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

هادی کوهساری[1]*، سیده ثریا سجادی[2]، عراز سلطان ساعدی فر[2]، مریم صادق شش پلی[3]

[1] دانشیار گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران
[2] دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد مینودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مینودشت، ایران
[3]دانش آموخته دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
* نویسنده مسئول: *hadikoohsari@yahoo.com*

چکیده

نوشیدنی کفیر از قدیمی‌ترین محصولات تخمیری شیر است که پروبیوتیک طبیعی و کمپلکسی از یک مجموعه همزیستی میکروبی است که از تخمیر شیر به‌وسیله دانه‌های کفیر حاصل می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه‌شده با شیر گاو علیه ۱۰ باکتری بیماری‌زا می‌باشد. دانه‌های کفیر به شیر گاو (پرچرب و کم چرب) افزوده و عمل تخمیر در ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. دانه‌ها از عصاره کفیر جدا و فعالیت ضدباکتریایی عصاره کفیر علیه ۱۰ باکتری بیماریزا با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با نمونه‌های ۲۵ درجه سانتیگراد فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و ایزوله بومی *کلبسیلا پنومونیه*، نشان دادند. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر علیه *انتروکوکوس فکالیس* و *شیگلا دیسانتری* مربوط به نمونه‌های تهیه‌شده با شیر کم‌چرب در دمای ۳۷ درجه به‌ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۸/۵ و ۱۲/۵ میلیمتر بود. نمونه‌های تهیه‌شده با شیر پرچرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به‌ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۲۲ و ۱۹ میلیمتر، فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* نشان دادند. درخصوص *اشریشیا کلی* اعم از ایزوله بومی و سویه استاندارد و *سالمونلا تیفی موریوم*، اختلاف معناداری از نظر تاثیر نوع شیر و دمای تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی در بین تیمارها مشاهده نشد ($P>0/05$). *باسیلوس سرئوس* مقاومت قابل‌ملاحظه‌ای نسبت به نمونه‌های کفیر از خود نشان داد. باتوجه به فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه‌های کفیر تهیه‌شده با شیر گاو استفاده از این نوشیدنی تخمیری توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: کفیر، فعالیت ضد باکتریایی، شیر گاو، باکتریهای بیماریزا

مقدمه

تاریخچه استفاده از میکروارگانیسم های زنده در غذا به ویژه باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک به منظور حفظ و بهبود سلامت انسان بسیار طولانی است. فرآورده های لبنی اولین نوع از محصولات پروبیوتیکی بوده اند که مورد استفاده بشر قرار گرفته اند. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به مقدار کافی از آن ها مصرف می شود اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارد (Fuller, 1989). پروبیوتیک ممکن است یک سویه واحد، یا مجموعه ای از میکروارگانیسمهای مختلف باشد که میتوانند از طریق فعالیتهای سیستم ایمنی ، فعالیت های متابولیک و مانع در برابر فرآیندهای پاتولوژیک، باعث افزایش سلامتی شود. کفیر مثالی از یک پروبیوتیک است که انواع مختلفی از باکتری های و مخمرها در آن حضور دارند (Simova, et al., 2002).

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 سیستم ایمنی بدن، متعادل کردن فشار خون، درمان بیماریهای گوارشی و کاهش سطح کلسترول سرم می‌شود و همچنین دارای فعالیتهای ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضدتوموری می باشد (Farnworth, 2005).

طیف وسیعی از ترکیبات فعال زیستی از جمله اسیدهای آلی، CO2، پراکسید هیدروژن، اتانول، پپتیدهای فعالی زیستی، اگزوپلی‌ساکاریدهایی مانند کفیران، باکتریوسین ها از تخمیر دانه های کفیر تولید می شوند که به طور مستقل یا با یکدیگر مزایای سلامتی مختلفی مرتبط با مصرف کفیر را باعث می شوند. محصولات اصلی تخمیر کفیر، اسید لاکتیک، اتانول، و CO2 هستند که ویسکوزیته، اسیدیته و مقدار کم الکل این نوشیدنی را مهیا می کنند. اجزای جزئی از جمله دی استیل ، استالدهید، اتیل و اسیدهای آمینه نیز به طعم این نوشیدنی تخمیری کمک می کنند (Rattray and O'Connel, 2011).

در طـی فرایند تخمیر باکتری های لاکتیک موجود در دانه هـای کفیر، اسید لاکتیک و مخمرها الکل و دی اکسـید کـربن تولید مینمایند. مقادیر اسید لاکتیک، الکل و دی اکسـیدکربن موجود در کفیر تحت تاثیر زمان و درجه حرارت گرمخانه گذاری تغییر می کند (Robinson, 1991).

دانه‌های کفیر، دانه‌های ژله مانندی شبیه گل‌کلم کوچک هستند. 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 (LaRivière, et al. 1967; Farnworth, 2005).

دانه‌های کفیر وقتی به شیر تازه منتقل می شوند، زنده می مانند و در این مدت تقریباً ۲۰ ساعت رشد می کنند و جرم آنها ۲۵ درصد افزایش می یابد (Farnworth, 2005).

دانه های کفیر نمونه ای از همزیستی بین مخمر و باکتریها است. میکرو فلور دانه‌های کفیر به‌طور قابل‌توجهی پایدار است و اگر تحت شرایط کشت و فیزیولوژیکی مناسب نگهداری و انکوبه شود، فعالیت خود را برای سال‌ها حفظ می‌کند. نسبت دانه به شیر، زمان و دما انکوبه گذاری، بهداشت در حین جداسازی دانه های کفیر، شستشوی دانه ها و نگهداری در سرما، همه به شدت بر کیفیت محصول و میکرو فلور دانه های کفیر تأثیر می گذارد (Gao and Li, 2016).

میکروارگانیسم های رایج جدا شده از دانه های کفیر در مناطق مختلف تفاوت هایی با هم دارند. باکتری‌های دانه‌ها معمولاً گونه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک از جنس های لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس، استرپتوکوکوس و لوکونوستوک هستند. همچنین باکتری های اسید استیک و گونه های استوباکتر در کنار مخمرهایی از جنس ساکارومایسس، کاندیدا، کلویورومایسس، زیگوساکارومایسس، رودوتورولا از میکروفلور موجود در دانه های کفیر می باشند. ترکیب میکروبی کلی کفیر پیچیده است و مشخص است که از منطقه ای به منطقه دیگر متفاوت است. محیط کشت نگهداری و شرایط نگهداری از عوامل اصلی منجر به تنوع میکروبی دانه های کفیر است (Schwan et al., 2014).

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 قابل توجهی را به خود جلب کرده‌اند (Kourkoutas, et al., 2007).

ظرفیت تولید مثلی دانه های 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 (Pop, et al., 2014).

