

Qualité microbiologique du blé dur fermenté de *Matmor Hamoum* : Indispositions digestives, microflore avantageusement technologique et potentiels pathogènes

[Microbial quality of fermented durum wheat in *Matmor Hamoum* : Digestive discomfort, functional microbiota and potential pathogens]

Moustapha Soungalo Drabo¹, Hafidha Khadem²⁻³, Nour-eddine Benatmane², Abdelhak Ouhab², Mazouzi Fatma Zohra²,
Kheira Soualmi², and Boubakeur Badra²⁻³

¹Laboratoire de Biochimie et Immunologie Appliquées, Université de Ouagadougou, Burkina Faso

²Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Tiaret, Algeria

³Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire, Université de Mascara, Algeria

Copyright © 2019 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: *Hamoum* is a secular fermented food in Algeria that remains beyond any official control for its microbiological compliance. Its microflora was investigated in the aim to evaluate the microbial quality in term of beneficial flora and potential contaminants. A sample was obtained from two years old fermented wheat in *Matmor* (in Relizan, Algeria). A Survey was carried out to evaluate the appreciation of the food commodity in city of Relizan and the microflora was analyzed according to the biochemical phenotypes and MALDI-TOF spectra. Then, the presumptive beneficial isolates were screened for biofilm and protease production ability. The commodity is rich in potential probiotic and starter cultures from microbial groups lactic acid bacteria (LAB), *Actinomyces* and *Bacillus (Lysinibacillus fusiformis)*. Besides, 53% of surveyed individuals asserted digestive discomfort, diarrhea, nausea or flatulence, associated to the consumption, and microbial analysis identified potential pathogenic or toxigenic microorganisms, *Candida Krusei*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus kristinae*, *Enterococcus durans*, et *Clostridium spp.* Whenever *Hamoum* is rich in functional microorganism, it can expose to potential health or microbiological risks. It should be appropriate to have closer look at its production and marketing practices.

KEYWORDS: *Hamoum*, sanitary quality, microflora, *Lysinibacillus fusiformis*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus durans*, MALDI-TOF identification, Algeria.

RESUME: *Hamoum* est un produit alimentaire séculaire d'Algérie riche en flore bénéfique. Sa microflore a été analysée afin d'apprécier sa qualité microbiologique en terme de microorganismes bénéfiques et de potentiel pathogènes. Une enquête a été réalisée à Rélizane (Algérie) afin d'évaluer le niveau d'appréciation du blé fermenté dans la population locale et un échantillon d'un *Matmor* vieille de deux ans a été collecté. La composition microbienne a été analysée sur la base de l'identité biochimique et MALDI-TOF, capacité de production de biofilm, et activité protéolytique. L'échantillon était riche en microorganismes avantageusement technologiques et probiotiques (Bactéries lactiques, *Actinomyces* et *Bacillus*). Mais il a été reporté une indisposition digestive (53% des personnes interrogées ont signalé des diarrhées, nausée ou flatulence) suite à la consommation du *Hamoum* et les analyses microbiologiques ont identifié les potentiels microorganismes pathogènes et toxigènes *Candida Krusei*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus kristinae*, *Enterococcus durans*, et *Clostridium spp.* Bien que le *Hamoum* soit riche en microflore bénéfique, il pourrait présenter de potentiel risque sanitaire. Il serait approprié d'évaluer, en termes de bonnes pratiques d'hygiène, les conditions de productions et de commercialisation.

MOTS-CLEFS: *Hamoum*, qualité sanitaire, microflore, *Lysinibacillus fusiformis*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus durans*, identification MALDI-TOF, Algeria.

1 INTRODUCTION

La fermentation est un processus naturel ou spontané mettant en évidence le monde microbien. L'homme a appris à l'utiliser empiriquement pour de nombreux biens, à savoir la production et la conservation de ses aliments. Elle ajoute de nouvelles fonctionnalités, organoleptiques, nutritionnelles, et thérapeutiques aux aliments. Elle permet ainsi à l'homme à la fois de prévoir les disettes et d'avoir une alimentation saine. Bien qu'un vieux savoir, il est important de la maîtriser et la caractériser pour éviter les risques sanitaires. L'Afrique du Nord a une riche tradition culinaire qui utilise des produits fermentés provenant des producteurs locaux, au niveau ménage, ne maîtrisant pas les bonnes pratiques d'hygiène et de production [1]. Leurs consommations posent alors des risques sanitaires. Les études scientifiques évaluant le risque sanitaire restent toujours sommaires [1]. Le blé dur fermenté *Hamoum* est un de ces produits séculaires du Maghreb, dont le risque sanitaire est précairement évalué. Il est utilisé dans des mets emblématiques de la région, le couscous et le pain [2]. Et au regard de sa valeur nutritionnelle et des potentielles fonctionnalités sanitaires, il pourrait être un aliment fonctionnel [2][3] [4][5]. Cela demande qu'il respecte les standards, une analyse des points critiques de contamination et leur contrôle (HACCP) et la vulgarisation des bonnes pratiques d'hygiène et de production pour une meilleure promotion.

