



جداسازی و شناسایی کپک‌های مولد فساد در دوغ ایرانی بر پایه روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی

مژگان یزدی^۱، محبوبه سرابی جماب^{۲*}، ابوالفضل پهلوانلو^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

۲- دانشیار گروه زیست فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

۳- استادیار گروه زیست فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	فساد در محصولات لبنی می‌تواند توسط انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها صورت گیرد. با توجه به تولید مایکوتوکسین‌ها توسط برخی از کپک‌ها در محصولات لبنی، شناسایی نوع فساد کپکی به منظور اتخاذ روش مناسبی جهت جلوگیری از بروز چنین فسادی بسیار حائز اهمیت است؛ لذا در مطالعه حاضر، ۳۰ نمونه دوغ آلوده با علائم فساد مانند تورم، بوی بد و طعم تلخ از یک کارخانه لبنی در طی یک سال جمع آوری شد. براساس نتایج بدست آمده بر پایه روش‌های مبتنی بر کشت، تنها در دو نمونه، آلودگی به کپک مشاهده گردید. در مجموع ۴ جدایه کپکی، پس از خالص‌سازی، براساس مشاهدات میکروسکوپی، مشخصات میکروسکوپی و نیز روش مولکولی PCR شناسایی شدند. ۳ جدایه آسپرژیلوس فلاووس، و یک جدایه به عنوان پنی‌سیلیوم کرایزورژنوم تشخیص داده شدند. با توجه به قابلیت توکسین‌زایی گونه‌های شناسایی شده، پایش نقاط بحرانی خط تولید دوغ به منظور کنترل فرایند تولید و جلوگیری از آلودگی‌های ثانویه به منظور دستیابی به محصولی سالم بسیار حائز اهمیت خواهد بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۷	
کلمات کلیدی:	
دوغ، روش ماکروسکوپی، روش میکروسکوپی، کپک، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.	
DOI: 10.52547/fsct.18.117.133	
* مسئول مکاتبات: m.sarabi@rifst.ac.ir	

۱- مقدمه

در میان نوشیدنی‌های لبنی رایج در ایران، دوغ به عنوان یک فراورده تخمیری سالم که به دلیل ویژگی‌های حسی مطلوب به عنوان یک نوشیدنی فرح بخش از مقبولیت بالایی برخوردار می‌باشد بسیار مورد مصرف قرار می‌گیرد که این امر منجر به پذیرش این محصول به عنوان نوشیدنی ملی شده است [۱]. با توجه به بررسی منابع در خصوص آمار تولید دوغ در ایران در سال‌های اخیر، رقم جدیدی در این خصوص ارائه نشده است؛ با این حال، بر اساس آخرین آمار منتشره از سوی دفتر آمار و فن‌آوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی، میزان تولید دوغ در ایران روند افزایشی داشته است؛ به طوری که میزان تولید دوغ در سال ۱۳۹۴ در مجموع بیش از یک میلیون و دویست و هشتاد هزار تن در سال بوده است [۲].

شیر و محصولات لبنی، به دلیل رطوبت بالا، pH تقریباً خنثی و وجود مواد مغذی (چربی، پروتئین، ویتامین و املاح معدنی)، محیطی مناسب برای رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. معمولاً در صنایع لبنی، طی عمل پاستوریزاسیون شیر خام، قسمت عمده بار میکروبی آن از بین می‌رود، هرچند عواملی مانند دما و زمان فرایند، بهداشت تجهیزات مورد استفاده، محیط، کارگران و شرایط نگهداری پس از فرایند بر میزان بار میکروبی محصول نهایی تأثیرگذار است. یکی از عوامل مهمی که در کیفیت فراورده‌های حاصل از شیر اثر دارد، آلودگی ثانویه فراورده می‌باشد. آلودگی‌های ثانویه در بخش سرد کردن محصول، محل نگهداری و یا بسته‌بندی نهایی محصول در اثر شرایط نامناسب بهداشتی ایجاد می‌شوند [۳]. در اکثر مطالعات انجام شده روی ماست و دوغ، باکتری‌های سرمادوست، کلی‌فرم‌ها و مخمرها را عامل اصلی فساد این فراورده‌های لبنی تخمیری عنوان نموده‌اند [۴-۸]؛ این در حالی است که احتمال آلودگی کپکی نیز دور از انتظار نیست. حاتمی‌کیا و همکاران (۲۰۱۶) ۲۰۰ نمونه دوغ، شامل ۱۵۰ نمونه تجاری از ۵ برند مختلف تولید کننده دوغ در ایران و ۵۰ نمونه دست‌ساز، به‌طور تصادفی از سوپرمارکت‌ها خریداری نموده و شمارش کلی‌فرم‌ها، اشریشیا کلی^۱، استافیلوکوکوس اورئوس^۲، کپک و مخمر را بر طبق استانداردهای ملی ایران انجام دادند. حضور اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس

اورئوس در همه نمونه‌ها منفی بود. شمارش کلی‌فرم همه نمونه‌ها کمتر از حد مجاز استاندارد ایران بود؛ در صورتی که در ۵۶ نمونه (۲۸ درصد نمونه‌ها) میزان شمارش کپک و مخمر بیش از ۱۰۰ cfu/ml که حداکثر میزان مجاز براساس استاندارد ایران به شماره ۲۴۵۳ است؛ به‌دست آمد که ۹۰ درصد نمونه‌های دست‌ساخته و ۷/۳ درصد نمونه‌های تجاری را شامل می‌شد [۹ و ۱۰].

