



Research Paper

Evaluation of the Inhibitory Effect of *Enterococcus durans* Strains Isolated
from Kefir Grains Against Five Foodborne Pathogenic Bacteria

Matin Shafiee^{1*}, Yasamin Shafiee², Shahla Soltani-Nezhad³

¹Health and Wellness Center, Kerman Province Education, Kerman, Iran

²Department of Biology and Vector Control, University of Medical Sciences, Kerman, Iran

³Department of Microbiology, Ji.C., Islamic Azad University, Jiroft, Iran

Received: 08/08/2025, Accepted: 03/09/2025

Abstract

Kefir is a fermented probiotic beverage with strong antimicrobial properties, derived from kefir grains. This study aimed to isolate and identify bacterial strains present in kefir and evaluate their antibacterial activity against five major foodborne pathogens, including *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica*. After culturing the samples on MRS agar and purification, 34 Gram-positive isolates were obtained. Among them, four superior strains with the highest antagonistic activity were selected and subjected to molecular identification. 16S rRNA gene sequencing results revealed that these strains belong to the species *Enterococcus durans* and were registered in the Gene Bank under accession numbers MT032372, MT032373, MT032374, MT032375. These strains lacked proteolytic activity but exhibited amylolytic activity and the ability to produce strong antibacterial metabolites. Increasing the fermentation time from 24 to 72 hours led to a significant increase in the diameter of the growth inhibition zones (ranging from 10 to 23 mm). The findings indicate that the *Enterococcus durans* strains isolated from kefir have high potential for use as biocontrol agents in the food industry and for the production of probiotic products.

Keywords: Kefir, probiotic, antibacterial activity, *Enterococcus durans*, foodborne pathogens

Citation: Shafiee M, Shafiee Y, Soltani-Nezhad S, Evaluation of the inhibitory effect of *Enterococcus durans* strains isolated from kefir grains against five foodborne pathogenic bacteria. *Quality and Durability of Agricultural Products and Food Staffs*, 2025; 4(4): 91-102.



© The Author(s) **Publisher:** Islamic Azad University of Kerman, Iran

DOI: <https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1214324>

* **Corresponding author** Matin Shafiee, **Email:** matinshafie1356@gmail.com

Extended Abstract

Introduction

Kefir, a traditional fermented dairy beverage, has attracted growing scientific and industrial attention due to its diverse microbial community and broad spectrum of health-promoting properties. Produced from gelatinous kefir grains, which harbor a complex symbiosis of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, and yeasts embedded in a polysaccharide matrix known as kefiran, kefir represents a unique natural consortium with both nutritional and therapeutic relevance. Its fermentation process results in a wide array of metabolites including lactic acid, acetic acid, ethanol, carbon dioxide, and volatile flavor compounds that not only contribute to its sensory attributes but also exert significant antimicrobial, immunomodulatory, and antioxidant activities. Regular consumption of kefir has been associated with health benefits ranging from cholesterol and blood pressure reduction to improved immune response, allergy control, and reduced risks of cardiovascular disease and cancer. Central to these effects is the production of antimicrobial metabolites such as organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl, and bacteriocins, which can inhibit the growth of diverse human and foodborne pathogens. Food safety remains a pressing global issue, as contamination of food products with pathogenic bacteria is a major cause of foodborne illnesses and outbreaks. Among the most common foodborne pathogens are *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (particularly O157:H7), and *Salmonella enterica*. These microorganisms are responsible for a range of gastrointestinal infections, systemic complications, and food poisoning events, often exacerbated by their resilience in food matrices and resistance to environmental stresses.

Controlling these pathogens in food products is therefore a critical concern for public health and the food industry. Despite evidence supporting kefir's antimicrobial capacity, most studies have been limited to broad observations of inhibitory activity, with relatively little focus on identifying specific bacterial strains from kefir responsible for such effects. This gap motivated the present study, which aimed to isolate, characterize, and molecularly identify probiotic strains from kefir grains and to evaluate their antagonistic potential against the aforementioned five major foodborne pathogens.

Methods

Kefir grains were traditionally cultured in pasteurized whole milk under sterile conditions. Following fermentation, bacterial isolates were obtained by serial dilution and plating on selective MRS agar. Colonies were purified and subjected to preliminary identification using Gram staining, catalase testing, carbohydrate fermentation profiling, and assays for amylolytic and proteolytic activity. Only Gram-positive, catalase-negative isolates with promising metabolic characteristics were selected for further analysis. Antagonistic activity was evaluated by the well diffusion method against standardized suspensions of the five pathogens. Supernatants from probiotic cultures were introduced into agar wells seeded with pathogens, and zones of inhibition were measured. Strains exhibiting the strongest inhibitory effects were subjected to molecular identification through 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis.

Results

From kefir samples, 34 bacterial isolates were obtained, all Gram-positive and belonging morphologically to cocci or rods. Catalase tests were uniformly negative, confirming their lactic acid

bacterial nature. Fermentation patterns revealed metabolic diversity among isolates. Both *Lactobacillus* and *Enterococcus* species exhibited inhibitory effects against the pathogens, but *Enterococcus* isolates produced consistently larger inhibition zones, indicating stronger antagonistic potential. Notably, four isolates designated AK-IAUK5, AK-IAUK6, AK-IAUK7, and AK-IAUK8—demonstrated the highest activity against all five pathogens, with inhibition zones ranging from 10 to 23 mm. These strains were positive for amylolytic activity but lacked proteolytic activity, a desirable trait for food applications since proteolytic breakdown can negatively affect sensory or nutritional qualities. Molecular sequencing confirmed all four isolates as *Enterococcus durans*, with >99% sequence identity to reference strains. Phylogenetic analysis placed them firmly within the *E. durans* clade, clearly distinct from closely related species such as *E. faecium* and *E. hirae*. Their sequences were deposited in GenBank with accession numbers MT032372–MT032375.