Chaque produit fermenté est associé à une microflore spécifique dont la connaissance permet d'évaluer le risque sanitaire, microbiologique et de développer des compositions starters pour une meilleure maîtrise de la fermentation. Les bactéries lactiques et les levures ont été identifiées comme la principale microflore ferment du *Hamoum* [5][6][7]. Le *Hamoum* est obtenu après plusieurs années (plus de 3 ans) de fermentation spontanée dans des silos souterrains (*Matmor*). Par ailleurs, Merabti (2015) [2] a identifié la fermentation hors *Matmor* et caractérisé la microflore fonctionnelle, avec une réduction considérable du temps (6 à 12 mois). Ce procédé permettrait une maîtrise de la qualité microbiologique. La caractérisation de la microflore pose les bases pour le développement des cultures starters. La fermentation contrôlée hors *Matmor* et l'utilisation des cultures starters améliorera l'hygiène et la qualité [8]. C'est dans cet objectif d'évaluer la qualité microbiologique du *Hamoum* et de caractériser les bactéries avantageusement technologiques que cette recherche a été conduite.

2 MATERIEL METHODES

2.1 ECHANTILLON

500 g de blé fermenté de deux ans dans un *Matmor* dans la région de Ouled Ayche (wilaya de Relizane) a été obtenu auprès d'un producteur. Le contenu du *Matmor* a été mélangé avant prélèvement dans un plastique stérile hermétique.

2.2 QUESTIONNAIRE ET ZONE D'ENQUÊTE

Un questionnaire a été conçu et a ciblé la population des deux sexes, d'âge supérieur à 40 ans, et ayant au moins une fois consommé le *Hamoum*. Il renseigne essentiellement la fréquence de consommation, l'âge (enfance ou adulte) à la première consommation/découverte, le cadre de la consommation (en famille ou hors), l'indisposition digestive rencontrée, le mode d'acquisition et les formes de consommation. L'enquête a été menée dans la wilaya de Relizane.

2.3 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

L'échantillon a été débarrassé des corps étrangers (Cailloux, sable, bois, insecte) et 10 g est dissout dans 90 ml d'eau distillée stérile. L'ensemble est reposé 30 min et secoué vigoureusement. 0.1 ml de la dilution 10^{-3} est ensemencé dans les géloses PCA, Columbia, Mac-Conkey, Chapman, et Viande Foie.

La microflore est phénotypiquement (caractères culturels, microscopiques, et biochimiques) identifiée suivants les tableaux d'assortiment dans [9]. Les différents tests biochimiques ont été réalisés suivant les procédures décrites dans [9].

2.4 IDENTIFICATION MS-MALDI-TOF

Les isolats dont l'assortiment n'aboutit pas sont identifiés sur la base de leurs spectres protéomiques par Spectrométrie de Masse, - Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice - Temps De Vol (MS-MALDI-TOF) [10]. Les aliquotes des isolats ont été réalisés sur la gélose sélectif MRS et M17 et envoyés sous glacière au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses physico-chimiques (CRAPC-Algérie). L'identification a été réalisée en utilisant le logiciel MALDI Biotyper 1.1 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

2.5 QUANTIFICATION DU BIOFILM, AGRÉGATION ET ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE

Le biofilm a été quantifié par la coloration au cristal violet selon le protocole décrite dans [11]. La capacité d'agrégation a été estimée par le test de sédimentation après 4h selon le protocole décrite dans [12].

La plage de protéolyse sur gélose au lait écrémé a été utilisée pour le screening de l'activité protéolytique [13].

