

ARTICLE

Kefir 유래 유산균 *Lactobacillus pentosus* Strains의 항균 및 항산화 효과

이 정 은¹ · 국 무 창^{2*}

¹경기대학교 대체의학과, ²배화여자대학교 식품영양학과

Antimicrobial and Antioxidant Effects of Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus pentosus* Strains Derived from Kefir

Jeong-Eun Lee¹, Moochang Kook^{2*}

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

²Department of Food & Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 03039, Korea

Received: August 03, 2021

Revised: August 20, 2021

Accepted: September 01, 2021

*Corresponding author :

Moochang Kook
Department of Food & Nutrition,
Baewha Women's University,
Seoul 03039, Korea
Tel : +82-2-399-0765
E-mail : bmes153@gmail.com

Copyright © 2021 Resources Science Research Institute, Kongju National University. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Jeong-Eun Lee
<https://orcid.org/0000-0002-7442-7045>
Moochang Kook
<https://orcid.org/0000-0003-4098-8298>

Abstract

In this study, useful lactic acid bacteria were isolated from kefir, which contains complexes of bacteria, yeast and serves as a reservoir for beneficial strains. As a result of 16s rRNA sequence analysis of 2 strains of kefir-derived lactic acid bacteria with remarkable antimicrobial activity, both BMSE-K006 and K009 showed 99.86% homology with *Lactobacillus pentosus* DSM 20314. The availability of carbohydrate fermentation patterns of *L. pentosus* BMSE-K006 and K009 were similar, and the availability of D-galactose and lactose was observed, confirming the availability of sugar in milk or dairy products. Also the antimicrobial activity of *L. pentosus* BMSE-K006 and K009 showed the highest against pathogenic bacteria such as *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, but no antifungal effect was observed against *Candida albicans* strains. *L. pentosus* BMSE-K006 and K009 cultured supernatant showed DPPH radical scavenging activity of 69.02% and 65.88%, respectively. Therefore, these results are expected that *L. pentosus* BMSE-K006 and K009 could be potential resources as useful lactic acid bacteria isolated from kefir.

Keywords

Kefir, *Lactobacillus pentosus*, Antimicrobial effect, Antioxidant effect

1. 서론

케피어 (kefir)는 다양한 박테리아, 효모 등이 함유된 kefir grain을 우유에서 발효시켜 얻어지며, 전 세계 여러 지역에서 생산되는 전통 acidic-alcoholic 발효유로 알려져 있다 (Prado *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2017; Slattery *et al.*, 2019). 일반적으로 kefir grain에는 10⁸ CFU/g의 lactic acid bacteria (LAB), 10⁶-10⁷ CFU/g의 yeast, 10⁵ CFU/g의 acetic acid bacteria가 존재하며, LAB 중 호모발효 (homofermentative) 및 이종발효 (heterofermentative) 종인 *Lactobacillus* (Lb), *Lactococcus* (Lc), *Leuconostoc* (Le) spp.이 가장 많이 발견된다 (Garrote *et al.*, 2010). 최근 케피어에서 분리된 유산균으로는 *Lc. lactis*, *Le. mesenteroides*, *Lb. kefir*, *Lb. sunkii* (Han *et al.*, 2018), *Lb. harbinensis*, *Lb. paracase*, *Lb. plantarum* (Talib *et al.*, 2019), *Lb. kefiranoferens* (Sun *et al.*, 2019), *Lb. plantarum* (Dinamaraca *et al.*, 2020), *Lb. pentosus* (You *et al.*, 2020) 등이 있으며, 이에 대한 다양한 효능이 연구되었다.

케피어에서 분리되는 미생물총은 원산지, 배양조건, 저장 및 가공 과정에 크게 의존하며 (Garrote *et al.*, 2010; Bengoa *et al.*, 2018), 케피어의 영양성분 또한 우유의 성분, 곡물의 미생물 조성, 발효시간 및 온도, 보관조건에 따라 달라진다 (Rosa *et al.*, 2017). 케피어는 대장암 (Khoury *et al.*, 2014), 호르몬

의존성 유방암 (de Moreno de LeBlanc and Perdigon, 2010), 성인 백혈병 (Maalouf *et al.*, 2011), 피부암 (Nagira *et al.*, 2002) 등에 대한 효과가 입증되었고, 케피어 내 유산균 또한 면역 및 종양세포에 대한 효과 (Yamane *et al.*, 2018), 항균, 항산화, 항알레르기 및 종양억제 (Slattery *et al.*, 2019) 등 다양한 효과가 보고된 바 있다.

