استخدام تقانة (FT-IR) في تحديد إمكانية إنتاج سلالات محلية من بكتيريا *Lactococcus lactis* لعديدات السكاريد الخارجية

The Application of FT-IR Technique in Determination the Ability of Producing Exopolysaccharides from Local Strains of *Lactococcus lactis*

آلاء سليمان(1) أيمن المريري(2) عهد أبو يونس(3)

A. SULIMAN (1) A. ALMARIRI (2) A. E. ABOU YOUNES (3)

(1) طالبة ماجستير- قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

(1) Master's student -.Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria

(2) مدير بحوث في هيئة الطاقة الذرية، سورية.

(2) Prof. at the atomic energy commission, Syria.

(3) قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

(3) Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

الملخص

هدف البحث إلى التعرف على إمكانية التحديد السريع للسلالات المنتجة لعديدات السكاريد الخارجية (EPS) والتابعة لبكتيريا *Lactococcus lactis* وذلك باستخدام تقانة تحويل فوريير للأشعة تحت الحمراء (FT-IR)، حيث تم استخدام سلالات تابعة للنوع *Lc. Lactis* سبق أن تم عزلها في قسم علوم الأغذية في كلية الهندسة الزراعية في جامعة دمشق (سورية)، حيث أجري الفحص التقليدي المبدئي للكشف عن الـ EPS على هذه السلالات، وذلك بالاعتماد على النمط الظاهري اللزج لـ EPS بعد تحضين السلالات لمدة 72 ساعة عند الدرجة 30ْم.

وتم إجراء تطبيق تقانة FT-IR للتعرف على إنتاج الـ EPS في هيئة الطاقة الذرية (سورية) في الفترة الممتدة بين آذار(مارس) 2012 وآذار(مارس) 2013، وقد حددت تقانة FT-IR أن ست من السلالات المدروسة من أصل 45 سلالة معزولة كانت منتجة لـ EPS حيث احتوى طيف FT-IR الناتج على عدة قمم دلت على وجود المجموعات الوظيفية المتعددة التي تدخل في تركيب الـ EPS. وقد أمكنت تقانة FT-IR من تحديد السلالات خلال فترة لا تتعدى الـ 25 ساعة، ومن الممكن استخدامها كوسيلة سريعة وموثوقة لتحديد السلالات البكتيرية المنتجة للـ EPS.

الكلمات المفتاحية: *Lactococcus lactis*، تقانة تحويل فوريير للأشعة تحت الحمراء، عديدات السكاريد الخارجية.

Abstract

This research aimed to identify the possibility of rapid identification of strains of the bacteria *Lactococcus lactis* producing exopolysaccharides (EPS) using the technique of Fourier transform infrared (FT-IR), which was used strains belonging to the type *Lc. lactis* had been

©2022 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved. **ISSN: 2305-5243; AIF-23 (p: 143 - 150)**

isolated in the Department of Food Science- College of Agricultural Engineering- Damascus University/Syria. Where an examination was performed of the traditional primary detection of the EPS on these strains, and that depending on the phenotype of viscous EPS after incubation strains for 72 hours in 30^{O}c,then, It was an application of the technique FT-IR to identify the production of EPS at the atomic energy commission between March 2012 and March 2013, FT-IR technique had identified that only six of the tested strains out of 25 strain isolated was productive for EPS, output spectrum FT-IR contained several peaks indicated the presence of multiple functional groups that Enter in the composition of the EPS. FT-IR technique has afforded of identify strains within a period not exceed 25 hours and can be used as a fast and reliable identification method of bacterial strains producing of EPS.

Keywords: *Lactococcus lactis*, Technique Fourier transform infrared, Exopolysaccharides.

المقدمة

تؤدي عديدات السكاريد الخارجية المنتجة من قبل بعض أنواع السلالات البكتيرية دوراً مهماً في الصناعات الغذائية، إضافة إلى العديد من التطبيقات المحتملة في مجالات عديدة كالصناعات الدوائية والمواد اللاصقة (Orsod وزملاؤه، 2012)، ومعالجة النفايات الصناعية في التربة (Edward وزملاؤه، 2011)، إلا أن دورها الأهم لها يتجلى في عملية التصنيع الغذائي، ولا سيما في صناعة منتجات الألبان المتخمرة، حيث يُسهم الـ EPS في تطوير خواص القوام والمذاق في منتجات الألبان المتخمرة (Boels وزملاؤه، 2001) ، بالإضافة إلى أن للـ EPS طعماً خاصاً، فهي تزيد من فترة بقاء منتجات الحليب في الفم وبالتالي تعمل كمعزز للطعم (Duboc و Mollet،2001)، وجود فائدة إضافية فيزيولوجية للـ EPS تتمثل ببقائها لوقت أطول في القناة الهضمية وبالتالي تعزز تشكيل مستعمرات لبكتيريا البروبيوتيك المفيدة (German وزملاؤه، 1999).