ماده خام اصلی کفیر، شیر گاو است. این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو علیه ۱۰ باکتری بیماریزا شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسانتری*، *انتروکوکوس فکالیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیا کلی* (ایزوله بومی و سویه استاندارد) و *کلبسیلا پنومونیه* (ایزوله بومی و سویه استاندارد)، انجام شد.

مواد و روش کار

آماده سازی عصاره‌های کفیر

دانه های کفیر از فروشگاه پربیوتیک تهیه شد و فرایند احیاء و تخمیر دانه مطابق روش ارائه شده توسط عجم و کوهساری (۲۰۲۰) انجام شد. بطور خلاصه دانه ها با ساب کالچرهای متوالی در شیر به مدت ۴ روز در ۲۵ درجه سانتیگراد احیاء شدند. شیر هر ۲۴ ساعت تعویض گردید. پس از احیاء، دانه های کفیر با آب مقطر استریل شسته شدند و ۵ گرم از آن‌ها به ۵۰ میلی لیتر شیر گاو پرچرب (۳/۲۵ درصد) و کم چرب (۱ درصد) تلقیح شد و در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از بازه زمانی تخمیر (۴۸ ساعت) دانه های کفیر از محصول تخمیری جدا شدند. عصاره های کفیر تا زمان انجام آزمون های فعالیت ضدباکتریایی در دمای یخچال نگهداری شدند. (Ajam and Koohsari, 2020)

آماده سازی سویه های باکتریایی مورد آزمون

فعالیت ضدباکتریایی نمونه های 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 تیفی موریوم* (PTCC 1596)، *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC 1811) و *کلبسیلا پنومونیه* (ایزوله بومی و سویه استاندارد PTCC 1290) و سه باکتری گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1154) و *انتروکوکوس فکالیس* (PTCC 1778) بودند. سویه های استاندارد به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گنبدکاووس در محیط BHI و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد احیاء شدند. آنگاه چند کلنی یک دست از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری به محیط کشت نوترینت براث تلقیح شد و در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد تا کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند حاصل شود ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) (Weinstein, et al., 2018).

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 مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ 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 عصاره های کفیر در داخل چاهک‌ها ریخته و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری های مورد آزمون تعیین شد .(Weinstein, et al., 2018)

تجزیه و تحلیل آماری

متغیرهای مستقل تحقیق شامل نوع کفیر (نمونه های کفیر تهیه شده از شیر گاو پرچرب و کم چرب)، دمای تخمیر (۲۵ و۳۷ درجه سانتیگراد) و نوع باکتری بیماری‌زا (۱۰ گونه باکتری) و متغیر وابسته تحقیق فعالیت ضدباکتریایی (قطر هاله عدم رشد هر یک از باکتریهای بیماری زا در مواجه با نمونه‌های کفیر) نمونه‌های کفیر تهیه شده می باشند. 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 نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت پذیرفت.

نتایج

فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو علیه باکتری های مورد آزمون

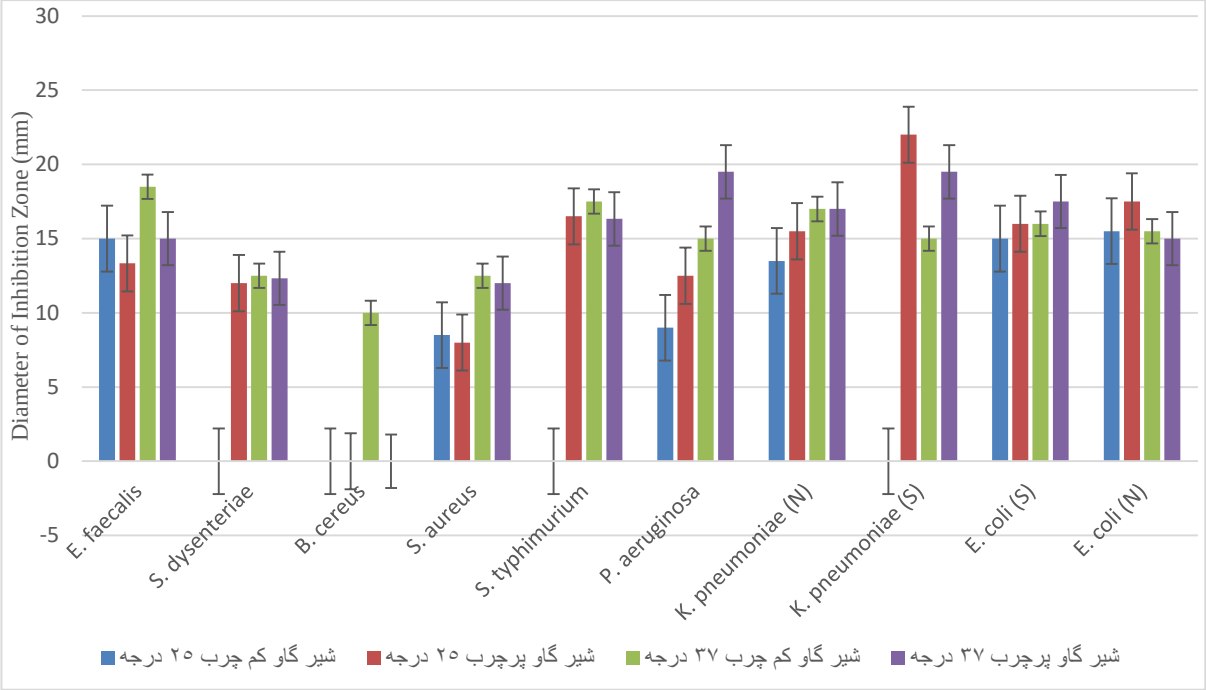
جدول ۱ و شکل ۱ میانگین قطر هاله عدم رشد باکتریهای مورد آزمون را در مواجهه با نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو را نشان می دهد که حاکی از فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو است.

