مجله مهندسی بیوسیستم ایران (۴۰) ۱، ۱۳۸۸ (۹۱-۸۷)

مقایسه روش‌های مولکولی RAPD-PCR و DGGE-PCR در شناسایی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده در طی رسیدن پنیر لیقوان

تیوا کفیلی*[۱]، سیدهادی رضوی[۲]، زهرا امام جمعه[۳]، غلامرضا صالحی جوزانی[۴]، محمد رضا نقوی[۵]

۱، ۲، ۳، ۵، دانشجوی دکترای، استادیار و دانشیاران پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۴، استادیار موسسه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

(تاریخ دریافت:۸۷/۷/۲- تاریخ تصویب: ۸۸/۳/۴)

چکیده

در این تحقیق با استفاده از دو روش مولکولی مستقل از کشت دی کد-پی سی آر (DGGE-PCR) و وابسته به کشت رپید-پی سی آر (RAPD-PCR)، تغییرات جمعیتی لاکتوباسیلوس‌های پنیر سنتی لیقوان بررسی شد. هر دو این تکنیک‌ها، توانایی بالایی در شناسایی و ردیابی این گروه از باکتری‌های اسیدلاکتیک نشان دادند. با این حال، تفاوت هایی نیز در نحوه شناسایی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده در مراحل مختلف رسیدن دیده شد. در روش وابسته به کشت رپید لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم و لاکتوباسیلوس برویس در محصول رسیده به عنوان جمعیت غالب شناسایی شدند. اما در روش مستقل از کشت دی کد حضور دو سویه لاکتوباسیلوس کرواتوس و ساکیی نیز دیده شد که در روش وابسته به کشت قابل شناسایی نبودند. از مزیت‌های روش رپید فراهم کردن داده‌هایی کمی برای جمعیت باکتریایی مختلف بود در حالی‌که روش دی کد، تنها قادر به فراهم آوردن داده‌هایی نیمه کمی بود. با توجه به محاسن و محدودیت‌های هر دو روش می‌توان گفت که هر دو این روش‌ها به تنهایی کامل نبوده و در صورت کاربرد تلفیقی، داده‌های قابل اطمینان تری ارائه خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: جمعیت باکتریایی، روش مستقل از کشت، ورش وابسته به کشت، پنیر سنتی

مقدمه

پنیر لیقوان، محصولی سنتی تولید شده در روستای کوهستانی لیقوان، منطقه آذربایجان کشور بوده که بدون استفاده از آغازگرهای میکروبی و از شیر گوسفند یا بز و یا مخلوطی از آنها تولید می‌شود. بر خلاف محبوبیت و افزایش میزان مصرف آن در میان مصرف کنندگان ایرانی، مطالعات محدودی در زمینه شناسایی جمعیت باکتریایی آن صورت پذیرفته است. تنها تحقیقات موجود مربوط به بررسی فلور میکروبی در محصول نهایی (پنیر) است که با استفاده از روش‌های فنوتیپیکی صورت گرفته اما با توجه به محدودیت‌های موجود در این روش‌ها شناسایی در حد گونه میسر نبوده و شناسایی دقیق‌تر جدایه‌ها منوط به انجام آزمون‌های ژنتیکی تکمیلی اعلام شده است (Abdi et al., 2006; Barouei et al., 2008).