وعلى خلاف الـ EPS المنتجة من بكتيريا أخرى فإن لـ EPS المنتج من بكتيريا حمض اللبن (LAB) خصائص مميزة مثل خفض الكوليسترول (Nakajima وزملاؤه، 1992)، وتنشيط المناعة (Hosono وزملاؤه، 1997 ؛ Chabot وزملاؤه، 2001)، مع الإشارة إلى أن استعمال بكتيريا LAB في صناعة منتجات الألبان المتخمرة كان مستمراً لقرون عديدة، ومع إنتاج الـ EPS من قبل بعض السلالات البكتيرية التابعة لهذه المجموعة تضاعفت أهمية هذه البكتيريا في هذه الصناعة لأن المستهلك يطلب دائماً أطعمة جديدة ومتنوعة وطبيعية خالية من الإضافات الغذائية وتحقق طعماً وقواماً جيداً مرغوباً، ومن أهم الأنواع في هذه المجموعة والتي تنتج بعضاً من سلالاتها الـ EPS بكفاءة جيدة بكتيريا *Lactococcus lactis* وهي بكتيريا كروية الشكل تتجمع بصورة أزواج أو سلاسل قصيرة، موجبة الغرام، محبة للحرارة المتوسطة (Mesophilic)، متجانسة التخمر(Homofermentative)، تنتج بعض سلالاتها ينتج متعددات السكر (Exopolysaccharide EPS) و/ أو مضادات بكتيرية (Bacteriocins)، ولا تملك سياطاً (Flagella) للحركة، ولا تشكل أبواغاً داخلية (Endospores)، ويندرج تحت النوع *Lactococcus lactis* ثلاثة تحت أنواع: *Lc. lactis*, Samarzija) ssp. *Lactis* ,*Lc. lactis* ssp. *cremoris Lc. lactis* ssp. *Lactis biovar diacetylactis* وزملاؤه، 2001).

تم على مدى السنوات القليلة الماضية إحراز تقدم مهم في دراسة إنتاج Exopolysaccharide (EPS) من خلال العديد من بكتيريا حمض اللبن بشكل عام، وتخصصت أبحاث قليلة بدراسة إنتاج الـ EPS من قبل بكتيريا *Lc. Lactis* حيث جرت دراسة من قبل، Knoshaug وزملائه (2007) ومن أهم النتائج التي تم التوصل إليها من خلال هذه الدراسة أن منتجات الألبان المتخمرة المصنعة بإضافة سلالة

Lc. Lactis subsp. cremoris Ropy 352 المنتجة للـ EPS كانت تملك قواماً أكثر نعومة وتتمتع باللزوجة العالية بالمقارنة مع المنتجات المصنعة بدون إضافة هذه السلالة، حيث أظهرت السلالة إنتاج EPS بكمية كبيرة وصلت لحد 10% (وزن EPS من كمية الحليب الخالي الدسم المستخدم في تنمية هذه السلالة)، حيث ارتفعت لزوجة الحليب إلى 24 باسكال بعد 24 ساعة.

وفي دراسة أخرى على سلالات تابعة للجنس *Lactococcus* في جامعة ولاية أوريغون لعلم الأحياء المجهرية (Oregon State University، 2012) للتحقق فيما إذا كانت سلالات أخرى تظَهر خاصية EPS مماثلة ظاهرياً إلى EPS التي أنتجتها *Lc. lactis subsp. cremoris* Ropy 352، وجدت الدراسة التي شملت 60 سلالة، أن 11 سلالة منها قادرة على إنتاج EPS مماثل ظاهرياً لـ EPS التي تنتجها *Lc. lactis subsp. Cremoris Ropy* 352، وقد أكدت الدراسة على أن أفضل نسبة إضافة للسلالة المنتجة لـ EPS تبلغ 2%.

