

外界环境因素对戊糖乳杆菌生物膜形成的影响*

任晓璞¹ 妥彦峰² 李明杨¹ 王磊¹ 姚东琴¹

(1. 塔里木大学南疆特色农产品深加工兵团重点实验室, 阿拉尔 843300; 2. 大连工业大学食品学院, 大连 116000)

摘要:以一株分离自新疆传统乳制品中生物膜强阳性的戊糖乳杆菌为研究对象,采用微量板半定量法分别探索了不同理化因素及几种食品添加剂对乳酸菌生物膜形成的影响。结果表明戊糖乳杆菌生物膜形成的最佳理化条件为接种量 1:200、培养温度 37℃、培养时间 48 h、葡萄糖质量分数 2%、pH 值 5.8~6.8, Ca²⁺ 及乳酸的加入基本能完全抑制生物膜的形成。

关键词: 乳酸菌 生物膜 理化因素 食品添加剂

中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2014)11-0230-05

引言

乳酸菌是世界公认能安全地应用于食品领域的细菌,经过乳酸菌发酵的食品酸度高、营养丰富、风味独特,易于消化吸收,改善肠道的微循环,对多种疾病能起到预防、治疗或辅助治疗的作用。乳酸菌代谢产物乳酸是食品、医药、日化等领域的重要原料之一;乳酸菌细菌素可作为食品的天然保护剂,不但对人体健康无害,并且具有一定的营养价值^[1]。

细菌生物膜是指细菌黏附于物体表面,并分泌大量多糖、蛋白质和 DNA 等多聚物质,将自身包裹其中而形成的复杂膜状结构^[2]。生物膜是微生物在自然环境下生存的一种方式,它的形成过程是微生物附着、生长、脱落及衰亡过程综合作用的结果,影响微生物在介质表面形成生物膜的因素有很多^[3]。所有的微生物均能形成生物膜^[4]。胞外多糖是生物膜形成的必需条件,在食品工业上某些微生物胞外多糖,例如黄原胶、凝胶多糖、短梗霉多糖、海藻多糖等^[5],能够改善食品的流变学特性,增强食品的稳定性和持水能力,赋予食品良好的口感和风味;此外,对人体还具有突出的生理功能,如抗肿瘤、调理肠道、抗致突变、抗溃疡、降低血清胆固醇等^[6]。

国内有关乳酸菌生物膜的研究很少,尤其是戊糖乳杆菌生物膜更是鲜有报道;国外关于这类有益生物膜的研究也处于起始阶段, Morikawa^[7] 曾对枯草芽孢杆菌有益生物膜对人类的贡献进行了综述,他指出有益生物膜在作为生防试剂、生物反应器及生物修复等方面起着重要作用。乳酸菌作为公认安

全细菌,其胞外代谢产物均为公认安全,因此该类细菌所形成的生物膜有着巨大的开发研究潜力,深入研究并开发利用其特性成为必然趋势。然而,外界条件对任何微生物生物膜形成的影响都是巨大的。营养条件、理化条件等都极大的影响着生物膜的特性和结构^[8]。

本文在前期研究中分离获得了一株戊糖乳杆菌,其生物膜形成能力表现为强阳性,因此将其作为本研究的试验对象,对其生物膜形成的影响因素进行探索,以期为后续开发利用乳酸菌生物膜提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株

试验中所使用的细菌有两种,表皮葡萄球菌 ATCC 35984(RP62A)是生物膜形成的阳性菌株,在试验中作为生物膜形成的阳性对照;戊糖乳杆菌分离自新疆特色乳制品酸奶疙瘩,经检测为生物膜形成的强阳性菌株,为试验菌株。

1.1.2 培养基及培养条件

表皮葡萄球菌培养基为胰蛋白胨大豆肉汤(TSB),戊糖乳杆菌培养基为 MRS 肉汤培养基,均在 37℃ 条件下有氧培养。

1.1.3 主要仪器及试剂

Absorbance Microplate Reader(Bilog, ELx808), B120-RAD550 型酶标仪(Bio-Rad), BGZ-70 型电热鼓风干燥箱(上海博迅),八道移液器

