



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

# ASPETTI MICROBIOLOGICI E FUNZIONALI DEL KEFIR D'ACQUA

TIPO TESI: Compilativa

Studente:  
VALENTINA LISTRANI

Relatore:  
DOTT.SSA VESNA MILANOVIĆ

*Vesna Milanovic*

Correlatori:  
DOTT.SSA CRISTIANA GAROFALO

*Cristiana Garofalo*

DOTT.SSA FEDERICA CARDINALI

*Federica Cardinali*

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

Alla mia famiglia.

# SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE .....	4
ELENCO DELLE FIGURE .....	5
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	6
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	7
CAPITOLO 1: ORIGINE E DISTRIBUZIONE DEL KEFIR D'ACQUA .....	9
CAPITOLO 2: MICROBIOTA DEL KEFIR D'ACQUA E DIFFERENZE CON IL KEFIR DI LATTE .....	11
CAPITOLO 3: DINAMICHE DI FERMENTAZIONE E INTERAZIONI MICROBICHE .....	21
CAPITOLO 4 : PRODUZIONE DEL KEFIR D'ACQUA .....	27
CAPITOLO 5: RESISTENZA E SICUREZZA DELLA FERMENTAZIONE DEL KEFIR D'ACQUA .....	29
CAPITOLO 6: BEVANDE ALTERNATIVE NON CASEARIE NEL MONDO.....	31
CAPITOLO 7: EFFETTI BENEFICI ALLA SALUTE .....	34
CONCLUSIONI .....	35
BIBLIOGRAFIA .....	36

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 2-1: Batteri lattici e lieviti nei grani di kefir d'acqua e le loro percentuali (Pidoux, 1989). .....	12
Tabella 2-2: Conta delle unità formanti colonie/g (UFC/g) dei tre grani di kefir d'acqua ottenuti su terreni di coltura diversi (Gulitz et al., 2011) .....	14
Tabella 2-3: Panoramica delle percentuali delle specie batteriche identificate in tre campioni di grani di kefir d'acqua (Gulitz et al., 2011) .....	15
Tabella 2-4: Microrganismi identificati nel kefir d'acqua e nel kefir di latte (Fiorda et al., 2017). .....	18

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 3-1: Attività metaboliche e microbiche durante la fermentazione del kefir d'acqua. *LAB, batteri lattici; AAB, batteri acetici (Fiorda et al., 2017).....	22
Figura 3-2: Differenza nella crescita dei lattobacilli isolati di kefir d'acqua in coltura singola e in co-coltura con lieviti in mezzo di kefir d'acqua (WKM). Le linee continue rappresentano la crescita in coltivazione singola di <i>Lb. hordei</i> (A) e <i>Lb. nagelli</i> (B), rispettivamente. Le linee tratteggiate mostrano la crescita di <i>Lb. hordei</i> (A) e <i>Lb. nagelli</i> (B) in co-coltivazione con <i>Z. florentina</i> , mentre le linee punteggiate mostrano la coltivazione con <i>S. cerevisiae</i> . (Stadie et al., 2013) .....	24
Figura 3-3: Differenza nella crescita dei lieviti isolati dal kefir d'acqua in coltura singola e in co-coltura con lattobacilli in mezzo di kefir d'acqua (WKM). Le linee continue rappresentano la crescita in coltivazione singola di <i>Z. florentina</i> (A) e <i>S. cerevisiae</i> (B), rispettivamente. Le linee tratteggiate mostrano la crescita di <i>Z. florentina</i> (A) e <i>S. cerevisiae</i> (B) in co-coltivazione con <i>Lb. hordei</i> , mentre le linee punteggiate la co-coltivazione con <i>Lb. nagelii</i> (Stadie et al., 2013). .....	25
Figura 3-4: Panoramica dell'interazione dei principali isolati di kefir d' acqua coltivabili rappresentativi. (Stadie et al., 2013).....	26
Figura 4-1: Diagramma di flusso del processo per la produzione di bevande di kefir d'acqua (Fiorda et al., 2017).....	28
Figura 6-1: Prodotti non caseari derivanti dalla fermentazione con i grani di kefir d'acqua (Fiorda et al., 2017).....	31

## ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

### *SIGLA*

EPS	Esopolisaccaridi
LAB	Batteri lattici
AAB	Batteri acetici
PDA	Potato Dextrose Agar
PCA	Plate Count Agar
PCR-DGGE	Polymerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
MRS	De Man Rogosa Sharpe agar
GM	<i>Gluconobacter</i> medium
YPG	Yeast Extract Peptone Glycerol agar
RAPD-PCR	Random Amplification of Polymorphic DNA - PCR
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
UFC	Unità Formanti Colonie
SCDM	Simplified Chemically Defined Medium

## INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

La fermentazione è uno dei metodi più antichi ed economici sfruttato dall'uomo sin dall'antichità per la trasformazione e la conservazione degli alimenti. È un processo che modifica profondamente le caratteristiche organolettiche della materia prima, conferendogli nuovi sapori e aromi riscontrabili nel prodotto finale. I prodotti fermentati sono ampiamente diffusi in tutto il mondo e presentano spesso dei forti legami con le tradizioni e la coltura di determinate aree geografiche. La fermentazione è un processo operato per lo più da batteri e lieviti, che grazie alle specifiche proprietà probiotiche permettono l'ottenimento di prodotti funzionali con effetti benefici sulla salute umana (Bottazzi, 1998).

La trasformazione del latte crudo in latte acido, mediante fermentazione lattica, rappresenta uno dei primi processi biotecnologici scoperti dall'uomo in ambito lattiero-caseario. Oggi, nel mondo esiste una vasta gamma di prodotti denominati "latte fermentati" che presentano proprietà specifiche legate all'esistenza di una propria microflora attiva e alla presenza di sostanze risultanti dal metabolismo di questi microrganismi, che gli attribuisce la connotazione dunque di alimento funzionale.

Per definizione "un alimento può essere considerato 'funzionale', se è sufficientemente dimostrata la sua influenza benefica su una o più funzioni del corpo, oltre ad effetti nutrizionali adeguati, tanto da risultare rilevante per uno stato di benessere e di salute o per la riduzione del rischio di una malattia" (Diplock et al., 1999 - British Journal of Nutrition). I cibi funzionali influenzano quindi positivamente una o più funzioni biologiche del corpo umano, migliorando lo stato di salute e riducendo il rischio legato all'insorgenza di specifiche patologie. Questa categoria di cibi include tutti i prodotti che contengono microrganismi probiotici definiti come "microrganismi vivi e vitali che se somministrati in quantità adeguate conferiscono un effetto benefico alla salute dell'ospite". Negli ultimi anni l'incremento della consapevolezza del consumatore e contestualmente l'aumento della diffusione di nuovi stili alimentari hanno spinto la comunità scientifica a sviluppare nuovi cibi funzionali. Lo yogurt in questo contesto è considerato il latte fermentato probiotico meglio conosciuto e consumato in tutto il mondo.

Il kefir tradizionale rappresenta un importante esempio di latte fermentato, diventato molto popolare nel XX secolo a seguito di svariati studi che ne valutarono le eccezionali proprietà

curative e benefiche sulla salute umana (Shavit, 2008). Questa bevanda originaria del Caucaso, in Asia centrale, il cui nome deriva dalla parola turca keyif che significa “sentirsi bene” (de Oliveira Leite et al., 2013) è conosciuta e consumata in molti paesi del mondo, ma le sue origini storiche non sono ancora state chiarite (Fiorda et al., 2017).

Negli ultimi anni, in relazione al crescente numero di soggetti intolleranti o allergici al lattosio e ai suoi derivati, l’interesse del mondo scientifico e dei consumatori è aumentato notevolmente nei confronti di prodotti fermentati probiotici non caseari.

In questo contesto trova dunque ampio interesse il kefir d’acqua, un prodotto artigianale tradizionale ottenuto dalla fermentazione dei grani di kefir di una soluzione di acqua e zucchero. I grani di kefir sono formati da migliaia di microrganismi, batteri e lieviti, che vivono in stretta associazione all’interno di una matrice polimerica. I microrganismi sono i responsabili dell’intero processo fermentativo alla base della produzione della bevanda. I meccanismi con cui avviene la fermentazione del kefir d’acqua risultano estremamente complessi in relazione alla elevata biodiversità microbica. La preparazione del kefir necessita dell’inoculo dei grani di kefir in un recipiente contenente acqua, zucchero con l’aggiunta di frutta e verdura. A seguito dell’inoculo avverrà la fermentazione che normalmente termina nel giro di qualche giorno. La bevanda che si ottiene avrà caratteristiche peculiari sia dal punto di vista chimico sia dal punto di vista organolettico.

Questo lavoro di Tesi si propone dunque di ricercare ed analizzare la bibliografia scientifica ad oggi disponibile al fine di evidenziare i diversi aspetti della produzione del kefir d’acqua, con particolare interesse agli aspetti microbiologici.

# Capitolo 1

## “ORIGINE E DISTRIBUZIONE DEL KEFIR D’ACQUA”

Con la denominazione “kefir” [nome che deriva dalla parola turca keyif che significa “sentirsi bene” (de Oliveira Leite et al., 2013)] si indica una bevanda fermentata simile allo yogurt, originaria della regione del Caucaso, in Asia centrale, dove viene consumata da oltre mille anni. Le particolari proprietà di questa bevanda – come ci suggerisce la stessa etimologia del nome – hanno un impatto positivo sul benessere dell’intero organismo.

In epoche più recenti il consumo di kefir è stato associato ad un ottimale stato di salute e per questo il suo consumo risulta parte integrante della dieta tradizione in molte aree geografiche. In Russia, ad esempio, ancora oggi viene somministrato negli ospedali e nelle mense scolastiche e prescritto dai medici per prevenire e curare disturbi gastrointestinali, metabolici e cardiovascolari (Prado et al., 2015).

La fermentazione di questa bevanda è indotta da piccole masse bianche e resistenti chiamate “grani di kefir”, le quali ospitano una popolazione microbica complessa, formata da batteri e lieviti.

I “grani di kefir” si presentano come una massa di forma irregolare, di consistenza gelatinosa e di colore bianco-giallastro, composta da granuli di grandezza variabile, dall’aspetto simile a piccole cime di cavolfiore. Per quanto riguarda il kefir, è possibile distinguere due componenti principali: la fase solida, rappresentata dai grani di kefir nei quali vivono miliardi di cellule microbiche; e la fase liquida, dalla quale i microrganismi traggono i composti necessari per avviare il processo di fermentazione (Pidoux, 1989).

