



Litteraturredport "Blown Packs" II

Litteratur undersøgelse

Af Tomas Jacobsen

Sammendrag

Baggrund

I forlængelse af et tidligere projekt "Udvikling af en PCR metode til påvisning af "blown pack" clostridier", ønsker KAF gennemført en litteratur-undersøgelse om "blown pack". Undersøgelsen skal omfatte, hvor clostridierne findes, hvor ofte og i hvilket niveau de findes, samt om der findes effektive metoder til at eliminere dem fra fersk kød.

Konklusion

Rapporten konkluderer følgende om de clostridier, der forårsager "blown pack":

- Clostridierne tilføres oftest kødet via huder og fæces; oprindeligt kommer clostridierne fra jord/miljø
- Typisk findes kun få sporer på kødet, men selv få sporer kan forårsage "blown pack"
- Krympning af vakuumpakket oksekød øger risikoen for "blown pack"
- Der blev ikke fundet beskrevne metoder, som effektivt eliminerer "blown pack" clostridierne fra oksekødet efter slagtning/opskæring, men følgende er forsøgt:
 - Behandling med peroxysyre (ingen effekt på kød)
 - Afskylning med koldt/varmt vand (nogen effekt på kød)
 - Tilsætning af mælkesyrebakterier (nogen effekt på gasproduktion, men giver dårlig lugt/smag)

Diskussion

Der er i litteraturen enighed om, at de fleste tilfælde af "blown pack" på køleopbevaret vakuumpakket okse-, lamme- eller vildtkød skyldes psykrofile eller psykrotrofe clostridier. De psykrofile clostridier kan ikke vokse ved så høje temperaturer, som findes i dyrene, så deres tilstedeværelse må skyldes, at de findes i dyrenes omgivelser eller foder. En enkelt artikel omtaler, at psykrotrofe clostridier kan være opformeret i lymfe eller væv. Den primære kilde til de psykrofile clostridier kendes ikke, men clostridierne er fundet i jord, vand og plantemateriale. Der er tilsyneladende en sæson variation i forekomsten af clostridierne, idet der bliver fundet flest positive prøver om foråret og færrest om efteråret. Udenlandske undersøgelser viser, at de psykrofile eller psykrotrofe clostridier kan findes på en stor andel af prøver fra fæces og huder (fra ca. 10 % til tæt på 100 %). Flere undersøgelser konkluderer, at clostridierne på kødudskæringer findes i meget lavt antal, men også at få sporer kan give "blown pack". Der er enighed om, at hovedkilden til forurening af kødet med clostridierne skyldes forurening fra fæces eller huder. Clostridieforekomsten på huder kan enten skyldes forurening med fæces eller, at bakterierne er påført fra omgivelserne.

Clostridierne er obligat anaerobe og mange af dem kan kun vokse ved lave temperaturer. Det har vist sig vanskeligt at dyrke de psykrofile og psykrotrofe clostridier, idet der skal anvendes mange forskellige substrater for at få den højeste genfinding af de forskellige stammer, og ofte er genfindingen lav eller helt fraværende, selv fra pustede pakker. DNA baserede metoder er udviklet, dog hovedsageligt til de vegetative celler af clostridier. Da der er adskillige stammer af clostridier, der kan forårsage pustning skal de DNA baserede metoder dække flere stammer. Da de forskellige clostridiers DNA ikke er gennemgribende karakteriseret, findes der kun sekvens fra 16s rRNA generne. Af den årsag kan det være vanskeligt at konstruere primere og prober, der er 100 % specifikke. Med DNA metoderne findes normalt en højere frekvens af positive prøver end med dyrkningsbaserede metoder. Nogle positive prøver fra DNA metoder kan være fra vegetative celler, som ikke er aktive, men det kan ikke afgøres, hvor stort et problem, det udgør pga. vanskelighederne med de dyrkningsbaserede metoder.

I oksekød podet med forskellige clostridier giver varmekrympning af plastemballagen en hurtigere fremvækst af clostridierne og dermed større problemer med "blown pack" end ikke varmekrympet emballage. Temperaturen af varmekrympningen er 70-90 °C og varighed ca. 15-3 sek. Der er ikke forskel på, hvilken temperatur, der anvendes til varmekrympning for fremvækst af clostridierne. Én artikel finder, at hvis der trækkes vakuum til 9 mbar i stedet for 6 mbar udsættes tidspunktet for dannelse af "blown pack". Effekten af krympning kan skyldes, at varmebehandlingen øger spiringen af clostridiesporer, eller at det hæmmer den øvrige flora. Podeniveau og lagringstemperatur har stor betydning for, hvor hurtigt der dannes gas i pakkerne. En lagringstemperatur på -1,5 °C giver næsten en fordobling af holdbarheden i forhold til 4 °C lagring. Ligeledes betyder et podeniveau på 1-2 sporer/100 cm² i forhold til 1000 sporer/cm² at holdbarheden ca. halveres ved højt podeniveau.

