

Research Article

Kefir 유래 유산균 *Lactiplantibacillus pentosus* Strains의 다제내성균에 대한 항균효과

이정은¹ · 김진홍² · 국무창^{3*}

¹경기대학교 대학원 대체의학과, ²(주)더가든오브내추럴솔루션, ³배화여자대학교 식품영양학과

Antimicrobial Effect of *Lactiplantibacillus pentosus* Strains Isolated from Kefir against Multidrug-Resistant Bacteria

Jeong-Eun Lee¹, Jin-Hong Kim², and Moochang Kook^{3*}

¹Department of Alternative Medicine, Kyonggi University, Seoul 03746, Republic of Korea

²The Garden of Natural Solution, Gyeonggi-do 18103, Republic of Korea

³Department of Food & Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 03039, Republic of Korea

Received: Dec. 6, 2021

Revised: Dec. 23, 2021

Accepted: Dec. 27, 2021

*Corresponding author :

Moochang Kook

Department of Food & Nutrition,

Baewha Women's University,

Seoul 03039, Republic of Korea

Tel: +82-2-399-0765

Fax: +82-2-737-6711

E-mail: bmse153@gmail.com

ORCID

Jeong-Eun Lee

<https://orcid.org/0000-0002-7442-7045>

Jin-Hong Kim

<https://orcid.org/0000-0002-2763-3163>

Moochang Kook

<https://orcid.org/0000-0003-4098-8298>

Abstract

In this study, the inhibitory effect of *Lactiplantibacillus pentosus* BMSE-K006 and K009 against multidrug-resistant strains, such as *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., was to be confirmed. The antimicrobial effect of *L. pentosus* BMSE-K006 was confirmed higher than *L. pentosus* BMSE-K009, except for *Escherichia coli* 1507 CCARM 0236. This study can verify the remarkable antimicrobial effect of LAB isolated from kefir against multidrug-resistant strains, and it is considered that additional studies on the characteristics and safety of probiotics are needed.

Keywords

kefir, lactic acid bacteria, antimicrobial effect

서론

Kefir는 여러 종의 박테리아와 효모가 존재하는 kefir grain을 발효하여 얻어지는 acidic-alcoholic 발효유이다(Leite *et al.*, 2013; Prado *et al.*, 2015). Kefir grain에는 10^8 cfu/g의 lactic acid bacteria(LAB), 10^5 cfu/g의 acetic acid bacteria 및 10^6 - 10^7 cfu/g의 효모가 존재하며, kefir에서 가장 흔히 발견되는 박테리아는 *Lactobacillus*(Lb) spp., *Lactococcus*(Lc) spp., *Streptococcus* spp. 및 *Leuconostoc* spp. 등이 있다(Garrote *et al.*, 2010; Bourrie *et al.*, 2016). 이처럼 kefir는 안전하고 잠재적으로 유익한 균주의 저장소 역할을 할 뿐만 아니라, 다양한 미생물 구성으로 인해 probiotics 자원으로 간주된다(Prado *et al.*, 2015; Bengoa *et al.*, 2018).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

최근 연구된 kefir 유래 유산균으로는 *Lc. lactis*, *Lb. kefir*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*(Gamba *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009), *Lc. kefiranoferiens*(Maeda *et al.*, 2004), *Lc. cremoris*, *Lc. lactis*, *S. thermophilus*, *S. durans*(Yüksekdağ *et al.*, 2004) 등이 있으며, 그 중 *Lactobacillus* spp.는 kefir grain의 우세한 종으로 알려져 있다(Slattey *et al.*, 2019). Kefir 내 미생물 조성은 원산지, 발효과정에서 사용되는 기질, 배양조건 및 저장 및 가공 과정 등에 크게 의존하여 달라질 수 있으며(Garrote *et al.*, 2010; Bourrie *et al.*, 2016; Bengoa *et al.*, 2018), kefir의 영양성분 또한 발효 시 사용되는 우유, kefir grain 내 미생물 조성, 발효시간 및 온도, 보관조건에 따라 달라진다(Rosa *et al.*, 2017). Kefir에는 다양한 유산균과 대사산물이 존재하여 콜레스테롤 수치 감소(Vujičić *et al.*, 1992), 항균 및 항진균(Cevikbas *et al.*, 1994), 대장암(Khoury *et al.*, 2014), 피부암(Nagira *et al.*, 2002) 등 광범위한 건강상의 이점을 제공하는 것으로 알려져 있으며(Bourrie *et al.*, 2016), kefir 뿐만 아니라, kefir 유래 유산균 또한 총 콜레스테롤 및 중성지방 감소(Maeda *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009), 항균 및 항진균(Yüksekdağ *et al.*, 2004), 면역 및 종양세포 억제(Yamane *et al.*, 2018), 항산화, 항알레르기 및 종양억제(Slattey *et al.*, 2019) 등에 대한 효능이 연구된 바 있다. 한편, 최근 항생제의 사용빈도와 농도의 증가 및 무분별한 항생제 사용으로 인한 다제내성(multidrug-resistance, MDR) bacteria가 출현하여 전 세계적인 문제로 대두되었다(Moon *et al.*, 2006; Shin, 2017). 이에 본 연구에서는 항생제 내성 균주의 문제를 예방 및 해결하기 위해 선행된 Lee 와 Kook(2021)의 연구에서 분리한 kefir 유래 유산균 *Lb. pentosus* BMSE-K006과 *Lb. pentosus* BMSE-K009의 후속 연구로써 다제내성 균에 대한 항균효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