تعددت الطرائق المتبعة في الكشف عن عديدات السكاريد بدءاً من الطرائق التقليدية التي تعتمد على النمط الظاهري اللزج لـ EPS من خلال لمسهم بأداة معقمة ومراقبة تشكيل سلاسل مرئية طويلة (Torkar و Tegar، 2006) أو حتى بالاعتماد على الطرائق الوراثية (Kleerebezem وزملاؤه، 1999).

ويُعَد استخدام تقانة FT-IR كوسيلة سريعة وموثوقة هو الأفضل لتوصيف الـ EPS المنتج من قبل العديد من السلالات البكتيرية مثلما وجد كل من Orsod وزملائه (2012), Yaday وزملائه(2011).

FT-IRهو اختصار لـ Fourier Transform InfraRed (تحويل فوريير للأشعة تحت الحمراء)، ويعد الأسلوب المفضل للقياس بالأشعة تحت الحمراء حيث تمر الأشعة من خلال العينة، وقسم من الأشعة تحت الحمراء تمتصه العينة وبعض منها يمرّ عبر العينة، ويمثل الطيف الناتج امتصاص الجزيئات ويخلق بصمةً جزيئية للعينة، كما هو الحال في بصمات الأصابع، ولا يوجد هيكلين جزيئيين (كل منهما فريد من نوعه) ينتجان نفس طيف الأشعة تحت الحمراء، وهذا يجعل التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء مفيداً وموثوقاً في نتائجه لعدة أنواع من التحليل.

هَدَفَ البحث إلى تحديد السلالات التابعة للنوع *Lc.lactis* والمعزولة من الجبن الأبيض المحلي المصنع من حليب أبقار وأغنام، والمنتجة لمتعددات السكر (Exopolysaccharides) وذلك باستخدام تقانة الأشعة تحت الحمراء Fourier Transform Infra-Red (FT-IR).

مواد البحث وطرائقـه

أجريت الدراسة على 45 سلالة من بكتيريا *Lc .lactis* سبق عزلها وتنميطها باستخدام مجموعة من الاختبارات البيوكيميائية إضافة إلى الاعتماد على نظام API 20 Strep وتقانة تفاعل التسلسل البوليمرازي (PCR) في مخابر قسم علوم الأغذية /في كلية الهندسة الزراعية في جامعة دمشق(سورية)/، حيث تم عزل هذه السلالات من /32/ عينة جبن أبيض بلدي مصنعة من حليب الأغنام و/17/ عينة جبن أبيض بلدي مصنعة من حليب الأبقار، وهذه الأنواع من الأجبان غير معاملة حرارياً ولم يُضف لها بادئ، ولم تحفظ ضمن محلول ملحي، وقد جُمعت العينات عشوائياً من مناطق مختلفة من القطر العربي السوري (دمشق وريف دمشق ودرعا ومنطقة الغاب) في الفترة الممتدة بين آذار(مارس) 2012 و آذار(مارس) 2013.

تم دراسة مقدرة السلالات المتحصل عليها والمصنفة سابقاً على إنتاج عديدات السكر الخارجية (EPS) باتباع الطريقة التقليدية في الكشف، حيث جرت دراسة لمظهر المستعمرات النامية على بيئة M17 وإدخال أداة معقمة بعد مرور 72 ساعة من التحضين على الدرجة 30ْم، ومراقبة المواد اللزجة المتكونة والتي يمكن سحبها بسهولة من المستعمرة المدروسة (Torkar و Tegar، 2006).

استخدام تقانة FT-IR:

تمت زراعة البكتيريا على بيئة APT الآغار- (ألمانيا)، ثم حضنت على درجة 30ْم لمدة 24 ساعة، وبعد انتهاء فترة التحضين، تم أخذ كمية مناسبة وكافية من الزراعة (0.2 مل) بوساطة إبرة تلقيح بلاتينية خاصة قطرها 1 ملم (بحسب توصيات العمل على الجهاز FT-IR)، وتم وضعها ضمن 100 ميكرولتر من ماء مقطر معقم، وتم المزج جيداً، بعدها أُخذ من المعلق مقدار 25 ميكروليتر ووُضِع على صفيحة خاصة (وهي صفيحة مصنعة من الكوارتز وخاصة بجهاز FT-IR مقسمة إلى 96 حفرة) ضمن الحفرة المخصصة، مع ملاحظة عدم تلوث الحفرة، وُضعت الصفيحة ضمن مجفف على الدرجة 60ْم لمدة 30 دقيقة، بعدها وضعت الصفيحة في جهاز FT-IR (جهاز من شركة HTS - ألمانيا) في مخابر الميكروبيولوجيا والمناعيات في قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية في هيئة الطاقة الذرية (سورية).

