جداسازی و شناسایی سویه‌های میکروبی بومی ماست

• **رضوان پوراحمد**، دانشجوی دکترای صنایع غذایی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی
• **مهناز مظاهری اسدی**، دانشیار سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران
• **سعید میردامادی**، استادیار سازمان پژوهش علمی و صنعتی ایران

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: تیر ماه ۱۳۸۳

چکیده

در این تحقیق، ۵ نمونه ماست سنتی از مناطق گیلان و گلپایگان اصفهان جمع‌آوری و در شرایط استاندارد به آزمایشگاه منتقل شدند. جمعیت میکروبی، pH، اسیدیته و استالدئید این ماست‌ها اندازه‌گیری شد. استالدئید با روش گاز کروماتوگرافی اندازه‌گیری گردید. پس از انجام کشت‌های میکروبی متوالی سویه‌های باکتری‌های لاکتیک جداسازی و خالص‌سازی شدند. این سویه‌های بومی براساس خصوصیات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی شناسایی و به صورت آمپول در محیط کشت حاوی شیر بدون چربی و گیسرول در ۷۰- درجهٔ سانتیگراد نگهداری گردیدند. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی سویه‌های میکروبی بومی ماست بوده تا بتوان در آینده از آنها به‌عنوان استارتر در کارخانجات صنایع شیر برای تولید محصولاتی مطلوب از نظر ذائقه مردم ایران استفاده نمود.

کلمات کلیدی: ماست، سویه‌های میکروبی بومی، جداسازی، شناسایی، گاز کروماتوگرافی، استالدئید.

Pajouhesh & Sazandegi No 65 pp: 42-48

Isolation and Identification of Iraianian native yoghurt starters

By: R. Pourahmad, PH. D Student in Food Science & Technology at Islamic Azad University (Science & Research Campus) M. Mazaheri Assadi, Assistant profesor, Biotechneloy Center Iranian Research organization for science and Technology S. Mirdamadi, Assitant Professor, Biotechnology Center, Iranian Research Organization for Science & Technology.

In this study, local yoghurts were collected from Golpayegan and the villages of province Gilan. Samples were transferred to laboratory under standard conditions. Microbial population, pH, acidity and acetaldehyde of each samples were measured. Acetaldehyde content was measured by Gas – chromatography method. After consecutive microbial culturing, the strains of lactic acid bacteria were isolated and purified. These strains were identified on the basis of morphological and biochemical characteristics.The isolated bacteria were preserved at $-70^{\circ C}$ in skim milk plus glycerol. The main objective of our study was to isolate, purify and identify of native yoghurt starters. The isolated strains can be used as starter for the production of desirable yoghurts that meet the taste of Iranian consumers.

Keyworks: Yoghurt, Iranian Native Starters, Isolation, Identification.

مقدمه

ماســت یکی از فرآورده‌های تخمیرشده شــیر است که از طریق تخمیر لاکتیک بوسیله *Lactobacillus delbrueckii Subsp.bulgaricus* زیرگونــهٔ بولگاریکــوس و *Streptococus termophilus* تولید می‌شــود. بین این دو ارگانیســم رابطهٔ همزیستی[1] وجود دارد. منشاء تولید این فرآورده شــبه‌جزیره بالکان و خاورمیانه بوده است. امروزه در بسیاری از کشــورهای جهان تولید می‌شود. این محصول از ارزش تغذیه‌ای و درمانی قابل توجهی برخوردار است (۳ ، ۱۳).

