

# Hochdruckinduzierte Veränderungen von Lebensmittelinhaltsstoffen

Dissertation

vorgelegt von Diplom-Lebensmittelchemikerin Katharina Irena Krzikalla

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzende: Prof. Dr. Andrea Hartwig  
Berichter: Prof. Dr. Dipl.-Ing. Dietrich Knorr  
Berichter: Prof. Dr. Reiner Wittkowski

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14.12.2007

Berlin 2008  
D 83

## **Impressum**

Dissertationen

Vorglegt von Katharina Irena Krzikalla

Hochdruckinduzierte Veränderungen von  
Lebensmittelinhaltsstoffen

Bundesinstitut für Risikobewertung  
Pressestelle  
Thielallee 88-92  
14195 Berlin

Berlin 2008 (Dissertationen 02/2008)  
162 Seiten, 83 Abbildungen, 63 Tabellen  
€ 10,-

Druck: Umschlag, Inhalt und buchbinderische Verarbeitung  
BfR-Hausdruckerei Dahlem

**ISSN 1863-852X ISBN 3-938163-36-4**

**Inhalt**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Wissenschaftliche Zielstellung	7
1.2	Zusammenfassung	8
1.3	Abstract	9
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>11</b>
2.1	Technologie der Lebensmittelkonservierung im geschichtlichen Abriss	11
2.2	Hochdruckbehandlung	12
2.3	Zusammenstellung der durch HPP induzierten Veränderungen im Lebensmittel	15
2.3.1	Mikrobiologie	15
2.3.2	Durch HPP potenziell induzierte chemische Reaktionen	17
2.3.2.1	Proteine	18
2.3.2.2	Fette	19
2.3.2.3	Fettabbau	20
2.3.2.3.1	Hydrolyse	21
2.3.2.3.2	Lipidperoxidation	22
2.3.2.3.3	Autoxidation	22
2.3.2.3.3.1	Autoxidation der Ölsäuremethylester	24
2.3.2.3.3.2	Autoxidation der Linolsäuremethylester	25
2.3.2.3.4	Oxidation durch Lipoxidase/Lipoxygenase	27
2.3.2.3.5	Fettveränderungen durch HPP in realen Lebensmitteln	29
2.3.2.4	Zusatzstoffe	32
2.3.2.5	Fettbegleitstoffe: Tocopherole	33
2.3.2.6	Maßnahmen zur Verhinderung der Fettoxidation in Lebensmitteln	34
2.3.3	Lebensmittelmodelle	35
2.3.3.1	Schweinefett	35
2.3.3.2	Hackfleisch	35
2.3.3.3	Fleisch, Fisch	36
2.3.4	Zusammenstellung der durch HPP verursachten Reaktionen	37
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>39</b>
3.1	Materialien	39
3.1.1	Chemikalien	39
3.1.2	Standardsubstanzen	39
3.1.3	Materialien	41
3.1.4	Geräte und Software	41
3.1.5	Proben	41
3.2	Methoden und Verfahren	42
3.2.1	Hochdruckbehandlung	42
3.2.2	Analytik	43
3.2.3	Versuchsplanung	44
3.2.4	Fraktionelle faktorielle Versuchsplanung	44
3.2.5	Ausgewählte Analysenverfahren	47
3.2.5.1	Allgemeine Parameter	47
3.2.5.1.1	Aussehen und Konsistenz	47
3.2.5.1.2	pH-Wert	47
3.2.5.1.3	Mikrobiologie	48

3.2.5.1.4	Fettextraktion	48
3.2.5.2	Chemische Fettkennzahlen	49
3.2.5.2.1	Säurezahl (SZ)	49
3.2.5.2.2	Peroxidzahl (POZ)	49
3.2.5.3	Kennzahlen für den oxidativen Fettverderb	50
3.2.5.3.1	Freie Fettsäuren (FFS)	50
3.2.5.3.2	Gesamtfettsäurespektrum	50
3.2.5.3.3	Flüchtige Verbindungen: Hexanal, Octanal	51
3.2.5.3.4	Tocopherol-Bestimmung	52
3.2.5.4	Enzyme	53
3.2.5.4.1	Lipase	53
3.2.5.4.2	Lipoxygenase	55
<b>4</b>	<b>Darstellung der Ergebnisse mit Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Fleisch- und Fleischprodukte im Konservierungsprozess: Modellfestlegung</b>	<b>57</b>
4.1.1	Mettwurst	57
<b>4.2</b>	<b>Festlegung der Behandlungsparameter für die Hochdruckbehandlung</b>	<b>57</b>
4.2.1	Hochdruckbehandlungsparameter	59
<b>4.3</b>	<b>Reales Lebensmittel: frische Zwiebelmettwurst</b>	<b>59</b>
4.3.1	Vorversuche am realen Lebensmittel Zwiebelmettwurst	59
4.3.2	Allgemeine Parameter	59
4.3.2.1	Aussehen und Konsistenz	59
4.3.2.2	Fettextraktion	60
4.3.2.3	pH-Wert	61
4.3.3	Chemische Fettkennzahlen	61
4.3.3.1	Thiobarbitursäurezahl (TBA), Peroxidzahl (POZ)	61
4.3.3.2	Säurezahl (SZ)	62
4.3.4	Kennzahlen für den oxidativen Fettverderb	64
4.3.4.1	Freie Fettsäuren (FFS)	64
4.3.4.2	Gesamtfettsäurespektrum	65
4.3.4.3	Lipase	65
4.3.5	Bewertung der Ergebnisse der Vorversuche mit Zwiebelmettwurst	68
<b>4.4</b>	<b>Bestätigung der Ergebnisse und Überprüfung der Hypothesen aus den Vorversuchen</b>	<b>70</b>
4.4.1	Allgemeine Parameter	70
4.4.1.1	Aussehen und Konsistenz	70
4.4.1.2	pH-Wert	71
4.4.1.3	Mikrobiologie der Mettwurst	72
4.4.2	Chemische Fettkennzahlen	74
4.4.2.1	Säurezahl (SZ)	74
4.4.3	Kennzahlen für den oxidativen Fettverderb	76
4.4.3.1	Freie Fettsäuren (FFS)	76
4.4.3.2	Gesamtfettsäurespektrum	77
4.4.3.3	HS-GC: Octanal	78
4.4.3.4	Die Abhängigkeit der Octanalkonzentration von der freien Ölsäure	80
4.4.3.5	Die Abhängigkeit der Octanalkonzentration von der Gesamtölsäurekonzentration	82
4.4.3.6	Vitamin E	82
4.4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen mit der Zwiebelmettwurst	84

4.4.4.1	Statische Clusteranalyse der Ergebnisse zur Mettwurst	86
<b>4.5</b>	<b>Mettwurst-Modelle</b>	<b>88</b>
<b>4.6</b>	<b>Einfaktorielles und Einkomponenten Modell: Hackfleisch</b>	<b>88</b>
4.6.1	Allgemeine Parameter	89
4.6.2	Aussehen und Konsistenz	89
4.6.3	pH-Wert	90
4.6.4	Chemische Fettkennzahlen	90
4.6.4.1	Säurezahl (SZ)	90
4.6.5	Kennzahlen für den oxidativen Fettverderb	91
4.6.5.1	Freie Fettsäuren (FFS)	91
4.6.5.2	Gesamtfettsäurespektrum	91
4.6.5.3	Octanalbestimmung	92
4.6.5.4	Hexanalbestimmung	92
4.6.5.5	Vitamin E	93
4.6.6	Bewertung der Ergebnisse des ersten Hackfleischmodells	94
<b>4.7</b>	<b>Mehrfaktorielles und Multikomponenten Modell: Hackfleisch</b>	<b>95</b>
4.7.1	Allgemeine Parameter	95
4.7.1.1	Aussehen	95
4.7.1.2	pH-Wert	98
4.7.1.3	Mikrobiologie des Hackfleisches	100
4.7.2	Chemische Fettkennzahlen	101
4.7.2.1	Säurezahl (SZ)	101
4.7.3	Kennzahlen für den oxidativen Fettverderb	105
4.7.3.1	Hexanalbestimmung	105
4.7.3.2	Octanalbestimmung	108
4.7.3.3	Vitamin E	112
4.7.4	Zusammenfassung der Hackfleischergebnisse	115
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>117</b>
5.1	Vergleich: Mettwurst mit Hackfleisch	117
5.2	Übergreifende Ergebnisse	120
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>127</b>
8.1	Literatur	127
8.2	Tabellen und Diagramme	139
8.2.1	Vorversuche	139
8.2.2	Hauptversuche	139
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>153</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>155</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>159</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>161</b>



## 1 Einleitung

### 1.1 Wissenschaftliche Zielstellung

Die Hochdruckbehandlung (HPP) zur Haltbarmachung ist ein innovativer Prozessschritt in der Lebensmitteltechnologie. Mit diesem Verfahren behandelte Lebensmittel werden auf dem europäischen Markt bereits angeboten. Die Novel Foods Verordnung [Verordnung (EG) No. 258/97 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, L 43, 1-7 (1997)] regelt das Inverkehrbringen von neuartigen Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten, die möglicherweise auch unter Einsatz neuer Verfahren der Lebensmitteltechnologie hergestellt wurden, im europäischen Wirtschaftsraum. Ein Kriterium für die Zulassung ist die wesentliche Gleichwertigkeit bzw. substantielle Äquivalenz dieser Lebensmittel mit konventionellen Produkten.

Insbesondere bei mikrobiologisch verderblichen Lebensmitteln spielt die Haltbarmachung und die Gewährung der Genusstauglichkeit eine besondere Rolle in der Lebensmittelsicherheit. Die Mettwurst ist ein solches mikrobiologisch-hygienisch kritisches Produkt. Aus lebensmitteltechnologischer Sicht wäre die Etablierung eines Verfahrens zur Haltbarmachung wie die Hochdruckbehandlung wegen der Inaktivierung unerwünschter Mikroorganismen und der damit verbundenen Haltbarkeitsverlängerung besonders sinnvoll. Die Aussagen zu stofflichen und chemischen Veränderungen durch die Hochdruckbehandlung sind aber bisher als unzulänglich anzusehen.

So gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben über die druckinduzierte Oxidation von Fetten. Bisherige Arbeiten weisen darauf hin, dass die Oxidation von Fetten in druckbehandelten matrixfreien Modellen vermindert (149;176), dagegen in druckbehandelten realen Lebensmitteln scheinbar erhöht ist (135). Die Veränderungen der Fettsäuren und die Entstehung von Reaktionsprodukten in realen Lebensmitteln sind unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen Beitrag zum Verständnis hochdruckinduzierter Fettveränderungen zu erarbeiten. Nach der Ermittlung und Entwicklung geeigneter Methoden zur Charakterisierung der Unterschiede zwischen hochdruckbehandelter und unbehandelter Mettwurst anhand von Vorversuchen sollten im Anschluss am Beispiel des Vergleiches mehrerer Chargen von Mettwürsten verschiedene Hypothesen geprüft werden, welche eine kritische Auseinandersetzung mit der einschlägigen Literatur sowie ein besseres Verständnis dieser Prozesse erlauben.

Hierfür wurden im Rahmen eines Forschungsprojektes des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) in Kooperation mit der Technischen Universität Berlin geeignete Materialien in einer Pilotanlage der TU Berlin unter unterschiedlichen Prozessbedingungen hergestellt. Als Untersuchungsobjekt wurde die frische Zwiebelmettwurst ausgewählt. Von Versuchen mit Modellsystemen wurde Abstand genommen, da bereits in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben ist, dass eine Übertragung der Erkenntnisse vom Modell auf ein reales Lebensmittel wegen der komplexeren Matrix und Interaktionen von Inhaltsstoffen in den meisten Fällen nicht möglich ist.

Neben den Untersuchungen zur Qualitätsbeurteilung hochdruckbehandelter Mettwürste sollten insbesondere die Veränderungen von Fetten und Fettbegleitstoffen verfolgt werden. Der mikrobiologische Verderb und dessen Verlauf sollten begleitend untersucht werden und werden zur Erklärung mikrobieller Fettveränderungen herangezogen.

Durch das Aufstellen voneinander unabhängiger Versuchsreihen sollte der Einfluss der Hochdruckbehandlung auf die Fettoxidation und andere chemische Veränderungen der Fett-

säuren frisch hergestellter umgeröteter Würste (industrielle Standard-Rezeptur) mit nachfolgender Lagerung – unter handelsüblichen Bedingungen – ermittelt werden.

Besondere Aufmerksamkeit sollte auf die Veränderungen während der Lagerung hochdruckbehandelter Fleischprodukte gelegt werden, um lagerungsbedingte Effekte von den rein druckinduzierten Effekten abzugrenzen und Empfehlungen für sachgerechte Lagerbedingungen geben zu können.

## 1.2 Zusammenfassung

Die Hochdruckbehandlung (High Pressure Processing, HPP) zur Pasteurisierung ist ein relativ neuer Prozessschritt in der Lebensmitteltechnologie. Ein Ziel dieser innovativen Technologie im Lebensmittelbereich ist die Schaffung einer Alternative zur konventionellen thermischen Behandlung. Durch das Verfahren besteht die Möglichkeit, unerwünschte Veränderungen wertbestimmender Lebensmittelinhaltsstoffe zu vermeiden, was mit der Verbesserung der Produktqualität einhergeht. Auf diese Weise behandelte Lebensmittel werden auf dem europäischen Markt bereits angeboten. Für den europäischen Wirtschaftsraum regelt die Novel Foods Verordnung [(EG) Nr.: 258/97] das Inverkehrbringen von neuartigen Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten, wobei ein Kriterium für die Zulassung die wesentliche Gleichwertigkeit bzw. substantielle Äquivalenz von konventionellen und neuartigen Lebensmitteln ist.

Frische Mettwurst ist ein mikrobiologisch-hygienisch anfälliges Produkt. Aus lebensmitteltechnologischer Sicht wäre die Behandlung wegen der Inaktivierung unerwünschter Mikroorganismen und der damit verbundenen Haltbarkeitsverlängerung nicht nur sinnvoll, sondern zum Schutz der Gesundheit des Verbrauchers auch erstrebenswert.

Um eine Gesundheitsbeeinträchtigung des Verbrauchers durch neue Technologien auszuschließen, wird im Vorfeld der Zulassung eine Risikobewertung durchgeführt. Hierbei ist nicht nur der Status des Lebensmittels nach einer erfolgten Hochdruckbehandlung zu betrachten, sondern auch die Veränderungen während der nachfolgenden Lagerung auch beim Verbraucher. Hierfür wurde der Verlauf des Fettverderbes anhand von charakteristischen Parametern wie Fettkennzahlen: Säurezahl (SZ), Fettsäurespektrum des gesamten Fettes und der freien Fettsäuren, Bildung von Off-Flavour-Verbindungen sowie die Aktivität der fettabbauenden Enzyme: Lipase, Lipoxygenase analysiert. Ein wertbestimmender Inhaltsstoff ist das Vitamin E, das auch ein natürliches Antioxidanz in frischer Mettwurst darstellt. Die Analyse des Vitamin E-Gehaltes nach der Hochdruckbehandlung und auch im Verlauf der Lagerung zeigte, dass der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt durch die Hochdruckbehandlung selbst nicht wesentlich beeinflusst wurde. Über die gesamte Lagerdauer betrachtet ergab sich eine Abnahme des Gehaltes sowohl bei den druckbehandelten als auch bei den unbehandelten Proben. Um die Effekte der Hochdruckbehandlung in Verbindung mit den Zusatzstoffen der Mettwurst zu klären, wurde Hackfleisch mit Ascorbinsäure, Nitritpökelsalz und Citrat hochdruckbehandelt und untersucht.

Alle durchgeführten Analysen wurden statistisch ausgewertet, damit die nachgewiesenen Unterschiede sicher auf die Behandlung und nicht auf die Produktionschargen der Mettwurst zurückzuführen waren. Die Betrachtung der Gesamtheit der Ergebnisse lässt den Schluss zu, dass der Einfluss der Hochdruckbehandlung auf die Fettveränderung nur gering und gegenüber Effekten von Zusatzstoffen bzw. durch die Lagerung bedingten Veränderungen sehr niedrig ist.



### 1.3 Abstract

High Pressure Processing (HPP) is a relatively new step in the preservation process in food technology. The aim of this technology in food production is the establishment of an alternative treatment in comparison to the conventional thermal one. The unfavourable changing of food components and food co-compounds can be avoided by the use of high pressure. This has an effect on the increase of the product quality. Foodstuff produced with this technique, is already offered on the European market. The Novel Foods regulation EC 97/258 adjusts the introduction on the market of novel foods or novel food ingredients in the European Economic Area. In all case the substantial equivalence to existing foods is one criteria for permission.

Fresh salami-style sausage is susceptible to microbiological contamination. For technological purposes HPP has an important effect on extending shelf life by decreasing of undesirable microorganisms.

The necessary risk assessment for new technologies before their market admission has the aim to protect consumer's health. In this connection it is essential to observe changes of food components and food co-compounds induced by High Pressure Treatment in comparison to untreated food and effects caused by storage. The fat oxidation was analysed by characteristic parameters: acid value (AV), fatty acids and free fatty acids, the formation of off-flavour-components and the activity of lipase and lipoxygenase. Also Vitamin E is a native antioxidant in fresh salami-style sausage and a valuable substance of content. The changing of vitamin E by high pressure treatment and during the subsequent storage was investigated. It has been shown that the content of  $\alpha$ -Tocopherol was not considerably affected by High Pressure Treatment. Regarding the whole period of storage the content of vitamin E of the pressurised and untreated samples is decreased.

For investigation of the effects caused by High Pressure Processing in combination with food additives of the fresh salami-style sausage, ascorbic acid, food curing agent and citrate were added to minced meat.

All analysis were evaluated statistically to secure and guarantee that the changing is effected by the High Pressure Processing and not caused by the natural variety of the batches. In conclusion the High Presssure Treatment has only a low influence on fat oxidation in comparison to food additives and the storage conditions.



## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Technologie der Lebensmittelkonservierung im geschichtlichen Abriss

Die ersten Konservierungstechniken waren das Einsalzen und das Trocknen. Das Pökeln wurde vielleicht schon 2500 v. Chr. in Babylonien oder 400 n. Chr. im Römischen Reich entdeckt und eingesetzt. In den gemäßigten Zonen bestimmten Getreide bzw. Mehl mit gedörretem, gesalzenem oder gepökelttem Fleisch oder mit gesalzenem und ungesalzenem Trockenfisch das Nahrungsangebot. So wurde zwölf Jahre alter Stockfisch im 14. Jahrhundert vor der Zubereitung eine Nacht lang gewässert und dann mit einem Schmiedehammer so lange bearbeitet, bis er weich wurde. In manchen Ländern wurde Brot nur zwei- bis dreimal pro Jahr gebacken, ausgetrocknet und dann in aufgeweichter Breiform verzehrt. Im Laufe der Zeit vergrößerte sich das Angebot der Konservierungsstoffe um den Alkohol, den Rauch und die schwefligen oder organischen Säuren wie Essig- und Milchsäure. Eine Zusammenfassung der geschichtlichen Entwicklung der Lebensmittelkonservierung gibt die folgende Tabelle wieder.

**Tabelle 1: Geschichte der Lebensmittelkonservierung im Überblick**

bereits vor 3000 v. Chr.	Salzen, Trocknen/Räuchern
ca. 3000 v. Chr.	Einlegen in Öl (Mesopotamien)
ca. 2000 v. Chr.	Einlegen in Essig (Ägypten)
ca. 1000 v. Chr.	Gaslagerung (Getreidespeicher, in denen Kohlendioxid der Atemluft vor Verderb schützte)
ca. 50 n. Chr.	Einlegen in Honig, Versiegeln mit Ton oder Wachs, Schwefeln (Römisches Reich)
ca. 200 n. Chr.	Kühlen mit Verdunstungskälte (Römisches Reich)
ca. 1000 n. Chr.	Einlegen in Alkohol (Arabien), Konservieren mit Milchsäure (Ostasien, Orient), Konservieren mit Zucker (Ostasien, Orient)
1353	Konservieren mit Zucker (Europa)
1397	Pökeln (G. Beukel); evtl. schon 2500 v. Chr. (Babylonien) und 400 n. Chr. (Römisches Reich)
1497	Missbilligung des zu starken Schwefelns von Wein auf dem Reichstag zu Lindau
1765	Abkochen verhindert Lebensmittelverderb (L. Spallanzani)
1775	Empfehlung von Borax durch Höfer
1809	Erfindung des Prinzips der Konservendose (Napoleons Leibkoch N.F. Appert)
1810	Empfehlung von schwefliger Säure zur Fleischkonservierung
1833	Empfehlung von Kreosot zur Fleischkonservierung (von Reichenbach)
1858	Entdeckung der antimikrobiellen Wirkung der Borsäure (Jaques)
1859	Isolierung der Sorbinsäure aus Vogelbeeröl durch Hofmann
1865	Konservierende Wirkung von Ameisensäure (Jodin)
1874	Konservierende Wirkung von Salicylsäure (Kofbe/Thiersch)
1875	Mikroorganismen als Verursacher des Lebensmittelverderbs erkannt (Pasteur)
1875	antimikrobielle Wirkung der Benzoessäure (Fleck)
1907	Empfehlung von Formaldehyd und Wasserstoffperoxid zur Milchkonservierung (von Behring)
1908	Zulassung von Benzoessäure für Lebensmittel in den USA
1913	antimikrobielle Wirkung der p-Chlorbenzoessäure durch Margolius
1923	Erste Genehmigung zur direkten Verwendung von Nitrit in Fleischprodukten (USA), Konservierende Wirkung der p-Hydroxybenzoessäureester (Sabalitschka)
1938	Konservierende Wirkung der Propionsäure (Hofmann, Dalby, Schweitzer)
1939/40	Konservierende Wirkung der Sorbinsäure (Müller/Gooding)
1947	Entdeckung der antimikrobiellen Wirkung der Dehydracetsäure durch Coleman und Wolf
ab 1950	weltweite Revision der Zulassung neuer Konservierungsstoffe, Lebensmittelbestrahlung (westliche Industrieländer, UdSSR, Japan)
1954	Beginn der technischen Herstellung von Sorbinsäure
1956	Entdeckung der antimikrobiellen Wirkung von Pyrokohlensäurediethylester durch Bernhard, Thoma und Genth
ab 1980	zunehmende Verwendung von Schutzgasen

Veränderte Tabelle aus: (111;165)

Im Jahr 1897 hat Bert von Hite (80;81) mit den Studien der Effekte der Hochdruckbehandlung auf Milch, Fleisch und Fruchtsäfte begonnen. Anstoß war die Unzufriedenheit über Unzulänglichkeiten der Sterilisation, Kühlung und Pasteurisation als Methoden der Konservierung von Milch. Die technologischen Probleme zusammen mit der nicht routinierten Handhabung der Materialien und Proben unter Hochdruck waren ein Hindernis für die Erforschung der neuen Technik (106). Danach geriet diese Technologie in Vergessenheit, bis Ende der 80er Jahre ein staatlich gefördertes Programm zur Marktreife einiger Produkte führte (145).

Seit 1989 gewinnt die Hochdruckbehandlung an Bedeutung, die über die rein akademischen Studien hinausgeht. Dies geschieht vor allem in Japan. Dort werden Fruchtzubereitungen durch HPP haltbar gemacht (68).

Beträchtliche Investitionen in der letzten Zeit weisen auf ein erhöhtes Potenzial von HPP für die Konservierung und Modifikation von Lebensmitteln hin. Gleichzeitig wurden einige hochdruckbehandelte Lebensmittel kommerziell in Japan, den USA und Europa in den Verkehr gebracht (31).

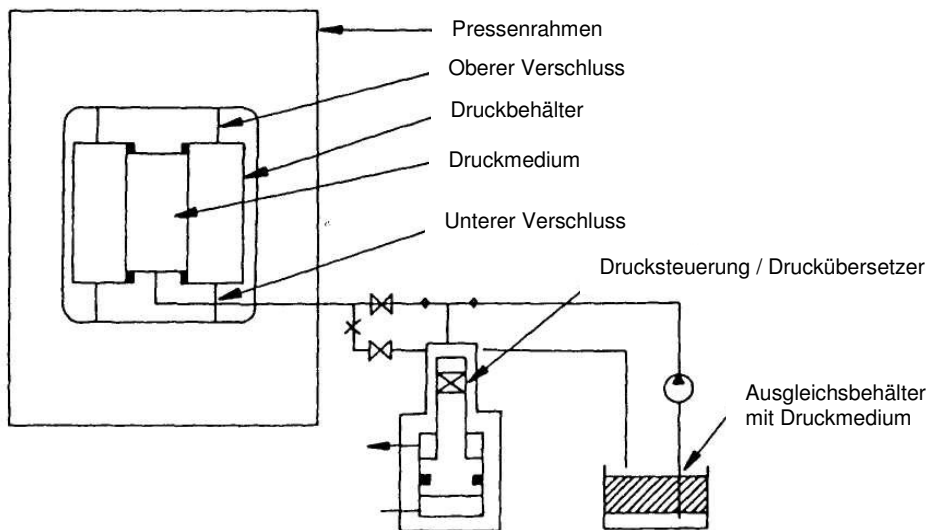
## 2.2 Hochdruckbehandlung

Die Hochdruckbehandlung ist ein relativ neues Verfahren in Europa, um Lebensmittel und Lebensmittelzubereitungen haltbar zu machen, indem die pathogenen und unerwünschten Keime abgetötet oder in ihrer Vitalität beeinträchtigt werden. Zudem können Enzyme inaktiviert werden. Die Produkte werden in der Verpackung, bei flüssigen Lebensmitteln auch direkt, in Druckbehältern mehrere Minuten Drücken von bis zu 1.000 MPa (10.000 bar) ausgesetzt. Im Vergleich zu den konventionellen thermischen Pasteurisations- und Sterilisationsverfahren sind die eingetragenen Energien, und damit die thermische Belastung der Lebensmittel, sehr gering. Deshalb wird das Verfahren auch als „kalte Pasteurisation“ oder „Pascalisation“ bezeichnet. Bei einigen Applikationen erfolgt jedoch gleichzeitig zur Kompression eine thermische Behandlung bei milder Hitze (bis ca. 60 °C). Nach Heinz et al. (70-76) führt eine Kombination aus HPP und thermischer Behandlung zur Revitalisierung von Sporenbildnern und danach zu ihrer Abtötung durch Ausnutzung des Tyndall-Effektes (162). Hierzu können sowohl Batch-Verfahren (Abbildung 1) als auch in letzter Zeit nahezu vollständig automatisierte Anlagen zur Hochdruckbehandlung in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden. Eine detaillierte Darstellung zur Technologie und Anwendung ist sowohl bei Patterson et al. als auch bei Knorr et al. zu finden (142).

Rechtlich geregelt wird die Hochdruckbehandlung durch die **Novel Foods Verordnung** (Verordnung (EG) Nr. 258/97 des europäischen Parlaments und des Rates über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten), die das Inverkehrbringen neuartiger Lebensmittel in der EU regelt. Hierunter fallen unter anderem auch Lebensmittel, die durch bisher innerhalb der EU nicht übliche lebensmitteltechnologische Verfahren hergestellt wurden, wie es z. B. bei der Hochdruckbehandlung der Fall ist.

Für die Beurteilung von Lebensmitteln, die mit neuartigen Verfahren hergestellt wurden, ist die wesentliche Gleichwertigkeit zu konventionellen Lebensmitteln ein wichtiges Prüfkriterium. Die Hochdruckbehandlung findet bereits heute bei einigen Produkten Anwendung. So wurden erste hochdruckbehandelte Lebensmittel innerhalb des europäischen Wirtschaftsraumes in Verkehr gebracht. Beispielsweise wird in Spanien Schinken nach dem Verpacken zur Keimreduzierung hochdruckbehandelt. In Frankreich werden Orangen- und Grapefruitsäfte mit diesem Verfahren stabilisiert und hergestellt. Auf dem außereuropäischen Markt ist bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Produkte zu erhalten, bei denen die Hochdruckbehandlung eingesetzt wurde.

**Abbildung 1: Skizze einer Hochdruckanlage**

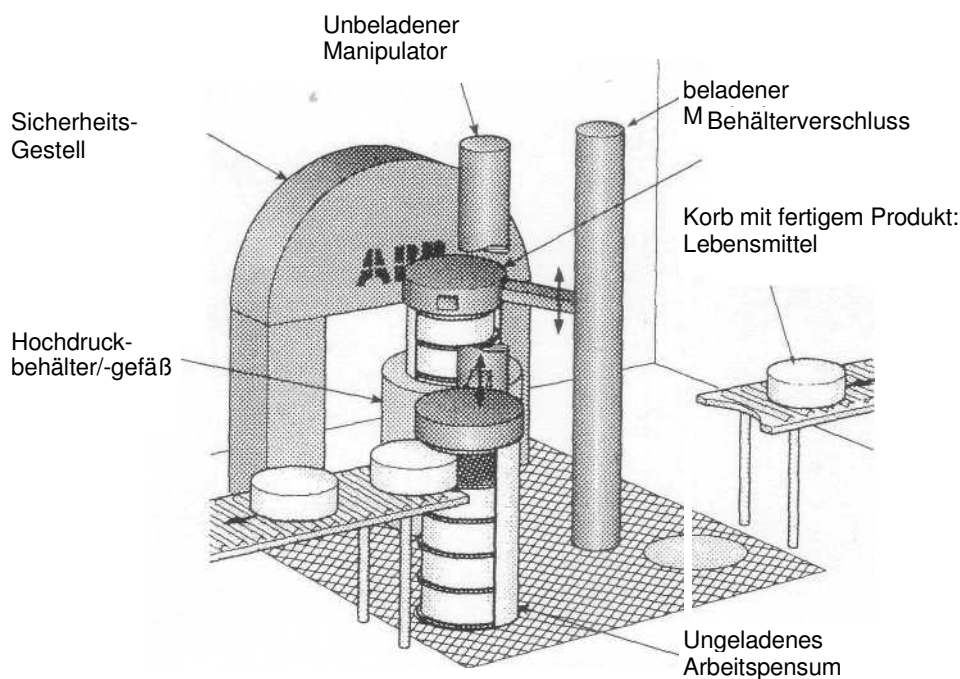


Quelle: (43)

So werden in Japan neben hochdruckbehandelten Joghurts auch Fruchtzubereitungen, Marmeladen und Säfte angeboten, während in der USA vor allem auch hochdruckbehandelte Feinkostprodukte wie z. B. Guacamole erhältlich sind.

Die europäische Gesetzgebung und Rechtsprechung sieht aber vor, dass alle hochdruckbehandelten Produkte erst nach Prüfung gemäß Novel Food Verordnung, d.h. nach Durchlaufen eines Zulassungsverfahrens, auf den europäischen Markt gelangen dürfen. So stellte der Hersteller Danone bereits 1997 in Frankreich einen Antrag auf Zulassung neuartiger Lebensmittel gemäß Artikel 4 der Verordnung (EG) Nr. 258/97 für hochdruckkonservierte

**Abbildung 2: Schematische Darstellung einer automatisierten Hochdruckanlage**



Quelle: (43)

Frucht zubereiten. Nach eingehender Prüfung durch die zuständigen Behörden wurde der Antrag am 23.05.2001 genehmigt (2001/424/EG).

Diese und weitere Anträge auf Zulassung erfolgten durch Prüfung auf wesentliche Gleichwertigkeit zu konventionellen Lebensmitteln, da oft die notwendigen wissenschaftlichen Vergleichsdaten fehlen oder nur wenig untersucht wurden. Um diesen Notstand zu lösen, sind vergleichende Studien mit hochdruckbehandelten und konventionell hergestellten Lebensmitteln wichtig.

Eine bedeutende Fragestellung hierbei ist der Einfluss der Hochdruckbehandlung auf die Lebensmittelinhaltsstoffe und das damit einhergehende Gesundheitsrisiko für den Verbraucher. Außerdem hängt für den Verbraucher die Qualität der Lebensmittel von ihrem Geschmack, ihrem Aroma, ihrer Textur, ihrer Farbe und ihrem Nährwert ab (135;144) und somit von der Frage, inwieweit diese Faktoren durch die Hochdruckbehandlung beeinflusst werden.

**Abbildung 3: Hochdruckanlage der Technischen Universität Berlin, Fachgebiet Lebensmittelbiotechnologie und -prozess-technik, Königin-Luise-Str. 22, D-14195 Berlin**



Die bisherige Forschungstätigkeit erstreckte sich schwerpunktmäßig auf die technologische Anwendung und Verfahrensentwicklung.

Gesundheitliche Aspekte – im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes – wurden bei der technologischen Entwicklung und Optimierung dabei nur in geringem Umfang bzw. überhaupt nicht berücksichtigt.

Ein Ziel dieser neuen Technologie im Lebensmittelbereich ist die Schaffung von Alternativen zur konventionellen thermischen Behandlung. Damit besteht die Möglichkeit, unerwünschte Veränderungen wertbestimmender Lebensmittelinhaltsstoffe zu vermeiden.

Erste Ergebnisse über das Verhalten von Lebensmittelinhaltsstoffen unter hohen hydrostatischen Drücken liegen vor (43;144;190), sie sind jedoch nur bedingt auf reale Lebensmittel übertragbar, da sich Lebensmittel in ihrer komplexen Zusammensetzung in wesentlichen Punkten von Modellsystemen unterscheiden.

## 2.3 Zusammenstellung der durch HPP induzierten Veränderungen im Lebensmittel

Dieser Abschnitt gibt einen Überblick über die bereits untersuchten durch Hochdruckbehandlung induzierten Veränderungen in Lebensmitteln.

Eine Zusammenfassung über die Auswirkungen von Hochdruck auf die Mikrobiologie, Chemie und strukturelle Änderungen von Lebensmitteln und Lebensmittelzusatzstoffen sowie die technologischen Aspekte dieses Prozesses sind im Buch: "High pressure processing of foods" von D. A. Ledward et al. dargestellt (106). Neben der Entwicklung der Hochdrucktechnologie betrachtet er speziell die Auswirkungen der HPP auf Mikroorganismen und insbesondere deren Inaktivierung. Dabei werden Mikroben als Hochdrucktarget ebenso diskutiert wie die Kinetik der HPP-Inaktivierung von Mikroorganismen als auch der Effekt von HPP auf vegetative pathogene Mikroorganismen, mikrobiologischer Inaktivierungsmechanismus, HPP-Effekt auf Biomoleküle, HPP-Effekt auf Milch und Fleisch, HPP-Effekt auf Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, Kesselbauart, experimenteller Kesselstein, Produktionsausstattung für kommerzielle Produktion, kontinuierliche Systeme etc (106).

Bei Fleisch treten mehrere Effekte auf, die durch HPP bewirkt werden: Inaktivierung von Mikroorganismen und Veränderung der Struktur durch das Gelbildungsvermögen (68).

Die Basis-Prinzipien, die den Hochdruckeffekten bei Lebensmitteln zugrunde liegen, sowie ihre Qualitätsmerkmale wurden von Cheftel et al. präsentiert. Die Veränderungen der Muskelenzyme und die Fleisch-Proteolyse mit den dazugehörigen Modifikationen der Muskel-Ultrastruktur sowie die Effekte an Myofibrillen und die daraus folgende Fleischstruktur und hochdruckbegünstigte „Fleischweichmachung“ wurden untersucht. Des Weiteren wurden die hochdruckinduzierte Gelierung und Umstrukturierung von Hackfleisch, die Veränderungen im Myoglobin und in der daraus resultierenden Fleischfarbe erforscht. Der Einfluss von HPP auf Fettoxidation im Muskel und die Inaktivierung von Mikroorganismen (Pathogene und Sporenbildner) im Fleisch kombiniert bei HPP mit thermischer Pasteurisation von Fleischprodukten wurden diskutiert (31).

### 2.3.1 Mikrobiologie

HPP führt bei Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen, Pilzen zu deren Inaktivierung durch die Veränderung der Permeabilität der Zellmembran und durch die Inaktivierung der Enzyme (68).

Mikrobiologische Inaktivierung kann durch einige Faktoren, die durch HPP begünstigt werden, herbeigeführt werden: Die Änderung der Permeabilität der Zellmembran kann zur Denaturierung der Proteine durch Veränderungen der Bindungen mit dazugehöriger Inaktivierung der Schlüsselenzyme führen. Druck ab 101 bis 303 MPa führt zu reversibler Denaturierung und über 303 MPa zu irreversiblen Veränderungen (4;83). Generell sind grampositive Bakterien resistenter gegen Druck als gramnegative. Hefen und Schimmel sind sehr drucksensitiv, während Bakteriosporen höhere Drücke als 1000 MPa überleben können. Dagegen scheinen Viren resistent zu sein (169). Die Sensitivität der Mikroorganismen gegen Druck variiert in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsphase. Zum Beispiel sind Zellen in der exponentiellen Phase drucksensitiver als in der stationären Phase. Die Kombination von Druck und Temperatur kann die zur HPP notwendige Druckhöhe erniedrigen (4).

Die Effekte von HPP auf Mikroorganismen in Lebensmitteln werden durch die Wirkung von HPP auf Wasser, von der Temperatur während der Hochdruckbehandlung, von den Bestandteilen der behandelten Lebensmittel und vom Zustand und physiologischen Stadium der Mikroorganismen beeinflusst. Im Lebensmittel selbst wird dessen Sicherheit bzw. Unbedenklichkeit und dessen mikrobiologische Stabilität von zwei Effekten bestimmt:

1. dem Effekt von HPP auf Lebensmittel während der Behandlung.
2. dem Effekt nach der Behandlung während der „Erholung“ und Regenerierung von Mikroorganismen (4).

Nach Adegoke et al. schützen Milch und Sahne durch Micell-Bildung aus Fetttröpfchen in hydrophiler Phase Mikroorganismen vor HPP, was mit der destruktiven Wirkung von HPP auf die gleichen Mikroorganismen in Modellsystemen verglichen werden kann (4;169).

In der Studie von Jung et al. wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Drücke (50-600 MPa) und Haltezeiten (20-300 sec.) auf die Farbe und mikrobiologische Qualität von Rindermuskeln untersucht. Die Experimente wurden bei 10 °C durchgeführt. Die Wirkung der Druckintensität ist signifikanter für die rote Farbe des Fleisches als die Haltezeiten. Drücke über 300 MPa induzieren Veränderungen der Fleischfarben, eine Abnahme der gesamten Flora und ein Hinausschieben des mikrobiellen Wachstums (520 MPa, 260 sec.) um eine Woche. Während der Lagerung bei 4 °C in den ersten drei Tagen war die Zunahme der roten Färbung typisch für die bei 130 MPa behandelten Proben, während die rote Farbe der bei 520 MPa behandelten Proben schrittweise mit der Metmyoglobinabnahme sank (91).

Die Hochdruckbehandlung stellt eine attraktive nichtthermische Behandlung zur Stabilisierung von Fleischprodukten dar, um die Gesamtkeimzahl nach der Herstellung zu minimieren. Die Kombination von Hochdruckbehandlung mit Bakterioziden führt zur Verminderung von Mikroorganismen (84).

Zur vollständigen Abtötung bzw. Inaktivierung von  $10^8$  KBE/g *E. coli* war in streichfähiger Rohwurst eine Hochdruckbehandlung mit 500 MPa über 10 Minuten oder mit 350 MPa über 30 Minuten notwendig (196).

Bei einer Druckhöhe von 300 MPa war eine Reduzierung der angeimpften *Listeria innocua* Keime von  $10^8$  KBE/g bis unter die Nachweisgrenze in den Rohwürsten nach 15 Minuten möglich. *Listeria innocua* zeigte eine höhere Drucksensibilität als *E. coli* (196).

Die EHEC-Keime wurden (bei einem Gehalt von  $7,6 \cdot 10^5$  KBE/g EHEC 0103:H2 und  $9,1 \cdot 10^5$  EHEC 026:H) in streichfähiger Rohwurst bei einer 15minütigen Hochdruckbehandlung mit 500 MPa vollständig abgetötet (196).

Gesamtkeimzahl, psychrophile, acidophile Bakterien und *E. coli* wurden bei der Hochdruckbehandlung mit 500 MPa für 10 Minuten in gekochtem Schinken und roher geräucherter Schweinelende signifikant reduziert (92).

Die Reduktionsraten von Gesamtkeimzahl, Lactobacillen, Pseudomonaden und *E. coli* wurden in gekochtem Schinken und Schweinehackfleisch bei HPP mit 300 MPa für 15 Minuten und 5, 20, 35 und 50 °C untersucht (109).

Die gefrorenen Hackfleischproben wurden hochdruckbehandelt. Die Verbindung der Anwendung von HPP und thermischer Behandlung führte zur Reduzierung von *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* und *B. stearothermophilus* in beimpften Hackfleischproben. Diese Proben wurden 15 unterschiedlichen Behandlungen aus einer Kombination von Temperatur (20, 50 oder 80 °C), Druck (50, 225, oder 400 MPa) und Behandlungsdauer (1,0; 30,5 oder 60,0 Minuten) unterzogen. Alle Bakterien wurden reduziert bei der Anwendung von HPP mit thermischer Behandlung zum Sporolieren von Sporenbildnern wie *Bacillus* spp., der druckresistenter als *Streptococcus faecalis* ist. Die Ergebnisse zeigten, dass Druck oberhalb von 400 MPa bei 50 °C für 30 Minuten zur kommerziell üblichen Sterilität führte (122).



HPP ist wirkungsvoll bei der Risikokontrolle von Salmonellen und Listerien in rohem oder mariniertem Fleisch. Die Haltbarkeit des marinierten Fleisches konnte durch HPP im Hinblick auf Sporenbildner und pathogene Bakterien verlängert werden (84).

HPP bei 400 MPa für 30 Minuten und bei 20 und 50 °C führte zu keiner Verringerung von Clostridien und *Bacillus* spp. in einem Schweinefleischprodukt mit Karotten und Erbsen. Grampositive Kokken (*Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus aureus*) scheinen druckresistenter zu sein als *Saccharomyces cerevisiae* und die gramnegativen Bakterien (*Pseudomonas fluorescens* und *Escherichia coli*). Die Hochdruckbehandlung von pH-neutralen Produkten (low-acid-Produkten) kann nicht allein zur erfolgreichen Pasteurisierung bzw. Sterilisation führen (121).

**Tabelle 2: Effekt der Hochdruckbehandlung auf ausgewählte Mikroorganismen**

Mikroorganismen	Behandlungsbedingungen			Medium
	MPa	Zeit (min)	Dezimalreduktion	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	300	5	5	Satsuma Mandarinensaft
<i>Aspergillus awamori</i>	300	5	5	Satsuma Mandarinensaft
<i>Listeria innocua</i>	360	5	1	Hackfleisch aus Rindfleischmuskel
<i>Listeria monocytogenes</i>	350	10	4	Phosphatpuffer
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	172	10	2.5	Phosphatpuffer
<i>Salmonella typhimurium</i>	345	10	1.8	Phosphatpuffer
Gesamtkeimzahl	340	5	1.9	frisch geschnittene Ananas

Quelle: (43)

Beispiele zur Auswirkung von HPP auf Mikroorganismen sind in Tabelle 2 dargestellt. Das Auskeimen der Sporen unter Hochdruck ist temperaturabhängig. Bei 0 °C war das Auskeimen der Sporen nicht möglich und sie waren bis zu 1000 MPa druckresistent, während die gleichen Ergebnisse bei moderaten Temperaturen bei 100 MPa erreicht werden konnten. Ausgekeimte Sporen konnten bei 600 MPa und 50-70 °C abgetötet werden. Nach Fellows (43) kann die Verbindung von Hochdruck und der thermischen Behandlung zu synergistischen oder antagonistischen Effekten im mikrobiellen Wachstum, in der Enzymaktivität und in der chemischen Reaktivität führen. Die Auswirkung von Hochdruck ist ebenfalls von den Mikroorganismen abhängig (43).

Die Effektivität einer thermischen Behandlung zur Reduktion von Mikroorganismen kann durch die Hochdruckbehandlung forciert oder gemindert werden. Die Auswirkung von HPP und Temperatur auf verschiedene Mikroorganismen wurde von Galazka und Ledward untersucht (43;50). Des Weiteren hängt die Wirksamkeit der thermischen und Hochdruckbehandlung von der Matrix, d.h. unter anderem von Fett- und Proteinmicellen, dem Wassergehalt, dem pH-Wert (low acid Produkte) und vielen anderen Bestandteilen ab.

### 2.3.2 Durch HPP potenziell induzierte chemische Reaktionen

In diesem Abschnitt erfolgt eine Zusammenstellung der durch HPP induzierten Reaktionen, die einen Einfluss auf die Fettveränderung haben können.

Aus dem Bereich der Hochdruckchemie ist bekannt, dass der Druck neben der Temperatur und der Konzentration der Reaktionspartner einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf und den Gleichgewichtspunkt chemischer Reaktionen hat (187).

Die adiabatische Kompression bei der Druckbehandlung beeinflusst die verschiedenen Lebensmittelinhaltsstoffe unterschiedlich. Am geringsten ist die Wirkung bei kleinen Molekülen wie Vitaminen und Aromakomponenten; größere Effekte sind bei großen Molekülen mit

komplizierter räumlicher Struktur, wie z. B. Proteinen, zu erwarten. Ein Überblick zur Veränderung von Lebensmittelinhaltsstoffen bei der Druckbehandlung ist bei Pfister et al. zu entnehmen (146;147).

Die Auswirkung der Hochdruckbehandlung auf verschiedene Lebensmittel, u.a. Milch, Fruchtprodukte und Fleisch, ist untersucht worden. Reaktionen, die mit einer Verminderung des Volumens nach dem Prinzip von Le Chatelier einhergehen, werden unter HPP bevorzugt. Hierbei handelt es sich um Ionisierungen, Bildung von Wasserstoffbrücken, Radikalkettenreaktion und Diels-Alder-Reaktionen (176). Kovalente Bindungen werden nicht zerstört. Maillard-Reaktionen wurden nicht beobachtet. Makromoleküle wie Proteine denaturieren. Enzyme können, da sie Proteine sind, sowohl durch das Denaturieren inaktiviert als auch aktiviert werden. Nach Hauck et al. kann es sich um eine Folge der Enzymaktivierung bei der verstärkten Lipidoxidation handeln, die zur Ranzigkeit der Lebensmittel führt (68).

Folgende Strukturänderungen der Verbindungen können für die Hochdruckbehandlung formuliert werden (entnommen aus Welti-Chanes et al. (190)):

- *Niedermolekulare Verbindungen:* Eine Veränderung durch HPP (1000 bis 2000 MPa) ist bei niedermolekularen Verbindungen in der primären Struktur sehr unwahrscheinlich durch den relativ niedrigen Energieeintrag.
- *Wasserstoffbrückenbindungen:* Die Bildung von neuen Wasserstoffbrücken geht mit einer Verringerung des Volumens einher.
- *Hydrophobische Effekte:* Die hydrophoben Effekte steigen mit der Anwesenheit und der Anzahl von Verbindungen, die ionisiert werden können. Die Wechselwirkungen zwischen bzw. in biologischen Makromolekülen (Proteinen, Fetten), die durch HPP verursacht werden, sind nicht auf die molekulare Strukturebene (Primärstruktur), sondern auf die Veränderungen in der Bindung von Substraten und Enzymen (sekundäre bis quartäre Struktur) zurückzuführen.
- *Bildung von kovalenten Bindungen:* In Lebensmitteln werden unter HPP folgende Reaktionen begünstigt: Menschutkin-Reaktion, Reaktion an C-C- und C-O-Bindungen, polare Cycloaddition [2+2], Diels-Alder-Reaktion.
- *Solvolysereaktion:* Diese Reaktion der Fette wird nach Tauscher et al. durch die HPP begünstigt, während die Hydrolyse verhindert wird. Die von Tauscher et al. vorgenommene Differenzierung von Hydrolyse und Solvolyse ist ungewöhnlich, da sonstige Autoren die Hydrolyse von Fetten als Spezialreaktion der allgemeinen Solvolysereaktion betrachten (14;16;23;33;34;48;49;155;181).

### 2.3.2.1 Proteine

Hochdruck bewirkt eine Änderung der Struktur und Reaktivität von Biopolymeren wie Proteinen. In Proteinen bewirkt HPP durch ein Auffalten der molekularen Struktur, eine Veränderung des Aggregatzustandes durch das Reagieren mit anderen Proteinen in Lebensmitteln oder durch Veränderung der Proteine. Hieraus resultiert eine Änderung der Textur von Lebensmitteln. Gelbildung ist eine Folge von HPP (43).

Es wurden Studien zur Auswirkung des Hochdrucks auf die Struktur und Farbstabilität des Met-Myoglobins im Rindfleisch durchgeführt. Durch die Hochdruckbehandlung (80-100 MPa, 20 min), die zwei Tage post mortem durchgeführt wurde, erhöhte sich die Stabilität der Farbe des Rindfleisches, welches der Luft ausgesetzt wurde. Dies war ein positiver Effekt für die Farbstabilität des l. dorsi und weniger für p. major (30).

Einen ähnlichen Effekt hat die Hochdruckbehandlung (bei 80-100 MPa für 20 min) auf die Farbstabilität bei Rindfleisch, 20 Tage post mortem angewandt (30).

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Hochdruckbehandlung Fleischproben beeinflusst, für welche die Farbstabilität wichtig ist, die aber mit steigender Zeit post mortem abnimmt (30).

Ab einem Druckbereich von 300 bis 400 MPa wurden Veränderungen im Hackfleisch in den Proteinen wie z. B. Myosin, Actin und sarcoplasmatischen Proteinen induziert, was mittels DSC und Elektrophorese bewiesen wurde. Hieraus kann gefolgert werden, dass die Denaturierung der Proteine einen Einfluss auf die Fettoxidation hat. Diese Vermutung, dass denaturierte Proteine einen kooperativen Effekt auf die Lipidoxidation haben, wurde bereits von Wada (1992) geäußert (28).

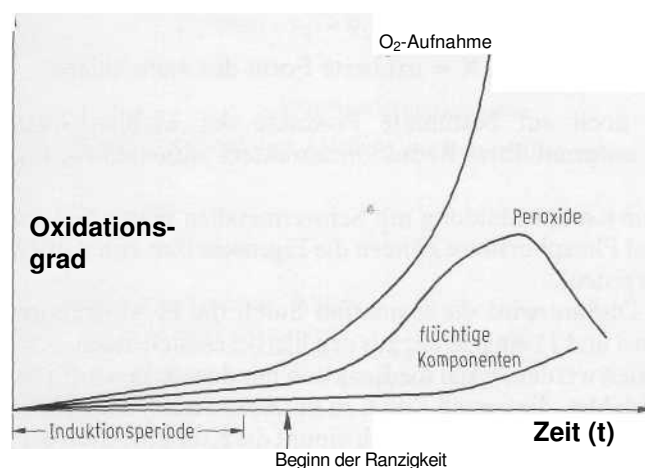
Der katalytische Effekt von HPP auf Fette nahm mit der Erhöhung des Druckes zu, während die Proteine stärker denaturierten. Dies könnte auf die Denaturierung von Myoglobin und Hämoglobin zurückgeführt werden, wobei Metall-Ionen (Eisen-Ionen) freigesetzt wurden (28).

Das hochdruckinduzierte von Okamoto et al. festgestellte Freisetzen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen des sarcoplasmatischen Retikulums durch den Verlust der Struktur der Myofibrillen kann einer der Gründe für die weiche Textur des Fleisches von Hasen sein (137).

### 2.3.2.2 Fette

Nahrungsfette und Nahrungsöle sind empfindlich gegenüber oxidativen Veränderungen. Die oxidative Empfindlichkeit steigt mit ihrem Anteil an ungesättigten Fettsäuren. Durch eine fortschreitende Oxidation der Nahrungsfette und -öle werden Lebensmittel genussuntauglich (14;16;23;33;34;47-49;63;69;117;123;129;140;155;168;189).

**Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Fettoxidation ( $\text{O}_2$ -Aufnahme), der Bildung von Hydroperoxiden und der Bildung flüchtiger Ranzigkeitsprodukte**

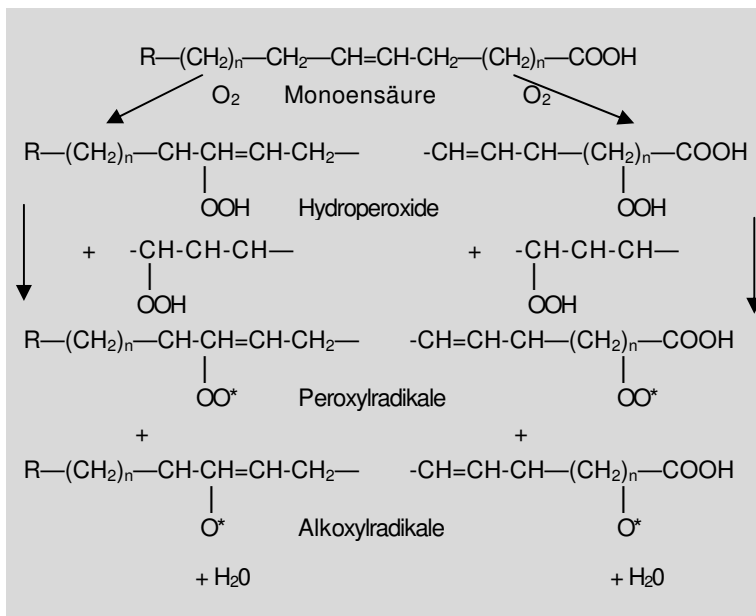


Quelle: (78)

Der Verlauf der Sauerstoffaufnahme ungesättigter Fettsäuren ist in Abbildung 4 dargestellt. Nach einer Induktionsperiode erfolgt verstärkt die Bildung von Peroxiden, die wiederum zu flüchtigen Komponenten wie Hexanal und Octanal abgebaut werden. Die Induktionsperiode nimmt mit zunehmender Anzahl von Doppelbindungen ab, d.h. die Induktionsperiode nimmt in folgender Reihe von Öl-, Linol- und Linolensäure ab. Die Oxidation der Fettsäuren wird autokatalytisch beschleunigt, weil die entstehenden Fettsäurehydroperoxide in Radikale zerfallen und dadurch die Gesamtreaktionen beschleunigen. Schwermetallspuren (Eisen, Kupfer und Cobalt) und Hämoglobin/Häminverbindungen können die Fettoxidation beschleunigen (78).

Die Oxidationsgeschwindigkeit der Fettsäuren steigt also mit der Anzahl der Doppelbindungen in einem Fettsäure-Molekül. Zum Beispiel ist das Verhältnis der Oxidationsgeschwindigkeiten der Methylester von Öl-, Linol- und Linolensäure zueinander: 1:12:24 (14).

Die Lipide werden bevorzugt an den  $\alpha$ -Methylgruppen, die den Doppelbindungen benachbart sind (Allylstellung), oxidiert. Die Oxidation der Doppelbindungen ist im Folgenden dargestellt:



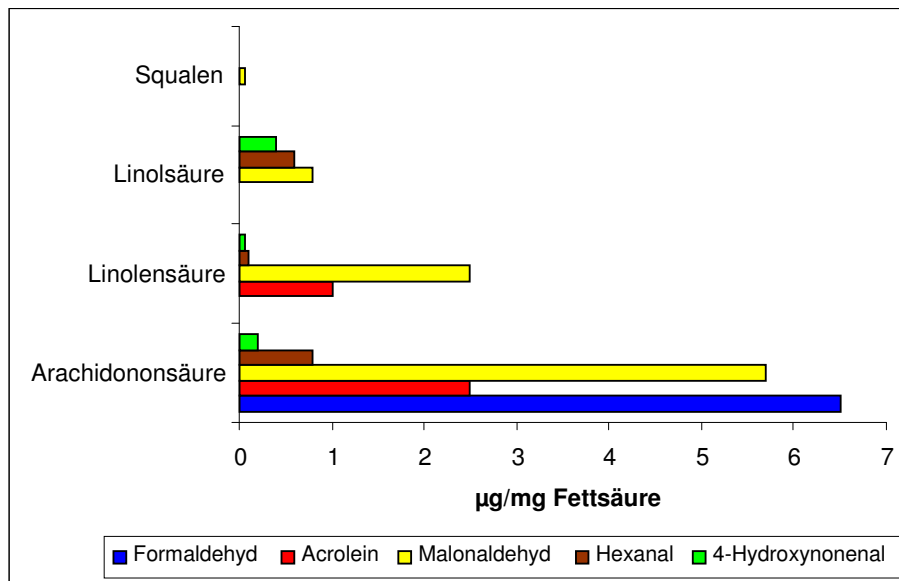
Die Anzahl der flüchtigen Verbindungen, die durch UV-Licht aus den Fettsäuren entstehen, und ihre jeweiligen Konzentrationen steigen mit der Anzahl der ungesättigten Bindungen der Fettsäuren an, wie in Abbildung 5 dargestellt (193).

### 2.3.2.3 Fettabbau

Die Fettoxidation bzw. der Fettverderb kann auf verschiedenen Wegen und nach unterschiedlichen Mechanismen – Autoxidation, thermale Oxidation, Photooxidation und durch Lipoxygenase verstärkte Oxidation – verlaufen (168).

Die Veränderungen der Lipide lassen sich in zwei voneinander unabhängige Fettverderbvorgänge unterteilen: die Hydrolyse und die Lipidperoxidation.

Abbildung 5: Flüchtige Verbindungen, gebildet aus Fettsäuren durch UV ( $\lambda = 350 \text{ nm}$ )



Quelle: (193)

### 2.3.2.3.1 Hydrolyse

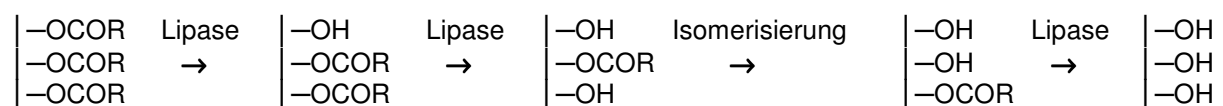
Bei der Hydrolyse werden Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt. Dies geschieht meist enzymatisch. Zur hydrolytischen Spaltung der Esterbindung ist Wasser als Reaktionspartner notwendig. Die hydrolytische Spaltung von Fettsäuren verläuft autokatalytisch. Das bedeutet, dass größere Wassermengen im Fett zur Zunahme der freien Fettsäuren führen, die ihrerseits bereits in geringen Mengen geschmacklich und geruchlich hervortreten können. Beispielsweise wird Fett mit 1 µg Caprylsäure oder 10 µg Caprinsäure pro Gramm durch einen seifigen Geschmack als verdorben empfunden.

Enzymatische Fettspaltung tritt besonders bei tierischen Fetten auf. Insbesondere sind hier Darmabputzfette zu nennen. Die **Lipase** ist in der Natur weit verbreitet. Dieses Enzym kommt in den Organen fast aller Tiere, in vielen Pflanzen wie z. B. im Ölsamen der Rizinus-Pflanze, in Bakterien und Pilzen vor. Die tierische Lipase unterscheidet sich von der mikrobiellen in ihren physiologischen Maxima (pH-Wert und in ihrer Aktivität) (19;172).

Die Lipase ist eine Hydrolase und katalysiert die Freisetzung der Fettsäuren aus Triglyceriden (14). Lipasen setzen bei Kontakt mit dem passenden Substrat Fettsäuren frei, die je nach Molekulargewicht mehr oder weniger stark sensorisch bemerkbar sind (14).

Abbildung 6: Hydrolyse mittels Lipase

Prinzip:



Quelle: (130)

Lipasen hydrolysieren Triglyceride zu Diglyceriden und freien Fettsäuren (Abbildung 6), wobei das letzte Glycerid in der Mittelstellung verbleibt und selten, sehr langsam oder überhaupt nicht abgespalten wird. Lipasen reagieren bevorzugt mit den emulgierten Fetten (19;172).

Das Wirkungsoptimum mikrobieller und bakterieller Lipasen liegt bei pH 7,0 und 37 °C. Die optimalen Reaktionsbedingungen sind aber sehr von der Herkunft der Lipase abhängig. Die Unterschiede gehen weiter bis zu den Inhibitoren und Aktivatoren. Beispielsweise wird tierische Lipase durch Calciumoleat, Albumin und Gallensalze (Cholate) aktiviert. Auf mikrobielle Lipase wirken Calcium-Ionen aktivierend, die Gallensalze aber nur in geringen Konzentrationen (19;172).

Die Lipase reagiert an der Grenzfläche zwischen Öltröpfchen und der wässrigen Phase. Deshalb spielt der Emulgierungsgrad eine wichtige Rolle für die wirksame Substratkonzentration (130).

#### 2.3.2.3.2 Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation lässt sich in die **Autoxidation** und die **Oxidation durch Lipoxygenasen** unterteilen. Bei der Lipidperoxidation werden ungesättigte Fettsäuren wie Öl-, Linol- und Linolensäure zu Hydroperoxiden oxidiert, die durch Folgereaktionen in eine Vielzahl von Verbindungen wie Hexanal und Octanal überführt werden können.

#### 2.3.2.3.3 Autoxidation

Die Geschwindigkeit der Autoxidation ist von der Fettsäurezusammensetzung, der Konzentration und Wirksamkeit von Pro- und Antioxidantien, der mit Sauerstoff in Berührung kommenden Oberfläche und den Lagerungsbedingungen wie Temperatur, Licht und dem Wassergehalt abhängig. Nach Ablauf der Induktionsphase steigt die Geschwindigkeit der Autoxidation in Abhängigkeit von der Zeit, was in Abbildung 4 dargestellt ist. Die Länge der Induktionsphase und die Oxidationsgeschwindigkeit hängen auch von der Fettsäurezusammensetzung des Fettes ab. Je mehr Allylgruppen in der Fettsäure vorkommen, desto kürzer ist die Induktionsphase und die Oxidation verläuft schneller (16).

Die Autoxidation besteht aus vier Stufen:

##### 1. Stufe: Radikalbildung

Bildung von Peroxy- ( $\text{RO}_2^\bullet$ ), Alkoxy- ( $\text{RO}^\bullet$ ) oder Alkyl- ( $\text{R}^\bullet$ ) Radikalen

Der Start des Fettabbaus beinhaltet die Abspaltung des Wasserstoffs durch ein Radikal, wie z. B. Hydroxylradikal, die meist an einer Doppelbindung der Fettsäure erfolgt. Die aus den Hydroperoxiden hervorgehenden Radikale können die Oxidation starten (193).

##### 2. Stufe: Radikalreaktion

- (1)  $\text{R}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO}_2^\bullet$
- (2)  $\text{RO}_2^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{R}^\bullet$
- (3)  $\text{RO}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{ROH} + \text{R}^\bullet$

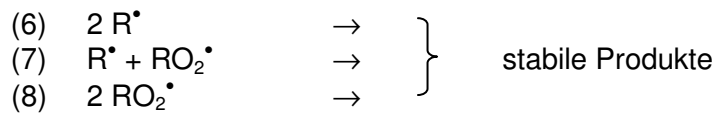
Das so an die Doppelbindung gebundene Hydroxylradikal kann mit Sauerstoff und mit weiteren Fettsäuren reagieren (193).

##### 3. Stufe: Radikalrückbildung

- (4)  $\text{ROOH} \rightarrow \text{RO}^\bullet + \text{OH}^\bullet$
- (5)  $2 \text{ROOH} \rightarrow \text{RO}_2^\bullet + \text{RO}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$

Das Ende der Reaktion wird durch die Bildung von stabilen und nicht reaktiven Endprodukten eingeleitet (193).

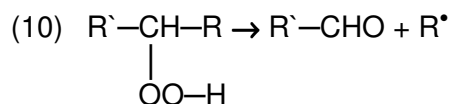
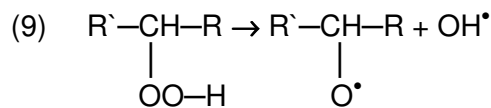
#### 4. Stufe: Radikalverlust



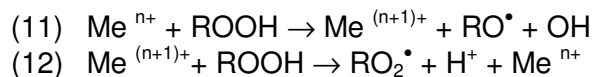
Die Reaktion Nummer (2) ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Diese Reaktion verläuft am langsamsten und bestimmt somit den Verlauf der nachfolgenden Reaktionen.