Discussion

The findings confirm that *Enterococcus durans* strains isolated from kefir grains possess strong inhibitory activity against major foodborne pathogens, surpassing that of *Lactobacillus* isolates in this study. The inhibitory effects are likely mediated by the production of organic acids, hydrogen peroxide, bacteriocins, and other secondary metabolites. Importantly, the absence of proteolytic activity suggests that these strains are less likely to degrade host or food proteins, making them suitable candidates for industrial application. The enhanced antagonistic activity observed with longer fermentation times (72 h vs. 24 h) underscores the dynamic nature of metabolite production in kefir and highlights the importance of fermentation parameters in optimizing antimicrobial efficacy. These results align

with previous reports documenting the antimicrobial effects of kefir-fermented broths and kefir-derived lactic acid bacteria. However, the present study adds to the field by identifying specific *E. durans* strains as highly active contributors to kefir's antimicrobial properties. The growing interest in postbiotics, including bacteriocins and exopolysaccharides like kefiran, further emphasizes the potential of such strains for application in functional foods, nutraceuticals, and therapeutic formulations. Beyond food preservation, these strains could serve as biocontrol agents, contributing to safer food supply chains. Furthermore, emerging research suggests kefir-derived metabolites may exert effects comparable to, or even exceeding, conventional antibiotics, raising possibilities for their use as alternatives or adjuncts in combating antibiotic resistance.

Conclusion

This study found that specific *E. durans* strains from kefir grains are strong natural antimicrobials. These strains are promising for the food and health industries because they have strong antimicrobial effects, lack proteolytic activity and are genetically confirmed as safe candidates. They could be used as natural biocontrol agents, probiotics, or in therapeutic products. Future research should test their safety and effectiveness in animals and humans, and explore uses in antimicrobial packaging or supplements. This highlights the potential of traditional fermented foods like kefir in modern biotechnology.

Keywords: Kefir, probiotic, antibacterial activity, *Enterococcus durans*, foodborne pathogens

Funding: There was no external funding in this study.

Authors' contribution: All authors contributed equally to preparation of this manuscript.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.



مقاله پژوهشی

بررسی اثر مهارکننده سویه‌های *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از دانه‌های کفیر بر پنج باکتری پاتوژن عامل مسمومیت غذایی

متین شفیعی^{۱*}، یاسمین شفیعی^۲، شهلا سلطانی نژاد^۳

^۱ مرکز سلامت و تندرستی، آموزش و پرورش استان کرمان، کرمان، ایران

^۲ گروه بیولوژی و کنترل ناقلین بیماری‌ها، دانشگاه علوم پزشکی، کرمان، ایران

^۳ گروه میکروبیولوژی، واحد جیرفت، دانشگاه آزاد اسلامی، جیرفت، ایران

دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۱۷، پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۱۲

چکیده

کفیر یک نوشیدنی تخمیری پروبیوتیک با خواص ضد میکروبی قوی است که از دانه‌های کفیر حاصل می‌شود. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی موجود در کفیر و ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها علیه پنج پاتوژن مهم غذایی شامل *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *شریشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* انجام شد. پس از کشت نمونه‌ها در محیط MRS آگار و خالص‌سازی، ۳۴ جدایه گرم مثبت به دست آمد. از میان آن‌ها، چهار سویه برتر با بیشترین فعالیت آنتاگونیستی انتخاب و مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. نتایج تعیین توالی ژن *TS rRNA*^۱ نشان داد که این سویه‌ها متعلق به گونه *انتروکوکوس دورانس* هستند و با شماره‌های دسترسی MT032372، MT032373، MT032374 و MT032375، در بانک ژن ثبت شدند. این سویه‌ها فاقد فعالیت پروتئولیتیکی بودند، اما دارای فعالیت آمیلولیتیکی و توانایی تولید متابولیت‌های ضدباکتریایی قوی بودند. افزایش زمان تخمیر از ۲۴ به ۷۲ ساعت منجر به افزایش معنادار قطر هاله‌های مهار رشد در محدوده ۱۰ تا ۲۳ میلی‌متر شد. یافته‌ها نشان می‌دهد که سویه‌های *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از کفیر پتانسیل بالایی برای استفاده به عنوان عوامل بیوکنترل در صنایع غذایی و تولید محصولات پروبیوتیک دارند.

واژه‌های کلیدی: کفیر، پروبیوتیک، فعالیت ضدباکتریایی، *انتروکوکوس دورانس*، پاتوژن‌های غذایی

استناد: متین شفیعی، یاسمین شفیعی، شهلا سلطانی نژاد. بررسی اثر مهارکننده سویه‌های *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از

دانه‌های کفیر بر پنج باکتری پاتوژن عامل مسمومیت غذایی، کیفیت و ماندگاری تولیدات کشاورزی و مواد غذایی، (۱۴۰۴)،

دوره ۴، شماره ۴، صفحات ۹۱-۱۰۲.

DOI: <https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1214324>

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، ایران

© نویسندگان



مقدمه

کفیر یک نوشیدنی تخمیری سنتی است که از همزیستی پیچیده باکتری‌های اسیدلاکتیک، باکتری‌های تولیدکننده اسیداستیک و گونه‌های متنوع مخمر در دانه‌های ژلاتینی کفیر حاصل می‌شود (۱). در فرایند تخمیر، متابولیت‌های گوناگونی از جمله اسیدلاکتیک، اسیداستیک، اتانول، دی‌اکسیدکربن و ترکیبات فرار طعم‌دهنده تولید می‌شوند که علاوه بر ایجاد ویژگی‌های حسی خاص، نقش‌های فیزیولوژیک، ضد میکروبی و تعدیل‌کننده ایمنی نیز ایفا می‌کنند (۲). ترکیب میکروبی کفیر شامل باکتری‌هایی نظیر: *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *لوکونوستوک*، *استوباکتر*، *استرپتوکوک*، و همچنین مخمرهایی مانند *کلورومایسس*، *کاندیدا*، *ساکارومایسس*، و *رودوترولا* است که در یک ماتریکس پلی‌ساکاریدی به نام کفیران (یک گلوکولاکتان محلول در آب) محصور شده‌اند (۳). کفیران افزون بر نقش ساختاری، اثرات زیستی مهمی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، تعدیل ایمنی و بهبود ویژگی‌های رئولوژیک محصول دارد. طیف اثرات عملکردی کفیر بسیار گسترده است و مصرف منظم آن می‌تواند به کاهش کلسترول و فشار خون، کنترل دیابت، بهبود واکنش‌های آلرژیک، تقویت سیستم ایمنی و حتی کاهش ریسک بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان منجر شود (۴). یکی از مکانیسم‌های کلیدی این اثرات، تولید متابولیت‌های ضد میکروبی نظیر اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل و به‌ویژه باکتریوسین‌ها است که توانایی مهار رشد طیف وسیعی از پاتوژن‌های غذایی و انسانی را دارند (۵). ایمنی مواد غذایی یکی از دغدغه‌های مهم بهداشت عمومی است، زیرا آلودگی مواد غذایی به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌تواند منجر به بروز مسمومیت‌های شدید و شیوع بیماری‌های گسترده شود. در میان عوامل میکروبی، برخی باکتری‌های پاتوژن نقش کلیدی در بروز بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده دارند و کنترل آن‌ها در صنایع غذایی اهمیت ویژه‌ای دارد. در این پژوهش، پنج باکتری پاتوژن شایع شامل: *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *شریشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* مورد بررسی قرار گرفته‌اند. *باسیلوس سرئوس* یک باکتری گرم‌مثبت و اسپورزا است که به‌طور گسترده در خاک، غلات و