Nella preparazione del kefir tradizionale veniva usato come mezzo per la fermentazione il latte vaccino o di altre specie animali (latte di capra o latte di pecora); mentre i granuli venivano tramandati da una generazione all’altra, o passati da famiglia in famiglia, così come facevano i nostri antenati con il lievito per la panificazione.

Oltre al latte, una fonte di zuccheri alternativa può essere rappresentata dal latte di soia, latte di cocco o banalmente da una soluzione di acqua e zucchero integrale. Quest’ultima possibilità consente il consumo del kefir anche a soggetti vegani, intolleranti e allergici ai latticini.

Il passaggio da fonti contenenti latticini ad altre contenenti solo zuccheri semplici come fruttosio e glucosio, modifica in parte l'aspetto visivo del substrato attivo rendendolo trasparente e mucillaginoso. Per distinguere questa bevanda dal tipico kefir di latte gli venne assegnato il nome di "kefir d'acqua" (Fiorda et al., 2017).

L'origine storica del kefir d'acqua rimane ancora poco chiara. Ci sono diversi rapporti scientifici che descrivono grani simili, il primo tra questi fu pubblicato da Beijerinck nel 1889 che metteva in relazione i grani di kefir con le piante di zenzero utilizzate per la produzione della birra, portate dai soldati inglesi dalla Crimea durante la guerra nel 1855. Più tardi, Lutz (1899) descrisse un sistema simile chiamato "tibi" originato dai frutti di fico d'india in Messico. Successivamente, in Francia, Vayssier (1978) attribuì al sistema l'appellativo di "grani di kefir d'acqua" per differenziarli dai grani di kefir di latte (Pidoux, 1989). Come dimostrano anche le diverse denominazioni conferitegli nel tempo, la provenienza del kefir d'acqua sembra essere policentrica (Waldherr et al., 2010). I grani di kefir d'acqua sono infatti noti come "tibicos" "cristalli d'acqua", "api californiane", "api africane" o "semi della birra giapponese" (Miguel et al., 2011). Si ritiene, inoltre, che i grani sono stati estratti dal cactus messicano (*Opuntia*). Sebbene il kefir sia una bevanda storicamente molto antica e diffusa in oriente, la sua distribuzione nel resto del mondo è relativamente recente. Attualmente, i paesi con il più alto consumo di kefir d'acqua o bevande simili sono gli Stati Uniti d'America, il Messico e il Canada in America del nord; Giappone, Thailandia e Malesia in Asia; Francia, Grecia, Portogallo, Turchia, Italia, Russia, Regno Unito, Paesi Bassi, Norvegia e Svezia in Europa; e infine, Brasile, Cile, Perù e Argentina in America Latina (De Oliveira Leite et al., 2013; Farnworth, 2005; Jianzhong et al., 2009; Sarkar, 2007).

## Capitolo 2

### “MICROBIOTA DEL KEFIR D’ACQUA E DIFFERENZE CON IL KEFIR DI LATTE”

Il kefir d’acqua è una bevanda leggermente acida e alcolica ottenuta dalla fermentazione di una soluzione zuccherina con i grani di kefir d’acqua costituiti da una comunità microbica composta da diverse specie batteriche (batteri lattici e batteri acetici) e fungine all’interno di una matrice polisaccaridica (Fiorda e al., 2017).

Il kefir d’acqua ed il kefir di latte, in termini merceologici, rientrano nella categoria degli alimenti fermentati, come anche il più comune yogurt. Se, per quanto riguarda lo yogurt, sono stati già definiti e consolidati i meccanismi, le interazioni e i rapporti tra le specie che portano alla sua formazione, riguardo al kefir d’acqua vi sono ancora pochi dati scientifici che lo chiariscono. Il kefir d’acqua viene realizzato a partire dalla fermentazione di una soluzione zuccherina da parte di decine di batteri lattici, batteri acetici e altre decine di lieviti, le cui popolazioni convivono simbioticamente all’interno di una matrice polimerica, composta principalmente da esopolisaccaridi (EPS). I grani del kefir d’acqua sono quindi simili ad un “biofilm”, che indica la complessità della popolazione microbica e il loro grado di associazione presente all’interno della matrice polimerica da essa stessa prodotta. Inoltre, l’alto contenuto di zuccheri e la bassa concentrazione di amminoacidi del kefir d’acqua sono fattori che contribuiscono a renderlo un habitat esigente dove solo i microrganismi ben adattati sono in grado di crescere e fornire reciprocamente i nutrienti essenziali. Di fatti, per comprendere il sinergismo che si instaura tra le principali specie di lieviti e batteri sono stati impiegati metodi avanzati di analisi.

In generale, la simbiosi fu definita come “la convivenza di organismi diversi” dal micologo tedesco Heinrich Anton de Bary e può esistere in tre categorie (mutualistica, commensalistica e parassitaria) distinte a seconda delle interazioni che si instaurano tra i microrganismi che ne fanno parte.

Il microbiota del kefir d’acqua gode della forma di mutualismo per cui i microrganismi coabitano armonicamente traendone un vantaggio reciproco senza che tale rapporto sia obbligato. La simbiosi è ampiamente diffusa negli alimenti fermentati ma i meccanismi con cui avviene non sono del tutto stati chiariti. Per comprendere a pieno le interazioni tra i microrganismi del

microbiota, è di fondamentale importanza provvedere ad una conoscenza più approfondita della sua composizione.

Pidoux, nel 1988, esaminò una bevanda a base di acqua e zucchero con fichi e limone, la cui fermentazione era indotta da grani di kefir diversi da quelli conosciuti per la fermentazione del kefir di latte, i quali si presentavano trasparenti, mucilluginosi e molto meno resistenti. I tibicos (grani di kefir d'acqua), provenienti dal cactus messicano, godevano di particolari proprietà che non erano ancora state completamente comprese dalla letteratura scientifica. L'obiettivo iniziale di Pidoux (1988) era di determinare la quantità di ciascun gruppo di microrganismi presente nei grani e di identificarne le specie principali responsabili della produzione di EPS. Attraverso l'osservazione dei grani al microscopio elettronico a scansione, era stato possibile identificare i microrganismi simili tra di loro dal punto di vista morfologico. Le conte vitali microbiche effettuate su terreni di coltura agarizzati risultavano più alte nei casi in cui le condizioni di incubazione (23-25°C) erano in linea con i parametri di crescita adatti ai microrganismi mesofili.

Da qui si evinse che i batteri lattici erano il gruppo microbico maggiormente presente nei grani di kefir d'acqua (Tabella 1).

**Tabella 2-1: Batteri lattici e lieviti nei grani di kefir d'acqua e le loro percentuali (Pidoux, 1989).**

Specie isolate su <b>PDA* (lieviti)</b>	Specie isolate su <b>PCA** + 1% latte (batteri lattici)</b>	<b>Percentuale di batteri lattici</b>
<i>Zygosaccharomices florentinus (Zygorulasporea florentina)</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	30%
<i>Torulasporea pretoriensis</i>	<i>Lactobacillus casei subsp. casei</i>	42%
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i>	<6%
<i>Candida lambica</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum</i>	<6%
<i>Candida valida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	28%
	<i>Streptococcus lactis</i>	<6%

		<i>Streptococcus cremoris</i>	<6%
Numero di colonie isolate per l'identificazione	11	18	
Numero dei differenti ceppi	5	7	

\* PDA, (Potato Dextrose Agar) terreno di coltura utilizzato per l'enumerazione dei lieviti; \*\*PCA, (Plate Count Agar) terreno di coltura utilizzato per l'enumerazione dei batteri lattici.

Dai dati ottenuti fu possibile definire come le specie *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* e *Lactobacillus casei* subsp. *rahamnosus* rappresentavano meno del 6% del microbiota. *Lactobacillus casei* subsp. *casei* era la specie predominante (42%), caratterizzata dalla possibilità di crescere ad alte concentrazioni di saccarosio, seguita da *Lactobacillus hilgardii* (30%), l'unica specie isolata in questo studio in grado di produrre un polisaccaride gelificante importante nella biosintesi dei grani. Infine, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* è stato identificato tra i batteri lattici con una percentuale del 28%.

I lieviti rappresentavano circa il 3% del microbiota. Dai grani di kefir d'acqua sono stati ottenuti solo undici isolati di lieviti, appartenenti a cinque specie diverse: *Zygosaccharomyces florentinus*, *Torulaspora pretoriensis*, *Kloeckera apiculata*, *Candida lambica*, *Candida valida*.

Magalhães et al. (2010) hanno studiato il microbiota del kefir d'acqua brasiliano utilizzando il metodo coltura indipendente PCR-DGGE (PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) che ha permesso di identificare le specie batteriche predominanti come *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus parabuchneri* e *Acetobacter lovaniensis*, e fungine come *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*. La tecnica PCR-DGGE ha consentito per la prima volta di rilevare le specie *Acetobacter lovaniensis* e *Kazachstania aerobia* nel kefir d'acqua.

In seguito, Gulitz et al. (2011), hanno analizzato il microbiota di tre diversi campioni di kefir d'acqua provenienti dalla Germania, utilizzando i metodi molecolari avanzati. I campioni di kefir d'acqua erano stati prelevati da diverse preparazioni domestiche tradizionali, ognuno dei quali è stato propagato in condizioni standardizzate per almeno due volte in modo da eliminare tutte le influenze derivanti dalle procedure di produzioni casalinghe. Il kefir d'acqua è stato preparato in una soluzione di saccarosio al 10% (100 g/l) utilizzando l'acqua di rubinetto contenente fichi secchi ed una fetta di limone che forniscono i nutrienti necessari per la propagazione dei grani di kefir. La fermentazione è avvenuta a 21°C per tre giorni, in seguito alla quale è stato scartato il

surnatante per il recupero dei grani. Questi ultimi sono stati filtrati e lavati accuratamente con acqua di rubinetto e sottoposti alle conte vitali usando MRS (de Man Rogosa Sharpe) agar per la crescita di lactobacilli; GM (*Gluconobacter* medium) agar per la crescita di *Gluconobacter* e YPG (Yeast Extract Peptone Glycerol) agar per la crescita di lieviti. Dopo l'incubazione, da ogni terreno sono state isolate e purificate diverse colonie di batteri e lieviti. Inoltre, i batteri isolati sono stati testati per la loro capacità di produrre EPS. Un numero totale di 453 isolati è stato identificato e tipizzato mediante il sequenziamento del gene 16S rRNA e RAPD PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction), rispettivamente. L'identificazione dei lieviti è avvenuta con metodo FTIR (Fourier Trasform Infrared Spectroscopy) o mediante sequenziamento parziale del gene 26S rRNA.