جدول ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتریهای مورد آزمون در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو

	شیر گاو پرچرب ۳۷ درجه	شیر گاو کم چرب ۳۷ درجه	شیر گاو پرچرب ۲۵ درجه	شیر گاو کم چرب ۲۵ درجه	سطح معنی داری
انتروکوکوس فکالیس	۱۵±۱^{bcB}	۱۸/۵± ۱/۵^{aA}	۱۳/۳۳± ۰/۳۳ ^{dB}	۱۵± ۱^{abB}	**۰/۴۳**
شیگلا دیسانتری	۱۲/۳۳± ۰/۳۳ ^{cA}	۱۲/۵± ۰/۵^{cdA}	۱۲± ۰^{dA}	-	**۰/۶۶**
باسیلوس سرئوس	–	۱۰± ۰^{dA}	-	-	-
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲± ۰/۵۷^{cA}	۱۲/۵± ۰/۵^{cdA}	–	۸/۵± ۰/۵^{cB}	**۰/۰۱**
سالمونلا تیفی موریوم	۱۶/۳۳± ۳/۲۱ ^{abA}	۱۷/۵± ۰/۵^{abA}	۱۶/۵± ۰/۵^{bcA}	–	**۰/۹۷**
سودوموناس آئروژینوزا	۱۹/۵± ۱/۵^{aA}	۱۵± ۱^{bcB}	۱۲/۵±۰/۵^{dC}	۹± ۰^{cD}	**۰/۰۰**
کلبسیلا پنومونیه (سویه استاندارد)	۱۹/۵± ۰/۵^{aA}	۱۵± ۱^{bcB}	۲۲± ۱^{aA}	-	**۰/۰۲**
کلبسیلا پنومونیه (ایزوله بومی)	۱۷± ۱^{abA}	۱۷± ۱^{abA}	۱۵/۵± ۰/۵^{cAB}	۱۳/۵± ۰/۵^{bB}	**۰/۰۹**
اشریشیا کلی (ایزوله بومی)	۱۵±۱^{bcA}	۱۵/۵± ۰/۵^{bA}	۱۷/۵± ۰/۵^{bA}	۱۵/۵± ۰/۵^{aA}	**۰/۳۸**
اشریشیا کلی (سویه استاندارد)	۱۷/۵± ۰/۵^{abA}	۱۶± ۰^{abA}	۱۶± ۰^{bcA}	۱۵± ۰^{abA}	**۰/۱۳**
سطح معنی داری	۰/۰۳	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	

میانگین±انحراف معیار. حروف غیرمشابه کوچک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد ($P\leq ۰/۰۵$).

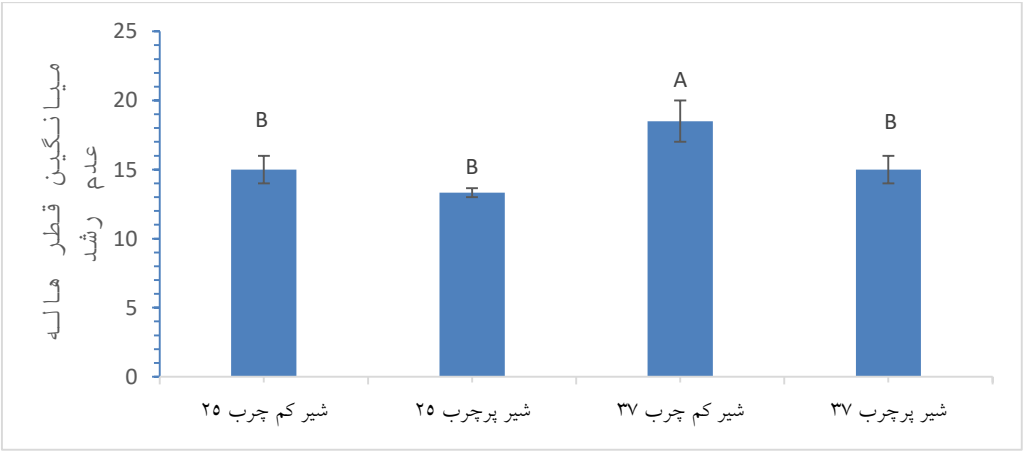
میانگین±انحراف معیار. حروف غیرمشابه بزرگ در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد ($P\leq ۰/۰۵$).



شکل ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتریهای مورد آزمون در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو

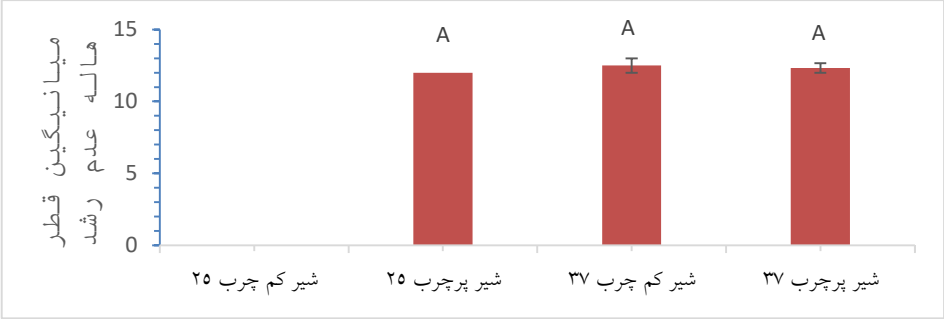
همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود، نتایج مربوط به تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتریهای *انتروکوکوس فکالیس* و *شیگلا دیسانتری* حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد (P>۰/۰۵). (شکل ۲و ۳).

بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر علیه *انتروکوکوس فکالیس* و *شیگلا دیسانتری* مربوط به نمونه های کفیر تهیه شده با شیر کم چرب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۸/۵ و ۱۲/۵ میلیمتر بود (جدول ۱).



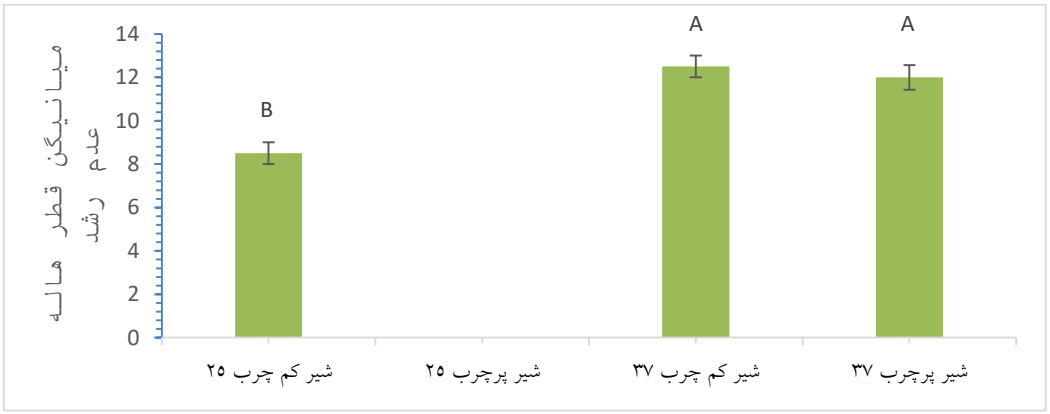
شکل ۲. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتری *انتروکوکوس فکالیس*

(حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد (P≤۰/۰۵).)

