

# LEUCONOSTOC GASICOMITATUM E PRODUZIONE DI ACIDO BUTIRRICO IN CARNI EQUINE REFRIGERATE E CONFEZIONATE SOTTOVUOTO

## LEUCONOSTOC GASICOMITATUM AND PRODUCTION OF BUTYRIC ACID IN CHILLED VACUUM-PACKED EQUINE MEAT

Milesi S., Pirani S., Cantoni C.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano

### SUMMARY

Blown pack is a common alteration in chilled vacuum-packed meat. *Clostridium* spp. is commonly known as the causing agent of this meat spoilage. In this work we demonstrate that also heterofermentative Lactic Acid Bacteria (LAB) such as *Leuconostoc* spp. can be involved. We analyzed four samples of chilled vacuum-packed equine meat with blown-pack spoilage and we found high levels of *Lc. gasicomitatum* (about 7-8 Log ufc/g). This m.o. is able to produce butyric acid and ethanol. We found both this volatile compounds in our samples.

### KEY WORDS

*Leuconostoc gasicomitatum*, butyric acid, equine meat, blown-pack

### INTRODUZIONE

Il confezionamento delle carni in materiale plastico sottovuoto ha portato numerosi vantaggi per quanto riguarda la shelf-life del prodotto.

Tuttavia dagli inizi degli anni '80 hanno cominciato a verificarsi casi di alterazioni sia in carni bovine che ovine ed equine (1). Sono stati riscontrati sia formazione di bolle gassose isolate sia rigonfiamenti consistenti dell'imballaggio (bombaggi), con presenza di odori anomali. Nelle confezioni sono stati ritrovati gas quali idrogeno (H<sub>2</sub>), anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), tracce di idrogeno solforato (H<sub>2</sub>S) e altri solfuri e acidi organici (ac. butirrico, isovalerico, acetico).

Le cause più comuni per la formazione di questi gas che causano il rigonfiamento degli imballaggi plastici sono di tipo batterico e possono essere suddivise in:

Clostridi psicrofili:

- *C. esterteticum* sub. *esterteticum*: elabora butanolo, ac. butirrico, ac. acetico, butil-estere H<sub>2</sub>S;
- *C. esterteticum* sub. *Lameraniense*: ac. acetico, ac. butirrico, ac. propionico, ac. isobutirrico e H<sub>2</sub>S;
- *C. frigoriphilum* (2): ac. butirrico ed etanolo;
- *C. gasigenes*: etanolo, ac. acetico, ac. butirrico, butanolo;
- *C. algidocarnis*: ac. butirrico, ac. acetico, ac. 2-metilpropionico, ac. 2-metilbutirrico, ac. 3-metilbutirrico;
- *C. frigidicarnis*: ac. acetico, etanolo, ac. butirrico, ac. isovalerico, butanolo;
- *C. algidixilanolicum*: ac. acetico, ac. formico, etanolo, ac. butirrico, butanolo.

*Enterobacteriaceae* psicrotrofe (producono CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S e ac. butirrico in basse concentrazioni):

- *Serratia liquefaciens*;
- *Enterobacter aerogenes*;

- *Hafnia alvei*;
  - *Pantoea agglomerans*;
  - *Raultella planticola*;
  - *Shewanella* spp.;
  - *Brochothrix thermosphacta*.
- Batteri Lattici (LAB) etero-fermentanti:
- *Weissella* spp.;
  - *Lactobacillus sakei*: CO<sub>2</sub>, ac. lattico, etanolo;
  - *Lb. brevis*: CO<sub>2</sub>, ac. lattico, etanolo;
  - *Lb. fermentum*: CO<sub>2</sub>, ac. lattico, etanolo;
  - *Leuconostoc mesenteroides*: CO<sub>2</sub>, ac. lattico, etanolo;
  - *Lc. gelidum*: CO<sub>2</sub>, ac. lattico, etanolo;
  - *Lc. carnosum*: CO<sub>2</sub>, ac. lattico, etanolo;
  - *Lc. gasicomitatum*: ac. butirrico ed etanolo.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di dimostrare il coinvolgimento di *Lc. gasicomitatum* nel rigonfiamento di carni equine confezionate sottovuoto che all'apertura presentavano un forte odore di ac. butirrico.

## MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati quattro campioni di roast-beef equino confezionato sottovuoto provenienti dall'Est Europa. Le mezzene erano state importate in Italia e sezionate e confezionate in territorio nazionale. Tutte e quattro le confezioni presentavano un evidentissimo bombaggio dell'imballaggio plastico. All'apertura delle confezioni si avvertiva un forte odore di ac. butirrico (odore di formaggio). Sulla superficie della carne si poteva notare una patina viscosa (*slime*) mentre non era rilevabile alcuna alterazione di colore evidente.

Da ciascun campione sono stati prelevati sterilmente 10g mediante scarificazione superficiale.

