

菌株聚集和成膜特性对开菲尔粒成粒作用的影响

韩雪, 井雪萍, 杨喆, 刘采云

(哈尔滨工业大学化工学院, 黑龙江哈尔滨 150090)

摘要: 开菲尔粒是一种天然的发酵剂, 原粒在牛奶中经长期培养后会不断长大, 分裂产生新的开菲尔粒。开菲尔的成粒特性已经引起了人们的广泛关注, 然而到目前为止, 人们还无法人工合成开菲尔粒, 这与其粒中复杂的微生物体系及成分组成等息息相关; 开菲尔粒的形成是一个复杂的过程, 其中所含的微生物菌系、蛋白质、多糖等成分均会影响开菲尔粒的形成。因此, 本文根据国内外的研究动态, 介绍了开菲尔粒中微生物的多样性及分布, 阐述了开菲尔粒中的微生物及蛋白质、多糖等成分对菌株聚集及生物膜形成特性的影响, 进而从微生物的聚集能力及生物膜形成能力的角度出发, 综述了开菲尔粒的成粒特性, 以期研究开菲尔粒的形成机制, 建立人工合成开菲尔粒的方法, 开发开菲尔产品提供思路。

关键词: 开菲尔粒; 微生物多样性; 生物膜; 成粒特性

文章编号: 1673-9078(2016)10-310-316

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.046

Effect of Microbial Aggregation and Biofilm Formation on Kefir Grain Formation

HAN Xue, JING Xue-ping, YANG Zhe, LIU Cai-yun

(School of Chemical Engineering and technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Kefir grain is a natural starter culture, and the original grain can grow and split to produce new Kefir grains after long-term subculturing in milk. The grain formation properties of the Kefir grain have attracted considerable research attention. However, synthetic Kefir grains still cannot be obtained due to the complex microbial system and the grain composition. Kefir grain formation is a complex process, and can be affected by the microbial strains present, proteins, polysaccharides, and other components. Therefore, based on results from recent studies, the diversity and distribution of microorganisms in Kefir grains were investigated and the effects of the microorganisms, proteins, and polysaccharides in the Kefir grain on microbial strain aggregation and biofilm formation were discussed. Subsequently, the features of Kefir grain formation were summarized based on the aggregation and biofilm formation abilities of the microorganisms. These findings can help to reveal the mechanism underlying Kefir grain formation, establish new methods for synthesizing artificial Kefir grains, and provide new approaches for developing Kefir products.

Key words: Kefir grain; microbial diversity; biofilm; grain formation property

开菲尔粒是一种乳白色、胶质状、呈块状的自然菌种, 有一定的弹性, 直径在 1~15 mm 不等, 有活性的开菲尔粒可浮在乳表面, 原粒在牛奶中经长期培养后会不断长大、分裂产生新的开菲尔粒^[1], 开菲尔粒和西藏灵菇粒是不同来源的同一品系的菌粒^[2]。经开菲尔粒发酵的开菲尔奶的风味与普通酸奶有较大差别, 除了具有发酵奶特有的酸味、香味, 还有轻微的醇香味, 这是因为开菲尔粒的发酵过程除乳酸发酵

外, 还伴有轻微的由酵母菌引起的酒精发酵。此外, 开菲尔奶还具有高蛋白质、低糖、低热量的特点, 其中含有的大量有益菌, 能产生有益于人体的代谢产物, 具有改善消化机能、抗菌消炎、增强免疫系统等多种保健功能, 因此受到了人们广泛的关注^[3]。传统开菲尔粒不易保藏, 受环境因素影响大, 需不断进行传代培养, 且粒的增长速度过慢, 使得其产品不稳定, 无法实现工业化大规模生产^[4]。但至今为止, 开菲尔粒数量的增加仍依赖于原粒在乳中的分裂, 在没有原粒存在条件下, 人们仍无法合成新的开菲尔粒^[5]。开菲尔粒的成粒是个复杂的过程, 人们还无法解释其成粒的具体机制, 由于从开菲尔粒中分离出的菌有许多具有聚集和生物膜形成的能力, 并且开菲尔粒中含有的蛋白质、多糖等成分对微生物的聚集和生物