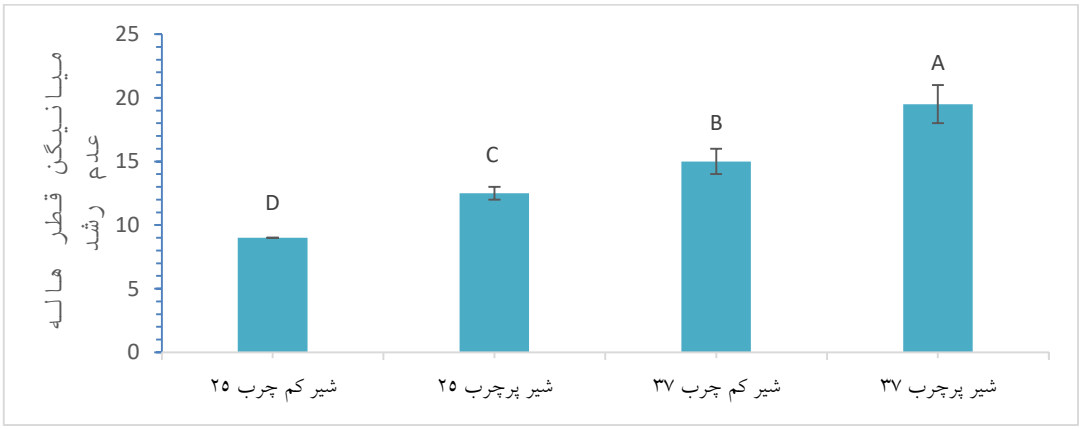


شکل ۳. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتری *شیگلا دیسانتری*
(حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد (P≤۰/۰۵).)

یافته های مربوط به باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها را نشان داد (P<۰/۰۵) (جدول ۱). همانطور که مشاهده می شود نمونه های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به نمونه های تهیه شده در ۲۵ درجه سانتیگراد نشان دادند که حاکی از تاثیر دمای تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر می باشد (شکل ۴ و ۵).

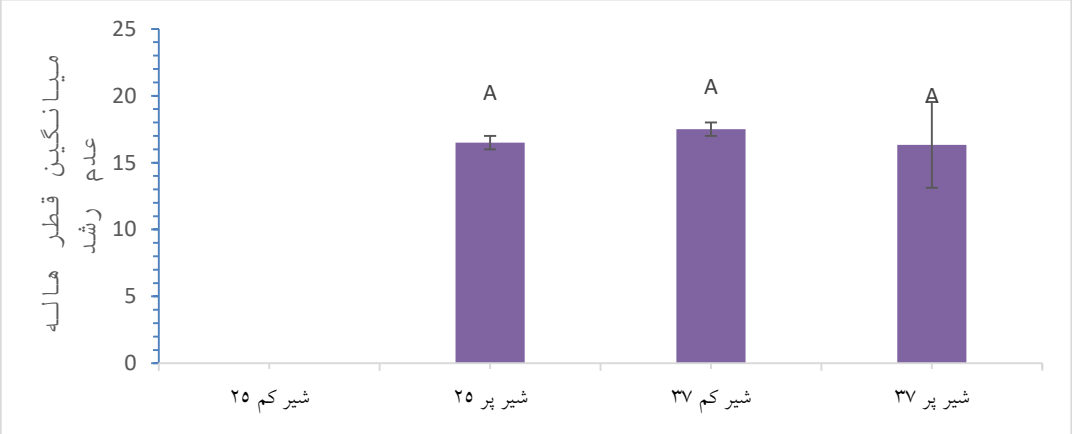


شکل ۴. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*
(حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد (P≤۰/۰۵).)



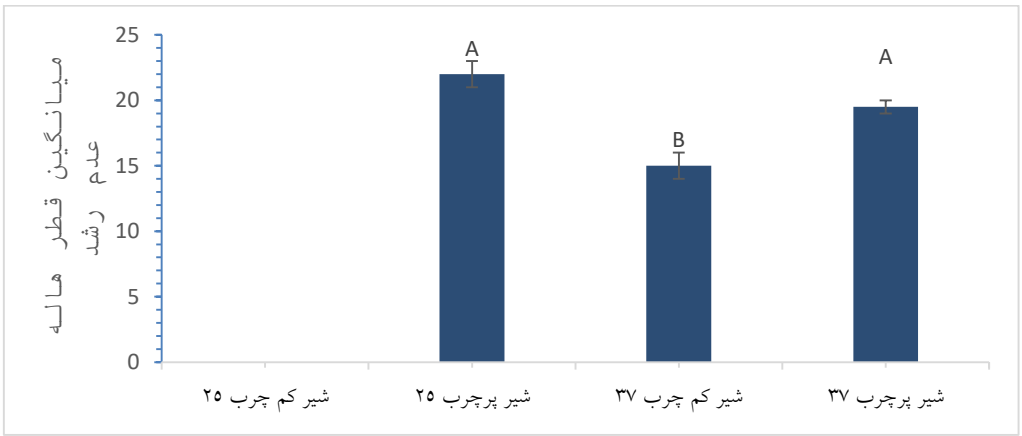
شکل ۵. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*
(حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد (P≤۰/۰۵).)

بر اساس نتایج جدول ۱، در خصوص باکتری *سالمونلا تیفی موریوم*، اختلاف معنی داری در بین تیمارهای حاضر مشاهده نشد (P>۰/۰۵). نوع شیر و دمای تخمیر تاثیری بر فعالیت ضدباکتریایی علیه این باکتری گرم منفی نداشت. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه این باکتری در نمونه کفیر تهیه شده با شیر کم چرب و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۷/۵ میلیمتر مشاهده شد (جدول ۱).

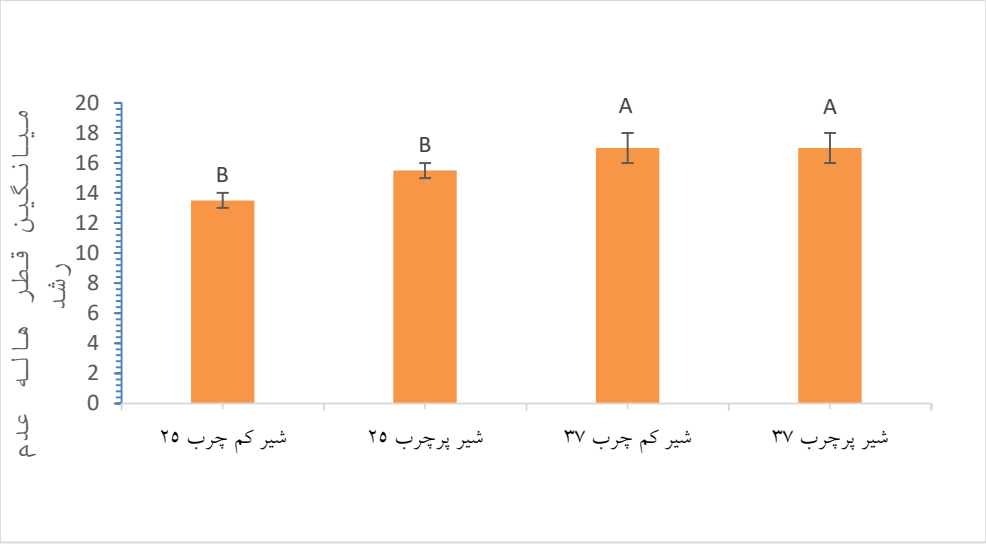


شکل ۶. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر باکتری سالمونلا تیفی موریوم
(حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد (P≤۰/۰۵).)