فرآورده‌های تخمیرشــدهٔ شیر ازجمله ماســت منبع بسیار غنیِ پروتئین، کلســیم، فسفر، پتاســیم و ویتامین‌های B هستند. معمولاً مقدار پروتئین ماســت به دلیل تغلیظ و یا افزودن مواد جامد به آن، از شیر بیشتر اســت. درمورد پروتئین‌های ماست باید متذکر شد که با توجه به اینکه باکتریهای مایه ماســت تا حــدی پروتئولیز اولیه را انجــام می‌دهند، قابلیت هضم پروتئین‌ها افزایــش می‌یابد. همچنین پروتئینهای ماســت، قبل از اینکه خورده شــوند، منعقد می‌شوند، در نتیجه آنزیم‌های پروتئولیتیک دســتگاه گــوارش به راحتی می‌توانند آنها را هضم نمایند (۱۲).

درمورد ویتامین‌های ماست باید گفت که طی تخمیر جهت تولید ماســت میزان بســیاری از ویتامین‌های گروه B خصوصاً اسیدفولیک افزایش می‌یابد (۸).

باکتریوســینها و ترکیبــات ضدمیکروبــی نظیر اســید بنزوئیک بوســیله ارگانیسمهای ماست تولید می‌شوند. این متابولیتها دارای اثر نگهدارنده از طریق کنترل رشــد ارگانیسم‌های بیماریزا و عامل فساد می‌باشند (۵).

باکتریهای لاکتیک ماســت مولد آنزیم لاکتــاز یا بتاگالاکتوزیداز می‌باشند، در نتیجه مصرف این فرآورده برای افرادی که دچار کمبود لاکتاز هستند، مناسب می‌باشد (۵).

ماســت در درمــان بیماریهای گوارشــی و عفونت‌هــای رودهای می‌توانــد مؤثر واقع شــود، همچنین اثرات ضدســرطانی آن توســط بســیاری از محققین بر روی مدلهای حیوانی بررســی و ثابت شــده است (۱۱).

حدود ۶۰٪ مصرف ســرانهٔ شــیر ایران را فرآورده‌های تخمیر شده ازجمله ماســت تشــکیل می‌دهد. در کارخانجات ایران، استارتر وارداتی که مخلوطی از *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* به نســبت مســاوی می‌باشــد، برای تولید ماست مورد اســتفاده قرار می‌گیرد. در کنار تولید ماســت صنعتی، در بعضی مناطــق ایران ســالیان دراز، تولید و مصرف محصولات بومی حفظ شــده اســت. این محصولات دارای عطر و طعم مطلوبتر و بافت مســتحکم‌تری می‌باشند و با ذائقه مردم ایران سازگاری بیشــتری دارند. بنابراین هدف از این تحقیق، جداســازی و شناســایی سویه‌های میکروبی بومی ماست بوده تا کارخانجات صنایع شیر بتوانند از آنهــا به عنوان اســتارتر بهره‌برداری نمایند و ایــن امر نه تنها موجب تولید محصولی با کیفیت بهتر می‌شود بلکه موجب صرف هزینهٔ کمتر و جلوگیری از خروج مقادیر قابل توجهی ارز از کشور می‌گردد.

مواد و روشها

۵ نمونه ماســت بومی (ســنتی) جمع‌آوری گردیدند که ۲ نمونه مربوط به گیلان (شهرســتان رشت، دهستانهای کیژده و مرکزی) و ۳ نمونه مربوط به گلپایگان (دهســتانهای مرکزی) بوده است. نمونه‌ها در مجاورت یخ حمل گردیدند و به آزمایشــگاه پایلوت بیوتکنولوژی ســازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران رسانده شدند.

pH نمونه‌های ماســت با اســتفاده از pH متر اندازه‌گیری شد. اسیدیته بوسیلهٔ تیتراســیون با سود ۰/۱ نرمال تعیین گردید (۱۰). برای اندازه‌گیری اســتالدئید ابتدا نمونه‌ها تقطیر شــده و بعد از استخراج اســتالدئید، به GC تزریق گردیدند (۶). لازم به ذکر اســت که ســتون مورد اســتفاده در GC از جنس سیلیکون و با نام تجاری SE۳۰ دارای طول ۲/۵ متر و بالاترین تحمل حرارتی ۲۳۰ سانتی‌گراد بوده است.

