



Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Lehrstuhl für Lebensmittelverpackungstechnik

## **Untersuchung der Dynamik flüchtiger organischer Verbindungen von Schutzgas-verpacktem Fleisch als Grundlage für Intelligente Verpackungen**

Corinna Franke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. R. F. Vogel

Prüfer der Dissertation 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H.-C. Langowski  
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. J.-P. Majschak

Die Dissertation wurde am 20.12.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.06.2018 angenommen.



# Danksagung

An erster Stelle gilt ein besonderer Dank meinem Doktorvater und Ordinarius des Lehrstuhls Herrn Prof. Dr. rer. nat. H.-C. Langowski, der diese Arbeit erst möglich machte und mich während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation durch zielführende Diskussionen zu wissenschaftlichen und methodischen Fragestellungen unterstützte.

Auch dem Prüfer dieser Arbeit Herrn Prof. Dr.-Ing. J.-P. Majschak sowie dem Vorsitzenden Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. R. F. Vogel gilt mein Dank für die Übernahme ihrer Ämter.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls bin ich sehr dankbar für die immer positive Atmosphäre sowie die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit. Es fällt mir schwer, einzelne Personen zu nennen, jedoch möchte ich doch im besonderen Maße Frau Birgit Piechotta danken. Sie hatte für mich immer ein offenes Ohr und hat mir sehr viele Verwaltungsarbeiten und organisatorische Aufgaben während meiner Zeit am Lehrstuhl bis zur Prüfung abgenommen.

Besonders möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meinen Projektpartnern bedanken, mit denen ich im Rahmen des IGF-Forschungsprojektes 17803N zusammenarbeiten durfte. Vor allem das teamorientierte Arbeiten und der Zusammenhalt haben zum Gelingen der Arbeit maßgeblich beigetragen.

Ein weiterer Dank gilt den Studenten, mit denen ich während meiner Zeit am Lehrstuhl zusammenarbeiten durfte und die mich bei meinem Forschungsprojekt unterstützt haben.

Ein ganz großer Dank gilt meiner Familie, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit immer unterstützt und mir in vielen Situationen Kraft gegeben hat, nicht den Mut zu verlieren. Meinen beiden Großmüttern danke ich für den starken emotionalen Halt. Ein außerordentlicher Dank geht an meinen Ehemann Sven, der mich durch seine ehrliche und offene Kritik bei der Arbeit unterstützt und mich unermüdlich gestärkt und motiviert hat. Besonders möchte ich mich aber auch bei meinen beiden Eltern Gitta und Klaus bedanken. Sie haben mir erst diese Ausbildung ermöglicht und mit ihrer Unterstützung und Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Symbolverzeichnis</b>	<b>xi</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>xvii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xx</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2 Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1 Verderb von Fleisch durch Mikroorganismen . . . . .	5
2.1.1 Fleisch verderbende Mikroorganismen unter Schutzgasatmosphäre . . .	5
2.1.1.1 <i>B. thermosphacta</i> . . . . .	6
2.1.1.2 Milchsäurebakterien . . . . .	7
2.1.1.3 Pseudomonaden . . . . .	9
2.1.2 pathogene Mikroorganismen . . . . .	11
2.1.3 Einfluss der Temperatur auf den Fleischverderb . . . . .	12
2.1.4 Mikrobiologische Kriterien für Frischfleisch . . . . .	12
2.2 Stoffwechselaktivitäten von Fleisch verderbenden Mikroorganismen . . . . .	13
2.2.1 <i>B. thermosphacta</i> . . . . .	13
2.2.2 Milchsäurebakterien . . . . .	15
2.2.2.1 <i>L. piscium</i> . . . . .	16
2.2.2.2 <i>Leuconostoc</i> . . . . .	17
2.2.2.3 Carnobakterien . . . . .	17
2.2.3 Pseudomonaden . . . . .	18
2.2.4 Zusammenfassung der grundsätzlich möglichen flüchtigen Verbindungen, die von Fleisch verderbenden Mikroorganismen gebildet werden . . . . .	20
2.3 Verderb von Fleisch durch Oxidation . . . . .	22
2.4 Bildung von flüchtigen organischen Verbindungen während der Lagerung von frischem, Schutzgas-verpacktem Fleisch . . . . .	23
2.4.1 Alkohole . . . . .	24
2.4.2 Aldehyde/Ketone . . . . .	24
2.4.3 Säuren/Ester . . . . .	25

2.4.4	Amine . . . . .	25
2.4.5	Sulfide/Thiole . . . . .	27
2.4.6	Alkane/Alkene . . . . .	27
2.5	Sensorische Veränderungen beim Fleischverderb . . . . .	30
2.6	In der Literatur beschriebene "Frischeindikatoren" . . . . .	33
2.6.1	Indikatoren für die Detektion von Sulfiden/Thiolen . . . . .	34
2.6.2	Indikatoren für die Detektion von Aminen/Stickstoffverbindungen . . . . .	34
2.6.3	Indikatoren für die Detektion von CO <sub>2</sub> . . . . .	35
2.6.4	Indikatoren für die Detektion mehrerer Analyte . . . . .	35
2.6.5	Leistung und Schwächen derzeitiger Frischeindikatoren . . . . .	36
2.7	Protonenauschreaktions-Massenspektrometrie . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>41</b>
3.1	Probenvorbereitung und Messroutinen . . . . .	41
3.1.1	Beimpfung der Proben mit Einzelstämmen . . . . .	41
3.1.2	Referenzmessungen . . . . .	42
3.1.3	Spontaner Verderb . . . . .	42
3.1.4	Identifikation der detektierten VOCs . . . . .	42
3.2	Untersuchung der flüchtigen Verbindungen . . . . .	43
3.2.1	Protonenauschreaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS) . . . . .	43
3.2.1.1	Analytischer Messaufbau . . . . .	43
3.2.1.2	Messverfahren . . . . .	45
3.2.2	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) . . . . .	47
3.3	Mikrobiologische Analysen . . . . .	47
3.4	Sensorische Untersuchungen . . . . .	48
3.4.1	Hähnchen . . . . .	48
3.4.2	Rindfleisch . . . . .	49
3.5	Datenauswertung . . . . .	51
3.5.1	PTR-MS . . . . .	51
3.5.2	Eignung des PTR-MS-Messaufbaus zur Detektion von flüchtigen Verbindungen beim Fleischverderb . . . . .	56
3.5.3	GC-MS . . . . .	58
3.5.4	sensorische Untersuchung . . . . .	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1	Eignung des PTR-MS-Messaufbaus zum Nachweis von flüchtigen organischen Verbindungen bei Schutzgas-verpacktem Fleisch . . . . .	63
4.2	Diskussion . . . . .	67
4.3	Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch . . . . .	70
4.3.1	Hähnchenfleisch beimpft mit <i>Brochothrix thermosphacta</i> . . . . .	70

4.3.2	Hähnchenfleisch beimpft mit <i>Carnobacterium sp.</i> . . . . .	74
4.3.3	Hähnchenfleisch beimpft mit <i>Pseudomonas sp.</i> . . . . .	78
4.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung des flüchtigen Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch . . . . .	82
4.3.5	Diskussion . . . . .	84
4.4	Spontanverderb bei Hähnchenfleisch . . . . .	86
4.4.1	Spontanverderb bei 4 °C . . . . .	86
4.4.2	Spontanverderb bei 10 °C . . . . .	90
4.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Spontanverderb von Hähnchenfleisch . . . . .	94
4.4.4	Diskussion . . . . .	95
4.5	Sensorische Untersuchung bei Hähnchenfleisch . . . . .	97
4.5.1	Ergebnisse . . . . .	97
4.5.2	Diskussion . . . . .	102
4.6	Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Rindfleisch . . . . .	103
4.6.1	Rindfleisch beimpft mit <i>L. piscium</i> 9.3 . . . . .	103
4.6.2	Rindfleisch beimpft mit <i>L. piscium</i> 14 . . . . .	106
4.6.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung des flüchtigen Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Rindfleisch . . . . .	110
4.6.4	Diskussion . . . . .	111
4.7	Spontanverderb von Rindfleisch . . . . .	112
4.7.1	Spontanverderb bei 4 °C . . . . .	112
4.7.2	Spontanverderb bei 10 °C . . . . .	116
4.7.3	Spontanverderb bei 10 °C (späte Phase) . . . . .	122
4.7.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Spontanverderb von Rindfleisch . . . . .	128
4.7.5	Diskussion . . . . .	131
4.8	Sensorische Untersuchung bei Rindfleisch . . . . .	133
4.8.1	Sensorische Untersuchung bei 4°C . . . . .	133
4.8.2	Sensorische Untersuchung bei 10 °C . . . . .	138
4.8.3	Diskussion . . . . .	143
4.9	Schlussfolgerungen für die Verwendung von VOCs als mögliche Verderbsmarker und die Anwendung von "Frischeindikatoren" in Schutzgasverpackungen . . . . .	145
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>147</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>149</b>
<b>6</b>	<b>Veröffentlichungen</b> . . . . .	<b>169</b>
6.1	Für die Dissertation relevante Veröffentlichungen . . . . .	169
6.2	Sonstige Veröffentlichungen während der Zeitdauer der Dissertation . . . . .	170

<b>A Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch</b>	<b>171</b>
A.1 <i>B. thermosphacta</i> . . . . .	171
A.2 <i>C. divergens</i> . . . . .	177
A.3 <i>Ps. fragi</i> . . . . .	182
<b>B Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Hähnchenfleisch</b>	<b>187</b>
B.1 Spontanverderb bei 4 °C . . . . .	187
B.2 Spontanverderb bei 10 °C . . . . .	193
<b>C Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Rindfleisch</b>	<b>199</b>
C.1 <i>L. piscium</i> 9.3 . . . . .	199
C.2 <i>L. piscium</i> 14 . . . . .	203
<b>D Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Rindfleisch</b>	<b>209</b>
D.1 Spontanverderb bei 4 °C . . . . .	209
D.2 Spontanverderb bei 10 °C . . . . .	215
D.3 Spontanverderb bei 10 °C (späte Phase) . . . . .	223

# Abkürzungsverzeichnis

a	aerob verpackt
ATP	Adenosintriphosphat
b	unter Schutzgas verpackt
B. thermosphacta	Brochothrix thermosphacta
BAI	Biogene-Amin-Index (Summe von 1,4-Butandiamin (Putrescin), 1,5-Pentandiamin (Cadaverin) und 4-(2-Aminoethyl)-phenol (Tyramin))
C. divergens	Carnobacterium divergens
C. maltaromaticum	Carnobacterium maltaromaticum
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cps	Zählraten pro Sekunde
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V.
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
E. coli	Escherichia coli
F	im Fleisch detektiert
FFI	Frischeindikator
Fkt.	Funktion
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
H	Hähnchenfleisch
HS-SPME	Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (headspace-solid phase microextraction)

## Abkürzungsverzeichnis

---

h	Stunde
K	im Kopfraum der Probe detektiert
KBE	Koloniebildende Einheiten
L	Beleuchtung
l	Liter
l	Länge
L. alimentarius	Lactobacillus alimentarius
L. lactis	Lactococcus lactis
L. monocytogenes	Listeria monocytogenes
L. piscium	Lactococcus piscium
L. plantarum	Lactobacillus plantarum
L. sakei	Lactobacillus sakei
Lc. gelidum ssp. gasicomitatum	Leuconostoc gelidum ssp. gasicomitatum
Lc. gelidum ssp. gelidum	Leuconostoc gelidum ssp. gelidum
Lc. mesenteroides	Leuconostoc mesenteroides
LDh	Lactat-Dehydrogenase
MDA	Malondialdehyd
min	Minute
ml	Mililiter
ms	Milisekunde
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PA	Protonenaffinität
PDh	Pyruvat-Dehydrogenase
PFA	Perfluoralkoxy
ppb <sub>v</sub>	Volumenanteile pro Milliarde

ppm	Teile pro Million
ppm <sub>v</sub>	Volumenanteile pro Million
ppt <sub>v</sub>	Volumenanteile pro Trillion
Ps. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
Ps. fluorescens	Pseudomonas fluorescens
Ps. fragi	Pseudomonas fragi
Ps. ludensis	Pseudomonas ludensis
Ps. putida	Pseudomonas putida
PTR-MS	Protonenaustauschreaktions-Massenspektrometrie
R	Rindfleisch
s	Sekunde
STR	Sauerstofftransmissionsrate der Verpackung
T	Temperatur
t	Zeit
TBARS	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen
TMA-N	Trimethylamin-Stickstoff
TVB-N	gesamte basische flüchtige Stickstoffverbindungen
V	Kopfraumvolumen
KVK	Kopfraum-Volumenkonzentration
VOCs	flüchtige organische Verbindungen
Y. enterocolitica	Yersinia enterocolitica
°C	Grad Celsius



# Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung	Einheit
$\mu_0$	eingeschränkte Mobilität	-
$21^+_{\text{cps}}$	Anzahl an $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen des schweren Wasserisotops in cps	-
b	Stauchung/Streckung der e-Funktion in Richtung der y-Achse	-
c	Konzentration in Abhängigkeit des Radius und der Zeit	-
$c_0$	Oberflächenkonzentration	-
$c_1$	Anfangskonzentration	-
$c_a$	Konzentration im Fleisch	$\frac{\text{mg}}{\text{m}^3}$
$c_g$	Konzentration in der Gasphase	$\frac{\text{mg}}{\text{m}^3}$
d	Steigung der Geraden	-
D	Diffusionskonstante	-
E	elektrische Feldstärke	$\frac{\text{V}}{\text{m}}$
f	Stauchung/Streckung der Polynomfunktion in Richtung der y-Achse	-
k	Reaktionskonstante	$\times 10^{-9} \frac{\text{cm}^3}{\text{s}}$
$L_d$	Länge des Driftraums	9,6 cm
M	Molmasse	$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$
$\text{MH}^+$	protonierte Molekülmasse	-
n	Anzahl der Panelisten	-

Symbol	Bedeutung	Einheit
N	Teilchenanzahldichte	$\text{m}^{-3}$
$N_0$	Teilchenanzahldichte bei Standardbedingungen (1 atm und 273,15 K)	$\text{m}^{-3}$
$N_A$	Avogadro-Konstante	$6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
$N_d$	Teilchenanzahldichte im Driftraum	$\text{m}^{-3}$
$p_d$	Druck im Driftraum	2,2 mbar
$p_{\text{Referenz}}$	Referenzdruck	980 mbar
R	Universelle Gaskonstante	$83,144621 \frac{\text{mbar}\cdot\text{l}}{\text{mol}\cdot\text{K}}$
s	Anzahl der Panelisten, bei denen $Y \leq j$ zutrifft	-
$T_d$	Temperatur im Driftraum	333,15 K
$t_r$	Reaktionszeit	0,0001 s
$T_{\text{Referenz}}$	Referenztemperatur	277,15 K
$Tr_{21^+}$	Transmissionsrate des schweren Wasserisotops	0,772
$Tr_{MH^+}$	Transmissionsraten der protonierten Moleküle	-
u	Maximum des Zuwachses	-
w	Zeitkonstante	-
y	zeitliche Verschiebung (Wendepunkt des Zuwachses)	-
z	Grundlinie (Achsenabschnitt)	-

# Abbildungsverzeichnis

2.1	2,3-Butandion-Stoffwechsel von <i>B. thermosphacta</i> . . . . .	15
2.2	Phosphoketolase-Weg von Milchsäurebakterien . . . . .	18
2.3	Bildung biogener Amine . . . . .	19
2.4	Schematischer Aufbau des PTR-MS . . . . .	39
3.1	Vereinfachte Darstellung des entwickelten Messaufbaus . . . . .	45
3.2	Fotografie des entwickelten Messaufbaus . . . . .	46
3.3	Konzentrationsverteilungen zu verschiedenen Zeiten für die Diffusion in eine Ebene	58
3.4	Grafische Darstellung der sequentiellen logistischen Regression für das Attribut <i>visueller Frischeeindruck</i> bei Hähnchenfleisch . . . . .	61
4.1	Konzentrationsverteilungen zu verschiedenen Zeiten für die Diffusion in eine Ebene	67
4.2	Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der mit <i>B. thermosphacta</i> beimpften Proben . . . . .	71
4.3	Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethanol ( <i>m/z</i> 47) der mit <i>B. thermosphacta</i> beimpften Proben . . . . .	72
4.4	Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( <i>m/z</i> 59) der mit <i>B. thermosphacta</i> beimpften Proben . . . . .	72
4.5	Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( <i>m/z</i> 63) der mit <i>B. thermosphacta</i> beimpften Proben . . . . .	73
4.6	Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( <i>m/z</i> 87) der mit <i>B. thermosphacta</i> beimpften Proben . . . . .	73
4.7	Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( <i>m/z</i> 89) der mit <i>B. thermosphacta</i> beimpften Proben . . . . .	74
4.8	Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der mit <i>C. divergens</i> beimpften Proben	75
4.9	Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethanol ( <i>m/z</i> 47) der mit <i>C. divergens</i> beimpften Proben . . . . .	76
4.10	Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( <i>m/z</i> 59) der mit <i>C. divergens</i> beimpften Proben . . . . .	76
4.11	Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( <i>m/z</i> 63) der mit <i>C. divergens</i> beimpften Proben . . . . .	77
4.12	Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( <i>m/z</i> 87) der mit <i>C. divergens</i> beimpften Proben . . . . .	77

4.13 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( <i>m/z</i> 89) der mit <i>C. divergens</i> beimpften Proben . . . . .	78
4.14 Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der mit <i>Ps. fragi</i> beimpften Proben . . . . .	79
4.15 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Fragmenten von Alkoholen und Säuren ( <i>m/z</i> 41) der mit <i>Ps. fragi</i> beimpften Proben . . . . .	80
4.16 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Fragmenten von Alkoholen, Säuren und Estern ( <i>m/z</i> 43) der mit <i>Ps. fragi</i> beimpften Proben . . . . .	80
4.17 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( <i>m/z</i> 59) der mit <i>Ps. fragi</i> beimpften Proben . . . . .	81
4.18 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( <i>m/z</i> 63) der mit <i>Ps. fragi</i> beimpften Proben . . . . .	81
4.19 Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben bei 4 °C . . . . .	87
4.20 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethanol ( <i>m/z</i> 47) der bei 4 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben . . . . .	88
4.21 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( <i>m/z</i> 59) der bei 4 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben . . . . .	88
4.22 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( <i>m/z</i> 63) der bei 4 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben . . . . .	89
4.23 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( <i>m/z</i> 87) der bei 4 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben . . . . .	89
4.24 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( <i>m/z</i> 89) der bei 4 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben . . . . .	90
4.25 Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben bei 10 °C . . . . .	91
4.26 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( <i>m/z</i> 59) der bei 10 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben . . . . .	92
4.27 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( <i>m/z</i> 63) der bei 10 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben . . . . .	92
4.28 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( <i>m/z</i> 87) der bei 10 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben . . . . .	93
4.29 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( <i>m/z</i> 89) der bei 10 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben . . . . .	93
4.30 Mikrobiologische Ergebnisse zur sensorischen Untersuchungen bei Hähnchenfleisch . . . . .	98
4.31 Mikrobiologische Ergebnisse zur sensorischen Untersuchungen bei Hähnchenfleisch . . . . .	98
4.32 Grafische Darstellung der Attribute für Schutzgas-verpacktes Hähnchenfleisch (30 % CO <sub>2</sub> und 70 % O <sub>2</sub> ) bei 4 °C . . . . .	99

---

4.33 Ergebnisse der sequentiellen logistischen Regression der wichtigsten Attribute von Schutzgas-verpacktem Hähnchenfleisch (4 °C) . . . . .	101
4.34 Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der mit <i>L. piscium</i> 9.3 beimpften Rindfleischproben . . . . .	104
4.35 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( <i>m/z</i> 59) der mit <i>L. piscium</i> 9.3 beimpften Proben . . . . .	105
4.36 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( <i>m/z</i> 63) der mit <i>L. piscium</i> 9.3 beimpften Rindfleischproben . . . . .	105
4.37 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( <i>m/z</i> 87) der mit <i>L. piscium</i> 9.3 beimpften Rindfleischproben . . . . .	106
4.38 Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der mit <i>L. piscium</i> 14 beimpften Rindfleischproben . . . . .	107
4.39 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( <i>m/z</i> 59) der mit <i>L. piscium</i> 14 beimpften Rindfleischproben . . . . .	108
4.40 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( <i>m/z</i> 63) der mit <i>L. piscium</i> 14 beimpften Rindfleischproben . . . . .	108
4.41 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( <i>m/z</i> 87) der mit <i>L. piscium</i> 14 beimpften Rindfleischproben . . . . .	109
4.42 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( <i>m/z</i> 89) der mit <i>L. piscium</i> 14 beimpften Rindfleischproben . . . . .	109
4.43 Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der spontan verdorbenen Rindfleischproben bei 4 °C . . . . .	113
4.44 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methanol ( <i>m/z</i> 33) der bei 4 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	114
4.45 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( <i>m/z</i> 59) der bei 4 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	114
4.46 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethansäure ( <i>m/z</i> 61) der bei 4 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	115
4.47 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( <i>m/z</i> 63) der bei 4 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	115
4.48 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( <i>m/z</i> 87) der bei 4 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	116
4.49 Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der spontan verdorbenen Rindfleischproben bei 10 °C . . . . .	118
4.50 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methanol ( <i>m/z</i> 33) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	118
4.51 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethanol ( <i>m/z</i> 47) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	119

---

4.52 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( <i>m/z</i> 59) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	119
4.53 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethansäure ( <i>m/z</i> 61) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	120
4.54 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( <i>m/z</i> 63) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	120
4.55 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( <i>m/z</i> 87) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	121
4.56 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( <i>m/z</i> 89) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben . . . . .	121
4.57 Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase) . . . . .	123
4.58 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methanol ( <i>m/z</i> 33) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase) . . . . .	124
4.59 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethanol ( <i>m/z</i> 47) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase) . . . . .	124
4.60 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( <i>m/z</i> 59) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase) . . . . .	125
4.61 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethylacetat ( <i>m/z</i> 61) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase) . . . . .	125
4.62 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( <i>m/z</i> 63) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase) . . . . .	126
4.63 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Propansäure ( <i>m/z</i> 75) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase) . . . . .	126
4.64 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( <i>m/z</i> 87) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase) . . . . .	127
4.65 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( <i>m/z</i> 89) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase) . . . . .	127
4.66 Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Ethylfuran ( <i>m/z</i> 97) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase) . . . . .	128
4.67 Mikrobiologische Ergebnisse zur sensorischen Untersuchung bei Rindfleisch (4 °C), Versuchsreihe 1 . . . . .	134
4.68 Mikrobiologische Ergebnisse zur sensorischen Untersuchung bei Rindfleisch (4 °C), Versuchsreihe 2 . . . . .	134
4.69 Grafische Darstellung der Attribute für Schutzgas-verpacktes Rindfleisch (30 % CO <sub>2</sub> und 70 % O <sub>2</sub> ) bei 4 °C . . . . .	135
4.70 Ergebnisse der sequentiellen logistischen Regression der wichtigsten Attribute von Schutzgas-verpacktem Rindfleisch (4 °C) . . . . .	137

4.71 Mikrobiologische Ergebnisse zur sensorischen Untersuchung bei Rindfleisch (10 °C), Versuchsreihe 1 . . . . .	139
4.72 Mikrobiologische Ergebnisse zur sensorischen Untersuchung bei Rindfleisch (10 °C), Versuchsreihe 2 . . . . .	139
4.73 Grafische Darstellung der Attribute für Schutzgas-verpacktes Rindfleisch (30 % CO <sub>2</sub> und 70 % O <sub>2</sub> ) bei 10 °C . . . . .	140
4.74 Ergebnisse der sequentiellen logistischen Regression der wichtigsten Attribute von Schutzgas-verpacktem Rindfleisch (10 °C) . . . . .	142



# Tabellenverzeichnis

2.1	Einfluss der Schutzgasatmosphäre auf das Wachstum von typischen Fleischverderbern . . . . .	10
2.2	Temperaturbedingungen für das Wachstum von typischen Fleischverderbern . . . . .	12
2.3	Grundsätzlich mögliche flüchtige Verbindungen von Fleisch verderbenden Mikroorganismen . . . . .	20
2.4	In der Literatur beschriebene flüchtige organische Verbindungen während der Lagerung von Schutzgas-verpacktem Rind- und Hähnchenfleisch . . . . .	27
2.5	Geruchsbeschreibung flüchtiger Verbindungen von Fleisch . . . . .	31
2.6	Geruchsschwellenwerte und Geruchsbeschreibung von Amininen in Fleisch . . . . .	33
2.7	Übersicht einiger bisher entwickelter Frischeindikatoren . . . . .	36
3.1	Zusammenfassung der finalen Attribute, verwendete Referenzsubstanzen bzw. -produkte und mögliche Merkmalsausprägungen für Hähnchenfleisch . . . . .	49
3.2	Zusammenfassung der finalen Attribute, verwendete Referenzsubstanzen bzw. -produkte und mögliche Merkmalsausprägungen für Rindfleisch . . . . .	50
3.3	Fragmentierungsgrad der identifizierten VOCs . . . . .	51
3.4	Reaktionskonstanten $k$ für Protonenauschreaktionen zwischen Hydronium-Ionen und flüchtigen organischen Verbindungen . . . . .	53
3.5	Übersicht der für die nicht-lineare Regression verwendeten Funktionen . . . . .	54
3.6	Verteilungskoeffizienten $P$ zwischen Muskelgewebe und Luft . . . . .	57
4.1	Detektierte flüchtige Substanzen mit PTR-MS . . . . .	64
4.2	Aus den detektierten Kopfraum-Volumenkonzentrationen berechnete Konzentrationen im Kopfraum der Probenbehälter . . . . .	65
4.3	Berechnete Konzentrationen in den Fleischproben . . . . .	66
4.4	Berechnete Substanzmengen in den Fleischproben durch Diffusion . . . . .	66
4.5	Ergebnisse der nicht-linearen Regression der mit <i>B. thermosphacta</i> beimpften Hähnchenfleischproben bei 4 °C . . . . .	82
4.6	Ergebnisse der nicht-linearen Regression der mit <i>C. divergens</i> beimpften Hähnchenfleischproben bei 4 °C . . . . .	83
4.7	Ergebnisse der nicht-linearen Regression der mit <i>Ps. fragi</i> beimpften Hähnchenfleischproben bei 4 °C . . . . .	83

4.8	Ergebnisse der nicht-linearen Regression von spontan verdorbenem Hähnchenfleisch bei 4 °C . . . . .	94
4.9	Ergebnisse der nicht-linearen Regression von spontan verdorbenem Hähnchenfleisch bei 10 °C . . . . .	95
4.10	Ergebnisse der nicht-linearen Regression der mit <i>L. piscium</i> 9.3 beimpften Rindfleischproben bei 4 °C . . . . .	110
4.11	Ergebnisse der nicht-linearen Regression der mit <i>L. piscium</i> 14 beimpften Rindfleischproben bei 4 °C . . . . .	110
4.12	Ergebnisse der nicht-linearen Regression von spontan verdorbenem Rindfleisch bei 4 °C . . . . .	128
4.13	Ergebnisse der nicht-linearen Regression von spontan verdorbenem Rindfleisch bei 10 °C . . . . .	129
4.14	Ergebnisse der nicht-linearen Regression von spontan verdorbenem Rindfleisch bei 10 °C (späte Phase) . . . . .	130

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Fleisch ist ein leicht verderbliches Lebensmittel, dessen Haltbarkeit durch viele Faktoren beeinflusst wird. Dazu zählen die Zusammensetzung der unvermeidbar auf der Fleischoberfläche vorkommenden Mikroorganismen, die Anfangskeimzahl, die Wechselwirkungen der Mikroorganismen untereinander, Lagerbedingungen und Temperatur (Casaburi et al., 2015). Um die Haltbarkeit zu verlängern, wird daher das Fleisch oft in der Schutzgasverpackung angeboten und mit einem Haltbarkeitsdatum bei empfohlener Lagertemperatur (max. 4 Grad Celsius (°C)) versehen. Bei Schutzgas-verpacktem Fleisch können dabei zwei unterschiedliche Haltbarkeitsdaten unterschieden werden: Das Mindesthaltbarkeitsdatum und das Verbrauchsdatum. Das Mindesthaltbarkeitsdatum, welches hauptsächlich bei vormariniertem Grillfleisch eingesetzt wird, ist durch das Deutsche Institut für Normung e.V. (DIN) definiert als "das Datum, bis zu dem das Lebensmittel unter angemessenen Aufbewahrungsbedingungen seine spezifischen Eigenschaften behält" (DIN, 2003). Das Verbrauchsdatum hingegen kommt "bei in mikrobiologischer Hinsicht sehr leicht verderblichen Lebensmitteln, die nach kurzer Zeit eine unmittelbare Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen könnten" wie Hähnchenbrustfilet oder Hackfleisch zum Einsatz (BMJV, 2014).

Die Bestimmung der Haltbarkeit von Fleisch erfolgt derzeit über traditionelle Prüfverfahren wie Lager- und Stabilitätsstudien bei optimalen Lagerbedingungen sowie mikrobiologische und sensorische Analysen. Diese Methoden sind nicht nur sehr zeitaufwendig und kostenintensiv (Mayr et al., 2003a; Paramithiotis et al., 2009), sondern erlauben aufgrund von natürlich vorkommenden Variabilitäten des Fleisches keine genaue Beschreibung der Verderbsmechanismen, womit das Haltbarkeitsdatum nur mit einer relativ großen Unsicherheit für jedes einzelne Produkt ermittelt werden kann. In der Realität lässt sich die empfohlene Lagertemperatur von < 4 °C nicht immer einhalten (Bantleon, 2015). Somit kann das Fleisch bereits vor Ende des Haltbarkeitsdatums verdorben sein.

Deshalb wurden in den letzten Jahren nach Alternativen gesucht, den Verderbsstatus von Fleisch zerstörungsfrei, schnell und einfach bestimmen zu können (Rukchon et al., 2014). Als eine mögliche Alternative wurden sog. Frischeindikatoren als Teil der "Intelligenten Verpackungen" entwickelt. Intelligente Verpackungen sind "Materialien und Gegenstände, mit denen der Zustand eines verpackten Lebensmittels oder die das Lebensmittel umgebende Umwelt überwacht wird" (Verordnung (EG) Nr. 450/2009, 2009). Im Fall der Frischeindikatoren erfolgt die Überwachung, indem flüchtige Verbindungen aus dem Lebensmittel mit der reaktiven Substanz des Indikators reagieren und meistens anhand eines Farbumschlages dem Konsumenten den

---

Verderbszustand mitteilen. Somit bildet die Kenntnis über die Bildung und Freisetzung von flüchtigen Verbindungen die Grundlage für die erfolgreiche Entwicklung von Frischeindikatoren. Trotz zahlreicher patentierter Indikatorsysteme (bspw. Elsome und Slade, 2006; Smolander et al., 2004b; Williams et al., 2006) gibt es kaum Beispiele auf dem Markt.

Ein Grund für diesen eingeschränkten Erfolg könnte daran liegen, dass konventionelle Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)-Analysen für die Detektion von flüchtigen Verbindungen verwendet wurden (Argyri et al., 2015; Dainty et al., 1989; Eilamo et al., 1998; Insausti et al., 2002; Jackson et al., 1992), um eine Basis für die Entwicklung von Frischeindikatoren zu generieren. Diese Methode erlaubt jedoch nur intermittierende Messungen, die beträchtliche Probenvorbereitungen erfordert und damit nur offline-Analysen ermöglicht. Es stehen nur begrenzt Informationen über die Freisetzungsdynamik von flüchtigen Verbindungen zur Verfügung (Blake et al., 2009).

Ziel dieser Arbeit war daher, flüchtige organische Verbindungen (VOCs) bei Schutzgas-verpacktem Hähnchen- und Rindfleisch als mögliche Verderbsmarker näher zu untersuchen. Möglichst viele der während des Verderbs gebildeten und freigesetzten VOCs sollten identifiziert und zeitabhängig die Bildungsraten sowie Konzentrationen bestimmt werden. Die Detektion der Bildungsraten und Konzentrationen der VOCs erfolgte mit einer in diesem Bereich neuen Technik, der Protonenaustauschreaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS). Diese Technik bietet die Möglichkeit, flüchtige organische Verbindungen im Kopfraum der Fleischverpackung in Echtzeit zu überwachen und ohne notwendige Probenvorbereitung die VOCs direkt zu quantifizieren. PTR-MS basiert auf einer chemischen Ionisation und erlaubt die gleichzeitige Gasphasenerkennung von einer Vielzahl von VOCs bis zu einem Detektionslimit im Volumenanteile pro Trillion (ppt<sub>v</sub>)-Bereich über einen weiten Dynamikbereich. Zusätzlich sollte Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME)-GC-MS bei repräsentativen Proben durchgeführt werden, um die mit dem PTR-MS gemessenen VOCs zu bestätigen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

- PTR-MS ist geeignet, um (sensorisch aktive) VOCs beim Fleischverderb zu erfassen
- Trotz natürlicher Schwankungen in der Fleischqualität ist die Detektion von einheitlichen Metabolitspektren möglich
- Die detektierten Metabolitspektren sind eindeutig, um das Ende der Haltbarkeit zu bestimmen
- Das Metabolitspektrum ist unabhängig von der Temperatur

Aus den oben genannten Hypothesen leitet sich der Aufbau der Arbeit ab. Zum Einen wurde frisches Hähnchenbrustfilet sowie Rindfleisch mit verschiedenen Einzelstämmen beimpft und die Freisetzung der VOCs bei 4 °C Lagertemperatur gemessen, um das flüchtige Metabolit-spektrum der Einzelstämme zu beurteilen. Als Einzelstämme wurden Vertreter der Gattungen von *Brochothrix thermosphacta* (*B. thermosphacta*), *Carnobacterium divergens* (*C. divergens*), *Pseudomonas fragi* (*Ps. fragi*) und *Lactococcus piscium* (*L. piscium*) gewählt.

Zum Anderen wurde spontan verderbendes Fleisch bei zwei verschiedenen Temperaturen von 4 und 10 °C untersucht, um den Einfluss der Temperatur auf das VOC-Profil zu ermitteln. Neben der Detektion der VOCs wurden sensorische Analysen durchgeführt, um das Auftreten sensorischer Veränderungen von Fleisch mit einzelnen VOCs überprüfen zu können. Mikrobiologische Untersuchungen waren nicht Gegenstand dieser Arbeit, wurden jedoch im Rahmen des gemeinsamen IGF-Forschungsvorhabens 17803N von den Doktoranden des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie Weihenstephan durchgeführt. Die zum besseren Verständnis notwendigen Ergebnisse sind als Ergänzung in dieser Arbeit aufgeführt.



## 2 Grundlagen

### 2.1 Verderb von Fleisch durch Mikroorganismen

Fleisch gehört zu den leicht verderblichen Lebensmitteln, da aufgrund der chemischen Zusammensetzung eine Vielzahl an Mikroorganismen auf der Oberfläche wachsen können (Mayr et al., 2003a). Der Muskel lebender und gesunder Tiere ist zunächst keimfrei. Erst wenn die Tiere geschlachtet werden, können die natürlicherweise und in typischer Zusammensetzung mit dem gesunden Tier vergesellschafteten Mikroorganismen das Fleisch besiedeln (Sofos und Smith, 2009). Trotz Vorsichtsmaßnahmen ist eine Kontamination unvermeidlich.

Unter Einhaltung der erforderlichen Hygienemaßnahmen (Tier-LMHV, 2007; Verordnung (EG) Nr. 853/2004, 2004) beträgt die Anfangskeimzahl bei Geflügel  $10^3$  bis  $10^4$  Koloniebildende Einheiten (KBE)/ $\text{cm}^2$ , bei Nichteinhaltung kann die anfängliche Gesamtkeimzahl bis auf  $10^6$  KBE/ $\text{cm}^2$  ansteigen (Bem und Hechelmann, 1994). Von der heterogenen Ausgangsflora gibt es nur wenige Spezies, die sich beim Fleischverderb durchsetzen können. Die Entwicklung der Verderbsflora hängt dabei u. a. von der Temperatur, Lagerzeit und Verpackungsart ab (Doulgeraki et al., 2010; Doulgeraki et al., 2011; Ercolini et al., 2011; Ercolini et al., 2006; Eyles et al., 1993).

#### 2.1.1 Fleisch verderbende Mikroorganismen unter Schutzgasatmosphäre

Zu den typischen Fleisch verderbenden Mikroorganismen gehören Milchsäurebakterien, Pseudomonaden, Enterobakterien und *B. thermosphacta*. Um die Haltbarkeit zu verlängern, wird Fleisch oft in der Schutzgasatmosphäre angeboten. Als Schutzgase werden für Fleisch Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ), Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) eingesetzt. Die Zusammensetzung der Gase hängt dabei vom Fleischtyp ab. In Deutschland wird für frisches Hähnchenbrustfilet und Rindfleisch typischerweise eine Schutzgaszusammensetzung von 20 %  $\text{CO}_2$  und 80 %  $\text{O}_2$  eingesetzt, während in anderen Ländern wie Frankreich und Spanien bei Hähnchenfleisch der Sauerstoffanteil durch Stickstoff ersetzt wird.  $\text{O}_2$  hält die rote Farbe des frischen Fleisches durch Stabilisierung der Oxymyoglobinbildung aufrecht, während  $\text{N}_2$  als Stützgas dient.  $\text{CO}_2$  ist das wichtigste Schutzgas, da es eine hemmende Wirkung für eine Vielzahl an Mikroorganismen aufweist (Farber, 1991; Gill und Tan, 1980). Bei Fleisch soll das eingesetzte  $\text{CO}_2$  die schnell wachsende aerobe gramnegative Mikroflora (hauptsächlich Pseudomonaden) hemmen, welche den Fleischverderb unter aeroben Bedingungen verursacht (Insausti et al., 2001).

Der inhibitorische Effekt von CO<sub>2</sub> ist bislang noch nicht vollständig geklärt. In der Literatur sind verschiedene Hypothesen über die Wirkungsweise von CO<sub>2</sub> beschrieben. Eine Theorie basiert auf der Funktion von CO<sub>2</sub> als ein Stoffwechselregulator, indem es enzymatische Reaktionen in der Zelle beeinflusst. Enzymatische Reaktionen werden entweder vollständig gehemmt oder finden nur verlangsamt statt (Farber, 1991; King und Nagel, 1975). Eine zweite Möglichkeit liegt in der Löslichkeit von CO<sub>2</sub> in der Wasserphase des Fleisches. Durch die teilweise Lösung von CO<sub>2</sub> in Wasser entsteht Kohlensäure. Hierdurch kommt es zu einer pH-Wert-Änderung an der Fleischoberfläche, welche hemmend auf einige Mikroorganismen wirkt (Devlieghere et al., 1998). Die dritte These beruht auf einer Veränderung der Wachstumsraten von Mikroorganismen in der lag-Phase (Anlaufphase) und der exponentiellen Wachstumsphase (Farber, 1991; Kropf, 2004). Im Folgenden wird das Wachstumsverhalten typischer Fleischverderber in Abhängigkeit der Schutzgaszusammensetzung und Fleischart (Hähnchen- und Rindfleisch) näher beschrieben, welches in Tabelle 2.1 zusammengefasst ist.

### 2.1.1.1 *B. thermosphacta*

#### Hähnchen

*B. thermosphacta* ist ein grampositiver, psychrothropher, fakultativ anaerober Mikroorganismus und gehört zu den bedeutendsten Fleischverderbern von Schutzgas-verpacktem Hähnchenfleisch (Gallas et al., 2010; Smolander et al., 2004a). Die eingesetzte Schutzgasatmosphäre hat dabei einen Einfluss auf die Wachstumsrate. Jiménez et al. (1997) fanden heraus, dass das Wachstum von *B. thermosphacta* bei allen in ihrer Studie untersuchten Schutzgasatmosphären (30 % CO<sub>2</sub> und 70 % N<sub>2</sub>; 70 % CO<sub>2</sub> und 30 % N<sub>2</sub>) nicht gehemmt wurde. Im Gegensatz dazu wiesen Gallas et al. (2010) nach, dass in einer N<sub>2</sub>-reichen Atmosphäre (25 % CO<sub>2</sub> und 75 % N<sub>2</sub>) signifikant niedrigere Werte von *B. thermosphacta* erreicht wurden im Vergleich zu einer O<sub>2</sub>-reichen Schutzgaszusammensetzung (25 % CO<sub>2</sub> und 75 % O<sub>2</sub>).

Nach Rossaint et al. (2015) ist *B. thermosphacta* in der Lage, unter O<sub>2</sub>-reicher Atmosphäre als auch unter O<sub>2</sub>-reduzierten Bedingungen zu wachsen. Allerdings bevorzugt *B. thermosphacta* das Wachstum unter O<sub>2</sub>-Bedingungen. In ihrer Studie zeigten sie, dass *B. thermosphacta* in den ersten 6 Tagen unter O<sub>2</sub>-reicher (30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub>) und O<sub>2</sub>-freier Atmosphäre (30 % CO<sub>2</sub> und 70 % N<sub>2</sub>) ähnliche Wachstumsraten aufwies. Ab dem 7. Tag besaß *B. thermosphacta* unter O<sub>2</sub>-reicher Atmosphäre ein schnelleres Wachstumsverhalten und dominierte die Mikroflora. Das verringerte Wachstum in N<sub>2</sub>-Atmosphären erklärten sie durch Wechselwirkungen mit anderen Mikroorganismen wie Milchsäurebakterien. Dies stimmte mit den Ergebnissen von Russo et al., 2006 überein, die herausfanden, dass in Anwesenheit von Milchsäurebakterien das Wachstum von *B. thermosphacta* deutlich reduziert war. Waren hingegen Milchsäurebakterien und Pseudomonaden präsent, wurden höhere Keimzahlen von *B. thermosphacta* erzielt im Vergleich zu *B. thermosphacta* alleine. Weiterhin wiesen Balamatsia et al. (2007) nach, dass *B. thermosphacta* durch den Einsatz von einem N<sub>2</sub>-haltigen Schutzgas (30 % CO<sub>2</sub>, 65 % N<sub>2</sub> und

5 % O<sub>2</sub>; 65 % CO<sub>2</sub>, 30 % N<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub>) gehemmt wurde. *B. thermosphacta* gehörte zwar zu den dominierenden Mikroorganismen unter Schutzgas, allerdings waren die Keimzahlen über den gesamten Lagerzeitraum geringer als bei einer aeroben Lagerung.

Pin et al. (2002) hingegen stellten fest, dass der O<sub>2</sub>-Gehalt in der Schutzgasatmosphäre keine Auswirkung auf das Wachstum von *B. thermosphacta* in Trypton-Soja-Brühe hatte, jedoch mit steigendem CO<sub>2</sub>-Gehalt das Wachstum geringer wurde. Herbert (2014) wies nach, dass der O<sub>2</sub>-Gehalt in der Atmosphäre einen Einfluss auf die Dominanz von *B. thermosphacta* hatte. Erst nach 7,5 Tagen konnte sich *B. thermosphacta* bei einer 45 %-igen O<sub>2</sub>-Atmosphäre (25 % N<sub>2</sub> und 30 % CO<sub>2</sub>) gegenüber den anderen Mikroorganismen durchsetzen, während bei einem O<sub>2</sub>-Gehalt von 70 % (30 % CO<sub>2</sub>) *B. thermosphacta* von Anfang an dominierte.

## Rindfleisch

*B. thermosphacta* hat beim Verderb von Schutzgas-verpacktem Rindfleisch nur eine untergeordnete Bedeutung. So wurde in der Studie von Zakrys-Waliwander et al. (2011) ein Wachstum von *B. thermosphacta* unter verschiedenen Schutzgasatmosphären (20 % CO<sub>2</sub> und 80 % O<sub>2</sub>; 30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub>; 30 % CO<sub>2</sub>, 50 % O<sub>2</sub> und 20 % N<sub>2</sub>) nicht nachgewiesen. Auch Jääskeläinen et al. (2016) zeigten, dass *B. thermosphacta* bei verdorbenem Rindfleisch in O<sub>2</sub>-reicher Schutzgasatmosphäre (20 % CO<sub>2</sub> und 80 % O<sub>2</sub>) nur mit einer relativen Häufigkeit < 5 % detektiert wurde. Aus diesem Grund schlussfolgerten sie, dass *B. thermosphacta* nicht zu den Verderbsorganismen bei Rindfleisch gehörte. In einer anderen Studie wurde das Wachstum von *B. thermosphacta* vollständig bei einer Schutzgaszusammensetzung von 30 % O<sub>2</sub> und 70 % CO<sub>2</sub> sowie 50 % O<sub>2</sub> und 50 % CO<sub>2</sub> unterdrückt. Bei 70 % O<sub>2</sub> und 30 % CO<sub>2</sub> war das Wachstum nur eingeschränkt im Vergleich zu einer aeroben Lagerung. Keinen Einfluss auf das Wachstum hatte das Schutzgas bestehend aus 30 % O<sub>2</sub>, 30 % CO<sub>2</sub> und 40 % N<sub>2</sub>, da die Keimzahlen mit den Proben aus aerober Lagerung vergleichbar waren (Esmer et al., 2011).

### 2.1.1.2 Milchsäurebakterien

#### Hähnchen

Milchsäurebakterien sind fakultativ anaerobe Mikroorganismen. Zu den Milchsäurebakterien, die auf Fleisch unter modifizierter Atmosphäre gefunden wurden, gehörten vor allem Lactobacillen (*Lactobacillus alimentarius* (*L. alimentarius*) und *Lactobacillus sakei* (*L. sakei*)), Leuconostoc (*Leuconostoc mesenteroides* (*Lc. mesenteroides*)), Lactococcen (*Lactococcus lactis* (*L. lactis*)) und Carnobakterien (*C. divergens*) (Hanna et al., 1981). Nach Herbert et al. (2013) haben Milchsäurebakterien wie *Lactobacilli* ssp. keinen entscheidenden Einfluss auf den Verderb von Schutzgas-verpacktem Hähnchenfleisch, da sie zu den langsam wachsenden Mikroorganismen zählen und anaerobe Bedingungen oder Schutzgasen mit hohem CO<sub>2</sub>-Gehalt vorziehen.

Auch Tománková et al. (2012) stellten fest, dass die Keimzahlen der Milchsäurebakterien unter O<sub>2</sub>-reicher Atmosphäre (30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub>) nur langsam stiegen. Allerdings hatte dabei die Zusammensetzung der modifizierten Atmosphäre keine Wirkung auf das Wachstum, sondern nur die Menge an gelöstem Schutzgas in der Haut und im Muskelgewebe der Proben. Rossaint et al. (2015) zeigten, dass *Lactobacilli spp.* unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre (30 % CO<sub>2</sub> und 70 % N<sub>2</sub>) eine höhere Wachstumsrate aufwiesen im Vergleich zu einer O<sub>2</sub>-reichen (30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub>) Schutzgaszusammensetzung. In Anwesenheit von O<sub>2</sub> stieg die Anfangskeimzahl von *Lactococcus ssp.* nur um eine Zehnerpotenz.

### Rindfleisch

Milchsäurebakterien kommt eine größere Bedeutung bei Schutzgas-verpacktem Rindfleisch zu. Den Ergebnissen von Hanna et al. (1981) zufolge verdrängten *Leuconostoc ssp.* die anfängliche Mikroflora bestehend aus *Micrococcus* und *Moraxella-Acinetobacter ssp.* während der Lagerung in einer Schutzgasatmosphäre von 75 % O<sub>2</sub> und 25 % CO<sub>2</sub> bei einer Lagertemperatur von 1-2 °C und wurden zum dominierenden Mikroorganismus. Dies ist in Übereinstimmung mit Jääskeläinen et al. (2016). Sie wiesen nach, dass das Wachstum von *Leuconostoc* unter O<sub>2</sub>-reicher Atmosphäre (20 % CO<sub>2</sub> und 80 % O<sub>2</sub>) begünstigt war. Die relative Häufigkeit von *Leuconostoc* stieg während der Lagerzeit auf 53 % ausgehend von einem anfänglichen Wert von 5 %, wobei der Genus *Leuconostoc* hauptsächlich durch *Leuconostoc gelidum ssp. gasicomitatum* (*Lc. gelidum ssp. gasicomitatum*) vertreten war. Trotz begünstigter Atmosphäre dominierte *Lactobacillus* die Flora, die relative Häufigkeit jedoch blieb mit  $\geq 90$  % konstant.

Auch Jackson et al. (1992) wiesen nach, dass die Mikroflora durch *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) bei einer O<sub>2</sub>-freien Atmosphäre (40 % CO<sub>2</sub> und 60 % N<sub>2</sub>; 100 % CO<sub>2</sub>) bestimmt wurde. Dies ist in Übereinstimmung mit Zakrys-Waliwander et al. (2011). Sie fanden heraus, dass Milchsäurebakterien in unterschiedlichen Schutzgaszusammensetzungen (75 % O<sub>2</sub> und 25 % CO<sub>2</sub>; 80 % O<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub>; 70 % O<sub>2</sub> und 30 % CO<sub>2</sub>; 50 % O<sub>2</sub>, 30 % CO<sub>2</sub> und 20 % N<sub>2</sub>) vorherrschten. Im Gegensatz dazu zeigten Andreevskaya et al. (2015), dass das Verderbspotential von *L. piscium* vom Stamm und den Lagerbedingungen stark abhängig war. Auch Esmer et al. (2011) stellten fest, dass die eingesetzte Schutzgasatmosphäre die Mikroflora beeinflusst. Unter einer Schutzgasatmosphäre von 30 % O<sub>2</sub> und 70 % CO<sub>2</sub> sowie 30 % O<sub>2</sub>, 30 % CO<sub>2</sub> und 40 % N<sub>2</sub> trat das Wachstum von Milchsäurebakterien erst zu einem späten Zeitpunkt auf, während bei 50 % O<sub>2</sub> und 50 % CO<sub>2</sub> das Wachstum eingeschränkt war. Eine Zusammensetzung von 70 % O<sub>2</sub> und 30 % CO<sub>2</sub> förderte hingegen das Wachstum von Milchsäurebakterien.

### 2.1.1.3 Pseudomonaden

#### Hähnchen

Pseudomonaden sind unter aeroben Bedingungen eine der wichtigsten Fleischverderber neben *Moraxella* und *Acinetobacter* (Farber, 1991). Die am häufigsten mit Fleisch assoziierten Vertreter von Pseudomonaden sind *Ps. fragi*, *Pseudomonas ludensis* (*Ps. ludensis*), *Shewanella putrefaciens* und *Pseudomonas fluorescens* (*Ps. fluorescens*) (García-Lopez et al., 1998; Molin et al., 1986). In der Literatur gibt es einige kontroverse Ergebnisse über den Einfluss von modifizierten Atmosphären auf Pseudomonaden bei Hähnchenfleisch. Nach Farber (1991) werden Pseudomonaden ab einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 20 % gehemmt. Auch Sawaya et al. (1995) sind der Meinung, dass CO<sub>2</sub> das Wachstum von Pseudomonaden unterdrückt und dass höhere CO<sub>2</sub>-Konzentrationen das Wachstum stärker hemmt. Im Gegensatz dazu zeigten Herbert und Kreyenschmidt (2015) in ihrer Studie, dass Pseudomonaden gut unter CO<sub>2</sub>-reicher Atmosphäre (70 % O<sub>2</sub> und 30 % CO<sub>2</sub>; 30 % CO<sub>2</sub> und 70 % N<sub>2</sub>) wuchsen und zu den dominierenden Mikroorganismen gehörten. Pettersen et al. (2004) wiesen nach, dass der Anfangssauerstoffgehalt (0 %, 2 % und 4 %) in einer N<sub>2</sub>-reichen Atmosphäre einen beachtlichen Einfluss auf das Wachstum von Pseudomonaden hatte. Bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 4 % erreichten Pseudomonaden bereits nach 8 Tagen hohe Keimzahlen, bei einer O<sub>2</sub>-freien Atmosphäre wurden ähnliche Werte erst nach 21 Tagen erzielt.

#### Rindfleisch

Jackson et al. (1992) stellten fest, dass nach einer Lagerung von 21 und 28 Tagen unter einer Schutzgaszusammensetzung von 20 % CO<sub>2</sub> und 80 % O<sub>2</sub> die Mikroflora hauptsächlich durch *Pseudomonas putida* (*Ps. putida*) vertreten war. Im Gegensatz dazu war in der Studie von Zakrys-Waliwander et al. (2011) das Wachstum von Pseudomonaden innerhalb des Versuchszeitraums von 14 Tagen vollständig inhibiert. In der Studie von Jääskeläinen et al. (2016) wurden zwar Pseudomonaden bei Schutzgas-verpacktem (20 % CO<sub>2</sub> und 80 % O<sub>2</sub>) Rindfleisch nachgewiesen, sie gehörten jedoch nicht zu den spezifischen Verderbsorganismen, da ihre relative Häufigkeit < 5 % betrug. In der Studie von Esmer et al. (2011) wurde in einer Schutzgaszusammensetzungen von 30 % O<sub>2</sub> und 70 % CO<sub>2</sub> sowie 50 % O<sub>2</sub> und 50 % CO<sub>2</sub> kein Wachstum von Pseudomonaden festgestellt. Bei einer Schutzgasatmosphäre von 70 % O<sub>2</sub> und 30 % CO<sub>2</sub> wurde das Wachstum nur im Vergleich zu einer aeroben Lagerung begrenzt. Eine Zusammensetzung von 30 % O<sub>2</sub>, 30 % CO<sub>2</sub> und 40 % N<sub>2</sub> hatte keine hemmende Eigenschaften auf das Wachstum von Pseudomonaden, da die Keimzahlen mit einer aeroben Lagerung vergleichbar waren.

## 2.1 Verderb von Fleisch durch Mikroorganismen

Tabelle 2.1: Einfluss der Schutzgasatmosphäre auf das Wachstum von typischen Fleischverderbern mit +: nicht gehemmtes Wachstum, -: gehemmtes/eingeschränktes Wachstum

Mikroorganismus	Schutzgasatmosphäre			Wachstum	Quelle
	O <sub>2</sub> [%]	CO <sub>2</sub> [%]	N <sub>2</sub> [%]		
<b><i>B. thermosphacta</i></b>					
Hähnchen	-	30	70	+	Jiménez et al., 1997
	-	70	30	+	Jiménez et al., 1997
	-	25	75	-	Gallas et al., 2010
	70	30	-	+	Rossaint et al., 2015
	-	30	70	-	Rossaint et al., 2015
	5	30	65	-	Balamatsia et al., 2007
	5	65	30	-	Balamatsia et al., 2007
	70	30	-	+	Herbert, 2014
	80	20	-	+	Höll et al., 2016
	Rind	75	25	-	-
80		20	-	-	Zakrys-Waliwander et al., 2011
70		30	-	-	Zakrys-Waliwander et al., 2011
50		30	20	-	Zakrys-Waliwander et al., 2011
80		20	-	-	Jääskeläinen et al., 2016
30		70	-	-	Esmer et al., 2011
50		50	-	-	Esmer et al., 2011
30		30	40	+	Esmer et al., 2011
70	30	-	-	Esmer et al., 2011	
<b>Milchsäurebakterien</b>					
Hähnchen	70	30	-	-	Tománková et al., 2012
	70	30	-	-	Rossaint et al., 2015
	-	30	70	+	Rossaint et al., 2015
	80	20	-	+	Höll et al., 2016
	-	35	65	+	Höll et al., 2016
Rind	75	25	-	+	Hanna et al., 1981
	80	20	-	+	Jääskeläinen et al., 2016
		40	60	+	Jackson et al., 1992
	-	100	-	+	Jackson et al., 1992
	75	25	-	+	Zakrys-Waliwander et al., 2011
	80	20	-	+	Zakrys-Waliwander et al., 2011
	70	30	-	+	Zakrys-Waliwander et al., 2011
	50	30	20	+	Zakrys-Waliwander et al., 2011
	30	70	-	-	Esmer et al., 2011
	30	30	40	-	Esmer et al., 2011
50	50	-	-	Esmer et al., 2011	
70	30	-	+	Esmer et al., 2011	
<b>Pseudomonaden</b>					
Hähnchen	-	70	30	-	Sawaya et al., 1995
	-	30	70	-	Sawaya et al., 1995
	60	25	15	+	Herbert et al., 2013

Tabelle 2.1: Fortsetzung

Mikroorganismus	Schutzgasatmosphäre			Wachstum	Quelle
	O <sub>2</sub> [%]	CO <sub>2</sub> [%]	N <sub>2</sub> [%]		
Rind	45	30	25	+	Herbert et al., 2013
	-	18	82	+	Herbert et al., 2013
	-	60	40	-	Pettersen et al., 2004
	75	25	-	-	Zakrys-Waliwander et al., 2011
	80	20	-	-	Zakrys-Waliwander et al., 2011
	70	30	-	-	Zakrys-Waliwander et al., 2011
	50	30	20	-	Zakrys-Waliwander et al., 2011
	80	20	-	-	Jääskeläinen et al., 2016
	30	70	-	-	Esmer et al., 2011
	30	30	40	+	Esmer et al., 2011
	50	50	-	-	Esmer et al., 2011
70	30	-	-	Esmer et al., 2011	

Zusammenfassend lässt sich aus den Rechercheergebnissen ableiten, dass das Wachstum von Mikroorganismen auf der Fleischoberfläche von vielen Faktoren abhängig ist. Zu diesen Faktoren zählen:

- initiale Mikroflora
- Wechselwirkung zwischen den Mikroorganismen
- Verderbspotential der auf der Fleischoberfläche vorhandenen Mikroorganismen (langsam oder schnell wachsende Mikroorganismen)
- stammspezifische Unterschiede der Mikroorganismen
- Lagerbedingungen wie Schutzgaszusammensetzung und Lagerdauer
- Fleischsorte (Rind, Hähnchen)

### 2.1.2 pathogene Mikroorganismen

Salmonellen, pathogene *Escherichia coli* (*E. coli*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) und *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) gehören zu den pathogenen auf der Fleischoberfläche wachsenden Mikroorganismen. Im Allgemeinen kommen diese Mikroorganismen nur in geringen Keimzahlen vor. Das Wachstum kann durch den Einsatz von CO<sub>2</sub>-reichen Schutzgasatmosphären und niedrigen Temperaturen (2 - 4 °C) zusätzlich reduziert oder inhibiert werden (Conte-Junior et al., 2010; García de Fernando et al., 1995; Strotmann et al., 2008). Eine Gesundheitsgefährdung tritt wegen der geringen Kontamination in der Regel nur beim Verzehr von rohem Fleisch auf. Da diese Organismen in der Regel nur geringe Keimzahlen aufweisen, die zwar für eine Infektion bedeutsam sein können, jedoch weit unter den Zahlen liegen, die für eine messbare Metabolitbildung während des Fleischverderbs notwendig wären, bleiben diese Mikroorganismen im Rahmen dieser Arbeit unberücksichtigt.

### 2.1.3 Einfluss der Temperatur auf den Fleischverderb

Temperatur zählt zu den bedeutendsten Faktoren, um den Verderbsprozess und die Lebensmittelsicherheit zu beeinflussen (Koutsoumanis und Taoukis, 2005). Vor allem die Dauer der lag-Phase, die spezifische Wachstumsrate und die finale Keimzahl der Mikroorganismen können durch die Wahl der Temperatur kontrolliert werden (Labuza und Fu, 1993). Pettersen et al. (2004) untersuchten Schutzgas-verpackte Hähnchenbrust und zeigten, dass das Wachstum von *Pseudomonas ssp.* durch die Temperatur gesteuert wurde. Sie erklärten die höheren Keimzahlen bei 8 °C im Vergleich zu 4 °C durch höhere Wachstumsraten und durch die geringere Löslichkeit von CO<sub>2</sub>, wodurch der inhibitorische Effekt von CO<sub>2</sub> gesenkt wurde (Gill, 1996; Löwenadler, 1994). Dies ist in Übereinstimmung mit Tsigarida und Nychas (2001). Ihren Ergebnissen zufolge stieg die Wachstumsrate von *Pseudomonas ssp.* unabhängig von den Lagerbedingungen (aerob bzw. 100 % CO<sub>2</sub>) mit steigender Temperatur, bei gleichzeitiger Verkürzung der lag-Phase. Gleiche Ergebnisse erzielten sie mit *Lactobacillus ssp.*. Doulgeraki et al. (2010) wiesen nach, dass Mikroorganismen, die zur gleichen Spezies gehören, nicht immer bei den gleichen Temperaturen wachsen müssen. Bei Schutzgas-verpacktem Rinderhack dominierte *Leuconostoc ssp.* die Mikroflora bei 10 und 15 °C. Bei 0 und 5 °C hingegen war *L. sakei* der vorherrschende Mikroorganismus. In der Studie von Argyri et al. (2015) dominierten Milchsäurebakterien die Mikroflora, gefolgt von *B. thermosphacta* bei Schutzgas-verpacktem Rind und niedrigen Temperaturen (0, 5 °C). Das Wachstum von Pseudomonaden wurde verzögert. Bei höheren Temperaturen (10, 15 °C) gehörten Milchsäurebakterien zur einzigen dominierenden Gruppe.