نتایج مربوط به سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* بیانگر تاثیر نوع شیر بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر می‌باشد (P<۰/۰۵) بطوریکه نمونه های تهیه شده با شیر پرچرب فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نشان دادند. قطر هاله عدم رشد ۲۲ و ۱۹ میلیمتر به ترتیب در نمونه‌های تهیه شده در شیر پرچرب ۲۵ و ۳۷ درجه حاکی از این تاثیر قابل توجه است (جدول ۱). تاثیر معنادار دمای تخمیر در فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده علیه ایزوله بومی این باکتری مشهود است (P<۰/۰۵). بطوریکه فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بطور معنی داری بیشتر از فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده در ۲۵ درجه سانتیگراد می باشد (شکل ۸).



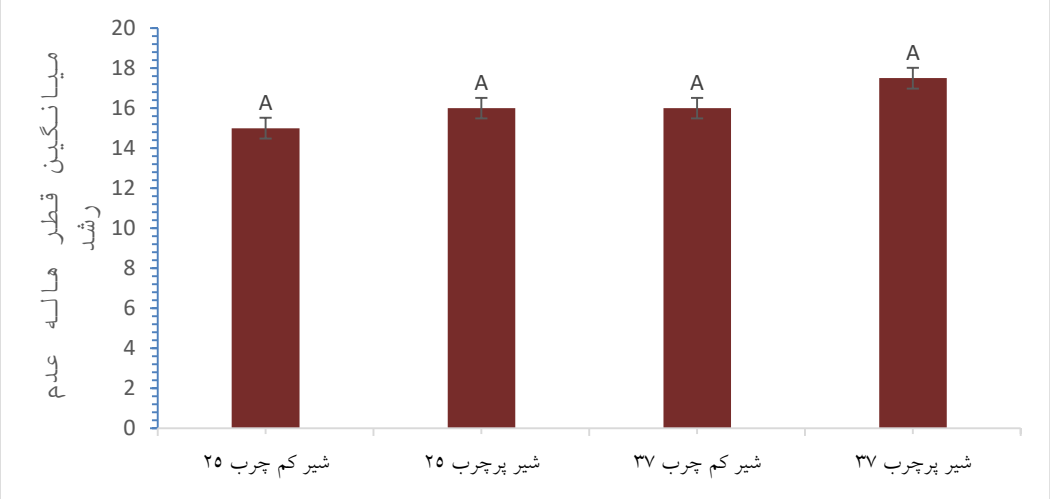
شکل ۷. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه*
(حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد (P≤۰/۰۵).)



شکل ۸. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر ایزوله بومی *کلبسیلا پنومونیه*

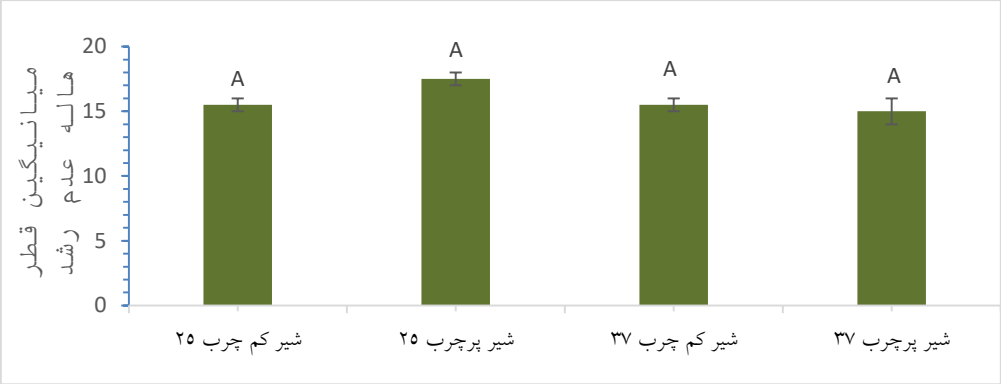
(حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد (P≤۰/۰۵).)

در خصوص باکتری *اشریشیا کلی* اعم از ایزوله بومی و سویه استاندارد، اختلاف معناداری از نظر تاثیر نوع شیر و دمای تخمیر در بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). (شکل ۹ و ۱۰). با این وجود بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه ایزوله بومی و استاندارد *اشریشیا کلی* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۷/۵ میلیمتر در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر پرچرب در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد مشاهده شد (جدول ۱).



شکل ۹. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر سویه استاندارد *اشریشیا کلی*

(حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد (P≤۰/۰۵).)



شکل ۱۰. تاثیر نمونه های کفیر حاصل از شیر کم چرب و پر چرب در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه بر ایزوله بومی *اشریشیا کلی*
(حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد (P≤۰/۰۵).)

در بین باکتریهای مورد آزمون، *باسیلوس سرئوس* به عنوان یک باکتری گرم مثبت عامل مسمومیت های غذایی، مقاومت قابل توجهی نسبت به عصاره نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو از خود نشان داد، بطوریکه فقط نمونه کفیر تهیه شده با شیر گاو کم چرب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۰ میلیمتر توانست از رشد این باکتری جلوگیری کند.

بحث

نتایج حاکی از فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو علیه باکتریهای مورد آزمون است. این فعالیت ضدباکتریایی را می توان ناشی از تولید اسید لاکتیک و دیگر ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده به وسیله باکتریهای اسید لاکتیک موجود در دانه های کفیر دانست (Kourkoutas, et al., 2007).

فعالیت ضدمیکروبی عصاره کفیر در مطالعات متعددی گزارش شده است (Santos, et al., 2003; Silva, et al., 2009; Chifiriuc, et al., 2011; Garrote, et al., 2000). این مطالعات نشان می دهد که کفیر یک نوشیدنی ضد میکروبی است. و این فعالیت ضدمیکروبی با تولید اسیدهای آلی، پپتیدها (باکتریوسین ها)، دی اکسید کربن، پراکسید هیدروژن، اتانول و دی‌استیل ارتباط دارد (Oliveira Leite, et al., 2013). علاوه بر این ترکیبات، اگزوپلی ساکارید تولید شده بوسیله دانه های کفیر به نام کفیران نیز دارای فعالیت های ضدباکتریایی می باشد (Wang, et al., 2008; Prado et al., 2015). این ترکیبات نه فقط در فعالیت ضدمیکروبی علیه پاتوژن های گوارشی در طی تولید و نگهداری نوشیدنی تاثیر دارند، همچنین در درمان و پیشگیری از عفونت های گوارشی، گاستروانتریت و عونت های واژینال موثرند (Farnworth, 2005; Sarkar, 2007).

