

شناسایی و بررسی گوناگونی ژنتیکی باکتری های اسید لاکتیک باکتری های اسید لاکتیک غیر آغازگر در پنیر رسیده تالشی

تیوا کفیلی^{*}، محسن علی نسایی

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بوبین زهرا

چکیده

سابقه و هدف: امروزه روش های مولکولی بر پایه PCR در مطالعه گوناگونی میکروبی غذاهای تخمیری به طور گسترده ای کاربرد یافته اند. هدف این مطالعه شناسایی و بررسی گوناگونی ژنتیکی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از پنیر سنتی تالشی است.

مواد و روش ها: ۵۴ سویه وحشی باکتری اسید لاکتیک در محیط های M17 و MRS ایزوله شده و پس از استخراج DNA با روش RAPD-PCR و نرم افزار MVSP خوشه بندی شدند. گونه ها توسط آزمون rRNA ۱۶S شناسایی شدند.

یافته ها: شش بیوتایپ اصلی و غالب در این پنیر سنتی شامل جنس ها و گونه های لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم، پلانتاروم، ساکنی، پاراکاژنی و لاکتوکوکسی ها، گونه های استرپتوکوکوس گالولیتیکوس، انتروکوکوس فکالیس و فیسوم بودند.

بحث: پرایمرهای به کار گرفته شده M13 و D836 در روش RAPD-PCR قادر به ایجاد پروفایل ها باندی مجزایی بوده که امکان تفکیک و خوشه بندی جدایه ها را فراهم ساخت. وجود ۲۶ ژنوتایپ در میان ۵۴ جدایه نشان دهنده گوناگونی ژنتیکی بالایی بود.

نتیجه گیری: روش های مولکولی قادر به تفکیک و شناسایی سریع و قابل اطمینان باکتری های اسید لاکتیک بوده و گوناگونی ژنتیکی بالایی آن ها را نیز نشان دادند. غالب ترین باکتری غیر آغازگر را نیز لاکتوباسیلوس های هترو فرمانتاتیو تشکیل می دادند.

واژه های کلیدی: RAPD-PCR، باکتری اسید لاکتیک غیر آغاز کننده، rRNA ۱۶S، پنیر تالشی، گوناگونی ژنتیکی

مقدمه

ممکن است شیر خام، افزودنی ها و یا محیطی که در آن تولید پنیر صورت می گیرد، باشد (۹). حضور و ورود آن ها از کنترل تولید کننده خارج بوده و این مسئله تفاوت در کیفیت پنیر تولید شده را باعث می شود و در نتیجه، در فرآیند سنتی و استفاده از آغازگرهای طبیعی، نیاز به مراقبت دائمی شرایط تکنولوژیکی برای رسیدن به محصول نهایی مطلوب است (۲۵، ۱۵). همچنین استفاده از محصول های سنتی ممکن است با خطرهای بهداشتی همراه باشد (۹). بنابراین امروزه استفاده از آغازگرهای انتخابی (هر چند غیر اختصاصی) جهت دست-یابی به کیفیت یکنواخت و آسانی کنترل فرآیند، معمول است. ترکیب روش استانداردیزه کردن میکروبی شیر همراه با به کارگیری کشت های غیر آغازگر منجر به تولید محصولی با کیفیت بالا و یکنواخت می گردد (۱۳). از آنجا که طیف وسیعی از باکتری های اسید لاکتیک در ایجاد خصوصیت های عطر و طعمی مؤثرند، جهت حفظ ویژگی های سنتی و گوناگونی بیولوژیکی موجود در این دسته از محصول های

با توجه به روند صنعتی شدن و در تهدید بودن شیوه دامداری سنتی، خطر از دست رفتن محصول های سنتی تخمیری که همواره به عنوان مخزن عظیمی از سویه های حاوی ژن های مفید و بخشی از میراث طبیعی و ملی احساس می شود (۶، ۱۴). همچنین محصول های سنتی دارای خصوصیت های عطر و طعمی مگوناگونی و پیچیده ای هستند که عامل تعیین کننده آن و تفاوت در کیفیت، دسته ای از باکتری ها به نام باکتری های اسید لاکتیک غیر آغازگر هستند که منشاء آنها

نویسنده مسئول :

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بوبین زهرا

پست الکترونیکی: tivkafil@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۶

سویه ها و جنس های مختلف باکتریایی به شمار می روند که در این مطالعه نیز از آزمون RAPD-PCR، که روشی مطمئن و سریع بوده و در آن از پرایمرهای طراحی شده تصادفی سود برده می شود (۱۸) و ۱۶S rRNA که بر پایه PCR می باشد، استفاده شد (۲۶).