따라서 케피어는 안전하고 잠재적으로 유익한 균주의 저장소 역할을 할 뿐만 아니라(Bengoa *et al.*, 2018) 케피어 곡물 및 케피어 내 미생물총은 다양하고 잠재적인 이점이 있어 건강상의 이점을 위한 유제품 생산에 유용할 수 있음을 나타낸다 (Zheng *et al.*, 2013). 이에 본 연구에서는 케피어 유래 유용 유산균을 분리하여 분리 균주의 생화학적 특성과 항균활성 및 항산화 효능을 확인하여 유용 유산균 자원으로써 기초자료를 마련하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

Kefir에서 유산균의 분리 및 동정

중국 현지 가정에서 수집한 kefir 시료 3개를 멸균튜브에 채취하여 4℃에서 보관 후, 신선도 유지를 위해 5일 이내 조건 하에 유산균을 분리하였다. Kefir 시료와 0.85% NaCl을 1:9 (v/v)수준에서 연속적으로 희석한 후, 최종 농도가 10⁻⁸이 되도록 희석하였다. 희석액을 100 μL 취하여 유산균 감별배지인 Bromo Cresol Purple (BCP) plate count agar (EIKEN chemical, Tokyo, Japan)에 희석도말하여 30℃에서 24시간 배양하였고, 노란색 환을 형성한 콜로니를 취해 Lactobacilli MRS broth (Difco Co., Sparks, MD, USA)에서 이를 순수 분리하였다. 항균활성이 우수한 균주의 선별을 위해 *Escherichia coli* KCTC 2571 및 *Staphylococcus aureus* KCTC 3881에 대한 disk diffusion 항균활성 측정을 통해, 항균력이 확인된 균주를 1차 선별하였으며, 선별된 균주의 16s rRNA 염기서열을 분석하여 최종 동정하였다 (BIOFACT Co., Daejeon, Korea). 염기서열 분석을 위해 518F (CCAGCAGCCGCGTAATACG)와 805R (GACTACCAGGGTATCTAATC) primer와 CLUSTAL_X (Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics)를 사용하였으며 분석한 염기서열은 GenBank database 및 EzTaxon-e server에서 비교 분석하였다. 분리 균주의 생화학적 특성 분석에는 API CHL kit (BioMérieux, Craponne, France), API ZYM kit (BioMérieux, Craponne, France)를 이용하여 당이용성 및 효소 활성 정도를 확인하였다.

항균활성 측정

항균활성 측정에 사용된 지시균주는 *Staphylococcus spp.*, *Escherichia spp.* 및 *Pseudomonas spp.*, *Candida albicans*의 총 8주를 사용하였다 (Table 1). 지시균주는 각각 Tryptone Soy Broth (Difco),

Table 1. List of indicator strains

	Strains	Collection no.	Culture media
Gram ⁺	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM 11335	Tryptic soy broth
	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 3881	Tryptic soy broth
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCTC 1917	Luria bertani broth
Gram ⁻	<i>Escherichia coli</i>	KCTC 2571	Luria bertani broth
	<i>Escherichia coli</i>	KCTC 1039	Luria bertani broth
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCTC 2513	Tryptic soy broth
Fungi	<i>Candida albicans</i>	KCTC 7270	Yeast malt broth
	<i>Candida albicans</i>	KCTC 7965	Yeast malt broth

Luria-Bertani broth (Difco), Yeast Malt broth (Difco)에 2% (v/v) 수준인 2.5×10^7 CFU/mL를 접종하여 37°C에서 18시간 배양하였으며, 배양 후 최종 지시균주의 균수를 106 CFU/mL로 조정하여 실험에 사용하였다. 항균활성 측정은 disk diffusion 방법에 의하여 확인하였으며, clear zone의 크기가 15 mm 이상이면 +++, 10-15 mm는 ++, 10 mm 미만일 경우 +로 판별하였다. 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 (SM13P020SL, Hyundai micro Co., Seoul, Korea)로 여과한 것을 시료로 사용하였다.