فرآورده‌های غذایی وجود دارد. مقاومت بالای اسپوره‌های این باکتری در برابر شرایط نامساعد محیطی، امکان بقا و تکثیر آن را در مواد غذایی فراهم می‌کند. این باکتری با تولید سموم مختلف، از عوامل شناخته‌شده مسمومیت غذایی به‌ویژه در غذاهای آماده و برنج محسوب می‌شود (۶). *استافیلوکوکوس اورئوس* از دیگر باکتری‌های گرم‌مثبت و تولیدکننده انتروتوکسین است که به‌طور طبیعی در پوست و غشاهای مخاطی انسان حضور دارد. آلودگی مواد غذایی از طریق دستکاری و آماده‌سازی غیربهداشتی رخ می‌دهد و به دلیل پایداری بالای سموم در برابر حرارت، این باکتری از عوامل مهم مسمومیت‌های حاد غذایی به شمار می‌آید (۷). *لیستریا مونوسیتوژنز* باکتری گرم‌مثبتی است که توانایی رشد در دماهای پایین را دارا می‌باشد و به همین دلیل در محصولات لبنی و فرآورده‌های سردخانه‌ای تهدیدی جدی محسوب می‌شود. ابتلا به لیستریوزیس در گروه‌های حساس مانند زنان باردار، نوزادان و افراد دارای نقص ایمنی می‌تواند عوارض شدید و حتی مرگ‌ومیر ایجاد کند (۸). *شریشیا کلی* یک باکتری گرم‌منفی روده‌ای است که اگرچه اغلب سویه‌های آن غیر بیماری‌زا هستند، اما سویه‌های پاتوژن آن مانند *شریشیا کلی* O157:H7 به دلیل تولید شیکاتوکسین می‌توانند موجب اسهال خونی و در موارد شدید، سندرم همولیتیک اورمیک شوند. منابع اصلی آلودگی شامل گوشت نیم‌پز، سبزیجات خام و آب آلوده است (۹). *سالمونلا انتریکا* از باکتری‌های گرم‌منفی روده‌ای است که سروتیپ‌های متعددی از آن در بروز مسمومیت‌های غذایی دخالت دارند. این باکتری عمدتاً از طریق فرآورده‌های دامی، تخم‌مرغ و غذاهای آلوده منتقل می‌شود و یکی از علل شایع گاستروانتریت در جهان به شمار می‌رود (۱۰). مطالعات جدید همچنین نشان داده‌اند که کفیر با افزایش فعالیت ماکروفاژها، تحریک سنتز نیتریک‌اکساید و تقویت توان فاگوسیتیک، نقش قابل توجهی در بهبود پاسخ‌های ایمنی ذاتی ایفا می‌کند (۱۱). علاوه بر اثرات گوارشی و سیستمیک، فرآورده‌های موضعی حاصل از دانه‌های کفیر نیز کاربردهای درمانی دارند (۱۲). برای نمونه، ژل‌های تهیه‌شده از کفیر در مدل‌های حیوانی زخم سوختگی و زخم باز، موجب تسریع بهبود، کاهش التهاب و پاک‌سازی سریع‌تر عفونت نسبت به درمان‌های مرسوم شده‌اند (۱۳). این ویژگی‌ها کفیر را به یک غذای عملکردی ارزشمند با

تست کاتالاز، تخمیر قندها (ساکارز، فروکتوز، مانوز، ریبوز، گالاکتوز، مالتوز، گزیلوز و رامنوز) و ارزیابی ویژگی‌های متابولیکی نظیر فعالیت آمیلولیتیکی و پروتئولیتیکی به‌منظور غربالگری سویه‌های دارای پتانسیل پروبیوتیکی انجام شد (۱۵). کلیه آزمایش‌ها در شرایط استریل و در سه تکرار مستقل صورت پذیرفت تا از صحت و تکرارپذیری نتایج اطمینان حاصل شود. جدایه‌هایی که ویژگی‌های مطلوب پروبیوتیکی نشان دادند، گزینش شدند تا در آزمون‌های آنتاگونیستی و شناسایی مولکولی مورد بررسی قرار گیرند.

بررسی فعالیت آمیلولیتیکی

برای بررسی توانایی تجزیه نشاسته، هر جدایه با استفاده از لوپ استریل به‌صورت خطی روی سطح محیط کشت استارچ آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای 30°C به مدت ۵ روز گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از دوره انکوباسیون، محلول ۱ درصد به سطح پلیت‌ها افزوده شد. ایجاد هاله‌ی شفاف در اطراف خط رشد نشان‌دهنده فعالیت آمیلولیتیکی جدایه بود. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند و میانگین قطر هاله‌ها بر حسب میلی‌متر ثبت گردید (۱۶).

بررسی فعالیت پروتئولیتیکی

به‌منظور سنجش توانایی هیدرولیز پروتئین، کشت تازه‌ی ۲۴ ساعته از جدایه‌ها به‌صورت خطی روی سطح محیط MRS agar حاوی ۱۰ درصد شیر خشک بدون چربی^۲ تلقیح گردید. پلیت‌ها در دمای 30°C به مدت ۵ روز گرم‌خانه‌گذاری شدند. تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها نشانه‌ای از فعالیت پروتئولیتیکی بود. شدت فعالیت جدایه‌ها بر اساس قطر هاله‌ها تعیین و ثبت گردید. برای اطمینان از دقت نتایج، این آزمایش‌ها نیز در سه تکرار انجام شدند (۱۷).