Sono state quindi allestite diluizioni decimali e 0,1 ml di ogni diluizione sono stati piastrati su appositi terreni e incubati secondo le seguenti modalità:

- *Enterobacteriaceae*: terreno VRBG agar (Oxoid) incubato a 37°C per 24 ore;
- LAB: terreno MRS agar (VWR) e APT agar (Bio-life) a 30°C in condizioni di microaerofilia per 48 ore;
- *Leuconostoc* spp.: TSA (Oxoid) + 4% di saccarosio a 30°C in condizioni di microaerofilia per 48 ore;
- *Clostridium* spp.: in piastre a doppio strato di TSC agar (VWR) incubate in condizioni di anaerobiosi a 37°C per 72 ore.

Da ciascun campione sono stati prelevati 10 ml di essudato che sono stati quindi posti in provette contenenti 10 ml di RCM broth (Oxoid) e Fluid Tioglicolate

colate broth (Oxoid) a doppia concentrazione.

Per ogni tipologia di terreno e per ogni campione le provette sono state trattate come segue: chiarire meglio

- 2 provette (una si RCM broth una di Fluid Tioglicolate Broth) sono state sottoposte a shock-termico a 80°C per 10 minuti, tramite immersione in bagnetto termostatico;
- 2 provette (una si RCM broth una di Fluid Tioglicolate Broth) sono state sottoposte a shock-termico a 60°C per 10 minuti, tramite immersione in bagnetto termostatico;
- 2 provette (una si RCM broth una di Fluid Tioglicolate Broth) sono state sottoposte a shock-termico a 45°C per 25 minuti, tramite immersione in bagnetto termostatico;

Inoltre 1ml di essudato da ogni campione è stato sottoposto a trattamento in 5 ml di etanolo al 90% per 60 minuti. 1ml di tale sospensione è poi stato posto in RCM broth e Fluid Tioglicolate broth.

Tutte le provette trattate termicamente e con etanolo sono state incubate in due diverse modalità:

- in anaerobiosi a 30°C per 5 giorni;
- in anaerobiosi a 4 °C per 14 giorni.

Dalle piastre di TSA + 4% di saccarosio sono state isolate 15 colonie morfologicamente assimilabili a *Leuconostoc* spp. che sono state sottoposte a colorazione di Gram e ad identificazione fenotipica secondo la metodica proposta da Bjorkroth K:J. e coll., 2000 (3).

Su campioni di essudato è stata poi eseguita una ricerca di composti volatili mediante gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS) secondo la tecnica descritta da Cantoni e coll, 2007 (2)

## RISULTATI

I risultati delle analisi microbiologiche sono apprezzabili nei grafici sottostanti.

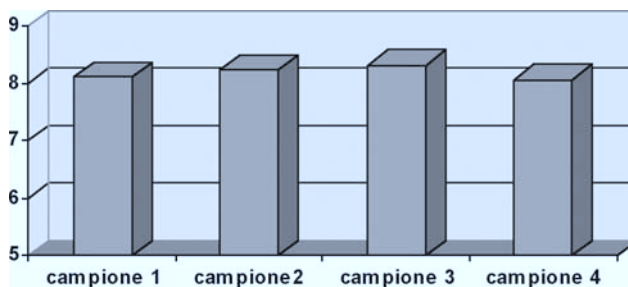


Grafico 1: valori di LAB riscontrati nei campioni espressi in Log ufc/g

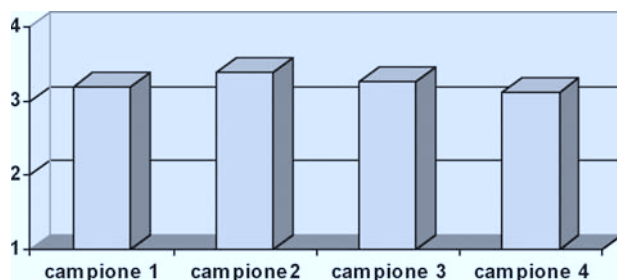


Grafico 2: valori di *Enterobacteriaceae* riscontrati nei campioni espressi in Log ufc/g

In nessun campione sono state rinvenute colonie di *Clostridium* spp.

Nella tabella n. 1 sono riportate le caratteristiche fenotipiche delle colonie di *Leuconostoc* spp. isolate.