از هر نمونه ماست، رقتهای مناسب تهیه گردید و بر روی پلیتهای حاوی محیط‌هــای کشــت MRS Agar ، Plate Count Agar و M_{17}Agar کشــت ســطحی داده شــد. پلیتها به مدت ۷۲ ـ ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری گردیدند (۲). ســپس پرگنه‌های تشکیل شده از نظر تعداد، اندازه، شــکل و رنگ بررســی شــده و از هر یک لام تهیه گردیــد. لامها به روش گرم، رنگ آمیزی شــدند. به منظور تهیهٔ کشــت‌های خالص میکروبی چندبــار تجدید کشــت صورت گرفت و باید متذکر شــد کــه از محیط‌های کشــت اختصاصی MRS Agar (برای لاکتوباســیلها) و MRS Agar (برای اســترپتوکوکها) اســتفاده گردیــد (۴، ۷). آزمایش کاتالاز بــرای هر یک از ســویه‌های میکروبی جداســازی شــده انجام شــد. همچنین هر یک از این ســویه‌ها به محیط شــیر بدون چربی[2] تلقیح شــدند و توانایــی تولید لخته و اســید مورد بررســی قرار گرفت. برای شناســایی گونه‌های لاکتوباسیلوس و اســترپتوکوکوس آزمایش‌های رشد در ۱۵ درجه ســانتیگراد و ۴۵ درجه سانتیگراد، هیدرولیز آرژنین و تخمیر قندها انجام شد (۴، ۷).

کلیهٔ میکروارگانیســمهای خالص به صورت آمپول در محیط حاوی شیر بدون چربی و گلیســرول در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند (۱۲).

نتایج و بحث

آزمایشــهای میکروبی و فیزیکوشیمیایی بر روی ماستهای سنتی گیلان (شــماره‌های ۱ و ۲) و گلپایگان (شــماره‌های ۳ و ۴ و ۵) انجام شــد. نتایج حاصل از شمارش میکروبی در جدول ۱ مشخص گردیده است.

ماســتهای سنتی شماره ۱ و شــماره ۲ گیلان به ترتیب دارای جمعیت ۳×۱۰^{۸} و ۲×۱۰^{۸} در هــر میلــی لیتر بودند. در این دو ماســت فقط آلودگی مخمر وجود داشــت و تعداد مخمر در آنها به ترتیب ۳×۱۰^{۲} و ۲×۱۰^{۲} کلنی در هر میلی لیتر بوده اســت. ماستهای سنتی گلپایگان (شماره‌های ۳ ، ۴ و ۵) بــه ترتیب دارای جمعیت میکروبی ۵×۱۰^{۸}، ۵×۱۰^{۷} و ۵×۱۰^{۷} ســلول در هر میلی لیتر بودند. بررســی‌های انجام شده بیانگر آن بود که آلودگی کپک و مخمر در این نمونه‌ها وجود داشــته اســت. البته در نمونه‌های شماره ۳ و ۵ گلپایگان، آلودگی کپک مشــاهده شــد. تعداد مخمر در سه نمونه ماست گلپایگان به ترتیب ۶×۱۰^{۲}، ۵×۱۰^{۲} و ۷×۱۰^{۲} عدد در میلی لیتر بوده است.

در واقع آلودگی میکروبی کپک و مخمر در ماستهای سنتی گیلان کمتر بوده و این ماستها از کیفیت بهداشتی بالاتری برخوردار می‌باشند.

نتایج آزمایشـــهای اندازه‌گیری pH، اسیدیته و استالدئید در (جدول ۲) نشان داده شده است.