جرى تحليل العينات والأطياف باستخدام برنامج OPUS بالمقارنة مع مكتبة الأطياف الخاصة والتي بينت وجود المجموعات الوظيفية المتعددة التي تدخل في تركيب الـ EPS.

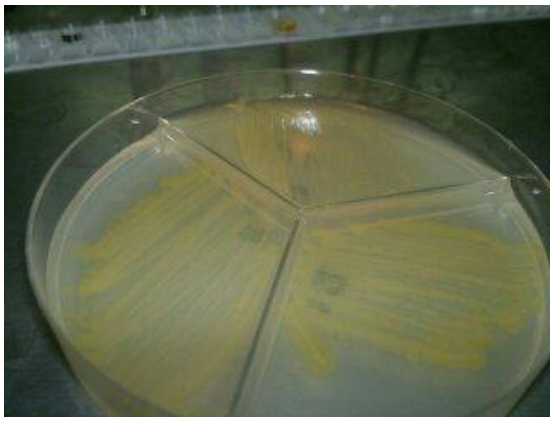
النتائج والمناقشة

تم دراسة مقدرة السلالات الـ 45 المتحصل عليها (الجدول1) -والمصنفة سابقاً- على إنتاج عديدات السكر الخارجية (EPS) باتباع الطريقة التقليدية في الكشف، فقد تم تسجيل مظهر المستعمرات النامية على بيئة M17 بعد مرور72 ساعة من التحضين على الدرجة 30°م وذلك بإدخال أداة معقمة مع مراقبة المواد اللزجة المتكونة بحسب Torkar و Tegar (2006).

الجدول (1) نسبة السلالات المنتجة لعديدات السكر ونسبة السلالات غير المنتجة لعديدات السكر

إنتاج عديدات السكر	عدد السلالات	النسبة المئوية (%)
قادرة	6	13.34
غير قادرة	39	86.67
المجموع	45	

يُلاحظ الجدول 1أن نسبة السلالات القادرة على إنتاج عديدات السكر وصلت إلى 13.34%، أي ست سلالات فقط من أصل 45 سلالة تم دراستها، وهذا يتوافق إلى حد ما مع نتائجOregon State University(2011) حيث وُجِد أن 11 سلالة من أصل 60 سلالة مدروسة كانت قادرة على إنتاج**EPS.**