I risultati delle conte vitali sono riportati nella Tabella 2.

**Tabella 2-2: Conta delle unità formanti colonie/g (UFC/g) dei tre grani di kefir d'acqua ottenuti su terreni di coltura diversi (Gulitz et al., 2011)**

Terreno di coltura	Kefir d'acqua I	Kefir d'acqua II	Kefir d'acqua III
MRS*	1,6 x 10 <sup>8</sup>	1,3 x 10 <sup>8</sup>	1,3 x 10 <sup>8</sup>
GM**	3,7 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	5,6 x 10 <sup>8</sup>
YPG***	6,4 x 10 <sup>6</sup>	5,8 x 10 <sup>6</sup>	2,7 x 10 <sup>7</sup>

\*MRS (de Man, Rogosa and Sharpe agar), terreno di coltura utilizzato per la crescita dei batteri lattici; \*\*GM (*Gluconobacter* medium), terreno di coltura per la crescita dei presunti *Gluconobacter*; \*\*\*YPG (Yeast Extract–Peptone–Glycerol agar), terreno di coltura per la crescita dei lieviti.

Il numero delle Unità Formanti Colonie/g (UFC/g) nei tre campioni di kefir d'acqua variava da 1,2 x 10<sup>6</sup> a 5,6 x 10<sup>8</sup>. Sul terreno GM è stata rilevata una differenza significativa tra i campioni, mostrando una carica di presunti *Gluconobacter* più alta nei grani di kefir d'acqua III rispetto di quella dei campioni I e II. I risultati delle conte vitali di lieviti nei campioni I e II erano simili con valori pari a 6,4 x 10<sup>6</sup> e 5,6 x 10<sup>6</sup> UFC/g, rispettivamente, mentre il campione III era caratterizzato da una carica più alta (2,7 x 10<sup>7</sup> UFC/g).

I risultati del sequenziamento (Tabella 2-2) hanno mostrato che il microbiota di tre grani di kefir d'acqua era costituito principalmente da tre specie batteriche, *Lactobacillus hordei*, *Lactobacillus nagelli* e *Leuc. mesenteroides*, presenti nei singoli campioni con abbondanze diverse. *Lb. hordei* era la specie più abbondante (57,4%) nel campione I, seguita da *Lb. nagelii*, la specie predominante (39.9%) nel campione II, mentre nel campione III risultava essere

*Leuconostoc citreum*. Le specie rimanenti come *Lb. casei*, *Lb. hilgardii*, *Leuc. mesenteroides* e *Leuc. citreum* erano presenti in quantità irrilevanti.

**Tabella 2-3: Panoramica delle percentuali delle specie batteriche identificate in tre campioni di grani di kefir d'acqua (Gulitz et al., 2011)**

SPECIE	Kefir d'acqua I (%)	Kefir d'acqua II (%)	Kefir d'acqua III (%)
<i>Lb. casei</i>	7.9	7.0	/
<i>Lb. hilgardii</i>	2.6	/	/
<i>Lb. hordei</i>	57.4	25.2	11.2
<i>Lb. nagelii</i>	14.2	39.9	14
<i>Leuc. citreum</i>	/	/	24.3
<i>Leucc. mesenteroides</i>	14.7	18.1	28
<i>Ac. fabarum</i>	3.2	9.8	17.8
<i>Ac. orientalis</i>	/	/	4.7

La specie *Lb. hilgardii*, con un'importanza significativa sia dal punto di vista quantitativo che dal punto di vista metabolico in studi precedenti (Pidoux, 1988), era isolata ed identificata esclusivamente nel campione I con un'abbondanza relativamente bassa (2.6%).

Per quanto riguarda il contenuto di lieviti, sono state identificate quattro specie diverse, di cui *Hanseniaspora valbyensis*, *Lachancea fermentati*, *S. cerevisiae* e *Zygorulaspora florentina*. A differenza del gruppo dei batteri lattici, in questo caso le analisi hanno riportato risultati piuttosto uniformi tra i campioni osservati.

I risultati di Gulitz et al., (2011) su campioni di kefir d'acqua, confrontati con quelli relativi al lavoro di Franzetti et al. (1998) e di Pidoux (1988), dimostrano che la presenza di *Lb. casei* non risulta essere rilevante in termini di influenza metabolica sulle proprietà della bevanda risultante. Lo stesso discorso vale per *Lb. hilgardii* che sembra non essere indispensabile nella formazione e definizione delle caratteristiche organolettiche del prodotto finale. Secondo Pidoux et al. (1990) ci sono alcuni ceppi di *Lb. hilgardii* che sono stati descritti per avere un ruolo importante, insieme a *Lactobacillus brevis*, nella formazione dello strato di EPS, essenziale per la stabilità dei grani di kefir (Waldherr et al., 2010). Gulitz et al. (2011) ha trovato ceppi del genere *Leuconostoc* che hanno una funzione essenziale nella formazione di EPS, insieme a *Lb. nagelii*, *Lb. hordei*, ricoprendo il ruolo descritto per *Lb. hilgardii* in altri consorzi.

Tutte le specie di lievito osservate sono in grado di fermentare il glucosio, mostrando lo stesso metabolismo di base, ma solo *S. cerevisiae*, dotato dell'enzima invertasi, è capace di convertire il saccarosio in monosaccaridi, rendendo disponibile il glucosio come metabolita libero per essere utilizzato dalle altre cellule di lievito (Ikram-UI-Haq and Ali, 2007).

L'utilizzo di metodi molecolari avanzati come il sequenziamento del gene 16S rRNA e la genotipizzazione tramite RAPD ha giocato un ruolo fondamentale nell'identificazione delle specie isolate portando all'identificazione di nuove specie che forniscono una visione qualitativamente e quantitativamente più dettagliata del microbiota del kefir d'acqua.

Le differenze nel microbiota dei kefir d'acqua riportate nei diversi studi possono essere riferite, in una certa misura, all'utilizzo di diverse tecniche di identificazione. Infatti, Miguel et al. (2011) hanno analizzato i campioni di kefir d'acqua brasiliani mediante la tecnica coltura indipendente PCR-DGGE riportando la presenza di alcune specie batteriche (*Gluconobacter liquefaciens* e *Bacillus cereus*) e fungine (*Pichia cecembensis*, *Pichia caribbica* e *Zygosaccharomyces fermentati*) per la prima volta. Lo stesso metodo è stato utilizzato per lo studio del microbiota del kefir d'acqua thailandese mostrando una composizione microbica simile (*Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Gluconobacter japonicas*, *B. cereus*, *S. cerevisiae*, e *Candida ethanolica*) a quella identificata nelle bevande di altre parti del mondo (Sarikkha et al., 2015).

Gulitz et al. (2013) attraverso l'analisi metagenomica del gene 16S rRNA rivelò la presenza di bifidobatteri nei grani di kefir d'acqua, seguito da Laureys et al. (2016) che verificarono la presenza di questo gruppo di batteri in campioni di kefir d'acqua provenienti dal Belgio utilizzando i metodi coltura dipendenti.

Il filo conduttore tra il kefir tradizionale (kefir di latte) e il kefir d'acqua risiede nella loro denominazione merceologica, entrambi infatti sono alimenti probiotici. Questa definizione è attribuita al fatto che i microrganismi che costituiscono i grani di kefir sono generalmente microrganismi in grado di promuovere la salute ed il benessere nell'uomo. Il kefir è infatti conosciuto per essere un'ottima fonte di probiotici che sono preparati di cellule microbiche o componenti di cellule microbiche con un effetto benefico sulla salute dell'ospite (Lopitz et al., 2006).

Sia i grani di kefir di latte che i grani di kefir d'acqua fermentano la frazione di zuccheri presente nel mezzo. Tuttavia, si tratta di due colture differenti, non derivanti l'una dall'altra. La distinzione più immediata da fare risiede nel tipo di substrato che fermentano: il kefir di latte, come ci suggerisce la sua denominazione, è un prodotto lattiero-caseario, mentre il kefir d'acqua non deriva dal latte ma da una soluzione zuccherina. I grani di kefir di latte fermentano zuccheri come il lattosio, un disaccaride composto da glucosio e galattosio che costituisce, in maggior misura, la

parte glucidica del latte. I grani di kefir d'acqua, contrariamente, utilizzano zuccheri derivanti dalla frutta e saccarosio. I grani di kefir d'acqua sono abbastanza simili ai grani di kefir di latte in termini di struttura, microrganismi associati e prodotti derivanti dal processo di fermentazione. Ciò che li differenzia e caratterizza è la composizione e l'abbondanza delle specie microbiche nonché la concentrazione dei nutrienti che si ritrovano nel mezzo durante la fermentazione. Queste discrepanze hanno un effetto sulla granulazione e sulla crescita microbica dei grani (Hsieh et al., 2012). Negli ultimi 30 anni sono stati effettuati molteplici studi che lo confermano. Il kefir è costituito da un consorzio stabile composto principalmente da batteri lattici, batteri acetici e lieviti. Una descrizione completa delle diverse specie batteriche e fungine identificate fin ora nelle matrici di kefir di latte e kefir d'acqua è mostrata in Tabella 2-4.

Tabella 2-4: *Microrganismi identificati nel kefir d'acqua e nel kefir di latte (Fiorda et al., 2017).*

**Table 1**

Microorganisms isolated from sugary and milk kefir grains.

Microbial group	Genus	Sugary kefir	Milk kefir
Bacteria	<i>Acetobacter</i>	<i>A. fabarium</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. lovaniensis</i> .	<i>A. fabarium</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. lovaniensis</i> , <i>Acetobacter aceti</i> , <i>A. rasens</i> .
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>L. diolivorans</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. harbinensis</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. hordeii</i> , <i>L. kefiranoferiens</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. nagelli</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. parafarraginis</i> , <i>L. perolens</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. satsumensis</i> .	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>pseudoplatantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. kefiranoferiens</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. otakiensis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sake</i> , <i>L. sunkii</i> .
	<i>Leuconostoc</i>	<i>L. citreum</i> , <i>L. mesenteroides</i> .	<i>L. mesenteroides</i> .
	<i>Lactococcus</i>	nd.	<i>L. cremoris</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. raffinolactis</i> .
	<i>Pediococcus</i> <i>Streptococcus</i>	nd. nd.	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. dextrinicus</i> , <i>P. pentosaceus</i> . <i>S. durans</i> , <i>S. thermophilus</i> .
	Other species	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> , <i>Oenococcus kitaharae</i> , <i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> .	nd.
Yeast	<i>Candida</i>	nd.	<i>C. inconspicua</i> , <i>C. kefir</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lambica</i> , <i>C. maris</i> , <i>C. humilis</i> .
	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. turicensis</i> .
	<i>Pichia</i> <i>Lanchancea</i>	<i>P. membranifaciens</i> , <i>P. kudriavzevii</i> <i>L. fermentati</i> , <i>L. meyericii</i> .	<i>P. fermentans</i> . <i>L. meyericii</i> .
	<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i> .	<i>K. lactis</i> .
	<i>Kazachstania</i>	<i>K. aerobia</i> , <i>K. unispora</i> .	<i>K. unispora</i> , <i>K. servazzii</i> , <i>K. aerobia</i> , <i>K. solicola</i> .
	<i>Hanseniaspora</i>	<i>H. valbyensis</i> , <i>H. uvarum</i> .	<i>H. guillermondi</i> .
	Other species	<i>Zygorulasporea florentina</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Zygosaccharomyces fermentati</i> , <i>Dekkera bruxellensis</i> .	<i>Cryptococcus humicolus</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Zygosaccharomyces fermentati</i> .