收稿日期: 2015-11-25

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31101317); 哈尔滨市青年创新人才基金项目(2013RFQXJ147); 黑龙江省博士后科研启动金项目(LBH-Q12108)

作者简介: 韩雪(1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学、食品发酵

膜形成有促进的作用,因此可以推测开菲尔的成粒机制与其中复杂的微生物菌系、菌体的聚集、生物膜的形成有关。本文介绍了开菲尔粒的微生物多样性,菌体聚集及微生物生物膜成膜的研究现状,综述了开菲尔粒的成粒特性,以期建立人工合成开菲尔粒的方法,实现开菲尔产品的工业化生产提供理论依据。

1 开菲尔粒中微生物的多样性与分布

开菲尔粒中含有丰富的微生物,主要为乳酸菌、其次为酵母菌及少量醋酸菌等。目前对开菲尔粒中微生物的研究多集中在乳酸菌和酵母菌而对醋酸菌研究较少,但醋酸菌有助于维持开菲尔粒中各种微生物之间的互生关系,也可通过增加制品的黏度来提高制品的稳定性^[6]。开菲尔微生物种群中乳杆菌含量较高,在可分离出的菌种中,乳杆菌的含量可达70%~80%^[7],其中主要有马乳酒样乳杆菌(*Lactobacillus kefirifaciens*)、高加索酸乳杆菌(*Lactobacillus kefir*)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、内氏乳杆菌(*Lactobacillus Nagelii*)等;酵母菌主要是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、平常假丝酵母(*Candida inconspicua*)、克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianu*)等^[8,9];已从开菲尔粒中分离出的醋酸菌较少,有东方醋酸菌(*Acetobacter orientalis*)、巴斯德醋酸杆菌(*Acetobacter pasteurianus*)^[10];此外开菲尔粒中的微生物还有嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)等^[9]。开菲尔粒中微生物含量丰富、菌系分布复杂,关于微生物在开菲尔粒中的分布情况尚未达成共识。一种观点认为开菲尔粒中的长杆菌主要分布在开菲尔粒的内部,短杆菌主要分布在开菲尔粒的外部,乳球菌、醋酸菌都分布在开菲尔粒的表面,越靠近内层含量越少^[11];酵母菌则分布在

开菲尔粒的内外两层,位于内层的酵母菌不发酵乳糖,位于外层的酵母菌发酵乳糖;菌群密度方面内部的菌群密度小于外部^[12]。另一种观点认为开菲尔粒外层主要为酵母和球菌;内层微生物以短杆菌为主,兼有部分酵母菌和长杆菌,内层菌体密度比较大^[13]。开菲尔粒中微生物的差异可能是由于开菲尔粒的来源不同、观察方法不同、以及观察区域的不同导致的。尽管开菲尔粒中微生物的分布存在一定的差异,但所有研究结果都表明这种分布是有一定规律性的,并不是杂乱无章的。

2 开菲尔粒成粒特性的研究

目前,有学者通过微胶囊技术包埋开菲尔粒中优势菌来模拟形成开菲尔粒,使产品具有开菲尔发酵特性。Chen^[14]等通过将分离自开菲尔中的微生物进行包埋,固定化来形成近似于开菲尔粒的结构,使其在发酵乳性能上与天然粒相近。周剑忠^[15]对从西藏灵菇粒中分离出的优势菌进行混合发酵制备了微囊化纯培养发酵剂,结果表明,利用混合微囊化发酵剂发酵的酸乳在挥发性风味成分上与西藏灵菇粒的发酵乳有90%相同。虽然这些方法都获得了近似天然开菲尔产品的性质,但其制品功能性及质量都无法与天然粒发酵的产品相比^[16]。曲宜^[17]分别采用包埋和开菲尔发酵制得的干酪为载体,模拟天然西藏灵菇粒,并与天然西藏灵菇粒的菌系相比,得出两种载体中的酵母菌菌落的结构相似,而在细菌方面,人工载体的瑞士乳杆菌含量较多,马乳酒样乳杆菌含量较少,进一步对两种载体连续传代培养,发现人工载体的主要成分含量有接近西藏灵菇粒主要成分含量的趋势,但这种人工载体在连续传代培养过程中质量有所损失,增值率为负,未能实现人工开菲尔粒的合成。