Forskellige metoder til at hæmme fremvækst og gasdannelse fra clostridierne har været afprøvet i podede vakuumpakkede oksekøds udskæringer. I en undersøgelse afprøves afskylning med enten vand eller 180 mM peroxyeddikesyre. Der ses ingen effekt af behandlingerne i forhold til ikke-vaskede hold. I en anden undersøgelse afprøves enten varmt (80 °C) eller koldt (24 °C) vands skylning. I dette forsøg øges tiden til gasdannelse fra 40 dage uden vask til 51 dage med vask. Der var ikke forskel på varmt eller koldt vand. Årsagen til, at der er forskel på resultaterne i de to undersøgelser kan være vaskeanlæggets udformning, mængden af vand, der anvendes, eller at der i det ene forsøg er et 30 min. tørre interval efter podning. Tilsætning af mælkesyrebakterierne *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosum* eller *Lactobacillus sakei* i forskellig mængde til vakuumpakkede oksekødsstykker podet med clostridier, kan nedsætte eller hindre gasdannelse fra clostridierne. Virkemåden for denne effekt er ikke kendt. I forsøget med *L. mesenteroides* er der ikke signifikant forskel på antallet af clostridier i pakker med og uden mælkesyrebakterier, hvilket kunne forventes at være tilfældet, hvis det var næringskonkurrence, der forårsagede effekten. I forsøget, hvor prøverne er podet med et højt antal *L. carnosum* eller *L. sakei* blev prøverne efter 29 dages lagring ved 4 °C bedømt til at være sensorisk meget ringere end ikke podede prøver. Den sensoriske effekt af *L. mesenteroides* er ikke undersøgt. Afprøvning af at tilføre luft (ilt) i 30 min. til de vakuumpakkede kødstykker, når sporerne er spiret (efter 3 døgn) havde ingen effekt, selvom de vegetative celler er følsomme over for ilt. Når de vegetative celler vokser på kødoverflader, kan de dog overleve i flere døgn i atmosfæreluft.

Da der ikke findes effektive metoder til at fjerne clostridierne, hvis de er kommet på kødet eller metoder, der forhindrer fremvæksten af clostridierne, er det vigtigt, at der opretholdes en meget høj slagtehygiejne, så fækal forurening af kødet undgås i videst muligt omfang. Ligeledes skal det ved afhudningen så vidt muligt undgås, at ydersiden af huden kommer i kontakt med slagtekroppen. Af udenlandske undersøgelser fremgår, at problemet er størst ved starten af opridsningen, hvor hudens yderside kan rulle tilbage, idet den største forekomst af clostridier på de udskæringer, som har været undersøgt er fundet på slag. En undersøgelse af, hvordan clostridierne kommer i dyrenes foder og påføres huderne kunne måske nedsætte antallet af kuldeterante clostridier i fæces og på huder inden slagting af dyrene.

Litteratur review

Der er foretaget en litteratursøgning med Web of Knowledge v. 5.10 i FSTA databasen med søgeordene "blown pack", *aligidicarnis* eller *frigidicarnis* eller *estertheticum* eller *gasigenes* eller *bowmani*. Der er fundet 148 hits ved de 2 søgninger. Søgningen er sidst foretaget juli 2013.

På baggrund af titler og abstract er der udvalgt 37 artikler hvoraf 21 er anvendt i dette notat.

Definition

Psykrofile ("kulde-elskende") bakterier defineres normalt som bakterier, der har vækst i temperaturområdet $\pm 1,5 - 5^{\circ}\text{C}$ med et vækstopimum omkring $15 - 20^{\circ}\text{C}$ og ingen vækst ved temperaturer over ca. 22°C .

Psykrotrofe ("kulde-tolerante") bakterier defineres normalt som bakterier der har vækst både ved temperaturer mellem $0 - 5^{\circ}\text{C}$ og ved $30 - 37^{\circ}\text{C}$, typisk med et vækstopimum omkring 30°C .

Forekomst af psykrofile og psykrotrofe clostridier

De psykrofile clostridier, som giver "blown pack" i vakuumpakket fersk kød kan ikke vokse ved temperaturer over max. $18-25^{\circ}\text{C}$. Der kan derfor ikke ske opformering af disse clostridier i dyrene. Det antages derfor, at forurening med disse bakterier skyldes sporer, som enten er blevet påført dyrenes huder, eller sporer, som dyrene har indtaget og som efterfølgende påføres kødet som fækal forurening. Psykrotrofe clostridier kan muligvis opformeres i dyrene, og nogle af dem (*C. aligidicarnis*) kan forårsage fordærv i vakuumpakket kød.

