



## جداسازی و شناسایی عوامل میکروبی ایجاد کننده لکه زرد در کالباس مرغ به روش های مبتنی بر کشت و مولکولی

عاطفه سرادقی توپکانلو<sup>۱</sup>، فخری شهیدی<sup>۲\*</sup>، علی جوادمنش<sup>۳</sup>، سید علی مرتضوی<sup>۴</sup>، محمد جواد وریدی<sup>۵</sup>، سحر روشنگر<sup>۶</sup>

- ۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
- ۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
- ۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
- ۴- استاد استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
- ۵- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
- ۶- دانشجوی دکتری، علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

در حال حاضر یکی از مشکلات مربوط به ماندگاری فراورده های گوشتی، ایجاد لکه زرد ناشی از آلودگی میکروبی در کالباس است. هدف از این پژوهش جداسازی عوامل میکروبی ایجاد کننده لکه زرد از کالباس توسط روش های مبتنی بر کشت و مولکولی بوده است. بدین منظور از از نواحی لکه زرد ۱۵ نمونه کالباس مرغ نمونه برداری و جداسازی انجام شد. در مجموع ۴۴ پرگنه که روی محیط های کشت، <sup>۱</sup>M17، <sup>۲</sup>MRS، <sup>۳</sup>YGC، و <sup>۴</sup>PDB رشد کرده بودند، به کالباس های برش خورده قبل از بسته بندی تلقیح و پس از بسته بندی و پدیدار شدن لکه زرد در ۹ نمونه، جدایه های مورد نظر با روش مبتنی بر کشت و تعیین توالی دو طرفه ناحیه V3 ژن 16S rRNA و نیز ناحیه ITS4 ژن 18S rRNA شناسایی شدند. نتایج حاصل از روش مبتنی بر کشت و مولکولی، نشان داد که عامل اصلی ایجاد کننده لکه زرد در کالباس مرغ بسته بندی شده تحت خلاء، *Enterococcus faecium*، *Streptococcus faecium* و *Candida saitoana* بودند. علاوه بر آن یک گونه *Enterococcus* و یک گونه *Candida* نیز در حد جنس شناسایی شدند. همچنین بررسی نمونه های دارای لکه زرد نشان داد که میکروارگانیسم های عامل لکه زرد، باعث تغییر pH، شاخص های رنگی <sup>\*</sup>L، <sup>\*</sup>a، و <sup>\*</sup>b و سینرسیس در مقایسه با نمونه شاهد می گردند، اما میزان تغییرات تنها در میزان سینرسیس و <sup>\*</sup>a معنی دار بوده است.

تاریخ های مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۳۱

کلمات کلیدی:

جداسازی،

شناسایی،

لکه زرد،

کالباس،

تعیین توالی

DOI: 10.52547/fsct.18.05.01

\* مسئول مکاتبات:

fshahidi@um.ac.ir

1. Broth acc to Terzaghi
2. Yeast Extract Chloramphenicol Agar
3. De Man Rogasa and Sharpe.
4. Potato Dextrose Agar

## ۱- مقدمه

آلودگی ثانویه توسط باکتری ها و مخمرها بسیار مستعد نموده است. همچنین شرایط میکروآئروفیل، حضور نیتريت و نمک، مانع رشد باکتری‌های گرم منفی شده، در حالیکه شرایط مطلوبی برای رشد باکتری‌های اسید لاکتیک مهیا می‌کند [۱]. در حال حاضر یکی از مشکلات عمده فرآورده‌های گوشتی، ایجاد لکه زرد بر روی کالباس طی نگهداری است [۴، ۵، ۶، ۷، ۸]. کارخانه‌های فرآورده‌های گوشتی برای جلوگیری از ایجاد لکه زرد، دمای پاستوریزاسیون را افزایش می‌دهند. که این امر سبب چروکیدگی و افزایش سینرسیس فرآورده و در نتیجه کاهش بازار پسندی می‌گردد. لذا، برای برطرف کردن چروکیدگی و سینرسیس ناشی از افزایش دما، از مواد پرکننده<sup>۱</sup> بیشتری، استفاده می‌کنند. لذا شناسایی عوامل میکروبی ایجاد کننده لکه زرد و جلوگیری از تشکیل آن بر اساس منشأ آلودگی، نیاز به استفاده از دمای بالاتر در پاستوریزاسیون، و در نتیجه نیاز به استفاده از مواد پرکننده بیشتر را، برطرف نموده و مانع برگشت فرآورده از سطح بازار و زیان‌های اقتصادی از این طریق خواهد شد. هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی دقیق عوامل میکروبی ایجاد کننده لکه زرد در کالباس مرغ با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت و مولکولی جدایه‌ها با استفاده از تکثیر و تعیین توالی نواحی، ژن-های 16S-rRNA و 18S rRNA بوده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- تهیه نمونه

در این پژوهش ۱۵ نمونه کالباس برش خورده بسته‌بندی شده تحت خلاء، پس از ظهور لکه زرد برای جداسازی و شناسایی انتخاب گردید. با استفاده از محیط کشت M17، MRS، YGC جداسازی از نواحی لکه زرد انجام شد. سپس جدایه‌های باکتریایی با آزمایش‌های کاتالاز و اکسیداز و رنگ آمیزی گرم و رنگ آمیزی اسپور، شناسایی و برای انجام آزمایش‌های بعدی از جدایه‌های باکتریایی و مخمری استوک تهیه گردید. سپس به منظور شناسایی دقیق میکروارگانیسم‌های عامل لکه زرد، جدایه‌های باکتریایی و مخمری در کارخانه به کالباس‌های برش

فرآورده‌های گوشتی به ویژه سوسیس و کالباس یکی از پر مصرف ترین مواد غذایی در جوامع مختلف هستند [۱]. و تنها در کشور آلمان بیش از پانصد نوع فرآورده گوشتی با اسامی مختلف وجود دارد [۲]. سوسیس و کالباس عبارت است از، مخلوطی پایدار حاصل از گوشت دام و طیور کشتاری، چربی و آب که همراه با مواد دیگری در داخل پوشش‌های طبیعی و یا مصنوعی در شرایط مناسب پر شده و پس از طی فرایند حرارتی مناسب و سایر فرایندهای لازم برای مصرف خوراک انسان آماده می‌گردد [۳]. تقریباً همه کالباس‌ها و سوسیس‌های تهیه شده در کارخانه‌های فرآورده‌های گوشتی ایران از نوع حرارت دیده هستند [۳]. در فرآورده‌های گوشتی مانند کالباس‌های پخته و عمل آمده همیشه خطر آلودگی به میکروارگانیسم‌هایی مانند بی‌هوازی‌ها و هوازی‌هایی مانند استافیلوکوک‌های طلائی و حتی سالمونلا وجود دارد، زیرا همیشه حرارت کافی برای از بین بردن آن‌ها (به ویژه در کالباس‌های با پوشش قطور) وجود نخواهد داشت. در فلور میکروبی کالباس‌ها علاوه بر هوازی‌های هاگ‌زا، میکروکوک‌ها، و استریتوکوک‌ها و همچنین لاکتوباسیلوس‌ها نیز وجود دارند. در فرآورده‌های پخته به علت بالا بودن دما و مدت تیمار حرارتی، تعداد هوازی‌های هاگ‌زا غالب هستند. مخمرها به عنوان آلوده کننده سطحی کالباس‌ها در هوای محیط سرد خانه وجود دارند، و در داخل کالباس‌های خام (در طول پروسه رسیدن) رشد و تکثیر خواهند یافت گرچه بسیاری از آنها جهت تخمیر در فلور میکروبی آغازگر موجود هستند که جزو مخمرهای مفید بوده قدرت بیماری زایی ندارند. مخمرهایی که معمولاً از فرآورده‌های گوشتی عمل آمده جدا می‌شوند عبارتند از *Candida*، *Torulopsis*، *Rhodotorula* - *Bullera*، *Sporobolomyces*، *Hansenula*، *Saccharomyces*، *Debaromyces*، *Trichosporon* [۱]. در کالباس‌های بسته بندی شده تحت خلاء، فرایند حرارتی ۷۲-۸۵ درجه سانتی‌گراد اعمال می‌گردد. زمان ماندگاری این فرآورده در دمای ۸-۱۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ روز می‌باشد. محتوای نمک پایین (حدود ۲ درصد)، pH خنثی (حدود ۶) و فعالیت آب بالا (بیش از ۰/۹۴)، این فرآورده را برای