علاوه بر نقش کپک‌ها در فساد فراورده‌های لبنی، به دلیل قابلیت تولید میکوتوکسین‌هایی نظیر آفلاتوکسین‌ها و ...، جداسازی و شناسایی کپک‌های مولد فساد، جهت دستیابی به یک استراتژی مناسب و هدفمند به منظور کنترل پارامترهای کیفی و افزایش ماندگاری دوغ حائز اهمیت می‌باشد. در این راستا، روش‌های برپایه کشت و مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی روش‌های ساده، متداول و مفیدی هستند که برای ارزیابی جمعیت میکروبی محصولات لبنی استفاده می‌شوند؛ علاوه بر این، پیشرفت‌های اخیر در فن‌آوری‌های ژنومیک و بیوانفورماتیک، ابزارهای قدرتمندی را برای شناسایی میکروارگانیسم‌های هدف فراهم آورده است؛ بنابراین، با ترکیب تکنیک‌های شناسایی مورفولوژیکی با روش‌های مولکولی می‌توان دقت، اطمینان و اعتبار نتایج را ارتقاء داد [۱۱].

تاکنون هیچ تحقیق پیشرفته‌ای برای شناسایی دقیق نوع آلودگی کپک دوغ ایرانی انجام نشده است. بنابراین، این مطالعه با هدف جداسازی کپک‌های عامل فساد دوغ مرجوعی جمع‌آوری شده طی مدت یک سال، از یک کارخانه لبنی، شناسایی جدایه‌ها با روش‌های ماکروسکوپی و همچنین میکروسکوپی و در نهایت شناسایی بر پایه روش مولکولی PCR، در حد جنس و گونه، انجام گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه نمونه دوغ

به منظور بررسی آلودگی کپکی نمونه‌های دوغ تلخ، کلیه نمونه‌های آلوده و مرجوعی یک کارخانه تولید فراورده‌های لبنی (۳۰ نمونه) در مدت یک‌سال به آزمایشگاه منتقل گردید.

1. *Escherichia coli*
2. *Staphylococcus aureus*

لاکتوفنل کاتن‌بلو^۵ از میسلیم کپک‌های جدایی شده لام تهیه گردید (شکل ۱) و سپس با استفاده از میکروسکوپ، مشخصات آن‌ها مانند (شکل کونیدیوفور^۶، طول کونیدیوفور، شکل فیالید^۷، ابعاد فیالید و شکل کونیدیا^۸) مورد مطالعه قرار گرفت [۱۷]. ابعاد اشکال مختلف میکروسکوپی با استفاده از نرم‌افزار IMAGE J تعیین اندازه شد.

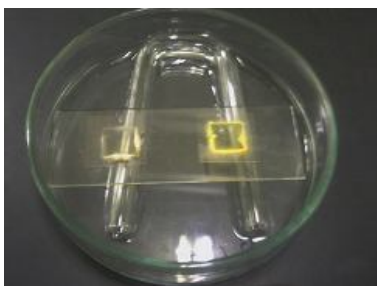


Fig 1 Slides prepared from mold mycelium by slide culture method.

۲-۶- استخراج DNA

جهت استخراج DNA از کپک‌ها، به کمک بیستوری استریل، قطعه‌ای از جدایه‌های خالص شده از محیط کشت وای جی سی جدا گردید و به ارلن حاوی محیط کشت پوتیتو دکستروز برات^۹ منتقل شد. ارلن‌ها به گرم‌خانه شیکردار منتقل شدند و به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در این مدت عمل همزدن با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه انجام شد تا از تولید اسپور توسط جدایه‌ها جلوگیری شده و تنها میسلیم آن‌ها تکثیر گردد (شکل ۲). در پایان هفتمین روز، میسلیم کپک‌ها با کمک کاغذ صافی در شرایط کاملاً استریل جدا شد و به پلیت استریل انتقال یافت. پس از نگهداری آن‌ها به مدت یک‌شنبه‌روز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، با کمک نیتروژن مایع، نمونه خشک و سپس خرد و پودر یکنواختی از آن تهیه شد [۱۸]. سپس به میسلیم قارچی پودر شده در ازت مایع، ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (یک درصد CTAB، ۱۰۰ میلی‌مول Tris-HCl با ۸= pH، ۲۰ میلی‌مول EDTA، ۱/۴ مول NaCl، ۳ درصد PVP و ۰/۲ درصد β -Mercaptoethanol) افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه همراه با اینورت کردن به آرامی هر ۱۰ دقیقه یک بار، در

۲-۲- جداسازی کپک‌ها

این آزمون براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۹۴ و نیز استاندارد بین‌المللی ایزو به شماره ۶۶۱۱ و با استفاده از محیط کشت وای جی سی آگار^۱ (حاوی عصاره مخمر، گلوکز، کلرامفنیکل و آگار) انجام شد. پلیت‌ها به صورت وارونه و به مدت ۳ الی ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۲-۱۳].

۲-۳- شناسایی جدایه‌های کپکی

روش‌های بیوشیمیایی اغلب برای شناسایی باکتری‌ها و مخمرها استفاده می‌شوند. در مقابل، این روش‌ها برای شناسایی قارچ‌های رشته‌ای (کپک‌ها) به ندرت کاربرد دارند [۱۴]. جدایه‌های کپکی، پس از اطمینان از دستیابی به نمونه کپکی خالص، با بررسی مورفولوژی کلنی و مشاهدات میکروسکوپی و نیز به کمک روش مولکولی بر پایه PCR شناسایی شدند [۱۵].

۲-۴- خالص‌سازی کپک‌ها

به منظور خالص‌سازی کلنی‌های قارچی از روش تک اسپور^۲ استفاده گردید. بدین صورت که توسط آنس سوزنی ظریف، میزان کمی از اسپور قارچی به لوله محتوی آب مقطر استریل منتقل شد و سپس توسط لام هموسیستم رقت آن محاسبه گردید. پس از تهیه رقتی مناسب، قطره‌ای از سوسپانسیون حاصل به محیط کشت واتر آگار^۳ انتقال یافت. پس از گذشت ۱۲ الی ۲۴ ساعت، از کلنی رشد یافته بر روی محیط واتر آگار به پلیت حاوی محیط کشت استریل وای جی سی در ۳ نقطه انتقال داده شد و به مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید [۱۶].