다제내성 균에 대한 항균활성 측정

항균활성 측정에 사용된 지시균주는 다제내성 균주를 포함하여 *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp. 등 총 7주로 각 균주와 항생제 정보는 서울여자대학교로부터 제공받아 사용하였다(Table 1). 항균활성 측정에 사용된 지시균주는 각각 Luria-Bertani broth (Difco Co., Sparks, MD, USA), Tryptone Soy Broth(Difco)에 2% (v/v) 접종하여 37℃에서 18시간 배양 후, 배양액과 0.85% NaCl을 1:9 (v/v)수준에서 연속적으로 희석하여 최종 지시균주의 균수를 10⁶ CFU/mL로 조정된 균액을 실험에 사용하였다. 다제내성 균주의 항균활성은 disk diffusion 방법을 사용하여 측정하였

Table 1. List of indicator strains

	Strains	Collection no.	Culture media	Antibiotics resistant ¹⁾
Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM 11335	TSB	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> 285	CCARM 0204	TSB	Amp, Nor, GM
	<i>Staphylococcus aureus</i> 503	CCARM 0205	TSB	Amp, Nor, GM
Gram-	<i>Escherichia coli</i>	KCTC 2571	LB	-
	<i>Escherichia coli</i> 078	CCARM 0230	LB	Amp, Nor, GM
	<i>Escherichia coli</i> DC 0	CCARM 0237	LB	Amp, Nor, GM
	<i>Escherichia coli</i> 1507	CCARM 0236	LB	Amp, Nor, GM

¹⁾ AMP; ampicillin, Nor; norfloxacin, GM; gentamycin.

으며, clear zone의 크기가 15mm 이상이면 +++, 10-15mm는 ++, 10mm 미만일 경우 +로 판별하였다. 본 연구의 모든 항균활성 측정에는 유산균을 MRS broth에 2% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후 5분간 원심분리(13,000 × g) 하여 상등액을 취해 0.2 µm membrane filter(Hyundai micro Co.)로 여과한 것을 시료로 사용하였다.

최소저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)와 최소살균농도(Minimum bactericidal concentration, MBC) 측정

MIC 및 MBC 측정에는 다제내성 균을 포함하는 그람 양성균 *Staphylococcus* spp., 그람 음성균 *Escherichia* spp. 등 7주를 대상으로 측정하였으며, 지시 균주는 각각 TSB 및 LB broth에 2% (v/v) 수준으로 접종하여 37℃에서 18시간 배양 후, 최종 지시균주의 균수를 10⁶ CFU/mL로 조정된 균액을 실험에 사용하였다. MIC 및 MBC는 Wiegand *et al.*(2008)의 액체배지 희석법(broth dilution method)을 이용하여 확인하였다. 96-well microplate (cell culture plate, SPL Life Sciences, Korea)에 액체배지와 시료를 첨가하여 2-fold dilution하여 지시 균주를 분주하고, 37℃에서 18시간 배양하여 생육 저해정도를 확인하였다. 이후, TSA, LB agar plate에 희선도말하여 37℃에서 24시간 배양 후, 콜로니 생성이 저해되는 최소농도를 최소저해농도(MIC), 콜로니 생성이 확인되지 않는 농도를 최소살균농도(MBC)로 설정하였다. 농도는 유



산균 배양액 내 단백질 함량(mg/mL)으로 표기하였으며, 유산균 배양액의 단백질 정량은 BCA protein assay kit(TakaRa Bio Inc., Japan)를 이용하여 BCA(bicinchoninic acid) protein assay를 시행하였으며, bovine serum albumin(BSA)을 이용하여 정량하였다.