1. Filler

## ۲-۲- شناسایی مبتنی بر کشت

### ۲-۲-۱- رنگ آمیزی گرم

توسط روش کریستیان گرم و پرگنه‌های تازه (۱۸ ساعته) انجام و سپس توسط میکروسکوپ با لنز ۱۰۰ مشاهده شد [۱۲].

### ۲-۲-۲- رنگ آمیزی اسپور

برای رنگ آمیزی اسپور پس از تهیه اسمیر روی لام شیشه‌ای، رنگ سبز (مالاشیت گرین) روی لکه ریخته و پس از ۵ دقیقه حرارت ملایم (عدم خشک شدن رنگ مالاشیت گرین)، رنگ سافرانین اضافه و نگهداری پس از ۱ دقیقه شسته و در نهایت لام با میکروسکوپ لنز ۱۰۰ بررسی شد [۱۳].

### ۲-۲-۳- آزمایش اکسیداز

توسط روش کوواکس، محلول ۱ درصد از معرف کوواکس اکسیداز<sup>۲</sup> و پرگنه (۲۴ ساعته) انجام پذیرفت. اگر پس از ۱۰ تا ۶۰ ثانیه رنگ بنفش ظاهر شود، آزمایش مثبت و موید حضور سیتوکروم اکسیداز است [۱۴].

### ۲-۲-۴- آزمایش کاتالاز

پرگنه‌های منفرد کشت تازه (۲۴ ساعته)، در مجاورت محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن، قرار گرفتند. مشاهده حباب هوا بیانگر حضور آنزیم کاتالاز و مثبت بودن واکنش است [۱۵]. در نهایت تهیه پس از آزمایش‌های شناسایی مبتنی بر کشت، از جدایه‌های باکتریایی در محیط کشت استریل MRS و جدایه‌های مخمر در محیط کشت PDB استوک تهیه و تا انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری گردیدند [۱۶].

## ۲-۳- شناسایی به روش مولکولی

شناسایی جدایه‌ها با روش مبتنی بر کشت و فنوتیپی، جهت شناسایی و تعیین دقیق جدایه‌ها تا حد زیر گونه امکان پذیر نیست [۱۶] و [۱۷]. آنالیز توالی ناحیه 16S rRNA، ابزاری دقیق برای تعیین جنس و گونه تا حد زیر گونه است [۱۶] و [۱۸].

خرده تلقیح و سپس تحت خلاء بسته‌بندی و تا پدیدار شدن لکه زرد در یخچال نگهداری گردیدند. پس از حدود ۳-۴ هفته و ایجاد لکه زرد در ۹ نمونه کالباس، جدایه‌های مربوطه به روش مولکولی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس شناسایی شدند. در نهایت به منظور تاثیر میکروارگانیسم‌ها بر روی برخی از ویژگی‌های فراورده، تغییرات pH، میزان سینتریس و فاکتورهای  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  اندازه‌گیری شدند. نمونه‌های کالباس‌های مرغ مورد نظر در این تحقیق بر اساس ۹۰ درصد گوشت مرغ در شرکت فراورده‌های گوشتی کاله واقع در آمل، تهیه و تحت خلاء بسته‌بندی گردیدند و تا ظاهر شدن لکه زرد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در ادامه جهت نمونه برداری، تحت شرایط استریل از هر نمونه ۱۰ گرم برداشته و با ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر استریل مخلوط و با استفاده از استومیکر همگن سازی انجام شد. رقت‌های مورد نظر به صورت ده دهی تهیه گردیدند. برای جداسازی از سه رقت پایانی (۸، ۹، ۱۰) استفاده و روی محیط‌های کشت YGC، M17 Agar، MRS Agar و PDB کشت به عمل آمد و پتری‌دیش‌های کشت شده در دماهای ۳۷، ۳۲، ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. پرگنه‌های منفرد انتخاب و برای خالص سازی تا ۴ مرحله روی محیط‌های کشت YGC، M17 Agar، MRS Agar کشت خطی انجام و در دماهای مذکور تا ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. در مجموع ۴۲ جدایه باکتریایی و ۲ جدایه مخمری از نمونه‌ها غربالگری گردید. سپس با استفاده از محیط کشت YGC، ذخیره مخمری [۹]. تهیه و تا انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند اما از جدایه‌های باکتریایی پس از شناسایی مبتنی بر کشت، ذخیره باکتریایی [۱۰]. تهیه و تا انجام شناسایی به روش مولکولی نگهداری گردیدند [۱۱].

آگارز ۱ درصد انجام پذیرفت. برای تعیین کمیت و خلوص DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ایپوک در این روش شدت جذب نور در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانش شد.

### ۲-۳-۲- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی از آغازگرهای مستقیم<sup>۳</sup> و معکوس<sup>۴</sup> برای تکثیر ناحیه V3 ژن کدکننده 16S-rDNA به طول ۳۵۰ جفت باز و برای شناسایی مولکولی جدایه‌های مخمری نیز از یک جفت آغازگر برای تکثیر ناحیه ITS4 ژن 18S-rDNA به طول ۸۰۰ جفت باز استفاده شد (جدول ۱). واکنش PCR طبق مخلوط واکنش<sup>۵</sup>، جدول ۲ و برنامه دمایی زیر انجام پذیرفت: مرحله واسرشتی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه شروع و سپس ۳۵ چرخه دمایی بدین صورت تکرار شد: مرحله واسرشتی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه؛ مرحله اتصال آغازگرها در ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه؛ در آخرین مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام پذیرفت.

محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پس از الکتروفورز بر روی ژل ۱/۲ درصد و اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، برای حذف مواد اضافی موجود در محصولات و جلوگیری از بروز مشکل در تعیین توالی، به روش رسوب با اتانول خالص‌سازی [۲۱] شدند، سپس برای توالی‌یابی دو طرفه جهت تعیین جنس و گونه به شرکت ژن فن آوران ارسال شدند. پس از توالی‌یابی و جهت کنترل کیفیت، نتایج با استفاده از نرم افزار کروماس (Chromas) نسخه ۲.۶ (<http://technelysium.com.au>) بررسی و سپس با توالی-های موجود در بانک ژنی NCBI توسط ابزار BLAST Nucleotide، مورد ارزیابی قرار گرفت [۲۲].

در مرحله دوم پژوهش، شناسایی جدایه‌ها به روش مولکولی انجام شد.

### ۲-۳-۱- استخراج DNA

در این پژوهش، از ۹ جدایه (۷ جدایه باکتریایی و ۲ جدایه مخمر) جداسازی شده از نمونه‌های کالباس حاوی لکه زرد، استخراج DNA به روش SDS و پروتیناز K توأم با کمی تغییر روش، بدین شرح انجام گردید: ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت MRS، کشت داده و سپس شستشو با PBS و سانتریفیوژ، به منظور هضم آنزیمی پپتیدوگلیکان غشای سلول، ۴۰۰ میکرولیتر محلول SDS حاوی لیوزیم اضافه و میکروتیوب‌ها انکوبه شدند؛ سپس جهت هموزن کردن توسط هموژنایزر، بیدهای شیشه‌ای در هر میکروتیوب قرار گرفته و نمونه‌ها در دور ۴۰۰۰ و در مدت ۱ دقیقه هموژنیزه شدند و به منظور هضم بقایای غشای سلول، پروتیناز K اضافه نموده و میکروتیوب به انکوباتور ۶۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد؛ در ادامه، ۵ میکرولیتر RNase A اضافه گرمخانه‌گذاری گردید؛ سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ و محلول رویی، به میکروتیوب جدید منتقل شد؛ ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (۲۴ به ۱) اضافه نموده و به مدت ۱ دقیقه مخلوط و سانتریفیوژ انجام پذیرفت و فاز رویی به تیوب جدید منتقل گردید؛ DNA با افزودن ۰/۷ حجم یخ سرد ایزوپروپانول و انکوباسیون در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شد و سپس سانتریفیوژ انجام پذیرفت، محلول رویی خارج شد؛ سپس اتانول سرد ۷۰ درصد به آن اضافه شد و پس از چند بار وارونه کردن تیوب‌ها، مجدداً سانتریفیوژ انجام شد و محلول رویی خارج شد؛ سپس پلت را در دمای محیط قرار گرفت تا پلت حاصل خشک شود و در نهایت پلت DNA در ۵۰ میکرولیتر بافر TE<sup>۱</sup>، حل گردید [۱۷].

تعیین کیفیت DNA استخراج شده، با روش الکتروفورز با ژل

1. (10 mM Tris,pH8,1Mm EDTA)

2. PCR  
3. Forward Primer  
4. Reverse Primer  
5. Master mix

**Table 1** Specifications of primer sequences

name	Sequence	Connection temperature	Source
Forward	5'-TAC GGG AGG CGA CAG T-3'	53 °C	[15]
Reverse	5'-TAT TAC CGG GGC TGC T-3'		
ITS4-F	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	53 °C	[16]
ITS4-R	5'-CAGACTT(G/A)TA(C/T)ATGGTCCAG3'		

و با استفاده از دستمال سه لایه جاذب الرطوبه، آب خارج شده از محصول، خشک و سپس توزین گردیدند. در انتها میزان سینرسیس طبق فرمول (میزان سینرسیس برابر است با اختلاف وزن اولیه و ثانویه تقسیم بر وزن ثانویه ضرب ۱۰۰) محاسبه شد [۲۵].

### ۲-۵- روش آماری آنالیز داده‌ها

برای نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف<sup>۲</sup> استفاده شد که برای pH و شاخص‌های رنگی ۰/۰۵ p value > که توزیع داده‌ها نرمال بوده و مقایسه میانگین توسط آزمون تی تک نمونه‌ای<sup>۳</sup> و برای آزمون سینرسیس که ۰/۰۵ p value < است، آزمون معنی‌دار شده، توزیع داده‌ها نرمال نبوده و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون ویلکاکسون تک نمونه‌ای<sup>۴</sup> با سطح اطمینان ۹۵ درصد همچنین آزمون باینومیل<sup>۵</sup> نیز با سطح اطمینان ۹۵ درصد برای همه نمونه‌ها انجام پذیرفت. برای بررسی روابط بین متغیرها آزمون همبستگی پیرسون<sup>۶</sup> و نمودار پراکنندگی ترسیم گردید همه آزمون‌ها توسط نرم‌افزار SPSS<sup>۷</sup> نسخه ۲۲ انجام پذیرفت.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- شناسایی جدایه‌های عامل لکه زرد

پس از نمونه برداری و جداسازی به روش مبتنی بر کشت، در مجموع ۴۲ جدایه باکتریایی و ۲ جدایه مخمری، جداسازی شد. در این پژوهش طبق جدول ۳ همه جدایه‌های باکتریایی (۴۲)، گرم مثبت، اکسیداز منفی، کاتالاز منفی و فاقد اسپور، بودند. طبق مطالعات پیشین باکتری‌های اسید لاکتیک، کوکسی یا میله‌ای و گرم مثبت [۲۶]، اکسیداز منفی [۲۸]، کاتالاز منفی [۲۷] و فاقد اسپور هستند [۳۰].

**Table 2** PCR reaction components

Material	Volume (μl)
Master mix (2X)	12.5
ddH <sub>2</sub> O	9.5
Forward primer	0.5 (10 pmol)
Reverse primer	0.5 (10 pmol)
Template DNA	2 (50-70 ng)

### ۲-۴- بررسی خصوصیات فیزیکی شیمیایی

#### ۲-۴-۱- آزمون رنگ سنجی

جهت آزمون رنگ سنجی، نمونه‌های حاوی لکه زرد، با استفاده از دستگاه هانتر لب (Konica Minolta, Japan)، پارامترهای زردی و قرمزی و روشنی مورد ارزیابی قرار گرفت [۲۳]. L\*، پارامتر روشنایی بوده، که محدوده آن از صفر (سیاه) تا صد (سفید) است. a\*، پارامتر قرمزی (قرمز تا سبز) است. در فرآورده‌های گوشتی هنگامی که a\* افزایش یابد، بیانگر افزایش قرمزی و کاهش a\* به معنای کاهش قرمزی است. فاکتور a\* شاخص پایداری رنگ، گوشت و فرآورده‌های گوشتی است [۲۴]. b\*، بیانگر شدت اکسیداسیون است. به علت واکنش میوگلوبین و نیتريت و تشکیل نیتروزو میوگلوبین، در نتیجه میوگلوبین از فرم کاتالیزوری اکسیداسیون خارج، و در نتیجه اکسیداسیون رخ نمی‌دهد [۲۴].

#### ۲-۴-۲- تعیین pH

برای اندازه گیری pH ۱۰ گرم از هر نمونه، در ۹۰ سی سی آب مقطر همگن و با استفاده از pH متر دیجیتال، اندازه گیری شد [۱۶].