收稿日期:2013-11-27 修回日期:2014-01-03

* 国家自然科学基金资助项目(31160342)和新疆塔里木大学校长基金资助项目(TDZKSS201309)

作者简介:任晓璞,讲师,主要从事食品微生物学研究, E-mail: rxp_love@126.com

(Eppendorf AG), 96 孔板 (Labphil Biotechnology), 葡萄糖、氯化钠、氯化钙、氯化镁、乳酸、柠檬酸、苹果酸、磷酸、明胶、麦芽糊精等生化试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 乳酸菌的培养

将细菌甘油管划线接种于琼脂培养板活化, 待过夜培养后挑取单克隆接种到液体培养基, 37℃ 培养过夜 (活菌数达到约 10^8 cfu/mL)。

1.2.2 生物膜试验

根据 Christensen 等方法^[9] 并略做改动。按体积比 1:100 的接种比例将过夜培养的菌液 30 μ L 接种至 3 mL 培养基中, 振荡摇匀后, 吸取 200 μ L 至 96 孔细胞培养板中, 每株接种 5 孔; 剩余 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 (ATCC 35984)。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 OD₅₉₀ 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 μ L 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 OD₄₉₀ 值。所有生物膜形成检测试验均在不同时间重复 3 次。

1.2.3 常规理化因素对乳酸菌生物膜形成的影响

(1) 接种量

在 96 孔培养板中接入不同体积比的细菌母液 (1:1、1:5、1:10、1:50、1:100、1:200、1:300、1:400、1:500、1:1000) 至 3 mL 液体培养基中, 检测生物膜形成。若无特殊说明, 本文所提到接种量比例均为体积比。

(2) 培养温度

将细胞培养板置于不同的培养温度 (20、28、37、42℃) 静置培养 48 h, 检测生物膜形成。

(3) 培养时间

将细胞培养板在 37℃ 下分别培养不同的时间 (6、24、48、72 h), 检测生物膜形成。

(4) 葡萄糖

在细胞培养板中分别加入不同质量分数 (0、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、6.0%、8.0%、10.0%) 葡萄糖的液体培养基稀释菌液 200 μ L, 检测生物膜形成。

(5) 氯化钠

用不同质量分数氯化钠 (0、1.0%、2.0%、4.0%、6.0%、8.0%、10.0%) 的液体培养基稀释菌液, 检测生物膜形成。

(6) pH 值

用不同 pH 值 (1.8、2.8、3.8、4.8、5.8、6.8、

7.8、8.8、9.8、10.8) 的液体培养基稀释菌液, 检测生物膜形成。

(7) Ca²⁺ 与 Mg²⁺

用含不同质量分数 Ca²⁺ 与 Mg²⁺ (0、0.5%、1.0%、1.5%) 的液体培养基稀释菌液, 检测生物膜形成。

1.2.4 食品添加酸类对乳酸菌生物膜形成的影响

(1) 乳酸

在细胞培养板中分别加入不同体积分数 (0、0.2%、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0%、3.0%) 乳酸的液体培养基稀释菌液 200 μ L, 检测生物膜形成。

(2) 柠檬酸

在细胞培养板中分别加入不同体积分数 (0、0.2%、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0%、3.0%) 柠檬酸的液体培养基稀释菌液 200 μ L, 检测生物膜形成。

(3) 苹果酸

在细胞培养板中分别加入不同体积分数 (0、0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.5%、2.0%) 苹果酸的液体培养基稀释菌液 200 μ L, 检测生物膜形成。

(4) 磷酸

在细胞培养板中分别加入不同体积分数 (0、0.2%、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0%、3.0%) 磷酸的液体培养基稀释菌液 200 μ L, 检测生物膜形成。

1.2.5 食品稳定剂对乳酸菌生物膜形成的影响

(1) 明胶

在细胞培养板中分别加入不同质量分数 (0、0.05%、0.10%、0.15%、0.20%) 明胶的液体培养基稀释菌液 200 μ L, 检测生物膜形成。

(2) 麦芽糊精

在细胞培养板中分别加入不同质量分数 (0、2.0%、5.0%、8.0%、12.0%、15.0%、18.0%) 麦芽糊精的液体培养基稀释菌液 200 μ L, 检测生物膜形成。