DPPH radical 소거능 측정

유산균 배양액의 DPPH radical 소거능은 Blois (1958)의 방법을 참고하여 측정하였다. 대조군으로 0.5% (w/v) vitamin C를 사용하였으며, 100% ethanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH solution 500 µL에 배양액 60 µL를 혼합 후 30분간 암반응 하였다. 이후 UV/VIS-spectrophotometer (BioTek, Vermont, USA)를 이용하여 520 nm에서 O.D.를 측정하였다. 소거능 값은 배양액 첨가군 (A)과 배양액을 첨가하지 않은 blank군 (A₀)간의 흡광도 비 (%)로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = (A_0 - A) / A_0 \times 100$$

용혈성 확인

분리 균주의 용혈성을 확인하기 위해 blood agar base (Kisan Bio Co., Seoul, Korea)에 5% defibrinated sheep blood (Kisan Bio)를 첨가한 blood agar plate에 분리 균주와 대조균인 *S. aureus* KCCM 11335를 희석 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후, Argyri 등 (2013)의 방법에 따라 용혈성을 확인하였다.

통계분석

본 연구에서는 생화학적 특성을 제외한 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.

III. 결과 및 고찰

Kefir에서 분리한 유산균의 분리 및 동정

Kefir로부터 유용 유산균을 분리하기 위해 중국 현지 가정에서 kefir 시료를 수집하여 6주의 유산균을 분리하였으며, 이후 항균력이 우수한 균주를 선별하기 위해 *E. coli* KCTC 2571 및 *S. aureus* KCTC 3881에 대한 항균활성을 확인하였다 (Fig. 1). 지시균주에서 모두 항균력이 우수한 K006과 K009를 선별하여 16s rRNA 유전자 염기서열 분석 결과, 분리 균주 BMSE-K006, K009는 *Lactobacillus pentosus* DSM 20314와 모두 99.86%의 상동성을 보였다 (data not shown). 이후 분리 균주의 생화학적 특성을 확인하기 위하여 API CHL kit와 API ZYM kit를 이용하여 당이용성 및 효소활성을 분석하였다. API 50 CHL kit를 이용하여 분리 균주의 당이용성을 확인한 결과, D-galactose, D-glucose, D-fructose, mannitol, sorbitol, lactose, inulin 등 29개의 탄소원에서 양성반응을 보였다 (Table 2). BMSE-K006과 K009의 당이용성 패턴은 유사하였으나 BMSE-K009는 K006보다 이당류인 melibiose의 추가적인 이용이 확인되었다. API ZYM kit를 이용한 분리 균주의 효소활성을 확인한 결과, BMSE-K006과 K009는 leucin arylamidase, valine arylamidase, β-glucosidase, N-acetyl-β

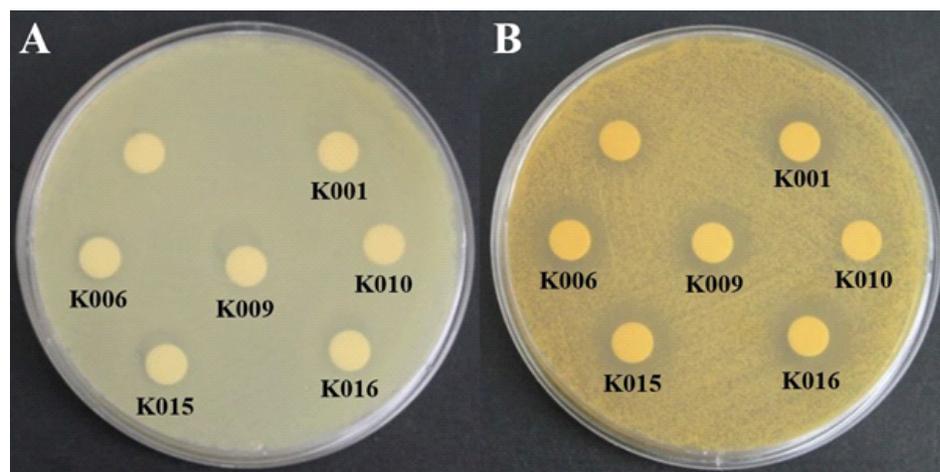


Fig. 1. Antimicrobial effects of lactic acid bacteria isolated from kefir.