Tabelle 2.2: Temperaturbedingungen für das Wachstum von typischen Fleischverderbern

Spezies	Temperatur in °C			Quelle
	Minimum	Optimum	Maximum	
<i>B. thermosphacta</i>	0	20 - 25	30	Sneath et al. (1986)
<i>C. divergens</i>	0		40	Pikuta und Hoover (2014)
<i>C. maltaromaticum</i>	0	28 - 32	40	Pikuta und Hoover (2014)
<i>Leuconostoc</i>	5	20 - 30		Sneath et al. (1986)
<i>Lactobacillus</i>	2	30 - 40	53	Sneath et al. (1986)
<i>Pseudomonas</i>	-7 - 4	20 - 30	31 - 43	Banwart (1998)
<i>Ps. fragi</i>	0	23 - 26	30	Gallo et al. (1988)
<i>Ps. aeruginosa</i>	8	37	42	Krieg und Holt (1984)
<i>Ps. fluorescens</i>	0 - 6	20 - 25	40	Banwart (1998)
<i>Ps. putida</i>		25 - 30		Krieg und Holt (1984)

### 2.1.4 Mikrobiologische Kriterien für Frischfleisch

In Deutschland und Europa gibt es nur sehr wenige gesetzlich festgelegte mikrobiologische Anforderungen für Hähnchen- und Rindfleisch. Lediglich für Salmonellen müssen gesetzlich vorgegebene Grenzwerte eingehalten werden. Beispielsweise dürfen in einer Probe von 25 Gramm (g) von in Verkehr gebrachten Erzeugnissen aus Geflügel während der Haltbarkeitsdauer keine Salmonellen nachgewiesen werden (EG Nr. 2073/2005, 2005).

Fleisch gilt im Allgemeinen als verdorben, wenn die Gesamtkeimzahl einen Richtwert von  $5 \times 10^6$  bis  $10^8$  KBE/cm<sup>2</sup> (durchschnittlich  $10^7$ ) erreicht hat (Regez et al., 1988). Diese Angabe ist jedoch sehr ungenau, da die Art der Mikroorganismen auf der Fleischoberfläche eine große Rolle spielt. So können beispielsweise Milchsäurebakterien auch als Schutzkulturen dienen (Budde, 2003; Groth Laursen et al., 2005; Nilsson et al., 1999; Pothakos et al., 2015). Auch einzelne Pathogene werden hier nicht berücksichtigt. Genauere Informationen lassen sich über die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM) finden. Die DGHM veröffentlicht in regelmäßigen Abständen Warn- und Richtwerte für Lebensmittel, die bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums eingehalten werden sollen.

## 2.2 Stoffwechselaktivitäten von Fleisch verderbenden Mikroorganismen

Unabhängig von der Verpackungsart und vom Mikroorganismus werden niedermolekulare Kohlenhydrate wie Glucose und Glucose-6-phosphat als erstes Substrat für den mikrobiellen Stoffwechsel verbraucht (Gill und Newton, 1977; Nychas et al., 1988). Zu Beginn bildet sich ein Diffusionsgefälle innerhalb des Fleisches, wodurch die Glucosekonzentration auf der Fleischoberfläche aufrecht erhalten wird (Gill, 1986b). Somit führt der Glucoseabbau zu den ersten Anzeichen von Fehlgerüchen (Nychas et al., 1998b). Zu den freigesetzten Substanzen gehören Ethanoat, 3-Hydroxy-2-butanon, 2,3-Butandion, Ethansäure, 3-Methylbutanol, 2-Methylpropanol und Ethanol (Nychas et al., 1998a; Nychas et al., 2007; Tsigarida et al., 2003). Ethanoat wird dabei über den Phosphoketolase-Weg aus Acetylphosphat bei gleichzeitiger Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen (Cogan und Jordan, 1994; Säde, 2011). Auf der Fleischoberfläche befinden sich im Allgemeinen ausreichende Mengen an Glucose und weitere einfache Kohlenhydrate, um ein Wachstum der Mikroorganismen auf ungefähr  $10^8$  bis  $10^9$  KBE/cm<sup>2</sup> zu erlauben. Erst dann erfolgt der Abbau von weiteren Substraten wie freien Aminosäuren, 2-Hydroxypropanoat (Lactat), Gluconat, Glucose-6-phosphat, Ethanol, Ethanoat, Methanoat, Nucleotiden, Urea und wasserlöslichen Proteinen (Ellis und Goodacre, 2001; Gill, 1976; Gill, 1986a; McMeekin, 1982; Nychas et al., 2007).

### 2.2.1 *B. thermosphacta*

*B. thermosphacta* hat viele Enzyme, um den Hexose-Monophosphat-Stoffwechsel und Emden-Meyerhof-Weg (Glycolyse) sowie Pyruvat-Stoffwechsel zu betreiben (Collins-Thompson et al., 1972; Grau, 1983). Zu den wichtigsten Stoffwechselprodukten gehört 3-Hydroxy-2-butanon, welches durch die Enzyme  $\alpha$ -Acetolactat-Synthase und Acetolactat-Decarboxylase gebildet wird. Das erste Enzym wandelt Pyruvat in  $\alpha$ -Acetolactat um, während das zweite Enzym für die Decarboxylierung von  $\alpha$ -Acetolactat zu 3-Hydroxy-2-butanon verantwortlich ist. 3-Hydroxy-2-butanon kann weiter zu 2,3-Butandiol durch die Butandiol-Dehydrogenase reduziert werden.

Die Bildung von 2,3-Butandion erfolgt durch die nicht-enzymatische oxidative Decarboxylierung von 3-Hydroxy-2-butanon (Dainty und Hibbard, 1983; Stanborough et al., 2017). Unter aeroben Bedingungen bevorzugt *B. thermosphacta* die Verstoffwechslung von Glucose, aber auch Glucose-6-phosphat, Aminosäuren, Ribose und Glycerol können umgewandelt werden (zusammengefasst in Casaburi et al. (2015)). Jedoch ist die Anzahl an verwertbaren Aminosäuren begrenzt (Gill und Newton, 1977).

Unter anaeroben Verhältnissen, wie Schutzgas oder Vakuum, findet nur die Umwandlung von Glucose und Glucose-6-phosphat statt (zusammengefasst in Casaburi et al. (2015)). Die Zusammensetzung der Schutzgasatmosphäre ist dabei entscheidend, ob der Stoffwechsel von *B. thermosphacta* aerob oder anaerob ist (Pin et al., 2002). Während des aeroben Metabolismus entstehen hauptsächlich 3-Hydroxy-2-butanon, Ethansäure, 3-Methylbutanol, 2,3-Butandiol, Isobutansäure und 3-Methylbutansäure (Blickstad und Molin, 1984; Casaburi et al., 2014; Dainty und Hibbard, 1980; Dainty und Hibbard, 1983; Dainty und Hofman, 1983). Dabei nimmt mit steigendem O<sub>2</sub>-Gehalt in der Schutzgasatmosphäre die Verstoffwechslung von Glucose und die Bildungsrate von 3-Hydroxy-2-butanon/2,3-Butandion sowie Ethansäure zu (Blickstad, 1983; Pin et al., 2002). Unter anaeroben Bedingungen werden hauptsächlich 2-Hydroxypropansäure und Ethanol produziert, die Bildung von 3-Hydroxy-2-butanon findet hingegen nicht statt (Dainty et al., 1979; Hitchener et al., 1979). Weitere Einflussfaktoren auf die Bildung von Metaboliten sind der pH-Wert, die Temperatur und die Substratverfügbarkeit (Blickstad, 1983; Pin et al., 2002).

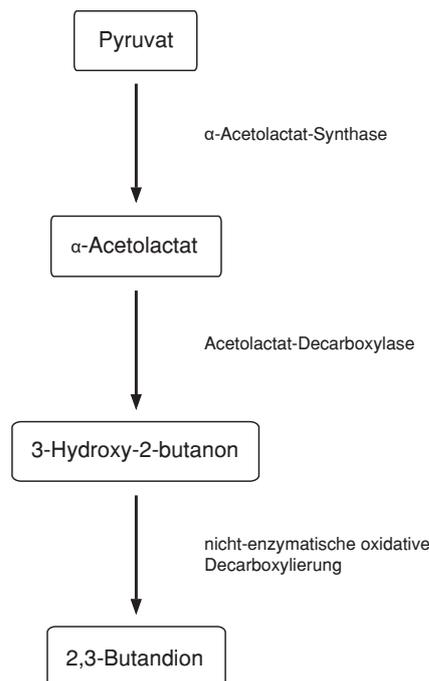


Abbildung 2.1: 2,3-Butandion-Stoffwechsel von *B. thermosphacta*; eigene Darstellung nach Dainty und Hibbard (1983) und Stanborough et al. (2017)

### 2.2.2 Milchsäurebakterien

Viele Milchsäurebakterien sind in der Lage, von einer Fermentation zu einer aeroben Atmung zu wechseln, wenn Häm zur Verfügung steht. Die Wachstumsbedingungen steuern dabei das Gleichgewicht zwischen Fermentation und Atmung (Duwat et al., 2001). Kohlenhydrate stellen für Milchsäurebakterien die bedeutendste Substratquelle dar (Pothakos et al., 2015). Unter aeroben Bedingungen findet die Verstoffwechslung von Glucose als auch von Glucose-6-phosphat statt, unter Vakuum und Schutzgas können Milchsäurebakterien hingegen nach dem Verbrauch von Kohlenhydraten zusätzlich Aminosäuren verwerten (zusammengefasst in Casaburi et al., 2015).

Das wichtigste Abbauprodukt von Glucose stellt 2-Hydroxypropansäure (Milchsäure) dar. Im Fall von homofermentativen Milchsäurebakterien (bspw. *C. divergens* (Bruyn et al., 1988)) erfolgt dies über den Glycolyse-Weg. Heterofermentative Bakterien verwenden den Phosphoketolase-Weg für die Synthese von 2-Hydroxypropansäure, bei dem als Nebenprodukte auch Ethanol und CO<sub>2</sub> entstehen (siehe Abb. 2.3). Steht Glucose als Energiequelle nicht mehr zur Verfügung, wechseln homofermentative Milchsäurebakterien zu einem heterofermentativen Stoffwechsel, um das als Zwischenprodukt gebildete Pyruvat zu spalten. Dabei werden Ethanol, Ethanoat und Methanoat als Endprodukte gebildet, wobei die beiden letzten Verbindungen durch die Pyruvat-Format-Lyase entstehen (Kandler, 1983).

Milchsäurebakterien besitzen neben der Synthese von 2-Hydroxypropansäure noch weitere Stoffwechselwege. Eine der wichtigsten Wege ist der Abbau von Pyruvat zu 3-Hydroxy-2-butanon/2,3-Butandion. Der Abbau kann über zwei Wege stattfinden: entweder über die Umsetzung von Acetolactat zu 3-Hydroxy-2-butanon und einer darauffolgenden Oxidation zu 2,3-Butandion oder durch die direkte Herstellung aus acetyl-CoA oder aktiviertem Ethanal (Acetaldehyd) (Hugenholz und Starrenburg, 1992; Kandler, 1983; Speckman und Collins, 1968). Zudem können Alkohole, Ketone, Aldehyde, Ester, flüchtige Fettsäuren, Carbonsäuren und Schwefelverbindungen wie 3-Methylbutanol, 1-Hexanol, 2-Ethyl-1-hexanol, 1-Octen-3-ol, 3-Octanon, 2-Heptanon, Hexanal, Ethyloctanoat, Butansäure, Hexansäure und Schwefelverbindungen wie Methylsulfanylmethan (Dimethylsulfid) gebildet werden (Casaburi et al., 2011; Ercolini et al., 2011; Ercolini et al., 2009).

Die Bildung der Metabolite ist dabei von einigen Faktoren abhängig, beispielsweise vom Glucosegehalt, von der Spezies und von den Lagerbedingungen (Borch und Molin, 1989; Casaburi et al., 2011; Leisner et al., 2007). Sind Hexosen als einzige Energiequelle anwesend, findet die Bildung von 3-Hydroxy-2-butanon/2,3-Butandion nur in geringen Mengen statt. Sobald jedoch zusätzliches Pyruvat aus organischen Säuren freigesetzt wird, entstehen signifikante Mengen. Zudem wird die Synthese von 2,3-Butandion, Ethanal, 3-Hydroxy-2-butanon, Butylenglycol und Ethanol vom Oxidations-Reduktions-Gleichgewicht des Systems beeinflusst (Kandler, 1983).

### 2.2.2.1 *L. piscium*

*L. piscium* gilt als einer der bedeutendsten Fleischverderber von Schutzgas-verpacktem Rindfleisch. Bei diesem Mikroorganismus wird Glucose (und andere Hexosen) über die Glycolyse abgebaut, da die hierfür erforderlichen glycolytischen Enzyme im Genom gefunden wurden. Gene für den Phosphoketolase-Weg hingegen sind nicht vorhanden. *L. piscium* gehört somit zu den homofermentativen Milchsäurebakterien (Andreevskaya et al., 2015; Axelsson, 2004).

*L. piscium* besitzt vier Stoffwechselwege für die Verwendung von Pyruvat: den 3-Hydroxy-2-butanon/2,3-Butandion-, Pyruvat-Dehydrogenase-, L-Lactat-Dehydrogenase- und den Pyruvat-Format-Lyase-Stoffwechselweg. 2,3-Butandion/3-Hydroxy-2-butanon wird hauptsächlich synthetisiert, wenn Pyruvat im Überschuss vorliegt. Dies ist der Fall, wenn zusätzliches Pyruvat produziert wird, ohne Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) dabei zu reduzieren (Citrat-Metabolismus, Aspartat, Alanin) oder indem die Umwandlung von Pyruvat in 2-Hydroxypropanoat in Anwesenheit von zusätzlichen Elektronenakzeptoren wie O<sub>2</sub> stattfindet (Andreevskaya et al., 2015; Axelsson, 2004; Kieronczyk et al., 2004). Ethanol kann über die Aldehyd-Alkohol-Dehydrogenase aus Acetyl Coenzym A gebildet werden, welches durch die Pyruvat-Dehydrogenase und die Pyruvat-Format-Lyase entsteht (Andreevskaya et al., 2015).

### 2.2.2.2 *Leuconostoc*

Im Gegensatz dazu wird der Genus *Leuconostoc* als heterofermentativ bezeichnet, da er den Hexose-Monophosphat- und Phosphoketolase-Stoffwechselweg aufweist. Einige Stämme besitzen einen oxidativen Mechanismus, wobei Ethansäure anstelle von Ethanol produziert wird (Sneath et al., 1986). *Leuconostoc gelidum* sp. *gasicomitatum* kann keine Proteine, Lactat oder Fettsäuren verwerten, jedoch kann dieser Mikroorganismus andere Substrate wie Nucleoside, Adenosin und Inosin nutzen. Besonders Inosin ist reichlich im Fleisch vorhanden und stellt daher eine gute Energiequelle dar, wenn Glucose der limitierende Faktor ist. 3-Hydroxy-2-butanon/2,3-Butandion wird nur in Anwesenheit von Inosin und Ribose gebildet, da hier die  $\alpha$ -Acetolactat-Synthase hochreguliert wird. Die Gewinnung von 3-Hydroxy-2-butanon erfolgt dabei aus  $\alpha$ -Acetolactat, entweder direkt über die Acetolactat-Decarboxylase oder indirekt durch die Reduktion von 2,3-Butandion durch die Diacetyl-Reduktase. Stehen nur  $O_2$  und Glucose zur Verfügung, findet eine Produktion von 3-Hydroxy-2-butanon/2,3-Butandion nicht statt (Jääskeläinen et al., 2015).

Der Stoffwechsel und damit die Bildung von Endprodukten bei *L. gelidum* ssp. *gasicomitatum* wird vom  $O_2$ -Gehalt in der Verpackung beeinflusst (Pothakos et al., 2014). So wird mehr Ethansäure in Anwesenheit von  $O_2$  gebildet, während 2,3-Butandion, 2,3-Butandiol und Ethanal nur bzw. hauptsächlich produziert werden, wenn  $O_2$  verfügbar ist. Im Vergleich zur aeroben Lagerung wird 2,3-Butandion in höheren Mengen bei einer Schutzgasatmosphäre von 50 %  $CO_2$  und 50 %  $O_2$  produziert (Pothakos et al., 2014). Auch der pH-Wert hat einen Einfluss auf die Bildung von 2,3-Butandion. *Lc. mesenteroides* zeigt eine höhere Produktion an 2,3-Butandion bei pH 4 im Gegensatz zu optimalen Bedingungen bei pH 5,5 (Christensen und Pederson, 1958).

### 2.2.2.3 Carnobakterien

Der Stoffwechsel von Carnobakterien ist von den Lagerbedingungen abhängig, da beispielsweise Methansäure nur unter anaeroben Verhältnissen und nicht bei einer aeroben Lagerung gebildet wird (Borch und Molin, 1989). *C. maltaromaticum* produziert unter aeroben Bedingungen 3-Methylbutanol, Heptanol, 3-Octanone und Hexanal, welche bei Vakuum-verpacktem Fleisch nicht gefunden wurden. Unter Vakuum entstehen organische Verbindungen wie 3-Hydroxy-2-butanon, Butansäure und 1-Octen-3-ol (Casaburi et al., 2011). 3-Methylbutanal gehört zu den bedeutendsten Stoffwechselprodukten von *C. maltaromaticum*. Die Bildung von 3-Methylbutanal kann dabei entweder direkt über die  $\alpha$ -Ketosäure-Decarboxylase oder indirekt über die  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenase erfolgen (Afzal et al., 2012). *C. divergens* gehört zu den homofermentativen Milchsäurebakterien, da Glucose hauptsächlich über die Glycolyse zu 2-Hydroxypropanoat verstoffwechselt wird (Bruyn et al., 1988).

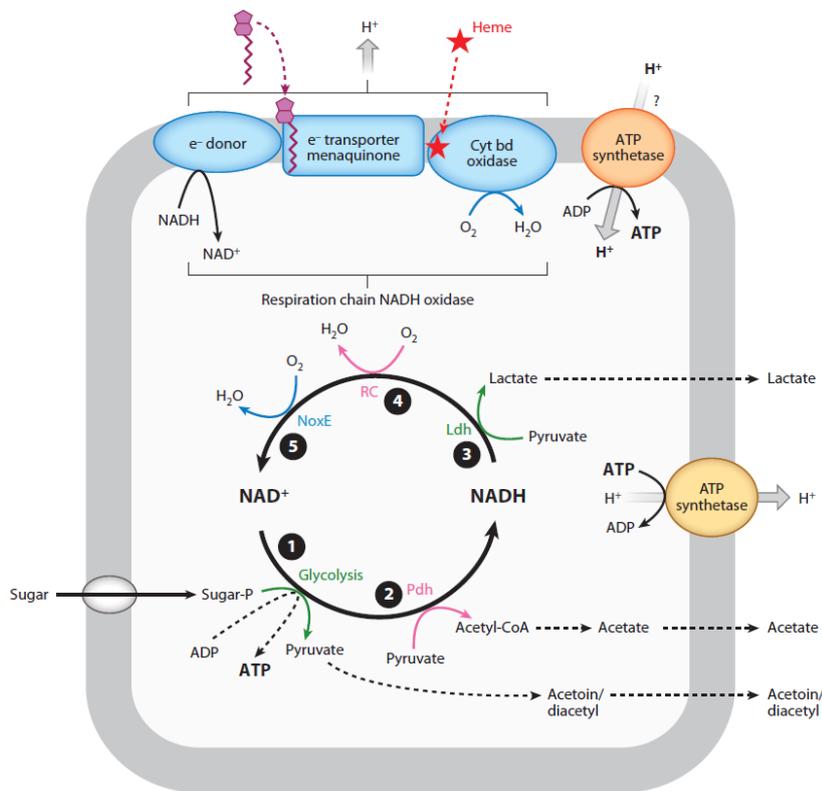


Abbildung 2.2: Kohlenhydratmetabolismus und Atmung von Milchsäurebakterien; 1: Kohlenhydrate werden über die Glycolyse zu Pyruvat umgewandelt unter der Bildung von ATP und NADH, 2: Pyruvat-Dehydrogenase (PDh) stellt zusätzliches NADH aus Pyruvat bereit, wenn O<sub>2</sub> anwesend ist, 3: Lactat-Dehydrogenase (LDh) oxidiert NADH zu Nicotinamadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) bei der Bildung von 2-Hydroxypropanoat aus Pyruvat; wenn O<sub>2</sub> verfügbar ist, wird NADH durch zusätzliche Enzyme oxidiert: 4: Membran-NADH-Oxidase der Atmungskette, 5: cytoplasmatische H<sub>2</sub>O-bildende NADH-Oxidase (NoxE) (Pedersen et al., 2012)

### 2.2.3 Pseudomonaden

Pseudomonaden gehören zu den gramnegativen Mikroorganismen. Sie wachsen überwiegend unter aeroben Bedingungen und haben somit einen oxidativen Stoffwechsel mit O<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor. Einige Stämme von *Pseudomonas* können auch unter anaeroben Verhältnissen wachsen. In diesem Fall ersetzen sie O<sub>2</sub> durch Nitrat, um möglichst effizient Energie zu gewinnen. Nitrat wird dabei über drei Zwischenschritte (Nitrit, Stickstoffoxid, Distickstoffoxid) zu Distickstoff umgewandelt (Arai et al., 2005; Schreiber et al., 2007).

Pseudomonaden können Glucose sowohl über den extra- als auch intrazellulärem Weg zu Gluconat mit Hilfe der Gluconat-Dehydrogenase verstoffwechseln. Vor allem Gluconat spielt eine bedeutende Rolle als Zwischenprodukt zur Bildung von Pyruvat durch den Entner-Doudoroff-Weg (Nychas et al., 1988). Steht Glucose nur noch limitierend zu Verfügung, verändert sich die Stoffwechselrate von *Pseudomonas ssp.* nicht (Gill, 1976), da sie neben Glucose auch weitere Substrate verbrauchen können. Unter aeroben Bedingungen können *Pseudomonas* neben Glu-

cose auch Glucose-6-phosphat, 2-Hydroxypropanoat, Pyruvat, Gluconat, Gluconat-6-phosphat und Aminosäuren verwerten (Nychas et al., 2008), unter Schutzgasatmosphäre und Vakuum Glucose-6-phosphat, Pyruvat, Gluconat, Aminosäuren und Ethansäure (zusammengefasst in Casaburi et al. (2015)).

Haben *Pseudomonas* eine Keimzahl von  $10^7 - 10^8$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht, treten Schleimbildung und die Entwicklung von Fehlgerüchen auf (Nychas et al., 2008). Der gebildete Schleim besteht aus Polysacchariden und wird aus Kohlenhydraten produziert (Evans und Linker, 1973). Die Bildung von Fehlgerüchen erfolgt vor allem, wenn Glucose und 2-Hydroxypropanoat als Nährstoffquelle bereits verstoffwechselt wurden und Pseudomonaden auf andere Energiequellen wie Aminosäuren umsteigen (Nychas et al., 2008). Pseudomonaden können aus den Aminosäuren biogene Amine wie 2-(1H-imidazol-5-yl)-ethanamin (Histamin), 1,4-Butandiamin (Putrescin), 4-(2-Aminoethyl)-phenol (Tyramin), 2-(1H-Indol-3-yl)-ethanamin (Tryptamin), 2-Phenylethanamin und 1,5-Pentandiamin (Cadaverin) herstellen (Balamatsia et al., 2006; Hernández-Jover et al., 1997). Die Bildung der biogenen Amine ist jedoch vom Stamm abhängig (Geornaras et al., 1995).

Viele Stämme (*Ps. fragi*) sind in der Lage Ethylester zu bilden. Diese entstehen durch die Veresterung von Fettsäuren und Ethanol. Letzteres kann durch die Reduzierung von Ethanal synthetisiert werden (Edwards et al., 1987; Ercolini et al., 2010; Reddy et al., 1969; Sato et al., 1992). Bei Stämmen, die nur sehr wenige oder keine Ester bilden, erfolgt die Umwandlung von Fettsäuren durch Oxidation in Aldehyde, Ketone oder Alkohole (Ercolini et al., 2010; Montel et al., 1998).

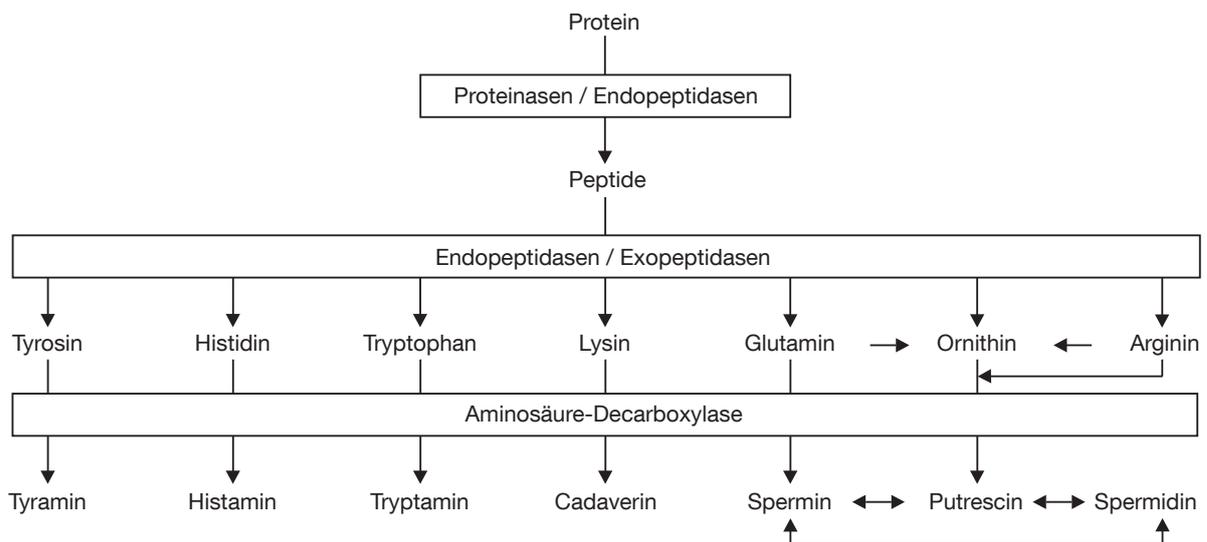


Abbildung 2.3: Bildung biogener Amine, eigene Darstellung nach Ruiz-Capillas und Jiménez-Colmenero (2005)

### 2.2.4 Zusammenfassung der grundsätzlich möglichen flüchtigen Verbindungen, die von Fleisch verderbenden Mikroorganismen gebildet werden

Tabelle 2.3: Grundsätzlich mögliche flüchtige Verbindungen von Fleisch verderbenden Mikroorganismen mit t: Zeit, T: Temperatur, STR: Sauerstofftransmissionsrate der Verpackung, L: Beleuchtung, CO<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub>-Konzentration, V: Kopfraumvolumen, (+): Bildung nimmt mit steigender/steigendem t, T, STR, L, CO<sub>2</sub>, V oder Glucosekonzentration zu, (-): Bildung nimmt mit steigender/steigendem t, T, STR, L, CO<sub>2</sub>, V oder Glucosekonzentration ab, (+/-): kontroverse Ergebnisse

chem. Verbindung	Substrat	Mikroorganismus	Einflussfaktoren	Quelle
<b>Alkohole</b>				
Methanol		Pseudomonaden		Freeman et al. (1976)
Ethanol		<i>B. thermosphacta</i> , Enterobakterien, Milchsäurebakterien, Pseudomonaden	t (+), T (+), CO <sub>2</sub> (-), V (-), pH (+)	Blickstad (1983), Borch und Molin (1989), Dainty et al. (1989), Eilamo et al. (1998), Freeman et al. (1976) und Nychas et al. (2008)
1-Hexanol		Milchsäurebakterien		Casaburi et al. (2011)
2,3-Butandiol	2,3-Butandion	<i>B. thermosphacta</i> , Milchsäurebakterien	Glucose (+), T, pH, O <sub>2</sub> (+)	Nychas et al. (2008) und Pothakos et al. (2014)
3-Methylbutanol		<i>B. thermosphacta</i> , Milchsäurebakterien, Enterobakterien (S. proteamaculans)	Glucose (+), pH (-)	Casaburi et al. (2011), Dainty et al. (1989), Ercolini et al. (2009) und Nychas et al. (2008)
1-Octen-3-ol		Milchsäurebakterien, Enterobakterien (S. proteamaculans)		Casaburi et al. (2011) und Ercolini et al. (2009)
<b>Aldehyde/Ketone</b>				
Hexanal		Milchsäurebakterien		Casaburi et al. (2011)
2-Propanon (Aceton)	Glucose	Milchsäurebakterien	STR (-), L (+)	Eilamo et al. (1998)KEGG Database
2,3-Butandion (Diacetyl)		<i>B. thermosphacta</i> , Milchsäurebakterien	Glucose (-), O <sub>2</sub> (+)	Casaburi et al. (2011), Kandler (1983), Nychas et al. (2008) und Pothakos et al. (2014)

Tabelle 2.3: Fortsetzung

chem. Verbindung	Substrat	Mikroorganismus	Einflussfaktoren	Quelle
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	Glucose, Alanin, 2,3-Butandion	<i>B. thermosphacta</i> , Milchsäurebakterien	Glucose (+/-), pH (+/-), O <sub>2</sub> , T (+/-)	Blickstad und Molin (1984), Blickstad (1983), Borch und Molin (1989), Casaburi et al. (2011), Dainty und Hibbard (1980), Dainty und Hibbard (1983) und Nychas et al. (2008)
Ethanal (Acetaldehyd)		Milchsäurebakterien	O <sub>2</sub> (+)	Pothakos et al. (2014)
<b>Säuren/Ester</b>				
2-Hydroxypropansäure (Milchsäure)	Glucose	Milchsäurebakterien	T (+), pH (+), O <sub>2</sub> (-)	Borch und Molin (1989) und Nychas et al. (2008)
Ethansäure (Essigsäure)	Glucose, Alanin	<i>B. thermosphacta</i> , Milchsäurebakterien	Glucose (+), O <sub>2</sub> (+), pH (+/-), T (+/-)	Blickstad und Molin (1984), Blickstad (1983), Borch und Molin (1989), Dainty und Hibbard (1983), Dainty und Hofman (1983), Nychas et al. (2008) und Pothakos et al. (2014)
Butansäure		Milchsäurebakterien		Casaburi et al. (2011)
Isobutansäure	Valin, Leucin	<i>B. thermosphacta</i>	Glucose (-), T (-), pH (+)	Dainty und Hibbard (1980), Dainty und Hibbard (1983) und Nychas et al. (2008)
3-Methylbutansäure	Valin, Leucin	<i>B. thermosphacta</i>	Glucose (-), T (-), pH (+)	Dainty und Hibbard (1980), Dainty und Hibbard (1983) und Nychas et al. (2008)
Methylester		Pseudomonaden	Glucose (-)	Nychas et al. (2008)
Ethylester		Pseudomonaden	Glucose (-)	Nychas et al. (2008)
Ethyloctanoat		Milchsäurebakterien		Ercolini et al. (2009)
<b>Amine</b>				
1,4-Butandiamin (Putrescin)	Ornithin, Arginin			García-Lopez et al. (1998)
1,5-Pentandiamin (Cadaverin)	Lysin			García-Lopez et al. (1998)
4-(2-Aminoethyl)-phenol (Tyramin)		<i>B. thermosphacta</i>		Nowak und Czynowska, 2011

## 2.3 Verderb von Fleisch durch Oxidation

Tabelle 2.3: Fortsetzung

chem. Verbindung	Substrat	Mikroorganismus	Einflussfaktoren	Quelle
2-(1H-imidazol-5-yl)-ethanamin (Histamin)		<i>B. thermosphacta</i>		Casaburi et al. (2014) und Nowak und Czynowska (2011)
Methanamin		Pseudomonaden		García-Lopez et al. (1998)
N-Methylmethanamin		Pseudomonaden		García-Lopez et al. (1998)
N,N-Dimethylmethanamin		Pseudomonaden		García-Lopez et al. (1998)
<b>Sulfide/Thiole</b>				
Sulfan (Schwefelwasserstoff)		Pseudomonaden		Freeman et al. (1976)
Methylsulfanylmethan (Dimethylsulfid)	Methionin, Methanthiol	Milchsäurebakterien, Pseudomonaden, Enterobakterien	t (+), T (+)	Casaburi et al. (2011), Dainty et al. (1989), Eilamo et al. (1998), García-Lopez et al. (1998), McMeekin (1982) und Nychas et al. (2008)
Methyldisulfanylmethan (Dimethyldisulfid)	Methionin	Pseudomonaden, Milchsäurebakterien	t (+), T (+), CO <sub>2</sub> (-), V (-), STR (-)	Casaburi et al. (2011), Dainty et al. (1989), Eilamo et al. (1998), Ercolini et al. (2011) und Nychas et al. (2008)
Methandithion		Pseudomonaden ( <i>fragi</i> ), <i>C. divergens</i>	t (+), T (+), CO <sub>2</sub> (-)	Eilamo et al. (1998) und Ercolini et al. (2009)

## 2.3 Verderb von Fleisch durch Oxidation

Neben mikrobiellem Verderb von Fleisch kann es auch zu Qualitätsverminderungen durch oxidative Vorgänge kommen, wodurch Fehlgerüche entstehen und die Zartheit des Fleisches verringert wird. Dies ist vor allem der Fall, wenn das Fleisch unter einer O<sub>2</sub>-angereicherten Schutzgasatmosphäre verpackt wird. Bereits bei einem O<sub>2</sub>-Anteil von 50 % wurde bei Rindfleisch eine hohe Ranzigkeit gemessen (Resconi et al., 2012). Bei der Oxidation wird zwischen Lipid- und Proteinoxidation unterschieden.

Die Oxidation von Lipiden basiert auf einer Radikalkettenreaktion, bei der allylständige Wasserstoffatome der Lipide abgespalten werden. Hierbei entstehen in einem ersten Schritt Peroxy-, Alkoxy- oder Alkylradikale. Alkylradikale reagieren weiter mit O<sub>2</sub>, um Peroxyradikale zu bilden.

Peroxy- und Alkoxyradikale spalten in einem weiteren Schritt ein Wasserstoffatom von einer Alkylkette eines anderen Moleküls ab, wodurch Fettsäurehydroperoxide, Alkohole und Alkylradikale entstehen. Die Fettsäurehydroperoxide können durch Kettenverzweigungen weiter in Radikale umgewandelt werden, was zu einer Beschleunigung der Kettenreaktion führt (Heiss und Eichner, 1995; Min und Ahn, 2005). Fettsäuren wie Arachidon- und Linolsäure werden somit in flüchtige Verbindungen wie Hexanal, 2-Octenal, 2-Nonenal, 1-Octen-3-ol, Methyl-5-oxopentanoat, Pentan und 2,4-Decadienal zersetzt (Artz et al., 1993; Calkins und Hodgen, 2007; Ullrich und Grosch, 1987).

Die Proteinoxidation verläuft ähnlich wie die Lipidoxidation. Sind sauerstoffspezifische Spezies vorhanden, werden Wasserstoffatome von den Proteinen abgespalten. Das bei dieser Reaktion entstandene kohlenstoffzentrierte Radikal wird anschließend zu einem Peroxyradikal umgesetzt, wenn  $O_2$  vorhanden ist. Zudem entstehen Alkylperoxide durch die Abspaltung eines Wasserstoffatoms von einem anderen Molekül. Reagieren die entstandenen Produkte weiter mit Hydroperoxyradikalen, werden Alkoxyradikale und ihre Hydroxylderivate gebildet (Lund et al., 2011). Durch die Oxidation der Aminosäuren können eine Vielzahl an Verbindungen produziert werden. Dazu zählen beispielsweise Alkohole, Carbonylverbindungen, 3-Methylbutansäure, Isovaleraldehyd und Methioninsulfoxid (Bekhit et al., 2013).

## 2.4 Bildung von flüchtigen organischen Verbindungen während der Lagerung von frischem, Schutzgas-verpacktem Fleisch

Beim Verderb von Fleisch entstehen immer flüchtige und nichtflüchtige Verbindungen, von denen einige sensorisch äußerst aktiv sind. In den letzten Jahren wurden viele Untersuchungen durchgeführt, diese flüchtigen organischen Verbindungen (VOCs) zu identifizieren und im Hinblick auf ihre Eignung als verderbsanzeigende Verbindungen zu prüfen. Der Fokus der Untersuchungen lag dabei auf verpacktem Rinderhackfleisch. Es gibt nur eine limitierte Anzahl an Veröffentlichungen, die Schutzgas-verpacktes Hähnchenfleisch thematisieren. Hierbei wurde überwiegend die Bildung biogener Amine berücksichtigt.

Die Identifizierung von VOCs als mögliche Verderbsindikatoren hängt von der Wahl der Methode und dem experimentellen Aufbau ab (Paczkowski und Schütz, 2011). In den meisten Fällen erfolgte bislang die Detektion und Quantifizierung der beim Fleischverderb gebildeten flüchtigen Verbindungen durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) (Argyri et al., 2015; Dainty et al., 1989; Eilamo et al., 1998; Insausti et al., 2002; Jackson et al., 1992). Obwohl GC-MS eine sehr empfindliche (Empfindlichkeit bis zu 0,1 ppt<sub>v</sub>) und verlässliche Methode ist, sind aufgrund der zeitlichen Auflösung nur intermittierende Messungen möglich, wodurch wichtige Informationen bezüglich des Fleischverderbs verloren gehen können. Zusätzlich muss in Abhängigkeit vom nachzuweisenden Stoff die Probe in der Regel zeitaufwändig aufkonzentriert werden (Blake et al., 2009). Eine oft verwendete Möglichkeit, flüchtige Stoffe aufzukonzentrieren, ist das Verfahren der Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) (Argyri et al., 2015;

## 2.4 Bildung von flüchtigen organischen Verbindungen während der Lagerung von frischem, Schutzgas-verpacktem Fleisch

---

Bhattacharjee et al., 2011; Pérez et al., 2008). Hierbei wird ein Adsorbiermaterial in den Kopfraum der Probe gehalten, an welches flüchtige Stoffe adsorbieren. Dabei kommt es zu einer Anreicherung der Analyte. Ein Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, dass die Oberfläche der HS-SPME-Fasern für unterschiedliche Klassen von VOCs modifiziert sind (Paczkowski und Schütz, 2011). Somit wird die Anreicherungsfähigkeit der Stoffe an die Faser beeinflusst. Zudem konkurrieren die flüchtigen Verbindungen miteinander und die Anreicherung erfolgt meistens bei höheren Temperaturen als beim eigentlichen Versuch, um den Dampfdruck der zu untersuchenden Analyte zu erhöhen und damit das Detektionslimit zu erniedrigen. Somit ist eine genaue Quantifizierung der detektierten Analyte nicht möglich.

### 2.4.1 Alkohole

Eilamo et al. (1998) untersuchten die Entstehung flüchtiger Verbindungen bei frischen Hähnchenschenkeln in Abhängigkeit verschiedener Lager- und Verpackungsbedingungen. Sie zeigten, dass die Konzentration von Ethanol mit steigendem CO<sub>2</sub>-Gehalt und Kopfraumvolumen der Verpackung sank. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Bildung von Ethanol stärker durch die Lagerzeit als durch die Temperatur beeinflusst wurde. Weitere Faktoren wie Sauerstofftransmissionsrate der Verpackung und Beleuchtung zeigten nur geringe Auswirkungen. In der Studie von Saraiva et al. (2015) wurden VOCs als mögliche Verderbsanzeiger von Vakuum- und Schutzgas-verpacktem (70 % O<sub>2</sub>, 20 % CO<sub>2</sub> und 10 % N<sub>2</sub>) Rindfleisch untersucht. Die beiden Substanzen 2-Methylbutanol und 3-Methylbutanol nahmen dabei innerhalb des Beobachtungszeitraumes signifikant in ihrer Konzentration zu, wobei 2-Methylbutanol nur bei Schutzgas-verpackten Proben detektiert wurde.

### 2.4.2 Aldehyde/Ketone

Ercolini et al. (2011) untersuchten den Einfluss von verschiedenen Verpackungsbedingungen auf die Bildungen von VOCs bei Rindfleisch. Das sog. "Volatilom" unter Schutzgasbedingungen (60 % O<sub>2</sub> und 40 % CO<sub>2</sub>) wurde hauptsächlich durch 3-Hydroxy-2-butanon bestimmt, dessen Konzentration mit dem Vorkommen von *B. thermosphacta* korrelierte. Dies ist in Übereinstimmung mit Jääskeläinen et al. (2016), welche auch VOCs während der Lagerung von Schutzgas-verpacktem (80 % O<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub>) Rindfleisch detektierten. Mit der Lagerzeit bildete sich bei den Proben ein buttriges Fehl aroma, welches durch die Produktion von 3-Hydroxy-2-butanon und 2,3-Butandion hervorgerufen wurde. Diese beiden VOCs stammten aus dem Stoffwechsel von *Leuconostoc*. Weiterhin stiegen die Konzentrationen von Hexanal und Nonanal während des Versuchszeitraumes durch die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren. In der Studie von Insausti et al. (2002) wurden VOCs bei der Lagerung von Schutzgas-verpacktem (60 % O<sub>2</sub>, 30 % CO<sub>2</sub> und 10 % N<sub>2</sub>) Rindfleisch identifiziert. Es zeigte sich, dass mit dem Anstieg von 2-Propanon die Qualität des Rindfleisches abnahm.

Andere VOCs wurden von Saraiva et al. (2015) als mögliche Verderbsmarker identifiziert. In ihrer Studie wiesen sie nach, dass 3,5-Octandion und 3-Methylbutanal in signifikanten Mengen während der Lagerung von Rindfleisch unter Schutzgas (70 % O<sub>2</sub>, 20 % CO<sub>2</sub> und 10 % N<sub>2</sub>) und Vakuum gebildet wurden, während 2,3-Octandion und 2-Methylbutanal nur bei Schutzgas-verpackten Proben gefunden wurden. Olivares et al. (2012) untersuchten die Bildung von VOCs bei Schutzgas-verpacktem (80 % O<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub>) Rindfleisch von zwei verschiedenen Lieferanten. Deutliche Konzentrationsunterschiede von 2-Propanon, Ethanal, Propionaldehyd, 2-Pentalen und 2-Heptenal wurden nach 8 Tagen festgestellt, als für das Fleisch ein Wert für Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (TBARS) von 2 mg Malondialdehyd (MDA)/kg ermittelt wurde. Dieser Wert gilt als kritischer Grenzwert für die Lipidoxidation, bis zu dem das Fleisch noch keine Fehlgerüche aufweist (Campo et al., 2006). Die Konzentrationen in den VOCs zwischen den beiden Lieferanten unterschieden sich bis auf 2-Pentalen signifikant.

### 2.4.3 Säuren/Ester

Jackson et al. (1992) analysierten den Einfluss auf die Bildung von VOCs während der Lagerung von Rindfleisch in Abhängigkeit von verschiedenen Verpackungsarten. Sie fanden heraus, dass unter einer O<sub>2</sub>-reichen Atmosphäre (80 % O<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub>) die Bildung von Ethylethanoat mit der Entstehung von Fehlgerüchen korrelierte. Weiterhin stieg bei der Lagerung von Rindfleisch unter einer Schutzgasatmosphäre von 20 % CO<sub>2</sub> und 80 % O<sub>2</sub> die Konzentration von Ethansäure mit der Lagerzeit (Jääskeläinen et al., 2016). Butansäure wurde bei Schutzgas-verpacktem (80 % O<sub>2</sub> und 20 % CO<sub>2</sub>) Rindfleisch identifiziert, als das Fleisch den Schwellenwert (2 mg MDA/kg) erreichte, sensorisch abgelehnt zu werden. In dieser Studie wurde Fleisch von verschiedenen Lieferanten untersucht. Die Konzentration von Butansäure stieg dabei beim Fleisch von einem Lieferanten schneller im Vergleich zum zweiten Lieferanten (Olivares et al., 2012).

### 2.4.4 Amine

In der Studie von Rokka et al. (2004) wurde der Einfluss der Temperatur auf die Bildung von biogenen Aminen von Schutzgas-verpackter (80 % CO<sub>2</sub> und 20 % N<sub>2</sub>) Hähnchenbrust untersucht. Es zeigte sich, dass bei höheren Temperaturen (6,1 °C; 7,4 °C; 8,3 °C) die Konzentration von 4-(2-Aminoethyl)-phenol (Tyramin) direkt nach dem Verpacken stieg, während die Bildung von 1,4-Butandiamin (Putrescin) erst nach einer Lagerzeit von 9 Tagen bei 6,5 und 7,4 °C erfolgte. Bei Lagerbedingungen < 6,1 °C stieg die Konzentration von 4-(2-Aminoethyl)-phenol (Tyramin) nur langsam, während eine Produktion von 1,4-Butandiamin (Putrescin) und 1,5-Pentandiamin (Cadaverin) nicht stattfand. Da die Konzentrationsänderungen dieser Amine neben Zeit und Temperatur auch die mikrobiologischen Eigenschaften des Fleisches widerspiegelten, wurden 4-(2-Aminoethyl)-phenol (Tyramin), 1,5-Pentandiamin (Cadaverin) und 1,4-Butandiamin (Putrescin) als potentielle Indikatoren betrachtet.

## 2.4 Bildung von flüchtigen organischen Verbindungen während der Lagerung von frischem, Schutzgas-verpacktem Fleisch

---

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Balamatsia et al. (2006) berichtet. Sie bewerteten die Eignung biogener Amine zur Bestimmung des Verderbszustandes von Schutzgas-verpackter (30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub>) Hähnchenbrust. Die Konzentration von 1,4-Butandiamin (Putrescin) und 1,5-Pentandiamin (Cadaverin) stieg kontinuierlich mit der Lagerzeit, während 4-(2-Aminoethyl)-phenol (Tyramin) nur in geringen Mengen detektiert wurde. N,N'-bis(3-Aminopropyl)-butan-1,4-diamin (Spermin) und N'-(3-Aminopropyl)-butan-1,4-diamin (Spermidin) hingegen zeigten eine Abnahme in ihrer Konzentration. Den mikrobiologischen und sensorischen Ergebnissen entsprechend schlussfolgerten die Autoren, dass der sog. Biogene-Amin-Index (Summe von 1,4-Butandiamin (Putrescin), 1,5-Pentandiamin (Cadaverin) und 4-(2-Aminoethyl)-phenol (Tyramin)) (BAI) eine Möglichkeit ist, die Fleischqualität zu überwachen. Diese Resultate wurden auch von Fraqueza et al. (2012) bestätigt, die die Einflüsse von unterschiedlichen Schutzgasatmosphären auf die Bildung von biogenen Aminen bei Truthahnfleisch auswerteten.

Balamatsia et al. (2007) erweiterten ihre Studie, in der sie die gesamten flüchtigen Amine von Schutzgas-verpackten (5 % O<sub>2</sub>, 30 % CO<sub>2</sub> und 65 % N<sub>2</sub>; 5 % O<sub>2</sub>, 65 % CO<sub>2</sub> und 30 % N<sub>2</sub>) Hähnchenbrustfilets bestimmten. Aufgrund der guten Korrelation zwischen der Bildung von gesamten basischen flüchtigen Stickstoffverbindungen (TVB-N) und Trimethylamin-Stickstoff (TMA-N), der Entwicklung der Keimzahlen sowie sensorischer Auswertungen, empfahlen sie TVB-N und TMA-N als mögliche Frischeindikatoren. Gallas et al. (2010) zeigten, dass der BAI zwischen den einzelnen Proben aufgrund von individuellen Einflüssen auf die Bildung der biogenen Amine extrem schwanken kann. Unter N<sub>2</sub>-reicher Atmosphäre (25 % CO<sub>2</sub> und 75 % N<sub>2</sub>) war der BAI deutlich höher als bei O<sub>2</sub>-reicher Atmosphäre (75 % O<sub>2</sub> und 25 % CO<sub>2</sub>). Zudem wurden in der N<sub>2</sub>-reichen Atmosphäre hauptsächlich 1,4-Butandiamin (Putrescin) und 1,5-Pentandiamin (Cadaverin) detektiert, in der anderen 1,4-Butandiamin (Putrescin) und Spermin. Die Unterschiede im BAI wurde durch das Wachstum coliformer Bakterien unter N<sub>2</sub>-reicher Atmosphäre hervorgerufen.

García-Lopez et al., 1998 hingegen berichteten, dass biogene Amine nicht als Verderbsindikatoren geeignet sind, da die Detektion dieser Amine erst möglich ist, wenn die Gesamtkeimzahl 10<sup>7</sup> KBE/cm<sup>2</sup> übersteigt.

### 2.4.5 Sulfide/Thiole

Die Auswirkungen von unterschiedlichen Verpackungs- und Lagerbedingungen auf die Synthese von flüchtigen Verbindungen bei Hähnchenfleisch wurden von Eilamo et al. (1998) untersucht. Ihren Ergebnissen zufolge wurde die Bildung von Methylsulfanylmethan (Dimethylsulfid), Methandithion und Methyldisulfanylmethan (Dimethyldisulfid) mehr durch die Temperatur als durch die Lagerzeit beeinflusst. Zudem korrelierte die Menge an Methyldisulfanylmethan gut mit dem Geruch des Fleisches und der Zahl an sulfitreduzierenden Clostridien. Aus diesem Grund wurde Methyldisulfanylmethan als möglicher Indikator vorgeschlagen. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Rajamäki et al. (2006). Auch sie wiesen eine Korrelation zwischen Lagertemperatur und Konzentrationsänderung von Methyldisulfanylmethan (Dimethyldisulfid) nach.

### 2.4.6 Alkane/Alkene

Insausti et al. (2002) untersuchten den Einfluss von fünf verschiedenen Rassen auf die Bildung von VOCs bei Schutzgas-verpacktem (60 % O<sub>2</sub>, 30 % CO<sub>2</sub> und 10 % N<sub>2</sub>) Rindfleisch. Sie fanden heraus, dass die Qualitätsabnahme des Fleisches mit der Zeit durch den Konzentrationsanstieg von 2,3,3-Trimethylpentan, 2,2,5-Trimethylhexan, 3-Octen, 3-Methyl-2-hepten sowie 2-Octen charakterisiert wurde. Auch Jackson et al. (1992) analysierten die Bildung von VOCs während des Verderbs von Rindfleisch verpackt unter verschiedenen Gasatmosphären. Bei einer Schutzgaszusammensetzung von 20 % CO<sub>2</sub> und 80 % O<sub>2</sub> detektierten sie 1-Hexen, 3-Hexen, Benzen und 1-Hepten, als das Fleisch sensorisch nicht mehr als frisch betrachtet wurde. 3-Methylpentan wurde von Saraiva et al. (2015) bei Schutzgas-verpacktem (70 % O<sub>2</sub>, 20 % CO<sub>2</sub> und 10 % N<sub>2</sub>) und Vakuum-verpacktem Rindfleisch detektiert. Die Konzentration dieses VOCs sank während der Lagerung und wurde daher als Nachweis des frühen Verderbs in Betracht gezogen.

Tabelle 2.4: In der Literatur beschriebene flüchtige organische Verbindungen während der Lagerung von Schutzgas-verpacktem Rind- und Hähnchenfleisch

chem. Verbindung	Schutzgaszusammensetzung			Fleischart	Quelle
	O <sub>2</sub> in %	CO <sub>2</sub> in %	N <sub>2</sub> in %		
<b>Alkohole</b>					
2-Phenylethanol	60	40	-	Rind	Ercolini et al. (2011)
2,3-Butandiol	60	40	-	Rind	Ercolini et al. (2011)
1-Octen-3-ol	60	40	-	Rind	Ercolini et al. (2011)
	80	20	-	Rind	Jääskeläinen et al. (2016)
Ethanol	0, 2, 4	20, 50, 80	Stützgas	Huhn	Eilamo et al. (1998)
2-Methylbutanol	70	20	10	Rind	Saraiva et al. (2015)
3-Methylbutanol	70	20	10	Rind	Saraiva et al. (2015)
1-Pentanol	70	20	10	Rind	Saraiva et al. (2015)
1-Hexanol	70	20	10	Rind	Saraiva et al. (2015)

## 2.4 Bildung von flüchtigen organischen Verbindungen während der Lagerung von frischem, Schutzgas-verpacktem Fleisch

Tabelle 2.4: Fortsetzung

chem. Verbindung	Schutzgaszusammensetzung			Fleischart	Quelle
	O <sub>2</sub> in %	CO <sub>2</sub> in %	N <sub>2</sub> in %		
<b>Aldehyde/Ketone</b>					
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	60	40	-	Rind	Ercolini et al. (2011)
	80	20	-	Rind	Jääskeläinen et al. (2016)
2,3-Butandion (Diacetyl)	80	20	-	Rind	Jääskeläinen et al. (2016)
2-Propanon (Aceton)	60	30	10	Rind	Insausti et al. (2002)
	80	20	-	Rind	Olivares et al. (2012)
2,3-Octandion	70	20	10	Rind	Saraiva et al. (2015)
3,5-Octandion	70	20	10	Rind	Saraiva et al. (2015)
Ethanal (Acetaldehyd)	80	20	-	Rind	Olivares et al. (2012)
Propionaldehyd	80	20	-	Rind	Olivares et al. (2012)
2-Pentenal	80	20	-	Rind	Olivares et al. (2012)
Hexanal	80	20	-	Rind	Jääskeläinen et al. (2016)
Nonanal	80	20	-	Rind	Jääskeläinen et al. (2016)
2-Heptenal	80	20	-	Rind	Olivares et al. (2012)
2-Methylbutanal	70	20	10	Rind	Saraiva et al. (2015)
3-Methylbutanal	70	20	10	Rind	Saraiva et al. (2015)
<b>Säuren/Ester</b>					
Ethansäure (Essigsäure)	80	20	-	Rind	Jääskeläinen et al. (2016)
Butansäure	60	40	-	Rind	Ercolini et al. (2011)
	80	20	-	Rind	Olivares et al. (2012)
Hexansäure	60	40	-	Rind	Ercolini et al. (2011)
Ethyl octanoat	60	40	-	Rind	Ercolini et al. (2011)
Ethylethanoat	80	20	-	Rind	Jackson et al. (1992)
<b>Amine</b>					
4-(2-Aminoethyl)-phenol (Tyramin)	-	80	20	Huhn	Rokka et al. (2004)
1,5-Pentandiamin (Cadaverin)	-	80	20	Huhn	Rokka et al. (2004)
	-	30	70	Huhn	Balamatsia et al. (2006)
1,4-Butandiamin (Putrescin)	-	80	20	Huhn	Rokka et al. (2004)
	-	30	70	Huhn	Balamatsia et al. (2006)
TVB-N	5	30, 65	65, 30	Huhn	Balamatsia et al. (2007)
TMA-N	5	30, 65	65, 30	Huhn	Balamatsia et al. (2007)
BAI	75	25	75	Huhn	Gallas et al. (2010)
<b>Sulfide/Thiole</b>					
Methylsulfanylmethan (Dimethylsulfid)	60	40		Rind	Ercolini et al. (2011)

Tabelle 2.4: Fortsetzung

chem. Verbindung	Schutzgaszusammensetzung			Fleischart	Quelle
	O <sub>2</sub> in %	CO <sub>2</sub> in %	N <sub>2</sub> in %		
	0, 2, 4	20, 50, 80	Stützgas	Huhn	Eilamo et al. (1998)
	80	20	-	Rind	Olivares et al. (2012)
Methyldisulfanylmethan (Dimethyldisulfid)	0, 2, 4	20, 50, 80	Stützgas	Huhn	Eilamo et al. (1998)
	-	80	20	Huhn	Rajamäki et al. (2006)
Methandithion	0, 2, 4	20, 50, 80	Stützgas	Huhn	Eilamo et al. (1998)
<b>Alkane/Alkene</b>					
3-Methylpentan	70	20	10	Rind	Saraiva et al. (2015)
2,3,3-Trimethylpentan	60	30	10	Rind	Insausti et al. (2002)
3-Octen	60	30	10	Rind	Insausti et al. (2002)
3-Methyl-2-hepten	60	30	10	Rind	Insausti et al. (2002)
2-Octen	60	30	10	Rind	Insausti et al. (2002)
1-Hexen	80	20	-	Rind	Jackson et al. (1992)
3-Hexen	80	20	-	Rind	Jackson et al. (1992)
Benzen	80	20	-	Rind	Jackson et al. (1992)
1-Hepten	80	20	-	Rind	Jackson et al. (1992)

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass eine Vielzahl an (unterschiedlichen) flüchtigen Substanzen während des Verderbs von Fleisch entsteht. Die Bildung und Freisetzung der Substanzen wird dabei von vielen Faktoren beeinflusst. Zu den wichtigsten Einflussfaktoren gehören:

- Versuchsbedingungen (analytische Methode, experimenteller Aufbau)
- Lagerbedingungen (Schutzgaszusammensetzung, Temperatur, Lagerdauer, Kopfraumvolumen)
- Mikrobiotazusammensetzung
- metabolische Aktivität der Mikroorganismen
- Herkunft des Fleisches
- Fleischsorte (Rind, Hähnchen)

Somit stellt der Fleischverderb und damit verbunden die Bildung und Freisetzung von flüchtigen Substanzen einen sehr komplexen Prozess dar.

## 2.5 Sensorische Veränderungen beim Fleischverderb

Die sensorische Wahrnehmung von Fleisch gehört neben Zartheit zu den bedeutendsten Einflüssen auf die Verbraucherakzeptanz. Bereits kleine Veränderungen in der sensorischen Bewertung können eine entscheidende Wirkung auf den Gesamteindruck haben (Huffman et al., 1996; Platter et al., 2003). Zu den sensorischen Kriterien gehören u. a. Aussehen (Farbe), Bildung von Fehlgerüchen und Schleim, wobei die Entstehung von Fehlgerüchen dabei das erste Zeichen für den Verderb von Fleisch ist. Das Aroma von Fleisch hängt von vielen Einflüssen ab. Dazu zählen Produktion, Verarbeitung, Rasse, Alter, Futtermittel, pH-Wert und Anwesenheit von freien Aminosäuren (Jayasena et al., 2013).

Der Geruch von Fleisch besteht im Wesentlichen aus flüchtigen Fettsäuren, Aldehyden, Alkoholen, Estern, Benzolen, Schwefelverbindungen und Terpenen. Je nach Konzentration tragen sie zu einem positiven oder negativen sensorischen Eindruck bei. Die Konzentration der einzelnen Verbindungen hängt dabei von der Tierspezies, Alter, Futtermittel, Verarbeitung und Lagerbedingungen ab (Casaburi et al., 2015). Von allen Verbindungen, die während der Lagerung von Lebensmitteln entstehen, sind nur eine limitierte Anzahl entscheidend für das Aroma. Als aromatische Verbindungen werden hauptsächlich diejenigen bezeichnet, deren Konzentrationen höher als der Geruchsschwellenwert liegt. Verbindungen mit einer geringeren Konzentration als der Geruchsschwellenwert tragen nur zum Aroma bei, wenn Mischungen aus ihnen den Schwellenwert überschreiten. Besondere Bedeutung kommt den Schlüsselaromakomponenten zu, da sie den charakteristischen Geruch eines Lebensmittels bestimmen. Der Geruchsschwellenwert beschreibt die niedrigste Konzentration eines Stoffes, bei welcher das Aroma eines Stoffes gerade wahrgenommen werden kann. Der Geruchsschwellenwert ist dabei abhängig von der Temperatur und dem Medium (pH-Wert) sowie der Wasser- und Öllöslichkeit des Stoffes (Belitz et al., 2009; Nollet, 2004).