#### ۲-۴-۳- آزمون سینرسیس<sup>۱</sup>

برای آزمون سینرسیس (آب پس دادگی)، ۳۰۰ گرم از نمونه‌ها درون پوشش سه لایه، تحت خلاء بسته بندی و سپس وزن آن‌ها یادداشت شد. نمونه‌ها بعد از ظهور لکه زرد از بسته بندی خارج

2. Kolmogorov-Smirnov

3. One sample T-test

4. One sample wilcoxon test

5. Binomial test

6. Pearson

7. Statistical Package for Social Sciences

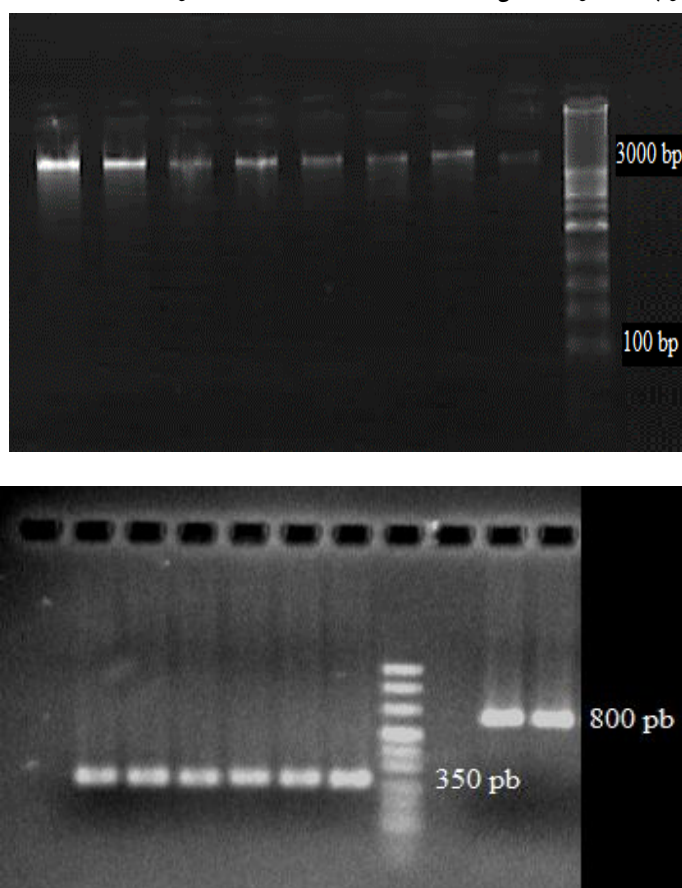
1. Syneresis

**Table 3** Test results based on culture of bacterial isolates

Sample	Morphology	Gram	Spores	Oxidase	Catalase
G	Cocci	+	-	-	-
Q	Cocci	+	-	-	-
C	Cocci	+	-	-	-
M	Cocci	+	-	-	-
B	Cocci	+	-	-	-
V	Cocci	+	-	-	-
X	Cocci	+	-	-	-

سپس برای توالی یابی دو طرفه به شرکت ژن فن آوران ارسال شدند و در نهایت با توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI مورد ارزیابی قرار گرفتند. طبق جدول ۴، نتایج حاصل از توالی-یابی، آنالیز و مقایسه توالی‌ها با توالی ژنوم مرجع نشان داد که جدایه‌های شناسایی شده شامل *Enterococcus spp.*، *Enterococcus faecium*، *Streptococcus faecium*، *Candida* و *Candida spp.*، *Enterococcus faecalis* و *Saitoana* بودند.

خلوص DNA استخراج شده به روش نانودراپ نتایج حاصل از ژل آگارز را در استخراج DNA تایید کرد (شکل ۱). نسبت، نمونه‌های استخراج شده در محدوده ۱/۸ تا ۲/۱ قرار داشتند، در نتیجه خلوص نمونه‌ها بالا بوده و فاقد DNA پروتئین است. تکثیر قطعات ۸۰۰ جفت بازی ناحیه ITS4 ژن 18S-rDNA و نیز ۳۵۰ جفت بازی ناحیه V3 ژن 16S-rDNA بطور اختصاصی انجام شد (شکل ۱). در مرحله بعد محصولات حاصل از واکنش PCR، به روش رسوب با اتانول خالص سازی شد



**Fig 1** Agarose electrophoresis of extracted DNA (top) and PCR products of ITS4 (800 pb) and V3 (350 pb) regions of ribosomal DNA (bottom).

گوشت بستگی دارد [۳۱-۳۲]. *Enterococcus* ها قادر به مقاومت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه هستند. سویه‌های *E. faecium* نسبت به سایر گونه‌های *E. faecalis* مقاوم‌تر بوده و در دماهای ۶۲ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد مقاوم‌اند [۳۲]. طیف وسیعی از مخمرها از سوسیس‌ها ایزوله شده اما [۳۲]. *Candida* و *Debaryomyces hansenii* رایج هستند [۱۱]. دیویس و همکاران (۱۹۹۸)، گزارش کردند که لایه چسبناک زرد-سبز (غیرکاروتنوئیدی)، روی سطح سوسیس ناشی از رشد *Candida saitoana* بود. در مطالعات پیشین از *Candida* از پشم گوسفند، علوفه و خاک و ادویه جداسازی شده، که می‌تواند در کشتارگاه از طریق پوست، لاشه، تجهیزات و کارکنان به گوشت و در نهایت به فراورده منتقل گردد [۸] که قادر به تحمل دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه نبودند [۳۳]. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج تحقیقات قبلی مطابقت دارد. در هیچ یک از مطالعات گذشته، اطلاعاتی در زمینه مقاومت حرارتی *Candida saitoana* در دسترس نیست. برای کنترل این فساد لازم است طی فرآیند حرارتی، دمای داخلی محصول حداقل ۳۰ دقیقه به ۷۱/۱ درجه سانتی‌گراد برسد [۱۲]. برای جلوگیری از فساد فراورده‌های گوشتی توسط *Enterococcus* ها فرآیند حرارتی کافی بر اساس مقادیر D-values انتروکوکوس مقاوم به حرارت جدا شده از مواد خام اعمال گردد و فراورده در حداقل زمان نگهداری شود [۳۱].

### ۲-۳- تعیین pH

بر اساس نتایج آزمون مقایسه میانگین‌ها اختلاف معنی داری ( $p \text{ value} > 0/05$ ) بین pH نمونه‌ها نسبت به نمونه شاهد وجود ندارد. با توجه به آزمون بایونومیال pH همه نمونه‌ها بالاتر (۵/۵)  $pH >$  از نمونه شاهد است. شواهد بیانگر افزایش pH در همه‌ی نمونه‌های تلقیح شده با جدایه‌های عامل لکه زرد می‌باشد.