2.6 ANALYSE DES DONNÉES

Les données ont été enregistrées et les différentes fréquences et moyennes ont été calculées en utilisant le tableur Excel 2010.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 MODALITÉS DE CONSOMMATION ET APPRÉCIATION DU *HAMOUM*

Au total, 37 répondants ont été obtenus avec une fréquence très faible de consommation du *Hamoum* (Figure 1). Plus de 87% le consomment rarement ou très rarement (pas plus d'un mois dans le semestre), contre 13% assez fréquemment (au moins 1 fois chaque trimestre) et 0% fréquemment (Figure 1 A). Cependant, le *Hamoum* est rapporté comme un produit séculaire des pays arabes [2]. La fermentation est une technique de préservation du blé pour prévoir et résoudre les périodes de disette. Il serait en train de perdre de l'appréciation dans la nouvelle génération, face aux produits alimentaires industriels qui remplissent les marchés. 43% des interrogés l'ont connu et consommé à leur âge adulte, contre 57% à leur enfance (Figure 1 B). Ils le consomment principalement en famille (67%) – 33% à l'occasion d'une invitation (Figure 1 C).

Le produit est en grande partie consommé directement par les détenteurs de *Matmor* (les producteurs) (73%) et seulement 27% l'achètent dans les marchés ou directement avec les producteurs (Figure 1 D).