با توجه به افزایش اقبال عمومی به استفاده از محصولات با ایمنی بهداشتی بالا، اداره نظارت بر مواد غذایی ایران استفاده از شیر پاستوریزه شده را برای تولید پنیر توصیه می‌کند. اما پاستوریزاسیون علاوه بر تاثیر گذاری بر روی آنزیم‌های پروتئولیکی و لیپولیتیکی، موجب حذف میکروارگانیسم‌های کلیدی موثر در رسیدن پنیر می‌گردد (Beresford et al., 2001). همچنین استفاده از آغازگرهای تجاری نیز موجب از دست رفتن ویژگی‌های منحصر به فرد محصولات سنتی خواهد شد (Hickey et al., 2007; Gaya et al., 2005). لذا، جهت تامین تمامی اهداف ذکر شده، لزوم جداسازی جدایه‌های طبیعی و طراحی یک کشت آغازگر برای این محصول احساس می‌گردد. اولین گام جهت این مهم، دستیابی به اطلاعات مربوط به تغییرات جمعیتی باکتری‌های اسیدلاکتیک در طی رسیدن پنیر می‌باشد. با توجه به زمان‌بری و محدودیت‌های موجود در روش‌های سنتی موجود، روش‌های مولکولی امروزه بطور وسیعی در شناسایی میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی تخمیری که دارای جمعیت میکروبی پیچیده‌ای هستند، استفاده می‌شود (Cocolin et al., 2004, Hensiek et al., 1992) . محققین متعددی کارآیی بالای رپید پی سی آر را در ارزیابی بار میکروبی پنیرهای سنتی گزارش نموده‌اند (De Angelis et al., 2001; Fitzsimons et al., 1999; Mora et al., 2000 & Randazzo et al., 2006).

* نویسنده مسئول Email: Tivkafil@.ut. ac.ir

روش دی کد نیز از دیگر انواع روش‌های مولکولی است که بطور گسترده‌ای در تعیین تنوع جمعیتی محصولات لبنی به کار رفته است (Ercolini et al., 2004; Ercolini et al., 2001 & Giraffa et al., 2001).

هدف از این تحقیق، شناسایی تغییرات جمعیتی و همچنین جداسازی لاکتوباسیلوس‌های دخیل در رسیدن پنیر سنتی لیقوان با سود جستن از دو تکنیک مولکولی رپید و دی کد است. این امر می‌تواند در طراحی و دست‌یابی به یک کشت کمکی، برای به کارگیری در تولید صنعتی پنیر لیقوان با استفاده از شیر پاستوریزه موثر باشد.

مواد و روش‌ها

شرایط نمونه برداری

نمونه‌های (شیر، پنیریک ماهه و پنیر رسیده) در طی ماه‌های دی، بهمن و اسفند سال ۱۳۸۶ و از کارگاه برادران حاکیان، روستای لیقوان نمونه برداری شده و در کنار یخ، سریعا به آزمایشگاه منتقل شده و آزمون‌های مربوطه در همان روز انجام شده و یا پس از هموژنیزاسیون با استفاده از تری سیترات سدیم ۲٪ تا زمان انجام آزمون در C °۸۰- قرار داده شدند.

روش استخراج دی ان آ از پنیر و جدایه‌های لاکتو باسیلوس

جهت استخراج دی ان ا، از یک میلی‌لیتر جدایه‌های رشد داده شده در ام آر اس براث و یا یک میلی‌لیتر پنیر همگن سازی شده، از پروتکل ذکر شده توسط (Ercolini et al., 2001) استفاده شد.

شرایط پی سی آر و شناسایی باندها:

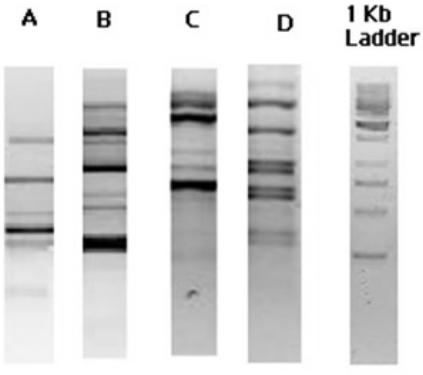
واکنش رپید پی سی آر در حجم µL ۲۵ و با استفاده از Master red mix ۲X (Amplicon II, Denmark) و پرایمر تصادفی M13 با غلظت mM ۰/۲و با استفاده از شرایط ذکر شده توسط (Andrighetto et al., 2001)، انجام گرفت. در واکنش پی سی آر چندگانه نیز از شرایط پیشنهاد شده توسط (Torriani et al.,2001) در برای شناسایی لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم و پلانتاروم استفاده، و در صورت عدم شناسایی در این پی سی آر، از واکنش پی سی آر پیشنهاد شده توسط (Song et al., 2000) استفاده شد. در واکنش مربوط به دی کد نیز، ناحیه V3 از ژن 16S rRNA باکتری‌های بافت پنیر، توسط آغازگر پیش رو F357-(GC) و آغازگر پس رونده R518 با شرایط ذکر شده توسط (Morea et al., 2000) تکثیر شدند.