Frisches Fleisch besitzt nur ein schwaches Aroma, welches meistens mit den Attributen "*blutig*", "*metallisch*" und "*salzig*" beschrieben wird (Joo und Kim, 2011). Bis zu einer mikrobiellen Kontamination  $<10^7$  KBE/g gilt Fleisch sensorisch als "frisch". Erste Fehlgerüche sind wahrnehmbar, wenn die Mikrobiota eine Gesamtkeimzahl von mindestens  $>10^8$  KBE/g erreicht hat. Typische Aromen von "nicht frischem" Fleisch sind "*Molkerei*", "*buttrig*", "*fettig*" und "*käsigt*". Mit steigender Keimzahl ändert sich der Geruch von Fleisch zu einem "*süßen*", "*fruchtigen*" bis hin zu einem "*verdorbenen*" Aroma ( $>10^9$  KBE/g) (Dainty et al., 1985).

Nach 7 Tagen aerober Lagerung wurde der Geruch von Hähnchenfleisch mit "*Abwaschlappen*", "*nasser Hund*" und "*Dosenmais*" assoziiert bedingt durch die Bildung von Schwefel- und Stickstoffverbindungen (Baston und Barna, 2010). Unter  $O_2$ -reicher Schutzgasatmosphäre verpackt, bildet sich bei Hähnchenfleisch ein ranziges Aroma aus, das durch Protein- und Lipidoxidation hervorgerufen wird (Jongberg et al., 2014). Dies liegt vor allem daran, dass Hähnchenfleisch im Vergleich zu rotem Fleisch reicher an ungesättigten Fettsäuren ist (Jayasena et al., 2013). Aber

auch bei Schutzgas-verpacktem Rindfleisch entstehen bedingt durch den hohen zur Umrötung des Fleisches wichtigen O<sub>2</sub>-Gehalt ranzige Noten. Diese werden durch die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren hervorgerufen (Zakrys-Waliwander et al., 2011). Neben "ranzig" wird das Aroma auch mit "käsig" oder "buttrig" beschrieben (Borch et al., 1996). Dies ist bedingt durch die Bildung und Freisetzung von 3-Hydroxy-2-butanon, 2,3-Butandion und 3-Methylbutanol. Die Bildung der ersten beiden VOCs wird bei Schutzgas-verpacktem Rindfleisch mit dem Stoffwechsel von Milchsäurebakterien in Verbindung gebracht (Dainty et al., 1985; Jääskeläinen et al., 2016).

Tabelle 2.5: Geruchsbeschreibung flüchtiger Verbindungen von Fleisch mit H: Hähnchenfleisch und R: Rindfleisch, a: aerob verpackt und b: unter Schutzgas verpackt, F: im Fleisch detektiert, K: im Kopfraum der Probe detektiert, ppm: Teile pro Million, ppm<sub>v</sub>: Volumnanteile pro Million, nda: keine Daten verfügbar

chem. Verbindung	Geruchsbeschreibung	Geruchsschwelle in Luft in mg/kg bzw. ppm	Konzentration im Kopfraum	Quelle
<b>Alkohole</b>				
Ethanol	Alkohol, mild	0,52	0,314 ppm <sub>v</sub> <sup>R,b</sup> >0,01 - 0,3 ppm <sup>H,b</sup>	Ioannidis et al. (2015), Lecanu et al. (2002), Nagata (2003) und Olivares et al. (2012)
3-Methylbutanol	fruchtig, Alkohol, Whiskey	0,0017	>0,03 - 0,1 ppm <sup>H,b</sup>	Ioannidis et al. (2015), Lecanu et al. (2002) und Nagata (2003)
<b>Aldehyde/Ketone</b>				
Ethanal (Acetaldehyd)	frisch, grün, ätherisch, stechend	0,0015	0,051 - 0,101 ppm <sub>v</sub> <sup>R,b</sup>	Amoore und Hautala (1983), Czerny et al. (2008), Jirovetz et al. (2002), Nagata (2003) und Olivares et al. (2012)
Propionaldehyd	Alkohol, Whiskey, Wein, Kakao, nussig	nda	0,003 - 0,014 ppm <sub>v</sub> <sup>R,b</sup>	Olivares et al. (2012) und The Good Scents Company (2015)
2-Pentenal	stechend, grün, fruchtig, Apfel	nda	0,011 - 0,025 ppm <sub>v</sub> <sup>R,b</sup>	Olivares et al. (2012) und The Good Scents Company (2015)
Hexanal	grün, grasig, fettig	nda	nda	Jirovetz et al. (2002)

## 2.5 Sensorische Veränderungen beim Fleischverderb

Tabelle 2.6: Fortsetzung

chem. Verbindung	Geruchsbeschreibung	Geruchsschwelle in Luft in mg/kg bzw.	Konzentration im Kopfraum	Quelle
2-Heptenal	grün, frisch, fruchtig, Apfel, fettig	nda	0,006 - 0,016 ppm <sub>v</sub> <sup>R,b</sup>	Olivares et al. (2012) und The Good Scents Company (2015)
2-Propanon (Aceton)	ätherisch, fruchtig	42	0,2 - 0,737 ppm <sub>v</sub> <sup>R,b</sup> >0,04 - 0,4 ppm <sup>H,b</sup>	Ioannidis et al. (2015), Lecanu et al. (2002), Nagata (2003) und Olivares et al. (2012)
3-Hydroxy-2-butanon (Acetoin)	Butter	nda	>0,003 - 0,1 ppm <sup>H,b</sup>	Ioannidis et al. (2015) und Lecanu et al. (2002)
<b>Säuren/Ester</b>				
Ethansäure (Essigsäure)	Essig, stechend, sauer	0,006	0,017 - 0,028 ppm <sub>v</sub> <sup>R,b</sup>	Jirovetz et al. (2002), Lecanu et al. (2002), Nagata (2003) und Olivares et al. (2012)
Butansäure	Butter, ölig	0,00019	0,003 - 0,024 ppm <sub>v</sub> <sup>R,b</sup>	Nagata (2003), Olivares et al. (2012) und Pérez-Silva et al. (2006)
<b>Sulfide/Thiole</b>				
Methylsulfanylmethan (Dimethylsulfid)	Kohl, Spargel, faulig, frischer Kürbis, Mais	0,003	0,009 - 0,052 ppm <sub>v</sub> <sup>R,b</sup> 0 - 0,4 ppm <sup>H,b</sup> 1,3 - 1,6 ppm <sub>v</sub> <sup>H,b</sup>	Ioannidis et al. (2015), Lecanu et al. (2002), Nagata (2003), Olivares et al. (2012), Peterson und Reineccius (2003) und Rajamäki et al. (2006)
Methyldisulfanylmethan (Dimethyldisulfid)	Blumenkohl, Knoblauch	0,0022	0,005 - 0,035 ppm <sub>v</sub> <sup>R,b</sup>	Lecanu et al. (2002), Nagata (2003) und Olivares et al. (2012)

Tabelle 2.6: Fortsetzung

chem. Verbindung	Geruchsbeschreibung	Geruchsschwelle in Luft in mg/kg bzw.	Konzentration im Kopfraum	Quelle
Methandithion	Gemüse, schweflig	0,21	0,026 - 0,079 ppm <sup>R,b</sup>	Leonardos et al. (1969), Nagata (2003) und Olivares et al. (2012)

Tabelle 2.6: Geruchsschwellenwerte und Geruchsbeschreibung von Aminen in Fleisch mit H: Hähnchenfleisch und R: Rindfleisch, a: aerob verpackt und b: unter Schutzgas verpackt, nda: keine Daten verfügbar

chem. Verbindung	Geruchsbeschreibung	Geruchsschwelle in Luft in mg/kg bzw. ppm	Konzentration im Fleisch	Quelle
1,4-Butandiamin (Putrescin)	piperidinartig, Verwesung	nda	75,5 mg/kg <sup>H,a</sup> 65,3 mg/kg <sup>H,b</sup> 2,2 - 7,4 mg/kg <sup>H,b</sup> 26,5 - 72,5 mg/kg <sup>H,b</sup>	Balamatsia et al. (2006), Gallas et al. (2010), Rokka et al. (2004) und Wang et al. (1975)
1,5-Pentandiamin (Cadaverin)	süß, aminartig, Verwesung	190 <sup>W</sup>	24,8 mg/kg <sup>H,a</sup> 30,8 mg/kg <sup>H,b</sup> < 10 mg/kg <sup>H,b</sup> 8,5 - 42,4 mg/kg <sup>H,b</sup>	Balamatsia et al. (2006), Gallas et al. (2010), Legrum (2015), Rokka et al. (2004) und Wang et al. (1975)
4-(2-Aminoethyl)-phenol (Tyramin)	mild, phenolisch, gekocht, gummiartig	nda	< 10 mg/kg <sup>H,a,b</sup> 110 - 130 mg/kg <sup>H,b</sup> 1,9 - 3,2 mg/kg <sup>H,b</sup>	Balamatsia et al. (2006), Gallas et al. (2010), Rokka et al. (2004) und The Good Scents Company (2015)
Trimethylamin-N (TMA-N)	nda	0,6	215 N mg/kg <sup>H,a</sup> < 215 N mg/kg <sup>H,b</sup>	Balamatsia et al. (2007) und Rothe et al. (1972)
TVB-N	nda	nda	545 mg N/kg <sup>H,a</sup> 296 - 431 mg N/kg <sup>H,b</sup>	Balamatsia et al. (2007)

## 2.6 In der Literatur beschriebene "Frischeindikatoren"

Auf Grundlage bestehender Erkenntnisse zur Bildung und Freisetzung flüchtiger Verbindungen während der Lagerung von Frischfleisch (siehe Kapitel 2.4) wurden Funktionsprinzipien für Frischeindikatoren abgeleitet. Die meisten der bisher entwickelten Frischeindikatoren beruhen auf einer pH-Wert-Änderung. Es wurden aber auch andere Konzepte beispielsweise basierend auf einem Ligandenaustausch oder Oxidation eingeführt. Trotz dieser vielfältigen Funktionsprinzipien ist die Anwesenheit von flüchtigen Verbindungen, die eine pH-Wert-Verschiebung in

saurer oder basischer Richtung verursachen, Voraussetzung für die meisten Indikatorsysteme. Obwohl zahlreiche Konzepte patentiert wurden, haben nur wenige die Marktreife erreicht. Bis heute gibt es kaum Anwendungen auf dem Markt. Einziger derzeit marktverfügbare Indikator ist "Beef-Fresh Sensor" von Safe Food Scientific. Dieser Sensor reagiert nach Herstellerangaben auf gebildete biogene Amine bei Rindfleisch unter aerober Lagerung, wenn eine Keimzahl von  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht ist (Safe Food Scientific, 2017).

### 2.6.1 Indikatoren für die Detektion von Sulfiden/Thiolen

Smolander et al. (2002) entwickelten einen Frischeindikator für die Verderbsbestimmung von Schutzgas-verpacktem Hähnchenfleisch auf Grundlage von in Agarosegel immobilisiertem roten Myoglobin. Dieser Indikator reagierte mit Sulfan (Schwefelwasserstoff), welches besonders beim mikrobiellen Verderb von Geflügelfleisch gebildet wird, zu grünem Sulphmyoglobin. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Farbwechsel des Indikators mit den mikrobiologischen und sensorischen Veränderungen in Zusammenhang stand. Der vollständige Farbwechsel lief jedoch nur sehr langsam ab. Die Gruppe entwickelte einen weiteren Indikator (FreshnessGuard) für die Detektion von Schwefelverbindungen, insbesondere von Sulfan (Schwefelwasserstoff). Dieser Indikator war aus einer nanoskaligen Schicht aus Silber und/oder Kupfer aufgebaut, die in Form eines Kreuzes auf die Verpackung aufgedruckt wurde. Über die Schichtdicke konnte die Empfindlichkeit des Sensors geregelt werden. In Gegenwart des Analyten ergab sich ein Farbumschlag von braun bis hin zu lichtundurchlässigem Weiß (Smolander et al., 2004b).

Ein ähnlicher Indikator wurde von La Valle Sansone et al. (2015) vorgestellt. Die druckbare Indikatortinte bestand im Wesentlichen aus Metallsalzen auf Basis von Kupfer oder Eisen, die auf verschiedene Schwefelverbindungen (Sulfan (Schwefelwasserstoff), Methylsulfanylmethan (Dimethylsulfid), Methyldisulfanylmethan (Dimethyldisulfid), 2,3-Dimethyltrisulfid und Thiole wie Methanthiol und Ethanthiol) reagierte. In Anwesenheit von Schwefelverbindungen änderte sich die Farbe der Tinte von grün nach orange. Koskela et al. (2015) überwachten den Frischezustand von Hähnchenfleisch mit Hilfe eines H<sub>2</sub>S-Sensors auf Basis von Gold- und Silber-Elektroden und einer gedruckten Kupferacetat-Schicht. Obwohl der Sensor erst nach 3,4 Tagen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums die Schwefelverbindungen detektierte, war der entwickelte Indikator laut den Autoren geeignet, den Verderbszustand von Schutzgas-verpacktem Hähnchenfleisch anzuzeigen.

### 2.6.2 Indikatoren für die Detektion von Aminen/Stickstoffverbindungen

Für den Nachweis von flüchtigen Aminen bei Fleisch und Geflügel wurde ein Indikator mit dem Namen "SensorQ" von Williams et al. (2006) konstruiert. Basis dieses Indikators waren natürliche Pflanzenpigmente wie Flavonoide und/oder Betalaine, welche mit Aminen interagierten und somit eine Farbänderung von orange nach grün hervorriefen. Urmila et al. (2015) prüften die Einsatzfähigkeit eines kolorimetrischen Sensors für die Frischebestimmung von Hähnchen-

fleisch, welcher aus neun Metalloporphyrin-Farbstoffen und drei pH-Indikatoren bestand. Die Substanzen wurden dabei auf einer C2 Umkehrphasen-Silicagel-Platte aufgebracht und reagierten auf eine Vielzahl von VOCs wie Sulfan (Schwefelwasserstoff), N-haltige Verbindungen und organische Säuren. Mit ihren Ergebnissen zeigten sie, dass der Sensor geeignet ist, die TVB-N Konzentration zu bestimmen. Auch Kuswandi et al. (2014) entwickelten einen Sensor für die Detektion von flüchtigen Aminen bei Hähnchenfleisch. Hierfür wurde Methylrot durch Absorption auf einer Cellulosemembran aufgebracht. Der Indikator zeigte eine Farbänderung von rot nach gelb als der Verderb von Hähnchenfleisch eindeutig nachgewiesen werden konnte.

### **2.6.3 Indikatoren für die Detektion von CO<sub>2</sub>**

Rukchon et al. (2014) testeten zwei verschiedene Indikatoren auf Basis von pH-empfindlichen Farbstoffen für die Detektion von gebildetem CO<sub>2</sub> bei aerob verpacktem Hähnchenfleisch. Ein Indikator enthielt Bromthymolblau und Methylrot als reaktive Substanz, während der andere eine Mischung aus Bromthymolblau, Bromkresolgrün und Phenolrot enthielt. Ihren Ergebnissen zufolge, war der Indikator mit Bromthymolblau und Methylrot besser geeignet, da er eine hohe Empfindlichkeit gegenüber CO<sub>2</sub> aufwies und schnell auf die Anwesenheit von CO<sub>2</sub> antwortete. Zudem änderte der Indikator seine Farbe mit steigender Keimzahl und wurde daher als potentieller Frischesensor vorgeschlagen. Sie zeigten weiterhin, dass der Indikator auch bei Schutzgas-verpacktem Fleisch eingesetzt werden kann, indem der Indikator auf den CO<sub>2</sub>-Anfangsgehalt in der Schutzgasatmosphäre mit einer Natriumhydroxidlösung eingestellt wird.

### **2.6.4 Indikatoren für die Detektion mehrerer Analyte**

Salinas et al. (2012) entwarfen einen Indikator für die Frischebestimmung von Schutzgas-verpacktem Hähnchenfleisch. Der Indikator wurde in Siliciumdioxid und Aluminiumoxid-Materialien eingebettet und bestand aus einer kolorimetrischen Sensormatrix, welche sechzehn Farbstoffe wie pH-Indikatoren, Lewis-Säuren, natürliche Pigmente, Wasserstoff bindende Derivate sowie spezielle Indikatoren für die Detektion von Schwefel- und Aminverbindungen enthielt. Das Array war in der Lage, die Fleischproben mit einer zweitägigen Abweichung von der Lagerzeit voneinander zu unterscheiden und erzeugte einen charakteristischen Fingerabdruck. Da mit Hilfe des Arrays die Fleischproben entsprechend ihres Frischegrads klassifiziert werden konnten, wurde das getestete System als Basis für die Entwicklung einer elektronischen Nase in Erwägung gezogen.

Im Gegensatz dazu entwickelten Elsome und Slade (2006) ein Indikatorsystem, das sowohl für die Detektion von Schwefel- als auch Stickstoffverbindungen geeignet ist. Es war im Wesentlichen aus einem Metallkomplex mit einem reversibel koordinierten Chromophor oder Fluorophor als Ligand aufgebaut. In Anwesenheit der Analyte ging der Metallkomplex bevorzugt eine Bindung mit den VOCs ein und setzte dabei den Liganden frei. Dadurch änderte der Indikator seine optischen Eigenschaften von pink nach gelb ([www.foodfreshnesstechnology.com](http://www.foodfreshnesstechnology.com)).

## 2.6 In der Literatur beschriebene "Frischeindikatoren"

Tabelle 2.7: Übersicht einiger bisher entwickelter Frischeindikatoren

Name (falls vorhanden)	Funktionsprinzip	Detektion von	reaktive Substanz	Quelle
SensorQ	pH-Wert	flüchtige Basen	Betalaine, Flavonoide	Williams et al. (2006)
	pH-Wert	CO <sub>2</sub>	Bromthymolblau, Methylrot, Bromkresolgrün, Phenolrot	Rukchon et al. (2014)
	pH-Wert	S-Verbindungen, organische Säuren, Alkohole, Ketone, biogene Amine	Metallporphyrine, Bromthymolblau, Bromkresolgrün, Neutralrot	Urmila et al. (2015)
	pH-Wert	flüchtige Amine	Methylrot	Kuswandi et al. (2014)
Fresh Tag	pH-Wert	flüchtige Basen und Säuren	Bromphenolblau, Phenolrot, Bromkresolgrün	Miller (1999)
Freshness Guard	Oxidation	Sulfan (Schwefelwasserstoff)	metallisches Silber und/oder Kupfer	Smolander et al. (2004b)
	Oxidation	Sulfan (Schwefelwasserstoff)	Myoglobin	Smolander et al. (2002)
It's Fresh	Ligandenaustausch	N- und S-Verbindungen	koordinierter Metallkomplex	Elsome und Slade (2006)
		N-Verbindungen (Indol)	Vanillin	Nerin de la Puerta et al. (2012)

### 2.6.5 Leistung und Schwächen derzeitiger Frischeindikatoren

Die Idee der Frischeindikatoren, wie sie in Punkt 2.6 beschrieben wurden, sollten eine Möglichkeit darstellen, Qualitätsveränderungen von Lebensmitteln durch einfaches kolorimetrisches Auslesen festzustellen und auch eine direkte Echtzeitüberwachung des Lebensmittelverderbs durch die Detektion von Abbauprodukten zu erlauben. Dies macht sie in der Theorie deutlich besser als die Verwendung von geschätzten Haltbarkeitsdaten, die auf Untersuchungen unter definierten Bedingungen und Erfahrungswerten beruhen. Somit sind die angegebenen Haltbarkeitsdaten kein sicherer Zeitpunkt für das Ende der Haltbarkeit; sie sind viel mehr ein gutgläubiges Versprechen von Frische, besonders wenn Konsumenten mit Lebensmitteln unangemessen umgehen (Ahvenainen und Hurme, 1997; Lewis, 2002).

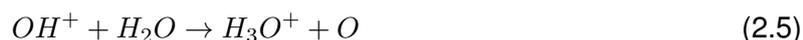
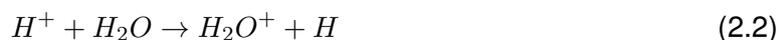
Obwohl eine Vielzahl an Indikator-Systemen entwickelt und patentiert wurde, gibt es bislang nur eine sehr begrenzte Anzahl von kommerziellen Produkten auf dem Markt. Auf der einen Seite kann dies auf fehlende Standardisierung und Zuverlässigkeit zurückgeführt werden. Die bisher entwickelten Systeme produzieren alle unterschiedliche Farbänderungen und erfordern daher spezifische Referenzwerte. Jedoch ist eine Standardisierung aufgrund von Wettbewerb höchstwahrscheinlich nicht möglich (Pfaff, 2006). Die meisten Indikatoren wurden erfolgreich mit Modellsystemen unter definierten Laborbedingungen getestet, aber nie in umfassenden Studien mit einer breiten Auswahl an Lebensmittelproben und unter verschiedenen realen Bedingungen (Ahvenainen und Hurme, 1997). Dies ist jedoch wichtig, da zum Beispiel die Bildung von flüchti-

gen Metaboliten von einer Vielzahl von Faktoren, wie die Zusammensetzung von Lebensmitteln, Initialflora, Art der Verpackung und Lagerbedingungen abhängt (Smolander, 2008). Auf der anderen Seite kann die eingeschränkte Verbreitung auf dem Markt der erforderlichen Migrationsforschung und den hohen Kosten zugeschrieben werden. Da die Indikatoren in der Regel in direktem Kontakt mit dem Produkt stehen, müssen sie aus lebensmittelsicheren Materialien hergestellt werden, die Gegenstand von einigen gesetzlichen Vorschriften sind (Verordnung (EG) Nr. 1935/2004, 2004; Verordnung (EG) Nr. 450/2009, 2009; Verordnung (EU) Nr. 10/2011, 2011) und umfangreiche Migrationsuntersuchungen erfordern, um unbeabsichtigte Kontaminationen auszuschließen. Darüber hinaus liegen die zusätzlichen Kosten für Intelligente Verpackungen bei 50 - 100 % der gesamten Verpackungskosten, was viel zu teuer für eine breite Anwendung in der Lebensmittelindustrie ist, da diese in der Regel nicht mehr für die Verpackungskosten aufbringen kann als 10 % der Gesamtkosten eines auf dem Markt erhältlichen Produkts (Dainelli et al., 2008). Allerdings können kostengünstige Lösungen den Verderb nicht ausreichend genau anzeigen (Pfaff, 2006). Falsche Farbänderungen, sog. falsch-positive oder falsch-negative, sind möglich, wodurch das Interesse der Produzenten an diesen konkurrierenden Frischeindikatoren noch stark limitiert ist (Kerry et al., 2006).

Zudem basieren die meisten Funktionsprinzipien der entwickelten Frischeindikatoren auf einer pH-Wert-Änderung oder der Detektion von Schwefel- und Stickstoffverbindungen. Die Ergebnisse aus 2.4 zeigten jedoch, dass bei Schutzgas-verpacktem Fleisch nur sehr wenige der gebildeten und freigesetzten Substanzen eine Änderung des pH-Wertes hervorrufen können oder zur Gruppe der Sulfide/Thiole bzw. Amine/Stickstoffverbindungen gehören. Die meisten der identifizierten Substanzen stammen aus den Stoffklassen der Aldehyde/Ketone, Alkane/Alkene und Alkohole. Somit verhindern viele mögliche Konkurrenzreaktionen die sichere Indikation des Fleischverderbs mit bisher entwickelten Frischeindikatoren.

## 2.7 Protonenauschreaktions-Massenspektrometrie

Das Funktionsprinzip eines Protonenauschreaktions-Massenspektrometers (PTR-MS) basiert auf einer sanften, chemischen Ionisation von flüchtigen Verbindungen mit Hydroniumionen in der Gasphase. Aufgrund der hohen zeitlichen Auflösung und der hohen Empfindlichkeit sind Messungen von hunderten von flüchtigen Verbindungen innerhalb weniger Minuten bis zu einer Konzentration von 10 ppt<sub>v</sub> möglich. PTR-MS eignet sich daher sehr gut für Echtzeitmessungen (Blake et al., 2009). Das PTR-MS besteht im Wesentlichen aus einer Ionenquelle, einem Driftraum und einem Detektionssystem (siehe Abbildung 2.4). In der Ionenquelle wird in einem ersten Schritt Wasserdampf über den Primärgaseinlass in eine Hohlkathode eingelassen und dort zu H<sup>+</sup>, OH<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>O<sup>+</sup> und H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> ionisiert.

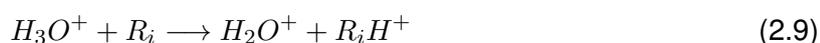


Anschließend reagieren die gebildeten Ionen weiter mit Wasserdampf zu Hydroniumionen ( $H_3O^+$ ). Damit mehr als 99,5 % der gebildeten Ionen die Ionenquelle als  $H_3O^+$ -Ionen verlassen, findet dieser Prozess in einer zusätzlichen kleinen Driftregion statt, welche sich zwischen der Hohlkathode und dem Driftraum befindet. Dies führt zu hohen Konzentrationen als auch zu hohen Zählraten von typischerweise  $10^6 - 10^7$  im Detektionssystem (Ellis und Mayhew, 2014; Lindinger, 1973; Lindinger et al., 1998b; Pahl et al., 1972; Wang et al., 2012).



Im Driftraum findet der eigentliche Ionisationsprozess der zu detektierenden Spurengase statt. Der Driftraum ist aus mehreren gleichmäßig verteilten Metallringen aufgebaut, die jeweils durch isolierendes Material voneinander getrennt sind. Hierbei kommt oft ein spezielles statisch ableitendes Teflon zum Einsatz, da es zwei Vorteile besitzt: zum einen stellt es ein gutes Isolationsmaterial dar und zum anderen weist es aber auch eine ausreichende Leitfähigkeit auf, wodurch das Entstehen einer überschüssigen statischen Aufladung unterbunden wird. Eine statische Aufladung würde zu unerwünschten elektrischen Feldern führen, wodurch die Ionenbewegung erschwert wird (Ellis und Mayhew, 2014; Wang et al., 2012).

Zwischen den angrenzenden Metallringen sind jeweils Widerstände angebracht. Eine angelegte Hochspannungsquelle sorgt für einen Spannungsgradienten, der ein homogenes elektrisches Feld entlang der Driftraumachse erzeugt. Hierfür wird typischerweise für ein Driftrohr mit einer Länge von 10 cm eine Spannung von 500 V eingestellt. Über eine senkrecht zur Ionengeschwindigkeit liegenden Venturidüse wird das Trägergas, welches die Spurenkomponenten  $R_i$  enthält, in den Driftraum eingezogen. Dort interagieren die Gase  $R_i$  mit den  $H_3O^+$ -Ionen. Es entstehen  $R_iH^+$ -Ionen, die eine Masse besitzen, welche um 1 größer ist als die Neutralgaskomponente  $R_i$  (Ellis und Mayhew, 2014; Wang et al., 2012).



Ein Protonentausch findet statt, wenn das zu untersuchende Gas R eine größere Protonenaffinität (PA) als das Reaktionsgas ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) besitzt ( $PA_{\text{Wasser}} = 691 \pm 3 \text{ kJ/mol}$ ). Denn nur in diesem Fall ist die Reaktion exergon und läuft damit freiwillig ab. Die meisten organischen und auch anorganischen Verbindungen besitzen eine Protonenaffinität von  $< 900 \text{ kJ/mol}$ . Somit ist die Protonenaffinität hoch genug, einen Protonentausch mit  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen einzugehen und die abgegebene Energie klein genug, um eine Fragmentierung gering zu halten, so dass nur ein Ionenprodukt entsteht. Die Hauptkomponenten der Luft hingegen besitzen eine niedrigere Protonenaffinität als Wasser und gehen keinen spontanen Protonentausch ein. Luft eignet sich daher besonders gut als Trägergas (Blake et al., 2009; Ellis und Mayhew, 2014; Lindinger et al., 1998a; Lindinger et al., 1998b).

Als Detektionssystem dienen hauptsächlich Quadrupolmassenspektrometer. Die Anzahl der Gas-Ionen am Sekundär-Elektronen-Vervielfacher verhält sich dabei proportional zur Konzentration der Neutralgaskomponente (Blake et al., 2009; Ellis und Mayhew, 2014; Lindinger et al., 1998a; Lindinger et al., 1998b).

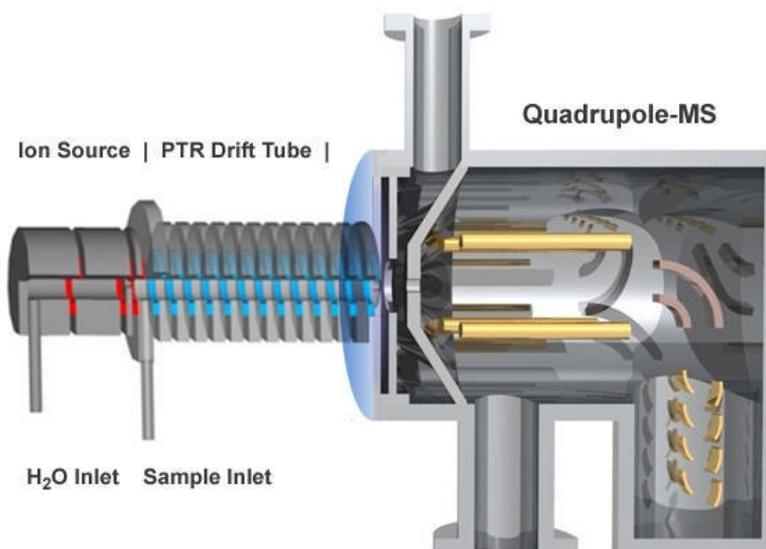


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau des PTR-MS (Ionicon, 2016)

PTR-MS hat sich bereits seit einigen Jahren in vielen Anwendungsbereichen als Messinstrument für flüchtige organische Verbindungen bewährt. Neben großen Anwendungsbereichen in Medizin und Umwelt, werden zunehmend Lebensmittel untersucht. So lassen sich erste Ansätze zur Bestimmung flüchtiger Verbindungen während des Fleischverderbs in der Literatur finden. Mayr et al. (2003a) und Mayr et al. (2003b) wiesen die Eignung von PTR-MS als mögliches Messverfahren zur Bestimmung der flüchtigen Verbindungen beim Fleischverderb nach. Allerdings erfolgten hierbei die Untersuchungen bei aerob gelagertem Fleisch und es wurden nur

intermittierende Messungen durchgeführt. Untersuchungen zur kontinuierlichen Freisetzung von mikrobiellen flüchtigen Metaboliten wurden erstmalig von Bunge et al. (2008) durchgeführt. Die von den Autoren entwickelte Methode wurde erfolgreich validiert und es zeigte sich, dass PTR-MS ein großes Potential besitzt, flüchtige Verbindungen im Kopfraum zu detektieren.

Ein Nachteil von PTR-MS ist, dass die flüchtigen Verbindungen aufgrund der geringen Massenauflösung des Quadrupol-Massenspektrometers nicht eindeutig identifiziert werden können. Dieses Problem kann aber teilweise gelöst werden, indem zusätzlich GC-MS bei repräsentativen Proben angewendet wird. Eine weitere Möglichkeit liegt im Vergleich der detektierten Substanzen mit Ergebnissen aus der Literatur (Franke und Beauchamp, 2017; Mayr et al., 2003a).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Probenvorbereitung und Messroutinen

Für die Versuche zur Bestimmung des flüchtigen Metabolitspektrums von Einzelstämmen und zur Bestimmung des spontanen Verderbs wurden Schutzgas-verpacktes Hähnchenbrustfilet der Firma Heidegold (Wiesenhof, PHW-Gruppe) als auch Schutzgas-verpackte Rindernuss (Feneberg, Kempten) mit einer angegebenen Resthaltbarkeit von 7 Tagen am Tag der Lieferung bezogen. Dieser Tag wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche als "Tag 0" festgelegt, welcher 1-2 Tage nach Produktion liegen konnte. Anschließend wurde das Fleisch, wie in den folgenden Gliederungspunkten beschrieben (3.1.1 bis 3.1.4), von den Doktoranden des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie Weihenstephan im Rahmen des gemeinsamen Forschungsvorhabens (AiF 17803N) für die Untersuchungen vorbereitet. Die bearbeiteten Proben wurden in Perfluoralkoxy (PFA)-Behälter (1 Liter (l), Savillex, Eden Prairie, USA) gegeben, welche anschließend verschlossen und in den für diese Arbeit entwickelten Messaufbau integriert (siehe 3.2.1.1) wurden. Der Messaufbau befand sich in einem Kühlbrutschrank (ICP 110, Memmert, Schwabach, Deutschland), um die gewünschte Lagertemperatur konstant zu halten. Aufgrund der langen Versuchsdauer und der hohen Anzahl an Versuchen war es nicht immer möglich, zur gleichen Jahreszeit zu messen. Hierdurch konnten systematische Abweichungen in der Anfangsverkeimung der Fleischproben nicht vollständig ausgeschlossen werden.

#### 3.1.1 Beimpfung der Proben mit Einzelstämmen

Für die Versuche zur Bestimmung des flüchtigen Metabolitspektrums von Einzelstämmen wurden aus dem Fleisch 20 cm<sup>2</sup> große runde Stücke ausgeschnitten, welche anschließend mit dem zu untersuchenden Einzelstamm angeimpft wurden. Hierfür wurde eine Bakteriensuspension in Ringer-Lösung mit einer Konzentration von etwa  $2 \times 10^8$  KBE/ml hergestellt und jeweils 100 µl davon auf der Ober- und Unterseite gleichmäßig verteilt. Ziel war es, eine finale Zellzahl von  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> des beimpften Einzelstammes auf der Fleischoberfläche zu erlangen. Als Einzelstämme wurden für Hähnchenfleisch *B. thermosphacta*, *C. divergens* und *Ps. fragi* gewählt. Rindfleisch wurde mit zwei verschiedenen Stämmen *L. piscium* beimpft. Jeweils drei der mit demselben Einzelstamm beimpften Fleischstücke wurden in drei PFA-Behälter gegeben, um eine Dreifachbestimmung durchzuführen. Übrige beimpfte Fleischstücke wurden verwendet, um mikrobiologische Analysen für Tag 0 durchzuführen (Abschlussbericht IGF-Vorhaben 17803 N, 2017).

#### 3.1.2 Referenzmessungen

Parallel zur Dreifachbestimmung des flüchtigen Metabolitspektrums der Einzelstämme erfolgte die Messung einer Referenzprobe. Für die Herstellung der Referenzprobe wurden aus dem Fleisch 20 cm<sup>2</sup> große runde Stücke ausgeschnitten, auf dessen Ober- und Unterseite jeweils 100 µl Ringer-Lösung gleichmäßig aufgetragen wurden. Drei Stücke der Referenzprobe wurden in einen PFA-Behälter gelegt. Übriggebliebene unbeimpfte Fleischstücke dienten der Untersuchung der Anfangskeimzahl und der initialen Mikrobiotazusammensetzung (Abschlussbericht IGF-Vorhaben 17803 N, 2017).

#### 3.1.3 Spontaner Verderb

Für die Versuche zur Bestimmung des spontanen Verderbs von Hähnchenfleisch wurde jeweils ein Hähnchenbrustfilet in drei PFA-Behälter gegeben. Der vierte PFA-Behälter diente der Überprüfung des Hintergrundsignals. Zur Bestimmung des spontanen Verderbs von Rindfleisch wurde aus den Rindernusscheiben 20 cm<sup>2</sup> runde Stücke ausgeschnitten. Jeweils drei Stücke wurden in vier PFA-Behälter gegeben. Nach dem Schließen der PFA-Behälter wurden diese in den Versuchsaufbau eingebunden. Übriges Fleisch (Hähnchen und Rind) wurde für die Bestimmung der Anfangsbedingungen (Keimzahl, Mikrobiotazusammensetzung) eingesetzt.

#### 3.1.4 Identifikation der detektierten VOCs

Zur Identifikation der mit PTR-MS detektierten flüchtigen Verbindungen durch GC-MS wurden nach Beenden der Messung das Fleisch aus den PFA-Behältern und zusätzlich parallel gelagerte Fleischproben analysiert. Aus dem Fleisch wurden runde Stücke mit einer Oberfläche von 6,6 cm<sup>2</sup> ausgestochen. Für die GC-MS-Analysen wurden die Fleischstücke halbiert und jeweils eine Hälfte in ein 20 Milliliter (ml) Vial gegeben, welches mit einem Deckel und einem Septum verschlossen wurde. Bis zur Messung der flüchtigen Verbindungen wurden die Proben entweder auf Eis gelegt oder bei -18 °C eingefroren. Direkt vor der Messung wurden die Proben für 30 Minuten (min) in einen Wärmeschrank bei 30 °C gegeben, um ein eventuelles Auftauen und eine Gleichgewichtseinstellung der flüchtigen Verbindungen im Kopfraum zu ermöglichen. Anschließend wurde eine Kopfraum-Festphasen-Mikroextraktions-Faser (HS-SPME) dem Kopfraum der Probe für 45 min bei gleicher Temperatur ausgesetzt.

## 3.2 Untersuchung der flüchtigen Verbindungen

### 3.2.1 Protonenaustauschreaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS)

#### 3.2.1.1 Analytischer Messaufbau

Abbildung 3.1 stellt eine vereinfachte Zeichnung des entwickelten Messaufbaus dar, welcher bereits teilweise in Franke und Beauchamp (2017) beschrieben und diskutiert wurde. Der Versuchsaufbau wurde so gestaltet, dass er vielfältig eingesetzt werden kann. Beispielsweise kann die Lagertemperatur, die Dauer des Versuchs und die Zusammensetzung der Atmosphäre an die zu untersuchende Probe angepasst werden. Zudem ist die Verwendung des entwickelten Messaufbaus nicht nur auf on-line Messungen mit PTR-MS beschränkt, sondern kann auch zusammen mit anderen Techniken wie selektierte Ionen-Strömungsrohr-Massenspektrometrie (selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS), Atmosphärendruck-Chemische-Ionisations-Massenspektrometrie (atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, APCI-MS), spektroskopische oder elektrochemische Sensor-basierte Techniken sowie GC-MS-Analysen mit vorgeschalteter "purge and trap" Probenahme verwendet werden.

Der Messaufbau beinhaltet vier PFA-Behälter, die mit gasdichten Schraubdeckeln versehen wurden. Jeder Deckel war mit jeweils einem Gaseinlass und -auslass (1/8" OD PFA Verbindungen) ausgestattet. Die Einlässe wurden über PFA-Verbindungen und PFA-Schläuche (Savillex, Eden Prairie, USA) mit einer herkömmlichen Druckgasflasche über einen Druckminderer verbunden. Die Druckgasflasche enthielt eine bereits vom Unternehmen vorgemischte Gasmischung bestehend aus 30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub> (Messer, Bad Soden, Deutschland). Diese Gasmischung erzeugte eine Schutzgasatmosphäre in den Probenbehältern und diente gleichzeitig als Trägergas bei der Probenentnahme im Kopfraum. Zwei Massendurchflussregler (MDR) (Bronkhorst, AK Ruurlo, Niederlanden) wurden verwendet, um den Volumenstrom des Trägergases (0 - 10 ml/min bei Standarddruck und -temperatur, MDR<sub>MA</sub>) und der Verdünnungsluft (0 - 100 ml/min, MDR<sub>VL</sub>) zu kontrollieren und konstant zu halten. Die Verdünnungsluft wurde aus einem Druckluftanschluss im Labor bezogen, welche durch einen Partikelfilter und nachgeschaltetem Katalysator aufgereinigt wurde, um mögliche in der Druckluft enthaltene Aerosole und flüchtige Verbindungen zu entfernen.

Ein Bypass mit zwei manuellen Ventilen (Swagelok, V<sub>MAN1</sub> und V<sub>MAN2</sub>) wurde um den Massendurchflussregler für das Trägergas gelegt. Dies ermöglichte ein schnelles Spülen des Kopfraums mit Schutzgas, nachdem die Probenbehälter in den Versuchsaufbau integriert wurden. Die Verwendung eines Bypasses hatte zwei Ziele. Zum einen hätte das Befüllen der Probenbehälter über den Massendurchflussregler (max. 10 ml/min) länger als 100 min für jeden Behälter gebraucht, was zu einer Verzögerung des Starts der Messung geführt hätte. Zum anderen war es wichtig, die Proben so schnell wie möglich der Schutzgasatmosphäre auszusetzen, um rasch die gewünschten Lagerbedingungen herzustellen. Eine zu lange Lagerung der Proben unter

aeroben Bedingungen hätte eine Änderung der Mikroflora und damit verbunden die Bildung von anderen flüchtigen Verbindungen mit sich bringen können.

Zwei- und Drei-Wege-Magnetventile (Teqcom Industries, Santa Ana, USA) wurden in einer speziellen Konfiguration in den Versuchsaufbau integriert, um eine automatisierte und nacheinander (in Reihe) geschaltete Probenahme zu ermöglichen sowie eine potentielle Kreuzkontamination der Proben untereinander zu vermeiden. Die Zustandsänderung der Magnetventile wurde durch ein elektrisches Signal über eine direkte Verbindung zum analogen Eingang/Ausgang des PTR-MS erreicht. Die eingebauten Ventile wurden wie folgt ausgelegt: Drei-Wege-Sicherheitsventile an den Behältereingängen ( $V_{S-EIN1}$  und  $V_{S-EIN2}$ ) und -ausgängen ( $V_{S-AUS1}$ ,  $V_{S-AUS2}$  und  $V_{S-AUS3}$ ) verhinderten Kreuzkontaminationen zwischen den Proben und erlaubten die reihenweise Messung der Proben, zwei Zwei-Wege-“Rückschlag“-Ventile ( $V_{RS-EIN}$  und  $V_{RS-AUS}$ ) unterbanden ein Rückspülen der Verdünnungsluft in die Probenbehälter während den Messpausen.

Vor der eigentlichen Messung wurde jeder Probenbehälter über den Bypass, wie oben beschrieben, für 1 min bei einem Volumenstrom von 5,5 l/min mit Schutzgas gespült, um die im Behälter enthaltene Luft komplett durch Schutzgas zu ersetzen. Während des Versuchs strömte das Schutzgas mit einer sehr geringen, konstanten Geschwindigkeit von 10 ml/min ( $MDR_{MA}$ ) durch den zu messenden Behälter, wodurch eine ausreichende Anreicherung des Trägergases mit den zu detektierenden VOCs garantiert wurde. Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass das Schutzgas nur zu den entsprechenden Messzeitpunkten durch den Kopfraum der Behälter strömte. In der Zeit zwischen den Messungen wurde das Gas in den Behältern statisch gehalten, um den Gasaustausch in den Behältern über den Versuchszeitraum zu minimieren und den Gleichgewichtszustand der flüchtigen Substanzen im Kopfraum zu erhalten. Dies wurde durch eine geschlossene Position der Sicherheitsventile an den Ein- und Ausgängen erreicht.

Nachdem das mit den VOCs angereicherte Trägergas aus den Behältern ausgeströmt war, wurde es mit aufgereinigter Verdünnungsluft im Faktor 1:10 verdünnt, bevor es mit PTR-MS gemessen wurde. Die Verdünnung der Schutzgasatmosphäre war aus mehreren Gründen erforderlich. Zum einen benötigte das verwendete PTR-MS einen kontinuierlichen Trägergasstrom von mindestens 90 ml/min. Somit war der gewählte Trägergasstrom des Schutzgases mit 10 ml/min zu gering und es hätte sich ein Vakuum gebildet. Zum anderen war die in dieser Arbeit verwendete Schutzgasatmosphäre mit  $CO_2$  und  $O_2$  angereichert, welche in hohen Konzentrationen zu Problemen bei PTR-MS-Analysen führen. Ein hoher Gehalt an  $CO_2$  ändert die Puffergasteildichte im Driftraum des PTR-MS und die Ionenmobilität in der Reaktionskammer. Zudem wird die Ausbeute der Produkt-Ionen beeinflusst. Dies führt zu einem unerwünschten Ausmaß an Unsicherheit bei der Quantifizierung. Ein hoher Gehalt an  $O_2$  verursacht die Bildung von  $O_2^+$ -Ionen durch das Rückströmen des Trägergases in die Hohlkathode der Ionenquelle. Dies sollte vermieden werden, da Ionenaustausch zwischen den  $O_2^+$ -Ionen und den zu detektierenden VOCs begünstigt wird. Ionenaustausch konkurriert mit dem gewünschten Protonenaustausch (mit Hydronium-Ionen) und erschwert die Auswertung des Massenspektrums, wodurch die Unsicherheit steigt, VOCs richtig zu identifizieren. Durch das Verdünnen des Träger-

gases im Faktor 1:10 (v/v) mit Verdünnungsluft wurden diese Probleme gelöst, da  $O_2$  und  $CO_2$  zu hinreichend geringen Gehalten reduziert wurden. Überschüssiges Gas konnte über einen Überfluss entweichen und wurde durch einen Laborabzug entfernt (Franke und Beauchamp, 2017).

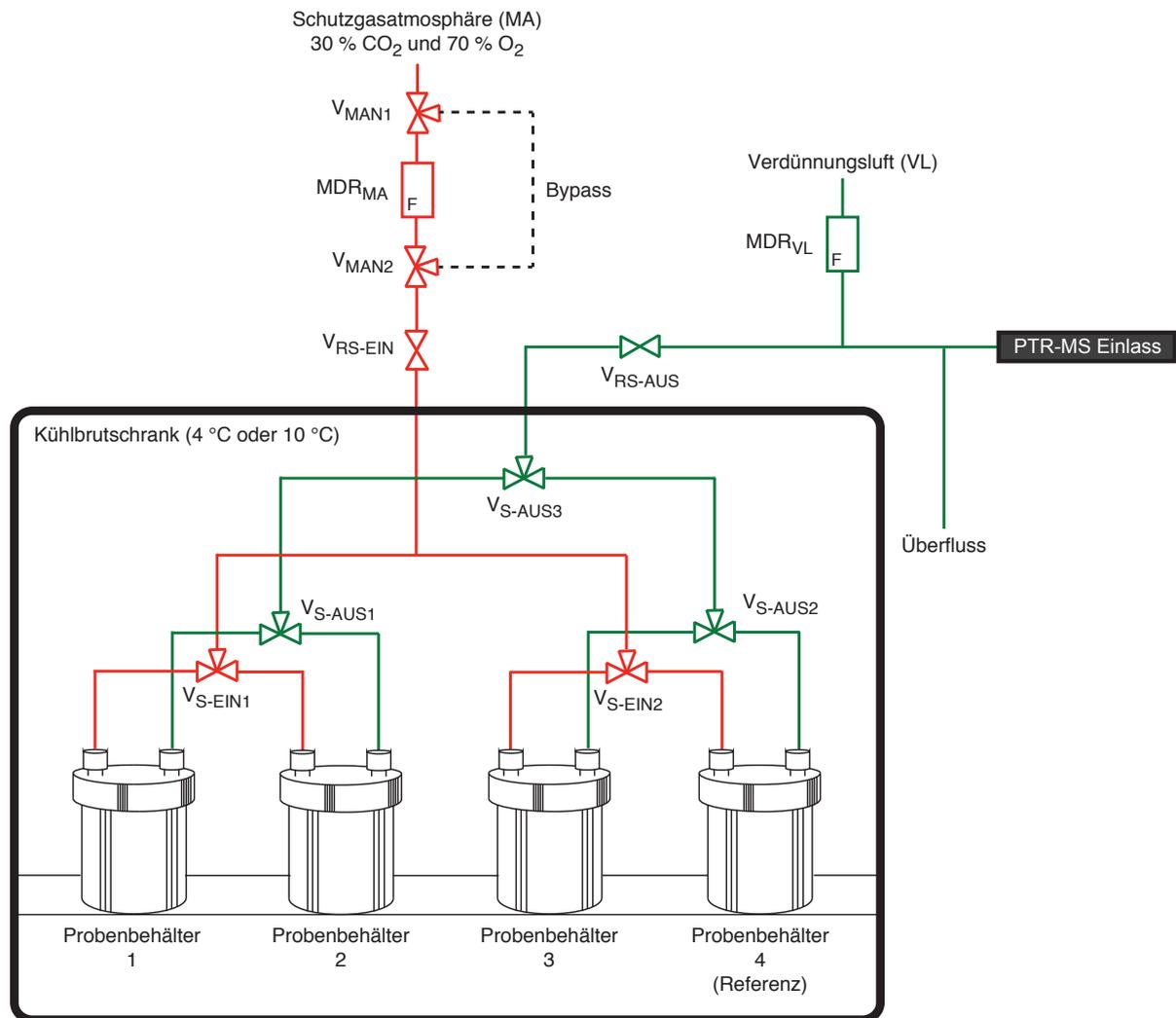


Abbildung 3.1: Vereinfachte Darstellung des entwickelten Messaufbaus, nach Franke und Beauchamp (2017)

### 3.2.1.2 Messverfahren

Für die Messung der VOCs wurde ein Hochempfindlichkeits-PTR-MS (HS-PTR-MS, Ionicon Analytik, Innsbruck, Österreich) verwendet. Der PTR-MS-Einlass war mit einer Kapillare aus Silcosteel™ (0,01" ID, 1/16" OD) (Restek, Bad Homburg, Deutschland) versehen und war auf eine Temperatur von 80 °C aufgeheizt. Die Gasansaugrate betrug 89-92 ml/min. Das PTR-MS arbeitete im Scan-Modus von Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen ( $m/z$ ) zwischen 20 - 160 mit einer Verweilzeit von 500 Millisekunden (ms) je  $m/z$ . Dies entsprach einer Zykluslänge von ca. 70 Sekunden (s) und einem Gasaustausch von ~60 ml pro Probe und Messzeitpunkt.

### 3.2 Untersuchung der flüchtigen Verbindungen

---

Mit diesen Parametern fand ein vollständiger Volumenaustausch (1 l) des Kopfraums nach 3,5 Tagen statt. Der PTR-MS-Driftraum wies eine Spannung von 600 V, eine Temperatur von 60 °C und einen Druck von 2,2 mbar auf, was einem Verhältnis aus elektrischer Feldstärke und Puffergas-Teilchendichte ( $E/N$ ) von  $132 \times 10^{-21} \text{ Vm}^2$  entsprach. Jede Probe wurde für 5 Zyklen gemessen (~6 min), eine nach der anderen (in Reihe), gefolgt von einer verlängerten Messung der Verdünnungsluft (250 Zyklen, 4,9 h). Die Messung der Verdünnungsluft diente der Bestimmung des Hintergrundsignals. Das Messintervall von 4,9 Stunden (h) wurde gewählt, um den Gasaustausch von jeder Probe zu minimieren, aber gleichzeitig sicherzustellen, dass eine ausreichende zeitliche Auflösung gegeben war, die Freisetzungskinetiken der VOCs zu verfolgen (Franke und Beauchamp, 2017).

Die Messfolge lief kontinuierlich über einen Versuchszeitraum von 7 Tagen für die Messungen zur Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen (*B. thermosphacta*, *C. divergens*, *Ps. fragi* auf Hähnchenfleisch, *L. piscium* auf Rindfleisch) sowie zur Bestimmung des Spontanverderbs bei 10 °C ab. Zur Bestimmung des Spontanverderbs bei 4 °C erfolgten die Messungen über einen Versuchszeitraum von 12 (Hähnchenfleisch) bzw. 14 Tagen (Rindfleisch).



Abbildung 3.2: Fotografie des entwickelten Messaufbaus

### 3.2.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Um die Substanzen mit GC-MS identifizieren zu können, wurden sie zunächst aus dem Kopfraum der Proben mit Hilfe der Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (headspace-solid phase microextraction, HS-SPME) extrahiert. Bei dieser Methode werden Substanzen an einer Faser adsorbiert und angereichert. Als HS-SPME-Faser wurde bei Hähnchenfleisch eine DVB/CAR/PDMS - 50/30  $\mu\text{m}$  (Nadellänge 10 mm, Nadelgröße 0,51 mm, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gewählt, die in einem manuellen Halter befestigt wurde. Für die Messung der flüchtigen Metabolite bei Rindfleisch wurde eine DVB/PDMS-Faser (Nadellänge 10 mm, Nadelgröße, 0,51 mm, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) verwendet. Vor der ersten Messung wurde die jeweilige Faser entsprechend den Empfehlungen des Herstellers vorkonditioniert. GC-MS-Analysen erfolgten mit einem Agilent 7890 A Gaschromatographen, welcher an einen Agilent 5975 C Massenspektrometer gekoppelt war.

Die Injektionsöffnung des Gaschromatographen war mit einem Verdampferrohrchen aus Glas passend für HS-SPME-Fasern ausgestattet. Zur Trennung der flüchtigen Verbindungen wurde eine ZB-1-Säule (100 % Dimethylpolysiloxan, Länge 60 m, Schichtdicke 0,25  $\mu\text{m}$ , 0,25 mm I.D., Zebron) für Hähnchenfleisch und eine ZB-Wax-Säule (Polyethylenglycol (PEG), Länge 60 m, Schichtdicke 0,25  $\mu\text{m}$ , 0,25 mm I.D., Zebron) für Rindfleisch eingesetzt mit Helium als Trägergas und einem Volumenstrom des Trägergases von 1 ml/min. Messungen wurden im "splitless mode" durchgeführt. Für die Desorption der flüchtigen Verbindungen und zur Vermeidung von Übertragungseffekten wurde die Faser für 10 min in den Injektor des Gaschromatographen gehalten. Die Grenzflächentemperatur wurde auf 250 °C eingestellt. Die Ofentemperatur wurde für 5 min auf 40 °C gesetzt. Anschließend wurde ein Temperaturanstieg von 4 °C/min bis auf 250 °C programmiert und die Temperatur für 5 min gehalten. Die Temperatur der MS-Quelle und des Quadrupols wurden auf 230 und 150 °C gesetzt.

### 3.3 Mikrobiologische Analysen

Mikrobiologische Analysen wurden von Doktoranden des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie im Rahmen des gemeinsamen Forschungsvorhabens durchgeführt. Die ausgewerteten MALDI-TOF Daten wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Eine genaue Beschreibung des experimentellen Designs können in Höll et al. (2016) sowie den Dissertationen von Linda Höll (Höll, 2018) und Maik Hilgarth (Hilgarth, voraussichtliche Veröffentlichung 2018) gefunden werden. Um ein besseres Verständnis von den PTR-MS-Daten zu erhalten, wurden ausgewählte mikrobiologische Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit grafisch dargestellt und interpretiert. Teile der in dieser Arbeit eingefügten Ergebnisse und Abbildungen sind auch Bestandteile der beiden Dissertationen von Linda Höll und Maik Hilgarth.

## 3.4 Sensorische Untersuchungen

### 3.4.1 Hähnchen

Die sensorischen Untersuchungen bei Hähnchenfleisch wurden bereits teilweise in Franke et al. (2017) beschrieben und diskutiert. Sensorische Untersuchungen wurden in Doppelbestimmung (zwei Versuchsreihen) durchgeführt. Für die einzelnen Versuchsreihen wurde frisches Schutzgasverpacktes Hähnchenbrustfilet vom gleichen Produzenten, wie unter 3.1 beschrieben, am Tag der Lieferung erworben (Tag 0). Zu diesem Zeitpunkt besaß das Hähnchenfleisch bereits ein tatsächliches Alter von 1-2 Tagen. Nach Transport wurden die Packungen unter einer Sterilbank geöffnet und die Hähnchenbrustfilets mit einem sterilen Skalpell halbiert. Jeweils ein halbes Hähnchenbrustfilet wurde in eine neue MAP-Schale aus Polypropylen ( $O_2$ -Durchlässigkeit:  $< 234 \text{ cm}^3(\text{STP})/(\text{m}^2\text{dbar})$ , Materialdicke:  $270 \mu\text{m}$ , ES-Plastic GmbH, Hutthurm, Deutschland) gelegt und mit einer Deckelfolie aus PET/PA/EVOH/PP ( $O_2$ -Durchlässigkeit:  $3 \text{ cm}^3(\text{STP})/(\text{m}^2\text{dbar})$ , Südpack Verpackungen GmbH + Co. KG, Ochsenhausen, Deutschland) durch einen Traysealer (T250, Multivac, Wolfertschwenden, Deutschland) unter einer Schutzgasatmosphäre von 30 %  $\text{CO}_2$  sowie 70 %  $\text{O}_2$  verpackt. Anschließend wurden die einzelnen Packungen mit einer dreistelligen Zufallsnummer kodiert. Bis zu den sensorischen Analysen wurden die Proben bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Die sensorische Untersuchung erfolgte jeweils an den Tagen 1, 5, 6, 7, 9, 11 und 14. Hierbei wurde die Intensität (Merkmalsausprägung) der festgelegten Attribute in allen, randomisiert verteilten Proben auf einer visuellen Analogskala durch das Sensorikpanel bewertet. In dieser Arbeit wurde das Fleisch nicht wie bei einer klassischen sensorischen Untersuchung von 10 (frisches Fleisch) bis 0 (verdorbenes Fleisch) beurteilt, sondern von 0 bis 10. Dabei entsprach eine Bewertung von 0 einem visuell und orthonasalen frischen Fleisch, eine Bewertung von 10 stand für ein visuell und orthonasal verdorbenes Fleisch. Für jedes untersuchte Alter des Fleisches wurden von zwei zufällig ausgewählten Panelisten die Proben nach dem Bewerten für mikrobiologische Untersuchungen weiter verwendet, wie es unter Punkt 3.3 beschrieben ist.

Vor der sensorischen Bewertung der Hähnchenfleischproben wurde das Panel bestehend aus elf Probanden (8 w, 3 m, durchschnittliches Alter: 32 Jahre) geschult. Hierfür fanden deskriptive Analysen in insgesamt zwei Sitzungen und einer Gruppendiskussion statt. Für die Schulung erfolgte in einem ersten Schritt die Sammlung der Attribute. Hierfür wurden den Probanden Proben ausgehändigt, die sie visuell und orthonasal charakterisieren sollten. In der anschließenden Gruppendiskussion wurden alle genannten Attribute besprochen. Attribute, deren Nennung nur einmal erfolgte, wurden nach Diskussion mit dem Probanden verworfen oder einem anderen genannten Attribut mit entsprechender Bedeutung zugeordnet. Zusätzlich wurden für die gewählten Attribute Referenzsubstanzen bzw. -produkte festgelegt, um ein einheitliches Verständnis über die einzelnen Attribute zu erzielen. In Tab. 3.2 sind die finalen Attribute

mit zugehörigen Referenzsubstanzen bzw. -produkten und möglicher Merkmalsausprägung zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der finalen Attribute, verwendete Referenzsubstanzen bzw. -produkte und mögliche Merkmalsausprägungen für Hähnchenfleisch

Attribut	Referenzsubstanz bzw. -produkt	Merkmalsausprägung (0 - 10)
Frischeeindruck (visuell)		frisch - verdorben
Glanz		matt - glänzend
schmierig		nicht schmierig - deutlich schmierig
rot		hellrot - dunkelrot/bräunlich
grau/grünlich		nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
Fleischsaft		kein Fleischsaft - deutlich sichtbarer Fleischsaft
Frischeeindruck (orthonasal)		frisch - verdorben
verdorben	verdorbenes Fleisch	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
stechend	Ethansäure (Essigsäure)	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
metallisch/blutig	tr-4,5-Epoxy-E-2-decenal	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
käsigs/schweißig	Butansäure	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
kunststoffartig/fettig	E,E-2,4-Decadienal	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
ölig	ranziges Sonnenblumenöl	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
Butter	2,3-Butandion (Diacetyl)	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
säuerlich	Sauerrahmbutter	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
vergoren/hefig	Kumys	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
honigartig	Phenyllessigsäure	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
fruchtig	Ethylbutanoat	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar

### 3.4.2 Rindfleisch

Die Proben für die sensorischen Untersuchungen bei Rindfleisch wurden vom gleichen Produzenten, wie in 3.1 erwähnt, zur Verfügung gestellt. Die bereits vom Unternehmen unter Schutzgas-verpackten Proben wurden 1 Tag nach dem Schlachten und Verpacken an einem örtlichen Supermarkt abgeholt und nach erfolgtem Transport zum Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie Weihenstephan bis zu den sensorischen Untersuchungen bei 4 bzw. 10 °C gelagert. Sensorische Untersuchungen fanden in Doppelbestimmung (zwei Versuchsreihen) statt. Bei einer Lagertemperatur von 4 °C wurde das Fleisch an den Tagen 1, 6, 7, 8, 11, 14 und 21 untersucht. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten war eine Doppelbestimmung an Tag 21 nicht möglich. Bei einer Lagerung der Proben bei 10 °C wurden die sensorischen Analysen an den Tagen 1, 7, 11, 14 und 21 von einem Panel bestehend aus 10 Panelisten aus einem größeren Panelistenpool (n = 22, 9 m, 13 w, durchschnittliches Alter: 29 Jahre) durchgeführt. Zwei ungeöffnete Packungen pro sensorisch untersuchtem Alter des Fleisches wurden verwendet, um die Proben mikrobiologisch zu analysieren.