2 结果与分析

2.1 各种理化因素对乳酸菌生物膜形成的影响

图 1 为不同理化因素在不同质量分数或体积分数条件下对戊糖乳杆菌生物膜形成的影响。

2.1.1 接种量

接种量是指加入种子液的体积与接种后培养液体积的比例, 其大小决定了细菌生长繁殖的速度, 过大或过小的接种量均不利于细菌后续的生长。接种量过大会引起溶氧不足以及营养物质的过快消耗, 过小则会延长培养时间, 导致延迟期增长。在本研

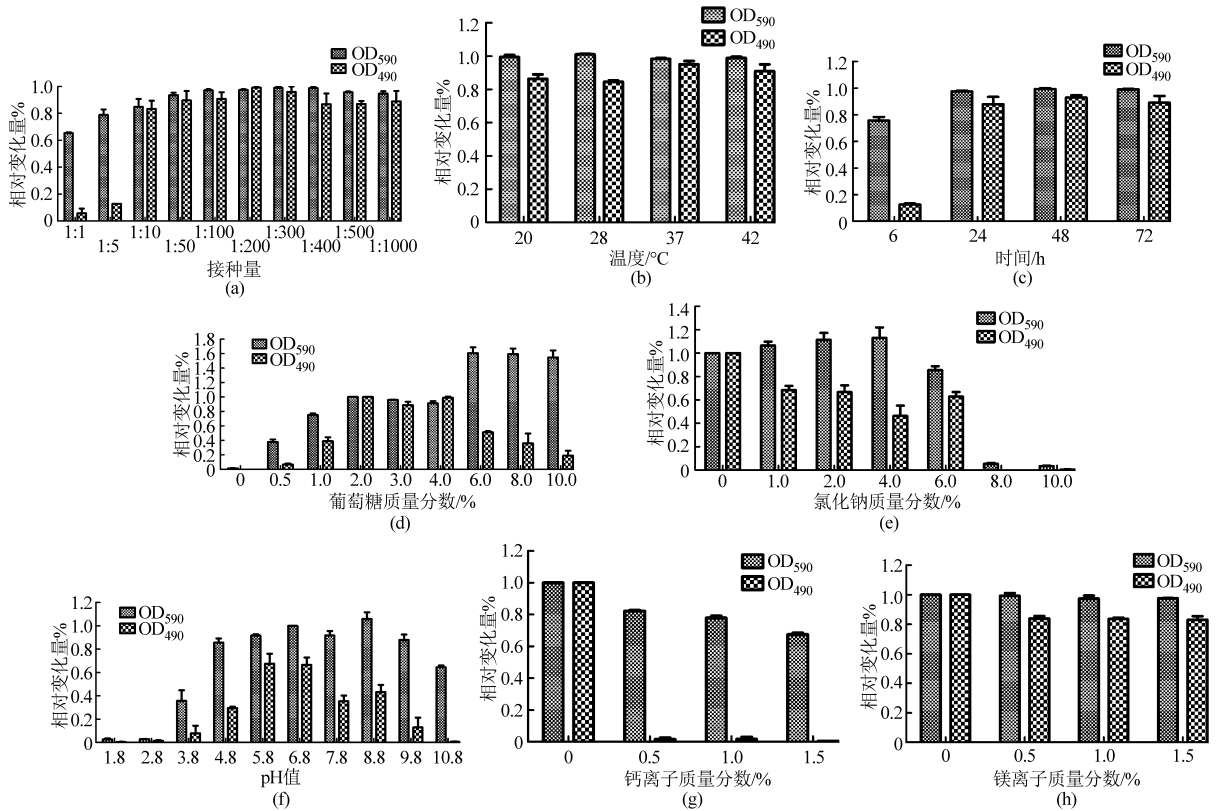


图1 不同理化因素对戊糖乳杆菌生长及其生物膜形成的影响

Fig. 1 Effect of different physical and chemical factors on growth and biofilm produced by *L. pentosus*