جهت شناسایی باندهای رنگ‌آمیزی شده، میزان مهاجرت آنها با باندهای حاصله از گونه‌های شناخته شده (شاهد) مقایسه شدند (Fitzsimons et al., 1999). همچنین از آغازگرهای اختصاصی ذکر شده در واکنش‌های پی سی آر چندگانه استفاده شد.

نتایج

شناسایی گونه‌ها با استفاده از رپید

در مجموع ۱۳۵ کلنی از هر مرحله نمونه بردای، به طور تصادفی جداسازی و پس از انتقال به محیط مایع MRS براث و گرمخانه‌گذاری در طول شب، مورد استخراج دی ان آ و آزمون رپید با استفاده از پرایمر M13 (Ercolini et al., 2004) قرار گرفتند. پس از انجام واکنش و الکتروفورز محصولات واکنش بر روی آگارز ۱/۵٪، در مجموع ۴ الگوی ژنتیکی که با حروف A, B, C, D در شکل ۱ نشان داده شده است، دیده شد. با توجه به انجام نمونه‌برداری در طی پروسه رسیدن، تکنیک رپید امکان بررسی تغییرات رشد ۴ الگوی ژنتیکی را میسر ساخت (شکل ۲). شناسایی چهار الگوی ژنتیکی مختلف با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و در واکنش های جداگانه پی سی آر پیشنهاد شده توسط (Torriani et al., 2002; Song et al., 2000)، و با استفاده از نمونه کنترل مثبت در واکنش‌های پی سی آر چندگانه صورت گرفت.



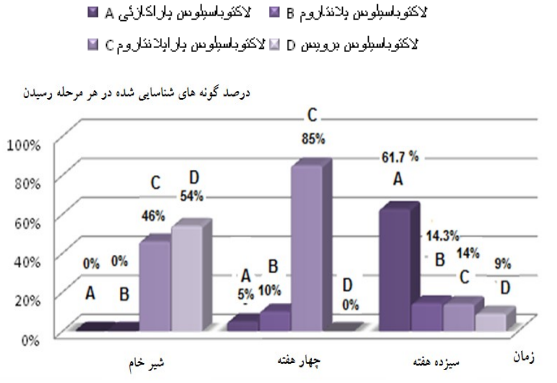
شکل ۱- چهار الگوی ژنتیکی رپید، یافت شده در میان جدایه های لاکتوباسیلوس پنیر لیقوان

A: الگوی ژنتیکی مربوط به لاکتوباسیلوس پاراکازئی *(lb. paracasei)*، B: لاکتوباسیلوس پلانتاروم *(Lb. plantarum)*، C: لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم *(Lb. para plantarum)*، D: لاکتوباسیلوس برویس(*Lb. brevis*)

بر این اساس، ژنوتایپ های A، B، C و D به ترتیب به عنوان لاکتوباسیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم و لاکتوباسیلوس برویس شناسایی شدند.

چنانچه در شکل ۲ آمده است، از میان لاکتوباسیل های

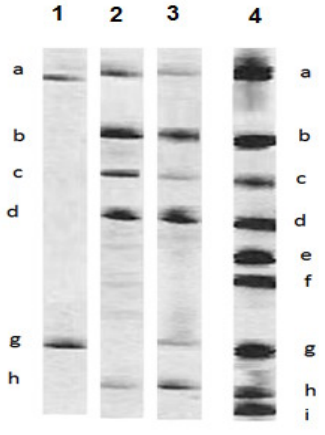
جداسازی شده از شیر خام ۵۴٪ آنها الگوی ژنتیکی C (لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم)، و ۴۶٪ از آنها الگوی ژنتیپیکی D (لاکتوباسیلوس برویس) را نشان دادند. این درصد و ترکیب جمعیتی باکتریایی در مراحل بعدی رسیدن پنیر تغییر کرده و پس از چهارهفته فرآیند، این نسبت تا حدود زیادی تغییر کرده و لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم و لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس پاراکازئی به ترتیب با ۸۶ و ۱۰ و ۵٪ شناسایی شدند. در این مرحله الگوی ژنتیکی D، مربوط به لاکتوباسیلوس برویس دیده نشد. نهایتا در پنیر رسیده باز هم این نسبت ها تغییر یافته، به طوریکه از مجموع جدایه ها در این مرحله، لاکتوباسیلوس پاراکازئی حدودا با ۶۱،۷٪ بیشترین جمعیت را به خود اختصاص داده و لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم و لاکتوباسیلوس برویس به ترتیب با نسبت های ۱۴،۳, ۱۴ و ۹ درصد در ردیف های بعدی قرار داشتند.