통계분석

본 연구에서는 모든 실험을 3회 이상 반복 수행하였으며, 결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Science, Ver. 20, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계분석하였다. 각 실험군에 대한 유의적 차이는 독립표본 t-test를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검토하였다.

결과 및 고찰

다제내성 균에 대한 항균활성

유산균은 젖산(lactic acid), 박테리옌(bacteriocin) 및 과산화수소(hydrogen peroxide) 등에 의해 항균효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Mezaini *et al.*, 2009). Lee와 Kook(2021)은 항균효과가 우수한 균주를 선별하기 위해 kefir 유래 유산균 6주의 그람 양성균 및 그람 음성균에 대한 항균 효과를 확인하였으며, 그 중 *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 우수한 항균효과를 보고하였다. 이에 본 연구에서는 *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 후속 연구로서 *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp. 등 총 5주의 다제내성 균주에 대한 항균효과를 확인하였다(Table 2).

그 결과, *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009는 다제내성균 중 그람 음성균 *Staphylococcus* spp.보다 그람 음성균 *Escherichia* spp.에서 억제효과가 더 큰 것으로 확인되었

다. 본 연구의 disk diffusion 방법에 의한 다제내성 균주에 대한 항균효과는 그람 양성균 및 그람 음성균 모두에서 다소 낮은 활성을 보였으나, Chifiriuc *et al.*, (2011)은 *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp. 등에 대한 kefir의 우수한 항균효과와 kefir 내 probiotics에 의한 넓은 항균 스펙트럼을 보고하였다. Abriouel *et al.*, (2011)이 분리한 *L. pentosus* MP-10 균주 또한 *Salmonella* spp.과 *S. aureus* 및 *E. faecalis*에 대한 항균효과를 보고한 바 있으며, 최근 Dai *et al.*, (2021)은 *L. pentosus*가 생산하는 bacteriocin의 그람 양성균과 그람 음성균에 대한 광범위한 항균 활성을 입증하였다. 본 연구결과는 *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 다제내성 균주에 대한 항균효과를 입증하는 데 의의를 둘 수 있으며, 그람 양성 및 그람 음성균 모두 억제하는 효과가 있음을 확인하여 *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 유용 유산균 자원으로써 가치가 있을 것으로 판단된다.

MIC 및 MBC 측정

Lee와 Kook(2021)의 연구에서는 분리한 kefir 유래 유산균 *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp. 등 지시균주 7주에서 우수한 항균효과가 있음을 보고하여, 본 연구에서는 다제내성 균주를 포함하여 지시균주 총 7주에 대한 항균효과를 확인하였다. *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009는 다제내성 균주 중 그람 양성 및 그람 음성균 모두 억제하는 효과를 확인할 수 있었으며, 이에 다제내성균을 포함한 *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp. 등 7주에 대한 최소저해농도(MIC)와 최소살균농도(MBC)를 측정하였다(Table 3). 그 결과, *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 모두 그람 음성균에 대한 MIC(>3.13-6.25 mg/mL) 및 MBC(6.25-12.50 mg/mL)가 그람 양성균에 대한 MIC(>3.13-12.50 mg/mL) 및 MBC(6.25-25.00 mg/mL)보다 더 우수한 것으로 나타났다.

그람 양성균인 *S. aureus* KCCM 11335의 경우, *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 MIC는 >12.50 mg/mL, MBC는 25.00 mg/mL로 나타났으며, 다제내성 균주인 *S. aureus* 285 CCARM 0204와 *S. aureus* 503 CCARM 0205의 경우, *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 MIC는 각각 >3.13 mg/mL, >6.25 mg/mL, MBC는 각각 6.35 mg/mL, 12.50 mg/mL로 나타나, *L. pentosus* BMSE-K009 보다 *L. pentosus* BMSE-K006의 항균효과가 더 우수한 것으로 확인되었다. 그람 음성균인 *E. coli* KCTC 2571, *E. coli* 078 CCARM 0230의 경우, *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus*

Table 2. Antimicrobial effects of *Lactiplantibacillus pentosus* BMSE-K006 and K009 against multidrug-resistant bacteria

	Strains	K006	K009
Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i> 285 CCARM 0204	+	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> 503 CCARM 0205	+	+
Gram-	<i>Escherichia coli</i> 078 CCARM 0230	w	w
	<i>Escherichia coli</i> DC 0 CCARM 0237	+	+
	<i>Escherichia coli</i> 1507 CCARM 0236	+	+

1) -: negative, w; weak positive, +; < 10mm.