از مکانیسمهای فعالیت ضدباکتریایی عصاره های کفیر، می توان به pH اسیدی، در نتیجه تخمیر لاکتوز و افزایش محتوای اسیدهای آلی، همچون اسید لاکتیک، اسید استیک و ... توسط میکروارگانیسم‌های موجود در دانه های کفیر اشاره کرد.

اسید لاکتیک از طریق غشاء سیتوپلاسمی نفوذ می کند و باعث اسیدی شدن سیتوپلاسم و مهار فعالیت آنزیم ها می شود. در pH داخل سلولی بیشتر اسیدها منجر به تولید یون های هیدروژن می شوند که با اعمال متابولیکی مهم همچون فسفریلاسیون اکسیداتیو تداخل می کنند و باعث مهار گونه های هوازی می شوند. علاوه بر این، مشخص شد که اسید لاکتیک و استیک وقتی در عصاره کفیر با هم تولید می شوند، اثر مهاری هم افزایی عالی دارند و این اثر به تقویت اسید استیک در کاهش pH توسط اسید لاکتیک مربوط می شود (Farnworth., 2005).

تصور می شود که باکتریوسین ها با خراب کردن (corrupting) یون پتاسیم و ATP، پتانسیل غشاها را تغییر می دهند و باعث می شوند سلول ها نتوانند pH داخل سلول را متعادل کنند (Sezer and Guven, 2009).

میکروارگانیسم‌های موجود در دانه‌های کفیر به وسیله ماتریکس پروتئینی و پلی ساکاریدی به نام کفیران احاطه شده‌اند. کفیران یک گلوکوگالاکتان منشعب محلول در آب است که از مقادیر یکسان D-گالاکتوز و D-گلوکز تشکیل

شده است. تولید کفیران بیشتر توسط گونه های *لاکتوباسیلوس کفیرانوفاسینس* و *لاکتوباسیلوس کفیر* صورت می‌گیرد. فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدتوموری نوشیدنی کفیر را به کفیران نسبت می‌دهند. 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 (Frengova, et. al., 2002; Zajšek and Goršek., 2011).

به این واسطه تفاوتهای موجود در فعالیت ضدباکتریایی نمونه های مختلف را می توان به تفاوتهای موجود در شرایط تخمیر و نوع شیر مورد استفاده و البته حساسیت سویه های مختلف باکتریایی نسبت داد.

نقش های بیولوژیک این نوشیدنی تخمیری به ترکیبات موجود در محصول نهایی، میکروارگانیسمهای موجود در دانه های کفیر و ترکیبات حدواسط ناشی از متابولیسم آنها مربوط می شود. تفاوت در مقدار و نوع این میکروارگانیسمها و ترکیبات حدواسط با شرایط تخمیر از قبیل زمان، تخمیر، دما، درجه همزن، نوع شیر، نسبت تلقیح دانه ها همچنین pH و حساسیت های سویه های مختلف باکتریایی به آن ارتباط دارد (Rattray and O'Connel, 2011; Simova, et al., 2002; Tamime, 2006).

در مطالعه Ajam and Koohsari (۲۰۲۰) به تاثیر نوع شیر بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *شیگلا دیسانتری* اشاره شده است و بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد این باکتری‌ها، در نمونه‌های کفیر تهیه شده در شیر پرچرب دیده شد و نمونه های تخمیر شده در شیر پرچرب فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را علیه باکتری های مورد آزمون نشان دادند (Ajam and Koohsari., 2020).

مطالعات مختلف به نقش مثبت شیر پرچرب، خام و پاستوریزه در مقایسه با اسکیم میلک در استخراج کفیران از دانه های کفیر و فعالیت ضدباکتریایی عصاره کفیر اشاره داشته اند. فلورانس و همکاران (۲۰۱۲) شیر خام را به عنوان سوبسترای مناسب برای تهیه شیرهای تخمیری پیشنهاد دادند (Florence et al., 2012).

با در نظر گرفتن اینکه بسیاری فعالیت ضدباکتریایی نوشیدنی کفیر را به ترکیب پلی ساکاریدی کفیران نسبت می دهند، Zajšek و Goršek نیز با هدف بررسی نیازمندی های رشد برای تولید کفیران از دانه های کفیر، شیر پرچرب گاو را به عنوان بهترین محیط برای تولید کفیران از دانه های کفیر، معرفی کردند (Zajšek and Goršek, 2011). Weschenfelder و همکاران فعالیت ضدباکتریایی بیشتر نمونه های کفیر تهیه شده در شیر پاستوریزه را نسبت به نمونه های کفیر تهیه شده با اسکیم میلک گزارش کردند (Weschenfelder et al., 2018).

این موضوع میتواند به وابسته بودن میکروارگانیسمهای موجود در دانه های کفیر به سوبستراهای دارای محتوای پروتئین و چربی بالاتر به منظور تولید ترکیبات با ماهیت ضدمیکروبی مربوط شود. فعالیت‌های ضدباکتریایی نوشیدنی کفیر را به کفیران نسبت می‌دهند و تولید کفیران می‌تواند به طور چشم‌گیری با کنترل شرایط کشت افزایش یابد (Frengova et. al., 2002; Zajšek and Goršek., 2011). فعالیت ضدباکتریایی بیشتر نمونه های کفیر تهیه شده در شیر پاستوریزه که چربی بیشتری از اسکیم میلک دارد نشان از تولید کفیران بیشتر در این نمونه هاست. فعالیت ضدباکتریایی بیشتر نمونه های کفیران استخراج شده از دانه های کفیر تخمیر شده در شیر پرچرب نسبت به شیر بدون چربی در مطالعه حاضر می تواند به وابسته بودن رشد دانه های کفیر به حضور و میزان سوبستراهای مورد نیاز برای رشد میکروارگانیسمهای موجود در دانه های کفیر از جمله پروتئین و لاکتوز صحه بگذارد.