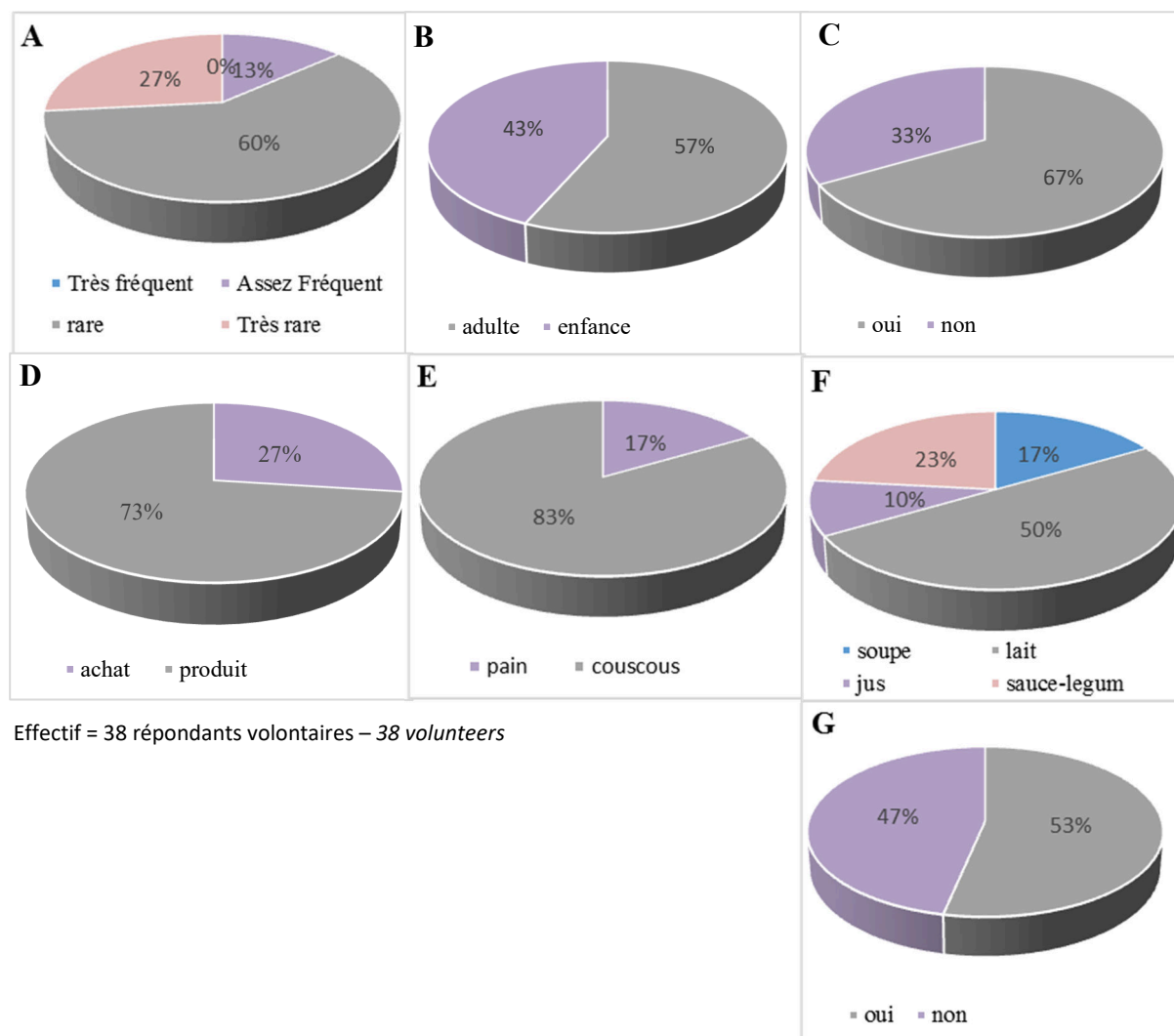


Fig. 1. A. fréquence de consommation – frequency of consumption (very frequent, ready-frequent, rare, very rare), B. distribution de l'âge de la première consommation/découverte – Distribution of period of first consumption (adult or childhood), C. cadre de consommation (en famille ou non) – Place of consumption (in family or invitation), D. mode acquisition – acquisition way (producer or buyer), E. forme de consommation – type of meal, F. Accompagnement – trimming et G. indisposition digestive – digestive discomfort (Enquête dans la région de Relizane, Algérie – Survey realized in Relizane, Algeria)

Les maladies nutritionnelles deviennent fréquentes dans les sociétés. Il serait important de promouvoir les produits locaux d'une grande valeur nutritionnelle. La fermentation offre au blé de nouvelles fonctionnalités organoleptiques (aspect, odeur, saveur) et nutritionnelles (composition biochimique et microbiologique bénéfique à la santé) [3][4][5][14]. Le blé fermenté pourrait être une importante ressource pour lutter contre les différentes maladies nutritionnelles, diabète, dyslipidémie/obésité et hypertension, qui prennent de l'ampleur dans la société algérienne. L'extrait de germe de blé fermenté a été montré efficace comme adjuvant dans le traitement du cancer gastro-intestinal [15]. Le profil protéique du *Hamoum* présenterait la même fonctionnalité [3], et le microbiote aurait un effet protecteur contre certains pathogènes gastriques [4].

Le *Hamoum* est transformé et très largement consommé en couscous et pain ou galette emblématiques des pays arabes [2]. 83% le transforment en couscous et 17% en pain (Figure 1 E) - ils l'accompagnent de lait (50%), soupe (17%), jus (10%), ou sans accompagnement (23%) (Figure 1 F). Les différents mets sont très appréciés des algériens. Cependant, un grand nombre d'interrogés (53%) (Figure 1 G) relatent des indispositions digestives, diarrhée, nausée ou flatulence. En effet, le *Hamoum* est obtenu après plusieurs années de fermentation spontanée qui pourrait l'exposer à la contamination microbienne. Il n'existe toujours pas, à notre connaissance, un guide de bonne pratique d'hygiène et de production. Une nouvelle méthode hors *Matmor* est développée pour réduire considérablement le temps de la fermentation [2]. Elle est également tributaire de la fermentation spontanée. Cependant, de nombreux travaux y identifient une grande diversité de bactéries lactiques et leurs caractéristiques technologiques [5][6][7] et pavent le développement de cultures starters. Les cultures starters et la

fermentation hors *Matmor* pourront permettre une standardisation de la qualité et la maîtrise de la sécurité et l'hygiène du *Hamoum* ; et cela en appui d'un guide de bonne pratique d'hygiène et de transformation.

3.2 QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DU *HAMOUM*

Le *Hamoum* a une microflore riche, levures, bactéries lactique, entérobactéries, et bactéries sporulantes. La culture et la microscopie révèlent cette riche flore microbienne aux différents phénotypes morphologiques, culturels, et biochimiques.