Come mostrato nella Tabella 2-4, entrambi i grani sono caratterizzati da una grande varietà di microrganismi. L'identificazione del microbiota presente nel kefir e nei suoi grani è importante poiché è direttamente correlato alla qualità del prodotto probiotico finale. La composizione microbica del kefir tradizionale comprende circa  $10^8$  UFC/mL di batteri del genere *Lactobacillus*,  $10^5$  UFC/mL di batteri del genere *Lactococcus* e  $10^6$  UFC/mL di batteri acetici e lieviti. La composizione microbica dei grani mostra l'abbondanza relativa di batteri del genere *Lactobacillus* e *Lactococcus* dal 65 all'80%, mentre la percentuale rimanente è occupata da lieviti (Rosa et al., 2017). È stato osservato che i grani di kefir di latte mostrano una carica di batteri lattici circa un logaritmo superiore rispetto ai grani del kefir d'acqua. Sebbene il contenuto di batteri lattici sia inferiore nei grani di kefir d'acqua, questi ultimi vantano di una elevata quantità di batteri del genere *Lactococcus* (Murat et al., 2019).

I batteri maggiormente presenti nel kefir di latte sono batteri lattici del genere *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. A livello di specie, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lb. casei* subsp. *pseudopantarum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefir* e *Lactobacillus brevis* rappresentano tra il 37 e il 90% dell'intera comunità microbica. Altri generi presenti in minore quantità sono *Acetobacter* e *Bifidobacterium*, relativamente più presenti nel kefir d'acqua, in quanto il metabolismo dei batteri acetici è più attivo nelle matrici zuccherine, in quanto utilizzano l'etanolo per la loro crescita.

Il numero esatto di specie batteriche presenti nel kefir varia a seconda delle tecniche di analisi utilizzate. L'analisi del gene 16S rRNA ha dimostrato la presenza di un numero variabile da 24 a 56 differenti specie nei grani di kefir d'acqua e da 22 a 61 nei grani di kefir di latte, il numero molto più alto di quanto osservato utilizzando tecniche coltura-dipendenti (Fiorda et al., 2017). Le proporzioni tra queste specie variano a seconda della provenienza dei grani esaminati, ma anche a seconda che si identificano le specie presenti nei grani o quelle presenti nella bevanda ottenuta. Ad esempio, le specie *Lb. lactis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus* sono generalmente molto più abbondanti nel kefir che nei grani di kefir. In generale, secondo gli studi più significativi, i grani di kefir contengono un solo genere (*Lactobacillus*) o al massimo due generi (*Lactobacillus* e *Acetobacter*) dominanti, mentre gli altri generi rappresentano meno del 10% del microbiota. La bevanda ottenuta (kefir) dagli stessi grani mostra invece una relativa abbondanza e varietà di generi, diversi da quelli dominanti nei grani, come *Leuconostoc* e *Lactococcus*, e solo in seguito *Lactobacillus* e *Acetobacter* (Burrie et al., 2016).

Oltre alla popolazione batterica troviamo anche numerosi lieviti. I generi maggiormente presenti sia nei grani che nel kefir di latte, sono *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Candida*.

Durante il processo di fermentazione le proporzioni di queste specie cambiano, i lieviti del genere *Saccharomyces* non fermentando il lattosio non si riproducono in maniera proporzionale ai lieviti che fermentano direttamente il lattosio che contrariamente aumentano di numero e si distribuiscono in maniera analoga tra i grani ed il kefir. Nel kefir d'acqua accade esattamente l'opposto. Essendo un substrato ad alto contenuto di saccarosio, esso stimola maggiormente la crescita di lieviti del genere *Saccharomyces* (Fiorda et al., 2017).

Mettendo in relazione la ricchezza delle specie di lieviti presenti nel kefir d'acqua con quelle del kefir di latte si evince che, oltre ad essere un gruppo estremamente diversificato, la loro presenza dipende anche dalla fonte di carbonio e dalla disponibilità della fonte energetica nel substrato durante la fermentazione. Come detto sopra, l'alto contenuto di saccarosio nelle matrici zuccherine da cui nasce il kefir d'acqua, stimola la crescita delle specie del genere *Saccharomyces* ed altre specie di lieviti come quelli del genere *Hanseniaspora*, *Pichia* e *Lachancea*, i quali risultano generalmente dominanti nella prima fase della fermentazione, prima che *S. cerevisiae* prenda il sopravvento. La presenza di lieviti appartenenti ai generi *Hanseniaspora*, *Pichia* e *Lachancea* contribuisce al potenziamento delle qualità sensoriali delle bevande probiotiche promuovendone un aroma forte e tipicamente rinfrescante e pungente (Magalhaes et al., 2010).

## Capitolo 3

### “DINAMICHE DI FERMENTAZIONE E INTERAZIONI MICROBICHE”

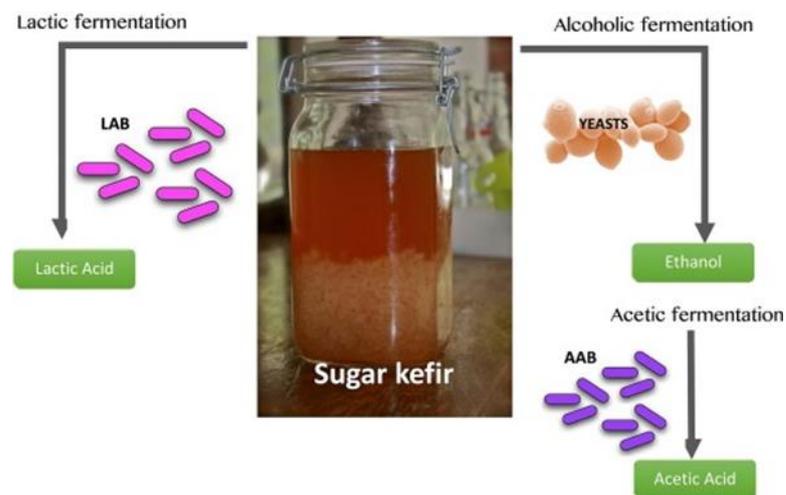
Il kefir d'acqua è una bevanda fermentata ottenuta aggiungendo i grani di kefir d'acqua ad una soluzione zuccherina (8%, p/v) nella quale può essere inserita una piccola quantità di frutta o verdura. Solitamente, questa miscela viene fermentata a temperatura ambiente in condizioni anaerobiche, per un periodo che varia da due a quattro giorni, in seguito ai quali viene filtrata per separare i grani dalla bevanda ottenuta che risulta leggermente dolce, acida, alcolica e frizzante con un colore giallastro ed un aroma fruttato (Laureys et al., 2018).

Il recipiente in cui si effettua la fermentazione viene solitamente protetto dall'atmosfera circostante per impedire l'ingresso di ossigeno e allo stesso tempo rendere possibile la fuoriuscita dell'anidride carbonica che si forma durante la fermentazione, prevenendo un eccessivo accumulo di pressione nel recipiente. L'ossigeno che rimane nel recipiente viene utilizzato in parte per la fase di avviamento della fermentazione fino al suo completo consumo, passando così ad un ambiente completamente anaerobico. L'ossigeno può essere influente sulla crescita e sul metabolismo dei microrganismi con un conseguente impatto sulla diversità microbica e la produzione dei metaboliti durante il processo (Laureys et al., 2018). Comunemente si utilizza acqua minerale naturale, un mezzo contenente ioni di calcio e composti necessari per la crescita ottimale dei grani di kefir d'acqua. Altri nutrienti necessari alla fermentazione, come amminoacidi, vitamine e minerali sono forniti dai frutti aggiunti alla miscela di fermentazione. Sebbene i frutti siano ricchi di nutrienti, la quantità aggiunta risulta relativamente scarsa, ciò rende il mezzo di fermentazione povero di nutrienti. Poiché i frutti sono una fonte importante di nutrienti durante la fermentazione, la quantità e il tipo di frutti utilizzati hanno un forte impatto sulla qualità finale del prodotto. È stato dimostrato che la presenza di ossigeno, la concentrazione e la fonte di nutrienti influenza la crescita dei grani di kefir d'acqua, il loro microbiota, e la produzione di metaboliti durante la fermentazione (Laureys et al., 2018).

Il saccarosio è il principale substrato per i microrganismi del kefir d'acqua e viene convertito dal loro metabolismo in etanolo, anidride carbonica, acido lattico, glicerolo, acido

acetico, mannitolo ed una varietà di composti aromatici. All'inizio della fermentazione il substrato occupa circa l'80% del volume totale, ed è formato da circa il 90% di saccarosio, 6% di zuccheri riduttori e da una piccola percentuale di minerali, come il potassio, il calcio, il fosforo, il magnesio, il sodio, il ferro, il manganese, lo zinco ed il rame (Guerra and Mujica, 2010). Un terreno così composto è considerato idoneo per la crescita microbica che è strettamente correlata con l'aumento della biomassa dei grani di kefir.

In Figura 3-1 sono mostrate le principali attività metaboliche svolte dai vari gruppi microbici durante la fermentazione del kefir d'acqua.