همانگونه که در جدول ۲ مشخص است مقدار ترکیبات (استالدئید) در سه نمونه ماست سنتی گلپایگان (شماره‌های ۳ ، ۴ و ۵) بیشتر از دو نمونه ماست سنتی گیلان (شماره‌های ۱ و ۲) می‌باشد. ماستهای سنتی گلپایگان ترش‌تر از ماســت‌های سنتی گیلان هستند یا به عبارتی از اسیدیته بالاتر و pH پایین‌تری نسبت به ماست‌های گیلان برخوردارند.

کروماتوگرامهای اســتالدئید اســتخراج شده از ماســت‌های سنتی در نمودارهای ۱ تا ۵ ضمیمه شــده است. باید متذکر شد که مقادیر استالدئید بدست آمده در محدودهٔ اشاره شده توسط سایر محققین می‌باشد (۱۴).

بعــد از حــذف آلودگــی مخمر یــا کپک، جداســازی لاکتوباســیلها و استرپتوکوکها انجام شد که نتایج آن به صورت زیر است:

از نمونه ماســت شــماره ۱، یک ســویه اســترپتوکوکوس و یک سویه لاکتوباســیلوس جداســازی شــد. پرگنه‌های ســویه نمونه ۱(S_1)به صورت بســیار ریز و کرم رنگ در ســطح پلیت ظاهر گردید. همچنین این ســویه در زیر میکروســکوپ به شکل کوکسی‌های گرم مثبت (جفت یا زنجیره‌ای) مشــاهده شد. ســویه لاکتوباســیلوس نمونه ماست شــماره ۱ (L_1) دارای پرگنه‌های بســیار ریز و کرم رنگ در ســطح پلیت بود و ســویه فوق در زیر میکروســکوپ به صورت میله‌ای باریک و دراز مشــاهده شــد، همچنین از نمونه ماســت‌های ۲ ، ۳ ، ۴ و ۵ نیز یک سویه استرپتوکوکوس و یک سویه لاکتوباسیلوس جداسازی گردید. وضعیت ظاهری پرگنه‌های این سویه‌های اســترپتوکوکوس($S4, S_3, S_2$ و S_5) مشابه سویه S_1 (بسیار ریز و کرم‌رنگ) بود که در تصویر ۱ مشخص شده است.

این ســویه‌هامانند S_1 به صورت کروی‌شکل، جفت یا زنجیره‌ای در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند.

وضعیت ظاهری پرگنه‌های لاکتوباسیل‌های جداسازی شده (L_4, L_3.) L_2 و L_5) مشابه سویه L_1 (بسیار ریز و کرم‌رنگ) بود که در تصویر ۳ نشان داده شده است.

این ســویه‌های لاکتوباســیلوس (L_4, L_3. L_2 و L_5)مانند ســویه L_1 به صورت میله‌ای دراز و باریک در زیر میکروســکوپ مشــاهده شدند (تصویر

جدول ۱ ــ نتایج آزمایشهای میکروبی انجام شده بر روی ماستهای سنتی

نمونه ماست	جمعیت میکروبی (CFU/ml)	آلودگی میکروبی مخمر (CFU/ml)	کپک
۱	۳×۱۰^{۸}	۳×۱۰^{۲}	-
۲	۲×۱۰^{۸}	۲×۱۰^{۲}	-
۳	۵×۱۰^{۸}	۶×۱۰^{۲}	+
۴	۷×۱۰^{۸}	۵×۱۰^{۲}	-
۵	۸×۱۰^{۸}	۷×۱۰^{۲}	+

جدول ۲ ــ نتایج آزمایشهای فیزیکوشیمایی ماستهای سنتی

نمونه ماست	pH	اسیدیته (^{o}D)	استالدئید (ppm)
۱	۴	۱۱۰	۱/۳۲
۲	۴/۰۴	۱۰۵	۱/۳۱
۳	۳/۹۴	۱۲۰	۱/۴۳
۴	۳/۹۰	۱۲۴	۱/۴۴
۵	۳/۹۷	۱۱۵	۱/۴۱