۲-۵- ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی

ویژگی‌های مورفولوژیکی کلنی‌های قارچی خالص‌سازی شده از قبیل (قطر کلنی، رنگ کلنی، رنگ پشت کلنی و وجود ماده مترشحه) مورد مطالعه قرار گرفت. برای بررسی‌های میکروسکوپی ابتدا به روش اسلاید کالچر^۴ با استفاده از محلول

5. Lactophenol Cotton Blue (LCB)
6. Conidiophore
7. Phialide
8. Conidia
9. Potato Dextrose Broth (PDB)

1. Yeast Glucose Chloramphenicol Agar (YGC Agar)
2. Single spore
3. Water Agar
4. Slide culture

تکثیر DNA از یک قطعه ۶۰۰ bp در یک مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتری حاوی ۱۰ میکرولیتر Mix Red Master (X ۲۰)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکو مول بر میکرولیتر)، ۸ میکرولیتر آب دیونیزه مولکولی و ۱ میکرولیتر DNA انجام شد. واکنش PCR در شرایط دمایی: ۳ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، در ادامه ۱۵ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و به همراه نیم درجه کاهش در هر چرخه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و سپس ۲۰ سیکل با برنامه دمایی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه در مرحله واسرشت، ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال پرایمر، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه در مرحله گسترش و در نهایت یک سیکل گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، انجام شد.

۲-۸- الکتروفورز، خالص سازی و تعیین توالی

محصولات PCR

محصولات PCR، روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی رنگ DNA gold viewer جهت رنگ آمیزی و نیز با استفاده از دستگاه ژل داگ مورد مشاهده و آنالیز قرار گرفتند. در ادامه باندهای مورد نظر از روی ژل بریده و سپس به میکروتیوپ های ۲ میلی لیتری منتقل گردیدند. استحصال مجدد DNA از ژل با استفاده از کیت استخراج از ژل Genet Bio کره جنوبی انجام شد. تعیین توالی قطعه تکثیر شده توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد. ترادف قطعات توالی یابی شده در بانک اطلاعاتی NCBI، Blast و مورد مقایسه قرار گرفت و جدایه ها در حد گونه شناسایی شدند. در نهایت، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining و مدل Maximum Composite Likelihood به وسیله نرم افزار MEGA 6 ترسیم گردید. اعتبار درخت ترسیم شده بر مبنای روش Bootstrap در هزار تکرار، تأیید شد [۲۱ و ۲۲].

۶۲ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شد. در مرحله بعد به مخلوط حاصل ۱ میکرولیتر پروتئیناز k افزوده و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سپس ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به نسبت ۱/۲۴ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه اینورت گردید. پس از مخلوط کردن، به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ xg در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی (حدود ۳۰۰ میکرولیتر) به تیوب دیگری منتقل و هم حجم آن مخلوط فنل/ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به نسبت ۱/۲۴/۲۵ افزوده شد. سپس در ۱۳۰۰۰ xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی (حدود ۲۵۰ میکرولیتر) به تیوب جدید منتقل شد و به محلول حاصل جهت ترسیب DNA، دو سوم حجم ایزوپروپانول سرد اضافه و اینورت گردید و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. سپس عمل سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ xg در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت پذیرفت. سوپرناتانت دور ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به پلت اضافه گردید و چندین بار اینورت و پس از آن سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ xg در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. اتانول (سوپرناتانت) دور ریخته شد و همچنین اجازه داده شد تا باقی مانده اتانول داخل میکروتیوب در دمای اتاق خارج شود. سپس ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر به پلت افزوده و به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس تا انجام آزمایشات به فریزر منتقل گردید [۱۹].



Fig 2 Amplified mold mycelium for DNA extraction.

۲-۷- تکثیر DNA

تکثیر DNA در ترموسایکلر گرادینی^۱ با استفاده از پرایمرهای ذیل انجام شد [۲۰]:

(F) 5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3'
(R) 5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3'

1. Gradient Thermal Cycler

۳- نتایج و بحث

ارزیابی، شامل اندازه قطر کلنی، رنگ کلنی، رنگ پشت کلنی، بافت و ماده مترشحه کلنی (جدول ۱) و مشخصات میکروسکوپی شامل شکل، طول و پهنای کونیدیوفور، شکل، طول و پهنای فیلادیا و همچنین شکل و قطر کونیدی (جدول ۲) بود [۲۳].

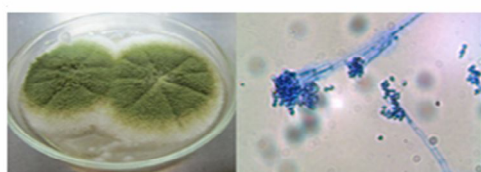
از میان ۳۰ نمونه دوغ مرجوعی کارخانه، تنها در دو نمونه، آلودگی به کپک مشاهده گردید که در مجموع ۴ جدایه کپکی به لحاظ خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مشاهده و مورد بررسی قرار گرفتند. مشخصات ماکروسکوپی جدایه مورد