### 3.4 Sensorische Untersuchungen

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der finalen Attribute, verwendete Referenzsubstanzen bzw. -produkte und mögliche Merkmalsausprägungen für Rindfleisch

Attribut	Referenzsubstanz bzw. -produkt	Merkmalsausprägung (0 - 10)
Frischeeindruck (visuell)		frisch - verdorben
Farbe		rot - braun/grau
Saft		kein Fleischsaft - deutlich sichtbar
schmierig		nicht schmierig - deutlich schmierig
Glanz		matt - glänzend
trockener Rand		nicht erkennbar - deutlich ausgeprägt
Friseeindruck (orthonasal)		frisch - verdorben
verdorben		nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
fruchtig		nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
Mango	Mangofrucht	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
Honig	Phenyllessigsäure	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
vergoren/hefig	Kefir	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
Alkohol	Ethanol	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
Butter	2,3-Butandion (Diacetyl)	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
Sauerrahm	Sauerrahm	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
käsigt	Butansäure	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
fettig	(E,E)-2.4-Decadienal	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
metallisch	(E)-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
fischig	Trimethylamin	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
stechend		nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
Essig	Ethansäure (Essigsäure)	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
schweflig	gekochtes Ei	nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar
fruchtig		nicht wahrnehmbar - deutlich wahrnehmbar

## 3.5 Datenauswertung

### 3.5.1 PTR-MS

Mit PTR-MS werden Signale von Ionen detektiert, die während der Protonierung von vorhandenen VOCs im Driftraum entstehen. Diese Ionensignale werden über das nominale Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) erfasst. Durch die sanfte chemische Ionisierung sind die meisten VOCs durch ihr Mutter-Ion (protonierte Molekülmasse,  $MH^+$ ) detektierbar, obwohl auch Fragmentierungen vorkommen können. Der Fragmentierungsgrad wurde für jede Substanz mit einem entsprechenden  $m/z$ -Verhältnis bestimmt, die eine Konzentrationsänderung während der Versuche zeigte und auf Basis von GC-MS-Messungen sowie Literaturrecherchen identifiziert wurde. Die Fragmentierungsanalysen erfolgten dabei durch das Messen von einzelnen Reinsubstanzen im Kopfraum der betreffenden Proben mit PTR-MS. In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse der Fragmentierungsanalysen zu finden. Wenn es erforderlich war, wurden die Konzentrationen der Substanzen entsprechend dem Fragmentierungsgrad korrigiert.

Tabelle 3.3: Fragmentierungsgrad der identifizierten VOCs

chem. Verbindung	protonierte Molekülmasse	Hauptfragment $m/z$ (absolute Häufigkeit in %)	weitere Fragmente $m/z$ (absolute Häufigkeit in %)
Methanol	33	33 (100)	-
Ethanol	47	47 (88)	29 (8,5), 45 (3,5)
Ameisensäure	47	47 (98,5)	48 (1,5)
2-Propanon (Aceton)	59	59 (94)	60 (6,1)
Ethansäure (Essigsäure)	61	43 (51,4)	61 (48,6)
Methylsulfanylmethan (Dimethylsulfid)	63	63 (92,2)	64 (7,8)
2-Butanon	73	73 (95,7)	74 (4,3)
2,3-Butandion (Diacetyl)	87	87 (80,9)	59 (15,3), 88 (3,8)
3-Methylbutanal	87	87 (94,7)	88 (5,3)
3-Hydroxy-2- butanon (Acetoin)	89	89 (96,4)	90 (3,6)
3-Methylbutanol	89	89 (93,8)	90 (6,3)
Isobutansäure	89	89 (62,9)	43 (19,6), 41 (12,6), 90 (2,8), 71 (2,2)
Propionsäure	75	75 (89,9)	57 (10,1)
1-Pentanol	89	43 (44,5)	39 (5,4), 41 (38,4), 71 (11,8)
1-Penten-3-ol	87	41 (39,2)	39 (7), 45 (12,7), 69 (36,5), 87 (4,6)
1-Propanol	61	41 (46,5)	39 (7,9), 43 (45,5)
2-Ethylfuran	97	97 (94,9)	98 (5,1)
Benzaldehyd	107	107 (87)	79 (7,1), 108 (5,9)
Butansäure	89	89 (49,2)	41 (14), 43 (32,1), 71 (4,7)
Ethylacetat	89	61 (47,6)	43 (43,1), 89 (9,3)
2,3-Butandiol	91	73 (67,4)	43 (11,6), 45 (21)

### 3.5 Datenauswertung

---

Die Auswertung der PTR-MS-Datensätze erfolgte mit dem Statistikprogramm R (Version: 3.2.0) und Excel (Word 2007). Die Kopfraum-Volumenkonzentration (KVK) in Volumenanteilen pro Milliarde (ppb<sub>v</sub>) wurde durch eine theoretische Annäherung basierend auf bekannten Reaktionskonstanten beim Protonentausch zwischen H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> und den entsprechenden Zielmolekülen bestimmt. Eine Standardmethode ist in Gouw et al. (2003) beschrieben.

$$KVK = \frac{(MH^+)_{cps}/Tr_{MH^+}}{(21^+)_{cps}/Tr_{21^+}} \cdot \frac{1}{k \cdot t_r} \cdot \frac{1}{N_d} \quad (3.1)$$

mit

$$N_d = \frac{p_d \cdot N_A}{R \cdot T_d} \quad (3.2)$$

und

$$t = \frac{L_d}{\mu_0 \cdot N_0} \cdot \left(\frac{E}{N}\right)^{-1} \quad (3.3)$$

mit:

MH <sup>+</sup> :	protonierte Molekülmasse
Tr <sub>MH<sup>+</sup></sub> :	Transmissionsraten der protonierten Moleküle
Tr <sub>21<sup>+</sup></sub> :	Transmissionsrate des schweren Wasserisotops (0,772)
21 <sup>+</sup> <sub>cps</sub> :	Anzahl an H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionen des schweren Wasserisotops in Zählraten pro Sekunde (cps)
k:	Reaktionskonstante ( $\times 10^{-9} \frac{cm^3}{s}$ )
t <sub>r</sub> :	Reaktionszeit im Driftraum (0,0001 s) (Keck et al., 2007)
N <sub>d</sub> :	Teilchenanzahldichte im Driftraum
p <sub>d</sub> :	Druck im Driftraum (2,2 mbar)
N <sub>A</sub> :	Avogadro-Konstante ( $6,02 \times 10^{23} \text{ 1/mol}$ )
R:	allgemeine Gaskonstante ( $83,144621 \frac{mbar \cdot l}{mol \cdot K}$ )
T <sub>d</sub> :	Temperatur im Driftraum (333,15 K)
L <sub>d</sub> :	Länge des Driftraums (9,6 cm)
μ <sub>0</sub> :	eingeschränkte Mobilität
N <sub>0</sub> :	Gasdichte bei Standarddruck (1 atm) und Standardtemperatur (273,15 K)
E:	elektrische Feldstärke
N:	Teilchenanzahldichte

Eine Standard-Reaktionskonstante k von  $2,0 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$  wurde für alle Verbindungen eingesetzt, für die in der Literatur kein spezieller k-Wert gefunden wurde und für alle m/z-Verhältnisse, für die mehr als eine chemische Verbindung zugeordnet werden konnte. Spezifische Reaktionskonstanten für alle anderen Verbindungen sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Die geschätzte

Fehlerwahrscheinlichkeit für die beschriebene Berechnung der Kopfraum-Volumenkonzentration liegt zwischen 15 und 30 % (D'Anna et al., 2005; Hewitt et al., 2003; Lindinger et al., 1998b).

Um die Einbeziehung von möglichen Einschleppungseffekten zu verhindern, wurden die Werte der ersten beiden Zyklen nach dem Wechsel von einer Probe zur nächsten verworfen und nur die Zyklen 3-5 für weitere Berechnungen berücksichtigt. Das Quantifizierungslimit (LOQ) wurde mit 10 x Standardabweichung des Hintergrundsignals berechnet. Die in dieser Arbeit in den Abbildungen bunt dargestellten Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten mit Konfidenzintervall ( $\alpha = 0,95$ ) aus den Zyklen 3-5 je Probe und Messzeitpunkt.

Zusätzlich wurden die Daten zur Metabolitbestimmung von Einzelstämmen und dem Spontanverderb mittels einer nicht-linearen Regression ausgewertet, um das dynamische Verhalten der Konzentrationsänderungen der detektierten Substanzen beschreiben zu können. Zur nicht-linearen Regression wurden Funktionen bzw. Kombinationen davon eingesetzt, welche in der Literatur zur Beschreibung von mikrobiellem Wachstum zu finden sind. Typischerweise handelt es sich hierbei um logistisches und exponentielles Wachstum (Juška et al., 2006; Zwietering et al., 1990).

Tabelle 3.4: Reaktionskonstanten  $k$  für Protonenauschreaktionen zwischen Hydronium-Ionen und flüchtigen organischen Verbindungen (Zhao und Zhang, 2004)

Verbindung	Summenformel	Reaktionskonstante $k \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$
Methanol	$\text{CH}_4\text{O}$	2,33
Ameisensäure	$\text{CH}_2\text{O}_2$	2,02
Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	2,26
Ethanal (Acetaldehyd)	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$	3,36
2-Propanon (Aceton)	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	3,00
2,3-Butandion (Diacetyl)	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$	1,71
Ethansäure (Essigsäure)	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	2,27
Methylsulfanylmethan (Dimethylsulfid)	$\text{C}_2\text{H}_6\text{S}$	2,53
2-Butanon	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$	3,38
Nonanal	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$	3,84
1-Propanol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	2,44
Benzaldehyd	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$	4,12

### 3.5 Datenauswertung

Tabelle 3.5: Übersicht der für die nicht-lineare Regression verwendeten Funktionen mit b: Stauchung/Streckung der e-Funktion (Wachstumsgeschwindigkeit), d: Steigung der Geraden, f: Stauchung/Streckung des Polynoms in Richtung der y-Achse, u: Maximum des Zuwachses, w: Zeitkonstante, y: zeitliche Verschiebung/Wendepunkt des Wachstums, z: y-Achsenabschnitt

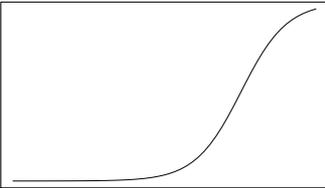
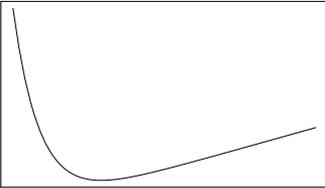
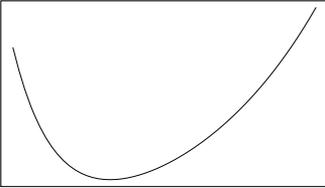
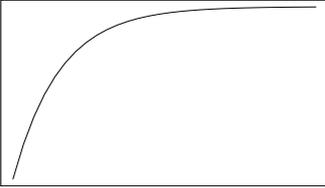
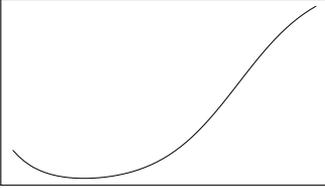
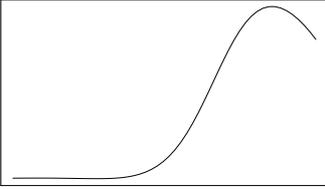
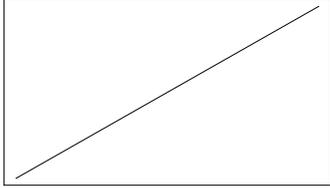
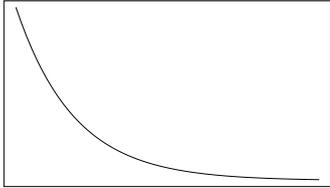
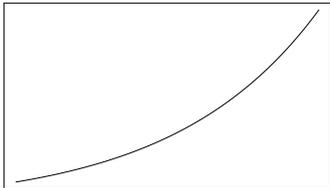
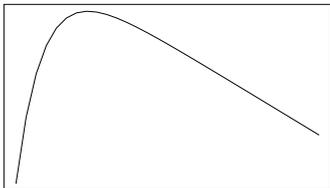
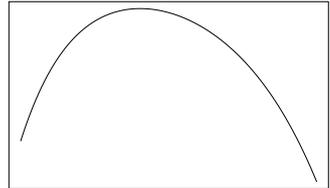
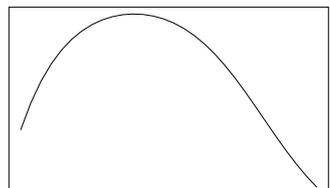
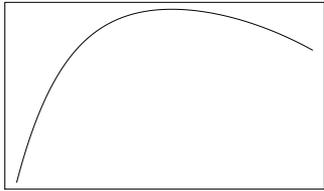
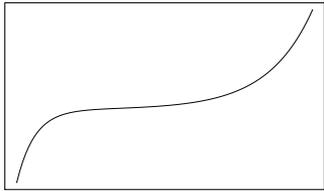
Nummer	Wachstumsverhalten	Fit-Funktion (Fkt.)	Grafik
1	logistisches Wachstum	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$	
2	exponentielle Abnahme + lineares Wachstum	$f(t) = z + b \cdot e^{-w \cdot t} + d \cdot t$	
3	exponentielle Abnahme + exponentielles Wachstum	$f(t) = b_1 \cdot e^{-w_1 \cdot t} + b_2 \cdot e^{w_2 \cdot t}$	
4	beschränktes Wachstum	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$	
5	logistisches Wachstum + exponentielles Wachstum	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w_1 \cdot t + y}} + b \cdot e^{-w_2 \cdot t}$	
6	logistisches Wachstum + Funktion 3. Grades	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$	

Tabelle 2.6: Fortsetzung

Nummer	Wachstumsverhalten	Funktion	Grafik
7	lineares Wachstum	$f(t) = z + d \cdot t$	
8	exponentielle Abnahme	$f(t) = z + b \cdot e^{-w \cdot t}$	
9	exponentielles Wachstum	$f(t) = z + b \cdot e^{w \cdot t}$	
10	beschränktes Wachstum + lineare Abnahme	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$	
11	beschränktes Wachstum + exponentielle Abnahme	$f(t) = u - b \cdot e^{-w_1 \cdot (t-t_0)} - e^{w_2 \cdot (t-t_0)}$	
12	beschränktes Wachstum + logistische Abnahme	$f(t) = u - e^{-t+x} - \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t+y}}$	

### 3.5 Datenauswertung

Tabelle 2.6: Fortsetzung

Nummer	Wachstumsverhalten	Funktion	Grafik
13	beschränktes Wachstum + Funktion 3. Grades	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - f \cdot t^3$	
14	beschränktes Wachstum + exponentielles Wachstum	$f(t) = u - b \cdot e^{-w_1 \cdot t} + e^{w_2 \cdot (t-x)}$	

#### 3.5.2 Eignung des PTR-MS-Messaufbaus zur Detektion von flüchtigen Verbindungen beim Fleischverderb

Zur Überprüfung der Eignung des entwickelten Messaufbaus zur Detektion von flüchtigen organischen Verbindungen beim Fleischverderb wurde aus repräsentativen, berechneten Kopfraum-Volumenkonzentrationen der einzelnen Substanzen die Konzentrationen im Fleisch ermittelt.

In einem ersten Schritt wurden die detektierten Kopfraum-Volumenkonzentrationen mit Hilfe des idealen Gasgesetzes in eine andere Einheit umgerechnet:

$$c\left[\frac{mg}{m^3}\right] = \frac{c[ppm] \cdot M \cdot p_{Referenz}}{R \cdot T_{Referenz}} \quad (3.4)$$

mit:

M: Molmasse [g/mol]

$p_{Referenz}$ : Referenzdruck (980 mbar)

$T_{Referenz}$ : Referenztemperatur (277,15 K)

R: universelle Gaskonstante (83,144621  $\frac{mbar \cdot l}{mol \cdot K}$ )

In einem zweiten Schritt wurde unter Verwendung des Verteilungskoeffizienten  $P$  die Konzentration im Fleisch nach Sander (2015) mit folgender Gleichung berechnet:

$$P = \frac{c_a}{c_g} \quad (3.5)$$

mit:

$c_a$ : Konzentration im Fleisch

$c_g$ : Konzentration in der Gasphase

Die Verteilungskoeffizienten für Muskelfleisch sind in Tabelle 3.6 zu finden.

Tabelle 3.6: Verteilungskoeffizienten  $P$  zwischen Muskelgewebe von Ratten und Luft bei 37 °C für ausgewählte flüchtige organische Verbindungen

chemische Verbindung	Molmasse in g/mol	Verteilungskoeffizient $P$	Quelle
Methanol	32,04	3980	Kaneko et al., 1994
Ethanol	46,07	1710	Kaneko et al., 1994
2-Propanon (Aceton)	58,08	165	Poulin und Krishnan, 1996
Ethylacetat	88,11	69,9	Kaneko et al., 1994
2-Butanon	72,11	160	Poulin und Krishnan, 1996

Zudem wurde die Diffusion der gelösten flüchtigen organischen Verbindungen im Fleisch mit Hilfe des 2. Fick'schen Gesetzes (Diffusionsgleichung) ermittelt.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (3.6)$$

mit:

$D$ : Diffusionskonstante

$c$ : Konzentration in Abhängigkeit des Radius und der Zeit

### 3.5 Datenauswertung

Das 2. Fick'sche Gesetz stellt die Beziehung zwischen zeitlichen und örtlichen Konzentrationsunterschieden dar. Unter den Annahmen, dass die flüchtigen Stoffe gleichmäßig auf der Fleischoberfläche gebildet werden und die Konzentration der gebildeten Stoffe zwischen den einzelnen Messzeitpunkten annähernd konstant ist, lässt sich die Diffusionsgleichung unter Verwendung der Abbildung 3.3 lösen (Crank, 1975). Für den effektiven Diffusionskoeffizienten von kleinen Molekülen in Lebensmitteln wie Fleisch wird in der Literatur ein Wert von etwa  $2 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  angegeben (Doulia et al., 2000). Die Ergebnisse zu dieser Berechnung sind in Abschnitt 4.1 zu finden.

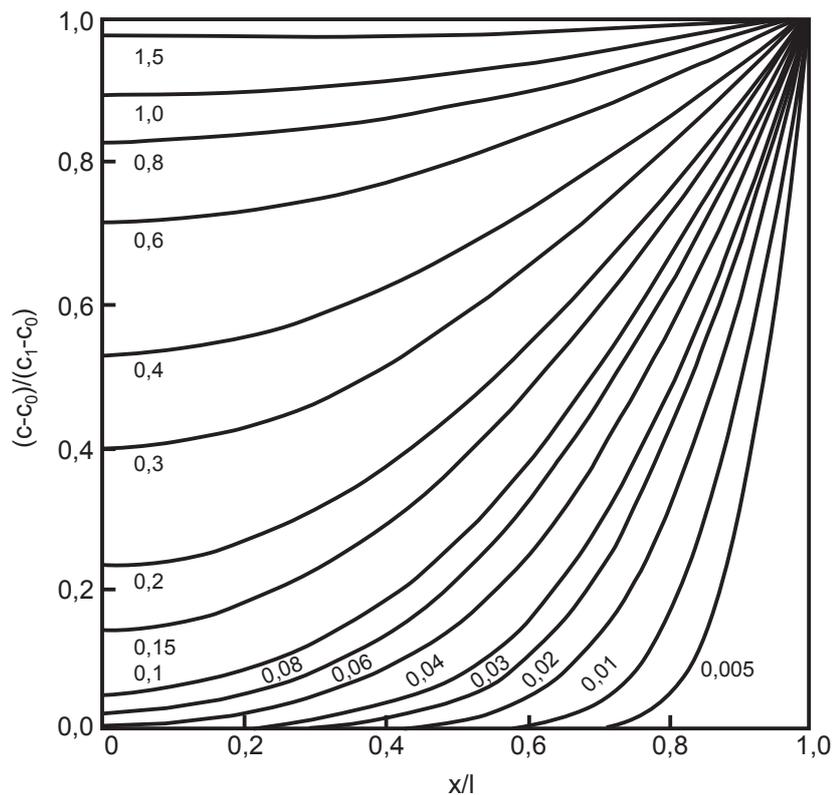


Abbildung 3.3: Konzentrationsverteilungen zu verschiedenen Zeiten für die Diffusion in eine Ebene mit  $-l < x < l$ , mit einer Anfangskonzentration  $c_0$  und einer Oberflächenkonzentration  $c_1$ . Zahlen an den Kurven sind Werte aus  $\frac{D \cdot t}{l^2}$  mit Diffusionskonstante  $D$ , Zeit  $t$  und Länge  $l$ ; nachgezeichnet nach Crank (1975)

#### 3.5.3 GC-MS

GC-MS-Chromatogramme wurden mit der Software OpenChrom ausgewertet. Für jeden Peak wurde die Fläche bestimmt und die Peaks durch den Vergleich mit den MS-Daten aus der NIST-Bibliothek (Version 2.0 c, Nov. 2004) und Referenzspektren von Reinsubstanzen identifiziert.

### 3.5.4 sensorische Untersuchung

Die Daten wurden im Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft) gesammelt und bearbeitet. Die Auswertung der Daten erfolgte durch das Statistikprogramm R.

#### **hierarchische Clusteranalyse**

Die hierarchische Clusteranalyse wurde verwendet, um einen ersten Eindruck über die Sensordaten zu erhalten und die einzelnen Attribute in Gruppen mit ähnlichem Verhalten einteilen zu können. Als Datensatz dienten dabei die berechneten Mittelwerte (Datenpunkte) für jedes Attribut und jeden Tag. Bei der hierarchischen Clusteranalyse werden zunächst alle Datenpunkte als eigenständige Cluster betrachtet und die Distanz der einzelnen Cluster zueinander für jeden Tag bestimmt. Diejenigen beiden Cluster, welche über alle Tage hinweg die geringste Distanz zueinander aufweisen, werden fusioniert. Anschließend werden die Abstände der restlichen Cluster neu berechnet und wieder die zwei Cluster mit dem geringsten Abstand zueinander fusioniert. Dieser Prozess wird solange wiederholt, bis sich alle Datenpunkte in einem einzigen Cluster befinden.

Für die Bestimmung des Abstandes wurde die "complete linkage"-Methode angewendet. Die Distanzbestimmung erfolgt dabei über die Maximal-Abstände zwischen den Clustern. Hierbei werden die Datenpunkte von jeweils zwei Clustern miteinander verglichen und die Datenpunkte mit dem größten Abstand zueinander für die Fusionierung herangezogen (Stein und Vollnhals, 2011; TUM, 2011).

Die Ergebnisse der Fusionierung wurden in einem Dendrogramm mit Heatmap dargestellt. Anhand des Dendrogramms konnte abgeleitet werden, welche Attribute in ihrem Verhalten ähnlich waren. Hierzu wurden die einzelnen Teilschritte der Fusionierung visuell betrachtet und diejenigen Cluster ausgesucht, welche subjektiv am geeignetsten aussahen. Besonders sinnvoll sind dabei Cluster bis zu einem großen Sprung zwischen zwei Fusionierungen, da große Sprünge auf Unähnlichkeiten hinweisen.

#### **sequentielle logistische Regression**

In einem weiteren Schritt wurde die Aussagenschärfe für jedes einzelne Attribut untersucht, d.h. es wurde ermittelt, in wie vielen Qualitätsstufen ein Attribut durch das Panel wahrnehmbar war. Hierfür wurden für jeden Tag die Wahrscheinlichkeiten  $P$  für das Auftreten aller möglichen Merkmalsausprägungen (0, 1, 2, ..., 10) berechnet. Anschließend wurde diejenige Merkmalsausprägung ausgewählt, die für den entsprechenden Tag die größte Wahrscheinlichkeit  $P$  aufwies. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten erfolgte dabei mit Hilfe der sequentiellen logistischen Regression, auch kumulatives Logit Modell genannt (Pennsylvania State University, 2017; University of Virginia, 2017).

Die sequentielle logistische Regression stellt eine Erweiterung der einfachen logistischen Regression dar. Sie wird verwendet, wenn es mehr als zwei Merkmalsausprägungen gibt und sich die abhängigen Variablen in aufeinanderfolgende Kategorien ordnen lassen, die der Reihe nach durchlaufen werden. Diese Analyse beruht auf der Modellierung der Wahrscheinlichkeit, dass die abhängige Variable  $Y$  in eine Kategorie  $j$  (oder niedriger) fällt, im Vergleich zu einer Kategorie darüber. Dementsprechend werden Wahrscheinlichkeiten bis zu einem Schwellenwert kumuliert (Pennsylvania State University, 2017; University of Virginia, 2017).

Die kumulierte Wahrscheinlichkeit  $P(Y \leq j)$  ist definiert als (University of Virginia, 2017):

$$P(Y \leq j) = \frac{e^{\alpha_j + \beta \cdot x}}{1 + e^{\alpha_j + \beta \cdot x}} \quad (3.7)$$

Dabei entsprechen die abhängigen Variablen  $Y$  den 11 möglichen Merkmalsausprägungen ( $Y = 0, 1, 2, \dots, 10$ ) und die Kategorien  $j$  den Grenzen zwischen jeweils zwei Merkmalsausprägungen ( $0|1, 1|2, \dots, 9|10$ ). Somit können die Sensorikdaten in 10 Kategorien ( $j = 1, 2, \dots, 10$ ) gegliedert werden.

$P(Y \leq j)$  wird dabei über die geschätzten Parameter  $\alpha$  und  $\beta$  bestimmt. Für die Schätzung der Parameter kommt die Maximum-Likelihood-Methode zum Einsatz. Hierbei wird in einem ersten Schritt die sog. Maximum-Likelihood-Funktion aufgestellt. Diese ergibt sich aus der Grundgleichung 3.8, in welche die Gleichung 3.7 eingesetzt wird. Anschließend werden in einem zweiten Schritt diejenigen Schätzwerte von  $\alpha$  und  $\beta$  berechnet, welche  $L(P)$  maximieren. Denn in diesem Fall ist es am wahrscheinlichsten, dass die geschätzten Parameter die realen Daten am besten widerspiegeln. Die optimalen Schätzwerte werden erhalten, indem die Maximum-Likelihood-Funktion jeweils nach  $\alpha$  und  $\beta$  abgeleitet und die Ableitung Null gesetzt wird (Mayerl und Urban, 2010).

$$L(P) = P^s \cdot (1 - P)^{n-s} \quad (3.8)$$

mit:

n: Anzahl der Panelisten

s: Anzahl der Panelisten, bei denen  $Y \leq j$  zutrifft

Sind die kumulierten Wahrscheinlichkeiten  $P(Y \leq j)$  bekannt, können die Wahrscheinlichkeiten  $P(Y = j)$  mit folgender Gleichung ermittelt werden (University of Virginia, 2017):

$$P(Y = j) = P(Y \leq j) - P(Y \leq j - 1) \quad (3.9)$$

Beispielhaft sind die Wahrscheinlichkeiten  $P(Y = j)$  für das Attribut *visueller Frischeindruck* bei Hähnchenfleisch in Abbildung 3.4 visualisiert. Die abhängigen Variablen  $Y$  fallen immer in diejenige Kategorie  $j$ , welche zum vorgegebenen Tag  $x$  die höchste Wahrscheinlichkeit aufweist (vergleiche Abbildung 4.33). Die eingezeichneten Pfeile stellen die Grenzen dar, an denen die abhängige Variable  $Y$  die Kategorie  $j$  wechselt.

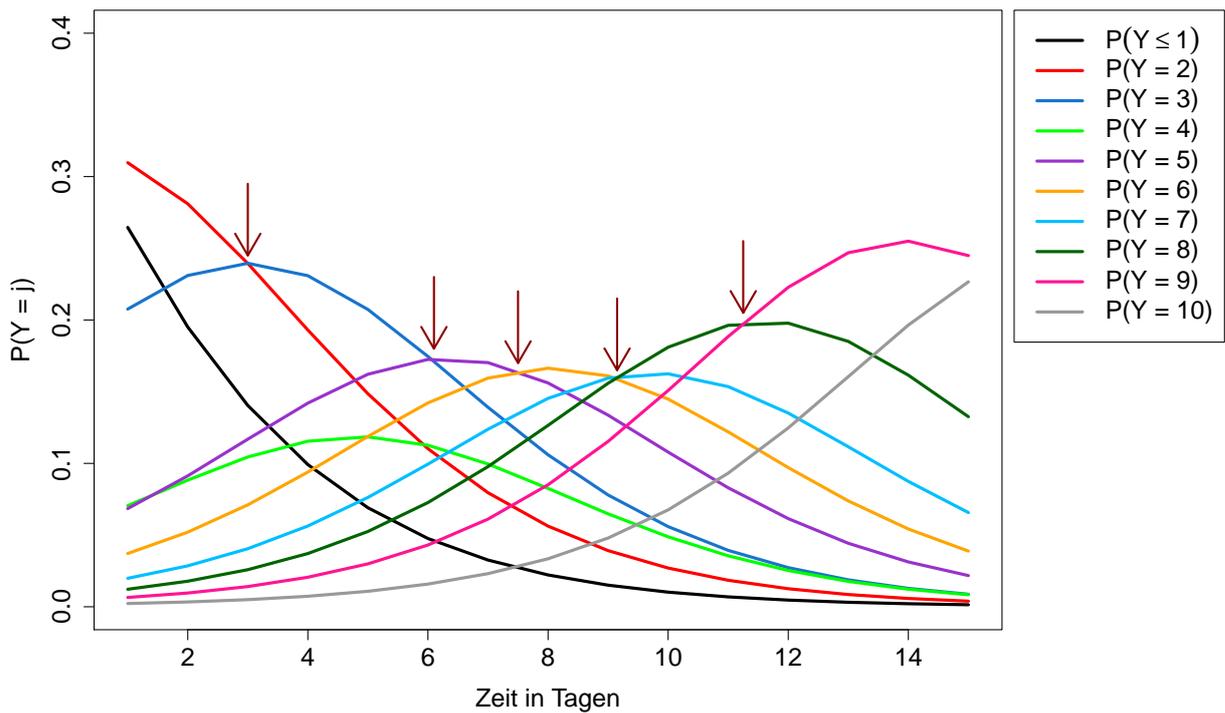


Abbildung 3.4: Grafische Darstellung der sequentiellen logistischen Regression für das Attribut *visueller Frischeindruck* bei Hähnchenfleisch

Die Merkmalsausprägungen mit der größten Wahrscheinlichkeit  $P(Y = j)$  sind in den Diagrammen als rote, horizontale Linien dargestellt. Zusätzlich wurden in den Diagrammen die sensorischen Bewertungen des Panels für die jeweiligen Messzeitpunkte als Boxplots eingefügt.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Eignung des PTR-MS-Messaufbaus zum Nachweis von flüchtigen organischen Verbindungen bei Schutzgas-verpacktem Fleisch

Die Ergebnisse wurden bereits teilweise in Franke und Beauchamp (2017) beschrieben und diskutiert. Mit Hilfe des entwickelten Messaufbaus wurden Konzentrationsänderungen von Substanzen mit insgesamt 9 verschiedenen  $m/z$ -Verhältnissen bei den Hähnchenfleisch-Versuchen und Substanzen mit insgesamt 13 verschiedenen  $m/z$ -Verhältnissen bei Rindfleisch erfasst. Die mit dem PTR-MS detektierten Substanzen wurden durch ergänzende HS-SPME GC-MS-Messungen an parallelen Proben und nach Beenden der Versuche an den zuerst im PTR-MS eingesetzten Proben identifiziert. Hierfür wurden Fleischstücke mit einer Oberfläche von  $3,3 \text{ cm}^2$  in ein 20 ml Vial gegeben und mit einem Deckel mit Septum verschlossen. Die flüchtigen Substanzen wurden anschließend bei  $30 \text{ °C}$  im Kopfraum der Proben an einer HS-SPME-Faser angereichert, um eine für die Identifizierung ausreichende Peakhöhe der einzelnen Substanzen zu erzielen (siehe 3.1.4 und 3.2.2).

Zusätzlich erfolgten auf Basis der Ergebnisse zu den GC-MS-Analysen Fragmentierungsmessungen von Reinsubstanzen mit dem PTR-MS sowie Vergleiche mit Literaturdaten zu Substanzemissionen beim Fleischverderb. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick aller Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wurden. Die Substanzen können den Hauptgruppen Alkohole, Aldehyde, Ketone, Kohlenwasserstoffe und Schwefelverbindungen zugeordnet werden. Für einige  $m/z$ -Verhältnisse wurden jeweils mehrere mögliche chemische Substanzen identifiziert (siehe Tabelle 4.1). Für diese  $m/z$ -Verhältnisse war trotz erfolgter ergänzender Analysen zu den PTR-MS-Messungen eine weitere Differenzierung nicht möglich. Daher wurden für diese  $m/z$ -Verhältnisse Substanzen nach Plausibilität festgelegt.

#### 4.1 Eignung des PTR-MS-Messaufbaus zum Nachweis von flüchtigen organischen Verbindungen bei Schutzgas-verpacktem Fleisch

Tabelle 4.1: Detektierte flüchtige Verbindungen mit PTR-MS, Verbindungen mit \* wurden mit HS-SPME GC-MS in dieser Arbeit identifiziert, die restlichen Verbindungen stammen aus Literaturdaten, die unterstrichenen Verbindungen stellen die nach Plausibilität am wahrscheinlichsten Substanzen für die entsprechenden *m/z*-Verhältnisse dar

<i>m/z</i> -Verhältnis	Mögliche Identifizierung der Verbindungen anhand von GC-MS-Analysen und Literatur	
	Hähnchen	Rind
33	nicht vorhanden	Methanol
41	Fragmente von Alkoholen und Säuren (u.a. 1-Propanol, Isobutansäure)	Fragmente von Alkoholen und Säuren (u.a. 1-Propanol, 1-Pentanol, 1-Penten-3-ol, Butansäure)
43	Fragmente von Alkoholen, Estern und Säuren (u.a. 1-Propanol, Isobutansäure)	Fragmente von Alkoholen, Estern und Säuren (u.a. Ethylacetat, 1-Propanol, Butansäure, 2,3-Butandiol)
47	Ethanol*	Ethanol
59	2-Propanon*	2-Propanon*
61	nicht vorhanden	Ethansäure*, Ethylacetat* (Fragment, später Verderb bei 10 °C)
63	Methylsulfanylmethan* (Dimethylsulfid)	Methylsulfanylmethan* (Dimethylsulfid)
69	nicht vorhanden	1-Penten-3-ol* (Fragment)
71	unbekannt, 1-Pentanol (Fragment)	unbekannt, 1-Pentanol (Fragment)
73	2-Butanon*	nicht vorhanden
75	nicht vorhanden	Propansäure*
87	<u>2,3-Butandion*</u> (Diacetyl), 3-Methylbutanal*	<u>2,3-Butandion*</u> (Diacetyl)
89	<u>3-Hydroxy-2-butanon*</u> (Acetoin), 3-Methylbutanol*	<u>3-Hydroxy-2-butanon*</u> (Acetoin), Butansäure*
97	nicht vorhanden	2-Ethylfuran*

Um die Eignung des entwickelten Messaufbaus zu überprüfen, wurden beispielhaft für einige detektierte flüchtige Substanzen die Konzentrationen in der Gasphase mit den ermittelten Konzentrationen der Substanzen im Fleisch verglichen. Anhand des Verhältnisses wurde qualitativ abgeleitet, ob der entwickelte Messaufbau die Bildung und Freisetzung von flüchtigen organischen Stoffen beeinflusst. Um die Konzentrationen in der Gasphase und im Fleisch zu erhalten, wurden die in 3.5.2 aufgeführten Formeln verwendet. Exemplarisch sind die Berechnungen für Ethanol in den Formeln 4.1 bis 4.6 aufgeführt.

Für die Berechnungen zur Gasphasen-Konzentration wurden in einem ersten Schritt für die ausgewählten Substanzen repräsentative, mit dem PTR-MS detektierte Kopfraum-Volumenkonzentrationen in [ppb<sub>v</sub>] gewählt. Anschließend wurde mit Hilfe des idealen Gasgesetzes die Kopfraum-Volumenkonzentration in [mg/m<sup>3</sup>] umgerechnet (Formel 4.1) und basierend auf diesem Ergebnis die Substanzmenge im Kopfraum der PFA-Behälter (1 l) bestimmt (Formel 4.2). Da bedingt durch den Messaufbau zu jedem Messzeitpunkt bei jeder Probe ein Gasaustausch von ca. 60 ml im Kopfraum stattgefunden hat, wurde zusätzlich berechnet, welche Menge von den jeweiligen Substanzen pro Messung entnommen wurde (Formel 4.3).

In einem zweiten Schritt wurde über den Verteilungskoeffizienten der jeweiligen Substanz (siehe 3.5.2, P(Ethanol) = 1710) die Konzentration in [mg/m<sup>3</sup>] im Fleisch bestimmt (Formel 4.2) und anschließend auf die Substanzmenge des für die Versuche verwendeten Fleischvolumens umge-

rechnet. Hierbei wurde angenommen, dass sich in jedem PFA-Behälter drei runde Fleischstücke befinden mit einer jeweiligen Oberfläche von  $20 \text{ cm}^2$  und einer Höhe von etwa  $1,5 \text{ cm}$  (Formel 4.5). In einem letzten Schritt wurde das Verhältnis aus "pro Messzeitpunkt entnommene Menge" und "Substanzmenge im Fleisch" bestimmt (Formel 4.6). Die Ergebnisse für die ausgewählten Substanzen sind in den Tabellen 4.2 und 4.3 zusammengefasst.

$$c(\text{Ethanol}) = \frac{0,003 \text{ ppm} \cdot 46,07 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 980 \text{ mbar}}{83,144621 \frac{\text{mbar} \cdot \text{l}}{\text{mol} \cdot \text{K}} \cdot 277,15 \text{ K}} = 0,006 \frac{\text{mg}}{\text{m}^3} \quad (4.1)$$

$$\text{Substanzmenge}(\text{Ethanol}, \text{Kopfraum}) = 0,006 \frac{\text{mg}}{\text{m}^3} \cdot 0,001 \text{ m}^3 = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mg} \quad (4.2)$$

$$\text{Substanzmenge}(\text{Ethanol}, \text{entnommen}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mg} \cdot \frac{60 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 3,6 \cdot 10^{-7} \text{ mg} \quad (4.3)$$

$$c(\text{Ethanol}, \text{Fleisch}) = 1710 \cdot 0,006 \frac{\text{mg}}{\text{m}^3} = 10,3 \frac{\text{mg}}{\text{m}^3} \quad (4.4)$$

$$\text{Substanzmenge}(\text{Ethanol}, \text{Fleisch}) = 9 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot 10,3 \frac{\text{mg}}{\text{m}^3} = 0,9 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \quad (4.5)$$

$$\frac{\text{pro Messzeitpunkt entnommene Menge}}{\text{Substanzmenge im Fleisch}} = \frac{3,6 \cdot 10^{-7} \text{ mg}}{0,9 \cdot 10^{-3} \text{ mg}} = 0,0009 \quad (4.6)$$

Tabelle 4.2: Aus den detektierten Kopfraum-Volumenkonzentrationen berechnete Konzentrationen im Kopfraum der Probenbehälter

chem. Verbindung	detektierte Kopfraum-Volumenkonzentration in ppb <sub>v</sub>	berechnete Konzentration in der Gasphase in mg/m <sup>3</sup>	Substanzmenge im Kopfraum in 10 <sup>-6</sup> mg	pro Messzeitpunkt entnommene Menge in 10 <sup>-7</sup> mg
Methanol	6	0,008	8	4,8
Ethanol	3	0,006	6	3,6
2-Propanon	20	0,05	5	3
Ethylacetat	10	0,038	38	22,8
2-Butanon	1	0,003	3	1,2

#### 4.1 Eignung des PTR-MS-Messaufbaus zum Nachweis von flüchtigen organischen Verbindungen bei Schutzgas-verpacktem Fleisch

Tabelle 4.3: Berechnete Konzentrationen in den Fleischproben

chem. Verbindung	berechnete Konzentration im Fleisch in mg/m <sup>3</sup>	Substanzmenge im Fleisch (V = 90 cm <sup>3</sup> ) in 10 <sup>-3</sup> mg	Verhältnis zw. pro Messzeitpunkt entnommene Menge und Substanzmenge im Fleisch
Methanol	31,8	2,9	0,0002
Ethanol	10,3	0,9	0,0004
2-Propanon	8,3	0,7	0,0004
Ethylacetat	2,7	0,2	0,01
2-Butanon	0,5	0,05	0,002

Die Berechnungen legten dar, dass die Konzentrationen der im Fleisch gelösten, chemischen Substanzen deutlich im Überschuss (ca. 4 Zehnerpotenzen) vorlagen, verglichen mit den Konzentrationen im Kopfraum bzw. der bei jedem Messzeitpunkt entnommenen Menge. Bedingt durch den Überschuss an chemischen Substanzen im Fleisch wurde das System nicht signifikant beeinflusst.

Zusätzlich zu diesen Überlegungen wurde die Diffusion der Substanzen in das Fleisch theoretisch mit Hilfe der Abbildung aus Crank (1975) ermittelt (siehe Abbildung 4.1). Unter den Annahmen, dass das für die PTR-MS-Messungen verwendete Fleisch eine Dicke  $l$  von 1,5 cm hatte und die Konzentration der gebildeten Stoffe zwischen den einzelnen Messzeitpunkten ( $t = 5$  h) annähernd konstant war, konnte der Quotient  $\frac{D \cdot t}{l^2}$  für den effektiven Diffusionskoeffizienten von kleinen Molekülen in Fleisch ( $2 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s, Doulia et al. (2000)) berechnet werden. Dieser Wert lag bei 0,016. Mit der Vereinfachung, dass die Anfangskonzentration im Fleisch  $c_0 = 0$  war, konnte für  $c/c_1 = 0,5$  der Quotient  $x/l = 0,84$  aus Abbildung 4.1 abgelesen werden. Hieraus ergab sich, dass sich in den obersten 2,4 mm mehr als 50 % der Oberflächenkonzentration befand. Die entsprechend zu diesem Ergebnis berechneten Substanzmengen sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Somit diffundierten die chemischen Verbindungen kaum in das Fleischinnere und waren hauptsächlich nur an der Oberfläche gelöst.

Tabelle 4.4: Berechnete Substanzmengen in den Fleischproben durch Diffusion

chem. Verbindung	Substanzmenge im Fleisch in den obersten 2,4 mm in 10 <sup>-3</sup> mg	Substanzmenge im Fleisch tiefer als 2,4 mm in 10 <sup>-3</sup> mg
Methanol	1,74	1,16
Ethanol	0,54	0,36
2-Propanon	0,42	0,28
Ethylacetat	0,12	0,08
2-Butanon	0,03	0,02

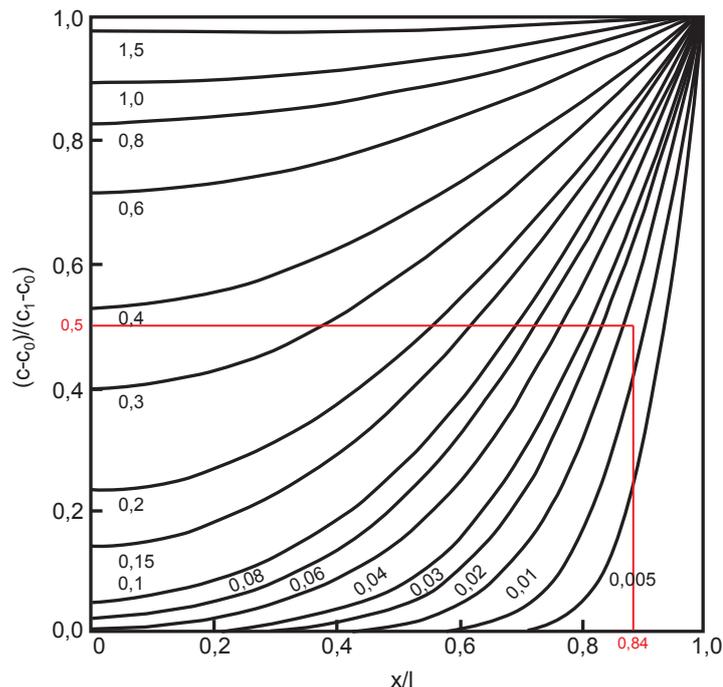


Abbildung 4.1: Konzentrationsverteilungen zu verschiedenen Zeiten für die Diffusion in eine Ebene mit  $-l < x < l$ , mit einer Anfangskonzentration  $c_0$  und einer Oberflächenkonzentration  $c_1$ . Zahlen an den Kurven sind Werte aus  $\frac{D \cdot t}{l^2}$  mit Diffusionskonstante  $D$ , Zeit  $t$  und Länge  $l$ ; nachgezeichnet nach Crank (1975) und erweitert

Dies zeigte, dass PTR-MS ein geeignetes Messinstrument ist, um die Bildung und Freisetzung von ausgewählten VOCs während der Lagerung von Schutzgas-verpacktem Fleisch bei niedrigen Temperaturen in Echtzeit zu messen. Die Echtzeitmessungen erlaubten eine Visualisierung des Verderbsprozesses und halfen mögliche flüchtige Verderbsmarker zu identifizieren.

## 4.2 Diskussion

Während der meisten PTR-MS-Messungen wurde die Temperatur im Kühlbrutschrank auf 4 °C gehalten, da diese Temperatur der maximal empfohlenen Lagerbedingung entspricht. Unter dieser Lagerbedingung wurde sichergestellt, dass nur diejenigen VOCs detektiert wurden, die wahrscheinlich auch in gleicher Weise während der Lagerung von kommerziell erhältlichem, Schutzgas-verpacktem Fleisch auftauchen. Einige Versuche (Spontanverderb Hähnchen und Rind) wurden auch bei 10 °C durchgeführt, um mögliche Kühlkettenunterbrechungen zu simulieren. Ein Nachteil bei niedrigen Temperaturen ist, dass der Dampfdruck aller flüchtigen Substanzen im Allgemeinen sehr gering ist, wodurch sich wenige gasförmige VOCs im Kopfraum der Proben befinden. Durch diese Tatsache und die Tatsache, dass auch die metabolische Aktivität der Mikroorganismen bei diesen Temperaturen reduziert ist, konnte die limitierte Anzahl der detektierten VOCs erklärt werden. Die Lagerung der Fleischproben bei höheren Temperaturen könnte zwar die Anzahl an detektierbaren VOCs erhöhen, würde jedoch auch die Zusammensetzung

zung der Mikroflora verändern. Der Verderb würde nicht mehr den typischen Lagerbedingungen von Schutzgas-verpacktem, marktverfügbarem Fleisch entsprechen.

Eine weitere Einschränkung des Versuchsaufbaus war, dass komplexe Gasmischungen, wie es beim Fleischverderb der Fall ist, oft unterschiedliche Verbindungen mit der gleichen nominalen Molekülmasse enthalten, beispielsweise Isobare und Isomere. Diese Verbindungen können aufgrund der geringen (nominalen) Massenauflösung des Quadrupolmassenspektrometers des PTR-MS nicht eindeutig identifiziert werden. Dieses Problem kann teilweise durch die Verwendung eines PTR-MS in Verbindung mit einem Flugzeit-Massenspektrometers (PTR-TOF-MS), durch Fragmentierungsmessungen mit dem PTR-MS oder auch durch Analysen bei repräsentativen Proben mit GC-MS gelöst werden. Mit Hilfe des PTR-TOF-MS lassen sich Isobare trennen, jedoch ist die Datenerfassung hier um ein Vielfaches komplizierter und ein PTR-TOF-MS stand zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Messungen nicht zur Verfügung.

Daher wurden in einem ersten Schritt ergänzende Analysen bei repräsentativen Proben mit HS-SPME GC-MS durchgeführt. Durch die im GC-MS verwendete Messtechnik lassen sich Einzelsubstanzen eines Stoffgemisches genau auftrennen und identifizieren, da die einzelnen Substanzen eines Stoffgemisches entsprechend ihren stoffspezifischen Eigenschaften unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase der Trennsäule eingehen. Dadurch ergibt sich für jede Substanz eine charakteristische Retentionszeit. Zudem entsteht im Massenspektrometer durch die eingesetzte Ionisationstechnik (meistenes Elektronenstoß-Ionisation) für jede Einzelsubstanz ein charakteristisches Fragmentmuster, so dass aus der Kombination von Retentionszeit und Fragmentstücken auf eine entsprechende Substanz geschlossen werden kann. Im Gegensatz dazu ist der Protonentransfer im PTR-MS eine sanfte Ionisationstechnik, so dass die meisten Substanzen durch ihre protonierte Molekülmasse detektiert werden.

Jedoch mussten für die GC-MS-Messungen die flüchtigen Substanzen im Kopfraum der Proben angereichert werden, um ausreichend hohe Peaks für die Identifizierung zu erzielen. Dies wurde erreicht, indem die flüchtigen Substanzen bei einer Temperatur von 30 °C an einer HS-SPME-Faser adsorbierten. Somit war es nicht möglich, die GC-MS-Messungen bei gleicher Temperatur wie die PTR-MS-Messungen durchzuführen. In einem zweiten Schritt wurden die identifizierten Substanzen mit Literaturdaten zum Fleischverderb verglichen und basierend auf den Ergebnissen Fragmentierungsmessungen von Reinsubstanzen mit dem PTR-MS durchgeführt, um eine weitere Differenzierung der Substanzen mit der gleichen nominalen Masse zu erzielen. Trotz dieser Maßnahmen war für die Substanzen mit  $m/z$  41, 43, 89 und zusätzlich für die Substanzen mit  $m/z$  87 bei Hähnchenfleisch eine genaue Identifizierung nicht möglich.

Es ist aus folgenden Gründen höchstwahrscheinlich, dass die Substanz mit  $m/z$  87 2,3-Butandion und die mit  $m/z$  89 3-Hydroxy-2-butanon bei Hähnchenfleisch entspricht. Schutzgas-verpacktes Hähnchenfleisch wird überwiegend von *B. thermosphacta* besiedelt (Höll et al., 2016), welcher hauptsächlich die beiden Substanzen unter aeroben Bedingungen bildet (Dainty und

Hibbard, 1980; Pin et al., 2002). 3-Hydroxy-2-butanon entsteht dabei aus Pyruvat (Glucose) über  $\alpha$ -Acetolactat durch die beiden Enzyme  $\alpha$ -Acetolactat-Synthase und Acetolactat-Decarboxylase. 2,3-Butandion wird durch die nicht-enzymatische oxidative Decarboxylierung von 3-Hydroxy-2-butanon gebildet (Dainty und Hibbard, 1983; Pin et al., 2002; Stanborough et al., 2017). Da Glucose als erstes Substrat beim Fleischverderb abgebaut wird, ist es naheliegend, dass 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon die ersten Qualitätsveränderungen des Fleisches anzeigen.

3-Methylbutanal, welches ebenfalls ein  $m/z$ -Verhältnis von 87 aufweist, wurde zwar in dieser Arbeit mit GC-MS als Stoffwechselprodukt von Mikroorganismen identifiziert, allerdings war eine Detektion erst zum Ende des jeweiligen Versuchszeitraums möglich. Bislang gibt es keine Literaturdaten, welche die Bildung von 3-Methylbutanal durch *B. thermosphacta* belegen. Diese Substanz könnte eventuell durch andere, auf der Fleischoberfläche wachsende Mikroorganismen gebildet worden sein. Jedoch entsteht 3-Methylbutanal aus der Aminosäure Leucin (O'Sullivan, 2017). Da Aminosäuren erst umgewandelt werden, wenn Glucose nicht mehr zur Verfügung steht, findet die Bildung dieser Substanz erst sehr spät im Verderbsprozess statt (2.2). Somit lag 2,3-Butandion mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit deutlich im Überschuss im Kopfraum der PTR-MS-Proben vor verglichen mit 3-Methylbutanal.

Auch 3-Methylbutanol, das ein  $m/z$ -Verhältnis von 89 besitzt, wurde mit GC-MS als Stoffwechselprodukt von Mikroorganismen identifiziert. Wie auch bei 3-Methylbutanal war eine Identifizierung jedoch erst zum Ende des jeweiligen Versuchszeitraums erfolgreich. 3-Methylbutanol ist der entsprechende Alkohol zu Isovaleriansäure (Dainty und Hibbard, 1980), welche wahrscheinlich von *B. thermosphacta* gebildet werden kann, da die entsprechenden Gene vorhanden sind. Da jedoch, wie bei 3-Methylbutanal, Isovaleriansäure aus dem Abbau von Aminosäuren (Leucin, Valin und Isoleucin) erfolgt, findet eine Produktion auch in diesem Fall erst statt, wenn Glucose der limitierende Faktor ist (Stanborough et al., 2017). Daher lag auch hier die Konzentration im Kopfraum der Proben von 3-Hydroxy-2-butanon höchstwahrscheinlich deutlich über der Konzentration von 3-Methylbutanol.

Wird die Substanz mit  $m/z$  89 bei Rindfleisch betrachtet, handelt es sich aus folgenden Gründen wahrscheinlich auch um 3-Hydroxy-2-butanon. Schutzgas-verpacktes Rindfleisch wird hauptsächlich von Milchsäurebakterien besiedelt. Zu den dominierenden Gruppen gehören *L. piscium*, *Leuconostoc gelidum ssp. gelidum* (*Lc. gelidum ssp. gelidum*) und *Lc. gelidum ssp. gasicomitatum* (Abschlussbericht IGF-Vorhaben 17803 N, 2017; Hanna et al., 1981; Jääskeläinen et al., 2016). Neben Milchsäure gehört 3-Hydroxy-2-butanon unter bestimmten Nährstoffvoraussetzungen zu den Hauptstoffwechselprodukten dieser Mikroorganismen (Andreevskaya et al., 2015; Jääskeläinen et al., 2015). Während *L. piscium* in der Lage ist, 3-Hydroxy-2-butanon aus Glucose zu produzieren, kann *Lc. gelidum* nur in Anwesenheit von Inosin und Ribose 3-Hydroxy-2-butanon bilden. Allerdings ist Inosin reichlich im Fleisch vorhanden und stellt daher

eine gute Energiequelle dar, wenn Glucose nicht mehr in ausreichenden Mengen zur Verfügung steht (Jääskeläinen et al., 2015; Johansson et al., 2011)

Butansäure, welches ein  $m/z$ -Verhältnis von 89 besitzt, wurde zwar ebenfalls in dieser Arbeit mit GC-MS als Stoffwechselprodukt von Milchsäurebakterien identifiziert. Butansäure ist eines der flüchtigen Hauptstoffwechselprodukte von Carnobakterien. Diese Substanz kann durch den Abbau von der Aminosäure Leucin entstehen (Casaburi et al., 2011; Kröckel, 2013). Da jedoch in dieser Arbeit Carnobakterien nur eine untergeordnete Rolle spielten und der Aminosäureabbau erst im fortgeschrittenen Verderb stattfindet, ist diese Substanz mit einem sehr hohen Grad an Wahrscheinlichkeit nicht für die Detektion des  $m/z$ -Verhältnisses verantwortlich.

Aus den genannten Gründen wird in der weiteren Arbeit davon ausgegangen, dass es sich bei der Substanz mit  $m/z$  87 um 2,3-Butandion und bei der Substanz mit  $m/z$  89 um 3-Hydroxy-2-butanon handelt.

### 4.3 Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch

Ziel dieser Versuche war es, das flüchtige Metabolitspektrum und damit verbunden die verderbsbezogene Aktivität von typischen Vertretern der autochthonen Mikrobiota (immer vorhandenen Mikroorganismen) über einen Zeitraum von 7 Tagen zu bestimmen. Hierfür wurde frisches Hähnchenbrustfilet mit Einzelstämmen beimpft. Als Einzelstämme wurden *B. thermosphacta* und *C. divergens* verwendet, da sie in Vorversuchen als Hauptverderber identifiziert wurden (Höll et al., 2016). Auch ein Stamm *Ps. fragi* wurde gewählt, da *Pseudomonas sp.* nach längerer Lagerzeit isoliert wurden (Höll et al., 2016). Die Versuche fanden jeweils in Dreifachbestimmung (Probe 1, Probe 2 und Probe 3) statt.

#### 4.3.1 Hähnchenfleisch beimpft mit *Brochothrix thermosphacta*

##### Wachstum

Abbildung 4.2 fasst die mikrobiologischen Ergebnisse zusammen. Es zeigte sich, dass die Anfangskeimzahl mit  $3,4 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> der Referenzprobe des unbeimpften Fleisches bereits an Tag 0 sehr hoch war, mit *B. thermosphacta* als dominierender Mikroorganismus. Nach Beimpfen des Fleisches dominierte *B. thermosphacta* mit einer größeren relativen Häufigkeit weiterhin die Mikroflora. *B. thermosphacta* behielt über den gesamten Messzeitraum die Rolle als vorherrschende Kontaminante, gefolgt von *Carnobacterium sp.*

### flüchtige Stoffwechselprodukte

Das flüchtige Metabolitspektrum umfasste Substanzen mit 8 verschiedenen  $m/z$ -Verhältnissen, die als Fragmente von Alkoholen, Säuren und Estern ( $m/z$  41 und  $m/z$  43), Ethanol ( $m/z$  47), 2-Propanon ( $m/z$  59), Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63), 2,3-Butandion ( $m/z$  87) und 3-Hydroxy-2-butanon ( $m/z$  89) identifiziert wurden. Die wichtigsten Ergebnisse der Bildung flüchtiger Stoffwechselprodukte von *B. thermosphacta* sind in den Abbildungen 4.3 bis 4.7 dargestellt. 2-Propanon war von Anfang an präsent, während 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon erst nach einer Lagerzeit von etwa 1 - 2 Tagen sicher quantifiziert werden konnten. Die Konzentration von Methylsulfanylmethan nahm am stärksten zu, Ethanol und 2,3-Butandion wurden nur in einem geringen Maß gebildet. Für alle drei Proben wurde die gleiche Anzahl an flüchtigen Substanzen detektiert. Jedoch unterschieden sich die gemessenen Konzentrationen von Ethanol und Methylsulfanylmethan innerhalb der Dreifachbestimmung.