جدول ۳ ـ خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌های استرپتوکوکوس جداسازیشده از ۵ نمونه ماست سنتی

آزمایش	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5
رشد در ۱۵ درجه سانتیگراد	–	–	–	–	–
رشد در ۴۵ درجه سانتیگراد	+	+	+	+	+
هیدرولیز آرژنین	–	–	–	–	–
تخمیر قندها:					
لاکتوز	+	+	+	+	+
مالتوز	–	–	–	–	–
گزیلوز	–	–	–	–	–
ساکارز	+	+	+	+	+
تشخیص	*Streptococcus thermophilus*	*Streptococcus thermophilus*	*Streptococcus thermophilus*	*Streptococcus thermophilus*	*Streptococcus thermophilus*

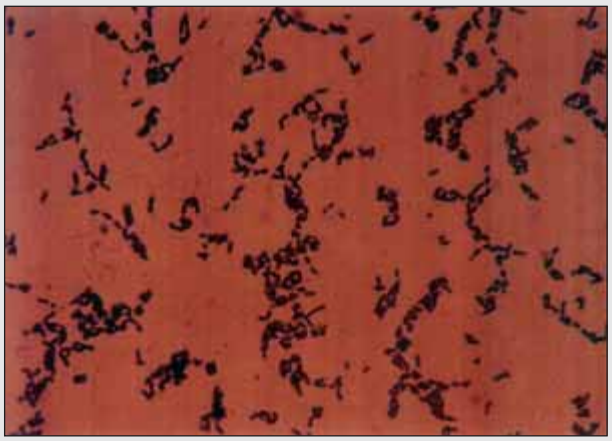
تصویر ۱ ـ شکل پرگنه‌های استرپتوکوکوس جداسازی شده

۴).

سویه‌های استرپتوکوکوس جداسازی شده کاتالاز منفی بوده و توانایی لخته نمودن شیر بدون چربی را داشتند. نتایج مربوط به آزمایشهای رشد در ۱۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد، هیدرولیز آرژنین و تخمیر قندها توسط این باکتری‌ها در جدول ۳ مشخص گردیده است.

همانگونه که در این جدول مشخص شده، سویه‌های مذکور قادر با رشد در دمای ۱۵درجه سانتیگراد نبوده، ولی همگی در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد رشد نمودند. همچنین توانایی هیدرولیز آرژنین را نداشتند و قادر به تخمیر لاکتوز و ساکارز بودند.

سویه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده کاتالاز منفی بوده و توانایی لخته نمودن شیر بدون چربی را داشتند. نتایج مربوط به آزمایش‌های رشد در ۱۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد، هیدرولیز آرژنین و تخمیر قندها توسط آنها در جدول ۴ نشان داده شده است.



تصویر ۲ ـ شکل میکروسکوپی سلولهای استرپتوکوکوس جداسازی‌شده

همانگونـه کـه در جـدول فـوق مشـخص گردیـد، سـویه‌های لاکتوباسـیلوس در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد رشد نمودند، ولی قادر به رشد در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد نمودند. این سویه‌ها توانایی هیدرولیز آرژنین را نداشـته و همچنین قادر به تخمیر سـاکارز، ملیبیوز و رافینوز نبودند و فقط توانایی تخمیر لاکتوز را داشـتند. از ۵ نمونه ماست سنتی،

تصویر ۳ ـ شکل پرگنه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی‌شده

تصویر ۴ ـ شکل میکروسکوپی سلولهای لاکتوباسیلوس جداسازی‌شده

۵ سویه استرپتوکوکوسو (S_1, S_2, S_3, S_4 و S_5)و ۵ سویه لاکتوباسیلوس (L_1, L_2, L_3, L_4 و L_5) جداسـازی و خالص‌سـازی گردیـد و براسـاس آزمایش‌های مرفولوژیکی و بیوشـیمیایی انجام شده بر روی آنها مشخص شـد که هر نمونه ماست سنتی حاوی یک سویه *Str. thermophilus* و یک سویه *L. bulgaricus* می‌باشد.