Table 2. Utilization of various carbohydrates by *Lactobacillus pentosus* BMSE-K006 and K009 isolated from kefir using API 50 CHL kit

Substrate	K006	K009	Substrate	K006	K009
Glycerol	- ¹⁾	-	Salicin	+	+
Erythritol	-	-	Cellobiose	+	+
D Arabinose	-	-	Maltose	+	+
L Arabinose	+	+	Lactose	+	+
Ribose D-Ribose	+	+	Melibiose	-	+
D Xylose D-Xylose	-	-	Sucrose	+	+
L Xylose L-Xylose	-	-	Trehalose	+	+
Adonitol D-Adonitol	-	-	Inulin	-	-
Methyl-BD-xylopyranoside	-	-	Melezitose	+	+
D-Galactose	+	+	Raffinose	-	-
D-Glucose	+	+	Starch	-	-
D-Fructose	+	+	Glycogen	-	-
D-Mannose	+	+	Xylitol	-	-
L-Sorbose	+	+	Gentiobiose	+	+
Rhamnose	W	W	D-Turanose	-	-
Dulcitol	-	-	D-Lyxose	-	-
Inositol	-	-	D-Tagatose	-	-
Mannitol	+	+	D-Fucose	-	-
Sorbitol	+	+	L-Fucose	-	-
α-Methyl-D-mannoside	-	-	D-Arabitol	-	-
α-Methyl-D-glucoside	-	-	L-Arabitol	-	-
N-Acetyl-glucosamine	+	+	GlucoNaTe	W	W
Amygdalin	+	+	2-Keto-Gluconate	-	-
Arbutin	+	+	5-Keto-Gluconate	-	-
Esculin	+	+			

¹⁾ -, negative, +, positive, w; weak positive.

-glucosaminidase에서 모두 양성반응을 보였다 (Table 3).

Bae 등 (2006)의 연구에서 분리한 *L. pentosus* CU13, *L. pentosus* CU05와 비교하였을 때, 본 연구에서 분리한 *L. pentosus* BMSE-K006과 K009의 당이용성 패턴과 유사하였다. 또한 Marroki 등 (2011)이 산양유에서 분리한 *L. pentosus* LbMS40, *L. pentosus* LbMT9, *L. pentosus* LbMT10과 비교하였을 때, BMSE-K006과 K009의 glycerol에 대한 이용성은 확인되지 않았으나, *L. pentosus* LbMS40, *L. pentosus* LbMT9, *L. pentosus* LbMT10보다 L-sorbose, amygdalin의 추가적인 당이용성이 확인되었으며, 본 연구에서 분리한 *L. pentosus* BMSE-K006과 K009는 D-galactose와 lactose의 이용성이 확인되어 우유 또는 유제품 등의 당이용 가능성을 확인할 수 있었다.

L. pentosus BMSE strains의 항균효과

분리 균주 *L. pentosus* BMSE-K006과 K009의 병원성 박테리아에 대한 항균력을 측정된 결과, *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp. 및 *Pseudomonas aeruginosa*에서 모두 우수한 항균력이 확인되었으며, *Candida albicans* 2주에 대한 항진균 효과는 나타나지 않았다 (Table 4).