بررسی فعالیت آنتاگونیستی

برای ارزیابی توانایی ضدباکتریایی جدایه‌های منتخب، روش انتشار چاهک^۳ به کار رفت. ابتدا سوسپانسیون

کاربردهای گسترده در صنایع غذایی، دارویی و پزشکی بازساخته‌اند. از سوی دیگر، مقبولیت جهانی، قیمت مناسب و ایمنی بالای این محصول، زمینه را برای توسعه تجاری و تولید فرآورده‌های نوین مبتنی بر کفیر فراهم ساخته است. با وجود این شواهد، شکاف‌های پژوهشی مهمی همچنان وجود دارد. بسیاری از تحقیقات تنها به بررسی کلی اثرات ضد میکروبی کفیر پرداخته‌اند و اطلاعات اندکی درباره شناسایی دقیق سویه‌های بومی و میزان فعالیت کمی آنها در برابر پاتوژن‌های خاص موجود است. بر همین اساس، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های پروبیوتیک موجود در کفیر و ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی آنها علیه پنج پاتوژن مهم مواد غذایی طراحی و اجرا گردید.

روش کار

آماده‌سازی و جداسازی باکتری‌ها

دانه‌های کفیر به روش سنتی به ماست کفیر تبدیل گردید. نمونه‌ها در شرایط استریل برداشت شده و در ظروف سترون به آزمایشگاه منتقل شدند تا تحت بررسی‌های میکروبیولوژیک قرار گیرند. برای تهیه نوشیدنی کفیر، شیر کامل پاستوریزه ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 85°C حرارت داده شد و سپس در شرایط استریل تا دمای 20°C سرد گردید. به هر لیتر شیر کامل (۲-۳٪ چربی) مقدار ۱۰ گرم دانه کفیر اضافه گردید و پس از ۲۴ ساعت تخمیر در دمای اتاق، دانه‌ها جدا شده و کفیر حاصل برای آزمایشات میکروبی مورد استفاده قرار گرفت (۱۴). به‌منظور جداسازی میکروارگانیسم‌ها، رقت‌های اعشاری از نمونه کفیر در سرم فیزیولوژی استریل تهیه و بر روی محیط انتخابی MRS^۱ آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. پلیت‌ها در شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای 30°C به مدت ۴۸-۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. کلنی‌های حاصل بر اساس مورفولوژی کلنی و ویژگی‌های میکروسکوپی انتخاب و برای خالص‌سازی چندین بار پاساژ داده شدند تا ایزوله‌های خالص به‌دست آید. برای شناسایی اولیه، رنگ‌آمیزی گرم انجام گرفت و تنها جدایه‌های گرم مثبت انتخاب شدند. سپس آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل:

^۲ Skim milk

^۳ Agar Well diffusion assay

^۱ De man, rogosa and sharpe (MRS) agar

واسرشت شدن در دمای 94°C به مدت ۲ دقیقه، اتصال در دمای 55°C به مدت ۴۰ ثانیه، طویل شدن در دمای 72°C درجه به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای 72°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول پی سی ار به ژل آگارز ۱ درصد منتقل و به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز گردید. توالی ژن *S rRNA16* توسط شرکت بیونیر کره جنوبی تعیین گردید. این توالی توسط نرم افزارهای مختلف از جمله Bio Edit، Finch Tv و Gene Runner مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. نتایج حاصل از بلاست توالی های مورد نظر در سایت های NCBI و EBI بررسی شده و توسط نرم افزار مگا نسخه ۱۰، آنالیز شد. درخت فیلوژنی به روش پیوند همجوار رسم گردید. در نهایت توالی ژن ها در بانک جهانی ژن ثبت گردید.

نتایج

از کشت نمونه های کفیر، در مجموع ۳۴ جدایه باکتریایی به دست آمد. تمامی جدایه ها گرم مثبت بوده و از نظر مورفولوژی به دو شکل کوکسی و میله ای مشاهده شدند. نتایج آزمایش کاتالاز نشان داد که همه جدایه ها کاتالاز منفی بودند. الگوهای تخمیر قندها میان جدایه ها متنوع بود و این تنوع می تواند نشان دهنده گوناگونی متابولیک و پتانسیل های زیستی متفاوت آنها باشد. بررسی فعالیت آنتاگونیستی نشان داد که گونه های هر دو جنس *لاکتوباسیلوس* و *انتروکوکوس* توانایی مهار رشد باکتری های بیماری زای روده ای را داشتند. با این حال، جدایه های *انتروکوکوس* اثر مهاری قوی تری نسبت به *لاکتوباسیلوس* از خود نشان دادند که این موضوع بر اساس مشاهده قطر هاله های عدم رشد بزرگ تر قابل استنباط بود. بیشترین اثر بازدارندگی به گونه های *انتروکوکوس* ارتباط داشت. افزایش زمان تخمیر از ۲۴ ساعت به ۷۲ ساعت موجب تقویت معنی دار فعالیت ضد باکتریایی جدایه های پروبیوتیکی کفیر گردید. این موضوع نشان می دهد که زمان تخمیر نقش مهمی در تولید متابولیت های ضد میکروبی دارد. از میان جدایه های بررسی شده، چهار سویه برتر با بالاترین فعالیت آنتاگونیستی انتخاب شدند. این سویه ها توانستند رشد پنج پاتوژن مهم غذایی مورد مطالعه را به طور مؤثر مهار