Moschonas et al. (2009) har undersøgt forekomsten af *C. estertheticum* og *C. gasigenes* på 4 Irske kvægslagterier. Der er udtaget prøver fra transportvogn, opstaldning, jord, huder, fæces, hove, afblødningsområde, hudeaftrækker, organudtagning, slagtekrop, transportbånd, udbening, og vakuumpakkemaskine. Der er i alt udtaget 1680 prøver. Der blev udtaget 35 prøver på hvert slagteri (ens prøvesteder på slagterierne), med prøveudtag hver måned i et år. Prøverne er analyseret både med traditionelle dyrkningsbaserede metoder og med PCR. Til PCR anvendes de primere som også har været afprøvet af DMRI (Broda et al. 2003).

Den højeste frekvens af positive prøver findes ved afhudning og afblødningsarealerne, hvor op til 37,5 % af prøverne var positive. Dernæst bliver der fundet 25,4 og 20,8 % positive prøver fra henholdsvis fæces og hove. På huder findes 18,8 % af prøverne positive. 2,1 % af slagtekroppene blev fundet positive, ligesom samme frekvens på 2,1 % blev fundet på transportbånd og vakuumpakke maskinen. Disse tal gælder for prøver identificeret med PCR. Tallene for positive prøver med dyrkning er væsentligt lavere, særligt for *C. estertheticum*, mens der for *C. gasigenes* bliver fundet ca. halvt så mange positive prøver ved dyrkning som ved PCR analyse. Da disse clostridier normalt er "strict anaerobe" kan en del af de prøver, der findes positive med PCR udmærket stamme fra vegetative

celler, som formodentlig ikke længere er levedygtige og derfor ikke kan påvises ved dyrkning.

Der er generelt en højere frekvens af prøver, der er positive med *C. gasigenes* end med *C. estertheticum*. Der er en årstidsvariation i antallet af positive prøver, idet der bliver fundet flest positive prøver i marts-maj og færrest positive prøver i oktober-november.

Broda et al. (2009) har undersøgt forekomsten af psykrofile og psykrotrofe clostridier fra 2 New Zealandske fåreslagterier og fra 5 leverandører til hvert slagteri. I alt er 357 prøver undersøgt. Prøverne er opformeret i PYGS i 3 uger ved 7 °C, hvorefter DNA er ekstraheret og clostridierne påvist med PCR.

Der er anvendt 3 primer sæt. Et sæt primere, der er specifikke for *C. gasigenes*, et sæt for *C. estertheticum* og et sæt, der påviser *C. algidicarnis* og *C. putrefaciens*.

C. gasigenes og/eller *C. estertheticum* blev fundet på græsningsarealer til fårene, i mudder og i vandløb. Fra fårenes pels og fæces kunne der påvises "blown pack" clostridier med en høj frekvens (tæt på 100 % af prøverne). På slagteriet kunne clostridierne påvises fra gulve ved afhudning og slagtning (15 - 60 % af prøverne). For de afhudede slagtekroppe blev der fundet "blown pack" clostridier med en frekvens fra ca. 4 % til 38 % af slagtekroppene. I køletunnellen blev der fundet enkelte positive prøver, mens der i 42 prøver fra udbeningsområdet blev fundet 1 positiv prøve. På et slagteri blev 24 køller undersøgt og 1 prøve var positiv for *C. estertheticum*. På det andet slagteri var 29 – 58 % af prøverne fra "lamb flaps" (lammeslag) positive. Af de vakuumpakkede udskårne kødstykker, blev der ikke fundet kasserede pakninger ("blown pack") selvom der blandt de 48 prøver var 14, der blev fundet positive for clostridierne. Broda et al. konkluderer heraf, at antallet af clostridier på slagtekroppene og kødstykkerne har været meget lavt og at de kun er blevet påvist pga. den 3 uger lange opformering ved 7 °C. For de clostridier, som er psykrotrofe, men kan vokse ved dyrenes kropstemperatur mener Broda et al., at der kan komme forurening på slagtekroppen fra vækst af disse clostridier i lymfesystem eller fra vækst i "deep tissue".

Silva et al. (2011) har undersøgt vakuumpakket oksekød og oksekødspakkeri og slagteri i Brasilien. De anvender dyrkningsbaserede metoder, og behandler prøverne med alkohol eller varme for at identificere sporedannere. Prøverne inkuberes i 4 uger ved 4, 15 og 37 °C, hvorefter de dyrkbare clostridier identificeres med 16S rRNA sekventering. De finder *C. gasigenes* og *C. algidicarnis* både i prøver af pustet og ikke pustet oksekød og *C. gasigenes* på huder i slagteri og transportbånd i kødpakkeri. De finder væsentligt højere kimtal af sporedannende psykrotrofe bakterier i de fordærvede pakkede kødstykker end i tilsvarende ikke-fordærvede kødstykker.