**Figura 3-1: Attività metaboliche e microbiche durante la fermentazione del kefir d'acqua. \*LAB, batteri lattici; AAB, batteri acetici (Fiorda et al., 2017).**

L'attività metabolica dei lieviti promuove la crescita dei batteri lattici ed acetici. L'idrolisi del saccarosio è indotta dall'attività dell'enzima invertasi, che viene prodotto principalmente dai lieviti del genere *Saccharomyces*. Questo enzima determina un aumento dei livelli di glucosio e fruttosio, rendendoli disponibili come fonte di carbonio per gli altri lieviti e batteri lattici. Inoltre, l'etanolo prodotto durante la fermentazione viene in parte utilizzato dai batteri acetici mediante attivazione del metabolismo dell'acido acetico (Malgalhaes et al., 2010). Durante la fermentazione è importante mantenere le condizioni di anaerobiosi per prevenire la proliferazione eccessiva dei batteri acetici che porterebbe ad una massiccia produzione di acido acetico e un abbassamento del pH. Nel corso della fermentazione, le conte vitali di batteri acetici variano in relazione alla fase in cui si trovano, la loro attività metabolica aumenta rapidamente alla fine del processo fermentativo in quanto i livelli di etanolo aumentano nel substrato (Moens et al., 2014).

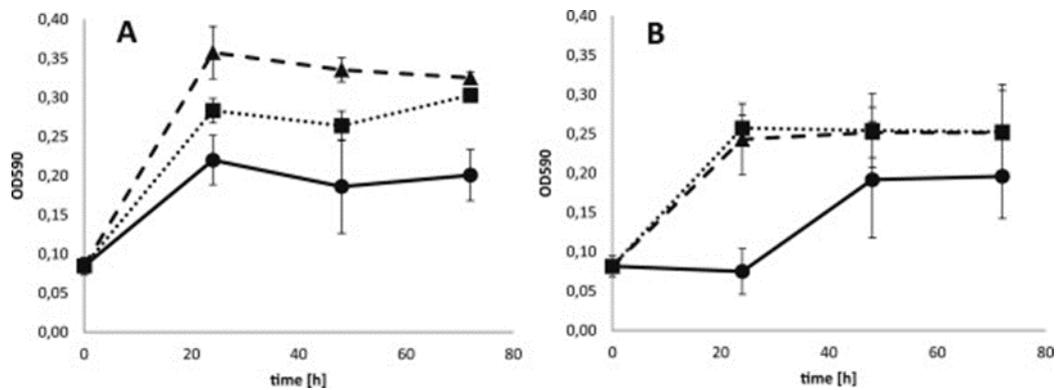
Durante la fermentazione del kefir d'acqua sono state osservate diverse forme di interazioni microbiche. Fiorda et al. (2016) hanno riportato che colture singole isolate dai grani di kefir non crescono in soluzione zuccherina o hanno una ridotta attività biochimica, questa scoperta complica ulteriormente lo studio delle interazioni microbiche durante la fermentazione del kefir. La fonte e la concentrazione dei nutrienti possono condizionare significativamente le interazioni tra microrganismi influenzando così direttamente la produzione dei composti aromatici e il sapore del prodotto finale (Laureys et al., 2018). Potrebbero verificarsi anche interazioni microbiche che conosciamo essere caratteristiche di altri processi fermentativi, come quello del vino e del lievito naturale, dove è stato osservato un meccanismo di morte e autolisi delle cellule di lievito che rilasciano nutrienti utilizzabili da parte dei batteri lattici per la loro crescita. Inoltre, possono avvenire interazioni lievito-lievito legate alle loro differenze metaboliche e la sensibilità ai fattori killer; le interazioni cellula-cellula (quorum sensing), o infine, possono avvenire anche una serie di interazione tra lieviti e batteri, come ad esempio la capacità di alcuni batteri lattici di produrre le sostanze che inibiscono la crescita dei lieviti durante la fermentazione del vino. Le tipologie di interazioni sopraelencate probabilmente si verificano anche durante la fermentazione del kefir d'acqua, influenzando la produzione di sostanze aromatiche di forte impatto sulle caratteristiche organolettiche e sensoriali del prodotto finale (Laureys et al., 2018).

Stadie et al., (2013) definirono alcune delle interazioni microbiche osservate durante la fermentazione, classificandole come interazioni fisiche. In particolare, le interazioni fisiche si basano sulla produzione di molecole segnale speciali (quorum sensing) e/o su associazioni simbiotiche con fattori di adesione come proteine e polisaccaridi (biofilm). Queste associazioni possono essere basate su differenti interazioni molecolari che dipendono dalle modificazioni dell'ambiente circostante come variazione del pH, interazioni trofiche, scambio di metaboliti, secrezioni proteiche e trasferimento genico.

Leroi e Pidoux (1993a) hanno determinato per primi il sinergismo tra le specie *Lb. hilgardii* e *Z. florentina* isolate da grani di kefir d'acqua ed analizzate in coltura mista. Dallo studio è emersa l'insorgenza di una simbiosi parassitaria nella quale *Lb. hilgardii* trae beneficio a spese di *Z. florentina*.

Stadie et al. (2013) hanno condotto uno studio al fine di investigare ulteriormente sulla natura delle interazioni simbiotiche che si stabiliscono durante la fermentazione del kefir d'acqua. Lo studio, basato su un sistema modello in co-coltura, ha previsto lo studio di batteri lattici e i lieviti predominanti quali *Lb. hordei*, *Lb. nagelii*, *Z. florentina* e *S. cerevisiae* (Gulitz et al., 2011).

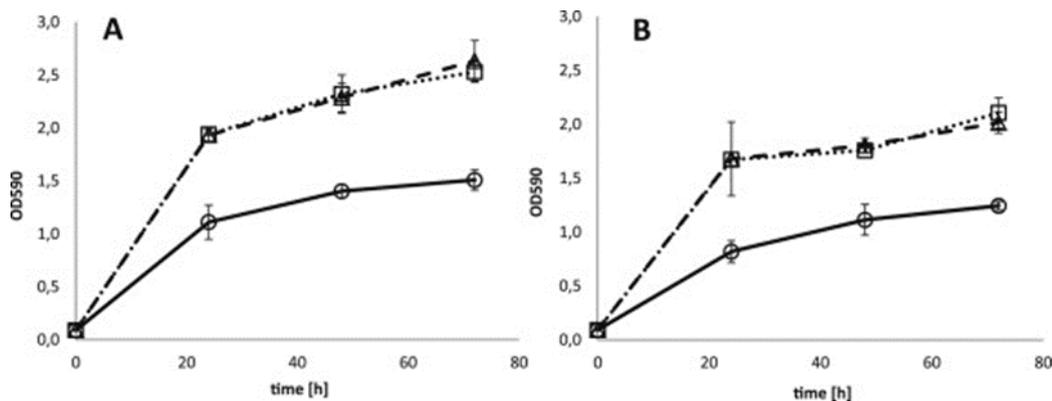
Lo studio ha evidenziato un miglioramento della crescita degli organismi in co-coltivazione rispetto alle colture pure come mostrato in Figura 3-2.



**Figura 3-2: Differenza nella crescita dei lattobacilli isolati di kefir d'acqua in coltura singola e in co-cultura con lieviti in mezzo di kefir d'acqua (WKM). Le linee continue rappresentano la crescita in coltivazione singola di *Lb. hordei* (A) e *Lb. nagelli* (B), rispettivamente. Le linee tratteggiate mostrano la crescita di *Lb. hordei* (A) e *LB. nagelli* (B) in co-coltivazione con *Z. florentina*, mentre le linee punteggiate mostrano la coltivazione con *S. cerevisiae* (Stadie et al., 2013)**

I lattobacilli crescono in maniera significativa in co-cultura con entrambi i lieviti. In particolare, *Lb. hordei* in co-coltivazione con *Z. florentina* ha mostrato un miglioramento significativo della crescita rispetto alla co-cultura con *S. cerevisiae*, mentre *Lb. nagelii* ha manifestato un incremento della fase esponenziale con entrambi i lieviti (Figura 3-2).

I lieviti mostrano velocità di crescita diversificate (Figura 3-3) in relazione alle caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente di crescita. In particolare, la crescita della specie *Z. florentina* si è influenzata dall'ambiente fisico-chimico. La crescita di chi???? è stata osservata a diversi valori di pH iniziali ed il pH ottimale è risultato essere di 4, mentre per *S. cerevisiae* la variazione del pH non ha condizionato il suo sviluppo.



**Figura 3-3: Differenza nella crescita dei lieviti isolati dal kefir d'acqua in coltura singola e in co-cultura con lattobacilli in mezzo di kefir d'acqua (WKM). Le linee continue rappresentano la crescita in coltivazione singola di *Z. florentina* (A) e *S. cerevisiae* (B), rispettivamente. Le linee tratteggiate mostrano la crescita di *Z. florentina* (A) e *S. cerevisiae* (B) in co-coltivazione con *Lb. hordei*, mentre le linee punteggiate la co-coltivazione con *Lb. nagelii* (Stadie et al., 2013)**

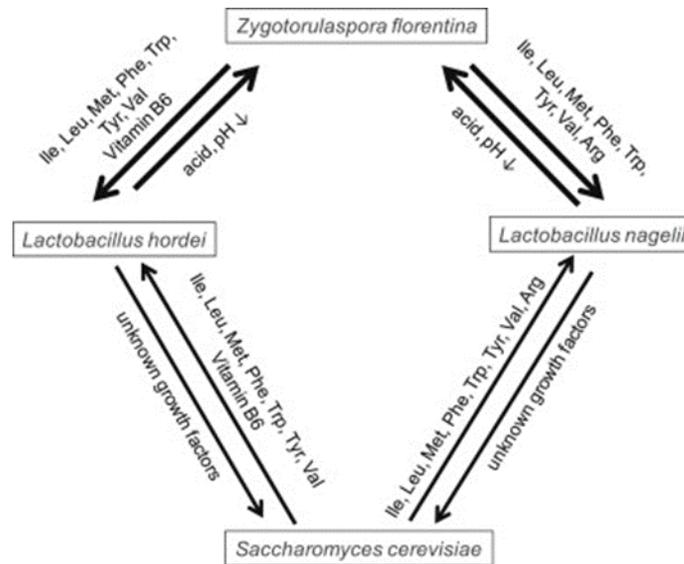
Nello studio di Gulitz et al. (2013) è stata inoltre valutata la crescita di *Lb. hordeii*, *Lb. nagelii*, *Z. florentina* e *S. cerevisiae* su terreno di coltura Simplified Chemically Defined Medium.

I lattobacilli hanno mostrato auxotrofia per sette amminoacidi essenziali quali L-leucina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-tirosina e L-valina. Nello specifico, *Lb. hordei* non è in grado di sintetizzare il piridossale (precursore della vitamina B6) mentre *Lb. nagelii* manca della capacità di sintesi dell'arginina. Al fine di comprendere il ruolo dei lieviti nella crescita di specifiche specie batteriche, è stato osservato il loro sviluppo in tre differenti terreni di coltura chimicamente definiti (SCDM):

- ✓  terreno privo di piridossale (SCDM – VitB6) specifico per comprendere le interazioni tra lieviti e *Lb. hordei*;
- ✓  terreno privo di arginina (SCDM – Arg) per osservare la crescita di *Lb. nagelii*;
- ✓  terreno privo di tutti i sette amminoacidi essenziali (SCDM – 7AS) specifico per valutare la crescita dei lattobacilli.