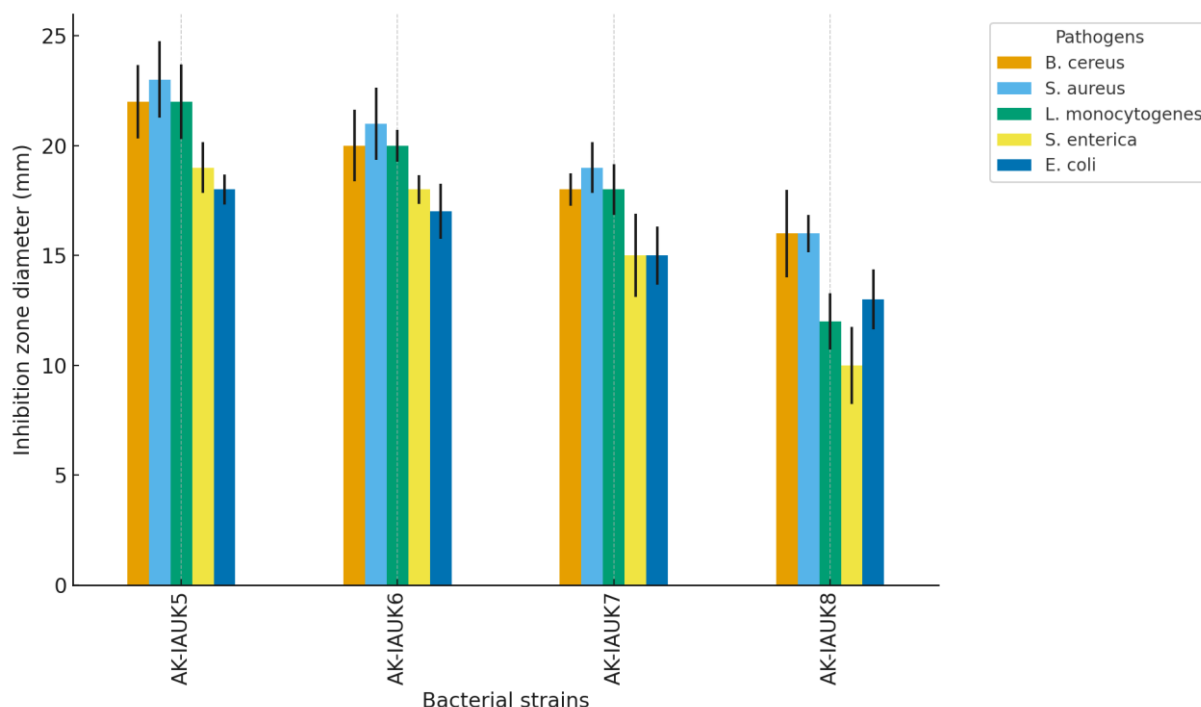
استاندارد از باکتری های پاتوژن مورد مطالعه شامل: *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ CFU/mL) تهیه شد. سپس این سوسپانسیون ها به طور یکنواخت بر سطح محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. با استفاده از پیت پاستور استریل، چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر روی محیط ایجاد گردید و سوپرناتانت کشت جدایه های پروبیوتیک در محیط MRS مایع به درون چاهک ها اضافه شد. پلیت ها برای یک ساعت در دمای 40°C جهت جذب بهتر نمونه نگهداری و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، قطر هاله های عدم رشد اطراف چاهک ها با کولیس دیجیتال اندازه گیری گردید. برای هر پاتوژن و جدایه، آزمایش ها در سه تکرار مستقل انجام شدند و میانگین قطر هاله ها به عنوان شاخص فعالیت آنتاگونیستی گزارش شد. سویه هایی که بالاترین فعالیت ضد میکروبی را نشان دادند برای شناسایی مولکولی انتخاب گردیدند (۱۸).

شناسایی مولکولی جدایه های برتر

جدایه های پروبیوتیکی که فعالیت آنزیمی بیشتری داشتند و نیز دارای فعالیت آنتاگونیستی بودند، به عنوان سویه های برتر جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند. ابتدا DNA ژنومی به کمک کیت استخراج DNA باکتری های گرم مثبت با شماره کاتالوگ DM05050 تهیه شده از شرکت پیشگامان انتقال ژن، استخراج گردید. به منظور تکثیر ژن *SrRNA16* از پرایمرهای $5' \rightarrow 3'$ و $3' \rightarrow 5'$ با توالی $5'-\text{AGAGTTTGATCCTGGCTCAG}-3'$ و $3'-\text{AAGGAGGTGATCCAGCCGCA}-5'$ با غلظت ۱۰ پیکومول استفاده گردید (۱۹). واکنش پی سی ار با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر بافر X5، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۲۵/۰ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱ میکرولیتر MgCl_2 ، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۰/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۱۹/۷۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام گردید. واکنش پی سی ار در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای 94°C و در ادامه ۳۵ چرخه شامل

احتمالاً اثر تخریبی کمتری بر پروتئین‌های میزبان یا مواد غذایی دارند.

کنند. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد ایجادشده توسط این جدایه‌ها در شکل (۱)، ارائه شده است. علاوه بر این، بررسی فعالیت‌های آنزیمی نشان داد که هر چهار سویه فعال *انتروکوکوس* دارای فعالیت آمیلولیتیکی مثبت بودند، اما هیچ‌گونه فعالیت پروتئولیتیکی از خود نشان ندادند. این ویژگی می‌تواند مزیت مهمی در کاربرد صنعتی آنها محسوب شود، زیرا سویه‌های فاقد فعالیت پروتئولیتیکی



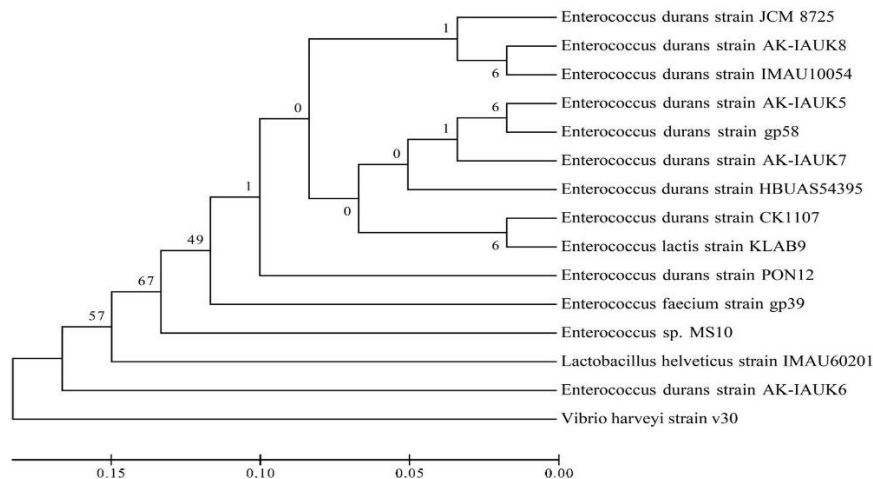
شکل ۱- فعالیت آنتاگونیستی ۴ سویه *انتروکوکوس* بر علیه ۵ باکتری پاتوژن مواد غذایی