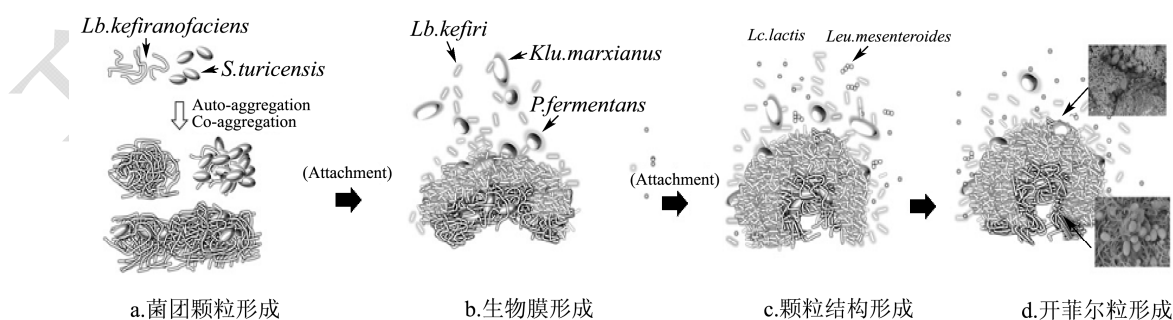


图1 开菲尔粒的形成^[11]

Fig.1 Schematic diagram of kefir grain formation^[11]

注: a.菌团颗粒形成; b.生物膜形成; c.颗粒结构形成; d.开菲尔粒形成。

波兰的 Kaminsky 提出了开菲尔粒的形成过程: 首先由乳酸菌分解乳糖产生乳酸, 其次由于酵母的作

用进行酒精发酵。同时, 由其产生的乳酸可作为开菲尔粒中杆菌的生长促进物质。杆菌利用乳糖分解所产

生的葡萄糖而形成黏质膜,黏质膜可黏附其它微生物,从而形成开菲尔粒^[18]。Wang^[19]在对开菲尔粒中菌株的自聚集及共聚集研究的基础上,对开菲尔成粒的机制提出了假设(图1),首先,马乳酒样乳杆菌和图列茨酵母(*Saccharomyces turicensis*)进行自动聚集和相互聚集形成小菌团颗粒(图1a)。随着pH的降低,高加索酸奶乳杆菌、克鲁维酵母、和发酵毕赤酵母(*Pichia fermentum*)由于其细胞表面特性和较强的相互聚集能力吸附到小菌团颗粒的表面,形成较薄的生物膜(图1b)。生物膜形成后,酵母菌和乳酸菌继续聚集到菌团颗粒上,使其呈现三维立体结构(图1c)。随着发酵的进行,菌团颗粒的密度不断增大,更多的微生物聚集到颗粒表面最终形成开菲尔粒(图1d)。但由于开菲尔粒菌系及成分的复杂,其成粒机制仍在进行研究,至今未能解释清楚,但极有可能与菌体的聚集和生物膜的形成有关。

3 开菲尔粒菌株成膜特性的研究

细菌形成的生物膜是细菌生长过程中为适应生存环境而形成的一种与游走态细胞(Planktonic cell)相对应的存在形式^[20],多数较浓密且肉眼可见。目前已经证实,大部分的细菌都可以在非生物物体或者生物物体表面形成生物膜结构。鉴定细菌生物膜的方法有试管法、银染法、结晶紫染色等,这类方法易操作且经济,适合大多数实验室操作,但这种方法不能观察到生物膜微结构,并且无法观察形成的生物膜中是否有活菌,具有一定的局限性。现在可利用扫描电镜、透射电镜、激光共聚焦扫描电镜等方法来检测生物膜,这类检测方法可以观察到生物膜不同生长时期的三维结构形态^[21]。用扫描电镜观察到大面积聚集细菌及连接于细菌之间的纤维样组织,即可认为大量生物膜存在^[22],通过激光共聚焦显微镜观察用双荧光染色的生物膜以及不同时期的生物膜时,可以观察到生物膜中活菌分布情况以及不同时期生物膜的厚度^[21]。