Die gebildeten Fettsäurehydroperoxide sind instabil und reagieren zu weiteren Reaktionsprodukten. Sehr stark verdorbene Fette weisen deshalb geringe Peroxidgehalte auf, aber dafür größere Mengen der Spaltprodukte der Fettsäurehydroperoxide. Die Spaltung kann auf vielen Wegen geschehen (14).

#### Hydroperoxidreaktionen



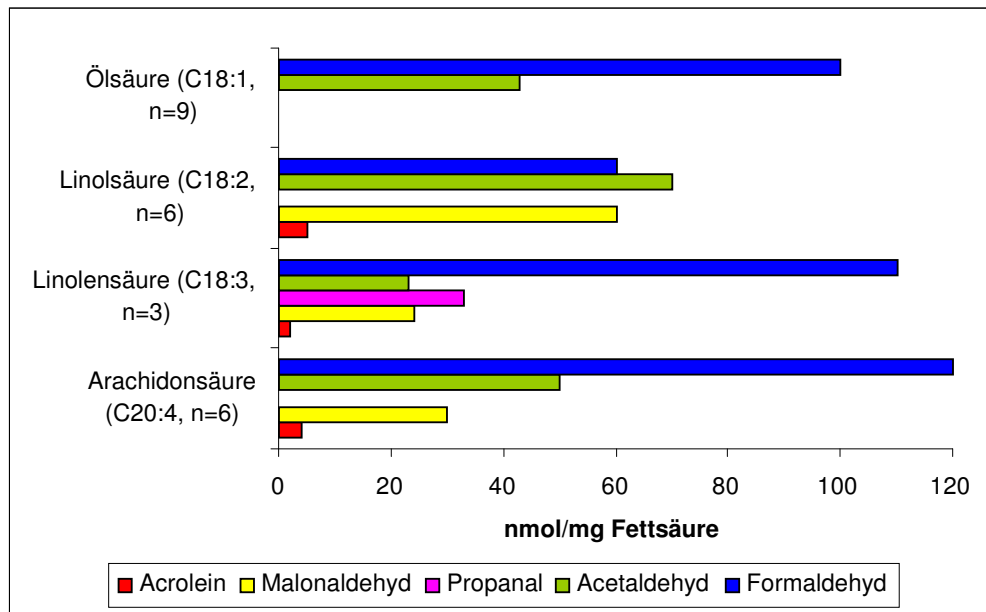
Metall-Ionen können bereits vorhandene Hydroperoxide unter Bildung von Radikalen zersetzen.



Somit wird die Autoxidation durch Metall-Ionen beschleunigt, die z. B. im Hämoglobin vorliegen und durch die Hochdruckbehandlung freigesetzt werden können (16). Diese Effekte wurden in Fisch und Fischmuskel beobachtet (27;93).

Auch in der Literatur (14) ist die Katalysatorwirkung von Ascorbinsäure beschrieben. Geringe Konzentrationen können den Hydroperoxid-Abbau beschleunigen, weil sie den reduzierenden Zustand der Metall-Ionen aufrechterhalten.

Die Autoxidation ist der am besten untersuchte Prozess des Fettabbaus. Die ersten Oxidationsprodukte sind Lipidhydroperoxide, welche durch Umlagerung und Cyclisierung (Ringbildung) zu Hydroperoxiepiden und Bicycloendoperoxiden reagieren. Diese Produkte sind relativ instabil und können zu einer Vielzahl von Folgereaktionsprodukten zerfallen, zu denen Carbonyle, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren und Ester, Hydroxysäuren, Alkane und Alkohole zählen. Die Bildung von Malondialdehyd ist ein wichtiger Marker und ein Indiz für den Fettabbau. Von Wong et al. wurde postuliert, dass Malondialdehyd aus den Zwischenschritten der Bicycloendoperoxide gebildet wird, welche in viele niedermolekulare Carbonylverbindungen zerfallen. In Abbildung 7 sind die flüchtigen Verbindungen, die aus Fettsäuren durch den Zusatz an Fenton's Reagenz – eines Radikals – gebildet wurden, dargestellt (193).

**Abbildung 7: Flüchtige Verbindungen, gebildet aus Fettsäuren durch Zusatz von Fenton's Reagenz**

Quelle: (193)

Die bei der Autoxidation primär gebildeten Hydroperoxide sind geruch- und geschmacklos und haben keinen Einfluss auf die sensorische Qualität der Öle bzw. Fette. Diese ändert sich erst, wenn die Hydroperoxide zersetzt werden. Dies kann über unterschiedliche Reaktionen geschehen. Dabei entstehen flüchtige Verbindungen, meist Aldehyde unterschiedlicher Kettenlänge. Aus Ölsäure entstehen hauptsächlich Aldehyde mit 8 oder 9 C-Atomen (Octanal, Nonanal), aus Linolsäure Aldehyde mit 5 bis 10 C-Atomen, die teilweise ungesättigt sind (z. B. Hexanal, 2-cis-2-trans-Octenal). Aus  $\alpha$ -Linolensäure entstehen vor allem ungesättigte Aldehyde (z. B. 2-trans, 4-cis-Heptadienal), die z. T. einen besonders intensiven Geruch aufweisen. Der leichte Verderb  $\alpha$ -linolensäure-reicher Produkte ist folglich nicht nur durch die geringe Oxidationsstabilität dieser Fettsäure, sondern auch auf die schon in Spuren wahrnehmbaren flüchtigen Aldehyde zurückzuführen (112).

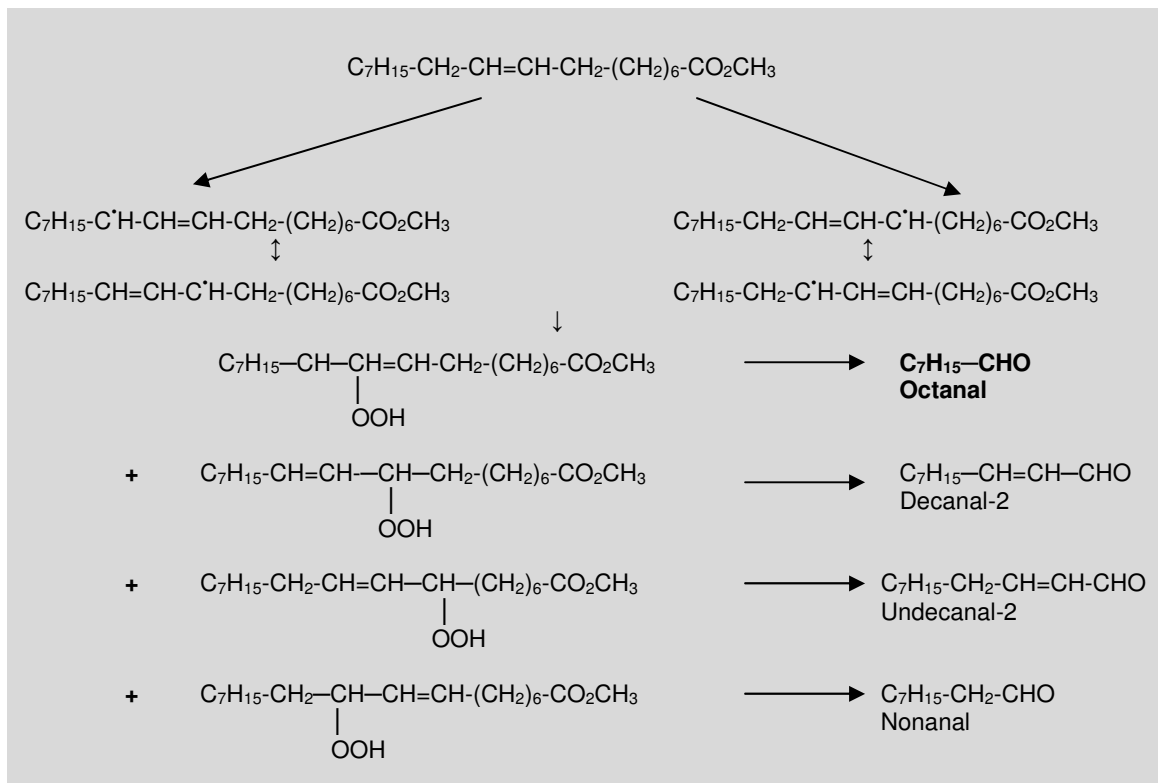
Die Instabilität der bei der Autoxidation gebildeten Hydroperoxide erklärt, warum diese Verbindungen nur zu Beginn des Fettverderbs nachweisbar sind (s. Peroxidzahl). Ein fortgeschrittenes Stadium lässt sich durch die gaschromatographische Analyse der Sekundärprodukte nachweisen. Als Indikatoren für die Linolsäureoxidation können z. B. die Gehalte an Pentanal, Hexanal und Malondialdehyd bestimmt werden (112).

#### 2.3.2.3.3.1 Autoxidation der Ölsäuremethylester

Die Fragmentierung bzw. Bildung von geruchsaktiven Aldehyden aus isomeren Hydroperoxiden der Ölsäure ist wie folgt dargestellt (14).



## Reaktionsmechanismus der Autoxidation der Ölsäure (14):



Zu den Spaltprodukten, die aus der Autoxidation der Ölsäure hervorgehen, gehört Octanal (16).

## 2.3.2.3.2 Autoxidation der Linolsäuremethylester

Während der Autoxidation von Linolsäuremethylester werden bevorzugt 9- und 13-Hydroperoxide gebildet, weil die Doppelbindungen des diallylischen Systems bevorzugt an den Kohlenstoffatomen 9 und 13 durch den Sauerstoff angegriffen werden. Die gebildeten Hydroperoxide sind instabil und zerfallen in Folgeprodukte. Zu den Folgeprodukten gehört unter anderem Hexanal (168).

Bei der Photooxidation werden alle vier Hydroperoxide aus der Linolsäure – 9-, 10-, 12- und 13-Hydroperoxide – zu ca. 35, 15, 15 und 35 % gebildet (168).

Hexanal kann sowohl aus 9- und 13-Hydroperoxiden der Linolsäure als auch aus anderen ungesättigten Aldehyden, die während der Linolsäureoxidation entstehen, gebildet werden. 2,4-Decadienal wird in geringeren Mengen als Hexanal gebildet, weil es aus 9-Hydroperoxyoctadeca-10,12-dienoic Säure entsteht (168).

Eine Zusammenfassung über die prozentuale Bildung von Hexanal und anderen Linolsäureoxidationsprodukten ist in den folgenden Tabellen (Tab. 3 und Tab. 4) dargestellt (78;168).

Bildung und Entstehung von Hexanal aus Linolsäure (16;185):

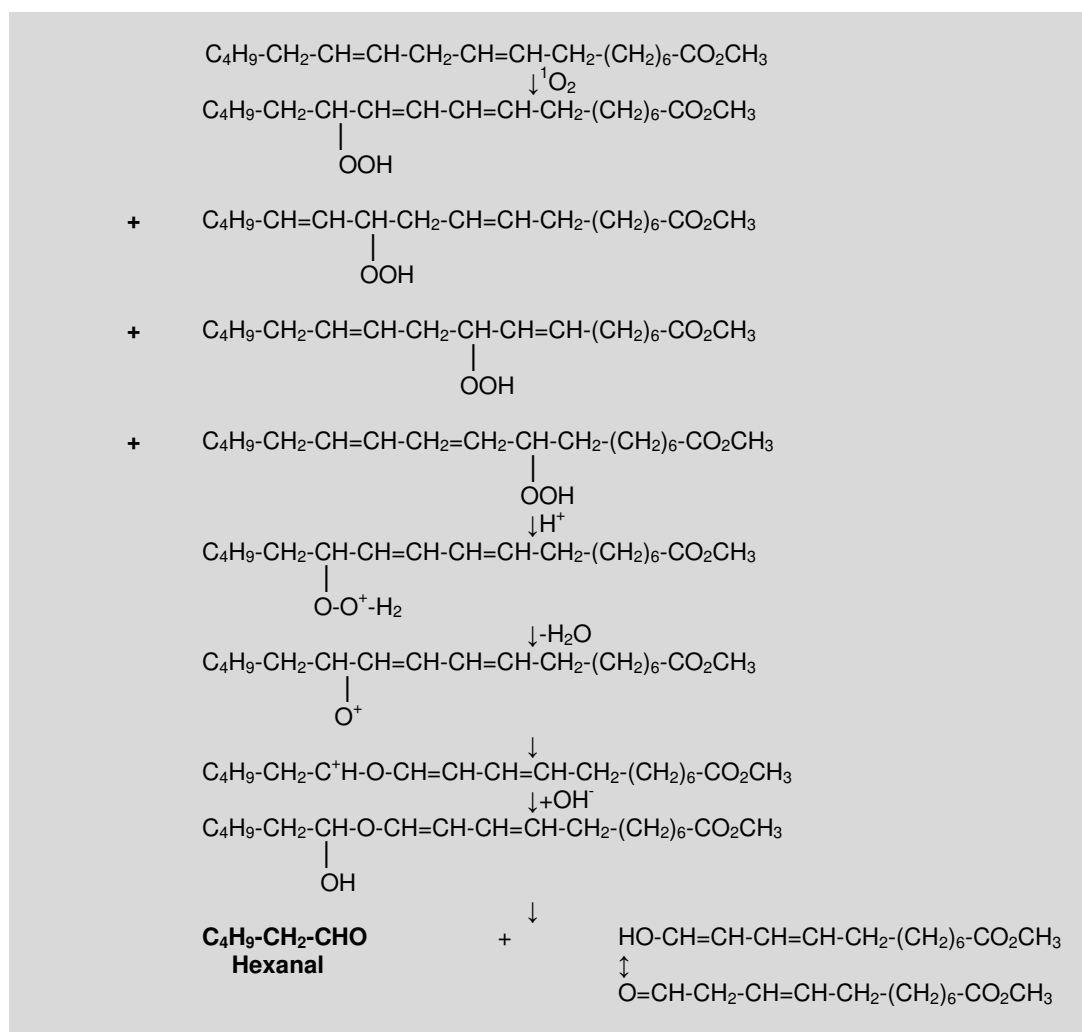


Tabelle 3: Flüchtige Verbindungen in %, gebildet während der Linol- und Linolensäureoxidation

Verbindung	gebildet aus Linolsäure (%)		gebildet aus Linolensäure (%)	
	Autoxidation	Photooxidation	Autoxidation	Photooxidation
Ethan	-	-	10,0	3,2
Propanal	-	-	7,7	9,0
2-Butenal	-	-	0,5	11,0
Pentan	9,9	4,3	-	-
Hexanal	<b>15</b>	<b>17</b>	-	-
2-Heptenal	-	9,9	-	-
2,4-Heptadienal	-	-	9,3	8,8
2,4-Decadienal	14	4,3	-	-
Decatrienal	-	-	14,0	4,8
andere	61,5	64,5	58,5	63,2

Quelle: (168)

**Tabelle 4: Bildung geruchsaktiver Aldehyde aus isomeren Hydroperoxiden ungesättigter Fettsäuren**

Fettsäure	Stellung der Hydroperoxidgruppe	gebildeter Aldehyd
Ölsäure	c11	Octanal
	c8	2-Undecenal
	c9	Decanal
	c9	2-Decenal
	c10	Nonanal
Linolsäure	c13	Hexanal
	c9	2,4-Decadienal
	c11	2-Octenal
	c12	2-Heptenal
Linolensäure	c16	Propanal
	c14	2-Pentenal
	c12	2,4-Heptadienal
	c13	3-Hexenal
	c11	2,5-Octadienal
	c9	2,4,7-Decatrienal

Quelle: (78)

Es sind wenig Linol-, Linolen- und Arachidonsäure im Schweinefleisch und Speck bzw. in der Mettwurst vorhanden, wie aus der Tabelle 5 zur Fettsäurezusammensetzung vom Schweineschmalz und Schweinefleisch ersichtlich ist.

C<sub>18:1</sub> – Ölsäure – kommt zu 40 bis 50 % im Schweinefleisch und Schweinefett vor, und als Abbauprodukt der Autoxidation dieser Ölsäure wird Octanal gebildet.

Hexanal ist ein Produkt der Autoxidation der Linolsäure. Die Linolsäure kommt zwischen 5 bis 12 % im Schweineschmalz und zu ca. 6,5 % im Fett aus dem Schweinefleisch vor. Diese 6,5 % Linolsäure aus dem Fett des Schweinefleisches sind nur ca. 0,1 % des Gesamtfleisches, was ein sehr geringer Anteil ist im Vergleich zu Ölsäure mit 40 bis 50 % im Fett und Schmalz bzw. 0,8 % im gesamten Schweinefleisch.

**Tabelle 5: Fettsäurezusammensetzung von Schweineschmalz und Schweinefleisch**

FS	Nahrungsfette und -öle in Schweineschmalz (%)	Zusammensetzung laut Lebensmittel-nährwerttabellen 1989/90 in Schweineschmalz (%)	Zusammensetzung laut Lebensmittel-nährwerttabellen 1989/90 im Schweinefleisch (%)	Zusammensetzung laut Lebensmittel-nährwerttabellen 1989/90 im Schweinefett aus Fleisch (%)
C14	> 4	0,9	0,03	1,49
C16	20-30	22,9	0,42	25,00
C16:1	5-11	3,8	0,08	4,76
C18	10-25	13,3	0,21	12,50
C18:1	40-50	41,1	0,81	48,21
C18:2	5-12	8,6	0,11	6,55
C18:3		1,0	0,03	1,49
C20		0,0	0,0	0,0
C20:4		1,7	0,0	0,0

Quellen: (23;171)

#### 2.3.2.3.4 Oxidation durch Lipoxidase/Lipoxygenase

Sehr stark wird der Sauerstoffangriff von Fettsäuren durch Haemin und Cytochrome gefördert (14;16;19;23;33;48;49;117;140;155;172;181;193).

Lipoxygenasen können Sauerstoff auf Fettsäuren übertragen. Die Spezifität der Lipoxygenasen erstreckt sich auf:

1. cis-cis-1-4-Pentadien-Strukturen
2. Doppelbindungen in  $\omega$ -6,  $\omega$ -9 oder  $\omega$ -12 vom  $\text{CH}_3$ -Ende gezählt.

Diese Voraussetzungen sind bei der Linol-, Linolen- und Arachidonsäure gegeben (14).

Technologische Herstellungsprozesse können die Flavour- und Off-Flavour-Effekte beeinflussen. Die Oxidation in der Dunkelheit während der Lagerung führt zu anderen Oxidationsprodukten als die unter Fluoreszenzlicht oder in gefrorenen Fetten. Bei Anwesenheit von Geweberesten aus der Fettpressung und ausreichender Feuchtigkeit wird die Hydrolyse verstärkt (168).

Beim Vorhandensein von Lipoxygenase-Enzymen in pflanzlichen und tierischen Fetten kann es zur Bildung von stereoselektiven Verbindungen mit unterschiedlicher Off-Flavour-Aktivität kommen. Die sekundäre Oxidation dieser Produkte der Lipoxygenaseoxidation führt zu Aldehyden, die das Aroma der Lebensmittel beeinflussen (168).

Die sekundären Oxidationsprodukte der Lipoxygenaseoxidation hängen vor allem von den Fettsäuren, wie z. B. omega-3, omega-6 und omega-9, aus denen sie gebildet werden, ab. Die Oxidation der omega-6-Fettsäuren führt zur Bildung von Hexanal, die der omega-3-Fettsäuren zur Propanalbildung (168).

In Pflanzen sind zwei Typen des Enzyms Lipoxygenase zu unterscheiden: Lipoxygenase Typ I und Typ II. Typ I Lipoxygenase setzt nur freie Fettsäuren um. Solche Enzyme bilden aus Linolsäure entweder das 9- oder das 13-Hydroperoxid. Die Typ II Lipoxygenase wirkt mehr als Katalysator der Autoxidation. In der folgenden Tabelle 6 sind die pH-Optima und die Peroxidierungsspezifität der Lipoxygenase dargestellt (16).

**Tabelle 6: Vorkommen und Eigenschaften von Lipoxygenase**

Lebensmittel	pH-Optimum	Peroxidierungsspezifität gegenüber Linolsäure, 9- bzw. 13-LOOH		
		9-LOOH (%)	13-LOOH (%)	Typ
Sojabohne, L-1	9,0	5	95	I
Sojabohne, L-2	6,5	50	50	II
Erbse, L-2	6,5	50	50	II
Erdnuss	6,0	0	100	I
Kartoffel	5,5	95	5	I
Tomate	5,5	95	5	I
Weizen	6,0	90	10	I
Gurke	5,5	75	25	
Apfel	6,0	10	90	
Erdbeere	6,5	23	77	
Stachelbeere	6,5	45	55	II

Quelle: (16)

Umgekehrt ist aber nur bei einer eindeutigen Verteilung wie 90 % zu 10 % oder besser bei 95 % zu 5 % zwischen dem 9- oder dem 13-Hydroperoxid eine Aussage über die Aktivität von der Typ I Lipoxygenase möglich. Alle anderen Verteilungen führen zur Spekulation über eine Typ I und Typ II Lipoxygenase-Beteiligung oder die Autoxidation.

Zusammenfassend kann die Autoxidation der Fette in vier Teilschritte unterteilt werden, die alle radikalisch ablaufen und im Abschnitt 2.3.2.3.3 näher erläutert sind. Die primären Produkte der Autoxidation – Hydroperoxide – sind geschmack- und geruchlos. Diese Veränderungen können beispielsweise durch den Anstieg der Iodzahl (IZ) oder der Peroxidzahl

(POZ) gemessen werden. Bei den Autoxidationsprodukten, die das Aroma negativ beeinflussen, handelt es sich um Aldehyde (Octanal, Hexanal, Propanal). Hexanal wird aus 18:2 $\omega$ 6, 18:3 $\omega$ 6 und 20:4 $\omega$ 6 gebildet, Octanal aus 18:1 $\omega$ 9 und Propanal aus 18:3 $\omega$ 3, 20:5 $\omega$ 3, 22:6 $\omega$ 3. Die einzelnen Bildungsschritte von Hexanal und Octanal sind im Abschnitt 2.3.3.3.1 und 2.3.3.3.2 dargestellt (168).

Diese Carbonylverbindungen führen selbst in geringen Konzentrationen zu sensorisch wahrnehmbaren Veränderungen und somit zur Un genießbarkeit dieser Lebensmittel (168).

Flüchtige Aldehyde, die während der Oxidation von Fetten gebildet werden, können wichtig für das Aroma und damit den Geschmack der Lebensmittel sein. Aldehyde mit niedrigen molekularen Gewichten wie Formaldehyd, Acetaldehyd, Malonaldehyd, spielen eine große Rolle in der Bewertung der Lebensmittelqualität. Hinzu kommt ihre wichtige physiologische und biochemische Rolle wegen der Reaktivität dieser Verbindungen mit nukleophilen Reaktionspartnern, wie Nucleinsäuren, Aminosäuren und Proteinen durch die elektrophilen Eigenschaften der niedermolekularen Aldehyde (193).

In solchen Matrices wie Lebensmittel werden aus Carbonylverbindungen (Aldehyden, Ketonen) die heterocyclischen Aromakomponenten mit Aminosäuren und Proteinen gebildet (193).

Die Oxidation von Membranen und Fetten spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Bildung von Aldehyden in gekochten Lebensmitteln. Formaldehyd und Acrolein wurden in verschiedenen Lebensmitteln, wie gesalzenem Schweinefleisch, Makrelen und weißem Brot nachgewiesen. Die Anwesenheit von Malondialdehyd konnte in vielen Fetten und fettreichen Produkten bestätigt werden (193).

Tangwongchai et al. haben die Aktivität der kommerziell erhältlichen Sojabohnenlipoxygenase in Abhängigkeit von der Hochdruckbehandlung untersucht. Die Lipoxygenase wurde in 0,2 M Tris-Puffer gelöst und einer Hochdruckbehandlung von 0,1; 200; 400 und 600 MPa für 20 Minuten unterzogen. Das Enzym war bei Atmosphärendruck (0,1 MPa) oberhalb von pH 5 bis pH 9 stabil. Im Citrat-Puffer war das Enzym zwischen pH 5 bis pH 8 bis zu 200 MPa stabil. Aber mit steigendem Druck verschob sich der pH-Bereich, in dem die Lipoxygenase stabil war, auf 7 bis 8. Das Enzym verlor die gesamte Aktivität nach einer Hochdruckbehandlung bei 600 MPa für 20 Minuten in beiden Puffern (90;174).

#### 2.3.2.3.5 Fettveränderungen durch HPP in realen Lebensmitteln

In Lebensmitteln ist die Autoxidation sehr wichtig. Die Radikalbildung aus neutralen Molekülen (Initialisierung der Fettoxidation) wie ungesättigten Fettsäuren soll durch Hochdruckbehandlung verhindert werden, während die Folgeschritte nach der Radikalbildung gefördert werden. Die Effekte der Hochdruckbehandlung in realen Lebensmitteln sind komplexer als in Fettmodellsystemen. Die Behandlung von Sardinenöl führte zum Anstieg des Fettverderbs, der zur Dauer der Behandlung und der Druckhöhe proportional war. Die Autoxidation von Linolensäure unter Hochdruck ist sehr komplex. Eine Behandlung mit 350 MPa führte zu mehr primären Oxidationsprodukten als unter Atmosphärendruck. Der Nachweis erfolgte über die Bildung von konjugierten Dienen mit einem Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 234$  nm. In der folgenden Tabelle 7 ist die Abnahme der Linolensäure nach unterschiedlicher Behandlungszeit und mit unterschiedlichem Druck aufgeführt (176).

**Tabelle 7: Linolensäurekonzentration nach unterschiedlicher Behandlungsdauer**

Dauer (h)	0,1 MPa (%)	350 MPa (%)	600 MPa (%)
1	99	80	91
3	76	73	89
21	52	72	80

Quelle: (176)

Die Bildung sekundärer Oxidationsprodukte während gekühlter Lagerung von vakuumverpacktem Putenfleisch war abhängig von der Höhe des eingesetzten Druckes (Druck bis zu 500 MPa bei 10 °C) und von der eingesetzten Behandlungszeit (Behandlungsdauer von 10 und tschüss 30 Minuten) (38).

Hochdruckbehandlung bei 400 MPa und niedrigeren Drücken für 10 und 30 Minuten führte während einer Lagerung von sechs Tagen bei 5 °C zu geringerer Hydroperoxidbildung gemessen als Thiobarbitursäure-Zahl als die thermische Behandlung bei 100 °C für 10 Minuten im Gegensatz zur Hochdruckbehandlung bei 500 MPa und 30 min, die während der späteren Lagerung bei 5 °C eine analoge Bildung von TBARs wie die thermische Behandlung bei 100 °C für 10 Minuten zeigte (38).

Die Bildung von TBARs während der Lagerung bei 5 °C ist exponentiell abhängig vom Behandlungsdruck bei beiden Behandlungszeiten (10, 30 min) und offensichtliche Aktivierungsvolumina wurden als Parameter für die Quantifikation der Hochdruckeffekte auf die Fettoxidation im Fleisch während der späteren Lagerung verwendet (38).

Es wurden keine signifikanten Zunahmen der Oxidationsraten im bei 300 MPa behandelten Hackfleisch nachgewiesen, aber oberhalb der Grenze von 300 MPa stieg die Oxidationsgeschwindigkeit mit der Intensität von HPP an. Hackfleischproben, die unter Luft (ohne Schutzgas) behandelt wurden, hatten zu Anfang höhere TBA-Werte als die unter Stickstoff behandelten. Solche Proben oxidierten aber während der Lagerung schneller als die nicht hochdruckbehandelten (28).

Fischfette enthalten viele ungesättigte Fettsäuren, die schnell oxidiert werden können. Ungesättigte Fettsäuren sind sehr anfällig für die Autoxidation und den oxidativen Abbau von Fetten in Lebensmitteln während der Lebensmittelherstellung und Lagerung. Wenn extrahiertes Sardinenöl hochdruckbehandelt (bis zu 506 MPa, 60 min) wurde, führte dies zu keiner Veränderung der POZ und TBA. Wenn andererseits Dorschmuskel mit HPP (202, 404 und 608 MPa, für 15 und 30 min) behandelt wurde, nahmen die POZ und die TBA der aus dem Muskel extrahierten Öle mit der Steigerung des Drucks und der Behandlungsdauer zu. Die POZ der hochdruckbehandelten und gekühlten Dorschmuskelproben war höher als die der nicht behandelten und gekühlten Proben. Die Zunahme der POZ durch HPP wurde ebenfalls bei Makrelenmuskeln beobachtet. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass isoliertes Fischfett gegen Autoxidation unter HPP (bis zu 608 MPa) relativ stabil ist, aber die Oxidation der Fette im Fischmuskeln durch HPP beschleunigt wurde (135).

Die Auswirkung von HPP (400 MPa) auf die oxidative Stabilität von Serano-Schinken zeigte die höchste Konzentration an TBARs nach 39 Tagen Lagerung (41). Im Serano-Schinken förderte Hochdruck ab 200 MPa die Radikalbildung und somit die Fettoxidation, was mittels ESR (spin-trapping) bzw. durch die Zunahme der Hexanalbildung nachgewiesen werden konnte (8).

Wie in Versuchen mit Hähnchenbrust ermittelt, förderte HPP ab 400 MPa, insbesondere ab 600 MPa, die Bildung von Hexanal, Octanal und Nonanal. Die Hochdruckbehandlung begünstigte die Entstehung sekundärer Oxidationsprodukte (8;51;57).

Die Lagerung hat einen signifikanten Einfluss auf die Bildung von Oxidationsprodukten, vor allem bei Anwesenheit von Sauerstoff in der Verpackung. Hexanal, Octanal und Nonanal wurden als Lipidoxidationsprodukte identifiziert und können als „press-over-flavour“ Indikatoren eingesetzt werden. Hexanal zeigte gute Korrelation mit TBARs (51).

Während der Lebensmittelherstellung spielen die Enzyme in manchen Lebensmitteln eine sehr wichtige Rolle, weil sie an Reaktionen beteiligt sind, die zur Verbesserung der Qualität der Endprodukte führen, wie beispielsweise bei Früchten (4).

Es wurden viele Studien zur Inaktivierung von Enzymen in Fruchtprodukten durchgeführt. Die Polyphenoloxidase ist zum Beispiel bis zu 1200 MPa und einer Behandlungszeit von 10 Minuten resistent. Sie ist bei höheren pH-Werten sensitiver (93;98).

Die Auswirkung von Hochdruck auf Mikroorganismen und Enzyme verknüpft mit niedriger Wasseraktivität, superkritischem CO<sub>2</sub>, Vorbehandlung mit Biopolymeren wie Chitosan oder Enzymen (Lysozyme, Glucoseoxidase) und Ethanol, Natriumsulfit und einigen anderen Zusätzen oder Bedingungen wurden studiert und analysiert (13;93;98;106;180).

Die Anwendung von HPP bei Lebensmitteln kann zur Inaktivierung oder zur Aktivierung von Enzymen oder Verbesserung der Enzymaktivität in diesen führen (82).

Die Inaktivierung von Enzymen durch HPP ist auf zwei Wegen möglich:

1. Veränderung der intramolekularen Struktur, d.h. des Reaktionszentrums
2. Änderungen in der Struktur der aktiven Seite der Enzyme und/oder in dem Enzym-Substrat-Zusammenspiel (83;139).

Zur Enzyminaktivierung sind hohe Drücke bei der HPP-Behandlung notwendig. Bei der Inaktivierung unter niedrigeren Drücken kann es sich um reversible Konfigurations- und Konformationsänderungen handeln. Es wurden bereits Versuche mit Katalase, Phosphatase, Lipase, Pectinesterase, Lipoxygenase, Peroxidase, Polyphenoloxidase und Lactoperoxidase durchgeführt. Die Peroxidase ist das druckstabilste Enzym. Nach einer Behandlung von 600 MPa bei 60 °C über 30 min sind 90 % der Enzymaktivität von Peroxidase erhalten geblieben (139).

Die Anfälligkeit für HPP-Inaktivierung bei einer Behandlung zwischen 100 bis 300 MPa von Enzymextrakten vom Pomatomas saltatrix (Korallenblaufisch) und Semicossyphus pulcher (Rotfisch/Fettkopffisch) wurde bewertet und verglichen. Fischenzyme waren empfindlicher für HPP-Inaktivierung als die entsprechenden Enzym-Gegenstücke von Säugetieren. Frisches Fischmuskelfleisch wurde ebenfalls ähnlichen Drücken ausgesetzt und die Farb- und Textur-Parameter in Abhängigkeit von HPP für die Kontrolle der Texturverschlechterung frischer Seeprodukte ermittelt. Die erzielten Ergebnisse erhärteten die Vermutung, dass die Hochdruckbehandlung als Lebensmittelbehandlungstechnik zur Kontrolle der Textur von Seeprodukten eingesetzt werden kann (10).

Lipoxygenase spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von flüchtigen Verbindungen in vielen pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln. Dieses Enzym baut Linol- und Linolensäure zu Hexanal und cis-3-Hexenal ab. cis-3-Hexenal wird in das stabilere trans-2-Hexenal umgewandelt (174). Die Aktivierung der Lipoxidase durch HPP führt zu mehr Oxidationsprodukten von Fettsäuren. Die Fettzusammensetzung verändert sich dadurch und es liegen mehr unerwünschte Stoffe vor (68).

Es gibt HPP-sensitive und HPP-tolerante Enzyme. Lipoxygenase gehört zu den hochdrucksensitiven Enzymen, ihre Aktivität nimmt nach 2 min bei 600 MPa im Tris-Puffer pH 7 und Sojamilch bei 25 °C ab und eine komplette Inaktivierung findet in Tris-Puffer nach 10 min bei 600 MPa bei 25 °C statt. Die Inaktivierung der Lipoxygenase kann in einer Reaktion erster

Ordnung erklärt werden. Im Temperaturbereich von 10 bis 64 °C war die Lipoxygenase nicht resistent gegen HPP (174).

Zusammenfassend ist feststellbar, dass HPP die Kinetik von Enzymreaktionen beschleunigen oder verlangsamen kann. Die Enzymaktivierung hängt von dem Medium (pH-Wert), der Temperatur und der Dauer der Behandlung ab. Enzyme können nach ihrer Sensitivität gegenüber HPP geordnet werden. Lipoxygenase ist ein hochdruck-sensitives Enzym.

#### 2.3.2.4 Zusatzstoffe

Die Zusatzstoffzulassungsverordnung regelt in Deutschland die Zulassung, Kennzeichnung und die Höchstmengen von Zusatzstoffen. Zu diesen Substanzen zählen auch Konservierungsstoffe. Zugelassen sind beispielsweise:

- Sorbinsäure, ihre Natrium-, Kalium- und Calciumsalze
- Benzoesäure und ihre Natrium-, Kalium- und Calciumsalze
- p-Hydroxybenzoesäureethylester, -methylester, und -n-propylester (PHB-Ester) sowie ihre Natriumverbindungen
- für spezielle Anwendungsgebiete schweflige Säure, Thiabendazol und Natamycin (105)
- Propionsäure

Zur chemischen Lebensmittelkonservierung gehören Kochsalz, Wasserstoffperoxid, Ethylalkohol, Saccharose, Nitrit, Räucherrauch, organische Säuren und noch viele weitere Stoffe (105).

Bei der Herstellung der frischen Zwiebelmettwurst werden Citrat (als Natriumsalz), Ascorbinsäure, Nitritpökelsalz und Gewürze eingesetzt.

Der Zusatz von **Zitronensäure** zu ausgelassenem Schweinefett hemmte die Zunahme der Oxidationsgeschwindigkeit bei der Hochdruckbehandlung (650-800 MPa). Dies deutet darauf hin, dass Übergangsmetallionen wahrscheinlich aus den Komplexen herausgelöst werden und fähig sind, die Lipidoxidation in dem hochdruckbehandelten Fett zu katalysieren. Dagegen war die Zitronensäure im Hackfleisch und in gewaschenen Fasern weniger effektiv in der Hemmung der Oxidation in den hochdruckbehandelten Proben wegen des erniedrigenden Effekts auf den pH-Wert (29).

**EDTA** [Natriumsalz] (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) war ein effektives Antioxidanz in den hochdruckbehandelten Hackfleischproben (400 und 800 MPa). Dies deutet darauf hin, dass durch Hochdruckbehandlung Ionen aus den Komplexen herausgelöst werden und die Lipidoxidation katalysieren (Metallkatalyse) (29).

Die Fettoxidation von pasteurisierter (300 und 500 MPa für 30 min bei 20 °C) oder gekochter (90 °C für 15 min) gehackter Hähnchenbrust oder Brät wurde bewertet. Mechanische Herstellung, vor und nach der Pasteurisierung und dem Kochen, und der Zusatz von **Kochsalz** wurden als oxidationsfördernde Schritte bewertet. Am 1., 3., 6. und 9. Tag nach der Lagerung bei 4 °C wurden TBARs mittels TBAR-Test und die Hexanalkonzentration mittels SPE-GC quantifiziert. Im Allgemeinen wiesen die hochdruckbehandelten Proben weniger Oxidationsprodukte auf als die gekochten. Tendenziell stiegen TBARs und Hexanalkonzentration mit der Lagerdauer. Beide Parameter zeigten ähnliche Muster während des Experiments. Unbehandeltes Brät enthielt mehr Oxidationsprodukte als hochdruckbehandeltes Brät. Salz und mechanische Verfahren hatten somit einen größeren prooxidativen Effekt als HPP auf die Proben (17).



Der Zusatz von Salz förderte die Radikalbildung (Bestimmung mittels ESR) durch HPP in Hähnchenbrust und insbesondere in Hähnchenkeulen (26).

Natriumchlorid (5 %) und einige **Antioxidantien** (400 mg/kg **Rosmarin-Extrakt**; 2000 mg/kg **Acerola-Extrakt**; 50 mg/kg EDTA; 1000, 2000 und 5000 mg/kg Natriumhexametaphosphate oder 5 und 10 % Eiweißpulver) wurden gehacktem Hähnchenfleisch zugesetzt (17;18).

Rosmarin-Extrakt war ein Antioxidanz für hochdruckbehandelte Proben, hatte aber einen geringen Einfluss auf das gekochte Lebensmittel (Hähnchenhackfleisch). Acerola-Extrakt war kein effektives Antioxidanz, aber EDTA verhinderte stark die Oxidation bei HPP-Proben. Hexametaphosphate wiesen ebenfalls antioxidative Fähigkeiten auf. Eiweißpulver verhinderte Hexanalbildung. Der Einsatz von Eibestandteilen bei HPP könnte ein neuer Weg zur Minderung der flüchtigen Oxidationsendprodukte sein (18). Rosmarin-Extrakt kommt als Antioxidanz wegen des Eigengeschmacks für Mettwurst nicht in Frage.

Einige dieser Mischungen wurden unter Zusatz von Wasser hergestellt (1:3) bei 15 000 rpm für 30 sec. und 20 °C. Diese Proben wurden pasteurisiert bei 300, 500 und 900 MPa für 30 min bei 20 °C oder gekocht bei 90 °C für 15 min (18).

Hexanal wurde nach 1, 3, 6 und 9 Tagen Lagerung (luftexponiert und bei 4 °C) mithilfe von SPME (solid phase microextraction) GC-FID quantifiziert. Die Hexanalkonzentrationen stiegen mit der Hochdruckbehandlung und Lagerdauer. Gekochtes Brät hatte eine höhere Hexanalkonzentration als Proben, die bei 300 MPa behandelt wurden, aber niedrigere als die bei 500 und 900 MPa behandelten (18).

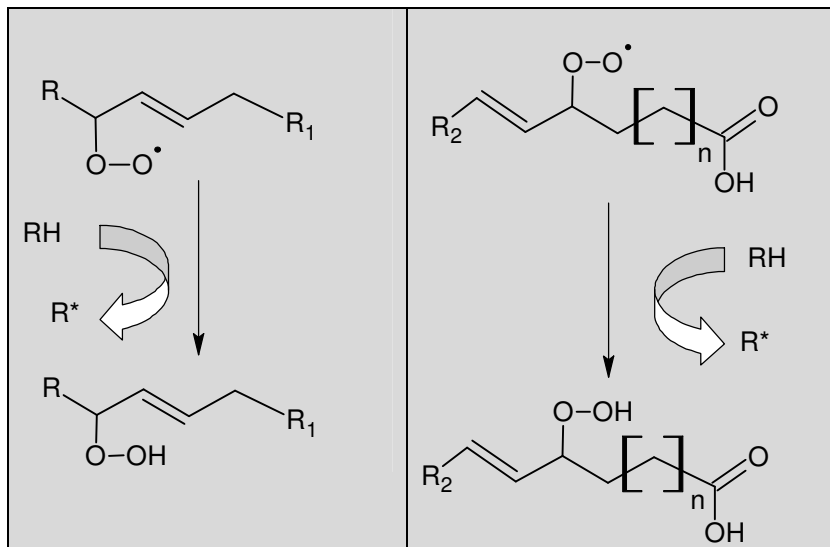
#### 2.3.2.5 Fettbegleitstoffe: Tocopherole

Die Tocopherole sind wichtige antioxidativ wirksame Substanzen, die den Fettverderb durch die Verlängerung der Induktionsphase verlangsamen, aber diesen nicht verhindern können. Die Wirkungsweise der Antioxidantien ist in Abbildung 8 dargestellt (35;170;192).

Vitamin E ist ein natürliches Antioxidanz in frischer Mettwurst und ein wichtiger Inhaltsstoff. Im Muskelfleisch des Schweins sind 0,1 mg und im Schweineschmalz 1,8 mg Gesamtocopherole im kg enthalten. Eine Abnahme der Tocopherole könnte ein Indikator für die beginnende Fettoxidation sein (28;77;78;148;159;181;192).

In den letzten Jahren wurde eine steigende Zahl von Forschungsarbeiten publiziert, die sich mit der Auswirkung der Hochdruckbehandlung auf Lebensmittelinhaltsstoffe auseinandersetzen. Die kritische Durchsicht der recherchierten Literatur im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass keine Untersuchungen bezüglich der Tocopherol-Erhaltung nach HPP in Lebensmitteln, in denen Vitamin E natürlich vorkommt, durchgeführt wurden.

Die Stabilität von Vitamin C, B<sub>1</sub> und B<sub>6</sub> gegenüber der Hochdruckbehandlung wurde in einem Multivitamin-Modellsystem (161) untersucht. Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>6</sub> wiesen keine Abnahme dieser Vitamine nach der Hochdruckbehandlung im Gegensatz zu Vitamin C auf. Die Vitamin C-Abnahme war unabhängig von der Intensität der Hochdruckbehandlung. Des Weiteren wurde die Vitamin C-Abnahme-Kinetik in Erdbeer „coulis“ und Eigelb untersucht und dargelegt, dass die Abnahmen der Vitamin C-Konzentrationen in hochdruckbehandelten und unbehandelten Lebensmitteln annähernd gleich sind (112).

**Abbildung 8: Modell für die Unterbrechung der Reaktionskaskade durch Tocopherol**

Quelle: (192)

Große Verluste der Ascorbinsäure wurden im Orangensaft während einer Lagerung von 8 bis 14 Wochen nach der Hochdruckbehandlung in Abhängigkeit von der Lagertemperatur (132;161) festgestellt.

Der Abbau von Vitamin C wurde von van den Broeck et al. (132;161;186) in Abhängigkeit von der Temperatur, dem pH-Wert und dem Druck sowohl in Puffersystemen als auch in realen Lebensmitteln wie gepressten Orangen und Tomaten experimentell bestimmt. Dabei war Vitamin C in realen Lebensmitteln thermolabiler als in den Modellsystemen.

Des Weiteren wurde die Stabilität von Vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, Niacin und Panthothensäure im Hähnchen-, Schweine- und Rindfleisch bei 200, 400 und 600 MPa analysiert (116). Hier zeigte sich, dass die untersuchten Vitamine durch hohe Drücke kaum beeinflusst wurden.

Nach Bognar et al. (24;116;161) hat die Hochdruckbehandlung keine Auswirkung auf die sensitiven Thiamine im lyophilisierten und wieder rehydrierten Schweinefleisch.

### 2.3.2.6 Maßnahmen zur Verhinderung der Fettoxidation in Lebensmitteln

Die Oxidationsstabilität von Fetten und Ölen wird durch die folgenden Faktoren bestimmt:

- Anzahl der Doppelbindungen im Molekül
- Spuren von Metall-Ionen
- Thermische Vorschädigung durch Erhitzen
- Vorschädigung durch Lichteinfluss
- Wassergehalt
- Anwesenheit natürlicher oder zugesetzter Antioxidantien (131;192)
- Anwesenheit von Enzymen.

Die hier dargestellten folgenden Faktoren können zur Hemmung der Fettoxidation in Lebensmitteln beitragen:

- Ausschluss von Sauerstoff: Vakuumverpackung, Lagerung unter Schutzgas (N<sub>2</sub>), Hohe Dichtigkeit der Verpackung
- Kühlung

- Ausschuss von Licht, z. B. Verwendung dunkler Flaschen
- Abwesenheit von Schwermetallen: Raffination, Einsatz von Komplexbildnern
- Antioxidantien: Tocopherole
- Inaktivierung von Enzymen wie Lipoxygenase: durch Blanchieren bei Gemüse (192).

Als eine echte Alternative ist an dieser Stelle die Hochdruckbehandlung zu nennen. Vor allem kann HPP eine mögliche Option für Lebensmittel sein, die wegen der Veränderung ihrer Konsistenz und des Geschmacks (Mettwurst) nicht thermisch behandelt werden können.

### 2.3.3 Lebensmittelmodelle

Die Analyse der Auswirkungen von HPP (100-300 MPa) auf Eigenschaften wie Wasser- und Fettbindung, Textur, Farbe, Mikrostruktur und Mikrobiologie von Fleischemulsionen mit wenig ( $90 \text{ g kg}^{-1}$ , LF = low-fat) und viel ( $247 \text{ g kg}^{-1}$ , HF = high-fat) Fett wurde von Jimenez-Colmenero et al. durchgeführt. Die Wirkung von HPP hing von der Druckintensität, der Behandlungsdauer und dem Fettgehalt ab (89).

#### 2.3.3.1 Schweinefett

**Ausgelassenes Schweinefett** wurde mit Hochdruck von 800 MPa für 20 Minuten bei  $19 \text{ }^\circ\text{C}$  behandelt und bei 4, 25 und  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. In allen Fällen oxidierten die hochdruckbehandelten Proben schneller als die unbehandelten. Die Induktionsperioden waren kürzer als die der unbehandelten Proben, was anhand der Ergebnisse der Analysen von Peroxidzahl (POZ), Thiobarbitursäurezahl (TBA) und der Absorption im UV-Bereich gezeigt werden konnte. Dieser Effekt war bei geringeren Behandlungsdrücken schwächer ausgeprägt (27).

Des Weiteren wurde festgestellt, dass bei allen Wasseraktivitäten, die niedriger als 0,4 und höher als 0,55 waren, die POZ des hochdruckbehandelten Schweinefetts niedriger war als die der Vergleichsprobe, die gleich gelagert wurde (27).

Die POZ des ranzigen Schweinefetts nimmt mit der Hochdruckbehandlung bei  $19 \text{ }^\circ\text{C}$  ab, nicht aber bei höheren Behandlungstemperaturen ( $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Dieser Effekt könnte die beobachtete Verlangsamung der Oxidation bei den Wassergehalten von 0,4 bis 0,5  $a_w$  erklären. Andere Faktoren, wie die Freisetzung der Metall-Ionen z. B. Eisen-Ionen aus dem Häm, könnten die Peroxid-Abnahme überlagern (27).

#### 2.3.3.2 Hackfleisch

Die Auswirkung der Hochdruckbehandlung (50-800 MPa) auf Hackfleisch – Textur, Aroma, Farbe – wurde überprüft (107).

Hackfleisch und Muskelfasern wurden hochdruckbehandelt (800 MPa, 20 min,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , vorher gelagert bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). In beiden Fällen oxidierten die hochdruckbehandelten Proben schneller als die Vergleichsproben. Dies wurde durch Bestimmung der TBA ermittelt. Die Oxidationsrate der mit Hochdruck behandelten Proben war ähnlich der der thermisch behandelten Proben. ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min) (28).

Hochdruckbehandeltes **Hackfleisch** wurde schneller oxidiert als unbehandelte gewaschene Fasern, die aber nach HPP höhere TBA-Werte aufwiesen. Dies zeigt, dass einige wasserlösliche Komponenten, die als Katalysator fungieren, eine wichtige Rolle bei der Oxidation nach HPP spielen (28).

HPP hatte einen geringen Einfluss auf die Fettoxidation unter 300 MPa, aber bei Drücken oberhalb von 300 MPa nahm der Einfluss proportional zu (28).

### 2.3.3.3 Fleisch, Fisch

Es konnte gezeigt werden, dass **Fleisch** und **Fisch** nach HPP eine andere Textur als nach einer thermischen Behandlung aufweisen. Dies ist eine Folge der relativen Stabilisierung von schwachen Verbindungen, die die Struktur der Myofibrillen beinhalten (107).

Wie auch immer die druckinduzierten Strukturen sein mögen und sich ausdehnen, sie wurden durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Spätere thermische Behandlung löste teilweise das Myosin-Gel auf und lieferte als Resultat eine Textur, die nicht sehr verschieden von der war, die nur durch thermische Behandlung erzeugt wurde (107).

Nach einer Hochdruckbehandlung über 400 MPa wurden die Fette im Fleisch und im Fisch, wegen der Freisetzung der Metallkatalysatoren (Eisen und vielleicht Kupfer) vom nicht-Häm-Ionen-Komplex, der im Gewebe vorhanden ist, sehr anfällig für die Autoxidation (107).

Das Fleisch eines Dorschmuskels und weißes Fleisch der Pute nehmen nach einer Hochdruckbehandlung, durch die Myosin denaturiert (200 MPa bei Dorsch und 400 MPa bei Pute), eine Erscheinung wie bei gekochtem Fleisch an (107).

In den rötlicheren Fleischarten denaturiert Myoglobin irreversibel bei Drücken oberhalb von 400 MPa und bildet ein Pigment, das ein ähnliches Spektrum aufweist wie das im gekochten Fleisch (107).

Nach der Hochdruckbehandlung über 400 MPa war die oxidative Stabilität von Fetten im **Dorschmuskel** (*Gadus morhua*) deutlich niedriger als die der unbehandelten Proben, was durch die Messung der TBA bewiesen wurde. Dies war auf die Freisetzung der Metall-Ionen aus Komplexen zurückzuführen. Durch den Zusatz von EDTA in weiteren Versuchen wurde die Zunahme der Oxidationsraten effektiv inhibiert und somit verhindert. Dieser Effekt wirkte sich nicht auf die hochdruckinduzierten Veränderungen der Proteine im Fett (Denaturierung) aus, was mittels DSC (differential scanning calorimetry) und Elektrophorese bewiesen wurde (9).

Einige wasserlösliche Proteine überstehen Drücke von 800 MPa, zu ihnen gehören die Proteasen. Aber bei Drücken über 200 MPa war eine Abnahme in der Aktivität der neutralen Protease (pH-Optimum bei 6,6) zu verzeichnen. Im Gegensatz zur thermischen Behandlung führte Hochdruck zur Bildung von Strukturen, die stabilisiert sind, zuletzt zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken und Strukturveränderung. TAP (texture profile analysis) zeigte, dass die Strukturen, die unter thermischer Einwirkung gebildet werden, sich von denen der HPP unterscheiden (9).

Tiefgefrorenes **Putenfleisch** wurde aufgetaut, bei 200 MPa für 20 min für gekühltes und 400 MPa für 20 min für gefrorenes Fleisch hochdruckbehandelt und wieder zur Lagerung eingefroren. In beiden Fällen wurden die Lagerexperimente über 15 Tage und 8 Monate durchgeführt. Die Veränderungen in der Mikrobiologie, Fettoxidation und Cholesterol-Oxidationsprodukte (COPs) wurden analysiert. Diese oben genannten Faktoren können die Haltbarkeit und die sensorische Qualität der Produkte beeinflussen. In Abhängigkeit von den Einflüssen der Behandlung war eine signifikante Reduktion der lebensfähigen Zellen, eine Zunahme der TBARs und die Bildung von COPs zu beobachten (183).

Zusammenfassend wird die Hochdruckbehandlung in der Lebensmittelherstellung eingesetzt und mehrere kommerzielle Produkte aus Früchten und Gemüse werden in Verkehr gebracht.

HPP bewirkt Proteindenaturierung, Inaktivierung einiger enzymatischer Aktivitäten und die Inaktivierung einiger Mikroorganismen. HPP beschleunigt die Fettoxidation in Muskeln. Intensive Erforschung der Effekte von HPP auf Fischgewebe zeigte die Vor- und Nachteile dieser neuen Herstellungs- und Behandlungstechnologie (135).

#### 2.3.4 Zusammenstellung der durch HPP verursachten Reaktionen

Extrahierte Fette werden durch HPP stabilisiert, sind diese aber noch im Muskel, werden sie durch HPP oxidiert.

Die Unterschiede zwischen den Lebensmittelmodellen aus Fettsäuren oder Triglyceriden und den realen Lebensmitteln sind sehr stark. Sie sind auf die Matrix zurückzuführen und somit bei jedem Lebensmittel und sogar jeder Charge wegen der unterschiedlichen Rohstoffe möglich.

Die Hochdruckbehandlung kann die Autoxidation von Fetten im Modellsystem oder bei der Behandlung von reinen Ölen und Fetten verhindern, indem die Radikalisierung neutraler Moleküle unterbunden wird (138;175;176;178;187). Im Gegensatz dazu ist bei der Behandlung von Muskelfleisch (Fisch und Fleisch) mit steigenden Behandlungsdrücken eine verstärkte Autoxidation der Fette beobachtet worden (9;135;145). Als Ursache werden prooxidative Effekte von Metall-Ionen (Fe, Cu) genannt, die den antioxidativen Effekt des Druckes überlagern (27-30;138). Zudem ist der Grad der Oxidation abhängig vom Wassergehalt der behandelten Probe (27).

Während im Modellsystem bei Fettsäuren oder isolierten Fetten die Oxidation vermindert war (Hemmung der Bildung von Radikalen) (27;175;176;178), konnte im Lebensmittel der gegenteilige Effekt nachgewiesen werden (27-29;138;175;176;178). In druckbehandeltem Schweinefleisch lag der TBA-Wert als ein Maß der Fettoxidation stets höher als in der hitzebehandelten Vergleichsprobe. Über die Veränderungen der Fettsäuren und Reaktionsprodukte bzw. Folgereaktionen bei Lagerung von druckbehandelten Produkten gibt es bisher nur wenige Erkenntnisse (28;138;175;176;178).

Während der Lagerung druckbehandelter fetthaltiger Lebensmittel kann die Autoxidation der Lipide stärker voranschreiten als bei konventionell hergestellten Lebensmitteln. Der Sauerstoffgehalt der Lagerungsatmosphäre scheint dabei keine entscheidende Rolle zu spielen, da auch unter Stickstoffatmosphäre eine gesteigerte Oxidation von Fisch-Lipiden festgestellt wurde (9;61;135;138;145). Bei der Druckbehandlung von Hähnchenbrust und anschließender Lagerung sind ebenfalls oxidative Veränderungen der Lipide festgestellt worden (28;138;175;176;178), die mit dem Behandlungsdruck und der Lagerdauer korrelieren.

Deshalb sind bei der Beurteilung verfahrensbedingter Effekte auf das Lebensmittel Veränderungen, die während der Lagerung auftreten, von denjenigen abzugrenzen, die primär bei der Druckbehandlung entstehen.

Fette können ebenfalls durch Mikroorganismen abgebaut werden. Es gibt Mikroorganismen, die schon ab Wassergehalten von 0,3 % überlebensfähig sind (14) und ab einem  $a_w$ -Wert von 0,6 stoffwechseln können (162). Wassergehalt und Wasseraktivität können nicht gleichgesetzt werden. Es gibt Kleinlebewesen, die in Schweineschmalz ab einem Wassergehalt von 0,3 % existieren können, aber wegen der geringen Bindung von Wasser an die Matrix einen  $a_w$ -Wert von 0,8 bis 0,9 zum Leben haben (14).

Im Folgenden wurden die wichtigsten Punkte zur Bedeutung der Enzyme für die hochdruckinduzierte Oxidation von Fetten in Lebensmitteln (LM) zusammengestellt:

**1. Autoxidation der Fette:**

- Senkung der Bildung von Radikalen (175;176;178)
- Steigerung der Bildung von Oxidationsendprodukten, die nach der Radikalbildung entstehen, wie Hexanal und Octanal
- Cyclisierung von Peroxiradikalen (16)
- Bildung von Malondialdehyd (16)

**2. Enzyme, die aus dem Lebensmittel stammen:**

- Inaktivierung der Enzyme
- Gleich gebliebene Aktivität der Enzyme
- Mögliche Freisetzung der Enzyme durch Zellzerstörung
- Steigerung der Enzymaktivität durch Strukturänderung

**3. Enzyme, die aus den Mikroorganismen stammen:**

- Abbau der Fette durch die noch lebensfähigen Mikroorganismen
- Inaktivierung der Enzyme und/oder ihre mögliche Freisetzung durch Zellzerstörung
- Gleich gebliebene Aktivität der Enzyme
- Steigerung der Enzymaktivität durch Strukturänderung und/oder durch ihre mögliche Freisetzung durch Zellzerstörung

Fettsäure-Modelle, bestehend aus freien Fettsäuren oder definierten Triglyceriden, die hochdruckbehandelt wurden, werden durch diese haltbarer als die unbehandelten.

Einige Lebensmittel, die hochdruckbehandelt wurden, wurden leider nicht haltbarer als die konventionell hergestellten, sondern sie verdarben schneller.

An dieser Stelle drängt sich die Frage nach den Unterschieden zwischen den Fettsäure(FS)modellen und Lebensmitteln auf. Warum wurden die im LM vorliegenden Enzyme aus den Lebensmitteln und den Mikroorganismen in den FS-Modellen nicht berücksichtigt?

Inwieweit Veränderungen von Fetten durch Hochdruckbehandlung auftreten können, hängt wie dargestellt von verschiedenen Faktoren ab. Zusammenfassend sind aber einige konkrete Effekte ableitbar. So wirkt die Hochdruckbehandlung auf die Hydrolyse der Fette unterdrückend während die Peroxidation gefördert wird. Die Lipidperoxidation wird nach derzeitigem Kenntnisstand durch die Freisetzung von Metall-Ionen (z. B. Eisen aus dem Hämoglobin) durch HPP begünstigt. In Bezug auf die eigentliche Fettoxidation verlängern bestimmte Zusatzstoffe wie Citronensäure die Induktionsphase der Fettoxidation.

Ein direkter Einfluss der Hochdruckbehandlung auf die Stabilität von Vitaminen und deren biologische Aktivität ist nicht zu beobachten.

Veränderungen der Enzymaktivität sind bei der Hochdruckbehandlung stark abhängig von Prozessparametern (pH-Wert, Behandlungsdruck, Temperatur,...) und von der Versuchsmatrix (Lebensmittel oder Modellsysteme).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders ausgewiesen, wurden nur analysenreine Chemikalien (zur Analyse, p.a.) und bidestilliertes Wasser verwendet.

- Chloroform, [67-66-3], Merck-Eurolab
- Methanol, ACS, ISO, [67-56-1], Merck-Eurolab
- Methanol, SeccoSolv, [67-56-1], HPLC, Merck-Eurolab
- Natriumchlorid, [7647-14-5], Suprapur, Merck
- Natriumchlorid, [7647-14-5], Merck
- Hexan, n-, [110-54-3], HPLC, Merck
- Hexan, n-, [110-54-3], Merck
- Chlorwasserstoff in Methanol, 1,25M HCl-Lösung in Methanol, [132228-87-6], GC, Fluka
- Natriumsulfat, wasserfrei, [7757-82-6], Merck
- tert-Butylmethylether, [1634-04-4], GC, Merck
- Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH), Macherey-Nagel
- Ascorbinsäure, [50-81-7], Merck
- Trichloressigsäure [76-03-9], Merck
- 0,9 % NaCl-Puffer / Lösung
- Tris-HCl-Puffer (pH 7,44): Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, [77-86-1], Merck, HCl, [7647-01-0], Merck

##### 3.1.2 Standardsubstanzen

###### pH-Standards:

- pH 4: Titrisol-9846, Merck
- pH 7: Titrisol-9848, Merck
- pH 10: Titrisol-9890, Merck

###### HS-GC-Standards:

- Hexanal, [66-25-1], Sigma H-9008, 250 ml, Lot 42K 2515
- Octanal, [124-13-0], Sigma O-7128, 100 g, Lot 22K 3445

###### Fettsäuren:

**Tabelle 8: Standards: FAME Mix**

Fettsäurestandard	Hersteller	Bestellnummer	Lot-Nummer
FAME Mix C4-C24	Supelco	18919-1AMP	LB14054
FAME Mix RM-6	Supelco	0-7631-1A	LA85891

**Tabelle 9: Standards: Fette, Öle**

Fett	Menge	Hersteller	Bestellnummer	Lot-Nummer	CAS-Nummer
Lard oil porcine, Approx. 0,5% free fatty acids	500 g	Sigma	L-0657	95H07401	8016-28-2

**Tabelle 10: Standards: freie Fettsäuren**

Fettsäure	Fettsäure	Menge	Hersteller	Bestellnummer	Lot-Nummer	CAS-Nummer
Arachidic Acid Methyl Ester	C20	1 g	Sigma	A3881		1120-28-1
Arachidonic Acid Methyl Ester	C20:4 (5, 8, 11, 14)	100 mg	Sigma	A-9298	052K1733	2566-89-4
Elaidic Acid Methyl Ester	C18:1 (tr 9)	1 g	Sigma	E-4762		2462-84-2
$\gamma$ -Linolenic Acid Methyl Ester	C18:3 (6,9,tr 12)	500 mg	Sigma	L-6503	101K1451	16326-32-2
Heptadecanoic Acid Methyl Ester	C17	1 g	Sigma	H-4515		1731-92-6
Lauric Acid Methyl Ester	C12	1 g	Sigma	L-7272		111-82-0
Linoleic Acid	C18:2 (9, 12)	10 g	Sigma	L-1376	112K0692	60-33-3
Linoleic Acid	C18:2 (9, 12)	5 g	Sigma	L-1376-5G	112K0692	
Linolelaidic Acid Methyl Ester	C18:2 (tr 9, tr 12)	100 mg	Sigma	L-2251	88H1217	2566-97-4
Linolenelaidic Acid Methyl Ester	C18:3 (tr 9, tr 12, tr 15)	25 mg	Sigma	L-2531	74H8455	14202-25-6
Linolenic Acid	C18:3 (9, 12, 15)	500 mg	Sigma	L-2376 - 500MG	063K3727	463-40-1
Myristic Acid Methyl Ester	C14	5 g	Sigma	M-3378		124-10-7
Nonadecanoic Acid Methyl Ester	C19	1 g	Sigma	N-5377		1731-94-8
Oleic Acid Methyl Ester	C18:1	5 g	Sigma	O-4754	092K0629	112-62-9
Palmitic Acid Methyl Ester	C16	5 g	Sigma	P-5177		112-39-0
Pentadecanoic Acid	C15	5 g	Sigma	P-6125		1002-84-2
Stearic Acid Methyl Ester	C18	10g	Sigma	S-5376	40K5303	112-61-8
Tridecanoic Acid Methyl Ester	C13	5 g	Sigma	T-0627	20K2504	1731-88-0
Tridecanoic Acid	C13	10 g	Sigma	T-0502	062K1105	638-53-9

**Tocopherole:****Tabelle 11: Tocopherolstandards**

Tocopherol	Reinheit	Firma	Artikel-Nummer	CAS-Nummer
( $\pm$ )- $\alpha$ -Tocopherol	95 % (HPLC),	Sigma	T-3251	10191-41-0
(+)- $\gamma$ -Tocopherol,	keine Angabe	Sigma	T-1782	54-28-4
(+)- $\delta$ -Tocopherol,	90 %	Sigma	T-2028	119-13-1
Tocopherol Set: DL- $\alpha$ -Tocopherol, DL- $\beta$ -Tocopherol, DL- $\gamma$ -Tocopherol, DL- $\delta$ -Tocopherol	$\geq$ 95 % (HPLC)	Calbiochem	613424	

**Enzymstandards:**

- Lipasestandard: Porcine Pancreas Lipase, Type VI-S; From Porcine Pancreas, Sigma, L-0382, 100.000 U, 1,9 mg solid, 52,900 U/mg solid, 75,600 U/mg prot.
- Colipase: Colipase from porcine pancreas, Sigma C 3028 – 5 mg, CAS [55126-92-6]



### Lipase-Aktivitäts-Test

Anwendungszweck: Enzymatischer Test zur quantitativen Bestimmung von Lipase in Humanserum und -plasma, Roche Lipase Farb-Test

1. Derivatisierungsreagenz (methanolische HCl): Fluka 17935; 1,25M HCl-Lösung in Methanol
2. Lipasestandard: Porcine Pancreas Lipase, Type VI-S; From Porcine Pancreas, Sigma L-0382, Lot: 081K7663, 100.000 U, 1,9 mg solid, 52,900 U/mg solid, 75,600 U/mg prot.
3. Colipase: Colipase from porcine pancreas, Sigma C 3028 – 5 mg, CAS [55126-92-6]

#### 3.1.3 Materialien

Cryovials: 5ml mit Silicondichtung [T-310-5A], Simport Plastics, Quebec, Kanada  
Faltenfilter Ø 185 mm (z. B. S&S 595 ½), Schleicher & Schuell

#### 3.1.4 Geräte und Software

Analytische HPLC: Beckman-System mit Autosampler: 507e, Pumpe: 126 und Shimadzu Fluoreszenzdetektor RF-10A  
HS-GC-FID: GC: Agilent 6890; Autosampler: PAL; Detector: FID  
GC-MS: GC: HP 5890; MSD: 5971; Injector: HP 6890  
Photometer: Shimadzu UV-2100, UV-VISIBLE Recording Spectrophotometer; Hyper UV Software  
pH-Meter: Beckman  $\Phi$  300 pH-Meter  
Laborzentrifuge: SIGMA 3 K30  
Rotavapor: R-134, Büchi  
Wasserbad: Grant Wasserbad, W 14 Spezial  
Ultraschallbad: Sonorex Digital 10 P; Bandeln  
Horizontalschüttler: Janke & Kunkel, VF 2

#### 3.1.5 Proben

**Mettwurst:** Frische Zwiebelmettwürste (ohne Zusatz von Vitamin E) im Kunstdarm aus mehreren Produktionschargen, die direkt nach der Reifung beim Hersteller bezogen wurden. Anschließend wurde die Hälfte der Proben hochdruckbehandelt. Die Lagerung erfolgte bei 7 °C im Kühlschrank ohne zusätzlichen Verpackungsschutz. Für die Untersuchung wurde jeweils eine Wurst geöffnet und analysiert.