Table 1 Macroscopic characteristics of mold isolates

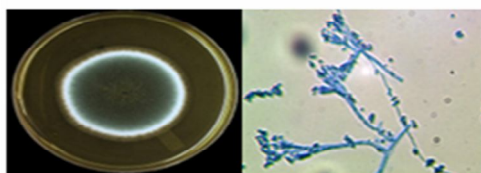
Macroscopic characteristics	Code of isolates			
	N70M	N68M	N67M	N66M
Colony diameter (mm)	3.1-4.2	3.0-3.5	5.5-6.0	3.5-4.0
Colony color	bluish green	yellow to light green with white border	yellow to light green with white border	yellow to light green with white border
The color of the back of the colony	dark yellow	colorless to light pink	colorless to light pink	colorless to light pink
Colony tissue	powdery / velvety	fluffy and cotton-like	fluffy and cotton-like	fluffy and cotton-like
Secreted substance	clear secretion	negative	negative	negative

Table 2 Microscopic characteristics of mold isolates

Microscopic characteristics	Code of isolates			
	N70M	N68M	N67M	N66M
Conidiophore shape	branch	long, transparent, thick-walled and prickly	long, transparent, thick-walled and prickly	long, transparent, thick-walled and prickly
Conidiophore length (μm)	551-630	621-7-8	421-565	550-637
Conidiophore width (μm)	8.2-10.3	11.2-26.0	14.1-25.5	7.9-10.3
Phialide shape	sweep like	flask shape	flask shape	flask shape
Phialide length (μm)	5.1-6.2	5.2-6.5	3.5-7.8	4.9-6.1
Phialide width (μm)	2.7-3.5	1.5-2.2	2.5-3.0	2.5-3.1
Conidia shape	spherical	oval / spherical, short chain	oval / spherical, short chain	oval / spherical, short chain
Conidia diameter (μm)	2.1-4.1	2.2-4.1	1.5-3.1	2.1-3.3



N66M, N67M, N68M



N70M

Fig 3 Macroscopic and microscopic images of mold isolates.

تصاویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌های کپکی در شکل ۳ نشان داده شده است.

در این مطالعه با بررسی خواص مورفولوژیکی جدایه‌های کپکی شناسایی اولیه در سطح جنس و در ادامه روش مولکولی جهت شناسایی در سطح گونه، انجام گردید.

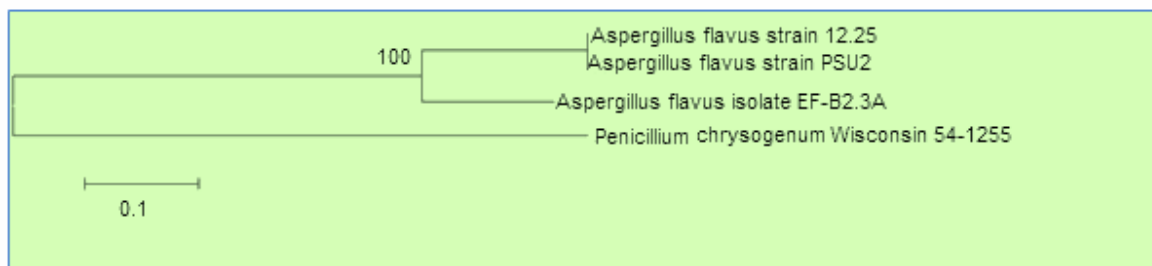
در مجموع براساس بررسی‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و نیز روش مولکولی بر پایه PCR (جدول ۳)، جدایه‌های N66M، N67M و N68M اسپرژیلوس فلاووس^۱، و نیز جدایه با کد N70M به عنوان پنی‌سیلیوم کرایزوژنوم^۲ تشخیص داده شدند.

1. *Aspergillus flavus*
2. *Penicillium crysogenum*

Table 3 Identification of mold isolates using sequencing

Genetic code	Percentage of similarity	The name of the microorganism	Code of isolates
KF018458.1	97	<i>Aspergillus flavus</i> strain 12.25	N66M
AM920436.1	99	<i>Aspergillus flavus</i> isolate EF-B2.3A	N67M
LC127086.1	95	<i>Aspergillus flavus</i> strain PSU2	N68M
AM920436.1	99	<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin54-1255	N70M

ارتباط فیلوژنتیکی بین گونه‌های کپکی در شکل ۴ نشان داده شده است.

**Fig 4** Phylogenetic tree based on 18 SrRNA sequence analysis of mold isolates from Doogh samples

مایکوتوکسین‌ها از قبیل آفلاتوکسین B1 و B2 تولید نماید [۲۵ و ۲۶].

پنی‌سیلیوم کرایزورژنوم قبلاً به عنوان پنی‌سیلیوم نوتا-توم^۳ شناخته شده بود. این گونه غالباً در محیط‌های خانگی و به‌طور خاص در محیط‌های با رطوبت و نم بالا یا آسیب‌دیده به‌وسیله آب یافت می‌شود. همچنین در مکان‌های مختلف دیگری از قبیل خاک، هوا، میوه‌ها و سبزیجات فاسد شده، مارگارین، پنیر و دیگر محصولات لبنی و سایر مواد غذایی یافت می‌شوند. کلنی‌های این گونه به رنگ سبز-آبی به همراه رنگ‌دانه‌های زرد دیده می‌شوند؛ با توجه به توانایی تولید انواع رنگ‌دانه متناسب با محیط کشت، شناسایی پنی‌سیلیوم کرایزورژنوم بر مبنای رنگ کلنی به تنهایی غیرممکن است [۲۷].