*Lb. hordei* e *Lb. nagelii* hanno registrato una crescita migliore in presenza della specie *Z. florentina* rispetto a *S. cerevisiae*, eccetto nel terreno SCDM – 7AS dove non è stato possibile rilevare alcuna interazione.

*Lb. hordei* in co-cultura con *Z. florentina* su SCDM – Arg, ha mostrato il tasso di crescita più elevato. Ulteriori test hanno però dimostrato l’incapacità di *Z. florentina* di produrre direttamente arginina ma bensì la capacità di secernere macromolecole dalle quali i lattobacilli possono poi ricavare l’amminoacido stesso.



**Figura 3-4: Panoramica dell'interazione dei principali isolati di kefir d'acqua coltivabili rappresentativi (Stadie et al., 2013).**

La figura 3-4 rappresenta una prima panoramica delle interazioni metaboliche rivelate dai principali isolati dei grani di kefir d’acqua in co-cultura. L’immagine schematizza in maniera lineare i legami tra *Z. florentina*, *S. cerevisiae*, *Lb. hordei* e *Lb. nagelii*.

*Z. florentina* è rappresentata in posizione ravvicinata rispetto ai due lattobacilli in quanto mostra maggiori interazioni molecolari rispetto a *S. cerevisiae*. L’attività metabolica di *Lb. hodei* e *Lb. nagelii* abbassano il pH del mezzo rendendolo ideale allo sviluppo dei lieviti, mentre *Z. florentina* e *S. cerevisiae* forniscono i nutrienti essenziali alla crescita dei batteri quali amminoacidi e vitamina B6.

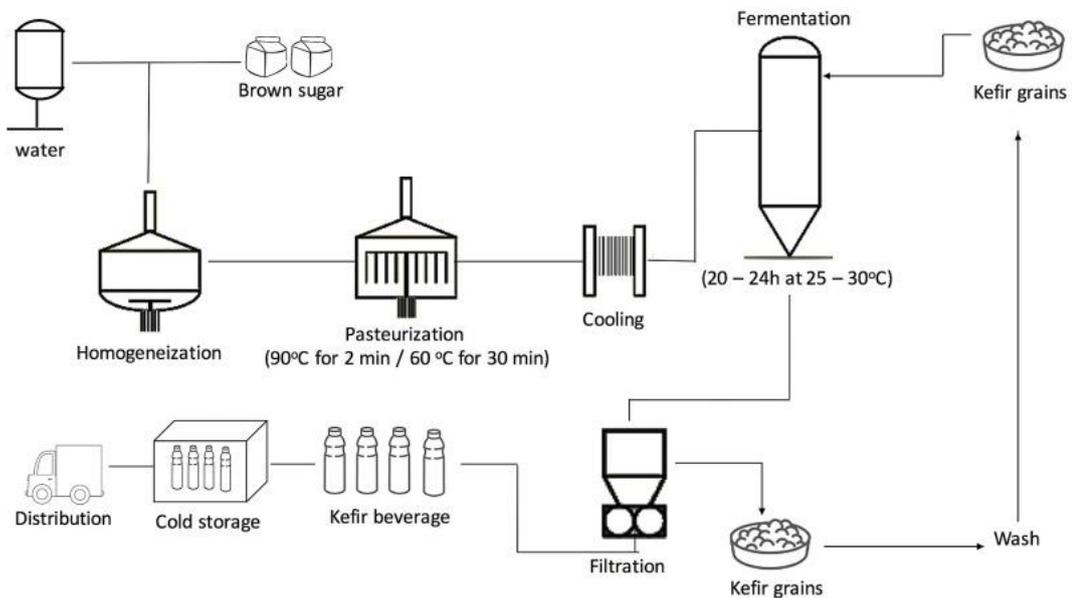
Le interazioni che si instaurano tra i lattobacilli e il lievito *S. cerevisiae* rimangono ancora sconosciute, nonostante quest’ultimo in co-cultura ha mostrato un miglioramento della crescita. Questo può essere spiegato dal fatto che il consorzio del kefir d’acqua contiene ulteriori specie microbiche, come i bifidobatteri, e prevede dunque l’instaurarsi di interazioni complesse di cui non si conosce ancora la natura stessa (Gulitz et al., 2013).

## Capitolo 4: “PRODUZIONE DEL KEFIR D’ACQUA”

Attualmente il kefir d’acqua è una bevanda tradizionalmente ottenuta nella produzione domestica in tutto il mondo per la quale non è stato stabilito un processo industriale. Per raggiungere un processo totalmente industrializzato, tuttavia, sono necessari ulteriori studi, soprattutto correlati alla progettazione di apparecchiature utilizzabili su larga scala. Le maggiori problematiche, in riferimento alla produzione su larga scala, sono legate alle possibili contaminazioni dei grani di kefir utilizzati per la fermentazione e le bevande ottenute. Affinché ciò non avvenga è importante stabilire metodi utili per stabilizzare la crescita microbica e garantire la presenza degli stessi gruppi microbici, anche quantitativamente, in lotti differenti.

Il processo di fermentazione dello yogurt su scala industriale può essere una base solida per la produzione industriale del kefir. Infatti, originariamente anche lo yogurt era un prodotto legato strettamente alle tradizioni casalinghe. Le comunità scientifiche hanno successivamente selezionato ceppi batterici idonei per essere utilizzati come colture starter, mentre le fasi di produzione sono state ottimizzate nel corso degli anni fino ad ottenere un processo standard e sicuro dal punto di vista microbiologico, funzionale e nutrizionale. Inoltre, è stata data maggior attenzione alla qualità delle materie prime. Ai tempi di oggi, lo yogurt viene principalmente prodotto a livello industriale sostituendo fundamentalmente tutte le produzioni casalinghe. L’industrializzazione dei processi di fermentazione ci ha permesso di monitorare al meglio ogni fase di produzione (trasporto, trasformazione e confezionamento) portando allo sviluppo di processi moderni ed altamente efficienti.

Il diagramma di flusso rappresentato in Figura 4-1 è stato disegnato come guida base per un ipotetico processo di produzione di kefir a livello industriale (Fiorda et al., 2017). In questo processo i grani di kefir vengono aggiunti in misura del 10% (p/v) direttamente al substrato precedentemente pastorizzato e raffreddato, e incubati per almeno 24 ore ad una temperatura di circa 25-30°C. Al termine della fermentazione, i grani vengono rimossi, in condizioni di sterilità, dal mezzo mediante filtrazione. Successivamente, i grani vengono lavati ed essiccati a temperatura ambiente e conservati in una vasca di raffreddamento per il successivo inoculo (Guzel-Seydim et al., 2000; Otles e Cagindi, 2003).



**Figura 4-1: Diagramma di flusso del processo per la produzione di bevande di kefir d'acqua (Fiorda et al., 2017).**

Il kefir d'acqua, pronto per il consumo, viene mantenuto ad una temperatura di refrigerazione, intorno ai 4°C, fino ad un massimo di venti giorni.

Gli unici processi alternativi ad oggi conosciuti per la preparazione del kefir d'acqua su scala industriale sono le colture starter di batteri lattici e lieviti liofilizzate, che sono state isolate durante la fermentazione del kefir.

## Capitolo 5

### “RESISTENZA E SICUREZZA DELLA FERMENTAZIONE DEL KEFIR D’ACQUA”

Il microbiota dei grani di kefir d’acqua è protetto dalla matrice polisaccaridica che determina una maggiore resistenza dei microrganismi a stress fisici e chimici rispetto ai microrganismi che crescono singolarmente. Di fatti, i microrganismi che popolano i grani di kefir hanno una forte resistenza alle radiazioni ultraviolette (UV), agli antibiotici e al trattamento con i gas (es. ozono).

Nella produzione di alimenti fermentati, per garantire la sicurezza, è di fondamentale importanza avere un controllo assoluto del processo. Un fattore che gioca un ruolo fondamentale a nostro favore è la complessità del microbiota e le interazioni tra batteri lattici e lieviti che assicurano che il processo di fermentazione sia privo di microrganismi patogeni (Koutinas et al., 2005). Tuttavia, operazioni dipendenti esclusivamente dall’uomo come l’eccessivo lavaggio dei grani dopo la fermentazione e la manipolazione impropria degli stessi potrebbero apportare alterazioni del microbiota, e di conseguenza modifiche non volute della qualità del prodotto finito. Ad esempio, la contaminazione dei grani di kefir da parte di *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Micrococcus* e di muffe contribuiscono al deterioramento della bevanda ottenuta dopo la fermentazione. Inoltre, anche altri fattori, come il basso livello di inoculo di grani di kefir oppure alte concentrazioni di zucchero potrebbero favorire la crescita di batteri patogeni, con i quali i microrganismi utili si troverebbero in competizione. Nonostante la subcoltura dei grani di kefir d’acqua consente di ottenere prodotti di buona qualità, i prodotti sono suscettibili alla contaminazione. In uno studio precedente, Garrote et al. (1997) hanno dimostrato che la conservazione dei grani a basse temperature (circa -80°C) è un’ottima alternativa alle subculture. I grani conservati in queste condizioni hanno mantenuto ed addirittura aumentato il loro peso ad una velocità paragonabile a quella riscontrata nei grani freschi. Il tasso di crescita mostrato ha rivelato che i microrganismi sono attivi e stimolati a produrre componenti della matrice. Inoltre, i grani di kefir d’acqua conservati in queste condizioni hanno mostrato di rispettare tutti i parametri necessari per la valutazione positiva di un metodo di conservazione come il mantenimento di tutte le specie

del microbiota e le loro relative abbondanze, le proprietà reologiche, l'acidità ed il contenuto di anidride carbonica.

## Capitolo 6

### “BEVANDE ALTERNATIVE NON CASEARIE NEL MONDO”

In relazione ai numerosi effetti positivi del kefir sulla salute umana, sono stati usati substrati alternativi, non caseari, per testare l'efficienza e la stabilità dei grani di kefir d'acqua. I substrati (frutta, verdura, melasse) finora testati sono mostrati nella Figura 6-1.