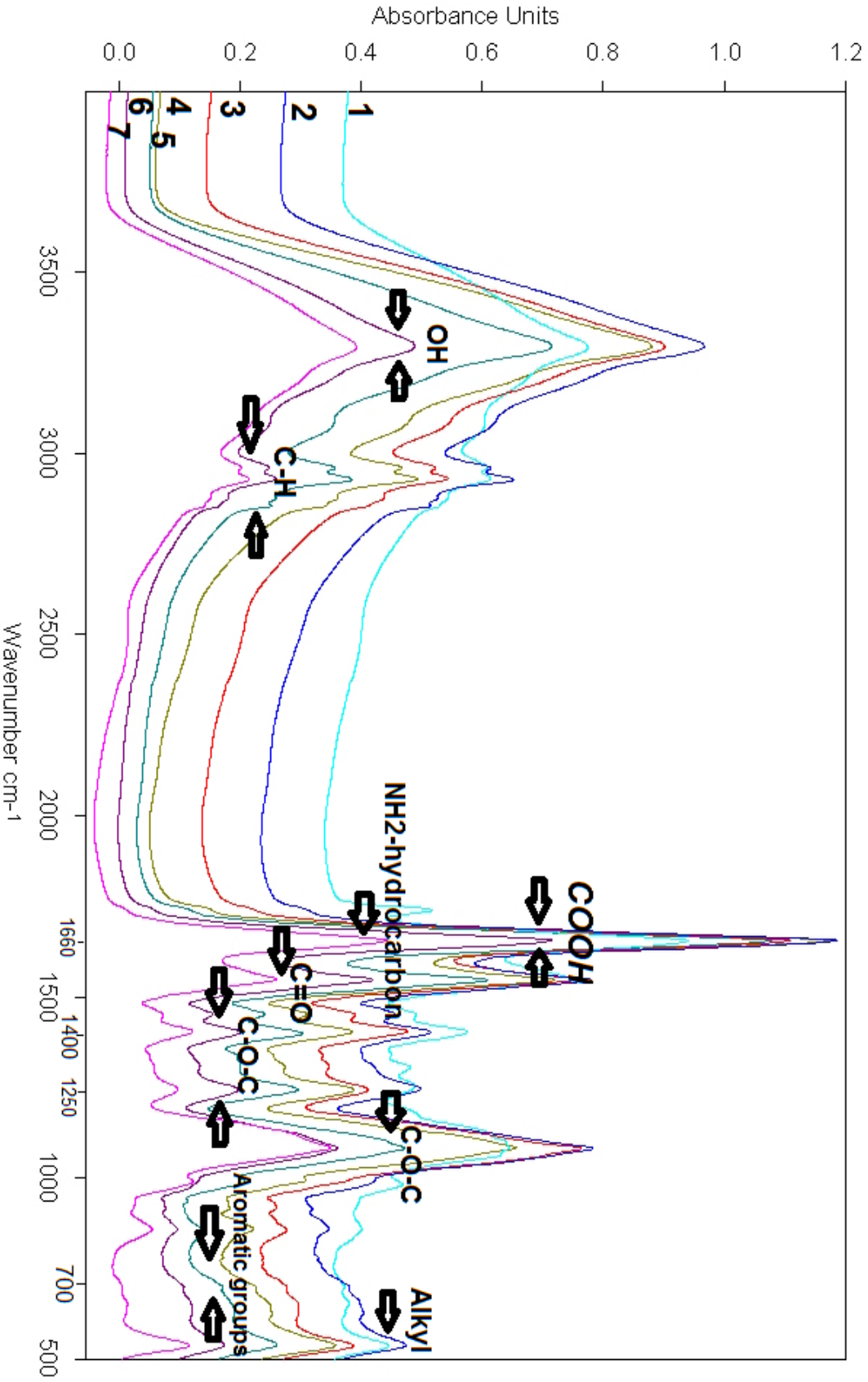
الشكل1. سلالة غير منتجة لـ EPS

الشكل2. سلالة منتجة لـ EPS

نتائج تقانة FT-IR:

تم دراسة الأطياف باستخدام البرمجيات الإحصائية ومكتبة الأطياف المزود بها جهاز تقانة FT-IR لتحديد مقدرة سلالات *Lc. Lactis* المدروسة على إنتاج مركبات الـ EPS، فقد تم دراسة أطياف لـ 45 سلالة، ويوضح الشكل1فقط السلالات الست المنتجة لعديدات السكر(السلالات من 2 إلى7) وسلالة واحدة غير منتجة (ذات الرقم 1)، وقد دُرست مجالات الطيف من 1600 إلى 1700 سم$^{-1}$ و 2800 إلى 3000سم$^{-1}$ و 3000 إلى 3400 سم$^{-1}$ و 700 إلى 770سم$^{-1}$ إضافة إلى القمم 550سم$^{-1}$ و 1100 سم$^{-1}$ و 1250 سم$^{-1}$ و 1400سم$^{-1}$ و 1590 سم$^{-1}$ و 1660سم$^{-1}$ ، ويُظهر الشكل1 نتائج الأطياف.

أما السلالات غير المنتجة لـ EPS فلم يتم استعراض نتائجها ضمن هذا البحث، وتم الاكتفاء بالسلالة رقم /1/ لكون النتائج متماثلة للسلالات غير المنتجة.



