



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

서 론

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. kefiri*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*(Gamba *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009), *Lc. kefiranofaciens*(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 전세계적인 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°C에서 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°C에서 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°C에서 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°C에서 18시간 배양하여 생육 저해정도를 확인하였다. 이후, TSA, LB agar plate에 희석도말하여 37°C에서 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), 박테리오신(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 alorña 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 antibacterial 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. *Food* **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.