شکل ۲- نمودار تغییر جمعیتی لاکتوباسیل های مزوفیل در طی رسیدن پنیر لیقوان

نتایج مربوط به تکنیک دی کد در شکل ۳ نشان داده شده است. در این تکنیک جهت شناسایی از باندهای مربوط به ناحیه V3 از ژن 16S rRNA نه گونه لاکتوباسیل به عنوان شاهد استفاده شده است (ستون چهارم، شکل ۳). همچنین لازم به ذکر بوده که این تکنیک دارای قابلیت نیمه کمی است، و میزان شدت باند می‌تواند بیانگر نسبی جمعیت باکتریایی در نظر گرفته شود (Randazzo et al., 2006) مشاهده می گردد که تعداد باندهای مربوط به باکتری ها، در طی رسیدن افزایش یافته و نهایتا از سه باند در شیر، به ۶ باند در پنیر رسیده می رسد.

شدت باند a، شناسایی شده به عنوان لاکتو باسیلوس پاراپلانتاروم در پنیر یک ماهه از میزان بالاتری برخوردار است اما در محصول رسیده از شدت آن کاسته شده است. باندهای d و b که به ترتیب مربوط به لاکتوباسیلوس ساکی و کرواتوس هستند، پس از گذشت یک ماه از آغاز فرآیند به صورت باند نسبتا قوی دیده شده و تا انتهای فرآیند بدون تغییرباقی ماندند. باند c، نشانگر لاکتوباسیلوس پلانتاروم روند افزایشی نشان داده و پس از رویت در پنیر یک ماهه به صورت باند ضعیف، در پنیر رسیده حضور پر رنگ تری را نشان داد. باند h، نماینده لاکتو باسیلوس پاراکازئی در پنیریک ماهه به صورت باند ضعیفی دیده شد اما در پنیر رسیده با شدت بیشتری قابل رویت است.



شکل ۳- نمایش باند مربوط به ناحیه V1 لاکتوباسیلوس های جدا شده در مراحل مختلف رسیدن پنیر لیقوان.

خط شماره ۱: شیر، خط شماره ۲: پنیر یک ماهه، شماره ۳: پنیر رسیده، خط شماره ۴: مخلوطی از محصولات تکثیر شده پی سی آر ناحیه V1 سویه های کنترل: a: لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم، b: لاکتوباسیلوس ساکی، c: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، d: لاکتوباسیلوس کرواتوس، e: لاکتوباسیلوس روترئی، f: لاکتوباسیلوس فرمانتوم، g: لاکتوباسیلوس برویس ، h: لاکتوباسیلوس پاراکازئی، i: لاکتوباسیلوس پنتوزوس

بحث

درک بهتر اینکه کدام جمعیت میکروبی متعلق به خانواده اسیدلاکتیک باکتریها در فرآیند تولید پنیرهای سنتی دارای نقش عمده است، نیازمند مطالعه عمیقی در زمینه ردیابی و شناسایی جمعیت میکروبی دخیل در تولید و رسیدن آنها است (Meroth et al., 2003). با این حال از مدت ها پیش عطر و طعم ویژه پنیرهای تولید شده از شیر خام به فعالیت لاکتوباسیل‌های هتروفرمانتاتیو غیر آغازگر نسبت داده شده است. این باکتری‌ها تاثیر بسیار مهم و مستقیمی بر روی گسترش ترکیبات معطر کلیدی مانند اسید استیک، اسید فوماریک و گاز دارند (Chamba et al., 2000 & Hertel et al.,1991). محدودیت‌های روش‌های سنتی مبتنی بر آزمون‌های بیوشیمیایی باعث گرایش محققان به استفاده روز