Tableau 1. *Caractères culturels, microscopiques et biochimiques et identification présomptive des isolats – Growth, microscopic, and biochemical characters and presumptive identification of isolates*

Isolats	BFR1	BFR2	BFR3	BFR4
cultures	M17 (O ₂ , 30°C, 24 h)	M17 (O ₂ , 30°C, 24 h)	M17 (O ₂ , 30°C, 24 h)	MRS (microO ₂ , 44°C, 48h)
Aspects culturels	PC translucides	MC bombées et crémeuses	PC	MC crémeuses blanchâtres
Gram (positif)	Cocci isolés, paires, tétrades, et chaînes	Coccobacilles isolés, paires et chaînes	Bacilles en paires et chaînes	Bacilles en paires
Catalase	-	+	-	-
Oxydase	+	+	+	+
Mannitol/Mobilité	-/-	+/-	-/-	+/-
ONPG	+	+	-	+
Citrate Simmons	-	-	-	-
TSI	Glucose	+	+	+
	Lactose	+	+	+
	H ₂ S	-	-	-
	Gaz	-	-	-
Protéolyse	+	+	+	+
RM	-	-	-	-
VP	-	-	-	-
ADH/LDC/ODC	+/-/-	+/-/-	+/+/+	+/-/-
Identification*	<i>E. durans</i> / <i>Pediococcus</i> spp.	<i>M. lactis</i> / <i>kristinae</i>	<i>Actinomyces</i> spp	<i>L. fermentum</i> **

*Référence [9], **Assortie faiblement, +/- Positif/Négatif, BFR Blé fermenté de Relizane, aérobie (O₂), microaérobie (microO₂), petite colonie (PC), moyenne colonie (MC), Sulfure d'hydrogène (H₂S), Clark & Lubs tests Rouge de Méthyle (RM) et Voges-Proskauer (VP), Arginine DiHydrolase (ADH), Lysine DécCarboxylase (LDC), et Ornithine DéCarboxylase (ODC).

Des familles microbiennes diverses ont été observées, notamment *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*/*Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*/*Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Actinomycetaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae* et *Saccharomycetaceae*. L'identification spécifique de colonies prises aléatoirement, caractères culturels et microscopiques (Coloration de Gram) (BFR1, BFR2, BFR3, BFR4, et BFR5), ont été obtenu par phénotypage biochimique (Tableau 1, Figure 2) : respectivement (*Enterococcus durans*/*Pediococcus* spp., *Micrococcus lactis*/*kristinae*, *Actinomyces* spp., *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus durans*).

Les *Bacillus* (bactéries sporulantes) ne sont pas de la microflore dominante dans la fermentation du *Hamoum*. Les bactéries lactiques et rarement les levures sont les leaders de la fermentation du blé dur en *Matmor* ([5][7]. Les isolats levures (coloration de Gram, Figure 2C), *Bacillus* présomptifs (Gram aspects, Catalase positive, Figure 2B), et BFR5 d'identification difficile ont été identifiés par MS-MALDI-TOF (Figure 2). Les spectres ont été assortis avec les références NCBI aux scores d'identification probable (1.700 < score < 1.999) du genre (Figure 2): *Candida krusei*, *Lysinibacillus fusiformis*, *E. durans*.

La microflore du *Hamoum* est prédominée de bactéries lactiques, en accord avec plusieurs travaux précédents [4][5][7]. A notre connaissance, aucune recherche précédente ne soulève la question de sa sécurité sanitaire/microbiologique. Ce travail a relevé la contamination par une flore qui pourrait être potentiellement toxigène et pathogène, notamment *Enterobacteriaceae*, *C. Krusei*, *Staphylococcus* spp., *M. kristinae*, *E. durans*, et *Clostridium* spp. La mise en évidence de ce risque

sanitaire/microbiologique (et le report d'indisposition digestive, Figure 1 G) soulève la question d'une recherche approfondie afin de mesurer les risques associés.

L'identification de bactéries sporulantes non pathogènes, *L. fusiformis*, avantageusement technologique [16], laisse supposer que la fermentation du blé pourrait impliquer les *Bacillus*. Il n'y a pas de travaux précédents sur le microbiote endosporulant du *Hamoum*. Cependant, les conditions de transformation en sous-sol, contrainte hydrique et haute température suggèrent fortement une implication des bactéries sporulantes, qui sont telluriques et résistantes à ces conditions. Les *Bacillus* ont des caractéristiques technologiques, activité protéolytique et caractères probiotiques (résistance à l'environnement gastrique, production de substances antimicrobiennes) [17] qui peuvent servir dans la recherche d'une formule de culture starter, en association avec la flore lactique.

