

酿酒酵母对乳杆菌生长与生物膜形成的影响

任晓镔^{1,2} 许倩^{1,2} 李明杨^{1,2} 牛希跃^{1,2}

(1. 塔里木大学生命科学学院, 阿拉尔 843300; 2. 塔里木大学新疆特色农产品深加工兵团重点实验室, 阿拉尔 843300)

摘要: 酿酒酵母与乳杆菌的共培养广泛存在于发酵食品中,以5株酿酒酵母和6株乳杆菌为研究对象,采用微量板半定量法分别检测酿酒酵母与乳杆菌的共培养及酿酒酵母代谢物对乳杆菌生长及生物膜形成的影响。结果表明,5株酿酒酵母与乳杆菌共培养均能促进乳杆菌的生长,但对其生物膜形成的影响各不相同,共培养组E+1、E+3及B+3中酿酒酵母能够显著促进乳杆菌生物膜的形成,而B+1、D+9及E+9组酿酒酵母能够显著抑制乳杆菌生物膜的形成(抑制率达80%及以上);5株酿酒酵母代谢物对乳酸菌生长的影响不大,但能在不同程度上影响乳杆菌生物膜的形成,其中酿酒酵母B对乳杆菌38生物膜的形成有显著促进作用,而酿酒酵母B、D对乳杆菌17生物膜的形成有显著的抑制作用。

关键词: 乳杆菌; 酿酒酵母; 生物膜; 共培养; 代谢物

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2016)02-0264-06

Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on *Lactobacillus* Growth and Biofilm Formation

Ren Xiaopu^{1,2} Xu Qian^{1,2} Li Mingyang^{1,2} Niu Xiyue^{1,2}

(1. College of Life Science, Tarim University, Alar 843300, China

2. Production & Construction Group Key Laboratory of Special Agricultural Products

Further Processing in Southern Xinjiang, Tarim University, Alar 843300, China)

Abstract: The co-existence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* widely exists in fermented food and their co-existence endows fermented foods with quite different flavors and tastes. Meanwhile, a large number of active substances and prebiotic substances were added to the fermented foods and they were very beneficial to human health. Five *Saccharomyces cerevisiae* strains and six *Lactobacillus* strains from different fermented foods were used in the research. Semi-quantitative assay was performed to examine effects of *Lactobacillus* co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* and the metabolites on *Lactobacillus* growth and biofilm formation. The results showed that all of the five *Saccharomyces cerevisiae* strains could promote *Lactobacillus* growth but had different effects on biofilm formation. All of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolites did not have obvious effects on *Lactobacillus* growth but also had effects on biofilm formation in different degrees. Especially, extremely significant promotion was found in the co-existence groups of E+1, B+3 and E+3, and extremely significant inhibition was also found in the co-existence groups of B+1, D+9 and E+9. It may be due to the strict selection roles of each other between the two strains. Meanwhile, comparing co-existence groups with metabolites groups, there was no very obvious connection. It appeared that different active substances acted different roles in the co-existence groups and metabolites groups.

Key words: *Lactobacillus*; *Saccharomyces cerevisiae*; biofilm; co-culture; metabolites

收稿日期: 2015-07-27 修回日期: 2015-08-31

基金项目: 新疆生产建设兵团工业科技攻关计划项目(2014BA026)和塔里木大学校长基金项目(TSZKSS201309)

作者简介: 任晓镔(1985—),男,讲师,主要从事食品微生物研究,E-mail: rxp_love@126.com

通信作者: 牛希跃(1978—),男,实验师,主要从事食品微生物研究,E-mail: 14970347@qq.com

引言

乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 是乳酸菌中重要的一个属,也是其中最大的一个属,迄今为止,已报道的种有 155 个^[1]。乳杆菌广泛应用于食品发酵、工业乳酸发酵以及医疗保健领域。胞外多糖 (Exopolysaccharide, EPS) 是乳杆菌的主要代谢产物之一,多数产 EPS 的乳酸菌是从乳品中分离得到的,如黏稠的发酵奶制品、酸奶、开菲尔粒等。EPS 同时也是细菌生物膜的主要成分之一^[2-3]。生物膜 (Biofilm, BF) 是一种黏附在生物或非生物材料表面由细菌群体和包裹菌体基质组成的聚合物^[4]。生物膜中的细菌与游离状态的细菌相比生理状态发生了显著变化,对抗菌剂具有很强的耐受性,因此由病原微生物生物膜引起的慢性创伤很难治愈^[5-6]。另一方面,生物膜的特性也被广泛应用于生物技术领域,例如采用某些微生物生物膜净化水质及抑制某些食品腐败微生物的生长等^[7]。生物膜结构具有良好的稳定性和对一些不利环境的耐受性,如果将此特性赋予有益微生物例如乳酸菌,将会更好地在生产和实践中发挥作用。

