**Food Research Journal**

Online ISSN: 2676-5691 Print ISSN: 2008-515X
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

# Antibacterial activity of soy milk fermented by kefir grain against a number of pathogenic bacteria

**Seyyede Sorayya Sajjadi[1], Hadi Koohsari✉[2] and Maryam Sadegh Shesh Poli[2]**

[1]MSc student, Department of Microbiology, Minudasht branch, Islamic Azad University, Minudasht, Iran
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran
[3]Graduated PhD of Molecular Medicine, Department of Microbiology, Gorgan branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
✉Corresponding author: hadikoohsari@yahoo.com

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article history:
Received: August 14, 2023
Accepted: December 31, 2023
Published: July 4, 2024

Keywords:
Antibacterial activity, Kefir, Pathogenic Bacteria, Soy Milk

ABSTRACT

**Background:** Kefir is a probiotic complex, from a microbial symbiosis that is commonly obtained from the fermentation of cow's milk with kefir grains. Some may be vegetarian or lactose intolerant or allergic to casein.
**Aims:** The purpose of this study is to investigate the antibacterial activity of kefir samples prepared with soy milk.
**Methods:** Activated kefir grains were added to soy milk (with and without sucrose) and the fermentation process was performed at 25 and 37°C. Then, kefir grains were separated from kefir extract and the antibacterial activity of the extract against 10 pathogenic bacteria was evaluated by well method.
**Results:** The presence of sucrose and fermentation temperature had a significant effect on the antibacterial activity against the tested bacteria except *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. Kefir samples prepared with soy milk containing sucrose showed more antibacterial activity. The highest antibacterial activity against the native isolate and the standard strain of *Klebsiella pneumoniae* was related to the kefir samples prepared with soy milk containing sucrose at the fermentation temperature of 37°C, with mean of diameter of inhibition zone of 21 and 18 mm, respectively. The highest antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* and *Salmonella typhimurium* was related to kefir samples prepared with soy milk containing sucrose at 25 and 37°C. *Escherichia coli*, especially the standard strain and *Bacillus cereus* showed more resistance to kefir extract.
**Conclusion:** The results indicated significant antibacterial activity of kefir samples prepared with soy milk against the tested bacteria except for *B. cereus* and the standard strain of *E. coli*.

Food Research Journal, 2024,34(2): 61-80
DOI: 10.22034/FR.2023.57991.1894

**Extended Abstract**

**Introduction:** Probiotics are live microorganisms that have beneficial effects on human health when consumed in sufficient quantities (Fuller 1989). Kefir beverage is a natural complex probiotic and one of the oldest fermented milk products. This microbial symbiotic is obtained by fermenting milk with kefir grains. Consumption of kefir is effective in promoting health and increases the body's immune system, balances blood pressure, treats digestive diseases and reduces serum cholesterol levels, and also has antibacterial, antifungal and antitumor activities (Farnworth 2005). The microflora of kefir grains contains a group of specific microbes that exist in a complex symbiotic relationship, including species of yeasts, lactic acid bacteria (Lactobacillus and Lactococcus), and acetic acid bacteria (Garbers 2004). Kefir is a complex probiotic, from a microbial symbiotic that is obtained from milk fermentation by kefir grains, and its consumption is effective in promoting health. The main raw material for making kefir beverage is cow's milk. For various reasons, some people do not consume cow's (animal) milk: they may be vegetarians or have health problems such as lactose intolerance or a casein allergy (Bau et al., 2015). These people switch to a vegetarian diet. Vegetarian diets are usually rich in nutrients and low in saturated fat. Research shows that diet can improve heart health, protect against cancer, and reduce the risk of type 2 diabetes. Plant-based milks are made from a wide variety of grains, nuts, and seeds. The most popular of them include soy milk, almond milk and oat milk (Dinua et al. 2017). Soy milk is an aqueous extract obtained from soybeans, which lacks some insoluble fibers, but contains all the biochemical compounds found in soybeans. Soy milk has about 3.5% protein (similar to cow's milk), 2% fat and 3% carbohydrates. Unlike cow's milk, soy milk has a small amount of unsaturated fat, triglycerides and low-density lipoprotein (LDL) and does not contain cholesterol. On the other hand, soy milk is a good alternative to milk for vegetarians due to its long shelf life and abundant nutrients, including vitamins and minerals. be (Jayachandran and Xu, 2019). Considering the increasing trend of people towards plant foods including plant milks such as soy milk and the need to introduce an alternative substrate with the potential of high biological activities to prepare kefir drinks, this study was conducted aim of investigating the antibacterial activity and sensory properties of kefir samples prepared with soy milk.

**Material and methods:** To preparation of soy milk, soybeans were soaked with distilled water for 24 hours. At the end of this step, the remaining water was removed. The soaked seeds were ground with water at a ratio of 1:8. This homogenate was filtered and sterilized, and it was used to prepare kefir seed inoculation and soy milk-based kefir (Bau et al. 2015). The regeneration and fermentation process of grains was done with successive subcultures in milk according to the method presented by Ajam and Koohsari (2020). Activated kefir grains were added to soy milk (with 2% and without sucrose) and the fermentation process was performed at 25°C and 37°C. After fermentation, kefir grains were separated from kefir extract and the antibacterial activity of kefir extract against 10 pathogenic bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* (native isolate and standard strain) and *Klebsiella pneumoniae* (native isolate and standard strain), was evaluated based on diffusion in agar and by the well method. For this purpose, the method presented by Weinstein et al., 2018 was used. Regarding sensory tests, in order to compare with kefir samples prepared from soy milk, kefir samples with cow's milk were also prepared, so that a comparison can be made between these samples. In order to study this comparison, indicators of overall appearance, color, fragrance, taste and mouthfeel and total score were measured.

**Results and discussion:** The results of the effect of fermentation temperature (25°C and

37°C) and the presence of sucrose in kefir samples prepared with soy milk on the antibacterial activity against the tested bacteria, except for the gram-positive bacteria *E. faecalis* and *S. aureus*, indicate a significant difference between treatments (P>0.05). The presence of sucrose and fermentation temperature had a significant effect on antibacterial activity against all tested bacteria except *E. faecalis* and *S. aureus*. And kefir samples prepared with soy milk containing sucrose showed more antibacterial activity. The highest antibacterial activity of kefir samples prepared with soy milk against *P. aeruginosa* was related to kefir samples prepared with soy milk containing sucrose at fermentation temperatures of 25°C and 37°C with mean of diameter of inhibition zone of 20 mm. The highest antibacterial activity of the kefir samples prepared with soy milk against *E. faecalis* is related to the samples prepared with soy milk without sucrose and at the fermentation temperature of 25°C with mean of diameter of inhibition zone of 18.5 mm and the highest antibacterial activity of the samples against *S. aureus* was related to the samples of soy milk without sucrose at the fermentation temperature of 37°C with mean of diameter of inhibition zone of 16 mm. The highest antibacterial activity against *S. dysenteriae* and *S. typhimurium* was observed in kefir samples prepared with soy milk containing sucrose at fermentation temperatures of 25°C and 37°C. The highest antibacterial activity of kefir samples prepared with soy milk against the native isolate and standard strain of *K. pneumoniae* was related to kefir samples prepared with soy milk containing sucrose at fermentation temperatures of 37 with mean of diameter of inhibition zone of 21 and 18 mm, respectively. Compared to other tested bacteria, *E. coli* and especially the standard strain of this bacteria, showed more resistance than kefir samples prepared with kefir soy milk. In this regard, *B. cereus* showed resistance to all treatments and no antibacterial activity was seen against this spore bearing bacteria bacterium. Based on the results of sensory tests, no significant difference was observed between the treatments in any of the indicators (P<0.05), but nevertheless, the sensory evaluations indicated low sensory acceptability of kefir samples prepared with soy milk, so compared to kefir samples obtained from cow's milk, it obtained a lower overall score. Antibacterial activity of fermented beverage is related to the compounds present in this beverage. It has also been reported that the compounds in kefir drink are affected by the type of substrate or milk (soy milk in the present study), fermentation conditions, kefir grain origin and storage conditions (Rosa et al., 2017). Soy milk has different carbohydrates, the most important of which are sucrose, raffinose and stachyose, while lactose is the main carbohydrate in cow's milk (Pinthong et al., 1980). Among the mechanisms of antibacterial activity of kefir extracts, we can mention acidic pH, as a result of lactose fermentation or alternative substrates, increasing the content of organic acids, such as lactic acid, acetic acid, etc., by microorganisms in kefir grains (Kourkoutas et al., 2007). Addition of carbohydrates (including sucrose) improves the ability of kefir grain microorganisms to produce lactic acid in soy milk. In addition to the role of organic acids, the antimicrobial activity of kefir beverage is related to the production of peptides (bacteriocins), carbon dioxide, hydrogen peroxide, ethanol and diacetyl (Oliveira Leite et al., 2013). In addition to these compounds, the exopolysaccharide produced by kefir grains called kefiran also has antibacterial activities (Wang et al., 2008 and Prado et al., 2015). The difference in the sensitivity of gram-positive and gram-negative bacteria to kefir samples can be attributed to the differences in the cell envelope and the composition of the bacterial cell wall. Gram positive bacteria have a different wall than gram negative bacteria. The main composition of the cell wall in gram-positive bacteria is peptidoglycan, while the amount of peptidoglycan in gram-negative bacteria is very low, and most of the cell wall is composed of the outer membrane containing lipid compounds, and this structure is not seen

in the cell wall of gram-positive bacteria (Silhavy et al. 2010 and Blair et al. 2015).