##### *Erster Versuch (Screeningversuch)*

Anzahl der Proben pro Untersuchungstag: 1  
Summe der Proben innerhalb des Analysenzeitraumes: 40  
Anzahl der Parallelbestimmungen pro Untersuchungstag: 2

##### *Jeder weitere Versuch*

Anzahl der Proben pro Untersuchungstag: 2  
Summe der Proben innerhalb des Analysenzeitraumes: 40 bis 80  
Anzahl der Parallelbestimmungen pro Untersuchungstag: 2

**1. Hackfleisch-Charge:** Hackfleisch mit: Ascorbinsäure: 0,5 g/kg Hackfleisch versetzt.

**2. Hackfleisch-Charge:** Hackfleisch mit jeweils unterschiedlichen Zutaten der Mettwurst versetzt: Ascorbinsäure: 0,5 g/kg Hackfleisch, Nitritpökelsalz: 18 g/kg Hackfleisch, Citrat: 3 g/kg. Hackfleisch und alle drei genannten Zusatzstoffe in den oben angegebenen Konzentrationen zusammen (21;77;99;189).

**1. HF-Charge:** Wegen des erwarteten schnelleren Verderbs fanden die ersten Analysen bereits einen Tag nach der Hochdruckbehandlung statt, im Gegensatz zu den Mettwurstproben. Die Hochdruckbehandlung erfolgte am 14.10.04.

Die Würste aus Hackfleisch mit der technologisch üblichen Einsatzmenge von 500 mg Ascorbinsäure/kg Hackfleisch wurden am Abend des 13.10.04 beim Fleischer hergestellt.

**2. HF-Charge:** Wegen des erwarteten schnelleren Verderbs wurden die Hackfleischproben tiefgefroren. Insgesamt dauerten die Analysen vier Wochen. Jede Woche fanden die ersten Analysen bereits einen Tag und drei weitere Tage nach dem Auftauen und der Hochdruckbehandlung statt, im Gegensatz zu den Mettwurstproben. Die erste Hochdruckbehandlung erfolgte am 15.08.05. Die Proben wurden am 12.08.05 hergestellt und waren bis zur Hochdruckbehandlung tiefgefroren bei -70 °C.

## 3.2 Methoden und Verfahren

### 3.2.1 Hochdruckbehandlung

#### Mettwurst

**Tabelle 12: Hochdruckbehandlungsparameter der Mettwurstchargen**

Nr.	Charge	Druck (MPa)	Dauer (min)	Temperatur (°C)
1.	PZWI20030411-...	300	10	4
		300	10	20
		600	10	4
		600	10	20
2.	PZWI20031107-...	600	10	20
3.	PZWI20040629-...	600	10	20
4.	D-050509-...	600	10	15

#### Hackfleisch

**Tabelle 13: Hochdruckbehandlungsparameter der Hackfleischchargen**

Nr.	Charge	Druck (MPa)	Dauer (min)	Temperatur (°C)
1.	D-041014-...	600	10	4
2.	D-050812-...	600	10	10

#### Lipasestandard: Porcine Pancreas Lipase

**Tabelle 14: Hochdruckbehandlungsparameter der Pankreas Lipase**

Druck (MPa)	Dauer (min)	Temperatur (°C)
0,1; 100, 200, 300, 400, 500, 600 und 700	2, 5, 10, 15, 20 und 30	0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60

### 3.2.2 Analytik

Die oxidativen Fettveränderungen können durch ausgewählte Analysenmethoden verfolgt werden. Bindung von Sauerstoff bewirkt eine Gewichtszunahme der extrahierten Fette der Proben. Bildung freier Radikale führt zu erhöhten Iodzahlen. Über die Induktionsperiode können Aussagen zur Stabilität der verschiedenen Fette gemacht werden. Der Nachweis der freien Radikale kann mit Hilfe von Trapping-Reagenzien mittels ESR erfolgen. Der Nachweis der ersten Oxidationsprodukte erfolgt über die Peroxidzahl (POZ), die einzelnen Hydroperoxide, die Abnahme der konjugierten Diene und Triene. Die sekundären Oxidationsprodukte wie Aldehyde, Ketone und Alkohole werden mittels HS-GC nachgewiesen. Die TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) und der Anisidinwert (para-Anisidin Value, p-AnV) sind Nachweismethoden für alle mit diesen Verbindungen reagierenden Stoffe (Aldehyde, Ketone, usw.). Sie werden als Summe und nicht einzeln bestimmt. Aussagen über die oxidative Stabilität der Fette lassen sich mit Hilfe eines Ranzimatens treffen. In den letzten Jahren wurden die Veränderungen von Fetten mittels NMR und FTIR verfolgt (14-16, 19, 20, 23, 33, 34, 37, 39, 42, 45, 47-49, 56, 58-60, 63, 86, 117, 124-127, 129, 130, 140, 155-158, 164, 166;168;170;172;184;191;194).

Die Methode der Wahl ist von dem Lebensmittel und der erwünschten Aussage abhängig. Bei komplexen Matrices müssen die Fette zuerst schonend und in Abhängigkeit von der folgenden Analysenmethode extrahiert werden (168).

In den Tabellen 15, 16 und 17 sind die möglichen Methoden zur Analyse des Verlaufes des Fettverderbs und möglicher Ursachen der Fettoxidation zusammengefasst. Die ausgewählten und anhand der Ergebnisse der ersten Mettwurstcharge überprüften Methoden wurden im Kapitel 3.2.5 „Ausgewählte Analysenverfahren“ dargestellt.

**Tabelle 15: Analysenmethoden: 1-3**

1. Standardanalytik	2. Autoxidation	3. Enzym. Oxidation
• Hexanal, Octanal	• Malondialdehyd	• photometrische Bestimmung
• cis/trans Doppelbindungen	• ESR (Radikale)	• Fettabbauprodukte untersuchen
• POZ	• Hydroperoxide	• Lipasen
• TBA		• Lipoxygenasen (Typ I und Typ II)
• Fettsäuren (GC-MS)		
• Konjugierte, isolierte Doppelbindungen		
• Sensorik		

**Tabelle 16: Analysenmethoden: 4-6**

4. Antioxidantien:	5. Fettbegleitstoffe:	6. Mikrobiologie
• Ascorbinsäure	• fettlösliche Vitamine: E, D, K, A	• GKZ
• fettlösliche Vitamine: E	• Phospho- und Glyco-Lipide	• Milchsäurebakterien
	• Lipoproteine	• Enterobacteriaceae
		• Listeria spp.
		• Salmonella spp.

**Tabelle 17: Analysenmethoden: 7-9**

7. Grundlagenforschung:	8. Reaktionskinetik:	9. Fe-Ionen aus Häm
• Reaktionsbedingungen schaffen, unter denen best. Produkte entstehen	• der Reaktionsprodukte der Enzyme	• Komplexbildner (EDTA)
• best. Bedingungen bzw. Reaktionsprodukte erforschen		• Nitritpökelsalz

### 3.2.3 Versuchsplanung

Zuerst wurden die geeigneten Methoden zur Feststellung der Unterschiede zwischen unbehandelter und hochdruckbehandelter Mettwurst etabliert. Ihre Verwendbarkeit wurde anhand weiterer Chargen bestätigt oder verworfen. Außerdem wurden weitere Methoden eingeführt und überprüft.

### 3.2.4 Fraktionelle faktorielle Versuchsplanung

Bei der Wiederholung der Versuche werden bekanntermaßen nicht genau gleiche Ergebnisse erzielt. Faktoren wie das Ausgangsmaterial (Rohstoffe), die Umgebungsbedingungen (Temperatur, Transport) und durch die Messung bedingte Unterschiede führen zur Streuung der Versuchsergebnisse.

Die statistischen Verfahren basieren auf folgenden Prinzipien:

- Absicherung gegen Fehlentscheidungen
- Der Mittelwert mehrerer Messungen streut weniger als die Einzelwerte, weil zufällige Abweichungen sich teilweise aufheben.

Wenn bei Versuchen die Unterschiede zwischen Prozess- und Produktvarianten und quantitative Unterschiede erkannt werden sollen, sind statistische Verfahren notwendig.

Je kleiner die Unterschiede sind, desto mehr Versuche müssen durchgeführt und ausgewertet werden, um die Unterschiede bestimmen zu können (12;36;79;87;96;102;160).

Hierzu werden folgende Verfahren der multifaktoriellen Versuchsplanung und der Clusteranalyse angewendet, da für die Berechnung und Beschreibung mittels deskriptiver Statistik der Versuchsergebnisse eine unverhältnismäßig hohe Anzahl von Versuchen notwendig wäre. Weiterhin würde bei der deskriptiven Analyse die faktorielle Abhängigkeit nicht berücksichtigt.

#### **Versuchsplanung**

Versuche sind teuer und zeitaufwendig, deshalb sollte der Versuchsumfang relativ klein sein. Es sollten jedoch alle für die Aussage notwendigen Analysen durchgeführt werden. Ist der erforderliche Versuchsumfang zu klein, dann werden Unterschiede nicht sicher erkannt. Zuerst muss also der Versuchsumfang festgelegt werden (96).

Man erhält auf diese Weise mit weniger Einzelversuchen mehr Informationen. Der Erfolg liegt in der Ausgewogenheit des Versuchsplans. Die Versuchsplanung erlaubt es, jedes Versuchsergebnis für die Berechnung der unterschiedlichen Effekte einzusetzen. Jedes Ergebnis kann somit mehrfach genutzt werden. Hieraus resultiert die Einsparung von Versuchen (96).

Die Ergebnisse sind ein empirisches Modell, dessen mathematische Form vorgegeben werden muss. Es beschreibt den experimentell ermittelten Zusammenhang (96).

Der experimentell ermittelte Zusammenhang führt zu Einschränkungen wie:

- eine Extrapolation ist nicht möglich, d.h. Aussagen nur im untersuchten Bereich
- Durchführung nur im Rahmen der Möglichkeiten der vorgegebenen Form
- Ausführung nur unter Berücksichtigung der Zufallsstreuung

Trotz der Einschränkungen sind diese Ergebnisse sehr wertvoll für die Prozess- und Produktionsoptimierung.

### **Fraktionelle faktorielle Versuchsplanung**

Nach ausführlicher Literaturrecherche und gemäß (96) wurde die Versuchsplanung (vorläufige Versuchsplanung vom 11.03.03) für die erste Charge entworfen.

Folgende Faktoren wurden bei der Versuchsplanung betrachtet:

1. Druck
2. Temperatur
3. Behandlungszeit (Dauer der Hochdruckbehandlung)
4. Fleisch (mit/ohne Fett- bzw. Speckzusatz).

Drei dieser Faktoren werden ausschließlich durch die Hochdruckbehandlung bestimmt. Das Fleisch unterliegt den Schwankungen, die durch die Fütterung der Tiere und das bei der Herstellung der Mettwurst übliche Verschneiden von magerem Fleisch mit Speck oder den Einsatz von fetthaltigem Fleisch bedingt sind. Hinzu kommt bei der Herstellung von Mettwurst der Einsatz von Nitritpökelsalz, Citrat, Ascorbinsäure und unterschiedlichen Gewürzen sowie Starterkulturen. Die chemische Zusammensetzung der Mettwurst ist somit chargenabhängig.

Wie schon in der Einführung beschrieben wurde, ist beim Einsatz von chargenabhängigen Faktoren die fraktionelle faktorielle Versuchsplanung unbedingt erforderlich.

Aus den oben genannten Faktoren entstanden folgende Vorschläge für die Versuchsanzahl:

1. Druck: 300 bis 900 MPa, alle 100 MPa, hieraus ergeben sich 7 Faktorstufen.
2. Temperatur: -20 °C bis +80 °C, alle 20 °C, hieraus lassen sich 6 Faktorstufen ableiten.
3. Zeit: 4 Zeitangaben: 2 min., 5 min., 10 min., 20 min., hieraus ergeben sich vier Faktorstufen.
4. Fleisch: unterschiedliche Chargen mit weiteren 2 Faktorstufen.

Aus den Faktoren mit den verschiedenen Faktorstufen ergab sich die durchzuführende Versuchszahl von  $7 \cdot 6 \cdot 4 \cdot 2 = \Sigma 336$  Hochdruckbehandlungen allein für die erste Charge. Die Anzahl der dazugehörigen Analysen wäre undurchführbar gewesen. Es wurde ein Versuchsplan mit der Summe der Versuche entworfen und zwei verschiedene Lösungsansätze entwickelt:

1. Lösungsansatz: Statistische Wahl von ca. 50 der möglichen 336 Versuche
2. Lösungsansatz: Reduzieren der Versuchsanzahl durch fraktionelle faktorielle Versuchsplanung.

Die Lösung dieses Problems erfolgte mit Hilfe der fraktionellen faktoriellen Versuchsplanung. Die Anzahl der Versuche wurde durch logische Herangehensweise und Überlegung minimiert.

### **Versuchsplanung**

Durch Literaturstudien und Überlegung erfolgte eine Reduzierung der 7 Druckstufen auf 3 Stufen; eine Erweiterung kann nach den Vorversuchen durchgeführt werden [ $\Sigma$  3-4].

1. Bei den Faktorstufen der Temperatur erfolgte eine Reduzierung der 6 auf 3 Stufen; eine Erweiterung kann nach den Vorversuchen durchgeführt werden [ $\Sigma$  3-4].
2. Die 4 Zeit-Faktorstufen wurden auf zwei reduziert [ $\Sigma$  2-3].
3. Die 2 Fleisch-Faktorstufen konnten nicht reduziert werden, weil es sich hierbei um unterschiedliche Chargen handelt. Dieser Faktor wurde sogar später auf vier erweitert, während die Zeit- und Druckfaktoren reduziert wurden [ $\Sigma$  2].

Aus der vorausgegangenen Literaturrecherche und den Überlegungen ergab sich eine Anzahl von 54 bis 96 durchzuführender Versuche.

### Tabellen zur Übersicht:

In der Tabelle 18 sind die Versuchsfaktorstufen mit 4 Druckstufen, 4 Temperatur-Stufen und zwei Zeitstufen (dargestellt durch 1 und 2) abgebildet. Bei der Durchführung aller Kombinationen ergibt sich eine Anzahl von 32 Versuchen.

**Tabelle 18: Variante 1: Druck-, Temp.- und Zeitstufen**

Temp. (°C) Druck (MPa)	W	X	Y	Z
A	1+2	1+2	1+2	1+2
B	1+2	1+2	1+2	1+2
C	1+2	1+2	1+2	1+2
D	1+2	1+2	1+2	1+2

Durchzuführende Versuchszahl:  $\Sigma$  16 bei 4 Druck- und 4 Temp.-Stufen;

**bei 2 Zeitstufen:  $4 \times 4 \times 2 \rightarrow \Sigma$  32**

Erläuterungen:

1: 1. Zeitstufe

2: 2. Zeitstufe

In der Tabelle 19 wurden die zwei Zeitfaktoren (Zeitstufen) teilweise reduziert, d. h. nicht jeder Versuch sollte mit zwei unterschiedlichen Behandlungszeiten durchgeführt werden. Lediglich die Versuche, die sich an den Diagonalen der Tabelle befinden, sollten zwei Mal durchgeführt werden. So ergeben sich 24 statt 32 Versuche, die statistisch sehr gut auswertbar sind.

**Tabelle 19: Variante 2: Druck-, Temp.- und Zeitstufen**

Temp. (°C) Druck (MPa)	W	X	Y	Z
A	1+2	2	1	2+1
B	2	1+2	2+1	1
C	1	2+1	1+2	2
D	2+1	1	2	1+2

Durchzuführende Versuchszahl:  $\Sigma$  16 bei 4 Druck- und 4 Temp.-Stufen;

**bei nur teilweise 2 Zeitstufen:  $\Sigma$  24 statt 32**

Die Versuchsfaktorstufen wurden reduziert auf 3 Druckstufen, 3 Temperatur-Stufen und 2 Zeitstufen. Hieraus ergibt sich eine Anzahl von 18 Versuchen, die in Tabelle 20 dargestellt sind.

**Tabelle 20: Variante 3: Druck-, Temp.- und Zeitstufen**

Temp. (°C) Druck (MPa)	X	Y	Z
A	2+1	2+1	2+1
B	2+1	2+1	2+1
C	2+1	2+1	2+1

Durchzuführende Versuchszahl:  $\Sigma$  9 bei 3 Druck- und 3 Temp.-Stufen;

**bei 2 Zeitstufen:  $3 \times 3 \times 2 \rightarrow \Sigma$  18**

Des Weiteren wurden die Zeitstufen weiter reduziert auf nur die Versuche, die in den Diagonalen dargestellt sind (Tabelle 21). Daraus folgt eine Reduktion der Versuchsanzahl von 18 auf 14 Versuche.

**Tabelle 21: Variante 4: Druck-, Temp.- und Zeitstufen**

Temp. (°C) \ Druck (MPa)	X	Y	Z
A	2+1	1	2+1
B	1	2+1	1
C	2+1	1	2+1

Durchzuführende Versuchszahl:  $\Sigma$  9 bei 3 Druck- und 3 Temp.-Stufen;  
**bei nur teilweise 2 Zeitstufen:  $\Sigma$  14 statt 18**

Nach reichlicher Literaturrecherche und Überlegung wurden folgende Versuche, die in Tabelle 22 dargestellt sind, mit der ersten Mettwurstcharge durchgeführt.

**Tabelle 22: Variante 4: 1. Mettwurstcharge**

Temp. (°C) \ Druck (MPa)	X	Y
A	1	1
B	1	1

mit A = 300 MPa, B = 600 MPa, X = 4 °C, Y = 20 °C und 1 = 10 min.

Hieraus ergaben sich zuerst vier Versuche für die erste Charge. Mit Hilfe der Ergebnisse der ersten Charge wurden weitere Behandlungsparameter, die in den Ergebnissen vorgestellt sind, erarbeitet.

### 3.2.5 Ausgewählte Analysenverfahren

Die Auswahl der Analysenverfahren erfolgte anhand von Vorversuchen an einer Matrix (erste Mettwurstcharge).

#### 3.2.5.1 Allgemeine Parameter

##### 3.2.5.1.1 Aussehen und Konsistenz

Die visuelle Beschaffenheit: die Farbe und die Konsistenz der Mettwürste mit und ohne Hochdruckbehandlung und während der Lagerung wurden mit Hilfe von Fotografien für jede Charge und den jeweiligen Untersuchungstag festgehalten.

##### 3.2.5.1.2 pH-Wert

Die pH-Wert-Messung erfolgte mit dem Beckman  $\Phi$  300 pH-Meter. Es wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

Mithilfe der pH-Wert-Bestimmung und der zeitlichen pH-Wert-Änderung können mikrobiologische Veränderungen wie das Wachstum von Lactobacillen in Mettwurst und Fleisch begleitend festgestellt werden. Des Weiteren kann die direkte Auswirkung der Hochdruckbehandlung auf den pH-Wert in der Mettwurst gemessen werden.

### 3.2.5.1.3 Mikrobiologie

Die Untersuchungsmethodik sowie angewandte Nährmedien zur Bestimmung von Gesamtkeimzahl, Milchsäurebakterien, *Enterobacteriaceae*, *Listeria* sowie *Salmonella* sind der folgenden Zusammenstellung zu entnehmen:

#### **Gesamtkeimzahl**

Die Gesamtkeimzahl wurde auf PC-Nährmedien bestimmt.

#### **Milchsäurebakterien**

Milchsäurebakterien wurden auf MRS-Nährmedien bestimmt.

#### **Bestimmung von *Enterobacteriaceae***

*Enterobacteriaceae* wurden auf VRBD-Nährmedien nachgewiesen.

#### **Bestimmung von *Listeria* spp.**

Bei der Bestimmung von *Listeria* spp. wurde das Selektivnährmedium PALCAM (nach DIN EN ISO 11290-1) verwendet.

#### **Bestimmung von *Salmonella* spp.**

Der Nachweis von *Salmonella* spp. wurde auf verschiedenen Selektivnährmedien nach Anreicherung in Rappaport-Vassiliadis (RVs) bzw. Tetrathionat-Brillantgrün-Galle-Bouillon (TBG) durchgeführt.

Zusätzlich zu den mikrobiellen Untersuchungen wurde die PCR zur Bestimmung möglicher *Listeria*- bzw. *Salmonella*-Stämme angewandt, da eine biochemische Differenzierung dieser Stämme zu zeitaufwendig ist.

### 3.2.5.1.4 Fettextraktion

Das Ziel der Fettextraktion ist, das Fett der Probe möglichst schonend und weitgehend vollständig zu extrahieren. Die Soxhlet-Extraktion und der Weibull-Stoldt-Aufschluss können wegen der relativ hohen Temperatur und Säure und der daraus folgenden Fettveränderungen nicht durchgeführt werden. Die Chloroform-Methanol-Extraktion und die Hexan-Extraktion kommen in Frage, weil sie ohne Zusatz von Säure und ohne höhere Temperaturen erfolgen.

#### **Chloroform-Methanol – Fettextraktion/Kaltextraktion**

##### *Versuchsdurchführung:*

Gemäß Hallermayer et al. mit folgenden Modifikationen (62):

Die Einwaage der Proben beträgt ca. 20 g. Die eingewogene Probe wird zweimal mit 50 ml Chloroform/Methanol-Lösung (1:1) überschichtet und zerkleinert. Anschließend erfolgt eine Behandlung der gelösten Probe für die Zeitdauer von 15 min. im Ultraschallbad. Die Filtrate der Probe werden in einem Scheidetrichter gesammelt. Das Chloroform/Methanol-Filtrat wird zwei Mal mit 50 ml 0,58 % NaCl-Lösung gewaschen. Das Einengen des extrahierten Fetts geschieht am Rotationsverdampfer. Das Entfernen des restlichen Chloroforms kann durch das Abblasen am Stickstoffstrom erfolgen.

Die extrahierten Fette werden in Aufbewahrungsgefäßen aus Kunststoff im Tiefkühler bei -70 °C aufbewahrt.



## Hexan – Fettextraktion/Kaltextraktion

### *Versuchsdurchführung:*

- Gemäß Matissek et al. (117)
- Gemäß § 64 Lebensmittel- und Futtermittel Gesetzbuch (LFGB), (ehemals § 35 Lebensmittel und Bedarfgegenstände Gesetz (LMBG)-Methodensammlung L 06.00-6 (2000))

### 3.2.5.2 Chemische Fettkennzahlen

#### 3.2.5.2.1 Säurezahl (SZ)

Die Bestimmung der SZ dient der Berechnung des Gehaltes an freien Fettsäuren (141).

Die Säurezahl ist ein Maß für den Gehalt an freien Fettsäuren in Fetten. Die gebundenen Fettsäuren werden nicht erfasst. Es werden neben freien Fettsäuren auch evtl. vorliegende Mineralsäuren erfasst (14;16;23;49;117;129;141;155).

Definition: Die SZ bezeichnet die Menge an Kaliumhydroxid in mg, die zur Neutralisation der in 1 g Fett enthaltenen freien organischen Säuren erforderlich ist (117;141).

### *Versuchsdurchführung:*

- Gemäß § 64 Lebensmittel- und Futtermittel Gesetzbuch (LFGB), (ehemals § 35 Lebensmittel und Bedarfgegenstände Gesetz (LMBG)-Methodensammlung L 13.00-7 (2000))
- Gemäß DGF-Standards, Determination of fatty acid value C-V 2 (81), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2004)

#### 3.2.5.2.2 Peroxidzahl (POZ)

Die Peroxidzahl ist ein Maß für den peroxidisch gebundenen Sauerstoff in Fetten. Primäre Oxidationsprodukte sind Hydroperoxide und geringe Mengen an anderen Peroxiden als Folge von Oxidation, insbesondere Autoxidation. Deshalb gibt die POZ Hinweise auf den Oxidationsgrad der Probe (117;141).

Mithilfe der POZ sind unter gewissen Einschränkungen Aussagen über den Verderb der analysierten Probe möglich. Mit fortschreitendem Verderb ist zu beachten, dass die Peroxide zerfallen und die POZ abnimmt. Die POZ durchläuft also ein Maximum und nimmt danach wieder ab (117;141).

Definition: Die POZ bezeichnet die erfassbare Menge an aktivem Sauerstoff, die in 1 kg Probe enthalten ist und wird in 1 / 8 mmol/kg angegeben. Durch Multiplikation der POZ mit der Äquivalentmasse des Sauerstoffs (= 8) erhält man die Menge in mg an aktivem Sauerstoff je Probe (117;141).

### *Versuchsdurchführung:*

- Gemäß § 64 Lebensmittel- und Futtermittel Gesetzbuch (LFGB), (ehemals § 35 Lebensmittel und Bedarfgegenstände Gesetz (LMBG)-Methodensammlung L 13.00-7 (2000))
- Gemäß DGF-Einheitmethoden: C-VI 6a – Teil 1 (02), Methode nach Wheeler
- Gemäß Matissek et al. (117)

### 3.2.5.3 Kennzahlen für den oxidativen Fettverderb

#### 3.2.5.3.1 Freie Fettsäuren (FFS)

Die FFS werden mittels GC-MS qualifiziert und ab einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen quantifiziert. C<sub>13</sub> kommt natürlicherweise im Schweinefett nicht vor und wird deshalb als interner Standard eingesetzt (11;65;67;86;118;134;157;158).

##### *Versuchsdurchführung:*

##### *Derivatisierung der freien Fettsäuren (FFS) mit methanolischer HCl*

Gemäß Schmid (163) mit folgenden Modifikationen:

20 bis 30 mg Fett werden eingewogen und in 100 µl n-Hexan gelöst. Des Weiteren erfolgt eine 1:10-Verdünnung und ein Zusatz des internen Standards. Nach Zugabe von 100 µl der methanolischen HCl wird diese Lösung 30 min lang bei 50 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend werden 200 µl Wasser hinzugefügt und die beiden Phasen ca. 30 Minuten lang geschüttelt. Danach wird die Hexanphase mit Natriumsulfat zur Entsäuerung getrocknet und ein Aliquot von 1 ml der Lösung zur gaschromatographischen Untersuchung eingesetzt.

##### **GC-MS:**

GC: Hewlett Packard 5890;

Temperaturprogramm: isotherm für 2 min bei 45 °C, von 45 °C auf 180 °C mit einer Rate von 30 °C/min, von 80 °C auf 220 °C mit einer Rate von 1 °C/min und weiter auf 250 °C mit einer Rate von 30 °C/min, für 5 min isotherm, Trägergas: Helium

Säule: Varian Inc. (100 m x 390 µm (AD), 250 µm (ID), Filmdicke von 0,25 µm; WCOT Fused Silica, Coating Select FAME; Chrompack Capillary Column, CP-select CB for FAME [Cat No 7420]),

Vorsäule: Agilent (2,5 m x 400 µm (AD), 250 µm (ID)) Fused Silica, deaktiviert, Transferline: Agilent (0,5 m x 400 µm (AD), 0,15 µm (ID)) Fused Silica, HT, deaktiviert

Autosampler: Hewlett Packard 7673 Series: Injektortemperatur: 270 °C, Injektionsvolumen: 1 µl; Splitmode (Split ratio: 23:1; Split flow: 22,5 ml/min);

MS-Detektor: Hewlett Packard 5971 Series: EI-SIM-Modus (m/z: 55,0; 69,0; 81,0; 57,0; 74,0; 83,0; 67,0; 79,0; 87,0; Dwelltime: 60 msec); Transferlinientemperatur: 280 °C

Interner Standard in Hexan:

Ca. 10 mg C<sub>13</sub>-Methylester und ca. 10 mg C<sub>15</sub>-Methylester werden in je einem Eppendorfgefäß in 1 ml Hexan gelöst. Davon werden jeweils 15 µl in einen 10 ml Messkolben pipettiert und mit Hexan aufgefüllt.

#### 3.2.5.3.2 Gesamtfettsäurespektrum

Es können nur Veränderungen insgesamt, d.h. FFS und gebundene FS als Triglyceride (TG), Diglyceride (DG) und Monoglyceride (MG) als Summe aller FS beobachtet werden. Das Gesamtfettsäurespektrum kann Aufschlüsse über die Veränderungen der Fettsäuren von hochdruckbehandelten im Vergleich zu unbehandelten Produkten geben. Hierbei kann es sich beispielsweise um Veränderungen der Fettsäuren von cis- in trans-Form handeln. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren können verstärkt durch HPP oxidiert und zu weiteren Oxidationsprodukten abgebaut werden (11;118;134;157;158).

*Versuchsdurchführung:  
Derivatisierung mit TMSH*

Gemäß der Anweisung vom Hersteller des Trimethylsulfoniumhydroxids (TMSH) Macherey-Nagel mit folgenden Modifikationen:

20 bis 30 mg Fett werden eingewogen und in 100 µl n-Hexan gelöst. 10 µl dieser Fettlösung werden entnommen und am Stickstoffstrom eingengt. Die ca. 2 mg Fett des eingengten Aliquots werden mit 750 µl tert-Butylmethylether (TBME) mit internem Standard versetzt. Weiterhin werden 250 µl der TMSH-Lösung hinzugefügt. Das Gemisch wird 30 Sekunden lang geschüttelt und 1:10 mit TBME/Methanol (9/1) verdünnt und zur gaschromatographischen Untersuchung eingesetzt.

Die Derivatisierungsreaktion erfolgte direkt im heißen Injektionsport.

**GC-MS:**

GC: Hewlett Packard 5890;

Temperaturprogramm: isotherm für 2 min bei 45 °C, von 45 °C auf 180 °C mit einer Rate von 30 °C/min, von 180 °C auf 220 °C mit einer Rate von 1 °C/min und weiter auf 250 °C mit einer Rate von 30 °C/min, für 5 min isotherm, Trägergas: Helium

Säule: Varian Inc. (100 m x 390 µm (AD), 250 µm (ID), Filmdicke von 0,25 µm; WCOT Fused Silica, Coating Select FAME; Chrompack Capillary Column, CP-select CB for FAME [Cat No 7420]),

Vorsäule: Agilent (2,5 m x 400 µm (AD), 250 µm (ID)) Fused Silica, deaktiviert, Transferline: Agilent (0,5 m x 400 µm (AD), 0,15 µm (ID)) Fused Silica, HT, deaktiviert

Autosampler: Hewlett Packard 7673 Series: Injektortemperatur: 270 °C, Injektionsvolumen: 1 µl; Splitmode (Split ratio: 23:1; Split flow: 22,5 ml / min)

MS-Detektor: Hewlett Packard 5971 Series: EI-SIM-Modus (m/z: 55,0; 69,0; 81,0; 57,0; 74,0; 83,0; 67,0; 79,0; 87,0; Dwelltime: 60 msec); Transferlinientemperatur: 280 °C

Interner Standard in Hexan:

Ca. 10 mg C<sub>13</sub>-Methylester und ca. 10 mg C<sub>15</sub> werden gemeinsam in einen 50 ml Messkolben eingewogen und mit TBME aufgefüllt.

### 3.2.5.3.3 Flüchtige Verbindungen: Hexanal, Octanal

Hexanal und Octanal sind flüchtige Verbindungen, die beim oxidativen Fettverderb entstehen. Sie sind sensorisch wahrnehmbar und besitzen eine sehr niedrige Geruchsschwelle (32-34;44;48;53;60;63;129;184;188;195).

Die Betrachtung von Octanal (und Hexanal) erfolgt stellvertretend für flüchtige Verbindungen.

Die Analyse der flüchtigen Verbindungen wie Octanal und Hexanal erfolgt mittels der Headspace-GC (HS-GC). Die HS-GC basiert auf der Probennahme aus einer Dampfphase, die sich mit einer kondensierten flüssigen oder festen Phase in einem abgeschlossenen System im thermodynamischen Gleichgewicht befindet.

Diese Analysenmethode eignet sich besonders für den analytischen Nachweis von Restlösmitteln in festen Verpackungsmaterialien und von Geruchsstoffen in Kunststoffen und Kunststoffdispersionen oder die Bestimmung von Aromastoffen in Nahrungs- und Genussmitteln.

Die Vorteile dieser HS-GC-Methode gegenüber den herkömmlichen analytischen Probenaufarbeitungsverfahren – Anreicherungsverfahren zur Aufkonzentrierung der Spurenbe-

standteile wie Extraktion, Destillation, Wasserdampfdestillation – liegen in der weniger aufwendigen Probenvorbereitung und dem geringeren Arbeitsaufwand (60).

### **HS-GC: Hexanal-, Octanal-Bestimmung**

*Versuchsdurchführung:*

Gemäß Goodridge et al. (54,88,95) mit folgenden Änderungen:

#### **Probenvorbereitung:**

Standardadditionskalibriergerade:  $2,0 \pm 0,5$  g Probe, 5 ml Öl, 2 g NaCl und je 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 µl Hexanal und Octanal werden in 20 ml Headspace-Glas-Vials überführt; die Vials mit Teflon-Silicon-Septen und Aluminiumverschlüssen verschlossen; Inkubation: Behandlung der Standardadditionskalibriergerade im Ultraschallbad bei 80 °C für 4 Stunden.

#### **HS-GC-FID:**

GC: Agilent 6890; Solgel-Wax (60 m x 320 µm, Filmdicke von 0,25 µm; SGE 054791 Solgel-Wax), und Wasserstoffträgergas bei einer Flussrate von 3,3 ml/min.

Inkubation im Heizblock des Autosamplers: 15 min bei 40 °C

Temperaturprogramm: isotherm für 5 min. bei 40 °C, von 40 °C auf 250 °C mit einer Rate von 22 °C/min und für 5 min. isotherm.

Autosampler: PAL; Injektionsvolumen: 500 µl; Splitmode (Split ratio: 20:1; Split flow: 65.5 ml/min)

Detector (FID): Temperatur: 250 °C, Wasserstoff-Fluss: 30 ml/min, Luft-Fluss: 400 ml/min, Makeup gas: Stickstoff (Fluss: 25 ml/min); gemäß der Methode von Goodridge et al (54).

#### 3.2.5.3.4 Tocopherol-Bestimmung

Der Abbau der Tocopherole während der Lagerung im Kühlschrank über einen Zeitraum von 10 Wochen wurde zusätzlich untersucht, um mögliche Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Mettwürsten vor und während der Lagerung beim Verbraucher und Hinweise auf oxidativen Verderb feststellen zu können (114).

**Proben:** Frische Zwiebelmettwurst (ohne Zusatz von Vitamin E) im Kunstdarm aus einer Produktionscharge, die direkt nach der Reifung vom Hersteller bezogen wurde. Anschließend wurde die Hälfte der Proben hochdruckbehandelt. Die Lagerung erfolgte bei 7 °C im Kühlschrank ohne zusätzlichen Verpackungsschutz. Für die Untersuchung wurde jeweils eine Wurst geöffnet und analysiert.

**Probenvorbereitung:** V. I. Piironen et al. (148) mit folgenden Modifikationen: die Mettwurst wird durchmischt. Es erfolgt keine Zerkleinerung, um Verluste an  $\alpha$ -Tocopherol durch den Wärmeeintrag beim Homogenisieren auszuschließen. Die Tocopherole werden mit n-Hexan unter Zusatz von Ascorbinsäure extrahiert. Der erhaltene Extrakt wird unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in eine definierte Menge n-Hexan aufgenommen und zur HPLC-Bestimmung (119;120) eingesetzt.

Die Fehler dieser Bestimmung resultieren aus einer hier nicht dargestellten Methodenvalidierung, bei der aus einer Probe mehrere Teilproben (Aliquote) hergestellt und deren Tocopherolgehalt bestimmt wurden. Die Schwankungsbreite von ca. 20 % ist auf die inhomogene Fettverteilung innerhalb der grob strukturierten Mettwurst zurückzuführen.

**Chromatographische Erfassung:** gemäß DGF-Einheitsmethoden [Bestimmung der Tocopherole und Tocotrienole F-II 4a (00) in: DGF-Einheitsmethoden, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2004).]

Stationäre Phase: Lichrospher® 100 DIOL, 5 µm, 250 x 4 mm i. D.; Mobile Phase: φ = 6 % TBME in Isooctan; Flussrate: 1,5 ml/min; Injektionsvolumen: 100 µl; Detektion: Fluoreszenz; Anregung: 295 nm/Emission: 330 nm; Kalibrierung im Bereich von 0,25 bis 5 µg/ml Tocopherole

### 3.2.5.4 Enzyme

Enzyme, die am Fettabbau beteiligt sind und dadurch bei der Betrachtung von HPP von Bedeutung sein können, sind Lipase und Lipoxigenase (5;19;25;39;43;65-67;86;110;128;130;143;152;153;164;166;172;173;194).

#### 3.2.5.4.1 Lipase

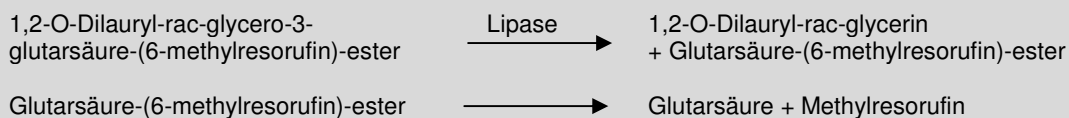
##### Lipase-Aktivitätsbestimmung mittels Roche-Test

Lipasen sind Glycoproteine mit einem Molekulargewicht von 47 000 Dalton. Sie sind Triglycerid-Hydrolasen, die die Spaltung von Triglyceriden zu Diglyceriden, Monoglyceriden oder Glycerin und freien Fettsäuren katalysieren (52;66;110).

Verwendet wurde der enzymatische Test zur quantitativen Bestimmung von Lipase in Humanserum und -plasma von Roche.

Diese Methode beruht auf der Spaltung eines mit Gallensäuren emulgierten spezifischen Lipasesubstrats, dem 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester. Mit der eingesetzten Kombination aus Gallensäure und Colipase wird das Pankreasenzym spezifisch erfasst. Bei Abwesenheit von Colipase wird praktisch keine Lipaseaktivität nachgewiesen. Die Colipase aktiviert nur die Pankreaslipase, nicht andere im Serum vorkommende lipolytische Enzyme. Durch den hohen Anteil an Cholaten ist sichergestellt, dass im Serum vorkommende Esterasen aufgrund der hohen negativen Grenzflächenladung nicht mit der Farbsubstanz reagieren können.

##### Reaktionsgleichung



##### Versuchsdurchführung

Gemäß Extraktion der Lipase aus dem Fleisch (19): Methoden der enzymatischen Analyse, Chemie GmbH, 778 (1962) und Bestimmung der Lipase-Aktivität: Vorschrift der Firma Roche mit folgenden Modifikationen:

Änderungen der Probenkonzentrationen und Reagenzienlösungen:

**Tabelle 23: Reagenzienlösungen der Lipaseaktivitätsbestimmung**

	Messlösung (ml)	Reagenzienleerwert (ml)
Reagenz R1	0,5	0,5
Lipaselösung: 1.000.000 U/l Lipasestandard in TrisHCl-Puffer, pH 7,44	0,05	-
Tris-HCl-Puffer pH7,4	-	0,05
Lösung gut durchmischen und 5 min bei 37 °C inkubieren. Reaktion durch Zugabe von Reagenz R2 starten.		
Reagenz R2	0,3	0,3

In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß werden 500 µl R1 sowie 20 µl der **Lipasestandardlösung** mit 1 000 000 U/l (Lipase in TrisHCl-Puffer, pH 7,44 gelöst) oder des **Proteinextraktes in 0,9 % NaCl-Lösung** pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt 5 min bei 37 °C im Wasserbad. Am Ende werden 300 µl R2 zugesetzt und es erfolgt eine weitere Inkubation, die durch photometrische Messungen alle 5 Minuten, insgesamt 60 Minuten lang, bei 570 und 578 nm unterbrochen wird.

**Tris-HCl-Puffer** und 0,9 % NaCl-Lösung: Herstellung der Pufferlösungen erfolgte gemäß (103).

### **Bestimmung der Lipase-Aktivität in der zu untersuchenden Probe (Mettwurst)**

Proteinextraktion-Durchführung:

#### *Proteinextraktion mit Tris-HCl-Puffer*

Ca. 20 g Probe werden eingewogen und mit 20 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,44) versetzt. Sowohl die Probe (Mettwurst) als auch der Tris-HCl-Puffer werden zuvor auf 4 °C im Kühlschrank temperiert. Die mit Tris-HCl-Puffer versetzte Probe wird mit dem Glasstab homogenisiert. Die Probenlösung wird für 2 h inkubiert und anschließend bei 4 °C und 6040 Rpm für 80 min. zentrifugiert. Der Überstand (die Flüssigkeit) wird abdekantiert. Die restliche feste Probe wird erneut mit 20 ml Tris-HCl-Puffer versetzt, vermischt, nach 2 h zentrifugiert und die Lösung abdekantiert. Insgesamt wird diese Prozedur dreimal durchgeführt. Alle drei Lösungen bzw. Extrakte werden zu einer Lösung bzw. einem Extrakt vereint und bei -15 °C im Tiefkühler gefroren und anschließend gefriergetrocknet (64).

#### *Proteinextraktion mit 0,9 %-NaCl-Puffer*

Ca. 20 g Probe werden eingewogen und mit 20 ml 0,9 % NaCl-Puffer (pH 7,44) versetzt. Sowohl die Probe (Mettwurst) als auch der NaCl-Puffer werden zuvor auf 4 °C im Kühlschrank temperiert. Die mit NaCl-Puffer versetzte Probe wird mit dem Glasstab homogenisiert. Die Probenlösung wird für 2 h inkubiert und anschließend bei 4 °C und 6040 Rpm für 80 min zentrifugiert. Der Überstand (die Flüssigkeit) wird abdekantiert. Die restliche feste Probe wird erneut mit 20 ml NaCl-Puffer versetzt, vermischt, nach 2 h zentrifugiert und die Lösung abdekantiert. Insgesamt wird diese Prozedur dreimal durchgeführt. Alle drei Lösungen bzw. Extrakte werden zu einer Lösung bzw. einem Extrakt vereint und bei -15 °C im Tiefkühler gefroren und anschließend gefriergetrocknet.

#### *Gefriertrocknen der vereinten Extrakte:*

Vorkühlung: 0,75 h; Temperatur: -10 °C;  
Haupttrocknung: 30 h; Temperatur: +4 °C, Vakuum: 0,200 mbar;  
Nachttrocknung: 2 h; Temperatur: -10 °C, Vakuum: 0,001 mbar;  
Sicherheitsdruck (Heizung): 2,560 mbar

Das aus der Mettwurst extrahierte Lipaseenzym wird zur Aktivitätsbestimmung in definierter Menge 0,9 % NaCl-Lösung gelöst. Die Bestimmung erfolgt nach Zugabe des Coenzym Co-lipase mit dem Roche-Test in 1,5 ml halbmikro Einmal-Küvetten oder mittels GC-MS.

#### *Lipase-Aktivitätsbestimmung mittels GC-MS:*

##### *Lipaseinkubation:*

Ca. 20 bis 30 mg Schweinefett werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen. Nach Zugabe von 20 µl der Lipaselösung mit 1 000 000 U/l (Lipase in TrisHCl-Puffer, pH 7,44 gelöst) wird 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend werden 500 µl n-Hexan hinzugefügt. Es folgt eine 1:50-Verdünnung mit n-Hexan mit internem Standard (C<sub>13</sub>-Methylester und C<sub>15</sub>). Die Lösung wird zur Derivatisierung der freien Fettsäuren mit methanolischer HCl eingesetzt. Verdünnungsfaktor insgesamt: 1:50

*Derivatisierung der freien Fettsäuren (FFS) nach der Lipaseinkubation*

Die Hexanphase wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl methanolischer HCl versetzt. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wird 0,5 h bei 50 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend werden 200 µl Wasser hinzugefügt und die beiden Phasen ca. 30 min lang geschüttelt. Die Hexanphase wird in ein Vial überführt und zur gaschromatographischen Untersuchung eingesetzt.

#### 3.2.5.4.2 Lipoxygenase

Die Lipoxygenaseaktivität kann nicht direkt gemessen, sondern nur anhand der Endprodukte wie dem 9- oder 13-Hydroperoxid annähernd bestimmt oder nicht ausgeschlossen werden. Die genauen Abläufe bei der enzymatischen Oxidation von Linolsäure wurden in der Einleitung dargelegt und erläutert.

Bei den Endabbauprodukten, die durch Lipoxygenase entstehen, wie Hexanal und Octanal aus Öl- und Linolsäuremethylestern, sind keine Rückschlüsse auf die Entstehungswege, wie Lipoxygenaseaktivität oder Autoxidation möglich. Lediglich aus dem Verhältnis dieser beiden Produkte zueinander sind Rückschlüsse teilweise möglich (94;154).





## 4 Darstellung der Ergebnisse mit Diskussion

### 4.1 Fleisch- und Fleischprodukte im Konservierungsprozess: Modellfestlegung

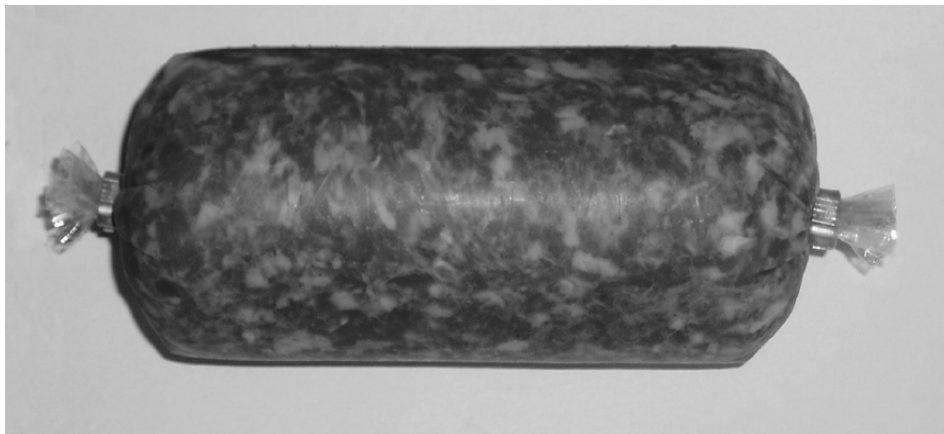
#### 4.1.1 Mettwurst

Bei der Mettwurst und der frischen Zwiebelmettwurst handelt es sich um zerkleinertes, gewürztes und gereiftes Hackfleisch. Der Frischecharakter konkurriert bei der Herstellung der Mettwurst und der Zwiebelmettwurst mit der Reifung (Fermentierung). Bei der Intensität der Reifung bestehen Unterschiede zwischen der schnittfesten Rohwurst (Salami) und der streichfähigen Mettwurst. Die Mettwürste werden mit Nitritpökelsalz versetzt und dadurch umgerötet, wobei keine oder nur eine unzureichende Konservierung beim Inverkehrbringen vorliegt. Deshalb sind diese Produkte teilweise mit einem hohen mikrobiologischen Risiko behaftet. Aus dem häufig unzureichenden Grad der Reifung resultiert das Gefährdungspotenzial für den Verbraucher durch potenzielle Krankheitserreger wie Salmonellen und Staphylokokken. Der Zusatz von Starterkulturen als Konkurrenzflora kann z. B. das Salmonellenwachstum unterdrücken. Die Hochdruckbehandlung könnte zur mikrobiologischen Stabilisierung solcher Produkte führen (99;189).

Die frische Mettwurst ist somit als ein mikrobiologisch-hygienisch anfälliges Produkt einzustufen. Es wäre aus lebensmitteltechnologischer Sicht wünschenswert, durch eine Behandlung eine Haltbarkeitsverlängerung und die gleichzeitige Inaktivierung unerwünschter Mikroorganismen zu erreichen. Ein konventionelles thermisches Pasteurisierungsverfahren ist wegen der veränderten Produkteigenschaften – Verlust der Textur des Rohwurstcharakters – nicht anwendbar. Die Hochdruckbehandlung stellt eine mögliche und sinnvolle Alternative dar.

Zur objektiven Beurteilung verfahrensbedingter Effekte der Hochdruckbehandlung auf das Lebensmittel sind Veränderungen, die während der Lagerung spontan auftreten, abzugrenzen.

**Abbildung 9: Mettwurst**



### 4.2 Festlegung der Behandlungsparameter für die Hochdruckbehandlung

Eine Zusammenfassung der Auswirkungen von der Hochdruckbehandlung auf verschiedene Mikroorganismen in unterschiedlichen Lebensmitteln gibt die Tabelle 24 wieder. Es handelt sich hierbei um eine Zusammenfassung der Angaben im Kapitel 2.3.1 Mikrobiologie.

Wegen des Rohwurstcharakters der Mettwurst und somit der nicht möglichen Anwendung von hohen Temperaturen, und aus den in Kapitel 2.3.1 „Mikrobiologie“ genannten Gründen, wie Keimreduktion, Inaktivierung der Enzyme, sind höhere Drücke und niedrigere Temperaturen notwendig.

**Tabelle 24: Zusammenfassung: Lebensmittel mit Mikroorganismen und Behandlungsparametern**

Lebensmittel	Organismus	Kontaminationsgrad (KBE/g)	Behandlungsdruck (MPa)	Behandlungsdauer (min)	Literaturstelle
streichfähige Rohwurst	E. coli	$10^8$	500/350	10/30	(196)
streichfähige Rohwurst	Listeria innocua	$10^8$	300	15	(196)
streichfähige Rohwurst	EHEC-Keime	$7,6 \cdot 10^5$ (EHEC 0103:H2 und $9,1 \cdot 10^5$ EHEC 026:H)	500	15	(196)
gekochter Schinken und rohe geräucherte Schweinelende	psychrophile und acidophile Bakterien und E. coli		500	10	(92)
Gekochter Schinken und Schweinehackfleisch	Gesamtkeimzahl, Lactobacillen, Pseudomonaden und E. coli		300	15	(109)
gefrorene Hackfleischproben	Streptococcus faecalis, Bacillus subtilis und B. stearothermophilus		50, 225 oder 400	1,0; 30,5 oder 60,0	(122)
rohes oder mariniertes Fleisch	Salmonellen und Listerien Sporenbildner und pathogene Bakterien				(84)
Schweinefleischprodukt mit Karotten und Erbsen	Clostridien und Bacillus spp. Enterococcus faecalis und Staphylococcus aureus Saccharomyces cerevisiae Pseudomonas fluorescens und Escherichia coli		400	30	(121)
Hackfleisch aus Rindfleischmuskel	Listeria innocua		360	5	(43)
Mandarinensaft	Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus awamori		300	5	(43)

Quelle: (43;84;92;109;121;122;196)

Nach der vorliegenden Literatur ist erst ab höheren Behandlungsdrücken die Auswirkung der Hochdruckbehandlung auf die Fette der Mettwurst messbar bzw. sind die Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Mettwürsten nachweisbar.

Nach der Durchführung erster Versuche mit der Mettwurstcharge und anschließender Auswertung ergaben die Ergebnisse, dass die Behandlung mit 300 MPa zu sehr geringen Fettveränderungen bei Mettwürsten führte. Um diese besser analysieren und beurteilen zu können, waren hohe Behandlungsdrücke von 600 MPa und Behandlungszeiten von 10 Minuten notwendig.

Diese Überlegungen führten zu den unten aufgelisteten Behandlungsparametern für alle Chargen.

#### 4.2.1 Hochdruckbehandlungsparameter

In den Tabellen 12, 13 und 14 in Kapitel 3.2.1 sind die Hochdruckbehandlungsparameter der Mettwürste, des Hackfleisches und des Lipasestandards wiedergegeben. Die Wahl der Parameter und ihre Veränderung für die nachfolgenden Chargen erfolgten aus den oben genannten Gründen.

### 4.3 Reales Lebensmittel: frische Zwiebelmettwurst

#### 4.3.1 Vorversuche am realen Lebensmittel Zwiebelmettwurst

Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um eine erste Versuchsreihe zur Überprüfung der Eignung der Methoden, um Unterschiede im Fettverderb zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürsten erfassen zu können.

In Bezug auf die zu behandelnde Fragestellung erfolgte eine Zusammenstellung der möglichen Analysemethoden zur Fettanalytik. Die ausgesuchten Methoden wurden im Hinblick auf ihre Aussagekraft zu hochdruckinduzierten und lagerungsbedingten Fettveränderungen experimentell überprüft. Die Liste ist eine Darstellung des Ergebnisses der Literaturrecherche und wurde bei neuem Erkenntnisstand aktualisiert.

Die ausgewählten Analysemethoden sind in der folgenden Tabelle 25 dargestellt.

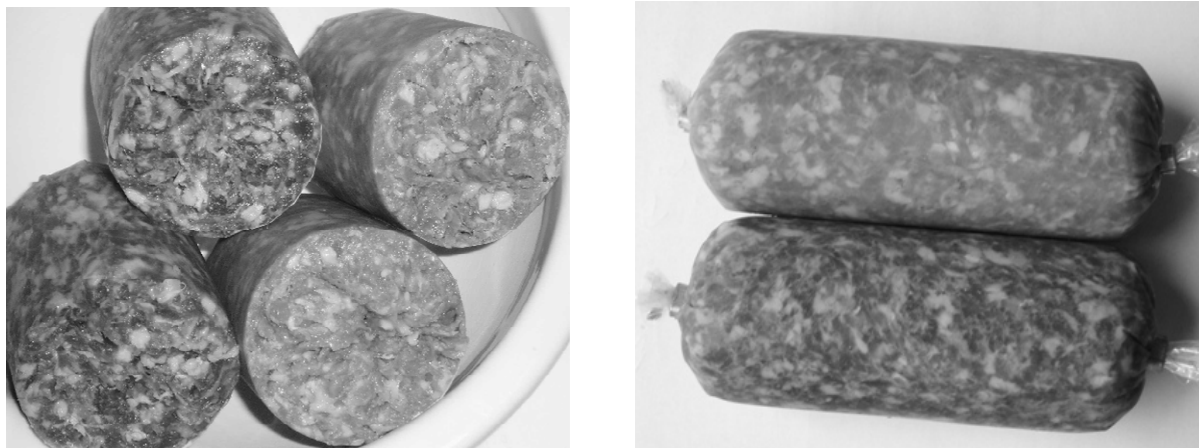
**Tabelle 25: Analysemethoden**

1.	Fettextraktion
2.	Fettkennzahlen: Säurezahl (SZ), Peroxidzahl (POZ)
3.	Thiobarbitursäurezahl (TBA)
4.	Hexanal-, Octanal-Bestimmung
5.	Bestimmung der Enzymaktivität (Lipasen, Lipoxygenasen)
6.	pH-Wert
7.	Vitamin E
8.	Charakteristische Fettsäurezusammensetzung anhand des Fettsäurespektrums
9.	konjugierte Doppelbindungen (Diene)
10.	Freie Fettsäuren (FFS) mittels GC-MS
11.	Hydroperoxidbildung bei ungesättigten Fettsäuren
12.	mikrobiologische Analyse

#### 4.3.2 Allgemeine Parameter

##### 4.3.2.1 Aussehen und Konsistenz

In Abbildung 10 sind die Photos der behandelten und unbehandelten Mettwürste der ersten Charge dargestellt. Es sind deutliche Unterschiede in Aussehen (Farbe) und Streichfähigkeit zwischen den hochdruckbehandelten und nicht behandelten Proben feststellbar.

**Abbildung 10: Behandelte und unbehandelte Mettwurst der ersten Charge**

linkes Bild: Hochdruckbehandelte Mettwurst rechts;  
rechtes Bild: Hochdruckbehandelte Mettwurst oben

Durch die Hochdruckbehandlung waren sichtbare äußerliche Veränderungen festzustellen. Die hochdruckbehandelten Produkte sind blasser in der Farbe und etwas fester in der Konsistenz wie der Schnittversuch zeigte.

#### 4.3.2.2 Fettextraktion

Es wurde ein geeignetes Extraktionsverfahren für mehrere Folgeanalysen gesucht. Anfangs wurde zu jeder Methode eine separate Fettextraktion durchgeführt, d.h. die folgenden Analysen wurden aus unterschiedlich gewonnenen Extrakten durchgeführt. Anschließend wurde eine Methode eruiert, mit der mehrere Analysen parallel aus einem Fettextrakt durchgeführt werden konnten.

Die in der folgenden Tabelle 26 dargestellten unterschiedlichen Verfahrensweisen der Fettextraktion wurden durchgeführt und bewertet.

**Tabelle 26: Fettextraktionen**

1.	Chloroform-Methanol- Kaltextraktion	Extraktion mit und ohne internen Standard (C15)
2.	Hexan- Kaltextraktion	Extraktion mit und ohne Ascorbinsäure
3.	Fettaufschluss nach Weibull-Stoldt	

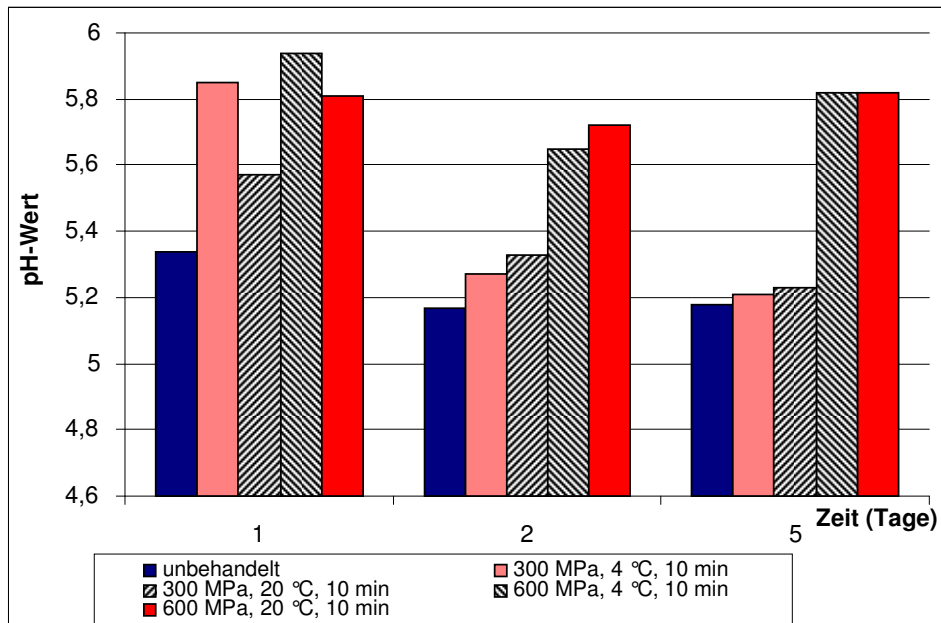
Durch die Ergebnisse der Vorversuche musste die Fettextraktion aus der Mettwurst optimiert werden. Das Fett sollte so extrahiert werden, dass für die zu bestimmenden Analyten der Verlust so gering wie möglich war, d.h. z. B. bei der Vitamin E-Bestimmung keine Oxidationsverluste entstehen konnten. Aus den genannten Gründen kamen der saure Aufschluss nach Weibull-Stoldt und die Soxhlett-Extraktion nicht in Betracht.

Aufbauend auf den separaten Fettextraktionen wurden Extraktionsverfahren eruiert, mit denen mehrere Analysen parallel aus einem Fettextrakt gewonnen werden konnten. Hierbei handelte es sich später um die Chloroform-Methanol-Extraktion für die Bestimmung von SZ, FFS sowie Fettsäurespektrum und um die Hexanextraktion mit Zusatz von Ascorbinsäure für die Vitamin E-Bestimmung.

### 4.3.2.3 pH-Wert

Die pH-Wert-Messung und eine mikrobiologische Analyse wurden versuchsbegleitend zur Produktcharakterisierung durchgeführt.

Abbildung 11: pH-Wert: 1. Charge



Die pH-Werte sind in Abbildung 11 dargestellt. Der pH-Wert der unbehandelten Mettwürste war deutlich – um ca. 0,4 bis 0,5 Einheiten – niedriger als der der mit 600 MPa hochdruckbehandelten Würste. Nach der von Orlie et al. beschriebenen (85;104;113;138) pH-Wert-Erhöpfung steigt der pH-Wert proportional zum ausgeübten Druck bis er einen Punkt erreicht, nachdem eine darüber hinausgehende Erhöhung der Drucke keine pH-Wert-Erhöpfung mehr bewirkt. Wie aus der Literatur abgeleitet, lagen die pH-Werte der mit 300 MPa behandelten Mettwürste dazwischen.

Die Unterschiede in den pH-Werten zwischen hochdruckbehandelten (600 MPa) und unbehandelten Würsten waren, wie der Wilcoxon-Test beweist, statistisch nicht signifikant. Die Vorversuche deuten darauf hin, dass hier keine messbaren Unterschiede vorliegen.