新疆是一个盛产发酵食品的地区,尤其是发酵乳制品,在这些发酵乳制品中,除乳酸菌外也经常伴有酵母菌的存在,二者共同发酵,赋予了发酵食品特殊的风味和口感。在共同发酵过程中,酵母菌为乳酸菌提供了多种营养因子(例如氨基酸、维生素和丙酮酸盐等物质)^[8],同时乳酸菌的代谢产物又为酵母菌提供了能量来源^[9]。乳酸菌与酵母菌之间可能存在某种相互作用,会对乳酸菌和酵母菌的生长和新陈代谢产生影响,可以改变发酵产品的成熟时间和产品的风味特征。本文以分离自新疆发酵乳制品中的 6 株乳杆菌和分离自慕萨莱思(新疆南疆地区特色葡萄酒)中的 5 株酿酒酵母为研究对象,研究 2 种微生物在共培养过程中,酿酒酵母细胞及其代谢物对乳杆菌生长及生物膜形成的影响,为开发利用发酵微生物资源及生物膜特性奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

实验中所用到的 5 株酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 均分离自新疆阿瓦提县慕萨莱思葡萄酒,并经生理生化及分子生物学鉴定为酿酒酵母,分别编号为 A、B、C、D、E;实验中所用到的 6 株乳杆菌均为分离自新疆民族特色乳制品酸奶子中,经前期研究鉴定结果如表 1 所示,490 nm 波长处 OD 值大于 0.56 时即生物膜形成强阳性菌株^[10]。

表 1 实验中所用到的乳杆菌

Tab.1 *Lactobacillus* used in research

菌株编号	乳杆菌名称	生物膜形成情况 ^[10]
ZWQ-1	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	强阳性
ZWQ-3	类植物乳杆菌 <i>Lactobacillus paraplantarum</i>	强阳性
ZWQ-9	戊糖乳杆菌 <i>Lactobacillus pentosus</i>	强阳性
ZWQ-17	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	强阳性
ZWQ-26	开菲尔乳杆菌 <i>Lactobacillus kefir</i>	强阳性
ZWQ-38	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	强阳性

1.2 培养条件

酿酒酵母种子液的培养条件为:采用 YPD 液体培养基在 28℃ 条件下培养 24 ~ 48 h。

乳杆菌种子液的培养条件为:采用 MRS 肉汤培养基在 37℃ 条件下培养 24 ~ 48 h。

实验过程中为便于进行结果分析,采用酿酒酵母(或其代谢物)编号 + 乳杆菌编号的方式分别代表不同的酿酒酵母(或其代谢物)与不同的乳杆菌混合培养。

1.3 乳杆菌生物膜形成能力的检测

参照 Christensen 等方法^[11]并略做改动。采用微量板半定量法对所分离得到的乳酸菌进行生物膜形成能力的检测。同时参照文献[12],使外界条件为生物膜形成的最适条件。按 1:200 的接种比例将静置 12 h 培养的菌液 15 μL 接种至 3 mL 培养基中,振荡摇匀后,吸取 200 μL 至 96 孔细胞培养板中,每株接种 5 孔,共计 90 孔;此外有 3 孔为对应空白对照(等体积的相应空白液体培养基);同时每一培养板中设阳性对照(表皮葡萄球菌 ATCC 35984)3 孔。37℃ 恒温静置培养 48 h 后,取出培养板用 Microplate Reader 测定其生长浊度 590 nm 处的 OD 值,然后轻轻拍出培养液,无菌水洗板 4 次,每次振摇 30 下左右,以洗去未黏附细菌。56℃ 干燥固定 1 h,50 μL 质量分数 0.5% 结晶紫染色 5 min,自来水冲洗除去多余染液,37℃ 晾干,再用 Microplate Reader 测定其生物膜形成 490 nm 处的 OD 值。所有生物膜形成检测实验均在不同时间重复 3 次。