**Conclusion:** Kefir samples prepared with soy milk showed antibacterial activity and the addition of sucrose is effective in increasing antibacterial activity. The antibacterial activity of kefir samples prepared with soy milk against Gram-negative bacteria such as *Shigella dysentery, Pseudomonas aeruginosa* and the native isolate and standard strain of *Klebsiella pneumoniae* is important, and shows the importance of using this fermented drink of plant origin as a suitable alternative to carbonated drinks with high sugar content.

**پژوهش‌های صنایع غذایی**
شاپا الکترونیکی: ۵۶۹۱-۲۶۷۶ ، شاپا چاپی ۵۱۵X- ۲۰۰۸
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

# فعالیت ضدباکتریایی شیر سویا تخمیرشده بوسیله دانه‌های کفیر علیه تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا

**سیده ثریا سجادی[۱]، هادی کوهساری[۲*]✉، مریم صادق شش‌پلی[۳]**

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد مینودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مینودشت، ایران
[۲]دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران
[۳]دانش آموخته دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
✉ مسئول مکاتبه: hadikoohsari@yahoo.com

مشخصات مقاله

نوع مقاله:
علمی پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۳
پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۰
انتشار: ۱۴۰۳/۴/۱۴

کلید واژگان:
باکتریهای بیماری‌زا،
شیر سویا،
فعالیت ضدباکتریایی،
کفیر

چکیده

**زمینه مطالعاتی:** کفیر یک پروبیوتیک کمپلکس، از یک مجموعه همزیستی میکروبی است که بطور رایج از تخمیر شیر گاو به‌وسیله دانه‌های کفیر حاصل می‌شود. برخی ممکن است گیاهخوار باشند یا عدم تحمل لاکتوز یا آلرژی به کازئین داشته باشند.

**هدف:** هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا می‌باشد.

**روش کار:** دانه‌های کفیر فعال شده به شیر سویا (با و بدون ساکاروز) افزوده و عمل تخمیر در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس، دانه‌های کفیر از عصاره کفیر جدا شدند و فعالیت ضدباکتریایی عصاره علیه ۱۰ باکتری بیماریزا با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** حضور ساکاروز و دمای تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهای مورد آزمون به استثناء *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تاثیر معناداری داشت. نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا دارای ساکاروز فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نشان دادند. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه ایزوله بومی و سویه استاندارد *کلبسیلا نومونیه* مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا حاوی ساکاروز در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتی‌گراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۱ و ۱۸ میلیمتر بود. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه *سودوموناس آئروژینوزا*، *شیگلا دیسانتری* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه‌شده با شیر سویا حاوی ساکاروز در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بود. *اشریشیا کلی* به خصوص سویه استاندارد و *باسیلوس سرئوس* مقاومت بیشتری را نسبت به عصاره کفیر نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاکی از فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا علیه باکتریهای مورد آزمون به استثنای *باسیلوس سرئوس* و سویه استاندارد *اشریشیا کلی* بود.

**مقدمه**

تاریخچه استفاده از میکروارگانیسم‌های زنده در غذا به‌ویژه باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک به منظور حفظ و بهبود سلامت انسان بسیار طولانی است. فرآورده‌های لبنی اولین نوع از محصولات پروبیوتیکی بوده‌اند که مورد استفاده بشر قرار گرفته‌اند. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به مقدار کافی از آنها مصرف می‌شود اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارد (فولر ۱۹۸۹).

نوشیدنی کفیر از جمله قدیمی‌ترین محصولات تخمیری شیر است که یک پروبیوتیک طبیعی و نوشابه‌ای الکلی – لاکتیکی است که از تخمیر شیر به وسیله دانه های کفیر حاصل می شود. مصرف کفیر در ارتقای سلامت مؤثر است و سبب بالا بردن کارایی سیستم ایمنی بدن، متعادل کردن فشار خون، درمان بیماری های گوارشی و کاهش سطح کلسترول سرم می‌شود و همچنین دارای فعالیت های ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضدتوموری می باشد (فارنورث ۲۰۰۵).

دانه‌های کفیر، دانه‌های ژله مانندی شبیه گل‌های گل‌کلم کوچک هستند که یک مجموعه همزیستی میکروبی است. این دانه‌ها بیوفیلمی پیچیده متشکل از اگزوپلی‌ساکاریدها و انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها، عمدتاً باکتری‌ها و مخمرها ساخته شده است. طول آنها ۱ تا ۳ سانتی متر، دارای لبه و شکل نامنظم و به رنگ سفید تا زرد و دارای یک بافت لزج اما محکم هستند (لاریویر و همکاران ۱۹۶۷ و فارنورث ۲۰۰۵).

میکروبیوتا دانه‌ها، حاوی گروهی از میکروب‌های خاص هستند که در یک رابطه پیچیده همزیستی وجود دارند و شامل گونه‌های مخمرها، باکتری‌های اسیدلاکتیک (لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس) و باکتری‌های اسید استیک هستند (گاربرس و همکاران ۲۰۰۴).

دانه‌های کفیر وقتی به شیر تازه منتقل می‌شوند، زنده می‌مانند و در این مدت تقریباً ۲۰ ساعت رشد می‌کنند و جرم آنها ۲۵ درصد افزایش می یابد (فارنورث ۲۰۰۵).

باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در دانه‌های کفیر به دلیل توانایی رقابت و مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماریزا و عامل فساد، چه با تولید اسیدلاکتیک و چه با افزایش بیان ترکیبات ضدمیکروبی، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (کورکوتاس و همکاران ۲۰۰۷).

ظرفیت تولید مثلی دانه‌های کفیر به طور قابل توجهی تحت تاثیر شرایط رشد قرار دارد. در شرایط نامساعد، رشد دانه کفیر مختل می‌شود، ظاهر آنها بدتر می‌شود و انعطاف پذیری آنها از دست می‌رود، کوچک می‌شوند و تعادل میکروبیولوژیکی آنها مختل می‌شود. در حالی که در شرایط مساعد، پس از پاساژهای متعدد در شیر، ظاهر معمولی، عملکردهای فیزیولوژیکی و خصوصیات تکنولوژیکی خود را بازیابی می‌کنند (پاپ و همکاران ۲۰۱۴).

البته پاساژهای متعدد می‌تواند در ایجاد تغییر در میکروبیوتای دانه کفیر و یا ایجاد جهش در میکروارگانیسم‌های تشکیل‌دهنده آن اثر گذاشته و در نتیجه عملکرد یا خصوصیات آن را دستخوش تغییر نامطلوب نماید.

نقش‌های بیولوژیک این نوشیدنی تخمیری به میکروارگانیسم‌های موجود در دانه های کفیر و ترکیبات حدواسط ناشی از متابولیسم آنها مربوط می‌شود. تفاوت در مقدار و نوع این میکروارگانیسم‌ها و ترکیبات حدواسط با شرایط تخمیر از قبیل نوع شیر، نسبت تلقیح دانه‌ها، زمان تخمیر و درجه حرارت تخمیر ارتباط دارد (راتری و اوکونل ۲۰۱۱ و سیموا و همکاران ۲۰۰۲ و تمیم ۲۰۰۶).

ماده خام اصلی کفیر، شیر گاو است. با این حال، به دلایل مختلف برخی از مردم شیر گاو (حیوانی) مصرف نمی‌کنند: ممکن است گیاهخوار باشند یا مشکلات سلامتی مانند عدم تحمل لاکتوز یا آلرژی به کازئین داشته باشند. شیر با منشاء گیاهی یا شیر گیاهی یا شیر غیر لبنی (Vegan milk) که بر خلاف شیرهای با منشاء جانوری، چربی اشباع کمی دارند و از طرفی حاوی مقدار زیادی کلسیم و پروتئین هستند و می‌توانند انتخاب جایگزینی برای افراد گیاه‌خوار (Vegetarians) و افرادی که نسبت به لاکتوز شیرهای لبنی حساسیت دارند و در هضم آن مشکل دارند، باشد.

رژیم‌های گیاهخواری معمولاً غنی از موادمغذی و چربی‌های اشباع کم هستند. تحقیقات نشان می‌دهد که رژیم غذایی می‌تواند سلامت قلب را بهبود بخشد، از سرطان محافظت کند

و خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ را کاهش دهد. شیرهای گیاهی از طیف گسترده‌ای از غلات، مغزها و دانه‌ها تهیه می‌شوند. محبوب‌ترین آنها شامل انواع شیر سویا، شیر بادام و شیر جو دوسر است (دینوا و همکاران ۲۰۱۷).

شیرسویا عصاره آبی حاصل از دانه های سویا می‌باشد که فاقد برخی از فیبرهای نامحلول بوده ولی حاوی کلیه ترکیبات بیوشیمیایی موجود در دانه‌های سویا می‌باشد. شیرسویا دارای حدود ۳/۵ درصد پروتئین (مشابه شیر گاو)، ۲ درصد چربی و ۳ درصد کربوهیدرات می‌باشد. مقدار پروتئین شیر سویا تقریبا با شیر گاو برابر بوده ولی از نظر توالی آمینواسیدی متفاوت است. برخالف شیر گاو، شیر سویا دارای مقدار کمی چربی غیراشباع، تری‌گلیسرید و لیپوپروتئین با چگالی پایینLDL بوده و فاقد کلسترول می‌باشد و از طرفی شیر سویا به دلیل ماندگاری طولانی و مواد مغذی فراوان اعم از ویتامینها و مواد معدنی، جایگزین مناسبی برای شیر برای گیاهخواران می باشد (جایاچاندران و ژو ۲۰۱۹).