Moschonas et al. (2011) har undersøgt diversiteten af psykrotrofe anaerobe bakterier fra 4 irske kvægs slagterier, samt fra pustede pakker af vakuumpakket oksekød. I alt er der undersøgt 431 anaerobe psykrotrofe bakterier. De fleste

bakterier isoleres fra huder og fæces, men 3 er isoleret fra pustede pakker. Alle isolater fra de pustede pakker er clostridier. Langt de fleste af de undersøgte bakterier tilhører clostridierne. Den bakterie, der hyppigst isoleres er *C. gasigenes* som udgør 315 af de 431 isolater. Den næsthypigste bakterie (52 isolater) er en ukendt clostridie (kaldet TC1), som ikke kan identificeres med 16S rRNA, og derfor kan være en ny art. *C. estertheticum* forekommer 17 gange blandt de 431 isolater. Mange forskellige arter af clostridier er forekommet en enkelt gang og 8 forskellige 16S rRNA sekvenser matcher ikke tidligere undersøgte bakterier.

Moschonas og Bolton (2013) har karakteriseret den nye art "blown pack" clostridier (TC1). Denne art har størst lighed med *C. lituseburensis* når 16S rRNA sekvenser anvendes til sammenligning, men adskiller sig fra denne på en række punkter. Dette viser blot, at identifikation og navngivning af psykrotrofe clostridier ikke kan gøres med 100% sikkerhed, baseret på 16SrRNA teknikken.

Broda et al. (2002) har undersøgt "blown pack" clostridier i forbindelse med slagting og vakuumpakning af hjortevildt. I alt 359 isolater af psykrotrofe clostridier blev isoleret fra 100 slagtedy og fra 33 prøver fra slagterimiljøet. Bakterierne blev isoleret ved en anaerob kuldeopformering og efterfølgende karakteriseret med "PCR – restriction fragment length polymorphism" (RFLP). De finder 6 % af huder og 5 % af fæces positive for psykrotrofe clostridier med samme RFLP profil som *C. gasigenes*. Interessant nok fandt de, at ingen af isolaterne fra slagterimiljøet tilhørte gruppen af "blown pack" clostridier. Da de bakterier, der bliver isoleret ikke kan opformeres ved temperaturer over 25 °C, og derfor ikke kan opformeres i dyrenes fordøjelsessystem, antages det, at bakterierne stammer fra hjortenes levesteder, fx fra foder og planteoverflader. Da både en del fæcesprøver og prøver af huder indeholder de psykrotrofe clostridier, diskuteres det, om clostridier på huderne skyldes fækal forurening. Det anføres også i artiklen, at det kan være meget vanskeligt at få isoleret de psykrotrofe bakterier med dyrkningsbaserede metoder og at resultaterne derfor kan være fejlbehæftede.

Byrne et al. (2009) har forsøgt at dyrke psykrotrofe clostridier fra pustede pakker af irsk okse- og lammekød fra forskellige kødopskæringsvirksomheder. Prøver af kødsaften fra de pustede pakker blev dyrket anaerobt i flydende RCM (reinforced clostridium medium) og derefter CBA (columbia blood agar), TSC (tryptose sulphite cycloserine), RCA (reinforced clostridial agar) og BHI ved 10°C. Det lykkedes ikke at isolere psykrotrofe clostridier fra nogen af prøverne. Sideløbende blev der oprenset DNA direkte fra kødsaften. Til den efterfølgende PCR blev der anvendt primere som amplificerer et 641 bp stykke af 16S rRNA fra *C. estertheticum*. I de pustede oksekødsprøver blev *C. estertheticum* påvist, idet det amplificerede PCR produkt havde 100 % overensstemmelse med *C. estertheticum* i blast analyse. Derimod blev der ikke fundet *C. estertheticum* i lammekødsprøverne. Byrne et al. mener, at dette skyldes, at det er en anden clostridieart, der giver pustning i lammekødet. Studiet viser igen tydeligt, at der er vanskeligheder med de dyrkningsbaserede metoder til påvisning af psykrotrofe clostridier.

Detektion af psykrofile og psykrotrofe clostridier

Som det fremgår af ovenstående afsnit er psykrotrofe clostridier vanskelige at påvise med dyrkningsbaserede metoder. Hvis clostridierne forventes at være på sporeform har Broda et al. (1998) udviklet en metode, hvor halvdelen af prøven behandles med absolut alkohol (1:1) i 60 min. og den anden halvdel behandles ved 80 °C i 10 min. Derefter kuldeopformes prøverne anaerobt i 3 uger ved 7 °C. Dette skulle give den største genfinding af både psykrofile og psykrotrofe clostridiesporer. Ethanol- eller varmebehandlingen sikrer, at vegetative celler elimineres i prøven og ikke overvokser clostridiesporerne i kuldeopformeringen. Efter opformeringen ekstraheres DNA og med PCR kan eventuelle clostridier efterfølgende påvises. Metoden er tidskrævende og påviser kun de clostridier som PCR primerne er rettet imod. Metoden kan kun anvendes til påvisning af sporer og da clostridierne typisk findes som vegetative celler i de pustede pakker, kan metoden ikke benyttes til dette formål.