آلودگی قارچی محصولات لبنی می‌تواند در طی مراحل مختلف از مزارع تا واحدهای تولیدی لبنی و خانه‌های مصرف‌کننده رخ دهد. به‌طور طبیعی در شیر خام 10^3 - 10^6 cfu/ml سلول قارچی وجود دارد که محیط‌های شيردوشي در دامداری‌ها از منابع مهم ورود این میکروارگانیسم‌ها به شیر می‌باشند. همچنین فساد محصولات لبنی به‌وسیله کپک‌ها می‌تواند ناشی از آلودگی هوای

کپک‌های مسئول در فساد محصولات لبنی در سطح جنس و گونه بسیار متنوع می‌باشند. در واقع بیش از ۱۰۰ گونه کپکی در محصولات لبنی فاسد شده توسط کپک‌ها، شناسایی شده است. بیشترین گونه‌ها متعلق به راسته آسکومیکوتا^۱ و موکورومیکوتا^۲ هستند. در راسته آسکومیکوتا، جنس پنی‌سیلیوم با ۴۰ گونه و پس از آن جنس اسپرژیلوس با ۱۰ گونه به‌طور مکرر در فساد محصولات لبنی گزارش شده‌اند. این قارچ‌ها قابلیت بیماری‌زایی یا تولید سمومی نظیر آفلاتوکسین را برای انسان و حیوان دارا می‌باشند [۲۴].

اسپرژیلوس فلاوروس دومین گونه رایج شناسایی شده در مسمومیت‌های غذایی ناشی از کپک‌ها می‌باشد. در طبیعت این گونه معمولاً در خاک، هوا، حیوانات، گیاهان مرده و نیز محصولات کشاورزی یافت می‌شود. کلنی‌های این گونه در فاز ابتدایی رشد به رنگ زرد-سبز دیده می‌شوند اما به مرور زمان رنگ آن‌ها به سبز تیره تغییر می‌یابد. بافت کلنی‌ها پشیمی یا پنبه مانند و گاهی اوقات دانه دانه است. اسپرژیلوس فلاوروس می‌تواند منجر به بیماری اسپرژیلوزیس شود و همچنین انواع

3. *penicillium notatum*

1. Ascomycota
2. Mucoromycota

هانسولاً^{۱۱} و در مورد کپک‌ها پنی‌سیلیوم و مونیلیا^{۱۱} شناسایی شدند که این آلودگی‌ها می‌تواند ناشی از یخچال‌گذاری نامناسب محصول باشند [۳۳].

Hayaloglu و Kirbag (۲۰۰۷) پنیر محلی ترکی کوفلو^{۱۲} را مورد مطالعه قرار دادند. غالب‌ترین جدایه‌ها گونه‌هایی از جنس پنی‌سیلیوم و ژئوتریکوم کاندیدوم^{۱۳} بودند. همچنین گونه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس^{۱۴}، آسپرژیلوس فلاووس، رایزوپوس نیگریکنس^{۱۵}، آسپرژیلوس نایجر^{۱۶} و آلترناریا آلترناته^{۱۷} را از این محصول شناسایی نمودند [۲۹].

Laurenčík و همکاران (۲۰۰۸) تنوع فلور میکروبی یوکاریوت را در پنیر گوسفندی سنتی اسلواک (بریندزا^{۱۸}) به‌وسیله تکنیک‌های کلاسیک و توالی‌یابی مورد مطالعه قرار دادند. موکور^{۱۹} به عنوان فراوان‌ترین کپک و پس از آن کپک‌های ناشی از هوا شامل آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس نایجر و گونه‌هایی از جنس پنی‌سیلیوم و آلترناریا شناسایی شدند. در میان مخمرها نیز کلورومایسس لاکتیس^{۲۰}، کلورومایسس مارکسیانوس^{۲۱}، کاندیدا اینکونسیپکوا^{۲۲}، کاندیدا سیلوانه^{۲۳}، پیچیا فرمنتانس^{۲۴} و تریشوسپورون دامستیکوم^{۲۵} تشخیص داده شدند. همچنین این مطالعه نشان داد که همه گونه‌های مخمری می‌توانند منابع کربنی غیرقابل تخمیر از قبیل اتانول، گلیسرول و اسیدلاکتیک را مورد مصرف قرار دهند [۳۰].

در مطالعه دیگری، Delavenne و همکاران (۲۰۱۱) تنوع قارچی را به‌وسیله روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا دنا توره کننده^{۲۶} (D-HPLC) و تکنیک ناحیه ITS₁ در شیرهای خام

محیط تولید محصول به‌ویژه پس از فرایند پاستوریزاسیون باشد. در حالی که کپک‌ها به‌طور معمول در فساد شیر و محصولات لبنی مایع درگیر نمی‌شوند، باز هم ممکن است در برخی محصولات کشت داده شده منجر به ایجاد تغییرات قابل رؤیت در اثر رشد مسلیوم روی سطح محصول و نیز ایجاد بدطعمی از طریق فعالیت پروتئولیتیکی در آن شوند. بیشترین اثر فساد کپکی در محصولاتی مانند پنیر و کره مشاهده شده که منجر به طعم تلخ و ظاهری کپک‌زده می‌شوند [۲۸].

گونه‌های مختلف کپکی به‌ویژه گونه‌های متعلق به دو جنس پنی‌سیلیوم و آسپرژیلوس آلودگی‌های رایج محصولات لبنی تخمیری به‌ویژه پنیرهای سخت یا نیمه سخت را باعث می‌شوند [۳۲-۲۹]. هرچند حضورشان در فساد سایر محصولات لبنی تازه دیگر مانند کره، ماست، شیر و پنیرهای حاصل از شیر بوفالو، بز و میش غافلگیرکننده نیست. در ماست، کپک‌ها می‌توانند به‌خوبی در حضور اکسیژن و pH پایین و شرایط محیطی انتخابی رشد کنند. در محصولات بسته‌بندی شده رشد کپک به‌وسیله میزان اکسیژن در دسترس، تحت تأثیر قرار می‌گیرد و برخی نیز می‌توانند در غلظت پایین اکسیژن محیط رشد نمایند. همچنین برخی از این گونه‌ها با دماهای پایین و برخی با شرایط خشکی نیز سازگار شده‌اند. در واقع گونه‌های متعلق به جنس‌های آسپرژیلوس، بایسوکلامیس^۱، کلادوسپوریوم^۲، فوزاریوم^۳، یوپی‌سیلیوم^۴ و پنی‌سیلیوم از شیر پاستوریزه، پنیر خامه‌ای و نوشیدنی‌های لبنی تیمار شده حرارتی جدا شده‌اند. حضور کپک‌ها در شیر تیمار شده حرارتی یا دیگر محصولات لبنی ممکن است ناشی از آلودگی‌های پس از فرایند، در طی بطری کردن یا بسته‌بندی باشد [۲۴].