1.4 酿酒酵母代谢物的制备

采用 YPD 液体培养基对酿酒酵母进行发酵,制备发酵液^[13]。将活化好的酿酒酵母按体积分数 2% 分别接种在 YPD 液体培养基中,28℃ 恒温振荡

培养 48 h;将培养液以 4 000 g 离心 20 min,取上清液,并用 0.45 μm 孔径的无菌滤器进行过滤处理,即得到无菌代谢物,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

1.5 酿酒酵母与乳杆菌共培养对乳杆菌生长及生物膜形成的影响

参照文献[14],采用 MRS 肉汤培养基对酿酒酵母及乳杆菌进行共培养。将乳杆菌与酿酒酵母种子液按 10:1 的菌体浓度比例混合接入 MRS 肉汤培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置培养 48 h,采用 Microplate Reader 测定其生长浊度 590 nm 处的 OD 值,并按照 1.3 节方法检测乳杆菌生物膜形成情况。对照组用空白的 YPD 培养基进行相同处理。每个实验在不同时间重复 3 次。

1.6 酿酒酵母代谢物对乳杆菌生长及生物膜形成的影响

将经过 1.4 节方法制备得到的酿酒酵母代谢物与乳杆菌按照 1:10 的体积比混合接入 MRS 肉汤培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置培养 48 h,采用 Microplate Reader 测定其生长浊度 590 nm 处的 OD 值,并按照 1.3 节方法检测乳杆菌生物膜形成情况。对照组用

空白的 YPD 培养基进行相同处理。每个实验在不同时间重复 3 次。

2 实验结果

2.1 乳杆菌生物膜形成能力

本研究中所用到的 6 株乳杆菌的生物膜形成能力均为强阳性(490 nm 处的 OD 值大于 0.56),并且在实验条件下,ZWQ-9 (*L. pentosus*) 的生物膜形成能力最强,与阳性对照(表皮葡萄球菌 ATCC 35984)形成生物膜的能力基本相同。

2.2 酿酒酵母与乳杆菌共培养对乳杆菌生长的影响

从图 1 中可以看出,5 株酿酒酵母对乳杆菌 ZWQ-1 及 ZWQ-3 生长的影响不大,而对 ZWQ-9、ZWQ-17、ZWQ-26 及 ZWQ-38 的生长影响较大。5 株酿酒酵母与这 4 株乳杆菌共培养能够明显促进其生长繁殖,增长率高达 2 倍或以上。这可能是因为 2 种微生物共培养过程中,酿酒酵母产生了一些代谢产物,是乳杆菌 ZWQ-9、ZWQ-17、ZWQ-26 及 ZWQ-38 生长繁殖的促进因子,却不能促进乳杆菌 ZWQ-1 及 ZWQ-3 的生长繁殖。

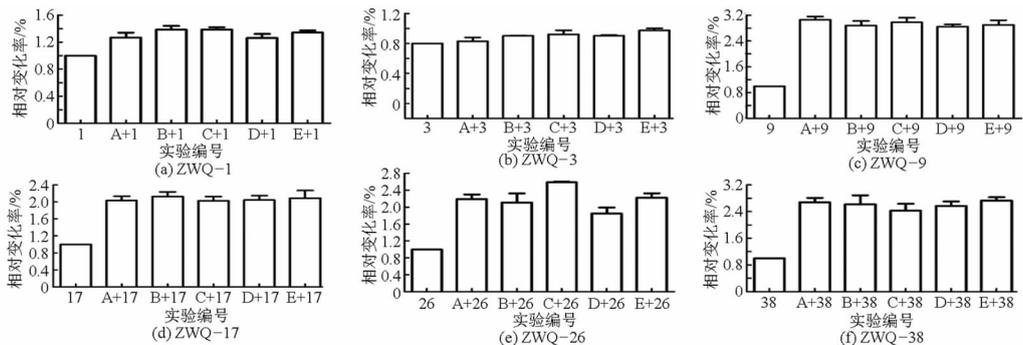


图 1 酿酒酵母与乳杆菌共培养对乳杆菌生长的影响

Fig. 1 Effects of *Saccharomyces cerevisiae* co-cultured with *Lactobacillus* on *Lactobacillus* growth

2.3 酿酒酵母与乳杆菌共培养对乳杆菌生物膜形成的影响

从图 2 中可以看出,不同的酿酒酵母对不同的乳杆菌生物膜形成的影响差异较大。酿酒酵母 A 对 ZWQ-1 及 ZWQ-17 生物膜形成的影响不大,但

是能够明显促进 ZWQ-3 的生物膜形成,却又能够明显抑制 ZWQ-9、ZWQ-26 及 ZWQ-38 的生物膜形成(抑制率约为 50% 以上);酿酒酵母 B 能够明显促进 ZWQ-3 生物膜的形成,但是对其他 5 株乳杆菌生物膜形成具有较明显的抑制作用;酿酒酵母 C