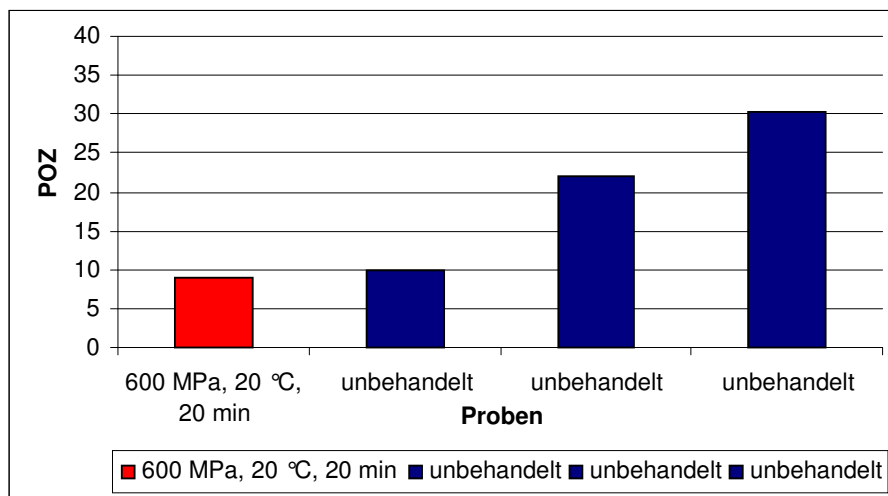
Der pH-Wert der hochdruckbehandelten Proben ist lediglich tendenziell höher als der der unbehandelten.

### 4.3.3 Chemische Fettkennzahlen

#### 4.3.3.1 Thiobarbitursäurezahl (TBA), Peroxidzahl (POZ)

Erste Ergebnisse zeigten, dass bei der Thiobarbitursäurezahl (TBA) und der Peroxidzahl (POZ) keine signifikanten Unterschiede zwischen frischer, hochdruckbehandelter und un behandelter Zwiebelmettwurst nachgewiesen werden können. Es konnte keine optimale Fettextraktion für diese beiden Bestimmungen etabliert werden.

Abbildung 12: POZ: 1. Charge



In der folgenden Abbildung 12 sind die Peroxidzahlen mehrerer Fettextrakte einer unbehandelten Probe im Vergleich zu einer bei 6000 bar und 20 °C behandelten dargestellt. Die Peroxidzahl der unbehandelten Probe schwankte zwischen 10 und 30, die der behandelten lag bei 10. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die POZ-Bestimmung als ungeeignet befunden, um Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Mettwürsten feststellen zu können.

Des Weiteren wurde die Anwendbarkeit der Thiobarbitursäurezahl (TBA) im Rahmen der Lagerversuche überprüft. Es stellte sich heraus, dass die Methode ebenso wie die POZ nicht geeignet war zur Feststellung der Unterschiede zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben.

#### 4.3.3.2 Säurezahl (SZ)

Die Säurezahl (SZ) ist ein Maß für den Gehalt an freien Fettsäuren in Fetten. Es werden neben den freien Fettsäuren auch eventuell vorliegende Mineralsäuren und organische Säuren im Lebensmittel miterfasst, dagegen nicht die gebundenen Fettsäuren (117;141). Die Säurezahl durchläuft im Laufe der Lagerzeit ein Maximum, das durch die höchste Konzentration an freien Fettsäuren verursacht wird. Danach werden die FFS zu weiteren Oxidationsprodukten abgebaut. Die durch Säurezahl und mittels GC-MS bestimmbaren freien Fettsäuren sind ein Zwischenprodukt der Fettoxidation.

Die Säurezahl der Mettwürste ist in den Abbildungen 13 und 14 gegen die Lagerzeit in Wochen dargestellt. Die Säurezahl der unbehandelten Mettwürste war ab der zweiten bis zur sechsten Woche höher als die der bei 300 MPa. Des Weiteren war die Säurezahl der unbehandelten Würste höher als die der bei 600 MPa hochdruckbehandelten Mettwürste. Weiterhin hatten die Proben, die bei 600 MPa behandelt wurden, geringere Säurezahlen als die bei 300 MPa behandelten. Die Säurezahl der unbehandelten war in der vierten Woche ca. 1,5-fach so hoch wie die der bei 600 MPa behandelten Proben.

Abbildung 13: SZ: 1. Charge

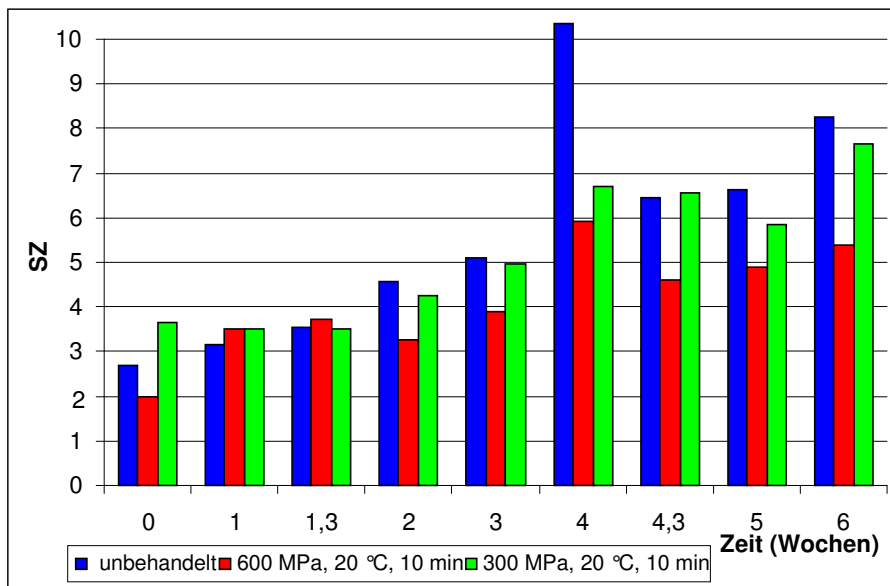
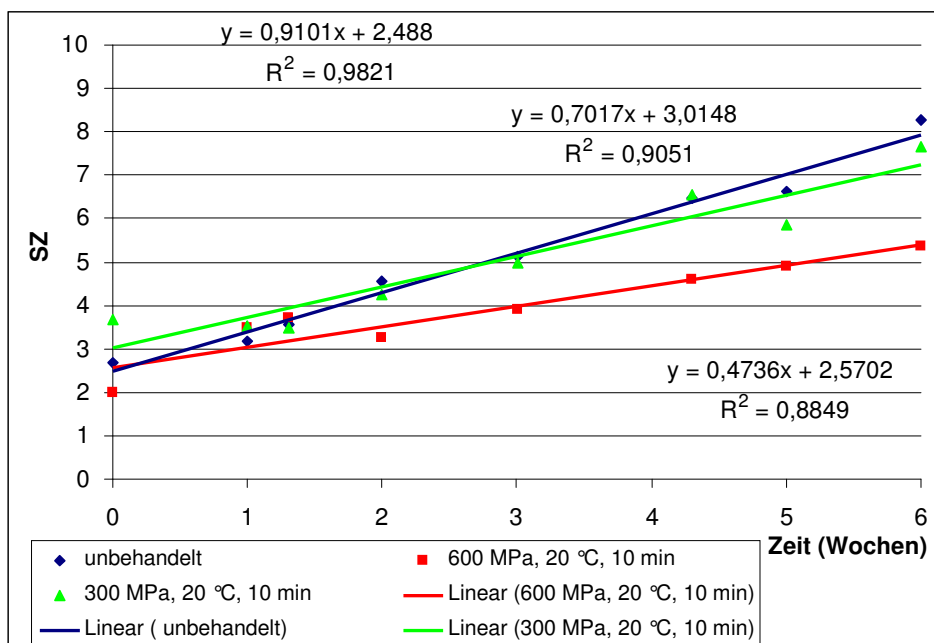


Abbildung 14: Konfidenzintervalle der SZ von der Mettwurst



Werden die Werte in der vierten Woche als Ausreißer angesehen und bei der weiteren Bewertung ignoriert, obwohl nach dem Grubbs-Test diese nicht als Ausreißer zu betrachten sind, ist eine Abhängigkeit der Säurezahl von der Druckhöhe und der Zeit ableitbar.

Die Säurezahl aller Proben (unbehandelte, bei 300 und 600 MPa behandelte) stieg innerhalb von sechs Wochen an. Die Säurezahl der unbehandelten Proben stieg steiler an als die der bei 300 und 600 MPa behandelten Proben. Die Steilheit des Anstiegs ( $m$ ) war bei den unbehandelten Proben ( $m = 0,9101$ ) deutlich höher als die der hochdruckbehandelten ( $m = 0,7017$  und  $m = 0,4736$ ), d.h. die SZ der unbehandelten Probe stieg schneller an. Die Steilheit des Anstiegs betrug bei den unbehandelten Proben ca. 0,9 bei den bei 300 MPa behandelten ca. 0,7 und bei den bei 600 MPa behandelten ca. 0,5 und war somit von der

Druckhöhe abhängig. Je höher der Behandlungsdruck war, desto geringer war die Säurezahl der Proben und ihr Anstieg war langsamer und flacher.

Die Konfidenzintervalle der linearen Ausgleichsgeraden der unbehandelten und der bei 600 MPa und 20 °C behandelten Mettwürste waren signifikant unterschiedlich, wie Abbildung 14 zeigt. Die Ausgleichsgerade der bei 300 MPa und 20 °C behandelten Mettwürste lag wie erwartet dazwischen.

Der Wilcoxon-Test ergab, dass die Unterschiede zwischen unbehandelt und 600 MPa signifikant waren. Weiterhin waren sie zwischen 300 MPa und 600 MPa signifikant. Aber zwischen unbehandelt und 300 MPa war die Säurezahl nicht signifikant unterschiedlich. Dies bedeutet, dass die SZ der bei 300 MPa behandelten sich statistisch von der SZ der unbehandelten Mettwürste kaum unterschied.

#### 4.3.4 Kennzahlen für den oxidativen Fettverderb

##### 4.3.4.1 Freie Fettsäuren (FFS)

Die Gehalte an freien Fettsäuren (FFS) der unbehandelten und hochdruckbehandelten Mettwurst-Proben wurden über sechs Wochen untersucht und die Ergebnisse sind in Abbildung 15 wiedergegeben. Die Menge der freien Fettsäuren der unbehandelten Mettwürste war im gesamten Untersuchungszeitraum durchgehend (insbesondere in der vierten Woche) deutlich höher als die der hochdruckbehandelten. Ersichtlich war ebenfalls der Einfluss der Druckhöhe auf die freien Fettsäuren. Mit steigendem Druck (von 0 MPa über 300 MPa bis 600 MPa) nahm die Menge der freien Fettsäuren im Fettextrakt ab. Hieraus sind erste Tendenzen im Lagerungsverhalten und Unterschiede zwischen den Behandlungen erkennbar. Es gibt ein Maximum, welches unabhängig von der Behandlung ist. Die Höhe des Maximums war von der Behandlung abhängig.

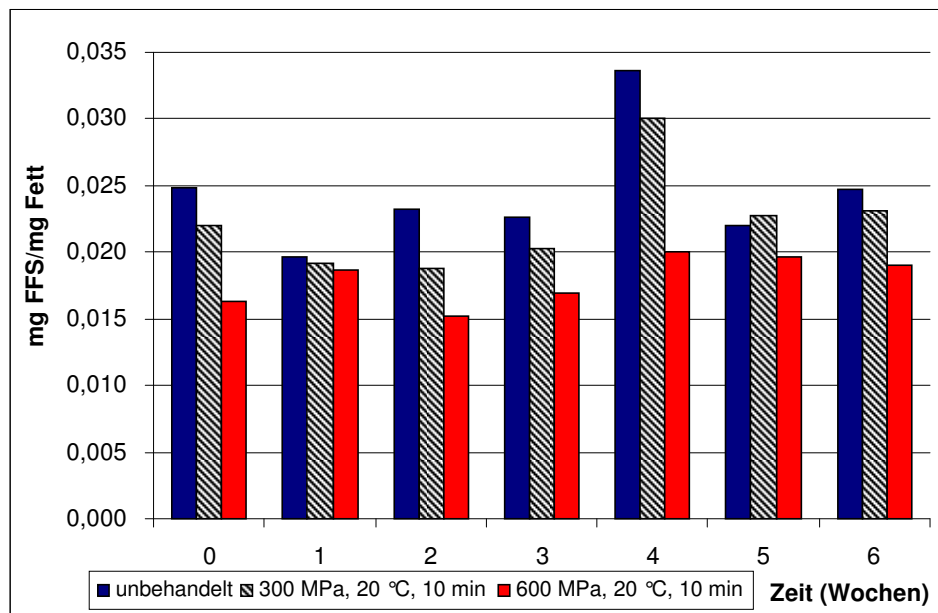
Hier waren ähnlich wie bei der Säurezahl-Bestimmung die FFS der unbehandelten Proben höher als die der bei 300 MPa und bei 600 MPa behandelten. Es gab ebenfalls ein Maximum in der vierten Woche, das bei den unbehandelten Proben signifikant höher war als bei den Proben, die bei 600 MPa behandelt wurden.

Die Unterschiede zwischen den FFS der bei 600 MPa behandelten und der unbehandelten Mettwürste waren nach dem Wilcoxon-Test hoch signifikant. Des Weiteren waren die Unterschiede zwischen den bei 600 MPa und der bei 300 MPa behandelten Mettwürsten nach dem Wilcoxon-Test hoch signifikant. Zwischen den FFS der bei 300 MPa behandelten und der unbehandelten Mettwürste waren die Differenzen eingeschränkt signifikant.

Die Ergebnisse aus der Bestimmung der Säurezahl wurden durch die der freien Fettsäuren mittels GC-MS bestätigt. Die messbaren Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Proben sind, wie bei der Säurezahl, von der Höhe des ausgeübten Druckes abhängig.



Abbildung 15: freie Fettsäuren (FFS): 1. Charge



#### 4.3.4.2 Gesamtfettsäurespektrum

In der Tabelle 5 im Kapitel 2.3.2.2.4.2 „Autoxidation der Linolsäuremethylester“ ist die Fettsäurezusammensetzung von Speck und Schweinefleisch aus mehreren Literaturangaben zusammengestellt (23;171). In der folgenden Tabelle 27 sind die Ergebnisse der Fettsäurezusammensetzung des aus der ersten Mettwurstcharge extrahierten Fettes dargestellt. Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 27 erkennbar ist, liegen alle Gehalte von Fettsäuren der Mettwurstproben innerhalb der in der Literatur beschriebenen Schwankungsbreiten.

Tabelle 27: Fettsäurezusammensetzung der ersten Mettwurstcharge

FS	Mettwurst 1. Charge PZWI20030411 (%)
C14	2,11
C16	7,64
C16:1	0,00
C18	26,38
C18:1 cis	26,06
C18:1 trans	2,59
C18:2	12,05
C18:3	0,00
C20	0,00
C20:4	0,00

#### 4.3.4.3 Lipase

Die Auswirkung von Hochdruck auf Mikroorganismen und Enzyme wurde von Kolakowski et al. beschrieben, wobei das Verhalten der Phosphatase, Peroxidase, Protease und Lipase untersucht wurden. Die Milchenzyme waren weniger drucksensitiv als die meisten Mikroorganismen. So wurde nur ein geringer Einfluss von HPP (200 bis 1000 MPa) auf Lipase in Milch beobachtet (100).

Die möglichen Auswirkungen des Hochdrucks auf die Lipase und ihre Aktivität wurden von Pfister et al. zusammengestellt. In verschiedenen Modellsystemen, insbesondere Puffersystemen, konnten die Lipasen durch HPP inaktiviert werden. Im Gegensatz dazu kam es in realen Lebensmitteln (Camembert und Gouda) nur zu einer geringen bzw. zu keiner Inaktivierung der Lipase. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 28 dargestellt (145).

**Tabelle 28: Lipase-Aktivität**

Herkunft	Behandlungsmedium	Parameter			Einfluss auf Aktivität
		Druck (MPa)	Temperatur (°C)	Haltezeit (min)	
		1100			stabil
		600			Inaktivierung
	TRIS Puffer, pH 7	700	45	10	komplette Inaktivierung
Käse	Camembert	50...200		240	geringe Inaktivierung
Käse	Gouda	50...200		240	stabil

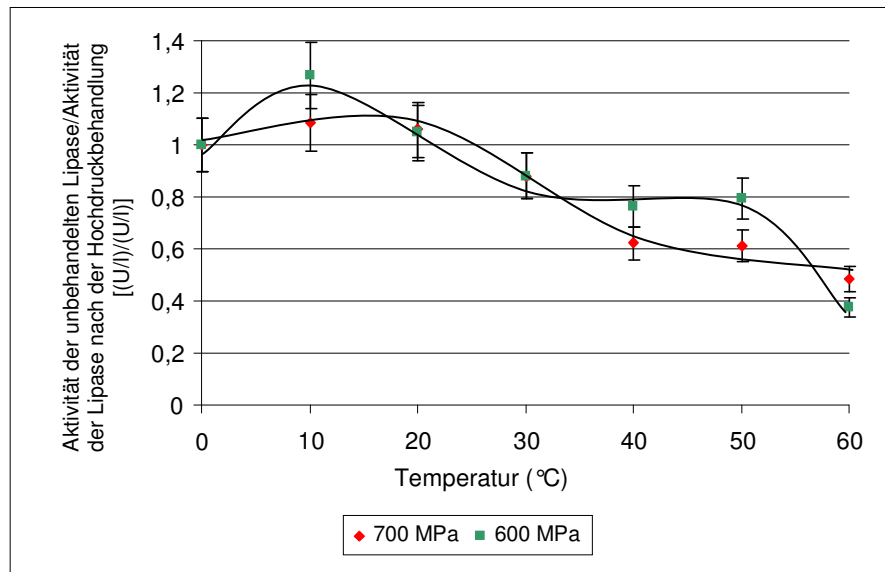
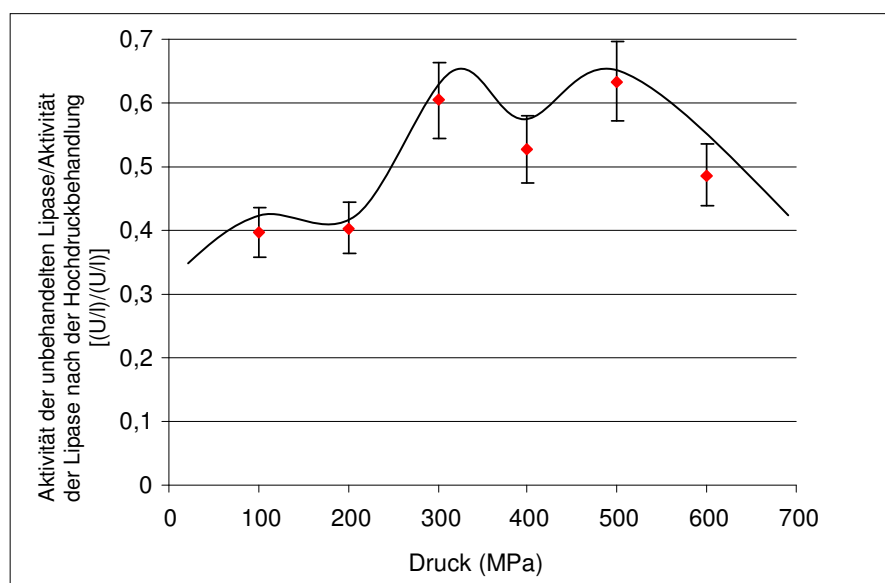
Quelle: (145)

Die Auswirkung von hohen Temperaturen und Hochdruck auf die hydrolytische Aktivität der kommerziellen *Rhizomucor miehei*-Lipase wurde ebenfalls von Kolakowski et al. untersucht, wobei die Inaktivierung bei hoher Temperatur und/oder hohen Drücken experimentell geprüft wurde. Unter Bedingungen bei denen keine Denaturierung unter Hochdruck erfolgt, zeigten die Ergebnisse, dass die Druckbehandlung die Enzyme vor thermischer Inaktivierung schützte (115).

Bei fettreichen Lebensmitteln ist die Lipaseaktivität von besonderer Wichtigkeit. In Bezug auf die Lipaseaktivität wurden für die vorliegende Arbeit weitreichende Untersuchungen vorgenommen. Begründet darauf, dass die Lipase u.a. Triglyceride in freie Fettsäuren spaltet, wurde die Aktivität des Lipasestandards mittels Roche-Aktivitäts-Test bei hohen Temperaturen mit und ohne HPP untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Bei dem Lipasestandard handelte es sich um Lipase aus dem Schweinepankreas.

Dargestellt ist in Abbildung 16 die relative Lipaseaktivität [Aktivität der unbehandelten Lipase/Aktivität der Lipase nach der Hochdruckbehandlung] gegen die Temperatur. Wie erkennbar ist, sank die Lipaseaktivität mit steigender Temperatur, sowohl bei 600 MPa als auch bei 700 MPa. Die Vergleichsprobe, d.h. der unbehandelte Lipasestandard, wurde bei 60 °C innerhalb von 5 Minuten inaktiviert. Unter Hochdruck bei 60 °C wurde die Lipase jedoch nicht inaktiviert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die These aufgestellt, dass HPP stabilisierend auf die Lipase wirken kann.

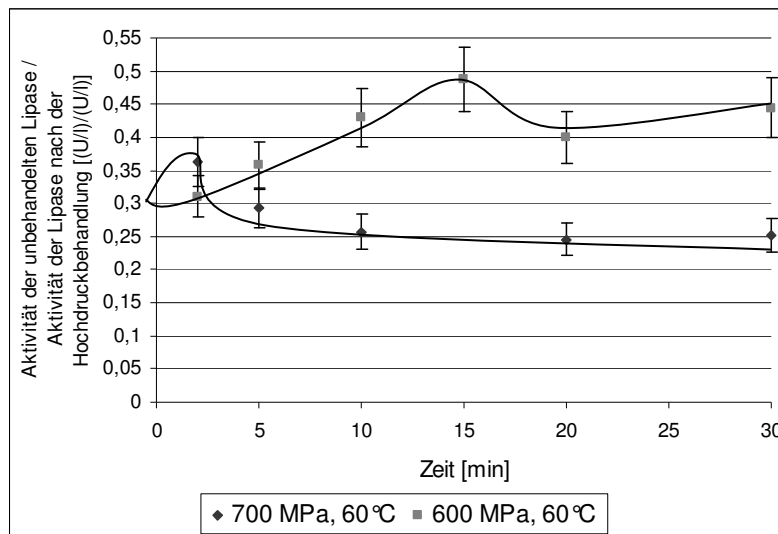
Des Weiteren wurde die Lipaseaktivität in Abhängigkeit vom Druck untersucht und in Abbildung 17 dargestellt. Alle Behandlungen erfolgten bei 60 °C. Die Vergleichsprobe ohne Hochdruckbehandlung wurde nur einer thermischen Behandlung von 10 Minuten ausgesetzt und dadurch inaktiviert. Im Gegensatz dazu blieben die thermisch- und hochdruckbehandelten Proben aktiv. Die ermittelten Ergebnisse zeigten, dass bei vorgegebener Temperatur (60 °C) und Zeit (10 min) bei Drücken oberhalb von 300 MPa eine Aktivitätssteigerung sowie eine Stabilisierung bei höheren Drücken erfolgte.

**Abbildung 16: Lipaseaktivität der Standards gegen Temperatur****Abbildung 17: Lipaseaktivität der Standards gegen Druck**

Die Ergebnisse bestätigen die oben aufgestellte These, dass die Hochdruckbehandlung die Lipase stabilisiert, weil die Lipaseaktivität ab 300 bis 500 MPa und 60 °C für 10 Minuten stabilisiert wurde.

In Abbildung 18 ist die Lipaseaktivität gegen die Dauer der Behandlung in Minuten abgebildet. Bei 700 MPa wurde die Lipase langsam inaktiviert und bei 600 MPa stabilisiert. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Kontrolllipase nach einer thermischen Behandlung (ohne Hochdruck) innerhalb von 5 Minuten inaktiviert war.

Abbildung 18: Lipaseaktivität der Standards gegen Zeit



Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mithilfe des Roche-Enzymtests. Diese Bestimmung ist mit einem relativ hohen Fehler von ca. 10 % behaftet. Deshalb wurde zusätzlich ein Aktivitätsnachweis anhand der Bestimmung der freien Fettsäuren mittels GC-MS noch erarbeitet bzw. parallel der Roche-Enzymtest verbessert.

Um diese Versuche auf das reale Messsystem mit Matrix transferieren zu können, wurde die Durchführung der Hochdruckversuche mit aus der Mettwurst extrahierter Lipase angestrebt. Deshalb fanden erste Versuche zur Extraktion von Lipasen aus Mettwurst und Hackfleisch statt. Diese Aktivitätsbestimmung der Lipase der Mettwurst scheiterte im weiteren Versuchverlauf an der Extraktion der Lipase aus der Mettwurst, weil diese, wie die Versuche zeigten, nicht reproduzierbar war.

Unter der Annahme, dass die oben aufgestellte These stimmte, wurde dies auch durch die weiteren Ergebnisse zur Lipaseaktivität in Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung bei 600 und 700 MPa bestätigt. Hier wurde gezeigt, dass die Lipaseaktivität bei 700 MPa stärker als bei 600 MPa unabhängig von der Dauer der Behandlung stabilisiert wurde.

#### 4.3.5 Bewertung der Ergebnisse der Vorversuche mit Zwiebelmettwurst

Im ersten Teil der Forschungsarbeit wurden die üblichen Methoden der Fettanalytik im Hinblick auf die Messung der Unterschiede zwischen hochdruckbehandelter und unbehandelter Mettwurst über eine Lagerdauer von sechs Wochen angewandt.

Die Hochdruckbehandlung führte zu sichtbaren Unterschieden im Aussehen und in der Konsistenz der Mettwürste. Die hochdruckbehandelten Produkte waren blasser in der Farbe und durch Proteinkoagulation geringfügig fester in der Konsistenz beim Anschneiden.

Es waren sichtbare, aber keine signifikanten Unterschiede in den pH-Werten zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürsten feststellbar.

Als optimale Fettextraktion für die Säurezahl und FFS-Bestimmung wurde die Chloroform-Methanol-Kaltextraktion ermittelt.

Wie die Versuche zeigten, konnten keine Unterschiede mittels der POZ und TBA nachgewiesen werden. Aus analytischen Gründen wurden weitere Untersuchungen zur POZ und zur TBA eingestellt.

Die Säurezahl der unbehandelten Mettwurst-Proben war signifikant höher als die der bei 600 MPa behandelten Proben. Anhand der Vorversuche zur Säurezahl kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Unterschiede in der Säurezahl zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürsten messbar waren. Hierbei spielte die Druckhöhe eine entscheidende Rolle. Zwischen unbehandelten und bei 300 MPa behandelten Proben gab es nur kleine Unterschiede, die statistisch als nicht signifikant charakterisiert wurden. Erst bei deutlich höheren Drücken von 600 MPa waren die Unterschiede bedeutsam.

Es gibt sowohl bei der Säurezahl als auch bei den freien Fettsäuren ein Maximum, welches unabhängig von der Behandlung ist, d.h. es trat bei allen Proben unabhängig von ihrer Behandlung auf. Die Höhe des Maximums und der Zeitpunkt, zu dem es auftrat, waren von der Behandlung abhängig. Die Unterschiede zwischen der SZ und den FFS können sich dadurch ergeben, dass bei der SZ auch kurzkettenige organische Säuren wie Milchsäure und Essigsäure - ( $C_2/C_x$ ) titriert werden und bei den FFS erst ab der Myristinsäure ( $C_{14}$ ) die Bestimmung bzw. Erfassung erfolgt. Die Essig- und Milchsäure können von den Mikroorganismen im Lebensmittel während der Verstoffwechslung produziert werden.

Nach der Betrachtung der Vorversuche zur Säurezahl konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die Hydrolyse durch den Einsatz der HPP unterbunden bzw. verlangsamt wurde.

Die Ergebnisse der FFS, die mittels GC-MS bestimmt wurden, bestätigten die Differenzen in der Säurezahl zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürsten.

Die bei der SZ aufgestellte Hypothese, dass die Hydrolyse, d.h. die Abspaltung der FFS von Triglyceriden (TG), durch HPP verlangsamt wird, konnte durch FFS bestätigt werden (175-178).

Um beurteilen zu können, ob diese Aussagen vom Linolensäure-Modell (101;176) auf reale Lebensmittel wie Mettwurst übertragbar sind, wurde die Optimierung der Hexanal- und Octanal-Bestimmung mittels der Headspace-GC und die dazugehörigen Lagerungsversuche eingeleitet.

Die Bestimmung der nativen Antioxidantien u.a. Tocopherole, mit denen der Beginn der Fettoxidation charakterisiert werden kann, wurde ins Analysenprogramm aufgenommen.

Die Vorversuche zur Aktivitätsbestimmung der Lipase mit dem Lipasestandard aus dem Schweinepankreas wiesen auf einen deutlich negativen Einfluss der HPP auf die Enzyminaktivierung hin. Die unbehandelte Lipase wurde bei 60 °C inaktiviert. Die Aktivität der hochdruckbehandelten Vergleichsproben blieb bei 600 und 700 MPa bis zu 30 °C relativ konstant, nahm danach mit steigender Temperatur bis auf  $4/10$  der Anfangsaktivität ab. Weiterhin wurde die Lipaseaktivität bei 60 °C und Drücken ab 300 bis 600 MPa stabilisiert. Sie wurde bei Behandlungszeiten bis 30 Minuten (600 und 700 MPa) auf  $1/4$  der Anfangsaktivität reduziert, aber nicht wie die Vergleichsprobe inaktiviert. Zusammenfassend sind Druck und Temperatur konträr beeinflussende Parameter. Es handelt sich hierbei um Antagonisten.

Die These, dass die Hochdruckbehandlung die Lipaseaktivität stabilisiert, konnte nach der Auswertung und Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden.

#### 4.4 Bestätigung der Ergebnisse und Überprüfung der Hypothesen aus den Vorversuchen

Im zweiten Arbeitsabschnitt wurden die erhaltenen Ergebnisse mit den ausgewählten Analysemethoden durch die Untersuchung weiterer Chargen bestätigt bzw. ggf. widerlegt. Ferner wurden weitere Analysemethoden eingeführt und überprüft.

Zur Überprüfung der Veränderungen wurden weitere drei Produktionschargen des gleichen Herstellers hochdruckbehandelt, (Hochdruckbehandlungsparameter siehe Kapitel 3.2.1 „Hochdruckbehandlung“) und mit unbehandelten Mettwürsten aus derselben Charge verglichen.

Nach der Methodenoptimierung wurde der Einfluss bzw. die Auswirkung der einzelnen Fettoxidationsparameter (wie Lipaseaktivität, Lipoxygenaseaktivität und Autoxidation) anhand von Lebensmittelmodellen bei vorgegebenen Faktoren der HPP (Druck, Zeit, Temperatur) bestimmt und mit konventionell hergestellten Lebensmitteln verglichen.

##### 4.4.1 Allgemeine Parameter

###### 4.4.1.1 Aussehen und Konsistenz

Die Mettwürste der ersten und dritten Charge wurden (in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt) visuell miteinander verglichen. Die Differenzen in der Farbe zwischen den hochdruckbehandelten Würsten beider Chargen waren deutlich sichtbar.

**Abbildung 19: Querschnitt von behandelter und unbehandelter Mettwurst der ersten und dritten Charge**



linkes Bild: hochdruckbehandelte Mettwürste links;  
rechtes Bild: hochdruckbehandelte Mettwürste unten

In der Regel waren die HPP-Produkte blasser in der Farbe und etwas fester in der Konsistenz beim Anschnitt. Die Mettwurstproben mit den Chargen- und Behandlungsunterschieden sind in Abbildung 11 und 12 abgebildet.

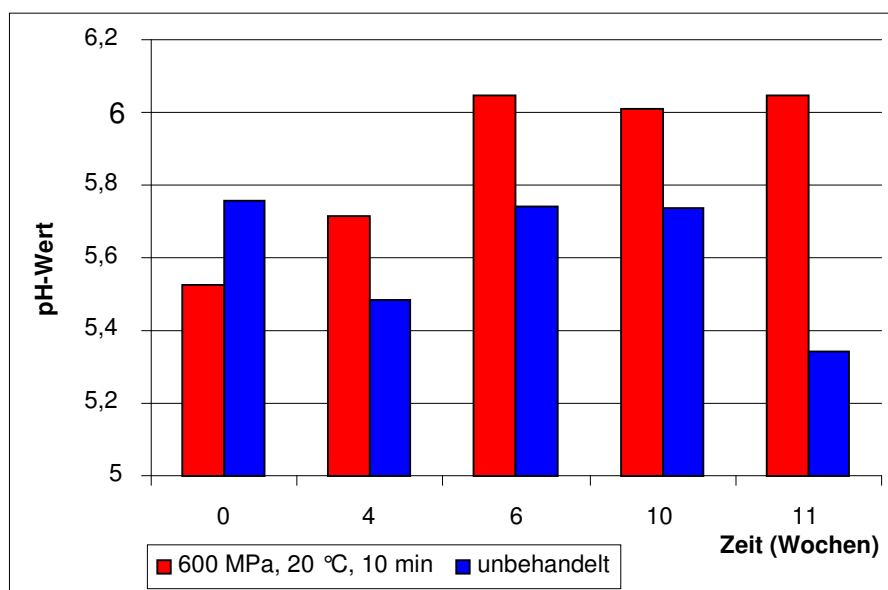
**Abbildung 20: Vergleich der behandelten und unbehandelten Mettwurst der zweiten Charge**

hochdruckbehandelte Mettwurst oben

Die Mettwürste der dritten Charge waren, wie der Schnitttest zeigte, nach der Hochdruckbehandlung streichfähig und sie waren kaum unterscheidbar von den unbehandelten. Die dritte Mettwurstcharge wurde vom Hersteller nach einer veränderten Rezeptur und mithilfe anderer Zusatzstoffe hergestellt. Zum Einsatz kamen u.a. andere Hydrokolloide, mit dem Effekt, dass die Mettwurst nach der Druckbehandlung streichfähiger war.

#### 4.4.1.2 pH-Wert

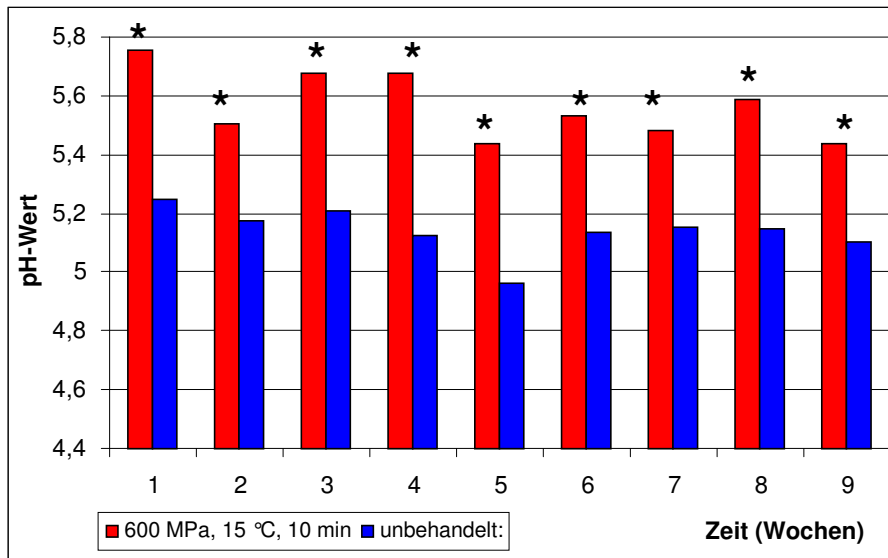
In Abbildung 21 sind die pH-Werte der hochdruckbehandelten und der unbehandelten Mettwurstproben in Abhängigkeit von der Zeit der 2. Charge dargestellt. Die Unterschiede des pH-Wertes zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben waren innerhalb des gesamten Untersuchungszeitraumes statistisch hoch signifikant.

**Abbildung 21: pH-Wert: 2. Charge**

Es zeichnete sich die Tendenz ab, dass der pH-Wert der unbehandelten Proben von 5,7 auf ca. 5,3 sank und der der behandelten Proben von 5,5 auf ca. 6,1 stieg.

Bei allen nachfolgenden Chargen waren die Unterschiede zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürsten sichtbar und bei zwei von drei Chargen sogar statistisch signifikant (Wilcoxon-Test). Als Beispiel für die Mettwurstcharge mit hoch signifikanten Unterschieden ist die vierte Mettwurstcharge in Abbildung 22 dargestellt.

Abbildung 22: pH-Wert: 4. Charge



Eine Mettwurst, Mehrfachbestimmung  $\Rightarrow n=5$ ,

\*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p=99\%$ ,  $n=5$

Die Absenkung des pH-Werts könnte auf eine mikrobielle Aktivität z. B. von Lactobacillen hinweisen, die bei der hochdruckbehandelten Probe vermindert ist. Wie in Kapitel 4.4.1.3 Mikrobiologie der Mettwurst dargestellt ist, führte die Hochdruckbehandlung zur vollständigen Abtötung der Lactobacillen. Die hochdruckbehandelten Mettwürste wiesen keine Milchsäurebakterien auf, während bei den unbehandelten Mettwürsten Milchsäurebakterien von  $10^8$  KBE/g festgestellt werden konnten. Durch die Hochdruckbehandlung wurde ebenfalls die Gesamtkeimzahl von  $10^8$  KBE/g auf ca.  $10^2$  bis  $10^4$  KBE/g reduziert.

#### 4.4.1.3 Mikrobiologie der Mettwurst

Die Mikrobiologie wurde versuchsbegleitend bei einer späteren Mettwurst und Hackfleisch-Charge durchgeführt. Die mikrobiologische Analyse wurde versuchsbegleitend zur Produktcharakterisierung durchgeführt.

Mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Rohwürsten und Rohpökelfleisch und zur Beurteilung von ungewürztem und gewürztem Hackfleisch auf Handelsebene sind bekannt und in den Tabellen 29 und 35 dargestellt (1-3).

Bundesweite Erhebungen zum mikrobiologischen Status von frischen streichfähigen Mettwürsten 1997 vom BgVV (182) ergaben, dass von 514 untersuchten Mettwürsten 8,2 % der Geflügel-Mettwürste und 3,2 % der Rotfleisch-Mettwürste auf Salmonella positiv waren. Die Geflügel-Mettwürste wiesen durchschnittlich eine höhere Salmonellenkontamination als die Rotfleisch-Mettwürste auf. Bedingt durch den Zusatz von Starterkulturen waren die Milchsäurebildner stets der Hauptanteil der Flora in den Rotfleisch- und den Geflügel-Mettwürsten. Die Gehalte der *Enterobacteriaceae* waren unterhalb der Nachweisgrenze von  $10^2$  KBE / g.



Deutlich erhöhte Gehalte an *Pseudomonas spp.* und *Enterobacteriaceae* wurden vermehrt in Zwiebelmettwurst, Teewurst und Braunschweiger Mettwurst beobachtet. Des Weiteren wurden Gehalte von  $10^3$  bis zu  $10^4$  KBE/g koagulasepositiven Staphylokokken nachgewiesen (182).

Die mikrobiologischen Untersuchungen wurden mit einer Charge Hackfleisch durchgeführt (siehe hierzu Kapitel: 4.7.1.3 Mikrobiologie des Hackfleisches).

Alle Mettwurstproben waren erwartungsgemäß mikrobiologisch unbedenklich. Die Analyseergebnisse sind in Tabelle 30 abgebildet, während die mikrobiologischen Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Rohwürsten und Rohpökelfleisch auf Handelsebene (1-3) in Tabelle 29 gezeigt sind.

**Tabelle 29: Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Rohwürsten und Rohpökelfleisch**

Keime	Ware	Richtwert (KbE/g)	Warnwert (KbE/g)
Enterobacteriaceae	ausgereift + schnittfest streichfähig	$1 \times 10^2$ $1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$ $1 \times 10^4$
Koagulase-positive Staphylokokken		$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$
Escherichia coli		$1 \times 10^1$	$1 \times 10^2$
Salmonellen		-	nicht nachweisbar in 25 g
Listeria monocytogenes		-	$1 \times 10^2$

Quellen: (1-3)

Die Gesamtkeimzahl, Milchsäurebakterien, Enterobacteriaceae, Listerien und Salmonellen aller Proben wurden bestimmt und alle Ergebnisse in Tabelle 30 wiedergegeben.

**Tabelle 30: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Mettwurst**

Datum der Untersuchung	GKZ (KBE/g)	Lactobacillus (KBE/g)	Entrobacteriaceae (KBE/g)	Listerien (KBE/g)	Salmonella (KBE/g)		
			VRBD		PALCAM	RAMBACH®	XLD
17.05.2005;HPP	1,42E+04	0	0	0	0	0	0
17.05.2005	6,31E+08	5,72E+08	9,54E+02	0	0	0	0
23.05.2005;HPP	5,70E+04	0	0	0	0	0	0
23.05.2005	6,95E+08	6,70E+08	1,40E+03	0	0	0	0
30.05.2005;HPP	7,00E+03	0	0	0	0	0	0
30.05.2005	5,04E+08	4,32E+08	2,00E+02	0	0	0	0
06.06.2005;HPP	1,55E+03	0	0	0	0	0	0
06.06.2005	5,63E+08	5,23E+08	6,50E+02	0	0	0	0
13.06.2005;HPP	6,95E+04	0	0	0	0	0	0
13.06.2005	5,50E+08	5,80E+08	5,00E+02	0	0	0	0
20.06.2005;HPP	2,70E+02	0	0	0	0	0	0
20.06.2005	6,14E+08	5,40E+08	3,00E+02	0	0	0	0

Alle unbehandelten Mettwürste zeigten Gesamtkeimzahlen von  $10^8$  KBE pro g Mettwurstmaterial, während die hochdruckbehandelten Rohwürste deutlich geringere Gesamtkeimzahlen von  $10^2$  bis  $10^4$  KBE/g aufwiesen.

Alle Proben wurden auf die Anwesenheit von Milchsäurebakterien untersucht. Während die hochdruckbehandelten Mettwürste keine Milchsäurebakterien aufwiesen, konnten bei den Mettwürsten Milchsäurebakterien von  $10^8$  KBE/g festgestellt werden.

Weiterhin wurden alle Proben auf die Anwesenheit von Enterobacteriaceae überprüft. Es wurden für die unbehandelten Mettwürste Keimzahlen von 1025 KBE/g nachgewiesen, während die hochdruckbehandelten Mettwürste durchgehend keine *Enterobacteriaceae* aufwiesen.

Alle Proben wurden ebenfalls auf die Anwesenheit von *Listeria spp.* und *Salmonella* untersucht. Auf diesen Selektivagarn (VRBD, PALCAM, RAMBACH, XLD und BPLS) wurden bei keinen Proben Listerien und Salmonellen nachgewiesen.

Zusammenfassend waren die Gesamtkeimzahlen der Mettwürste von  $10^8$  auf teilweise bis zu  $10^2$  KBE/g durch Hochdruck reduziert. Weiterhin wurden Milchsäurebakterien, Enterobacteriaceae, *Listeria spp.* und *Salmonella* durch Hochdruck (600 MPa, 10 Minuten, 4 °C) vollständig abgetötet.

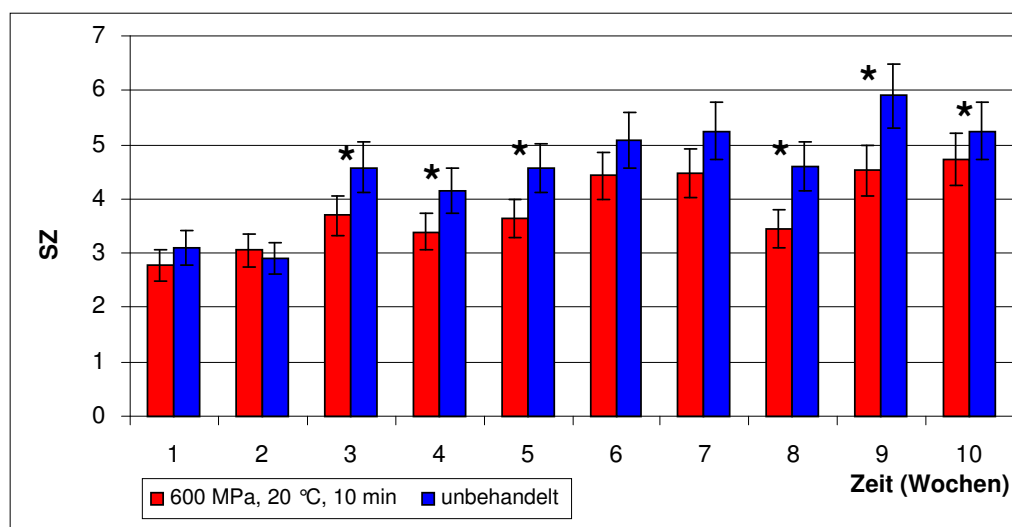
Zusammenfassend konnten in keiner der Proben Salmonellen und Listerien nachgewiesen werden. Die GKZ der konventionell hergestellten Mettwürste war niedriger als der Richtwert zur Beurteilung vom gewürzten und ungewürzten Hackfleisch auf Handelsebene. Die Gesamtkeimzahlen der hochdruckbehandelten Proben lagen unter 100 000 GKZ/g und waren somit deutlich unter der GKZ der konventionell hergestellten Mettwürste. Die Mikroorganismenflora (Lactobacillen, Entrobacteriaceae, Listerien und Salmonellen) der hochdruckbehandelten Mettwürste (Tab. 30) wurden inhibiert.

#### 4.4.2 Chemische Fettkennzahlen

##### 4.4.2.1 Säurezahl (SZ)

Die Ergebnisse der Vorversuche konnten mit der zweiten Mettwurstcharge nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse der zweiten Charge (Ergebnisse im Anhang wiedergegeben) deuten darauf hin, dass keine Unterschiede zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürsten vorlagen.

Abbildung 23: SZ: 3. Charge



Eine Mettwurst geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow$  n=4,

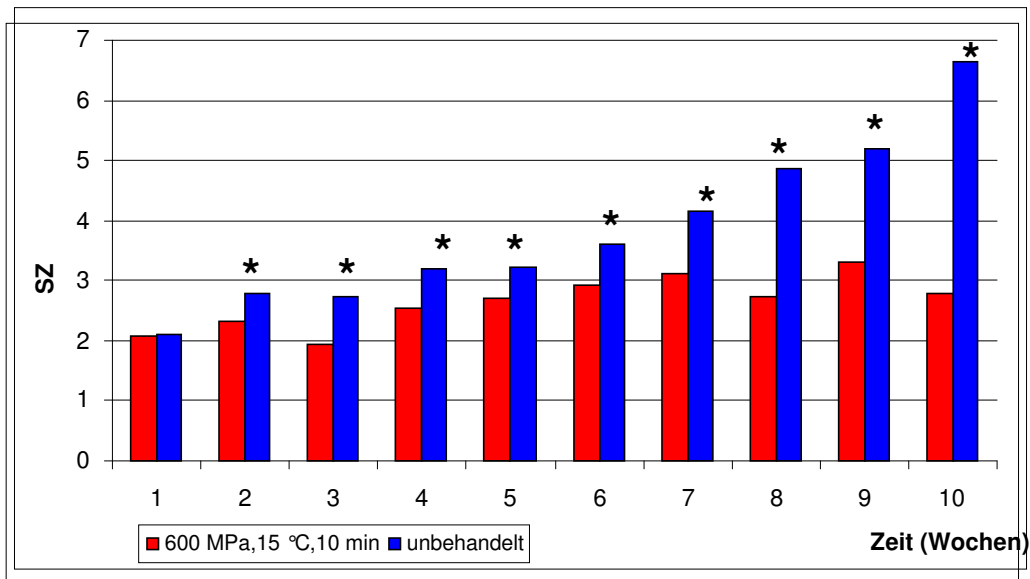
\*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test, p=95 %, n=4

Im Gegensatz dazu waren die Säurezahlen der unbehandelten Proben der dritten Charge tendenziell höher als die der hochdruckbehandelten Proben. Der Säurezahl-Verlauf innerhalb des Analysenzeitraumes von zehn Wochen der dritten Mettwurstcharge ist in Abbil-

dung 23 gezeigt. Es waren statistisch signifikante Unterschiede ab der dritten bis zur fünften Woche und in der achten bis zehnten Woche nachweisbar.

Hierbei waren die Konfidenzintervalle der linearen Ausgleichsgeraden von unbehandelten und bei 600 MPa behandelten Mettwürsten der dritten Charge nicht signifikant unterschiedlich, aber der Wilcoxon-Test ergab, dass die Unterschiede zwischen unbehandelten und bei 600 MPa behandelten Proben hoch signifikant waren.

**Abbildung 24: SZ: 4. Charge**



Eine Mettwurst geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow$   $n=4$ ,  
 \*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p=95\%$ ,  $n=4$

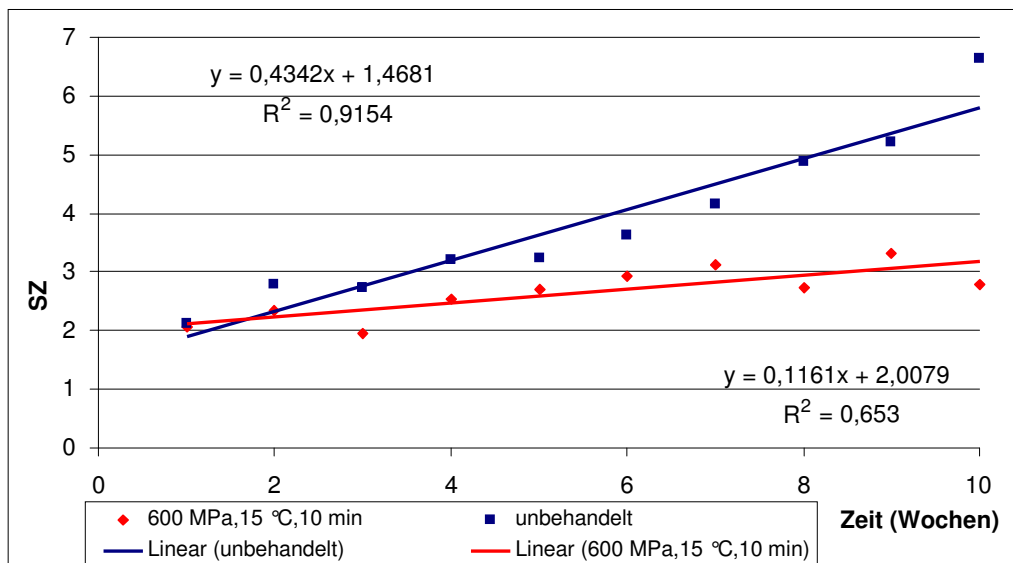
Auch bei der vierten Charge waren die Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Mettwürsten ab der zweiten bis zur zehnten Woche hoch signifikant. Die Säurezahl-Bestimmung der Mettwürste der vierten Charge ist in Abbildung 24 dargestellt.

Hier waren die Konfidenzintervalle der linearen Ausgleichsgeraden der unbehandelten und der bei 600 MPa behandelten Mettwürste, wie es in Abbildung 25 dargestellt ist, statistisch signifikant.

Des Weiteren ergab der Wilcoxon-Test, dass die Unterschiede zwischen unbehandelten und bei 600 MPa behandelten Proben hoch signifikant waren.

Eine mögliche Erklärung für die Differenzen in den Unterschieden in der Säurezahl zwischen behandelten und unbehandelten Mettwürsten von den verschiedenen Chargen ist, dass die Zusammensetzung des Fetts in jeder Charge variierte und somit der Grad der Auswirkungen der Hochdruckbehandlung ebenfalls stark schwankte.

Abbildung 25. SZ: 4. Charge: Konfidenzintervalle



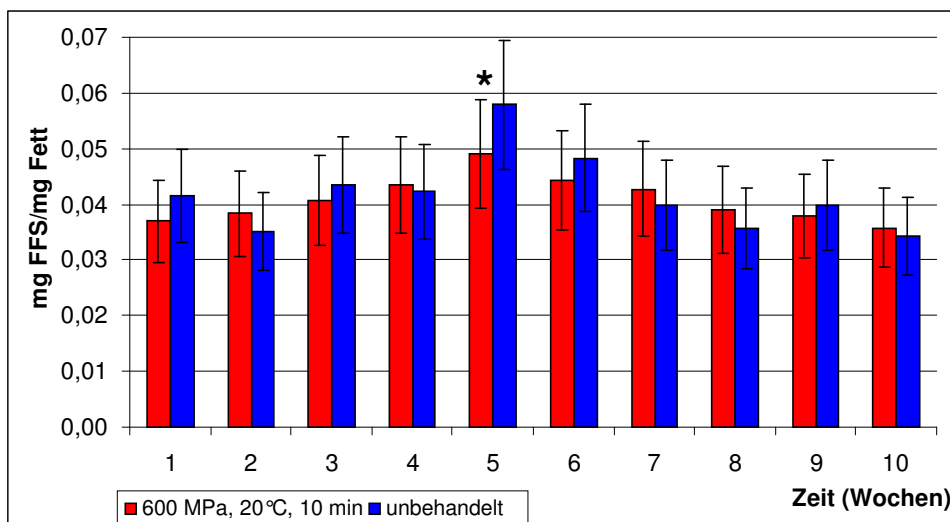
#### 4.4.3 Kennzahlen für den oxidativen Fettverderb

##### 4.4.3.1 Freie Fettsäuren (FFS)

Es waren keine messbaren Unterschiede in der zweiten Charge (ohne Abbildung, Ergebnisse im Anhang) zwischen behandelten und unbehandelten Würsten feststellbar (wie bei der SZ dieser Charge). Die Verläufe der FFS-Konzentrationskurven gegen die Zeit waren bei der behandelten und unbehandelten Probe nahezu gleich.

Die Verläufe der FFS-Konzentrationskurven in der Untersuchungszeit von zehn Wochen (Abbildung 26) der dritten Charge waren bei der behandelten und unbehandelten Probe tendenziell bis auf eine Woche gleich. Bei beiden Kurven ist ein Maximum in der fünften Woche zu erkennen. Der Gehalt von FFS der Probe ohne Hochdruckbehandlung war in der fünften Woche signifikant höher als der der hochdruckbehandelten Probe.

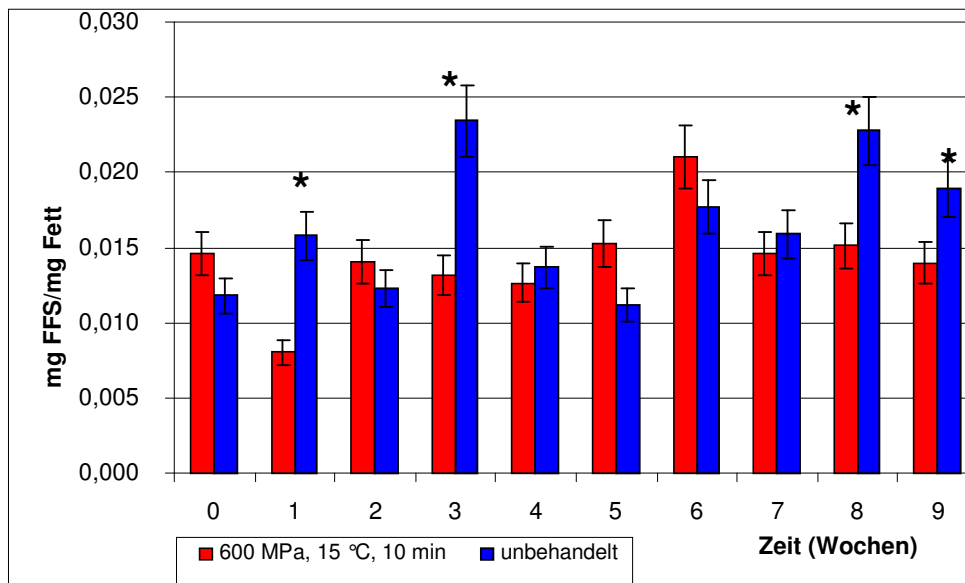
Abbildung 26: FFS: 3. Charge



Eine Mettwurst geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow n=4$ ,  
 \*signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p=95\%$ ,  $n=4$

Es handelt sich hier um kein zufälliges Phänomen. Es trat bei allen Chargen auf. Es sind aber nicht alle Ergebnisse in Diagrammen dargestellt. Die Ergebnisse sind in Tabellen im Anhang gezeigt.

Abbildung 27: FFS: 4. Charge



Eine Mettwurst geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow$  n=4,  
\*signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test, p=95 %, n=4

In der ersten, dritten, achten und neunten Woche der vierten Mettwurstcharge war der FFS-Anteil der unbehandelten Mettwurstprobe – gezeigt in Abbildung 27 – höher als der der hochdruckbehandelten Probe. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, wurde die Bildung von FFS durch HPP unterdrückt.

#### 4.4.3.2 Gesamtfettsäurespektrum

In der folgenden Tabelle 31 sind die Ergebnisse der Fettsäurezusammensetzung der Mettwürste der zweiten und vierten Charge dargestellt. Diese einzelnen Fettsäuren der Mettwürste wurden mit den in der Tabelle 5 im Kapitel 2.3.2.3.3.2 „Autoxidation der Linolsäuremethyl-ester“ zusammengestellten Literaturangaben zur Fettsäurezusammensetzung von Speck und Schweinefleisch (23;171) verglichen.

Tabelle 31: Fettsäurezusammensetzung der zweiten und vierten Mettwurstcharge

FS	Mettwurst	
	2. Charge PZWI20031107 (%)	4. Charge PZWI20040629 (%)
C14	3,20	2,41
C16	32,18	4,34
C16:1	0,00	0,00
C18	26,15	28,47
C18:1 cis	24,56	24,98
C18:1 trans	2,86	2,54
C18:2	10,46	13,70
C18:3	0,00	0,00
C20	0,00	0,00
C20:4	0,00	0,00

Alle Gehalte von Fettsäuren der Mettwürste liegen innerhalb der in der Literatur beschriebenen Schwankungsbreiten. Es waren Schwankungen der einzelnen Chargen untereinander nachweisbar.

#### 4.4.3.3 HS-GC: Octanal

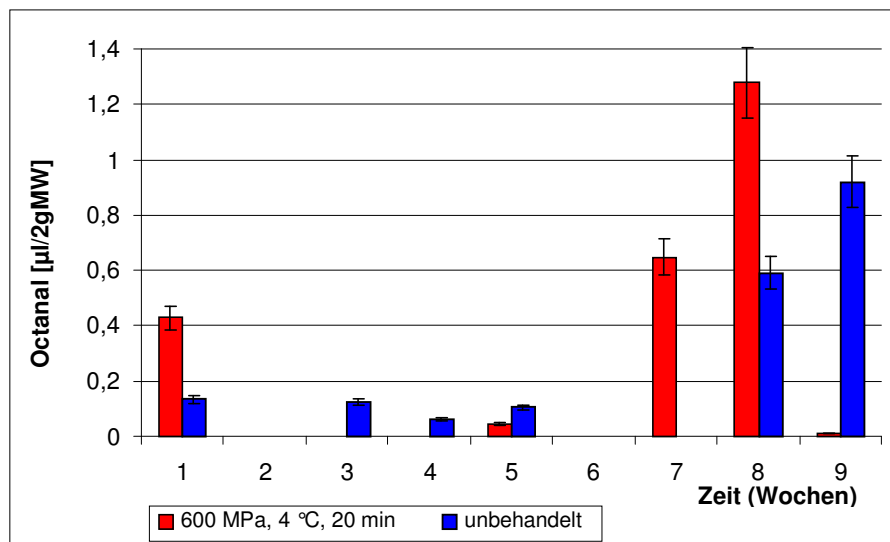
Da die Ölsäure zu ca. 26 bis 28 % in den untersuchten Mettwürsten vorkam und die Linolsäure zwischen 2,5 und 3 % in denselben Proben vorlag, wurde aufgrund der höheren Ausgangskonzentration von Ölsäure weniger Hexanal als Octanal gebildet.

Daher erfolgen die nachfolgenden Betrachtungen stellvertretend für alle flüchtigen Abbauprodukte nur für Octanal.

In der zweiten Charge war erst in der siebten Woche ein erhöhter Octanalgehalt in der hochdruckbehandelten Probe nachweisbar. Eine Verdoppelung der Octanalkonzentration erfolgte von der siebten auf die achte Woche. Dies ist in Abbildung 28 dargestellt.

Bei der unbehandelten Probe war der Octalanstieg erst in der achten Woche zu verzeichnen. Insgesamt war der Octanalgehalt zu allen Zeiten der Messung in der druckbehandelten Probe höher als in der Kontrollprobe. Das Maximum des Octanalgehaltes bei der behandelten Probe erschien zeitlich früher im Vergleich zur unbehandelten Mettwurst.

**Abbildung 28: Octanalkonzentration: 2. Charge**

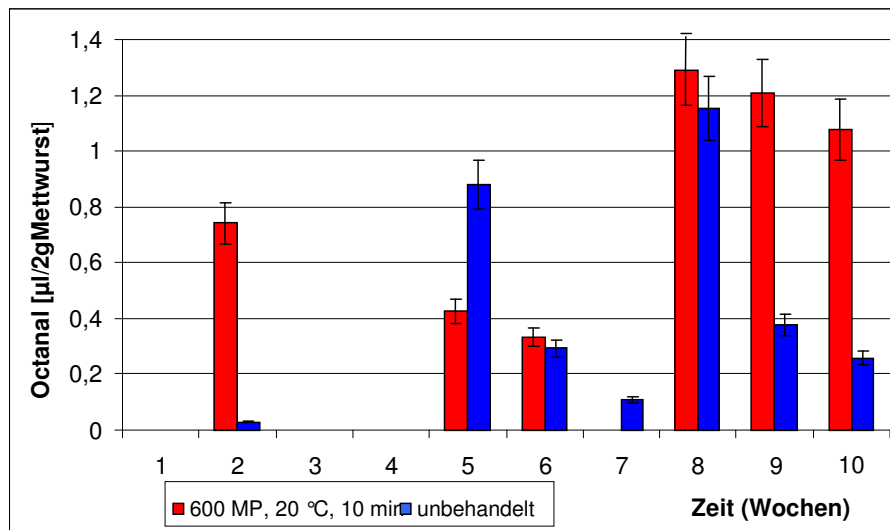


Fehlerbalken aus Mehrfachbestimmung, Matrixkalibration, n=10  
(Probe geöffnet im Kühlschrank gelagert und wöchentlich analysiert)

Auch in Abbildung 29 ist wie bei den anderen Abbildungen (28 und 30) die Octanalkonzentration gegen die Zeit in Wochen aufgetragen.