Moreira و همکاران (۲۰۰۱) آلودگی قارچی را در نمونه‌های ماست گزارش کردند. برخی از گونه‌های مخمری شامل دباریومایسس هانسینی^۵، ساکارومایسس سرویزیه^۶، مراکیا فریجیدا^۷، دباریومایسس کاستلی^۸ و جنس‌های کاندیدا^۹ و

9. Candida
10. Hansenula
11. Monilia
12. Kufllu
13. Geotrichum candidum
14. Aspergillus fumigatus
15. Rhizopus nigricans
16. Aspergillus niger
17. Alternaria alternate
18. Bryndza
19. Mucor
20. Kluyveromyces lactis
21. Kluyveromyces marxianus
22. Candida inconspicua
23. Candida silvae
24. Pichia fermentans
25. Trichosporon domesticum
26. denaturing high-performance liquid chromatography
27. Internal transcribed spacer

1. Byssochlamys
2. Cladosporium
3. Fusarium
4. Eupenicillium
5. Debaryomyces hansenii
6. Saccharomyces cerevisiae
7. Mrakia frigida
8. Debaryomyces castellii

مورفولوژیکی و مولکولی، فراوان‌ترین گونه‌های مخمیری به ترتیب *دباریومایسس هانسینی*، *گالاکتومایسس کانیدیوس*^{۱۸}، *کاندیدا پاراپسیلوسیس*^{۱۹}، *کاندیدا ساکه*^{۲۰}، *کاندیدا باتیسته*^{۲۱}، *کلورومایسس لاکتیس*، *پیچیا کودریاوزوی*^{۲۲} و *یارویا لیپولیتیکا*^{۲۳} بودند. در میان کپک‌ها پنی‌سیلیوم روکتوفورتی^{۲۴} و *آسپرژیلوس فلاووس* فراوان‌ترین گونه‌ها بودند [۳۲].

Garnier و همکاران (۲۰۱۷) نیز تنوع فساد قارچی مرتبط با محصولات لبنی مختلف فرانسوی را به‌وسیله تکنیک‌های مولکولی مورد بررسی قرار دادند. غالب‌ترین گونه‌های کپکی شناسایی شده پنی‌سیلیوم کومونه^{۲۵} و پنی‌سیلیوم بیالوویزنسه^{۲۶} و غالب‌ترین مخمرها گونه‌های *میروزیما گولیرموندی*^{۲۷} و *تریکوسپورون آسامی*^{۲۸} بودند [۲۴].

در مطالعه‌ای که توسط *Moubasher* و همکاران (۲۰۱۸) بر روی بررسی تنوع مخمرها و کپک‌های برخی از محصولات آلوده شده لبنی، بر اساس خصوصیات فنوتیپیکی و ژنوتیپیکی انجام گردید، مشخص شد که در میان مخمرها جنس‌های *کاندیدا*، *دباریومایسس*، *کلورومایسس*، *سایبرلیندنرا*^{۲۹}، *گالاکتومایسس*^{۳۰}، *تریشوسپورون*، *پیچیا*، *رودوتورولا* و در میان کپک‌ها جنس‌های پنی‌سیلیوم، *آسپرژیلوس*، *موکور* و *کلادوسپوریوم فراوان‌ترین* گونه‌های عامل آلودگی می‌باشند [۳۷].

۴- نتیجه‌گیری نهایی

زنجیره تولید یک محصول از ابتدای تهیه مواد اولیه تا دستیابی به محصول نهایی ارتباط تنگاتنگی با یکدیگر داشته و در صورتی که موارد بهداشتی به‌ویژه در نقاط بحرانی خط تولید محصول رعایت نگردد، قطعاً سبب ایجاد مشکلاتی از جمله فساد محصول نهایی خواهد شد؛ بنابراین بهترین روش برای جلوگیری از آلودگی و

گاو، بز و میش گزارش کردند. جنس‌های مخمیری شناسایی شده شامل *کاندیدا*، *کریپتوکوکوس*^۱، *دباریومایسس*، *ژئوتریکوم*، *کلورومایسس* و *پیچیا* و جنس‌های کپکی شامل *آسپرژیلوس*، *کریزوسپوریوم*^۲، *فوزاریوم*^۳ و پنی‌سیلیوم بودند [۳۴]. علاوه بر این *Ando* و همکاران (۲۰۱۲)، پنی‌سیلیوم *کرایزوژنوم* و پنی‌سیلیوم *ستیرینیوم*^۴ را از پنیر تجاری ایرانی جدایه نمودند [۳۵].

همچنین *Cheong* و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که کپک‌ها، بیشترین میکروارگانیسم‌های مولد فساد در محصولات لبنی تخمیری به‌ویژه پنیرها می‌باشند که می‌تواند منجر به زیان‌های اقتصادی و سلامتی عموم شوند که از این میان می‌توان کپک‌های پنی‌سیلیوم *سولیتیوم*^۵، *آسپرژیلوس ورسیکولور*^۶، *کلادوسپوریوم هرباروم*^۷، *موکور سیرسینلویدز*^۸ و *ژئوتریکوم کاندیدیوم* را نام برد [۳۶].