مصرف سویا و مشتقات آن به دلیل وجود پروتئین‌ها، ایزوفلاون‌ها، الیگوساکاریدها و سایر ترکیبات، فوایدی را برای سلامت انسان فراهم می‌کند (بائو و ایدا ۲۰۱۵).

این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا علیه ۱۰ باکتری بیماری‌زا شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*[1]، *باسیلوس سرئوس*[2]، *شیگلا دیسانتری*[3]، *انتروکوکوس فکالیس*[4]، *سودوموناس آئروژینوزا*[5]، *سالمونلا تیفی موریوم*[6]، *اشریشیا کلی*[7] (ایزوله بومی و سویه استاندارد) و *کلبسیلا نومونیه*[8] (ایزوله بومی و سویه استاندارد) انجام شد تا با توجه به گرایش روزافزون مردم به سمت مواد غذایی گیاهی از جمله شیرهای گیاهی مثل شیر سویا، ضمن بررسی ویژگی‌هاس حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده، سوبسترای جایگزینی با پتانسیل فعالیت‌های بیولوژیک بالا جهت تهیه نوشیدنی کفیر معرفی گردد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه شیر سویا

جهت تهیه شیر سویا، ۲۵۰ گرم دانه سویا با ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲٤ ساعت خیس شد. در پایان این مرحله، آب باقیمانده حذف شد. دانه های خیس شده با آب به نسبت ۱:۸ آسیاب شدند. این هموژن، فیلتر شد و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد و از آن برای تهیه تلقیح دانه‌های کفیر و تهیه کفیر بر پایه شیر سویا استفاده شد (بائو و همکاران ۲۰۱۵).

### آماده سازی عصاره‌های کفیر

دانه های کفیر از فروشگاه پربیوتیک تهیه شد و فرایند احیاء و تخمیر دانه ها مطابق روش ارائه شده توسط عجم و کوهساری (۲۰۲۰) انجام شد. بطور خلاصه دانه‌ها با پاساژهای متوالی در شیر به مدت ٤ روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد احیاء شدند. شیر هر ٢٤ ساعت تعویض گردید. پس از احیاء، دانه‌های کفیر با آب مقطر استریل شسته شدند و ۵ گرم از آن‌ها به ۵۰ میلی‌لیتر شیر سویا (با ۲ درصد ساکاروز و بدون ساکاروز) تلقیح شد و در در دماهای ۲۵ درجه و ۳۷ درجه گرمخانه گذاری شدند. پس از بازه زمانی تخمیر (٤٨ ساعت) دانه‌های کفیر از محصول تخمیری جدا شدند. عصاره‌های کفیر تا زمان انجام آزمون‌های فعالیت ضدباکتریایی در دمای یخچال نگهداری شدند (عجم و کوهساری ۲۰۲۰).

### آماده سازی سویه های باکتریایی مورد آزمون

فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر در مجموع علیه ۱۰ باکتری مورد بررسی قرار گرفت. از این ۱۰ باکتری، ۷ باکتری گرم منفی شامل *اشریشیا کلی* (ایزوله بومی و سویه استاندارد PTCC 1338) ، *شیگلا دیسانتری* (PTCC 1188)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (PTCC 1596)، *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC 1811) و *کلبسیلا نومونیه* (ایزوله بومی و سویه استاندارد PTCC 1290) و سه باکتری گرم مثبت شامل

[1] *Staphylococcus aureus*
[2] *Bacillus cereus*
[3] *Shigella dysenteriae*
[4] *Enterococcus faecalis*
[5] *Pseudomonas aeruginosa*
[6] *Salmonella typhimurium*
[7] *Escherichia coli*
[8] *Klebsiella pneumoniae*

*استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1154) و *انتروکوکوس فکالیس* (PTCC 1778) بودند. سویه‌های استاندارد به‌صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گنبدکاووس در محیط BHI و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد احیاء شدند. آنگاه چند کلنی یک دست از کشت ۲٤ ساعته هر باکتری به محیط کشت نوترینت براث تلقیح شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد تا کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند CFU/ml ۱/۵×۱۰^۸ حاصل شود (ونشتین و همکاران ۲۰۱۸).

**بررسی اثرات ضد باکتریایی به روش چاهک**

فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های کفیر، بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از سوسپانسیون معادل نیم مک‌فارلند (۱/۵ ×۱۰^۸ CFU/ml) باکتریهای پاتوژن مورد آزمون با سواپ استریل در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت یکنواخت تهیه شد. سپس با کمک چوب پنبه سوراخ‌کن استریل چاهک‌هایی به قطر ۸ میلی‌متر در محیط حفر شد و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های کفیر در داخل چاهک‌ها ریخته و به مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از این مدت با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها، حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد آزمون تعیین شد (ونشتین و همکاران ۲۰۱۸).

**ارزیابی حسی**

ارزیابی حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده توسط ۱۰ نفر از داوران از افراد داوطلب از نظر ویژگی‌های حسی شامل آزمون‌های ظاهرکلی، رنگ، عطر و بو، طعم و احساس دهانی (بافتی) مورد ارزیابی قرار گرفت. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره‌ای مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ٦ نسبتا خوب، نمره ۵ نه خوب و نه بد، نمره ٤ نسبتا بد نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و نهایتا نمره ۱ فوق‌العاده بد لحاظ گردید (میلگارد و همکاران ۱۹۹۱).

**تجزیه و تحلیل آماری**

متغیرهای مستقل تحقیق شامل نوع کفیر (نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا با و بدون ساکاروز)، دمای تخمیر (۲۵ و۳۷ درجه سانتی‌گراد) و نوع باکتری بیماری‌زا (۱۰ گونه باکتری) و متغیرهای وابسته تحقیق فعالیت ضدباکتریایی (قطر هاله عدم رشد هر یک از باکتری‌های بیماری‌زا در مواجه با نمونه‌های کفیر) و ویژگی‌های حسی نمونه‌های کفیر بود. هر آزمون حداقل در سه تکرار انجام شد و داده‌های حاصل بر اساس طرح کاملاً تصادفی و به کمک ANOVA یا آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی داری $P<0.05$ صورت گرفت و تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت پذیرفت.

## نتایج و بحث

**فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا**

میانگین قطر هاله عدم رشد باکتریهای مورد آزمون در مواجه با نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا در جدول ۱ آمده است، نتایج حاکی از فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا علیه باکتری‌های مورد آزمون به استثنای *باسیلوس سرئوس* و سویه استاندارد *اشریشیا کلی* بود. این فعالیت ضدباکتریایی عصاره نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا حتی علیه باکتری‌های گرم منفی همچون *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا نومونیه* اعم از ایزوله بومی و سویه استاندارد و *شیگلا دیسانتری* نیز مشاهده شد (جدول ۱).

**فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر سویا (با و بدون ساکاروز) در دمای تخمیر ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد علیه هر یک از باکتری‌های مورد آزمون**

نتایج تاثیر دمای تخمیر (۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و حضور ساکاروز در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر سویا بر فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های مورد آزمون به استثناء باکتریهای

گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، حاکی از وجود تفاوت معنی دار در بین تیمارها بود (P<۰/۰۵). از این نظر و در خصوص باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵) و حضور ساکاروز در شیر سویا بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تاثیر معناداری داشت و نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا دارای ساکاروز فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نشان دادند (شکل ۱). بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا علیه *سودوموناس آئروژینوزا*، مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا حاوی ساکاروز در دماهای تخمیر ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۰ میلیمتر بود (جدول ۱).

**Table 1- The mean diameter of inhibition zone of tested bacteria in the presence of kefir samples prepared with soy milk**

| | Soy milk without sucrose/25°C | Soy milk with sucrose/25°C | Soy milk without sucrose/37°C | Soy milk with sucrose/37°C |
|---|---|---|---|---|
| *E. faecalis* | $18.5\pm1.5^{aA}$ | – | $16.0\pm1.0^{aA}$ | $15.0\pm2.0^{bcA}$ |
| *S. dysenteriae* | $12.5\pm1.5^{cdB}$ | $18.5\pm1.5^{abA}$ | $12.5\pm1.5^{abB}$ | $18.0\pm1.0^{abA}$ |
| *B. cereus* | - | - | - | - |
| *S. aureus* | $14.0\pm1.0^{bcA}$ | $15.0\pm2.0^{cdA}$ | $16.0\pm2.0^{aA}$ | $15.0\pm2.0^{bcA}$ |
| *S. typhimurium* | – | $20.0\pm2.0^{aA}$ | $15.0\pm1.0^{aB}$ | $20.0\pm1.0^{aA}$ |
| *P. aeruginosa* | $15.5\pm0.5^{bB}$ | $20.0\pm1.0^{aA}$ | $14.0\pm1.0^{aB}$ | $20.0\pm1.0^{aA}$ |
| *K. pneumoniae (N*)* | $12.5\pm0.5^{cdC}$ | $17.0\pm0.0^{bcB}$ | $14.0\pm1.0^{aC}$ | $21.0\pm1.0^{aA}$ |
| *K. pneumoniae (S**)* | $16.0\pm1.0^{abA}$ | $15.0\pm0.0^{cdA}$ | $10.5\pm0.5^{bB}$ | $18.0\pm2.0^{abA}$ |
| *E. coli (S)* | $11.0\pm0.0^{dA}$ | $11.0\pm1.0^{eA}$ | – | – |
| *E. coli (N)* | $12.5\pm0.5^{cdA}$ | $13.5\pm0.5^{deA}$ | $10.5\pm0.5^{bB}$ | $13.0\pm0.0^{cA}$ |