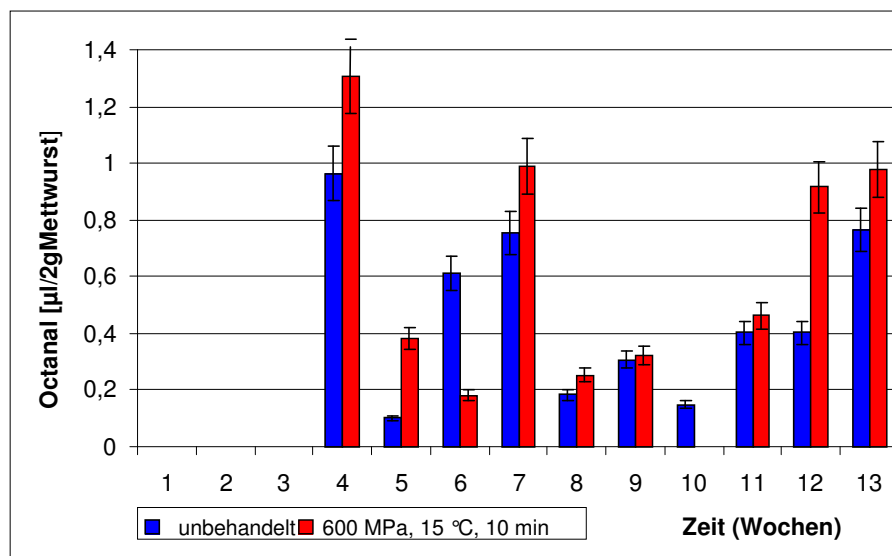
Bei der behandelten Probe der dritten Charge stieg die Octanalkonzentration zum ersten Mal in der zweiten bzw. dann in der fünften und später in der achten und neunten Woche an. In den unbehandelten Mettwürsten traten erst ab der fünften Untersuchungswoche messbare Octanalkonzentrationen auf und erreichten aber nicht die der hochdruckbehandelten Mettwurstproben.

Abbildung 29: Octanalkonzentration: 3. Charge



In der vierten Charge (Abbildung 30) waren tendenziell zwei Maxima ersichtlich. Sowohl bei der behandelten als auch bei der unbehandelten Mettwurst waren die Octanalgehalte der unbehandelten, wie in den Chargen davor, geringer als die der behandelten. Der Octanalgehalt der hochdruckbehandelten Mettwürste war in der vierten Woche (erstes Maximum) wesentlich höher als der der unbehandelten. Das zweite Maximum wurde bereits in der siebten Woche und das dritte in der zwölften und dreizehnten Woche erreicht. In allen Maxima war der Octanalgehalt der hochdruckbehandelten Proben deutlich höher als der der unbehandelten.

Abbildung 30: Octanalkonzentration: 4. Charge



Zwei Maxima führten zu der These, dass im Verlauf des ersten Maximums die Bildung von Octanal primär durch die Autoxidation und die fleischnative Lipoxygenaseaktivität gebildet wurde. Das zweite und weitere Maximum beruhte möglicherweise auf der Lipoxygenaseaktivität von Mikroorganismen.

Die Lipoxygenase könnte aus den Mikroorganismen stammen, die durch die Hochdruckbehandlung abgetötet wurden, aber ihre Enzyme nicht inaktiviert wurden. Weiterhin könnten anaerobe Mikroorganismen, die gegen die Hochdruckbehandlung resistenter sind, die aber

nicht untersucht wurden (siehe Kapitel 4.4.1.3 Mikrobiologie der Mettwurst), überlebt haben und zu diesem Fettabbau führen.

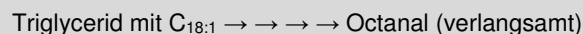
Die Ergebnisse der untersuchten Mettwürste lassen auf eine verkürzte Induktionsphase des Fettverderbs bei der hochdruckbehandelten Probe (ca. eine Woche) schließen. Anders formuliert konnte in der behandelten Mettwurst Octanal eine Woche früher nachgewiesen werden. Des Weiteren waren die Octanalgehalte der hochdruckbehandelten Proben höher als die der unbehandelten.

#### 4.4.3.4 Die Abhängigkeit der Octanalkonzentration von der freien Ölsäure

Aus der Ölsäure wird während der Fettoxidation Octanal gebildet (14;16;23;33;34;48;49;140). Um feststellen zu können, ob zwischen den beiden untersuchten Parametern freie Ölsäure und Octanal eine Abhängigkeit besteht, wurden die Octanalkonzentration gegen die freie Ölsäure (C18:1) in Diagrammen gegeneinander aufgetragen. Aus den Triglyceriden wurden die Fettsäuren, auch die Ölsäure, freigesetzt. Aus der freigesetzten Ölsäure entsteht Octanal. Octanal kann auch aus den nicht freien (noch an Triglyceride gebundenen Ölsäuren) Ölsäuren verlangsamt gebildet werden.



In dieser Reaktionsreihenfolge ist die freie Ölsäure ein Zwischenprodukt und Octanal das leichtflüchtige Endprodukt. Das Edukt ist das Triglycerid mit der Ölsäure.

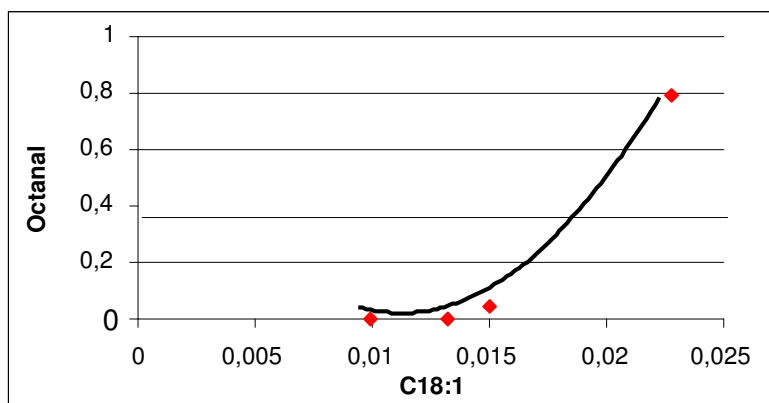


In der zweiten Reaktion ist die an Triglyceride gebundene Ölsäure das Edukt und Octanal das leichtflüchtige Endprodukt. Hierbei handelt es sich um eine Reaktion erster Ordnung.

Die Reaktion, bei der die Ölsäure ein Zwischenprodukt ist, ist eine Reaktion zweiter Ordnung.

In den folgenden Abbildungen ist die Octanalkonzentration gegen die Ölsäurekonzentration dargestellt. Die Octanalkonzentration  $[y = f(x)]$  ist von der Ölsäurekonzentration  $[x = \text{Ölsäurekonzentration}]$  abhängig.

**Abbildung 31: HPP: Octanal vs. FFS: C18:1, 2. Charge**



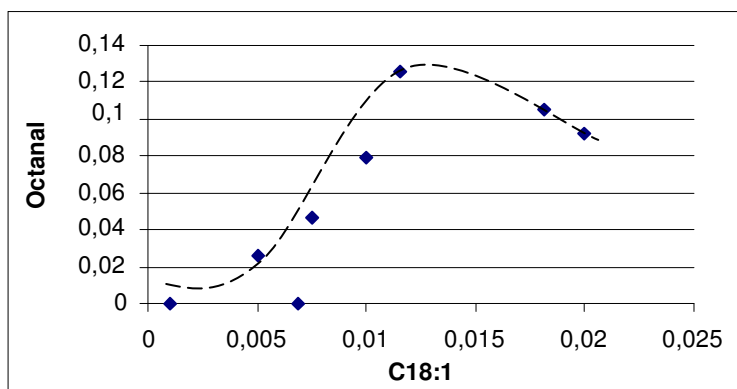


In Abbildung 31 ist die Octanalkonzentration gegen die Ölsäurekonzentration einer hochdruckbehandelten Mettwurstprobe dargestellt. Hierbei handelt es sich nach der allgemeinen Kinetik um eine Reaktion zweiter Ordnung. Je mehr Ölsäure aus den Triglyceriden freigesetzt werden kann, desto mehr Octanal wird nach einer anfänglichen Induktionsperiode aus der freien Ölsäure gebildet.

In Abbildung 32 ist die Octanalkonzentration gegen die Ölsäurekonzentration einer unbehandelten Mettwurstprobe gezeigt. Die Konzentration der freien Ölsäure in der unbehandelten Probe war annähernd so hoch wie in der behandelten Vergleichsprobe. Die Octanalendkonzentration ist aber um ca.  $\frac{1}{4}$  niedriger. Dieses Phänomen, dass die Endprodukte der Fettoxidation durch HPP gefördert werden, wurde auch bereits in der Literatur von Tauscher et al. beschrieben (176).

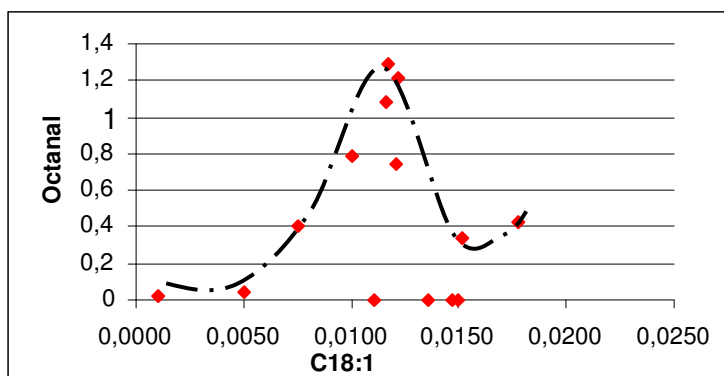
Die Reaktion ist zeitlich durch unterschiedliche Faktoren, die den Fettabbau beeinflussen können, verschoben im Vergleich zu der hochdruckbehandelten Probe. Es hat sich schnell nach der exponentiell verlaufenden Reaktion zweiter Ordnung ein Gleichgewicht gebildet: „steady state“, d.h. die Bildung und der Verlust von Octanal waren durch das Diffundieren aus der Probe wegen des hohen Dampfdruckes des Octanals im Gleichgewicht.

**Abbildung 32: oHPP: Octanal vs. FFS: C18:1, 2. Charge**



Die anderen Chargen wiesen ähnliche Verläufe der Octanalkonzentration gegen die freie Ölsäurekonzentration auf. In Abbildung 33 ist eine weitere Veränderung dargestellt. Hier ist die Octanalkonzentration gegen die Ölsäurekonzentration einer hochdruckbehandelten Probe dargestellt. Nach einem sehr steilen Maximum an Octanal wurde kein „steady state“ erreicht, sondern die Octanalkonzentration sank sehr stark, was durch den hohen Dampfdruck des Octanals zu begründen ist. Danach kam es wieder zu einem leichten Anstieg, d.h. es wurde mehr Octanal gebildet als verdunsten konnte.

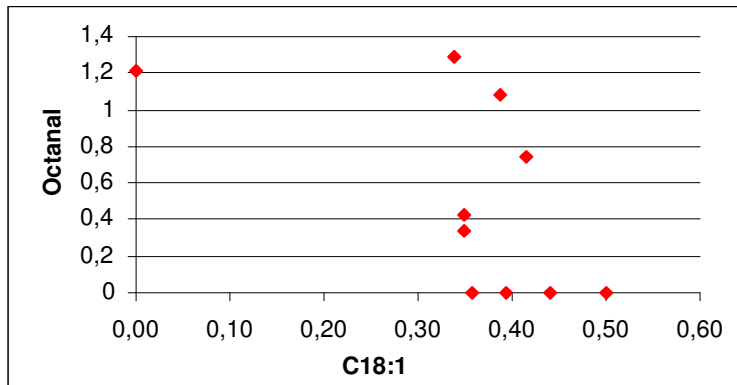
**Abbildung 33: HPP: Octanal vs. FFS: C18:1, 3. Charge**



#### 4.4.3.5 Die Abhängigkeit der Octanalkonzentration von der Gesamtölsäurekonzentration

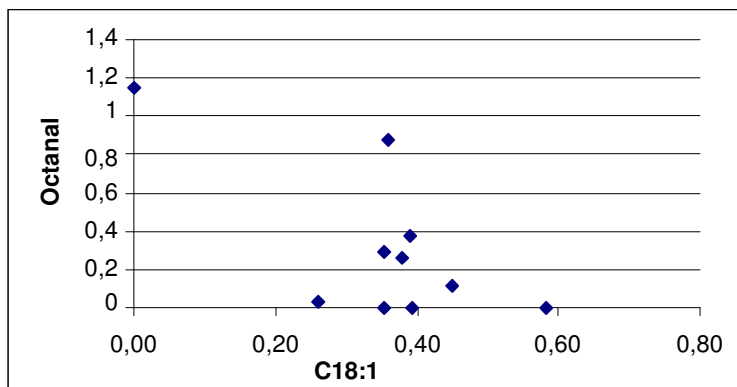
In den Abbildungen 34 und 35 sind die Octanalkonzentrationen unbehandelter und hochdruckbehandelter Proben in Abhängigkeit von der Gesamtölsäurekonzentration dargestellt.

**Abbildung 34: HPP: Octanal vs. Gesamt-FS: C18:1, 3. Charge**



Anhand der Abbildungen ist zu erkennen, dass keine Abhängigkeit zwischen der Gesamtölsäurekonzentration und dem Octanalgehalt vorliegt. Die Octanalkonzentration ist unabhängig davon, ob die Ölsäure an TG gebunden oder freigesetzt ist.

**Abbildung 35: oHPP: Octanal vs. Gesamt-FS: C18:1, 3. Charge**



Zusammenfassend wird Octanal aus der freien Ölsäure gebildet und nicht aus der noch in Triglyceride gebundenen Ölsäure. Die Reaktion verläuft über den Zwischenschritt Freisetzung der Ölsäure aus den Triglyceriden ab. Erst aus der freigesetzten Ölsäure wird Octanal gebildet.

#### 4.4.3.6 Vitamin E

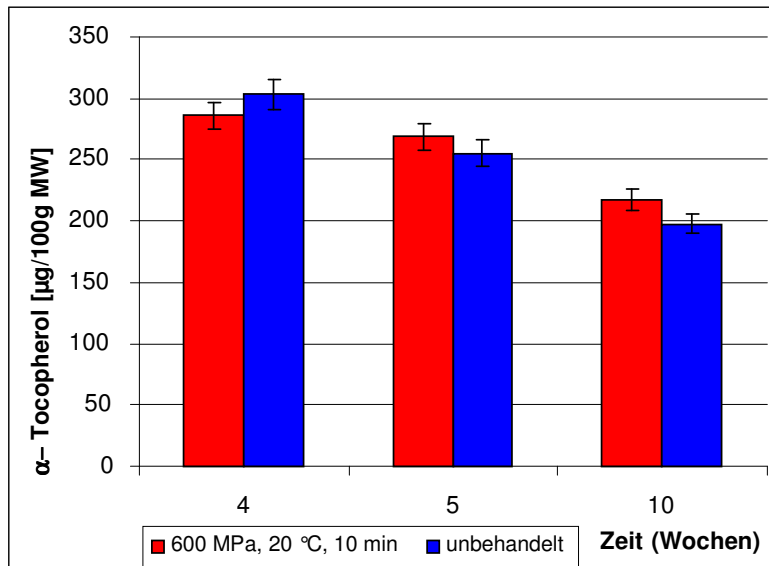
Tocopherole sind Antioxidanzien, die natürlich in frischer Mettwurst vorkommen. Ihre Veränderung durch Hochdruckbehandlung und während der anschließenden Lagerung wurde untersucht.

Erste Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Vitamin-E-Konzentrationen zwischen hochdruckbehandelter und konventionell hergestellter Mettwurst gleich waren. Dies bestätigte die schonende Weiterverarbeitung der Mettwurst mittels der Hochdruckbehandlung hinsichtlich des Gesamt-Tocopherolgehaltes.

In beiden Diagrammen (Abbildung 36 und 37) sind die Abnahmen des Vitamin-E-Gehaltes zweier unterschiedlicher Chargen gegen die Zeit dargestellt. Die Fehlerbalken dieser Bestimmung resultieren aus der hier nicht weiter dargestellten Validierung.

Die zweite Charge wurde stichpunktartig untersucht und aufgrund der Ergebnisse die Arbeitshypothese aufgestellt.

Abbildung 36: Vitamin E, 2. Charge



Um die Ergebnisse dieses Screenings zu bestätigen, wurden weitere Chargen der Zwiebelmettwurst untersucht und engere Messintervalle ausgewählt, um die Veränderungen bzw. den Verlauf besser verfolgen und genauer beschreiben zu können.

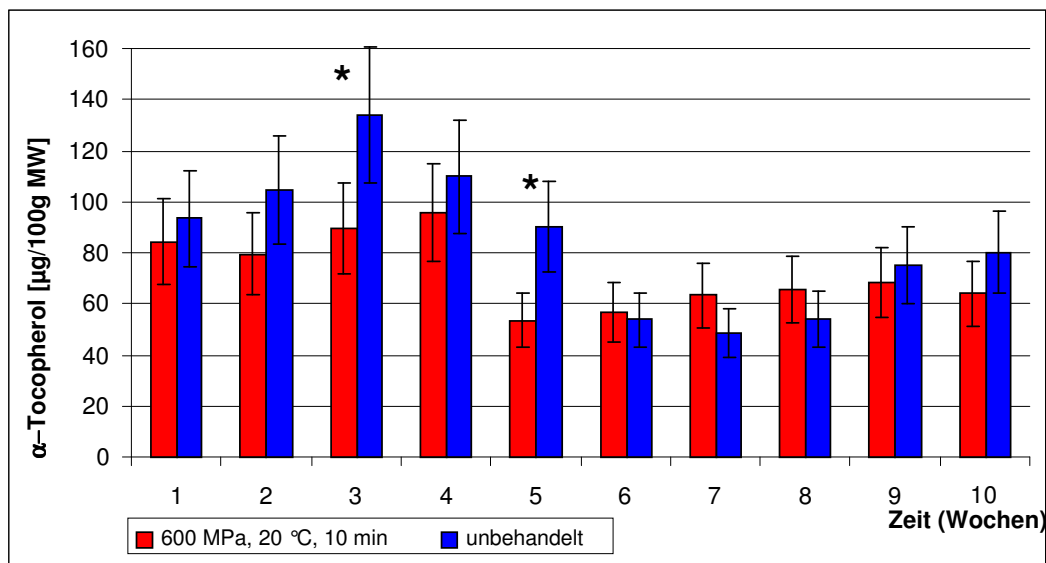
Der Vitamin E-Anfangsgehalt der dritten Charge (Abbildung 37) betrug ungefähr die Hälfte der Konzentration der zweiten Charge, was auf die unterschiedlichen Rohstoffe zurückzuführen ist.

Bei der zweiten Untersuchung (dritte Charge) waren zunächst ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den hochdruckbehandelten und konventionell hergestellten Mettwürsten nachweisbar. In der dritten und fünften Woche waren die Gehalte jedoch signifikant unterschiedlich. Nach der fünften Woche nahm der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der behandelten Mettwürste sichtbar ab, der der unbehandelten hingegen erst nach der sechsten. In der sechsten bis zehnten Woche gab es wieder keine Unterschiede zwischen unbehandelten und hochdruckbehandelten Mettwürsten.

Der zeitliche Verlauf der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration der dritten Charge bestätigte im Wesentlichen die Ergebnisse aus der Analyse der ersten Charge. Innerhalb der ersten drei Untersuchungszyklen nahm der Tocopherolgehalt zunächst zu, dann im weiteren Verlauf jedoch wieder ab. Da die Tocopherolgehalte auf die Frischfleischleinwaage bezogen wurden, ist eine mögliche Erklärung für die Zunahme der bei der Lagerung auftretende Wasserverlust.

Der Tocopherolgehalt (Ergebnisse sind im Anhang in Tabellen 50, 51 und 52 dargestellt) der vierten Charge betrug ca.  $150 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  Probe. Es gab während des Analysenzeitraums kleine messbare Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Proben, wobei diese aber nicht signifikant waren. Die Tocopherolkonzentration nahm innerhalb der zehn Wochen kaum ab. Dies war vermutlich, wie bei der dritten Charge, auf den Wasserverlust der Mettwürste, der bei der Einwaage nicht berücksichtigt wurde, während der Lagerung zurückzuführen. Dieser Wasserverlust wurde durch Differenzwägung abgesichert und bewiesen.

Abbildung 37: Vitamin E, 3. Charge



Eine Mettwurst geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow$   $n = 4$ ,  
 \*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p=95\%$ ,  $n = 4$

Die dargestellten  $\alpha$ -Tocopherolgehalte der untersuchten Mettwürste aller drei Chargen waren bereits zu Beginn unterschiedlich. Der Anfangsgehalt der dritten und vierten Charge (Abbildung 28, 29) betrug weniger als die Hälfte der Konzentration der zweiten Charge. Dies lässt sich auf die verschiedenen Rohstoffe, aus denen die Mettwurst hergestellt wurde, zurückführen.

Zusammenfassend ergab die Untersuchung mittels HPLC, dass signifikante Unterschiede im  $\alpha$ -Tocopherolgehalt zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürsten lediglich in der dritten und fünften Woche von zehn untersuchten Wochen festgestellt werden konnten. Die Vitamin E-Konzentration der behandelten Mettwürste war zu diesen Zeitpunkten signifikant niedriger als die unbehandelten Proben. An den restlichen acht Untersuchungstagen der dritten Charge waren jedoch keine weiteren signifikanten Unterschiede nachweisbar.

Die Analyse der vierten Mettwurstcharge ergab, dass zwischen den behandelten und unbehandelten Mettwürsten innerhalb eines Zeitraumes von zehn Wochen keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf den Tocopherolgehalt bestanden. Diese Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

#### 4.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen mit der Zwiebelmettwurst

Die pH-Werte der behandelten Mettwürste waren deutlich, sogar teilweise signifikant höher als die der unbehandelten Proben. In der Literatur wurde von Orlin et al. beschrieben (85;104;113;138), dass durch die Hochdruckbehandlung eine pH-Wert-Erhöhung im Lebensmittel verursacht werden kann.

Die Mikroorganismenflora wurde durch die Hochdruckbehandlung während des gesamten Analysenzeitraumes von sechs Wochen inaktiviert. Die Hochdruckbehandlung führte, wie in der Literatur bereits (7;40;71-73;75;76;82;83;108; 133;151;167;197) beschrieben, zur deutlichen Inaktivierung der gesamten Mikroorganismenflora.

Die Gehalte der Fettsäuren von den Mettwürsten liegen innerhalb der in der Literatur beschriebenen Schwankungsbreiten. Des Weiteren sind die Schwankungen der einzelnen Chargen untereinander sehr hoch. Da es sich bei Fleisch um ein Naturprodukt handelt, das fütterungs-, jahreszeitbedingten und anderen Schwankungen unterliegt sind, diese Variationen im Fettsäurespektrum erklärbar.

Die SZ der unbehandelten Mettwürste war signifikant höher als die der hochdruckbehandelten. Die Verminderung der SZ der hochdruckbehandelten Proben gegenüber den unbehandelten könnte auf die Schädigung von Mikroorganismen zurückgeführt werden. Die Mikroorganismen produzieren durch ihren Stoffwechsel Essig- und Milchsäure, die bei der Titration der SZ miterfasst werden. Wenn die Mikroorganismen durch Hochdruck beschädigt oder eliminiert wurden, führte dies zu einer verringerten Bildung der organischen Säuren, somit konnten keine der Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen bei der Titration miterfasst werden.

Sollten aber die Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Mettwürsten auf die Reduzierung der Hydrolyse der Triglyceride durch HPP zurückzuführen sein (176), müssten die Ergebnisse der SZ durch die Ergebnisse der FFS bestätigt werden.

Die Analysenergebnisse der FFS bestätigten die der SZ. Die Hochdruckbehandlung vermindert somit die Hydrolyse der Triglyceride.

Der unterschiedliche Verlauf zwischen der SZ und den FFS kann sich dadurch ergeben, dass bei der SZ auch kurzkettige Säuren wie Essigsäure ( $C_2$ ) titriert werden und bei den FFS die Bestimmung bzw. Erfassung erst ab der Myristinsäure ( $C_{14}$ ) erfolgt, wobei kurzkettige Verbindungen nicht erfasst werden.

In den behandelten Mettwürsten konnte Octanal eine Woche früher nachgewiesen werden. Weiterhin waren die Octanalgehalte der hochdruckbehandelten Proben höher als die der unbehandelten. Diese Ergebnisse der untersuchten Mettwürste lassen auf eine verkürzte Induktionsphase des Fettverderbs bei den hochdruckbehandelten Proben (ca. eine Woche) schließen, wie es in der Literatur von Tauscher et al. beschrieben wurde (43;175-179).

Das Octanal, welches verstärkt in den hochdruckbehandelten Mettwürsten nachgewiesen wurde, könnte durch die Lipoxxygenase gebildet werden, welche aus den Mikroorganismen stammt, die durch die Hochdruckbehandlung abgetötet wurden, aber ihre Enzyme nicht inhiert wurden. Des Weiteren könnten anaerobe Mikroorganismen, die gegen die Hochdruckbehandlung resistent sind, aber deren Anwesenheit nicht nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 4.4.1.3 Mikrobiologie der Mettwurst), die Hochdruckbehandlung überlebt haben und zu diesem Fettabbau führen (198).

Zwischen den beiden Parametern freie Ölsäure und Octanal bestand eine Abhängigkeit, was die Diagramme, in denen die Octanalkonzentration gegen die freie Ölsäure ( $C_{18:1}$ ) gegeneinander aufgetragen wurden, zeigen. Aus den Triglyceriden wurden die Fettsäuren, auch die Ölsäure, freigesetzt. Aus der freigesetzten Ölsäure entstand Octanal und nicht aus den nicht freien (noch an Triglyceride gebundenen Ölsäuren) Ölsäuren.

In dieser Reaktionsreihenfolge ist die freie Ölsäure ein Zwischenprodukt und Octanal das leichtflüchtige Endprodukt. Das Edukt ist das Triglycerid mit der Ölsäure.

In allen drei Chargen waren nur geringe Unterschiede in der Abnahme des Vitamin-E-Gehaltes zwischen hochdruckbehandelter und konventionell hergestellter Mettwurst nachweisbar. Dies bedeutet, dass die konventionell hergestellten Mettwürste keiner weiteren Behandlung bzw. Dotierung mit Tocopherolen unterzogen wurden und die Einführung der Hochdruckbehandlung ein zusätzlicher Verfahrensschritt zur Haltbarmachung des Produktes

nach abgeschlossener Reifung war. Unter diesen Annahmen, ergibt sich, dass die Weiterverarbeitung bzw. Haltbarmachung der Mettwurst mittels der Hochdruckbehandlung im Hinblick auf den  $\alpha$ -Tocopherolgehalt als ein schonendes Verfahren bezeichnet werden kann.

#### 4.4.4.1 Statische Clusteranalyse der Ergebnisse zur Mettwurst

Zusammenfassend bewirkte die Hochdruckbehandlung sichtbare Unterschiede im Aussehen und in der Konsistenz der Mettwürste. Es waren deutliche, teilweise signifikante pH-Werte-Unterschiede zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwurstvergleichsproben nachweisbar. Die Hochdruckbehandlung hatte eine positive Wirkung im Hinblick auf die Inaktivierung der Mikroorganismenflora während des gesamten Analysenzeitraumes von 6 Wochen. Sie hatte weiterhin eine positive Wirkung hinsichtlich des Gehaltes an FFS und SZ der Mettwurst, d.h. die Hydrolyse der Triglyceride wurde verzögert. Es wurde eine negative Tendenz der Wirkung von Hochdruck im Hinblick auf die Bildung von flüchtigen Verbindungen Hexanal und Octanal beobachtet, d.h. die Peroxidation der Fettsäuren wurde tendenziell gefördert. Positiv ist zu bemerken, dass nur geringe Unterschiede zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwurstvergleichsproben in den Vitamin E-Gehalten vorlagen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, messbare Unterschiede zwischen den Fetten von hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben feststellen zu können. Es wurde eine Tabelle mit den angewandten Analysemethoden erstellt.

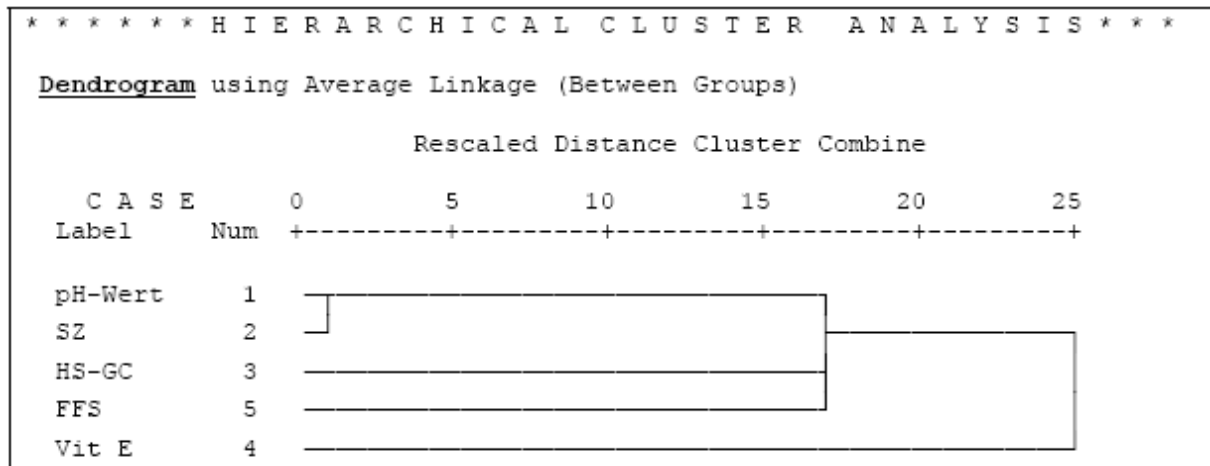
**Tabelle 32: Zusammenfassung der Ergebnisse der Mettwurst**

	1. Charge	2. Charge	3. Charge	4. Charge
pH-Wert	1	1	1	1
HS-GC	0	1	1	1
Vit E	0	0	1	0
SZ	1	1	1	1
FFS	1	0	0	1

In der Tabelle 32 sind die messbaren Differenzen in den unterschiedlichen Analysemethoden zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürsten dargestellt. Die zusammengetragenen Unterschiede wurden in dieser Tabelle gleichzeitig bewertet. Die Zahl 0 steht für das Ergebnis „keine messbaren Unterschiede“ und 1 für „messbare Unterschiede“ zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürsten.

Schließlich wurde zum Vergleich der Methoden eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt, um beurteilen zu können, welche der gemessenen Parameter sich gemeinsam in die gleiche Richtung bewegen, inwiefern die verschiedenen Parameter also partiell im statistischen Sinne abhängig sind.

Dazu wurde zu jeder Methode und jeder Charge festgehalten, ob ein signifikanter Unterschied durch Hochdruckbehandlung festgestellt werden konnte (binäre Codierung). Die hierarchische Clusteranalyse wurde mit SPSS 11.5 durchgeführt. Wegen der geringen Anzahl der Methoden wurde die Single-Linkage Methode (Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanz) verwendet. Im Falle fehlender Messwerte wurde „kein Unterschied festgestellt“ eingesetzt.

**Abbildung 38: Dendrogramm: hierarchische Clusteranalyse**

Wie aus dem Dendrogramm (Abbildung 38) und dem horizontalen Eiszapfendiagramm (Tabelle 33) der Clusteranalyse ersichtlich bilden die Bestimmungen pH-Wert und Säurezahl einen Cluster. Da sind die größten Unterschiede in den Differenzen der Ergebnisse behandelte und unbehandelte Mettwürste. Ein weiteres Cluster wird von den Bestimmungen FFS, HS-GC und pH-Wert mit Säurezahl gebildet. Die Differenzen der FFS- und Octanal-Bestimmung sind weniger ausgeprägt als die der Säurezahl und des pH-Wertes. Die Vitamin E-Bestimmung gehört zu keinem der beiden Cluster. Es gibt keine bzw. kaum Unterschiede bei dieser Bestimmung.

**Tabelle 33: Horizontales Eiszapfendiagramm**

Fall	Anzahl der Cluster			
	1	2	3	4
4:ln Vit E	X	X	X	X
	X			
5:FFS	X	X	X	X
	X	X	X	
3:HS-GC	X	X	X	X
	X	X		
2:SZ	X	X	X	X
	X	X	X	X
1:pH-Wert	X	X	X	X

Zusammenfassend sind die größten Unterschiede zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürsten mittels der pH-Wert- und Säurezahlbestimmung feststellbar. Weniger geeignet sind die Bestimmungen der FFS und der Octanalkonzentration. Ungeeignet zur Feststellung der Unterschiede ist die Vitamin E-Bestimmung.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die hochdruckinduzierten Veränderungen von Fetten zu analysieren.

Die hochdruckbehandelte Mettwurst hatte eine längere Induktionsphase der Hydrolyse. Dies drückte sich in niedrigerer Säurezahl und FFS im Vergleich zu unbehaltener Mettwurst aus. Die Induktionsphase der Peroxidation mit der Octanal- und Hexanalbildung war tendenziell um eine Woche kürzer als bei der unbehaltener Mettwurst. Diese Ergebnisse stimmen mit der in der Literatur genannten Wirkung überein (43;175;176;178;190;191).

Zu prüfen war, ob es sich bei der Säurezahl (SZ) und den freien Fettsäuren (FFS) hierbei um zufällige Ergebnisse handelte oder waren diese auf die Wirkung von HPP zurückzuführen, die in der Literatur beschrieben wird (135;176). Unter der Annahme, dass es sich hierbei um

die Wirkung von HPP auf Fett in Lebensmitteln handelte, war es nicht erklärbar, warum die Unterschiede so gering im Vergleich zu der in der von Ohshima (135) et al. beschriebenen Fischfettoxidation waren. Vermutlich war die vergleichsweise positive Wirkung der Hochdruckbehandlung auf die Zusatzstoffe der Mettwurst (Ascorbinsäure, Citrat, Nitritpökelsalz) zurückzuführen.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Octanal aus der freigesetzten und nicht aus der an Triglyceride gebundenen Ölsäure gebildet wurde. Dies bedeutet, dass die Triglyceride zuerst in freie Fettsäuren hydrolysiert werden und anschließend aus der freien Ölsäure Octanal entsteht. Hierbei handelt es sich um Reaktion zweiter Ordnung mit der freigesetzten Ölsäure als Zwischenprodukt.

Nach ausführlicher Betrachtung der Ergebnisse und Literaturrecherche wurde die weitere Hypothese aufgestellt, dass die Hochdruckbehandlung eine tendenziell positive Wirkung auf die Haltbarkeit der Mettwurst im Gegensatz zum in der Literatur beschriebenen Fisch (135;136) ausübte. Aus diesem Grunde sollte dieser Effekt auf die einzelnen Zusatzstoffe der Mettwurst zurückgeführt werden. Um die Wirkung der einzelnen Zusatzstoffe auf das Gesamtprodukt untersuchen zu können, sollte das Hackfleisch mit den einzelnen Komponenten untersucht werden.

Die erste Vermutung war, dass die eingesetzte Ascorbinsäure die Oxidation hemmt. Aus diesem Grund wurde eine Charge Hackfleisch mit Ascorbinsäure hergestellt, hochdruckbehandelt und analysiert. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

#### **4.5 Mettwurst-Modelle**

Es stellte sich heraus, dass die Hochdruckbehandlung im Gegensatz zum in der Literatur beschriebenen Fisch (135) eine tendenziell positive Wirkung auf die Haltbarkeit der Mettwurst ausübte. Die unterschiedlichen Effekte von HPP auf die Fette könnten auf den eingesetzten Zusatzstoffen der Mettwurst beruhen.

Mettwurst enthält eine Vielzahl von Zusatzstoffen, die direkten oder indirekten Einfluss auf das Verhalten des Fettverderbs haben können. Um die Wirkung der einzelnen Zusatzstoffe auf das Gesamtprodukt untersuchen zu können, sollte das Hackfleisch mit den einzelnen Komponenten untersucht werden.

Ascorbinsäure ist ein Antioxidationsmittel und Radikalfänger, deshalb lag die Vermutung nahe, dass die Unterschiede in der Auswirkung von HPP an dem Zusatz von Ascorbinsäure liegen könnten. Um diesen Einfluss zu studieren, wurden die Versuche zuerst mit Hackfleisch mit zugesetzter Ascorbinsäure durchgeführt.

#### **4.6 Einfaktorielles und Einkomponenten Modell: Hackfleisch**

Das Hackfleisch mit dem Zusatzstoff Ascorbinsäure dient als vereinfachtes Modell der Mettwurst zur Erklärung der Wirkung von HPP auf die einzelnen Bestandteile der Mettwurst.

Die Würste aus Hackfleisch mit der technologisch üblichen Einsatzmenge von 40 mg Ascorbinsäure/1 kg Hackfleisch wurden beim Fleischer hergestellt. Die Hochdruckbehandlung erfolgte einen Tag nach der Herstellung der Mettwürste.

Wegen des erwarteten schnelleren Verderbs von Hackfleisch fanden die Analysen im Gegensatz zu den Mettwurstproben bereits einen Tag und innerhalb der ersten vier Tage nach der Hochdruckbehandlung statt.



#### 4.6.1 Allgemeine Parameter

#### 4.6.2 Aussehen und Konsistenz

In den Abbildungen 38 und 39 sind die Fotos der unbehandelten und hochdruckbehandelten Hackfleischproben mit und ohne Zusatz von Ascorbinsäure dargestellt.

#### **Abbildung 39: Behandeltes und unbehandeltes Hackfleisch mit dem Zusatz Ascorbinsäure**



von links nach rechts: mit Asc. & mit HPP; mit Asc. & ohne HPP; ohne Asc. & mit HPP; ohne Asc. & ohne HPP;

Die Abbildung 38 gibt den Unterschied wieder. Die hochdruckbehandelten Proben mit und ohne Ascorbinsäure waren sehr blass. Lediglich die Probe ohne Hochdruckbehandlung und mit Ascorbinsäure wies eine Färbung wie die Mettwürste auf. Die Hackfleischprobe mit HPP und ohne Ascorbinsäure war noch blasser als die mit Ascorbinsäure.

#### **Abbildung 40: Querschnitt: behandeltes und unbehandeltes Hackfleisch mit dem Zusatz Ascorbinsäure**



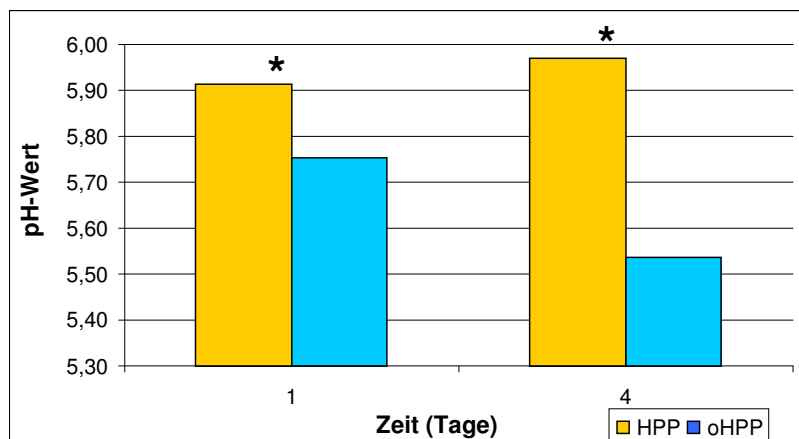
oben rechts: mit Asc. & ohne HPP; oben links: mit Asc. & mit HPP;  
unten rechts: ohne Asc. & ohne HPP; unten links: ohne Asc. & mit HPP;

Die Querschnitte in Abbildung 39 stützen diese Beobachtung, dass die Hochdruckbehandlung zum Verlust der roten Färbung der Proben führt und der Ascorbinsäurezusatz die rote Farbe stabilisierte.

### 4.6.3 pH-Wert

In Abbildung 41 ist der pH-Wert des ersten Mettwurst-Modells Hackfleisch mit Ascorbinsäure gegen die Zeit dargestellt. Die Messung erfolgte am ersten und am vierten Tag nach der Hochdruckbehandlung. Der pH-Wert der hochdruckbehandelten Probe war am ersten und vierten Tag hoch signifikant höher als der der unbehandelten Parallelprobe.

**Abbildung 41: pH-Wert: erste Hackfleischcharge**



Eine Hackfleischwurst, Mehrfachbestimmung  $\Rightarrow n = 5$ ,

\*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p = 99\%$ ,  $n = 5$

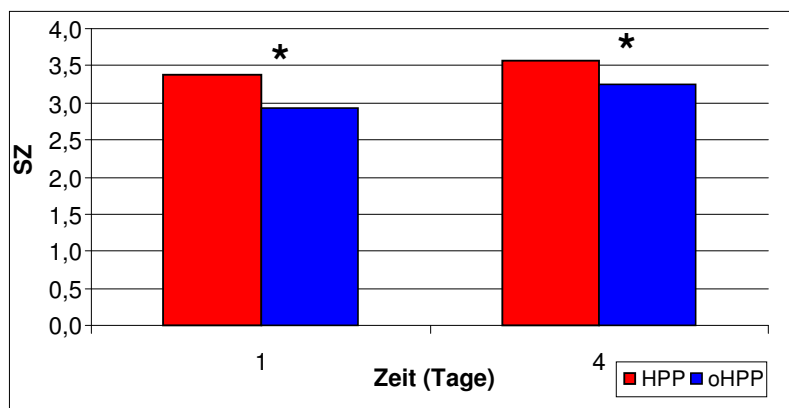
### 4.6.4 Chemische Fettkennzahlen

#### 4.6.4.1 Säurezahl (SZ)

Die Säurezahl des unbehandelten und behandelten Hackfleisches mit Ascorbinsäure ist in Abbildung 42 gezeigt. Die Messwerte des Hackfleisches entsprachen ungefähr der Säurezahl der Mettwürste in den ersten zwei Wochen.

Die Säurezahl der hochdruckbehandelten Hackfleischproben war im Gegensatz zu den Mettwürsten sowohl am ersten Messtag als auch nach drei Tagen signifikant höher als die der unbehandelten Hackfleischprobe.

**Abbildung 42: SZ: erste Hackfleischcharge**



Eine Hackfleischwurst geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow n = 4$ ,

\*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p = 99\%$ ,  $n = 4$

Daraus resultiert, dass die Säurezahl des Fleisches im Vergleich zur Mettwurst durch die Hochdruckbehandlung erhöht war und dass keine Induktionsphasenverkürzung im Hinblick auf die Säurezahl durch HPP stattgefunden hat. Die Hochdruckbehandlung förderte die Bildung bzw. Entstehung von freien Fettsäuren, die durch die Säurezahl bestimmt werden, bei den Hackfleischproben.

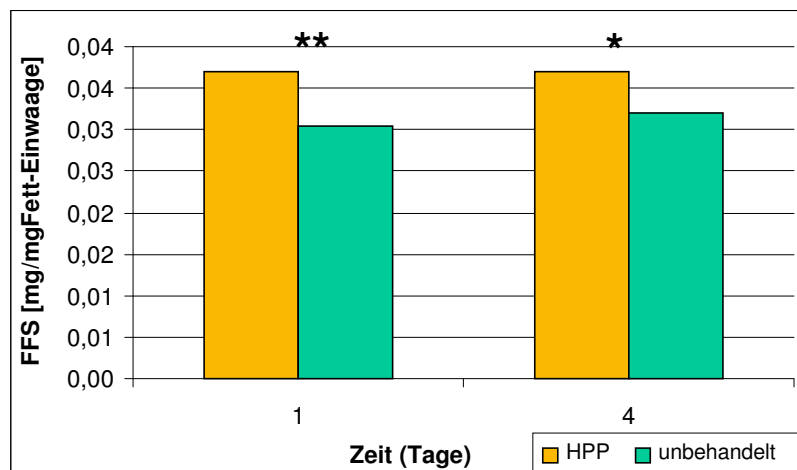
#### 4.6.5 Kennzahlen für den oxidativen Fettverderb

##### 4.6.5.1 Freie Fettsäuren (FFS)

Die FFS-Konzentration der hochdruckbehandelten Probe ist in Abbildung 43 wiedergegeben. Sie war sowohl am ersten Messtag als auch nach drei Tagen signifikant höher als die der unbehandelten Probe. Diese Ergebnisse entsprachen der FFS-Konzentration der Mettwürste in den ersten zwei bis drei Wochen und bestätigen die aus der SZ-Bestimmung gewonnenen Erkenntnisse.

Aus diesem Vergleich der FFS der Mettwürste und des Hackfleisches resultiert, dass die Konzentration der freien Fettsäuren durch HPP erhöht wurde und dass keine Induktionsphasenverkürzung im Hinblick auf die FFS stattgefunden hat.

**Abbildung 43: FFS: erste Hackfleischcharge**



Eine Hackfleischwurst geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow$   $n = 4$ ,

\* signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p=95\%$ ,  $n = 4$

\*\*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p=99\%$ ,  $n = 4$

##### 4.6.5.2 Gesamtfettsäurespektrum

In der Tabelle 34 wurden die Ergebnisse der Fettsäurezusammensetzung des Hackfleischfettextraktes dargestellt und mit den Literaturangaben aus Tabelle 5 im Kapitel 2.3.2.3.3.2 „Autoxidation der Linolsäuremethylester“ verglichen (23;171). Die Hackfleischproben lagen, wie erwartet, innerhalb der in der Literatur beschriebenen Schwankungsbreiten.

**Tabelle 34: Fettsäurezusammensetzung des Hackfleisches**

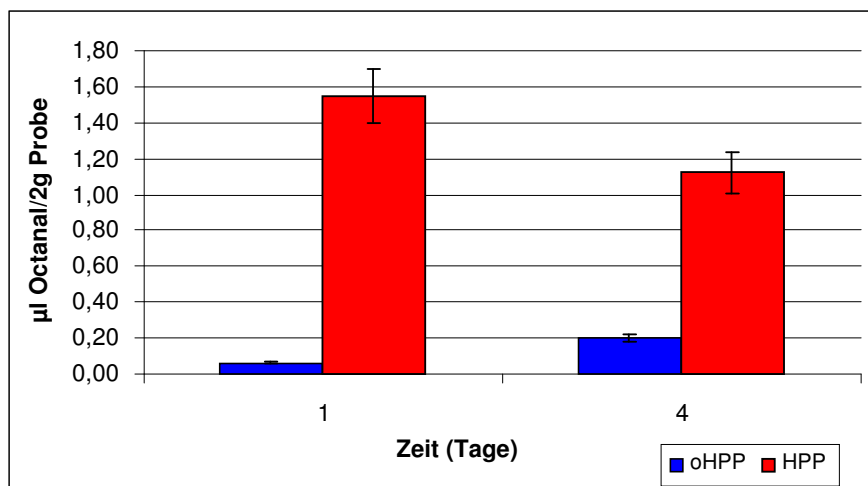
FS	Hackfleisch
	1. Charge D041014-6 (%)
C14	1,42
C16	35,69
C16:1	8,17
C18	30,22
C18:1 cis	15,88
C18:1 trans	2,29
C18:2	13,65
C18:3	0,00
C20	0,00
C20:4	0,00

#### 4.6.5.3 Octanalbestimmung

Die Abbildung 44 gibt den Verlauf der Octanalkonzentration am ersten und vierten Tag nach der Hochdruckbehandlung wieder.

Die Octanalkonzentration der HPP-Probe sank von einem sehr hohen ersten Messwert nach drei Tagen, die der unbehandelten Probe stieg innerhalb dieser Zeit.

Die Octanalkonzentration des hochdruckbehandelten Fleisches nach einem bzw. drei Tagen entsprach der Octanalkonzentration der Mettwurst in der achten und neunten Lagerungswoche.

**Abbildung 44: Octanalkonzentration: erste Hackfleischcharge**

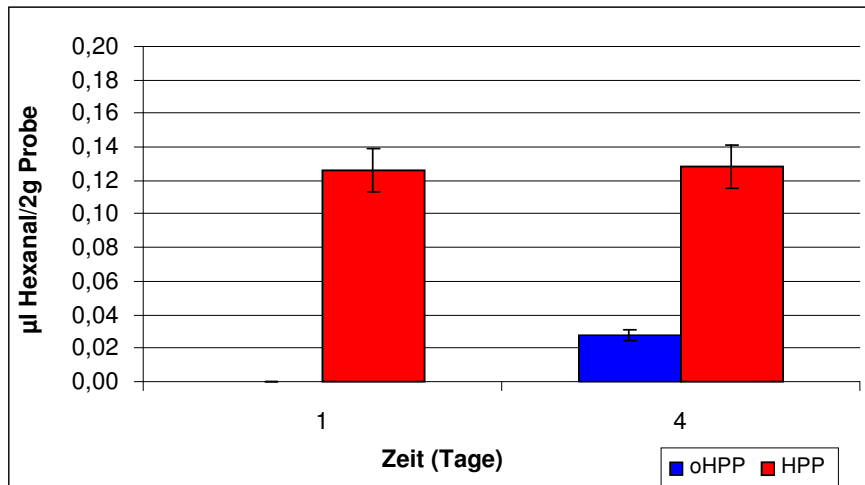
Fehlerbalken aus Mehrfachbestimmung, Matrixkalibrierung, n = 10  
(Probe ungeöffnet im Kühlschrank gelagert und am 1. und 4. Tag analysiert)

#### 4.6.5.4 Hexanalbestimmung

Parallel zu Octanal wurde ebenfalls Hexanal mittels der HS-GC bestimmt und die Ergebnisse sind in Abbildung 45 dargestellt. Es handelte sich hierbei um eine im Vergleich zur Mettwurst hohe Hexanalkonzentration. Im Kontrast zur Octanalkonzentration war diese aber relativ gering. Die Hexanalkonzentration des hochdruckbehandelten Fleisches war bereits nach einem Tag höher als die der Mettwurst in der achten Woche.

Die Hexanalkonzentration der hochdruckbehandelten Probe betrug am ersten Untersuchungstag und am vierten Tag 0,12  $\mu\text{l}/2\text{g}$  Probe. Hieraus ergibt sich, dass die Hexanalkonzentration der hochdruckbehandelten Probe vom ersten zum vierten Tag gleich blieb und die der unbehandelten Probe anstieg.

Abbildung 45: Hexanalkonzentration: erste Hackfleischcharge



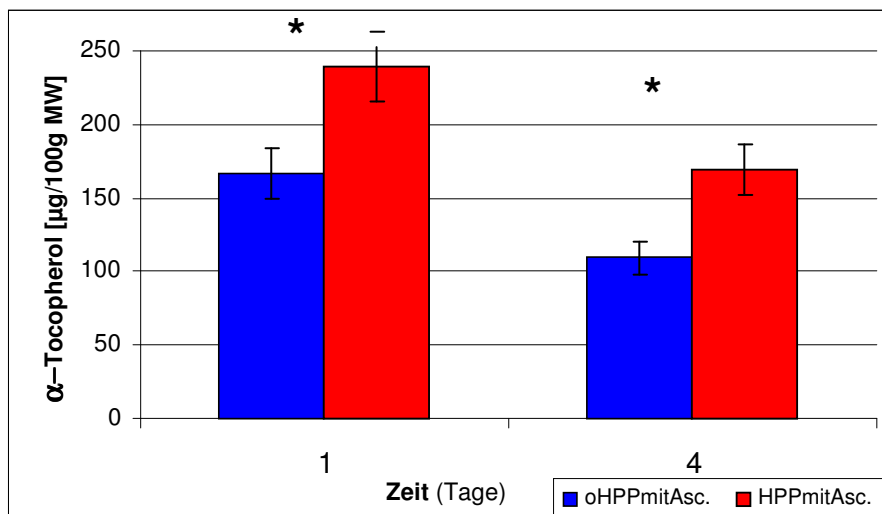
Fehlerbalken aus Mehrfachbestimmung, Matrixkalibration,  $n = 10$

Damit stimmen tendenziell die Verläufe der Hexanalkonzentration mit der Octanalkonzentration in den Hackfleischproben überein.

#### 4.6.5.5 Vitamin E

In Abbildung 46 ist der Tocopherolgehalt des hochdruckbehandelten und unbehandelten Hackfleisches mit Ascorbinsäure wiedergegeben. Der Tocopherolgehalt der hochdruckbehandelten Probe war sowohl am ersten als auch am vierten Tag signifikant höher als der der unbehandelten. Die Hochdruckbehandlung bewirkte eine Stabilisierung des Vitamin E.

Abbildung 46: Vitamin E: erste Hackfleischcharge



Eine Hackfleischwurst geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow n = 4$ ,

\*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p = 99\%$ ,  $n = 4$

#### 4.6.6 Bewertung der Ergebnisse des ersten Hackfleischmodells

Der Zusatz von Ascorbinsäure stabilisierte die Farbe des Hackfleisches, aber die Hackfleischproben waren im Vergleich zu den Mettwurstproben sehr blass. Die Hochdruckbehandlung führte ähnlich wie bei den Mettwurstproben zu einer blassen Farbe und festeren Konsistenz, was beim Anschnitt feststellbar war.

Der pH-Wert der hochdruckbehandelten Hackfleischproben war wie bei den Mettwurstproben signifikant höher als der der unbehandelten, was einerseits auf die Senkung des pH-Wertes und andererseits auf die Abtötung von Lactobacillen durch Hochdruck zurückzuführen war.

Die SZ und die FFS waren beim behandelten Hackfleisch signifikant höher als beim unbehandelten im Gegensatz zu den Mettwurstproben.

Der Octanalgehalt war im behandelten Hackfleisch bei allen Messungen signifikant höher als bei den unbehandelten Proben. Bemerkenswert ist, dass der Octanalgehalt von Beginn an eine sinkende Tendenz aufwies. Dies impliziert, dass möglicherweise die höchste Konzentration bei der ersten Messung am ersten Tag nach der Hochdruckbehandlung bereits überschritten war.

Die gleichen Tendenzen waren bei der Hexanalkonzentration feststellbar. Allerdings betragen die Hexanalkonzentrationen  $\frac{1}{10}$  der Octanalkonzentration.

Der Tocopherolgehalt der hochdruckbehandelten Hackfleischproben war durchgehend höher als der der unbehandelten.

Die Hochdruckbehandlung bewirkte sichtbare Unterschiede im Aussehen und in der Konsistenz der Mettwürste und ebenfalls signifikante pH-Wert-Unterschiede zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwurstvergleichsproben. Die Hochdruckbehandlung bewirkte die Umkehrung der Wirkung hinsichtlich des Gehaltes an FFS und SZ des Fleisches, d.h. die Hydrolyse der Triglyceride wurde durch Hochdruck gefördert. Es wurde ebenfalls die negative Wirkung im Hinblick auf die flüchtigen Verbindungen Hexanal und Octanal durch Hochdruck, d.h. die Peroxidation der Fettsäuren stark gefördert. Hochdruck hatte tendenziell eine positive Wirkung auf den Vitamin E-Gehalt.

Die erste Vermutung, dass die zur Mettwurstherstellung eingesetzte Ascorbinsäure die Oxidation hemmt, wurde nicht bestätigt, sondern mithilfe des ersten Hackfleischmodells widerlegt.

Aus den bisher durchgeführten Untersuchungen ergaben sich die folgenden kritischen Punkte, die einer genaueren Betrachtung bedürfen:

Die fehlenden Untersuchungen im Hinblick auf die Erklärung des Verlaufes des Fettverderbs beim Hackfleisch sollen nachgeholt werden und die Wirkung der üblichen Zusatzstoffe (Nitritpökelsalz, Citrate, Ascorbinsäure, Hydrokolloide) der Mettwurst soll auf die Lipidveränderungen untersucht werden.

#### 4.7 Mehrfaktorielles und Multikomponenten Modell: Hackfleisch

Der Fettverderb der Mettwürste wurde nicht eindeutig durch Hochdruck gefördert, wie es bei den Versuchen mit Fischmuskeln (135;136) beschrieben wurde.

Die Vermutung, dass der Ascorbinsäurezusatz die antioxidative Wirkung in der Mettwurst ausübt, wurde nicht bestätigt. Aus diesen Gründen wurden die weiteren Zusatzstoffe einzeln und zusammen untersucht.

Um die einzelnen Einflüsse der Zusatzstoffe der Mettwurst untersuchen zu können, wurde frisches Hackfleisch nach in der Herstellung von Mettwürsten eingesetzten üblichen Rezepturen (55;97;150) jeweils mit Ascorbinsäure (0,5 g/kg Hackfleisch), Citrat (3 g/kg Hackfleisch), Nitritpökelsalz (18 g/kg Hackfleisch) und mit der Summe dieser drei Zusatzstoffe in den oben angegebenen Konzentrationen versetzt, tief gefroren, später aufgetaut, hochdruckbehandelt und anschließend vier Tage lang im Kühlschrank gelagert und während der Lagerung täglich analysiert. Die Analyseergebnisse der hochdruckbehandelten Proben wurden immer mit gleichen unbehandelten Proben – „Nullmuster“ - verglichen.

Im Kapitel 2.3.2.4 „Zusatzstoffe“ wurde die Auswirkung einiger Zusatzstoffe auf die hochdruckinduzierte Fettoxidation im Lebensmittel zusammengefasst. Hieraus ging hervor, dass die Zitronensäure, EDTA, Rosmarin-Extrakt und Hexamethaphosphate antioxidativ wirksam waren, während das Eiweißpulver die Hexanalbildung verhinderte.

Folgende **Thesen** zu der Wirkung der einzelnen Zusatzstoffe in der Mettwurst wurden aufgestellt:

- Das Nitritpökelsalz stabilisiert den Häm-Komplex und verhindert die Freisetzung des Eisens aus dem Häm.
- Citrat ist ein Komplexbildner, der die freigesetzten Eisen-Ionen binden kann.
- Die Ascorbinsäure kann den Hydroperoxidabbau beschleunigen, indem sie den reduzierten Zustand der Metall-Ionen durch ihr prooxidatives Potenzial aufrechterhält.
- Die Lipoxigenaseaktivität könnte möglicherweise durch die Zusatzstoffe (Bindung des frei verfügbaren Wassers durch Hydrokolloide: Citrat und Phosphat) behindert werden.

Durch die Zugabe dieser unterschiedlichen Zusatzstoffe zum Hackfleisch konnte ihre Wirkung einzeln untersucht werden und durch Kombination mit weiteren Zusatzstoffen verstärkt und/oder vermindert werden, wenn es sich um Synergisten oder Antagonisten handelt.

##### 4.7.1 Allgemeine Parameter

Die Auswirkung der Hochdruckbehandlung auf die Mettwurst mit den einzelnen Zusatzstoffen – Ascorbinsäure, Nitritpökelsalz und Citrat – konnte durch den Einsatz von Hackfleisch mit den entsprechenden Konzentrationen an Ascorbinsäure, Nitritpökelsalz und Citrat erforscht werden. Die Untersuchungszeit für alle Analysen betrug vier Tage.

###### 4.7.1.1 Aussehen

Die Abbildung 47 gibt den Unterschied zwischen weiteren hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben mit und ohne Ascorbinsäure wieder. Die hochdruckbehandelten Proben mit und ohne Ascorbinsäure waren sehr blass. Lediglich die Probe ohne Hochdruckbehandlung und mit Ascorbinsäure wies eine Färbung wie die Mettwürste auf. Die Hackfleischprobe mit HPP und ohne Ascorbinsäure war noch blasser als die mit Ascorbinsäure. Die Quer-

schnitte in Abbildung 47 stützen diese Beobachtung, dass die Hochdruckbehandlung zum Verlust der roten Färbung der Proben führt und der Ascorbinsäurezusatz die rote Farbe stabilisierte.

**Abbildung 47: Hackfleisch mit Ascorbinsäure**



linkes Bild: von links nach rechts: mit Asc. & mit HPP; mit Asc. & ohne HPP; ohne Asc. & mit HPP; ohne Asc. & ohne HPP;  
 rechtes Bild: oben links: mit Asc. & mit HPP; oben rechts: ohne Asc. & mit HPP;  
 unten links: mit Asc. & ohne HPP; unten rechts: ohne Asc. & ohne HPP;

Die Abbildung 48 gibt den Unterschied zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben mit und ohne Citrat wieder. Die hochdruckbehandelten Proben mit und ohne Citrat waren blass. Lediglich die Probe ohne Hochdruckbehandlung und mit Citrat wies, ähnlich wie bei dem Ascorbinsäurezusatz, eine Färbung wie die Mettwürste auf. Die Hackfleischprobe mit HPP und ohne Citrat war noch blasser als die mit Citrat. Die Querschnitte in Abbildung 48 bestätigen diese Beobachtung, dass die Hochdruckbehandlung zum Verlust der roten Färbung der Proben führt und dass Citrat die rote Farbe stabilisierte.

**Abbildung 48: Hackfleisch mit Citrat**



linkes Bild: von links nach rechts: mit Citrat & mit HPP; mit Citrat & ohne HPP; ohne Citrat & mit HPP; ohne Citrat & ohne HPP;  
 rechtes Bild: oben links: mit Citrat & mit HPP; oben rechts: mit Citrat & ohne HPP;  
 unten links: ohne Citrat & mit HPP; unten rechts: ohne Citrat & ohne HPP;

Die Abbildung 49 gibt den Unterschied zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben mit und ohne NPS wieder. Die hochdruckbehandelten Proben mit und ohne NPS waren blass. Lediglich die Probe ohne Hochdruckbehandlung und mit NPS wies, ähnlich wie bei dem Ascorbinsäurezusatz, eine Färbung wie die Mettwürste auf. Die Hackfleischprobe mit HPP und ohne NPS war noch blasser als die mit NPS. Die Querschnitte in Abbildung 49



bestätigen diese Beobachtung, dass die Hochdruckbehandlung zum Verlust der roten Färbung der Proben führt und dass NPS die rote Farbe stabilisierte.

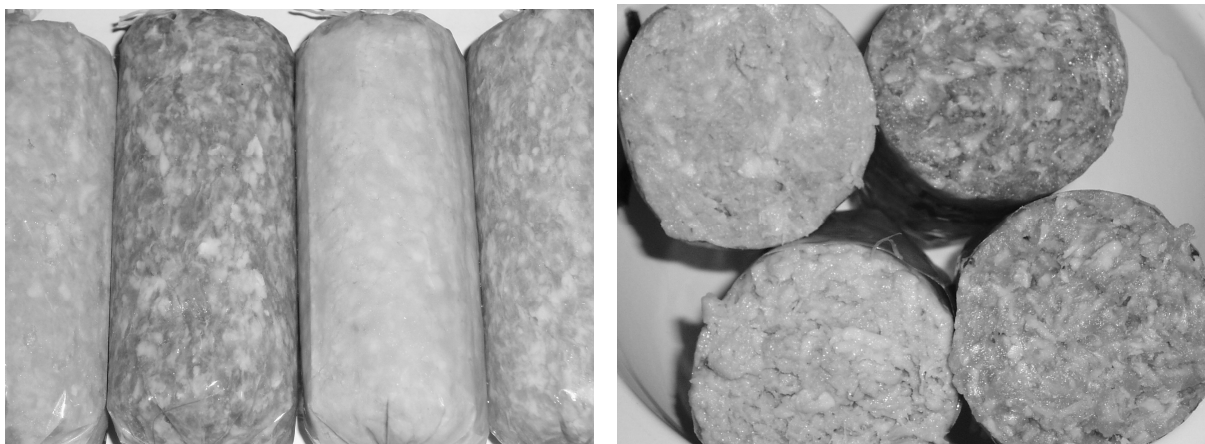
**Abbildung 49: Hackfleisch mit NPS**



linkes Bild: von links nach rechts: mit NPS & mit HPP; mit NPS & ohne HPP; ohne NPS & mit HPP; ohne NPS & ohne HPP;  
 rechtes Bild: oben links: mit NPS & mit HPP; oben rechts: mit NPS & ohne HPP;  
 unten links: ohne NPS & mit HPP; unten rechts: ohne NPS & ohne HPP;

Die Abbildung 50 gibt den Unterschied zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben mit und ohne Ascorbinsäure, Citrat und NPS wieder. Die hochdruckbehandelten Proben mit und ohne Ascorbinsäure, Citrat und NPS waren blass. Lediglich die Probe ohne Hochdruckbehandlung und mit Ascorbinsäure, Citrat und NPS wies, ähnlich wie bei dem Ascorbinsäurezusatz, eine Färbung wie die Mettwürste auf. Die Hackfleischprobe mit HPP und ohne Ascorbinsäure, Citrat und NPS war noch blasser als die mit den drei Zusätzen. Die Querschnitte in Abbildung 50 bestätigen diese Beobachtung, dass die Hochdruckbehandlung zum Verlust der roten Färbung der Proben führt und dass Ascorbinsäure, Citrat und NPS die rote Farbe stabilisierten.