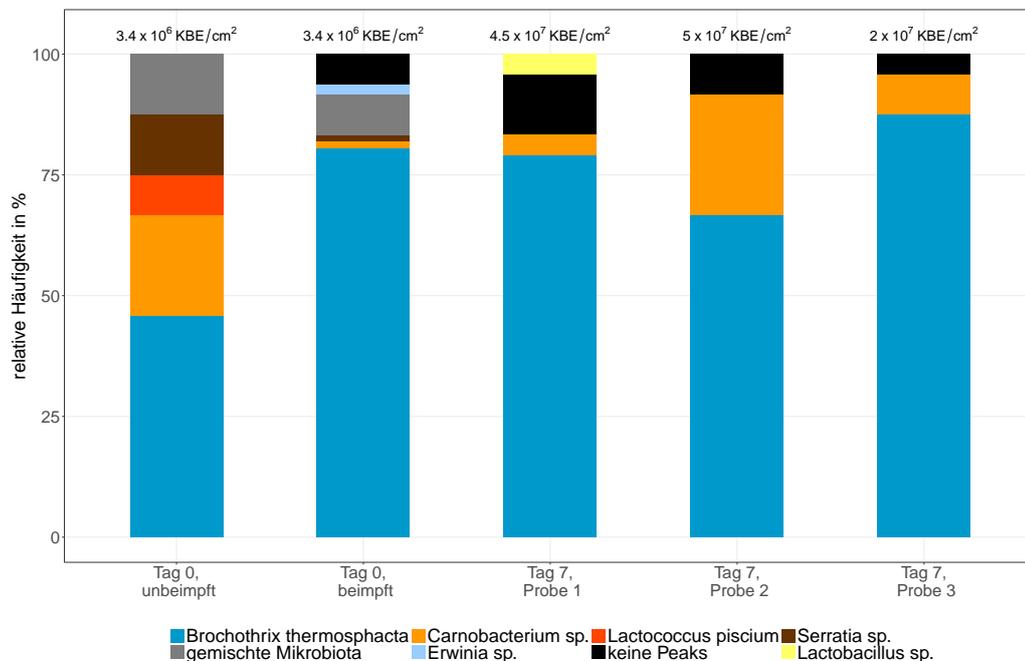


Abbildung 4.2: Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der mit *B. thermosphacta* beimpften Proben

### 4.3 Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch

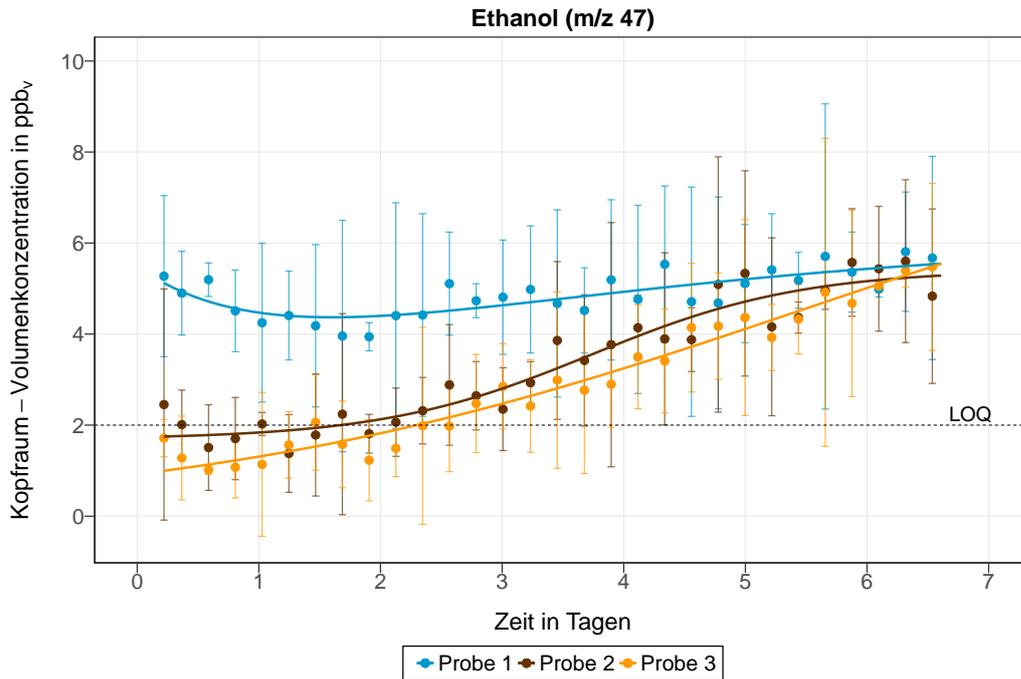


Abbildung 4.3: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethanol ( $m/z$  47) der mit *B. thermosphacta* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 5, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5)

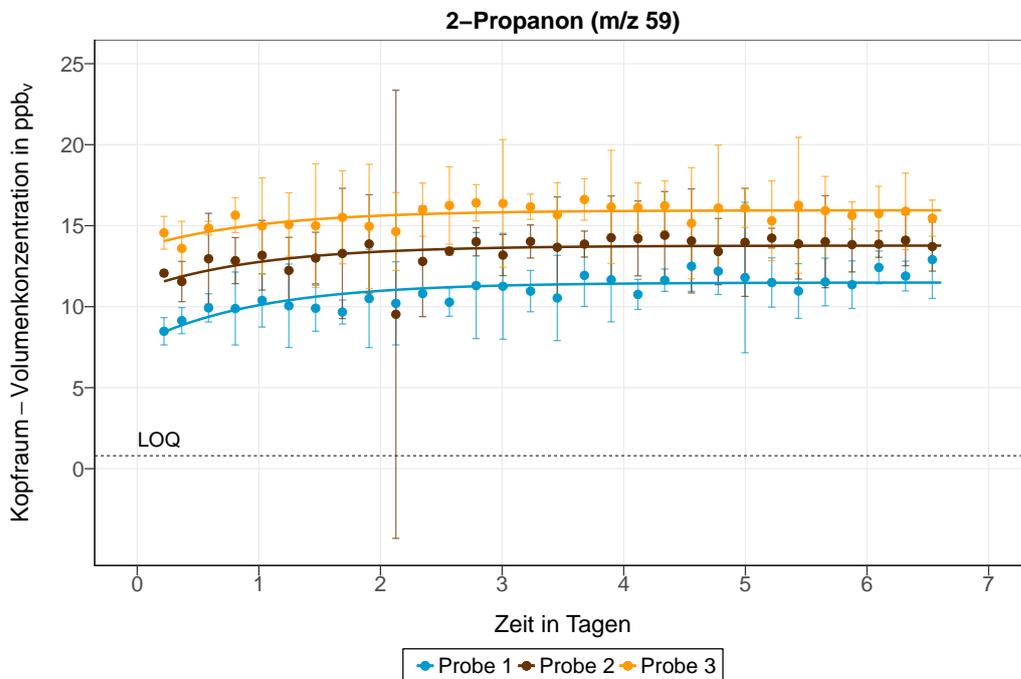


Abbildung 4.4: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( $m/z$  59) der mit *B. thermosphacta* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 4, Probe 2: Fit-Fkt. 4, Probe 3: Fit-Fkt. 4 (siehe Tabelle 3.5)

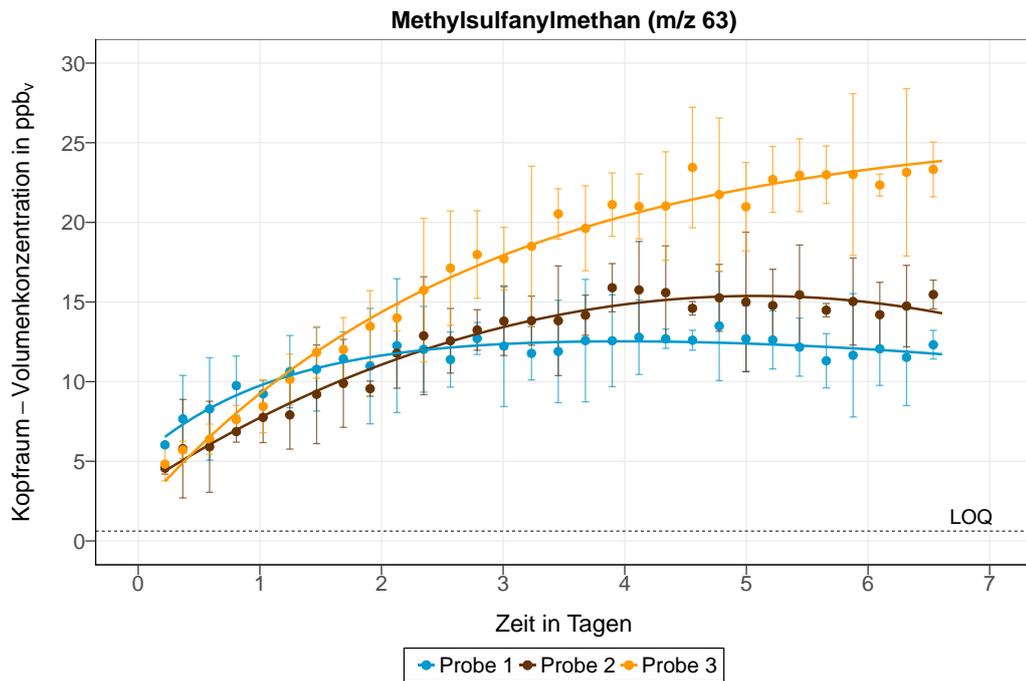


Abbildung 4.5: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63) der mit *B. thermosphacta* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 13, Probe 2: Fit-Fkt. 13, Probe 3: Fit-Fkt. 4 (siehe Tabelle 3.5)

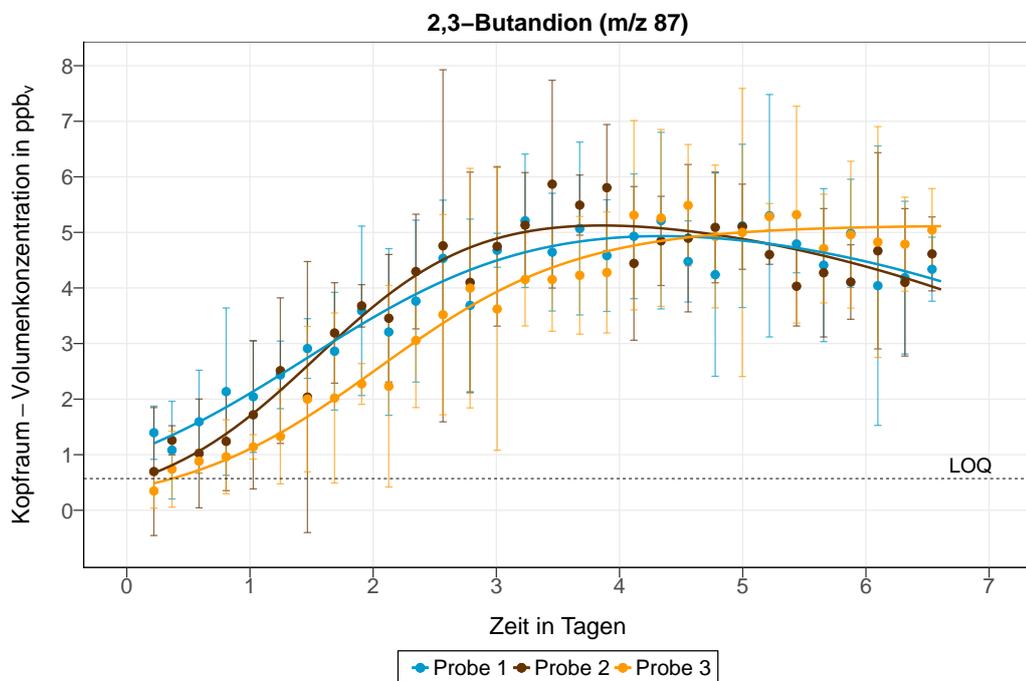


Abbildung 4.6: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( $m/z$  87) der mit *B. thermosphacta* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 6, Probe 2: Fit-Fkt. 6, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5)

### 4.3 Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch

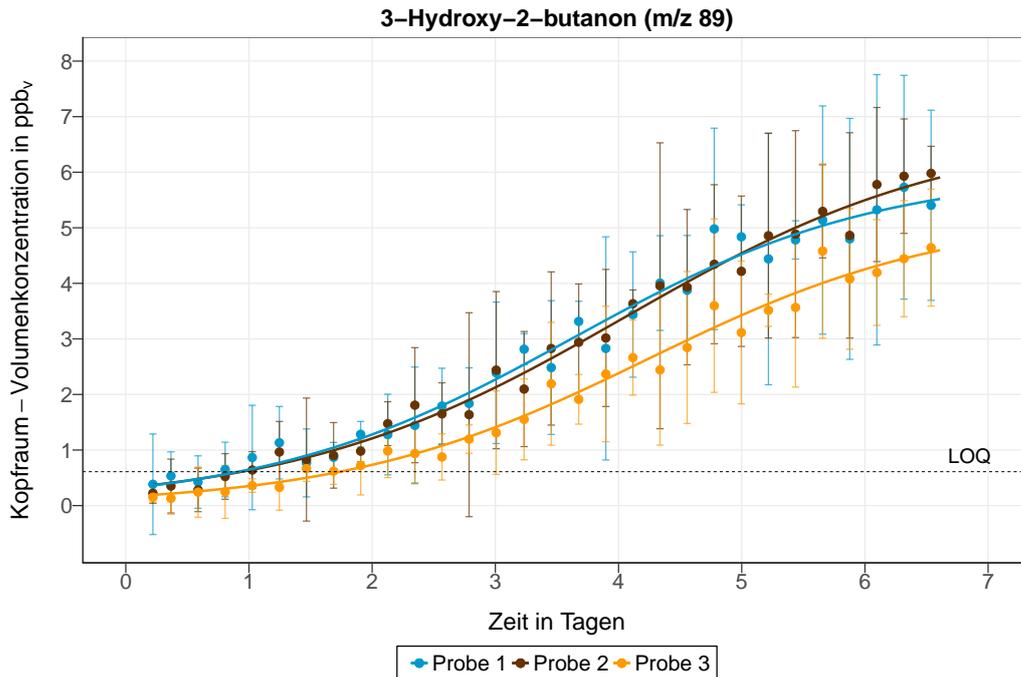


Abbildung 4.7: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( $m/z$  89) der mit *B. thermosphacta* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5)

#### 4.3.2 Hähnchenfleisch beimpft mit *Carnobacterium sp.*

##### Wachstum

Als repräsentativer Mikroorganismus für *Carnobacterium sp.* wurde *C. divergens* gewählt. In Abbildung 4.8 sind die Ergebnisse dargestellt. Auf der Referenzprobe des unbeimpften Fleisches hatten bereits  $4 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> die Oberfläche besiedelt. Die Mikrobiota bestand dabei hauptsächlich aus *Pseudomonas sp.* und *B. thermosphacta*. Nach Beimpfung mit  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> dominierte *C. divergens* an Tag 0 knapp vor *B. thermosphacta* die Mikrobiota. Während der Messung konnte sich *C. divergens* in diesem Versuch nicht weiter gegen *B. thermosphacta* durchsetzen, der am Ende in allen 3 Proben vorherrschend war.

##### flüchtige Stoffwechselprodukte

Das flüchtige Metabolitspektrum bestand aus Substanzen mit 9 verschiedenen  $m/z$ -Verhältnissen, welche als Fragmente von Alkoholen, Säuren und Estern ( $m/z$  41 und  $m/z$  43), Ethanol ( $m/z$  47), 2-Propanon ( $m/z$  59), Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63), 2,3-Butandion ( $m/z$  87) und 3-Hydroxy-2-butanon ( $m/z$  89) mit Hilfe von GC-MS sowie Literaturrecherchen identifiziert wurden. In den Abbildungen 4.9 bis 4.13 sind ausgewählte Ergebnisse veranschaulicht. 2-Propanon und Methylsulfanylmethan konnten von Beginn an detektiert werden, bei Ethanol, 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon war hingegen eine Quantifizierung erst nach 2 Tagen möglich. Am Ende des Versuchs wurden für Methylsulfanylmethan die höchsten Konzentrationsanstiege

im Kopfraum der Proben ermittelt, während 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon nur in niedrigen Konzentrationen gebildet wurden. Wie auch bereits bei der Bestimmung des flüchtigen Metabolitspektrums von *B. thermosphacta* wurde die gleiche Anzahl an flüchtigen Substanzen detektiert. Deutliche Unterschiede in der Konzentration wurden innerhalb der Dreifachbestimmung bei 2-Propanon und Methylsulfanylmethan detektiert.

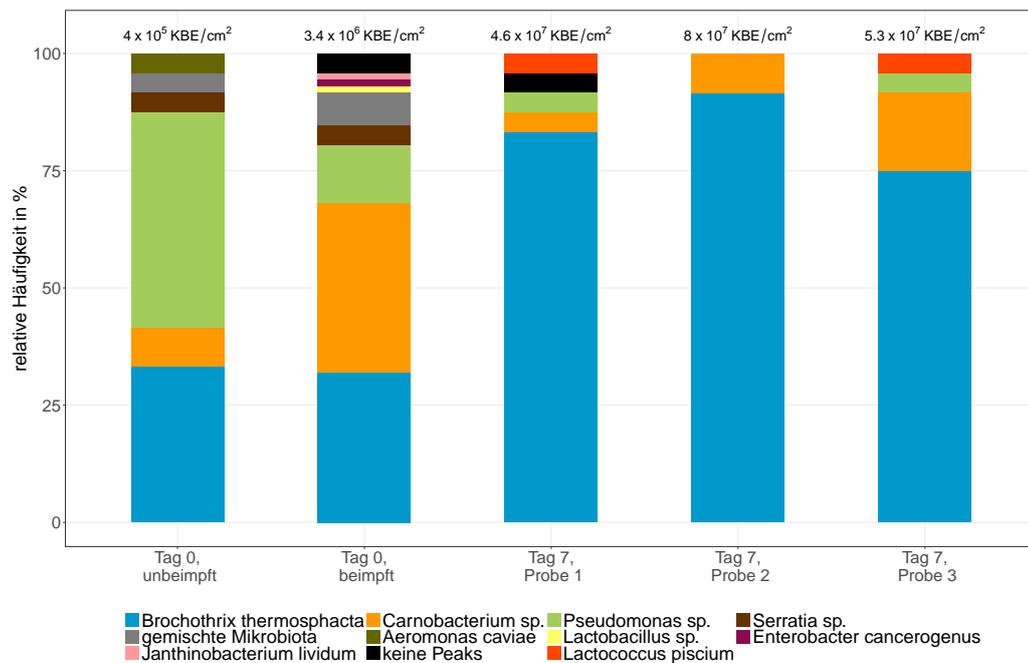


Abbildung 4.8: Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der mit *C. divergens* beimpften Proben

### 4.3 Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch

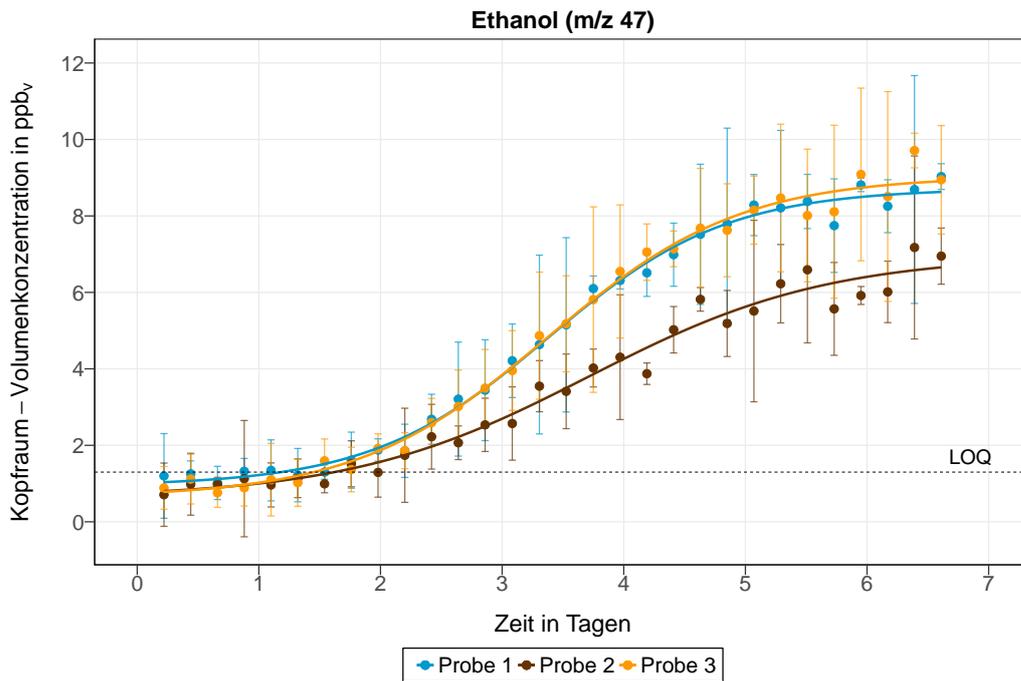


Abbildung 4.9: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethanol ( $m/z$  47) der mit *C. divergens* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5)

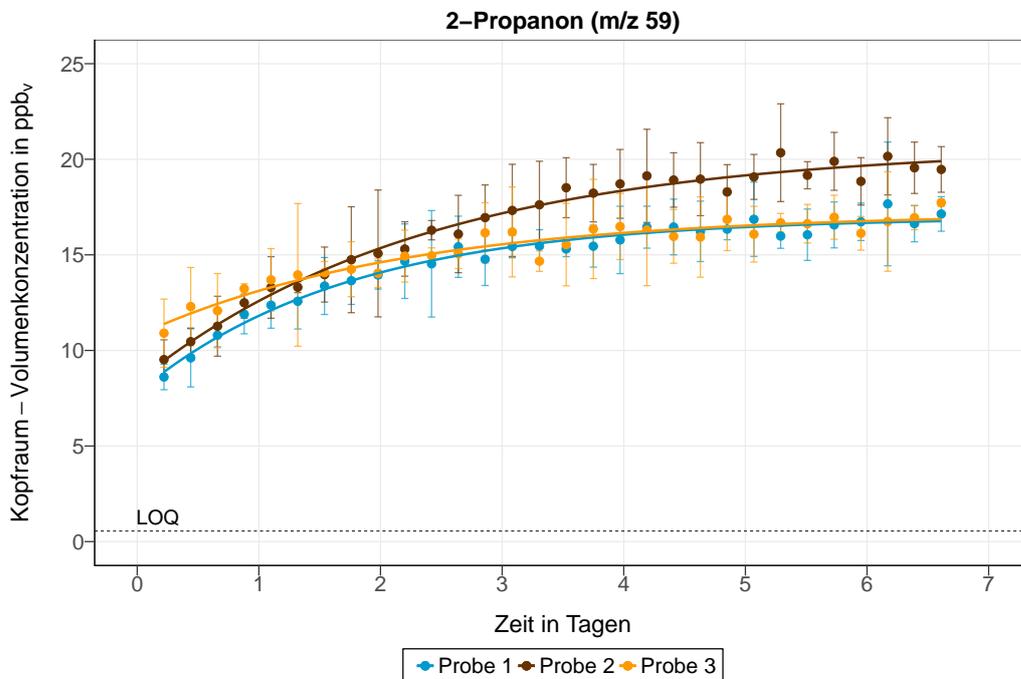


Abbildung 4.10: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( $m/z$  59) der mit *C. divergens* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 4, Probe 2: Fit-Fkt. 4, Probe 3: Fit-Fkt. 4 (siehe Tabelle 3.5)

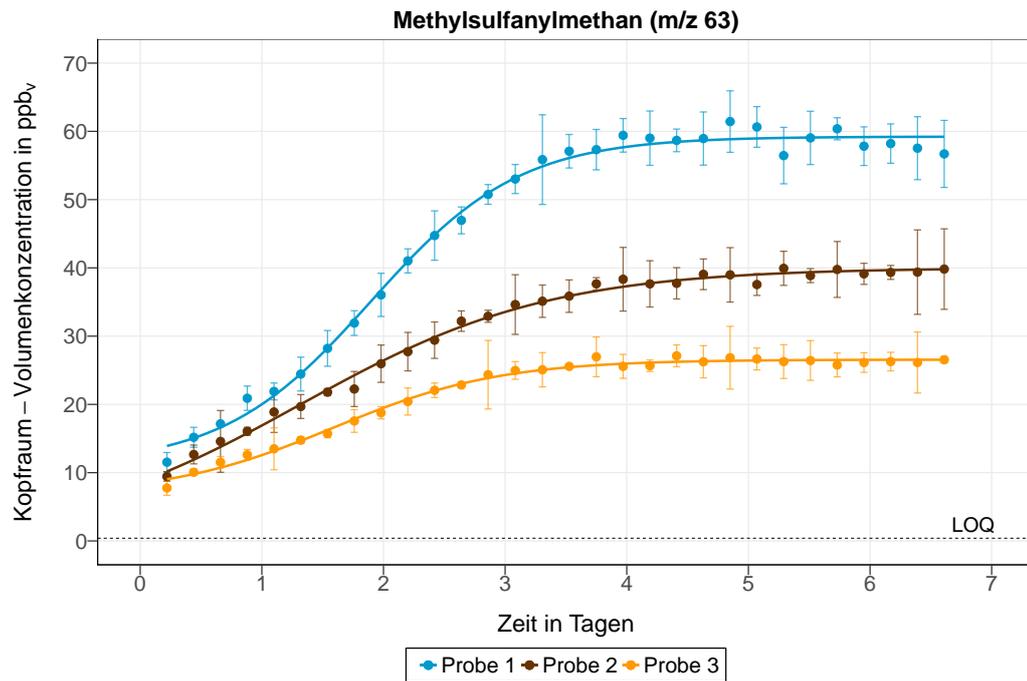


Abbildung 4.11: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63) der mit *C. divergens* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5)

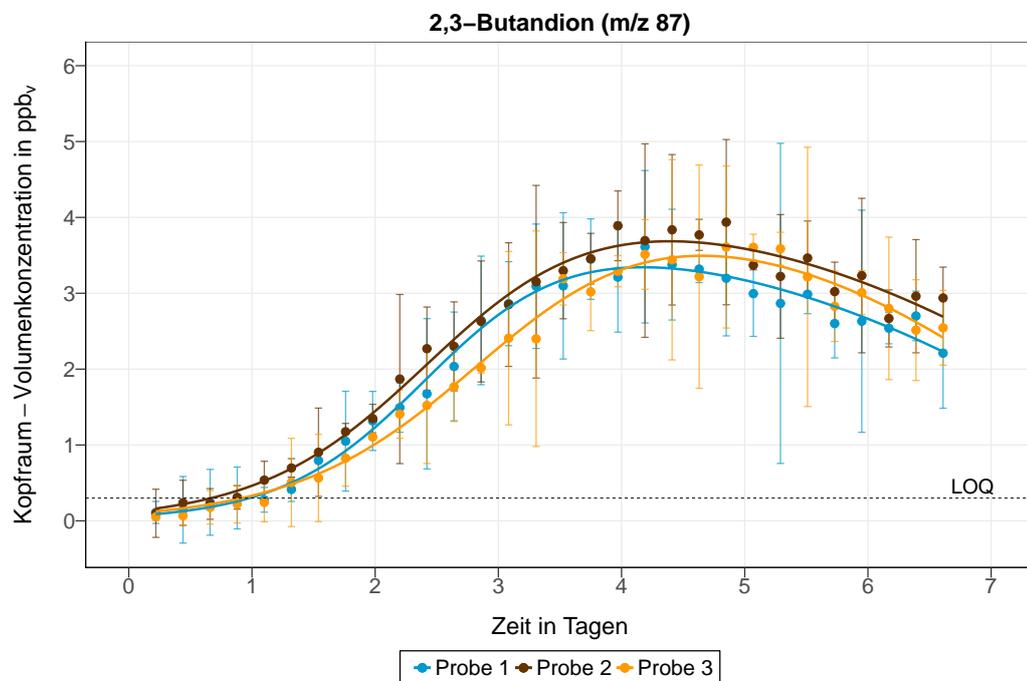


Abbildung 4.12: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( $m/z$  87) der mit *C. divergens* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 6, Probe 2: Fit-Fkt. 6, Probe 3: Fit-Fkt. 6 (siehe Tabelle 3.5)

### 4.3 Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch

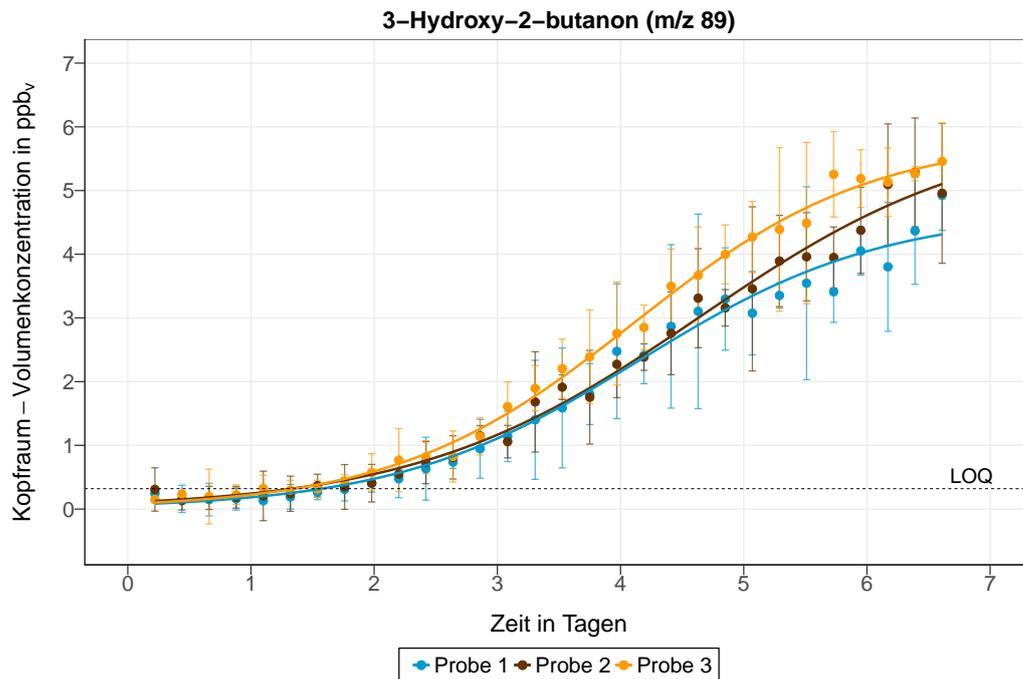


Abbildung 4.13: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( $m/z$  89) der mit *C. divergens* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5)

#### 4.3.3 Hähnchenfleisch beimpft mit *Pseudomonas sp.*

##### Wachstum

Frisches Hähnchenfleisch wurde mit *Ps. fragi*, stellvertretend für die auf Fleisch wachsenden *Pseudomonas sp.*, beimpft. Die Ergebnisse der Referenzprobe des unbeimpften Fleisches zeigten, dass keine Kolonien wuchsen und die Gesamtkeimzahl daher unterhalb des Detektionslimits lag. Nach Beimpfung des Fleisches mit *Ps. fragi* wies das Fleisch eine durchschnittliche Gesamtkeimzahl von  $5,4 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> auf, bestehend aus 100 % *Pseudomonas sp.* (siehe Tag 0 in Abbildung 4.14). Über den gesamten Messzeitraum konnten sich *Pseudomonas sp.* gegen die in natürlicherweise vorkommende Mikrobiota behaupten und blieben der dominierende Mikroorganismus

##### flüchtige Stoffwechselprodukte

In den Abbildungen 4.15 bis 4.18 sind die für diesen Versuch charakteristischen Substanzen dargestellt. Auffällig bei diesem Versuch war, dass *Pseudomonas sp.* hauptsächlich Schleim produzierten und kaum flüchtige Substanzen bildeten. Das flüchtige Metabolitspektrum bestand in diesem Versuch nur aus Substanzen mit 4 verschiedenen  $m/z$ -Verhältnissen. Diese wurden als Fragmente von Alkoholen, Säuren und Estern ( $m/z$  41 und  $m/z$  43), 2-Propanon ( $m/z$  59) und Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63) identifiziert. All diese Substanzen wurden von Beginn des Versuches an im Kopfraum der Proben detektiert. Während des gesamten Messzeitraumes änderten

sich die Konzentrationen der Alkoholen, Säuren und Estern sowie Methylsulfanylmethan kaum. Nur die Konzentration von 2-Propanon stieg über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich an. Somit wurden für 2-Propanon am Ende die höchsten Volumen-Kopfraumkonzentrationen erreicht. Die 3 Proben unterschieden sich nicht voneinander hinsichtlich der Anzahl an detektierten Substanzen, jedoch variierten die gemessenen Konzentrationen innerhalb der Dreifachbestimmung, ausgenommen Methylsulfanylmethan.

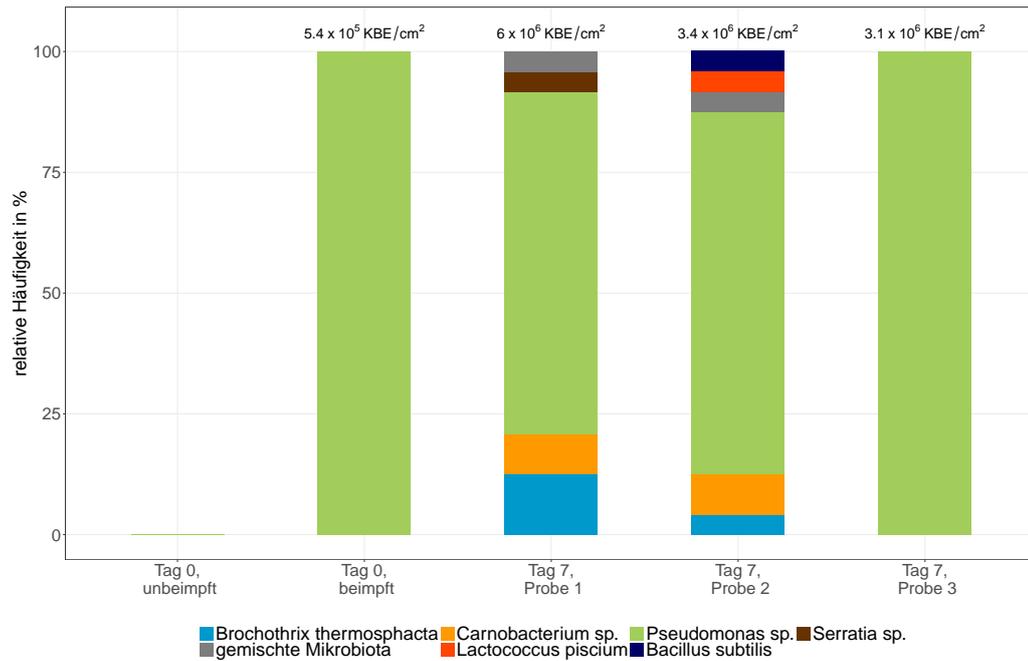


Abbildung 4.14: Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der mit *Ps. fragi* beimpften Proben

### 4.3 Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch

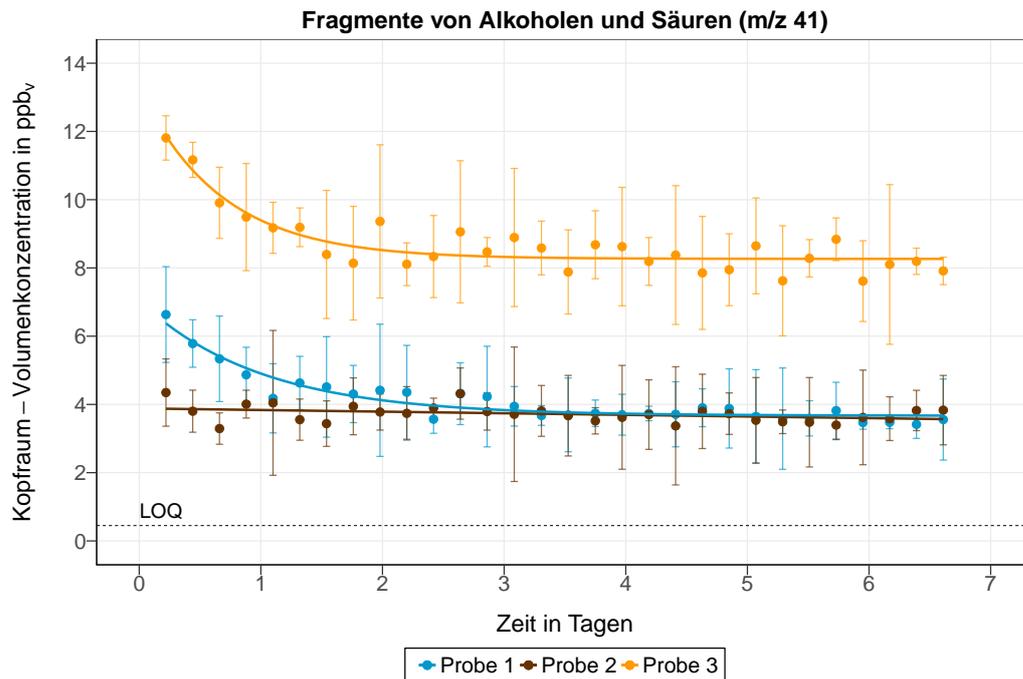


Abbildung 4.15: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Fragmenten von Alkoholen und Säuren ( $m/z$  41) der mit *Ps. fragi* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 8, Probe 2: Fit-Fkt. 7, Probe 3: Fit-Fkt. 8 (siehe Tabelle 3.5)

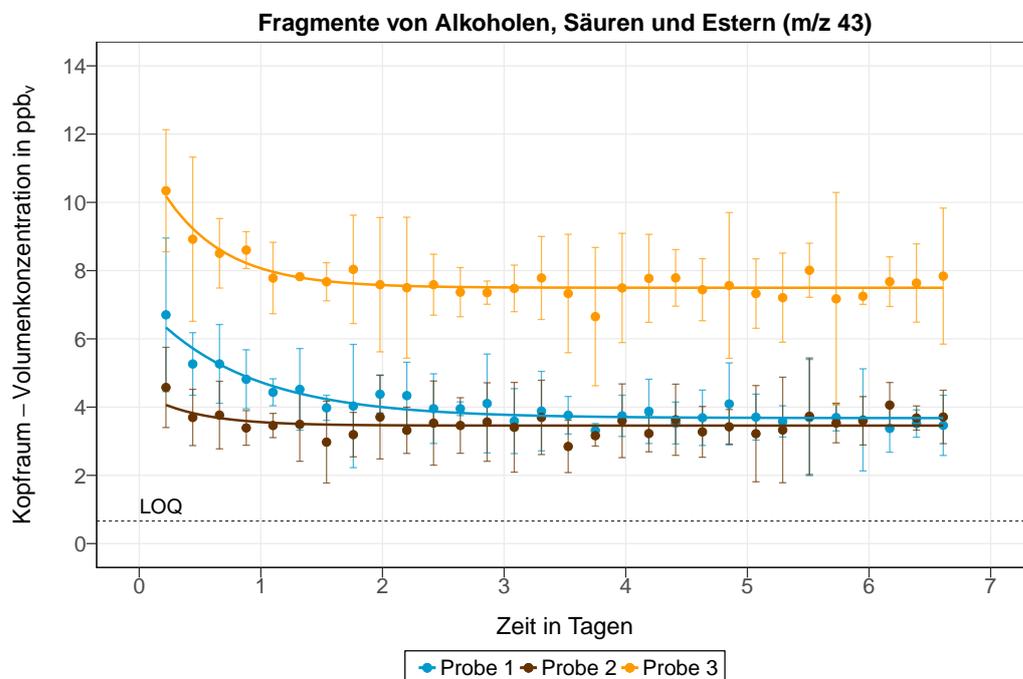


Abbildung 4.16: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Fragmenten von Alkoholen, Säuren und Estern ( $m/z$  43) der mit *Ps. fragi* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 8, Probe 2: Fit-Fkt. 8, Probe 3: Fit-Fkt. 8 (siehe Tabelle 3.5)

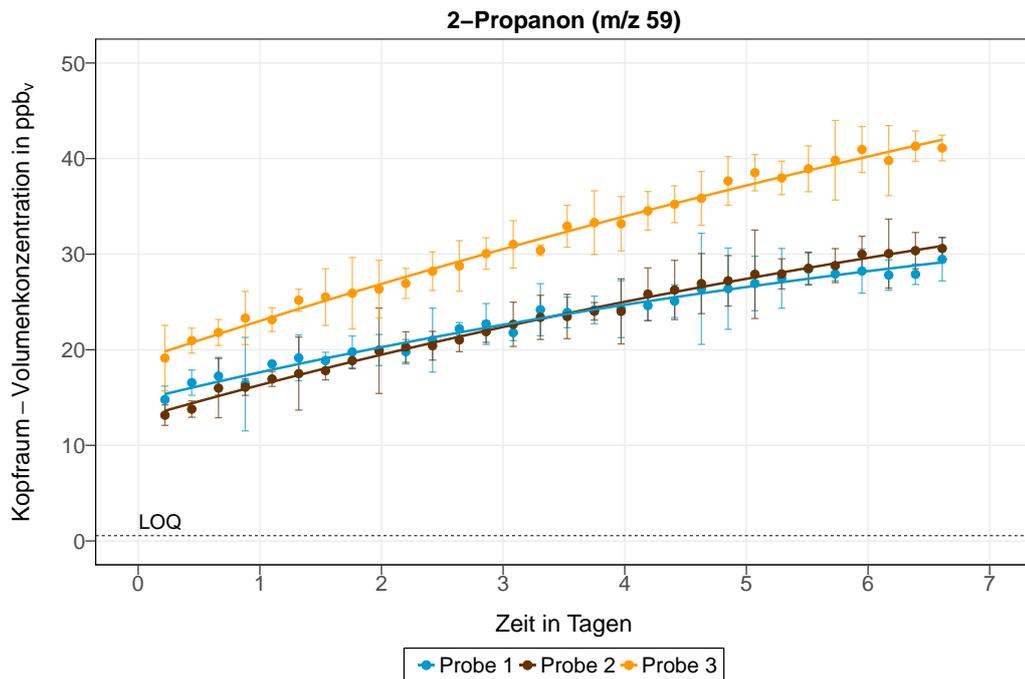


Abbildung 4.17: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( $m/z$  59) der mit *Ps. fragi* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 4, Probe 2: Fit-Fkt. 4, Probe 3: Fit-Fkt. 4 (siehe Tabelle 3.5)

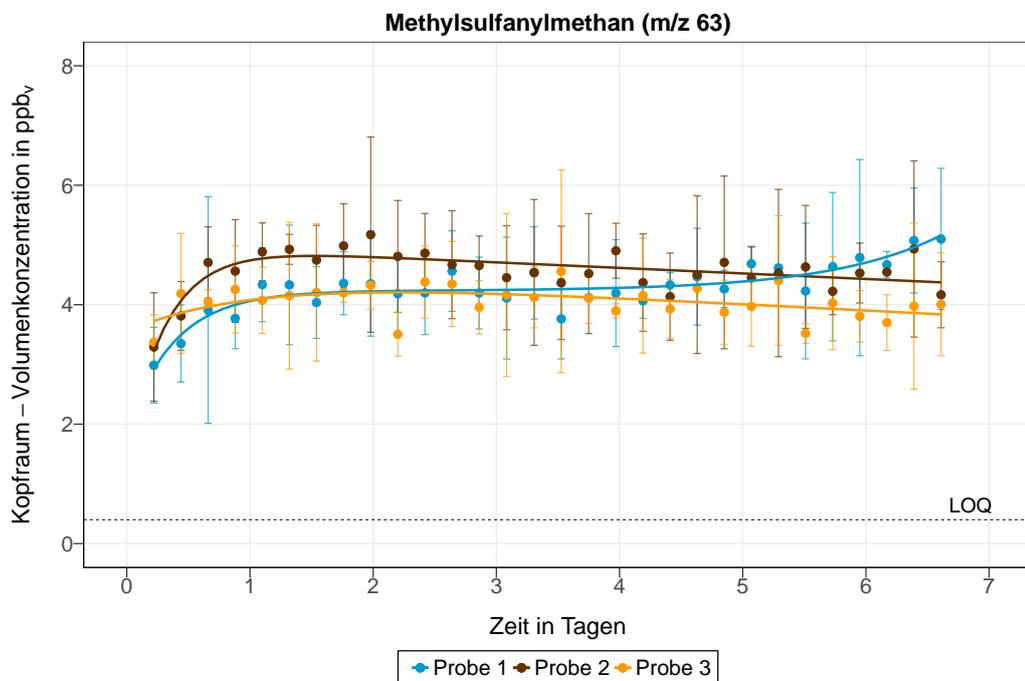


Abbildung 4.18: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63) der mit *Ps. fragi* beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 14, Probe 2: Fit-Fkt. 10, Probe 3: Fit-Fkt. 10 (siehe Tabelle 3.5)

### 4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung des flüchtigen Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch

Tabelle 4.5: Ergebnisse der nicht-linearen Regression der mit *B. thermosphacta* beimpften Hähnchenfleischproben bei 4 °C mit b: Stauchung/Streckung der e-Funktion (Wachstumsgeschwindigkeit), d: Steigung der Geraden, f: Stauchung/Streckung des Polynoms in Richtung der y-Achse, u: Maximum des Zuwachses, w: Zeitkonstante, y: zeitliche Verschiebung/Wendepunkt des Wachstums, z: y-Achsenabschnitt

m/z	Probe 1	Probe 2	Probe 3
47	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} + b \cdot e^{-t}$ u = 6,1 [5,34;7,82] w = 0,35 [0,13;0,61] b = 2,43 [1,3;19]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 1,69 [1,09;2,02] u = 3,73 [3,07;5,24] w = 1,16 [0,65;1,83] y = 4,33 [2,57;6,72]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 9,02 [6,59;28,96] w = 0,4 [0,28;0,53] y = 2,17 [1,88;3,24]
59	$f(t) = u - b \cdot e^{-t}$ u = 11,49 [11,26;11,72] b = 3,8 [2,87;4,74]	$f(t) = u - b \cdot e^{-t}$ u = 13,77 [13,42;14,12] b = 2,76 [1,34;4,17]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 15,95 [15,68;16,34] b = 2,36 [1,31;3,94] w = 0,98 [0,4;2,32]
63	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - f \cdot t^3$ u = 13,07 [12,36;14,35] b = 7,91 [6,77;9,17] w = 0,87 [0,53;1,29] f = 0,005 [0,0005;0,01]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - f \cdot t^3$ u = 23,59 [18,68;50,64] b = 20,27 [15,82;46,64] w = 0,25 [0,08;0,4] f = 0,02 [0,01;0,03]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 26,05 [24,88;27,53] b = 24,16 [23,06;25,33] w = 0,36 [0,31;0,42]
87	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$ u = 5,68 [5,07;6,71] w = 1,01 [0,76;1,3] y = 1,53 [1,26;1,85] f = 0,005 [0,002;0,01]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$ u = 5,63 [5,22;6,13] w = 1,49 [1,21;1,85] y = 2,33 [1,93;2,83] f = 0,006 [0,003;0,01]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 5,13 [4,93;5,35] w = 1,24 [1,05;1,47] y = 2,53 [2,15;2,99]
89	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 6,02 [5,49;6,8] w = 0,81 [0,67;0,96] y = 2,92 [2,6;3,32]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 6,79 [6,15;7,76] w = 0,74 [0,64;0,86] y = 3,02 [2,78;3,3]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 5,26 [4,74;6,05] w = 0,82 [0,69;0,95] y = 3,45 [3,15;3,83]

Tabelle 4.6: Ergebnisse der nicht-linearen Regression der mit *C. divergens* beimpften Hähnchenfleischproben bei 4 °C mit b: Stauchung/Streckung der e-Funktion (Wachstumsgeschwindigkeit), d: Steigung der Geraden, f: Stauchung/Streckung des Polynoms in Richtung der y-Achse, u: Maximum des Zuwachses, w: Zeitkonstante, y: zeitliche Verschiebung/Wendepunkt des Wachstums, z: y-Achsenabschnitt

m/z	Probe 1	Probe 2	Probe 3
47	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 0,94 [0,61;1,21] u = 7,78 [7,33;8,33] w = 1,37 [1,17;1,6] y = 4,64 [3,94;5,42]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 0,63 [0,1;0,98] u = 6,34 [5,63;7,51] w = 1,02 [0,76;1,3] y = 3,78 [2,86;4,8]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 0,64 [0,23;0,97] u = 8,41 [7,85;9,11] w = 1,27 [1,07;1,51] y = 4,31 [3,59;5,1]
59	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 16,96 [16,65;17,34] b = 9,19 [8,64;9,76] w = 0,58 [0,49;0,67]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 20,67 [20,12;21,37] b = 12,29 [11,69;12,9] w = 0,42 [0,35;0,49]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 17,18 [16,7;17,96] b = 6,41 [5,8;7,03] w = 0,46 [0,32;0,61]
63	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 11,01 [8,55;13,08] u = 48,22 [45,93;50,92] w = 1,64 [1,48;1,81] y = 3,11 [2,71;3,53]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 40,02 [39,51;40,55] w = 0,98 [0,92;1,04] y = 1,29 [1,2;1,38]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 6,68 [4,15;8,39] u = 19,88 [18,04;22,55] w = 1,46 [1,24;1,7] y = 2,33 [1,73;2,94]
87	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$ u = 3,98 [3,71;4,29] w = 1,71 [1,48;1,98] y = 4,16 [3,68;4,74] f = 0,006 [0,005;0,008]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$ u = 4,46 [4,13;4,84] w = 1,46 [1,28;1,66] y = 3,6 [3,26;4] f = 0,006 [0,004;0,008]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$ u = 4,69 [4,21;8,32] w = 1,34 [1,17;1,54] y = 3,89 [3,54;4,32] f = 0,008 [0,006;0,01]
89	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 4,67 [4,31;5,17] w = 1,01 [0,87;1,18] y = 4,2 [3,79;4,72]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 6,02 [5,54;6,67] w = 0,87 [0,78;0,97] y = 4,04 [3,79;4,33]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 5,83 [5,6;6,1] w = 1,04 [0,96;1,12] y = 4,25 [4,01;4,52]

Tabelle 4.7: Ergebnisse der nicht-linearen Regression der mit *Ps. fragi* beimpften Hähnchenfleischproben bei 4 °C mit b: Stauchung/Streckung der e-Funktion (Wachstumsgeschwindigkeit), d: Steigung der Geraden, f: Stauchung/Streckung des Polynoms in Richtung der y-Achse, u: Maximum des Zuwachses, w: Zeitkonstante, y: zeitliche Verschiebung/Wendepunkt des Wachstums, z: y-Achsenabschnitt

m/z	Probe 1	Probe 2	Probe 3
41	$f(t) = z + b \cdot e^{-w \cdot t}$ z = 3,67 [3,51;3,8] b = 3,37 [2,82;4,05] w = 1 [0,72;1,38]	$f(t) = z + d \cdot t$ z = 3,88 [3,71;4,06] d = -0,05 [-0,09;-0,003]	$f(t) = z + b \cdot e^{-w \cdot t}$ z = 8,26 [8,09;8,43] b = 4,98 [3,9;6,36] w = 1,48 [1,03;2,08]
43	$f(t) = z + b \cdot e^{-w \cdot t}$ z = 3,68 [3,54;3,8] b = 3,45 [2,81;4,26] w = 1,19 [0,84;1,67]	$f(t) = z + e^{-w \cdot t}$ z = 3,46 [3,36;3,55] w = 2,28 [1,32;4,4]	$f(t) = z + b \cdot e^{-w \cdot t}$ z = 7,5 [7,35;7,64] b = 4,16 [2,93;6,1] w = 1,99 [1,28;3,18]

### 4.3 Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch

Tabelle 2.6: Fortsetzung

m/z	Probe 1	Probe 2	Probe 3
59	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 41,77 [35,4;61,25] b = 27,08 [21,18;46,03] w = 0,12 [0,06;0,18]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 52,21 [43,02;76,87] b = 39,39 [30,64;63,57] w = 0,09 [0,05;0,14]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 88,23 [67,23;176,62] b = 69,34 [48,86;157,19] w = 0,06 [0,02;0,1]
63	$f(t) = u - b \cdot e^{-w_1 \cdot t} + e^{w_2 \cdot (t-x)}$ u = 4,23 [4,06;4,35] b = 2,31 [1,44;3,89] w <sub>1</sub> = 2,6 [1,52;4,62] w <sub>2</sub> = 1,11 [0,52;2,15] x = 6,6,68 [6,42;7,21]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ u = 4,99 [4,76;5,23] b = 3,48 [2,28;5,76] w = 3,13 [1,95;5,28] d = 0,09 [0,04;0,15]	$f(t) = u - e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ u = 4,55 [3,78;4,53] d = 0,11 [0,01;0,15]

#### 4.3.5 Diskussion

Das flüchtige Metabolitspektrum von *B. thermosphacta* und *Ps. fragi* konnte bestimmt werden. Aufgrund der Dominanz von *B. thermosphacta* beim Versuch mit *C. divergens* war das Untersuchen des flüchtigen Metabolitspektrums von *C. divergens* nicht möglich. Unter den gewählten Schutzgasbedingungen wies *B. thermosphacta* einen aeroben Stoffwechsel auf, während *Ps. fragi* als Einzelstamm kaum flüchtige Substanzen produzierte.

#### Wachstum

*B. thermosphacta* konnte sich gut gegen die heterogene Anfangsflora durchsetzen. Ein Grund hierfür liegt in der Fähigkeit, sich an das Nährmedium Fleisch anzupassen. Unter CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-reicher Schutzgasatmosphäre wird seine Entwicklung begünstigt, da das Wachstum der beim aeroben Verderb typischen Vertreter unter hohen CO<sub>2</sub>-Gehalten gehemmt wird. *B. thermosphacta* ist resistent gegenüber erhöhten CO<sub>2</sub>-Umgebungen und kann somit hochwachsen (siehe 2.1.1.1).

*C. divergens* konnte sich trotz einer Beimpfung mit ca. 10<sup>6</sup> KBE/cm<sup>2</sup> und damit einem 10-fachen Vorsprung gegenüber derjenigen der Initialmikrobiota nicht durchsetzen. Das frische unbeimpfte Fleisch wies an Tag 0 bereits hohe Keimzahlen von 4 x 10<sup>5</sup> KBE/cm<sup>2</sup> auf, wovon *B. thermosphacta* mit einer relativen Häufigkeit von 33,3 % vertreten war. Bei der Schlachtung gelangen unvermeidbar Mikroorganismen auf die Fleischoberfläche. Ein steriles Fleisch ist somit nicht herzustellen ohne die spezifischen Eigenschaften zu verändern. Die Keimzahl von *B. thermosphacta* war an Tag 0 bereits so hoch, dass sich *C. divergens* im Laufe des Versuchs nicht gegen diesen Mikroorganismus durchsetzen konnte. Milchsäurebakterien bevorzugen das Wachstum unter anaeroben Bedingungen. Im Gegensatz dazu ist *B. thermosphacta* unter O<sub>2</sub>-reichen Atmosphären in der Lage, das Wachstum von Milchsäurebakterien zu unterdrücken (siehe 2.1.1.1 und 2.1.1.2).

*Ps. fragi* war fähig unter CO<sub>2</sub>-reichen Verhältnissen zu wachsen und die Mikrobiota zu dominieren. Normalerweise werden *Pseudomonas* bei spontan verderbendem Fleisch ab einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von mindestens 20 % gehemmt bzw. können erst nach einer längeren Lagerzeit wachsen (siehe 2.1.1.3). Im Versuch zur Bestimmung des flüchtigen Metabolitspektrums von *Ps. fragi* war jedoch die initiale Gesamtkeimzahl so gering, dass sie unterhalb des Detektionslimits von 10<sup>3</sup> KBE/cm<sup>2</sup> lag. Zudem besaßen *Pseudomonas* durch die Beimpfung einen mehr als 1000-fachen Vorsprung gegenüber der Initialflora, so dass sie sich gegenüber den initial vorhandenen Mikroorganismen von Beginn an durchsetzten.

### flüchtige Stoffwechselprodukte

*B. thermosphacta* wies unter der gewählten Schutzgaszusammensetzung von 30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub> einen aeroben Stoffwechsel auf, da die für diesen Stoffwechsel typischen Metabolite wie 3-Hydroxy-2-butanon, 2,3-Butandion, 3-Methylbutanol und Isobutansäure mittels PTR-MS und GC-MS quantifiziert und identifiziert wurden (siehe Kapitel 2.2.1). Ein weiteres Hauptstoffwechselprodukt des aeroben Stoffwechsels von *B. thermosphacta* stellt Ethansäure dar (2.2.1). Ethansäure wurde jedoch hier weder mit dem PTR-MS detektiert noch mit GC-MS identifiziert. Gründe hierfür könnten sein, dass diese chemische Verbindung weiter als Substrat zur Herstellung von 3-Methylbutanol und Isobutansäure diene (siehe Kapitel 2.2.1) oder die HS-SPME-Faser in Kombination mit der verwendeten Kapillarsäule Ethansäure diskriminierte.

Die Konzentration von Methylsulfanylmethan nahm kontinuierlich zu. Bisher ist jedoch aus der Literatur nicht bekannt, dass *B. thermosphacta* Methylsulfanylmethan bilden kann. Da die Konzentrationszunahme jedoch mit dem mikrobiellen Wachstum korrelierte und *B. thermosphacta* die Mikrobiota dominierte, ist es sehr wahrscheinlich, dass *B. thermosphacta* Methylsulfanylmethan produzierte.

*Ps. fragi* als dominanter Mikroorganismus produzierte unter Schutzgasbedingungen hauptsächlich Schleim. Schleim entsteht aus Glucose, dient als Schutzfunktion und wird beispielsweise bei umweltbedingtem Stress wie eingeschränkter Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr gebildet (siehe 2.2.3). Als einzige flüchtige Verbindung wurde 2-Propanon gebildet und freigesetzt.

Normalerweise sind *Pseudomonas sp.* bekannt dafür, dass sie unter aeroben Bedingungen geruchsaktive flüchtige Verbindungen wie Ester und Amine produzieren (siehe 2.2.3). Dies lässt vermuten, dass die metabolische Aktivität von *Pseudomonas sp.* unter Schutzgasbedingungen im Vergleich zu einem aeroben Verderb von Hähnchenfleisch verändert war. Da *Pseudomonas sp.* in anderen Studien erst nach einer längeren Lagerzeit von spontan verderbendem, Schutzgas-verpacktem Hähnchen isoliert wurden (Höll et al., 2016), ist es wahrscheinlich, dass *Pseudomonas sp.* Mitverderber/Konkurrenten/Synergismen unter Schutzgasbedingungen benötigen. Diese anderen Mikroorganismen verwerten Glucose als erstes Substrat, bevor *Pseudomonas sp.* Aminosäuren und Proteine angreifen können, um ihren typischen Verderb zu verursachen.

## 4.4 Spontanverderb bei Hähnchenfleisch

In diesen Versuchen wurden die Bildungsraten sowie Konzentrationen der beim spontanen Verderb von Hähnchenfleisch gebildeten und freigesetzten VOCs zeitabhängig bestimmt. Ziel war es, ein oder mehrere Stoffe bzw. Stoffklassen zu identifizieren, die als mögliche Verderbsmarker zur Entwicklung von Frischeindikatoren dienen können. Hierfür wurde frisches Hähnchenfleisch bei 4 °C für 12 Tage und bei 10 °C für 7 Tage gelagert.

### 4.4.1 Spontanverderb bei 4 °C

#### Wachstum

Für die Detektion der VOCs beim Spontanverderb wurde jeweils ein Hähnchenbrustfilet in drei PFA-Behälter gelegt. Der vierte Behälter diente zur Überprüfung des Hintergrundsignals. Zwei weitere Hähnchenbrustfilets wurden als Referenzprobe verwendet, um die Keimzahl und Mikrobiotazusammensetzung an Tag 0 zu bestimmen. Die Referenzprobe war zu Beginn mit durchschnittlich  $9,6 \times 10^2$  KBE/cm<sup>2</sup> nur gering belastet. Die Anfangsflora war sehr heterogen und bestand aus *B. thermosphacta*, *Pseudomonas sp.*, *Butiauxella*, *Lactobacillus sp.*, *L. piscium*, *Leuconostoc*, *Serratia sp.* und *Staphylococcus* (Abbildung 4.19). Während der 12-tägigen Messung der VOCs konnten nur wenige Mikroorganismen von der anfangs heterogenen Mikrobiota wachsen. *B. thermosphacta* setzte sich gegen die anderen, auf der Fleischoberfläche vorhandenen, Mikroorganismen durch und dominierte in allen 3 Proben, gefolgt von *Carnobacterium sp.*. Der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> wurde zwischen Tag 7 und 9 erreicht (Abschlussbericht IGF-Vorhaben 17803 N, 2017).

#### flüchtige Stoffwechselprodukte

In diesem Versuch wurden Konzentrationsänderungen von Substanzen mit insgesamt 8 verschiedenen *m/z*-Verhältnissen detektiert. In den Abbildungen 4.20 bis 4.24 sind die bedeutendsten Ergebnisse zum Spontanverderb bei 4 °C dargestellt. Die Ergebnisse der nicht-linearen Regression ließen eine leichte Konzentrationsänderung für 2-Propanon vermuten. Allerdings wiesen die Messpunkte sehr große Konfidenzintervalle auf.

Die Kopfraum-Volumenkonzentrationen von Ethanol, Methylsulfanylmethan, 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon waren durch ein ähnliches dynamisches Verhalten charakterisiert, welches den Ergebnissen der nicht-linearen Regression zufolge durch ein logistisches Wachstum erklärbar war. In den ersten 6 - 7 Tagen wurden diese Substanzen nicht gebildet, wobei die Konzentrationen der detektierten Substanzen abgesehen von Methylsulfanylmethan in diesem Zeitraum unterhalb des Quantifizierungslimits lagen. Erst als die Keimzahlen eine Größe im Bereich des kritischen Grenzwerts von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreichten, stiegen die Konzentrationen bis zum Versuchsende kontinuierlich an. Aufgrund der großen Konfidenzintervalle wurden dabei

mit der Ausnahme von Methylsulfanylmethan keine Konzentrationsunterschiede innerhalb der Dreifachbestimmung festgestellt.

Am Versuchsende wurden für 2-Propanon die höchsten Konzentrationen berechnet, gefolgt von Methylsulfanylmethan. Für Ethanol, 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon hingegen wurden die geringsten Werte detektiert.