نشان داد که این سویه‌ها ارتباط نزدیکی با جدایه‌های *انتروکوکوس دورانس* گزارش شده از منابع لبنی تخمیری در کشورهای مختلف دارند. به منظور بررسی روابط تکاملی میان جدایه‌های به دست آمده و سویه‌های مرجع، یک درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن *16S rRNA* و با استفاده از روش پیوند همجواری و نرم افزار مگا ترسیم گردید. شاخص بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار محاسبه شد و مقادیر بالای بوت استرپ در گره‌ها نشان دهنده پایداری و اعتبار بالای گروه بندی‌های به دست آمده بود. همان گونه که در شکل (۲)، مشاهده می‌شود، چهار جدایه جدید (AK-IAUK5 تا AK-IAUK8) در یک خوشه مشترک قرار گرفته‌اند که به طور مستقیم با شاخه اصلی *انتروکوکوس دورانس* هم خانواده بوده و از سایر گونه‌های نزدیک مانند *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس هیرئی*

بر اساس نتایج حاصل از تعیین توالی ژن *16S Rrna* و تجزیه و تحلیل داده‌ها به وسیله نرم افزار بلاست در پایگاه داده NCBI GenBank، مشخص گردید که چهار جدایه فعال با بالاترین فعالیت آنتاگونیستی متعلق به جنس *انتروکوکوس* بوده و به طور مشخص به عنوان سویه‌های *انتروکوکوس دورانس* شناسایی شدند. این چهار جدایه شامل سویه های AK-IAUK6، AK-IAUK5، AK-IAUK7 و AK-IAUK8 بودند که به ترتیب با شماره‌های دسترسی MT032372، MT032373، MT032374 و MT032375 در بانک ژن ثبت شدند. مقایسه توالی‌ها نشان داد که شباهت ژنتیکی این جدایه‌ها با سویه‌های مرجع ثبت شده در بانک ژن بیش از ۹۹٪ است که بیانگر دقت بالای شناسایی و تعلق آنها به گونه *انتروکوکوس دورانس* می‌باشد. نتایج بلاست همچنین

فعالیت‌های آنتاگونیستی بلکه از دیدگاه ژنتیکی نیز به‌طور دقیق در گروه/انتروکوکوس دورانس طبقه‌بندی می‌شوند.

به‌وضوح متمایز می‌گردند. این یافته‌ها تأیید می‌کنند که سویه‌های جداسازی‌شده نه تنها از نظر فنوتیپی و



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی بر اساس نتایج توالی S rRNA16 به روش پیوند همجواری چهار سویه/انتروکوکوس دورانس AK-IAUK8، AK-IAUK7، AK-IAUK6، AK-IAUK5.

گرم منفی مقاوم را تأیید کردند، تا حدی مشابه ولی از جهت تمرکز بر انتروکوکوس‌ها متمایز است (۱۵). همچنین بررسی حاضر نشان داد که افزایش مدت زمان تخمیر (از ۲۴ تا ۷۲ ساعت) منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت ضدباکتریایی شد. این یافته با نتایج رحیم زاده و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد که گزارش کردند تغییرات زمان تخمیر نقش مستقیمی در تولید متابولیت‌های ضد میکروبی کفیر ایفا می‌کند (۲۲). از منظر بالینی و ایمنی غذایی، حضور سویه‌های/انتروکوکوس دورانس بدون فعالیت پروتئولیتیکی (برخلاف برخی لاکتوباسیلوس‌ها) می‌تواند مزیتی مهم برای استفاده صنعتی داشته باشد؛ زیرا عدم تجزیه پروتئین‌ها خطر تغییرات نامطلوب در خواص حسی یا کاهش ارزش تغذیه‌ای محصولات را کاهش می‌دهد. این موضوع با مطالعات دونکور و همکاران (۲۰۰۷) درباره نقش فعالیت پروتئولیتیکی در محصولات لبنی قابل مقایسه است (۲۳). یافته‌های این پژوهش نشان داد که سویه‌های/انتروکوکوس دورانس جداسازی‌شده از دانه‌های کفیر توانایی بالایی در مهار رشد پاتوژن‌های غذایی از جمله شامل: باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، اشریشیا کلی و سالمونلا انتریکا دارند. این اثرات با مطالعات اخیر در سطح جهانی همخوانی دارد که نشان می‌دهند مکانیسم‌های

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که جدایه‌های/انتروکوکوس دورانس جداسازی‌شده از دانه‌های کفیر دارای فعالیت آنتاگونیستی قوی علیه پنج باکتری پاتوژن غذایی هستند. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در محدوده ۱۰ تا ۲۳ میلی‌متر قرار داشت که بیانگر توانایی بالای این سویه‌ها در مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا است. این یافته‌ها با مطالعات پیشین در زمینه نقش ضدباکتریایی میکروارگانیسم‌های کفیر همسو است. به‌عنوان مثال، سیلوا و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که سوپرناتانت تخمیرشده با دانه‌های کفیر فعالیت قابل توجهی علیه طیف وسیعی از باکتری‌های بیماری‌زا نشان می‌دهد (۲۰). همچنین، کیم و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که کفیر قادر به مهار رشد باکتری‌های مولد فساد و پاتوژن‌های غذایی است (۲۱). در مقایسه با تحقیقات مشابه، یافته‌های ما اهمیت ویژه/انتروکوکوس دورانس را برجسته می‌کند. بیشتر پژوهش‌ها تاکنون بر نقش لاکتوباسیلوس‌ها تمرکز داشته‌اند، در حالی که در مطالعه حاضر انتروکوکوس‌ها فعالیت قوی‌تری از خود نشان دادند. این نتیجه با گزارش قانع و همکاران (۲۰۲۱) که فعالیت آنتاگونیستی بالای لاکتیک‌اسید باکتری‌های کفیر به‌ویژه در برابر باکتری‌های