**Abbildung 50: Hackfleisch mit Ascorbinsäure, Citrat und NPS**

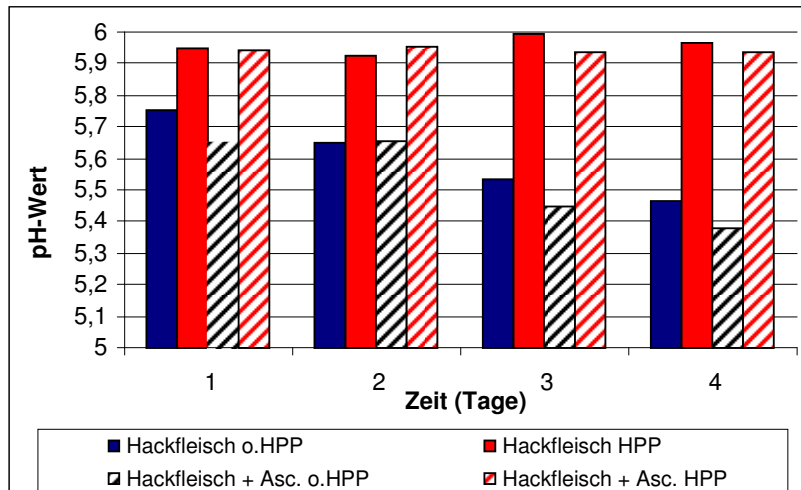


linkes Bild: von links nach rechts: mit Ascorbinsäure, Citrat, NPS & mit HPP; mit Ascorbinsäure, Citrat, NPS & ohne HPP; ohne Ascorbinsäure, Citrat, NPS & mit HPP; ohne Ascorbinsäure, Citrat, NPS & ohne HPP;  
 rechtes Bild: oben links: mit Ascorbinsäure, Citrat, NPS & mit HPP; oben rechts: mit Ascorbinsäure, Citrat, NPS & ohne HPP;  
 unten links: ohne Ascorbinsäure, Citrat, NPS & mit HPP; unten rechts: ohne Ascorbinsäure, Citrat, NPS & ohne HPP;

## 4.7.1.2 pH-Wert

In den folgenden Abbildungen 51 bis 54 sind die pH-Werte gegen die Zeit dargestellt. Die hochdruckbehandelten Proben sind rot markiert, während die unbehandelten blau sind.

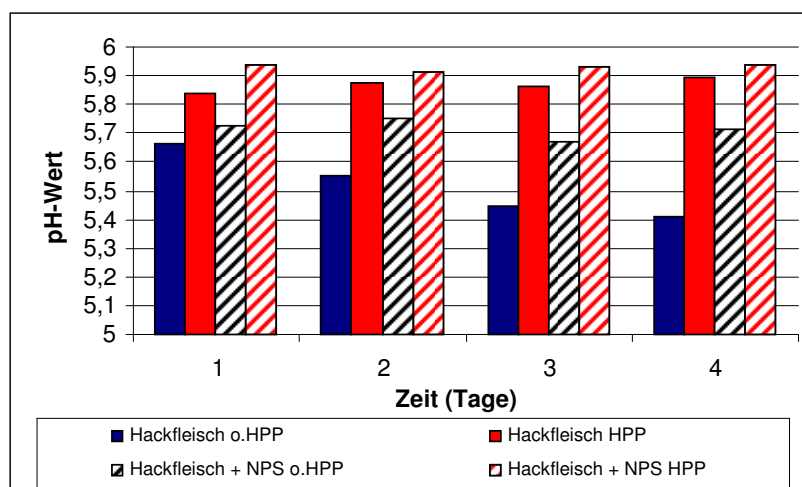
Abbildung 51: pH-Wert: Ascorbinsäure



Der pH-Wert der unbehandelten Proben sank im Laufe der vier Tage von 6 auf 5,4, der der hochdruckbehandelten Proben blieb bei 6. Der pH-Wert der Proben mit Ascorbinsäurezusatz verhielt sich wie der der Hackfleischproben ohne Zusatz. Ein Unterschied im pH-Wert-Verhalten zwischen den Hackfleischproben mit und ohne Ascorbinsäure war nicht nachweisbar. Beide Hackfleischproben wiesen die gleiche Abhängigkeit von der Hochdruckbehandlung auf. Der Unterschied zwischen unbehandelten und hochdruckbehandelten Proben war signifikant.

Der pH-Wert der unbehandelten Proben ohne NPS sank innerhalb der vier Versuchstage von 5,6 auf 5,4. Bei den unbehandelten Proben mit NPS veränderte er sich dagegen nicht, sondern blieb bei 5,8. Der pH-Wert der hochdruckbehandelten Proben blieb bei 5,8 – unabhängig vom NPS-Zusatz. Die Unterschiede waren signifikant.

Abbildung 52: pH-Wert: NPS

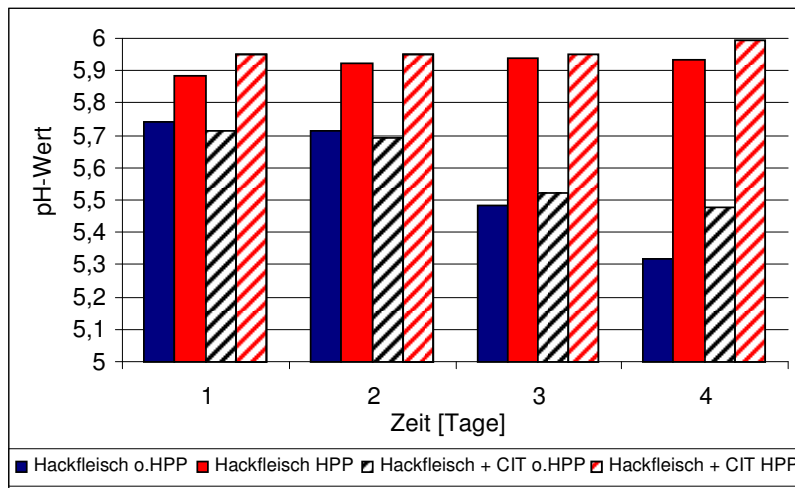


Die Zugabe von Citrat zu den Hackfleischproben hatte keine Auswirkung auf den pH-Wert. Er war, wie bei den Mettwurstproben, abhängig von der Hochdruckbehandlung. Bei den be-

handelten Proben blieb er bei pH 6 und bei den unbehandelten nahm er mit der Zeit von pH 5,8 auf pH 5,4 ab. Die Unterschiede waren ebenfalls signifikant.

Der pH-Wert der unbehandelten Hackfleischproben mit den Zusätzen an Ascorbinsäure, NPS und Citrat nahm nicht so stark ab, wie der ohne Zusätze, aber die Unterschiede waren signifikant. Der pH-Wert der hochdruckbehandelten Proben mit und ohne Zusätze blieb während der vier Tage bei pH 6 unverändert.

**Abbildung 53: pH-Wert: Citrat**

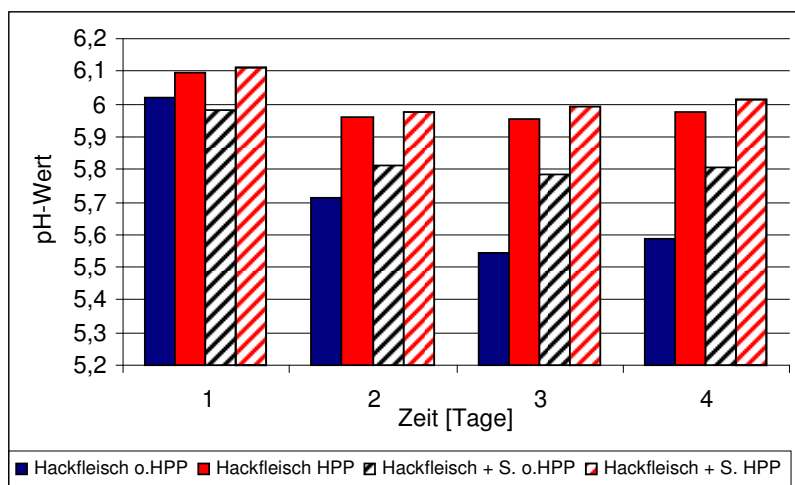


Es waren keine nach dem Wilcoxon-Test statistisch signifikanten Unterschiede sowohl zwischen den behandelten und unbehandelten Proben als auch den Hackfleischwürsten mit und ohne die drei Zusätze nachweisbar.

Die Konfidenzintervalle der linearen Ausgleichsgeraden der unbehandelten und der bei 600 MPa behandelten Hackfleischproben mit und ohne die Zusätze (Ascorbinsäure, NPS, Citrat) der zweiten Charge waren statistisch nicht signifikant.

Zusammenfassend bewirkten die Zusätze von Ascorbinsäure und Citrat keine Änderung im Vergleich zu den behandelten und unbehandelten Proben ohne Zusätze. Die Hochdruckbehandlung bewirkte, dass die Erniedrigung der pH-Werte der Proben nicht stattgefunden hat, wie es sonst bei den unbehandelten Proben der Fall war.

**Abbildung 54: pH-Wert: Summe**



Im Gegensatz dazu veränderte der Zusatz von NPS und von der Summe aller drei Zusätze das pH-Wert-Verhalten. Bei den unbehandelten Proben mit den Zusätzen sank der pH-Wert nicht wie bei den Vergleichsproben.

#### 4.7.1.3 Mikrobiologie des Hackfleisches

Alle Hackfleischproben waren erwartungsgemäß unbedenklich. Die Analysenergebnisse sind in den Tabellen 62 und 63 im Anhang wiedergegeben, während die mikrobiologischen Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von ungewürztem und gewürztem Hackfleisch auf Handelsebene (1-3) in Tabelle 35 dargestellt sind.

**Tabelle 35: Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von ungewürztem und gewürztem Hackfleisch auf Handelsebene**

	Ware	Richtwert (KBE/g)	Warnwert (KBE/g)
Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl		$5 \times 10^6$	-
Pseudomonaden		$1 \times 10^6$	-
Enterobacteriaceae		$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
Escherichia coli	ungewürzt	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$
	gewürzt	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$
Koagulase-positive Staphylokokken		$5 \times 10^2$	$5 \times 10^3$
Salmonellen		-	nicht nachweisbar in 25 g
Listeria monocytogenes		-	$1 \times 10^2$

Die Gesamtkeimzahl, Milchsäurebakterien, Enterobacteriaceae, Listerien und Salmonellen aller Proben wurden bestimmt.

Alle unbehandelten Rohwürste mit den Codierungen 0 und 2 zeigten Gesamtkeimzahlen von  $10^5$  bis  $10^6$  KBE pro g Rohwurstmaterial, während die hochdruckbehandelten Rohwürste mit den Codierungen 1 und 3 deutlich geringere Gesamtkeimzahlen (meist 0 KBE/g) aufwiesen.

Bei der Bestimmung von Milchsäurebakterien wurden ähnlich wie bei der Gesamtkeimzahl entsprechende Keimzahlen abhängig von den genannten Codierungen nachgewiesen. Während die unbehandelten Rohwürste mit den Codierungen 0 und 2 von  $10^4$  bis  $10^5$  KBE/g aufwiesen, konnten bei den hochdruckbehandelten Rohwürsten der übrigen Codierungen meist keine Milchsäurebakterien festgestellt werden. Ausnahmen bildeten hierbei die Proben 050812-043 ( $1 \times 10^2$  KBE/g) sowie 050812-049 ( $4,1 \times 10^6$  KBE/g), wobei es sich bei der zuletzt genannten Probe um einen Ablesefehler handeln könnte.

Die Bestimmung von *Enterobacteriaceae* erfolgte für alle Hackfleischwürste auf dem VRBD-Agar. Hier waren die Keimzahlen ähnlich denen der Gesamtzahl. Es wurden für die unbehandelten Rohwürste mit den Codierungen 0 und 2 Keimzahlen von  $10^4$  bis  $10^5$  KBE/g nachgewiesen, während die hochdruckbehandelten Rohwürste mit den Codierungen 1 und 3 durchgehend keine *Enterobacteriaceae* aufwiesen. Wiederum stellte die Probe 050812-043 ( $1,5 \times 10^5$  KBE/g) eine Ausnahme dar, weil diese Keimzahl, die höher als die Gesamtkeimzahl ( $4,1 \times 10^3$  KBE/g) war, einen zu starken Widerspruch darstellte. Dies könnte durch Kreuzkontamination bedingt sein.

Alle Proben wurden auf die Anwesenheit von *Listeria spp.* überprüft. Auf diesem Selektivagar (PALCAM) wurden bei manchen Proben Keime gezählt (siehe Tabelle 62 im Anhang) und mittels PCR untersucht. Die Ergebnisse der PCR waren alle durchgehend negativ auf *Liste-*

*ria spp.* Diese Keime wurden nur in den unbehandelten Rohwürsten (mit den Codierungen 0 und 2) nachgewiesen.

Die Bestimmung von *Salmonella spp.* erfolgte auf Selektivnährmedien. Es stellte sich heraus, dass trotz Einsatz aller verfügbaren Selektivnährmedien (Rambach-, XLD-, BPLS-Nährmedien) Keime wuchsen, die sich aber morphologisch stark vom mitgeführten *Salmonella*-Kontrollstamm unterschieden. Die damit verbundene PCR war deshalb erwartungsgemäß negativ. In der Beschreibung der angewachsenen Keime waren ebenfalls schwarze Kolonien auf Rambach-Nährmedium zu erkennen. Möglicherweise handelte es sich hierbei um *Escherichia coli*, da dieser Keim die gleiche Morphologie auf diesem Nährmedium aufweist.

Zusammenfassend führte die Hochdruckbehandlung zu einer Keimreduzierung. Die GKZ der konventionell hergestellten Hackfleischwürste war niedriger als der Richtwert zur Beurteilung vom gewürzten und ungewürzten Hackfleisch auf Handelsebene. Die Gesamtkeimzahlen der hochdruckbehandelten Proben lagen bei ca. 0 KBE/g und waren somit deutlich unter der GKZ ( $10^5$  bis  $10^6$  KBE/g) der unbehandelten Hackfleischwürste. Die Lactobacillen der hochdruckbehandelten Hackfleischwürste wurden inhibiert (von  $10^4$  bis  $10^5$  KBE/g auf 0 KBE/g). Es konnten in keiner der Proben Salmonellen und Listerien nachgewiesen werden. Die Zusätze übten keinen Effekt auf die Mikrobiologie des Hackfleisches aus.

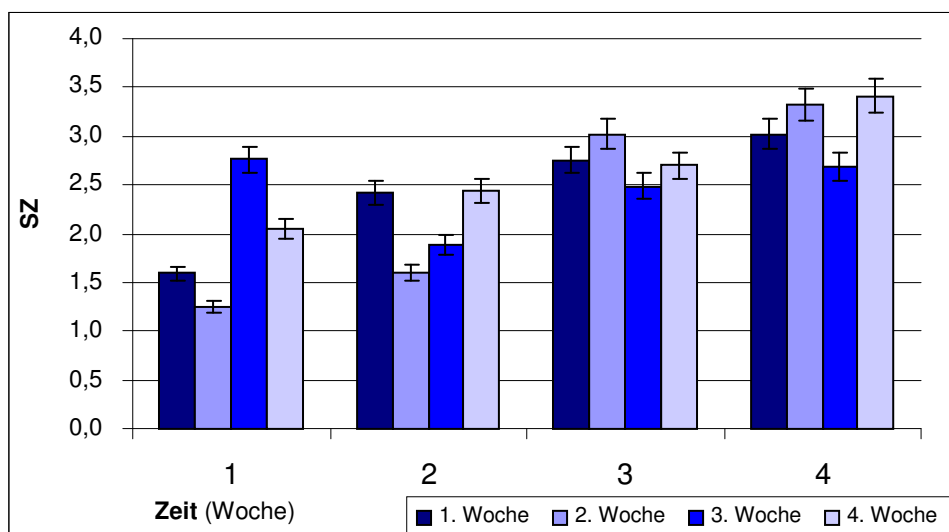
#### 4.7.2 Chemische Fettkennzahlen

##### 4.7.2.1 Säurezahl (SZ)

Zuerst wurden die unbehandelten und hochdruckbehandelten Proben ohne Zusätze, die als Vergleichswert/Basiswert immer mitgeführt wurden, untereinander verglichen.

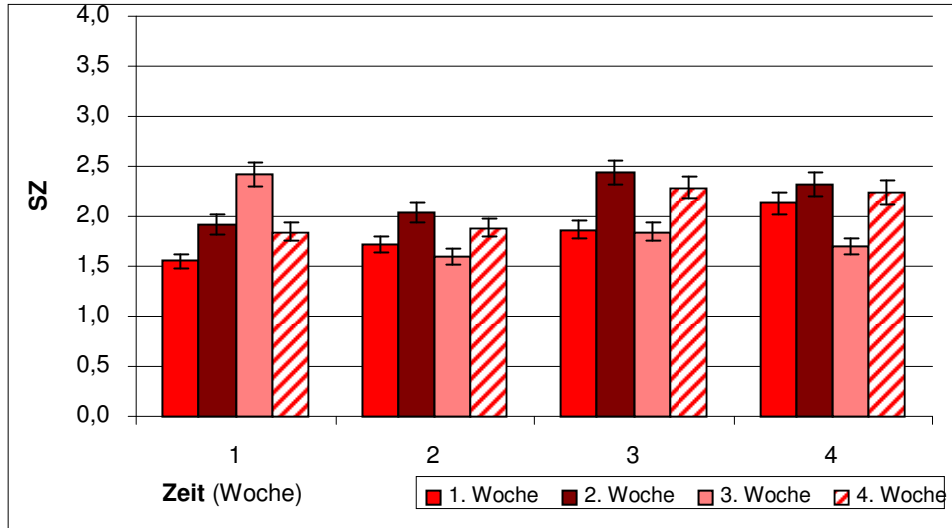
In den dargestellten Abbildungen 55 und 56 sind die Säurezahlen der begleitenden behandelten und unbehandelten Hackfleischproben ohne Zusätze innerhalb der untersuchten vier Tage abgebildet. Die hochdruckbehandelten Proben sind wie bei der pH-Wert-Darstellung rot markiert, während die unbehandelten in blau dargestellt sind.

**Abbildung 55: SZ: ohne HPP**



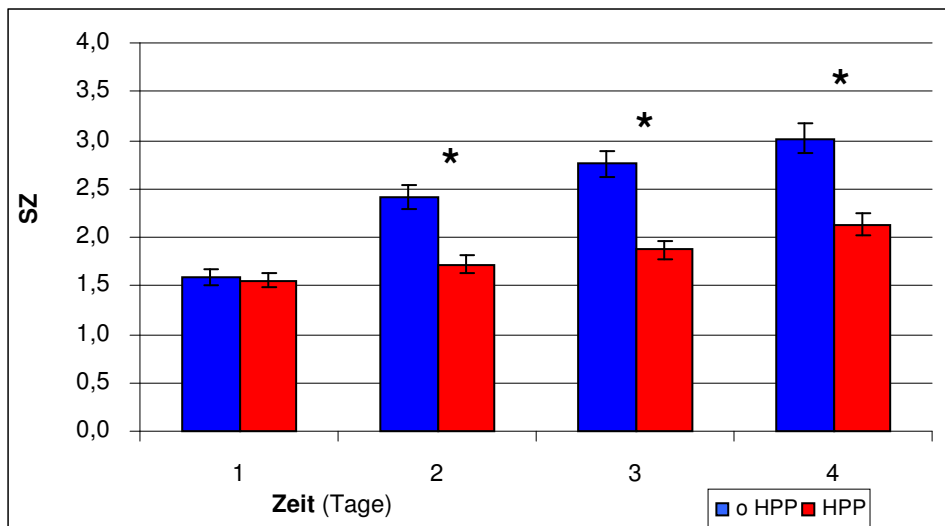
Die Säurezahl der unbehandelten Hackfleischproben stieg innerhalb des Analysenzeitraumes von vier Tagen von 1 bis 2 auf 3 bis 3,5 an, während die der hochdruckbehandelten Proben ohne Zusätze bei 1,5, höchstens 2,5 blieb.

Abbildung 56: SZ: HPP



In Abbildung 56 ist die Veränderung der Säurezahl der „Kontrollhackfleischproben“ ohne Zusatzstoffe dargestellt. Die Säurezahl der hochdruckbehandelten Probe war ab dem zweiten Messtag signifikant niedriger als die der unbehandelten Probe. Dies bedeutet, dass HPP die Bildung der Säurezahl bei den Hackfleischkontrollproben genauso wie bei den Mettwurstproben unterdrückte.

Abbildung 57: SZ. Hackfleisch ohne Zusatzstoffe

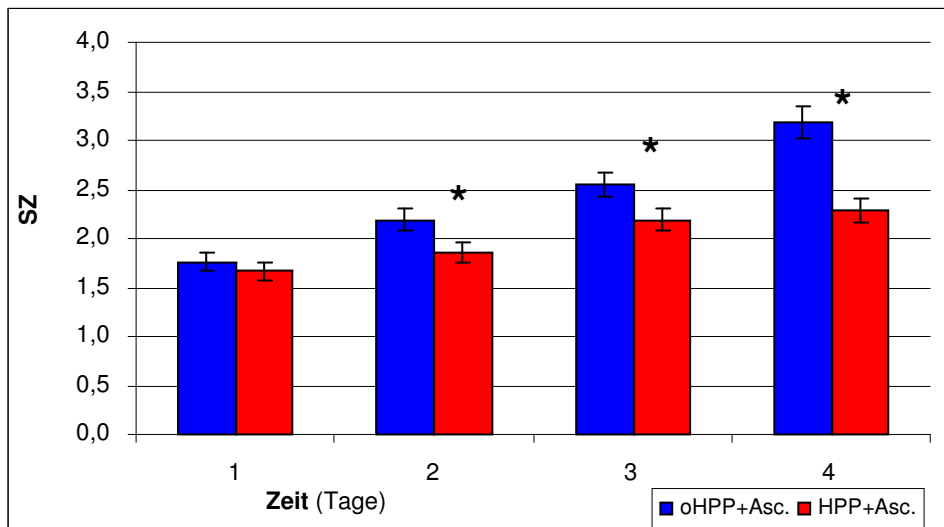


Eine Hackfleischprobe geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow$   $n = 4$ ,

\*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p = 99\%$ ,  $n = 4$

Die Säurezahl der hochdruckbehandelten Hackfleischproben war unabhängig vom Ascorbinsäurezusatz signifikant niedriger als die der unbehandelten, was in Abbildung 58 dargestellt ist. Gleiche Tendenzen ergaben sich bei den Säurezahlen der unterschiedlichen Chargen Mettwurst.

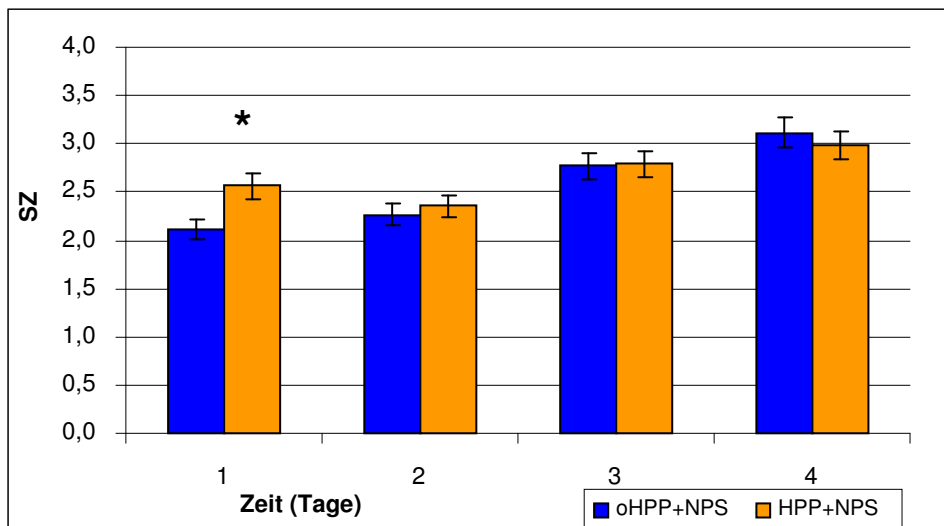
Abbildung 58: SZ: Ascorbinsäure



Eine Hackfleischprobe geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow$   $n = 4$ ,  
 \*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p = 99\%$ ,  $n = 4$

Die SZ der hochdruckbehandelten Hackfleischproben mit dem Zusatz von NPS ist in Abbildung 59 dargestellt. Sie war, anders als erwartet, annähernd gleich hoch wie die Säurezahl der unbehandelten Proben mit und ohne NPS. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hackfleischproben mit NPS mit HPP und ohne HPP ab dem zweiten Tag nachweisbar.

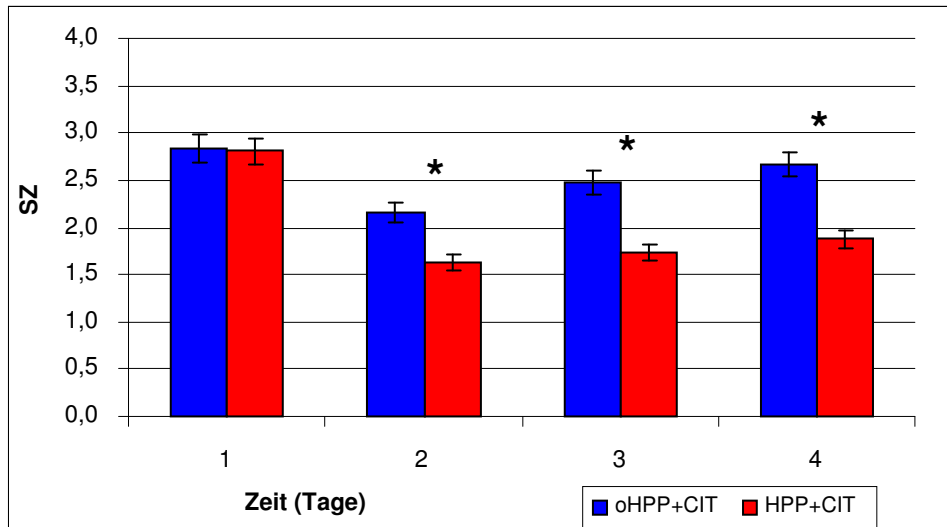
Abbildung 59: SZ: NPS



Eine Hackfleischprobe geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow$   $n = 4$ ,  
 \*signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p = 95\%$ ,  $n = 4$

Wie aus Abbildung 60 ersichtlich, waren signifikante Unterschiede zwischen den hochdruckbehandelten und unbehandelten Hackfleischproben mit Citrat nachweisbar. Diese waren unabhängig vom Citratzusatz, aber abhängig von der Hochdruckbehandlung. Die Säurezahl der unbehandelten Hackfleischproben war ab dem zweiten Analysentag ähnlich wie bei den Mettwürsten niedriger als bei den unbehandelten.

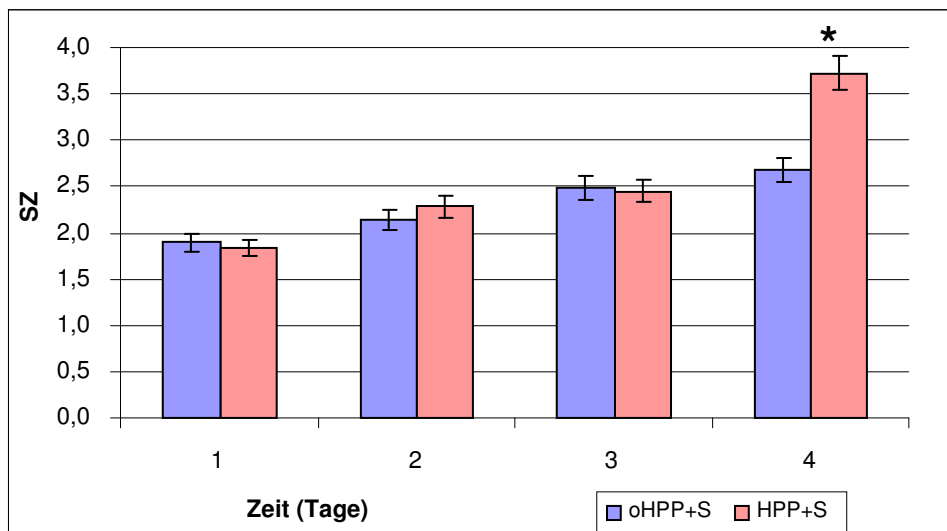
Abbildung 60: SZ: Citrat



Eine Hackfleischprobe geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow$   $n = 4$ ,  
 \*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p = 99\%$ ,  $n = 4$

In Abbildung 61 sind die Ergebnisse von den Hackfleischproben mit der Summe aller drei Zusatzstoffe Ascorbinsäure, Citrat und NPS wiedergegeben. Die Säurezahl beider Proben stieg tendenziell mit der Lagerzeit, aber erst am vierten Analysentag waren signifikante Unterschiede zwischen den hochdruckbehandelten und unbehandelten Hackfleischproben mit allen Zusätzen nachweisbar. Die Säurezahl der hochdruckbehandelten Probe war geringer als die der unbehandelten.

Abbildung 61: SZ: Summe: Ascorbinsäure &amp; NPS &amp; Citrat



Eine Hackfleischprobe geteilt  $\Rightarrow$  zwei Teilproben, Doppelbestimmung  $\Rightarrow$   $n = 4$ ,  
 \*hoch signifikante Unterschiede, doppelseitiger Mittelwert-t-Test,  $p = 99\%$ ,  $n = 4$

Es konnte eine positive Wirkung hinsichtlich des Gehaltes der Säurezahl des Hackfleisches mit Ascorbinsäure und Citrat nachgewiesen werden, d.h. die Hydrolyse der Triglyceride wurde verzögert. Weiterhin konnte eine negative Wirkung hinsichtlich des Gehaltes an Säurezahl des Hackfleisches mit Nitritpökelsalz und mit der Summe aller Zusatzstoffe beobachtet werden, d.h. die Hydrolyse der Triglyceride wurde beschleunigt, bzw. durch HPP nicht verhindert. Bemerkenswert ist, dass die Säurezahl der hochdruckbehandelten Proben bei allen



Proben ohne Zusatzstoffe ab dem zweiten Messtag signifikant niedriger als die der unbehandelten Probe war.

Die Säurezahl der hochdruckbehandelten Hackfleischproben mit den Zusätzen – Ascorbinsäure und Citrat – war hoch signifikant niedriger als die der unbehandelten mit den gleichen Zusätzen.

Zusammenfassend war bei allen Hackfleischproben mit Ausnahme von der Hackfleischprobe mit NPS, die Säurezahl bei den behandelten Proben niedriger als bei den unbehandelten.

Die Säurezahl der hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben mit allen drei Zusätzen war nahezu gleich. Lediglich am vierten Tag war die Säurezahl der hochdruckbehandelten Proben signifikant niedriger als die der unbehandelten.

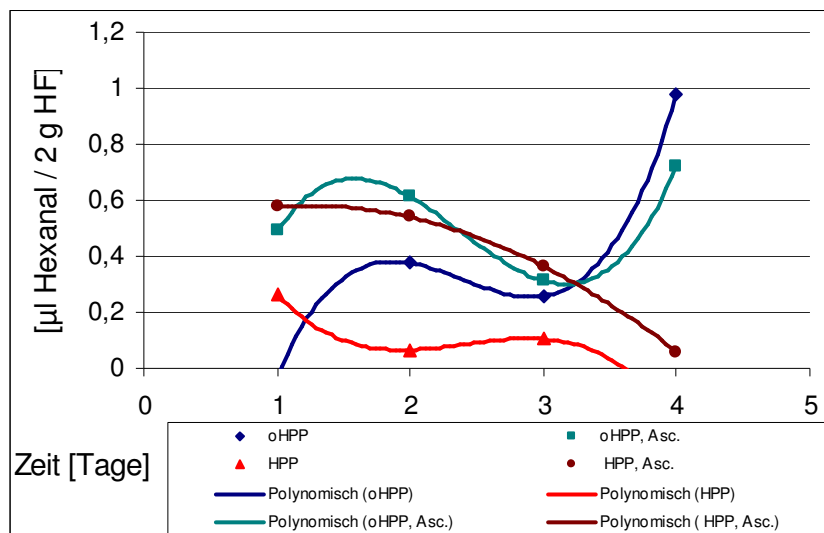
#### 4.7.3 Kennzahlen für den oxidativen Fettverderb

##### 4.7.3.1 Hexanalbestimmung

Die Lipidoxidation der Mettwurstproben wurde anhand der Messung der Entstehung von Hexanal und Octanal verfolgt. Hexanal und Octanal können sowohl während der Autoxidation entstehen als auch während der enzymatischen Fettoxidation durch Lipoxigenasen gebildet werden. Hierbei kann man nicht anhand des Endproduktes eine Aussage über den Entstehungsweg – Autoxidation oder enzymatische Oxidation – der sensorisch wahrnehmbaren Aldehyde treffen.

In den folgenden Abbildungen 62 bis 65 sind die Hexanalkonzentrationen gegen die Zeit dargestellt. Untersucht wurde das Hackfleisch innerhalb von vier Tagen nach der Hochdruckbehandlung. In rot sind die hochdruckbehandelten Proben ohne Zusätze, blau sind unbehandelte Proben ohne Zusätze, braun sind hochdruckbehandelte Proben mit Zusatz und grün unbehandelte Proben mit Zusatz dargestellt.

**Abbildung 62: Hexanal: Ascorbinsäure**



In Abbildung 62 ist die Hexanalkonzentration von hochdruckbehandelten und unbehandelten Hackfleischproben mit und ohne Ascorbinsäure gegen die Zeit dargestellt. Die hochdruckbehandelte Probe ohne Ascorbinsäure wies die geringsten Hexanalgehalte innerhalb der vier Tage auf. Die Hexanalkonzentration der hochdruckbehandelten Probe mit Ascorbinsäure war deutlich höher als die der hochdruckbehandelten Vergleichprobe ohne Ascorbinsäure. Die

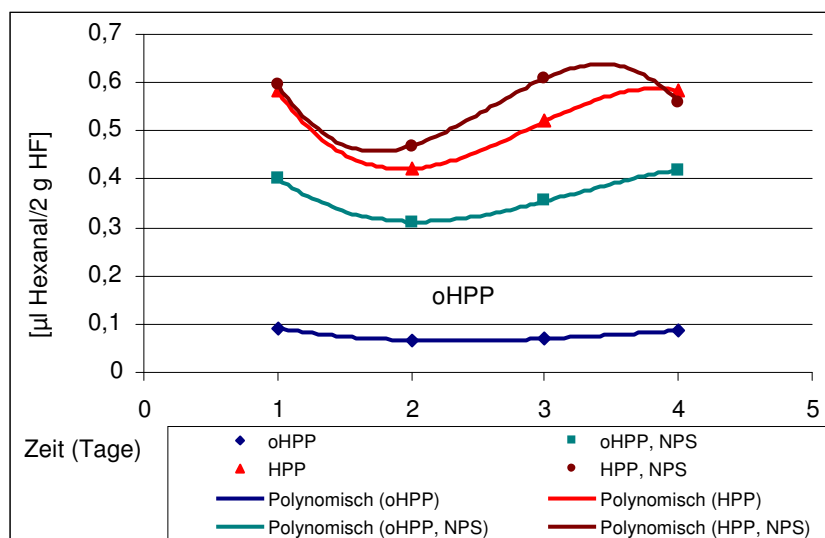
Hexanalkonzentrationen der behandelten Hackfleischproben nahmen innerhalb der vier Tage ab, die der unbehandelten Proben stieg. Die unbehandelten Hackfleischproben mit und ohne Ascorbinsäure wiesen einen ähnlichen Verlauf auf und stiegen am vierten Tag auf 0,8 bzw. 1  $\mu\text{l}$  Hexanal pro 2 mg Hackfleisch.

Zusammenfassend war kein deutlicher Einfluss der Ascorbinsäure auf die Hexanalkonzentration nachweisbar. Die Proben mit Ascorbinsäure verhielten sich ähnlich wie die entsprechenden hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben ohne diesen Zusatz.

Die Hexanalkonzentration von den hochdruckbehandelten und unbehandelten Hackfleischproben mit und ohne NPS ist in Abbildung 63 gegen die Zeit dargestellt. Die unbehandelte Probe ohne NPS wies die geringsten Hexanalgehalte innerhalb der vier Tage auf. Die Hexanalkonzentration der hochdruckbehandelten Probe mit NPS war deutlich höher als die der unbehandelten Vergleichprobe. Die Hexanalkonzentrationen der behandelten Probe mit NPS und der behandelten Hackfleischproben ohne NPS wiesen einen ähnlichen Verlauf auf und waren innerhalb der vier Tage auf ca. 0,4 bis 0,6  $\mu\text{l}$  Hexanal pro 2 mg Hackfleisch gestiegen.

Zusammenfassend war ein deutlicher Einfluss des NPS auf die Hexanalkonzentration nachweisbar. Die Proben mit NPS verhielten sich ähnlich wie die entsprechenden hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben ohne diesen Zusatz, jedoch war eine Tendenz zu progressivem Effekt durch NPS sichtbar. Die Hexanalkonzentration der unbehandelten Proben stieg durch den Zusatz von NPS.

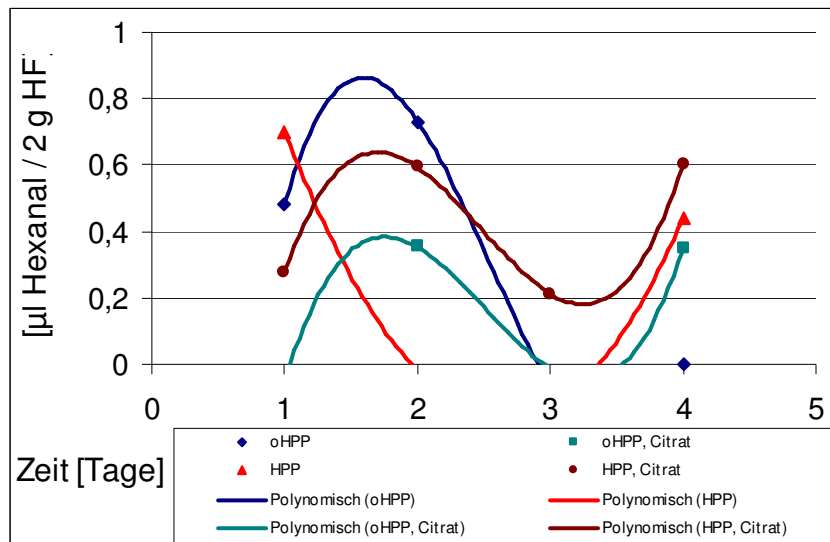
**Abbildung 63: Hexanal: NPS**



In Abbildung 64 ist die Hexanalkonzentration von hochdruckbehandelten und unbehandelten Hackfleischproben mit und ohne Citrat gegen die Zeit dargestellt. Die hochdruckbehandelte Probe ohne Citrat wies die höchsten Hexanalgehalte am ersten und vierten und die geringsten am zweiten und dritten Tag auf. Die Hexanalkonzentration der hochdruckbehandelten Probe mit Citrat verhielt sich ähnlich wie die beiden unbehandelten Proben mit und ohne Citrat. Die drei Proben hatten die höchsten Werte am ersten, zweiten und vierten Tag.

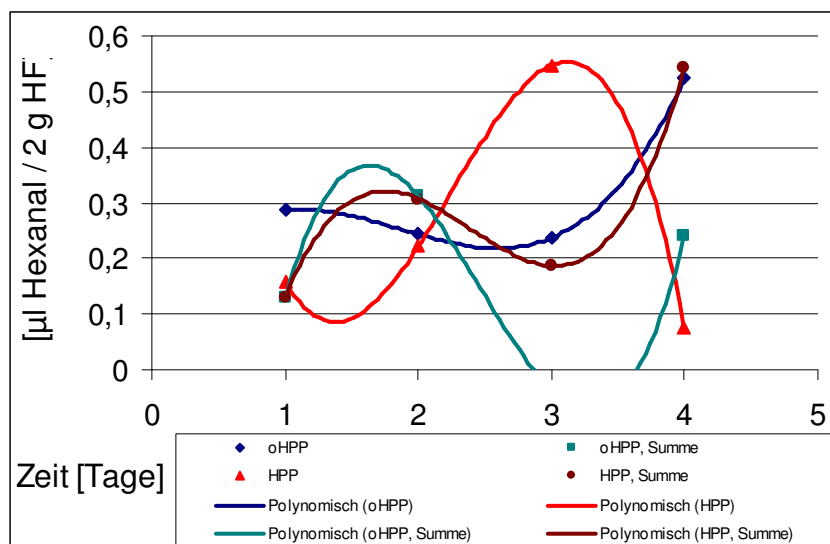
Zusammenfassend wirkte Citrat stabilisierend auf das Reaktionssystem, weil sich die behandelte Hackfleischprobe mit Citrat so wie ihre Vergleichsprobe (mit Citrat und ohne Hochdruckbehandlung) und die unbehandelte Probe ohne Citrat verhielt.

Abbildung 64: Hexanal: Citrat



In Abbildung 65 ist die Auswirkung der Hochdruckbehandlung und der drei Zusätze Ascorbinsäure, NPS und Citrat auf die Hexanalbildung innerhalb von vier Tagen dargestellt. Die Hexanalkonzentration der unbehandelten Probe ohne diese drei Zusätze erreicht am dritten Tag ein Maximum (0,5 µl Hexanal/2 g Hackfleisch). Dieses Maximum wurde von der unbehandelten Probe ohne Zusätze und von der hochdruckbehandelten Probe mit den Zusätzen einen Tag später erreicht. Die Hexanalkonzentration von der unbehandelten Hackfleischprobe mit den drei Zusätzen erreichte am vierten Tag lediglich die Hälfte der Maxima.

Abbildung 65: Hexanal: Asc.&amp; NPS &amp; Citrat



Zusammenfassend wirkte sich der Zusatz von den drei Substanzen (Ascorbinsäure, NPS und Citrat) reduzierend auf die Bildung von Hexanal in hochdruckbehandelten und unbehandelten Hackfleischproben aus. Die Wirkung der drei Substanzen allein war nicht so positiv wie ihre gemeinsame Wirkung bei ihrem gleichzeitigen Einsatz, weil die Hexanalkonzentration in den Maxima annähernd die Hälfte der Hexanalkonzentrationen bei den Versuchen mit Ascorbinsäure und Citrat betrug. Des Weiteren handelt es sich hierbei um Antagonisten. Der progressive Effekt, der durch HPP überwog, schien durch die Antagonisten abgemildert und verkleinert zu werden.

#### 4.7.3.2 Octanalbestimmung

In den Abbildungen 66 bis 69 sind die Octanalkonzentrationen gegen die Zeit dargestellt.

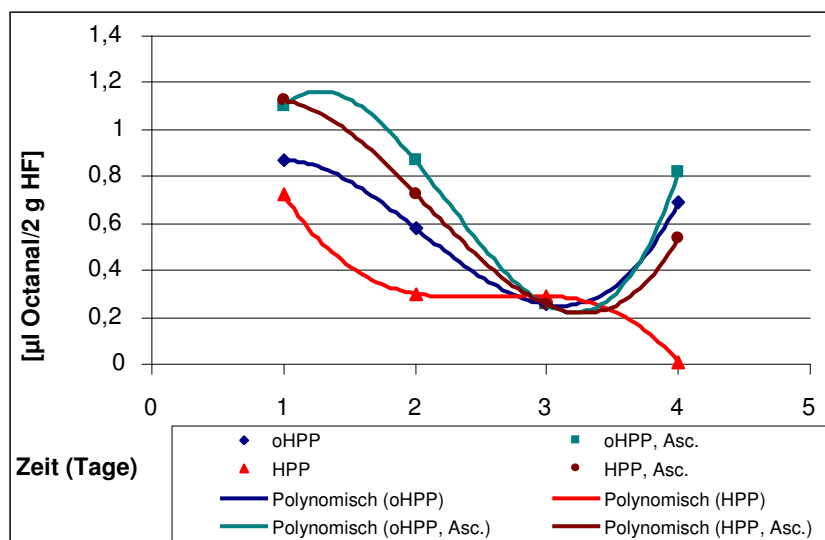
Untersucht wurde das Hackfleisch innerhalb von vier Tagen nach der Hochdruckbehandlung.

In Abbildung 66 ist die Octanalkonzentration gegen die Zeit dargestellt. Wie aus dieser Abbildung erkennbar ist, verhielten sich die hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben mit Ascorbinsäure annähernd so wie die unbehandelte Hackfleischprobe ohne HPP und ohne Ascorbinsäure. Die Octanalkonzentration der hochdruckbehandelten Hackfleischproben ohne Ascorbinsäure sank von 0,7 auf 0 µl Octanal in 2 g Hackfleisch innerhalb der vier Tage.

Zusammenfassend verhielten sich die Proben mit und ohne Ascorbinsäure, die dann behandelt wurden oder unbehandelt blieben, annähernd gleich. Demnach hatte der Ascorbinsäurezusatz keinen großen Einfluss auf die Octanalbildung bzw. ihre Verhinderung im Hackfleisch, aber dafür die Hochdruckbehandlung.

In Abbildung 67 ist die Octanalkonzentration der Hackfleischproben mit NPS gegen die Zeit dargestellt. Die niedrigste Octanalkonzentrationen war in den unbehandelten Hackfleischproben. Die Octanalkonzentration in den unbehandelten Proben mit NPS ist höher als in der Vergleichsprobe ohne HPS. Die durchgehend höchste Octanalkonzentration innerhalb der vier Tage hatte die hochdruckbehandelte Hackfleischprobe mit NPS, der hochdruckbehandelten Probe war durchgehend niedriger, aber die zweithöchste.

**Abbildung 66: Octanal: Ascorbinsäure**



Zusammenfassend bewirkte der Zusatz von NPS eine tendenzielle Verstärkung der Bildung von Octanal gesteigert in hochdruckbehandelten Proben.

Der Verlauf von der Octanalkonzentration innerhalb von vier Tagen nach der Hochdruckbehandlung und Zusatz von Citrat ist in Abbildung 67 dargestellt.

Die unbehandelte Probe ohne Citrat hatte die höchste Octanalkonzentration bereits am zweiten Tag. Die hochdruckbehandelten Proben mit und ohne Zusatz von Citrat weisen eine deutlich geringere Octanalkonzentration auf. Der Octanalgehalt der unbehandelten Hackfleischprobe mit Citrat wurde durch den Citratzusatz am gleichen Level bei 0,2 µl/2 g Probe gehalten.

Zusammenfassend stabilisierte Citrat das System. Die Bildung von Octanal wurde durch HPP und Citrat verlangsamt und abgeschwächt im Vergleich zu den restlichen Proben.

Abbildung 67: Octanal: NPS

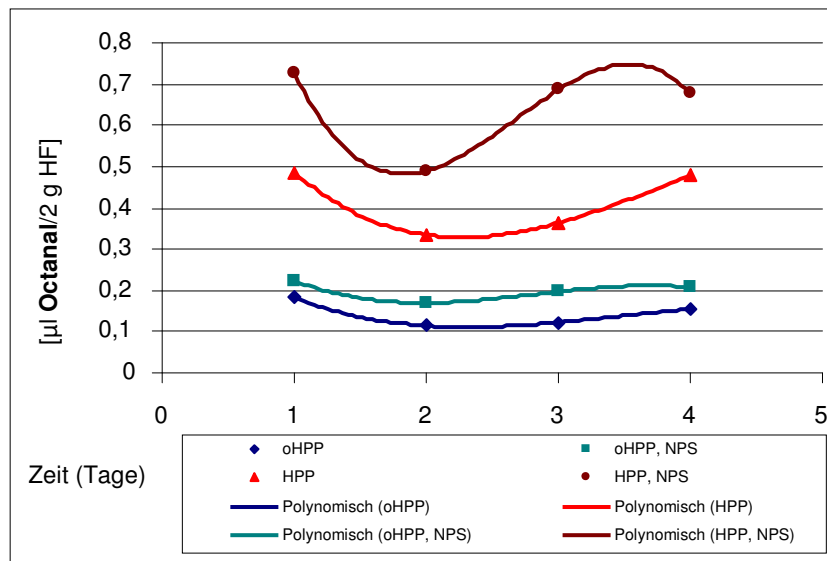
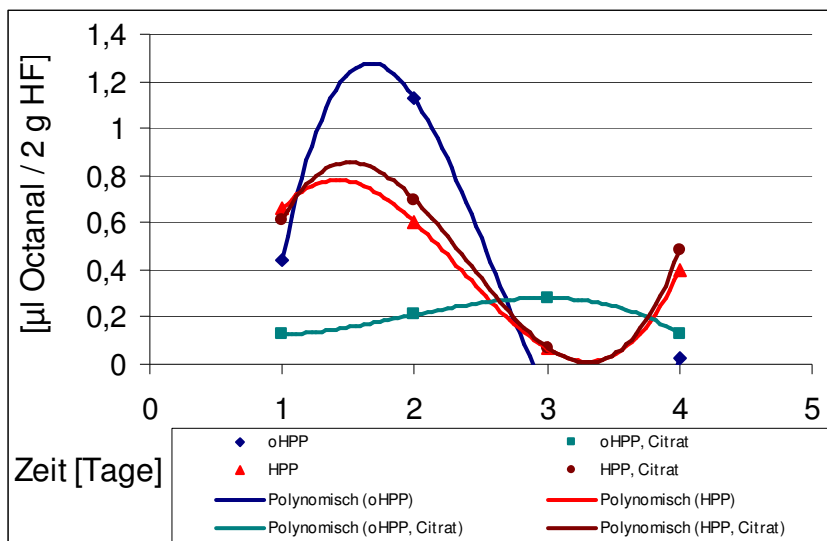
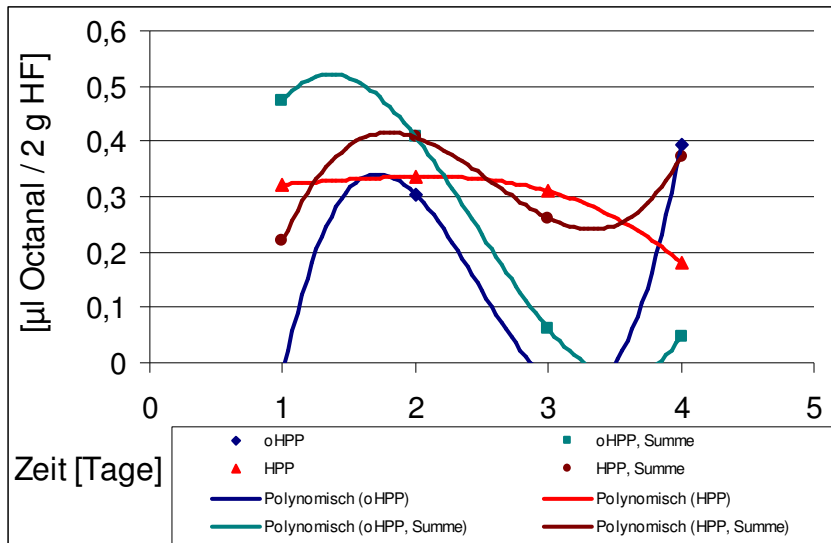


Abbildung 68: Octanal: Citrat



In Abbildung 69 ist die Octanalkonzentration der Hackfleischproben mit und ohne den Zusatz von Ascorbinsäure, NPS und Citrat gegen die Untersuchungsdauer von vier Tagen dargestellt.

Abbildung 69: Octanal: Asc.& NPS & Citrat



Zuerst muss erwähnt werden, dass die Octanalkonzentration auf die Hälfte im Vergleich zu den vorherigen Versuchen zur Octanalbildung reduziert wurde. Die höchste Konzentration wies die unbehandelte Probe mit den drei Zusätzen bereits am ersten Tag auf. Die unbehandelte Probe ohne Zusätze hatte am zweiten und vierten Tag Maxima. Die hochdruckbehandelte Probe blieb bei ca. 0,3 µl Octanal in 2 g Hackfleisch innerhalb der drei Tage und sank am vierten Tag. Die hochdruckbehandelte Probe mit den Zusätzen hatte Schwankungen in ihrer Octanalkonzentration, verhielt sich aber insgesamt ähnlich wie die behandelte ohne Zusätze.

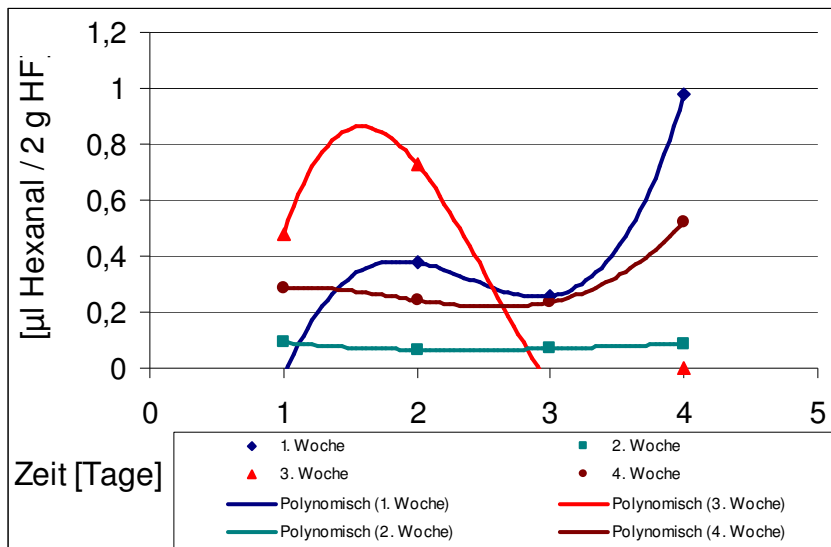
Zusammenfassend wurde der Einfluss der einzelnen Zusätze scheinbar aufgehoben, wie bei der Mettwurst. Insgesamt betrachtet war aber der Octanalgehalt gering (unter 0,4 µl) bei den beiden hochdruckbehandelten Proben.

Die Summe der drei Parameter bewirkte eine gegenseitige Aufhebung der Wirkungen der einzelnen Zusatzstoffe. Es handelt sich den erzielten Ergebnissen nach bei der Ascorbinsäure, dem Citrat und dem NPS um Antagonisten. NPS als Einzelzusatz förderte die Octanalbildung während Ascorbinsäure und Citrat dies verhinderten.

Letztendlich wurden die Vergleichsproben, d.h. die unbehandelten und behandelten Proben ohne die Zusätze (Nullmuster) der vier Untersuchungswochen miteinander verglichen.

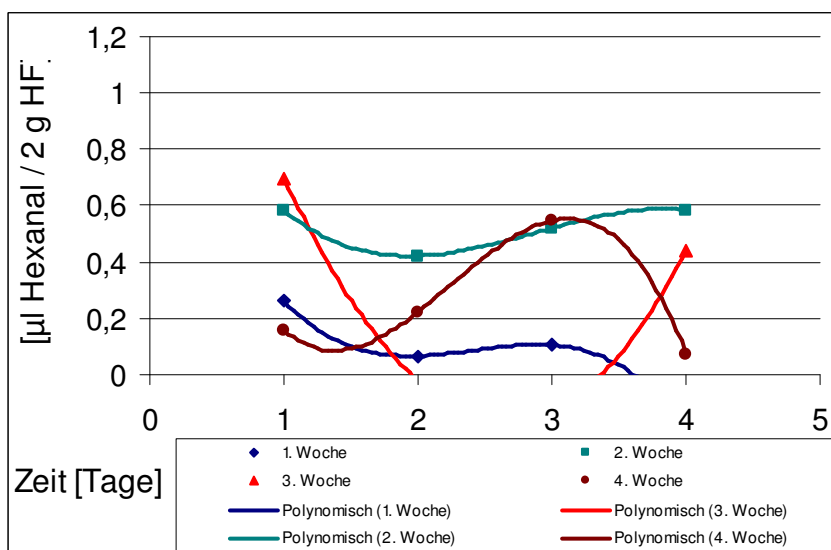
In Abbildung 70 ist die Hexanalkonzentration der unbehandelten Hackfleischproben der vier Wochen dargestellt. Alle Proben sollten die gleichen Kurven aufweisen, was aber nicht der Fall ist. Der Hexanalkonzentrationsverlauf der Probe in der dritten Woche weicht stark von den restlichen drei Proben ab.

Abbildung 70: Hexanal: BW, oHPP



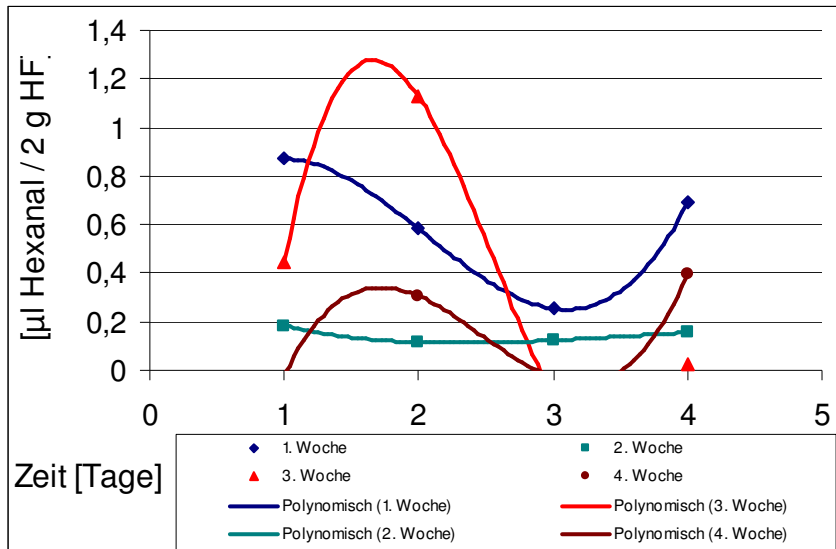
Die Abbildung 71 gibt die Hexanalkonzentration der behandelten Hackfleischproben der vier Wochen wieder. Hier sollten ebenfalls alle Proben die gleichen Kurven aufweisen, was aber nicht der Fall ist. Der Hexanalkonzentrationsverlauf der Probe in der dritten Woche weicht wiederholt stark von den restlichen drei Proben ab.

Abbildung 71: Hexanal: BW, HPP



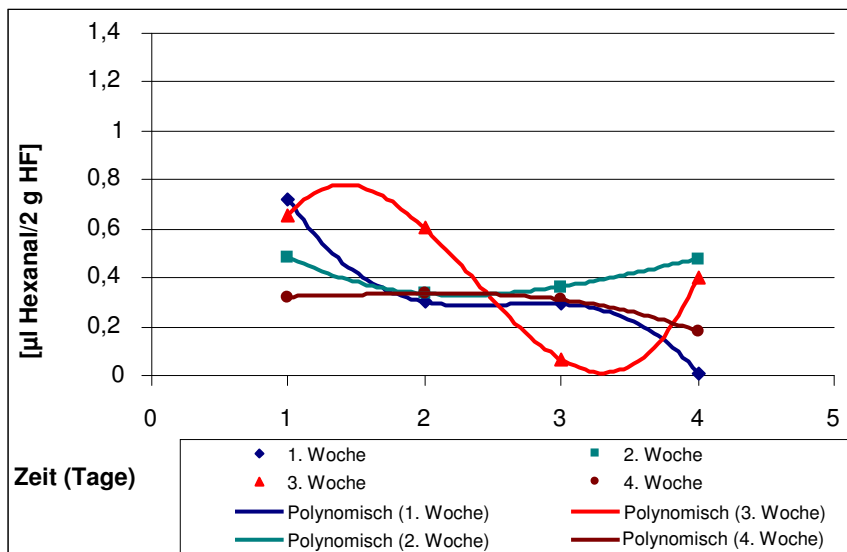
Diese Beobachtung wird durch die Unterschiede in der Octanalkonzentration der unbehandelten und hochdruckbehandelten Hackfleischproben in den Abbildungen 72 und 73 verstärkt. Aus diesen beiden Abbildungen ist erkennbar, dass die Unterschiede zwischen den „Nullmustern“ der dritten Woche und den restlichen drei Wochen stark sind.

Abbildung 72: Octanal: BW, oHPP



In der dritten Woche ist der Verlauf der unbehandelten und behandelten Probe ohne Zusatz stark unterschiedlich zu den weiteren vier Wochen.

Abbildung 73: Octanal: BW, HPP



Dies ist vermutlich nicht nur auf das Tiefgefrieren der Probe, sondern ebenfalls auf die hohen Temperaturen von 30 °C während der Versuchswoche zurückzuführen.

Anhand des Vergleichs der Nullproben mit und ohne Hochdruckbehandlung lässt sich schlussfolgern, dass das Tiefgefrieren ebenfalls einen hohen Effekt auf die Hexanal- und Octanal-Entstehung im Vergleich zur Hochdruckbehandlung hatte.

#### 4.7.3.3 Vitamin E

Die Abnahme des natürlichen Antioxidanz, d.h. des Tocopherols, ist ein Indiz für die eintretenden Fettveränderungen. Mithilfe des Mettwurst-Modells (Hackfleisch mit den unterschiedlichen Zusätzen) konnte die Auswirkung der einzelnen Zusatzstoffe, wie Ascorbinsäure, Nitritpökelsalz, Citrat und aller drei Zusätze zusammen, analysiert werden.

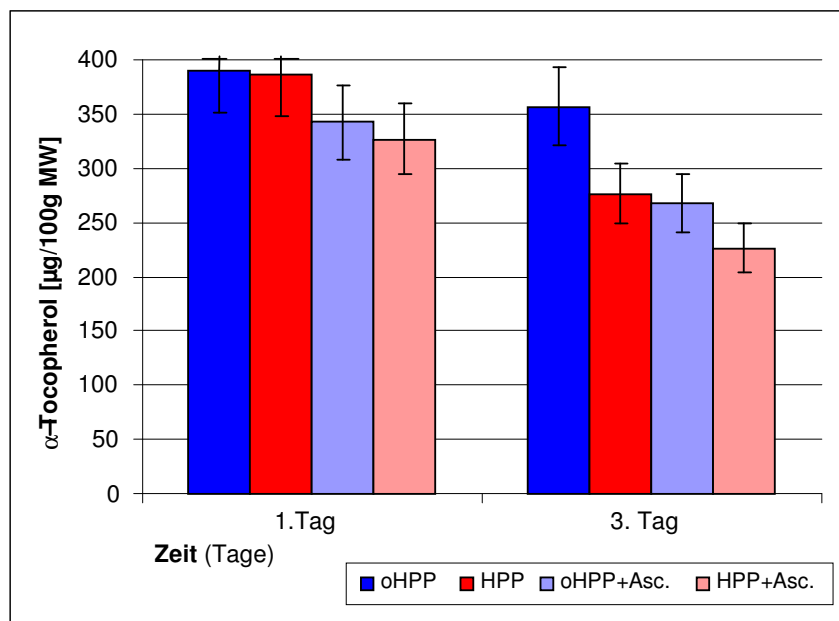


In Abbildung 74 ist der Vitamin E-Gehalt des Hackfleisches mit und ohne Ascorbinsäure und mit und ohne Hochdruckbehandlung dargestellt.

Die Vitamin E-Konzentration sank bei allen vier Proben innerhalb der drei Tage. Der Zusatz an Ascorbinsäure hatte keine Auswirkung auf den Anfangstocopherolgehalt am ersten Tag. Die Vitamin E-Gehalte sanken leicht vom ersten zum dritten Tag. Die unbehandelte Hackfleischprobe ohne Ascorbinsäure hatte am dritten Tag eine deutlich höhere Tocopherolkonzentration als die drei weiteren Proben: hochdruckbehandeltes Hackfleisch, unbehandeltes Hackfleisch ohne Ascorbinsäure und unbehandeltes Hackfleisch mit Ascorbinsäure.