Direkte dyrkning af vegetative clostridier fra "blown pack" lykkes sjældent (Byrne et al. 2009). Broda et al. (1998a) foreslår, at en række forskellige substrater anvendes for at optimere isolering af "blown pack" clostridier, da der ikke findes et enkelt substrat som giver god recovery af alle typer clostridier.

De forskellige PCR metoder til påvisning af psykrotrofe clostridier er gennemgået eller afprøvet i det tidligere "blown pack" projekt, og den udviklede multiplexe PCR har mindst lige så god følsomhed og specificitet som de metoder, der er beskrevet i litteraturen. Der er ikke i litteraturen fundet procedurer for direkte påvisning af "blown pack" clostridier i sporestadie. I produktionsmiljøet, på huden og i fæces må de psykrofile clostridier findes som sporer for at kunne overleve. I det tidligere "blown pack" projekt er der derfor udviklet en metode til DNA ekstraktion fra sporer, som giver ca. 10 gange større DNA udbytte end kommercielle DNA oprensingskit giver. Det er dog endnu ikke afklaret, om metoden har tilstrækkelig følsomhed til at kunne forudsige om et givent stykke kød vil udvikle pustede pakker ved vakuumlagring.

De i litteraturen beskrevne metoder til påvisning af clostridier i sporestadie anvender alle en 14-21 dages kuldeopformering inden DNA ekstraktion og PCR identifikation.

Temperatur, antal og varmebehandlings betydning for "blown packs" dannelse.

Silva et al. (2012) har undersøgt betydningen af vakuum (6 mbar eller 9 mbar) og temperatur af krympeproces (83, 84 eller 87 °C i 3 sec.) i vakuum/krympe pakket oksekød. Kødet var inden forsøget dekontamineret i 70 % ethanol for at fjerne følgefloa. De dekontaminede kødstykker blev podet med ca. 10^6 CFU af en blanding af vegetative celler og sporer af 10 forskellige isolater af *C. gasigenes* eller 2 forskellige isolater af *C. algidicarnis*. De finder, at krympning ved 87 °C og mindre vakuum (9 mbar) kan forsinke "blown pack" dannelsen. Ved 83 °C krympning og 6 mbar vakuum, giver nogle af stammerne tydelig gasdannelse allerede efter 14 dage ved 1 °C, hvorimod gasdannelsen udsættes med flere uger

ved at anvende 9 mbar vakuum og 87 °C krympning. Effekten af den høje krympningstemperatur kan skyldes, at der er podet med en blanding af vegetative celler og sporer.

Moschonas et al. (2011) har ligeledes undersøgt betydningen af forskellige varmekrympningstemperaturer og temperatur ved den efterfølgende kølelagring for, hvornår der optræder gasdannelse i podede vakuumpakket okse- og lammekød. De poder prøverne med sporer af enten *C. estertheticum*, *C. laramiense* (2 stammer), *C. gasigenes* og en *C. spp.* (TC1). Der podes med ca. 10^3 CFU/cm². De vakuumpakkede kødstykker blev derefter behandlet ved enten 50 °C i 15 sec., 70 °C i 10 sec. eller 90 °C i 3 sec., samt et kontrolhold, der ikke blev varmebehandlet. Pakkerne blev kølelagret ved -1,5; 1 og 4 °C i op til 100 dage. Pakkerne blev bedømt som værende "blown pack" når der var tydelig gasdannelse og de havde mistet vakuum. Maschonas et al. finder, at alle 3 varmebehandlinger nedsætter tiden til pakkerne puster. Varmebehandling til 90 °C nedsætter tiden til pakkerne mister vakuum mest, dette gælder for alle 3 lagringstemperaturer. Ved 1 °C lagring er "tiden til pustning" 36 dage for kontrolhold, der ikke er varmebehandlet, mens den for tilsvarende pakker varmebehandlet til 90 °C er 20 dage. Ved 4 °C lagring er "tiden til pustning" henholdsvis 27 dage og 14 dage.

Clemens et al. (2010) har undersøgt sporeantallets betydning for, hvor hurtigt der er gasdannelse i vakuumpakket okse- eller lammekød. De har anvendt en sporesuspension af *C. estertheticum* som podemateriale i et niveau fra 1-2 sporer pr. pakke op til ca. 100.000 sporer pr. pakke. Kødstykkerne bliver podet, vakuumpakket og krympet ved 78 °C i 3 sec. Derefter opbevares prøverne ved -1,5 eller 2 °C i op til 105 dage. Ved højt podeniveau (ca. 100.000 sporer pr. pakke) var der begyndende gasdannelse efter 37 dage ved -1,5 °C og efter 20 dage ved 2 °C. Ved lavt podeniveau (1-2 sporer pr. pakke) begyndte gasdannelsen efter 72 dage ved -1,5 °C og 41 dage ved 2 °C opbevaring. Undersøgelsen viser, at både podeniveau og temperatur har stor betydning for, hvornår der er synlig gasdannelse i pakkerne, men også, at et meget lavt podeniveau er nok til at give gasdannelse i produktets almindelige holdbarhedsperiode.