Kim 등 (2016)은 발효시간에 따른 kefir와 함께 lactic acid (pH 3.5)와 acetic acid (pH 3.5) 및 ethyl alcohol (2%) 용액의 항균효과를 비교하였는데, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *P.*

Table 3. Enzyme assay for major biochemical reactions of *Lactobacillus pentosus* BMSE-K006 and K009 isolated from kefir using API ZYM kit

Enzyme Assayed For	K006	K009
Control	Colorless or color of the sample if it has an intense coloration	
Alkaline phosphatase	- ¹⁾	-
Esterase (C4)	-	-
Esterase lipase (C8)	-	-
Lipase (C14)	-	-
Leucine arylamidase	+	+
Valine arylamidase	+	+
Crystine arylamidase	w	-
Trypsin	-	-
α -Chymotrypsin	-	-
Acid phosphatase	w	w
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	w	w
α -Galactosidase	w	w
β -Glucuronidase	+	+
β -Glucosidase	-	-
α -Glucosidase	+	+
β -Glucosidase	+	+
N-Acetyl- β -glucosaminidase	+	+
α -Mannosidase	-	-
α -Fucosidase	-	-

¹⁾ -; negative, +; positive, w; weak positive.

Table 4. Antimicrobial effects of *Lactobacillus pentosus* BMSE-K006 and K009 isolated from kefir

	Strains	K006	K009
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11335	+++ ¹⁾	+++
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 3881	++	++
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	+++	+++
Gram -	<i>Escherichia coli</i> KCTC 2571	++	++
	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1039	+++	+++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 2513	+++	++
Fungi	<i>Candida albicans</i> KCTC 7270	-	-
	<i>Candida albicans</i> KCTC 7965	-	-

¹⁾ +++; >15mm, ++; 10-15mm.

*aeruginosa*에서 모두 발효된 kefir에서만 항균효과가 나타나, kefir의 낮은 pH에 의한 항균효과가 아닌 kefir 내 다양한 대사산물을 포함하는 항균물질에 기인할 수 있음을 보고하였다. 한편 Chifiriuc 등 (2011)은 *Bacillus subtilis*, *E. faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, *E. coli*에 대한 kefir의 우수한 항균효과와 kefir 내 항균물질을 생산하는 복합적인 probiotics에 의한 넓은 항균 스펙트럼 활성을 나타냄을 보고하였으며, *P. aeruginosa*에 대한 kefir의 항균효과가 나타나지 않았으나, 본 연구에서 분리한 *L. pentosus* BMSE-K006과 K009는 *P. aeruginosa*에 대한 우수한 항균효과가 나타나, kefir 내 미생물에 의한 항균효과가 나타남을 유추할 수 있었다. 또한 *L. pentosus* TV35b가 생산하는 pentocin TV35b(Okkers *et al.*, 1999), *L. pentosus* CS2가 생산하는 pentocin MQ1 (Wayah and Philip, 2018), *L. pentosus*가 생산하는 박테리오킨인 lacidophilin (Zhu and Zhang, 2020) 등 *L. pentosus*가 생산하는 박테리오킨에 대한 연구를 통해 우수한 항균효과가 보고되었으며, 최근 Dai 등 (2021)은 *L. pentosus*가 생산하는 bacteriocin을 정제하여 그람 양성균과 그람 음성균에 대한 광범위한 항균 활성을 입증한 바 있다. 따라서 본 연구에서 분리한 *L. pentosus* BMSE-K006과 K009의 그람 양성균 및 그람 음성균에 대한 우수한 항균효과는 유산균이 생산하는 대사산물 중 특정 항균물질에 의한 것으로 추측할 수 있으며, 향후 항균 화합물과 작용기전을 규명하기 위한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

L. pentosus BMSE strains의 DPPH radical 소거능

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 ethanol 내에서 흡광도 (517 nm)를 갖는 안정적인 free radical로 항산화 물질과 같은 양성자 공여 물질을 만나면 free radical이 제거되어 흡광도가 감소된다 (Abubark *et al.*, 2012). 대표적인 항산화제인 vitamin C를 대조군으로 하여 분리 균주 배양액의 DPPH radical 소거능을 측정하여 유산균 배양액의 항산화 효과를 확인하고자 하였다. DPPH radical 소거능의 결과는 Fig. 2에 제시한 바와 같다. 대조군 0.5% vitamin C의 경우 94.12±0.28%, *L. pentosus* BMSE-K006과 K009는 각각 69.02±0.53%, 65.88±1.65%로 K006의 소거능이 더 높게 나타났다 ($p<0.05$).