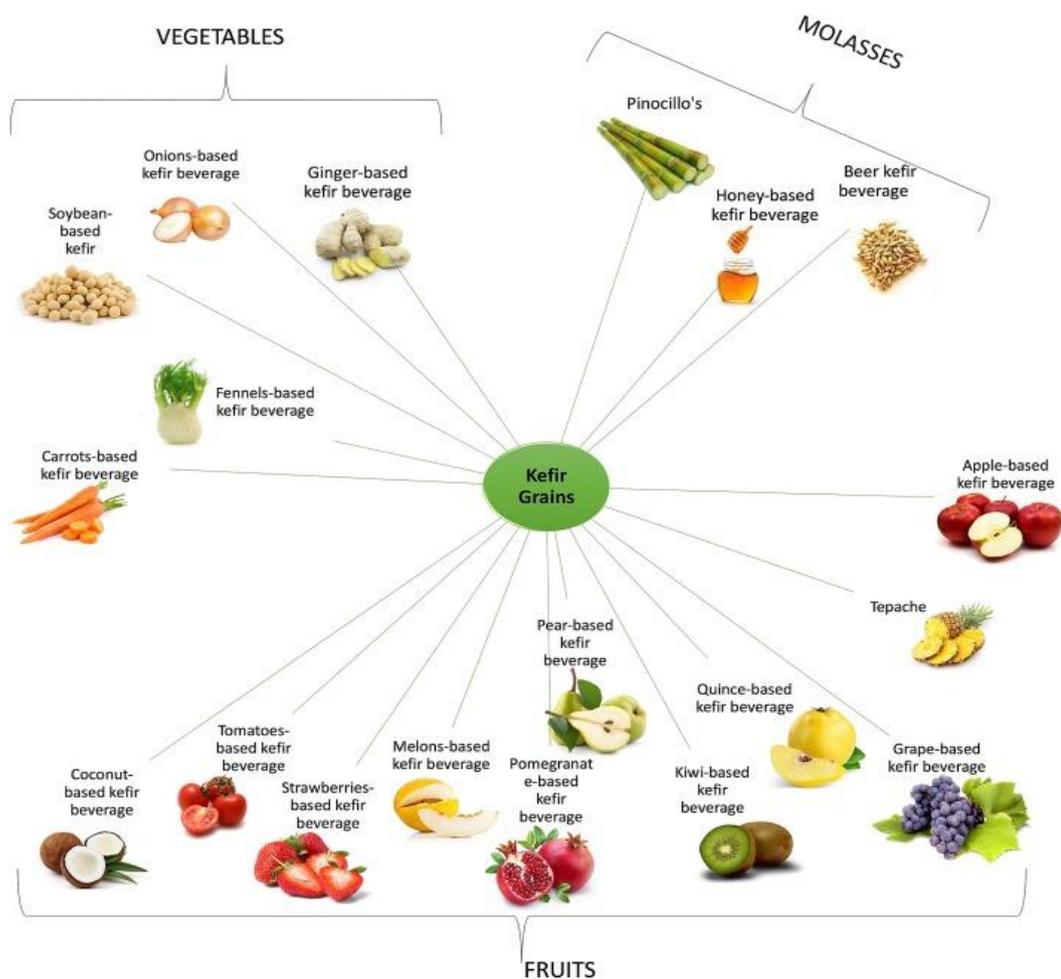


Figura 6-1: Prodotti non caseari derivanti dalla fermentazione con i grani di kefir d'acqua (Fiorda et al., 2017)

Come mostrato nella Figura 6-1, i frutti rappresentano il gruppo di substrati alternativi maggiormente utilizzato per la fermentazione. Finora sono stati testati frutti tradizionali come mele, pere, fragole e uva, oltre a frutti specifici per determinate regioni geografiche (melograni e mele cotogne), consentendo la produzione di bevande innovative, funzionali e probiotiche con caratteristiche simili al tradizionale kefir d'acqua (Gronnevik et al., 2011; Miguel et al., 2011). Alcune di queste bevande sono ampiamente consumate, come ad esempio la “tapache” che si ottiene dalla fermentazione di succo di ananas, cannella e zucchero di canna con dei grani di kefir d'acqua. La “tapache” è una bevanda estremamente diffusa nei paesi dell'America latina (Fuente-Salcido et al., 2015) come ad esempio in Messico dove è possibile acquistarla in piccoli chioschi chiamati “tepacherias” o da venditori ambulanti (Moreno-Terrazas et al., 2001).

Il kefir d'uva, piuttosto diffuso nel sud Italia, deriva dalla fermentazione dei grani di kefir con acqua, zucchero ed uva (Gaware et al., 2011). Questi prodotti hanno un gusto particolarmente acido e sono molto rinfrescanti, leggermente frizzanti, con bassa percentuale di alcol e acido acetico.

Come mostrato nella Figura 6-1, sono state prodotte anche bevande a base di verdure come carota, zenzero, finocchio e cipolla. La birra allo zenzero è una bevanda derivante dalla fermentazione del kefir allo zenzero. Il processo di fermentazione di questa bevanda avviene molto lentamente in quanto i grani fermentano lo zenzero, producendo una quantità di etanolo elevata. È molto conosciuta in molte zone della Grecia dove viene prodotta come specialità tipica locale (Daker e Stacey, 1938; Ward, 1892). Ai giorni d'oggi è ampiamente diffusa anche in Africa orientale, in particolare in Tanzania ed in Kenya dove si chiama “Tangawizi”.

La melassa è un ulteriore substrato utilizzato per la produzione di nuove bevande funzionali. Tradizionalmente, nei paesi dell' America latina i grani di kefir d'acqua vengono aggiunti alla panela, un preparato alimentare ottenuto dal succo della canna da zucchero (il cosiddetto “guarapo”), sottoposto ad ebollizione a temperature elevate ed evaporazione da dove se ne ricava una melassa viscosa che viene poi versata in piccoli stampi (generalmente rettangolari, ma talvolta anche tondeggianti) in cui la si lascia essiccare (Rubio et al., 1993). Negli ultimi anni, anche il miele viene utilizzato come substrato di fermentazione dei grani di kefir ottenendo una bevanda con alti valori nutrizionali e proprietà funzionali, come ad esempio la protezione del DNA da possibili danni ossidativi (Fiorda et al., 2016a; Fiorda et al., 2016b).

Diversi studi sono stati portati avanti sulla composizione chimica e sulla qualità organolettica e sensoriale delle diverse bevande non casearie a base di kefir d'acqua (Puerari

et al., 2012; Fiorda et al., 2016a; Corona et al., 2016; Randazzo et al., 2016). Nonostante tali caratteristiche subiscono delle variazioni a seconda del substrato utilizzato nella produzione della bevanda, si osserva generalmente una complessa composizione chimica del prodotto trasformato, che include zuccheri (saccarosio, glucosio e fruttosio), acidi organici (lattico, acetico, citrico, tartarico, butirrico, malico e propionico), alcoli (etanolo, esanolo e glicerolo) ed esteri (etil propionato, etile esanoato, ottanoato e decanoato). I prodotti analizzati e le loro caratteristiche hanno mostrato una buona accettazione da parte dei consumatori (Puerari et al., 2012; Fiorda et al., 2016a; Corona et al., 2016). Le caratteristiche sensoriali tipiche di questi prodotti sono determinate dalla presenza dei metaboliti della fermentazione nel prodotto finale. Il sapore rinfrescante è dovuto alla presenza di etanolo; l'aroma del fruttato è dovuto agli esteri, mentre la presenza del glicerolo dona corpo e consistenza alla bevanda. Come abbiamo già visto, il metabolismo dei lieviti stimolato dalle matrici zuccherine è il responsabile dell'aumento della concentrazione di etanolo, glicerolo ed esteri nel prodotto finito (Puerari et al., 2012; Fiorda et al., 2016a; Fiorda et al., 2016b).

## Capitolo 7

### “EFFETTI BENEFICI ALLA SALUTE”

Il kefir è una bevanda fermentata rinfrescante con forti caratteristiche sensoriali ed una varietà di sottoprodotti e microrganismi che ne costituiscono un prodotto di nicchia con sorprendenti effetti benefici sulla salute umana.

Sono molteplici gli studi che mostrano gli effetti positivi del kefir d'acqua sulla salute umana. Uno dei principali è la possibilità di essere consumato da soggetti intolleranti al lattosio, allergici ai prodotti caseari, vegani o vegetariani (Fiorda et al., 2016). Visto che le proprietà probiotiche sono ampiamente diffuse tra i batteri lattici, un sistema ricco di batteri lattici come quello del kefir d'acqua potrebbe avere le stesse proprietà (Waldherr et al., 2010). Un grande numero di microrganismi con potenziale probiotico è stato isolato da grani di kefir d'acqua (Gulitz et al., 2011; Magalhães et al., 2010; Soccol et al., 2010) mostrando le seguenti caratteristiche: la mancanza di patogenicità, una buona tolleranza alle condizioni riscontrabili nel tratto gastrointestinale e la capacità di aderire e colonizzare le pareti del tratto gastrointestinale con conseguente esclusione competitiva dei patogeni (Golowczyc et al., 2011; Rodrigues et al., 2005; Schneedorf, 2012; Soccol et al., 2010).

Il microbiota di kefir d'acqua ha mostrato una buona attività antimicrobica nei confronti di microrganismi patogeni per l'uomo, quali *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans* (Golowczyc et al., 2007; Rodrigues et al., 2005). Inoltre, i batteri lattici isolati da kefir d'acqua hanno mostrato effetti antiedemigeni (Moreira et al., 2008), antinfiammatori (Diniz et al., 2003), antiulcerogeni (Rodrigues et al., 2016), antiossidanti (Alsayadi et al., 2013), cicatrizzanti (Moreira et al., 2008), antimicrobici (Fiorda et al., 2016) e curativi (Rodrigues et al., 2005).

Come riportato da Fiorda et al. (2016), i grani di kefir d'acqua aggiunti nel miele (substrato) hanno prodotto una bevanda con effetti positivi sulla salute umana mostrando una forte attività antiossidante e l'alta concentrazione di EPS.