مواد و روش ها

روش نمونه برداری

۱۵ نمونه پنیر از فروشگاه های محلی منطقه تالش خریداری و در نهایت سه نمونه با بالاترین کیفیت طعم جهت آزمون های بعدی انتخاب شدند. نمونه ها در شرایط استریل و در کنار یخ به سرعت به آزمایشگاه منتقل شدند. ۲۰ گرم از هر نمونه انتخاب شده و پس از همگن سازی، در سیترا سدیوم ۲٪ (وزنی/حجمی) همگن و سپس رقیق سازی شد. سپس ۱۰۰ μl از رقت های تهیه شده بر روی محیط های M17، ۵-۵/۵ MRS (pH منتقل شده و به ترتیب در دمای ۳۰°C و ۳۷ و به مدت ۷۲ ساعت و در شرایط نیمه هوازی گرمخانه گذاری شدند (۲۰،۷).

جدا سازی جدایه های لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس

جهت جدا سازی لاکتوباسیلوس ها، از هر پلیت کلنی های کاملاً مجزای میله ای، گرم مثبت و کاتالاز منفی از هر پلیت محیط MRS به طور تصادفی انتخاب شده و جهت خالص سازی سه بار تجدید کشت شدند. جهت جدا سازی لاکتوکوکوس ها، سویه های گرم مثبت کروی کاتالاز منفی انتخاب شده و به طور مشابه خالص سازی گردیدند. در نهایت تک کلنی حاصل از کشت سوم به محیط MRS برات یا M17 برات منتقل شده و در گرمخانه قرار داده شدند. از محیط کشت مایع حاوی باکتری خالص سازی شده ۱ mL سانتریفوژ شده و سلول های ته نشین شده با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس محیط کشت تازه همراه با ۲۰٪ گلیسرول به جدایه ها اضافه شده و تا زمان انجام آزمایش ها، در دمای ۲۰°C - نگهداری شدند (۱۳).

استخراج DNA از جدایه ها

کلنی های خالص انتخاب و در ۱۰ mL محیط MRS برات منتقل و تا روز بعد گرمخانه گذاری شدند. سپس ۱ mL از آن به میکروتیوب ۱/۵ mL منتقل شده و سانتریفوژ شد. توده سلولی حاصله در ۵۰۰ μl بافر TES حاوی لیزوزیم (mg) ۲۰ ml⁻¹ و (۱۰ mg ml⁻¹) RNAase حل شده و پس از ورتکس به مدت یک دقیقه، در دمای ۳۷°C و به مدت ۱ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس ۳۰۰ μl نمک طعام ۵ مولار اضافه شد و مدت ۱۵ دقیقه در یخچال نگهداری شد.

مانند پنیرها، انتخاب و استفاده از سویه های طبیعی لاکتیکی و حتی غیر لاکتیکی توصیه می شود (۳۱، ۶).

برای طیف وسیعی از پنیرهای سنتی حضور باکتری های اسید لاکتیک غیرآغازگر مگوناگونی گزارش شده است که این مسئله اهمیت کسب دانستن دقیق نوع و گوناگونی ژنتیکی میکروارگانیسم های دخیل در رسیدن پنیرهای سنتی جهت دست یابی و طراحی کشت میکروبی ثانویه برای انواع پنیرهای سنتی را آشکار می سازد (۲۴، ۲۰، ۱۹، ۱۷). گوناگونی کم کشت های آغازگر به کار گرفته شده در تخمیر لبنی منجر به افزایش تقاضای تولید کنندگان این محصولات برای کشت های آغازگر جدید شده است (۳۴، ۱۶). در این راستا در دهه اخیر مطالعه های فراوانی بر روی جداسازی و مطالعه سویه های وحشی اسید لاکتیک صورت گرفته و نتایج آن منتشر شده است (۲۷، ۳۰، ۳۲، ۲۳، ۱۰).