مکمل درمانی در شرایط مقاومت آنتی‌بیوتیکی برجسته می‌سازد. مطالعه حاضر نیز نشان داد که هاله‌های عدم رشد ایجاد شده توسط سویه‌های *انتروکوکوس دورانس* در محدوده ۱۰ تا ۲۳ میلی‌متر بودند که با نتایج گزارش شده از آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک هم‌تراز یا حتی فراتر است. پلی‌ساکارید کفیران یکی از ترکیبات کلیدی کفیر است که هم نقش ساختاری و هم نقش عملکردی دارد. کفیران علاوه بر خاصیت پری‌بیوتیکی، با ایجاد لایه‌ای محافظ بر سطح سلول‌های باکتریایی و مهار چسبندگی پاتوژن‌ها به سلول‌های میزبان، اثر ضدباکتریایی نشان می‌دهد. استروهر و همکاران (۲۰۲۵)، در یک مرور جهانی گزارش کردند که کفیران و سایر متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در پایداری میکروبیوم و اثرات ضدباکتریایی کفیر ایفا می‌کنند (۲۷). این موضوع اهمیت سویه‌های فاقد فعالیت پروتئولیتیکی (مانند سویه‌های بدست آمده از تحقیق حاضر) را بیشتر می‌کند، زیرا احتمال تخریب ساختار پروتئینی مفید محصولات کاهش یافته و خواص عملکردی آن‌ها حفظ می‌شود. نوع ماده اولیه در تولید کفیر می‌تواند بر خواص ضدباکتریایی اثر بگذارد. پژوهش (۲۰۲۵) که کفیر تولیدشده از شیر گاو و شیر بادام را مقایسه کرده است، نشان داد که ترکیب متفاوت پروتئین‌ها و چربی‌ها بر شدت اثر ضدباکتریایی تأثیر دارد. به‌طور خاص، کفیر شیر گاو دارای پپتیدهای بیواکتیو بیشتری بود، در حالی که کفیر شیر بادام به‌دلیل وجود ترکیبات فنولی، اثرات هم‌افزایی ضدباکتریایی نشان داد (۲۸). این یافته‌ها نشان می‌دهد که اصلاح فرمولاسیون کفیر (بر پایه منابع لبنی و غیرلبنی) می‌تواند به تولید محصولات متنوع با کاربردهای خاص منجر شود. به‌طور کلی، نتایج حاضر در کنار مطالعات مشابه نشان می‌دهد که کفیر از طریق مجموعه‌ای از مکانیسم‌های پیچیده شامل تولید متابولیت‌های اسیدی و پپتیدی، فعالیت ژنی باکتریوسین‌ها، نقش پلی‌ساکاریدها و حتی هم‌افزایی با ترکیبات گیاهی (مانند فنول‌ها)، فعالیت ضدباکتریایی چشمگیری دارد. این ویژگی‌ها کفیر را نه‌تنها به یک نوشیدنی پروبیوتیک ارزشمند، بلکه به گزینه‌ای نویدبخش برای تولید محصولات درمانی و صنعتی تبدیل می‌کند. پیشنهاد می‌شود در آینده مطالعات درون تنی روی مدل‌های حیوانی و انسانی انجام گیرد تا اثرات ایمنی‌زایی و پایداری این سویه‌ها در سیستم گوارشی بررسی شود.

ضدباکتریایی کفیر چندبعدی بوده و شامل تولید اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، باکتریوسین‌ها، پپتیدهای بیواکتیو و پلی‌ساکاریدهایی مانند کفیران است. یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌ها، تولید متابولیت‌های اسیدی نظیر اسیدلاکتیک و اسیداستیک است که باعث کاهش pH محیط شده و شرایط رشد را برای باکتری‌های بیماری‌زا نامساعد می‌سازد. بر اساس گزارش تینگریکاری و همکاران (۲۰۲۴)، علاوه بر اسیدهای آلی، ترکیباتی مانند آب اکسیژنه و متابولیت‌های فرار دی‌استیل و استالدهید نیز در مهار رشد باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی نقش دارند (۲۴). این متابولیت‌ها علاوه بر خاصیت ضدباکتری، اثرات هم‌افزایی با سیستم ایمنی میزبان ایجاد می‌کنند. به‌طور مثال، اسیدهای چرب زنجیره کوتاه علاوه بر کاهش رشد پاتوژن‌ها، موجب تحریک پاسخ‌های ایمنی مخاطی می‌شوند. این مکانیسم‌ها توضیح می‌دهند که چرا افزایش زمان تخمیر از ۲۴ به ۷۲ ساعت در مطالعه حاضر به بهبود معنی‌دار فعالیت ضدباکتریایی منجر شد؛ زیرا تولید این متابولیت‌ها در زمان‌های طولانی‌تر افزایش می‌یابد. تنوع میکروبی موجود در دانه‌های کفیر به‌طور مستقیم با خاصیت ضدباکتریایی آن مرتبط است. محققین دیگری در سال ۲۰۲۳، با استفاده از متاژنومیک نشان دادند که گونه‌هایی نظیر *لاکتوباسیلوس کفیرانوفاسینس*^۱، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*^۲ و *لاکتوباسیلوس کفیری*^۳ حاوی ژن‌هایی برای تولید باکتریوسین‌ها هستند که توانایی بالایی در مهار باکتری‌های مقاوم دارند (۲۵). در این مطالعه نیز، سویه‌های *انتروکوکوس دورانس* به‌عنوان فعال‌ترین جدایه‌ها شناسایی شدند که با مطالعه قانع و همکاران (۲۰۲۱) در زمینه فعالیت پروبیوتیک لاکتیک‌اسیدباکتری‌های کفیر هم‌راستا است. چند مطالعه اخیر نشان داده‌اند که اثرات ضدباکتریایی کفیر می‌تواند حتی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج قوی‌تر باشد. به‌عنوان نمونه، سلیم و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند که عصاره‌های کفیر در برخی موارد فعالیت بیشتری نسبت به آمپی‌سیلین علیه پاتوژن‌های غذایی از خود نشان می‌دهند (۲۶). این یافته اهمیت کفیر را به‌عنوان جایگزین یا

¹ *Lactobacillus kefirifaciens*

² *Lactobacillus helveticus*

³ *Lactobacillus kefir*

تخمیر تقویت شد. نتایج مولکولی نیز تعلق جدایه‌ها به گونه *انتروکوکوس دورانس* را تأیید کرد. در مجموع، این سویه‌ها پتانسیل بالایی برای استفاده در صنایع غذایی به‌عنوان عامل بیوکنترل و همچنین در توسعه فرآورده‌های پروبیوتیک و درمانی ایمن دارند.

سپاسگزاری

نویسندگان صمیمانه از همکاری و پشتیبانی آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان قدردانی می‌نمایند

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نمی‌کنند.

