

开菲尔微生物多样性及互作关系研究进展

黎世威, 白英*

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 开菲尔是一种天然混菌发酵乳制品, 主要包含乳酸菌、酵母菌和醋酸菌等特定的微生物群落, 有着良好的风味和功能性, 但目前开菲尔粒的形成机理尚未明确, 一般认为开菲尔粒的形成是以细菌生物膜作为前体。本文综述了不同地区开菲尔的微生物多样性和其中微生物对发酵乳功能性和风味的影响, 以及开菲尔中微生物间的相互作用和发酵过程中的菌落演替, 并对开菲尔粒形成过程相关生物膜的形成进行介绍, 以为开菲尔粒形成机理的研究提供一定参考。

关键词: 开菲尔; 微生物; 相互作用; 生物膜

Advances in Microbial Diversity and Interactions in Kefir

LI Shiwei, BAI Ying*

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: Kefir is a fermented dairy beverage produced by using natural microbiota which mainly contains specific microbial communities such as lactic acid bacteria, yeast and acetic acid bacteria, and it has good flavor and health beneficial functions. However, the formation mechanism of kefir grains is not clear at present, and it is generally believed that the formation of kefir grains is based on bacterial biofilm as the precursor. This paper reviews the microbial diversity of kefir from different regions and the effects of microorganisms in kefir grains on the function and flavor of fermented milk, as well as the microbial interactions and succession during kefir fermentation. The role of biofilm formation in kefir grain formation is also described in order to provide some references for future research on the formation mechanism of kefir grains.

Keywords: kefir; microorganism; interaction; biofilm

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230111-090

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 01-0272-09

引文格式:

黎世威, 白英. 开菲尔微生物多样性及互作关系研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 272-280. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230111-090. <http://www.spkx.net.cn>

LI Shiwei, BAI Ying. Advances in microbial diversity and interactions in kefir[J]. Food Science, 2024, 45(1): 272-280. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230111-090. <http://www.spkx.net.cn>

开菲尔是一种具有黏性、含有轻度酒精的乳饮料, 呈酸性, 其使用开菲尔粒作为发酵剂, 通过牛乳发酵进行生产。开菲尔原产于高加索和中东地区以及我国西藏或蒙古^[1], 由于其有益健康, 现已遍布世界各地。开菲尔由牛乳与开菲尔粒中的细菌(包括乳酸菌和醋酸菌)和酵母共同发酵而成^[2], 乳酸菌分解乳糖产生葡萄糖和半乳糖, 促使酵母菌生长, 引起乙醇发酵, 并产生二氧化碳, 酵母菌的生长繁殖又能对乳酸菌和醋酸菌的生长起促进作用

用^[3]。开菲尔发酵一般应用到牛乳中, 也涉及一些其他乳如羊乳、驼乳等。开菲尔粒呈白色至黄白色, 形状结构不规则, 是像花椰菜一样的“小花”, 由多糖/蛋白质基质组成, 这些胞外多糖被称为Kefiran, 对开菲尔粒结构中微生物具有保护作用^[4], 含有稳定和特定的微生物群落, 由不同的乳酸、醋酸菌和酵母菌组成, 具有复杂的共生关系。这种特殊的结构赋予了有机体生物活性, 它们生长、繁殖, 并将其特性传递给下一代新的开菲尔粒^[5],

收稿日期: 2023-01-11

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31760460)

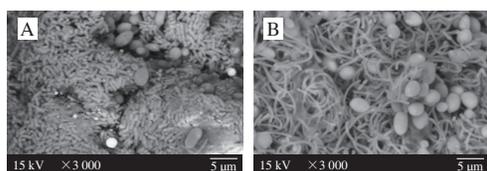
第一作者简介: 黎世威(1999—)(ORCID: 0000-0002-1296-2026), 男, 硕士研究生, 研究方向为乳品生物技术与加工工程。

E-mail: lishiwei990121@163.com

*通信作者简介: 白英(1968—)(ORCID: 0000-0003-3938-2176), 女, 教授, 博士, 研究方向为乳品生物技术与加工工程。

E-mail: baiying77@sina.com

入衰亡阶段。Tong Guangsen等^[13]同样在研究西藏地区的开菲尔时指出,发酵乳微生物群落的主导优势菌也为*L. kefiranofaciens*,此外*Acetobacter syzygii*和*Lactococcus lactis*也是其中的优势菌种,此外,还在发酵乳中观测到*Lactobacillus lactis*、*Leuconostoc pseudomesenteroides*、*Bacillus sporothermodurans*、*Lactobacillus parakefiri*和*Lactobacillus plantarum*等,而其中核心真菌区系主要由*K. marxianus*、*K. unispora*和*S. cerevisiae*组成。发酵乳中分离出的真菌株*K. unispora*、*P. fermentans*、*T. delbrueckii*和*S. cerevisiae*等均为乳糖阴性,此类真菌需要依靠发酵乳中由其他微生物代谢产生的半乳糖和葡萄糖生长繁殖^[14]。Wang Jianguye等^[15]从新疆地区开菲尔中分离出发酵所用的优质乳酸菌,共22株*Lactobacillus kefir*、3株*L. pseudomesenteroides*和2株*Leuconostoc mesenteroides*,其中优势菌为*L. kefir*,虽然与上述研究不同,其优势细菌并非*L. kefiranofaciens*,但*L. kefir*也能代谢出合成开菲尔粒所需的胞外多糖。与以上国内研究相类似,土耳其研究者Ilikkan等^[16]对当地两种开菲尔细菌和真菌的多样性进行了研究,16S rDNA和26S rDNA测序结果表明,其中一种优势菌为*L. kefiranofaciens*,另一种为*Bifidobacterium longum*,此外两者均包含的菌株包括*L. lactis*和*Lactobacillus helveticus*等,而Nalbantoglu^[17]和Yusufl^[18]等的研究均证明其所研究的土耳其地区开菲尔优势细菌为*L. kefiranofaciens*。Bicer等^[19]对土耳其当地5种开菲尔进行了微生物区系研究,发现在属水平上主要为乳杆菌属、乳球菌属、链球菌属、肠球菌属、明串珠菌属、乳杆菌属、漫游球菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、梭菌属、四球菌属、果杆菌属、肠球菌属等。与此相似,马来西亚的Zamberi等^[20]、希腊的Kalamaki等^[21]的研究结果也证明了其中的优势细菌为*L. kefiranofaciens*。然而,Yegin等^[22]在对土耳其科尼亚地区的开菲尔进行研究时发现,其细菌群落结构与其他地区的开菲尔有显著差异,宏基因组测序结果虽未检测到*L. kefiranofaciens*,但最优势的菌属仍为乳杆菌属,其次为酒球菌属、肠球菌属、链球菌属、片球菌属、明串珠菌属等,部分参考文献所示国家和地区开菲尔优势菌种统计见表1。