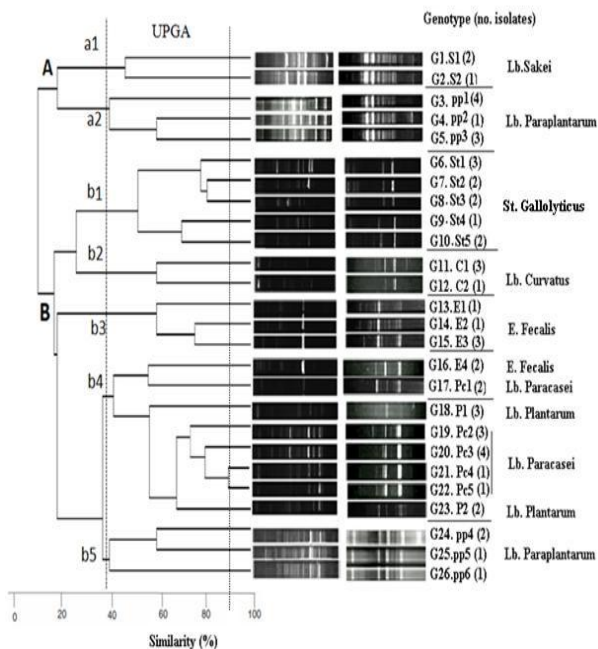
در کشور ما با توجه به گوناگونی آب و هوایی و رواج دامداری انواع پنیرهای سنتی در مناطق مختلف تولید می شود که از مهم ترین آن ها می توان به پنیرهای تبریز، لبقوان، شبستر، ارومیه، پنیر خیکی یا کوزه ای، سیامزگی، پنیر زنجان، پنیرهای کردستان و قزوین اشاره کرد که مطالعه ها بر روی برخی از این محصولات آغاز شده و نتایج آن منتشر شده است (۲۲، ۱۲، ۱۱، ۴، ۳، ۱).

پنیر تالشی نیز یکی از محصولات سنتی لبنی تولید شده در منطقه کوهستانی تالش استان گیلان می باشد که به طور سنتی و از شیر خام و بدون استفاده از آغازگر تولید شده و از ارزش تغذیه ای بالا، عطر و طعم خاص و محبوبیت بالایی برخوردار است. در حال حاضر هیچ گونه مطالعه ای بر روی این ماده غذایی صورت نگرفته است و دانسته ها بسیار کمی به خصوص در رابطه با وضعیت میکروبی آن وجود دارد. از آنجا که این محصول دارای عطر و طعم منحصر به فرد و بسیار پیچیده ای است گمان می رود دارای گوناگونی میکروبی بسیار غنی باشد. هدف از این تحقیق مطالعه، جداسازی و شناسایی سویه های این محصول سنتی است. نتایج حاصله علاوه بر بالا بردن دانسته ها و دانش عمومی میکروبیولوژی پنیرها و سویه های بومی ایران، می تواند در جهت افزایش کیفیت تولید و بهداشت این محصول و طراحی کشت آغازگر و تولید صنعتی آن مفید واقع شود (۲). تعیین گوناگونی باکتری های غیر آغازگر تا حد سویه، نیازمند استفاده از یک روش سریع و مناسب برای ارزیابی تعداد بالای باکتری های جدا سازی شده است (۲۱). شناساگرهای مولکولی امروزه به عنوان یکی از ابزارهای قوی شناسایی و مطالعه گوناگونی ژنتیکی میان

صورت گرفت (۲۶).

نتایج

پس از مقایسه الگوهای RAPD و حذف سویه‌های تکراری با الگوهای باندی یکسان، ۱۷ باسیلوس و ۹ کوکسی انتخاب شده و توسط نرم افزار MVSP و ضریب پیرسون و UPGMA خوشه‌بندی شدند. انگشت نگاری ژنتیکی به دست آمده از سویه‌ها با استفاده از هر دو پرایمر که در شکل ۱ نشان داده شده است. ژنوتایپ‌های مختلف دارای الگوی باندی متفاوت بوده و در یک خوشه عمده قرار گرفته اند و نشان دهنده این است که الگوهای مشابه نماینده یک گونه و یا یک جنس می باشد (۲۹).