生物膜是由细胞外多聚基质(Extracellular matrix, ECM)包裹细菌菌落形成的有结构的菌细胞群体,其上还有数百万的原核和真核细胞,ECM主要由多糖和其它大分子如蛋白质,DNA,酯和腐殖质构成,在多数生物膜内,微生物细胞占生物膜干重的比例较少,ECM几乎占生物膜干重的90%以上^[23]。生物膜的结构主要与ECM有关,而开菲尔粒的成分中除多种微生物外还含有大量的胞外多糖与蛋白质^[24],其组成成分会随来源的不同、培养条件的不同而不同,但没有显著的差异^[25]。开菲尔的组成成分与生物膜的成分相近,因此推测生物膜的形成可能是开菲尔粒形成

的关键。生物膜的形成是一个变化的过程,细菌由浮游状态变成成熟的生物膜大概要经过以下几个阶段:细菌可逆的吸附到基质中,细胞与细胞之间吸附与增殖形成小菌落,形成早期的生物膜、生物膜的成熟阶段、细菌的脱离^[26],其中,吸附阶段是细菌生物膜形成的关键步骤,它涉及到几个黏附分子的相互作用,能够引起细胞与附着物表面的物理化学反应。生物膜的形成,无论是同一种细菌还是各种不同的细菌都没有一致的途径,它们可以随着环境的变化而产生相应的变化^[27]。

3.1 开菲尔粒菌株的聚集能力及成膜特性

菌的聚集能力是菌体形成生物膜的基础,细菌的聚集能力包括同种菌株之间的自动聚集能力和不同菌株之间的共聚集能力^[28]。酵母菌的细胞壁表面有3种主要成分包括葡聚糖、甘露聚糖和角素,这些成分在共聚集作用中起着重要的作用,甘露聚糖在酵母菌的表面形成荚膜状的结构,细菌会吸附到这种荚膜结构中,使得细菌与酵母菌之间形成共聚集,如分离自开菲尔粒的高加索酸奶乳杆菌和解脂酵母(*Saccharomyces lipolytica*)有共聚集现象,但这种共聚集现象有其特异性,不是所有的细菌均具有这种聚集能力,分离自开菲尔的20种高加索酸奶乳杆菌菌株中只有6种可以与解脂酵母发生共聚集^[29]。开菲尔粒中菌株之间的相互聚集关系与菌株的表面电荷、疏水性、胞外多糖及表面蛋白密切相关^[12]。分离自开菲尔粒中的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)与酿酒酵母也有共聚集作用,这种共聚集作用会显著影响生物膜的形成,并且植物乳杆菌的表面蛋白和酿酒酵母的表面甘露聚糖有助于生物膜的形成^[30]。乳酸菌与酵母菌的聚集能力是由乳酸菌表面正电荷与酵母细胞表面负电荷发生的静电反应产生的^[31]。乳酸菌表面蛋白和酵母菌细胞壁上的多糖对酵母菌与乳酸菌的共聚集起着重要作用,乳酸菌表面蛋白与多糖的交互作用可以调节乳酸菌与酵母菌的聚集能力,但聚集程度与多糖的含量及结构有关^[32,33]。开菲尔粒中菌株之间及粒的成分之间如何交互作用还不清楚,可以推测开菲尔粒菌株之间发生共聚集作用,进一步增殖,与蛋白质、多糖共同作用形成生物膜。

微生物是否能形成生物膜及生物膜形成能力的强弱可以用生物膜形成指数(BFI)来表征,BFI值大于1.10时即认为微生物有较强的生物膜形成能力,BFI值小于0.35时即认为不能形成生物膜^[34]。任晓璞^[35]从新疆酸奶中分离出了110株菌,在检测的乳酸菌中,生物膜为阳性的共70株,占菌株总数的63.64%,其中生