Mean ± standard deviation. Different lowercase letters in each column indicate significant difference at the 5% probability level (P≥0.05).
Mean ± standard deviation. Different uppercase letters in each row indicate significant difference at the 5% probability level (P≥0.05).
.*N: Native isolate
**S: Standard strain

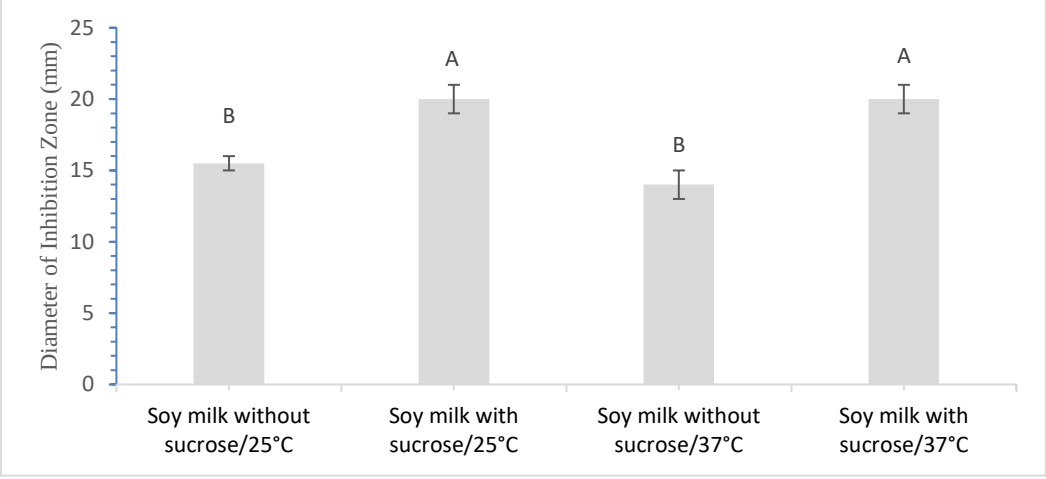


**Figure 1- The effect of fermentation temperature and the presence of sucrose in kefir samples prepared with soy milk on antibacterial activity against *P. aeruginosa*.**

نتایج آنالیز واریانس در خصوص فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا علیه *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (P>۰/۰۵). (شکل ۲و۳). با این وجود بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر سویا علیه *انتروکوکوس فکالیس* مربوط به نمونه‌های تهیه شده با شیر سویا بدون ساکاروز و در دمای تخمیر ۲۵ درجه سانتی‌گراد با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۸/۵ میلیمتر بود و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌ها علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به نمونه‌های شیر سویا بدون ساکاروز در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتی‌گراد با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۶ میلیمتر بود (جدول ۱).

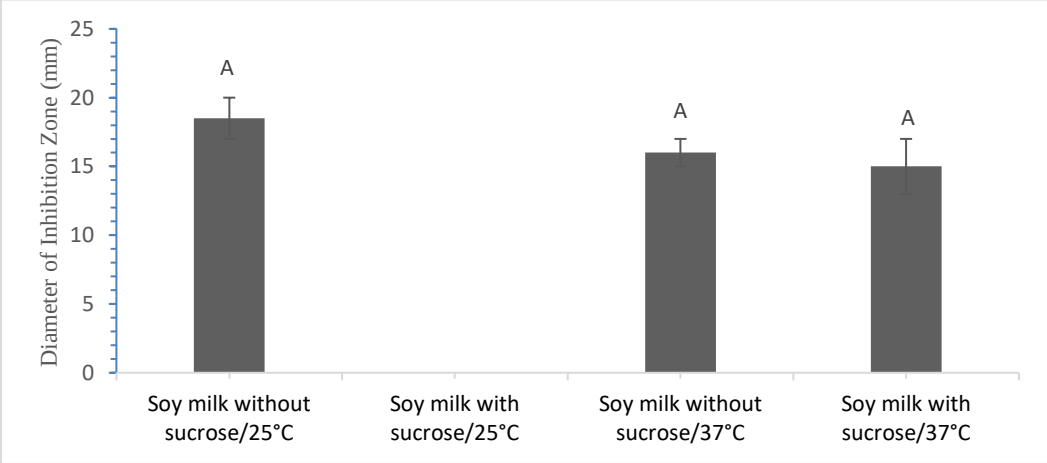


**Figure 2- The effect of fermentation temperature and the presence of sucrose in kefir samples prepared with soy milk on antibacterial activity against *E. faecalis***

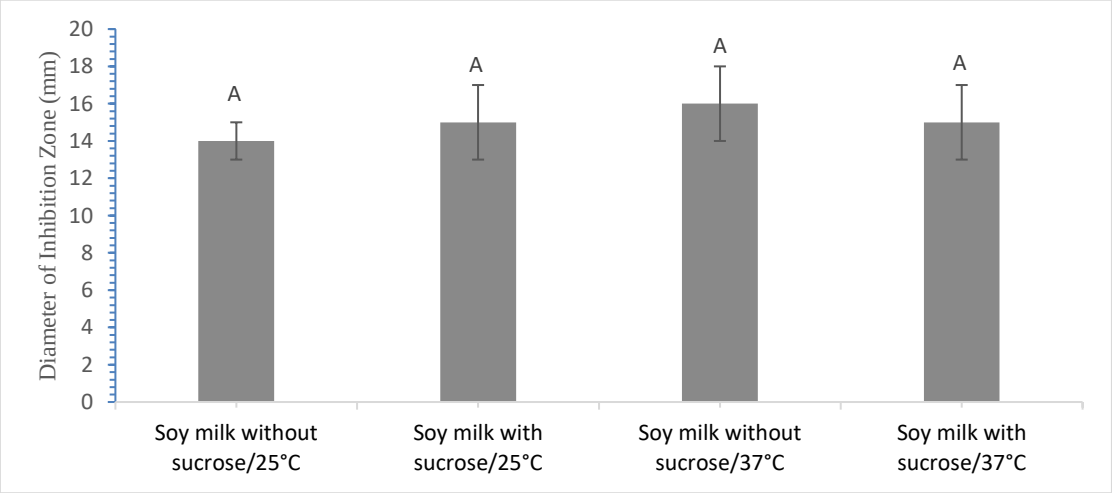


**Figure 3- The effect of fermentation temperature and the presence of sucrose in kefir samples prepared with soy milk on antibacterial activity against *S. aureus***

همانطور که در شکل ٤ مشاهده می شود، نتایج تاثیر دمای تخمیر (۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و حضور ساکاروز در نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا بر فعالیت ضدباکتریایی علیه *شیگلا دیسانتری* باکتری گرم منفی عامل اسهال خونی باسیلی بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها بود (P<۰/۰۵) (شکل ٤) و نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا دارای ساکاروز فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نشان دادند بطوریکه بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه *شیگلادیسانتری* در نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا دارای ساکاروز در دمای

تخمیر ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۸/۵ و ۱۸ میلیمتر بود (جدول ۱).

یافته‌های مذکور در خصوص *شیگلا دیسانتری*، در خصوص باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی‌موریوم* هم دیده شد (شکل ۵) و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم* در نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا دارای ساکاروز در دمای تخمیر ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۰ میلیمتر دیده شد (جدول ۱) که معرف این موضوع است که افزودن ساکاروز (شکر) به شیر سویا باعث افزایش فعالیت ضدباکتریایی نوشیدنی کفیر حاصل از آن می‌شود.

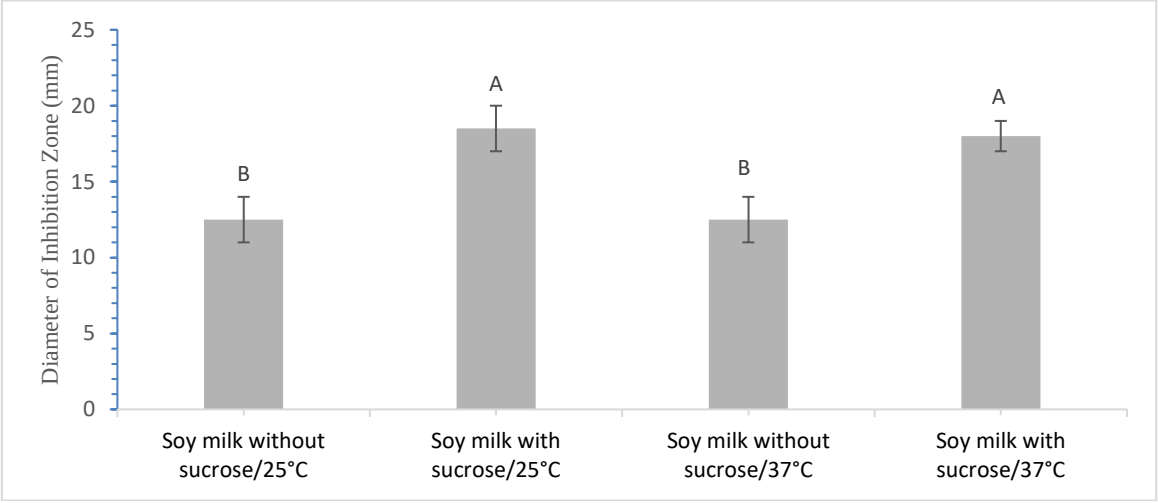


**Figure 4- The effect of fermentation temperature and the presence of sucrose in kefir samples prepared with soy milk on antibacterial activity against *S. dysenteriae***