شکل ۱. دندروگرام RAPD حاصل از الگوی حاصل از فرآورده های تکثیر شده آغازگرهای M۱۳ و D۸۳۹ با استفاده از ضریب تشابه پیرسون و UPGMA cluster و نرم افزار MVSP.

در حد شباهت ۱۵٪، دو گروه اصلی A و B دیده شد که گروه A به ترتیب در برگیرنده لاکتوباسیلوس ساکنی (۳ سویه، ۲ ژنوتایپ، حد شباهت ۴۸٪) و پارا پلانتاروم (۸ سویه، ۳ ژنوتایپ، ۳۹٪)، اما گروه B طیف وسیع تری از گونه‌ها شامل انتروکوکوس فکاليس (۷ سویه، ۴ ژنوتایپ، شباهت < ۲۰٪)، استرپتوکوکوس گالولیتیکوس (۹ سویه، ۵ ژنوتایپ، شباهت ۵۲٪) و لاکتوباسیلوس کرواتوس (۴ سویه، ۲ ژنوتایپ، شباهت ۵۷٪)، ساکنی (۳ سویه، ۲ ژنوتایپ، ۴۵٪)، پاراکازی (۱۱

سپس سانتیفریوژ با دور g ۲۹۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه اعمال شده و فاز رویی توسط ۰/۷ حجم ایزوپروپانول 20°C - ترسیب داده شد. رسوب حاصله با اتانول ۷۰٪ شستشو شد و مجدداً در $500\text{ }\mu\text{L}$ آب مقطر استریل حل شده و ابتدا با فنل و سپس با کلروفرم- ایزوآمیل با نسبت (۱:۲۴)، خالص شد. فاز آبی دوباره با استفاده از ۰/۷ حجم الکل ایزوپروپانول سرد و سانتیفریوژ یخچال دار g ۲۹۰۰۰، به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شد و در نهایت DNA حاصله پس از شستشو با اتانول ۷۰٪ و خشک کردن، در $50\text{ }\mu\text{L}$ بافر TE حل و در دمای 20°C - نگهداری شد (۲۶).

شرایط PCR - RAPD:

واکنش PCR در حجم $25\text{ }\mu\text{L}$ و با استفاده از X واکنش Master red mix ۲ (Amplicon II, Denmark) و پرایمرهای تصادفی M۱۳ و D۸۳۹ در غلظت های mM ۰/۲ انجام شد. برنامه PCR به کار گرفته شده، برنامه تاج دان شامل ۳۵ سیکل اتصال در دمای 31°C تا 62°C و با نرخ افزایشی 0.6°C در هر سیکل بود. $15\text{ }\mu\text{L}$ از فرآورده های PCR روی ژل آگارز ۲/۵٪ تلقیح شده و سپس در دستگاه الکتروفورز با 300 V به مدت ۵ ساعت قرار گرفتند. بر روی هر ژل آگارز نیز از سایز مارکر kb ۱ استفاده شد (۲۶، ۱۸).

آنالیز عددی نمونه های RAPD-PCR:

پس از تعیین باندهای مشترک و مشابه، برای تجزیه داده‌ها ابتدا ماتریس صفر و یک تشکیل شد. ماتریس داده‌ها که در آن توالی‌ها نماینده سویه‌ها و ستون‌ها نماینده نشانگرها بودند با استفاده از نرم افزار MVSP مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. روش آماری به کار گرفته شده تجزیه خوشه‌ای بود شباهت هر چه بیشتر اندازه و الگوی باندهای مختلف به عنوان تشابه ژنتیکی بیشتر و کمتر در نظر گرفته شد. برای محاسبه فاصله بین دو خوشه نیز از الگوریتم تجزیه خوشه‌ای UPGMA^۲ استفاده شد (۲۹).