Moschonas et al. (2010) har også undersøgt effekten af podeniveau og lagringstemperatur på, hvor lang tid der går før der dannes "blown pack". De afprøver 11 forskellige stammer af clostridier, som er isoleret fra slagterier eller vakuumpakket kød.

De poder prøverne med fra <10 til 10^3 CFU/cm² og inkuberer de vakuumpakkede okse- eller lammekøds stykker ved -1,5; 1 og 4 °C. Pakkerne er varmekrympet ved 90 °C i 3 sek. *C. estertheticum* er den af de afprøvede stammer, der hurtigst giver gasdannelse. Ved højt podeniveau og 4 °C lagring er tiden 14 dage og ved lavt podeniveau 28 dage. For lagring ved -1,5 °C er tiden henholdsvis 35 og 52 dage. Flere af de afprøvede stammer er > 100 dage om at danne gas i pakkerne, når de lagres ved -1,5 °C.

Bell et al. (2001) har undersøgt effekten af varmekrympning på vakuumpakket oksekød podet med 6 forskellige clostridiestammer der kan give "blown pack". De forskellige kulturer var podet til et niveau på 10^3 CFU/cm². De vakuumpakkede kødstykker blev varmekrympet ved 70 °C i 15 sec., 80 °C i 5 sec. eller 90 °C i 3 sec., samt et kontrolhold, der ikke var varmekrympet. Derefter blev pakkerne inkuberet ved enten -1,5; 1 eller 4 °C. De finder, at varmekrympning signifikant nedsætter tiden til gasdannelse i pakkerne i forhold til kontrolholdene, mens der ikke er statistisk signifikant forskel på de 3 varmebehandlinger. Kontrolholdet var 49 dage om at begynde at danne synlig gas, mens holdet som var varmekrympet ved 90 °C i 3 sec. begyndte at danne gas efter 34-35 dage.

Adam et al. (2011) har undersøgt, hvilke faktorer, der får *C. frigidicarnis* sporer til at spire. De afprøver en lang række stoffer fx lysozym, bryostatin, inosin, taurocholate, sukkerstoffer og aminosyrer. Ingen enkeltkomponent gav sporespiring ved 10 °C efter 72 timer. Alle reagenser og inkuberinger var anaerobe. De afprøver både varmebehandlede (60 °C 10 min.) og ikke varmebehandlede sporer. Varmebehandlede sporer spirer hurtigere end ikke-varmebehandlede. L-lactate i kombination med forskellige aminosyrer giver den hurtigste spiring, særlig kombinationen af L-lactate og L-valine gav kraftigt forøget sporespiring. Begge stoffer vil være til stede på overfladen af kød.

Metoder til at eliminere "blown pack"

Da der i litteraturen er enighed om, at de psykrotrofe clostridier påføres kødet fra huder eller fæces, er det vigtigt, at slagtingen foregår så hygiejnisk som muligt. Forskellige forholdsregler har været afprøvet for at nedsætte risikoen for kontaminering med bakterierne.

Boerema et al. (2007) har undersøgt effekten af peroxy eddikesyre skylning på "blown pack" gasdannelse i vakuumpakket oksekød podet med clostridier. De anvender flank steaks som bliver podet med enten 4 eller 40 sporer pr. cm². Sporerne er påført i 0,2 ml væske, og er derefter tørret ind i 30 min. inden behandlingen. De ophængte kødstykker blev behandlet med en 180 ppm peroxy eddikesyreopløsning i vand med en temperatur på 15-17 °C. Der blev anvendt et system med roterende dyser, og en afstand mellem dyser og kødoverflade på 30 cm. Der blev anvendt et tryk på $6 \cdot 10^5$ Pa ved dyserne. Efter behandlingen hang kødet og tørrede i 30 min. ved stuetemperatur. Der blev anvendt kontrolhold, der blev skyllet med vand i stedet for peroxy eddikesyre, samt et hold, der var ubehandlet. Stegene blev derefter vakuumpakket og lagret ved -1,5; 0 og 2 °C. Upodede vakuumpakkede stege gav ikke gasdannelse i løbet af 100 dages lagring. Behandling af de podede stege med enten vand eller peroxy eddikesyre havde ingen effekt på, hvornår der var gasdannelse i pakkerne. Med lavt podeniveau var der gasdannelse efter 30 dage ved 2 °C og ved højt podeniveau efter 25 dage.

I modsætning hertil, har Broda (2007) vist, at peroxy eddikesyre giver en 4 til 5 logs inaktivering af clostridiesporer i vandige opløsninger samt i vandige opløs-

ninger med 20 % oksefedt.