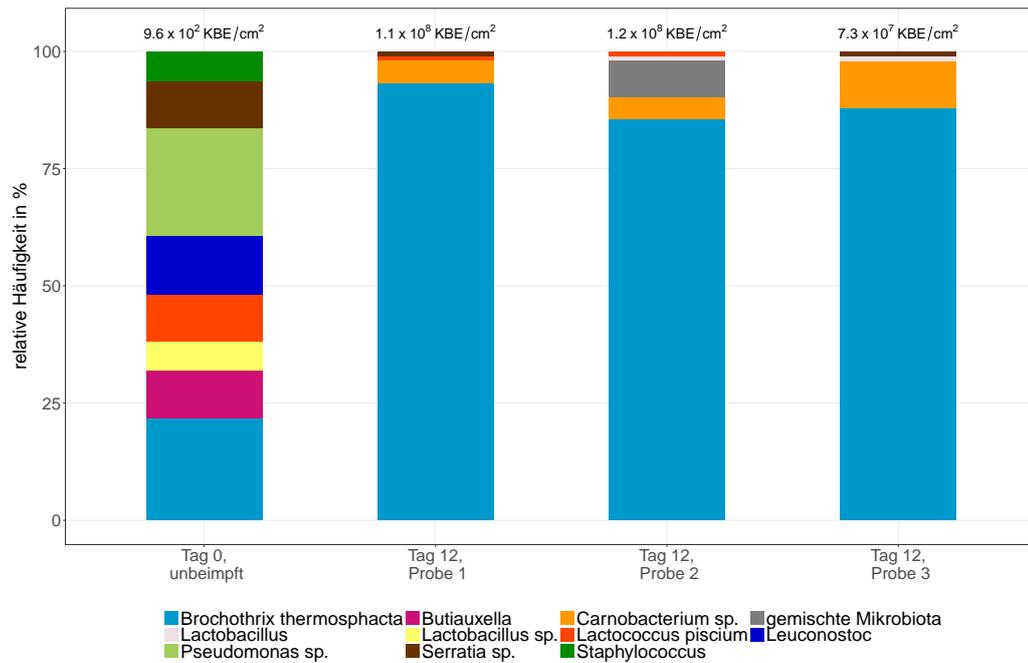


Abbildung 4.19: Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben bei 4 °C

#### 4.4 Spontanverderb bei Hähnchenfleisch

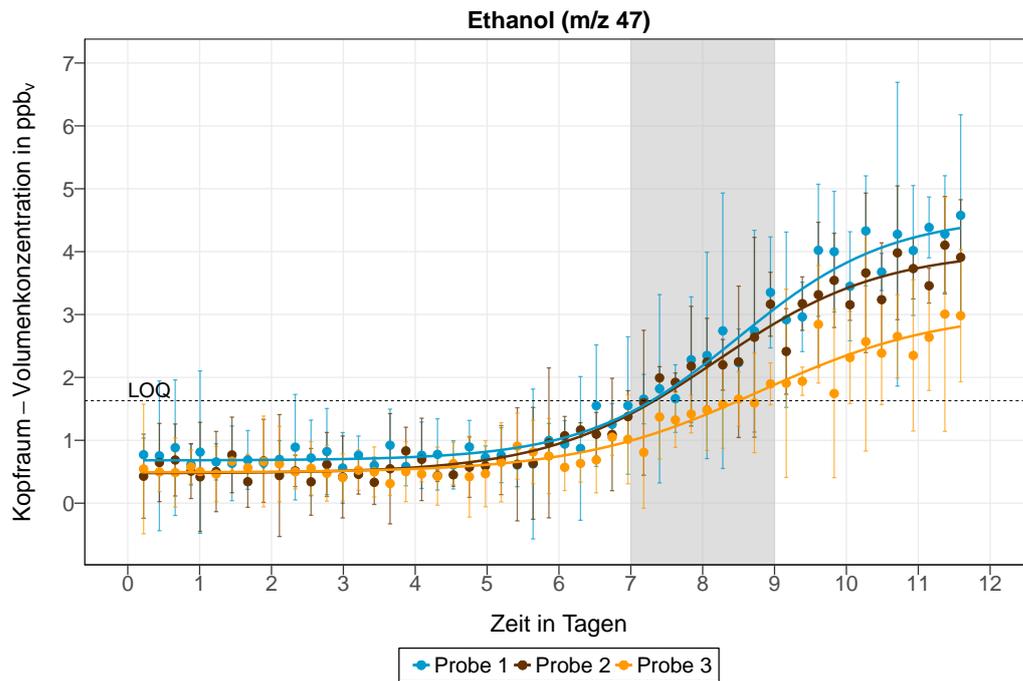


Abbildung 4.20: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethanol ( $m/z$  47) der bei 4 °C spontan verderbenen Hähnchenfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

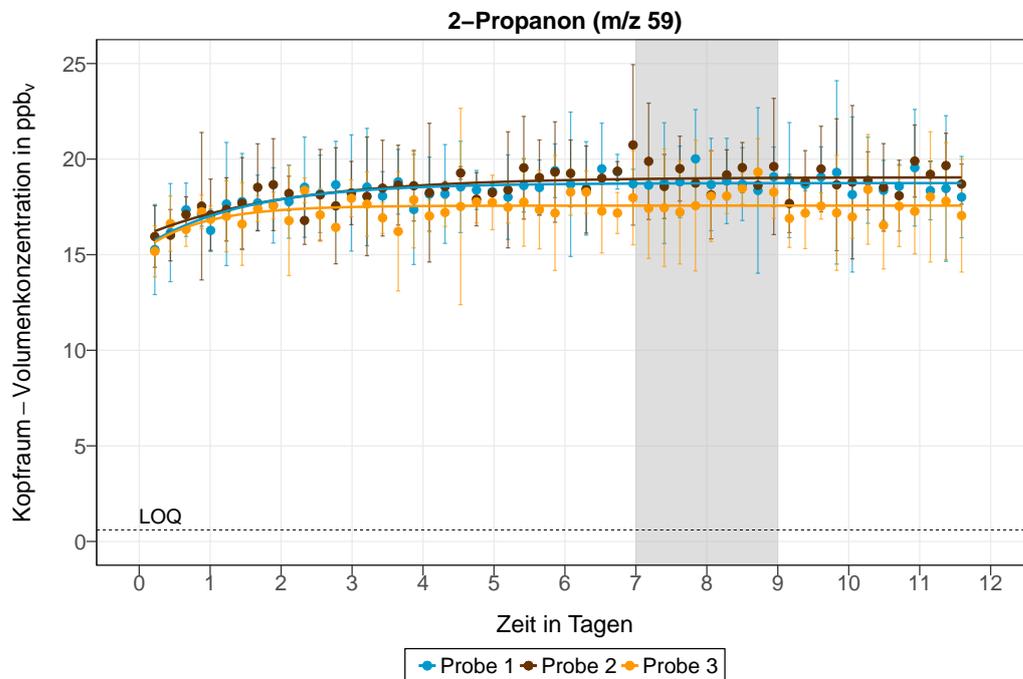


Abbildung 4.21: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( $m/z$  59) der bei 4 °C spontan verderbenen Hähnchenfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 4, Probe 2: Fit-Fkt. 4, Probe 3: Fit-Fkt. 4 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

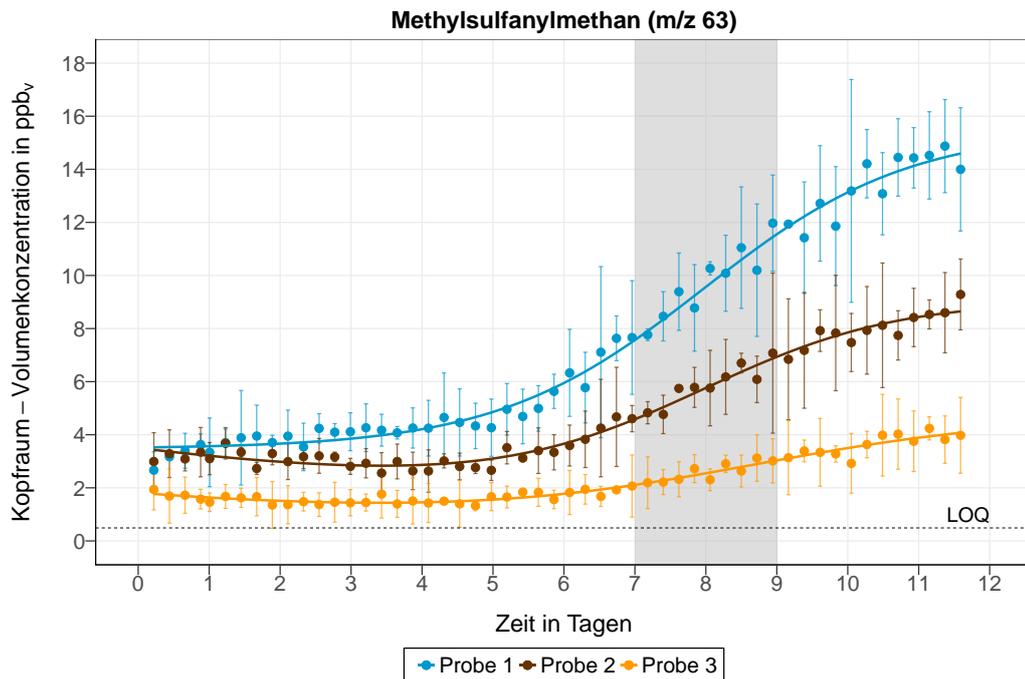


Abbildung 4.22: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63) der bei 4 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 5, Probe 3: Fit-Fkt. 5 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

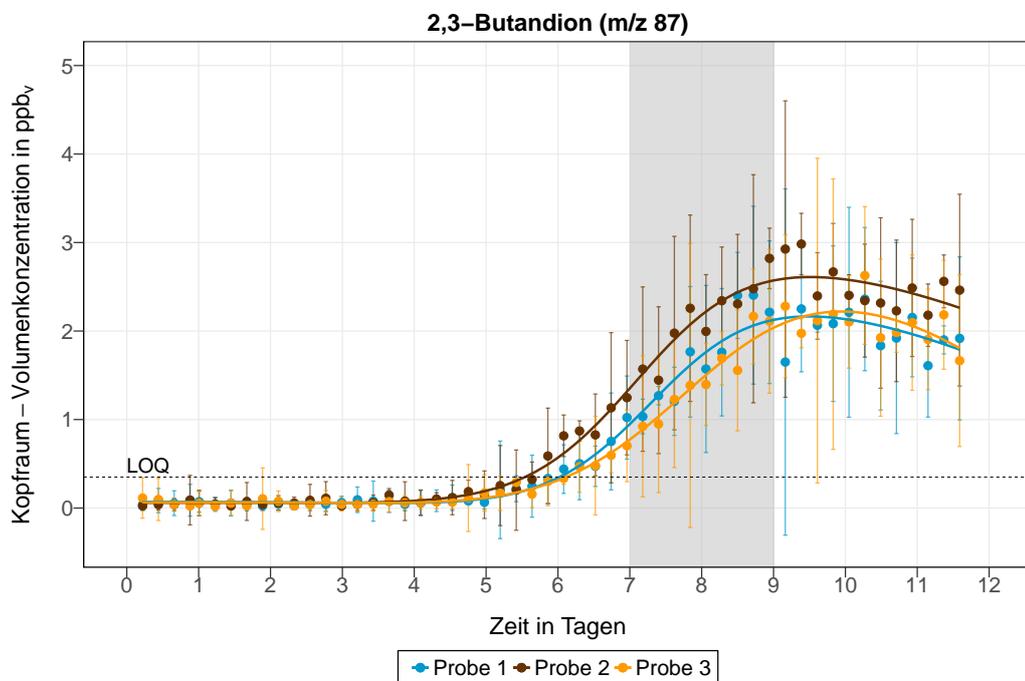


Abbildung 4.23: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( $m/z$  87) der bei 4 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 6, Probe 2: Fit-Fkt. 6, Probe 3: Fit-Fkt. 6 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

## 4.4 Spontanverderb bei Hähnchenfleisch

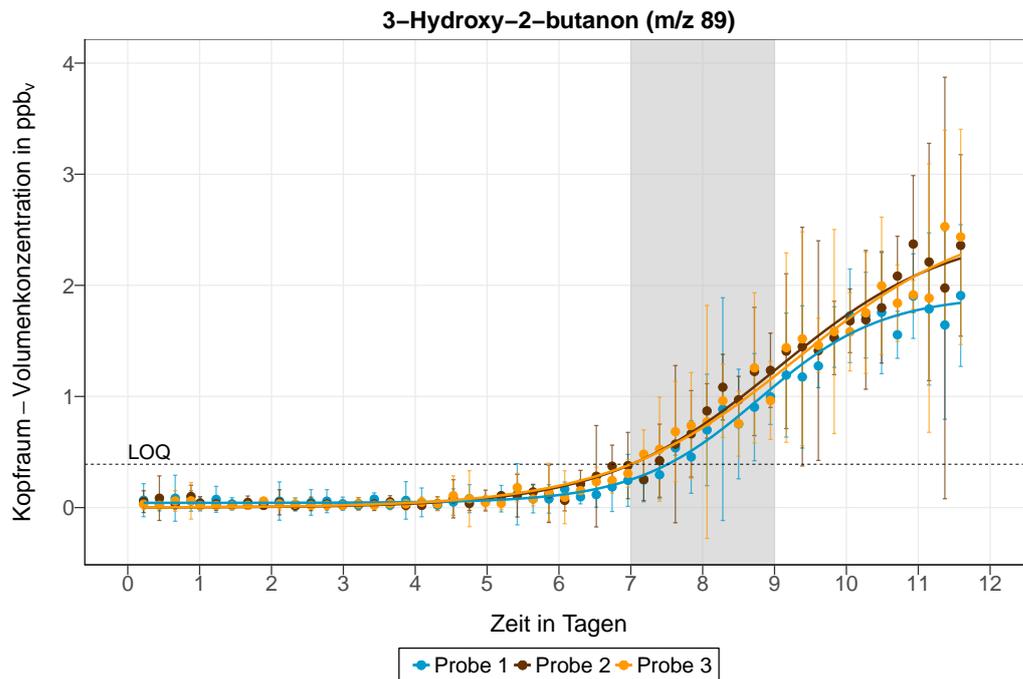


Abbildung 4.24: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( $m/z$  89) der bei 4 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

### 4.4.2 Spontanverderb bei 10 °C

#### Wachstum

Wie bereits bei der Messung des Spontanverderbs bei 4 °C wurde je ein Hähnchenbrustfilet in drei PFA-Behälter gegeben. Zwei weitere Hähnchenbrustfilets wurden als Referenz verwendet, um die Mikroflora und Keimzahl an Tag 0 zu bestimmen. Die Mikrobiota der Referenzprobe war mit einer Anfangskeimzahl von  $1,2 \times 10^4$  KBE/cm<sup>2</sup> sehr heterogen mit *B. thermosphacta* und *Pseudomonas sp.* als dominierende Mikroorganismen (siehe Abbildung 4.25). Über den gesamten Versuchszeitraum blieb *B. thermosphacta* in allen drei Proben der dominierende Mikroorganismus, wobei die relative Häufigkeit bei Probe 1 am höchsten war. Proben 2 und 3 wiesen am Ende eine heterogenere Mikrobiotazusammensetzung als Probe 1 auf. Der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> wurde zwischen Tag 2 und 5 erreicht (Abschlussbericht IGF-Vorhaben 17803 N, 2017).

### flüchtige Stoffwechselprodukte

Insgesamt wurden in diesem Versuch Substanzen mit 8 verschiedenen  $m/z$ -Verhältnissen detektiert. Die wichtigsten Ergebnisse der PTR-MS-Messungen sind in den Abbildungen 4.26 bis 4.29 dargestellt. Für 2-Propanon wurde zwar eine mögliche Regressions-Anpassungsfunktion für die jeweiligen Konzentrationsverläufe gefunden, jedoch waren die Konfidenzintervalle für die einzelnen Messwerte sehr groß.

Für Methylsulfanylmethan, 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon wurde ein vergleichbares dynamische Verhalten, wie bereits in 4.4.1 beschrieben, detektiert. Nach einer Anlaufphase stieg die Konzentration bis zum Versuchsende kontinuierlich an. Auch in diesem Versuch lagen die Konzentrationen von 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon in der Anlaufphase unterhalb des Quantifizierungslimits. Allerdings wurden die Substanzen in diesem Versuch bereits ab Tag 2 gebildet, an dem auch der Bereich um den kritischen Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> begann. Dabei unterschieden sich die Substanzen, abgesehen von Methylsulfanylmethan, aufgrund der berechneten hohen Konfidenzintervalle nicht quantitativ innerhalb der Dreifachbestimmung.

Nach Ende des Versuches war 2-Propanon in den höchsten Konzentrationen präsent, während Methylsulfanylmethan die niedrigsten Konzentrationen aufwies. 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon wurden in vergleichbaren Konzentrationen detektiert.

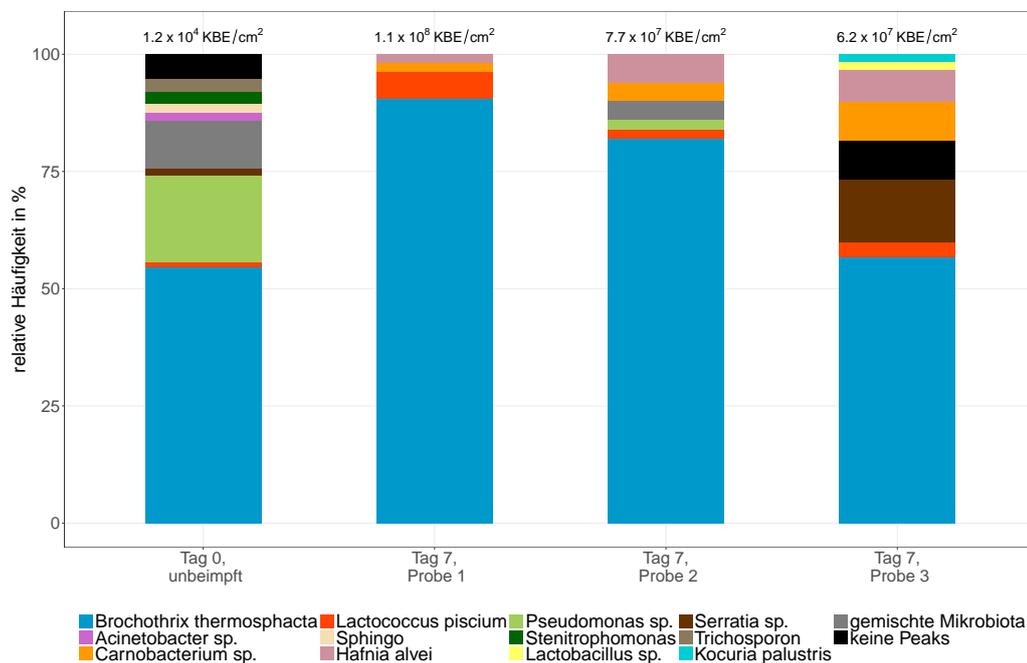


Abbildung 4.25: Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben bei 10 °C

#### 4.4 Spontanverderb bei Hähnchenfleisch

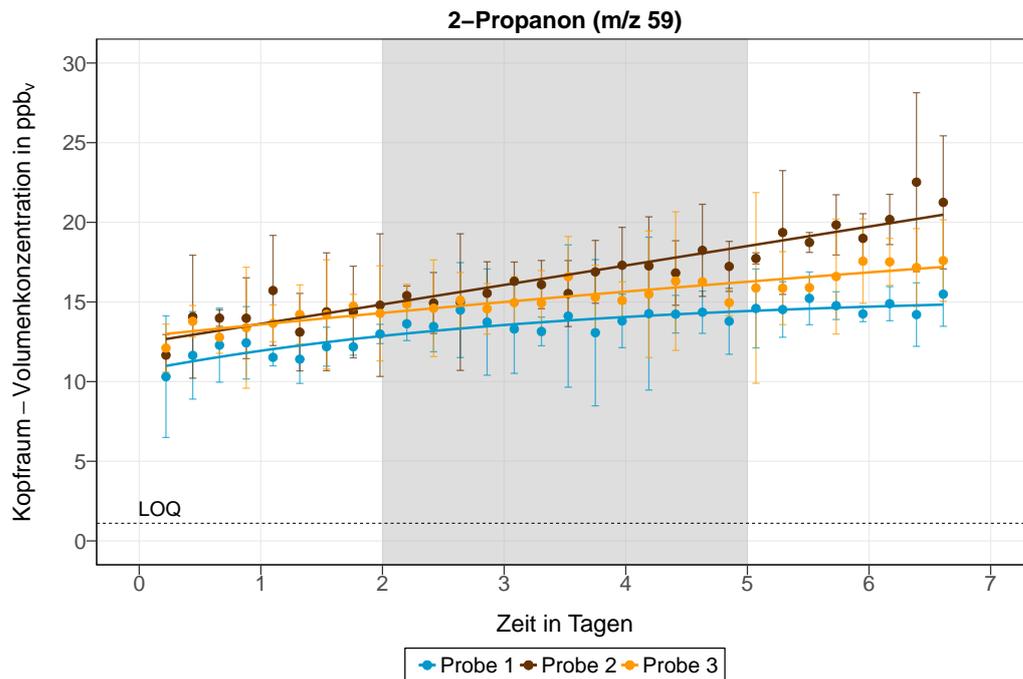


Abbildung 4.26: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( $m/z$  59) der bei 10 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 4, Probe 2: Fit-Fkt. 7, Probe 3: Fit-Fkt. 4 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

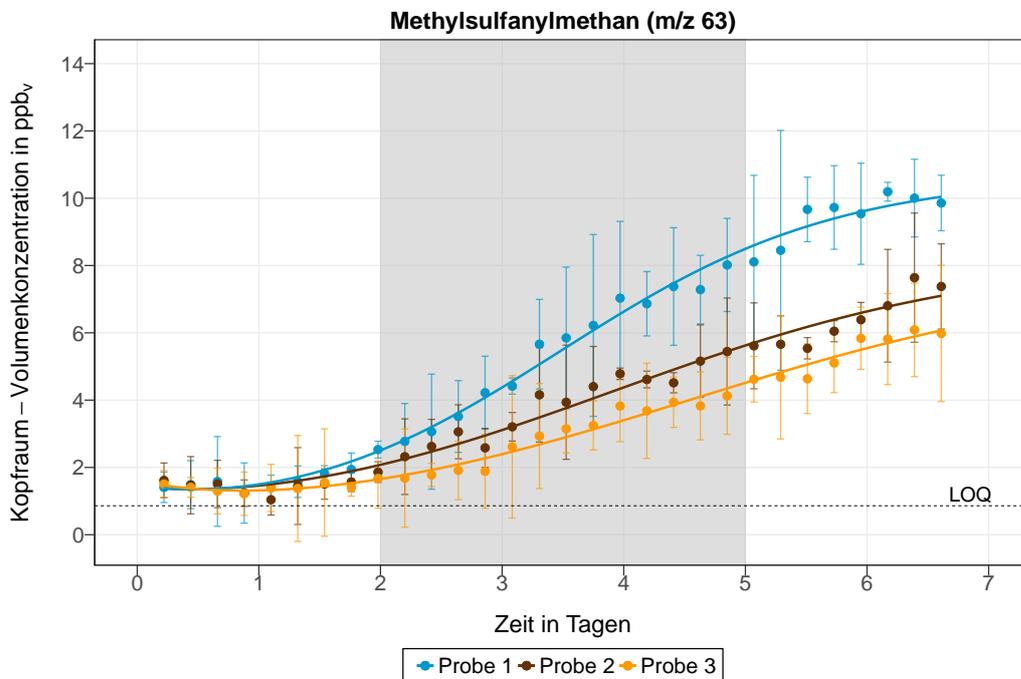


Abbildung 4.27: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63) der bei 10 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 5, Probe 2: Fit-Fkt. 5, Probe 3: Fit-Fkt. 5 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

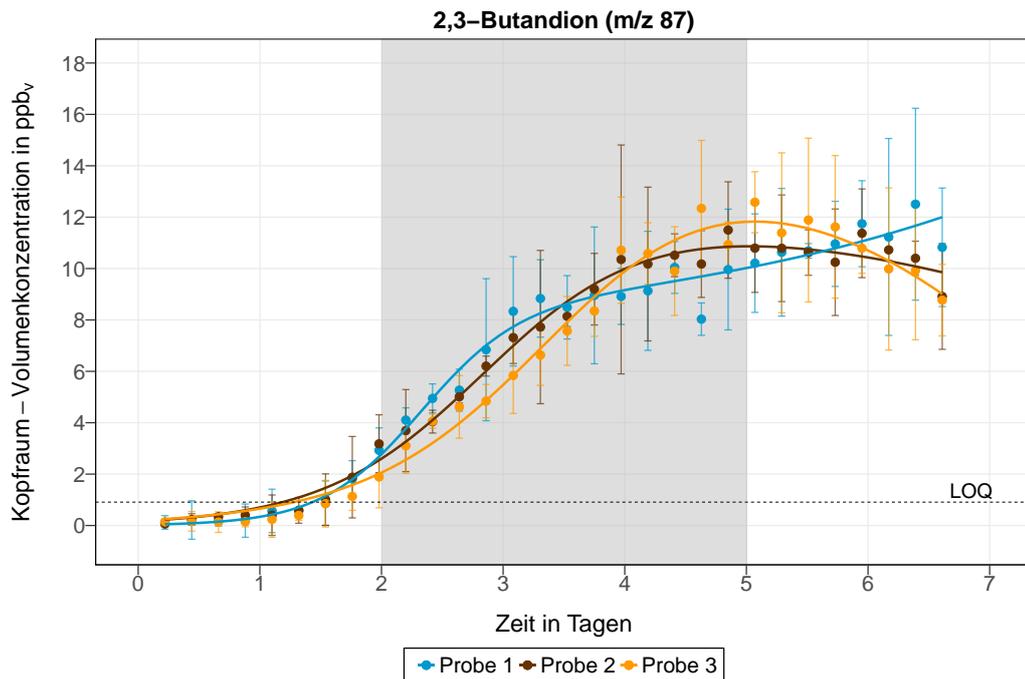


Abbildung 4.28: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( $m/z$  87) der bei 10 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 6, Probe 2: Fit-Fkt. 6, Probe 3: Fit-Fkt. 6 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

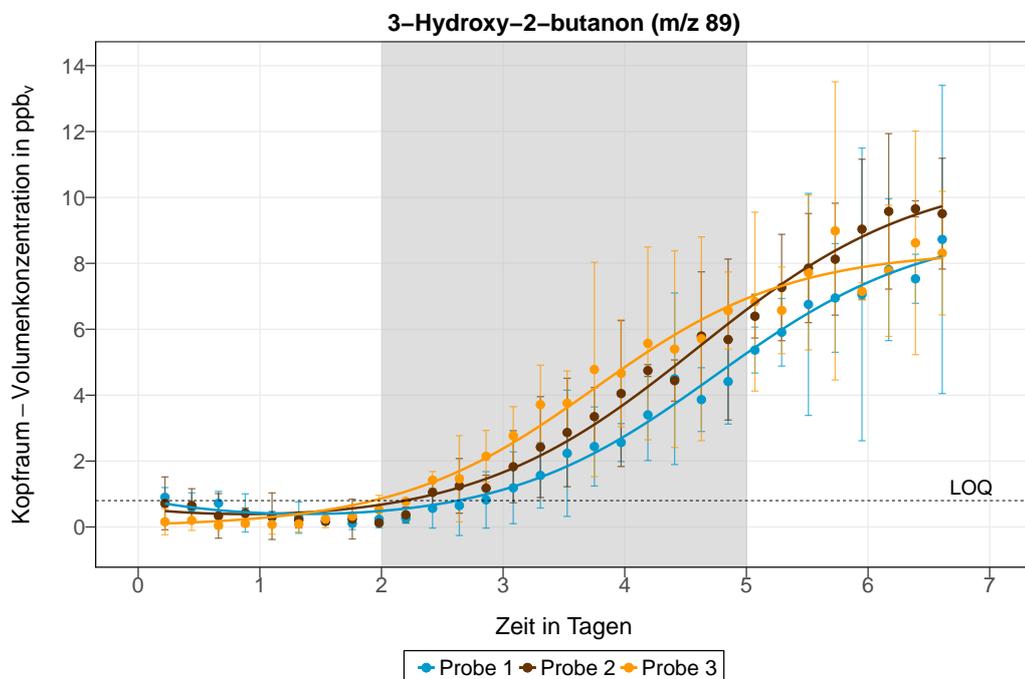


Abbildung 4.29: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( $m/z$  89) der bei 10 °C spontan verdorbenen Hähnchenfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 5, Probe 2: Fit-Fkt. 5, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

### 4.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Spontanverderb von Hähnchenfleisch

Tabelle 4.8: Ergebnisse der nicht-linearen Regression von spontan verdorbenem Hähnchenfleisch bei 4 °C mit b: Stauchung/Streckung der e-Funktion (Wachstumsgeschwindigkeit), d: Steigung der Geraden, f: Stauchung/Streckung des Polynoms in Richtung der y-Achse, u: Maximum des Zuwachses, w: Zeitkonstante, z: y-Achsenabschnitt

m/z	Probe 1	Probe 2	Probe 3
47	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 0,68 [0,58;0,77] u = 3,89 [3,56;4,35] w = 0,95 [0,78;1,15] y = 8,03 [6,74;9,6]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 0,47 [0,39;0,56] u = 3,55 [3,28;3,91] w = 0,86 [0,72;1,02] y = 7,05 [6,03;8,26]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 0,49 [0,4;0,57] u = 2,58 [2,225;3,28] w = 0,79 [0,58;1,03] y = 6,93 [5,5;8,78]
59	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 18,75 [18,55;18,98] b = 3,49 [2,59;4,69] w = 0,7 [0,42;1,17]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 19,05 [18,82;19,36] b = 3,15 [2,42;4,05] w = 0,5 [0,3;0,82]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 17,57 [17,39;17,81] b = 2,47 [1,18;6,02] w = 1,18 [0,34;3,9]
63	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 3,47 [3,21;3,7] u = 12,04 [11,24;13,09] w = 0,69 [0,6;0,78] y = 5,48 [4,87;6,14]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w_1 \cdot t + y}} + b \cdot e^{-w_2 \cdot t}$ u = 8,2 [7,1;9,39] w <sub>1</sub> = 0,67 [0,55;0,82] y = 5,34 [4,39;6,46] b = 3,46 [3,2;3,74] w <sub>2</sub> = 0,1 [0,05;0,16]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w_1 \cdot t + y}} + b \cdot e^{-w_2 \cdot t}$ u = 4,5 [3,25;7,15] w <sub>1</sub> = 0,5 [0,28;0,75] y = 4,29 [2,87;6,28] b = 1,75 [1,54;1,94] w <sub>2</sub> = 0,13 [0,04;0,34]
87	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$ z = 0,07 [0,007;0,13] u = 2,91 [2,38;3,73] w = 1,3 [1,03;1,66] y = 9,53 [7,72;12,01] f = 0,0007 [0,0003;0,001]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$ u = 3,5 [2,97;4,21] w = 1,15 [0,98;1,37] y = 8,17 [7,12;9,57] f = 0,0008 [0,0003;0,001]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$ u = 4,81 [3,24;7,5] w = 0,85 [0,71;1,08] y = 6,8 [6,02;8,25] f = 0,002 [0,001;0,003]
89	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 0,04 [0,01;0,07] u = 1,87 [1,76;2] w = 1,16 [1,01;1,34] y = 10,22 [8,97;11,67]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 2,51 [2,29;2,84] w = 0,83 [0,71;0,97] y = 7,53 [6,69;8,56]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 2,67 [2,38;3,11] w = 0,77 [0,66;0,9] y = 7,14 [6,39;8,06]

Tabelle 4.9: Ergebnisse der nicht-linearen Regression von spontan verdorbenem Hähnchenfleisch bei 10 °C mit b: Stauchung/Streckung der e-Funktion (Wachstumsgeschwindigkeit), d: Steigung der Geraden, f: Stauchung/Streckung des Polynoms in Richtung der y-Achse, u: Maximum des Zuwachses, w: Zeitkonstante, y: zeitliche Verschiebung/Wendepunkt des Wachstums, z: y-Achsenabschnitt

m/z	Probe 1	Probe 2	Probe 3
59	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 15,47 [14,55;20,72] b = 4,8 [3,86;9,45] w = 0,3 [0,08;0,56]	$f(t) = z + d \cdot t$ z = 12,4 [11,87;12,93] d = 1,22 [1,09;1,36]	$f(t) = u - b \cdot e^{-t}$ u = 15,93 [15,63;16,22] b = 5,3 [4,1;6,5]
63	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} + b \cdot e^{-t}$ u = 10,68 [10,11;11,44] w = 0,87 [0,75;1] y = 2,99 [2,68;3,33] b = 0,96 [0,24;1,63]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} + b \cdot e^{-t}$ u = 8,35 [7,41;10,23] w = 0,63 [0,49;0,78] y = 2,43 [2,19;2,75] b = 0,76 [0,06;1,4]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} + b \cdot e^{-t}$ u = 7,84 [6,61;11,06] w = 0,58 [0,43;0,73] y = 2,59 [2,36;2,9] b = 1,06 [0,42;1,65]
87	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$ u = 8,53 [7,98;9,14] w = 2,44 [2,02;2,99] y = 5,67 [4,75;6,88] f = -0,01 [-0,02;-0,01]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$ u = 12,45 [11,4;13,74] w = 1,51 [1,33;1,71] y = 4,31 [3,93;4,77] f = 0,009 [0,004;0,01]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} - f \cdot t^3$ u = 17,25 [15,17;19,97] w = 1,31 [1,17;1,47] y = 4,5 [4,19;4,87] f = 0,03 [0,02;0,04]
89	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} + b \cdot e^{-t}$ u = 9,16 [8,29;10,49] w = 1,15 [0,96;1,36] y = 5,45 [4,81;6,24] b = 0,82 [0,25;1,39]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}} + b \cdot e^{-t}$ u = 10,83 [10,11;11,76] w = 1,08 [0,96;1,22] y = 4,98 [4,58;5,44] b = 0,49 [0,01;0,96]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 8,39 [7,87;9,06] w = 1,24 [1,05;1,47] y = 4,65 [4,06;5,38]

#### 4.4.4 Diskussion

Unabhängig von der Temperatur wurde das Hähnchenfleisch hauptsächlich von *B. thermosphacta* besiedelt. Es konnte keine Substanz detektiert werden, die als möglicher Verderbsindikator dienen kann. Der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> korrelierte zwar mit dem beginnenden Konzentrationsanstieg von Methylsulfanylmethan, 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon. Es konnte jedoch kein Schwellenwert bestimmt werden, der den Qualitätszustand des Fleisches wiedergab.

#### Wachstum

Die Ergebnisse aus den Versuchen zum Spontanverderb zeigten, dass trotz unterschiedlicher Temperaturen die Mikroflora durch *B. thermosphacta* bestimmt war. Jedoch wies die Mikroflora bei 10 °C eine heterogenere Zusammensetzung auf. So wurden *Hafnia alvei* und *Kocuria palustris* nur bei 10 °C auf der Fleischoberfläche gefunden. Auch *Lactobacillus sp.* und *Pseudomonas sp.* konnten sich nach der 7-tägigen Lagerung bei 10 °C mit einer kleinen relativen Häufigkeit gegenüber anderen Mikroorganismen durchsetzen.

Zudem unterschieden sich die Versuche bei 4 und 10 °C in ihrer Anfangskeimzahl und Keimzahlentwicklung. Für den 10 °C Versuch waren die Anfangskeimzahlen eine Zehnerpotenz höher als beim 4 °C Versuch. Dies war bedingt durch die unterschiedlichen Jahreszeiten, in denen die Versuche stattfanden. Während der 10 °C Versuch im Juli durchgeführt wurde, erfolgte der 4 °C Versuch im Oktober. Wärmere Temperaturen, wie sie im Sommer vorkommen, begünstigten das Wachstum der Mikroorganismen während der Schlachtung, Verarbeitung und dem Transport.

#### **flüchtige Stoffwechselprodukte**

Die Ergebnisse zeigten, dass in Bezug auf die Verwendung als mögliche Verderbsindikatoren keine der detektierten Substanzen geeignet war. So korrelierte Ethanol zwar mit dem mikrobiellen Verderb bei 4 °C, jedoch war eine Detektion bei 10 °C nicht möglich. Weiterhin lagen bei 4 °C die gemessenen Konzentrationen im Bereich um den kritischen Grenzwert sehr nah am Quantifizierungslimit und für die einzelnen Messpunkte wurden sehr große Konfidenzintervalle berechnet, so dass keine genaue Aussage über die tatsächliche Konzentration getroffen werden konnte.

Nur für Methylsulfanylmethan, 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon wurde anhand der nicht-linearen Regression eine Korrelation mit dem mikrobiellen Wachstum beobachtet. Diese Substanzen stiegen in ihrer Konzentration, als die Keimzahlen den kritischen Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreichten. Somit war der beginnende Anstieg dieser Substanzen ein Indiz für den beginnenden Verderb. Jedoch konnte kein Schwellenwert für diese Substanzen (unabhängig von der Lagertemperatur) abgeleitet werden, der den Qualitätszustand des Fleisches wiedergab.

Zum einen war die Bildung und Freisetzung von 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon von der Temperatur abhängig. Bei 10 °C wurden deutlich höhere Konzentrationen detektiert im Vergleich zum 4 °C-Versuch. Zum anderen stammen 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon aus der gleichen Stoffklasse. Somit wäre die Entwicklung eines Frischeindikators auf Basis von einer der beiden Substanzen nicht durchführbar, da aufgrund von ähnlichen chemischen Eigenschaften eine mögliche Kreuzreaktion mit der jeweils anderen Substanz nicht ausgeschlossen werden kann.

Für Methylsulfanylmethan wurde zwar ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Bildung und mikrobiellem Wachstum beobachtet, allerdings korrelierte die gebildete Menge nicht mit der Gesamtkeimzahl. Deutliche quantitative Unterschiede konnten innerhalb der Dreifachbestimmung gemessen werden, obwohl die Proben ähnliche Keimzahlen aufwiesen. Dabei waren die detektierten Konzentrationen bei 4 °C höher als bei 10 °C. Somit war die Bildung dieser Substanz höchstwahrscheinlich nicht von der Temperatur abhängig. Vielmehr könnten die Nährstoffzusammensetzung und Mikrobiotazusammensetzung einen Einfluss auf die Bildung gehabt haben.

## 4.5 Sensorische Untersuchung bei Hähnchenfleisch

In dieser Arbeit ist zu beachten, dass das Fleisch nicht wie bei einer klassischen sensorischen Untersuchung von 10 (frisches Fleisch) bis 0 (verdorbenes Fleisch) bewertet wurde, sondern von 0 bis 10. Dabei entsprach eine Bewertung von 0 einem visuell und orthonasalen frischen Fleisch, eine Bewertung von 10 stand für ein visuell und orthonasal verdorbenes Fleisch.

### 4.5.1 Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden bereits teilweise in Franke et al. (2017) beschrieben und diskutiert. Die sensorische Untersuchung bei Hähnchenfleisch wurde, wie in 3.4.1 beschrieben, in zwei Versuchsreihen durchgeführt. In den Abbildungen 4.30 und 4.31 sind die mikrobiologischen Ergebnisse aus den beiden Versuchsreihen dargestellt. Die sensorisch untersuchten Proben aus Versuchsreihe 1 wiesen bereits an Tag 1 eine sehr hohe Keimzahl von  $9,2 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> auf. Bis Tag 6 stiegen die Keimzahlen signifikant und blieben anschließend bis Tag 9 konstant. Nach 9 Tagen erfolgte eine zweite Wachstumsphase bis zum Ende des Versuchszeitraums. Die Keimzahlen erreichten einen "finalen" Wert von  $1 \times 10^{12}$  KBE/cm<sup>2</sup>. In Versuchsreihe 2 wiesen die Proben eine wesentlich geringere Anfangskeimzahl von  $2,7 \times 10^4$  KBE/cm<sup>2</sup> auf. Dies lag daran, dass Versuchsreihe 2 im Herbst durchgeführt wurde, während die Untersuchung von Versuchsreihe 1 bereits im Sommer erfolgte. Die Gesamtkeimzahl stieg über den gesamten Versuchszeitraum stetig bis zu einem "finalen" Wert von  $6,8 \times 10^{10}$  KBE/cm<sup>2</sup>. Fleisch gilt im Allgemeinen als verdorben, wenn auf der Fleischoberfläche der kritische Wert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde (siehe 2.1.4). Dieser Grenzwert wurde an Tag 6 in beiden Versuchsreihen überschritten, was auch dem Ende der angegebenen Haltbarkeit entsprach.

Die Mikrobiota bei Versuchsreihe 1 wurde an Tag 1 hauptsächlich durch *B. thermosphacta* dominiert. Auch in den folgenden Tagen setzte sich *B. thermosphacta* gegenüber den anderen Mikroorganismen durch und blieb die vorherrschende Kontaminante. Ausnahme bildete Tag 7, an dem *B. thermosphacta* nicht identifiziert wurde und *Carnobacterium sp.* die Mikrobiota dominierte. An Tag 9 wurden zum ersten Mal in diesem Versuch *Lactobacillus sp.* nachgewiesen. Bis zum Versuchsende blieb *Lactobacillus sp.* mit niedrigen relativen Häufigkeiten als Bestandteil der Mikrobiota bestehen. Aufgrund eines Probenahmefehlers konnte an Tag 6 die Mikrobiotazusammensetzung nicht bestimmt werden.

Die initiale Mikrobiota bei Versuchsreihe 2 setzte sich aus *Carnobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.* und *Macroccoccus* zusammen. *Staphylococcus sp.* und *Macroccoccus* konnten sich in den darauffolgenden Tagen nicht gegen die weiteren, auf der Fleischoberfläche wachsenden Mikroorganismen durchsetzen und wurden nicht mehr detektiert. Ab Tag 5 herrschte überwiegend *B. thermosphacta* vor und blieb der dominierende Mikroorganismus über den gesamten Versuchszeitraum, gefolgt von *Carnobacterium sp.*. Ab Tag 7 konnte sich *L. piscium* durchsetzen und wurde bis zum Ende des Versuchszeitraums detektiert. Nur an Tag 9 konnte *Lc. gelidum* mit einer geringen relativen Häufigkeit nachgewiesen werden.

## 4.5 Sensorische Untersuchung bei Hähnchenfleisch

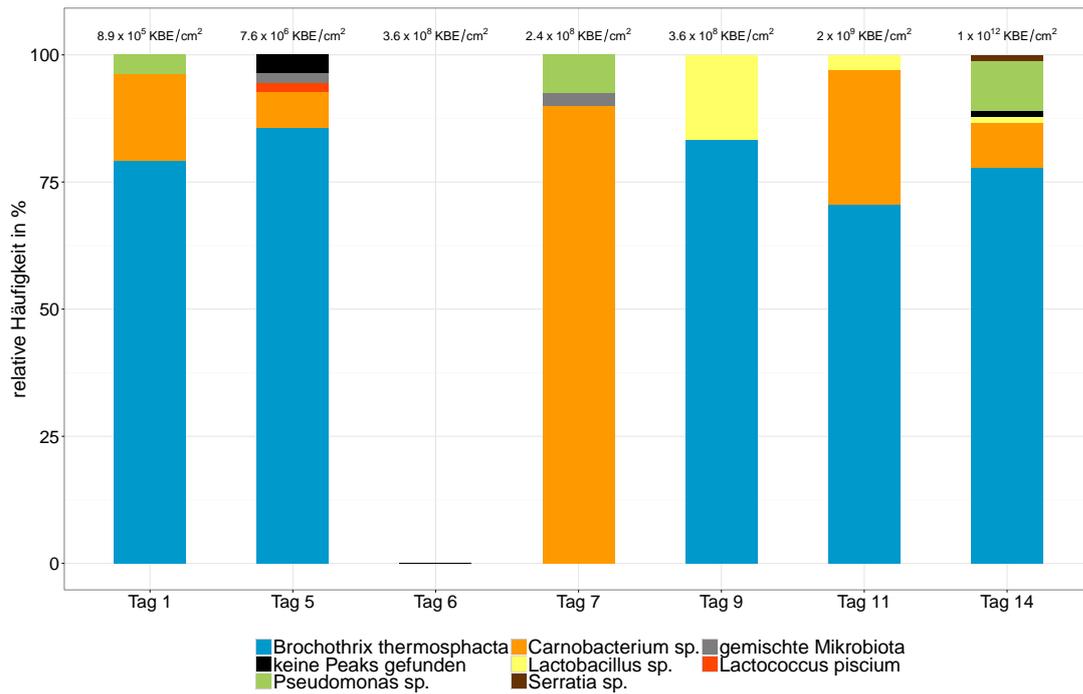


Abbildung 4.30: Mikrobiologische Ergebnisse der sensorischen Untersuchung bei Hähnchenfleisch, Versuchsreihe 1

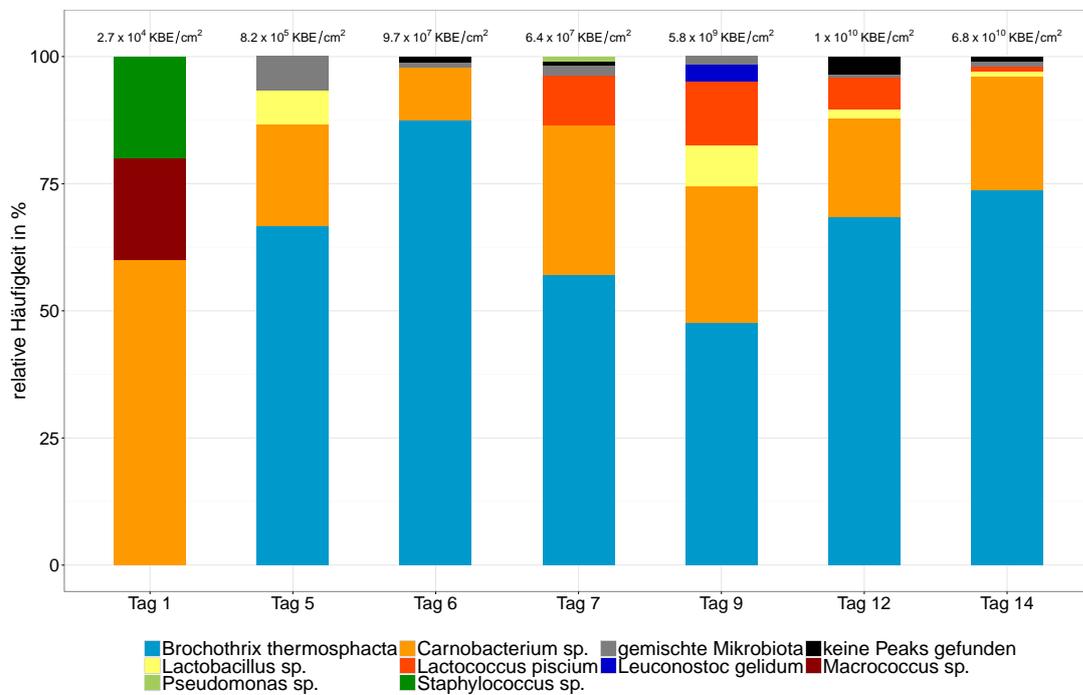


Abbildung 4.31: Mikrobiologische Ergebnisse der sensorischen Untersuchung bei Hähnchenfleisch, Versuchsreihe 2

Abbildung 4.32 gibt eine Zusammenfassung über die qualitativen Änderungen der einzelnen Attribute. Die durchschnittliche Bewertung des sensorischen Panels wurde entsprechend der untersuchten Tage geclustert. Die horizontalen Linien des Dendogramms geben die Ähnlichkeiten der Attribute wider. Je kürzer die Linien sind, desto näher sind die Abstände zwischen den verschiedenen Attributen und folglich desto mehr Ähnlichkeiten weisen die Attribute auf. Insgesamt wurden vier verschiedene Gruppen identifiziert:

- Gruppe 1: *verdorben (rohes Fleisch), säuerlich, Fleischsaft, grau/grünlich*
- Gruppe 2: *orthonasaler Frischeeindruck, visueller Frischeeindruck, Glanz*
- Gruppe 3: *schmierig, vergoren/hefig, Butter, metallisch/blutig, käsig/schweißig, rot*
- Gruppe 4: *Honig/Bienenwachs, ölig, kunststoffartig/fettig, fruchtig, stechend*

Von allen Gruppen zeigte Gruppe 2 den größten Einfluss auf die sensorische Bewertung der Schutzgas-verpackten Hähnchenbrustfilets. Die Bewertung der Gruppe 4 veränderte sich am wenigsten. In Gruppen 1 und 2 wurde der Gesamteindruck mit mehr verderbsspezifischen Attributen zusammengefasst. Während die Attribute *visueller Frischeeindruck*, *orthonasaler Frischeeindruck* und *Glanz* während des gesamten Versuchszeitraumes abnahmen, stiegen Attribute wie *verdorben*, *säuerlich*, *Fleischsaft* und *grau/grünlich* in ihrer Bewertung.

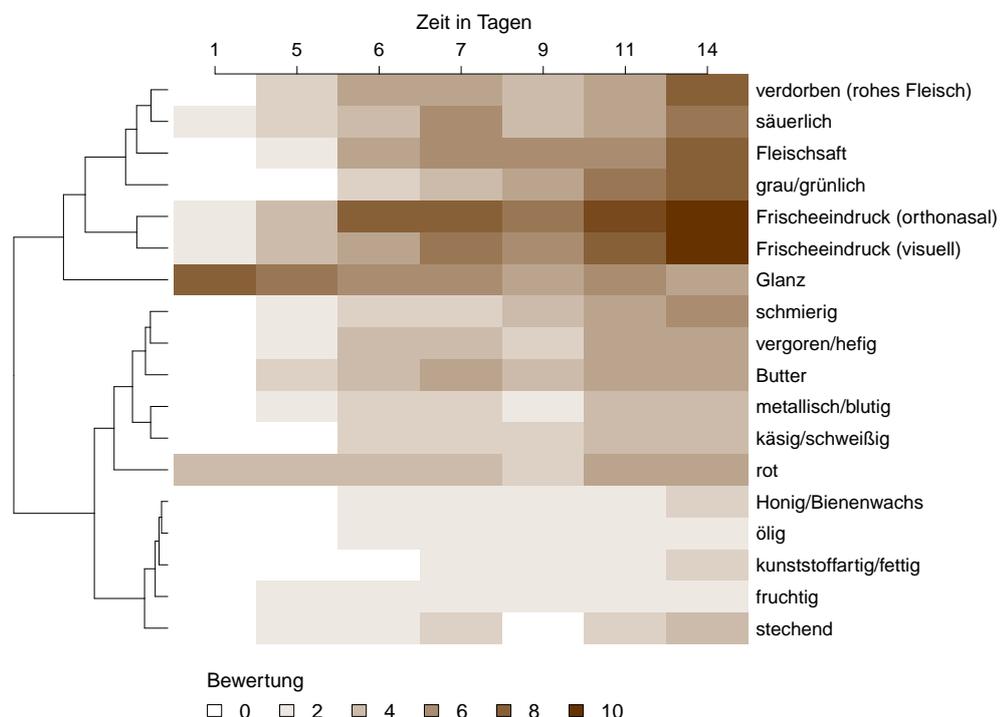


Abbildung 4.32: Grafische Darstellung der Attribute für Schutzgas-verpacktes Hähnchenfleisch (30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub>) bei 4 °C, nach Franke et al. (2017)

Ergebnisse der sequentiellen logistischen Regression (siehe 3.5.4) sind als rote horizontale Linien in Abbildung 4.33 illustriert. Zusätzlich sind in Abbildung 4.33 die Ergebnisse des Panels für die jeweiligen Messzeitpunkte als Boxplots dargestellt. Die sequentielle logistische Regression wurde verwendet, um die Aussagenschärfe für jedes einzelne Attribut zur Bestimmung des Qualitätszustandes von Fleisch zu bestimmen. In je mehr Qualitätsstufen (rote horizontale Linien) ein Attribut klassifiziert werden konnte, desto höher war seine Aussagenschärfe. Dabei wurde eine sensorische Bewertung von 5 als Grenzwert festgelegt, um den Einfluss von einzelnen Attributen auf den sensorischen Eindruck bestimmen zu können. Lag eine Qualitätsstufe bei einer sensorischen Bewertung  $< 5$ , war ein Attribut nicht wahrnehmbar, bei einer Bewertung  $> 5$  war das Attribut vorhanden und hatte somit einen Einfluss auf den sensorischen Eindruck von Fleisch.

Das Attribut *visueller Frischeeindruck* veränderte sich stufenweise in insgesamt 6 unterscheidbare Qualitätsstufen. Die ersten beiden Stufen befanden sich unterhalb des Grenzwertes. Die dritte Stufe lag auf dem Grenzwert, während sich die drei letzten Stufen oberhalb des Grenzwertes befanden. Zum ersten Mal wurde der Grenzwert an Tag 6 erreicht. Zwischen Tag 7 und 9 galt das Fleisch als "nicht mehr frisch", zwischen Tag 9 und 11 wurde das Aussehen als "verdorben" bezeichnet. Ab Tag 11 war das Fleisch "sehr stark verdorben". Eine Änderung des *orthonasalen Frischeeindrucks* wurde in den ersten 4 Tagen kaum wahrgenommen. Erst zum Ende des Haltbarkeitsdatums hin stieg der Einfluss auf den sensorischen Eindruck von Hähnchenfleisch. Die ersten deutlichen Fehlgerüche wurden ab Tag 6 ermittelt. Mit steigender Lagerzeit nahm der *orthonasale Frischeeindruck* immer mehr ab und erreichte ab Tag 12 die maximale sensorische Bewertung von 10, welche einem verdorbenen Fleisch entspricht.

Für das Attribut *verdorben (rohes Fleisch)* wurden nur 2 Qualitätsstufen gefunden. Im Zeitraum von 11 Tagen wurde das Attribut nicht wahrgenommen. Ab Tag 11 wurde der Grenzwert überschritten und blieb mit einer sensorischen Bewertung von 10 bis Tag 14 konstant. Auch für das Attribut *Butter* wurden nur zwei Qualitätsstufen ermittelt. Wie auch schon beim Attribut *verdorben* befand sich die erste Stufe unterhalb des Grenzwertes für insgesamt 11 Tage. Ab Tag 11 wurde das Attribut *Butter* sehr stark wahrgenommen.

Das Attribut *Fleischsaft* war durch drei Qualitätsstufen charakterisiert. Ab Tag 10 ist deutlich Fleischsaft aus den Hähnchenbrustfilets ausgetreten. Das Attribut *schmierig* war gekennzeichnet durch drei Stufen. Die erste Stufe hatte eine Länge von 8 Tagen und eine sensorische Bewertung von 1. Auch die zweite Stufe, welche von Tag 8 bis 12 andauerte, lag unterhalb des Grenzwertes. Erst ab Tag 12 bis zum Ende des Versuchszeitraumes wurde das Fleisch als *schmierig* bezeichnet. Für das Attribut *Glanz* wurden zwei Qualitätsstufen gefunden. Zwischen Tag 1 und 6 hatte das Fleisch einen schönen Glanz. Ab Tag 6 wurde das Fleisch als weniger glänzend/matt bewertet. Das Attribut *grau/grünlich* war durch drei Qualitätsstufen bestimmt. Die ersten beiden Stufen waren unterhalb des Grenzwertes lokalisiert und die dritte Stufe oberhalb des Grenzwertes mit einer maximalen sensorischen Bewertung von 10. In den ersten 12 Tagen war keine Änderung in der Fleischfarbe wahrnehmbar. Ab Tag 12 wurde eine deutliche *Grau-/Grünfärbung* festgestellt.

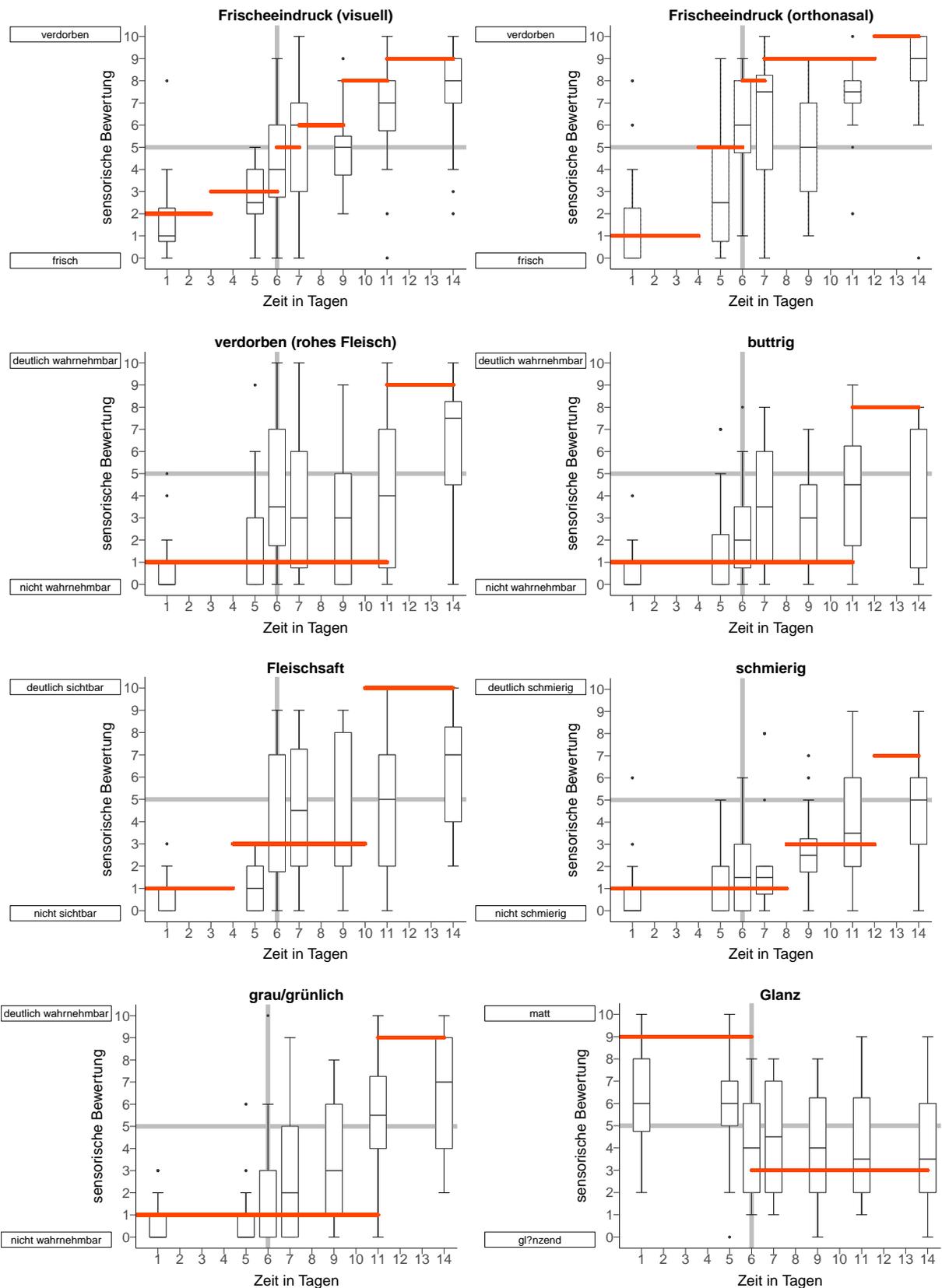


Abbildung 4.33: Ergebnisse der sequentiellen logistischen Regression (rote horizontale Linien) der wichtigsten Attribute von Schutzgas-verpacktem Hähnchenfleisch (4 °C); Die horizontale graue Linie markiert den Schwellenwert zwischen "nicht wahrnehmbar" und "wahrnehmbar"; Die vertikale graue Linie kennzeichnet das vom Produzenten deklarierte Haltbarkeitsdatum

### 4.5.2 Diskussion

Einzelne Attribute waren nicht entscheidend für die Bestimmung des Qualitätszustandes von Fleisch. Vielmehr wies der *visuelle* und *orthonasale Gesamteindruck* eine gute Korrelation mit dem kritischen Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> auf, was die industrielle Praxis bestätigt.