物膜阳性乳酸菌全为乳杆菌, 并且生物膜阳性乳杆菌的比例占总数的68.32%, 从中可以看出乳杆菌生物膜形成能力较强。Lebeer发现鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) 在体外条件下能较强的吸附到薄壁细胞和粘液中, 并且在无生命表面体上有较强的生物膜形成能力^[36]。目前对可形成生物膜的微生物研究多集中在致病菌或腐败菌^[37], 国内外对开菲尔粒的成膜性质的报道还比较少, 但已有研究表明开菲尔粒中的微生物可发生自动聚集现象进而可以形成生物膜。Wang^[19]对开菲尔粒中分离出的4种乳酸菌: 马乳酒样乳杆菌、高加索酸奶乳杆菌、肠膜明串株菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*), 3种酵母菌: 克鲁维酵母、图列茨酵母、发酵毕赤酵母进行研究, 结果显示, 马乳酒样乳杆菌和图列茨酵母有较强的自动聚集能力, 高加索酸奶乳杆菌、克鲁维酵母和发酵毕赤酵母有生物膜形成特性, 并且当图列茨酵母、马乳酒样乳杆菌和高加索酸奶乳杆菌共同培养时, 有较强的共聚集现象。由于开菲尔粒中含有丰富的乳酸菌、酵母菌, 而酵母菌具有良好的产荚膜能力, 可以吸附其他细菌从而形成生物膜, 醋酸菌虽然在开菲尔粒中含量较少, 但醋酸菌具有很好的成膜性^[38], 而且, 醋酸菌位于开菲尔粒的表面, 可以增加开菲尔粒的表层黏度^[16], 因此对富集浮游微生物可能起着重要作用, 对开菲尔粒的形成也起着不可忽视的作用。

3.2 开菲尔粒中的成分对菌株成膜特性的影响

生物膜上包裹菌体的基质的主要成分是胞外多糖(EPS), 占总量的50%~90%, 从开菲尔粒中分离出的乳酸菌大多具有产胞外多糖的能力^[39], EPS与乳酸菌生物膜的形成有直接关系, 是生物膜形成的必需条件, 它既能增强微生物细胞对外界环境的抵抗能力, 又是影响生物膜稳定的关键因素^[35]。一方面, EPS可以促进细菌吸附到生物或非生物体的表面, 有助于生物膜的完整性; 另一方面, 生物膜细胞生存的直接条件与生物膜的孔隙度、吸附性、带电性、疏水性和机械稳定性等因素直接相关, 而EPS可以通过影响这些因素来决定微环境中生物膜细胞的生存。用扫描电镜观察植物乳杆菌产生的胞外多糖, 发现该胞外多糖表面光滑、结构致密, 并且具有生物膜的可塑性^[40]。由开菲尔粒产生的乳酸菌胞外多糖称为开菲尔多糖, 开菲尔多糖由半乳糖和葡萄糖构成, 是一种水溶性的中性支链黏性多糖^[41]。在开菲尔发酵乳及脱蛋白乳清中开菲尔多糖的含量分别可以达到218 mg/L和247 mg/L^[42], 开菲尔多糖能够增加溶液的黏性、提高脱脂酸乳凝胶的流变特性、增加凝胶的表观黏度、提高脱脂酸乳凝

胶的储存时间等^[43]。开菲尔多糖浓度为2%的溶液即成一种黏性的液体, 开菲尔多糖可作为黏合剂, 使微生物固定在其上, 有利于开菲尔生物膜的形成^[44]。对从开菲尔粒中分离出的开菲尔多糖进行生物膜成膜试验, 发现开菲尔多糖可以形成生物膜, 并且当开菲尔多糖的浓度达到10g/kg时, 即可形成透明的显而易见的生物膜^[45]。

开菲尔粒中也含有较多的蛋白质, 其含量约为4.5%, 这些蛋白成分有助于生物膜的形成^[46]。在生物膜形成各个阶段其蛋白含量变化较大, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳分别分析生物膜形成的各个阶段蛋白质含量的变化, 浮游细菌转变成不可逆的吸附阶段时可检测到的蛋白含量增加了29%; 从不可逆的吸附细胞过度到生物膜成熟阶段蛋白含量增加了40%^[47]。对开菲尔中蛋白质的研究多数都是关于S层蛋白, 体外的S层蛋白能自发形成晶体结构, 并具有黏附功能, 可以覆盖在细菌表层形成特殊的生物膜结构^[48]。细菌S层蛋白存在于几乎所有的细菌种类中, S层蛋白是菌体的外层成分, 经菌体合成后分泌到胞外, 其主要功能之一就是作为细胞吸附到各种靶体上的媒介, 在微生物黏附定植方面有较大作用, 若通过化学方法使细菌表面缺失S层蛋白或在长期培养过程中用其他分子覆盖在S层蛋白表面时, 细菌与靶体的黏附性降低^[49]。但S层蛋白与宿主的黏附机制的研究至今没有达成共识, 其中一种猜想是认为S层蛋白赋予了菌体细胞表面的疏水性, 使得菌体可黏附到各种组织表面^[50]。S层蛋白的黏附性对生物膜的形成有重要的作用。