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که ابتدا باکتری‌های اسید لاکتیک و باکتری‌های آلوده کننده ثانویه در فراورده کم بوده، اما در انتهای فساد باکتری‌های اسید لاکتیک غالب هستند [۲۸]. *Enterococcus* ها از طریق تحمل پاستوریزاسیون یا آلودگی در مراحل نهایی فرایند، مانند برش و بسته‌بندی، در فراورده‌های گوشتی عامل فساد هستند [۳۰]. *Enterococcus faecium* و *Enterococcus faecalis* هر دو طی فرایند حرارتی زنده مانده و عامل فساد فراورده‌های گوشتی عمل‌آوری شده هستند [۳۱]. برودا<sup>۱</sup> و همکاران، گزارش کردند که در گوشت‌های بسته بندی شده تحت خلاء، *E. casseliflavus* تحت دمای ۴/۴ درجه سانتی‌گراد سبب ایجاد رنگ زرد به صورت لکه های کوچک می‌گردد، که در مقابل نور ماوراء بنفش، فلوروسنس ایجاد می‌کند [۲۵]. طبق گزارش دسوزا و وایتلی، باکتری *Streptococcus faecium* زیرگونه *casseliflavus* در فراورده‌های گوشتی عمل‌آوری شده تحت شرایط هوایی و بی‌هوایی در دمای ۴/۴ پس از ۳ هفته ایجاد رنگدانه کاروتنوئیدی می‌کند که به راحتی در قسمت چربی سوبسترای گوشت پراکنده می‌شود. تولید رنگدانه و پراکندگی زمانی که فیلمی از رطوبت در سطح گوشت وجود داشت، افزایش یافت. این جدایه بسیار مقاوم به حرارت بوده که می‌تواند در دمای ۷۱/۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه زنده بماند، اما قادر به تحمل به مدت ۳۰ دقیقه نخواهد بود. رنگدانه این باکتری گزارتوفیل اسیدی شامل هفت پیوند دوتایی کونژوگه بوده که بسیار مشابه کاروتن غیرقطبی جدا شده از رنگدانه<sup>۲</sup> تولیدی *S. faecium* UNH564P است. مقاومت حرارتی انتروکوکوس‌ها به عوامل متعددی مانند سن کشت، pH خارجی و ترکیبات محیط نگهدارنده، اجزای تشکیل دهنده مانند نمک، نیتريت و بافت

1. Broda  
2. 4-4- Diapo7,8,11,12- tetrahydro-lycopene

شاهد، اختلاف میانگین معنی داری ( $p \text{ value} > 0/05$ )، مشاهده نشد. طبق آزمون باینومیال، میانگین شاخص  $L^*$ ، ۱ نمونه پایین تر ( $L^* \leq 73/31$ ) و ۸ نمونه بالاتر ( $L^* > 73/31$ ) از نمونه شاهد است. با توجه به نتایج آزمون مقایسه میانگین، بین شاخص  $a^*$  نمونه‌ها و نمونه کنترل، اختلاف میانگین معنی داری ( $p \text{ value} < 0/05$ ) مشاهده گردید. بر اساس آزمون باینومیال، میانگین شاخص  $a^*$ ، همه نمونه‌ها پایین تر ( $a^* \leq 3/24$ ) از نمونه شاهد است. همچنین بین شاخص  $b^*$  نمونه‌ها و نمونه شاهد اختلاف میانگین معنی داری ( $p \text{ value} > 0/05$ ) مشاهده نشد و میانگین شاخص  $b^*$  در همه نمونه‌ها بیشتر ( $L^* > 73/31$ ) از نمونه شاهد می‌باشد. بیشترین  $b^*$  نیز مربوط به جدایه *Candida spp* است. ریبو<sup>۳</sup> و همکاران، همچنین هارمز<sup>۴</sup> و همکاران، نتایج مشابهی در بررسی سوسیس‌های تخمیری و سوسیس‌های عمل‌آوری شده، گزارش کردند [۳۷، ۳۸]. طبق بررسی جو<sup>۵</sup> و همکاران، در روز هشتم نگهداری سوسیس،  $b^* = 12$ ،  $a^* = 3$  و  $L^* = 63$  بوده است [۳۹]، که با نمونه شاهد پژوهش مطابقت دارد. طی بررسی اسلاویکا<sup>۶</sup> و همکاران رنگ سه نمونه سوسیس تخمیری طی دوره رسیدن  $7/8 - 7/3 = b^* = 15 - 19$ ،  $a^* = 35 - 45$  و  $L^* = 35 - 45$  بوده است. با از دست دادن رطوبت، غلظت میوگلوبین در محصول افزایش یافته و از طرف دیگر کم آبی بافت عضله باعث جذب بیشتر نور می‌شود که منجر به رنگ تیره‌تر فرآورده، یعنی مقدار  $L^*$  کمتر می‌گردد و پودر پاپریکا مقدار سبب تغییرات  $a^*$  و مقدار  $b^*$  می‌شود که می‌تواند مربوط به حضور کاروتنوئیدهای زرد رنگ حاصل از پودر پاپریکا باشد [۴۰].

آرکودلوس<sup>۱</sup> و همکاران، طی بررسی سوسیس‌های بسته‌بندی شده تحت خلاء، افزایش pH در مدت زمان ۱۵ روز نگهداری را گزارش نمودند [۳۴]. هو و همکاران، همچنین پالودان-مولر<sup>۲</sup> و همکاران، کاهش pH در طول مدت نگهداری را رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک گزارش کردند [۱۶-۳۶]. نتایج آزمایش در جدول ۴، نشان داده شده است.

### ۳-۳- بررسی سینرزیس

میانگین سینرزیس نمونه‌ها در جدول ۴، گزارش شده است. با توجه به نتایج آزمون مقایسه میانگین‌ها، بین سینرزیس نمونه‌ها، اختلاف معنی داری با نمونه شاهد ( $p \text{ value} < 0/05$ ) مشاهده شد. میانگین سینرزیس برای نمونه شاهد  $7/76$ ، اما میانگین نمونه‌های تلقیح شده  $11/290$  بود. طبق نتایج آزمون باینومیال، میانگین سینرزیس در همه نمونه‌ها بالاتر از میانگین نمونه شاهد است. در نتیجه همه میکروارگانیسم‌های عامل لکه زرد باعث افزایش سینرزیس شدند که بیشترین سینرزیس مربوط به نمونه مخمر (*Candida saitoana*) بود.