از افزون از روش‌های مولکولی به عنوان روش‌هایی سریع و کارآمد شده است (Fontana et al., 2004). به کارگیری روش‌های مولکولی مانند دی کد و رپید امکان بررسی دقیق ویژگی‌های لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو دخیل در رسیدن پنیرهای سنتی مانند لیقوان را امکان پذیر ساخته است. در روش رپید، پرایمر انتخاب شده (M13) امکان تفکیک میان سویه‌های لاکتوباسیلوس را فراهم می‌آورد همچنان که محققان دیگری نیز استفاده موفقیت آمیز از این پرایمر را در این زمینه گزارش کرده اند (Andrighetto et al., 2001). روش دی کد نیز که کاملا مستقل از کشت بوده قابلیت بالایی در بررسی جمعیت میکروبی خصوصا باکتری‌هایی که توانایی رشد در محیط‌های کشت را نداشته و یا دارای توانایی ضعیفی هستند، را دارا می باشد (Florez et al., 2006 & Miambi et al., 2003). با این حال بسیاری از محققین استفاده از چندین روش و یا ترکیب آنها را برای دست‌یابی به داده‌های قابل اطمینان‌تر پیشنهاد داده‌اند (Randazzo et al., 2006; Corsetti et al., 2001).

مقایسه ننتایج حاصله از هر دو تکنیک رپید و دی کد که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته‌اند، نتایج مشابهی را آشکار ساخت. همچنین در روش دی کد مشاهده گردید حضور و تغییرات شدت باندهای مربوط به هر سویه که می‌تواند به عنوان یک شاخص نیمه کمی در نظر گرفته شود، از روند منطقی پیروی می‌کند که با نتایج حاصله از روش رپید، نیز هم‌خوانی دارد. در هر دو این روش ها لاکتوباسیلوس برویس و پاراپلانتاروم، جمعیت غالب شیرخام را تشکیل داده که این نسبت در پنیر یک ماهه تغییر کرده و لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم به عنوان جمعیت غالب آشکار می شود. همچنین در هر دو روش، سویه‌های لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم، لاکتوباسیلوس پاراکازئی و لاکتوباسیلوس برویس سویه‌های غالب در پنیر رسیده، اعلام شدند با این حال لاکتوباسیلوس کرواتوس و ساکئی، احتمالا به دلیل عوامل محیطی پیچیده دخیل در گسترش آنها در پنیر لیقوان قادر به رشد در محیط کشت انتخابی لاکتوباسیل نبودند و تنها با روش دی کد در پنیر یک ماهه و همچنین در محصول رسیده قابل شناسایی بودند. همچنین این احتمال مطرح است که این سویه‌ها در هنگام انتخاب کلنی که به صورت تصادفی صورت می‌گرفت، انتخاب نشده باشند. عدم توانایی روش‌های وابسته به کشت در شناسایی این دو سویه همچنین در نتایج مطالعات قبل که از آزمون‌های بیوشمیایی سود جسته بودند گزارش شده است (Abdi et al., 2006 & Barouei et al., 2008). همچنین باند مربوط به لاکتوباسیلوس پاراکازئی در روش دی کد نسبتا ضعیف ظاهر شده است اما در نتایج مربوط به رپید جمعیت غالب را نشان می داد.

نتایج حاصله از مطالعات دیگر نیز چنین تفاوت‌هایی را در نتایج مربوط به ترکیب میکروبی غذاهای تخمیری با استفاده از روش‌های وابسته به کشت و مستقل از کشت، نشان داده و نهایتا استفاده از چندین روش مختلف را پیشنهاد داده‌اند (Miambi et al., 2003; Gaya et al., 2005; Randazzo et al., 2006). در این مطالعه نیز با توجه به مزیت‌ها و محدودیت‌های هر دو روش بکار گرفته شده، می‌توان گفت که لزوم بکارگیری حداقل دو روش از روش‌های وابسته و مستقل از کشت برای منعکس کردن واقعی تغییرات جمعیتی محیط‌های میکروبی پیچیده ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

در خاتمه محققان بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران، دانشکده بیوتکنولوژی گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی و موسسه تحقیقاتی محصولات لبنی IPLA، کشور اسپانیا که با کمک‌های خویش موجبات انجام این تحقیق را فراهم آوردند، نهایت تشکر و سپاسگزاری را به عمل آورند.