شناسایی:

پس از رسم دندروگرام مربوط به تجزیه و تحلیل الگوی باندهای مختلف، که در آن جدایه‌ها بر حسب میزان شباهت گروه بندی شده‌اند، از هر گروه یک جدایه به نمایندگی از سایر جدایه‌ها انتخاب و از DNA اصلی آن دوباره برای واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی برای تکثیر ناحیه rRNA ۱۶S استفاده شد. این ناحیه تعیین توالی شده و با مقایسه با سایر توالی‌ها در پایگاه‌های اطلاعاتی شناسایی

1 Touch down
2 Unweighted pair group

سویه، ۵ ژنوتایپ، ۴۲٪، پاراپلانتاروم (۴ سویه و ۲ ژنوتایپ، ۳۸٪) و پلانتاروم (۵ سویه، ۲ ژنوتایپ، ۵۷٪) را در بر گرفت. از هر گروه یک جدایه به نمایندگی از سایر جدایه‌ها انتخاب و ناحیه V3 از ژن rRNA ۱۶S مورد تعیین توالی قرار داده شد و پس از مقایسه با سایر توالی‌ها در پایگاه‌های اطلاعاتی شناسایی صورت گرفت. به طور کلی ۵۴ جدایه با میزان شباهت ۱۵٪ در دو خوشه اصلی A و B قرار داده شده است. گروه A شامل سه جدایه لاکتوباسیلوس ساکنی و ۸ جدایه لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم است که با ژنوتایپ‌های G1 تا G5 در زیر گروه‌های a2 و a1 در حد شباهت ۲۰٪ قرار گرفته‌اند. خوشه B مگوناگونی تر بوده و جنس‌های انتروکوکوس، استرپتوکوکوس و لاکتوباسیلوس را در خود جای داده است. سویه‌های متعلق به این جنس‌ها در زیر خوشه‌های b1, b2, b3, b4 و b5 گروه بندی شده‌اند. زیرگروه b1 حاوی ۱۰ سویه و ژنوتایپ‌های G6 تا G10 استرپتوکوکوس گالولیتیکوس با حد شباهت ۵۲٪ بوده و زیرگروه b2 شامل ۴ سویه لاکتوباسیلوس کرواتوس (G11 و G12) در حد شباهت ۵۷٪ است. سویه‌های انتروکوکوس فکالینس میزان شباهت کمی در حد کم‌تر از ۲۰٪ داشته و با ژنوتایپ‌های G13 تا G15 در زیر گروه b3 و ژنوتایپ G16 در b4.1 پراکنده شده‌اند. در زیر گروه b4.2 نیز دو گونه لاکتوباسیلوس پاراکازئی و پلانتاروم جای گرفته‌اند که سویه‌های پاراکازئی از لحاظ ژنتیکی دارای شباهت بیش‌تری (۶۸٪) بودند.

بحث

از آنجا که دست‌یابی به کشت‌های جانبی در کنار کشت‌های آغازگر نقش به‌سزایی در رسیدن و گسترش عطر و طعم‌های ویژه در پنیرهای صنعتی داشته است، تحقیق‌های زیادی بر روی جدا سازی و مطالعه جمعیت باکتریایی آن‌ها صورت گرفته است (۸). روش RAPD-PCR از کارآمدترین روش‌ها بوده که علاوه بر دارا بودن مزایایی چون سرعت بالا (امکان شناسایی تعداد بسیاری از باکتری‌ها در مدت زمان کم)، اقتصادی بودن و صحت بالای نتایج، امکان تفکیک باکتری‌ها و نیز بررسی گوناگونی ژنتیکی سویه‌های متعلق به یک گونه را نیز فراهم می‌آورد (۱۸). این تکنیک مطالعه محیط‌های پیچیده میکروبی مانند محصول‌های تخمیری سنتی را تسهیل نموده است و بنابراین در این تحقیق نیز برای شناسایی جنس‌ها و گونه‌های دخیل در رسیدن پنیر تالشی سود برده شده است. پس از خوشه بندی سویه‌ها با این روش و تعیین توالی rRNA ۱۶S سویه‌هایی که به نمایندگی در هر گروه انتخاب شده‌اند، دیده شد که این روش سویه‌ها را بنا بر جنس

و گونه یکسان در خوشه‌های مجزایی تفکیک نموده است. اما دیده شد یک گونه مشابه نیز ممکن است در خوشه‌های مختلفی قرار گیرد برای مثال سویه‌های لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم که در دو خوشه مجزای a2 و b5 پراکنده شده‌اند و نشان دهنده گوناگونی ژنتیکی بالای آن است.