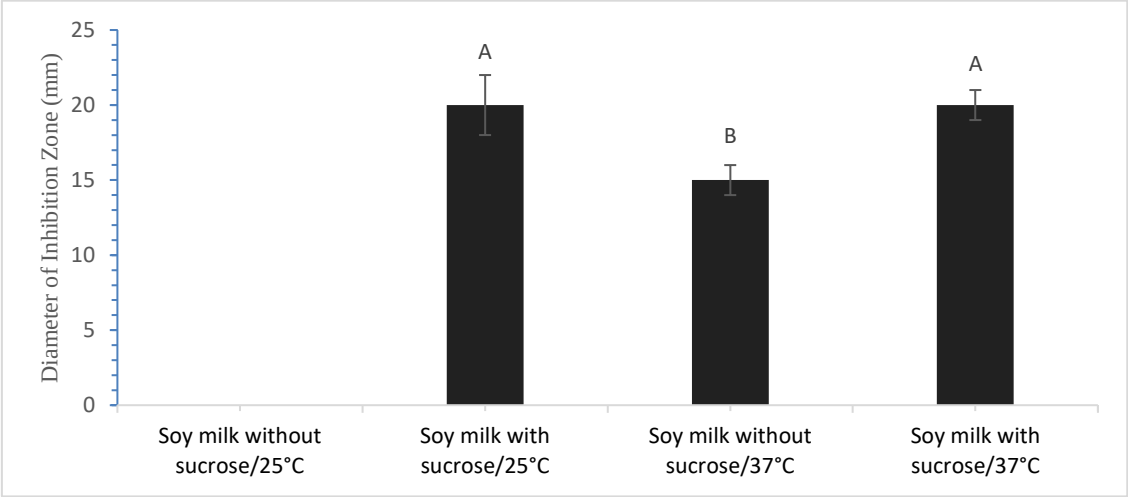


**Figure 5- The effect of fermentation temperature and the presence of sucrose in kefir samples prepared with soy milk on antibacterial activity against *S. typhimurium***

نتایج آنالیز واریانس در خصوص فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا علیه ایزوله بومی *کلبسیلا نومونیه* حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵) و حضور ساکاروز در شیر سویا بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تاثیر معناداری داشت و نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا دارای ساکاروز فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نشان دادند (شکل ٦). بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا علیه ایزوله بومی *کلبسیلا پنومونیه* مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا حاوی ساکاروز در دماهای تخمیر ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۱ و ۱۷ میلیمتر بود (جدول ۱). در خصوص سویه استاندارد این باکتری نیز اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۷) و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا با ساکاروز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۸ میلیمتر بود (جدول ۱)

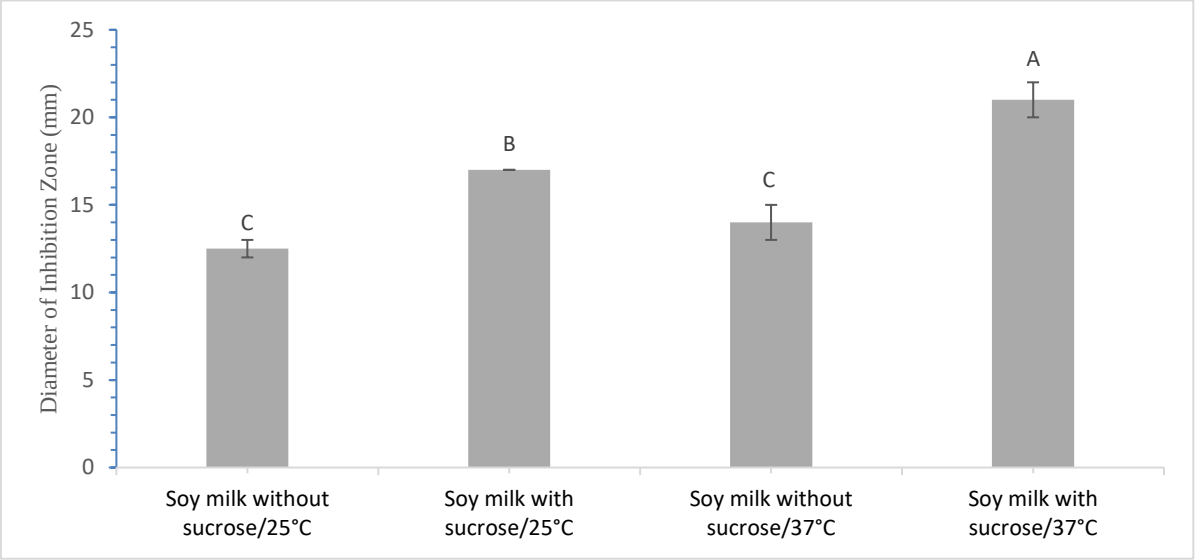


**Figure 6- The effect of fermentation temperature and the presence of sucrose in kefir samples prepared with soy milk on antibacterial activity against native isolate of *K. pneumoniae***

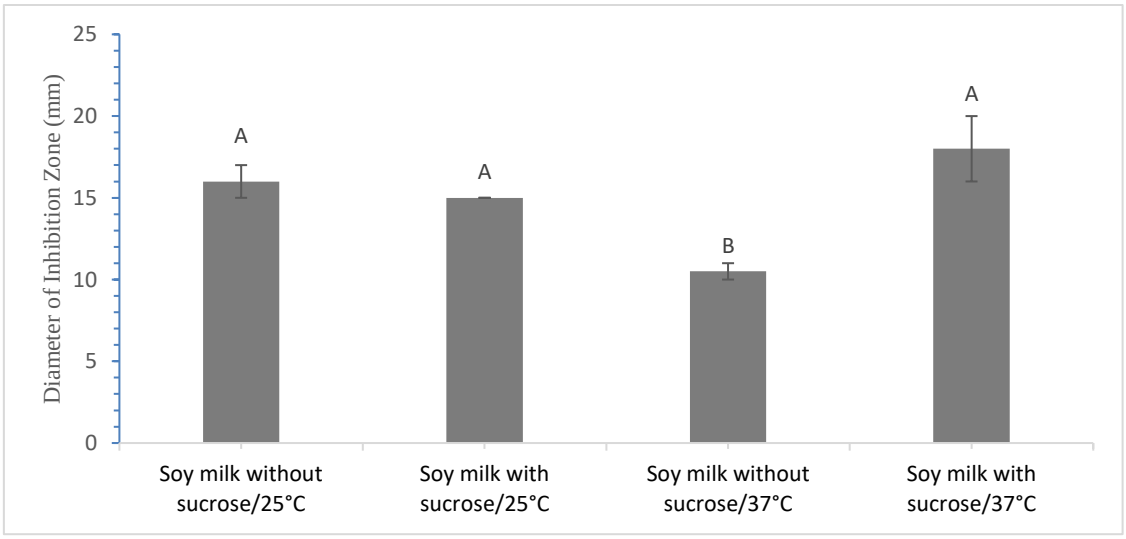


**Figure 7- The effect of fermentation temperature and the presence of sucrose in kefir samples prepared with soy milk on antibacterial activity against standard strain of *K. pneumoniae***

در خصوص با کتری گرم منفی *اشریشیا کلی* نیز نتایج حاکی از اختلاف معنادار بین تیمارها بود (P<۰/۰۵) (شکل ۸) و نمونه‌های تهیه شده با شیر سویا حاوی ساکاروز فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نشان دادند. البته در مقایسه با دیگر باکتری‌های مورد آزمون، *اشریشیا کلی* و به خصوص سویه استاندارد این باکتری، مقاومت بیشتری را نسبت به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا کفیر نشان داد. در این خصوص باکتری اسپوردار *باسیلوس سرئوس* نسبت به تمامی تیمارها مقاومت نشان داد و هیچگونه فعالیت ضدباکتریایی علیه این باکتری دیده نشد (جدول ۱).

**Figure 8- The effect of fermentation temperature and the presence of sucrose in kefir samples prepared with soy milk on antibacterial activity against native isolate of *E. coli***

**مقایسه نمونه‌های کفیر از نظر ویژگی‌های حسی**

در خصوص آزمون‌های حسی، جهت مقایسه با نمونه‌های کفیر تهیه شده از شیر سویا، نمونه‌های کفیر با شیر گاو نیز تهیه گردید، تا مقایسه‌ای بین این نمونه‌ها صورت پذیرد. نتایج مربوط به ارزیابی حسی کفیر حاصل از شیر گاو و شیر سویای تخمیری در جدول ۲ آمده است. که به‌منظور مطالعه این قیاس، شاخص‌های ظاهر کلی، رنگ، عطر و بو، طعم و احساس دهان و امتیاز کل مورد سنجش قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصل هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در هر یک از شاخص‌های نامبرده مشاهده نشد(P>۰/۰۵) ولی با این وجود ارزیابی‌ها حاکی از مقبولیت بالاتر نمونه کفیر گاوی در قیاس با شیر سویای تخمیری می‌باشد.