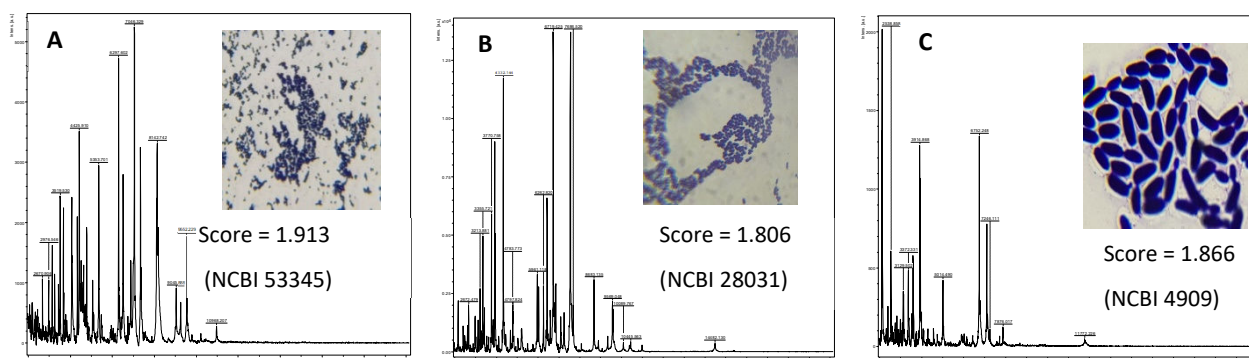


Fig. 2. Spectres MALDI-TOF & Coloration de Gram – Identification présomptive de – MALDI-TOF Spectra & Gram staining- Presumptive identification of A *E. durans* (BFR5), B. *L. fusiformis*, et de C *C. krusei* (Assortis avec les spectres standards de la base NCBI – Spectra matching using NCBI references)

3.3 CARACTÉRISTIQUES TECHNOLOGIQUES DES ISOLATS : CAPACITÉ DE PRODUCTION DU BIOFILM ET ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE

La fermentation entraîne une modification physicochimique importante du blé [5][14] et une protéolyse qui donnerait un profil protéique fonctionnel, comme adjuvant dans le traitement de cancer digestive [3][15]. Et pour des considérations technologiques, la capacité de production de biofilm et la production d'enzymes sont des caractéristiques importantes dans la sélection et l'évaluation de potentielles cultures starters [18][19]. Les différents isolats lactiques ont montré une importante capacité de production de biofilm et de protéase (Figures 3). La capacité de production du biofilm est révélée par une forte aptitude à s'adhérer au support (formation sessile sur le polystyrène) et à s'agréger (Agrégation%, Figure 3) [20]. Les isolats ont montré différentes aptitudes à former le biofilm, avec une plus grande valeur pour BFR4 (*L. fermentum*) (intensité de l'anneau et la Densité Optique (DO), Figure 3). La capacité d'agrégation était plus importante par ailleurs pour *Actinomyces* spp. (BFR3) (Figure 3). Les différents isolats présentent des aptitudes technologiques, avec de meilleurs profils (biofilm et production de protéase) pour les isolats BFR3 et BFR4 (respectivement *Actinomyces* spp. et *L. fermentum*).