Adams et al. (2013) har set på effekten af varmtvandsvask, koldt vandsvask, og tilførsel af ilt som metoder til at begrænse clostridier på vakuumpakket lamme-kød. Kødet var podet med 2,7 CFU/cm² sporer af *C. estertheticum*. Vask blev udført med roterende dyser i 10 sec. og en vandhastighed på 18 m/sec. temperaturen af varmt og koldt vand var henholdsvis 80° og 24,5 °C. Adams et al. finder, at vask af kødstykkerne udsætter tidspunktet for, hvornår der er gasdannelse i pakkerne, idet ikke-vaskede podede prøver havde gasdannelse efter ca. 40 dage, mens vaskede prøver havde gasdannelse efter ca. 51 dage. Der var ikke forskel på anvendelse af koldt og varmt vand. De afprøver også, om det er muligt at reducere væksten af vegetative celler, ved 3 dage efter pakning at åbne pakkerne i 30 min. og derefter vakuumpakke igen. Teoretisk skulle de spirede sporer/vegetative celler være følsomme over for ilt, men det havde ingen effekt på tiden til gasdannelsen.

Yang et al. (2011), har undersøgt gasdannelsen i sterilt oksekød ved at tilsætte *C. estertheticum* i kombination med *Leuconostoc mesenteroides* i forskellige blandingsforhold. De afprøver alle kombinationer af hver organisme op til 10³ CFU/cm². Gasdannelsen nedsættes kraftigt, når der er tilsat 10³ *L. mesenteroides* i forhold til prøver uden. Med 100 clostridiesporer pr. cm² var volumenforøgelsen af pakkerne ved 4 °C i gennemsnit 538 cm³ uden *L. mesenteroides* tilsat og med 1000 CFU/cm² *L. mesenteroides* var volumenforøgelsen kun 44 cm³. Ved podning med 1000 clostridier pr. cm² og et tilsvarende antal *L. mesenteroides* var volumenforøgelsen 150 cm³. *L. mesenteroides* har således en hæmmende effekt på gasdannelsen fra clostridierne. Yang et al. undersøger ikke effekten af *L. mesenteroides* på smagen af produkterne.

Meibom (2003) har undersøgt effekten af at tilsætte *Leuconostoc carnosum* (DMRICC 4010) eller *Lactobacillus sakei* (10⁷ CFU/cm²) sammen med clostridier (10² CFU/cm²). Pakkerne blev lagret ved 4 °C i op til 62 dage. Uden tilsætning af mælkesyrebakterier øgedes volumen af pakkerne med op til 300 cm³, mens der ikke blev målt nogen volumenforøgelse i pakker der var tilsat en af mælkesyrebakterierne.

Meibom undersøgte også effekten på smag og lugt af oksekødet efter 3 og 29 dages lagring. Prøver podet med mælkesyrebakterier adskilte sig ikke væsentligt fra kontrolprøver på dag 3, men på dag 29 blev prøverne med mælkesyrebakterier bedømt til at have meget mindre kødsmag, samt en mere syrlig smag og en mere smøragtig og syrlig lugt end kontrolholdet. Meibom konkluderer, at ændringen af smag og lugt ved tilsætning af mælkesyrebakterier er for stor til at metoden kan anvendes i den afprøvede form.

Yang & Badoni (2013) og Yang et al. (2009) har undersøgt, hvilke substrater forskellige clostridier anvender i et kødjuicesystem. Clostridierne vokser eksponentielt på den glukoserest, der er i kødet og flere stammer af clostridier er i stand til samtidig at bruge glykogen. Under væksten falder pH i kød modelsystemet

(mange af clostridierne kan opformeres ned til pH 5,2). Tilsyneladende går clostridierne i stationær fase, når glukosen er opbrugt. Nogle stammer fx *C. estertheticum* forbruger dog fortsat glykogen, samtidig med at de anvender laktat, som omdannes til alkoholer, hvorved pH igen stiger til udgangspunktet på pH 5,9. Yang et al. (2009) mener, at en stor del af gasproduktionen sker i stationærfasen, når bakterierne omsætter laktat.

Litteratur

Adam, K.H., Brunt, J., Brightwell, G., Flint, S.H., & Peck, M.W. (2011) Spore germination of psychrotolerant, red meat spoiler, *Clostridium frigidicarnis*. Lett. Appl. Microbiol. 53: 92-97.

Adam, K.H., Flint, S.H., & Brightwell, G. (2013) Reduction of spoilage of chilled vacuum-packed lamb by psychrotolerant clostridia. Meat Science 93: 310-315.

Bell, G.R., Moorhead, S.M., & Broda, D.M. (2001) Influence of heat shrink treatments on the onset of clostridial "blown pack" spoilage of vacuum packed chilled meat. Food Research International 34: 271-275.

Boerema, J.A., Broda, D.M., Penney, N., & Brightwell, G. (2007) Influence of peroxyacetic acid-based carcass rinse on the onset of "blown pack" spoilage in artificially inoculated vacuum-packed chilled beef. J. Food Protec. 70: 1434-1439.