**Table 2- Comparison of sensory characteristics of cow kefir and fermented soybean milk samples**

| | Soy Milk | Cow Milk |
|---|---|---|
| General appearance | 7.22±1.71 | 8±1.41 |
| Color | 7.33±1.58 | 7.71±1.7 |
| Fragrance | 7.33±1.58 | 7.71±2.13 |
| Taste | 7.33±1.58 | 7.71±2.13 |
| Mouth feel | 7.33±1.85 | 7.57±2.14 |
| Total score | 17.66±2.23 | 18±3.05 |

**بحث**

طی سال‌های اخیر، آگاهی عمومی جدیدی در مورد نیاز به کاهش یا جایگزینی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها با محصولات طبیعی ایجاد شده است. گزارش‌های زیادی در مورد فعالیت ضدباکتریایی کفیر شیر گاو و میکروارگانیسم‌های موجود در آن وجود دارد (روزا و همکاران ۲۰۱۷ و گاروت و همکارات ۲۰۰۰ و کاراسی و همکاران ۲۰۱٤ و سانتوس و همکاران ۲۰۰۳ و سیلوا و همکاران ۲۰۰۹چیفیریوک و همکاران ۲۰۱۱). کفیر شیر گاو فعالیت ضد باکتریایی را در برابر سویه‌های مختلف *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، گونه‌های سالمونلا، *شیگلا سونئی*، *شیگلا فلکسنری*، *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* نشان داد (گاروت و همکاران ۲۰۰۰).

فعالیت ضدباکتریایی نوشیدنی تخمیری به ترکیبات موجود در این نوشیدنی مرتبط است. همچنین گزارش شده است که ترکیبات موجود در نوشیدنی کفیر تحت تأثیر نوع سوبسترا یا شیر (شیر سویا در مطالعه حاضر)، شرایط تخمیر، منشاء دانه کفیر و شرایط نگهداری است (روزا و همکاران ۲۰۱۷).

رشد دانه‌های کفیر در محیط‌های کشت مختلف، به حضور و میزان سوبستراهای مورد نیاز برای رشد میکروارگانیسم‌های موجود در دانه‌های کفیر از جمله پروتئین و کربوهیدرات وابسته است. شیر سویا دارای کربوهیدارتهای مختلف است که مهمترین آنها ساکاروز، رافینوز و استاکیوز می‌باشند، درحالیکه در شیر گاو لاکتوز کربوهیدارت اصلی است (پینتونگ و همکاران ۱۹۸۰).

از مکانیسمهای فعالیت ضدباکتریایی عصاره های کفیر، می‌توان به pH اسیدی، در نتیجه تخمیر لاکتوز یا سوبستراهای جایگزین و افزایش محتوای اسیدهای آلی، همچون اسید لاکتیک، اسید استیک و ... توسط میکروارگانیسم‌های موجود در دانه‌های کفیر اشاره کرد (کورکوتاس و همکاران ۲۰۰۷).

اسید لاکتیک از طریق غشاء سیتوپلاسمی نفوذ می‌کند و باعث اسیدی شدن سیتوپلاسم و مهار فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. در pH داخل سلولی بیشتر اسیدها منجر به تولید یون‌های هیدروژن می‌شوند که با اعمال متابولیکی مهم همچون فسفریلاسیون اکسیداتیو تداخل می‌کنند و باعث مهار گونه‌های هوازی می‌شوند. علاوه بر این، مشخص شده است که اسید لاکتیک و استیک وقتی در عصاره کفیر با هم تولید می‌شوند، اثر هم‌افزایی در مهار میکروارگانیسم‌های مضر دارند که به تاثیر اسید استیک در کاهش بیشتر pH مربوط می‌شود (فارنورث ۲۰۰۵).

در مطالعه حاضر، حضور ساکاروز در شیر سویا بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تاثیر معناداری داشت و نمونه های کفیر تهیه شده با شیر سویا دارای ساکاروز فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نشان دادند. این افزایش فعالیت ضدباکتریایی در نمونه‌های تهیه شده حاوی ساکاروز می‌تواند به محتوای بالای اسیدهای آلی ناشی از تخمیر این کربوهیدرات توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، که نقش مهمی در فعالیت ضدباکتریایی ایفاء می کند، نسبت داده شود. افزودن کربوهیدرات‌ها توانایی میکروارگانیسم‌های دانه‌های کفیر را برای تولید اسید لاکتیک در شیر سویا بهبود می‌بخشد. در مطالعاتی تعداد لاکتوباسیلهای بیشتر در نمونه‌های نوشیدنی‌های کفیر بر پایه شیر سویا، با درصد بالایی از شیر سویا گزارش شد (لیو و لین ۲۰۰۰ و سیلوا و همکاران ۲۰۱۸). لیو و لین (۲۰۰۰) نشان دادند که افزودن ۱ درصد گلوکز یا لاکتوز به شیر سویا منجر به تولید اسید لاکتیک با غلظتی مشابه با غلظت آن در کفیر حاصل از شیر گاو می‌شود و نشان می‌دهد که افزودن این کربوهیدرات‌ها توانایی میکروارگانیسم‌های دانه‌های کفیر را برای تولید اسید لاکتیک در شیر سویا بهبود می‌بخشد (لیو و لین ۲۰۰۰).

گامبا و همکاران (۲۰۲۰) فعالیت ضدباکتریایی هر دو کفیر تهیه شده از شیر سویا و شیر گاو را علیه *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را گزارش کردند. البته محتویات میکروبی بین کفیر شیر گاو و شیر سویا متفاوت گزارش شد. کفیر شیر گاو یک ترکیب معمولی از باکتریهای

اسید لاکتیک، باکتریهای اسید استیک و مخمرها را نشان داد، در حالی که هیچ باکتری اسید استیکی در کفیر شیر سویا شمارش نشد. دلیل این تفاوت‌ها به غلظت کربوهیدرات و قندهای کمتر در شیر سویا ارتباط داده شد. چون غلظت قند در شیر سویا کمتر است، تعداد مخمرهای موجود در کفیر شیر سویا کمتر بود، در نتیجه اتانول کمتری تولید می شود و چون باکتریهای اسید استیک اتانول را به اسید استیک اکسید می‌کنند، در کفیر حاصل از شیر سویا حضور نداشتند. در این مطالعه افزایش قابل توجهی در اسیدهای لاکتیک و استیک بدون توجه به نوع شیر مشاهده شد که نشان دهنده رشد شدید میکروبی است که با مصرف کربوهیدرات‌های موجود در شیر گاو و شیر سویا پشتیبانی می‌شود. قندهایی که بیشترین مصرف را داشتند لاکتوز برای کفیر شیر گاو و ساکارز برای کفیر شیر سویا بودند. بنابراین، ترکیب قند می‌تواند عامل مهمی در انتخاب میکروب‌های در حال رشد در هر نوشیدنی کفیر باشد. نکته قابل توجه، یک اشکال در ساخت کفیر از تخمیر شیر سویا می تواند این باشد که دومین قند اصلی، استاکیوز (٤٤ درصد کل قندها)، توسط میکروارگانیسمهای کفیر استفاده نمی شود، که ممکن است فعالیت میکروبی در کفیر شیر سویا را محدود کند (گامبا و همکاران ۲۰۲۰). البته بائو و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که میکروب‌های کفیر در شیر سویا رافینوز و استاکیوز را مصرف می‌کنند. این تفاوتها ممکن است به منشاء دانه‌های سویا مربوط شود (بائو و همکاران ۲۰۱۵).

علاوه بر نقش اسیدهای آلی در فعالیت ضدباکتریایی، فعالیت ضدمیکروبی نوشیدنی کفیر با تولید پپتیدها (باکتریوسین‌ها)، دی‌اکسیدکربن، پراکسید هیدروژن، اتانول و دی‌استیل ارتباط دارد (اولیویرا لیته و همکاران ۲۰۱۳). علاوه بر این ترکیبات، اگزوپلی‌ساکارید تولید شده بوسیله دانه‌های کفیر به نام کفیران نیز دارای فعالیت‌های ضدباکتریایی می باشد (وانگ و همکاران ۲۰۰۸ و پرادو و همکاران ۲۰۱۵).

کفیران یک گلوکوگالاکتان منشعب است که که از مقادیر یکسان D-گالاکتوز و D-گلوکز تشکیل شده است. کفیران حدود ٢٤ درصد وزن دانه‌های کفیر را تشکیل می‌دهد و تولید آن بیشتر توسط گونه‌های *لاکتوباسیلوس کفیرانوفاسینس* و *لاکتوباسیلوس کفیر* صورت می‌گیرد (شن و همکاران ۲۰۱۸). مکانیسم پیشنهادی برای فعالیت ضدمیکروبی کفیران، اختلال در غشای سلولی از طریق تشکیل منافذ و اثرات شبه دترژنتی می باشد (باربوسا و همکاران ۲۰۱۱).

تولید کفیران می‌تواند به طور چشم‌گیری با کنترل شرایط کشت و اصلاح ترکیب واسطه، افزایش یابد، همچنین افزایش دانه‌های کفیر و تولید کفیران با اضافه کردن منابع معدنی تحریک می‌شود (فرنگوا و همکاران ۲۰۰۲ و ژاسک و گورسک ۲۰۱۱).

به این واسطه تفاوت‌های موجود در فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های مختلف را می‌توان به نوع شیر یا سوبسترای مورد استفاده، تفاوت‌های موجود در شرایط تخمیر از قبیل زمان، تخمیر، دما، درجه همزن، نوع شیر، نسبت تلقیح دانه‌ها همچنین pH و البته حساسیت سویه‌های مختلف باکتریایی نسبت داد (راترای و اوکونل ۲۰۱۱ و سیموا و همکاران ۲۰۰۲ و تمیم ۲۰۰٦).