به طور مشـابه سایر محققین سویه‌های بومی ماست را از کشورهای مختلـف جهان جداسـازی نمودند. ازجملـه Xanthopoulos و Petridis

جدول ۴ ـ خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی‌شده از ۵ نمونه ماست سنتی

آزمایش	L_1	L_2	L_3	L_4	L_5
رشد در 15^{oC}	-	-	-	-	-
رشد در 45^{oC}	+	+	+	+	+
هیدرولیز آرژنین	-	-	-	-	-
تخمیر قندها:					
لاکتوز	+	+	+	+	+
ساکارز	-	-	-	-	-
ملیبیوز	-	-	-	-	-
رافینوز	-	-	-	-	-
تشخیص	*Lactobacillus bulgaricus*	*Lactobacillus bulgaricus*	*Lactobacillus bulgaricus*	*Lactobacillus bulgaricus*	*Lactobacillus bulgaricus*

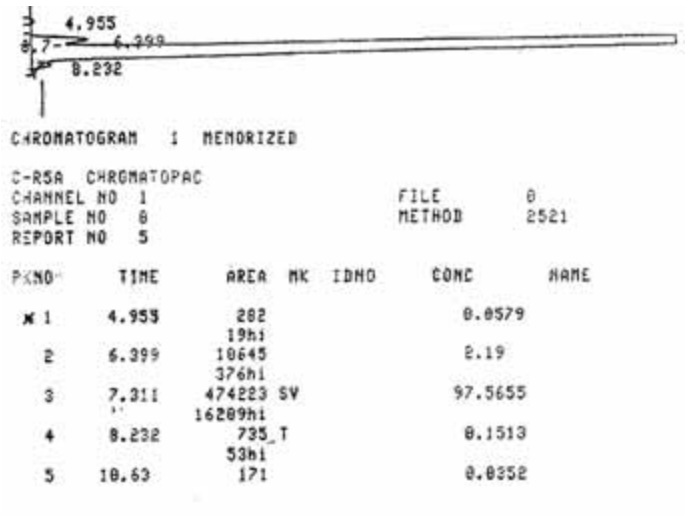
تحقیقاتی پیرامون جداسازی و شناسایی باکتریهای لاکتیک موجود در ماستهای سنتی یونان انجام دادند و تعداد زیادی از سویه‌های *L. delbrueckii subsp.bulgaricus* و *S. thermophilus* را جداسازی نموده و براساس آزمایشهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آنها را شناسایی کردند (۱۴).

همچنین Lick و Keller با استفاده از روش RCR[3] سویه‌های میکروبی را که شامل *S .thermophilus* و *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* بودند، شناسایی نمودند (۹).

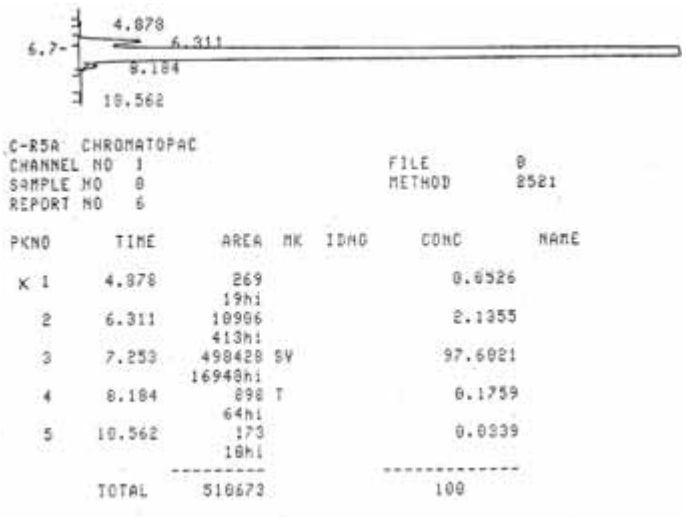
در ایران هم تحقیقات مشابهی انجام شد ازجمله آجدانی (۱۳۸۰) ماستهای سنتی مازندران (نور و آمل) را مورد بررسی قرار داد و از سه نمونه ماست بومی، ۷ سویه باکتریایی شامل ۲ سویهٔ *S. thermophilus*[1] و سویهٔ *Lactococcus lactis* ، سویه *L. lactis*[2] ، سویه *L. bulgaricus* و ۱ سویه *L. acidophilus* را جداسازی نمود (۱).