Der Zusatz an Ascorbinsäure hatte kaum eine messbare Auswirkung auf den Anfangstocopherolgehalt. Es war eine Tendenz in der Tocopherolgehaltabnahme der Hackfleischproben innerhalb der drei Tage deutlich erkennbar: Lagerung, Hochdruckbehandlung und der Zusatz von Ascorbinsäure senken den Vitamin E-Gehalt.

**Abbildung 74: Vitamin E: HF mit Ascorbinsäure**



Die Abbildung 75 gibt den Vitamin E-Verlauf des Hackfleisches mit und ohne Nitritpökelsalz und mit und ohne Hochdruckbehandlung wieder.

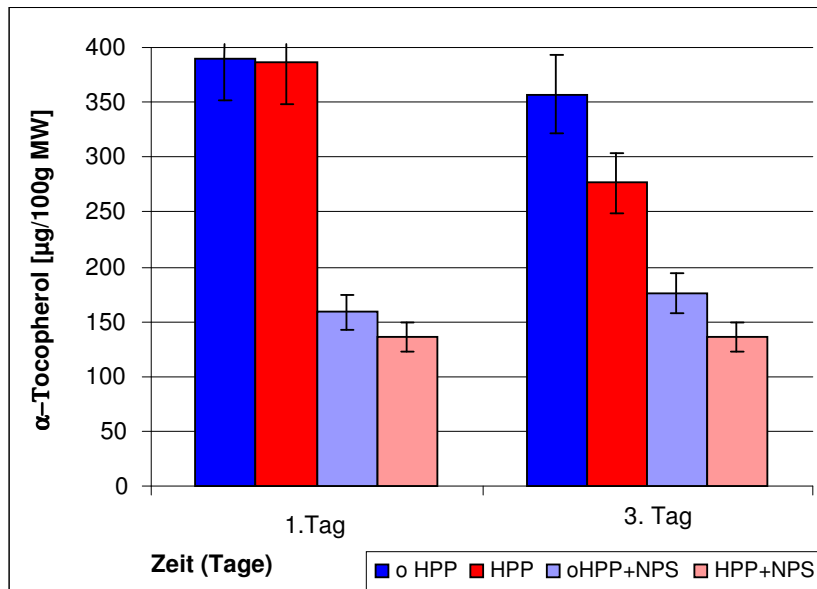
Die Anfangstocopherolgehalte der hochdruckbehandelten und unbehandelten Proben ohne Zusatz von NPS waren gleich (Abbildung 75). Der Vitamin E-Gehalt der beiden weiteren be- und unbehandelten Hackfleischproben mit NPS betrug weniger als die Hälfte am ersten Tag.

Bei den Hackfleischproben ohne NPS sank der Tocopherolgehalt innerhalb der drei Tage, bei der hochdruckbehandelten Probe tendenziell schneller als bei der unbehandelten.

Bei den beiden Hackfleischproben mit NPS veränderte sich die Tocopherolkonzentration in den drei Tagen nicht.

Mit dem Zusatz – NPS – war der Tocopherolgehalt signifikant niedriger als bei den Hackfleischproben ohne den Zusatz. Dieser Effekt war unabhängig von HPP zu beobachten.

Abbildung 75: Vitamin E: NPS



In Abbildung 76 ist der Vitamin E-Gehalt des Hackfleisches mit und ohne Citrat und mit und ohne Hochdruckbehandlung dargestellt.

Der Zusatz an Citrat und die Hochdruckbehandlung hatte keine Auswirkung auf den Tocopherolgehalt am ersten Tag. Drei Tage später sank der Tocopherolgehalt der hochdruckbehandelten Probe ohne Citrat und der beiden Proben (be- und unbehandelt) mit Citrat. Die Tocopherol-Konzentration der unbehandelten Hackfleischprobe ohne Citrat war geringfügig höher als die der anderen drei Proben.

Der Tocopherolgehalt der Hackfleischproben nahm innerhalb der zwei Tage relativ unabhängig von HPP und dem Zusatz an Citrat ab. Die Abnahme war auf die Lagerung zurückzuführen.

In Abbildung 77 ist der Vitamin E-Gehalt des Hackfleisches mit und ohne die Zusätze Ascorbinsäure, Nitritpökelsalz, Citrat und mit und ohne Hochdruckbehandlung dargestellt.

Mit den Zusätzen Ascorbinsäure, NPS und Citrat betrug der Tocopherolgehalt die Hälfte der Hackfleischproben ohne den Zusatz und dies unabhängig von HPP. Bei den Hackfleischproben ohne die Zusatzstoffe sinkt der Tocopherolgehalt mit der Lagerung, wie dies schon bei den anderen Proben beobachtet wurde. Die Vitamin E-Konzentration sank nicht mit der Lagerzeit bei den Proben mit den Zusatzstoffen, unabhängig von HPP.

Die Hochdruckbehandlung hatte einen geringeren Einfluss auf den Tocopherolgehalt im Vergleich zu dem Zusatz NPS und die Summe aller drei Zusatzstoffe. Die Zusätze Ascorbinsäure und Citrat hatten eine positive Wirkung hinsichtlich des Vitamin E-Gehaltes des Hackfleisches unabhängig von der Hochdruckbehandlung.

Abbildung 76: Vitamin E: Citrat

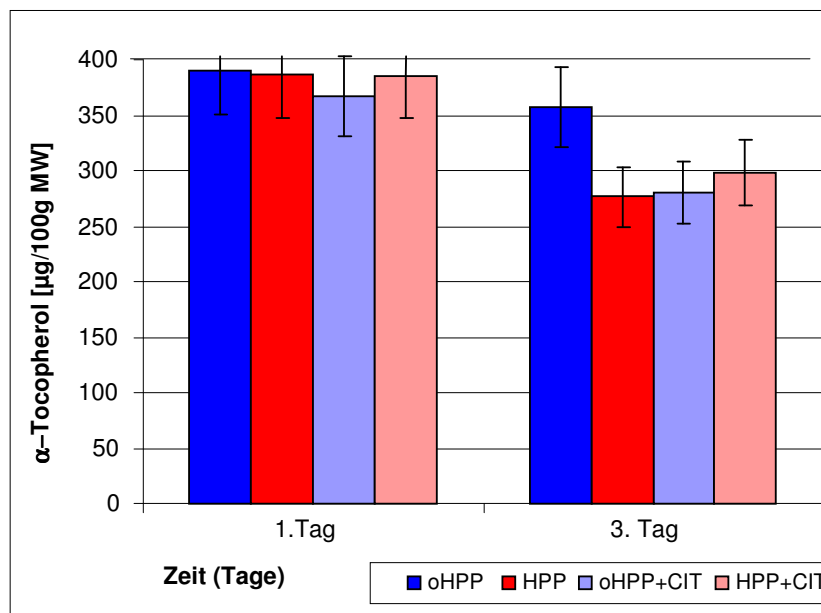
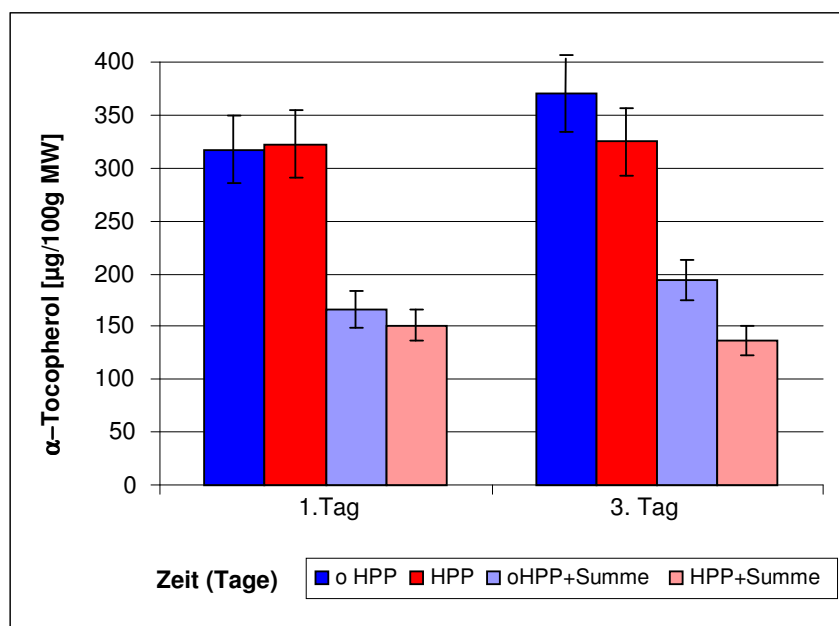


Abbildung 77: Vitamin E: Summe



#### 4.7.4 Zusammenfassung der Hackfleischergebnisse

Die Zusätze von Ascorbinsäure und Citrat erzeugten keine Änderung im Vergleich zu den behandelten und unbehandelten Proben ohne Zusätze. Im Gegensatz dazu veränderte der Zusatz von NPS und von der Summe aller drei Zusätze das pH-Wert-Verhalten. Der pH-Wert der unbehandelten Proben sank nicht mit diesen Zusätzen und verhielt sich eher wie der der hochdruckbehandelten Proben.

Zusammenfassend führte die Hochdruckbehandlung zu einer Keimreduzierung der GKZ und der Lactobacillen. Es konnten in keiner der Proben Salmonellen und Listerien nachgewiesen werden. Die Zusätze übten keinen Effekt auf die Mikrobiologie des Hackfleisches aus.

Die Säurezahl der hochdruckbehandelten Hackfleischproben ohne Zusatzstoffe war ab dem zweiten Messtag signifikant niedriger als die der unbehandelten Probe. Dies bedeutet, dass HPP die Bildung von Säurezahl bei den Hackfleischkontrollproben genau so wie bei den Mettwurstproben unterdrückte. Weiterhin wurde die Säurezahl durch die Hochdruckbehandlung von Proben mit Ascorbinsäure und Citrat verlangsamt, während der NPS-Zusatz die Säurezahl förderte. Dies bedeutet, dass NPS im Gegensatz zu Ascorbinsäure und Citrat die Hydrolyse der Fette des Hackfleisches förderte.

Die Ascorbinsäure hatte nachweisbar keinen negativen Einfluss auf die Hexanalkonzentration. Bei den Proben mit NPS war eine Tendenz zu progressivem Effekt durch NPS sichtbar. Die Hexanalkonzentration der unbehandelten Proben stieg durch den Zusatz von NPS. Citrat wirkte stabilisierend auf das Reaktionssystem.

Zusammenfassend wirkte sich der Zusatz von den drei Zusätzen (Ascorbinsäure, NPS und Citrat) stabilisierend auf die Bildung von Hexanal in hochdruckbehandelten und unbehandelten Hackfleischproben aus. Die Wirkung der drei Substanzen allein war weniger positiv im Hinblick auf Hexanalbildung als ihre gemeinsame Wirkung bei ihrem gleichzeitigen Einsatz, weil die Hexanalkonzentration in den Maxima annähernd die Hälfte der Hexanalkonzentrationen bei den Versuchen mit Ascorbinsäure und Citrat betrug. Bemerkenswert ist, dass der progressive Effekt, der durch HPP überwog, tendenziell durch die Antagonisten abgemildert wurde.

Der Ascorbinsäurezusatz hatte keinen großen Einfluss auf die Octanalbildung bzw. ihre Vermeidung im Hackfleisch, aber dafür die Hochdruckbehandlung. NPS bewirkte eine tendenzielle Verstärkung der Bildung von Octanal in unbehandelten und verstärkt in hochdruckbehandelten Proben. Citrat stabilisierte das System. Die Bildung von Octanal wurde durch HPP und Citrat verlangsamt und abgeschwächt im Vergleich zu den restlichen Proben. Zusammenfassend wurde der Einfluss der einzelnen Zusätze gegeneinander aufgehoben, wie bei der Mettwurst und den Hexanalkonzentrationen in den Hackfleischproben. Insgesamt betrachtet war aber der Octanalgehalt gering (unter 0,4 µl) bei den beiden hochdruckbehandelten Proben. Dies bedeutet, dass die Summe der drei Parameter eine gegenseitige Aufhebung der Wirkungen der einzelnen Zusatzstoffe bewirkte. Es handelt sich den erzielten Ergebnissen nach bei der Ascorbinsäure, dem Citrat und dem NPS um Antagonisten. NPS als Einzelzusatz förderte die Octanalbildung während Ascorbinsäure und Citrat dies verhinderten. Beim Vergleich von Nullproben (Proben ohne Zusätze) mit und ohne Hochdruckbehandlung lässt sich schlussfolgern, dass das Tiefgefrieren ebenfalls einen hohen Effekt auf die Hexanal- und Octanal-Entstehung im Vergleich zur Hochdruckbehandlung hatte. Anhand der Endprodukte Hexanal und Octanal und ihrem Verhältnis zueinander war keine Zuordnung zu ihrem Entstehungsweg – Autoxidation, enzymatische Lipidoxidation – möglich.

Die Vitamin E-Konzentration wurde durch die Hochdruckbehandlung nicht beeinflusst, vielmehr durch die Zugabe von NPS und aller drei Zusätze gemeinsam gesenkt. Ascorbinsäure und Citrat stabilisierten Vitamin E.

## 5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Untersucht wurden vier verschiedene Chargen handelsüblicher Zwiebelmettwurst und zwei Chargen Schweinehackfleisch mit Ascorbinsäure, Citrat und NPS auf den Einfluss der Hochdruckbehandlung hinsichtlich der Lipidveränderungen. Die druckbehandelten Proben wurden jeweils mit unbehandelten Kontrollproben verglichen.

Die einzelnen Ergebnisse der hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürste und Hackfleischwürste sind jeweils in den entsprechenden Kapiteln wiedergegeben.

### 5.1 Vergleich: Mettwurst mit Hackfleisch

Die Hochdruckbehandlung bewirkte sichtbare Unterschiede im Aussehen und in der Konsistenz der Mettwürste und der Hackfleischwürste mit allen drei Zusätzen (Ascorbinsäure, NPS, Citrat). Alle drei Zusätze milderten die Effekte der Hochdruckbehandlung.

Es konnten signifikante pH-Wert-Unterschiede zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Hackfleischwürsten nachgewiesen werden. Der Zusatz von Ascorbinsäure und Citrat bewirkte keine Änderung im Vergleich zu den behandelten und unbehandelten Proben ohne Zusätze, aber der Zusatz von NPS und von der Summe aller drei Zusätze veränderte das pH-Wert-Verhalten der unbehandelten Proben. Ihr pH-Wert sank nicht mit diesen Zusätzen und verhielt sich eher wie der der hochdruckbehandelten Proben. Im Ganzen betrachtet zeigten die Ergebnisse, dass die pH-Wert-Erhöhung in den behandelten Hackfleischproben mit der durch die Hochdruckbehandlung einhergehenden Mikroorganismen-Abtötung (71;72;83;197) und der in der Literatur von Orlie et al. beschriebenen (85;104;113;138) hochdruckinduzierten pH-Wert-Erhöhung in Lebensmitteln einhergingen. Eine Ausnahme waren die Hackfleischproben mit NPS. NPS bewirkte, dass eine geringere bis keine Absenkung des pH-Wertes während der Lagerung bei den unbehandelten Proben gemessen wurde.

Die zusammengefassten Ergebnisse wurden mit den Literaturangaben in der Tabelle 5 im Kapitel 2.3.2.3.3.2 „Autoxidation der Linolsäuremethylester“ zur Fettsäurezusammensetzung von Speck und Schweinefleisch (23;171) verglichen.

**Tabelle 36: Fettsäurezusammensetzung der Mettwurst und des Hackfleisches**

FS	Mettwurst			Hackfleisch
	1. Charge PZWI20030411 (%)	2. Charge PZWI20031107 (%)	4. Charge PZWI20040629 (%)	1. Charge D041014-6 (%)
C14	2,11	3,20	2,41	1,42
C16	7,64	32,18	4,34	35,69
C16:1	0,00	0,00	0,00	8,17
C18	26,38	26,15	28,47	30,22
C18:1 cis	26,06	24,56	24,98	15,88
C18:1 trans	2,59	2,86	2,54	2,29
C18:2	12,05	10,46	13,70	13,65
C18:3	0,00	0,00	0,00	0,00
C20	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4	0,00	0,00	0,00	0,00

Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 36 erkennbar ist, liegen alle Gehalte von Fettsäuren der Mettwurst- und Hackfleischproben innerhalb der in der Literatur beschriebenen Schwankungsbreiten. Des Weiteren sind die Schwankungen der einzelnen Chargen untereinander sehr hoch. Da es sich bei Fleisch um ein Naturprodukt handelt, das fütterungs-, jahreszeit-

bedingten und anderen Unterschieden unterliegt, sind diese Variationen im Fettsäurespektrum nachvollziehbar und entsprechen den natürlichen Schwankungen.

Bei einer eingehenden Betrachtung der Ergebnisse der Versuche ist auffällig, dass die Ölsäure zu ca. 26 bis 28 % in den untersuchten Mettwürsten vorkommt, während die Linolsäure zwischen 2,5 und 3 % in denselben Proben vorliegt.

Octanal ist ein Oxidationsprodukt der Ölsäure. Hexanal ist ein Oxidationsprodukt der Linolsäure. Da C18:2 nur in den Konzentrationen von 2,5 bis 3 % in der Mettwurst vorkommt, ist davon auszugehen, dass entgegen der Ergebnisse der Literaturrecherche (16;16;23;33;34;48;49;129;155;192) aufgrund der höheren Ausgangskonzentration von Ölsäure weniger Hexanal als Octanal gebildet wird. Diese Annahme wurde durch die erhaltenen Ergebnisse aller Mettwurstchargen bestätigt. Es konnten höhere Octanalkonzentrationen aus der Ölsäure gebildet und nachgewiesen werden als Hexanal aus Linolsäure. Aufgrund der besser messbaren Zunahme von Octanal und der damit verbundenen Möglichkeit, die Fettveränderungen besser verfolgen zu können, wurde in den durchgeführten Untersuchungen der Verlauf der Octanalkonzentration stellvertretend für die flüchtigen geruchsaktiven Verbindungen der Fettoxidation (Hexanal und Octanal) betrachtet.

Die hochdruckbehandelten Mettwürste hatten eine längere Induktionsphase bei der Hydrolyse der Triglyceride. Die Induktionsphase der Peroxidation mit der Octanal- und Hexanalbildung war um eine Woche kürzer als bei der unbehandelten Mettwurst. Demnach hatte die Hochdruckbehandlung positive Wirkung hinsichtlich des Gehaltes an FFS und SZ der Mettwurst, d.h. die Hydrolyse der Triglyceride wurde verzögert, was mit den Angaben von Tauscher et al. (175-178) in der Literatur übereinstimmt. Die flüchtigen Verbindungen Hexanal und Octanal, d.h. die Peroxidation der Fettsäuren, wurde tendenziell durch Hochdruck gefördert. Diese Folgereaktionen wurden ebenfalls von Tauscher et al. beschrieben. Hierbei handelte es sich um die hochdruckinduzierte Bildung von primären Oxidationsprodukten (175-178).

Eine Ausnahme war die Hackfleischprobe mit Ascorbinsäure. Die Hochdruckbehandlung bewirkte bei dieser Probe eine Umkehrung der Wirkung hinsichtlich des Gehaltes an FFS und SZ des Fleisches mit Ascorbinsäure und eine Förderung der Bildung – stärker als bei den Mettwürsten – von flüchtigen Verbindungen Hexanal und Octanal, d.h. die Peroxidation der Fettsäuren wurde stark gefördert.

Bei der Hackfleischwurst mit Ascorbinsäure und Citrat verhinderte die Hochdruckbehandlung die Hydrolyse, die durch geringere SZ und FFS nachgewiesen wurde. Bei der Hackfleischwurst mit NPS wurde die Hydrolyse der Triglyceride durch Hochdruck beschleunigt.

Die Peroxidation der Fettsäuren wurde bei den Mettwürsten und den Hackfleischproben sowohl mit NPS als auch mit allen drei Zusätzen (Ascorbinsäure, NPS, Citrat) durch Hochdruck gefördert. Allerdings verminderten Ascorbinsäure und Citrat in den Hackfleischwürsten die Bildung von Hexanal und Octanal. Die Hexanal- und Octanalkonzentrationen des Hackfleisches waren bereits am ersten Tag nach der Hochdruckbehandlung so hoch wie bei der Mettwurst nach fünf bis neun Wochen. Zusammenfassend hatte Citrat eine antioxidative Wirkung im Hackfleisch. Der Ascorbinsäure konnte sowohl eine prooxidative als auch eine antioxidative Wirkung, die schon in der Literatur (14;16;49;148;192) beschrieben wurde, nachgewiesen werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Tiefgefrieren einen höheren Einfluss auf die Hexanal- und Octanal-Entstehung als die durchgeführte Hochdruckbehandlung haben kann.

Die Betrachtung der Rezepturunterschiede zwischen Mettwurst und Hackfleisch in Kapitel 4.6 (Mehrfaktorielles und Multikomponenten Modell: Hackfleisch) und der Literatur in Kapitel 2.3.2.4 Zusatzstoffe (Zitronensäure, EDTA, Rosmarin-Extrakt, Hexamethaphosphate

und Eiweißpulver) führten zu folgenden **Thesen**, die in Kapitel 4.6 (Mehrfaktorielles und Multikomponenten Modell: Hackfleisch) aufgestellt wurden. Ihre Überprüfung anhand der zweiten Hackfleischcharge führte zu folgenden Ergebnissen:

- Das Nitritpökelsalz förderte die Säurezahlbildung, also stabilisiert NPS nicht den Häm-Komplex und verhinderte nicht die Freisetzung des Eisens aus dem Häm.
- Citrat verhinderte die Erhöhung der Säurezahl. Es ist ein Komplexbildner, der freigesetzte Eisen-Ionen binden könnte.
- Die Ascorbinsäure senkte die Säurezahl. Sie konnte also den Hydroperoxidabbau nicht beschleunigen, indem sie den reduzierten Zustand der Metall-Ionen durch ihr prooxidatives Potenzial aufrechterhielt. Dies ist anders als bei der ersten Hackfleischcharge, weil der Ascorbinsäurezusatz bei dieser Charge die Säurezahl förderte.
- Die mögliche Behinderung der Lipoxigenaseaktivität durch die Zusatzstoffe (Bindung des frei verfügbaren Wassers durch Hydrokolloide: Citrat und Phosphat) konnte nicht überprüft werden, weil Octanal gebildet wurde, aber seine Zuordnung zu einem bestimmten Oxidationsweg (Autoxidation und/oder enzymatische Lipidoxidation) nicht möglich war.

Unter der Annahme, dass die Zusätze Ascorbinsäure und Citrat Antagonisten von NPS sind und dass es sich bei der Hackfleischprobe um ein echtes Mehrkomponenten-System handelt, kann die sich aufhebende Wirkung dieser Stoffe in der Hackfleischprobe erklärt werden. Folgend ergab die Auswertung der durchgeführten Versuche, dass die Hochdruckbehandlung eine tendenziell positive Wirkung auf die Haltbarkeit der Mettwurst – im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Versuchen mit Fischmuskelfleisch – ausübt. Dieser zu beobachtende Effekt wird auf die Zusatzstoffe, die Rezepturbestandteile der Mettwurst sind, zurückgeführt. Dies bestätigten die durchgeführten Versuche mit reinem Hackfleisch mit den einzelnen Komponenten nach erfolgter Hochdruckbehandlung.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Lipidperoxidation, bei der Hexanal und Octanal gebildet werden, zwischen hochdruckbehandelter Mettwurst und Hackfleisch ist, dass die zweite Reaktionsstufe, die beim normalen Fettverderb geschwindigkeitsbestimmend ist (siehe Kapitel: 2.3.2.3.3 Autoxidation), beschleunigt wird.

Bei Anwesenheit von Metallen werden bereits vorhandene Hydroperoxide unter Bildung von Radikalen zersetzt (siehe Kapitel: 2.3.2.3.3 Autoxidation: Reaktionen Nummer 9 und 10). Diese Hydroperoxide sind das Produkt der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion des Fettverderbs. Wird das Produkt entzogen oder weiter abgebaut, verlagert sich das Gleichgewicht der Reaktion zur Produktseite und die Reaktion läuft im Vergleich zum Normalfall schneller ab. Die Metall-Ionen, die möglicherweise diese Reaktion katalysieren, könnten durch die Hochdruckbehandlung, wie dies in der Literatur von Ohshima et. al (9;27-29;135;138;145;175;176;178) beschrieben ist, aus dem Hämoglobin freigesetzt werden.

Sowohl bei den Mettwürsten als auch bei den Hackfleischproben war anhand der Endprodukte Hexanal und Octanal und ihrem Verhältnis zueinander keine Zuordnung zu ihrem Entstehungsweg – Autoxidation, enzymatische Lipidoxidation – möglich.

Die Vitamin E-Konzentration wurde durch die Hochdruckbehandlung sowohl bei den Mettwürsten als auch bei den Hackfleischwürsten mit Ascorbinsäure und Citrat und dem Hackfleisch ohne Zusatz nicht beeinflusst. Aber die Zugabe von NPS und aller drei Zusätze bewirkte eine Senkung der Vitamin E-Konzentration. Es handelt sich also bei der Hochdruckbehandlung um ein schonendes Verfahren im Hinblick auf den Vitamin E-Gehalt.

Die Auswirkungen der Hochdruckbehandlung auf den Fettverderb werden erst bei der Lagerung in vollem Umfang sichtbar. Sie hat auf die beiden untersuchten Reaktionswege des Fettverderbes (Hydrolyse und Peroxidation) unterschiedlich starken Einfluss. Die Peroxida-

tion wird unabhängig vom Produkt gefördert, die Hydrolyse in der Mettwurst unterdrückt, beim Hackfleisch abhängig von Zusätzen dagegen teilweise gefördert.

## 5.2 Übergreifende Ergebnisse

Zur Charakterisierung der Lipidveränderungen direkt nach der Druckbehandlung und einer nachfolgenden Lagerung unter handelsüblichen Bedingungen wurden zuerst die Methoden eruiert. Hierbei war das Ausschlusskriterium für die Analysenmethoden der Nachweis der Unterschiede zwischen unbehandelten und hochdruckbehandelten Mettwurst- und Hackfleischproben.

Die Analysenmethoden pH-Wert, Säurezahl (SZ), Gehalt an freien Fettsäuren (FFS), Gehalt an flüchtigen Verbindungen (exemplarisch: Hexanal und Octanal), Vitamin E-Bestimmung und die versuchsbegleitende Mikrobiologie wurden ausgewählt.

Die größten Unterschiede zwischen hochdruckbehandelten und unbehandelten Mettwürsten waren mittels der pH-Wert- und SZ-Bestimmung feststellbar. Weniger geeignet waren die Bestimmungen der FFS und der Octanalkonzentration. Ungeeignet zur Feststellung der Unterschiede war die Vitamin E-Bestimmung.

Eine Bestimmung bzw. Identifizierung, ob es sich bei einer unbekannt Probe um eine hochdruckbehandelte oder unbehandelte Mettwurst handelt, war mit Hilfe der oben genannten Bestimmungsmethoden bzw. Analysenmethoden nicht möglich. Die messbaren Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Mettwürsten waren sehr gering, so dass eine Aussage zur Herstellung nur im Vergleich zwischen den Proben möglich war.

Es konnte eine Abhängigkeit zwischen der Konzentration der freien Ölsäure und der Octanalkonzentration in der Mettwurst nachgewiesen werden. Das Octanal wurde bevorzugt aus der freigesetzten Ölsäure gebildet und nicht aus den noch an Triglyceride gebundenen Ölsäuren. Die freie Ölsäure war ein Zwischenprodukt und Octanal das leichtflüchtige Endprodukt. Das Edukt ist das Triglycerid mit der Ölsäure.

Es konnte keine Aussage getroffen werden, ob in der Mettwurst bevorzugt die Autoxidation oder die enzymatische Lipidoxidation stattfindet. Es war nicht möglich eine Zuordnung bei den gebildeten Endprodukten Hexanal und Octanal oder ihrem Verhältnis zueinander zu Autoxidationsprodukten oder zu Produkten der enzymatische Lipidoxidation zu treffen.

Die Lipoxygenase, die aus den Mikroorganismen stammt, die durch die Hochdruckbehandlung abgetötet wurden, ihre Enzymaktivität aber nicht inhibiert wurde, könnte für die verstärkte Bildung von Octanal in hochdruckbehandelten Mettwürsten, welches verstärkt in diesen Proben nachgewiesen wurde, verantwortlich sein. Nach der Auswertung der Literatur (198) wäre denkbar, dass anaerobe Mikroorganismen, die gegen die Hochdruckbehandlung resistent sein könnten, zu diesem Fettabbau führen könnten.

Die Versuche zur Aktivitätsbestimmung des Lipasestandards aus dem Schweinepankreas bestätigten die These, dass die Hochdruckbehandlung die Lipaseaktivität in einem bestimmten Rahmen stabilisiert. Die unbehandelte Lipase wurde bei 60 °C inaktiviert. Die Aktivität der hochdruckbehandelten Vergleichsproben blieb bei 600 und 700 MPa bis zu 30 °C relativ konstant, nahm danach mit steigender Temperatur bis auf  $\frac{4}{10}$  der Anfangsaktivität ab. Weiterhin wurde die Lipaseaktivität bei 60 °C und Drücken ab 300 bis 600 MPa stabilisiert. Sie wurde bei Behandlungszeiten bis 30 Minuten (600 und 700 MPa) auf  $\frac{1}{4}$  der Anfangsaktivität reduziert, aber nicht wie die Vergleichsprobe inaktiviert. Zusammenfassend sind Druck und Temperatur konträr beeinflussende Parameter der Lipase. Es handelt sich hierbei um Antagonisten.



## 6 Schlussfolgerung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die technologischen Einflüsse mit den lebensmittelchemischen Veränderungen unter Anwendung von Verfahren der klassischen Fettanalytik zu verfolgen bzw. zu charakterisieren und dadurch einen Beitrag zum Verständnis hochdruck-induzierter Fettveränderungen zu erarbeiten. Dafür wurden nach der kritischen Auswertung der einschlägigen Literatur zuerst verschiedene Hypothesen aufgestellt, welche ein besseres Verständnis dieser Prozesse erlauben. Als Untersuchungsobjekt wurde die frische Zwiebelmettwurst ausgewählt. Von Versuchen mit Modellsystemen, die lediglich aus Triglyceriden oder Fettsäuren bestehen, wurde Abstand genommen, da sie bereits in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben sind und eine Übertragung der Erkenntnisse vom Modell auf ein reales Lebensmittel wegen der komplexeren Matrix und Interaktionen von Inhaltsstoffen in den meisten Fällen nicht möglich ist. Die Hypothesen wurden mit Hilfe geeigneter Methoden zur Charakterisierung der Unterschiede zwischen hochdruckbehandelter und unbehandelter Mettwurst anhand von Vorversuchen geprüft. Die ermittelten Unterschiede und Gemeinsamkeiten wurden im Anschluss durch den Vergleich mehrerer Chargen von Mettwürsten statistisch abgesichert. Neben den Untersuchungen zur Qualitätsbeurteilung hochdruckbehandelter Mettwürste sollten insbesondere die Veränderungen von Fetten und Fettbegleitstoffen anhand von SZ, FFS, Gesamtfettsäurespektrum, Hexanal- und Octanalbildung und Vitamin E-Gehalt verfolgt werden. Der mikrobiologische Verderb und dessen Verlauf sollten begleitend betrachtet werden und gegebenenfalls zur Erklärung mikrobieller Fettveränderungen herangezogen werden. Durch das Aufstellen voneinander unabhängiger Versuchsreihen wurde der Einfluss der Hochdruckbehandlung zum einen auf die Fettoxidation und zum anderen auf chemische Veränderungen der Fettsäuren bei frisch hergestellten, umgeröteten Würsten (industrielle Standard-Rezeptur) mit nachfolgender Lagerung – unter handelsüblichen Bedingungen – ermittelt.

Es gibt zwei voneinander unabhängige Wege der chemischen Veränderungen von Lipiden: die Hydrolyse und die Lipidperoxidation (14;16;23;33;34;48;49;155). Durch die Hochdruckbehandlung wurde die Lipidperoxidation mit den Endabbauprodukten Hexanal und Octanal sowohl bei der Mettwurst als auch beim Hackfleisch gefördert. Die Induktionsphase der Peroxidation – nachgewiesen durch die Entstehung der flüchtigen Komponenten – war im Vergleich zu den unbehandelten Proben verkürzt.

Es waren weiterhin grundlegende Unterschiede bei der Induktionsphase der Peroxidation zwischen der Mettwurst und dem Hackfleisch feststellbar. Beim Hackfleisch setzte die Peroxidation sofort nach der Hochdruckbehandlung ein; bei der Mettwurst erst nach sieben bzw. acht Wochen. Die SZ und FFS des Hackfleisches lagen in der gleichen Größenordnung der Mettwurstproben in den ersten zwei bis drei Wochen. Die Mettwurst und das Hackfleisch unterschieden sich somit nicht in der Höhe der SZ und der FFS wesentlich voneinander, aber in der Länge der Induktionsphase bei der Peroxidation.

Es war jedoch eine Umkehrung in den Tendenzen nachweisbar bei der Bildung freier Fettsäuren, was durch niedrigere SZ und FFS nachweisbar war, d. h. die Hydrolyse wurde nur bei der Mettwurst und beim Hackfleisch mit Citrat durch Hochdruckbehandlung verzögert, beim Hackfleisch mit NPS wurde sie dagegen grundsätzlich gefördert, während beim Hackfleisch mit Ascorbinsäure kein eindeutiger Trend zu beobachten war (43;135;175;176-179). Für diese Unterschiede sind wahrscheinlich die Zusatzstoffe, die zur Herstellung der Mettwurst eingesetzt werden, verantwortlich.

Eine mögliche Erklärung der Unterschiede in der Lipidperoxidation mit der Bildung von Hexanal und Octanal zwischen hochdruckbehandelter Mettwurst und Hackfleisch ist, dass die zweite Reaktionsstufe, die beim normalen Fettverderb geschwindigkeitsbestimmend ist, beschleunigt wird. Bei Anwesenheit von Metallen werden bereits vorhandene Hydroperoxide unter Bildung von Radikalen zersetzt (s. Seite 23, Reaktionen Nummer 9 und 10). Diese

Hydroperoxide sind das Produkt der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion des Fettverderbs. Wird das Produkt entzogen oder weiter abgebaut, verlagert sich das Gleichgewicht der Reaktion zur Produktseite und die Reaktion läuft im Vergleich zum Normalfall schneller ab.

Die singulären Auswirkungen der Zusatzstoffe konnten bei der Mettwurst mit Hochdruckbehandlung im Bezug auf die Fettoxidation mit Hilfe des Hackfleischmodells vorgenommen werden. Das Nitritpökelsalz förderte die Freisetzung der Fettsäuren in der Hydrolyse der Glycerinester, die sich in der Erhöhung der Säurezahl wiedergibt. Dies bedeutet, dass NPS nicht den Häm-Komplex stabilisierte und durch die Freisetzung des Eisens aus dem Häm nicht verhinderte. Citrat dagegen verhinderte die Erhöhung der Säurezahl. Es ist ein Komplexbildner, der die freigesetzten Eisen-Ionen chemisch maskieren könnte. Die Ascorbinsäure senkte die Säurezahl bei der zweiten Hackfleischcharge. Dies war bei der ersten Hackfleischcharge anders, weil der Ascorbinsäurezusatz bei dieser Charge die Säurezahl förderte. Der Ascorbinsäurezusatz beeinflusste den Hydroperoxidabbau in Abhängigkeit von der begleitenden Lebensmittelmatrix und war somit uneindeutig in seiner Wirksamkeit. Dieses Verhalten der Ascorbinsäure kann aber auch durch ihr Redoxpotenzial erklärt werden. Sie kann den reduzierten Zustand der Metall-Ionen durch ihr prooxidatives Potenzial aufrechterhalten, oder die Metall-Ionen oxidieren.

Vorliegende Versuche zur möglichen Behinderung der Lipoxigenaseaktivität durch die Zusatzstoffe (Bindung des frei verfügbaren Wassers durch Hydrokolloide: Citrat und Phosphat) und zur Zuordnung von Octanal zu einem bestimmten Oxidationsweg (Autoxidation und/oder enzymatische Lipidoxidation) waren erfolgversprechend, müssten aber durch weitere Versuche bestätigt werden.

So wurde im Modellsystem gezeigt, dass die Hochdruckbehandlung unter bestimmten Bedingungen die Aktivität der Lipase im Vergleich zu einer thermischen Behandlung stabilisierte. Der Lipasestandard aus dem Schweinepankreas wurde durch die Hochdruckbehandlung nicht inaktiviert. Im Vergleich dazu wurde die unbehandelte Lipase durch die gleiche thermische Behandlung ohne HPP inaktiviert. Zusammenfassend waren Druck und Temperatur antagonistisch wirkende Parameter. Die Hochdruckbehandlung stabilisierte allgemein die Lipaseaktivität. Eine weitergehende Prüfung sollte Versuche mit der direkt aus den Mettwürsten extrahierten Lipase beinhalten. Zur Fokussierung sollten Versuche zur Inaktivierung der Lipoxigenase durch Hochdruckbehandlung durchgeführt werden. Eine Zuordnung anhand der prozentualen Verteilung der Endprodukte (Octanal und Hexanal), ob diese durch die Autoxidation oder Lipoxigenaseaktivität entstanden sind, würden weitere Versuche verdeutlichen. Bei einem eindeutigen Verhältnis von Hexanal zu Octanal (beispielweise 5:95 oder 75:25, siehe S. 34, Tabelle 6,) ist eine Aussage möglich. Hierbei werden Hexanal und Octanal durch die Lipoxigenaseaktivität gebildet. Bei einem Verhältnis von annähernd 50:50 könnten hingegen sowohl die Lipoxigenaseaktivität als auch Autoxidation für die Bildung von Hexanal und Octanal verantwortlich sein.

Weiterhin konnte eine Abhängigkeit zwischen der Konzentration der freien Ölsäure und der Octanalkonzentration in der Mettwurst nachgewiesen werden. Hieraus ist abzuleiten, dass Octanal bevorzugt aus der freigesetzten Ölsäure gebildet wurde und nicht aus der noch an Triglyceride gebundenen Ölsäure. Das Edukt war das Triglycerid mit der Ölsäure. Die freie Ölsäure war somit ein Zwischenprodukt und Octanal das leichtflüchtige Endprodukt der Reaktion.

Durch die Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der Hochdruckbehandlung auf die Veränderung von Fetten in starkem Maß von der Zusammensetzung der behandelten Produkte (Zusammensetzung des Fleisches: fettiges Fleisch oder mageres Fleisch mit Zusatz von Fett) und von ihren Zusätzen (NPS, Citrat, Ascorbinsäure, Gewürze, usw.) abhängig war.

Es ist darauf hinzuweisen, dass der Status des Lebensmittels unmittelbar vor der Behandlung einen Einfluss auf den Verlauf der Veränderungen während der Lagerungsperiode hat. Dies bedeutet, dass es nicht möglich ist, qualitativ geminderte Produkte durch Hochdruckbehandlung zu verbessern und gegebenenfalls so die Verbraucher zu täuschen.

Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch, dass aus dem Status des Lebensmittels nach einer erfolgten Druckbehandlung keine Aussage auf die Veränderungen während der Lagerung getroffen werden kann. Deshalb ist im Sinne des Verbraucherschutzes immer zu fordern, dass die Hersteller die lagerungsbedingten Veränderungen durch geeignete Versuchsreihen nachweisen müssen.

Die ermittelten Ergebnisse bestätigen vorhergehende Untersuchungen, die in der Literatur beschrieben sind, die allerdings mit Fischgewebe und Fischöl (107;135) erfolgten.

Als Gesamtergebnis ist festzuhalten, dass die Auswirkungen der Hochdruckbehandlung auf den Fettverderb erst bei der Lagerung in vollem Umfang sichtbar wurden. Sie hat auf die beiden untersuchten Reaktionswege des Fettverderbes (Hydrolyse und Peroxidation) unterschiedlich starken Einfluss. Die Peroxidation wird unabhängig vom Produkt gefördert, die Hydrolyse in der Mettwurst unterdrückt, beim Hackfleisch dagegen gefördert. Beim Hackfleisch hatte das Tiefgefrieren der Proben ebenfalls einen großen Einfluss auf die Peroxidation. Die Vorteilhaftigkeit der Hochdruckbehandlung ist unter diesen Bedingungen bei jedem Lebensmittel einzeln zu hinterfragen.

Die Studie zeigt aber auch, dass mit den zur Verfügung stehenden klassischen Methoden der Analytik selbst in Verbindung mit der multivariaten Auswertung der eindeutige Nachweis einer Hochdruckbehandlung bei auf dem Markt erhältlichen Produkten nur eingeschränkt möglich ist. So waren die Unterschiede zwischen den Mettwurstchargen teilweise größer als die zwischen den behandelten und unbehandelten Mettwürsten.

Die Hochdruckbehandlung führte zu einer Haltbarkeitsverlängerung. Ein Vorteil des Verfahrens war, dass es zur Keimreduzierung nach der Herstellung eingesetzt werden könnte.



## 7 Ausblick

Aus den bisher durchgeführten Untersuchungen bedürfen die folgenden kritischen Punkte einer genaueren Betrachtung:

- die Wirkung der üblichen Zusatzstoffe (Nitritpökelsalz, Citrate, Ascorbinsäure, Hydrokolloide) der Mettwurst auf die Lipidveränderungen,
- die Pro- und antioxidative Wirkung der Ascorbinsäure,
- die Optimierung der Lipase und Lipoxygenase der Mettwürste und ihre Aktivitätsbestimmung vor und nach der Hochdruckbehandlung.

Die Lipoxygenase könnte aus Mikroorganismen stammen, die zwar durch die Hochdruckbehandlung selbst abgetötet, aber deren Enzyme nicht inhiert wurden. Weiterhin könnten anaerobe Mikroorganismen, die gegen die Hochdruckbehandlung resistenter sind, die aber nicht untersucht wurden (siehe Kapitel 4.7.1.3 Mikrobiologie der Mettwurst), noch aktiv sein und zu einem Fettabbau führen (6;22;46;198). Es sollte daher eine Analyse der Mikroorganismenflora im Hinblick auf die Sensitivität gegenüber Hochdruck von anaeroben Mikroorganismen, die die beiden an dem Fettverderb beteiligten Enzyme Lipase und Lipoxygenase haben, erfolgen.

Auch wäre es von großem Interesse zu bestimmen, ob es sich um die Autoxidation oder enzymatische Lipoxidation handelt, weil dann entsprechende Schritte zur antioxidativen Wirkung eingeleitet werden können.

Die möglichen Erklärungsansätze der teilweise beschleunigten Lipidperoxidation beim reinen Hackfleisch gegenüber der Mettwurst finden sich in der Wirkung folgender Rezepturbestandteile in der Mettwurst:

- das Nitritpökelsalz in Verbindung mit Citrat und Ascorbinsäure stabilisiert den Häm-Komplex und verhindert die Freisetzung des Eisens aus dem Häm,
- Citrat ist ein Komplexbildner, der freigesetzte Eisen-Ionen chemisch maskieren kann,
- die Ascorbinsäure kann den Hydroperoxidabbau beschleunigen, indem sie den reduzierten Zustand der Metall-Ionen durch ihr prooxidatives Potenzial aufrechterhält,
- mögliche Inaktivierung der Lipoxygenase durch die Zusatzstoffe (Bindung des frei verfügbaren Wassers durch Hydrokolloide),
- die Wirkung üblicher Zusatzstoffe (Nitritpökelsalz, Citrate, Ascorbinsäure, Hydrokolloide) der Mettwurst auf die Lipidveränderungen bei Hochdruckbehandlung,
- Vergleich der Lipase- und Lipoxygenaseaktivität,
- potenzielle Freisetzung der fettverändernden Enzyme durch Hochdruckbehandlung,
- direkte Wirkung von Ascorbinsäure, Citrat und NPS auf diese fettverändernden Enzyme,
- Freisetzung von Metall-Ionen durch Hochdruckbehandlung bedingte Hämolyse,
- Klärung des Verlaufes der Fettoxidation: Hydrolyse und Peroxidation.

Die oben genannten kritischen Punkte bedürfen einer genaueren Betrachtung. Diese Hypothesen sollten durch geeignete Versuchsreihen überprüft werden.

Weiterhin sollte eingehender geprüft werden, ob durch alternative Analyseverfahren beruhend auf instrumentellen/spektroskopischen Verfahren wie IRMS, FTIR, NIR oder NMR und ESR eine eindeutigere Erfassung der Hochdruckbehandlung möglich wäre: Diese Techniken werden erfolgreich bereits im Authentizitäts- und Herkunftsnachweis routinemäßig angewendet.



## 8 Anhang

### 8.1 Literatur

- 1 [www.lm-mibi.uni-bonn.de/DGHM.html](http://www.lm-mibi.uni-bonn.de/DGHM.html). Stand: 26.03.2007
- 2 Fleischerzeugnisse (Entwurf der Arbeitsgruppe „Mikrobiologische Richt- und Warnwerte“ der Fachgruppe „Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene“ der DGHM und der Arbeitsgruppe „Lebensmittelmikrobiologie“ der SVUA/CVUA NRW, Stand: 16.11.04). 2004.
- 3 Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. 2005.
- 4 Adegoke,G.O.; Iwahashi,H.; Komatsu,Y. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by combination of hydrostatic pressure and monoterpenes. *Journal of Food Science* 1997, 62, 404-405.
- 5 Ahn,D.U.; Olson,D.G.; Jo,C.; Love,J.; Jin,S.K. Volatiles production and lipid oxidation in irradiated cooked sausage as related to packaging and storage. *Journal of Food Science* 1999, 64, 226-229.
- 6 Alves,M.M.; Vieira,J.A.M.; Pereira,R.M.A.; Pereira,M.A.; Mota,M. Effects of Lipids and Oleic Acid on Biomass Development in Anaerobic Fixed-Bed Reactors. Part II: Oleic Acid Toxicity and Biodegradability. *Water Res.* 35 [1], 264-270. 2001.
- 7 Ananta,E.; Knorr,D. Pressure-induced thermotolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Research International* 2003, 36, 991-997.
- 8 Andrés,A.I.; Møller,J.K.S.; Adamsen,C.E.; Skibsted,L.H. High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on radical formation, lipid oxidation and colour. *Eur Food Res Technol* 204, 219, 205–210.
- 9 Angsupanich,K.; Ledward,D.A. High pressure treatment effects on cod (*Gadus morhua*) muscle. *Food Chemistry* 1998, 63, 39-50.
- 10 Ashie,I.N.A.; Simpson,B.K. Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration. *Food Research International* 1996, 29, 569-575.
- 11 Baars,B.; Schaller,H. Fehlersuche in der Gaschromatographie: Diagnose aus dem Chromatogramm, VCH Verlagsgesellschaft mbH: 1994.
- 12 Backhaus,K.; Erichson,B.; Plinke,W.; Weiber,R. *Multivariate Analysemethoden*, 9. Auflage; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York: 2000.
- 13 Balny,C.; Hayashi,R.; Heremans,K.; Masson,P. *High Pressure and Biotechnology*, Colloques INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.; Vol. 224, 565.
- 14 Baltes,W. *Lebensmittelchemie*, 4. Auflage; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg: Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1995.
- 15 Baur,C.; Grosch,W.; Wieser,H.; Jugel,H. Enzymatic oxydation of linoleic acid: formation of bitter tasting fatty acids. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1977, 166, 171-176.
- 16 Belitz,H.-D.; Grosch,W. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. Auflage; Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1992.
- 17 Beltran,E.; Pla,R.; Yuste,J.; Mor-Mur,M. Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Science* 2003.

- 18 Beltran,E.; Pla,R.; Yuste,J.; Mor-Mur,M. Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries. *Meat Science* 2004, 66, 719-725.
- 19 Bergmeyer,H.U.; Gawehn,K. *Grundlagen der enzymatischen Analyse*, 1. Auflage; Verlag Chemie GmbH: 1977.
- 20 Bienkiewicz,G.; Kolakowska,A. Effects of lipid oxidation on fish lipids – amylopectin interactions. *Eur J Lipid Sci Technol* 2003, 105, 410-418.
- 21 Blunk,H.-C. Ascorbinsäure und Iso-Ascorbinsäure. Vergleich der technologischen Eigenschaften bei der Verarbeitung in Fleisch- und Wurstwaren. 1998, 70, 1494-1496.
- 22 Boari,G.; Brunetti,A.; Passino,R.; Rozz,A. Anaerobic Digestion of Olive oil Mill Wastewaters. *Agric.Wastes* 10, 161-175. 1984.
- 23 Bockisch,M. *Nahrungsfette und -öle*, 1. Ausgabe; Eugen Ulmer GmbH & Co.: Stuttgart, 1993.
- 24 Bognar,A.; Butz,P.; Kowalski,E.; Ludwig,H.; Tauscher,B. Stability of thiamine in pressurized model solutions and pork, Vol. Part II, 352-356.
- 25 Borgström,B.; Erlanson-Albertsson,C.; Wieloch,T. Pancreatic colipase: chemistry and physiology. *Journal of Lipid Research* 1979, 20, 805-816.
- 26 Bragagnolo,N.; Danielsen,B.; Skibsted,L.H. Combined effect of salt addition and high-pressure processing on formation of free radicals in chicken thigh and breast muscle. *European Food Research and Technologie* 2006.
- 27 Cheah,P.B.; Ledward,D.A. High-pressure effects on lipid oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1995, 72, 1059-1063.
- 28 Cheah,P.B.; Ledward,D.A. High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science* 1996, 43, 123-134.
- 29 Cheah,P.B.; Ledward,D.A. Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. *Journal of Food Science* 1997, 62, 1135-1138.
- 30 Cheah,P.B.; Ledward,D.A. Inhibition of metmyoglobin formation in fresh beef by pressure treatment. *Meat Science* 1997, 45, 411-418.
- 31 Cheftel,J.-C.; Culioli,J. Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science* 1997, 46, 211-236.
- 32 Chen,X.; Jo,C.; Lee,J.I.; Ahn,D.U. Lipid oxidation, volatiles and color changes of irradiated pork patties as affected by antioxidants. *Journal of Food Science* 1999, 64, 16-19.
- 33 Christie,W.W. *Advanced in Lipid Methodology - Four*, The Oily Press: 1997.
- 34 Christie,W.W. *Lipid Analysis, Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, 3. Edition; The Oily Press, in association with Lipid Tochnology: 2003.
- 35 Christie,W.W. Tocopherols. Structure, composition and analysis. *SCRI* 2003, 1-2.
- 36 Danzer,K.; Hobert,H.; Fischbacher,C.; Jagemann,K.-U. *Chemometrik Anwendungen*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 2001.
- 37 Diehl,B.W.K. Multinuclear high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. In *Lipid analysis in oils and fats*; Hamilton, R.J., Ed.; Blackie Academic & Professional: Liverpool, 1998.
- 38 Dissing,J.; Bruun-Jensen,L.; Skibsted,L.H. Effect of high-pressure treatment on lipid oxidation in turkey thigh muscle during chill storage. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* 1997, 205, 11-13.
- 39 Dixon,M.; Webb,E.C. *Enzymes*. In *Enzymes*; Longmans, Green & Co: 1958.



- 40 Dong-Un,L.; Heinz,V.; Knorr,D. Biphasic inactivation kinetics of *Escherichia coli* in liquid whole egg by high hydrostatic pressure treatments. *Biotechnology Progress* 2001, 17, 1020-1025.
- 41 Dörnenburg,H.; Knorr,D. Evaluation of elicitor- and high-pressure-induced enzymatic browning utilizing potato (*Solanum tuberosum*) suspension cultures as a model system for plant tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45, 4173-4177.
- 42 Du,M.; Ahn,D.U.; Nam,K.C.; Sell,J.L. Volatile profiles and lipid oxidation of irradiated cooked chicken meat from laying hens fed diets containing conjugated linoleic acid. *Poultry Science* 2001, 80, 235-241.
- 43 Fellows,P.J. *Food Processing Technology Principles and Practice*, 2 ed.; Woodhead Publishing Limited: Cambige England, 2005.
- 44 Fischer,U.; Grosch,W. Bildung von Aromastoffen bei der Autoxidation von Hexanal und 2(E)-Hexenal. *Z Lebensm Unters Forsch* 1988, 186, 495-499.
- 45 Fishwick,M.J.; Swoboda,P.A.T. Measurement of oxidation of polyunsaturated fatty acids by spectrometric assay of conjugated derivatives. *J Sci Food Agric* 1977, 28, 387-393.
- 46 Forsberg,C.W. Production of 1,3-propanediol from Glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 [4], 639-643. 1987.
- 47 Frankel,E.N. Hydroperoxidation of unsaturated fatty esters. *Basic Life Sci* 1988, 49, 265-282.
- 48 Frankel,E.N. *Lipid Oxidation*, The Oily Press: 1998.
- 49 Franzke,C. *Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 3. Auflage; Behr`s Verlag: Hamburg, 1996.
- 50 Galazka,V.B.; Ledward,D.A.; Dickinson,E.; Langley,K.R. High pressure effects on emulsifying behavior of whey protein concentrate. *Journal of Food Science* 1995, 60, 1341-1343.
- 51 Galazka,V.B.; Ledward,D.A.; Sumner,I.G.; Dickinson,E. Influence of high pressure on bovine serum albumin and its complex with dextran sulfate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45, 3465-3471.
- 52 Garfinkel,A.S.; Schotz,M.C. Separation of molecular species of lipoprotein lipase from adipose tissue. *Journal of Lipid Research* 1972, 13.
- 53 Gasser,U.; Grosch,W. Aromaextraktverdünnungsanalyse handelsüblicher Fleischaromen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1990, 190, 511-515.
- 54 Goodridge,C.F.; Beaudry,R.M.; Pestka,J.J.; Smith,D.M. Solid phase microextraction-gas chromatography for quantifying headspace hexanal above freeze-dried chicken myofibrils. *J Agric Food Chem* 2003, 51, 4185-4190.
- 55 Grau,R. *Fleisch und Fleischwaren*, 2. Ausgabe; Parey, P: Berlin, Hamburg, 1969.
- 56 Grosch,W. Abbau von Linolsäurehydroperoxyden zu flüchtigen Monocarbonylverbindungen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1976, 160, 371-375.
- 57 Grosch,W.; Laskawy,G. Differences in the amount and range of volatile carbonyl compounds formed by lipoxygenase isoenzymes from soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 1975, 23, 791-794.
- 58 Habulin,M.; Knez,Z. High-pressure enzymatic hydrolysis of oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2002, 104, 381-386.
- 59 Habulin,M.; Krmelj,V.; Knez,Z. Synthesis of oleic acid esters catalyzed by immobilized lipase. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 338-342.

- 60 Hachenberg,H.; Beringer,K. Die Haedspace-Gaschromatographie als Analysen- und Meßmethode, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden: 1996.
- 61 Hafsteinsson,H.; Gudmundsson,M.; Ohlsson,T. Effects of high pressure on fish and fish products. High pressure processing of food and food components: a literature survey and bibliography: performed by the Nordfood project High pressure processing 1994-1995 SIK; Goeteborg (Sweden) 1996, 47-53.
- 62 Hallermayer,R. Eine Schnellmethode zur Bestimmung des Fettgehaltes in Lebensmitteln I. Die Bestimmung in Fleischwaren. Deutsche Lebensmittelrundschau 1976, 72, 356-359.
- 63 Hamilton,R.J. Lipid analysis in oils and fats, Blackie Academic & Professional: Liverpool, 1998.
- 64 Hara,A.; Radin,N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. Analytical Biochemistry 1978, 90, 420-426.
- 65 Haslbeck,F.; Grosch,W. Untersuchungen zum lipolytischen Fettverderb III. Quantitative Analyse freier Fettsäuren. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1987, 185, 31-35.
- 66 Haslbeck,F.; Senser,F.; Grosch,W. Nachweis niedriger Lipase-Aktivitäten in Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1985, 181, 271-275.
- 67 Haslbeck,F.; Wieser,H.; Stempf,W.; Grosch,W. Untersuchungen zum lipolytischen Fettverderb II. Geruch und Geschmack von Fettsäuren in Sahne und Kokosfett. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1986, 185, 93-96.
- 68 Hauck,S.; Meyer,A.H. Hochdruckbehandlung von Fleisch und Fleischwaren – ein Novel Food-Verfahren? (High pressure processing of meat and meat products). Deutsche Lebensmittel-Rundschau 1999, 95, 59-62.
- 69 Heimann,W. Fette und Lipoide (Lipide). In Handbuch der Lebensmittelchemie; Schormüller,J., 1. Ausgabe; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
- 70 Heinz,V. High pressure processing of foods. A brief compilation of relevant processing aspects. Fleischwirtschaft 2003, 83, 106-110.
- 71 Heinz,V.; Knorr,D. Description of high pressure inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* by a distributional function, IFT 525 W. Van Buren St., Suite 1000, Chicago, IL 60607, USA; Institute of Food Technologists; 175.
- 72 Heinz,V.; Knorr,D. The effect of high pressure on microbial spores, EFFoST.
- 73 Heinz,V.; Knorr,D. Reduction of pathogen microorganisms by high pressure and pulsed electric fields: theoretical and practical considerations. Ernaehrung 2002, 26, 102-106.
- 74 Heinz,V.; Knorr,D. Effects of High Pressure on Microbial Spores. In Ultra High Pressure Treatments of Food; Hendrickx,M.E.G.; Knorr,D., Eds.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2004.
- 75 Heinz,V.; Knorr,D.; Schlüter,O. Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln. Spektrum der Wissenschaft 1998, 132-136.
- 76 Heinz,V.; Knorr,D. High pressure inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* cells by a three-state-model considering distributed resistance mechanisms. Food Biotechnology 1996, 10, 149-161.
- 77 Heiss,R. Lebensmitteltechnologie. Chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung, 6. Auflage; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 2004.

- 78 Heiss,R.; Eichner,K. Haltbarmachen von Lebensmitteln. Chemische, physikalische und mikrobiologische Grundlagen der Verfahren, 3. Auflage; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1995.
- 79 Hibbert,D.B.; Gooding,J.J. Data Analysis For Chemistry An Introductory Guide for Students and Laboratory Scientists, Oxford University Press, Inc.: Oxford, New York, 2006.
- 80 Hite,B. The effects of pressure on the preservation of milk. West Virginia Univ.Agric.Exp.Stn.Bull. 1899, 58, 15-35.
- 81 Hite,B.H.; Giddings,N.J.; Weakley,C.E. The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. West Virginia University Agricultural Experimental Station Bulletin 1914, 146, 2-67.
- 82 Hoover,D.G.; Knorr,D.; Zimmerman,F.; Bergman,C.; Mertens,B.; Deplace,G.; Lechowich,R.V. Use of hydrostatic pressure in food processing (Anwendung von Hydrostatischem Druck in der Lebensmittelverarbeitung und -konservierung). Food Technology (USA) 1993, 47, 149-156.
- 83 Hoover,D.G.; Metrick,C.; Papineau,A.M.; Farkas,D.F.; Knorr,D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. Food Technology (USA) 1989, 43, 99-107.
- 84 Hugas,M.; Garriga,M.; Monfort,J.M. New mild technologies in meat processing: High pressure as a model technology. Meat Science 2002, 62, 359-371.
- 85 Huppertz,T.; Fox,P.F.; Kelly,A.L. Dissociation of caseins in high pressure-treated bovine milk. International Dairy Journal 2004, 14, 675-680.
- 86 Janitz,W.; Pyrcz,J.; Grzeskowiak,B.; Berghofer,E. Einfluß technologischer Maßnahmen auf die Reaktionen oxidiertes Fette mit Fleischproteinen. 1. Qualitative und quantitative Veränderungen der Fett-Proteinkomplexe. Fleischwirtschaft 1990, 70, 206-208.
- 87 Janssen,J.; Laatz,W. Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows, 4. Auflage; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York: 2003.
- 88 Jensen,C.; Flensted-Jensen,M.; Skibsted,L.H.; Bertelsen,G. Warmed-over flavour in chill-stored pre-cooked pork patties in relation to dietary rapeseed oil and vitamin E supplementation. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 1998, 207, 154-159.
- 89 Jimenez-Colmenero,F.; Carballo,J.; Fernandez,P.; Barreto,G.; Solas,M.T. High-pressure-induced changes in the characteristics of low-fat and high-fat sausages. Journal of the Science of Food and Agriculture 1997, 75, 61-66.
- 90 Jung,S.; de Lamballerie-Anton,M.; Taylor,R.G.; Ghoul,M. High-pressure effects on lysosome integrity and lysosomal enzyme activity in bovine muscle. Journal of Agricultural Food Chemistry 2000, 48, 2467-2471.
- 91 Jung,S.; Ghoul,M.; de Lamballerie-Anton,M. Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 2003, 36, 625-631.
- 92 Karlowski,K.; Windyga,B.; Fonberg-Broczek,M.; Scieczynska,H.; Grochwska,A.; Gorecka,K.; Mroczek,J.; Grochalska,D.; Barabasz,A.; Arabas,J.; Szczepek,J.; Porowski,S. Effects of High Pressure Treatment on the Microbiological Quality, Texture and Color of Vacuum Packed Pork Meat Products. High Pressure Research 2002, 22, 725-732.
- 93 Kasai,M.; Okamoto,N.; Hatae,K.; Shimada,A. Role of calcium and magnesium ions in the hardening of pressure-treated root vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1997, 45, 599-603.

- 94 Kim, I.-S.; Grosch, W. Lipoxygenasen aus Birnen, Erd- und Stachelbeeren: partielle Reinigung und Eigenschaften. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1978, 167, 324-326.
- 95 Kim, Y.H.; Nam, K.C.; Ahn, D.U. Volatile profiles, lipid oxidation and sensory characteristics of irradiated meat from different animal species. *Meat Science* 2002, 61, 257-265.
- 96 Kleppmann, W. Taschenbuch Versuchsplanung, Produkte und Prozesse optimieren, 2. Auflage; Carl Hanser Verlag: München, Wien: 2001.
- 97 Knopf, K. Lebensmitteltechnologie Gewinnung und Verarbeitung der Lebensmittel in Industrie- und Großbetrieben, Ferdinand Schöningh: Paderborn, 1975.
- 98 Knorr, D. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology (USA)* 1993, 47, 156, 160-161.
- 99 Koch, H.; Fuchs, H.; Gemmer, H. Die Fabrikation feiner Fleisch- und Wurstwaren, 20. Auflage; Deutscher Fachverlag GmbH: Frankfurt am Main, 1992.
- 100 Kolakowski, P.; Reps, A.; Fetlinski, A. Microbial quality and some physico-chemical properties of high pressure-processed cow milk. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 2000, 9, 19-26.
- 101 Kowalski, E. Einfluß von hydrostatischem Hochdruck auf die Autoxidation von Linolensäure und auf Lipoxygenase-1. *Chemie, Universität Heidelberg*, 1995.
- 102 Kromidas, S. Validierung in der Analytik, Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 1999.
- 103 Küster, F.W.; Thiel, A.T. Rechentafeln für die chemische Analytik, 105. Auflage; de Gruyter: Berlin, New York, 2002.
- 104 Kwiatkowska, A.; Jankowska, B.; Cierach, M. Changes in meat hydration upon high pressure. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 2002, 11, 51-54.
- 105 Lanciotti, R.; Gardini, F.; Sinigaglia, M.; Guerzoni, M.E. Physiological responses to sublethal hydrostatic pressure in *Yarrowia lipolytica*. *Letters in Applied Microbiology* 1997, 24, 27-32.
- 106 Ledward, D.A. High pressure processing of foods, Nottingham University Press; Loughborough, Leicestershire (United Kingdom); viii + 208.
- 107 Ledward, D.A. High pressure processing of meat and fish, Technical Research Centre Finland, Information Service, PO Box 42, SF-02151 Espoo, Finland; Vol. 186, 165-175.
- 108 Lee, D.U.; Heinz, V.; Knorr, D. Effects of combination treatments of nisin and high-intensity ultrasound with high pressure on the microbial inactivation in liquid whole egg. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2003, 4, 387-393.
- 109 Lopez-Caballero, M.E.; Carballo, J.; Jimenez-Colmenero, F. Microbial inactivation in meat products by pressure/temperature processing. *Journal of Food Science* 2002, 67, 797-801.
- 110 Lowe, M.E. Colipase stabilizes the lid domain of pancreatic triglyceride lipase. *The Journal of Biological Chemistry* 1997, 272, 9-12.
- 111 Lück, E.; Jäger, M. Chemische Lebensmittelkonservierung Stoffe, Wirkungen, Methoden, 3. Auflage; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Tokyo, 1995.
- 112 Ludikhuyze, L.; de Cordt, S.; Weemaes, C.; Hendrickx, M.; Tobback, P. Kinetics for heat and pressure-temperature inactivation of *Bacillus subtilis* alpha-amylase. *Food Biotechnology* 1996, 10, 105-129.
- 113 Macfarlane, J.J.; McKenzie, I.J.; Turner, R.H. Pressure treatment of meat: effects on thermal transitions and shear values. *Meat Science* 1981, 5, 307-317.