الشكل3. أطياف السلالات التابعة لبكتيريا *Lc. Lactis* حيث أن الأطياف (2،3،4،5،6،7) منتجة لـ EPS أما طيف السلالة (1) فهو غير منتج لـ EPS

يظهر الشكل1 أطياف السلالات التابعة للنوع *Lc. Lactis* و يبين أن السلالات ذات الارقام (7،6،5،4،3،2) كانت قادرة على إنتاج ال EPS، في حين أن السلالة (1) كانت غير قادرة على إنتاج الـ EPS، وبحسب المقارنة مع مكتبة جهاز FT-IR ولكون عديدات السكر تشتمل على عدة جذور وروابط بحسب (Edward،2011):

1. يُلاحظ أن المنطقة الطيفية الواقعة بين 3000 و 3400 سم$^{-1}$هي المنطقة الخاصة بمجموعة (جذر) الهيدروكسيل (OH) وتتناسب نسبة الامتصاص مع ما قدمه Ashok kumar وزملاؤه (2001) و Iyer وزملاؤه (2005) و Ibrahim وزملاؤه (2005) و Bramhachari و Dubey (2006) و Edward وزملاؤه (2011) و Yaday وزملاؤه، (2011).
2. تشير القمة عند الطيف 1590سم$^{-1}$ إلى وجود مجموعة الكربونيل (C=O) بحسب ما ذكره Ibrahim وزملاؤه (2005) و Edward وزملاؤه (2011) و Yaday وزملاؤه (2011).
3. تحتوي المنطقة الطيفية الواقعة بين 2800 و 3000 سم$^{-1}$ على عدة قمم توافق امتصاص روابط C-H المختلفة (أحادية و ثنائية و ثلاثية) بحسب ما ذكره Yaday وزملاؤه (2011).
4. تشير القمة الطيفية عند 1660سم$^{-1}$ لوجود مجموعة NH2 متصلة بسلسلة Hydrocarbon والذي يدل على وجود Glucoseamin في EPS وهذا يتوافق مع نتائج Yaday وزملائه (2011).
5. تُعَد المنطقة الواقعة بين القيم 700 و 770سم$^{-1}$ منطقة المجموعات العطرية، وذلك بحسب ما تم ذكره عند كل من Ibrahim وزملائه (2005) و Yaday وزملائه (2011) و Orsod وزملائه (2012) .
6. تشير المنطقة الطيفية الحادة التي ظهرت عند القيمة 1100سم$^{-1}$ إلى وجود مجموعة C-O-C (Aryl Alkyl Symmetrical) وهي نفس القيمة التي ذكرها Edward وزملاؤه (2011).
7. تدل المنطقة الطيفية بين 1250 و 1400سم$^{-1}$على وجود مجموعة C-O-C (Aryl Alkyl Asymmetrical)، ولاسيما عندما تتعدى نسبة الامتصاص عند /1100سم$^{-1}$/ 0.2 وحدة امتصاص فإن هذا يشير إلى وجود المجموعة C-O-C وهذا يتوافق مع نتائج Ibrahim وزملائه (2005) و Edward وزملائه (2011).
8. أشارت المنطقة الطيفية عند القيمة 550 سم$^{-1}$ إلى وجود مجموعة ألكيل، وهذا يتوافق مع القيمة التي تم الحصول عليها من قبل Edward وزملائه (2011).
9. المنطقة الطيفية بين القيمة 1600 و 1700سم$^{-1}$ هي المنطقة المميزة لمجموعة COOH ، وهذا يتوافق مع ما ذكره Ashok kumar وزملائه (2001) وIyer وزملائه (2005) و Ortega-Morales وزملائه (2007)
10. من الملاحظ أن تقانة FT-IR غير قادرة ضمن المكتبة المتوفرة بالجهاز على تحديد أنواع السكريات المنتجة من قبل بكتيريا Lc. Lactis، كما أن تحديد كمية عديدات السكر المنتجة تحتاج لتقانة أخرى غير المستخدمة في هذا البحث.

الاستنتاجات

1. تمكنت ست سلالات من أصل 45 سلالة من إنتاج عديدات السكاريد الخارجية.
2. أسهمت تقانة الـ FT-IR في تأكيد مقدرة السلالات على إنتاج الـ EPS.
3. يمكن اعتبار المناطق الطيفية الواقعة بين 1000 و 2000 سم$^{-1}$وبين 2800 و 3400 سم$^{-1}$ هي مناطق طيفية مميزة لـ EPS عند *Lc.lactis*.
4. تحديد السلالات المنتجة للـ EPS باستخدام تقانة FT-IR بمدة لا تتجاوز الساعة الواحدة.

المقترحات

متابعة العمل على تعميم تقانة FT-IR في تحديد الـ EPS لباقي سلالات بكتيريا حمض اللبن و خاصة السلالات المعزولة محلياً.