开菲尔粒中含量较多的开菲尔多糖和蛋白质均有黏附和形成生物膜的能力, 因此推测, 生物膜的形成对开菲尔粒的形成有重要的作用。目前, 关于开菲尔粒中的其他成分, 如脂质、矿物质等物质的相关报道较少, 这些成分对生物膜及开菲尔粒的形成的作用还有待探索。

4 展望

由于开菲尔粒微生物构成及其产物的复杂性, 目前对开菲尔粒的研究多集中在菌相分布、代谢产物及其功能性方面, 而对其粒的形成机制知之甚少。尽管许多研究都试图通过将原粒中分离出的菌株进行互配来模拟天然开菲尔粒的菌群构成, 从而人工合成开菲尔粒, 但都未成功。目前可以使用纯培养发酵剂获得质量稳定的开菲尔产品, 但其制品在发酵及功能特性上无法和原粒发酵的产品相媲美, 开菲尔粒发酵产品的产业化、市场化仍未实现, 因此对开菲尔粒的成粒机制的研究势在必行。文章重点阐述了开菲尔粒中的

微生物、开菲尔多糖、蛋白质等成分对菌株聚集及生物膜形成的作用及影响,期望从生物膜的角度探索开菲尔粒的成粒机制,为研究开菲尔成粒机制提供新思路。

参考文献

- [1] Irigoyen A, Arana I, Castiella M, et al. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of Kefir during storage [J]. *Food Chemistry*, 2005, 90(4): 613-620
- [2] 李广智.藏灵菇发酵乳预防肥胖和高脂血症作用研究[D].长春:吉林大学,2008
LI Guang-zhi. Studies on preventing obesity and hyperlipidemia effects of Kefir [D]. Changchun: Jilin University, 2008
- [3] 贾磊.酵母与乳酸菌发酵特性研究及混合乳开菲尔的研制[D].天津:天津科技大学,2010
JIA Lei. Research on the fermentation characters of the selected yeast and lab and development of Kefir from mixed milk [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2010
- [4] 范佳,李艳.开菲尔粒中微生物菌群及分离鉴定研究进展[J].中国奶牛,2014,14:40-43
FAN Jia, LI Yan. Research progress on microbial group and its isolation and identification of Kefir grain [J]. *China Dairy*, 2014, 14: 40-43
- [5] Schoevers A, Britz T J. Influences of different culturing conditions on Kefir grain increase [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2003 56(3): 183-187
- [6] 夏波.开菲尔的微生态及其发酵剂的制备研究[D].长沙:湖南农业大学,2007
XIA Bo. Research on microbiological condition of Kefir and its composite starter [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2007
- [7] Gulitz A, Stadie J, Wenning M, et al. The microbial diversity of water Kefir [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 151(3): 284-288
- [8] Leite A M, Mayo B, Rachid C T, et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis [J]. *Food Microbiology*, 2012, 31(2): 215-221
- [9] Simova E, Beshkova D, Angelov A, et al. Lactic acid bacteria and yeasts in Kefir grains and Kefir made from them [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 28(1): 1-6
- [10] 刘芸,曹宜,刘波,等.开菲尔粒中醋酸菌的分离鉴定[J].福建农业学报,2012,27(5):544-549
LIU Yun, CAO Yi, LIU Bo, et al. Isolation and identification of acetobacter bacteria from Kefir grain [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27(5): 544-549
- [11] Zhou J, Liu X, Jiang H, et al. Analysis of the microflora in Tibetan Kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(8): 770-775
- [12] Guzel-Seydim Z, Wyffels J T, Seydim A C, et al. Turkish Kefir and Kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2005, 58(1): 25-29
- [13] 许女,王艳萍,习傲登,等.西藏 Kefir 粒中菌相的初步研究[J].中国酿造,2011,10:133-137
XU Nv, WANG Yan-ping, XI Ao-deng, et al. Microbial population analysis of Tibet Kefir [J]. *China Brewing*, 2011, 10: 133-137
- [14] Chen T H, Wang S Y, Chen K N, et al. Microbiological and chemical properties of Kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from Kefir grains [J]. *Journal of Dairy Science*, 2009 92(7): 3002-3013
- [15] 周剑忠,黄开红,董明盛,等.微生物纯培养发酵剂发酵奶与藏灵菇奶的比较研究[J].食品与发酵工业,2007,33(8):173-176
ZHOU Jian-zhong, HUANG Kai-hong, DONG Ming-sheng, et al. Study on fermented milk using mixed microcapsule pure cultures compared with tibetan Kefir [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(8): 173-176
- [16] 袁勇军,黄丽金,陈伟.发酵乳饮料-开菲尔的研究进展[J].安徽农业科学,2009,37(23):11154-11156
YUAN Yong-jun, HUANG Li-jin, CHEN Wei. Research advance on fermented milk beverage Kefir [J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2009, 37(23): 11154-11156
- [17] 曲莹.天然西藏灵菇粒与人工合成粒形成特性的对比研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2013
QU Yi. Research on characteristic differences between tibetan Kefir and artificial microorganism carriers [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2013
- [18] 王骥.开菲尔粒发酵榛子乳的研究[D].北京:中国农业科学院,2012
WANG Jian. Fermented of Hazelnut-Kefir milk [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2012
- [19] Wang S Y, Chen K N, Lo Y M, et al. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the Kefir grain [J]. *Food Microbiology*, 2012, 32(2): 274-285
- [20] 李学如,贾文祥,杨春.细菌生物膜的形成及其相关感染与