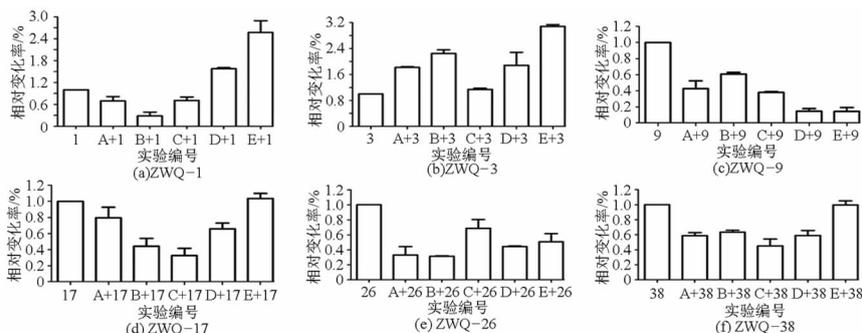


图 2 酿酒酵母与乳杆菌共培养对乳杆菌生物膜形成的影响

Fig. 2 Effects of *Saccharomyces cerevisiae* co-cultured with *Lactobacillus* on *Lactobacillus* biofilm formation

对乳杆菌 ZWQ-1、ZWQ-3 及 ZWQ-26 生物膜形成的影响不大,而能够较明显地抑制 ZWQ-9、ZWQ-17 及 ZWQ-38 的生物膜形成;酿酒酵母 D 对乳杆菌 ZWQ-1 及 ZWQ-3 生物膜的形成有促进作用,但对其他 4 株乳杆菌生物膜的形成却起着抑制作用,尤其是对 ZWQ-9 生物膜的形成抑制作用最为明显(抑制率为 85.4%);酿酒酵母 E 对乳杆菌 ZWQ-17 及 ZWQ-38 生物膜的形成影响不大,却

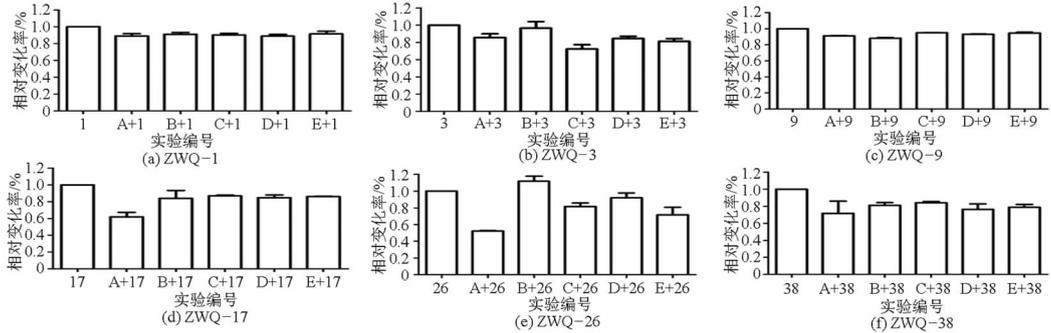


图 3 酿酒酵母代谢物对乳杆菌生长的影响

Fig. 3 Effects of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites on *Lactobacillus* growth

2.5 酿酒酵母代谢物对乳杆菌生物膜形成的影响

从图 4 中可以看出,不同酿酒酵母代谢物对不同乳杆菌生物膜的形成影响也各不相同。酿酒酵母 A 的代谢物对 ZWQ-1、ZWQ-3、ZWQ-9、ZWQ-17 及 ZWQ-26 的生物膜形成均有不同程度的抑制作用,其中对 ZWQ-17 的抑制作用最为明显(抑制率高达 80%);酿酒酵母 B 的代谢物对乳杆菌 ZWQ-38 生物膜的形成有极为明显的促进作用,而

能够明显增强 ZWQ-1 及 ZWQ-3 生物膜的形成,增长率高达 3 倍以上,而对乳杆菌 ZWQ-9 生物膜的形成具有明显的抑制作用,抑制率也高达 80%。

2.4 酿酒酵母代谢物对乳杆菌生长的影响

从图 3 中可以看出,除酿酒酵母 A 的代谢物对乳杆菌 ZWQ-17 及 ZWQ-26 的生长有一定程度的抑制作用以外(抑制率约为 50%),其他酿酒酵母代谢物对乳杆菌的生长均无明显影响。