Tabella n. 1

Prova eseguita	Risultato
Catalasi	-
Crescita 4°C	++
Crescita 30°C	+
Crescita 37°C	-
Produzione di gas dal glucosio	++
Produzione di slime dal saccarosio	++
Crescita in presenza di 10% di NaCl	-

Nella tabella numero 2 sono invece riportati i risultati della GC/MS eseguita sui campioni di essudato:

Tabella n. 2

COMPOSTO	ng/ml
<b>Acidi carbossilici</b>	
Acido acetico	2795.727
Acido butanoico	34853.55
<b>tot</b>	<b>37649.28</b>
<b>Esteri</b>	
Acido acetico etil estere	773.9171
Acido butanoico etil estere	35796.01
Acido butanoico butil estere	6278.21
Acido esanoico etil estere	168.3455
<b>tot</b>	<b>43016.49</b>
<b>Alcoli</b>	
etanolo	4954.184
1-butanolo	5254.309
1-eptanolo	8142.234
4-epten-olo	2781.52
<b>tot</b>	<b>21132.25</b>

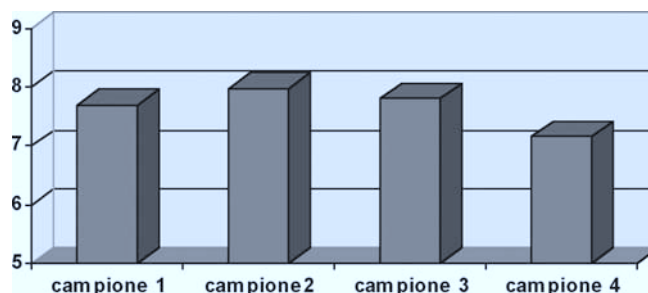


Grafico 2: valori di *Leuconostoc* spp. riscontrati nei campioni espressi in Log ufc/g

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il bombaggio di carni confezionate sottovuoto è un problema relativamente comune. E' stato studiato da numerosi autori (1, 2, 3, 4, 5) e molto spesso la responsabilità della produzione di gas e soprattutto di ac. butirrico è stata attribuita a batteri appartenenti al genere *Clostridium* (4). Nel 2004 Jones R.J e coll. (5) per primi hanno citato *Leuconostoc* spp. come possibile responsabile della produzione di ac. butirrico, etanolo e ac. lattico nelle carni confezionate sottovuoto, senza tuttavia identificarne con precisione la specie. Dai nostri studi appare evidente che *Leuconostoc* spp. ricoprono un ruolo fondamentale nel tipo di alterazione considerato. La loro massiccia presenza, che deriva probabilmente da una scarsa igiene nei processi di macellazione e di sezionamento, è infatti riscontrabile in tutti e quattro i campioni considerati. Dallo studio dei caratteri fenotipici (catalasi, crescita a diverse temperature, produzione di gas, produzione di *slime* e crescita al 10% di NaCl) e dallo spettro dei composti volatili prodotti siamo giunti alla conclusione che il batterio da noi considerato appartiene alla specie *Leuconostoc gasicomitatum*. Questo batterio era già stato studiato nel 2000 da Bjorkroth J.K. e coll (3) come alterante di carni confezionate sottovuoto e in atmosfera protettiva. Anche in questo caso si presentava un notevole bombaggio delle confezioni e all'apertura un forte odore di ac. butirrico. *Lc. gasicomitatum* è un batterio Gram positivo, non mobile, asporigeno di forma cocco-ovoidale. Cresce molto bene a temperature comprese tra i 4 e i 15°C, lentamente a 30°C e non cresce a 37°C. Non cresce in presenza di concentrazioni di NaCl superiori al 6,5%. E' un LAB eterofermentante (produce gas dal glucosio) non idrolizza l'arginina e produce una notevole quantità di *slime* dal saccarosio. I *Leuconostoc* non sembrano avere una particolare capacità proteolitica e la loro capacità di produrre gas (CO<sub>2</sub>) e ac. butirrico rimane tuttora senza una spiegazione. Tut-

tavia sembra plausibile identificare tale specie batterica quale responsabile dell'alterazione butirrica riscontrata nei nostri campioni in quanto dalle analisi batteriologiche appare evidente che i LAB sono la tipologia microbica predominante e di conseguenza l'unica imputabile. Sono comunque necessari ulteriori approfondimenti per studiare le caratteristiche metaboliche di *Lc. gasicomitatum* e la sua effettiva diffusione nelle matrici carnee.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Dainty R. H., Edwards R.A., Hibbard C.M. (1989). Spoilage of vacuum-packed beef by *Clostridium* sp. *Journal of Scientific Food Agriculture*. 49: 473-486
- 2) Cantoni C., Iacumin L., Milesi S. Comi G. (2007). Identificazione diretta con PCR di un clostridio psicrofilo in carni sottovuoto. *Ingegneria Alimentare*. 4(18): 18-22.
- 3) Bjorkroth K.J., Geisen R., Schillinger U., Weiss N., De Vos P., Holzapfel W.H., Korkeala H.J., Vandamme P. (2000). Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. Nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified atmosphere conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9): 3764-3772.
- 4) Broda D.M., DeLacy K.M., Bell R.G., Braggins T.J. Cook R.L. (1995). Psychrotrophic *Clostridium* spp. Associated with "blown-pack" spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *International Journal of Food Microbiology*. 29:335-352
- 5) Jones R.J. (2004). Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum packaged beef. *International Journal of Food Microbiology*. 90:273-282.