به طور کلی نتایج نشان دهنده شش بیوتایپ اصلی و غالب در این پنیر سنتی بود. غالب‌ترین جنس غیرآغازگر را لاکتوباسیلوس‌های هترو فرمانتاتیو اختیاری تشکیل داده که مگوناگونی‌ترین جنس نیز بوده و مشتمل بر گونه‌های پاراپلانتاروم، پاراکازئی، کرواتوس و ساکنی است. جدا سازی این گونه‌های لاکتوباسیلوس توسط محققان دیگر نیز در مطالعه‌ها گزارش شده است (۸، ۱۳، ۲۸، ۲۹). در حالی که لاکتوباسیلوس ساکنی جزء گونه‌های معمول یافت شده در محصول‌های گوشتی است در نمونه‌های لبنی کم‌تر گزارش شده است اما در سال ۲۰۰۸ توسط آمور^۳ و همکارانش سویه ای از این باکتری در پنیر ایتالیایی سولا^۴ شناسایی شده است (۵). گونه پاراپلانتاروم که بیش‌ترین تعداد لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده را تشکیل می‌دهد دارای گوناگونی ژنتیکی بالایی است به طوری که در دو خوشه کاملاً مجزای b5 و a2 پراکنده شده است. این گوناگونی البته به میزان کم‌تر در سایر گونه‌های لاکتوباسیلوس مانند کرواتوس و پلانتاروم و ساکنی دیده می‌شود. وجود گوناگونی ژنتیکی بالا حتی در میان یک گونه در گوناگونی و پیچیدگی عطر و طعم پنیرهای تولید شده از شیر خام نقش دارد. گوناگونی ژنتیکی بالای این گونه‌ها در بررسی‌های سایر محققان نیز گزارش شده است و با توجه به این واقعیت محققین به کارگیری کشت‌های مختلط حاوی شکل‌های مختلف ژنتیکی از یک سویه طبیعی را در طراحی کشت‌های جانبی کشت‌های آغازگر پیشنهاد کرده‌اند (۱۶، ۱۳، ۷، ۲). انواع لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمانتاتیو قادر به تولید باکتریوسین‌های مؤثر بر باکتری‌های گرم مثبتی مانند کلسترییدیوم و لیستریا و استافیلوکوکوس اورئوس بوده که می‌توانند دلیلی بر سلامت و ایمن بودن این محصول سنتی باشد که از شیر خام تولید شده است (۹، ۶).

پس از لاکتوباسیلوس‌ها، لاکتوکوکسی‌ها شامل استرپتوکوکوس گالولیتیکوس و انتروکوکوس فکالینس/فیسوم از سایر باکتری‌های مهم غیر آغازگر شناسایی شده بودند. وجود لاکتوکوکسی‌ها به عنوان کشت‌های غیر آغازگر در پنیرهای نیمه سخت در گذشته نیز گزارش شده بود برای