对 ZWQ-17 生物膜的形成却有极为明显的抑制作用(抑制率为 90% 以上);酿酒酵母 C 的代谢物对乳杆菌 ZWQ-3、ZWQ-9 及 ZWQ-17 的生物膜形成有较为明显的抑制作用,对其他乳杆菌生物膜的形成影响不大;酿酒酵母 D 的代谢物能够明显增强 ZWQ-26 的生物膜形成,但也能够明显抑制 ZWQ-17 的生物膜形成;酿酒酵母 E 的代谢物能够较明显地抑制 ZWQ-17 生物膜的形成。

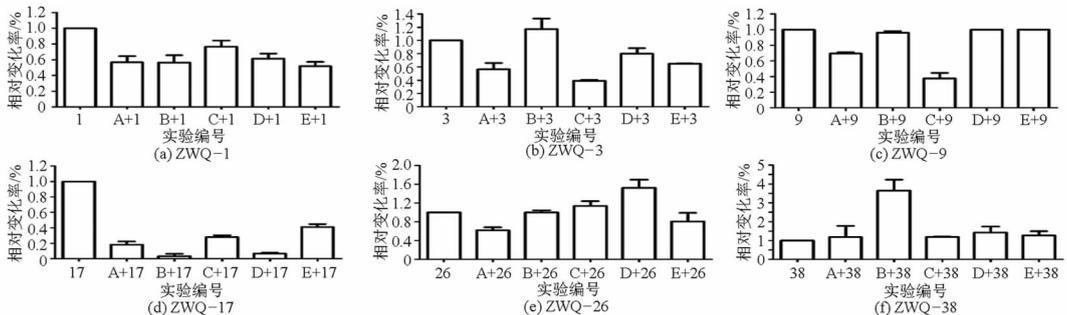


图 4 酿酒酵母代谢物对乳杆菌生物膜形成的影响

Fig. 4 Effects of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites on *Lactobacillus* biofilm formation

3 讨论

乳杆菌广泛存在于自然界中,并且在食品、医药及化妆品等领域有极为广泛的应用。乳杆菌同其他细菌一样,也能够合适的条件下聚集形成生物膜结构^[12,15]。很多学者都对细菌生物膜进行过报道,但是多限于单一菌种所形成的生物膜。然而在自然界中,细菌生物膜的形成不止一种细菌,混合多菌种生物膜已有多位学者进行过研究和报道。在新疆的传统发酵食品中,乳杆菌和酿酒酵母是极为常见的

菌种,并且是主要发酵微生物。本研究即针对 6 株分离自新疆发酵乳制品的乳杆菌,探索了 5 株酿酒酵母及其代谢物对乳杆菌生长及生物膜形成的影响。从本研究结果可以看出,在共培养条件下,酿酒酵母对乳杆菌生长及生物膜形成的影响具体包括以下几种情况:酿酒酵母对乳杆菌的生长及生物膜形成均无明显影响,例如 C+3 组;酿酒酵母对乳杆菌的生长无明显影响,但能够明显抑制或促进乳杆菌生物膜的形成,例如 B+1(抑制)、E+1、E+3(促进)等组;酿酒酵母对乳杆菌的生长有明显的促进

作用,但对其生物膜的形成却无明显影响,例如 A + 17、E + 38 等组;酿酒酵母对乳杆菌的生长有明显的促进作用,但对其生物膜的形成却有明显的抑制作用,例如 D + 9、E + 9 等组。在探索酿酒酵母代谢物对乳杆菌生长及生物膜形成影响的实验中,代谢物对乳杆菌生长及生物膜形成的影响有以下几种:酿酒酵母代谢物既不影响乳杆菌的生长,又不影响其生物膜的形成,例如 B + 9、D + 9、E + 9 等组;酿酒酵母代谢物不影响乳杆菌的生长,但是能够明显抑制或促进其生物膜的形成,例如 B + 17、D + 17(抑制)、B + 38、D + 26(促进)等组;酿酒酵母代谢物对乳杆菌的生长有一定的抑制作用,同时也在一定程度上对其生物膜的形成也具有抑制作用,例如 A + 17、A + 26 组。