究中,当戊糖乳杆菌接种量在1:10~1:1000之间变化时,细菌的生长及生物膜形成能力均变化不大(图1a),最佳接种量为1:200,但接种量高于1:5时,细菌生物膜形成被大大抑制。这可能是因为48 h的培养时间既能够提供较高接种量(1:10)细菌的营养需求,又能够满足较低接种量(1:1000)较长的培养时间。

2.1.2 培养温度

外界温度对各种微生物的生长及培养特性均有较大影响,尤其是对微生物的代谢产物,温度的差异会影响代谢产物基因的表达。本研究中所涉及的温度梯度下,细菌生长与生物膜形成的变化均不明显(图1b),这可能是因为不同的培养温度对控制乳酸菌生长及生物膜形成基因的表达影响较小。但从结果中可以看出,生物膜形成的最适温度为37℃。

2.1.3 培养时间

有学者指出,生物膜的形成过程分为3个阶段:0~6 h为黏附阶段,6~24 h为聚集阶段,24~72 h为成熟阶段^[10]。在此基础上,本研究也对乳酸菌生物膜的形成设定4个时间点(6、24、48、72 h),检测其生物膜的形成情况。由研究结果可以看出,培养时间大于24 h后对乳酸菌生长及其生物膜的形成影响不明显,但是培养时间过短(6 h)却严重影响生物膜的形成(图1c)。这说明6 h可能只是乳酸菌生

物膜形成的初始黏附阶段,后续的聚集阶段尚未开始。同时,在试验过程中也发现,24 h的试验组中,乳酸菌所形成的生物膜在介质底部的黏附力不强,生物膜较为松散(数据未显示),在洗脱浮游细菌的同时很容易将生物膜破坏,而在培养时间更长的试验组中无此现象,这也进一步验证了生物膜形成过程分为3个阶段的理论。

2.1.4 葡萄糖含量

乳酸菌是一类能够发酵葡萄糖或乳糖产生乳酸的细菌,因此葡萄糖是乳酸菌生长及其生物膜形成的必需营养物质。随着葡萄糖质量分数的增高,乳酸菌的生长情况持续升高,但其生物膜的形成能力增强到一定程度之后又逐渐降低(图1d)。这说明葡萄糖质量分数过高或过低均不利于乳酸菌生物膜的形成,并且高质量分数的葡萄糖对其生长有显著促进作用。这说明乳酸菌生物膜的形成同其他微生物一样,具有趋营养性^[11],同时也表明葡萄糖作为乳酸菌生长所需碳源的重要性。

2.1.5 氯化钠含量

质量分数为18%及6.5%氯化钠中乳酸菌能否生长是鉴别乳酸菌有关属的重要指征^[12],戊糖乳杆菌能够耐受质量分数为6.5%氯化钠,这与本研究结果相一致。6%以下氯化钠的加入对乳酸菌生物膜的形成有一定抑制作用,抑制率为40%左右

(图 1e)。当氯化钠质量分数达到 8% 及以上时, 乳酸菌的生长受到了抑制, 其生物膜也被完全抑制。值得注意的是, 当氯化钠质量分数为 6% 时, 生物膜的形成能力不降反升, 并且这个结果与本文同时进行的一株生物膜阴性的植物乳杆菌相一致, 均在 6% 的氯化钠条件下能够形成相对较强的生物膜, 这可能是与该质量分数的氯化钠能够起到刺激生物膜调控基因的表达而让其表达量增高所致。

2.1.6 pH 值

乳杆菌的最适 pH 值通常为 5.5 ~ 6.2, 一般在 pH 值为 5 或更低的情况下可生长。在中性或初始碱性 pH 值条件时, 通常会降低其生长速率^[12]。在本研究中, 生物膜形成能力最强的 pH 值为 5.8 ~ 6.8 (图 1f), 低于 3.8 时乳酸菌的生长及生物膜形成明显受到抑制, 高于 7.8 时, 生物膜的形成能力明显降低(降低约 50%)。在初始 pH 值为 9.8 及以上时, 乳酸菌的生物膜形成被大大抑制, 但是其生长却影响较小, 这可能是因为在细菌生长初期, 中性及碱性的培养条件延缓了细菌的生长繁殖, 但是随着细菌代谢产物乳酸等的分泌堆积, 逐渐改变了外界环境的碱性条件, 使其有利于乳酸菌的生长繁殖。