El-Fadaly و همکاران (۲۰۱۵) جدایه‌های قارچی حاصل از پنیر محلی رس^۹ در مصر را از انواع در حال رسیدن از کارخانه‌های مختلف مورد شناسایی قرار دادند. نتایج، حضور ۱۳ گونه ژئوتریکوم *کاندیدوم*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس اوکراسئوس*^{۱۰}، *آسپرژیلوس آلیاسئوس*^{۱۱}، *آسپرژیلوس اوریزه*^{۱۲}، *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس نیدولانس*^{۱۳}، *امیریسلا نیدولانس*^{۱۴}، *آسپرژیلوس گلوکوس*^{۱۵}، *آسپرژیلوس فلاویپس*^{۱۶} و نیز گونه‌های جنس‌های کپکی پنی‌سیلیوم، *موکور* و *رایزوپوس استولونيفر*^{۱۷} را آشکار کرد [۳۱].

Banjara و همکاران (۲۰۱۵) پروفایل قارچ‌های قابل رویش بر روی ۴۴ نوع پنیر را ارزیابی کردند. بر اساس آنالیزهای

1. *Cryptococcus*
2. *Chrisosporium*
3. *Fusarium*
4. *Penicillium citrinum*
5. *Penicillium solitum*
6. *Aspergillus versicolor*
7. *Cladosporium herbarum*
8. *Mucor circinelloides*
9. *Ras*
10. *Aspergillus ochraceus*
11. *Aspergillus alliaceus*
12. *Aspergillus oryzae*
13. *Aspergillus nidulans*
14. *Emericella nidulans*
15. *Aspergillus glaucus*
16. *Aspergillus flavipes*
17. *Rhizopus stolonifer*

18. *Galactomyces candidus*
19. *Candida. parapsilosis*
20. *Candida sake*
21. *Candida batistae*
22. *pichia kudriavzevii*
23. *Yarrowia lipolytica*
24. *Penicillium roqueforti*
25. *Penicillium commune*
26. *Penicillium bialowiezense*
27. *Meyerozyma guilliermondii*
28. *Trichosporon asahii*
29. *Cyberlindnera*
30. *Galactomyces*

- during Production Processes, *Journal of Food Research*, 21(1), 45-55.
- [8] Karaduman, A. Özasan, M. Kilic, I.H. Oğuzkan, S.B. 2019. Identification and Isolation of the Yeasts in Traditional Yogurts Collected From Villages in Gaziantep, Turkey. *Scientific and technical research*, 13(5), 10325-10327.
- [9] Hatamikia, M. Bahmani, M. Hassanzad Azar, H. Sepahvand, R. Parsaei, P. Aminzare, M. 2016. Microbial contamination of commercial and traditional doogh dairy products in Lorestan province of Iran. *Food Quality and Hazards Control*, 3(3), 114-116.
- [10] Institute of Standard and Industrial Researches of Iran. 2008. Simple Doogh: characteristics and test methods. Iran National Standard, No. 2453. Second revision.
- [11] Fernandes, R. 2009. *Microbiology Handbook-Dairy Products* (3rd .ed.). Leatherhead Publishing, a Division of Leatherhead Food International Ltd: Randalls Road, Leatherhead, UK, 173.
- [12] Institute of Standard and Industrial Researches of Iran. 1995. Method of searching and counting fungi (molds and yeasts) by colony counting method at 25 ° C. Iran National Standard , No. 1194. Eighth Edition.
- [13] International Organization for Standardization (ISO). 1992. Milk and milk Products- Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds-colony-count technique at 25°C. No. 6611.
- [14] Barnett, J.A. Payne, R.W. Yarrow, D. 2000. *Laboratory methods for identifying yeasts. Yeasts: characteristics and identification*. England, Cambridge University Press, 23-38.
- [15] Alexopoulos, C.J. Mims, C.W. Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley, pp:869.
- [16] Choi, Y.W. Hyde, K.D. Ho, W.H. 1999. Single spore isolation of fungi. *Fungal diversity*, 3, 29-38.
- [17] Harris, J.L. 1986. Modified method for fungal slide culture. *Clinical Microbiology*, 24(3), 460-461.
- [18] Noorbakhsh, R. Bahrami, A.R. Mortazavi, S.A. Bahreini, M. 2009. PCR-based identification of aflatoxigenic fungi associated with Iranian saffron. *Food Science and Biotechnology*, 18 (4), 1038-1041.
- فساد دوغ، شناسایی عوامل فساد و تعیین نقاط بحرانی خط تولید و اجرای سیستم کنترلی در این نقاط است. مسلماً تحقق این امر جز با شناخت دقیق عوامل ایجاد کننده آلودگی به منظور مبارزه با آنها میسر نخواهد بود؛ لذا این تحقیق، در جهت شناخت دقیق مهم‌ترین کپک‌های عامل آلودگی دوغ صورت گرفت. لازم به ذکر است دستیابی به دوغی با کیفیت میکروبی مناسب، علاوه بر حفظ سلامت مصرف‌کنندگان، نقش مؤثری در جلوگیری از زیان مالی به کارخانجات تولید این محصول، افزایش بازارپسندی و زمان ماندگاری دوغ خواهد داشت.