A. 外层结构; B. 内层结构。

图2 开菲尔的微观结构^[12]

Fig. 2 Microstructure of kefir^[12]

表1 部分国家和地区开菲尔优势菌种

Table 1 Dominant strains in kefir grains from some countries and regions

开菲尔来源	主要菌属	优势菌种	参考文献
西藏	乳杆菌属、双歧杆菌属、克鲁维酵母属	kefir K1: <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>K. marxianus</i>	[9]
	乳杆菌属、肠球菌属、哈萨克斯坦酵母属	kefir K2: <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>K. turicensis</i>	
西藏	乳杆菌属	<i>L. kefiranofaciens</i>	[10]
西藏	乳杆菌属、乳球菌属、醋杆菌属、克鲁维酵母属	<i>L. kefiranofaciens</i> , <i>A. syzygii</i> , <i>K. marxianus</i>	[13]
新疆	乳杆菌属、明串珠菌属	<i>L. kefir</i>	[15]
土耳其	乳杆菌属	kefir G: <i>L. kefiranofaciens</i>	[16]
	双歧杆菌属	kefir A: <i>Bifidobacterium longum</i>	
土耳其	乳杆菌属	<i>L. kefiranofaciens</i>	[17]
土耳其	乳杆菌属	<i>L. kefiranofaciens</i>	[18]
土耳其	链球菌属、乳杆菌属、乳球菌属、双歧杆菌属、明串珠菌属	预富集kefir: <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> ,	[22]
	乳球菌属、链球菌属、双歧杆菌属、明串珠菌属	未预富集kefir: <i>S. salivarius</i> , <i>B. animalis</i> , <i>L. pseudomesenteroides</i>	
马来西亚	乳杆菌属	<i>L. kefiranofaciens</i>	[20]
希腊	乳杆菌属、肠球菌属、拟杆菌属	<i>L. kefiranofaciens</i>	[21]

综上所述,一般情况下,即使是不同地区的开菲尔,也大都含有*L. kefiranofaciens*和*K. marxianus*,这两种菌株应该分别为开菲尔发酵乳优势细菌和优势真菌,同时也是开菲尔的特征菌株。此外,在属水平上一般含有乳杆菌属、乳球菌属、明串珠菌属、肠球菌属、链球菌属、双歧杆菌属、醋杆菌属、克鲁维酵母属、酿酒酵母属、假丝酵母属等^[23-25]。*L. kefiranofaciens*负责生产Kefiran,这是一种水溶性多糖,是开菲尔粒的基本和关键成分,其具有很强的共聚集能力,能够让菌株聚集到一起^[26]。而*K. marxianus*则是因为它具有酵母菌少有的利用乳糖发酵能力,在开菲尔发酵乳中能够正常生长繁殖,代谢产生细菌需要的维生素、氨基酸和其他基本生长因子^[27],为乳酸菌生长创造适宜的环境。*L. kefiranofaciens*和*Saccharomyces turicensis*具有较强的自聚集能力,并且开菲尔乳杆菌表现出显著的生物膜形成特性,当*Turicensis*和开菲尔乳酸菌菌株*L. kefiranofaciens*、*L. kefir*共培养时,发现显著的共聚集能力^[12],因此推断*L. kefiranofaciens*和*K. marxianus*、*K. turicensis*与开菲尔粒形成有较大关联。

2 开菲尔发酵乳的特性

2.1 开菲尔的益生性和功能性

开菲尔有着复杂的微生物区系,其中存在着一些表现出良好益生性的细菌和真菌,这些微生物可进入肠道对人体肠道菌群产生影响^[28-29],表现出抗病原菌活性^[30-31]和抗氧化活性^[32],能调节机体免疫系统,为抵抗病原体 and 癌变提供了基础。此外,这些微生物的初级代谢产物和次级代谢产物也表现出良好的功能性,对机体具有积极影响,是潜在的生物医药成分。

Walsh等^[33]通过宏基因组测序在开菲尔微生物中检测到与益生菌功能相关的基因,这些基因对益生菌性状的调控是其呈现出益生性的基础。Talib等^[34]从开菲尔中分离出乳杆菌*Lactobacillus harbinensis*、*Lactobacillus paracasei*和*L. plantarum*,这些乳杆菌在低pH值下的存活率很高,pH值为3和4时分别能达到(98.0±3.3)%和(96.1±1.7)%,在胆盐质量分数为0.3%和0.5%时存活率分别可达到(96.89±0.02)%和(96.84±0.02)%,对胆盐有着较高的耐受能力,同时对肠细胞显示出较高的黏附能力((96.3±0.01)%),没有溶血活性,对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基表现出良好的清除活性,因此,开菲尔中的乳杆菌有作为益生菌食品和饮料的巨大潜力。在动物实验中,开菲尔被证明能够缓解肥胖、2型糖尿病、血脂异常和非酒精性脂肪性肝病,这可能是通过调节宿主脂肪生成、脂质氧化和减少全身炎症实现的^[35],Bourrie等^[36]研究证明开菲尔中的微生物能够降低肝脏中编码3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 和CD36中胆固醇和脂质代谢的基因的表达,从而调控肥胖病症。Zeng Xuejun等^[37]使用从开菲尔中分离得到的*L. kefiranofaciens*和*Saccharomyces cerevisiae*对直肠癌模型小鼠进行治疗,结果显示这两种微生物对小鼠的微生物肠道菌群有着积极调节作用,降低了促炎细胞因子和癌细胞增殖指标的表达,直肠癌得到缓解。