2.1.7 金属离子

金属离子如 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 等也与生物膜有着密切关系^[13]。金属二价阳离子对细菌外膜脂多糖有稳定作用, 因而有助于细菌胞外多糖的交联稳定性, 其与阴离子产生的静电相互作用也有助于细菌的聚集和黏附, 从而有利于生物膜的形成^[14]。前期对表皮葡萄球菌 ATCC 35984 的生物膜形成条件探索研究时发现^[15], Ca^{2+} 能通过抑制细菌的生长繁殖而达到抑制生物膜的形成, 而在本研究中, 当 Ca^{2+} 质量分数达到 1.5% 时, 其生长情况变化不大, 相反生物膜的形成在 Ca^{2+} 为 0.5% 时即被基本完全抑制(图 1g)。这说明由于细菌种属间的差异导致 Ca^{2+}

抑制两种细菌生物膜的形成可能是通过不同的机制完成的。镁离子是多种酶的辅基, 有学者称 Mg^{2+} 不仅能增加细菌的早期黏附, 还对初期和成熟期的生物膜结构有影响, 使生物膜变得更复杂^[16]。然而在本研究中所涉及的 3 个梯度的 Mg^{2+} 质量分数, 均对乳酸菌生长及其生物膜的形成无明显影响(图 1h)。

2.2 食品添加酸类对乳酸菌生物膜形成的影响

乳酸菌是食品工业常用益生菌之一, 尤其与发酵食品关系极为密切。食品添加剂又是食品的必需添加物质之一, 从本研究的结果可以看出, 不同的食品添加剂对乳酸菌生物膜形成的影响不同。酸味剂是发酵食品常用的食品添加剂, 它不但使发酵食品的口感等性状发生了改变, 同时也改变了发酵微生物的生存环境, 尤其是其酸碱性。不同的食品添加酸类以及不同体积分数的酸对乳酸菌生长及生物膜形成的影响不同(图 2)。低体积分数的乳酸对乳酸菌的生长及其生物膜的形成均有明显的抑制作用(图 2a), 而其他 3 种食品添加酸体积分数达到 1.2% 及以上时, 才明显影响乳酸菌的生长及其生物膜的形成(图 2b ~ 2d)。这可能与乳酸菌本身及乳酸的某些特性密切相关。乳酸是乳酸菌最主要的代谢产物, 在培养液中额外加入其代谢产物, 能够对细菌产生乳酸的速率和产量起到反馈抑制的作用, 进而使其分泌乳酸的能力降低; 同时乳酸在食品行业不只是一种酸味剂, 还具有很强的防腐保鲜功效, 它在培养液中的大量存在, 能够显著抑制细菌的生长繁殖, 进而抑制其生物膜的形成。

2.3 食品稳定剂对乳酸菌生物膜形成的影响

明胶是水溶性蛋白质的混合物, 是一种天然营养型的食品增稠剂, 另外它还常被用作细菌的保护剂, 具有增加细菌稳定性的作用。麦芽糊精是淀粉的水解产物, 是一种营养型多糖, 具有很好的乳化作用和增稠效果。本研究选取这两种食品增稠剂或稳