- 防治[J].中国抗生素杂志,2003,28(1):55-59
- LI Xue-ru, JIA Wen-xiang, YANG Chun. The formation of the bacterial biofilm and its relative infection and treatment [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2003, 28(1): 55-59
- [21] 张蕾.空肠弯曲杆菌的分离鉴定及其生物膜形成的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2012
- ZHANG Lei. Isolation and identification of *Campylobacter jejuni* and its biofilm formation [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2012
- [22] 王冰,成颖,许珉.慢性中耳炎及胆脂瘤中细菌生物膜的观察[J].陕西医学杂志,2015,2(44):150-153
- WANG Bing, CHENG Ying, XU Min. Observation of bacterial biofilm in chronic otitis media and cholesteatoma [J]. Shanxi Medical Journal, 2015, 2(44): 150-153
- [23] Hori K, Matsumoto S. Bacterial adhesion: From mechanism to control [J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 48(3): 424-434
- [24] De Oliveira Leite A M, Miguel M A, Peixoto R S, et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of Kefir: a natural probiotic beverage [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(2): 341-349
- [25] Grønnevik H, Falstad M, Narvhus J A. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage [J]. International Dairy Journal, 2011, 21: 601-606
- [26] Karunakaran E, Biggs C A. Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(4): 1161-1175
- [27] 唐俊妮,史贤明,王红宁,等.细菌生物膜的形成与调控机制[J].生物学杂志,2009,26(2):48-53
- TANG Jun-ni, SHI Xian-ming, WANG Hong-ning, et al. The Formation and regulation mechanism of bacterial biofilm [J]. Journal of Biology, 2009, 26(2): 48-53
- [28] Schachtsiek M, Hammes W P, Hertel C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein cfp mediating coaggregation with and aggregation among pathogens [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7078-7085
- [29] Golowczyk M A, Mobili P, Garrote G L, et al. Interaction between *Lactobacillus Kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from Kefir grains: Evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins [J]. Journal of Dairy Research, 2009, 76(1): 111-116
- [30] Furukawa S, Yoshida K, Ogihara H, et al. Mixed-species biofilm formation by direct cell-cell contact between brewing yeasts and lactic acid bacteria [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2010, 74(11): 2316-2319
- [31] Hirayama S, Furukawa S, Ogihara H, et al. Yeast mannan structure necessary for co-aggregation with *Lactobacillus plantarum* ML11-11 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 419(4): 652-655
- [32] Xie N N, Zhou T, Li B. Kefir yeasts enhance probiotic potentials of *Lactobacillus paracasei* H9: the positive effects of coaggregation between the two strains [J]. Food Research International, 2012, 45: 394-401
- [33] Mobili P, de los Angeles Serradell M, Trejo S A, et al. Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2009, 95(4): 363-372
- [34] Teh K H, Flint S, French N. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 143: 118-124
- [35] 任晓璞,妥彦峰,梁月慧,等.新疆民族特色酸奶及酸奶疙瘩中乳酸菌的分离鉴定及其生物膜形成能力检测[J].塔里木大学学报,2014,26(4):1-4
- REN Xiao-pu, TUO Yan-feng, LIANG Yue-hui, et al. Isolation, identification and detection of the ability of biofilm formation of the lactic acid bacteria isolated from yogurt and yogurt lump with xinjiang ethnic characteristics [J]. Journal of Tarim University, 2014, 26(4): 1-4
- [36] Lebeer S, Verhoeven T, Véléz M. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6768-6775
- [37] Marie-Hélène C, Saskia S, Wolfgang K, et al. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria [J]. Research in Microbiology, 2006, 157(5): 471-478
- [38] 魏冉,张宝善,李亚武.醋酸菌产膜机理及膜对食醋发酵品质的影响[J].食品与发酵工业,2014,40(3):182-200
- WEI Ran, ZHANG Bao-shan, LI Ya-wu. Mechanism of production of pellicle by acetic acid bacteria and its effect on fermentation quality of vinegar [J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(3): 182-200
- [39] 范丽平,王亚峰,霍贵成.产胞外多糖乳酸菌的鉴定及发酵性能研究[J].食品与机械,2010,26(3):14-17
- FAN Li-ping, WANG Ya-feng, HUO Gui-cheng. Study on