المراجع

- **Ashok kumar, M., K.T.K. Anandapandian, and K. Parthiban**. 2001. Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming marine bacterium.Brazilian Archives of Biology and Technology. 54(2) : 259-265.
- **Boels, I.C., R.V. Kranenburg, J. Hugenholtz, M. Kleerebezem, and W. M. De Vos**. 2001. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. International Dairy Journal. 11 :723–732.
- **Bramhachari, P.V., and S.K. Dubey**. 2006. Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi strain VB23*. Letters in Applied Microbiology.43(5): 571-577.
- **Chabot, S., Y.U. Han-Ling, L. DE-léséleuc, D. Cloutier, M. Van C.N, Lessard, D. ROY, M. Lacroix, and D. Oth.** 2001. Exopolysaccharides from Lactobacillus *rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells and IFN-γ in mouse splenocytes. Le Lait, 81(6): 683-697.
- **Duboc, P., and B. Mollet**, 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. International Dairy Journal. 11: 759-768.
- **Edward, A., G. Melchias, J. Antonyprabhu, A. Wilson, V. Anbababthan, and K. Sivaperumal.** 2011. Detection of exopolysaccharides/bioemulsifier producing bacterial isolates from petroleum contaminated soil. International journal of biological technology. 2(2): 1-7.
- **German, S., B. chhiffrin, E. J. Reniero, R. Molle, B. Pfeifer, and A.J. Neeser**. 1999. The developement of functional foods: lessons from the gut. Trends Biotechnol.7:492-499.
- **Hosono, J., A. Ammenati, M. Natsume, M. Hirayama, T. Adachi, and S. Kaminogawa.** 1997. Characterizationof a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 61: 312–316.
- **Ibrahim, M., A. Nada, and D. Kamal**. 2005. Density functional theory and FTIR spectroscopic study of carboxyl group. Indian journal of pure and applied physics. 43: 911-917.
- **Iyer, A., K. Mody, and B. Jha**. 2005. Characterization of an exopolysaccharide produced by marine *Enterobacter cloacae*. Indian Journal of Experimental98653 Biology. 43: 467-471.
- **Kleerebezem, M., R. Kranenburg, R. Tuinier, p. Boels, and E. Looijesteijin**, 1999. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*:from genetic engineering to improved rheological properties. 357 – 365.

- **Knoshaug, E.P., J.A. Ahlgren, and J. E. Trempy**. 2007. Exopolysaccharide Expression in *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris Ropy352*: Evidence for Novel Gene Organization.Applied and Environmental Microbiology.73(3) : 897–905.
- **Nakajima, H. T., T. Hirota, T. Toba, T. Itok, and S. Adachi**. 1992. Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis subspecies cremoris SBT 0495*. Carbohydr. Res. 224:245–253.
- **Oregon State University.** 2012. Phenotypic Characterization of Exopolysaccharide Production in *Lactococcus*. Abstract retrievded May 29, 2012, From http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/handle/1957/29404
- **Orsod, M., M. Joseph, and F. Huyop**. 2012. Characterization of exopolysaccharides produced by *Bacillus cereus* and *Brachybacterium sp* isolated from Asian sea bass. Malaysian journal of microbiology. 8(3) : 170-174.
- **Ortega-Morales, B.O., J.L. Santiago-García, M.J. Chan-Bacab, X. Moppert, E. Miranda-Tello, M.L. Fardeau, J.C. Carrero, P. Bartolo-Pérez, A. Valadéz-González, and J. Guezennec.** 2007 . Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. Journal of Applied Microbiology102(1): 254-64.
- **Samarzija, D., N. Antunac, and J. Havranek**. 2001. Taxonomy,physiology and growth of *Lactococcus lactis*. Mljekarstvo. 51(1): 35-48.
- **Torkar, K.G., and S.G. Teger**. 2006. The presence of some pathogen microorganisms, yeasts and moulds in cheese samples produced at small dairy – processing plants. Acta agriculture Slovenica. 88(1): 37-51.
- **Yaday, V., S. Gurudutt, A. Jha, and A. Poonia**. 2011. A novel exopolysaccharides from probiotic *Lactobacillus fermentum CFR 2198*: production, purification and characterization. 1(4): 415-421.

N° Ref: 500