### ۳-۴- رنگ سنجی

میانگین شاخص‌های رنگی  $a^*$ ،  $L^*$  و  $b^*$  در جدول ۴ گزارش شده است. نمونه‌های *G* (*Enterococcus faecium*) و *K* (*Streptococcus faecium*) پس از باز شدن بسته بندی برای انجام آزمایش‌ها پس از چند ساعت در مجاورت هوا سبز رنگ شدند، که می‌تواند به دلیل اکسید شدن رنگدانه‌ها با توجه به ساختار کاروتنوئیدی آن‌ها باشد [۳۱]، همچنین نمونه مربوط به جدایه مخمر (*Candida spp*) تنها نمونه‌ای بود که، اسلایس‌های زیرین نیز حاوی لکه زرد بودند. با توجه به نتایج آزمون مقایسه میانگین‌ها، بین شاخص  $L^*$  نمونه‌ها و نمونه

3. Rubio  
4. Harms  
5. Jo  
6. Slavica

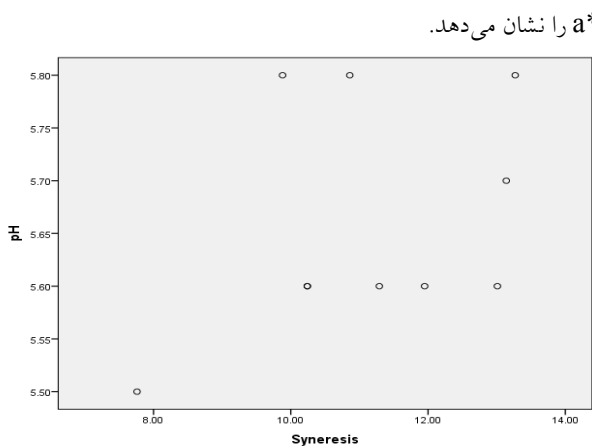
1. Arkoudelos  
4. Paludan-Muller



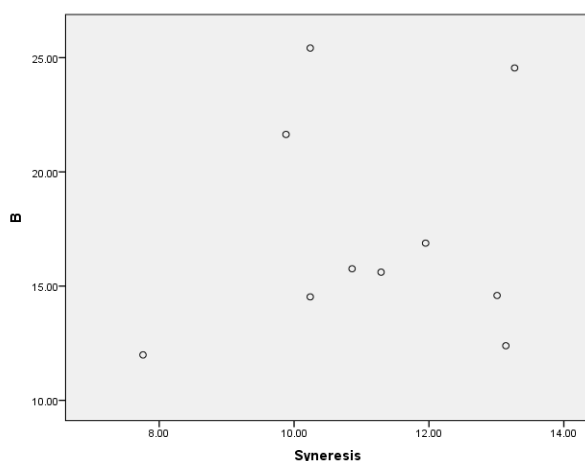
**Table 4** Sequence homology, pH, Syneresis and Color characteristics a\*, b\*, L\* measurement results

Sample	Isolated	Sequence homology %	Accession numbers	Syneresis	pH	L*	a*	b*
Control	-			7.76	5.5	73.31	3.24	11.99
K	<i>Streptococcus faecium</i>	92	MF896259	10.24	5.6	74.54	1.67	14.53
G	<i>Enterococcus faecium</i>	93	MT773438	10.86	5.8	73.75	0.63	15.76
B	<i>Enterococcus faecium</i>	98	MN493726	13.01	5.6	74.81	1.72	14.59
Q	<i>Enterococcus</i> sp.	90	KF387497	13.14	5.7	74.11	2.1	12.39
M	<i>Enterococcus</i> sp.	90	KX898902	11.29	5.6	76.75	1.6	15.61
C	<i>Enterococcus faecalis</i>	94	MT742939	11.95	5.6	66.49	2.26	16.88
V	<i>Enterococcus faecalis</i>	93	MT742944	9.88	5.8	70.8	1.04	21.64
X	<i>Candida saitoana</i>	96	AB013523	13.27	5.8	74.29	2.92	24.55
I	<i>Candida</i> sp.	92	KY996548	10.24	5.6	77.13	0.75	25.42

The control sample does not have a yellow spot. Sample K is related to *Streptococcus faecium* strain, G and B strains are *Enterococcus faecium* strain, Q and M strains are *Enterococcus* spp strain, C and V strains are *Enterococcus faecalis* strain, X strain is *Candida saitoana* and I strain is *Candida* spp.



**Fig 2** Scatter plot: pH with Syneresis



**Fig 3** Scatter plot: b\* with Syneresis

از جدول فوق می توان نتیجه گرفت که همه جدایه ها سبب افزایش pH، سینرزیس، L\*، b\* و کاهش a\* شده اند. در همه نمونه ها b\* افزایش یافته که با توجه به این مطلب که b\* در گوشت بیانگر میزان اکسیداسیون است می توان چنین برداشت نمود که همه میکروارگانیسم ها سبب افزایش اکسیداسیون می گردد.

در نمودار پراکندگی سینرزیس و pH هیچگونه رابطه خطی بین دو متغیر مشاهده نمی شود. در آزمون همبستگی پیرسون نیز بین دو متغیر سینرزیس و pH همبستگی معنی داری مشاهده نشد (p value > 0/05). شکل ۲، عدم وجود رابطه بین دو متغیر را نشان می دهد که بدین معنی است که دو متغیر سینرزیس و pH با هم رابطه و همبستگی ندارند. آزمون همبستگی پیرسون نشان داد که بین میزان سینرزیس و b\* همبستگی وجود دارد (p > 0/05). شکل ۳، نمودار پراکندگی سینرزیس و b\* را نشان می دهد. در آزمون همبستگی پیرسون بین میزان pH و b\* همبستگی معنی داری وجود ندارد (p value > 0/05). شکل ۴، نمودار پراکندگی pH و b\* را نشان می دهد. همبستگی پیرسون بین میزان a\* و b\* همبستگی وجود دارد (p value > 0/05). شکل ۵، نمودار پراکندگی a\* و b\* را نشان می دهد. همچنین طبق آزمون همبستگی پیرسون بین میزان L\* و b\* همبستگی معنی داری وجود ندارد (p value > 0/05). شکل ۶، نمودار پراکندگی L\* و b\* را نشان می دهد. در آزمون همبستگی پیرسون بین میزان L\* و a\* همبستگی معنی داری نبوده است (p value > 0/05). شکل ۷، نمودار پراکندگی L\* و