为了进一步研究酿酒酵母与乳杆菌共培养与酿酒酵母代谢物对乳杆菌生长及生物膜形成影响的差

异,将所得结果进行进一步分析。从乳杆菌的生长对比结果中可以看出(图 5),酿酒酵母与乳杆菌共培养均能够起到促进乳杆菌生长繁殖的作用,而酿酒酵母的代谢物却对乳杆菌的生长基本无明显的影响,在某些组合方面还存在一定的抑制作用。而对于乳杆菌的生物膜形成能力方面,酿酒酵母与乳杆菌共培养及酿酒酵母代谢物对乳杆菌生物膜形成的影响则各不相同,不同的菌种组合差异较大,如图 6 所示。Taketo 等曾指出^[16],乳酸菌能够与酵母菌形成混菌生物膜,但是二者之间存在一种非常严格的相互选择作用,只有当相互之间找到适合的搭档之后才会形成生物膜结构。在本研究中也寻找获得了几组相互之间能够促进生物膜形成的搭档(例如 E + 1、E + 3、B + 3 等组)。这为后续进行更进一步的研究奠定了基础条件。

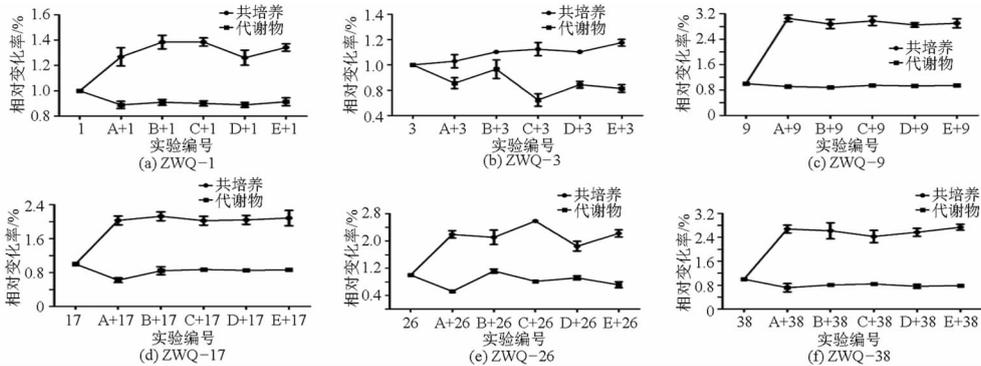


图 5 对比酿酒酵母共培养与其代谢物对乳杆菌生长的影响

Fig. 5 Effects of *Lactobacillus* co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* and its metabolites on *Lactobacillus* growth

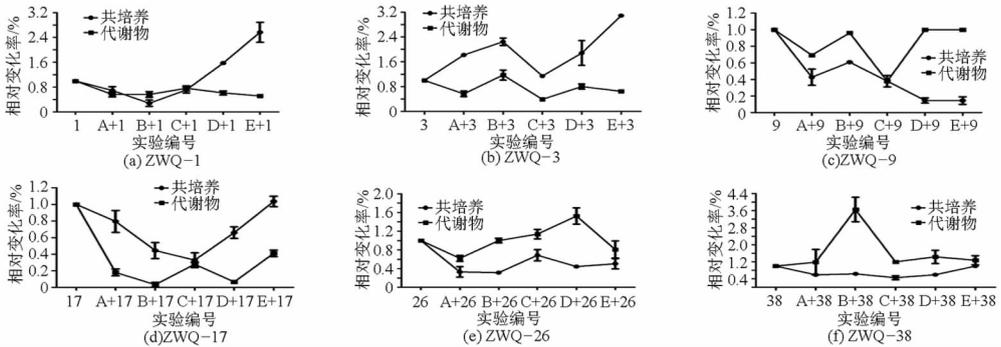


图 6 对比酿酒酵母共培养与其代谢物对乳杆菌生物膜形成的影响

Fig. 6 Effects of *Lactobacillus* co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* and its metabolites on *Lactobacillus* biofilm formation

国内外一些学者针对乳酸菌与酵母菌形成生物膜的机制进行了深入研究,不同的乳酸菌与酵母菌所形成混菌生物膜的机制均不相同,综合有以下几种:在共培养过程中,乳酸菌能够产生一些信号配体释放到外界环境中,酵母菌通过改变自身的细胞形态(例如产生一些小突起等)接收来自乳酸菌的信号配体,进而进行“交流”,形成混菌生物膜结构^[16]; Soichi 等发现^[17],在共培养过程中,乳酸菌与酵母菌通过细胞与细胞之间的直接接触进而形成混菌生物膜结构;有学者指出^[18-19],乳酸菌与酵母菌分别带