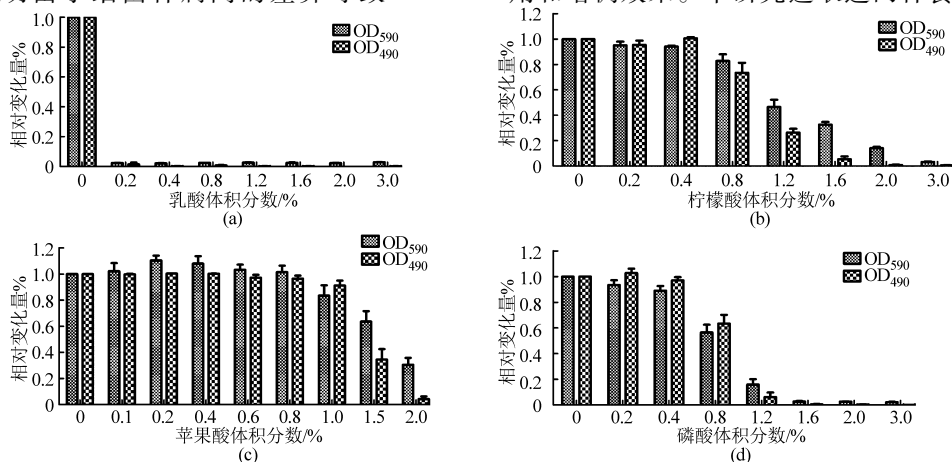


图 2 不同食品添加酸对戊糖乳杆菌生长及其生物膜形成的影响

Fig. 2 Effects of different food acidulants on growth and biofilm formation by *L. pentosus*

定剂进行试验,结果显示,两种食品稳定剂明胶及麦芽糊精对乳酸菌生长及其生物膜的形成影响均不明

显(图3),但是当麦芽糊精质量分数高于12%时,乳酸菌的生长受到一定程度的影响。

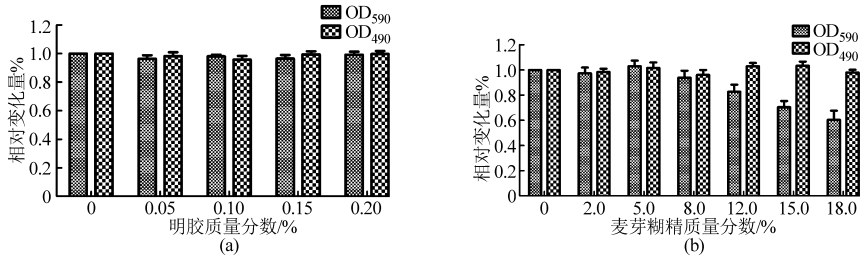


图3 明胶和麦芽糊精对戊糖乳杆菌生长及其生物膜形成的影响

Fig. 3 Effect of gelatin and maltodextrin on growth and biofilm formation by *L. pentosus*

3 结论

(1)接种量为1:200、培养温度为37℃、时间为48 h、初始pH值为5.8~6.8、葡萄糖质量分数不低于2%为戊糖乳杆菌的最适生物膜形成条件,氯化钠及Ca²⁺均对生物膜的形成有一定抑制作用。

(2)食品添加酸中低体积分数的乳酸即可在不影响乳酸菌生长的情况下强烈抑制其生物膜的形成,而其他3种食品添加酸在体积分数高于1.2%时通过抑制乳酸菌的生长而达到对其生物膜的抑制。