Abo-Saif와 Sakr (2020)이 분리한 *L. pentosus* 14FE와 *L. pentosus* 68FE의 DPPH radical 소거능은 각각 54.50%, 61.67%로 보고되었으며, 최근 Unban 등 (2021)이 *L. pentosus* 3주 배양액의 DPPH radical 소거능을 확인한 결과, 모두 70% 이상으로 보고한 바 있다. 분리 균주의 DPPH radical 소거능과 비교하였을 때, 본 연구에서 분리한 *L. pentosus* BMSE-K006과 K009의 DPPH radical 소거능과 유사하거나 더 우수하여 분리 균주는 산화적 스트레스를 방지할 수 있는 잠재적인 유용 유산균으로

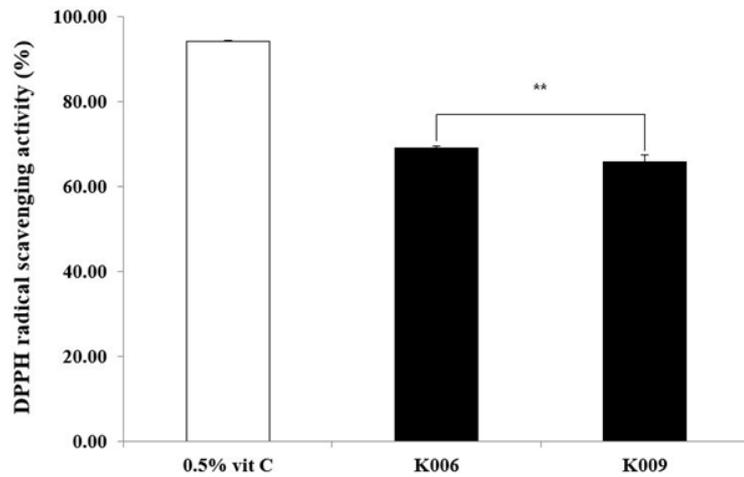


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of *Lactobacillus pentosus* BMSE-K006 and K009 isolated from Kefir. □ ; 0.1% vitamin C, ■ ; *L. pentosus* BMSE strains. Bar graph showed mean \pm SD of DPPH radical scavenging activity. p values refer to the analysis by unpaired t-test. **p < 0.05: K006 vs K009 by unpaired t-test.

가치가 있을 것으로 생각된다.

L. pentosus BMSE strains의 용혈성 확인

Lactobacillus 35종 중 *L. pentosus*, *L. plantarum* 및 *L. acidophilus* 등은 독성인자 및 전이 가능한 항생제 내성 유전자가 없을 경우 프로바이오틱스로 사용될 수 있다 (Montoro *et al.*, 2016). 그러나 일부 유산균 균주는 잠재적인 병원성을 가질 수 있는 것으로 보고된 바 있어 용혈성 유무, 항생제 내성, 독소 생성 유무, 대사적 특성 등의 확인이 필요하다 (Cannon *et al.*, 2005).

따라서 분리 균주의 용혈성 유무를 확인하기 위해 *S. aureus* KCCM 11335를 대조균으로 하여, *L. pentosus* BMSE-K006과 K009의 용혈성을 확인하였다 (Fig. 3). 그 결과, 분리 균주에서는 용혈성이 관찰되지 않아 안전성을 뒷받침할 수 있으며, 추후 probiotics의 특성 확인을 포함하여 항생제 내성

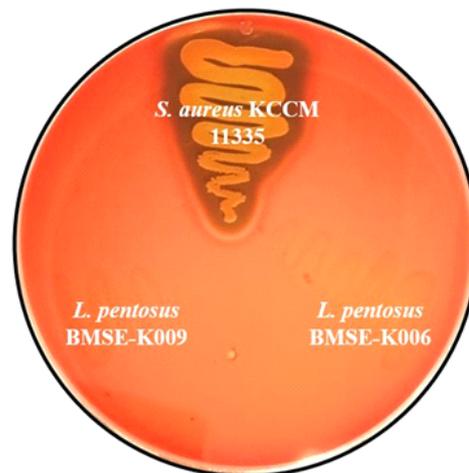


Fig. 3. Hemolysis of *Lactobacillus pentosus* BMSE-K006 and K009 isolated from kefir.