#### Wachstum

Der Produzent des Geflügelfleisches, welches in der sensorischen Untersuchung verwendet wurde, gibt ein Verbrauchsdatum von 8 Tagen nach der Schlachtung an, wenn das Fleisch in der ursprünglichen Schutzgasatmosphäre und bei höchstens 4 °C gelagert wird. Bereits an Tag 1 dieser beiden Versuchsreihen war die initiale Bakterienzahl relativ hoch. Zu dem Zeitpunkt hatte das Fleisch ein wirkliches Alter von 2-3 Tagen (siehe 3.4.1). Aufgrund der hohen Anfangskeimzahl wurde die kritische Keimzahl von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> bereits an Tag 6 überschritten, welcher auch gleichzeitig dem Ende der vom Produzenten angegebenen Haltbarkeit entsprach. Somit war entweder die zum Haltbarkeitsdatum addierte Sicherheitsspanne nicht richtig kalkuliert oder hygienische Maßnahmen wurden nicht ausreichend eingehalten.

#### Sensorische Bewertung

In Abbildung 4.33 sind die sensorischen Bewertungen des Panels mit Hilfe von Boxplots dargestellt. Zusätzlich wurden in den einzelnen Diagrammen in Abbildung 4.33 die Ergebnisse der sequentiellen logistischen Regression ergänzt. Eine sequentielle logistische Regression wurde verwendet, um die Aussagenschärfe der gewählten Attribute beurteilen zu können.

Den Ergebnissen der sequentiellen logistischen Regression zufolge hatte der Gesamteindruck (*visueller* und *orthonasaler Frischeeindruck*) den größten Einfluss auf die sensorische Bewertung, während mehr spezifische Attribute wie *metallisch/blutig*, *Honig*, *käsig/schweißig*, *Plastik* und *ölig* nicht entscheidend für die Bestimmung des Verderbszustandes waren. Aus diesem Grund waren *visueller* und *orthonasaler Frischeeindruck* die geeignetsten Attribute, um den Verderb von Schutzgas-verpacktem Hähnchenbrustfilet nachzuweisen. Erste Anzeichen des visuellen Verderbs waren ab Tag 7 feststellbar. Somit wurde der visuelle Verderb erst deutlich, als die kritische Keimzahl von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> bereits überschritten wurde. Erste geruchliche Veränderungen traten bereits ein Tag früher, an Tag 6, auf. Dies zeigte, dass die Bildung von Fehlgerüchen die ersten Anzeichen waren, dass das Fleisch verdirbt. Als eindeutig "verdorben" wurde das Fleisch erst ab Tag 11 bezeichnet. Demzufolge hat sich zwar der Fleischgeruch von "frisch" zu "nicht mehr frisch" zum Ende des angegebenen Haltbarkeitsdatums hin geändert, jedoch galt das Fleisch erst sensorisch als "verdorben", als das Haltbarkeitsdatum und die kritische Keimzahl bereits mehrere Tage überschritten waren.

Beim Attribut *Butter* ist anzunehmen, dass es durch 2,3-Butandion/3-Hydroxy-2-butanon hervorgerufen wird. Die Proben wurden hauptsächlich durch *B. thermosphacta* und *Carnobacterium sp.* besiedelt. Diese beiden Mikroorganismen sind typische Produzenten von 2,3-Butandion/3-Hydroxy-2-butanon, wie es bereits in Kapitel 2.2 beschrieben wurde. Ein buttriges Fehl aroma wurde erst deutlich wahrgenommen, als die Mikroorganismen bereits Keimzahlen von  $10^9$  KBE/cm<sup>2</sup> überschritten hatten und das Fleisch als "verdorben" bewertet wurde. Somit hatte die Bildung und Freisetzung des buttrigen Fehl aromas einen direkten Einfluss auf die sensorische Bewertung des Attributes *verdorben*.

## 4.6 Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Rindfleisch

Ziel dieser Versuche war es, das flüchtige Metabolitspektrum und damit verbunden die verderbsbezogene Aktivität von typischen Vertretern der autochthonen Mikrobiota (immer vorhandenen Mikroorganismen) über einen Zeitraum von 7 Tagen zu bestimmen. Hierfür wurde frisches Rindfleisch mit Einzelstämmen beimpft. Als Einzelstämme wurden zwei verschiedene Stämme von *L. piscium* verwendet, da sie in Vorversuchen als Hauptverderber identifiziert wurden (Abschlussbericht IGF-Vorhaben 17803 N, 2017). Die Versuche fanden jeweils in Dreifachbestimmung (Probe 1, Probe 2 und Probe 3) statt.

### 4.6.1 Rindfleisch beimpft mit *L. piscium* 9.3

#### Wachstum

In Abbildung 4.34 sind die Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen zusammengefasst. Die Referenzprobe des unbeimpften Fleisches wies mit  $9,1 \times 10^1$  KBE/cm<sup>2</sup> eine geringe Anfangs keimzahl auf und war durch eine sog. "gemischte Mikrobiota" kontaminiert. Die gemischte Mikrobiota enthielt alle Mikroorganismen, die aufgrund von fehlenden Referenzspektren in der Datenbank des MALDI-TOF-MS nicht näher identifiziert werden konnten. Nach Beimpfen der Proben setzte sich die Mikrobiota zu 100 % aus *L. piscium* zusammen. Nach Beenden des Versuchs zeigte sich jedoch, dass der beimpfte *L. piscium* Stamm teilweise von anderen Mikroorganismen verdrängt wurde und bei Proben 1 und 3 seine Dominanz verlor.

**flüchtige Stoffwechselprodukte**

Das flüchtige Metabolitspektrum setzte sich aus Substanzen mit 5 verschiedenen *m/z*-Verhältnissen zusammen. Die detektierten Substanzen wurden als Fragmente von Alkoholen, Säuren und Estern (*m/z* 41 und *m/z* 43), 2-Propanon (*m/z* 59), Methylsulfanylmethan (*m/z* 63) und 2,3-Butandion (*m/z* 87) identifiziert. Eine Auswahl der detektierten Substanzen ist in den Abbildungen 4.35 bis 4.37 aufgeführt. 2-Propanon und Methylsulfanylmethan waren von Anfang an im Kopfraum der Proben präsent, während 2,3-Butandion erst nach einer Lagerzeit von 4 Tagen sicher quantifiziert werden konnte. In diesem Versuch wurden nur für die beiden Substanzen 2-Propanon und 2,3-Butandion ein klarer Trend für die Konzentrationszunahme beobachtet. Die Bildung von 2,3-Butandion war dabei von der Probe abhängig. Somit war die Konzentrationszunahme von 2-Propanon über den gesamten Messzeitraum am höchsten.

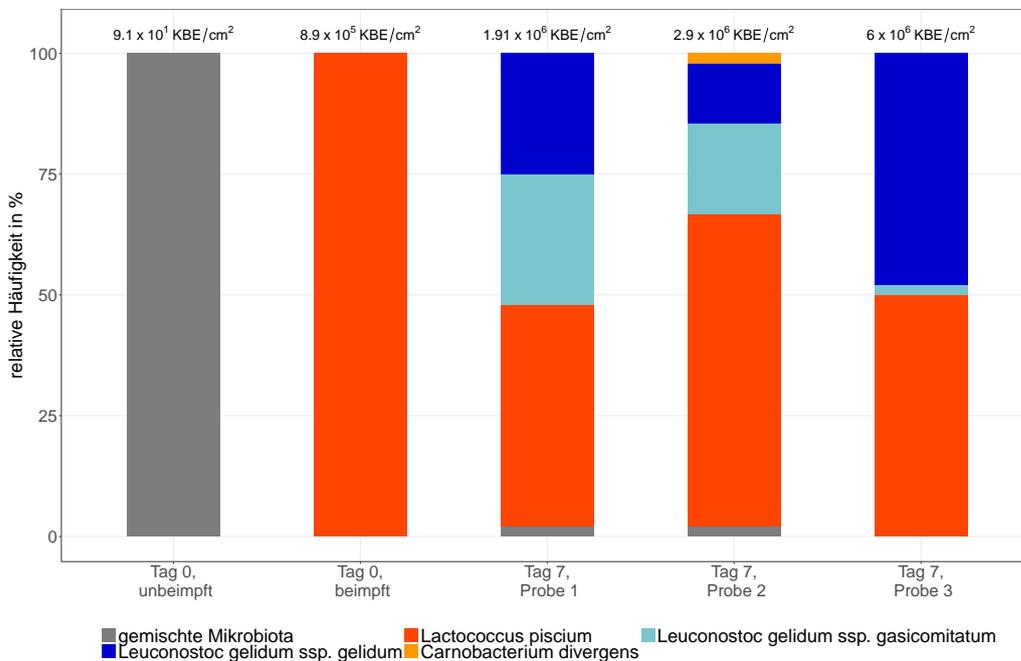


Abbildung 4.34: Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der mit *L. piscium* 9.3 beimpften Rindfleischproben

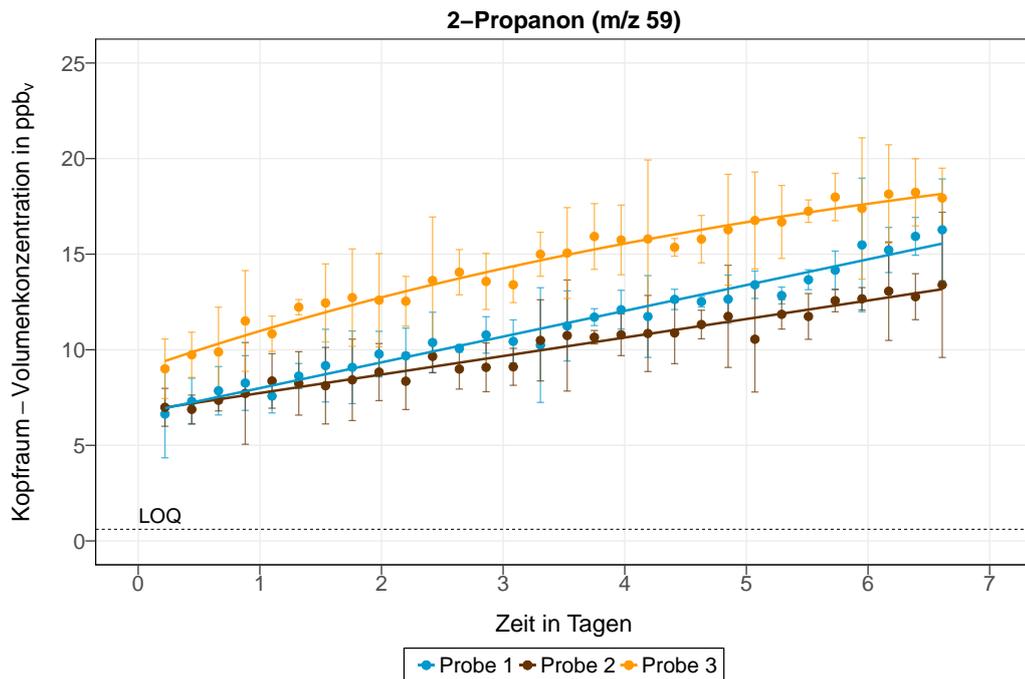


Abbildung 4.35: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( $m/z$  59) der mit *L. piscium* 9.3 beimpften Proben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 7, Probe 2: Fit-Fkt. 7, Probe 3: Fit-Fkt. 4 (siehe Tabelle 3.5)

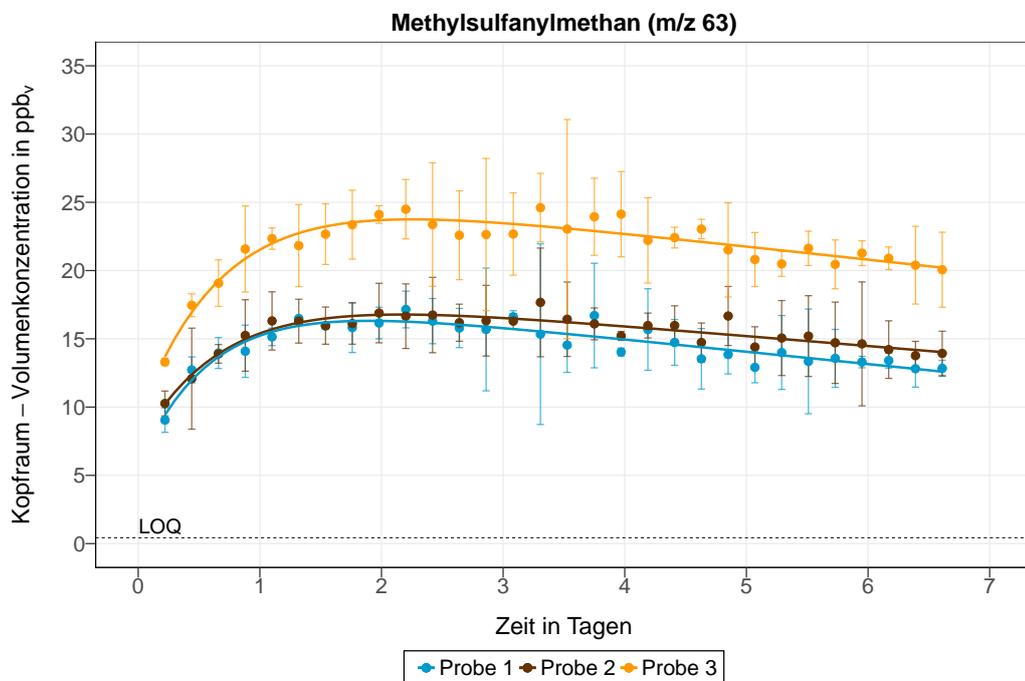


Abbildung 4.36: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63) der mit *L. piscium* 9.3 beimpften Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 10, Probe 2: Fit-Fkt. 10, Probe 3: Fit-Fkt. 10 (siehe Tabelle 3.5)

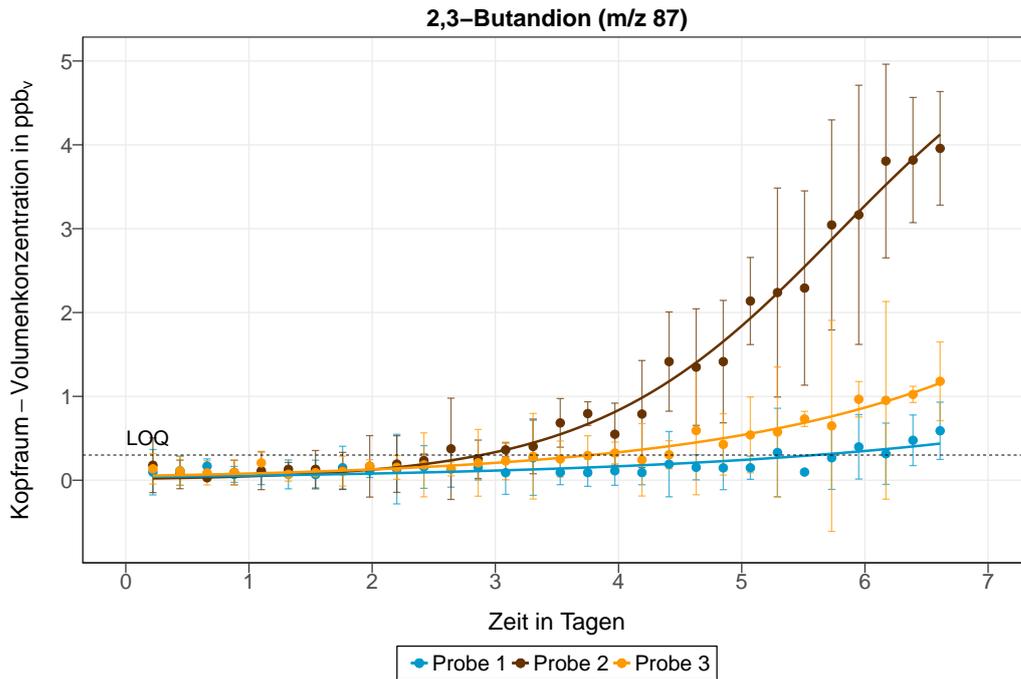


Abbildung 4.37: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( $m/z$  87) der mit *L. piscium* 9.3 beimpften Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 9, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 9 (siehe Tabelle 3.5)

### 4.6.2 Rindfleisch beimpft mit *L. piscium* 14

#### Wachstum

In einem weiteren Versuch wurde Rindernuss mit einem zweiten Stamm von *L. piscium* beimpft. Die Referenzprobe des unbeimpften Fleisches wies an Tag 0 eine Gesamtkeimzahl von  $1,8 \times 10^2$  KBE/cm<sup>2</sup> auf und war dabei zu 50 % durch *Staphylococcus equorum* und zu 50 % durch eine gemischte Mikrobiota kontaminiert. Nach Beimpfen des Fleisches wurden zu 100 % *L. piscium* auf der Fleischoberfläche gefunden. Während der 7-tägigen PTR-MS-Messung konnte *L. piscium* seine Dominanz weiter halten und wurde in allen untersuchten Proben zu 100 % nachgewiesen.

### flüchtige Stoffwechselprodukte

Das flüchtige Metabolitspektrum enthielt Substanzen mit insgesamt 6 verschiedenen  $m/z$ -Verhältnissen, welche als Fragmente von Alkoholen, Säuren und Estern ( $m/z$  41 und  $m/z$  43), 2-Propanon ( $m/z$  59), Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63), 2,3-Butandion ( $m/z$  87) und 3-Hydroxy-2-butanon ( $m/z$  89) identifiziert wurden. Ausgewählte Ergebnisse zur Bestimmung des flüchtigen Metabolitspektrums von *L. piscium* 14 sind in den Abbildungen 4.39 bis 4.42 dargestellt. 2-Propanon und Methylsulfanylmethan wurden dabei von Beginn an im Kopfraum der Proben detektiert, während 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon erst nach einem Zeitraum von 3 Tagen gebildet und in den Kopfraum der Proben freigesetzt wurden. Am Ende des Versuches wurde für 2,3-Butandion die höchsten Konzentrationen berechnet. 3-Hydroxy-2-butanon wurde nur mit einer geringen Konzentration gebildet. Konzentrationsunterschiede innerhalb der Dreifachbestimmung wurden teilweise für 2-Propanon, Methylsulfanylmethan und 2,3-Butandion detektiert.

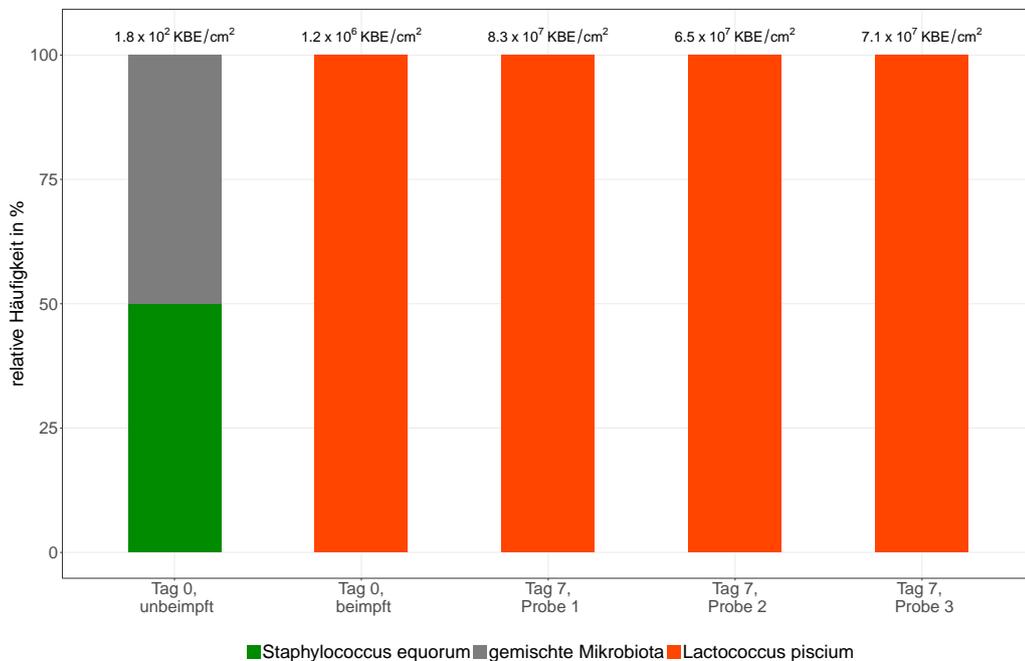


Abbildung 4.38: Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der mit *L. piscium* 14 beimpften Rindfleischproben

#### 4.6 Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Rindfleisch

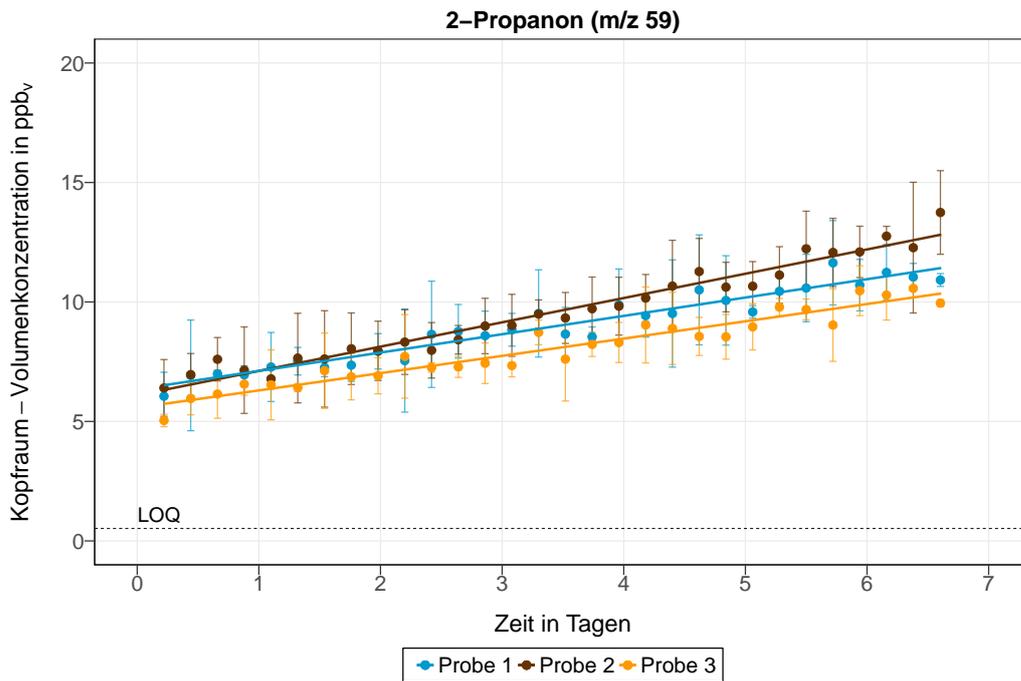


Abbildung 4.39: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( $m/z$  59) der mit *L. piscium* 14 beimpften Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 7, Probe 2: Fit-Fkt. 7, Probe 3: Fit-Fkt. 7 (siehe Tabelle 3.5)

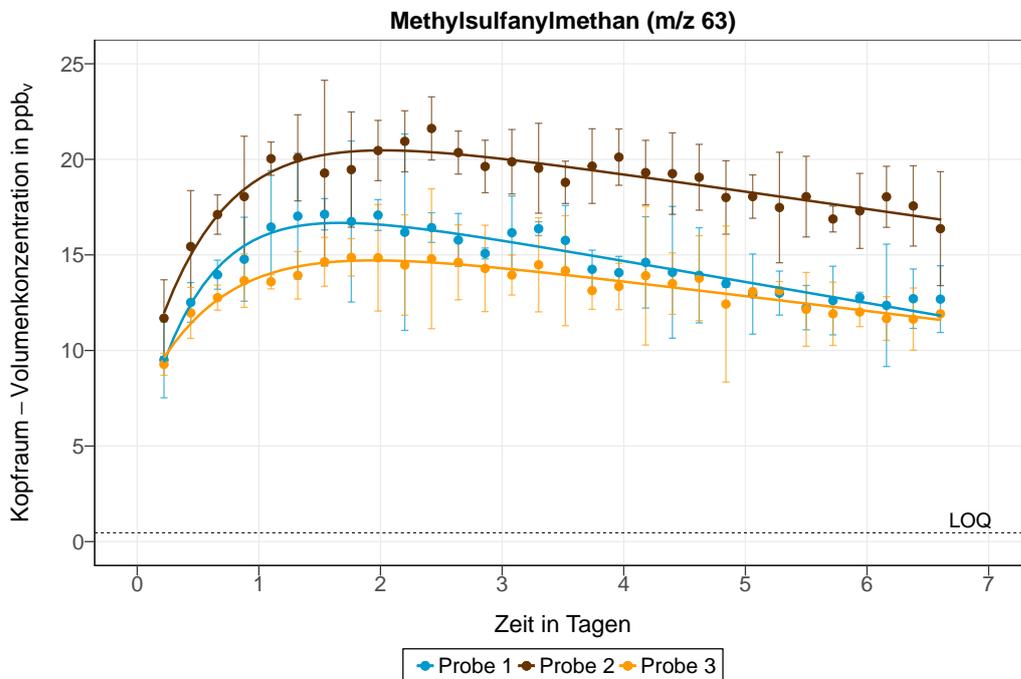


Abbildung 4.40: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63) der mit *L. piscium* 14 beimpften Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 10, Probe 2: Fit-Fkt. 10, Probe 3: Fit-Fkt. 10 (siehe Tabelle 3.5)

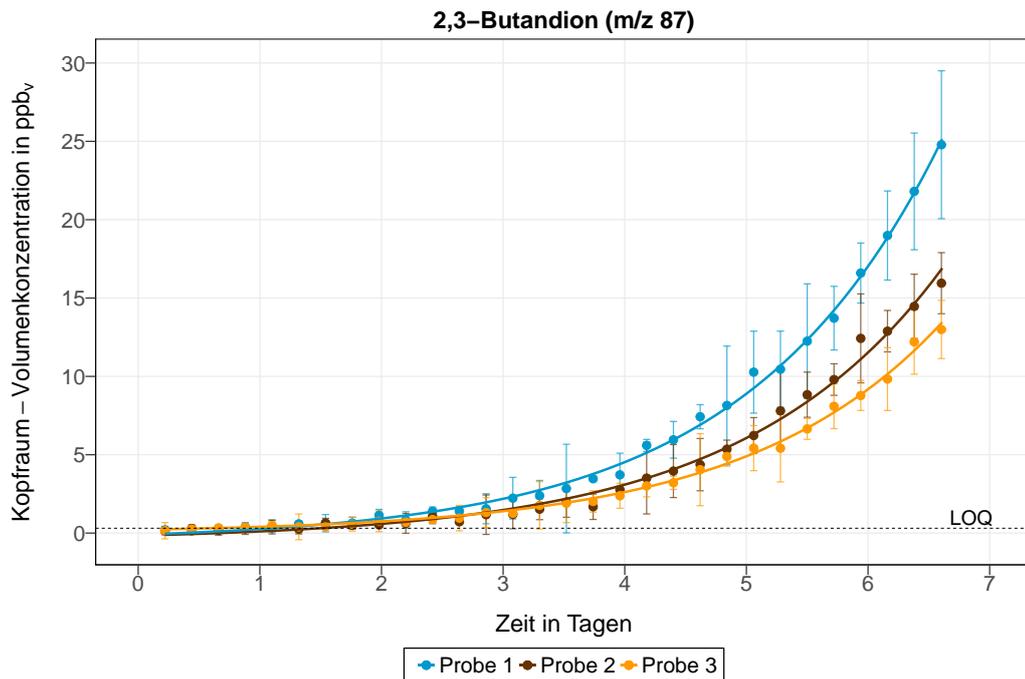


Abbildung 4.41: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( $m/z$  87) der mit *L. piscium* 14 beimpften Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 9, Probe 2: Fit-Fkt. 9, Probe 3: Fit-Fkt. 9 (siehe Tabelle 3.5)

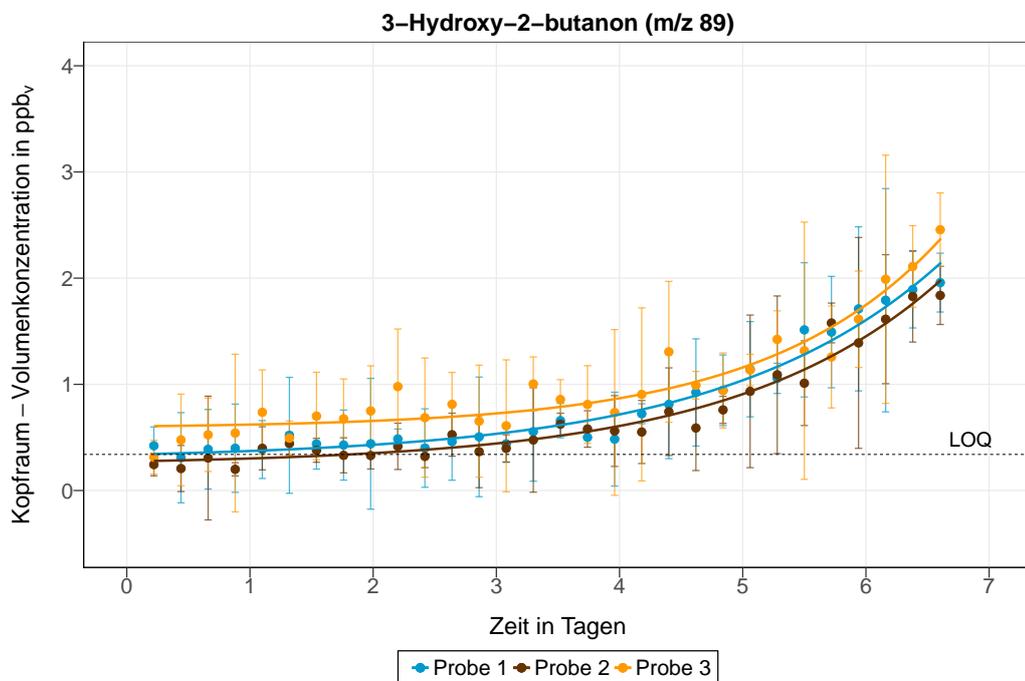


Abbildung 4.42: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( $m/z$  89) der mit *L. piscium* 14 beimpften Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 9, Probe 2: Fit-Fkt. 9, Probe 3: Fit-Fkt. 9 (siehe Tabelle 3.5)

### 4.6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung des flüchtigen Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Rindfleisch

Tabelle 4.10: Ergebnisse der nicht-linearen Regression der mit *L. piscium* 9.3 beimpften Rindfleischproben bei 4 °C mit b: Stauchung/Streckung der e-Funktion (Wachstumsgeschwindigkeit), d: Steigung der Geraden, f: Stauchung/Streckung des Polynoms in Richtung der y-Achse, u: Maximum des Zuwachses, w: Zeitkonstante, y: zeitliche Verschiebung/Wendepunkt des Wachstums, z: y-Achsenabschnitt

m/z	Probe 1	Probe 2	Probe 3
59	$f(t) = z + d \cdot t$ z = 6,64 [6,35;6,94] d = 1,35 [1,27;1,42]	$f(t) = z + d \cdot t$ z = 6,77 [6,47;7,07] d = 0,97 [0,89;1,04]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 23,54 [20,33;34,02] b = 14,61 [11,75;24,62] w = 0,15 [0,07;0,24]
63	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ u = 18,58 [17,66;19,74] b = 12,92 [10,98;15,24] w = 1,66 [1,21;2,27] d = 0,91 [0,71;1,14]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ u = 18,87 [17,89;20,24] b = 11,69 [10,03;13,55] w = 1,45 [1,02;2] d = 0,73 [0,53;1]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ u = 26,58 [25,25;28,38] b = 17,44 [15,25;19,9] w = 1,45 [1,06;1,94] d = 0,96 [0,69;1,31]
87	$f(t) = b \cdot e^{w \cdot t}$ b = 0,04 [0,02;0,07] w = 0,37 [0,26;0,51]	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 5,92 [4,9;8,07] w = 1,01 [0,84;1,2] y = 5,84 [5,34;6,54]	$f(t) = b \cdot e^{w \cdot t}$ b = 0,05 [0,03;0,07] w = 0,48 [0,41;0,55]

Tabelle 4.11: Ergebnisse der nicht-linearen Regression der mit *L. piscium* 14 beimpften Rindfleischproben bei 4 °C mit b: Stauchung/Streckung der e-Funktion (Wachstumsgeschwindigkeit), d: Steigung der Geraden, f: Stauchung/Streckung des Polynoms in Richtung der y-Achse, u: Maximum des Zuwachses, w: Zeitkonstante, y: zeitliche Verschiebung/Wendepunkt des Wachstums, z: y-Achsenabschnitt

m/z	Probe 1	Probe 2	Probe 3
59	$f(t) = z + d \cdot t$ z = 6,35 [6,09;6,6] d = 0,77 [0,7;0,83]	$f(t) = z + d \cdot t$ z = 6,1 [5,84;6,35] d = 1,02 [0,95;1,08]	$f(t) = z + d \cdot t$ z = 5,58 [5,36;5,79] d = 0,72 [0,67;0,78]
63	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ u = 19,09 [18,38;19,89] b = 14,48 [12,53;16,73] w = 1,94 [1,54;2,43] d = 1,1 [0,94;1,27]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ u = 22,87 [21,97;23,97] b = 15,38 [13,56;17,48] w = 1,64 [1,27;2,1] d = 0,91 [0,72;1,13]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ u = 16,74 [15,96;17,79] b = 9,69 [8,31;11,3] w = 1,51 [1,08;2,08] d = 0,78 [0,62;0,98]
87	$f(t) = z + b \cdot e^{w \cdot t}$ z = -0,52 [-0,89;-0,17] b = 0,42 [0,33;0,52] w = 0,62 [0,59;0,66]	$f(t) = z + b \cdot e^{w \cdot t}$ z = -0,47 [-0,78;-0,18] b = 0,31 [0,24;0,41] w = 0,61 [0,57;0,65]	$f(t) = b \cdot e^{w \cdot t}$ b = 0,21 [0,19;0,24] w = 0,63 [0,6;0,65]

Tabelle 2.6: Fortsetzung

<i>m/z</i>	Probe 1	Probe 2	Probe 3
89	$f(t) = z + b \cdot e^{w \cdot t}$ z = 0,3 [0,19;0,38] b = 0,04 [0,02;0,09] w = 0,57 [0,47;0,68]	$f(t) = z + b \cdot e^{w \cdot t}$ z = 0,24 [0,14;0,32] b = 0,03 [0,02;0,07] w = 0,6 [0,49;0,71]	$f(t) = z + b \cdot e^{w \cdot t}$ z = 0,59 [0,45;0,69] b = 0,02 [0,004;0,06] w = 0,71 [0,52;0,93]

#### 4.6.4 Diskussion

Das flüchtige Metabolitspektrum von *L. piscium* 14 konnte bestimmt werden, von *L. piscium* Stamm 9.3 hingegen war eine Bestimmung nicht möglich. *L. piscium* 14 bildete nur wenige VOCs mit 2,3-Butandion als flüchtiges Hauptstoffwechselprodukt.

#### Wachstum

*L. piscium* Stamm 9.3 wurde direkt nach dem Beimpfen an Tag 0 mit einer relativen Häufigkeit von 100 % auf dem Rindfleisch gefunden. Obwohl die Referenzprobe nur eine geringe Anfangs-keimbelastung aufwies und die Beimpfung erfolgreich war, konnte dieser Stamm während der 7-tägigen Messung seine Dominanz nicht verteidigen und wurde von anderen Mikroorganismen (*Lc. gelidum ssp. gasicomitatum* und *Lc. gelidum ssp. gelidum*) teilweise überwachsen. Im Gegensatz dazu, wies *L. piscium* Stamm 14 eine gute Durchsetzungskraft gegenüber anderen Mikroorganismen auf. Nach dem Beimpfen an Tag 0 bestand die Mikrobiota zu 100 % aus *L. piscium*, was bis zum Ende des Versuchs konstant blieb. Dies zeigte, dass das Verderbspotential von *L. piscium* vom Stamm abhängig ist. Diese Tatsache wurde bereits von Andreevskaya et al. (2015) festgestellt.

#### flüchtige Stoffwechselprodukte

Da *L. piscium* 14 über den gesamten Versuchszeitraum zu 100 % die Mikrobiota beherrschte, war die Bestimmung des flüchtigen Metabolitspektrums dieses Stammes möglich. Somit stammten alle detektierten VOCs höchstwahrscheinlich aus dem Stoffwechsel von *L. piscium* (siehe Abbildung 4.38). 2,3-Butandion (*m/z* 87) gehört neben 2-Hydroxypropionsäure zu den wichtigsten Stoffwechselprodukten von Milchsäurebakterien. 2,3-Butandion/3-Hydroxy-2-butanon wird vor allem gebildet, wenn Pyruvat im Überschuss vorliegt. Dies ist der Fall, wenn zusätzliche Elektronenakzeptoren wie O<sub>2</sub> vorhanden sind (siehe Kapitel 2.2.2). Die in diesem Versuch verwendete Schutzgasatmosphäre bestand zu 70 % aus O<sub>2</sub> (30 % CO<sub>2</sub>). Somit war ausreichend O<sub>2</sub> verfügbar, um Pyruvat herzustellen. *L. piscium* ist auch in der Lage, Ethanol zu bilden (siehe Kapitel 2.2.2), jedoch wurde eine Konzentrationsänderung in der Substanz mit *m/z* 47 bei diesem Versuch nicht festgestellt.

Das dynamische Verhalten der Substanz mit Methylsulfanylmethan (*m/z* 63) lässt vermuten, dass Methylsulfanylmethan keinen mikrobiellen Ursprung hatte. Aufgrund der hohen Anfangskonzentrationen gehört Methylsulfanylmethan höchstwahrscheinlich zum natürlichen Aroma

von frischem Rindfleisch. In den ersten Tagen der PTR-MS-Messung wurde diese Substanz in den Kopfraum kontinuierlich freigesetzt, bis sich ein Gleichgewicht im Kopfraum einstellte. Die anschließende lineare Abnahme war bedingt durch Oxidationsprozesse, wie es bereits in Insausti et al. (2002) erwähnt wurde.

## 4.7 Spontanverderb von Rindfleisch

In diesen Versuchen wurden die Bildungsraten sowie Konzentrationen der beim spontanen Verderb von Rindfleisch gebildeten und freigesetzten VOCs zeitabhängig bestimmt. Ziel war es, ein oder mehrere Stoffe bzw. Stoffklassen zu identifizieren, die als mögliche Verderbsmarker zur Entwicklung von Frischeindikatoren dienen können. Hierfür wurde frisches Rindfleisch bei 4 °C für 14 Tage und bei 10 °C für 7 Tage gelagert. Zusätzlich wurde die späte Verderbsphase bei 10 °C zwischen Tag 7 und 14 gemessen.

### 4.7.1 Spontanverderb bei 4 °C

#### Wachstum

Die Referenzprobe des frischen Fleisches war hauptsächlich durch eine gemischte Mikrobiota kontaminiert. Als identifizierbare initiale Kontaminanten wurden Milchsäurebakterien, *C. divergens* und *Staphylococcus spp.* auf der Fleischoberfläche gefunden. Nach 14-tägiger Messung des Fleisches bei 4 °C waren die gemischte Mikrobiota und *Staphylococcus spp.* komplett verschwunden. Das Fleisch war hauptsächlich von Milchsäurebakterien besiedelt. Während *L. piscium* bei Proben 1 und 3 dominierte, war bei Probe 2 *Lc. gelidum ssp. gelidum* vorherrschend. Der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> wurde zwischen Tag 7 und 10 erreicht (Abschlussbericht IGF-Vorhaben 17803 N, 2017).

#### flüchtige Stoffwechselprodukte

Insgesamt wurden in diesem Versuch Substanzen mit 9 verschiedenen *m/z*-Verhältnissen detektiert. Die wichtigsten Ergebnisse der PTR-MS-Messungen sind in den Abbildungen 4.44 bis 4.48 dargestellt. Die Ergebnisse der nicht-linearen Regression ließen eine leichte Konzentrationsänderung für Methanol und Ethansäure erkennen, allerdings wiesen die Messpunkte bei diesen Substanzen große Konfidenzintervalle auf. Zusätzlich verliefen die gemessenen Werte der Substanz mit *m/z* 33 nahe am Quantifizierungslimit.

Die Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon hingegen lag deutlich oberhalb des Quantifizierungslimits und stieg über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich an. Somit konnten hohe Konzentrationsänderungen über den 14-tägigen Messzeitraum eindeutig detektiert werden, wobei die drei Proben vergleichbare Werte innerhalb der Dreifachbestimmung aufwiesen.

Die Änderung der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan war den Ergebnissen der nicht-linearen Regression zufolge durch ein beschränktes Wachstum in den ersten 2 Tagen gefolgt von einer linearen Abnahme erklärbar. Die Werte der drei Proben unterschieden sich entsprechend der Konfidenzintervalle nicht voneinander.

2,3-Butandion wurde in den ersten 8 Tagen offenbar nicht gebildet. Der Messwert lag beim Quantifizierungslimit. Erst nach einer Lagerzeit von 8 Tagen, als der Bereich für den kritischen Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> bereits erreicht wurde, stieg die Konzentration bis zum Ende stark an. Dabei wurden keine Unterschiede innerhalb der Dreifachbestimmung festgestellt.

Am Versuchsende wurde für 2-Propanon die höchste Kopfraum-Volumenkonzentration detektiert. Methanol und Ethansäure waren in den geringsten Konzentrationen vorhanden.

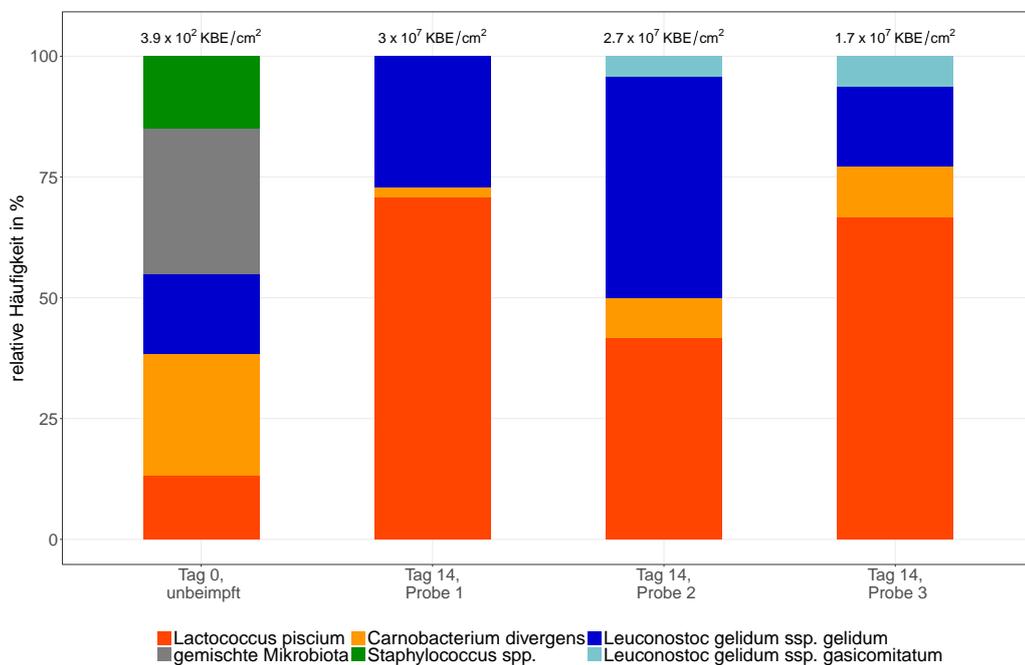


Abbildung 4.43: Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der spontan verdorbenen Rindfleischproben bei 4 °C

## 4.7 Spontanverderb von Rindfleisch

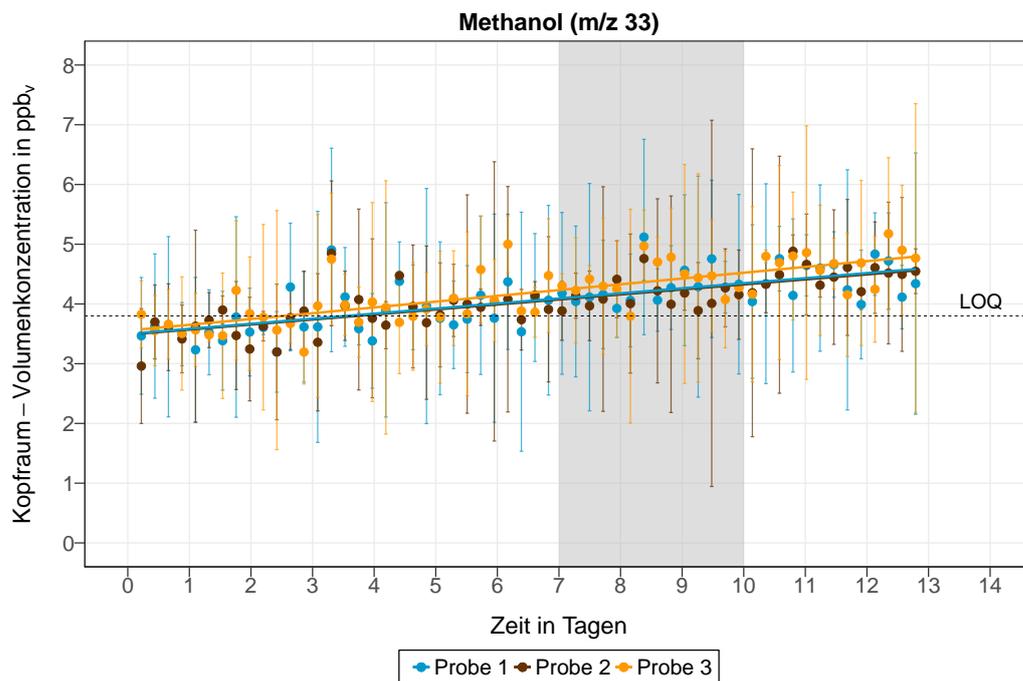


Abbildung 4.44: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methanol ( $m/z$  33) der bei 4 °C spontan verderbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 7, Probe 2: Fit-Fkt. 7, Probe 3: Fit-Fkt. 7 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

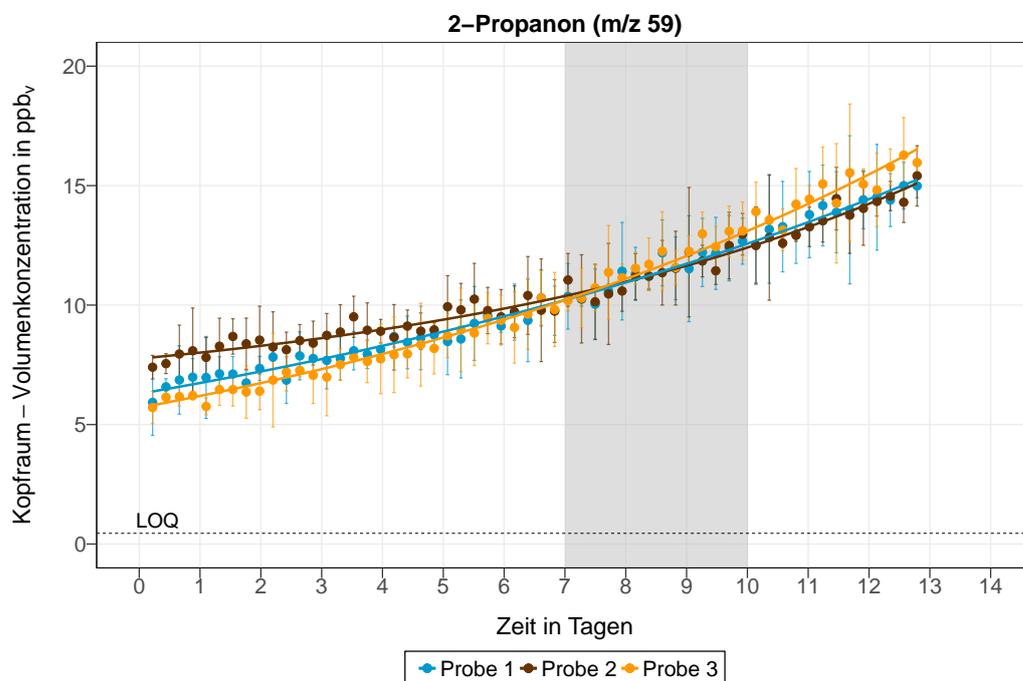


Abbildung 4.45: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( $m/z$  59) der bei 4 °C spontan verderbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 9, Probe 2: Fit-Fkt. 9, Probe 3: Fit-Fkt. 9 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

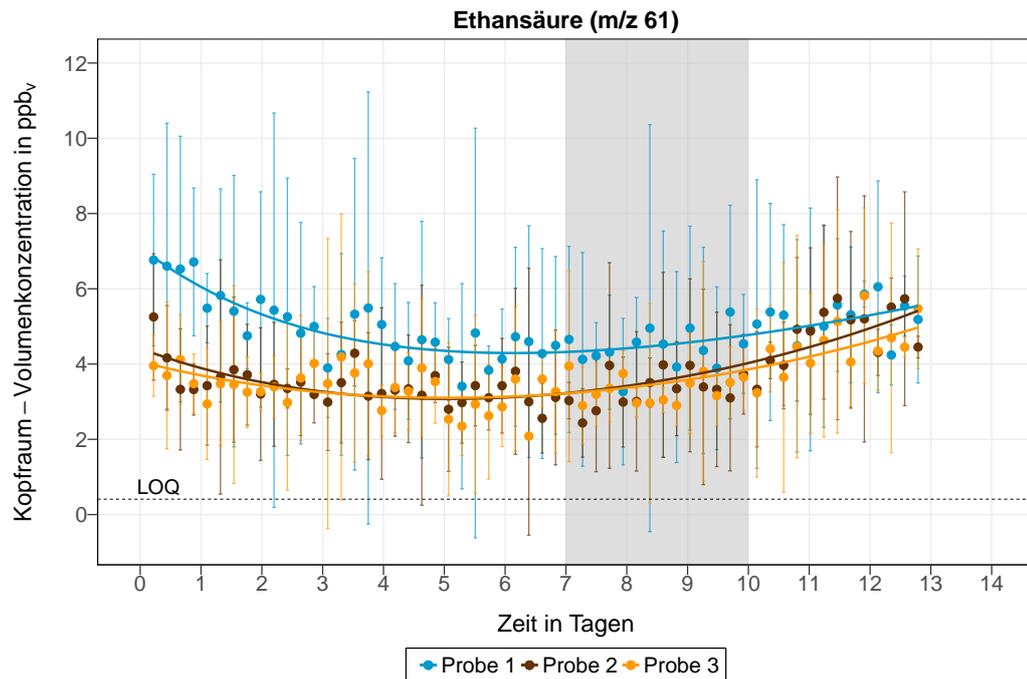


Abbildung 4.46: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethansäure ( $m/z$  61) der bei 4 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 3, Probe 2: Fit-Fkt. 3, Probe 3: Fit-Fkt. 3 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

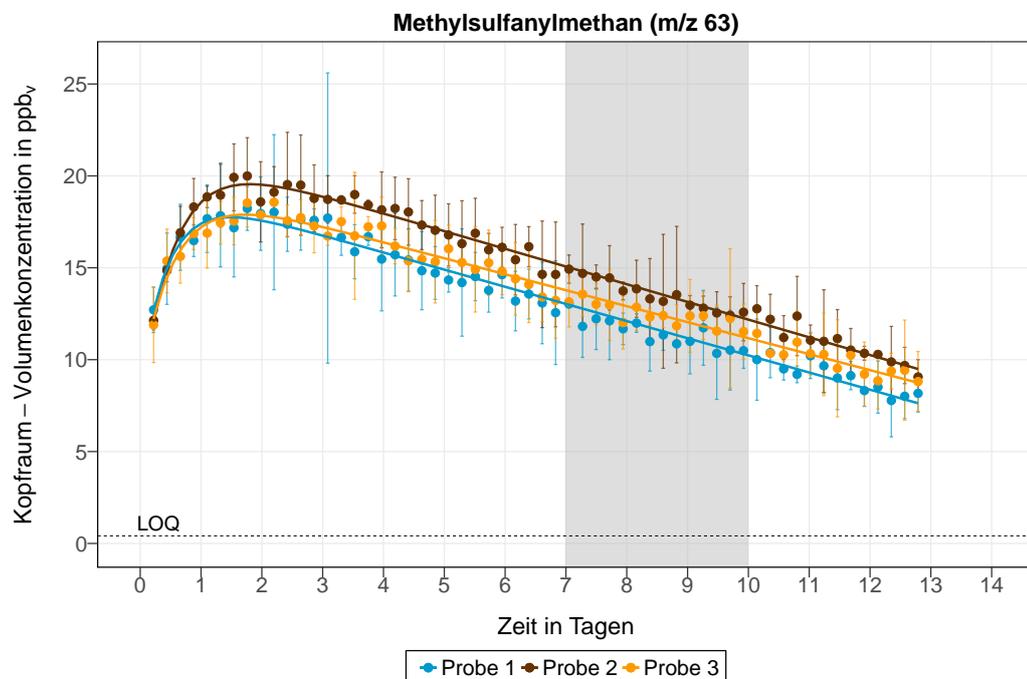


Abbildung 4.47: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63) der bei 4 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 10, Probe 2: Fit-Fkt. 10, Probe 3: Fit-Fkt. 10 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

## 4.7 Spontanverderb von Rindfleisch

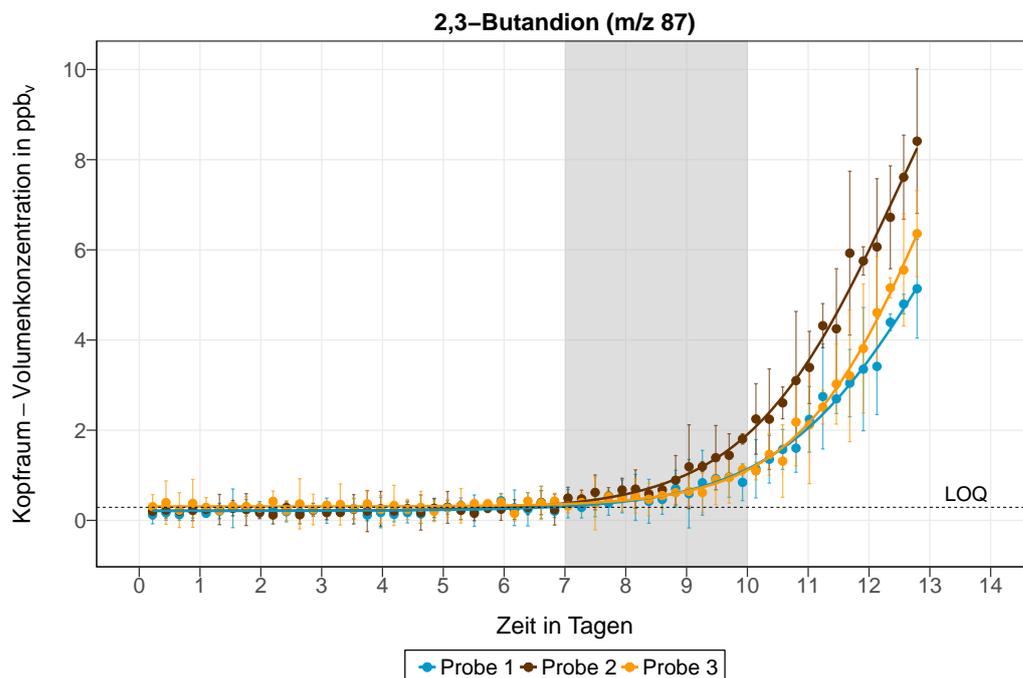


Abbildung 4.48: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( $m/z$  87) der bei 4 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

### 4.7.2 Spontanverderb bei 10 °C

#### Wachstum

Die Referenzprobe des frischen Rindfleisches war an Tag 0 hauptsächlich durch eine gemischte Mikrobiota kontaminiert. Weiterhin wurden *L. piscium*, *C. divergens* und *Staphylococcus spp.* auf der Fleischoberfläche bestimmt. Während des Messzeitraumes wurde die gemischte Mikrobiota größtenteils verdrängt und konnte nur noch bei Proben 2 und 3 mit einer sehr geringen relativen Häufigkeit gefunden werden. Milchsäurebakterien hingegen konnten sich wie auch schon in 4.7.1 gegenüber den anderen initial auf der Fleischoberfläche vorhandenen Mikroorganismen durchsetzen und dominierten die Mikrobiota in allen drei Proben mit *L. piscium* als Hauptverderber. Der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> wurde zwischen Tag 4 und 7 erreicht (Abschlussbericht IGF-Vorhaben 17803 N, 2017)

### **flüchtige Stoffwechselprodukte**

In diesem Versuch wurden Substanzen mit insgesamt 10 verschiedenen  $m/z$ -Verhältnissen detektiert. Die wichtigsten Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.50 bis 4.56 aufgeführt. Für Methanol konnten leichte Konzentrationsänderungen anhand der Ergebnisse der nicht-linearen Regression abgeleitet werden. Jedoch waren die Konfidenzintervalle der Messpunkte auch in diesem Versuch (vgl. 4.7.1) sehr groß.

Ethanol wurde in den ersten Tagen offenbar nicht gebildet, da der Messwert beim Quantifizierungslimit lag. Erst nachdem die Keimzahlen im Bereich des kritischen Grenzwertes von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> lagen, stieg die Konzentration kontinuierlich an und überschritt das Quantifizierungslimit an Tag 5,5. Allerdings waren die Konfidenzintervalle bei dieser Substanz auch sehr hoch.

Die Konzentration von 2-Propanon stieg über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich an. Hierbei wies Probe 1 zu jedem Messzeitpunkt die geringsten Werte auf, die Konzentrationen von Proben 2 und 3 waren vergleichbar.

Für Methylsulfanylmethan wurde die gleiche Dynamik wie auch schon in 4.7.1 beobachtet. Eine Konzentrationszunahme in den ersten 1,5 Tagen, gefolgt von einer kontinuierlichen Abnahme bis zum Ende des Versuchs. Allerdings wurden insgesamt höhere Konzentrationen bestimmt im Vergleich zum Versuch bei 4 °C. Zudem unterschieden sich die Konzentrationen in diesem Versuch innerhalb der Dreifachbestimmung.

Die Konzentrationsänderungen von Ethansäure, 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon wiesen ein ähnliches Verhalten auf. Nach einer lag-Phase von 4 Tagen stiegen die Konzentrationen kontinuierlich bis zum Versuchsende an. An diesem Tag begann auch der Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde. Ausgenommen war hier Probe 2 bei der Substanz mit  $m/z$  87, da sie bereits ab Tag 3 eine Änderung in ihrer Konzentration zeigte. Auffällig bei all diesen Substanzen war, dass das berechnete Konfidenzintervall im Allgemeinen sehr groß war.

Am Ende des Versuchs waren 2-Propanon, Ethansäure und Methylsulfanylmethan in den höchsten Kopfraum-Volumenkonzentrationen vorhanden, während Ethanol und 3-Hydroxy-2-butanon die geringsten Konzentrationen aufwiesen.