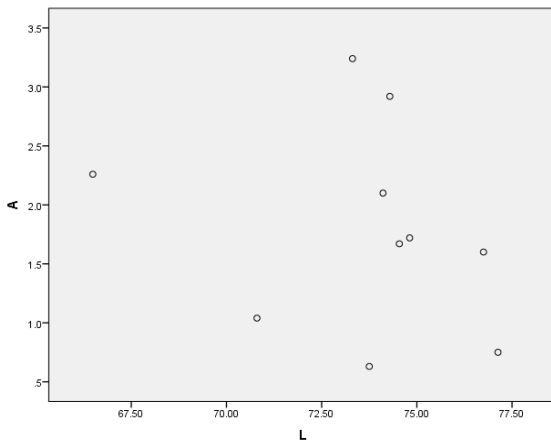


Fig 7 Scatter plot: a\* with L\*

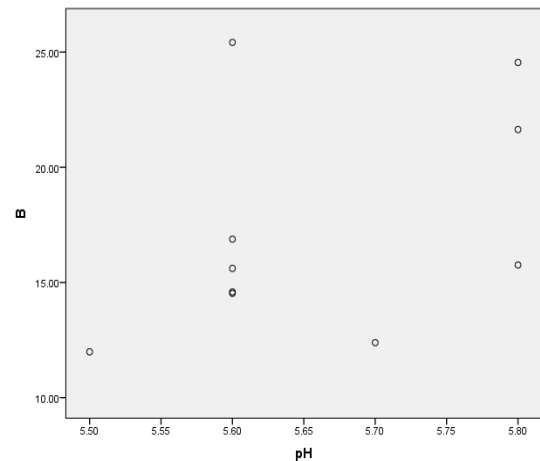


Fig 4 Scatter plot: b\* with pH

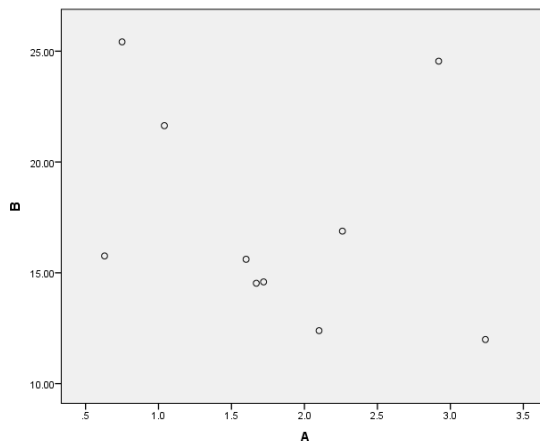


Fig 5 Scatter plot: b\* with a\*

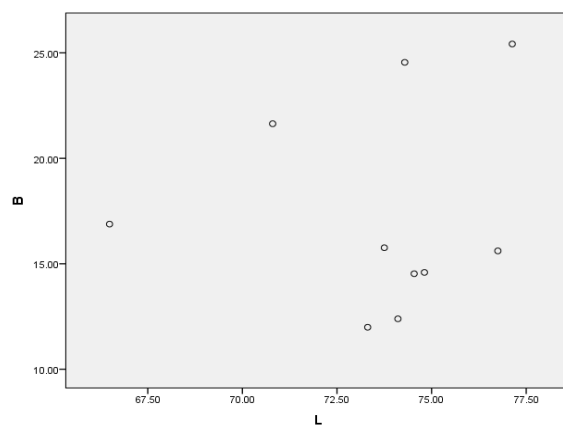


Fig 6 Scatter plot: b\* with L\*

#### ۴- نتیجه گیری

در حال حاضر کارخانه‌های فرآورده‌های گوشتی برای از بین بردن عوامل میکروبی ایجاد کننده لکه زرد و عدم برگشت فرآورده، دمای پاستوریزاسیون را افزایش می‌دهند، که این امر منجر به کاهش کیفیت فرآورده و لزوم افزودن فیلر اضافی می‌گردد. در نتیجه شناسایی عوامل میکروبی ایجاد کننده لکه زرد و جلوگیری از رشد آن با توجه به منبع آلودگی، بهترین راه‌کار برای افزایش زمان ماندگاری کالباس بدون نیاز به افزایش دمای پاستوریزاسیون و در پی آن افزودن فیلر اضافی به فرآورده است. با توجه به قیمت بالای گوشت و مرغ در صورتی که بتوان از بروز ضایعه لکه زرد در کالباس جلوگیری نمود، گام بزرگی در جهت جلوگیری از زیان‌های اقتصادی ناشی از برگشت فرآورده خواهد بود. برای بهبود فرایندهای مرتبط با نگهداری و تولید فرآورده‌های غذایی، بررسی دقیق فلور میکروبی آن‌ها و یا میکروارگانیسم‌های آلوده کننده این فرآورده‌ها ضروری است. شناسایی میکروارگانیسم‌ها با روش‌های مبتنی بر کشت و فنوتیپی، جهت شناسایی و تعیین دقیق جدایه‌ها تا حد زیر گونه امکان پذیر نیست. آنالیز توالی ناحیه 16S rRNA، ابزاری دقیق برای تعیین جنس و گونه تا حد زیر گونه است. لذا در این پژوهش از روش مولکولی برای شناسایی عوامل ایجاد کننده لکه زرد در کالباس برش خورده مرغ استفاده شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی و آنالیز نمونه‌ها، بیانگر این است که ۲ جدایه از جنس *Streptococcus*، ۵ جدایه از جنس *Enterobacteriaceae* و ۲ جدایه مخمر از جنس *Candida*، عامل لکه زرد می‌باشند.

- [6] Marilyn.J., Dowdel and Board R.G.1971. The Microbial Associations in British Fresh Sausages. *Journal. Applied. Bacteriology.* 34 (2), 317-337.
- [7] Varnam, A.H and Sutherland, J.P. 1995. Chapan & Hall Glasgow Weinheim New York. Tokyo Melbourne Madras. Hand Book Meat and Meat Products Technology, Chemistry and Microbiology. 3, 161-289.
- [8] Whiteley, A and Dsouza, M. D. 1989. A Yellow Discoloration of Cooked Cured Meat Products - Isolation and Characterization of the Causative Organism. *Journal of Food Protection.* 52, 392-395.
- [9] www.science.org, Science Gateway Protocols Cell Biology Protocols- Table of Contents Pubplus- a PubMed Search engine.
- [10] Hu, P., Zhou, G., Xu, X., Li, C. and Han, Y., 2009. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. *Food Control*, 20(2), 99-104.
- [11] Shad, A., Eskandari, M, H and Golmakani, M, H. 2015. Use of Coatings Containing Silver Nanoparticles to Improve The Shelf Life of Cut Emulsion Sausages In Vacuum Packaging, Shiraz University, Faculty of Agriculture, Department of Food Science and Technology, Master Thesis. 20-28.
- [12] Badis, A., Guetarni, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D. E., and Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21(5), 579-588.
- [13] Giraffa, G. & Neviani, E. 2000. Molecular identification and characterization of food associated lactobacilli. *Italian Journal of Food Science*, 4: 403-423.
- [14] Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178(4535), 703.
- [15] Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J.R.L.K., Glover, R.L.K. and Tano-Debrah, K. 2010. Microbiological characteristics of Ghanaian traditional fermented milk product, Nunu. *Nature and Science*, 8(9), 178-187.
- [16] Hu, P., Zhou, G., Xu, X., Li, C. and Han, Y. 2009. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. *Food*

همه جدایه‌های عامل لکه زرد شناسایی شده اعم از مخمرهای *Candida saitoana*, *Candida spp* همچنین باکتری‌های *Enterococcus faecium*، *Enterococcus faecali* و *Streptococcus faecium*، سبب تغییرات pH، میزان سینرسیس و شاخص‌های رنگی  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  شدند. در همه نمونه‌ها pH کاهش، سینرسیس افزایش، اما شاخص‌های رنگی  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  در برخی نمونه‌ها تغییرات افزایشی و در برخی نمونه‌ها تغییرات کاهش‌ی نشان دادند.

## ۵- سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح پژوهشی شماره ۳/۴۶۳۵۵ انجام پذیرفت. لذا بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت مالی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. همچنین از مدیر عامل محترم شرکت کاله و جناب آقای دکتر خزایی جهت همکاری در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

## ۶- منابع

- [1] Molanejad, M., Hedayati Fard, M., Ahmadi, M., Ghanbari, M. and Kiadeh, N. 1390. Investigating the effect of natural preservatives on increasing the shelf life of meat products. National Conference on Food Industries (New Technologies, Quality Control and Food Packaging), Islamic Azad University, Quchan Branch.
- [2] Rokni. N. D. 2014. Book of Meat Sciences and Industries, University of Tehran.,240, 235-234, 248-251.
- [3] Iranian Institute of Standards and Industrial Research. 1387. Sausages and sausages, test features and methods, National Standard of Iran No. 2303.
- [4] Davies, A.R., Board, R.J. and Board, R.G. eds.1998. Microbiology of meat and poultry. Springer Science & Business Media., 86, 87, 98, 106.
- [5] Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E.2006. The prokaryotes A Hand book on the boilogy of bacteria,third, Bacteria,Firmicutes, Cyanobacteria, 4(1,2,9),277.