开菲尔的生物活性肽和代谢产物可作为有益健康的成分,对某些病毒有拮抗作用,并且可作为血友病患者骨质疏松症的补充治疗^[38],孙敏等^[39]从西藏开菲尔中分离筛选出一株干酪乳杆菌,该菌株可代谢产生抗菌肽,对大肠杆菌ATCC25922和金黄色葡萄球菌ATCC25923的生长具有良好的抑制作用。其抗菌机制主要包括破坏致病菌细胞膜、裂解细胞、降解核酸、抑制蛋白质合成^[40]。Wang Hao等^[41]研究了来自中、美、德三国的3种开菲尔的蛋白图谱,发现它们相似度较高,同时细菌多样性具有很高的相似性,其中 α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白和 β -酪蛋白是潜在的抗高血压物质。Hurtado-Romero等^[42]研究了从墨西哥开菲尔中分离出的乳杆菌、乳球菌、明串珠菌、克鲁维酵母等菌种的聚合能力、抗菌活性、药物敏感性和体外胃肠道消化耐药性,结果表明该益生菌的性能优于市面上的益生菌,此外,这些细菌都有着不错的 γ -氨基丁酸生成能力,其中产量最高的是乳双歧杆菌,可达到1.66 mmol/L。

开菲尔作为一个天然菌种库,其中存在丰富的益生菌,同时其中的微生物还能产生具有良好功能性的代谢产物,这些都与开菲尔的微生物多样性密切相关。

2.2 形成的风味物质

发酵乳中的风味物质来源主要包括乳本身的成分、

微生物代谢产生的风味物质以及加工过程中产生的物质等^[43-44],而开菲尔风味差异则主要来自于其中微生物的差异,不同乳酸菌发酵过程中产生的风味物质有着较大差异,且不同微生物之间的相互作用同样会使发酵乳的风味成分发生变化,进而可以通过改变其中微生物的种类和数量来达到改变风味成分的目的。

风味物质一般包括两类,呈滋味和呈气味的物质,前者性质一般比较稳定,后者则一般为一些挥发性成分。开菲尔发酵乳中的风味物质的化学分类一般为糖、羧酸、醇、醛、酮、酯等成分^[45],其中糖包括原料乳中的乳糖、乳酸菌分解乳糖后得到的单糖,而细菌生成的胞外多糖由于分子质量较大,一般不会对风味有着直接贡献,但胞外多糖对发酵乳的稳定作用和增稠作用会使得发酵乳的口感得到提升^[46];羧酸则是脂肪酸水解、生化代谢过程和细菌代谢的结果^[47],在开菲尔中主要体现为乳酸菌发酵产生的乳酸、醋酸菌发酵产生的醋酸、丁酸等,但丁酸的气味一般被认为是令人不愉快的;醇类主要为酵母菌发酵糖类产生的乙醇和乙醛通过乙醇脱氢酶转化乙醇;醛、酮则是乳酸菌在发酵过程中产生的风味物质,其中乙醛则被认为是酸奶的特征风味物质^[48];酯类来源于有机酸和醇的反应,多为乳酸酯、乙酸酯、丁酸脂等。微生物类群与风味之间存在因果关系,添加*L. kefiranofaciens*增加了酯和酮的水平,而添加*Leuconostoc mesteroides*增加了乙酸和2,3-丁二酮的水平^[33]。开菲尔在不同乳中发酵也有着显著的风味差异,例如在羊乳和牛乳中发酵产生风味物质成分具有区别,羊乳样品的乙酸平均含量显著高于牛乳样品,牛乳中不含柠檬酸,丙酮酸含量显著高于羊乳,其余的挥发性成分无显著差异,这可能是由于原料羊乳和牛乳中的成分差异,导致发酵后产生的代谢物水平也有所差异^[49]。Guo Ting等^[50]研究了新疆3个开菲尔样品,除上述风味物质以外,还包括烯烴和丁基羟基甲苯;用藏式开菲尔发酵的切达干酪中,酯类和醇类的数量较大,含量较多,风味较强,其中的酯类呈现出水果香气^[51]。Hao Xiaona等^[52]从开菲尔中分离出来的益生菌*L. plantarum* 1-2形成了4种独特挥发性成分,包括乙苯、十二烷、己醇和丙酮,与普遍情况下的成分有着较大差异。

开菲尔发酵乳中的风味物质同样拥有一个相对稳定的体系,包括糖、羧酸、醇、醛、酮、酯等,但受不同开菲尔中的不同菌种的影响,代谢物有着不同程度的差异,也体现出在共性中有着个体性差异的风味成分。同时,伴随着发酵过程中菌种的演替,开菲尔的挥发性风味成分也处于一个动态变化过程中^[53],并且二者之间有着较为密切的关联性^[54]。

3 开菲尔中的菌落演替和相互作用

3.1 开菲尔发酵过程中的菌落演替

开菲尔是一个不同微生物群的独特共生组合,其中微生物群的微小变化可能导致开菲尔产品的物理化学、流变学、感官和营养特性的显著变化^[55],同时,即使是相同的开菲尔在不同条件下发酵,由于率先生长的优势菌株对后生长的菌株会产生不同的影响,发酵之后也会呈现出不同的效果^[56],带来发酵过程中微生物群落的差异^[57]。因此,研究开菲尔发酵过程中的菌落演替有利于了解其中潜在的菌种间相互作用、不同时间点下的优势菌,并可在相应的时间点获取所需要的代谢产物。