- identification and ferment character of high exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains [J]. Food and Machinery, 2010, 26(3): 14-17
- [40] Wang Y P, Li C, Liu P, et al. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(3): 895-903
- [41] Zavala L, Roberti P, Piermaria J A, et al. Gelling ability of Kefiran in the presence of sucrose and fructose and physicochemical characterization of the resulting cryogels [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(8): 5039-5047
- [42] Rimada P S, Abraham A G. Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by Kefir grains in milk and whey [J]. EDP Sciences, 2003 83(1): 79-87
- [43] 王艳萍,李超,Zaheer A.一株马乳酒样乳杆菌胞外多糖的理化性质[J].食品发酵与工业,2011,37(9):59-63
WANG Yan-ping, LI Chao, Zaheer A. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus Kefiranofaciens* ZW3 [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(9): 59-63
- [44] Rimada P S, Abraham A G. Kefiran improves rheological properties of glucono-delta-lactone induced skim milk gels [J]. International Dairy Journal, 2006, 16: 33-39
- [45] Piermaria J A, Pinotti A, Garcia M A, et al. Films based on Kefiran, an exopolysaccharide obtained from Kefir grain; Development and characterization [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(3): 684-690
- [46] Carasi P, Trejo F M, Pérez P F, et al. Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize *in vitro* cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins [J]. Anaerobe, 2012, 18:135-142
- [47] Stoodley P, Sauer K, Davies D G, et al. Biofilms as complex differentiated communities [J]. Annual Review of Microbiology, 2002, 56(3): 187-209
- [48] Sun Z L, Kong J, Hu S, et al. Characterization of a S-layer protein from *Lactobacillus crispatus* K313 and the domains responsible for binding to cell wall and adherence to collagen [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2013, 97(5): 1941-1952
- [49] Hynönen U, Palva A. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2013, 97(12): 5225-5243
- [50] 王彩凤.短小乳杆菌 S-层蛋白质的原核表达及其体外粘附性的初步鉴定[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2013
WANG Cai-feng. Prokaryotic expression of s-layer protein of *Lactobacillus brevis* and preliminary identification of its adhesion *in vitro* [D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2013