3 Amor

4 Sola

مثال در میان کوکسی‌های جداسازی شده از یک پنیر نیمه سخت ایتالیایی بنام پیه مونتز توما^۵ شش گونه استرپتوکوکوس و سه گونه انتروکوکوس (۱۶) و یا در بررسی-های میکروبی مربوط به پنیر لیقوان این گونه‌ها ردیابی و گزارش شده‌اند (۱۱). استرپتوکوکوس گالولیتیکوس (بوویس) نیز که قادر به تحمل شرایط نامطلوب حاکم بر پنیر بوده است، سویه معمولی در انواع پنیرها نبوده و تنها در سال ۱۹۹۸ در نمونه‌ای از پنیر یونانی بنام کاسری^۶ جداسازی و گزارش شده است. برخلاف این گونه، انواع انتروکوکوس در بسیاری از انواع پنیرها جداسازی و گزارش شده است چرا که به راحتی می-تواند در محصول‌های لبنی رشد کرده و زنده بماند. برخی محققان انتروکوکوس‌ها را در زمره باکتری‌های آغازگر دانسته‌اند اما با توجه به عدم تولید اسیدیتة بالا توسط آن‌ها سایر محققان آنها را بافت ثانویه میکروبی معرفی کرده‌اند (۳۳، ۱۱). با وجود سیستم‌های آنزیمی مؤثر در تولید عطر و طعم که سبب شده است برخی محققین از آن به عنوان میکروارگانیسم مطرح در طراحی کشت‌های آغازگر نام ببرند اما تولید ترکیب-ها خطرناکی مانند آمین‌های بیوژنیک نقش مثبت این میکروارگانیسم را در رساندن پنیر با تردید مواجه ساخته است (۱۹، ۹).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق برای اولین بار دانسته‌های مربوط به بافت و جمعیت میکروبی پنیر سنتی تالشی با استفاده از روش‌های ژنتیکی بر پایه PCR گزارش شده است. دیده شد روش‌های مولکولی RAPD-PCR و تعیین توالی rRNA ۱۶S به ترتیب روش‌های قوی و کارآمد در تفکیک، خوشه بندی و شناسایی جنس‌ها و حتی اغلب گونه‌های دخیل در رساندن پنیر است. این دانسته‌ها و آزمون‌های تکمیلی در مورد ویژگی-های تکنولوژیکی سویه‌های جداسازی شده که در حال حاضر در حال انجام است امکان انتخاب سویه‌های مناسب و مفید برای طراحی کشت آغازگر و یا کشت جانبی برای بهبود و یکنواختی کیفیت پنیر و تولید بهداشتی آن را فراهم می‌آورد.

سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوبین زهرا برای تأمین منابع مالی این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. یاورمنش م، هاشمی س م، مرتضوی س ع، حبیبی نجفی م ب، عدالتیان م ر، شناسایی و ارزیابی تغییرات فلورلاکتیکی ذاتی پنیر کوزه تازه ورسیده بر پایه روش مبتنی بر کشت و تخمیر کربوهیدرات، نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۳۹۲؛ ۱۲۵-۱۱۷.
2. Alessandria F, Zeppa G, Rantsiou K, Cocolin L. Characterization of artisanal Raschera PDO cheese: of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Micro*, 2008; 25: 392-399.
3. Aminifar M, Hamed M, Emam-Djomeh Z, Mehdinia A. The effect of ovine and bovine milk on the textural properties of Lighvan cheese during ripening. *Int. J. Dairy Technol* 2013; 66(1): 45-53.
4. Aminifar M, Hamed M, Emam-Djomeh Z, Mehdinia A. Investigation on proteolysis and formation of volatile compounds of Lighvan cheese during ripening. *J Food Sci Technol*, 2012; 20 :1-9.
5. Ammor, MS, Dufour E, Zagorec M, Chaillou S, Chevallier I, Characterization and selection of *Lactobacillus sake* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbio*, 2005; 22: 529-538.
6. Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J*, 2001; 11: 259-274
7. Callon C, Millet L, Montel LC. Diversity of lactic acid bacteria isolated from Salers cheese, *J Dairy Res*, 2004; 71: 231-244.
8. Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau M, Gueguen M, Vernoex J, Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products Laboratoire de microbiologie alimentaire, Review article, *Lait*, 2003; 83:269-306.
9. De Reu K, Debeuckelaere W, Botteldoorn N, De Block J, Herman L. Hygienic parameters, toxins and pathogen occurrence in raw milk cheeses. *J. Food Saf*, 2002; 22: 183-196.
10. Dubeuf JP, Ruiz Morales F, Castel Genis JM. Initiatives and projects to promote the Mediterranean local cheeses and their relations to the development of livestock systems and activities. *Small Ruminant Res*, 2010; 93(2): 67-75.
11. Edalatian MR, Habibi Najafi M, Mortazavi S, Alegria, Delgado S, Bassami M, Mayo B. Production of bacteriocins by *Enterococcus* spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. *Eur Food Res Technol*, 2012; 234(5): 789-796.
12. Farahani G, Ezzatpanah H, Abbasi S. Characterization of Siahmazgi cheese, an Iranian ewe's milk variety: Assessment of physico-chemical, textural and rheological specifications during ripening. *LWT-Food Sci Tech*, 2014; 58(2): 335-342.
13. Fitzsimons NA, Cogan TM, Ondon S, Beresford T. Phenotypic and Genotypic Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Mature Cheddar Cheese. *App Env Micr*, 1999; (65): 3418-3426.
14. Fox F, Diversity of Cheese Varieties, Cheese: chemistry, physics and microbiology, vol II. Chapman and Hall, London, United Kingdom, 1993, chapter 1, 17-20.
15. Fox F, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP, third ed. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 1. Elsevier Ltd., London, UK., 2004, 192-195.
16. ortina MG, Ricci G, Acquati A, Zeppa G, Gandini A, Manachini PL. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (POD) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiol*, 2003; 20: 397-404.
17. Giuseppe Z, Maria GF, PD Anna, Annibale G, Pier Luigi M, Characterization of autochthonous lactic acid bacteria from an artisanal Italian cheese, *Acta agr. Slov*. 2004; 1: 3-9.
18. Hou-Yang J, Guo-Hua Z, Zhi-Lan C. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis of Lactic Acid Bacteria from Yak Milk Tibet Area. *Food scie*, 2013; 7:206-211.