باکتریوسین‌ها پروتئین‌هایی هستند که توسط میکروارگانیسم‌های یک سویه تولید می‌شوند و در برابر میکروارگانیسم‌های یک سویه نزدیک فعال هستند، اما می‌توانند علیه سایر گونه‌های غیر مرتبط نیز عمل کنند (احمد و همکاران ۲۰۱۷). مکانیسم‌های مختلفی برای فعالیت ضدباکتریایی این ترکیبات پروتئینی ذکر شده است. باکتریوسین‌ها ممکن است در DNA، RNA، سنتز ATP یا مهار سنتز پروتئین، اختلال در غشاء و پتانسیل‌های یونی نقش داشته باشند (بیادالا و همکاران ۲۰۲۰ و سزاز و گوون ۲۰۰۹).

تفاوت حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به نمونه‌های کفیر را می‌توان به تفاوت‌های موجود در پوشش سلولی و ترکیبات دیواره باکتری نسبت داد. باکتری‌های گرم مثبت دارای دیواره متفاوت از باکتری‌های گرم منفی می‌باشند. ترکیب اصلی دیواره سلولی در باکتری‌های گرم مثبت، پپتیدوگلیکان می‌باشد در حالیکه میزان پپتیدوگلیکان در باکتری‌های گرم منفی بسیار کم می‌باشد و بخش اعظم دیواره سلولی از غشاء خارجی حاوی ترکیبات لیپیدی تشکیل شده است و این ساختار در دیواره سلولی گرم مثبت‌ها دیده نمی‌شود (سیلهاوی و همکاران ۲۰۱۰ و بلایر و همکاران ۲۰۱۵).

یک گام ضروری برای فعالیت ضد باکتریایی عبور از غشاء خارجی است که در باکتری‌های گرم منفی همچون *اشریشیا کلی* وجود دارد. مقاومت باکتریهای گرم منفی از جمله *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* می‌تواند به دلیل نفوذپذیری کمتر غشای خارجی این باکتری به عنوان یک باکتری گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت باشد که ورود عوامل ضدمیکروبی را به داخل سلول باکتری محدود می‌کند (نیکایدو ۲۰۰۹).

یکی از مهمترین مکانیسم‌های فعالیت ضدمیکروبی کفیر، کاهش pH به واسطه تولید اسیدهای آلی از جمله اسید لاکتیک و اسید استیک می‌باشد که این کاهش pH از مهمترین مکانیسم‌های در فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد (شن و همکاران ۲۰۱۸)، با این وجود فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر علیه باکتریهای گرم منفی را می‌توان به تاثیر اسید لاکتیک تولید شده بر نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی نسبت داد. آلاکومی و همکاران (۲۰۰۰) تاثیر اسیدلاکتیک بر نفوذپذیری غشای خارجی *اشریشیا کلی* O157: H7، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا انتریکا* سروار تیفی‌موریوم را مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند که اسید لاکتیک علاوه بر خاصیت ضدمیکروبی خود به‌دلیل کاهش PH، به‌عنوان یک نفوذکننده غشای خارجی باکتری گرم‌منفی نیز عمل می‌کند و ممکن است به عنوان تقویت‌کننده اثرات سایر مواد ضدمیکروبی عمل کند (آلاکومی و همکاران ۲۰۰۰).

با وجود اینکه بیشتر مطالعات به نقش اسیدهای آلی در فعالیت ضدباکتریایی کفیر علیه باکتری‌های گرم منفی اشاره دارند، ولی فعالیت ضدباکتریایی باکتریوسین‌های تولید شده به‌وسیله میکروبیوتا دانه‌های کفیر و اگزوپلی‌ساکارید کفیران علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی در مطالعات مختلف گزارش شده است (گونزالس اوروزکو و همکاران ۲۰۲۲).

با این وجود، نسبت دادن اثرات بازدارندگی تنها به یکی از ترکیبات تولید شده توسط میکروبیوتای کفیر دشوار است. علاوه بر این، همانطور که توسط سیلوا و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شده است، غلظت‌های مختلف منبع کربن و زمان‌های مختلف تخمیر دانه‌های کفیر بر مهار میکروارگانیسم‌های بیماری زا تأثیر می‌گذارد (۲۰۰۹).

علاوه بر این، همانطور که توسط کیم و همکاران (۲۰۱٦) گزارش شده است، ترکیبات بازدارنده مختلف می‌توانند در شرایط مختلف تخمیر وجود داشته باشند (کیم و همکاران ۲۰۱٦). کیم و همکاران اثرات ضدباکتریایی کفیر از منابع مختلف را در زمان‌های مختلف تخمیر علیه برخی از عوامل بیماری‌زای موادغذایی را آزمون کردند و فعالیت ضدباکتریایی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از ٤٨ ساعت تخمیر و *سالمونلا انتریتیدیس* در ٣٦ و ٧٢ ساعت تخمیر، اما نه در ٤٨ ساعت را گزارش کردند (کیم و همکاران ۲۰۱٦). عجم و کوهساری (۲۰۲۰) نیز نشان دادند که شرایط تخمیر از جمله دمای تخمیر، زمان تخمیر، نوع شیر و حتی شرایط همزدن بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تاثیر دارد و نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر پرچرب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد همراه با همزدن به مدت ٤٨ ساعت برای باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *شیگلا دیسانتری* و *باسیلوس سرئوس* و به مدت ۷۲ ساعت برای *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان دادند (عجم و کوهساری، ۲۰۲۰).

بنابراین، با توجه به اینکه نوشیدنی کفیر حاوی ترکیبات بازدارنده متفاوتی است، چنین فرض می‌شود که این ترکیبات برای تقویت یا تضاد با اثرات ضدباکتریایی خود با یکدیگر تعامل دارند. نمونه‌ای از این مکانیسم می‌تواند غیرفعال شدن باکتریوسین‌ها توسط اسیدهای آلی یا تجزیه آنزیمی در طی تخمیر باشد (گونزالس اوروزکو و همکاران ۲۰۲۲).

البته مقاومت ذاتی برخی از گرم مثبت‌ها مثل *انتروکوکوس فکالیس* نسبت به عوامل ضدمیکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها نیز قابل توجه می باشد و اثبات شده است. این مقاومت با وجود ژن‌های متعدد مرتبط با مقاومت دارویی در کروموزوم یا پلاسمید و تعداد متنوعی از استراتژی‌های ژنتیکی از جمله تغییر اهداف دارویی، غیرفعال‌سازی عوامل ضدمیکروبی، بیان بیش از حد پمپ‌های خروجی و پاسخ تطبیقی پیچیده پوشش سلولی حاصل می‌شود (پنتی و همکاران ۲۰۲۱ و میلر و همکاران ۲۰۱٤).

تفاوت در نتایج مطالعه حاضر با دیگر مطالعات ممکن است به دلیل تفاوت در منشاء کفیر مورد آزمون باشد. تفاوت در فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر با منشاء مختلف در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (آندرسون و گیلیلند ۱۹۹۹ و پینتادو و همکاران ۱۹۹٦). تفاوتهای منطقه‌ای و شرایط تخمیر می‌تواند تنوع میکروبی در دانه‌های کفیر را تغییر دهد و تنوع میکروبی مسئول فعالیتهای بیولوژیکی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی است (کوختین و همکاران ۲۰۱۸). بسته به منشأ منطقه‌ای دانه‌های کفیر، تنوع میکروبی آنها متفاوت است و بنابراین، فعالیت ضد باکتریایی آن نیز تغییر می‌کند (آلتای و همکاران ۲۰۱۳ و ژائو و همکاران ۲۰۱۲ و ژیانژونگ و همکاران ۲۰۰۹ و کابک و دابسون ۲۰۱۱).

در مطالعه دادخواه و همکاران (۲۰۱۱) با تغییر دمای نگهداری؛ میزان لاکتوباسیل‌های شیر سویای تخمیری با دانه‌های کفیر تغییر معنی‌داری پیدا کرد ($P<0/05$) بطوریکه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین میزان لاکتوباسیل‌ها مشاهده شد و این میزان در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد با کاهش معنی داری مواجه شد که در تحقیق حاضر نیز غالبا در دمای بالاتر حداکثر مهار میکروبی مشاهده گردید (دادخواه و همکاران ۲۰۱۱).

ارزیابی‌های حسی حاکی از این بود که نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا در مقایسه با نمونه‌های کفیر حاصل از شیر گاو امتیاز کلی کمتری را به دست آورد.

در مطالعه سیلوا و همکاران (۲۰۱۸)، ارزیابی حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا نشان داد که نمونه‌های با درصد شیر سویا بالاتر (٤۰ درصد) کمترین مقبولیت را داشت (سیلوا و همکاران ۲۰۱۸). محصولات با درصد بالاتر سویا به دلیل طعم خاص آن که به عنوان "لوبیا خام" شناخته می‌شود، اغلب کمتر مورد پذیرش مصرف کنندگان قرار می گیرند (ویانا و همکاران ۲۰۱۸).

تمایل مشابهی در نوشیدنی‌های پروبیوتیک تولید شده توسط کمپکا و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده شد، که فرمول ایده آل آن شیر سویا (۳۰/۱ درصد)، سرم شیر (۳۳/۳ درصد) و شیر گاو (۳٦/٦ درصد) برای پذیرش حسی خوب و تعداد سلول‌های زنده بالاتر بود (کمپکا و همکاران ۲۰۰۸).