Table 3. Determination for MIC and MBC of *Lactiplantibacillus pentosus* BMSE-K006 and K009 against multidrug-resistant bacteria

	Strains	MIC ¹⁾ (mg/mL)		MBC ²⁾ (mg/mL)	
		K006	K009	K006	K009
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11335	>12.50	>12.50	25.00	25.00
	<i>Staphylococcus aureus</i> 285 CCARM 0204	>3.13 ^{***3)}	>6.25	6.35 ^{***}	12.50
	<i>Staphylococcus aureus</i> 503 CCARM 0205	>3.13 ^{***}	>6.25	6.25 ^{***}	12.50
Gram -	<i>Escherichia coli</i> KCTC 2571	>3.13 ^{***}	>6.25	6.25 ^{***}	12.50
	<i>Escherichia coli</i> 078 CCARM 0230	>3.13 ^{***}	>6.25	6.25 ^{***}	12.50
	<i>Escherichia coli</i> DC 0 CCARM 0237	>3.13	>3.13	6.25	6.25
	<i>Escherichia coli</i> 1507 CCARM 0236	>6.25	>3.13 ^{***}	12.5	6.25 ^{***}

¹⁾ MIC; minimum inhibitory concentration,

²⁾ MBC; minimum bactericidal concentration,

³⁾ Data showed mean of MIC and MBC. *p* values refer to the analysis by unpaired t-test. ****p*<0.05: K006 vs K009 by unpaired t-test.

BMSE-K009의 MIC는 각각 >3.13 mg/mL, >6.25 mg/mL, MBC는 각각 6.25 mg/mL, 12.50 mg/mL로 나타나, *L. pentosus* BMSE-K009 보다 *L. pentosus* BMSE-K006의 항균효과가 더 우수한 것으로 확인되었다. 다제내성 균주 *E. coli* DC 0 CCARM 0237의 경우, *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 MIC는 모두 >3.13 mg/mL, MBC는 6.25 mg/mL로 동일하였으며, *E. coli* 1507 CCARM 0236의 경우, *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 MIC는 각각 >6.25 mg/mL, >3.13 mg/mL, MBC는 각각 12.50 mg/mL, 6.25 mg/mL로 나타나, *L. pentosus* BMSE-K009의 항균효과가 더 우수한 것으로 확인되었다. 따라서, 본 연구에서는 kefir 유래 유산균 *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 다제내성 균주에 대한 우수한 항균효과를 입증할 수 있는 기초자료가 될 것으로 판단된다.

요약

본 연구에서는 선행연구를 통해 병원성 박테리아의 억제효과가 입

증된 kefir 유래 유산균 *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009의 다제내성 균주를 포함하는 *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp. 등 총 7주에 대한 억제효과를 확인하고자 하였다. *L. pentosus* BMSE-K006과 *L. pentosus* BMSE-K009는 대체로 다제내성 균주 중 그람 음성균에 대한 억제효과가 더 큰 것으로 확인되었으며, *E. coli* 1507 CCARM 0236을 제외한 모든 지시 균주에서 *L. pentosus* BMSE-K009보다 *L. pentosus* BMSE-K006의 항균효과가 더 우수한 것으로 확인되었다. 본 연구는 kefir 유래 유산균의 다제내성 균주에 대한 우수한 항균효과를 입증할 수 있는 기초자료가 될 수 있으며, 추후 probiotics 특성 및 안전성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Acknowledgments

본 연구는 2019년도 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단 이공분야 기초연구사업의 지원으로 수행되었다(과제번호: NRF-2019R1FA105839).