- 114 Macrae,R. HPLC determination of vitamins. *Journal of Micronutrient Analysis* 1990, 7, 247-260.
- 115 Marie-Olive,M.N.; Athes,V.; Combes,D. Combined effects of pressure and temperature on enzyme stability. *High Pressure Research* 2000, 19, 707-712.
- 116 Maskova,E.; Holasova,M.; Gabrovska,D.; Strohalm,J. Stability of selected B-vitamins during high pressure processing of meat. *Czech Journal of Food Sciences – UZPI (Czech Republic)* 2000, 18, 171-172.
- 117 Matissek,R.; Schnepel,F.-M.; Steiner,G. *Lebensmittelanalytik, 2. Auflage*; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1992.
- 118 Matter,L. *Lebensmittel- und Umweltanalytik mit der Kapillar-GC*, VCH Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1994.
- 119 Meyer,V.R. *Fahlstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern, zweite Auflage ed.*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapor, Toronto, 1999.
- 120 Meyer,V.R. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.: Weinheim, 2004.
- 121 Moerman,F. High hydrostatic pressure inactivation of vegetative microorganisms, aerobic and anaerobic spores in pork Marengo, a low acidic particulate food product. *Meat Science* 2005, 69, 225-232.
- 122 Moerman,F.; Mertens,B.; Demey,L.; Huyghebaert,A. Reduction of *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* and *Streptococcus faecalis* in meat batters by temperature-high hydrostatic pressure pasteurization. *Meat Science* 2001, 59, 115-125.
- 123 Monin,G.; Hortos,M.; Diaz,I.; Rock,E.; Garcia-Regueiro,J.A. Lipolysis and lipid oxidation during chilled storage of meat from Large White and Pietrain pigs. *Meat Science* 2003, 64, 7-12.
- 124 Mörsel,J.-T. Fortschrittsbericht Lipidperoxidation. 1. Mitt. Primärreaktionen. *Nahrung* 1990, 34, 1-12.
- 125 Mörsel,J.-T.; Koswig,S. Veränderungen der Lipide von strahlenbehandelten Broilern. *SozEp Hefte* 1991, 181-205.
- 126 Mörsel,J.-T.; Meusel,D. Fortschrittsbericht Lipidperoxidation. 2. Mitt. Sekundäre Reaktionen. *Nahrung* 1990, 34, 13-27.
- 127 Mörsel,J.-T.; Müller,A.; Heyer,R. Untersuchungen zur Bildung und Zersetzung von Hydroperoxiden bei Bestrahlung von Linolsäure mit ionisierenden Strahlen. *SozEp Hefte* 1991, 129-142.
- 128 Motilva,M.-J.; Toldrá,F.; Flores,J. Assay of lipase and esterase activities in fresh pork meat and dry-cured ham. *Z Lebensm Unters Forsch* 1992, 195, 446-450.
- 129 Multon,J.-L. *Analysis of Food Constituents*, Wiley-VCH: New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1997.
- 130 Näher,G. Lipase – Titrimetrische Messung. In: „Methoden der enzymatischen Analyse“. In *Methoden der enzymatischen Analyse*; 1974.
- 131 Nam,K.C.; Ahn,D.C. Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. *Meat Science* 2002, 63, 1-8.
- 132 Nienaber,U.; Shellhammer,T.H. High-pressure processing of orange juice: Combination treatments and a shelf life study. *Journal of Food Science* 2001, 66, 332-336.

- 133 Noeckler,K.; Heinz,V.; Lemkau,K.; Knorr,D. Inactivation of *Trichinella spiralis* by high pressure treatment. (Inaktivierung von *Trichinella spiralis* in Schweinefleisch durch Hochdruckbehandlung). *Fleischwirtschaft* 2001, 81, 85-88.
- 134 Oehme,M. Praktische Einführung in die GC/MS-Analytik mit Quadrupolen Grundlagen und Anwendungen, Hüthig Verlag Heidelberg: 1996.
- 135 Ohshima,T.; Ushio,H.; Koizumi,C. High-pressure processing of fish and fish products. *Trends in Food Science & Technology* 1993, 4, 370-375.
- 136 Ohshima,T.; Nakagawa,T.; Koizumi,C. Effect of high hydrostatic pressure on the enzymatic degradation of phospholipids in fish muscle during storage. In *Seafood Science and Technology Proceedings of the International Conference Seafood 2000*; Bligh,G.; 1992.
- 137 Okamoto,A.; Suzuki,A.; Ikeuchi,Y.; Saito,M. Effects of high pressure treatment on Ca<sup>2+</sup> release and Ca<sup>2+</sup> uptake of sarcoplasmic reticulum. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 1995, 59, 266-270.
- 138 Orlien,V.; Hansen,E.; Skibsted,L.H. Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast muscle during chill storage: Critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *European Journal of Food Research and Technology* 2000, 211, 99-104.
- 139 Palou,E.; Lopez-Malo,A.; Welti-Chanes,J. Innovative fruit preservation methods using high pressure, CRC PRESS INC, 2000 CORPORATE BLVD NW, BOCA RATON, FL 33431- USA; 715-725.
- 140 Pardun,H. Analyse der Nahrungsfette, 1. Auflage; Parey, P: Weihenstephan/München, 1976.
- 141 Pardun,H. Spektralphotometrische Analysen. In: "Handbuch der Lebensmittelchemie". In *Handbuch der Lebensmittelchemie*; 1976.
- 142 Patterson,M.; Ledward,D.A.; Rogers,N. High Pressure Processing. In *Food Processing Handbook*; Brennan,J.G., 1.Auflage; Wiley-VCH: Weinheim, 2006.
- 143 Pfister,M. Aktivitätstests. Lipase Assays. 2003. Berlin.
- 144 Pfister,M.; Dehne,L.I. High-pressure processing – ein Überblick über chemische Veränderungen in Lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 2001, 97, 257-268.
- 145 Pfister,M.K.-H.; Butz,P.; Heinz,V.; Dehne,L.I.; Knorr,D.; Tauscher,B. Der Einfluss der Hochdruckbehandlung auf chemische Veränderungen in Lebensmitteln, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin – Pressestelle: Berlin, 2000.
- 146 Pfister,M.K.-H.; Butz,P.; Heinz,V.; Dehne,L.I.; Knorr,D.; Tauscher,B. Influence of high pressure treatment on chemical alterations in foods. A literature Review, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin – Pressestelle: Berlin, 2001.
- 147 Pfister,M.K.-H.; Dehne,L.I. High pressure processing – Ein Überblick über chemische Veränderungen in Lebensmitteln (High pressure processing – An overview of chemical changes in food). *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 2001, 97, 257-268.
- 148 Piironen,V.I.; Song,W.O.; Beecher,G.R.; Eitenmiller,R.R. Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Foods and Tissues in *Modern Analytical Methodologies in Fat- and Water-Soluble Vitamins*, John Wiley & Sons, INC.: 2000.
- 149 Ponce,E.; Pla,R.; Capellas,M.; Guamis,B.; Mor-Mur,M. Inactivation of *Escherichia coli* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure. *Food Microbiology* 1998, 15, 265-272.

- 150 Prändl,O.; Fischer,A.; Schmidhofer,T.; Sinell,H.-J. Fleisch Technologie und Hygiene der Gewinnung und Verarbeitung, 1. Ausgabe; Eugen Ulmer GmbH & Co.: Stuttgart, Hohenheim, 1988.
- 151 Raabe,E.; Knorr,D. Kinetics of starch hydrolysis with *Bacillus amyloliquefaciens*-alpha-amylase under high hydrostatic pressure. (Kinetik der Staerkehhydrolyse mit *Bacillus amyloliquefaciens*-Alpha-Amylase unter hohem hydrostatischen Druck). *Starch - Staerke* 1996, 48, 409-414.
- 152 Ramarathnam,N.; Rubin,L.J.; Diosady,L.L. Studies on meat flavor. 1. Qualitative and quantitative differences in uncured and cured pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1991, 39, 344-350.
- 153 Ramarathnam,N.; Rubin,L.J.; Diosady,L.L. Studies on meat flavor. 2. A quantitative investigation of the volatile carbonyls and hydrocarbons in uncured and cured beef and chicken. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1991, 39, 1839-1847.
- 154 Rathmann,K.; Mörsel,J.-T.; Grunert,S. Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung von Lipoxygenasen aus Sojabohnen. *Nahrung* 1990, 34, 29-35.
- 155 Rauscher,K.; Engst,R.; Freimuth,U. Untersuchung von Lebensmitteln, 1. Auflage ed.; VEB Fachbuchverlag Leipzig: 1972.
- 156 Rauscher,K.; Engst,R.; Freimuth,U. Kap. 2. Chemische und verwandte Methoden. 2.7 Enzymatische Methoden. In *Untersuchung von Lebensmitteln*; Rauscher,K.; Engst,R.; Freimuth,U., Eds.; VEB Fachbuchverlag Leipzig: Leipzig, 1986.
- 157 Rood,D. Troubleshooting in der Kapillar-Gas-Chromatographie, Hüthig Buch Verlag GmbH, Heidelberg: 1991.
- 158 Rood,D. A Practical Guide to the Care, Maintenance, and Troubleshooting of Capillary Gas Chromatographic Systems, 3. Edition; Wiley-VCH: Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 2001.
- 159 Ruttloff,H.; Proll,J.; Leuchtenberger,A. Lebensmittel- Biotechnologie und Ernährung Probleme und Lösungsansätze, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1996.
- 160 Sachs,L. Angewandte Statistik, 7. Auflage ed.; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 1992.
- 161 Sancho,F.; Lambert,Y.; Demazeau,G.; Largeteau,A.; Bouvier,J.M.; Narbonne,J.F. Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins. *Journal of Food Engineering* 1999, 39, 247-253.
- 162 Schlegel,H.G. Allgemeine Mikrobiologie, 6. Auflage ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 1985.
- 163 Schmid,U. Lipase-Katalysierte Synthese strukturierter Triglyceride: Verfahrensoptimierung und Erzeugung selektiver Lipasemutanten durch gerichtete Evolution. *Naturwissenschaft, Universität Stuttgart*, 1999.
- 164 Schweigart,H.A. Enzyme. In: "Vitalstoff Lehre, Vitalstoff-tabellarium", Kapitel III. In *Vitalstoff Lehre, Vitalstoff-tabellarium*; Veriag Hans Zauner Jr.: München - Dachau, 1962.
- 165 Seabert ,H.; Wöhrmann,H. Zur Geschichte der Lebensmittelkonservierung, *Naturwissenschaft im Unterricht Chemie*: 1993.
- 166 Seligman,A.M.; Nachlas,M.M. Lipase. In: "Methoden der enzymatischen Analyse". In *Methoden der enzymatischen Analyse*; Bergmeyer,H.-U., Ed.; Weinheim/Bergstraße, 1962.

- 167 Seyderhelm,I.; Knorr,D. Reduction of bacillus stearothermophilus spores by combined high pressure and temperature treatments. ZFL.Internationale Zeitschrift fuer Lebensmitteltechnologie und Verfahrenstechnik 1992, 43, 17-20.
- 168 Shahidi,F. Headspace volatile aldehydes as indicators of lipid oxidation in foods. In: "Headspace analysis of foods and flavours. Theorie ans practice.". In Headspace analysis of foods and flavours. Theory and practice.; Rouseff,R.L.; Cadwallader,K.R., Eds.; Kluwer Academic/ Plenum Publishers: New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2001.
- 169 Smelt,J.P.P.M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. Trends in Food Science & Technology 1998, 9, 152-158.
- 170 Song,W.O.; Beecher,G.R.; Eitenmiller,R.R. Modern Analytical Methodologies in Fat- and Water-Soluble Vitamins, John Wiley & Sons, Inc.: New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 2000.
- 171 Souci,S.W.; Fachmann,W.; Kraut,H. Die Zusammensetzung der Lebensmittel Nährwert-Tabellen 1989/90, 4. Ausgabe; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbG Stuttgart: Stuttgart, 1989.
- 172 Stellmach,B.; Gottschick,W.; Battermann,F.; Zabel,K. Bestimmungsmethoden Enzyme für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin, Steinkopff Verlag Darmstadt: 1988.
- 173 Surrey,K. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. Plant Physiology 1964, 39, 65-70.
- 174 Tangwongchai,R.; Ledward,D.A.; Ames,J.M. Effect of high-pressure treatment on lipoxygenase activity. Journal of Agricultural Food Chemistry 2000, 48, 2896-2902.
- 175 Tauscher,B. Pasteurisierung von Lebensmitteln mit hydrostatischem Hochdruck (Pasteurization of foods by high hydrostatic pressure). AID Verbraucherdienst 1995, 40, 51-57.
- 176 Tauscher,B. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 1995, 200, 3-13.
- 177 Tauscher,B. Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln (High pressure treatment of food). RFL.Rundschau fuer Fleischhygiene und Lebensmittelueberwachung (Germany) 1996, 48, 123-125.
- 178 Tauscher,B. Pasteurisierung von Lebensmitteln mit hydrostatischem Hochdruck (Pasteurization of foods using hydrostatic high pressure). Fluessiges Obst 1996, 63, 134-137.
- 179 Tauscher,B. Chemical reactions of food components under high hydrostatic pressure, In International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology; Ludwig, H., Springer-Verlag; 1998, 363-366.
- 180 Tedjo,W.; Eshtiaghi,M.N.; Knorr,D. Impact of Supercritical Carbon Dioxide and High Pressure on Lipoxygenase and Peroxidase Activity. Journal of Food Science 2000, 65, 1284-1287.
- 181 Ternes,W. Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung, 2. Auflage; Behr's Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1994.
- 182 Teufel,P.; Böhmer,L.; Weber,C. Bundesweite Erhebung zum mikrobiologischen Status von frischen streichfähigen Mettwürsten, bgvv: 1997.



- 183 Tuboly,E.; Lebowics,V.K.; Gaal,O.; Meszaros,L.; Farkas,J. Microbiological and lipid oxidation studies on mechanically deboned turkey meat treated by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* 2003, 56, 241-244.
- 184 Ulberth,F. Static headspace gas chromatography in the analysis of oils and fats. In *Lipid analysis in oils and fats*; Hamilton,R.J., 1. Edition; ackie Academic & Professional: Liverpool, 1998.
- 185 Ulrich,F.; Grosch,W. Identification of the most intensive volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1987, 184, 277-282.
- 186 van den Broeck,I.; Ludikhuyze,L.; Weemaes,C.; van Loey,A.; Hendrickx,M. Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998, 2001-2006.
- 187 van Eldik,R.; Asano,T.; Le Noble,W.J. Activation and reaction volumes in solution. *2. Chemical Review* 1989, 89, 549-688.
- 188 Vichi,S.; Castellote,A.I.; Pizzale,L.; Conte,L.S.; Buxaderas,S.; Lopez-Tamames,E. Analysis of virgin oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A* 2003, 983, 19-33.
- 189 Weber,H. *Fleisch und Fleischerzeugnisse*, 1. Auflage; Behr`s Verlag GmbH & Co.: 1996.
- 190 Welti-Chanes,J.; Lopez-Malo,A.; Palou,E.; Bermudez,D.; Guerrero-Beltran,J.A.; Barbosa-Canovas,G.V. Fundamentals and Applications of High Pressure Processing to Foods. In *Novel Food Processing Technologies*; Barbosa-Canovas,G.V.; Tapia,M.S.; Cano,M.P., Eds.; CRC Press: Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 2005.
- 191 Wiggers,S.B.; Kröger-Ohlsen,M.V.; Skibsted,L.H. Lipid oxidation in high pressure processed chicken breast during chill storage and subsequent heat treatment: effect of working pressure, packaging atmosphere and storage time. *European Food Research and Technologie* 2004, 219, 205-210.
- 192 Wisker,E.; Bergmann,H.; Schmelzer,C.; Treutter,D.; Rimbach,G. *Grundlagen der Lebensmittellehre*, 1. Auflage; Behr`s Verlag: 2006.
- 193 Wong,J.W.; Shibamoto,T. Use of volatile aldehydes for this measurement of oxidation in foods. in: "Chemical Markers for Processed and Stored Foods". In *Chemical Markers for Processed and Stored Foods*; Lee,T.-C.; Kim,H.J., Eds.; 1996.
- 194 Wood,J.D.; Richardson,R.I.; Nute,G.R.; Fisher,A.V.; Campo,M.M.; Kasapidou,E.; Sheard,P.R.; Enser,M. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science* 2003, 66, 21-23.
- 195 Yasuhara,A.; Shibamoto,T. Analysis of aldehydes and ketones in the headspace of heated pork fat. *Journal of Food Science* 1989, 54, 1471-1472.
- 196 Zenker,M. *Keimreduktion in streichfähiger Rohwurst durch Hochdruckbehandlung*. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin, 1998.
- 197 Zenker,M.; Heinz,V.; Knorr,D. Hydrostischer Hochdruck zur Erhöhung der mikrobiellen Sicherheit streichfähiger Rohwürste (High hydrostatic pressure for improving the microbiological security of spreadable raw sausages). *LVT* 2000, 45, 89-92.
- 198 Zhengkai,L.; Wrenn,B.; Venosa,A.D. Effects of Ferric Hydroxide on Methanogenesis From Lipids and Long-Chain Fatty Acids in Anaerobic Digestion. Redorbit [Stand: 26.02.2007].



## 8.2 Tabellen und Diagramme

### 8.2.1 Vorversuche

#### pH-Wert:

**Tabelle 37: pH-Werte, 1. Mettwurstcharge**

Proben	Tag		
	1	2	5
unbehandelt	5,34	5,17	5,18
300 MPa; 4 °C	5,85	5,27	5,21
300 MPa; 20 °C	5,57	5,33	5,23
600 MPa; 4 °C	5,94	5,65	5,82
600 MPa; 20 °C	5,81	5,72	5,82

#### SZ:

**Tabelle 38: SZ, 1. Mettwurstcharge**

Wochen	Proben		
	unbehandelt	600 MPa, 20 °C, 10 min	300 MPa, 20 °C, 10 min
0	2,70	1,99	3,67
1	3,17	3,50	3,53
1,3	3,55	3,72	3,50
2	4,57	3,25	4,24
3	5,12	3,92	4,98
4,3	6,46	4,60	6,55
5	6,62	4,90	5,85
6	8,28	5,38	7,67

#### FFS:

**Tabelle 39: FFS, 1. Mettwurstcharge**

mg FS/mg Einwaage	Woche						
Proben	0	1	2	3	4	5	6
unbehandelt	0,0248	0,0197	0,0233	0,0226	0,0336	0,0220	0,0248
300 MPa, 20 °C, 10 min	0,0220	0,0191	0,0188	0,0202	0,0301	0,0228	0,0231
600 MPa, 20 °C, 10 min	0,0164	0,0186	0,0152	0,0170	0,0200	0,0196	0,0190

### 8.2.2 Hauptversuche

#### pH-Wert:

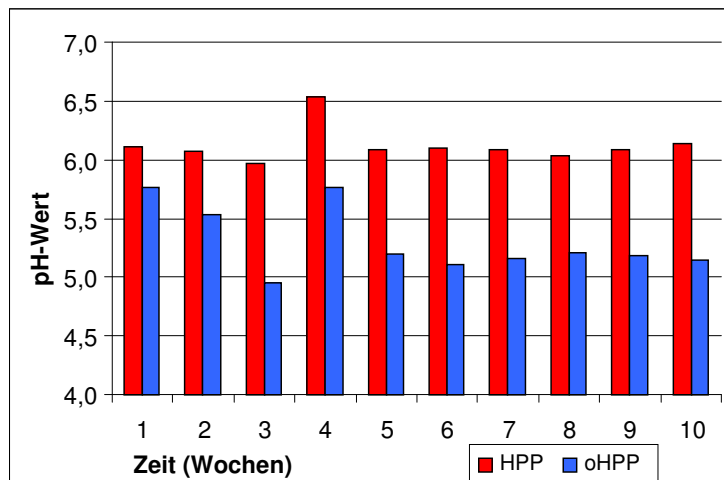
**Tabelle 40: pH-Werte, 2. Mettwurstcharge**

Proben	Woche			
	0	4	6	10
unbehandelt	5,76	5,484	5,742	5,738
600 MPa, 20 °C, 10 min	5,524	5,714	6,047	6,008

**Tabelle 41: pH-Werte, 3. Mettwurstcharge**

Proben	Woche											
	1	2	3	3	4	5	5	6	7	8	9	10
oHPP	5,77	5,54	4,95	4,98	6,54	5,76	5,19	5,11	5,16	5,21	5,19	5,15
HPP	6,12	6,08	5,96	5,96	5,75	6,54	6,08	6,10	6,08	6,04	6,09	6,14

Abbildung 78: pH-Wert, 3. Mettwurstcharge



Eine Mettwurst, Mehrfachbestimmung  $\Rightarrow$  n=5

Tabelle 42: pH-Werte, 4. Mettwurstcharge

Proben	Wochen								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
unbehandelt	5,25	5,176	5,21	5,126	4,966	5,136	5,152	5,148	5,104
600 MPa, 15 °C, 10 min	5,756	5,504	5,676	5,68	5,44	5,53	5,482	5,588	5,436

## Mikrobiologie

Tabelle 43: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung: 4. Mettwurstcharge

	GKZ	MRS	Entrobacteriaceae	Listerien	Salmonella		
	GKZ	MRS	VRBD	PALCAM	RAMBACH	XLD	BPLS
17.05.2005;HPP	1,42E+04	0	0	0	0	0	0
17.05.2005	6,31E+08	5,72E+08	9,54E+02	0	0	0	0
23.05.2005;HPP	5,70E+04	0	0	0	0	0	0
23.05.2005	6,95E+08	6,70E+08	1,40E+03	0	0	0	0
30.05.2005;HPP	7,00E+03	0	0	0	0	0	0
30.05.2005	5,04E+08	4,32E+08	2,00E+02	0	0	0	0
06.06.2005;HPP	1,55E+03	0	0	0	0	0	0
06.06.2005	5,63E+08	5,23E+08	6,50E+02	0	0	0	0
13.06.2005;HPP	6,95E+04	0	0	0	0	0	0
13.06.2005	5,50E+08	5,80E+08	5,00E+02	0	0	0	0
20.06.2005;HPP	2,70E+02	0	0	0	0	0	0
20.06.2005	6,14E+08	5,40E+08	3,00E+02	0	0	0	0

## SZ:

Tabelle 44: SZ, 2. Mettwurstcharge

Wochen	Proben	
	unbehandelt	6000 bar, 20 °C, 10 min
0	2,63	3,47
4	4,35	4,90
6	5,86	5,70
10	6,38	6,80

Abbildung 79: SZ: 2. Mettwurstcharge

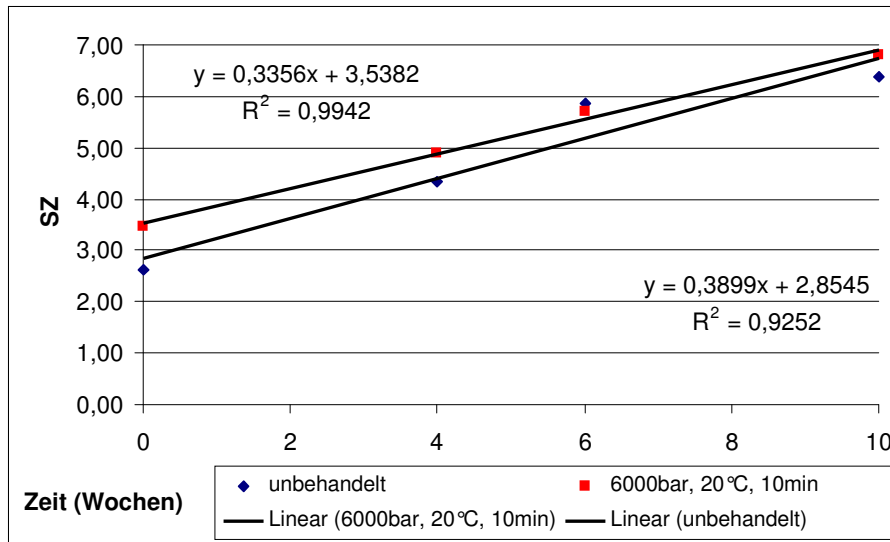


Tabelle 45: SZ, 3. Mettwurstcharge

Wochen	Proben	
	ohne HPP	600 MPa, 20 °C, 10 min
1	3,09	2,78
2	2,91	3,05
3	4,58	3,70
4	4,15	3,39
5	4,57	3,65
6	5,09	4,43
7	5,25	4,48
8	4,60	3,45
9	5,91	4,53
10	5,26	4,73

Abbildung 80: SZ: 3. Mettwurstcharge

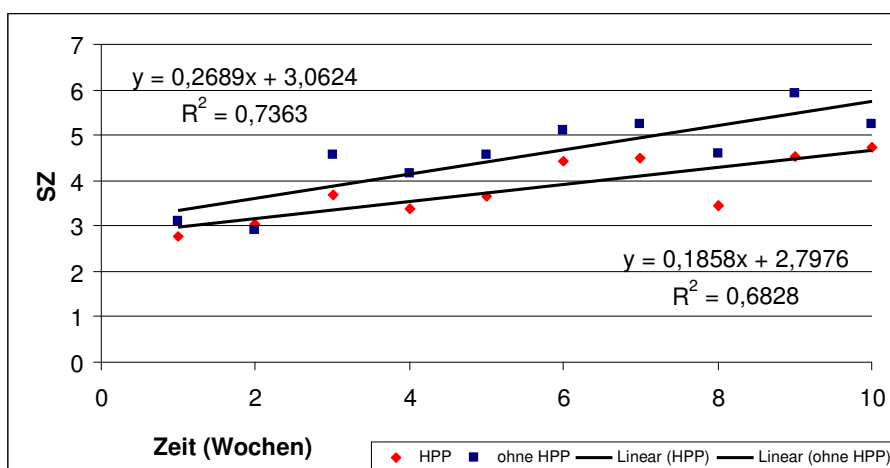


Abbildung 81: SZ: 4. Mettwurstcharge

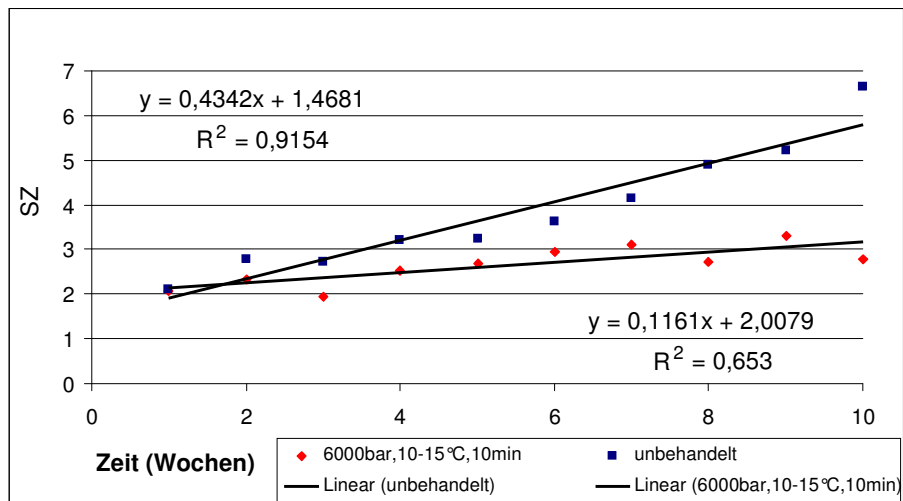
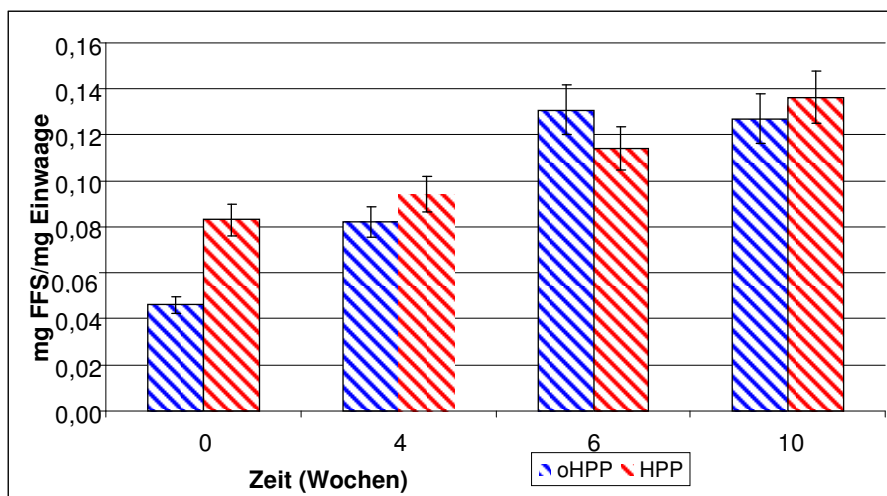


Tabelle 46: SZ, 4. Mettwurstcharge

Wochen	Proben	
	unbehandelt	600 MPa, 15 °C, 10 min
1	2,12	2,08
2	2,78	2,33
3	2,73	1,95
4	3,20	2,53
5	3,24	2,71
6	3,62	2,94
7	4,16	3,12
8	4,88	2,72
9	5,20	3,31
10	6,63	2,79

FFS:

Abbildung 82: FFS, 2. Mettwurstcharge



**Tabelle 47: FFS, 2. Mettwurstcharge**

Wochen	mg FS/mg Einwaage	
	oHPP	600 MPa, 4 °C, 10 min
0	0,0461	0,0832
4	0,0822	0,0942
6	0,1309	0,1143
10	0,1272	0,1363

**Tabelle 48: FFS, 3. Mettwurstcharge**

Wochen	mg FS/mg Einwaage	
	600 MPa, 20 °C, 10 min	ohne HPP
1	0,0309	0,0292
2	0,0268	0,0246
3	0,0312	0,0253
4	0,0313	0,0334
5	0,0345	0,0389
6	0,0361	0,0396
7	0,0281	0,0303
8	0,0244	0,0257
9	0,0270	0,0290
10	0,0298	0,0322

**Tabelle 49: FFS, 4. Mettwurstcharge**

Wochen	mg FS/mg Einwaage	
	oHPP	600 MPa, 15 °C, 10 min
0	0,0118	0,0146
1	0,0158	0,0080
2	0,0123	0,0140
3	0,0234	0,0132
4	0,0137	0,0127
5	0,0112	0,0153
6	0,0177	0,0210
7	0,0159	0,0146
8	0,0228	0,0151
9	0,0189	0,0140

**Vitamin E:****Tabelle 50: Vitamin E, 2. Charge**

Wochen	µg/100 g MW	
	HPP	oHPP
4	285,94	303,46
5	268,90	255,61
10	217,83	197,67

Tabelle 51: Vitamin E, 3. Charge

Wochen	µg/100 g MW	
	HPP	oHPP
1	84,25	93,55
2	79,54	104,69
3	89,52	134,15
4	95,47	109,77
5	53,56	90,25
6	56,73	53,77
7	63,52	48,35
8	65,54	54,00
9	68,43	75,04
10	64,05	80,08

Tabelle 52: Vitamin E, 4. Charge

Wochen	µg/100 g MW	
	HPP	oHPP
1	126,56	124,85
2	160,52	173,63
3	145,14	148,77
4	163,06	156,03
5	182,96	173,19
6	159,01	157,16
7	191,32	164,58
8	138,81	145,59
9	148,91	140,86
10	199,46	207,76

Abbildung 83: Vitamin E, 4. Mettwurstcharge



Eine Hackfleischwurst geteilt ⇒ zwei Teilproben, Doppelbestimmung ⇒ n=4



**Einfaktorielles und Einkomponenten Model: Hackfleisch mit Asc.****pH-Wert****Tabelle 53: pH-Werte, 1. Hackfleischcharge**

Proben	Tage	
	1	4
HPP	5,91	5,97
oHPP	5,75	5,54

**SZ****Tabelle 54: SZ, 1. Hackfleischcharge**

Tage	Proben	
	HPP	oHPP
1	3,39	2,92
4	3,56	3,24

**FFS****Tabelle 55: FFS, 1. Hackfleischcharge**

Tage	mg FFS/mg Fetteinwaage	
	HPP	unbehandelt
1	0,03697	0,03045
4	0,03696	0,03195

**Octanal****Tabelle 56: Octanal, 1. Hackfleischcharge**

Tage	Octanal ( $\mu$ l/2 g Probe)	
	oHPP	HPP
1	0,0640	1,5488
4	0,1976	1,1212

**Hexanal****Tabelle 57: Hexanal, 1. Hackfleischcharge**

Tage	Hexanal ( $\mu$ l/2 g Probe)	
	oHPP	HPP
1	0,0000	0,0778
4	0,0172	0,0000

**Vitamin E****Tabelle 58: Vitamin E, 1. Hackfleischcharge**

Tage	$\mu$ g/100 g HF	
	HPP mit Asc.	oHPP mit Asc.
1	239,25	166,71
4	169,26	109,21

**Mehrfaktorielles/Multikomponenten Model: Hackfleisch mit Asc., NPS und Citrat****pH-Wert****Tabelle 59: pH-Werte, 2. Hackfleischcharge**

Proben	Tag			
	1	2	3	4
Hackfleisch oHPP	5,75	5,65	5,54	5,46
Hackfleisch HPP	5,95	5,93	5,99	5,96
Hackfleisch + Asc. oHPP	5,65	5,65	5,45	5,38
Hackfleisch + Asc. HPP	5,94	5,95	5,94	5,94
Hackfleisch oHPP	5,66	5,55	5,45	5,41
Hackfleisch HPP	5,84	5,87	5,87	5,89
Hackfleisch + NPS oHPP	5,73	5,75	5,67	5,72
Hackfleisch + NPS HPP	5,94	5,92	5,93	5,94
Hackfleisch oHPP	5,74	5,72	5,48	5,32
Hackfleisch HPP	5,89	5,92	5,94	5,93
Hackfleisch + CIT oHPP	5,72	5,69	5,52	5,48
Hackfleisch + CIT HPP	5,95	5,95	5,95	5,99
Hackfleisch oHPP	6,02	5,71	5,54	5,59
Hackfleisch HPP	6,10	5,96	5,95	5,97
Hackfleisch + $\Sigma$ . oHPP	5,98	5,81	5,78	5,81
Hackfleisch + $\Sigma$ . HPP	6,11	5,98	5,99	6,01

**SZ****Tabelle 60: SZ, 2. Hackfleischcharge**

Proben	Tag			
	1	2	3	4
Hackfleisch oHPP	1,59	2,42	2,75	3,02
Hackfleisch HPP	1,55	1,72	1,87	2,13
Hackfleisch + Asc. oHPP	1,76	2,19	2,55	3,18
Hackfleisch + Asc. HPP	1,66	1,86	2,19	2,29
Hackfleisch oHPP	1,59	2,42	2,75	3,02
Hackfleisch HPP	1,55	1,72	1,87	2,13
Hackfleisch + NPS oHPP	2,11	2,27	2,77	3,12
Hackfleisch + NPS HPP	2,56	2,35	2,79	2,98
Hackfleisch HPP	1,59	2,42	2,75	3,02
Hackfleisch HPP	1,55	1,72	1,87	2,13
Hackfleisch + CIT oHPP	2,83	2,16	2,48	2,67
Hackfleisch + CIT HPP	2,81	1,64	1,74	1,88
Hackfleisch oHPP	1,59	2,42	2,75	3,02
Hackfleisch HPP	1,55	1,72	1,87	2,13
Hackfleisch + $\Sigma$ . oHPP	1,89	2,14	2,49	2,68
Hackfleisch + $\Sigma$ . HPP	1,83	2,28	2,45	3,72

**Vitamin E****Tabelle 61: Vitamin E, 2. Hackfleischcharge**

Proben	µg/100g HF	
	1. Tag	3. Tag
Hackfleisch oHPP	390,21	357,27
Hackfleisch HPP	387,01	276,43
Hackfleisch + Asc. oHPP	343,05	267,84
Hackfleisch + Asc. HPP	326,68	226,06
Hackfleisch oHPP	390,21	357,27
Hackfleisch HPP	387,01	276,43
Hackfleisch + NPS oHPP	159,02	175,80
Hackfleisch + NPS HPP	136,41	136,53
Hackfleisch oHPP	390,21	357,27
Hackfleisch HPP	387,01	276,43
Hackfleisch + CIT oHPP	367,08	280,51
Hackfleisch + CIT HPP	385,91	298,13
Hackfleisch oHPP	317,33	370,68
Hackfleisch HPP	322,79	324,95
Hackfleisch + Σ. oHPP	166,22	193,55
Hackfleisch + Σ. HPP	151,05	137,48



## Mikrobiologie

Tabelle 62: Mikrobiologische Untersuchungsergebnisse: 2. Hackfleischcharge

Datum	Gesamtkeimzahl PC-Nährmedium	Milchsäurebakterien MRS	Enterobacteriaceae VRBD	Listeria PALCAM-Nährmedium	Code	Behandlung	Zusätze
16.08.2005	6,10E+05	1,60E+05	8,20E+05	0	0	oHPP	o. Zusatz
16.08.2005	1,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	0	1	HPP	o. Zusatz
16.08.2005	4,10E+05	1,90E+05	1,30E+05	0	2	oHPP	Asc.
16.08.2005	1,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	0	3	HPP	Asc.
18.08.2005	8,30E+06	3,14E+06	6,00E+05	12 bzw. 16 KBE, jedoch in der PCR negativ	0	oHPP	o. Zusatz
18.08.2005	2,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	0	1	HPP	o. Zusatz
18.08.2005	8,00E+06	4,00E+06	2,40E+05	10 bzw. 13 KBE, jedoch in der PCR negativ	2	oHPP	Asc.
18.08.2005	2,50E+02	0,00E+00	0,00E+00	0	3	HPP	Asc.
23.08.2005	5,90E+05	9,50E+04	4,91E+04	17 bzw. 22 KBE, jedoch in der PCR negativ	0	oHPP	o. Zusatz
23.08.2005	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	1	HPP	o. Zusatz
23.08.2005	1,91E+05	4,30E+04	3,30E+04	8 bzw. 8 KBE, jedoch in der PCR negativ	2	oHPP	NPS
23.08.2005	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	3	HPP	NPS
25.08.2005	1,41E+07	2,10E+06	1,50E+05	0	0	oHPP	o. Zusatz
25.08.2005	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	1	HPP	o. Zusatz
25.08.2005	3,30E+06	8,50E+05	7,30E+05	0	2	oHPP	NPS
25.08.2005	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	3	HPP	NPS
30.08.2005	6,60E+05	1,14E+05	1,40E+05	11 bzw. 17 KBE, jedoch in der PCR negativ	0	oHPP	o. Zusatz
30.08.2005	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	1	HPP	o. Zusatz
30.08.2005	5,50E+05	7,10E+04	9,10E+05	38 bzw. 52 KBE, jedoch in der PCR negativ	2	oHPP	Citrat
30.08.2005	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	3	HPP	Citrat
01.09.2005	6,22E+06	6,00E+06	1,60E+05	12 bzw. 17 KBE, jedoch in der PCR negativ	0	oHPP	o. Zusatz
01.09.2005	4,10E+03	1,00E+02	1,50E+05	1 KBE, jedoch in der PCR negativ	1	HPP	o. Zusatz
01.09.2005	7,50E+06	3,00E+06	0,00E+00	24 bzw. 25 KBE, jedoch in der PCR negativ	2	oHPP	Citrat
01.09.2005	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	3	HPP	Citrat
06.09.2005	5,10E+05	1,41E+05	1,64E+05	18 bzw. 23 KBE, jedoch in der PCR negativ	0	oHPP	o. Zusatz
06.09.2005	1,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	1 KBE, jedoch in der PCR negativ	1	HPP	o. Zusatz
06.09.2005	3,00E+05	2,32E+04	3,50E+04	13 bzw. 17 KBE, jedoch in der PCR negativ	2	oHPP	Σ
06.09.2005	1,50E+02	0,00E+00	0,00E+00	0	3	HPP	Σ
08.09.2005	8,50E+06	4,10E+06	2,00E+05	13 bzw. 14 KBE, jedoch in der PCR negativ	0	oHPP	o. Zusatz
08.09.2005	0,00E+00	4,10E+06	0,00E+00	0	1	HPP	o. Zusatz
08.09.2005	6,90E+06	3,00E+06	3,00E+04	6 bzw. 13 KBE, jedoch in der PCR negativ	2	oHPP	Σ
08.09.2005	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3	HPP	Σ

**Tabelle 63: Nachweis von Salmonella in Rohwurst mit und ohne Hochdruckbehandlung**

Datum	Salmonella					Beschreibung	Behandlung	Zusätze
	RV RB	RV XLD	RV BPLS	TBG RB	TBG XLD			
16.8.05	0	1		0	1		o.HPP	o. Zusatz
16.8.05	0	0		0	0		HPP	o. Zusatz
16.8.05	0	1		1	1		o.HPP	Asc.
16.8.05	0	0		0	0		HPP	Asc.
18.8.05	0	0		0	0	1049 -> TBG -> Ramb. => Wachstum von Kolonien mit grüner Färbung; -> TBG -> BPLS => Wachstum von 3 verschiedenen Koloniearten: 1. blass rosafarben, 2. gelbe, 3. Gelbe mit grünlichem Zentrum; -> TBG -> XLD => gelbe/weiße Kolonien, zur Hälfte der Platte als Rasen -> Hämolyse	o.HPP	o. Zusatz
18.8.05	0	0		0	0		HPP	o. Zusatz
18.8.05	0	0		0	0	1050 -> TBG -> Ramb., BPLS, XLD => wie 1049	o.HPP	Asc.
18.8.05	0	0		0	0	1051 -> RVB -> XLD, BPLS => gelbe untypische Kolonien -> deshalb negativ; -> RVB -> Ramb. => grüne/schwarze Kolonien -> deshalb negativ; -> RVB -> XLD,NAL => negativ	HPP	Asc.
23.8.05	0	0		0	0	011 -> TBG -> XLD => gelbe Kolonien; -> TBG ->BPLS => gelbe Kolonien mit gelbem Zentrum; -> TBG -> Ramb. => schwarze Kolonien; -> RVB -> Ramb. => 1 schwarze Kolonie; -> RVB -> XLD => 1 gelbe Kolonie	o.HPP	o. Zusatz
23.8.05	0	0		0	0		HPP	o. Zusatz
23.8.05	0	0	0	21KBE	5 KBE	069 -> TBG -> XLD => viel gelbe Kolonien, 5 verdächtige Kolonien -> PCR; -> TBG -> BPLS => viele gelbe Kolonien mit grünlichem Zentrum, 11 verdächtige Kolonien -> PCR; -> TBG -> Ramb. => viele dunkelblaue Kolonien, 21 verdächtige rosafarbene Kolonien; -> RVB -> XLD => 3 gelbe Kolonien; -> RVB -> Ramb. => 3 schwarze + 1 rote Kolonie; -> RVB -> BPLS => gelbe und rosafarbene	o.HPP	NPS
23.8.05	0	0		0	0		HPP	NPS
25.8.05	0	0	0	0	0	012 -> RVB -> XLD => gelbe Kolonien; -> RVB -> BPLS => gelbe Kolonien mit grünlichem Zentrum; -> TBG -> XLD => weiße Kolonien; -> TBG -> BPLS => weiße und rosafarbene	o.HPP	o. Zusatz
25.8.05	0	0	0	0	0	037 -> kein RVB, TBG, kein Rambach vorhanden	HPP	o. Zusatz
25.8.05	0	0	0	0	0	070 -> wie 012	o.HPP	NPS
25.8.05	0	0	0	0	0	077 -> kein RVB; -> TBG -> XLD => gelbe Kolonien; -> TBG -> BPLS => gelbe Kolonien mit grünem Zentrum	HPP	NPS
30.8.05	0	0		0	0		o.HPP	o. Zusatz
30.8.05	0	0		0	0		HPP	o. Zusatz
30.8.05	0	0		0	0		o.HPP	Citrat
30.8.05	0	0		0	0		HPP	Citrat

Fortsetzung Tabelle 64: Nachweis von Salmonella in Rohwurst mit und ohne Hochdruckbehandlung

Datum	Salmonella					Beschreibung	Behandlung	Zusätze
	RV RB	RV XLD	RV BPLS	TBG RB	TBG XLD			
1.9.05	0	0		0	0	018 -> TBG -> Rambach => schwarze untypische Kolonien; -> TBG -> XLD => 2 verschiedene Kolonien a) gelb; b) rosafarben; -> TBG -> BPLS => untypische gelb/weiße Kolonien mit Hämolyse; auf RVB => auf allen Nährböden kein Wachstum	o.HPP	o. Zusatz
1.9.05	0	0		0	0		HPP	o. Zusatz
1.9.05	0	0		0	0	084 wie 018, ebenfalls auf RVB -> Ram, XLD, BPLS => kein Wachstum; wie 018, ebenfalls auf TBG wie 018	o.HPP	Citrat
1.9.05	0	0		0	0	091 wie 018	HPP	Citrat
6.9.05	0	0		0	0	024 -> TBG -> Ramb. => schwarze/dunkelblaue Kolonien; -> TBG -> XLD => gelbe/weiße Kolonien; -> TBG -> BPLS => a) wenige gelbe Kolonien -> PCR, b) viele weiße/klare Kolonien -> PCR; -> RVB -> BPLS => weiße Kolonien mit Hämolyse; -> RVB -> XLD => 3 weiße Kolonien mit Hämolyse; -> RVB -> Ramb. => 4 schwarze Kolonien mit rotem Rand	o.HPP	o. Zusatz
6.9.05	0	0		0	0		HPP	o. Zusatz
6.9.05	0	0		0	0	098 -> TBG -> XLD => klare/weiße Kolonien, darunter wenige gelbe; -> TBG -> Ramb. => 3 verschiedenfarbige Kolonien: a) schwarz -> PCR, b) dunkelrot -> PCR, c) rosafarben -> PCR; -> TBG -> BPLS => klare/weiße Kolonien, darunter wenige gelbe; -> RVB -> BPLS => 2 verschiedenfarbige Kolonien: a) gelb/weiße Kolonien mit Hämolyse -> PCR, b) 2 rosafarbene Kolonien -> PCR; -> RVB -> Ramb. => negative; -> RVB -> XLD => negative	o.HPP	Σ
6.9.05	0	0		0	0		HPP	Σ
8.9.05	0	0	0	0	0		o.HPP	o. Zusatz
8.9.05	0	0	0	0	0		HPP	o. Zusatz
8.9.05	0	0	0	0	0		o.HPP	Σ
8.9.05	0	0	0	0	0		HPP	Σ





## 9 Abkürzungsverzeichnis

Asc.	Ascorbinsäure
BPLS	Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose(-Agar)
CIT	Citrat
DSC	Differentialscanningkalorimetrie (engl. Differential Scanning Calorimetry)
EDTA	Natriumsalz von Ethylendiamintetraessigsäure (engl. Ethylenediamine-tetraacetic Acid Disodium Salt)
ESR	Elektronen Spin Resonanz
FAME	Fettsäuremethylester (engl. Fatty Acid Methyl Esters)
FFS	freie Fettsäuren
FS	Fettsäure
FTIR	Fourier transformierte Infrarotspektroskopie (engl. Fourier Transformed Infrared Spectroscopy)
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Kopplung der Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie
GKZ	Gesamtkeimzahl
HF	Hackfleisch
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPP	Hochdruckbehandlung (engl. High Pressure Processing)
oHPP	ohne Hochdruckbehandlung (ohne High Pressure Processing)
HPT	Hochdruckbehandlung (engl. High Pressure Treatment )
IRMS	Isotopenverhältnis Massenspektrometrie (engl. Isotope Ratio Mass Spectrometry)
KBE	Koloniebildende Einheit
LM	Lebensmittel
MPa	Mega Pascal (1 Pa = $1 \times 10^{-5}$ bar; 1 MPa = 10 bar)
MS	Massenspektrometrie
MW	Mettwurst
NMR	Kernspinresonanzspektrometrie (engl. Nuclear Magnetic Resonance)
NIR	nahes Infrarot
NPS	Nitritpökelsalz
p-AnV	para-Anisidin Value
POZ	Peroxidzahl
Rpm.	Umdrehungen pro Minute (engl. Rounds Per Minute)
SPE	Festphasenextraktion (engl. Solid Phase Extraction)
SPME	Festphasenmikroextraktion (engl. Solid Phase Micro Extraction)
SZ	Säurezahl
TBA	Thiobarbitursäurezahl (engl. Thiobarbituric Acid)
TBARs	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (engl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances)
TG	Triglyceride
TBME	tert-Butylmethylether
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
VRBD	Kristalviolett-Neutralrot-Galle-Glucose(-Agar)
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat(-Agar)



## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Skizze einer Hochdruckanlage	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer automatisierten Hochdruckanlage	13
Abbildung 3: Hochdruckanlage der Technischen Universität Berlin, Fachgebiet Lebensmittelbiotechnologie und -prozessentechnik, Königin-Luise-Str. 22, D-14195 Berlin	14
Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Fettoxidation (O <sub>2</sub> -Aufnahme), der Bildung von Hydroperoxiden und der Bildung flüchtiger Ranzigkeitsprodukte	19
Abbildung 5: Flüchtige Verbindungen, gebildet aus Fettsäuren durch UV (	21
Abbildung 6: Hydrolyse mittels Lipase	21
Abbildung 7: Flüchtige Verbindungen, gebildet aus Fettsäuren durch Zusatz von Fenton's Reagenz	24
Abbildung 8: Modell für die Unterbrechung der Reaktionskaskade durch Tocopherol	34
Abbildung 9: Mettwurst	57
Abbildung 10: Behandelte und unbehandelte Mettwurst der ersten Charge	60
Abbildung 11: pH-Wert: 1. Charge	61
Abbildung 12: POZ: 1. Charge	62
Abbildung 13: SZ: 1. Charge	63
Abbildung 14: Konfidenzintervalle der SZ von der Mettwurst	63
Abbildung 15: freie Fettsäuren (FFS): 1. Charge	65
Abbildung 16: Lipaseaktivität der Standards gegen Temperatur	67
Abbildung 17: Lipaseaktivität der Standards gegen Druck	67
Abbildung 18: Lipaseaktivität der Standards gegen Zeit	68
Abbildung 19: Querschnitt von behandelter und unbehandelter Mettwurst der ersten und dritten Charge	70
Abbildung 20: Vergleich der behandelten und unbehandelten Mettwurst der zweiten Charge	71
Abbildung 21: pH-Wert: 2. Charge	71
Abbildung 22: pH-Wert: 4. Charge	72
Abbildung 23: SZ: 3. Charge	74
Abbildung 24: SZ: 4. Charge	75
Abbildung 25. SZ: 4. Charge: Konfidenzintervalle	76
Abbildung 26: FFS: 3. Charge	76
Abbildung 27: FFS: 4. Charge	77
Abbildung 28: Octanalkonzentration: 2. Charge	78
Abbildung 29: Octanalkonzentration: 3. Charge	79
Abbildung 30: Octanalkonzentration: 4. Charge	79
Abbildung 31: HPP: Octanal vs. FFS: C18:1, 2. Charge	80

Abbildung 32: oHPP: Octanal vs. FFS: C18:1, 2. Charge	81
Abbildung 33: HPP: Octanal vs. FFS: C18:1, 3. Charge	81
Abbildung 34: HPP: Octanal vs. Gesamt-FS: C18:1, 3. Charge	82
Abbildung 35: oHPP: Octanal vs. Gesamt-FS: C18:1, 3. Charge	82
Abbildung 36: Vitamin E, 2. Charge	83
Abbildung 37: Vitamin E, 3. Charge	84
Abbildung 38: Dendrogram: hierarchische Clusteranalyse	87
Abbildung 39: Behandeltes und unbehandeltes Hackfleisch mit dem Zusatz Ascorbinsäure	89
Abbildung 40: Querschnitt: behandeltes und unbehandeltes Hackfleisch mit dem Zusatz Ascorbinsäure	89
Abbildung 41: pH-Wert: erste Hackfleischcharge	90
Abbildung 42: SZ: erste Hackfleischcharge	90
Abbildung 43: FFS: erste Hackfleischcharge	91
Abbildung 44: Octanalkonzentration: erste Hackfleischcharge	92
Abbildung 45: Hexanalkonzentration: erste Hackfleischcharge	93
Abbildung 46: Vitamin E: erste Hackfleischcharge	93
Abbildung 47: Hackfleisch mit Ascorbinsäure	96
Abbildung 48: Hackfleisch mit Citrat	96
Abbildung 49: Hackfleisch mit NPS	97
Abbildung 50: Hackfleisch mit Ascorbinsäure, Citrat und NPS	97
Abbildung 51: pH-Wert: Ascorbinsäure	98
Abbildung 52: pH-Wert: NPS	98
Abbildung 53: pH-Wert: Citrat	99
Abbildung 54: pH-Wert: Summe	99
Abbildung 55: SZ: ohne HPP	101
Abbildung 56: SZ: HPP	102
Abbildung 57: SZ: Hackfleisch ohne Zusatzstoffe	102
Abbildung 58: SZ: Ascorbinsäure	103
Abbildung 59: SZ: NPS	103
Abbildung 60: SZ: Citrat	104
Abbildung 61: SZ: Summe: Ascorbinsäure & NPS & Citrat	104
Abbildung 62: Hexanal: Ascorbinsäure	105
Abbildung 63: Hexanal: NPS	106
Abbildung 64: Hexanal: Citrat	107
Abbildung 65: Hexanal: Asc.& NPS & Citrat	107
Abbildung 66: Octanal: Ascorbinsäure	108
Abbildung 67: Octanal: NPS	109

---

Abbildung 68: Octanal: Citrat	109
Abbildung 69: Octanal: Asc.& NPS & Citra	109
Abbildung 70: Hexanal: BW, oHPP	111
Abbildung 71: Hexanal: BW, HPP	111
Abbildung 72: Octanal: BW, oHPP	112
Abbildung 73: Octanal: BW, HPP	112
Abbildung 74: Vitamin E: HF mit Ascorbinsäure	113
Abbildung 76: Vitamin E: Citrat	115
Abbildung 77: Vitamin E: Summe	115
Abbildung 78: pH-Wert, 3. Mettwurstcharge	140
Abbildung 79: SZ: 2. Mettwurstcharge	141
Abbildung 80: SZ: 3. Mettwurstcharge	141
Abbildung 81: SZ: 4. Mettwurstcharge	142
Abbildung 82: FFS, 2. Mettwurstcharge	142
Abbildung 83: Vitamin E, 4. Mettwurstcharge	144



## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geschichte der Lebensmittelkonservierung im Überblick	11
Tabelle 2: Effekt der Hochdruckbehandlung auf ausgewählte Mikroorganismen	17
Tabelle 3: Flüchtige Verbindungen in %, gebildet während der Linol- und Linolensäureoxidation	26
Tabelle 4: Bildung geruchsaktiver Aldehyde aus isomeren Hydroperoxiden ungesättigter Fettsäuren	27
Tabelle 5: Fettsäurezusammensetzung von Schweineschmalz und Schweinefleisch	27
Tabelle 6: Vorkommen und Eigenschaften von Lipoxygenase	28
Tabelle 7: Linolensäurekonzentration nach unterschiedlicher Behandlungsdauer	30
Tabelle 8: Standards: FAME Mix	39
Tabelle 9: Standards: Fette, Öle	39
Tabelle 10: Standards: freie Fettsäuren	40
Tabelle 11: Tocopherolstandards	40
Tabelle 12: Hochdruckbehandlungsparameter der Mettwurstchargen	42
Tabelle 13: Hochdruckbehandlungsparameter der Hackfleischchargen	42
Tabelle 14: Hochdruckbehandlungsparameter der Pankreas Lipase	42
Tabelle 15: Analysenmethoden: 1-3	43
Tabelle 16: Analysenmethoden: 4-6	43
Tabelle 17: Analysenmethoden: 7-9	43
Tabelle 18: Variante 1: Druck-, Temp.- und Zeitstufen	46
Tabelle 19: Variante 2: Druck-, Temp.- und Zeitstufen	46
Tabelle 20: Variante 3: Druck-, Temp.- und Zeitstufen	46
Tabelle 21: Variante 4: Druck-, Temp.- und Zeitstufen	47
Tabelle 22: Variante 4: 1. Mettwurstcharge	47
Tabelle 23: Reagenzienlösungen der Lipaseaktivitätsbestimmung	53
Tabelle 24: Zusammenfassung: Lebensmittel mit Mikroorganismen und Behandlungsparametern	58
Tabelle 25: Analysenmethoden	59
Tabelle 26: Fettextraktionen	60
Tabelle 27: Fettsäurezusammensetzung der ersten Mettwurstcharge	65
Tabelle 28: Lipase-Aktivität	66
Tabelle 29: Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Rohwürsten und Rohpökelfleisch	73
Tabelle 30: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Mettwurst	73
Tabelle 31: Fettsäurezusammensetzung der zweiten und vierten Mettwurstcharge	77
Tabelle 32: Zusammenfassung der Ergebnisse der Mettwurst	86
Tabelle 33: Horizontales Eiszapfendiagramm	87

Tabelle 34: Fettsäurezusammensetzung des Hackfleisches	92
Tabelle 35: Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von ungewürztem und gewürztem Hackfleisch auf Handelsebene	100
Tabelle 36: Fettsäurezusammensetzung der Mettwurst und des Hackfleisches	117
Tabelle 37: pH-Werte, 1. Mettwurstcharge	139
Tabelle 38: SZ, 1. Mettwurstcharge	139
Tabelle 39: FFS, 1. Mettwurstcharge	139
Tabelle 40: pH-Werte, 2. Mettwurstcharge	139
Tabelle 41: pH-Werte, 3. Mettwurstcharge	139
Tabelle 42: pH-Werte, 4. Mettwurstcharge	140
Tabelle 43: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung: 4. Mettwurstcharge	140
Tabelle 44: SZ, 2. Mettwurstcharge	140
Tabelle 45: SZ, 3. Mettwurstcharge	141
Tabelle 46: SZ, 4. Mettwurstcharge	142
Tabelle 47: FFS, 2. Mettwurstcharge	143
Tabelle 48: FFS, 3. Mettwurstcharge	143
Tabelle 49: FFS, 4. Mettwurstcharge	143
Tabelle 50: Vitamin E, 2. Charge	143
Tabelle 51: Vitamin E, 3. Charge	144
Tabelle 52: Vitamin E, 4. Charge	144
Tabelle 53: pH-Werte, 1. Hackfleischcharge	145
Tabelle 54: SZ, 1. Hackfleischcharge	145
Tabelle 55: FFS, 1. Hackfleischcharge	145
Tabelle 56: Octanal, 1. Hackfleischcharge	145
Tabelle 57: Hexanal, 1. Hackfleischcharge	145
Tabelle 58: Vitamin E, 1. Hackfleischcharge	145
Tabelle 59: pH-Werte, 2. Hackfleischcharge	146
Tabelle 60: SZ, 2. Hackfleischcharge	146
Tabelle 61: Vitamin E, 2. Hackfleischcharge	147
Tabelle 62: Mikrobiologische Untersuchungsergebnisse: 2. Hackfleischcharge	149
Tabelle 63: Nachweis von Salmonella in Rohwurst mit und ohne Hochdruckbehandlung	150



## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Dissertation mit Rat und Tat unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Dipl.-Ing. D. Knorr danke ich für die Themenstellung sowie für die fachliche Unterstützung im Hinblick auf die Technologie und Hilfe bei der Anfertigung der Dissertation. Herrn Prof. Dr. R. Wittkowski sei für die freundliche Übernahme der Tätigkeit als zweiter Gutachter und für die tatkräftige Unterstützung des Projektes besonders gedankt.

Herrn Priv.-Doz. Dr. J.-Th. Mörsel danke ich für die fachliche Unterstützung im Hinblick auf die Fettanalytik, die anregenden Diskussionen und Hilfe bei der Anfertigung der Dissertation. Für die umfangreichen fachlichen Diskussionen der Ergebnisse aus lebensmitteltechnologischer Sicht danke ich Herrn Dr.-Ing. Volker Heinz.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Horst Stefan Klaffke für die große Hilfsbereitschaft, kompetente fachliche Betreuung und Hilfe bei allen möglichen und undenkbaeren Problemen. Herrn Dr. Peter Boczek danke ich für das stets offene Ohr in allen fachlichen und persönlichen Fragen.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich besonders Herrn Dr. L. Dehne sowie Herrn Dipl.-Ing. Michael Pfister für die Verfügbarkeit der zur Untersuchung notwendigen Geräte und Materialien. Weiterhin haben sie durch viele grundlegende Diskussionen angeregt, mich mit der Problematik eingehender auseinanderzusetzen.

Herrn Dipl.-Ing. Stefan Boguslawski, Dr. Roman Buckow und Dr. Marco Zenker danke ich für tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Hochdruckbehandlung der Proben.

Den Mitarbeitern der Fachgruppe 42 (Kiem Mac, Michael Herrmessen, PD Dr. L. Ellerbroek) des BfR möchte ich für die Durchführung der mikrobiologischen Analysen danken.

Herrn Dr. Manol Roussev danke ich für die vielen und anregenden Diskussionen und das kritische Lesen des Manuskripts.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der fraktionellen, faktoriellen Versuchsplanung und die anschließende statistische Auswertung der Daten bedanke ich mich bei Dr. Hans Mielke.

Herrn Dipl.-Ing. Götz Röhl danke ich für die Unterstützung und anregende Diskussionen bei der Bewertung der Ergebnisse zur Mikrobiologie und dem Verständnis für das Anfertigen der Arbeit.

Bei Wladislawa Gottfried, Margarida Vargas, Rita Boje-Haderer, Renate Theobald, Dr. Bärbel Jansen und Lillian Roth möchte ich mich für die unermüdliche Unterstützung bei der Erarbeitung der notwendigen Daten und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meinem Freund Dipl.-Ing. Dirk Wiegner danke ich für die unermüdliche nicht nur seelische Unterstützung und seine Art, alle Dinge mit Humor zu tragen.

Schließlich danke ich meinem Vater für das Ermöglichen meines Studiums. Er hat mich immer bestärkt und mir jegliche Unterstützung während dieser Zeit gegeben.

Besonderer Dank gilt auch allen Freunden, die hier nicht namentlich genannt sind, mir während dieser Zeit hilfreich zur Seite standen, mich tatkräftig unterstützt und meine Launen ertragen haben. Und natürlich danke ich allen, die hier nicht namentlich aufgeführt sind, die

sich aber jederzeit freundlich und hilfsbereit gezeigt haben und so zu einer unvergesslichen und konstruktiven Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Katharina Irena Krzikalla

Berlin, den 22.09.07