등의 안전성 확인에 대한 입증이 필요할 것으로 생각된다.

IV. 요약

본 연구에서는 박테리아, 효모 등의 복합체가 존재하고 유익한 균주의 저장소 역할을 하는 케피어(kefir)로부터 유용 유산균을 분리하고자 하였다. 항균활성이 우수한 케피어 유래 유산균 2주의 16s rRNA 염기서열 분석 결과, BMSE-K006과 K009는 *Lactobacillus pentosus* DSM 20314와 모두 99.86%의 상동성을 보였다. *L. pentosus* BMSE-K006과 K009 두 균주의 당이용성 패턴은 유사하였으며, D-galactose와 lactose의 이용성이 확인되어 우유 또는 유제품 등의 당이용 가능성을 확인하였다. 또한 *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp. 및 *Pseudomonas aeruginosa* 등 병원성 박테리아에 대한 *L. pentosus* BMSE-K006과 K009의 항균활성을 확인한 결과, 지시균주에서 모두 우수한 항균력을 보였다. 그러나 *Candida albicans* 2주에 대한 항진균 효과는 나타나지 않았다. *L. pentosus* BMSE-K006과 K009 배양액은 각각 69.02%, 65.88%의 우수한 DPPH radical 소거능을 보였으며, 용혈성 유무를 확인한 결과, 두 균주 모두 용혈성은 관찰되지 않았다. 본 연구에서는 케피어 유래 유산균 *L. pentosus* BMSE-K006과 K009의 병원성 박테리아에 대한 우수한 항균효과 및 항산화 효과가 입증되어 유용 유산균 자원의 가능성을 뒷받침할 기초자료가 될 수 있을 것으로 판단된다.

V. 참고문헌

1. Abo-Saif FAA, Sakr EAE. 2020. Characterization and bioactivities of exopolysaccharide produced from probiotic *Lactobacillus plantarum* 47FE and *Lactobacillus pentosus* 68FE. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 24:100231.
2. Abubark MAS, Hassan Z, Imdakim MMA, Sharifa. 2012. AS, Antioxidant activity of lactic acid bacteria (LAB) fermented skim milk as determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and ferrous chelating activity (FCA). *Afr J Microbiol Res* 6(34):6358-6364.
3. Argyri AA, Zoumpoulou G, Karatzas K AG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ, Tassou CC. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol* 33(2):282-291.
4. Bae IH, Byun JR, Bae GS, Lee SS, Chang MB, Yoon YH. 2006. Inhibition activity against pathogenic organism of probiotic bacteria and characterization of inhibition activity of isolated bacteria from calf dejecta. *Food Sci. Anim. Resour.* 48(6):907-920.
5. Bengoa AA, Iraporda C, Garrote GL, Abraham AG. 2018. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *J Appl Microbiol* 126(3):686-700.
6. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181(4617):1199-1200.
7. Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24(1):31-40.
8. Chifiriuc MC, Cioaca AB, Lazar Y. 2011. *In vitro* assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. *Anaerobe* 17(6):433-435.
9. Dai M, Li Y, Xu L, Wu D, Zhou Q, Li P, Gu Q. 2021. A novel bacteriocin from *Lactobacillus pentosus* ZFM94 and its antibacterial mode of action. *Front Nutr* 8:710862.