همانگونه که قبلاً اشاره شد، ۱۰ سویه میکروبی بومی جداسازی شده در این تحقیق با استفاده از روش انجماد یعنی به صورت آمپول در محیط کشت حاوی شیر بدون چربی و گلیسرول در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

در مرحلهٔ بعد می‌بایست نقش و توانایی هر یک از این سویه‌ها مورد بررسی قرار گیرد. در واقع جداسازی سویه‌های مذکور، امکان تهیهٔ کشتهای مایه را فراهم خواهد نمود. این کشتهای مایه می‌بایست از نظر تولید ماست با کیفیت حسی مطلوب مورد بررسی قرار گیرند و روش استانداردی برای تولید انبوه ماست در صنعت با استفاده از این کشتهای مایه تدوین گردد تا بدین ترتیب نیاز به وارد کردن استارتر خارجی برطرف شود.



نمودار ۱ ــ کروماتوگرام استالدئید استخراج شده از ماست سنتی شماره ۱



نمودار ۲ ــ کروماتوگرام استالدئید استخراج شده از ماست سنتی شماره ۲

پاورقی‌ها

1. Symbiotic
2. Skim Milk
3. Polymerase Chain Reaction.

منابع مورد استفاده

۱ـ آجدانی، هاتف و ملکزاده، فریدون، ۱۳۸۰؛ شناسایی سویه‌های استارترهای بومی مولد ماست، جداسازی، نگهداری و بررسی نقش هر یک از آنها. پایاننامهٔ کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم.

2- Atlas, R. M. 1983; Experimental microbiology. Macmillan Publishing Company, New York.

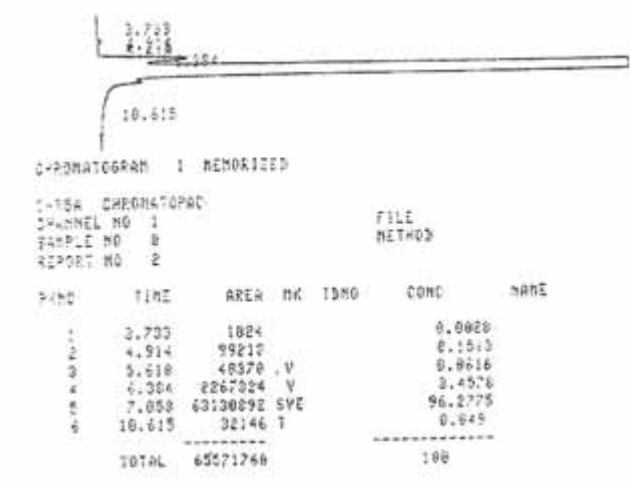
3- Early, R. 1998; The technology of dairy products. Blackie Academic & Professional, London.

4- Hardie, J. M. 1986; In Bergey's manual of systematic bacteriology (eds. Sneath, P.H.A., Mair, N.S. and Sharpe, M.E.) Vol. 2, William & Wilkins, Baltimore, PP. 1043-1070.