References

- Abriouel H, Benomar N, Pulido RP, Cañamero MM, and Gálvez A (2011) Annotated genome sequence of *Lactobacillus pentosus* MP-10, which has probiotic potential, from naturally fermented aloréña green table olives. *J. Bacteriol.* **193**, 4559-4560.
- Bengoa AA, Iraporda C, Garrote GL, and Abraham AG. (2018) Kefir micro-organisms: Their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *J. Appl. Microbiol.* **126**, 686-700.
- Bourrie BCT, Willing BP, and Cotter PD (2016) The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Front. Microbiol.* **7**, 647.
- Cevikbas A, Yemni E, Ezzedenn FW, Yardimici T, Cevikbas U, and Stohs S (1994) Antitumoural anti-bacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytother. Res.* **8**, 78-82.
- Chifiriuc MC, Cioaca AB, and Lazar Y (2011). *In vitro* assay of the antimicrobial activity of kefir against bacterial and fungal strains. *Anaerobe* **17**, 433-435.
- Dai M, Li Y, Xu L, Wu D, Zhou Q, Li P, and Gu Q (2021) A novel bacteriocin from *Lactobacillus pentosus*



- ZFM94 and its antibacterial mode of action. *Front. Nutr.* **8**, 710862.
7. 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. *Int. J. Microbiol.* **2020**.
8. Garrote GL, Abraham AG, and De Antoni GL (2010) Microbial interactions in Kefir: A natural probiotic drink. *Biotechnology of Lactic acid Bacteria: Novel Applications*. pp. 327-340.
9. Khoury N, El-Hayek S, Tarras O, El-Sabban M, El-Sibai M, and Rizk S (2014) Kefir exhibits antiproliferative and proapoptotic effects on colon adenocarcinoma cells with no significant effects on cell migration and invasion. *Int. J. Oncol.* **45**, 2117-2127.
10. Kim DH, Jeong DA, Kim HS, Kang IB, Chon JW, Song KY, and Seo KH (2016) Antimicrobial activity of Kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. *Food Sci. Anim. Resour.* **36**, 787-790.
11. Lee JE and Kook MC (2021) Antimicrobial and anti-oxidant effects of lactic acid bacteria *Lactiplantibacillus pentosus* strains derived from Kefir. *Resour. Sci. Res.* **3**, (accepted).
12. Leite AMdeO, Miguel MAL, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT, and Paschoalin VMF (2013) Microbiological, technological and therapeutic properties of Kefir: A natural probiotic beverage. *Braz. J. Microbiol.* **44**, 341-349.
13. Maeda H, Zhu X, Suzuki S, Suzuki K, and Kitamura S. (2004) Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2BT. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5533-5538.
14. Mezaini A, Chihib NE, Bouras AD, Nedjar-arroume N, and Hornez JP (2009) Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. *J. Environ. Public Health.* **2009**, 678495.
15. Moon BY, Lee SK, and Park JH (2006) Antibiotic resistant characteristics of *Bifidobacterium* from Korean intestine origin and commercial yogurts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**, 313-316.
16. Nagira T, Narisawa J, Teruya K, Katakura Y, Shim SY, Kusumoto K, Tokumaru S, Tokumaru K, Barnes DW, and Shirahata S (2002) Suppression of UVC-induced cell damage and enhancement of DNA repair by the fermented milk, Kefir. *Cytotechnology* **40**, 125-137.
17. Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, and Soccol CR (2015) Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front. Microbiol.* **30**, 1177.
18. Rosa DD, Dias MMS, Grześkowiak LM, Reis SA, Conceição LL, and Peluzio M do CG (2017) Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr. Res. Rev.* **1**, 82-96.
19. Shin EJ (2017) Antimicrobials and antimicrobial resistant superbacteria. *Ewha Med. J.* **40**, 99-103.
20. Slattery C, Cotter PD, and O'Toole PW (2019) Analysis of health benefits conferred by *Lactobacillus* species from Kefir. *Nutrients.* **11**, 1252.
21. Vujičić IF, Vulić, M, and Könyves T (1992) Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnol. Lett.* **14**, 847-850.
22. Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z, Zhang B, and Bai X (2009) Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet Kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 341-347.
23. Wiegand I, Hilpert K, and Hancock RE (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* **3**(2), 163-175.
24. Yamane T, Sakamoto T, Nakagaki T, and Nakano Y (2018) Lactic acid bacteria from Kefir increase cytotoxicity of natural killer cells to tumor cells. *Foods* **7**, 48.
25. Yüksesdağ ZN, Beyatli Y, and Aslim B (2004) Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *J. WT-Food Sci. Technol.* **37**, 663-667.