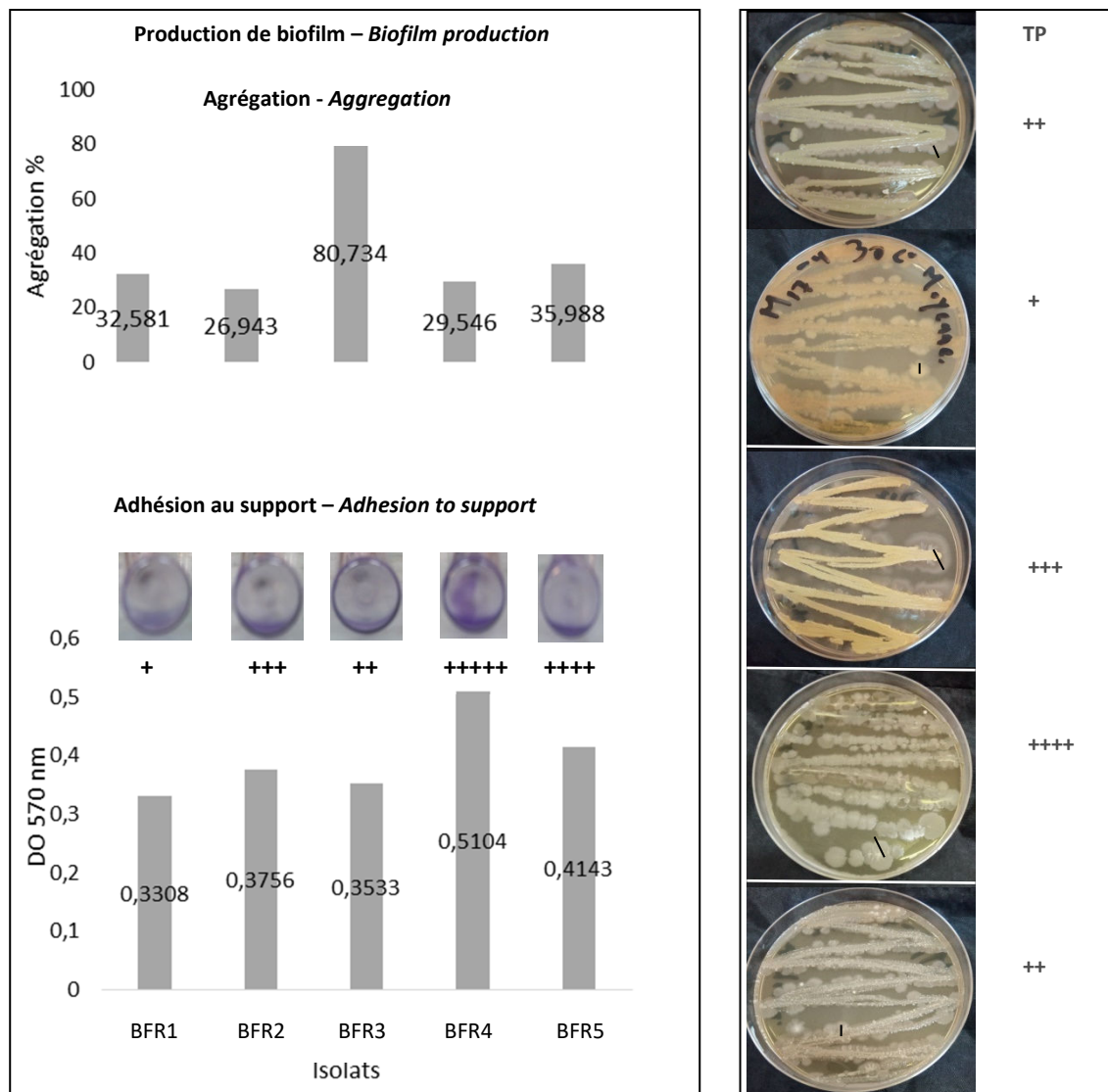


Fig. 3. Propriétés fonctionnelles des isolats, capacité de production du biofilm (agrégation % et adhésion au support) et activité protéolytique – Functional properties of isolates, biofilm production ability (aggregation, and adhesion to support) + Intensité de l’anneau sur le polystyrène ou la taille de la plage de protéolyse (TP) – Intensity of ring on polystyrene or size of proteolysis halo, \ estimation de la taille de la plage de protéolyse – Estimate size of proteolysis halo

4 CONCLUSION

Le *Hamoum* est un produit séculaire transformé en des mets emblématiques algériens. Il possède de nombreuses vertus nutritionnelles et sanitaires et pourrait être promu plus largement dans l’alimentation de la population, face à la progression des différentes pathologies nutritionnelles (diabète, surpoids). Les travaux précédents se sont beaucoup intéressés à la valeur nutritionnelle et la composition microbienne avantageusement fonctionnelle. Cependant, nous avons soulevé dans ce présent projet le risque sanitaire ou microbiologique. L’enquête a rapporté des indispositions digestives rencontrées avec la consommation du *Hamoum* et des germes potentiellement pathogènes, *Candida krusei*, *Enterococcus durans*, *micrococcus kristinae.*, et *Clostridium spp.* ont été identifiés. Les groupes microbiens *Actinomyces* et *Bacillus*, avantageusement technologiques, pourraient être explorés parallèlement aux bactéries lactiques pour le développement de cultures starters. En perspective à ce présent travail, il serait essentiel d’évaluer les pratiques de production, voir promouvoir la fermentation contrôlée hors Matmor.