- [27] JF MacFaddin, Philadelphia, Baltimore, Maryland; Lippincott Williams & Wilkins. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria Third ed, 225-28.
- [28] Holley, R.A. 1997. Impact of slicing hygiene upon shelf life and distribution of spoilage bacteria in vacuum packaged cured meats. *Food Microbiology*, 14(3), 201-211.
- [29] Broda, D.M., Saul, D.J., Lawson, P.A., Bell, R.G. and Musgrave, D.R. 2000. *Clostridium gasigenes* sp., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), 107-118.
- [30] Hugas, M., Garriga, M. and Aymerich, M.T. 2003. Functionality of enterococci in meat products. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 223-233.
- [31] Moreno, M.F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 1-24.
- [32] Deak, T. 2007. Handbook of food spoilage yeasts. CRC press., 52,21,68,365-377,469,525-526,548-552.
- [33] Mushtaq, A., Smith, D.G. And Mahboob, S. 2013. Effect of Heat Treatment on Stationary Phase Cells of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 4(2), 234-236.
- [34] Stamatis, N. and Arkoudelos, J. 2007. Quality assessment of *Scomber colias japonicus* under modified atmosphere and vacuum packaging. *Food Control*, 18(4), 292-300.
- [35] Özpölat, E., Patır, B., Guran, H.Ş. and Gul, M.R. 2014. Effect of vacuum-packing method on the shelf-life of *Capoeta umbra* sausages. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(1), 178-184.
- [36] Paludan-Müller, C., Huss, H.H. and Gram, L. 1999. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 46(3), 219-229.
- [37] Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán, M.D., Rovira, J. and Jaime, I. 2008. Effect of the packaging method and the storage time on lipid oxidation and colour stability on dry Control, 20(2), 99-104.
- [17] Ebrahimi, M, A., Alahyar Parsa, SH., Piraish, S. 2015. Direct extraction and purification of soil microbial total DNA and molecular detection of soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* causal agent of tomato vascular wilt. *Journal Scientific Research of Crop Biotechnology*, 4(12), 55-66.
- [18] Vali Poori, Ruhollah., Majid Goodarzi and Shahram Neneh Krani. 2015. A Study of the Quantity and Quality of Talent DNA Using Spectrophotometer and Agars Gel in Larry Romanov Sheep. *International Development Conference on Agriculture, Environment and Tourism*, Tabriz.
- [19] Garman, R.D., Doherty, P.J. and Raulet, D.H. 1986. Diversity, rearrangement, and expression of murine T cell gamma genes. *Cell*, 45(5), 733-742.
- [20] Shankar, S., Rao, M. and Laxman, R.S. 2011. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process biochemistry*, 46(2), 579-585.
- [21] Javadmanesh, A. 2013. Contribution of IGF system and GH-IGF1 axis to heterosis in a bovine fetus model. PhD thesis. The University of Adelaide, Adelaide, Australia.
- [22] Lobo, I. 2008. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Nature Education* 1(1), 215.
- [23] Pankaj, B. P., Opera, U. L., 2013. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology* 6, 36-60.
- [24] García-Esteban, M., Ansorena, D. and Astiasarán, I. 2004. Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. *Meat Science*, 67(1), 57-63.
- [25] Sepulveda Cossio, C. A., Restrepo Molina, D. A., & Cabrera Torres, K. R. 2013. Effects of Locus Bean Gum, kappa Carrageenan and Iota Carrageenan on the Syneresis, Texture and Some sensory Characteristics of Cooked Ham. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 66(2), 7095-7106.
- [26] Schaeffer, A. B., and Fulton. M. D. (1993). A simplified method of staining endospores. *Science (New York, NY)*, 77(1990), 194-194.

- changes in irradiated cooked pork sausage with different fat sources and packaging during storage. *Meat Science*, 55(1),107-113.
- [40] Slavica, V.M., Dragica, K., Dejana, T., Djordje, O., Natalija, D. and Marija, J. 2013. Colour and texture characteristics of “Užička” fermented sausage produced in the traditional way. *Meat Technology/Tehnologija Mesa*, 54(2),137-143.
- fermented sausage salchichón manufactured with raw material with a high level of mono and poly unsaturated fatty acids. *Meat Science*, 80(4), 1182-1187.
- [38] Harms, C., Fuhrmann, H., Nowak, B., Wenzel, S. and Sallmann, H.P. 2003. Effect of dietary vitamin E supplementation on the shelf life of cured pork sausage. *Meat Science*, 63(1), 101-105.
- [39] Jo, C., Jin, S.K. and Ahn, D.U. 2000. Color



## Isolation and Identification of Yellow Spot Causing Microbial Agents on Chicken Sausage Based on Culture and Molecular Methods

Soradeghi Toopkanloo, A. <sup>1</sup>, Shahidi, F. <sup>2\*</sup>, Javadmanesh, A. <sup>3</sup>, Mortazavi, S. A. <sup>2</sup>, Varidi, M. J. <sup>2</sup>, Roshanak, S. <sup>4</sup>

1. MSc, Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran  
 2. Professor, Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran  
 3. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran  
 4. Ph.D. student, Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

## ARTICLE INFO

## ABSTRACT

## Article History:

Received 2020/05/05  
 Accepted 2020/09/21

## Keywords:

Isolation,  
 Identification,  
 Yellow spots,  
 Sausage,  
 Sequencing.

DOI: 10.52547/fsct.18.05.01

\*Corresponding Author E-Mail:  
 fshahidi@um.ac.ir

One of the problems with the processed meat products shelf life is the formation of yellow spots in sausages. The aim of this study was to isolate and identify the microbial agents causing yellow stain from sausage by molecular- and culture-based methods. For this purpose, 15 samples from yellow spot and separation areas of chicken sausages were sampled. A total of 44 colonies grown on the MRS, M17, YGC, and PDB culture medium were inoculated into pre-packaged cutting sausages to induce the yellow spot. Yellow spots appearance 9 samples and they were characterized by both culture-based methods and sequencing of a 350 bp fragment from 16S rRNA V3 region and a 800bp fragment from 18S rRNA ITS4 region. The results of the culture-based and molecular assay showed that the main causes of the yellow spots in the chicken sausage packaged under vacuum were *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecium* and *Candida saitoana*. In addition, one species of *Enterococcus* and one species of *Candida* were also identified at the genus level. Examination of yellow spotted samples also showed that the microorganisms that cause yellow spotting cause changes in pH, color indices L\*, a\* and b\*, and syneresis compared to the control sample but the rate of change is only in the syneresis quantity and a\* was significant.