马龙等^[43]对新疆地区的开菲尔在25℃的发酵过程(每24h取样,共120h)进行了分析,结果显示在发酵过程中乳杆菌属在48h时丰度达到最大,而链球菌属和芽孢杆菌属在整个发酵过程中丰度呈现出先下降再上升的趋势,在48h达到最低,此外还有着少量乳球菌属和葡萄球菌属,以及微量嗜血杆菌属和奈瑟氏菌属,均随着发酵进行而降低,与其他开菲尔的发酵不同的是,此开菲尔中并没有检出大量的醋酸菌和酵母,二者几乎不存在于发酵乳中,而在真菌丰度变化中,不同发酵时期有着不同霉菌存在,且真菌菌属丰度占比呈逐渐减少趋势。之后,在同样条件下研究发酵过程中酵母菌落变化规律,证实了在发酵过程中酵母菌数量一直减少,72h时达到最少,此时出现的真菌多为霉菌^[58]。同样以新疆地区开菲尔为研究对象,史大伟等^[59]研究了发酵过程中细菌丰度变化,开菲尔发酵过程中细菌多样性随着发酵进行而降低,然后达到稳态,在属水平上,0h时相对丰度大于1%的属有8种,包括肠杆菌属、蛭弧菌属、嗜甲基菌属、鞘氨醇单胞菌属、罗尔斯顿菌属、弯曲杆菌属、食酸菌属、苯细菌属,这些菌属一般都少见于开菲尔中,可能是牛乳中的原始菌种;24h时芽孢杆菌属和肠杆菌属达到最大,二者相对丰度达到了98%以上,其他菌属非常少;48h时主要为气单胞菌属、嗜热杆菌属和链球菌属;72h时主要为芽孢杆菌属、肠杆菌属和气单胞菌属;96h时主要为芽孢杆菌属、肠杆菌属和链球菌属。王毛毛等^[60]研究了开菲尔在整个发酵过程中的菌属变化,随着发酵的开始,牛乳中原始菌群丰度降低,乳杆菌属和醋酸杆菌属的相对丰度快速升高,发酵前期乳杆菌属为优势菌,占据发酵的主导地位,相对丰度可占到92%以上,但随着发酵的不断进行,醋酸杆菌的相对丰度增加,使得醋酸杆菌的相对丰度在1%~8%之间,这可能是由于发酵初期乳杆菌因为厌氧发酵生长较快,但随着发酵进行,发酵乳中醇类的积累和供氧量的增加导致乳杆菌的生长受到抑制,而酵母和醋酸菌则受环境变化影响较小。Blasche等^[61]研究了德国开菲尔在90h内的微生物

生长状态,认为发酵过程根据优势微生物变化可分为6个阶段,第1阶段以*L. kefiranofaciens*为主导,第2和第3阶段则是乳酸乳杆菌和乳酸杆菌的快速生长,在第4阶段时*L. kefiranofaciens*达到稳定期,*L. kefir*则开始出现,到达第5阶段时,几乎所有物种的增长都停止,到达最后一个阶段时,仅有*Acetobacter fabarum*和*Lactobacillus kefir*大量生长。Walsh等^[33]的研究也验证了这个结论,证明在发酵早期阶段*L. kefiranofaciens*是稳定的优势菌种,而在后期两者却存在差异,在他的研究中,后期优势菌种体现为明串珠菌属。

综合以上研究可以发现,由于不同地区开菲尔中微生物区系相差较大,菌落演替目前尚无具体可循规律,但其核心均为乳杆菌属的菌种,而产生开菲尔多糖、促使开菲尔粒形成的*L. kefiranofaciens*可能是演替中频繁出现的乳杆菌属中的关键菌种。因此可以推断,开菲尔粒的形成需要*L. kefiranofaciens*作为主导,以产生所需的胞外多糖Kefiran^[26]。同时,由于*L. kefiranofaciens*、*Lactobacillus kefir*和酵母较强的共聚集作用,使得开菲尔粒的形成始于*L. kefiranofaciens*和酵母的共聚集而形成小的颗粒^[12],然后开菲尔中的微生物和其他活性物质与小颗粒发生黏附或聚集,最终形成开菲尔粒。此外,开菲尔中微生物营养素消耗、代谢产物积累以及整个生命活动过程对发酵环境产生的影响会对其他菌的生命活动产生影响,并且此种影响交互发生,进而对开菲尔菌落演替产生影响。

3.2 开菲尔微生物相互作用

开菲尔中存在着丰富的细菌、真菌,这些微生物之间存在着稳定的相互作用,一般包括菌种间的共生、拮抗作用。共生作用一般体现为各自的代谢物会对其他菌株的生命活动产生正面影响,例如乳酸菌可分解乳糖产生半乳糖和葡萄糖,以供酵母利用,酵母则为细菌提供生长因子等,以及生产出开菲尔粒形成所必须的胞外多糖^[24],从而使得微生物聚集络合。张培等^[56]发现从开菲尔中分离的乳酸菌和酵母菌共培养对各自细胞损伤有修复作用,对热压力和pH值压力的应答均有着显著促进作用,但共培养对同为开菲尔中优势乳酸菌的嗜热链球菌和酵母菌的破损修复作用不显著。巩小芬^[62]对分离出的明串珠菌、干酪乳杆菌、开菲尔乳杆菌和酵母菌进行了抑菌圈拮抗实验,指出四者之间均无拮抗性,并且体现出良好的相互作用,乳酸菌与酵母菌接种比例为5:1的复合发酵乳的凝乳时间从8~9h缩短至6h,并且获得了更为良好的感官和风味。Golowczyk等^[63]对从开菲尔中分离出的20株*L. kefir*和*Saccharomyces lipolytica*进行了聚集实验和血液凝集实验,结果显示其中6株能与*S. lipolytica*发生共聚集作用,纯化的*L. kefir*的S层蛋白有较强的凝血能力,表明细菌表面蛋白的凝集素样活性介导了其与酵