REFERENCES

- [1] Benkerroum N., Traditional Fermented Foods of North African Countries : Technology and Food Safety Challenges With Regard to Microbiological Risks. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 12 : 54-89, 2013.
- [2] Merabti R., Blé dur fermenté lemzeit : étude du nouveau procédé de fermentation à l'extérieur du *Matmor* et caractérisation de l'écosystème (interactions du microbiote avec la matrice). *Thèse de doctorat, Université des Frères Mentouri-Constantine* : 177pp, 2015.
- [3] Benakriche B.M., Amier L. & Kheroua O., Evaluation du profil protéique par électrophorèse sur gel SDS-Page d'un blé fermenté naturel type *Hamoum* compare au blé normal. *Résumé Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie & d'Oncologie digestive*. 361pp., 2017. www.snfge.org/content/evaluation-du-profil-proteique-par-electrophor Consulté le 28/06/2018 19h05
- [4] Mokhtari S., Kheroua O. & Saidi D., Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Algerian durum wheat (*Triticum durum*) natural fermented in underground silos *Matmora* "El-Hammoum" and their antimicrobial activity against pathogenic germs. *J Nutr Health Sci*. 3(4): 1-12, 2016.
- [5] Bekhouche F., Merabti R. & Bailly J.D., *Lemzeiet*: Traditional couscous manufacture from fermented wheat (Algeria); investigation of the process and estimation of the technological and nutritional quality. *Afr. J. Food Sci. Technol.*, 3(8): 167-175, 2013.
- [6] Kalbaza K., Zadi-Karam H. & Karam N.E., Identification and major technological characteristics of *Lactococcus* and *Lactobacillus* strains isolated from "Hamoum", an Algerian fermented wheat. *Afr J Biotechnol*. 17 (5): 108-117, 2018.
- [7] Benakriche B.M., Benabde, Imoumen D. & Mortet A., Lactic acid bacteria diversity in the fermented wheat *Hamoum* in West Algeria. *Pakistan J. Nutr.*, 15(7): 639-648, 2016.
- [8] Holzapfel W.H., Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75: 197-212, 2002.
- [9] Cowan and Steel's manual for identification of medical bacteria - 3rd ed /edited and rev. by G.I. Barrow & R.K.A. Feltham., UK *Cambridge University Press* 331p, 2003.
- [10] Pavlovic M., Huber I., Konrad R. & Busch U., Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *Open Microbiol. J.*, 7: 135-41, 2013.
- [11] Pope C.F., McHugh T.D. & Gillespie S.H., Methods to determine fitness in bacteria. *Methods Mol. Biol.*, 642: 113-121.
- [12] Balakrishna A., 2013. In vitro Evaluation of adhesion and aggregation abilities of four potential probiotic strains isolated from guppy (*Poecilia reticulata*). *Braz. Arch. Biol. Techn.*, 56 (5): 793-800, 2010.
- [13] Savadogo A., Tapsoba F., Zongo C., Taale E., Tarnagda B. & Baba-Moussa L., Biofilm producing strains from local seeds foods (*Zamne, Bikalga and Soumbala*): Effect of glucose and agar concentrations on the biofilm production. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.*, 4: 48-59, 2016.
- [14] Gourchala F., Hobamahoro A.F., Mihoub F. & Henrchi C., Effect of natural fermentation on the nutritional quality of "el hammoum" durum wheat (*Triticum durum*) fermented product of the Algerian country. *Int J Biotechnol Res*. 4:9-18., 2014.
- [15] Yeend T., Robinson K., Lockwood C. & McArthur A., Effectiveness of the fermented wheat germ extract as an adjunct therapy in the treatment of cancer: A systematic review. *Libr Syst Rev.*, 10 (42 Suppl.): 1-12, 2012.
- [16] Divakar K., Surya P.M., Nandhinidevi G. & Gautam P., Kinetic characterization and fed-batch fermentation for maximal simultaneous production of esterase and protease from *Lysinibacillus fusiformis* AU01. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 47 (4): 323-332, 2017.
- [17] Haldar L., Ghandi D.N. & Mazumdar D., Functional properties of spore-forming *Bacillus* strains: Pre-requisite for probiotic functions. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 6 (2): 162-169, 2017.
- [18] Berlanga M. & Guerrero R., Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb. Cell Fact.*, 15:165. 1-11, 2016.
- [19] Latorre J.D., Hernandez-Velasco X., Wolfenden R.E., Vicente J.L., Wolfenden A.D., Menconi A., et al., Evaluation and selection of *Bacillus* Species Based on enzyme production, antimicrobial activity, and biofilm synthesis as direct-fed microbial candidates for Poultry. *Front. Vet. Sci.*, 3:1-9, 2016.
- [20] O'toole G.A. & Kolter R., Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30:295-304, 1998.