(3)明胶和麦芽糊精均对乳酸菌的生长和生物膜的形成影响不大。

参 考 文 献

- 杨洁彬,郭兴华,张箴,等. 乳酸菌:生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- 谢红梅. 铜绿假单胞菌生物膜形成影响因素及相关基因的研究[D]. 上海:复旦大学,2004.
Xie Hongmei. Impact factors and relative genes of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formation [D]. Shanghai: Fudan University, 2004. (in Chinese)
- 李贵兵,任树梅,杨培岭,等. 再生水条件下灌水器内生物膜生长对流量的影响[J]. 农业机械学报,2012, 43(3): 33-38.
Li Guibing, Ren Shumei, Yang Peiling, et al. Effects of growth of biofilm to emitters flow in emitter of reclaimed wastewater irrigation [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(3): 33-38. (in Chinese)
- 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.
- Czarczyk K, Myszyńska K. Biosynthesis of extracellular polymeric substances and its role in microbial biofilm formation [J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2007, 16(6): 799-806.
- Khue N T H, Ngoc N H. Exopolysaccharide in *Lactobacillus Rhamnosus* Pn04 after co-culture with *Leuconostoc mesenteroides* Vtcc-B-643[J]. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2013, 3(7): 14-17.
- Morikawa M. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(1): 1-8.
- Sutherland I W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework [J]. Microbiology, 2001, 147(1): 3-9.
- 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.
- 邵圣文,张志智,顾红光. 铜绿假单胞菌生物膜形成及厚度实时检测[J]. 中国公共卫生,2010, 26(2): 231-232.
Shao Shengwen, Zhang Zhizhi, Gu Hongguang. Real-time detection of development and thickness of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm [J]. Chinese Journal of Public Health, 2010, 26(2): 231-232. (in Chinese)
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(10): 2675-2679.
- 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix [J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(9): 623-633.
- Geesey G G, Wigglesworth-Cooksey B, Cooksey K E. Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: a review [J]. Biofouling, 2000, 15(2): 195-205.
- 任晓镭,陈伟,张利莉. 不同环境因素对表皮葡萄球菌生物被膜形成的影响[J]. 西北农业学报,2011, 20(12): 1-5.
Ren Xiaopu, Chen Wei, Zhang Lili. Effects of different factors on biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2011, 20(12): 1-5. (in Chinese)
- 林雅茵,余加林,卢起,等. 镁离子对黏液型铜绿假单胞菌生物膜形成过程的影响[J]. 中国微生物学杂志,2009, 12(6): 515-518.
Lin Yayin, Yu Jialin, Lu Qi, et al. Effects of magnesium ions on the mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm [J]. Chinese Journal of Microecology, 2009, 12(6): 515-518. (in Chinese)

Abstract: The simultaneous ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) technology of extracting antioxidants from clove was optimized and the reason for high-efficiency of this method was analyzed. The results show that the optimal parameters of the UMAE technology were as follows, ethanol concentration was 50% , ratio of extracting solution to sample was 30 mL/g, ultrasonic power was 50 W , the microwave power was 100 W and the extracting time was 12 min. Comparative study show that the extraction ratio of antioxidants from clove by UMAE was significantly improved compared with water bath oscillator extraction (WBOE) in the same conditions. It was also found that the superiority of UMAE was simultaneously acted and mutually reinforced by ultrasonic and microwave through interaction analysis. A comparison of scanning electron microscopy images from the clove powders by UMAE, WBOE, microwave assisted extraction (MAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) indicated the extraction efficiency was higher by UMEA with the more serious disruption of cell structure and the more sufficient interaction.

Key words: Clove Antioxidants Simultaneous ultrasonic/microwave assisted extraction Scanning electron microscopy

(上接第 234 页)

Effects of Environmental Factors on Biofilm Formation by *Lactobacillus pentosus*

Ren Xiaopu¹ Tuo Yanfeng² Li Mingyang¹ Wang Lei¹ Yao Dongqin¹

(1. Production & Construction Group Key Laboratory of Special Agricultural Products Further Processing in Southern Xinjiang, Tarim University, Alar 843300, China

2. College of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116000, China)

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) are recognized as probiotics worldwide. The cell itself and all kinds of metabolites are essential parts of the human life processes. The bacterial biofilm has been described as sessile bacterial communities that attached to surfaces aggregating in a hydrated polymeric matrix of their own synthesis. LAB biofilm has broad perspective for their particularities. *Lactobacillus pentosus*, which isolated from the traditional dairy products of Xinjiang and had a strong positive biofilm formation, was taken as the research subjects. Semi-quantitative assay was performed to examine effects of different physical and chemical factors and several food additives on biofilm formation by *L. pentosus*. The results showed that the optimum physical and chemical conditions for biofilm formation of *L. pentosus* were inoculation volume at 1:200, incubation temperature at 37°C, culture period at 48 h, glucose concentration at 2%, pH value at 5.8~6.8, and so on. The addition of Ca²⁺ and lactic acid obviously inhibited biofilm formation by *L. pentosus* completely.

Key words: Lactic acid bacteria Biofilm Physical and chemical factors Food additives