母细胞的聚集，同时细菌表面的由多糖和蛋白质形成的糖蛋白也是微生物间信号传导的关键，这可能与生物膜和开菲尔粒胞外基质的形成有着极大的关联。

如图3所示，拮抗作用主要体现为代谢物的积累对微生物的生长产生影响。例如酵母和醋酸菌发酵积累乙醇、乙酸等，乙醇和乙酸浓度不断增加会对细菌的生长繁殖产生抑制作用^[60]，Lo等^[64]以乳酸为唯一碳源培养*K. marxianus*，在不同的pH值条件下确定乳酸培养物中的最佳生长和释放蛋白，并且发现通过高效液相色谱二级质谱联用鉴定的蛋白与三羧酸循环、糖酵解途径和细胞应激反应相关，其研究表明，乳酸可诱导*K. marxianus*的生长和自溶，释放蛋白质和肽。因此在开菲尔中，随着发酵的不断进行，乳酸菌代谢过程中不断积累的乳酸会使得酵母菌发生自溶。

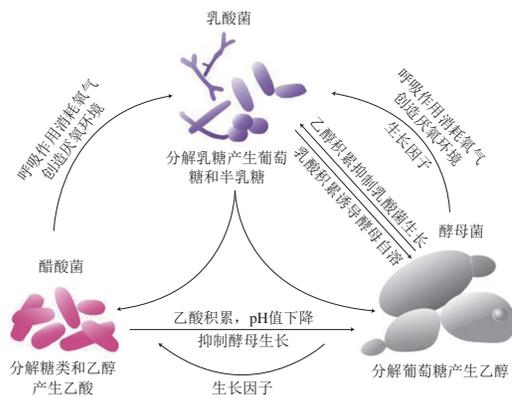


图3 开菲尔中乳酸菌、酵母菌和醋酸菌之间的相互作用

Fig. 3 Interaction between lactic acid bacteria, yeast and acetic acid bacteria in kefir

3.3 生物膜形成

细菌生物膜是包裹在由胞外多糖、蛋白质和DNA组成的细胞外聚合物中的结构化细胞群落^[65]。生物膜的一个主要特征是形成了细胞外多糖基质，这有助于提高微生物对抗抗生素和酶的能力^[66]，并且开菲尔表面具有非晶态特征，较粗糙的表面使其具有良好黏附性^[67]。Wang Xiaomeng等^[9]评估了开菲尔粒增殖速率、开菲尔胞外多糖的结构特征，并通过使用Syto9绿色荧光核酸染料、碘化丙啶、异硫氰基荧光素标记的刀豆球蛋白等染料对开菲尔发酵过程中的死、活细胞和胞外多糖进行染色，进一步验证了生物膜的形成，认为生物膜主要是靠胞外多糖和开菲尔中细胞交叠形成的结构，确定了乳酸菌产生的胞外多糖和生物膜对开菲尔粒形成有着直接影响。生物膜基本骨架是由多种胞外多糖组成的三维结构，对细菌在固体表面的黏附以及细胞内的聚集起关键作用，并且生物膜的黏着性在很大程度上受胞外多糖含量影响。笔者所在研究团队前期研究结果^[68]表明，开菲尔胞外多糖与乳蛋白存在相互作用，在中性水相介质

中，Kefiran与乳清蛋白的相互作用导致粒径增大以及电位绝对值减小，而在发酵乳体系中，Kefiran使得发酵乳粒径增大，Zeta电位绝对值降低，荧光强度减小，其微观结构为片状结构，表面形成了部分网络结构，黏弹性显著增加。Han Xue等^[69]证明了活菌数与生物膜的形成无直接关系，主要依赖于微生物代谢积累到胞外的生物大分子，认为开菲尔生物膜的形成主要与*K. marxianus*有关，该酵母具有极强的疏水性和共聚集能力，使其具有强大的生物膜形成性能。与其研究结果相似，笔者所在实验室从开菲尔发酵乳及开菲尔粒中分离出的开菲尔胞外多糖的微观结构明显不同，且来自开菲尔粒的胞外多糖由于其独特的结构特点，使其具有较强絮凝活性^[70]。此外，由于开菲尔粒及开菲尔发酵乳中微生物的种类不同，所产胞外多糖的结构及功能也不同，这一点可从本研究团队前期对乳酸菌胞外多糖的研究结果^[71-72]中得到证实。

此外，Dong Jian等^[73]还验证了醋酸菌也能在发酵过程中产生生物膜，这可能是开菲尔形成的关键，见图4。与其他研究人员类似，Dong Jian等^[73]也认为开菲尔粒的形成分为两个阶段，第一阶段是生物膜形成，在酵母的共聚集作用下，乳酸菌、醋酸菌和酵母菌结合到一起，黏附在醋酸菌产生的生物膜上，进而形成开菲尔基质生物膜；第二阶段为开菲尔粒形成，开菲尔基质生物膜形成后由于胞外多糖的作用折叠成封闭的囊泡结构，最终形成开菲尔粒，但不同之处在于他们认为生物膜的形成是以醋酸菌作为主导。总之，生物膜的形成源自于微生物代谢物和微生物之间以及微生物与微生物之间的相互作用，同时也是开菲尔粒形成的基础。

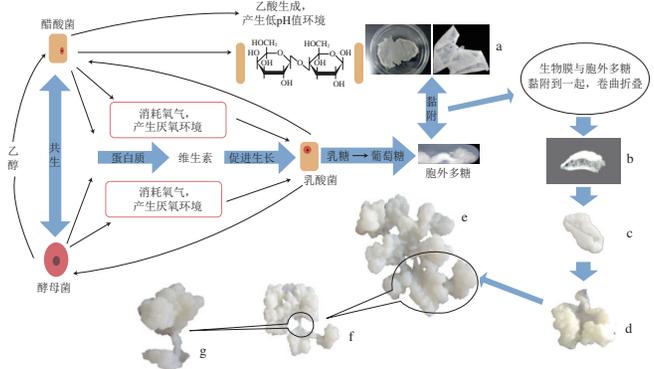


图4 开菲尔粒的形成机制与过程^[73]