19. Jayarao BM and SP Oliver. Polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species isolated from bovine milk. *J. Food Prot*, 1994; 57: 240-245.
20. Jordan KN and Cogan TM. Identification and growth of nonstarter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese, *Food Res* 1993; 32: 47-55.
21. Johansson ML, Quednau M, Molin G, Ahrne S. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett Appl Microbiol*, 1995; 21: 155-159.
22. Karami M, Ehsani MR, Mousavi SM, Rezaei K, Safari M, Changes in the rheological properties of Iranian UF Feta cheese during ripening. *Food Chem* 2009; 112(3): 539-44.
23. Kumar S. Effect of rate of addition of starter culture on textural characteristics of buffalo milk Feta type cheese during ripening. *J. Food Sci Technol*, 2014; 51(4): 800-804.
24. Law BA, Castanon M and Sharpe ME. The effect of non-starter bacteria on the chemical composition and the flavor of Cheddar cheese. *J Dairy Res*, 1976; 43: 117-125.
25. Leclercq-Perlat MN, Helias A, Corrieu G. Short communication: Little change takes place in Camembert-type cheese water activities throughout ripening in terms of relative humidity and salt. *J. Dairy Sci*, 2013; 96(12): 7521-7525.
26. Moschetti G, Blaiotta G, Aponte M, Catzeddu P, Villan F. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *J. Appl Micro*, 1998; 85: 25-36.
27. Murtaza MA, Ur-Rehman S, Anjum FM, Huma N, Hafiz I. Cheddar Cheese Ripening and Flavor Characterization: A Review. *Crit Rev Food Sci*, 2013; 54(10): 13-21.
28. Sanchez I, Sesen S, Justa M, Poveda L, Cabezas P. Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *Int J. Food Mic*, 2006; 265-273.
29. Sesena S, Justa M, Cabezas L, Llanos P. Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *Int J. Food Microb*, 2006; 107: 265-273.
30. Silva LF, Casella T, Gomes ES, Nogueira MC, De Dea Lindner J, Penna AL. Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *J. Food Sci*, 2015; 80(2): 411-7.
31. Steele JL, Unlu G. Impact of lactic acid bacteria on cheese flavour development. *Food Technol*, 1992; 46: 128-135.
32. Tailliez PJ, Tremblay SD, Ehrlich A, Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Syst Appl Microbiol*, 1998; 21: 530-538.
33. Tsakalidou E, Zoidou, Pot L, Wasill W, Ldwig LA, Devriee G, Alantzopoulos KH Schleifer and Kersters K. Kasseri cheese and description of *Streptococcus rnedonicus* sp. nov. E. *Int J. Sys Bact*; 1998, 48: 519-527.
34. Wouters JTM, Ayad EHE, Hugenholtz J, Smit G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int Dairy J*, 2002; 12: 91-109.