همانطور که در نتایج اشاره شد، نمونه های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با نمونه های تهیه شده در ۲۵ درجه سانتیگراد، فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و ایزوله بومی *کلبسیلا پنومونیه* نشان دادند که حاکی از تاثیر دمای تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی می باشد. همچنین بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر علیه *انتروکوکوس فکالیس* و *شیگلا دیسانتری* مربوط به نمونه های کفیر تهیه شده با شیر کم چرب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۸/۵ و ۱۲/۵ میلیمتر

بود. در مطالعه تاثیر شرایط مختلف تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی شیر گاو تخمیرشده بوسیله دانه‌های کفیر علیه چهار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *شیگلا دیسانتری* نتایج مطالعه Ajam and Koohsari (۲۰۲۰) نشان داد که دمای تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر علیه تمامی باکتری های مورد آزمون به استثناء *شیگلا دیسانتری* تاثیر معناداری داشت و با وجود اینکه بیشترین هاله عدم رشد باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *شیگلا دیسانتری* و *باسیلوس سرئوس* در نمونه‌های کفیر تخمیر شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه های تخمیر شده در ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده شد ولی با در نظر گرفتن تمامی فاکتورها و اثرات متقابل آنها، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری های مورد آزمون در نمونه های کفیر تخمیر شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده گردید (Ajam and Koohsari., 2020).

مشاهده بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در نمونه های تخمیر شده در ۲۵ درجه سانتیگراد، را می‌توان به وابسته بودن تولید ترکیبات با ماهیت ضدمیکروبی به این محدوده دمایی نسبت داد. فعالیت‌های ضدباکتریایی نوشیدنی کفیر را به کفیران نسبت می‌دهند و تولید کفیران می‌تواند به طور چشم‌گیری با کنترل شرایط کشت افزایش یابد (Frengova, et. al., 2002; Zajšek and Goršek., 2011).

Zajšek و Goršek (۲۰۱۱) بهترین شرایط برای تولید کفیران از دانه های کفیر را تخمیر در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و همزدن در ۸۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در شیر پرچرب گاو معرفی کردند که با وقوع بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در شرایط مذکور، همخوانی دارد. تولید ماکزیمم کفیران در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد شاید به دلیل این واقعیت است که میکروارگانیسمها با افزایش تولید کفیران خود را در برابر تأثیرات محیطی محافظت می کنند (Zajšek and Goršek., 2011). البته، کفیرهای سنتی نیز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت تهیه می‌شوند (Farnworth and Mainville, 2008).

مطالعات مشابه به ماکزیمم رشد دانه های کفیر و تولید کفیران در دمای محیط (۳۰-۲۵ درجه سانتیگراد) هم از دانه های کفیر و هم از کشت *لاکتوباسیلوس کفیرانوفاسینس* اشاره کرده اند (Pop, et al., 2014; Ismaiel, et al., 2011; Harta et al., 2003; Yokoi and Paraskevopoulou et al., 2003; Watanabe, 1992; Tanaguchi, et al., 2001; Yeesang, et al., 2007).

کاهش استخراج کفیران در دماهای تخمیر بالاتر در مطالعات مشابه گزارش شده است (Rimada and Abraham., 2001). این کاهش استخراج می تواند ناشی از حل شدن کفیران در دماهای بالا باشد (Rimada and Abraham., 2001).

با تمام این تفاسیر، رشد دانه های کفیر در محیط های کشت مختلف، به حضور و میزان سوبستراهای مورد نیاز برای رشد میکروارگانیسمهای موجود در دانه های کفیر از جمله پروتئین و لاکتوز وابسته است و مقادیر ترکیبات اصلی شیر می‌تواند به طور قابل توجهی بین گاوها، نژادهای مختلف و بین گاوهای همان نژاد و بسته به نوع خوراک متفاوت باشد (Bylund, 1995).

از طرفی تفاوت در نتایج مطالعه حاضر با دیگر مطالعات ممکن است به دلیل تفاوت در منشاء کفیر مورد آزمون باشد. تفاوت در فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر با منشاء مختلف در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Anderson and Gilliland, 1999; Pintado, et al., 1996).

تفاوتهای منطقه‌ای و شرایط تخمیر می‌تواند تنوع میکروبی در دانه‌های کفیر را تغییر دهد و تنوع میکروبی مسئول فعالیتهای بیولوژیکی است (Kukhtyn et al., 2018). تنوع میکروبی مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کفیر است و بسته به منشأ منطقه‌ای دانه‌های کفیر، تنوع میکروبی آنها متفاوت است و بنابراین، فعالیت ضد باکتریایی آن نیز تغییر می‌کند (Altay, et al., 2013; Gao et al., 2012; Jianzhong, et al., 2009; Kabak and Dobson, 2011).

نتیجه‌گیری

بطورکلی نمونه های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با نمونه‌های ۲۵ درجه سانتیگراد، فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و ایزوله بومی *کلبسیلا پنومونیه* نشان دادند. همچنین بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر علیه *انتروکوکوس فکالیس* و *شیگلا دیسانتری* مربوط به نمونه‌های تهیه شده با شیر کم‌چرب در ۳۷ درجه سانتیگراد بود. در بین باکتریهای مورد آزمون، *باسیلوس سرئوس* مقاومت قابل ملاحظه‌ای نسبت به عصاره‌های نمونه‌های کفیر از خود نشان داد. با توجه به فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو علیه باکتریهای بیماریزای مورد آزمون، استفاده از این نوشیدنی تخمیری به عنوان جایگزینی مناسبی برای نوشیدنی های گازدار با محتوای قند بالا توصیه می شود.

منابع:

1. Ajam F. and Koohsari H. 2020. Effect of some fermentation conditions on antibacterial activity of fermented milk by kefir grains. J. Food Process Preserv. 44 (12): e14913.
2. Altay F., Karbancıoglu-Guler F., Daskaya-Dikmen C. and Heperkan D. 2013. Are view on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. Int. J. Food Microbiol. 167: 44-56.
3. Anderson J.W. and Gilliland S.E. 1999. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus L1* on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. J Am Coll Nutr. 18: 43-50.
4. Bylund G. 1995. Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, S-221 86 Lund.
5. Chifiriuc M.C., Cioaca A.B. and Lazar V. 2011. In vitro assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. Anaerobe 17:433-435.
6. Farnworth E.R. 2005. Kefir. A complex probiotic. Food Sci Tech Bull. 2: 1-17.
7. Farnworth E.R. and Mainville I. 2008. Kefir - a fermented milk product. In: Handbook of fermented functional foods. 2nd ed. Farnworth, E. R. (ed) CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp. 89-127.
8. Florence A.C.R., Oliveira R.P.S., Silva R.C., Soares F.A.S.M., Gioielli L.A. and Oliveira M.N. 2012. Organic milk improves *Bifidobacterium lactis* counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. Food Sci Technol. 49: 89-95.
9. Frengova G.I., Simova E.D., Beshkova D.M. and Simov Z.I. 2002. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. Zeitschrift für Naturforschung C. 57: 805-810.
10. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals; A review. J Appl Bacteriol. 66: 365-378.
11. 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. J Food Sci. 77:425-433.
12. Gao X. and Li B. 2016. Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review. Cogent Food Agric. 2: 1-10.
13. Garrote G.L., Abraham A.G. and De Antoni G.L. 2000. Inhibitory power of kefir: The role of organics acids. J Food Prot. 63:364-369.
14. Harta O., Iconomopoulou M., Bekatorou A., Nigam P., Kontominas M. and Koutinas A.A. 2004. Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter. Food Chem. 88:237-242.
15. Ismaiel A.A., Ghaly M.F. and El-Naggar A.K. 2011. Some physicochemical analyses of kefir produced under different fermentation conditions. J Sci Ind Res. 70:365-372.
16. Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanhu J. and Mingsheng D. 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. Food Microbiol. 26:770-775.
17. Kabak, B., and Dobson, A. 2011. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. Crit. Rev. Food Sci Nutr. 51:248-260.
18. Kourkoutas Y., Sipsas V., Papavasiliou G. and Koutinas A.A. 2007. An economic evaluation of freeze-dried kefir starter culture production using whey. J Dairy Sci. 90:2175-2180.
19. 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. J. Food Sci Technol. 55:252-257.
20. La Riviere J.W.M., Kooiman P. and Schmidt K. 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. Arch Mikrobiol. 59:269-278.