Fig. 4 Formation mechanism and process of kefir grains^[73]

4 结语

综上所述，开菲尔的微生物多样性体现为不同开菲尔之间存在着同一性菌种和差异性菌种，这些开菲尔中的微生物在发酵乳中体现出丰富的功能性，积累的代谢产物具有良好风味，同时其分泌的生物大分子物质和微

生物之间聚集形成生物膜。目前,对开菲尔的研究已经在各个领域里展开,在益生性和功能性方面有着巨大的研究潜力。除此之外,还包括丰富的风味成分和有益代谢物,这一切都源于开菲尔复杂的微生物区系和其中微生物与微生物及发酵环境之间的动态影响。已有很多学者通过实验对开菲尔体系研究作出推论和验证,但这个复杂的共生体系和开菲尔粒形成的具体机理仍需要进一步探究,同时开菲尔是一个丰富的菌种库,从中筛选出生产所需要的菌株,研究其功能特性,仍然是当前研究的热点。本研究团队目前正在针对内蒙古不同地区开菲尔粒中微生物进行分离鉴定,同时对其相互作用进行研究,以期揭示开菲尔粒的形成机理提供一定的研究基础。

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. DOI:10.1016/j.foodchem.2004.04.021.
- [2] MAGRA T I, ANTONIOU K D, PSOMAS E I. Effect of milk fat, kefir grain inoculum and storage time on the flow properties and microbiological characteristics of kefir[J]. Journal of Texture Studies, 2012, 43(4): 299-308. DOI:10.1111/j.1745-4603.2011.00343.x.
- [3] 韩雪, 雷鹏, 樵飞, 等. 发酵乳制品中乳酸菌与酵母菌相互作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(7): 388-391. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.07.074.
- [4] HAMET M F, LONDERO A, MEDRANO M, et al. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains[J]. Food Microbiology, 2013, 36(2): 327-334. DOI:10.1016/j.fm.2013.06.022.
- [5] YILDIZ- AKGUL F, YETISEMIYEN A, SENEL E, et al. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir produced by secondary fermentation[J]. Mljekarstvo, 2018, 68(3): 201-213. DOI:10.15567/mljekarstvo.2018.0305.
- [6] 王荫榆, 李会荣, 贾士芳, 等. 应用变性梯度凝胶电泳和16S rDNA序列分析对kefir粒中细菌多样性的研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(2): 310-313. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.2006.02.029.
- [7] 卢曼, 陈小兵, 王兴兴, 等. 西藏开菲尔粒中酵母菌的分离与初步鉴定[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(1): 138-145.
- [8] 刘朋龙, 王亮, 钟浩, 等. 开菲尔粒中主要组成菌的分离鉴定[J]. 新疆畜牧业, 2016(8): 36-40. DOI:10.16795/j.cnki.xjxmy.2016.08.010.
- [9] WANG X M, LI W P, XU M J, et al. The microbial diversity and biofilm-forming characteristic of two traditional tibetan kefir grains[J]. Foods, 2022, 11(1): 12. DOI:10.3390/foods11010012.
- [10] ZENG X J, WANG Y W, JIA H, et al. Metagenomic analysis of microflora structure and functional capacity in probiotic Tibetan kefir grains[J]. Food Research International, 2022, 151: 110849. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110849.
- [11] WANG X X, XIAO J Z, JIA Y S, et al. *Lactobacillus kefirifaciens*, the sole dominant and stable bacterial species, exhibits distinct morphotypes upon colonization in Tibetan kefir grains[J]. Heliyon, 2018, 4(6): e00649. DOI:10.1016/j.heliyon.2018.e00649.
- [12] 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. DOI:10.1016/j.fm.2012.07.001.
- [13] TONG G S, LI X, GUO J H. Microbial diversity and volatile metabolites of kefir prepared by different milk types[J]. CyTA-Journal of Food, 2021, 19(1): 399-407. DOI:10.1080/19476337.2021.1912190.
- [14] DIOSMA G, ROMANIN D E, REY-BURUSCO M F, et al. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(1): 43-53. DOI:10.1007/s11274-013-1419-9.
- [15] WANG J Y, WANG L, GONG X F, et al. Isolation, identification, and selection of lactic acid bacteria from kefir grains in different Xinjiang area[J]. China Dairy Industry, 2018, 46(8): 4-8. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2018.08.001.
- [16] ILIKKAN O K, BAGDAT E S. Comparison of bacterial and fungal biodiversity of Turkish kefir grains with high-throughput metagenomic analysis[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 152: 112375. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112375.
- [17] NALBANTOGLU U, CAKAR A, DOGAN H, et al. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains[J]. Food Microbiology, 2014, 41: 42-51. DOI:10.1016/j.fm.2014.01.014.
- [18] YUSUF B, GURKAN U. Analysis of the kefir and koumiss microbiota with the focus on certain functional properties of selected lactic acid bacteria[J]. Mljekarstvo, 2021, 71(2): 112-123. DOI:10.15567/mljekarstvo.2021.0204.
- [19] BICER Y, TELLİ A E, SONMEZ G, et al. Comparison of commercial and traditional kefir microbiota using metagenomic analysis[J]. International Journal of Dairy Technology, 2021, 74(3): 528-534. DOI:10.1111/1471-0307.12789.
- [20] ZAMBERI N R, MOHAMAD N E, YEAP S K, et al. 16S metagenomic microbial composition analysis of kefir grain using MEGAN and BaseSpace[J]. Food Biotechnology, 2016, 30(3): 219-230. DOI:10.1080/08905436.2016.1200987.
- [21] KALAMAKI M S, ANGELIDIS A S. High-throughput, sequence-based analysis of the microbiota of Greek kefir grains from two geographic regions[J]. Food Technology and Biotechnology, 2020, 58(2): 138-146. DOI:10.17113/ftb.58.02.20.6581.
- [22] YEGIN Z, YURT M N Z, TASBASI B B, et al. Determination of bacterial community structure of Turkish kefir beverages via metagenomic approach[J]. International Dairy Journal, 2022, 129: 105337. DOI:10.1016/j.idairyj.2022.105337.
- [23] KAZOU M, GRAFAKOU A, TSAKALIDOU E, et al. Zooming into the microbiota of home-made and industrial kefir produced in Greece using classical microbiological and amplicon-based metagenomics analyses[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 621069. DOI:10.3389/fmicb.2021.621069.
- [24] VERCE M, DE VUYST L, WECKX S. Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 479. DOI:10.3389/fmicb.2019.00479.
- [25] GALLI V, VENTURI M, MARI E, et al. Selection of yeast and lactic acid bacteria strains, isolated from spontaneous raw milk fermentation, for the production of a potential probiotic fermented milk[J]. Fermentation, 2022, 8(8): 407. DOI:10.3390/fermentation8080407.
- [26] GEORGALAKI M, ZOUNPOPOULOU G, ANASTASIOU R, et al. *Lactobacillus kefirifaciens*: from isolation and taxonomy to probiotic properties and applications[J]. Microorganisms, 2021, 9(10): 2158. DOI:10.3390/microorganisms9102158.
- [27] VILJOEN B C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 69(1/2): 37-44. DOI:10.1016/S0168-1605(01)00570-0.