در طی فرآیند تخمیر، اسیدهای آلی (لاکتیک و استیک) محصولات اصلی هستند که اسید استیک به شدت با طعم نامطبوع سرکه همراه است. وجود اسید لاکتیک در نوشیدنی‌های تخمیری مطلوب‌تر است زیرا توضیح داده شده است که طعم مناسب را تضمین می‌کند و طعم "ترش ملایم" را در بر می‌گیرد (استروهله و همکاران ۲۰۰٦).

## نتیجه گیری

نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا فعالیت ضدباکتریایی را نشان دادند و افزودن ساکاروز در افزایش فعالیت ضدباکتریایی موثر می‌باشد. فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر سویا علیه باکتری‌های گرم منفی همچون *شیگلا دیسانتری*، *سودوموناس آئروژینوزا* و ایزوله بومی و سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* دارای اهمیت می‌باشد و استفاده از این نوشیدنی تخمیری با منشاء گیاهی را به عنوان جایگزین نوشیدنی‌های گازدار با محتوای قند بالا مطرح می‌سازد.

## References


Ahmad V, Khan MS, Jamal QMS, Alzohairy MA, Al Karaawi MA and Siddiqui MU, 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: In therapy, agriculture and food preservation. International Journal of Antimicrobial Agents 49: 1-11.

Ajam F and Koohsari H, 2020. Effect of some fermentation conditions on antibacterial activity of fermented milk by kefir grains. Journal of Food Processing and Preservation 44 (12): e14913.

Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K and Helander IM, 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. Applied and environmental microbiology 66 (5): 2001-2005.

Altay F, Karbancıoglu-Guler F, Daskaya-Dikmen C and Heperkan D, 2013. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. International Journal of Food Microbiology 167: 44–56.

Anderson JW and Gilliland SE, 1999. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus L1* on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. Journal of the American College of Nutrition 18: 43-50.

Barbosa AF, Santos PG, Lucho AMS and Schneedorf JM, 2011. Kefiran can disrupt the cell membrane through induced pore formation. Journal of Electroanalytical Chemistry 653: 61-66.

Ba´u TR, Garcia S and Ida EI, 2015. Changes in soymilk during fermentation with kefir culture: oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. International Journal of Food Sciences and Nutrition 66: 845–850.

Biadała A, Szablewski T, Lasik-Kurdys M and Cegielska-Radziejewska R, 2020. Antimicrobial activity of goat's milk fermented by single strain of kefir grain microflora. European Food Research and Technology 246: 1231-1239.

Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO and Piddock LJ, 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology 13 (1): 42-51.

Carasi P, Diaz M, Racedo SM, De Antoni G, Urdaci MC and Serradell ML, 2014. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefiri*," BioMed Research International 2014: Article ID e208974.

Chifiriuc MC, Cioaca AB and Lazar V, 2011. In vitro assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. Anaerobe 17:433-435.

Dadkhah SH, Pourahmad R, Mazaheri Assadi M, Moghimi A, 2011. Kefir production from soymilk. Annals of Biological Research 2 (6): 293-299.

Dinua M, Abbatea R, Gensinia GF, Casinia A and Sofi F, 2017. Vegetarian, vegan diets and multiple health outcomes: A systematic review with meta-analysis of observational studies. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57: 3640–3649.

Farnworth ER, 2005. Kefir. A complex probiotic. Food Science Technology, Bulletin. 2: 1-17.

Frengova GI, Simova ED, Beshkova DM and Simov ZI, 2002. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains, Zeitschrift für Naturforschung C 57: 805-810.

Fuller R, 1989. Probiotics in man and animals; A review. Journal of Applied Bacteriology 66: 365-378.

Gamba RR, Yamamoto S, Abdel-Hamid M, Sasaki T, Michihata T, Koyanagi T and Enomoto T, 2020. Chemical, Microbiological, and Functional Characterization of Kefir Produced from Cow's Milk and Soy Milk. International Journal of Microbiology 2020: Article ID 7019286.

Gao J, Gu F, Abdella N, Ruan H, and He G, 2012. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China. Journal of Food Science 77: 425-433.

Garbers IM, Britz TJ, Witthuhn RC, 2004. PCR-based denaturing gradient gel electrophoretictypification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 687-693.

Garrote GL, Abraham AG, and De Antoni GL, 2000. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. Journal of Food Protection 63 (3): 364-369.

González-Orozco BD, García-Cano I, Jiménez-Flores R, and Alvárez VB, 2022. Invited review: Milk kefir microbiota—Direct and indirect antimicrobial effects. Journal of Dairy Science 105 (5): 3703-3715.

Jayachandran M and Xu B, 2019. An insight into the health benefits of fermented soy products. Food Chemistry 271: 362-371.

Jianzhong Z, Xiaoli L, Hanhu J and Mingsheng D, 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. Food Microbiology 26: 770-775.

Kabak B and Dobson A, 2011. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 51(3): 248-60.

Kempka AP, Krüger RL, Valduga E, Di Luccio M, Treichel H, Cansian R and Oliveira D, 2008. Formulation of a peach-flavored dairy drink using alternative substrates and probiotic culture. Food Science and Technology 28: 170-177.

Kim DH, Jeong D, Kim H, Kang IB, Chon JW, Song KY and Seo KH. 2016. Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. Korean journal for food science of animal resources 36 (6): 787-790.

Kourkoutas Y, Sipsas V, Papavasiliou G and Koutinas AA, 2007. An economic evaluation of freeze-dried kefir starter culture production using whey. Journal of Dairy Science 90: 2175-2180.

Kukhtyn M, Vichko O, Horyuk Y, Shved O and Novikov V, 2018. Some probiotic characteristics of a fermented milk product based on microbiota of ‘‘Tibetan kefir grains’’ cultivated in Ukrainian household. Journal of Food Science and Technology 55: 252-257.

La Riviere JWM, Kooiman P, Schmidt K, 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. Arch. Mikrobiology 59: 269-278.

Liu JR, Lin CW, 2000. Production of Kefir from Soymilk with or Without Added Glucose, Lactose, or Sucrose. Journal of Food Science 65 (4): 716-719.

Nikaido H, 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiology and molecular biology reviews 67 (4): 593-656.

Oliveira Leite AM, Lemos Miguel MA, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT and Paschoalin VMF, 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. Brazilian Journal of Microbiology 44 (2): 341-349.

Pintado ME, Lopes Da Silva JA, Fernandes PB, Malcata FX and Hogg TA, 1996. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. International journal of Food Science and Technology 31: 15-26.

Pinthong R, Macrae R and Dick J, 1980. The development of a soya- based yogurt. III. Analysis of oligosaccharides. International journal of Food Science and Technology 15: 661-667.

Pop C, Apostu S, Salanta L, Rotar AM, Sindic M, Mabon N and Socaciu C, 2014. Influence of Different Growth Conditions on the Kefir Grains Production, used in the Kefiran Synthesis. Bulletin UASVM Food Science and Technology 71(2): 147-153.

Prado MR, Blandon LM, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-soccol V and Soccol CR, 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. Frontiers in Microbiology 6: 1-10.

Rattray FP, O’Connell MJ, 2011. Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences (2th ed). Academic Press, San Diego, USA, Pp.518-524.

Rosa DD, Dias MM S, Grze´SkoŁ Wiak M, Reis SA, Conceição LL and Peluzio MDCG, 2017. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. Nutrition Research Reviews 30 (1): 82-96.

Sezer C and Guven A, 2009. Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria ısolated from foods. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi 15: 45-50.

Shen Y, Kim DH, Chon JW, Kim H, Song KY and Seo KH, 2018. Nutritional effects and antimicrobial activity of kefir (grains). Journal of Milk Science and Biotechnology 36: 1-13.

Silhavy TJ, Kahne D and Walker S, 2010. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2(5): a000414.

Silva CFG, Santos FL, de Santana LRR, Silva MVL and Conceicao TDA, 2018. Development and characterization of a soymilk Kefir-based functional beverage. Food Science and Technology Campinas 38(3): 543-550.

Silva KR, Rodrigues SA, Filho LX and Lima AS, 2009. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. Applied Biochemistry and Biotechnology 152: 316-325.

Simova E, Beshkova D, Angelov A, Hristozova T, Frengova G and Spasov Z, 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 28: 1-6.

Stroehle L, Zweytick G and Berghofer E, 2006. Sauerkraut fermentation with L (+)-lactic acid producing bacteria. Ernaehrung 30(1): 293-303.

Tamime AY, 2006. Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: Tamime, AY (ed.), Fermented Milk Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, Pp.174-216.

Viana JV, Cruz AG, Zoellner SS, Silva R and Batista ALD, 2011. Probiotic foods: consumer perception and attitudes. International Journal of Food Science & Technology 43(1): 1577-1580.

Wang Y, Ahmed Z, Feng W, Li C and Song S, 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. International Journal of Biological Macromolecules 43: 283-288.

Weinstein MP, Patel JB, Burnham CA, Campeau S, Conville PS, Doern C, … Zimmer BL, 2018. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In Clinical and laboratory standard institute (Vol. M07, 11th ed., pp. 15–35). Pennsylvania, USA. Wayne.

Zajšek K and Goršek A, 2011. Experimental assessment of the impact of cultivation conditions on kefiran production by the mixed microflora imbedded in kefir grains. Chemical Engineering Transactions 24: 481-486.