21. Oliveira Leite A.M., Lemos Miguel M.A., Peixoto R.S., Rosado A.S., Silva J.T. and Paschoalin V.M.F. 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. Braz J Microbiol. 44:341-349.
22. Paraskevopoulou A., Blekas G., Kiosseoglou V., Bekatorou A. and Kanellaki M. 2003. Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. Food Res Int. 36:431-438.
23. Pintado M.E., Lopes Da Silva J.A., Fernandes P.B., Malcata F.X. and Hogg T.A. 1996. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. Int J Food Sci Technol. 31:15-26.
24. Pop C., Apostu S., Salanta L., Rotar A.m., Sindic M., Mabon N. and Socaciu C. 2014. Influence of Different Growth Conditions on the Kefir Grains Production, used in the Kefiran Synthesis. Bull UASVM Food Sci Tech. 71:147-153.
25. Prado M.R., Blandon L.M., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C., Castro G.R., Thomaz-soccol V. and Soccol C.R. 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. Front Microbiol. 6:1-10.
26. Rattray F.P. and O'Connell M.J. 2011. Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences (2th ed). Academic Press, San Diego, USA, p.518-524.
27. Rimada P.S. and Abraham A.G. 2001. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. J Dairy Res. 68:653-661.
28. Robinson R.K. 1967. Therapeutic properties of fermented Milks. London Elsevier. 1991, 22-25.
29. Santos A., San Mauro M., Sanchez A., Torres J.M. and Marquina D. 2003. The Antimicrobial Properties of Different Strains of Lactobacillus spp. Isolated from Kefir. Syst Appl Microbiol. 26:434-437.
30. Sarkar S. 2007. Potential of kefir as a dietetic beverage - a review. Br Food J. 109:280-290.
31. Schwan R.F., Magalhães-Guedes K.T. and Dias D.R. 2014. KEFIR – Grain and Beverages: A Review. Sci Agrar Parana. 14:1-9.
32. Sezer C. and Guven A. 2009. Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria ısolated from foods. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 15:45-50.
33. Silva K.R., Rodrigues S.A., Filho L.X. and Lima A.S. 2009. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. Appl Biochem Biotechnol. 152:316-325.
34. 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. J. Ind Microbiol Biotechnol. 28:1-6.
35. Tamime A.Y. 2006. Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: Tamime, AY (ed.), Fermented Milk Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, p.174-216.
36. Taniguchi M., Nomura M., Itaya T. and Tanaka T. 2001. Kefiran Production by *Lactobacillus kefiranofaciens* under the Culture Conditions Established by Mimicking the Existence and Activities of Yeast in Kefir Grains. Food Sci Technol Res. 7:333-337.
37. 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. Int J. Biol Macromol. 43:283-288.
38. Weinstein M.P., Patel J.B., Burnham C.A., Campeau S., Conville P.S., Doern C., … Zimmer B.L. 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.
39. Weschenfelder, S., Paim, M.P., Gerhard, C., Carvalho, H.H.C. and Wiest, J.M. 2018. Antibacterial activity of different formulations of cheese and whey produced with kefir grains. Rev. Cien. Agron. 49, 443-449.

40. Yeesang C., Chanthachum S. and Cheirsilp B. 2007. Sago starch as a low-cost carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. World J. Microb Biot. 24:1195-1201.
41. Yokoi H. and Watanabe T. 1992. Optimum culture conditions for production of kefiran by *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains. J. Ferment Bio Eng. 74:327-329.
42. Zajšek K. and Goršek A. 2011. Experimental assessment of the impact ofultivation conditions on kefiran production by the mixed microflora imbedded in kefir grains. Chem Eng Trans. 24:481-486.

Antibacterial activity of cow milk fermented by kefir grains against a number of pathogenic bacteria

Antibacterial activity of cow milk fermented …

Hadi Koohsari[1*], Seyyede Sorayya Sajjadi[2], Araz Soltan Saedifar[2], Maryam Sadegh Shesh Poli[3]

[1] Associate Professor, Department of Microbiology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

[2]Graduated student, Department of Microbiology, Minudasht branch, Islamic Azad University, Minudasht, Iran

[3]Graduated Ph.D of Molecular Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

[*]**Corresponding author**: *hadikoohsari@yahoo.com*

Abstract

Kefir beverage is one of the oldest fermented milk products, which is a natural probiotic and a complex of microbial symbiotic that is obtained from the fermentation of milk by kefir grains. The study aimed antibacterial activity of kefir samples prepared with cow milk against 10 pathogenic bacteria. Kefir grains were added to cow milk (Full-fat and low-fat) and fermentation was done at 25°C and 37°C. Grains were separated from kefir extract and the antibacterial activity of kefir extract was evaluated against 10 pathogenic bacteria by well method. Kefir samples prepared at 37°C compared to 25°C samples showed more antibacterial activity against S. *aureus*, *P. aeruginosa* and native *K. pneumoniae* isolated. The most antibacterial activity of kefir samples against *E. faecalis* and *S. dysenteriae* was related to the samples prepared with low-fat milk at 37°C, respectively, with the average diameter of inhibition zone of 18.5 and 12.5 mm. The samples prepared with full-fat milk in 25°C and 37°C indicated more antibacterial activity with the diameter of inhibition zone of 22 and 19 mm against the standard *K. pneumoniae* strain, respectively. Significant difference was not observed about milk type and fermentation temperature effect on antibacterial activity against *E. coli*, both native isolate and standard strain and *S. typhimurium* ($P<0.05$). *B. cereus* showed significant resistance to kefir samples. Kefir prepared with cow milk is recommended due to significant antibacterial activity.

Key words: Kefir, Antibacterial activity, Cow milk, Pathogenic bacteria