همچنین امکان بهره‌گیری از کفیر در تولید مواد بسته‌بندی ضد میکروبی یا مکمل‌های دارویی نیز می‌تواند مسیر تازه‌ای برای استفاده صنعتی فراهم کند. بر این اساس، نیاز به تدوین و اجرای راهبردهای کنترلی سخت‌گیرانه‌تر، آموزش در زنجیره تولید و نظارت دقیق‌تر بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت مرغداری کشور به‌شدت احساس می‌شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که سویه‌های *انتروکوکوس دورانس* جدا شده از دانه‌های کفیر دارای بالاترین فعالیت آنتاگونیستی علیه پنج پاتوژن مهم غذایی هستند. این اثرات عمدتاً به تولید اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین‌ها مرتبط بود و با افزایش زمان

References

1. Azizi NF, Kumar MR, Yeap SK, Abdullah JO, Khalid M, Omar AR, et al. Kefir and its biological activities. *Foods*. 2021;10(6):1210.
2. Kök-Taş T, Seydim AC, Özer B, Guzel-Seydim ZB. Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of dairy science*. 2013;96(2):780-9.
3. Garofalo C, Osimani A, Milanović V, Aquilanti L, De Filippis F, Stellato G, et al. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food microbiology*. 2015;49:123-33.
4. de Lima Barros SÉ, dos Santos Rocha C, de Moura MSB, Barcelos MP, da Silva Hage-Melim LI. Potential beneficial effects of kefir and its postbiotic, kefirin, on child food allergy. *Food & Function*. 2021;12(9):3770-86.
5. Dadashi S, Boddohi S, Soleimani N. Preparation, characterization, and antibacterial effect of doxycycline loaded kefir nanofibers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;52:979-85.
6. Dietrich R, Jessberger N, Ehling-Schulz M, Märklbauer E, Granum PE. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*. 2021;13(2):98.
7. Hennekinne J-A, De Buyser M-L, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS microbiology reviews*. 2012;36(4):815-36.
8. Savelyeva E, Kolesov D, Khvatov I. Food Poisoning and its prevention on the example of *Listeria Monocytogenes*. *Journal of Global Pharma Technology*. 2020;12.(۰۶)
9. Mokhtar A, Karmi M. Surveillance of food poisoning *Escherichia coli* (STEC) in ready-to-eat meat products in Aswan, Egypt. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*. 2021;41-50.
10. Hosseini-zhad B, Berizi E, Nader M, Mazloomi SM, Hosseini-zadeh S, Ebrahimi L, et al. Prevalence of *Salmonella* contamination in consumed eggs in Iran: A systematic review and meta-analysis study on published studies from 1996 to 2018. *Veterinary World*. 2020;13(12):2743.
11. Adiloğlu AK, Gönülateş N, İşler M, Senol A. The effect of kefir consumption on human immune system: a cytokine study. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2013;47(2):273-81.
12. Apalowo OE, Adegoye GA, Mbogori T, Kandiah J, Obuotor TM. Nutritional characteristics, health impact, and applications of kefir. *Foods*. 2024;13(7):1026.

13. Abdullah D, Khomeini K, Vani AT, Dewi NP, Yustisia PA. IN VIVO study of kefir gel probiotics on wound healing. Nusantara Hasana Journal. 2022;2(1):119-27.
14. Wszolek M, Kupiec-Teahan B, Skov Guldager H, Tamime A. Production of kefir, koumiss and other related products. Fermented milks. 2006:174-216.
15. Ghane M, Babaeekhou L, Najafabadi BM, Mirmostafa MS. Lactic acid bacteria from kefir grains: Potential probiotics with antagonistic activity against multidrug resistant Gram-negative bacteria. Malaysian Journal of Microbiology. 2021;17.(۴)
16. Pugliese A, Ulzurrun MJ, Coluccio Leskow F, de Antoni G, Kakisu EJ. Microbiological and chemical characterization of fermented quinoa beverages obtained with kefir microorganisms. 2023.
17. Ghane M, Babaeekhou L, Ketabi SS. Antibiofilm activity of kefir probiotic lactobacilli against uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). Avicenna journal of medical biotechnology. 2020;12(4):221.
18. Kıvanç M, Yapıcı E. Kefir as a probiotic dairy beverage: determination lactic acid bacteria and yeast. International Journal of Food Engineering. 2015;1(1):55-60.
19. Güler MA, Çetin B, Albayrak B, Meral-Aktaş H, Tekgündüz KŞ, Kara M, et al. Isolation, identification, and in vitro probiotic characterization of forty novel *Bifidobacterium* strains from neonatal feces in Erzurum province, Türkiye. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2024;104(7):4165-75.
20. Silva KR, Rodrigues SA, Filho LX, Lima ÁS. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. Applied biochemistry and biotechnology. 2009;152(2):316-25.
21. Kim D-H, Jeong D, Kim H, Kang I-B, Chon J-W, Song K-Y, et al. Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. Korean journal for food science of animal resources. 2016;36(6):787.
22. Rahimzadeh G, Bahar M, Mozafari N, Salehi M. Antimicrobial activity kefir on *Pseudomonas aeruginosa*. 2011.
23. Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah NP. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and *in vitro* angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. Le Lait. 2007;87(1):21-38.
24. Tingirikari JMR, Sharma A, Lee H-J. Kefir: a fermented plethora of symbiotic microbiome and health. Journal of Ethnic Foods. 2024;11(1):35.
25. González-Orozco BD, García-Cano I, Escobar-Zepeda A, Jiménez-Flores R, Álvarez VB. Metagenomic analysis and antibacterial activity of kefir microorganisms. Journal of Food Science. 2023;88(7):2933-49.
26. Saleem K, Ikram A, Saeed F, Afzaal M, Ateeq H, Hussain M, et al. Nutritional and functional properties of kefir. International Journal of Food Properties. 2023;26(2):3261-74.
27. Ströher JA, Oliveira WdC, de Freitas AS, Salazar MM, da Silva LdFF, Bresciani L, et al. A global review of geographical diversity of kefir microbiome. Fermentation. 2025;11(3):150.
28. Shafie SR, Hew JX, Sulaiman N. Proximate composition and antimicrobial activity of Kefir produced from cow's and Almond milk: Proximate composition and antimicrobial activity of kefir mixtures. Journal of Tropical Life Science. 2023;13(2):287-96.