有不同的电荷,乳酸菌带正电荷,酵母菌带负电荷,二者在共培养过程中通过静电的相互作用,相互吸引而促进了生物膜的形成;还有学者指出^[20-22],乳酸菌与酵母菌共聚集后形成生物膜结构主要是通过一些细胞表面蛋白、胞内分子伴侣蛋白(例如 DnaK、GroEL)、糖酵解酶(例如丙酮酸激酶等)和甘露聚糖等作为信号识别分子实现的。

乳酸菌与酵母菌的共培养是一种相互利用、相互促进的过程。在自然发酵乳制品中,酵母菌不能利用乳糖,但是可以利用半乳糖作为碳源进行发酵,

乳酸菌能够将乳糖转化为半乳糖和葡萄糖为酵母菌提供碳源；乳酸菌的生长条件较为特殊，需要某些特殊的营养因子。酵母菌在发酵过程中产生多种代谢产物，例如氨基酸、维生素和丙酮酸盐等物质，可以作为乳酸菌的营养因子。有学者发现乳酸菌与酵母菌的代谢产物之间也存在一种互补机制^[23]，即一种菌产生的代谢产物会被另一种菌利用。这种现象也广泛存在于葡萄酒等发酵酒类的酿造过程中。有学者^[24]研究了植物乳杆菌与酿酒酵母混合生物膜的形成在乙醇发酵过程中的应用，发现混合生物膜结构由于其对外界环境的高度耐受性而被用于细胞固定化技术，能够长期维持恒定的乙醇产量，并且保持菌种不会退化。乳酸菌与酵母菌的混菌生物膜由于其结构的特性广泛存在于各种发酵食品中，在产品的风味、口感、营养价值及生理功能等方面均要优于任何单一菌种的发酵产品，相信随着科技进步及发酵食品的工业化发展，乳酸菌与酵母菌的混合生物膜将会被更广泛地应用。

4 结论

(1) 酿酒酵母与乳杆菌共培养过程中，5 株酿酒

酵母均能够在不同程度上促进 6 株乳杆菌的生长，但是对生物膜形成的影响各不相同，其中 E + 1、E + 3 及 B + 3 组中酿酒酵母能够显著促进乳杆菌生物膜的形成，而 B + 1、D + 9 及 E + 9 组中酿酒酵母却能够显著抑制乳杆菌生物膜的形成（抑制率高达 80% 及以上）。

(2) 5 株酿酒酵母代谢物对 6 株乳杆菌的生长均影响不大，但是对生物膜形成的影响有较大差异，其中酿酒酵母 B 的代谢物能够显著促进乳杆菌 38 的生物膜形成，而酿酒酵母 B 和 D 的代谢物却能够显著抑制乳杆菌 17 的生物膜形成，抑制率高达 90% 以上。

(3) 酿酒酵母与乳杆菌共培养过程中，二者之间有一种严格的相互选择作用机制，某些菌株之间（E + 1、E + 3 及 B + 3 组）能够形成组合，有利于菌株的生物膜形成；同时在某些酿酒酵母（例如酿酒酵母 B）的代谢物中可能存在一些活性成分也能够促进某些乳杆菌生物膜的形成。但是共培养组与代谢物处理组之间并不存在严格的相互关联。