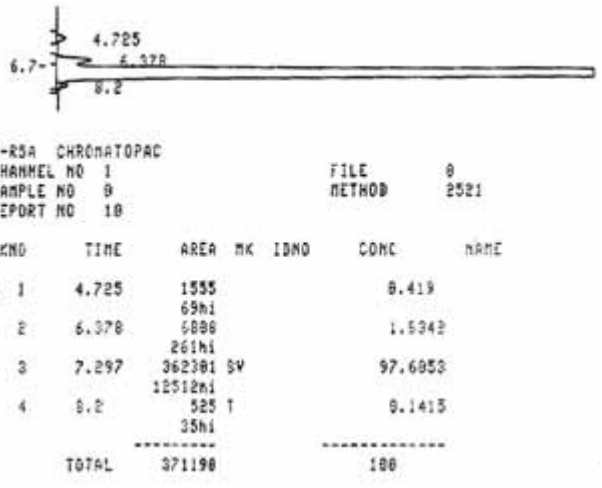
5- Hui, Y. H., 1998; Dairy science and technology handbook. VCH Publichers,New York.

6- Jeakang, A. Y., JosepH, F. and Dotris, A. 1998; Gas chromatographic detection of yoghurt flavor compounds and changes during refrigerated storage. Journal of cultured dairy products 2:6-9.

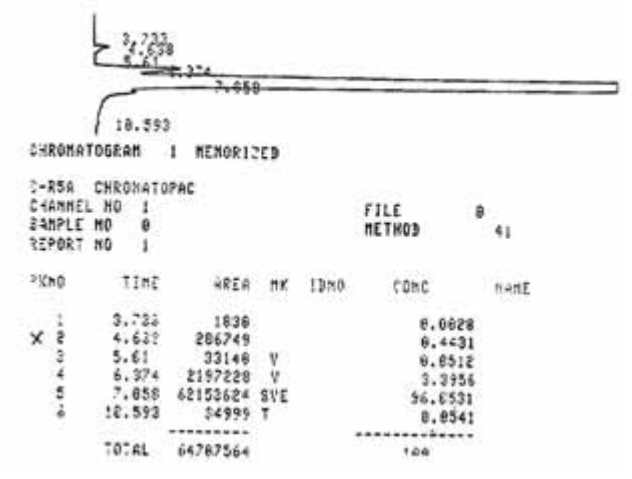
7- Kandler, O. and Weiss, N. 1986; In Bergey's manual of



نمودار ۳ ـ کروماتوگرام استالدئید استخراج شده از ماست سنتی شماره ۳



نمودار ۵ ـ کروماتوگرام استالدئید استخراج شده از ماست سنتی شماره ۵



نمودار ۴ ـ کروماتوگرام استالدئید استخراج شده از ماست سنتی شماره ۴

systematic bacteriology (eds.Sneath, P.H.A., Mair, N.S. and Sharpe, M. E.) Vol. 1, William & Wilkins, Baltimore, PP. 1209 – 1234.

8- Kneifel, W., Holub, S. and Wirthmann, M. 1989; Monitoring of B- complex vitamins in yoghurt during fermentation. Journal of Dairy Research 56:651 – 655.

9- Lick, S., Keller, M., Krusch, U. and Heller, K. J. 1996; Identification of starter cultures in thermally treated plain yoghurt using gene peobs and polymerase chain reaction. Journal of Daity Research 63:607 – 613.

10- Marshall, R. 1992; Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association, Washington, DC.

11- Marth, E. H. and Steel, J. L. 2001; Applied dairy microbiology Marcel Dekker, New York.

12- Tamime, A. Y. and Robibson, R. K. 1999; Yoghurt Science and Technology. CRC Press, Boca Ratoh.

13- Walstra, P. Geuts, T. J., Noomen, A., Jelema, A. and Van Boeke, M. A. J. S. 1999; Dairy Technology. Marcel Dekker, New York.

14- Xanthopoulos, V., Pettidis, D. and Tzanetakis, N. 2001; Characterization and classification of *Streptococcus thermopssHilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus from traditional Greek yoghurts. Journal of Food Science 66:747 – 752.