- [28] YILMAZ B, SHARMA H, MELEKOGLU E, et al. Recent developments in dairy kefir-derived lactic acid bacteria and their health benefits[J]. Food Bioscience, 2022, 46: 101592. DOI:10.1016/j.fbio.2022.101592.
- [29] VIEIRA L V, DE SOUSA L M, CORDEIRO MAIA T A, et al. Milk Kefir therapy reduces inflammation and alveolar bone loss on periodontitis in rats[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 139: 111677. DOI:10.1016/j.biopha.2021.111677.
- [30] M'HIR S, RTIBI K, MEJRI A, et al. Development of a novel whey date beverage fermented with kefir grains using response surface methodology[J]. Journal of Chemistry, 2019, 2019: 1-13. DOI:10.1155/2019/1218058.
- [31] KUMAR L M, SAAD W Z, MOHAMAD R, et al. Influence of biofilm-forming lactic acid bacteria against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA S547)[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2017, 7(12): 1107-1115. DOI:10.1016/j.apjtb.2017.10.013.
- [32] STREIMIKYTE P, KAILIUVIENE J, MAZONIENE E, et al. The biochemical alteration of enzymatically hydrolysed and spontaneously fermented oat flour and its impact on pathogenic bacteria[J]. Foods, 2022, 11(14): 2055. DOI:10.3390/foods11142055.
- [33] WALSH A M, CRISPIE F, KILCAWLEY K, et al. Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir[J]. Msystems, 2016, 1(5): e00052-16. DOI:10.1128/mSystems.00052-16.
- [34] TALIB N, MOHAMAD N E, YEAP S K, et al. Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. from kefir samples in malaysia[J]. Molecules, 2019, 24(14): 2606. DOI:10.3390/molecules24142606.
- [35] BOURRIE B C, RICHARD C, WILLING B P. Kefir in the prevention and treatment of obesity and metabolic disorders[J]. Current Nutrition Reports, 2020, 9(3): 184-192. DOI:10.1007/s13668-020-00315-3.
- [36] BOURRIE B C, JU T, FOUHSE J M, et al. Kefir microbial composition is a deciding factor in the physiological impact of kefir in a mouse model of obesity[J]. British Journal of Nutrition, 2021, 125(2): 129-138. DOI:10.1017/S0007114520002743.
- [37] ZENG X J, JIA H, SHI Y H, et al. *Lactobacillus kefirifaciens* JKSP109 and *Saccharomyces cerevisiae* JKSP39 isolated from Tibetan kefir grain co-alleviated AOM/DSS induced inflammation and colorectal carcinogenesis[J]. Food & Function, 2022, 13(13): 6947-6961. DOI:10.1039/D1FO02939H.
- [38] YEN C C, LIU Y W, CHANG G R L, et al. Therapeutic effects of kefir peptides on hemophilia-induced osteoporosis in mice with deficient ccoagulation factor VIII[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022, 10: 794198. DOI:10.3389/fcell.2022.794198.
- [39] 孙敏, 孙玥, 李博, 等. 开菲尔粒中乳酸菌的筛选与发酵特性[J]. 乳业科学与技术, 2020, 43(4): 1-6. DOI:10.15922/j.cnki.jdst.2020.04.001.
- [40] GUT A M, VASILJEVIC T, YEAGER T, et al. Kefir characteristics and antibacterial properties-potential applications in control of enteric bacterial infection[J]. International Dairy Journal, 2021, 118: 105021. DOI:10.1016/j.idairyj.2021.105021.
- [41] WANG H, ZHOU X H, SUN Y X, et al. Differences in protein profiles of kefir grains from different origins when subcultured in goat milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(24): 7515-7524. DOI:10.1021/acs.jafc.2c01391.
- [42] HURTADO-ROMERO A, DEL TORO-BARBOSA M, GRADILLA-HERNÁNDEZ M S, et al. Probiotic properties, prebiotic fermentability, and GABA-producing capacity of microorganisms isolated from Mexican milk kefir grains: a clustering evaluation for functional dairy food applications[J]. Foods, 2021, 10(10): 2275. DOI:10.3390/foods10102275.
- [43] 马龙, 邢军, 李安, 等. 开菲尔不同发酵时期微生物群落结构的变化[J]. 现代食品科技, 2019, 35(8): 27-34. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.005.
- [44] 陈妍, 陆利霞, 熊晓辉. 微生物发酵法生产食品风味物质[J]. 中国调味品, 2011, 36(7): 13-17. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2011.07.004.
- [45] FARAG M A, JOMAA S A, ABD EL-WAHED A, et al. The many faces of kefir fermented dairy products: quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety[J]. Nutrients, 2020, 12(2): 346. DOI:10.3390/nu12020346.
- [46] 郑晓燕. 开菲尔粒中胞外多糖优质生产菌株的筛选, 胞外多糖理化性质的表征及其在拉丝酸奶中的应用研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020: 22-27. DOI:10.27170/d.cnki.gjsuu.2020.002439.
- [47] BAKHSHANDEH T, POURAHMAD R. Effects of incubation temperature and storage period on flavor and aroma compounds in kefir[J]. International Journal of Biology and Biotechnology, 2013, 10(2): 187-192.
- [48] 丹彤, 包秋华, 孟和, 等. 发酵乳风味物质乙酰, 双乙酰的合成途径及其调控机制[J]. 食品科技, 2012(7): 75-79. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2012.07.031.
- [49] SARICA E, COSKUN H. Effect of frozen storage on some characteristics of kefir samples made from cow's and goat's milk[J]. Food Science and Technology International, 2022, 28(2): 157-168. DOI:10.1177/10820132211003710.
- [50] GUO T, HAO Y, ZHANG J, et al. Research on volatile flavor characteristics of yogurt fermented by traditional kefir[J]. China Dairy Industry, 2017, 45(1): 8-11; 24. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2017.01.002.
- [51] GUO T, YU Z J, CHEN C, et al. Volatile flavor compounds of fast-ripened Cheddar cheese slurry model fermented with Tibetan kefir[J]. Food Science, 2018, 39(8): 90-96. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201808015.
- [52] HAO X N, ZHANG J, YANG Y W, et al. Effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* on volatile flavor formation in Cheddar cheese[J]. Food Science, 2018, 39(4): 49-58. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201804009.
- [53] 古丽加马力·艾萨, 邢军, 马龙, 等. 开菲尔发酵过程中风味物质动态变化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(12): 173-178. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.023537.
- [54] 马龙. 开菲尔发酵过程中微生物与挥发性风味物质的相关性[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学, 2020: 15-19. DOI:10.27432/d.cnki.gxsfu.2020.000161.
- [55] WANG H, WANG C, GUO M. Autogenic successions of bacteria and fungi in kefir grains from different origins when sub-cultured in goat milk[J]. Food Research International, 2020, 138: 109784. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109784.
- [56] 张培, 李亚慧, 娄越, 等. 开菲尔粒中酵母菌与乳酸菌共生机制的研究[J]. 湖州师范学院学报, 2020, 42(8): 40-46; 92. DOI:10.3969/j.issn.1009-1734.2020.08.007.
- [57] HECER C, ULUSOY B, KAYNARCA D. Effect of different fermentation conditions on composition of kefir microbiota[J]. International Food Research Journal, 2019, 26(2): 401-409.
- [58] 马龙, 邢军, 李安, 等. 开菲尔粒发酵过程酵母菌多样性和动态规律[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(9): 24-28. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2019.09.005.
- [59] 史大伟, 邢军, 马龙, 等. PacBio测序分析开菲尔发酵过程中细菌演替[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(2): 19-23. DOI:10.19827/j.issn1001-2230.2021.02.004.