参 考 文 献

- 1 郭兴华, 凌代文. 乳酸细菌现代研究实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- 2 Vu B, Chen M, Crawford R J, et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation[J]. *Molecules*, 2009, 14(7): 2535 - 2554.
- 3 Flemming H C, Neu T R, Wozniak D J. The EPS matrix: the "house of biofilm cells" [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(22): 7945 - 7947.
- 4 Hall-Stoodley L, Costerton J W, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(2): 95 - 108.
- 5 Melchior M B, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilm: a role in recurrent mastitis infection? [J]. *The Veterinary Journal*, 2006, 171(3): 398 - 407.
- 6 Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(10): 2675 - 2679.
- 7 Speranza B, Sinigaglia M, Corbo M R. Non starter lactic acid bacteria biofilms: a means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese[J]. *Food Control*, 2009, 20(11): 1063 - 1067.
- 8 Roostita R, Fleet G H. The occurrence and growth of yeast in Camembert and Blue-veined cheese[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 28(3): 393 - 404.
- 9 Loretan T. The diversity and technological properties of yeasts from indigenous traditional South African fermented milks[D]. Bloemfontein: University Orange Free State, 1999.
- 10 任晓镭, 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 - 7.
Ren Xiaopu, Tuo Yanfeng, Liang Yuehui, 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 - 7. (in Chinese)
- 11 Christensen G D, Simpson W A, Younger J J, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1985, 22(6): 996 - 1006.
- 12 任晓镭, 妥彦峰, 李明杨, 等. 外界环境因素对戊糖乳杆菌生物膜形成的影响[J]. *农业机械学报*, 2014, 45(11): 230 - 235.
Ren Xiaopu, Tuo Yanfeng, Li Mingyang, et al. Effects of environmental factors on biofilm formation by *Lactobacillus pentosus* [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(11): 230 - 235. (in Chinese)
- 13 刘敏敏, 贺银凤. 酸马奶中具有潜在共生性乳酸菌和酵母菌的筛选[J]. *食品科学*, 2011, 32(11): 255 - 259.
Liu Minmin, He Yinfeng. Screening of potential symbiotic lactic acid bacteria and yeasts from koumiss[J]. *Food Science*, 2011, 32(11): 255 - 259. (in Chinese)

- 13 张振文,宁鹏飞,张军贤,等.葡萄酒缩合单宁测定方法的比较研究[J].食品科学,2012,33(20):233-237.
Zhang Zhenwen, Ning Pengfei, Zhang Junxian, et al. Comparison of two methods for the determination of condensed tannins in wine[J]. Food Science, 2012, 33(20): 233-237. (in Chinese)
 - 14 李艳,崔彦志,随子华.橡木桶陈酿干红葡萄酒过程中聚合色素的变化[J].酿酒科技,2009(3):48-50.
Li Yan, Cui Yanzhi, Sui Zihua. Changes of polymeric tannin during dry red grape wine aging in oak barrel[J]. Liquar-Making Science and Technology, 2009(3): 48-50. (in Chinese)
 - 15 Rio J L P Del, Kennedy J A. Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2006, 57(2): 125-132.
 - 16 李华,王华,袁春龙,等.葡萄酒化学[M].北京:科学出版社,2005.
 - 17 Wrolstad R E, Skrede G, Lea P, et al. Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries[J]. Journal of Food Science, 2006, 55(4): 1064-1065.
 - 18 Boulton R B, Singleton V L, Bisson L F, et al. Principles and practices of winemaking[M]. New York: Chapman & Hall,1998.
-

(上接第269页)

- 14 张玉辉,史延桥,王戌晋,等.乳酸菌和酵母菌联合培养初探[J].食品科技,2009,34(2):273-276.
Zhang Yuhui, Shi Yanqiao, Wang Xujin, et al. Study on co-culture of lactobacillus and yeast[J]. Food Science and Technology, 2009,34(2):273-276. (in Chinese)
- 15 Kubota H, Senda S, Nomura N, et al. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008,106(4):381-386.
- 16 Kawarai T, Furukawa S, Ogihara H, et al. Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14):4673-4676.
- 17 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]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010,74(11):2316-2319.
- 18 Momose H, Iwano K, Tonoike R. Studies on the aggregation of yeast caused by *Lactobacilli* [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 1969,15(1):19-26.
- 19 Furukawa S, Nojima N, Yoshida K, et al. The importance of inter-species cell-cell co-gaareation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in mixed-species biofilm formation [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2011,75(8):1430-1434.
- 20 Gabriele Pretzer, Johannes Snel, Douwe Molenaar, et al. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Bacteriology,2005,187(17):6128-6136.
- 21 Marina Alejandra Golowczyc, Pablo Mobili, Graciela Liliana Garrote, et al. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains;evidence for lectin-like activity bacterial surface proteins[J]. Journal of Dairy Research, 2009,76(1):111-116.
- 22 Yoshio Katakura, Ryosuke Sano, Takashi Hashimoto, et al. Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010,86(1):319-326.
- 23 Tamime A Y, Marshall V M E. Microbiology and technology of fermented milks[M]//Law B A. Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. London: Blackie Academic & Professional,1997.
- 24 Atsumu Abe, Soichi Furukawa, Shinya Watanabe, et al. Yeasts and lactic acid bacteria mixed-specie biofilm formation is a promising cell immobilization technology for ethanol fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2013, 171(1):72-79.