Broda, D.M. (2007) The effect of peroxyacetic acid-based sanitizer, heat and ultrasonic waves on the survival of *Clostridium estertheticum* spores in vitro. Lett. Appl. Microbiol. 45: 336-341.

Broda, D. M., Bell, R.G., Boerema, J.A., & Musgrave, D. R. (2002) The abattoire source of culturable psychrophilic *Clostridia* spp. Causing 'blown pack' spoilage in vacuum-packed chilled venison. J. Appl. Microbiol. 93: 817-824.

Broda, D. M., Boerema, J.A., & Brightwell, G. (2009) Sources of psychrophilic and psychrotolerant clostridia causing spoilage of vacuum-packed chilled meats, as determined by PCR amplification procedure. J. Appl. Microbiol. 107: 178-186.

Broda, D. M., De Lacy, K.M., & Bell, R.G. (1998) Efficacy of heat and ethanol treatment for the isolation of psychrotropic *Clostridium* spp. Associated with the spoilage of chilled vacuum-packed meats. Int. J. Food Microbiol. 39: 61-68.

Broda, D. M., De Lacy, K.M., & Bell, R.G. (1998a) Influence of culture media on the recovery of psychrotropic *Clostridium* spp. Associated with the spoilage of vacuum-packed meats. Int. J. Food Microbiol. 39: 69-78.

Byrne, B., Monaghan, A. M., Lyng, J. G., Sheridan, J.J., & Bolton, D. J. (2009) A case of "blown-pack" meat linked to *Clostridium estertheticum* in Ireland. *J. Food Safety* 29: 628-635.

Clemens, R.M., Adam, K.H., & Brightwell (2010) Contamination levels of *Clostridium estertheticum* spores that result in gaseous spoilage of vacuum-packed chilled beef and lamb meat. *Lett. Appl. Microbiol.* 50: 591-596.

Hansen, F. (2000) Psykrotrofe sporedannere i kød og kødprodukter. Proj. nr. 18.409. Rapport af 15. september (gemt som SF dok 50597)

Koch, A. G., Christensen, H. & Jacobsen, T. (2007) Pustede vakuumpakker ("blown pack"). Proj. nr. 01865. Rapport af 8. januar. SF dok 38547.1

Meibom, T. J. (2003) Kontrol af psykrotrofe clostridier i vakuumpakket oksekød. Eksamensprojekt DTU971319.

Moschonas, G. & Bolton, D.J. (2013) Characterization of a potentially novel 'blown pack' spoilage bacterium isolated from bovine hide. *J. Appl. Microbiol.* 114: 771-777.

Moschonas, G., Bolton, D.J., McDowell, D.A., & Sheridan, J.J. (2011) Diversity of culturable psychrophilic and psychrotrophic anaerobic bacteria isolated from beef abattoirs and their environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 4280-4284.

Moschonas, G., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., & McDowell, D. A. (2009) Isolation and sources of "blown pack" spoilage clostridia in beef abattoirs. *J. Appl. Microbiol.* 107: 616-624.

Moschonas, G. Bolton, D.J., Sheridan J.J., & McDowell, D.A. (2010) The effect of storage temperature and inoculum level on the time of onset of 'blown pack' spoilage. *J. Appl. Microbiol.* 108: 532-539.

Moschonas, G. Bolton, D.J., Sheridan, J.J., & McDowell, D.A. (2011) The effect of heat shrink and storage temperature on the time of onset of "blown pack" spoilage. *Meat Science* 87: 115-118.

Silva, A. R., Paulo, E.N., Sant'Ana, A. S., Chaves, R.D., & Massauger, P.R. (2011) Involvement of *Clostridium gasigenes* and *C. algidicarnis* in 'blown pack' spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *Int J. Food Microbiol.* 148: 156-163.

Silva, A.R., Tahara, A.C.C., Chaves, R. D., Sant'Ana, A.S., Faria, J.d.A.F., Massauger, P.R. (2012) Influence of different shrinking temperatures and vacuum condition on the ability of psychrotrophic *Clostridium* to cause 'blown pack' spoilage in chilled vacuum-packed beef. *Meat Science* 92: 498-505.

Yang, X., & Badoni, M. (2013) Substrate utilization during incubation in meat juice medium of psychrotolerant clostridia associated with blown pack spoilage. *Food Microbiol.* 34: 400-405.

Yang, X., Balamurugan, S., & Gill, C.O. (2009) Substrate utilization by *Clostridium estertheticum* cultivated in meat juice medium. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 501-505.

Yang, X., Balamurugan, S., & Gill, C.O. (2011) Effects on the development of blown pack spoilage of initial numbers of *Clostridium estertheticum* and *leucostoc mesenteroides* on vacuum packed beef. *Meat Science* 88: 361-367.