10. de Moreno de LeBlanc A, Perdigon G. 2010. The application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation. *Proc Nutr Soc* 69(3):421-428.
11. Dinamaraca MA, González-Pizarro K, Ahumada R, Ibacache-Quiroga C. 2020. Draft genome sequences of *Lactobacillus plantarum* strain K03D08 and *Acetobacter syzygii* Strain K03D05, isolated from a Kefir beverage collected in Chile. *Microbiol Resour Announc* 9(31): e00611-00620.
12. Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. 2010. Microbial interactions in kefir: A natural probiotic drink. *Biotechnology of Lactic acid Bacteria: Novel Applications*. pp 327-340.
13. Han X, Zhang LJ, Wu HY, Wu YF, Zhao SN. 2018. Investigation of microorganisms involved in kefir biofilm formation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111(12):2361-2370.
14. Khoury N, El-Hayek S, Tarras O, El-Sabban M, El-Sibai M, 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(5):2117-2127.
15. Kim DH, Jeong DA, Kim HS, Kang IB, Chon JW, Song KY, Seo KH. 2016. Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. *Food Sci. Anim. Resour* 36(6):787-790.
16. Maalouf K, Baydoun E, Rizk S. 2011. Kefir induces cell-cycle arrest and apoptosis in HTLV-1-negative malignant T-lymphocytes. *Cancer Manag Res* 3:39-47.
17. Marroki A, Zúñiga M, Kihal M, Pérez-Martínez G. 2011. Characterization of *Lactobacillus* from Algerian goat's milk based on phenotypic, 16s rDNA sequencing and their technological properties. *Braz J Microbiol* 42(1):158-71.
18. Montoro BP, Benomar N, Lerma LL, Gutiérrez SC, Gálvez A, Abriouel H. 2016. Fermented almoreña table olives as a source of potential probiotic *Lactobacillus pentosus* strains. *Front Microbiol* 7:1583.
19. Nagira T, Narisawa J, Teruya K, Katakura Y, Shim SY, Kusumoto K, Tokumaru S, Tokumaru K, Barnes DW, Shirahata S. 2002. Suppression of UVC-induced cell damage and enhancement of DNA repair by the fermented milk, Kefir. *Cytotechnology* 40(1):125-137.
20. Okkers DJ, Dicks LMT, Silvester M, Joubert JJ, Odendaal HJ. 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J Appl Microbiol* 87(5):726-734.
21. Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front. Microbiol* 30:1177.
22. Rosa DD, Dias MMS, Grześkowiak ŁM, Reis SA, Conceição LL, Peluzio M do CG. 2017. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev.* 30(1):82-96.
23. Slattery C, Cotter PD, O'Toole PW. 2019. Analysis of health benefits conferred by *Lactobacillus* species from Kefir. *Nutrients* 11(6):1252.
24. Sun Y, Geng W, Pan Y, Wang JJ, Xiao P, Wang YP. 2019. Supplementation with *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 from Tibetan Kefir improves depression-like behavior in stressed mice by modulating the gut microbiota. *Food Funct* 10(2):925-937.

25. Talib N, Mohamad NE, Yeap SK, Hussin Y, Aziz MNM, Masarudin MJ, Sharifuddin SA, Hui YW, Ho CL, Alitheen NB. 2019. Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. from Kefir samples in Malaysia. *Molecules* 24(14):2606.
26. Unban K, Chaichana W, Baipong S, Abdullahi AD, Kanpiengjai A, Shetty K, Khanongnuch C. 2021. Probiotic and antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from indigenous fermented tea leaves (Miang) of North Thailand and promising application in synbiotic formulation. *Fermentation* 7(3):195.
27. Wayah SB, Philip K. 2018. Pentocin MQ1: a novel, broad-spectrum, pore-forming bacteriocin from *Lactobacillus pentosus* CS2 with quorum sensing regulatory mechanism and biopreservative potential. *Front Microbiol* 9:564.
28. Yamane T, Sakamoto T, Nakagaki T, Nakano Y. 2018. Lactic acid bacteria from kefir increase cytotoxicity of natural killer cells to tumor cells. *Foods* 7(4):48.
29. You X, Yang L, Zhao XJ, Ma K, Chen XH, Zhang CL, Wang CX, Dong MS, Rui X, Zhang QQ, Li W. 2020. Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* LZ-R-17 isolated from Tibetan kefir. *Int J Biol Macromol* 158:408-419.
30. Zheng YC, Lu YL, Wang JF, Yang LF, Pan C, Huang Y. 2013. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan Kefir grains. *PLoS One* 8: e69868.
31. Zhu Y, Zhang S. 2020. Antibacterial activity and mechanism of lacidophilin from *Lactobacillus pentosus* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 11:582349.