۵- منابع

- [1] Codex alimentarius commission. 2010. Project document for a regional standard for Doogh. Prepared by the Islamic Republic of Iran., CX/NEA 11/6/7.
- [2] Deputy of Planning and Economy, Information and Communication Technology Center. 2015. *Agricultural Statistics, Volume II*, Ministry of Jihad Agriculture.
- [3] Smit, G. Smit, B. A. Engels, W.J. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 591-610.
- [4] Vasdinyei, R. Deak, T. 2003. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 123-130.
- [5] Mayoral, M. B. Martín, R. Sanz, A. Hernández, P.E. González, I. García, T. 2005. Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. *International journal of food microbiology*, 105(1), 27-34.
- [6] Ledenbach, L.H. Marshall, R.T. 2009. *Microbiological spoilage of dairy products. Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*, Food Microbiology and Food Safety, Springer, New York, 41-67.
- [7] Mehraban Sangatash, M. Sarabi-Jamab, M. Karajian, R. Nourbakhsh, R. Gholasi, F. Vosough, A. S. Mohsenzadeh, M. 2011. Evaluation of Microbiological Contamination Sources on Swelling of Iranian Yoghurt Drink

- Kilara, N.P. Shah (eds), *International Journal of Dairy Technology*, 62(2), 288-289.
- [29] Hayaloglu, A.A. Kirbag, S. 2007. Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. *International journal of food microbiology*, 115(3), 376-380.
- [30] Laurenčík, M. Sulo, P. Sláviková, E. Piecková, E. Seman, M. Ebringer, L. 2008. The diversity of eukaryotic microbiota in the traditional Slovak sheep cheese-Bryndza. *International journal of food microbiology*, 127(1-2), 176-179.
- [31] El-Fadaly, H.M. El-Kadi, S.M. Hamad, M.N. Habib, A.A. 2015. Isolation and Identification of Egyptian Ras Cheese (Romy) Contaminating Fungi during Ripening Period. *Microbiology Research*, 5(1), 1-10.
- [32] Banjara, N. Suhr, M.J. Hallen-Adams, H.E. 2015. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Current microbiology*, 70(6), 792-800.
- [33] Moreira, S.R. Schwan, R.F. Carvalho, E.P.D. Wheals, A.E. 2001. Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(2), 117-122.
- [34] Delavenne, E. Mounier, J. Asmani, K. Jany, J L. Barbier, G. Le Blay G. 2011. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International journal of food microbiology*, 151(2), 247-251.
- [35] Ando, H. Hatanaka, K. Ohata, I. Yamashita-Kitaguchi, Y. Kurata, A. Kishimoto, N. 2012. Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. *Food Control*, 26(2), 472-478.
- [36] Cheong, E.Y.L. Sandhu, A. Jayabalan, J. Le, T.T.K. Nhiep, N.T. Ho, H.T.M. Zwielerhner, J. Bansal, N. Turner, M.S. 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, 91-97.
- [37] Moubasher, A.A. Abdel-Sater, M.A. Soliman, Z.S.M. 2018. Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt. *Journal de Mycologie Medicale*, 28(1), 76-86.
- [19] Nishiguchi, M.K. Doukakis, P. Egan, M. Kizirian, D. Phillips, A. Prendini, L. Rosenbaum, H.C. Torres, E. Wyner, Y. Desalle, R. Giribet, G. 2002. DNA isolation procedures. *Techniques in Molecular Systematics and Evolution*. Switzerland, Birkhiuser Verlag Basel, 249-287.
- Michele K. NishiguchiPhaedra DoukakisMary EganDavid KizirianAloysius PhillipsLorenzo PrendiniHoward C. RosenbaumElizabeth TorresYael WynerRob DeSalleGonzalo Giribet
- [20] Zhou, G. Whong, W.Z. Ong, T. Chen, B. 2000. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Molecular and cellular probes*, 14(6), 339-348.
- [21] Tamura, K. Stecher, G. Peterson, D. Filipiski, A. Kumar, S. 2013. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- [22] Saitou, N. Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- [23] Pitt, J.I. Hocking, A.D. Samson, R.A. King, A.D. 1992. Recommended methods for the mycological examination of foods. In: *Modern methods in food mycology*. R A. Samson, A D. Hocking, J.I. Pitt, A.D. King (eds), Amsterdam, Elsevier, 365-368.
- [24] Garnier, L. Valence, F. Mounier, J. 2017. Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms*, 5(3), 42.
- [25] Amaike, S. Keller, N.P. 2011. *Aspergillus flavus*. *Annual review of phytopathology*, 49, 107-133.
- [26] Pitt, J.I. Hocking, A.D. 2009. *Aspergillus and Related Teleomorphs*. In: *Fungi and Food Spoilage*. Boston, Springer, 305-311.
- [27] Andersen, B. Frisvad, J.C. Søndergaard, I. Rasmussen, I.S. Larsen, L.S. 2011. Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Applied Environmental Microbiology*, 77(12), 4180-4188.
- [28] McDougall, I.A. 2009. *Dairy Processing Quality Assurance (2008)*. R.C. Chandan, A.



Isolation and identification of spoilage molds in Iranian Doogh based on morphological and molecular methods

Yazdi, M. ¹, Sarabi-Jamab, M. ^{2*}, Pahlevanlo, A. ³

1. PhD student, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article History:</p> <p>Received 2021/ 05/ 01 Accepted 2021/ 06/ 07</p> <p>Keywords:</p> <p>Doogh, Macroscopic observations, Microscopic Characteristics, Mold, PCR.</p> <p>DOI: 10.52547/fsct.18.117.133</p> <p>*Corresponding Author E-Mail: m.sarabi@rifst.ac.ir</p>	<p>Spoilage of dairy products can be caused by a variety of microorganisms, including bacteria, yeasts and molds. due to production of mycotoxins by some molds in dairy products, it is important to identification of exact causes mold in order to adopt an appropriate method to prevent such contamination; Therefore, in the present study, 30 samples of contaminated Doogh with signs of spoilage such as swelling, bad smell and bitter taste were collected from a dairy factory during one year. According to the results, molds were observed in only two samples. After purification, 4 isolates were identified based on macroscopic observations, microscopic characteristics and PCR technique. Three isolates were <i>Aspergillus flavus</i>, and one isolate was identified as <i>Penicillium chrysogenum</i>. Due to the ability of the identified species to produce toxins, monitoring the critical points of the Doogh production line in order to process control and prevent secondary contamination in order to achieve a healthy product will be very important.</p>