## CONCLUSIONI

In questo elaborato abbiamo potuto constatare che il kefir d'acqua, nonostante sia una bevanda conosciuta da centinaia di anni in molte aree geografiche, è diventata oggetto di studio solo in epoche recenti. La sua composizione microbica si è rivelata, al pari del kefir di latte, estremamente complessa. Diversi studi *in vitro* e *in vivo* hanno permesso di chiarire solo alcuni dei meccanismi e delle interazioni che si manifestano nei grani di kefir d'acqua. Questi ultimi sono molto simili ai grani di kefir di latte per struttura, microrganismi associati, e prodotti finali della fermentazione. Ciò che ha differenziato i grani di kefir d'acqua dai grani di kefir di latte è stata l'abbondanza con cui i microrganismi popolano il microbiota. Il kefir d'acqua a causa delle sue basse concentrazioni di amminoacidi essenziali e vitamine ha rivelato alcuni meccanismi fermentativi e interazioni microbiche unici e complessi, che necessitano però di una più approfondita analisi. La produzione di kefir d'acqua è tutt'oggi ancorata ad un processo empirico. È infatti risultato estremamente difficile riprodurre artificialmente la complessità delle interazioni interne al microbiota, per questa ragione non si è ancora a conoscenza di un processo standardizzato che ne permetta la produzione su grande scala.

Il kefir tradizionale ed il kefir d'acqua sono stati associati a molteplici effetti benefici sulla salute del consumatore. Tenendo conto della crescente complessità delle esigenze e delle diverse tipologie di consumatori, tra cui vegani, vegetariani e soggetti con intolleranza / allergia ai latticini, sono state sviluppate nuove bevande funzionali non casearie le quali presentano caratteristiche microbiche eterogenee che riflettono la stessa codominanza di lieviti e batteri lattici tipica del kefir d'acqua. Inoltre, le proprietà fisico-chimiche ed organolettiche delle bevande a base di frutta e verdure hanno soddisfatto le aspettative e i gusti degli assaggiatori. Queste bevande hanno rivelato la presenza di molecole con azione antiossidante ed antimicrobica, risultando essere prodotti sani e apprezzabili da un'ampia gamma di consumatori. Non si sa ancora molto sulla relazione dettagliata tra microrganismi, la qualità finale del prodotto e gli aspetti tecnologici e funzionali per la produzione di prodotti standardizzati. Sia la biologia che la chimica del kefir d'acqua e delle nuove bevande non casearie hanno bisogno di una analisi completa di tutti gli aspetti della produzione.

## BIBLIOGRAFIA

- Acik M., Cakiroglu F. P., Altan M., Baybo T., 2019. Alternative source of probiotics for lactose intolerance and vegan individuals: sugary kefir. *Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1590/fst.27919>
- Alsayadi M. S., Jawfi Y. A., Belarbi M., Sabri F. Z., 2013, Antioxidant potency of water kefir. *Journal Microbiology and Biotechnology. Food Scienze and technology*, 2, pp. 2444-2447.
- Beijerinck, M.W., 1889. Sur le kefir. *Archives Neerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles*, Haarlem, 23, 248–258.
- Bottazzi V., 1998. I latti fermentati. Istituto Danone.
- Corona O., Randazzo W., Miceli A., Guarcello R., Francesca N., Erten H., Moschetti G., Settanni L., 2016. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT – Food Science and Technology*, 66, pp. 572-581.
- Daker W. D., Stacey M., 1938. Investigation of a polysaccharide produced from sucrose by beta-bacterium vermiforme (ward-meyer). *Biochemical Journal*, 36, pp. 1946-1948.
- De Oliveira Leite M., et al., 2012. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*.
- Diniz R. O., Garla L. K., Carvalho J. C. T., Schneedorf J. M., 2003. Study of anti-inflammatory activity of tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. *Pharmacol. Res.*, 47, pp. 49-52.
- Diplock AT et al., 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document. *British Journal of Nutrition*.

- Farnworth E. R., 2005. Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology. Bull. Funct. Foods*, 2, pp. 1-17.
- Fiorda F. A., de Melo Pereira G. V., Thomaz-Soccol V., Rakshit S. K., Pagnoncelli M. G. B., de Souza Vandenberghe L. P., Soccol C. R., 2017. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation. *Food Microbiology*, 66, pp 86-95.
- Fiorda F. A., De Melo Pereira G. V., Thomaz-Soccol V., Medeiros A. P., Rakshit S. K., Soccol C. R., 2016. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. *LWT – Food Science and Technology*, 86, pp. 690-607.
- Fuente-Salcido N. M., Castañeda-Ramírez J. C., García-Almendárez B.E., Bideshi D. K., Salcedo-Hernández R., Barboza-Corona J. E., 2015. Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M- Tuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México. *Food Science Nutritional*, 3, pp. 434-442.
- Garrote G. L., Abraham A. G., De Antoni G. L., 1997. Preservation of kefir grains, a comparative study. *LWT-Food Science and Technology*, 30, pp. 77-84.
- Gaware V., Kotade K., Dolas R., Dhamak K., Somwshis S., Nikam V., Kashid V., 2011. The magic of kefir: a review. *Pharmacologyonline*, 1, 376-386.
- Golowczyc M. A., Mobili P., Garrote G.L., Abraham A. G., Antoni G. L., 2007. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal Food Microbiology*, 118, pp. 264-273.
- Golowczyc M. A., Silva J., Texeira P., Antoni G. L., Abraham A. G., 2011. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International Journal Food Microbiology*, 144, pp. 556-560.
- Grønnevik H., Falstad M., Narvhus J. A., 2011. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *Int. Dairy J.*, 21, pp. 601-606.

- Guerra M. J., Mujica M. V., 2010. Physical and chemical properties of granulated cane sugar “panelas”. *Food Science and Technology*, (Campinas), 30, pp. 250-257.
- Gulitz A., Stadie J., Ehrmann M. A., Ludwig W., Vogel R. F., 2013. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *J. Appl. Microbiol.*, 114, pp. 1082-1091.
- Gulitz A., Stadie J., Wenning M., Ehrmann M. A., Vogel R. F., 2011. The microbial diversity of water kefir. *International Journal Food Microbiology*, 151, pp. 284-288.
- Guzel-Seydim Z, Seydim A. C., Greene A. K., 2000. Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. *J. Dairy Sci.*, 83, pp. 275-277.
- Hsieh H., Wang S., Chen T., Huang Y., Chen M., 2012. Effects of cow’s and goat’s milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International Journal Food Microbiology*, 157, pp. 73-81.
- Ikram-UI-Haq, Ali S., 2007. Kinetics of invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch cultures. *Pak. J. Bot.*, 39, pp. 907-912.
- Jianzhong Z., Xiaolia L., Hanhub J., Mingsheng D., 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 26, pp. 770-775.
- Koutinas A. A., Athanasiadis I., Bekatorou A., Iconomopoulou M., Blekas G., 2005. Kefir yeast technology: scale-up in SCP production using milk whey. *Biotechnol. Bioeng.*, 89, pp. 788-796.
- Laureys D., Aerts M., Vandamme P., De Vuyst L., 2018. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiology*, 73, pp. 351-361.S
- Lutz M. L., 1899. Recherches biologiques sur la constitution du Tibi. *Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France*, 15, pp. 68-72.

- Miguel M. G. C. P., Cardoso P. G., Magalhães K. T., Schwan R. F., 2011. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian states. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, pp. 1875-1884.
- Moens F., Lefeber T., De Vuyst L., 2014. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 1848-1857.
- Moreira M. E. C., Santos M. H., Zolini G. P. P., Wouters A. T. B., Carvalho J. C. T., Schneedorf J. M., 2008. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of a carbohydrate fraction isolated from sugary kefir. *J. Medicinal Food*, 11, pp. 356-361.
- Moreno-Terrazas R., Reyes-Morales H., Huerta-Ochoa S., Guerrero-Legarreta I., Vernon-Carter E. J., 2001. Consumer awareness of the main sensory attributes of tepache, a traditional fermented fruit beverage. *Food Sci. Technol. Int.*, 7, pp. 411-415.
- Otles S., Cagindi O., 2003. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Food Eng. Dep.*, 2, pp. 54-59.
- Pidoux M., 1989. The microbial-flora of sugary kefir grain (the geenger plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 5, pp. 223-238.
- Prado M. R., Blandón M. L., Vandenberghe L. P. S., Rodrigues C. C., Guillermo R., Thomaz-Soccol V. T., Soccol C. R., 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front. Microbiol.*, 6, pp. 1-12.
- Puerari C., Magalhães K. T., Schwan R. F., 2012. New cocoa pulp-based kefir beverages: microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Res. Int.*, 48, pp. 634-640.
- Randazzo W., Corona O., Guarcello R., Francesca N., Germanà A. M., Erten H., Moschetti G., Settanni L., 2016. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology*, 54, pp. 40-51.

- Randazzo W., Corona O., Guarcello R., Francesca N., Germana M. A., Erten H., Moschetti G., Settanni L., 2016. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology*, 54, pp. 40-51.
- Rodrigues K. L., Araújo T. H., Schneedorf J. M., Ferreira C. S., Moraes G. O. I., Coimbra R. S., Rodrigues M. R., 2016. A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. *J. Funct. Foods*, 21, pp. 58-69.
- Rodrigues K. L., Caputo L. R. G., Carvalho J. C. T., Evangelista J., Schneedorf J. M., 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25, pp. 404-408.
- Rubio M. T., Lappe P., Wachter C., Ulloa M., 1993. Microbial and biochemical studies of the fermentation of sugary solutions inoculated with tibi grains. *Revista Latino-americana de Microbiología*, 35, pp. 19-31.
- Sarikkha P., Nitisoravut R., Poljungreed I., Boonyarattanakalin S., 2015. Identification of bacteria and yeast communities in a Thai sugary kefir by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) analyses. *J. Industrial Technol.*, 11, pp. 25-39.
- Sarkar S., 2007. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *Br. J. Nutr.*, 109, pp. 280-290.
- Schneedorf J. M., 2012. Kefir D'Aqua and its probiotic properties. E.C. Rigobelo (Ed.), *Probiotic in Animals*, Intech, Croatia, pp. 53-76.
- Shavit E., 2008. Renewed interest in kefir, the ancient elixir of longevity. *Fungi*, 1 (2).
- Soccol C. R., Vandenberghe L. P. S., Spier M. R., Medeiros A. B. P., Yamaguishi C. T., Lindner J. D. D., Thomaz-Soccol V., 2010. The potential of probiotics: a review. *Food Technol. Biotechnol.*, 48, pp. 413-434.
- Stadie J., Gulitz A., Erhmann M. A., Vogel R. F., 2013. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology*, 35, pp. 92-98.

Vayssier Y., 1978. Le kéfir: analyse qualitative et quantitative. *Revue Laitière français*, 361, pp. 3-75.

Waldherr F. W., Doll V. M., Meissner D., Vogel R. F., 2010. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiology*, 27, pp. 672-678.

Ward H. M., 1892. The ginger-beer plant, and the organisms composing it: a contribution to the study of fermentation-yeasts and bacteria. *Philosophical Trans. R. Soc. Lond.*, 183, pp. 125-197.