- [60] 王毛毛, 马晓钰, 牛晨, 等. 基于气相离子迁移色谱的雪莲菌发酵乳香气与雪莲菌菌群动态变化研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(10): 42-47. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030694.
- [61] BLASCHE S, KIM Y, MARS R A, et al. Metabolic cooperation and spatiotemporal niche partitioning in a kefir microbial community[J]. Nature Microbiology, 2021, 6(2): 196-208. DOI:10.1038/s41564-020-00816-5.
- [62] 巩小芬. 开菲尔粒中优质乳酸菌, 酵母菌的分离鉴定与开菲尔复合发酵剂的研制[D]. 镇江: 江苏大学, 2018: 75-84.
- [63] GOLOWCZYC 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. DOI:10.1017/S0022029908003749.
- [64] LO S C, YANG C, MATHEW D C, et al. Growth and autolysis of the kefir yeast *Kluyveromyces marxianus* in lactate culture[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 1-11. DOI:10.1038/s41598-021-94101-y.
- [65] PAROLIN C, CROATTI V, LAGHI L, et al. *Lactobacillus* biofilms influence anti-*Candida* activity[J]. Frontiers in microbiology, 2021, 12: 750368. DOI:10.3389/fmicb.2021.750368.
- [66] SALAS-JARA M J, ILABACA A, VEGA M, et al. Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics[J]. Microorganisms, 2016, 4(3): 35. DOI:10.3390/microorganisms4030035.
- [67] MATOS R S, LOPES G A C, FERREIRA N S, et al. Superficial characterization of kefir biofilms associated with acai and cupuacu extracts[J]. Arabian Journal for Science and Engineering, 2018, 43(7): 3371-3379. DOI:10.1007/s13369-017-3024-y.
- [68] 白英, 王纯玮. 开菲尔胞外多糖对发酵乳凝胶形成的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(11): 79-84. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033365.
- [69] HAN X, ZHANG L J, WU H Y, et al. Investigation of microorganisms involved in kefir biofilm formation[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2018, 111(12): 2361-2370. DOI:10.1007/s10482-018-1125-6.
- [70] 王纯玮, 白英. 开菲尔胞外多糖理化性质及其抗氧化特性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(21): 104-110. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030493.
- [71] 白英, 刘乃齐. *Enterococcus faecium* AS8及其胞外多糖对发酵乳流变学特性的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(10): 70-76. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180530-419.
- [72] BAI Y, LIU N. Effect of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus casei* HS4 on microstructure and rheological properties of fermented milk[J]. Food Science, 2019, 40(12): 145-152. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180624-452.
- [73] DONG J, LIU B, JIANG T M, et al. The biofilm hypothesis: the formation mechanism of Tibetan kefir grains[J]. International Journal of Dairy Technology, 2018, 71: 44-50. DOI:10.1111/1471-0307.12473.