REFERENCES

Abdi, R., M. Shikh-Zeinoddin, & Soleimanian-Zad, S. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iraninan Lighvan cheese, *Pakistan Journal of Biology Science*, 9, 99-103.

Andrighetto, C., Zampese, L. & Lombardi, A. (2001). RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plant and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, 33, 27-30.

Barouei, J., Karbassi, A., Goddusi, H. B. & Mortazavi, A. (2008). Lactic Microflora present in liqvan Ewe's milk cheese. *InternationalJournal of Food properties*, 11(2), 407-414.

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.

Cocolin, L., Innocente, N. & Comi, G. (2004). The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE-PCR to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 93-91.

Coppola, S., Blaiotta, G. & Ercolini, G. (2001). Molecular evaluation of microbial diversity in different types of Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 414-420.

Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N. & Gobbetti, M. (2001). Phenotypic and

molecular identification & clustering of lacti acid bacteria and yeasts from wheat and sourdoughs of southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 95-104.

Coeuret, V., Duberent, S., Bernerdeau, M., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 83, 269–306.

De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M. R. & Gobbetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2011-2020.

Ercolini, D., Blaiotta, G. & Coppola, S. (2001). The potential of a polyphasic DGGE-PCR approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 610-617.

Ercolini, D., Mauriello, G., Moschetti, G. & Coppola, S. (2004). DGGE-PCR fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 273-270.

Fitzsimons, N. A., Cogan, T. M., Condon, S. & Beresford, T. (1999). Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3418-3426.

Fl?rez, A. B. & Mayo, B. (2006). Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by DGGE-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 165-171.

Fontana, C., Cocconcelli, P. S. & Vignolo, G. (2004). Monitoring the bacteria population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean susages. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 131-142.

Gaya, P., S?nchez, C., Fern?ndez-Garc?a, M. & Nu?ez, M. (2005). Proteolysis during ripening of Manchego cheese made from raw or pasteurized ewes' milk seasonal variation. *Journal of Dairy Research*, 72, 287-295.

Giraffa, G. & Neviani., E. (2001). DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 19-34.

Hensiek, R., G. Krupp & Stackebrand, E. (1992). Development of diagnostic oligonucleutide probes for four Lactobacillus species occurring in the intestinal tract. *System Applied Microbiology*, 15, 123-128.

Hertel, C., Ludwig, W., Obst, M. & Schleifer, K. H. (1991). 23S rRNA targeted oligonucleutide probe for the rapid identification of meat *lactobacilli*, *System Applied Microbiology*, 14, 173-177.

Hickey, D. K., Kilcawley, K. N., Beresford, T. P. & Wilkinson, M. G. (2007). Lipolysis in cheddar cheese made from raw thermized, and pasteurized milks. *Journal of Dairy Science*, 90, 47-56.

Meroth, C. B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M. J. & Hammes, W. P. (2003). Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 475-482.

Miambi, E., Guyot, J. P. & Ampe. F. (2003). Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 111-120.

Mora, D., Fortina, M. G. & Manachini, P. L. (2000). Development of molecular RAPD marker for the identification of Pediococcus acidilactici strains. *Systematic and Applied Microbiology*, 23, 400-408.

Muyzer, G., De Waal, E. C. & Uitterlinden,. A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.

Randazzo, C. L., Vaughan, E. E. & Caggia, C. (2006). Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and DGGE-PCR analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 1-8.

Sanchez, I., Sesena, S. J., Poveda, M., Cabezas, L. & Palop, L. (2005). Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolated from Spanish goat cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 355-362.

Song, Y., Kato, N., Liu, C., Matsumiya, Y., Kato, H. & Watanabe, K. (2000). Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using groupand species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA, *FEMS Microbiology Letter*, 187, 167–173.

Torriani, S., Felis, G. E. & Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3450-3454.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.