## 4.7 Spontanverderb von Rindfleisch

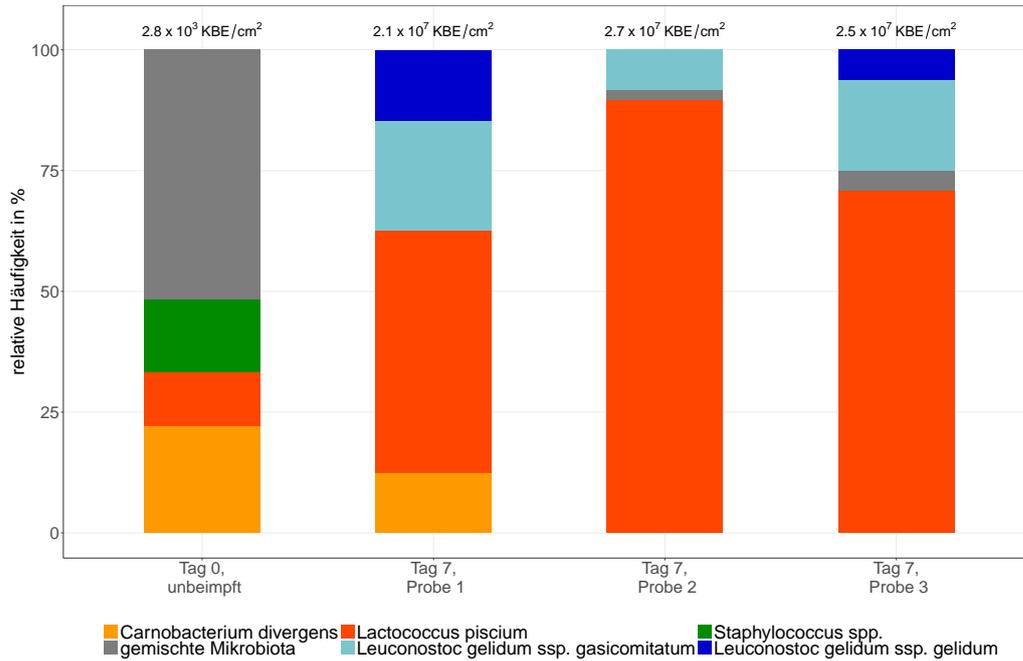


Abbildung 4.49: Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der spontan verdorbenen Rindfleischproben bei 10 °C

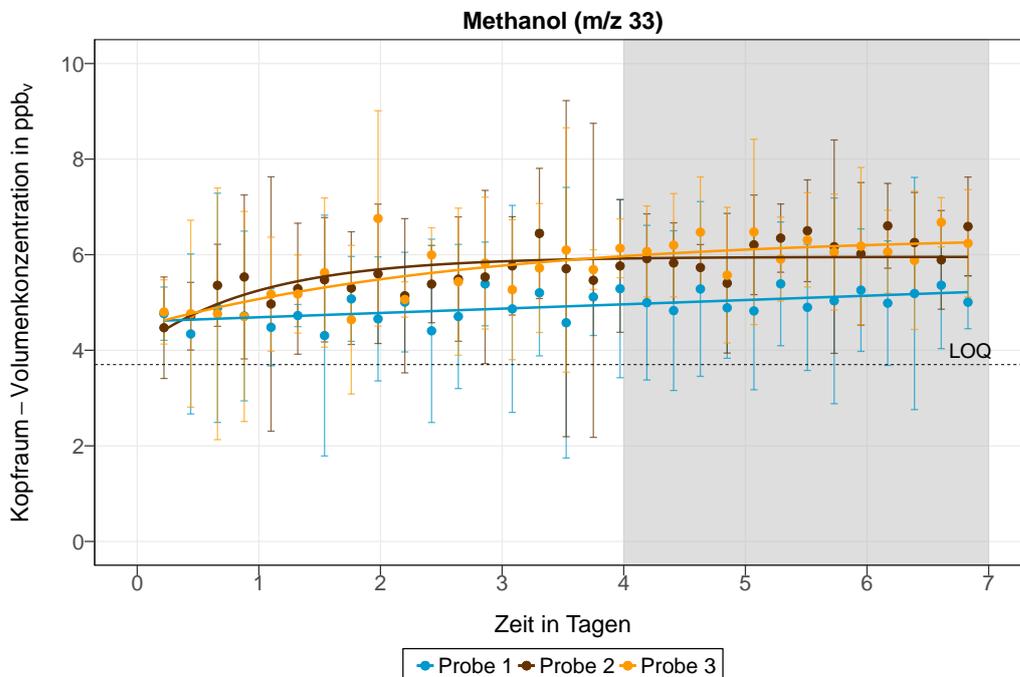


Abbildung 4.50: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methanol ( $m/z$  33) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 7, Probe 2: Fit-Fkt. 4, Probe 3: Fit-Fkt. 4 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

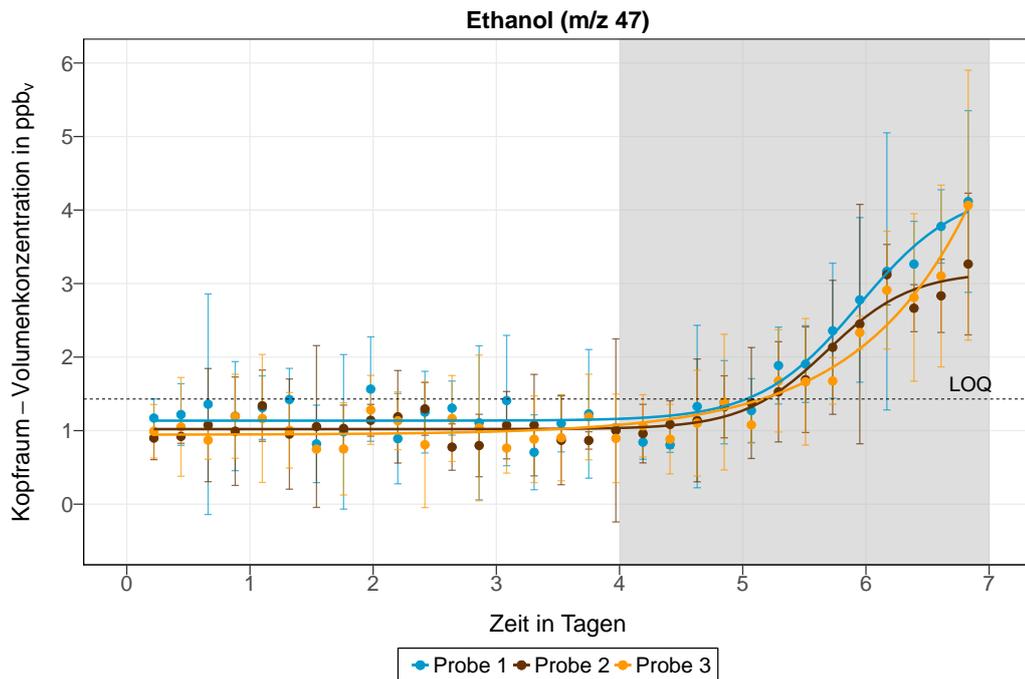


Abbildung 4.51: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethanol ( $m/z$  47) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 9 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

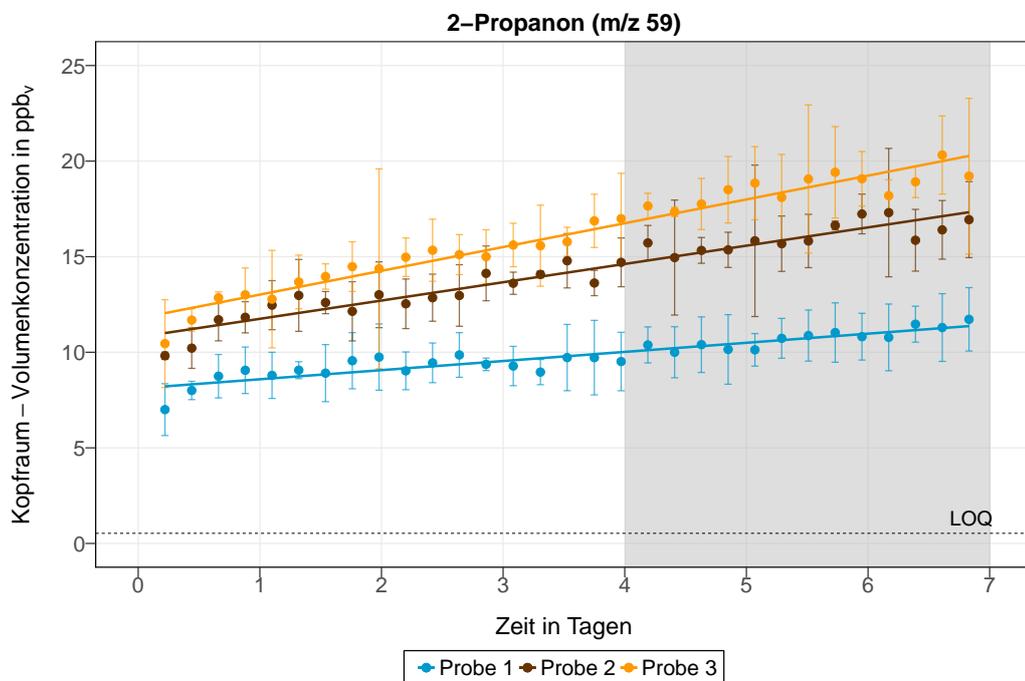


Abbildung 4.52: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( $m/z$  59) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 7, Probe 2: Fit-Fkt. 7, Probe 3: Fit-Fkt. 7 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

## 4.7 Spontanverderb von Rindfleisch

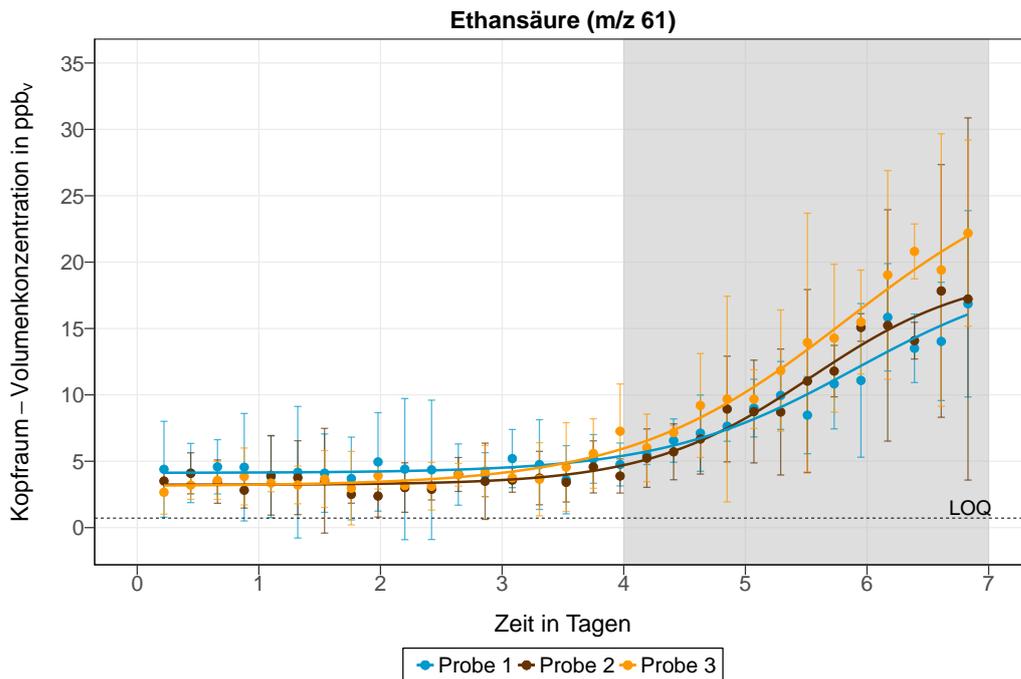


Abbildung 4.53: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethansäure (*m/z* 61) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

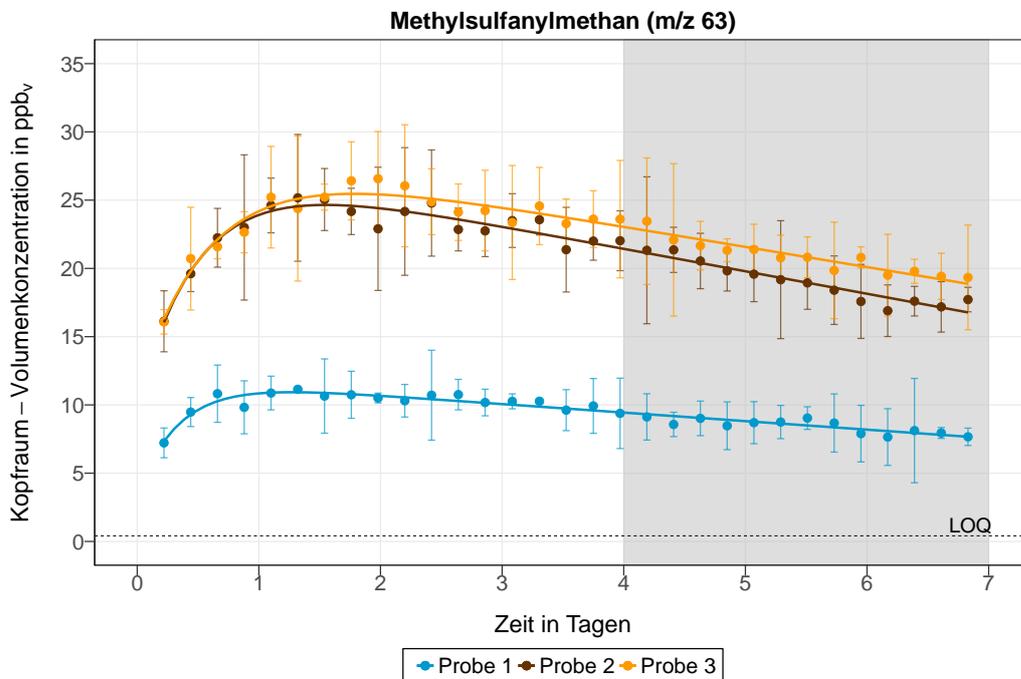


Abbildung 4.54: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan (*m/z* 63) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 10, Probe 2: Fit-Fkt. 10, Probe 3: Fit-Fkt. 10 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

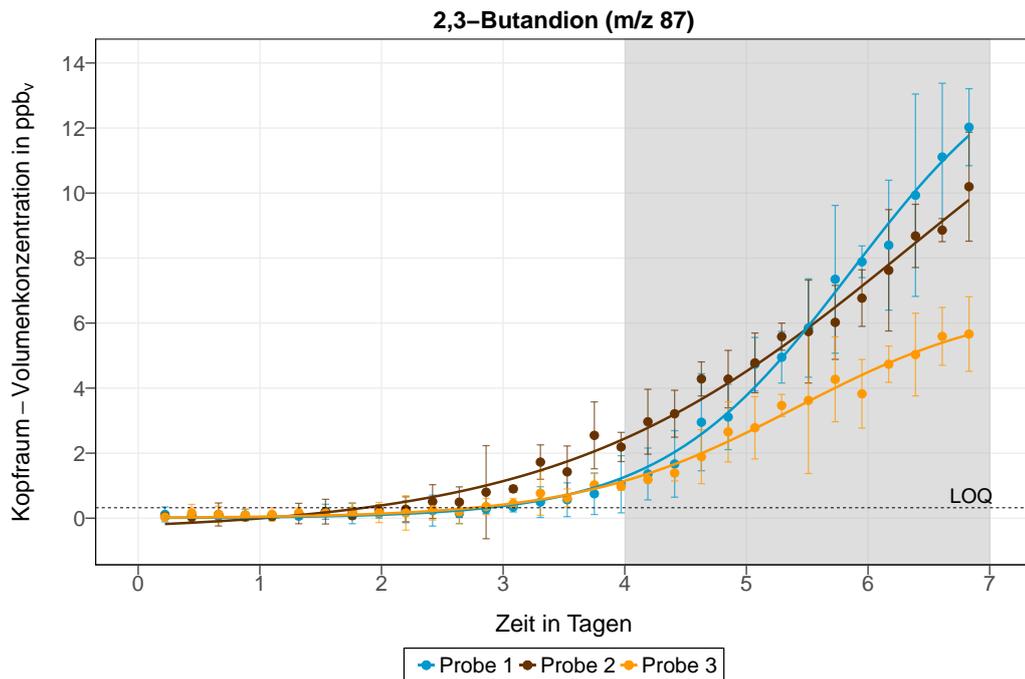


Abbildung 4.55: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( $m/z$  87) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

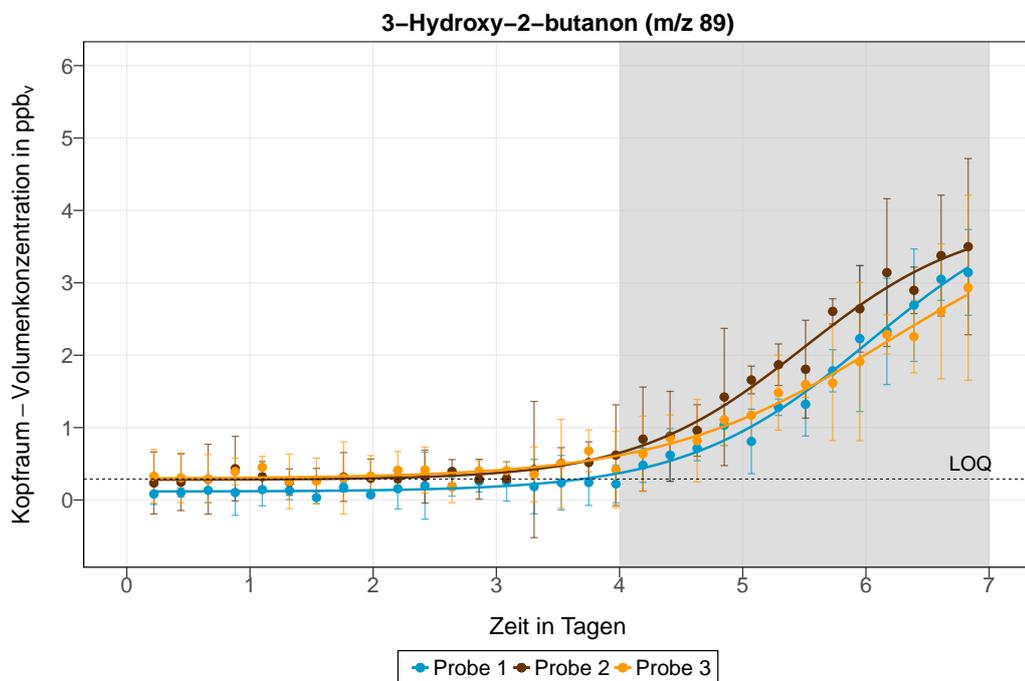


Abbildung 4.56: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( $m/z$  89) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben, LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

### 4.7.3 Spontanverderb bei 10 °C (späte Phase)

#### Wachstum

Ziel dieses Versuches war es, die Bildung und Freisetzung von VOCs in einer späteren Verfallsphase zu messen und zu überprüfen, ob Unterschiede im Metabolitspektrum zwischen frühem (siehe 4.7.2) und spätem Verderb bestehen. Da eine längere Frequentierung des PTR-MS-Instruments zum Versuchszeitpunkt nicht möglich war, wurden für diesen Versuch in einem ersten Schritt Rindernussscheiben in kommerziellen Schutzgasverpackungen für einen Zeitraum von 7 Tagen bei 10 °C unbehandelt vorgelagert. Nach dieser Lagerzeit wurden in einem zweiten Schritt aus den Rindernussscheiben runde Stücke mit einer Oberfläche von 20 cm<sup>2</sup> (~33 g) ausgeschnitten und jeweils drei der ausgeschnittenen Stücke in die PTR-MS-Behälter gegeben. Die Bildung und Freisetzung von VOCs wurde anschließend bei 10 °C über eine Lagerzeit von weiteren 7 Tagen detektiert. Übrige Fleischstücke wurden zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl und Mikrobiota verwendet.

Zu Beginn der PTR-MS-Messung war die Mikrobiota hauptsächlich durch Milchsäurebakterien bestimmt, welche auch schon bei den vorherigen Untersuchungen (siehe 4.7.1 und 4.7.2) dominierten. Zu diesem Zeitpunkt war der kritische Grenzwert von 10<sup>7</sup> KBE/cm<sup>2</sup> bereits überschritten. Über den Messzeitraum von 7 Tagen blieben die Gesamtkeimzahlen annähernd konstant. Auch die Mikrobiotazusammensetzung unterschied sich zwischen Tag 7 und Tag 14 kaum voneinander, ausgenommen *Hafnia alvei*, welcher nur an Tag 14 auf der Fleischoberfläche mit einer geringen relativen Häufigkeit detektiert wurde.

#### flüchtige Stoffwechselprodukte

Insgesamt wurden Substanzen mit 13 verschiedenen *m/z*-Verhältnissen detektiert. Ausgewählte Ergebnisse der PTR-MS-Messungen sind in den Abbildungen 4.58 bis 4.66 dargestellt. Für Methanol, 2-Propanon und Propansäure konnten die Konzentrationsverläufe durch die Verwendung der nicht-linearen Regression an mathematische Gleichungen angepasst werden. Allerdings waren die Konzentrationsänderungen dieser Substanzen sehr klein und die gemessenen Werte der meisten Substanzen wiesen zusätzlich große Konfidenzintervalle auf.

Die Konzentrationen von Ethanol, Ethylacetat und 2-Ethylfuran nahmen über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich zu, wobei die Konzentrationszunahme von Ethylacetat am stärksten war. Allerdings konnten die Zunahmen durch unterschiedliche Regressionsgleichungen angepasst werden. Während der Konzentrationsverlauf von Ethanol durch ein logistisches Wachstum erklärbar war, wurde für den Konzentrationsverlauf von Ethylacetat ein exponentielles Wachstum abgeleitet. Für 2-Ethylfuran wurde eine beschränkte Konzentrationszunahme gefunden.

Die Konzentrationsänderung von Methylsulfanylmethan verlief kongruent zu den beiden vorherigen Versuchen (vgl. 4.7.1 und 4.7.2). In diesem Versuch jedoch wiesen die Konzentrationen von Proben 1 und 3 ähnliche Werte auf, die Werte von Probe 2 lagen deutlich unterhalb der anderen beiden Proben.

Das dynamische Verhalten von 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon war sehr ähnlich. Die Kopfraum-Volumenkonzentrationen stiegen bis Tag 9 bzw. 10 an und nahmen anschließend über den restlichen Versuchszeitraum ab. Dabei wurden für 2,3-Butandion deutlich höhere Konzentrationen im Vergleich zu 3-Hydroxy-2-butanon detektiert. Zudem wurden für diese Substanz kleinere Konfidenzintervalle berechnet.

Am Ende des Versuches war Ethylacetat in den höchsten Konzentrationen im Kopfraum der Proben vorhanden. Propansäure und 3-Hydroxy-2-butanon hingegen wiesen die geringsten Kopfraum-Volumenkonzentrationen auf.

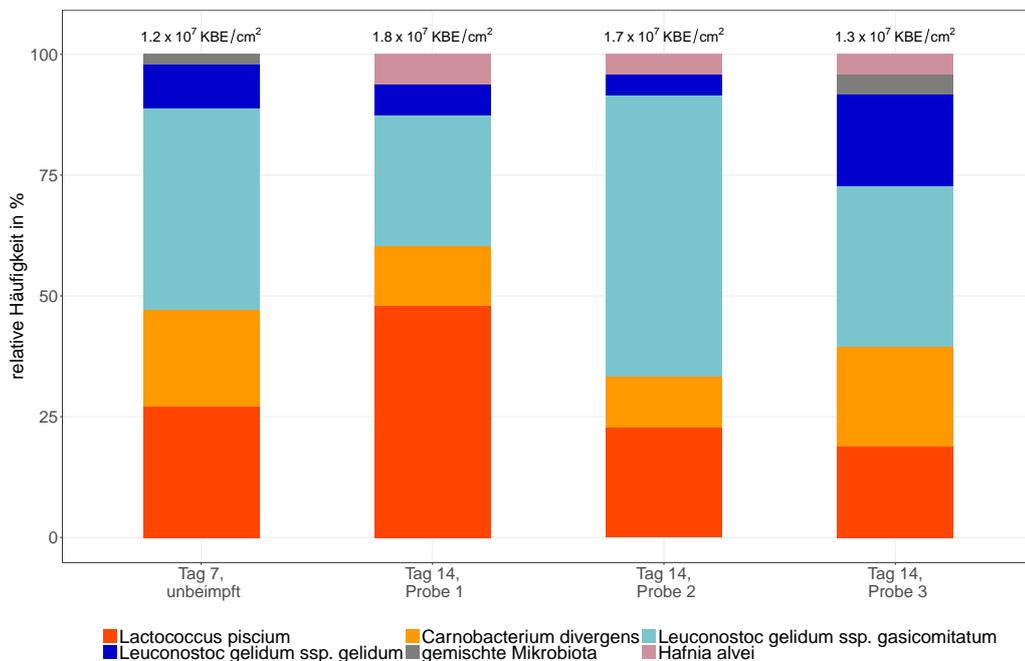


Abbildung 4.57: Relative Häufigkeiten und Gesamtkeimzahl der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase)

## 4.7 Spontanverderb von Rindfleisch

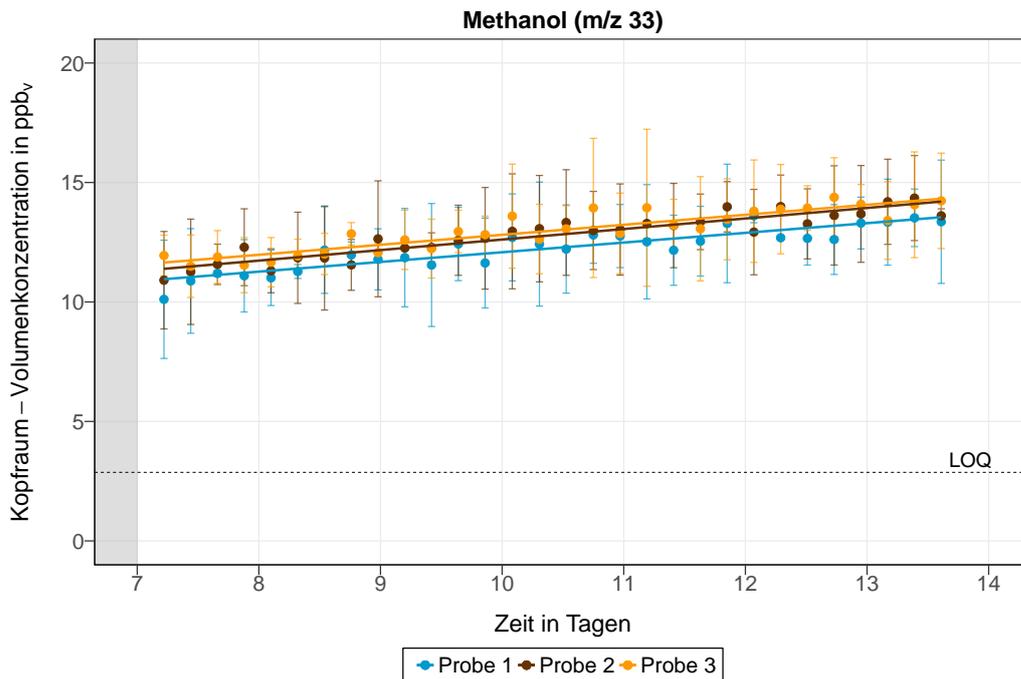


Abbildung 4.58: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methanol ( $m/z$  33) der bei 10 °C spontan verderbenden Rindfleischproben (späte Phase), LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 7, Probe 2: Fit-Fkt. 7, Probe 3: Fit-Fkt. 7 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

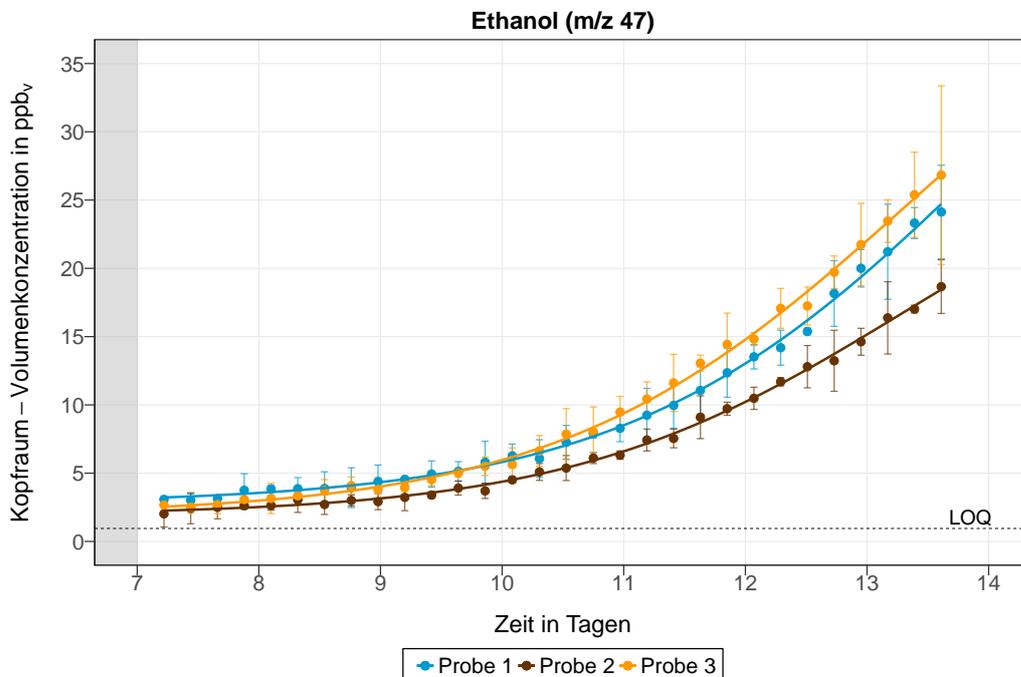


Abbildung 4.59: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethanol ( $m/z$  47) der bei 10 °C spontan verderbenden Rindfleischproben (späte Phase), LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 1, Probe 2: Fit-Fkt. 1, Probe 3: Fit-Fkt. 1 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

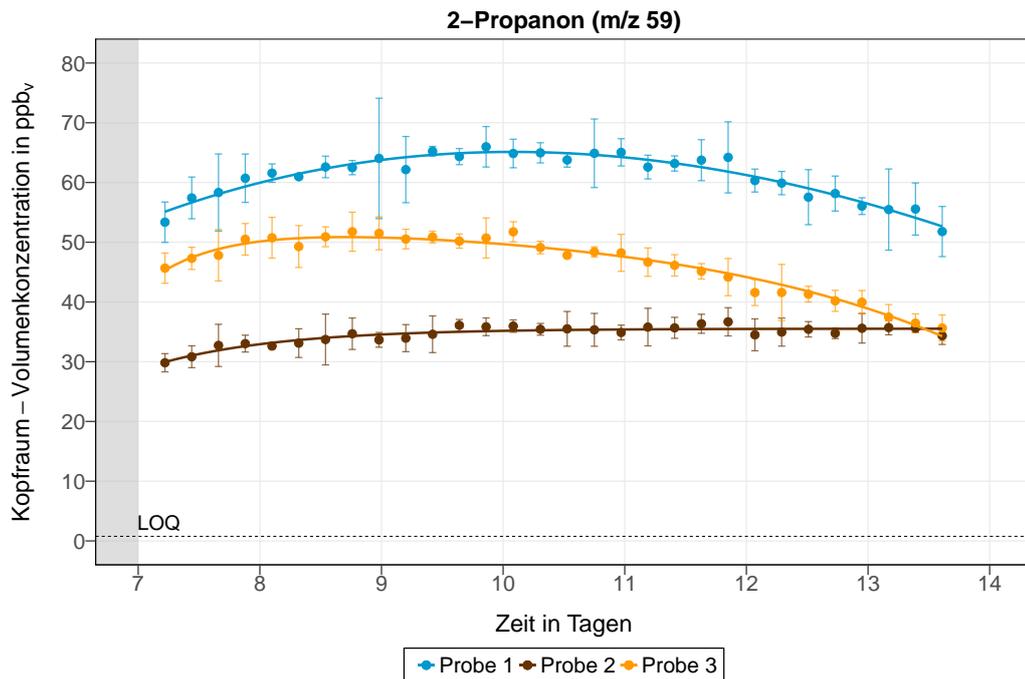


Abbildung 4.60: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Propanon ( $m/z$  59) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase), LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 11, Probe 2: Fit-Fkt. 4, Probe 3: Fit-Fkt. 10 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

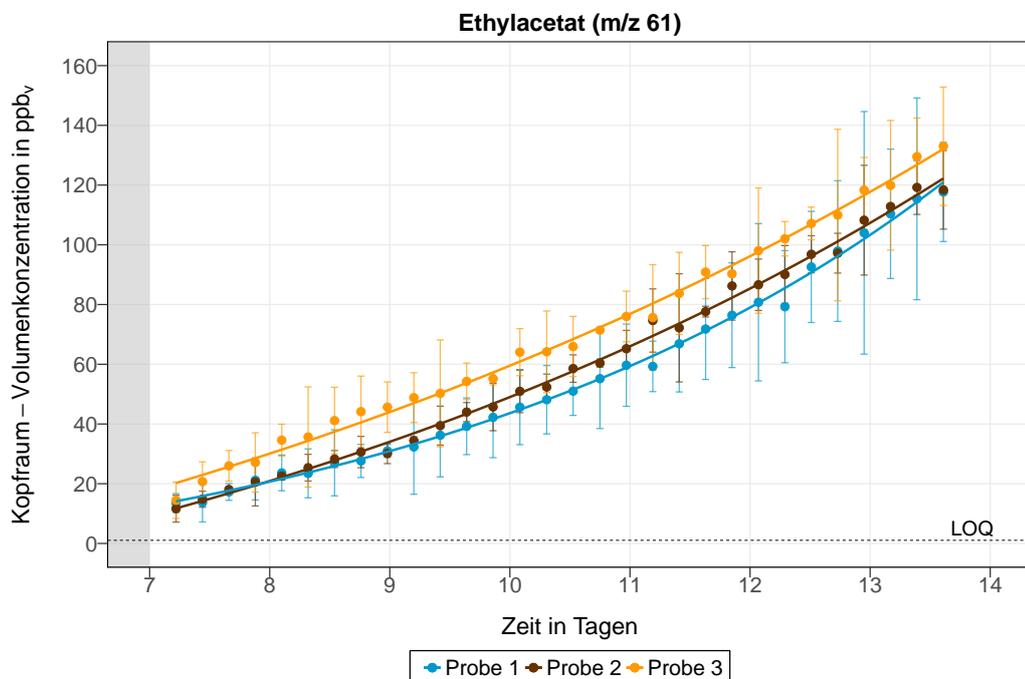


Abbildung 4.61: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Ethylacetat ( $m/z$  61) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase), LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 9, Probe 2: Fit-Fkt. 9, Probe 3: Fit-Fkt. 9 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

## 4.7 Spontanverderb von Rindfleisch

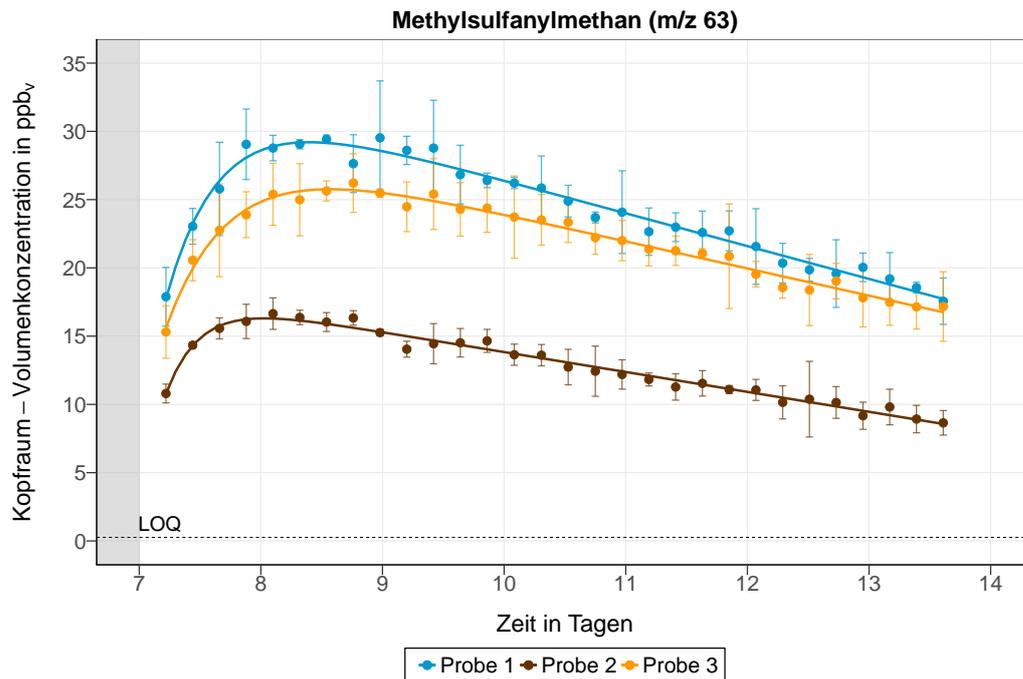


Abbildung 4.62: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Methylsulfanylmethan ( $m/z$  63) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase), LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 10, Probe 2: Fit-Fkt. 10, Probe 3: Fit-Fkt. 10 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

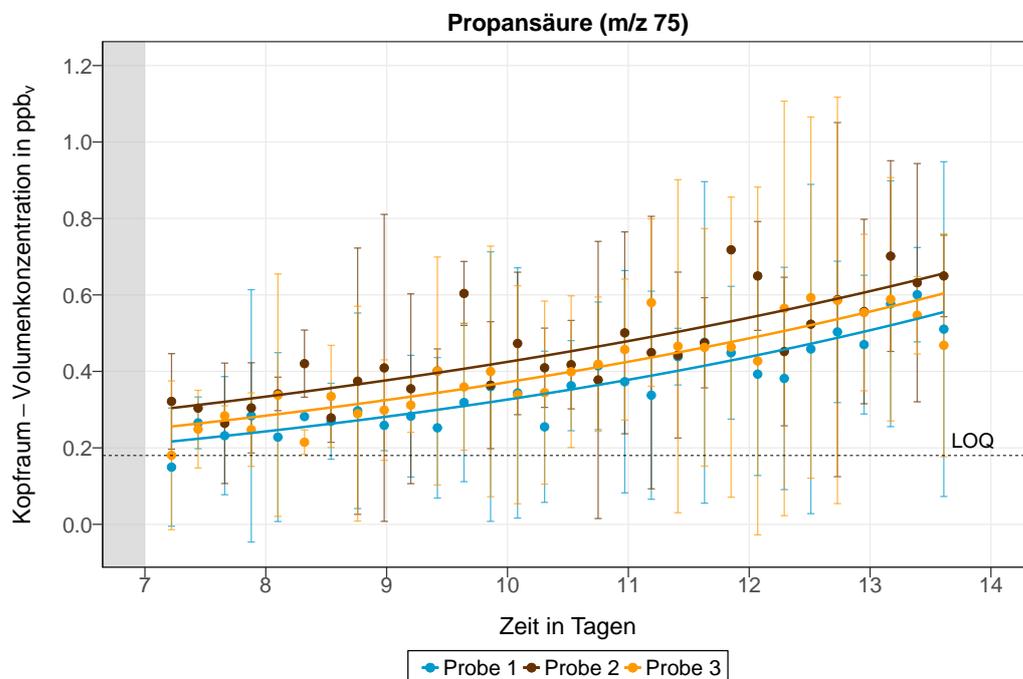


Abbildung 4.63: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von Propansäure ( $m/z$  75) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase), LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 9, Probe 2: Fit-Fkt. 9, Probe 3: Fit-Fkt. 9 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

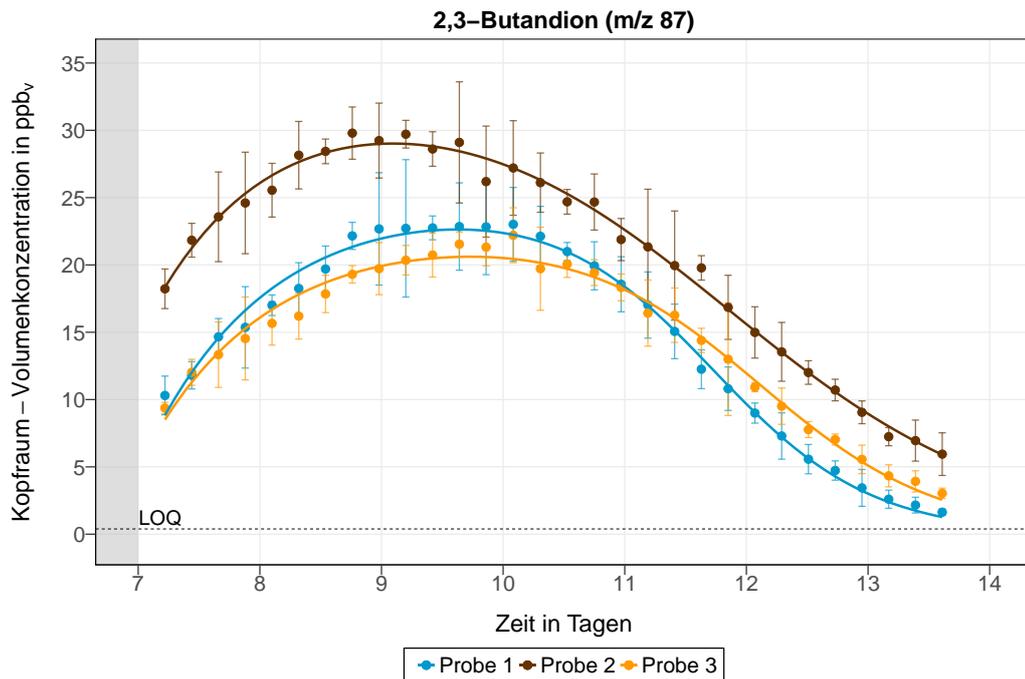


Abbildung 4.64: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2,3-Butandion ( $m/z$  87) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase), LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 12, Probe 2: Fit-Fkt. 12, Probe 3: Fit-Fkt. 12 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

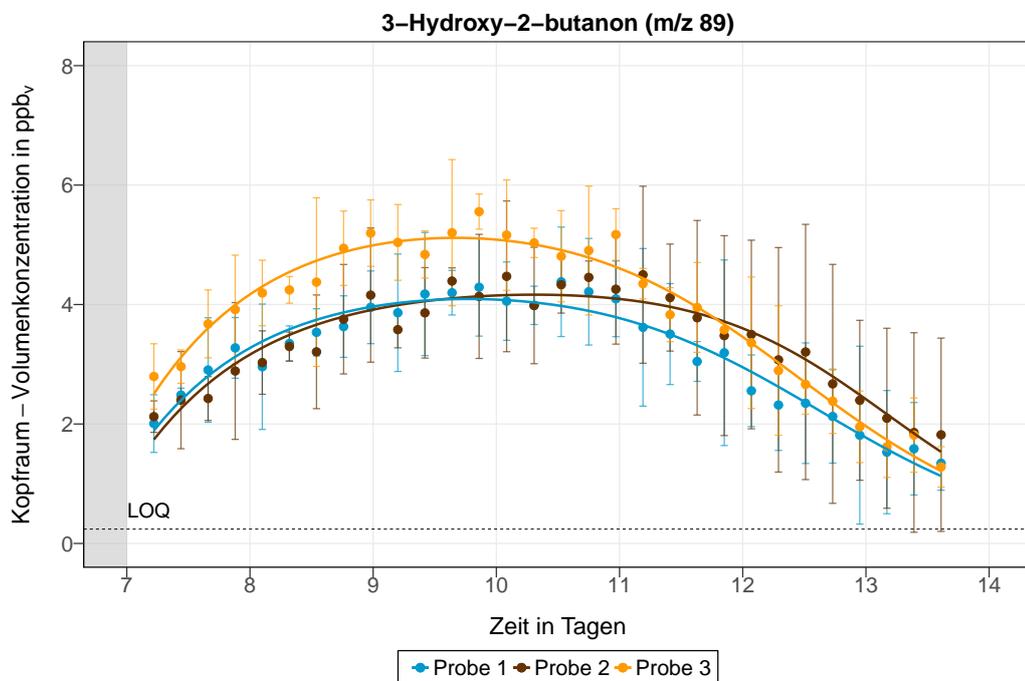


Abbildung 4.65: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 3-Hydroxy-2-butanon ( $m/z$  89) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase), LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 12, Probe 2: Fit-Fkt. 12, Probe 3: Fit-Fkt. 12 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

## 4.7 Spontanverderb von Rindfleisch

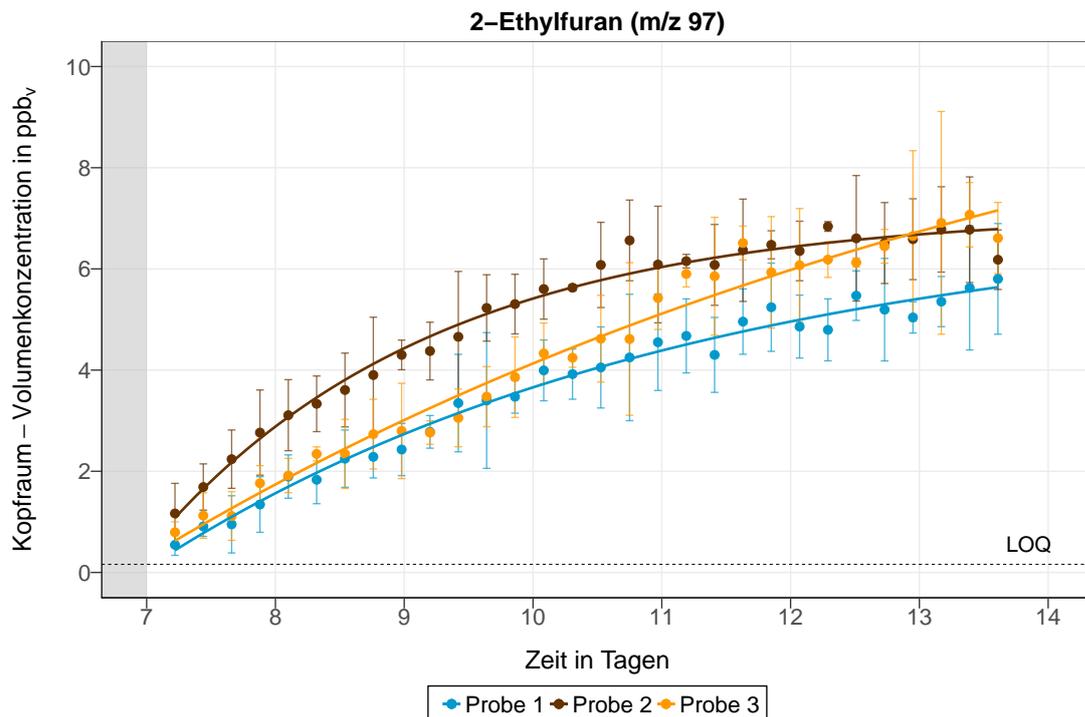


Abbildung 4.66: Zeitlicher Verlauf der Kopfraum-Volumenkonzentration von 2-Ethylfuran ( $m/z$  97) der bei 10 °C spontan verdorbenen Rindfleischproben (späte Phase), LOQ: Quantifizierungslimit (limit of quantification), Probe 1: Fit-Fkt. 4, Probe 2: Fit-Fkt. 4, Probe 3: Fit-Fkt. 4 (siehe Tabelle 3.5), grau hinterlegter Bereich: Zeitraum, in dem der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreicht wurde

### 4.7.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Spontanverderb von Rindfleisch

Tabelle 4.12: Ergebnisse der nicht-linearen Regression von spontan verdorbenem Rindfleisch bei 4 °C mit b: Stauchung/Streckung der e-Funktion (Wachstumsgeschwindigkeit), d: Steigung der Geraden, f: Stauchung/Streckung des Polynoms in Richtung der y-Achse, u: Maximum des Zuwachses, w: Zeitkonstante, y: zeitliche Verschiebung/Wendepunkt des Wachstums, z: y-Achsenabschnitt

m/z	Probe 1	Probe 2	Probe 3
33	$f(t) = z + d \cdot t$ $z = 3,5$ [3,34;3,65] $d = 0,08$ [0,06;0,1]	$f(t) = z + d \cdot t$ $z = 3,5$ [3,35;3,63] $d = 0,08$ [0,07;0,1]	$f(t) = z + d \cdot t$ $z = 3,55$ [3,41;3,7] $d = 0,1$ [0,08;0,12]
59	$f(t) = b \cdot e^{w \cdot t}$ $b = 6,29$ [6,17;6,41] $w = 0,07$ [0,07;0,07]	$f(t) = z + b \cdot e^{w \cdot t}$ $z = 5,84$ [4,72;6,62] $b = 1,92$ [1,31;2,87] $w = 0,12$ [0,88;1,04]	$f(t) = b \cdot e^{w \cdot t}$ $b = 5,7$ [5,59;5,82] $w = 0,08$ [0,08;0,09]
61	$f(t) = b_1 \cdot e^{-w_1 \cdot t} + b_2 \cdot e^{w_2 \cdot t}$ $b_1 = 4,77$ [3,45;6,16] $w_1 = 0,29$ [0,13;0,58] $b_2 = 2,33$ [0,58;3,69] $w_2 = 0,07$ [0,03;0,16]	$f(t) = b \cdot e^{-w_1 \cdot t} + e^{w_2 \cdot t}$ $b = 3,41$ [2,98;3,87] $w_1 = 0,21$ [0,17;0,27] $w_2 = 0,13$ [0,12;0,13]	$f(t) = b \cdot e^{-w_1 \cdot t} + e^{w_2 \cdot t}$ $b = 3,06$ [2,66;3,49] $w_1 = 0,17$ [0,13;0,22] $w_2 = 0,12$ [0,11;0,13]

Tabelle 4.12: Fortsetzung

<i>m/z</i>	Probe 1	Probe 2	Probe 3
63	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ $u = 19,57$ [19,24;19,9] $b = 10,8$ [8,88;13,21] $w = 2,17$ [1,72;2,79] $d = 0,93$ [0,89;0,97]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ $u = 21,81$ [21,52;22,12] $b = 14,26$ [12,78;15,92] $w = 1,83$ [1,58;2,13] $d = 0,96$ [0,93;1]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ $u = 19,87$ [19,57;20,18] $b = 11,16$ [9,7;12,87] $w = 1,83$ [1,51;2,23] $d = 0,87$ [0,83;0,91]
87	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ $z = 0,21$ [0,17;0,25] $u = 11,33$ [8,29;20,6] $w = 0,78$ [0,67;0,89] $y = 10,19$ [9,55;11,1]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ $z = 0,21$ [0,15;0,27] $u = 14,22$ [11,97;18,15] $w = 0,81$ [0,73;0,9] $y = 10,12$ [9,48;10,87]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ $z = 0,31$ [0,27;0,35] $u = 13,58$ [10,27;22,08] $w = 0,91$ [0,8;1,03] $y = 11,87$ [11,1;12,89]

Tabelle 4.13: Ergebnisse der nicht-linearen Regression von spontan verdorbenem Rindfleisch bei 10 °C mit b: Stauchung/Streckung der e-Funktion (Wachstumsgeschwindigkeit), d: Steigung der Geraden, f: Stauchung/Streckung des Polynoms in Richtung der y-Achse, u: Maximum des Zuwachses, w: Zeitkonstante, y: zeitliche Verschiebung/Wendepunkt des Wachstums, z: y-Achsenabschnitt

<i>m/z</i>	Probe 1	Probe 2	Probe 3
33	$f(t) = z + d \cdot t$ $z = 4,6$ [4,35;4,85] $d = 0,09$ [0,03;0,15]	$f(t) = u - b \cdot e^{-t}$ $u = 5,96$ [5,8;6,1] $b = 1,91$ [1,28;2,54]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ $u = 6,41$ [6,04;12,4] $b = 1,94$ [1,41;7,51] $w = 0,37$ [0,04;0,78]
47	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ $z = 1,14$ [1,05;1,22] $u = 3,16$ [2,61;4,41] $w = 2,48$ [1,73;3,56] $y = 14,76$ [10,85;20,71]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ $z = 1,02$ [0,95;1,1] $u = 2,14$ [1,86;2,64] $w = 2,93$ [1,94;4,59] $y = 16,66$ [11,39;25,92]	$f(t) = z + b \cdot e^{w \cdot t}$ $z = 0,94$ [0,85;1,04] $b = 0,002$ [0,0004;0,005] $w = 1,11$ [0,93;1,31]
59	$f(t) = z + d \cdot t$ $z = 8,11$ [7,86;8,36] $d = 0,48$ [0,41;0,54]	$f(t) = z + d \cdot t$ $z = 10,79$ [10,47;11,12] $d = 0,96$ [0,88;1,04]	$f(t) = z + d \cdot t$ $z = 11,77$ [11,4;12,15] $d = 1,24$ [1,15;1,34]
61	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ $z = 4,12$ [3,56;4,59] $u = 15,62$ [11,85;34,98] $w = 1,26$ [0,8;1,81] $y = 7,45$ [5,72;10,05]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ $z = 3,23$ [1,3;1,81] $u = 16,2$ [6,55;10,86] $w = 1,49$ [1,06;2,04] $y = 8,27$ [6,33;10,94]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ $z = 3,13$ [1,17;1,81] $u = 24,97$ [9,71;18,96] $w = 1,12$ [0,82;1,47] $y = 6,55$ [5,38;8,11]
63	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ $u = 11,94$ [11,49;12,46] $b = 8,43$ [6,08;12,93] $w = 2,89$ [1,83;4,7] $d = 0,63$ [0,53;0,74]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ $u = 28,03$ [27,14;29,05] $b = 17,99$ [15,38;21,15] $w = 1,99$ [1,53;2,57] $d = 1,65$ [1,46;1,86]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t} - d \cdot t$ $u = 28,98$ [27,96;30,18] $b = 17,94$ [15,6;20,61] $w = 1,69$ [1,32;2,16] $d = 1,48$ [1,27;1,72]

## 4.7 Spontanverderb von Rindfleisch

Tabelle 4.13: Fortsetzung

m/z	Probe 1	Probe 2	Probe 3
87	$f(t) = \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 15,13 [13,71;17,15] w = 1,29 [1,16;1,43] y = 7,54 [7,03;8,15]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = -0,43 [-0,78;-0,16] u = 17,5 [13,81;27,24] w = 0,69 [0,56;0,83] y = 4,4 [4,07;4,82]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ u = 6,76 [6,11;7,71] w = 1,14 [1;1,3] y = 6,13 [5,59;6,79]
89	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 0,12 [0,06;0,17] u = 4,15 [3,55;5,27] w = 1,34 [1,12;1,6] y = 8,1 [7,11;9,3]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 0,28 [0,2;0,35] u = 3,64 [3,24;4,29] w = 1,46 [1,19;1,77] y = 8,01 [6,78;9,5]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 0,3 [0,21;0,37] u = 3,78 [2,86;7,43] w = 1,09 [0,79;1,43] y = 6,74 [5,72;8,21]

Tabelle 4.14: Ergebnisse der nicht-linearen Regression von spontan verdorbenem Rindfleisch bei 10 °C (späte Phase) mit b: Stauchung/Streckung der e-Funktion (Wachstumsgeschwindigkeit), d: Steigung der Geraden, f: Stauchung/Streckung des Polynoms in Richtung der y-Achse, u: Maximum des Zuwachses, w: Zeitkonstante, y: zeitliche Verschiebung/Wendepunkt des Wachstums, z: y-Achsenabschnitt

m/z	Probe 1	Probe 2	Probe 3
33	$f(t) = z + d \cdot t$ z = 8 [7,23;8,81] d = 0,41 [0,33;0,48]	$f(t) = z + d \cdot t$ z = 8,2 [7,44;8,97] d = 0,4 [0,37;0,51]	$f(t) = z + d \cdot t$ z = 8,63 [7,88;9,37] d = 0,42 [0,35;0,49]
47	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 2,74 [2,18;3,19] u = 49,95 [37,57;87,16] w = 0,69 [0,57;0,8] y = 9,6 [8,77;10,61]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 1,91 [1,54;2,21] u = 29,73 [24,62;39,88] w = 0,73 [0,63;0,83] y = 9,68 [8,79;10,66]	$f(t) = z + \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t + y}}$ z = 1,91 [1,23;2,45] u = 45,54 [36,85;64,88] w = 0,7 [0,59;0,81] y = 9,3 [8,35;10,36]
59	$f(t) = u - b \cdot e^{-w_1 \cdot (t-t_0)} - e^{w_2 \cdot (t-t_0)}$ u = 71,38 [69,62;74,31] b = 18,07 [16,13;20,1] w <sub>1</sub> = 0,63 [0,42;0,88] w <sub>2</sub> = 0,44 [0,42;0,47] t <sub>0</sub> = 7	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot (t-t_0)}$ u = 35,53 [35,24;35,86] b = 6,93 [5,75;8,28] w = 0,98 [0,73;1,3] t <sub>0</sub> = 7	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot (t-t_0)} - d \cdot (t - t_0)$ u = 77,39 [69,19;98,3] b = 33,29 [25,76;53,33] w = 0,43 [0,27;0,6] d = 6,04 [4,93;8,26] t <sub>0</sub> = 7
61	$f(t) = z + b \cdot e^{w \cdot t}$ z = -21,51 [-42,88;-7,47] b = 7,45 [3,55;16,07] w = 0,22 [0,17;0,27]	$f(t) = z + b \cdot e^{w \cdot t}$ z = -74,98 [-106,88;-53,1] b = 34,24 [21,87;55,41] w = 0,13 [0,1;0,15]	$f(t) = z + b \cdot e^{w \cdot t}$ z = -90,28 [-171,48;-49,78] b = 50,16 [25,04;112,35] w = 0,11 [0,07;0,15]
63	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot (t-t_0)} - d \cdot (t - t_0)$ u = 33,62 [32,96;34,33] b = 25,32 [22,93;28,05] w = 2,27 [1,96;2,63] d = 2,41 [2,26;2,56] t <sub>0</sub> = 7	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot (t-t_0)} - d \cdot (t - t_0)$ u = 18,21 [17,9;18,53] b = 15,47 [13,08;18,64] w = 3,54 [2,94;4,29] d = 1,46 [1,39;1,53] t <sub>0</sub> = 7	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot (t-t_0)} - d \cdot (t - t_0)$ u = 29,91 [29,23;30,67] b = 21,19 [19,35;23,27] w = 1,93 [1,64;2,26] d = 2 [1,84;2,15] t <sub>0</sub> = 7

Tabelle 4.14: Fortsetzung

m/z Probe 1	Probe 2	Probe 3
75 $f(t) = b \cdot e^{w \cdot t}$ b = 0,07 [0,05;0,11] w = 0,15 [0,12;0,18]	$f(t) = b \cdot e^{w \cdot t}$ b = 0,13 [0,08;0,17] w = 0,12 [0,09;0,15]	$f(t) = b \cdot e^{w \cdot t}$ b = 0,1 [0,07;0,14] w = 0,13 [0,1;0,17]
87 $f(t) = u - e^{-t+x} - \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t+y}}$ u = 25,09 [24,51;25,71] x = 10,01 [9,93;10,08] w = 1,53 [1,42;1,64] y = 17,91 [16,63;19,29]	$f(t) = u - e^{-t+x} - \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t+y}}$ u = 34,36 [33,1;35,83] x = 9,95 [9,84;10,06] w = 0,87 [0,8;0,94] y = 10,25 [9,38;11,17]	$f(t) = u - e^{-t+x} - \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t+y}}$ u = 22,63 [22,11;23,18] x = 9,86 [9,79;9,94] w = 1,36 [1,26;1,46] y = 16,42 [15,19;17,74]
89 $f(t) = u - e^{-t+x} - \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t+y}}$ u = 4,49 [4,29;4,72] x = 8,17 [8;8,32] w = 1,09 [0,91;1,29] y = 13,78 [11,49;16,32]	$f(t) = u - e^{-t+x} - \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t+y}}$ u = 4,37 [4,18;4,6] x = 8,19 [8;8,36] w = 1,36 [1,04;1,75] y = 17,87 [13,69;23,02]	$f(t) = u - e^{-t+x} - \frac{u}{1 + e^{-w \cdot t+y}}$ u = 5,65 [5,44;5,88] x = 8,36 [8,23;8,48] w = 1,1 [0,97;1,24] y = 13,65 [11,95;15,5]
97 $f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 7,09 [6,48;8,02] b = 37,07 [28,41;50,61] w = 0,24 [0,19;0,29]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 7,12 [6,88;7,39] b = 161,76 [108,48;247,22] w = 0,46 [0,4;0,52]	$f(t) = u - b \cdot e^{-w \cdot t}$ u = 12,27 [10,05;17,2] b = 29,51 [27,38;35,16] w = 0,13 [0,08;0,18]

#### 4.7.5 Diskussion

Unabhängig von der Temperatur wurde das Rindfleisch hauptsächlich von Milchsäurebakterien besiedelt. Es konnte jedoch keine detektierbare Substanz als möglicher Verderbsindikator identifiziert werden. Der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> korrelierte zwar bei beiden Lagertemperaturen mit dem beginnenden Konzentrationsanstieg von 2,3-Butandion, allerdings konnte kein Schwellenwert bestimmt werden, der den Qualitätszustand des Fleisches sicher wiedergab.

#### Wachstum

Trotz unterschiedlicher Temperaturen und Lagerdauer gehörten Milchsäurebakterien bei allen drei Versuchen zu den Hauptverderbern. Jedoch dominierte nicht immer die gleiche Spezies die Mikrobiota. Während bei 4 °C und 10 °C (frühe Phase) hauptsächlich *L. piscium* auf der Fleischoberfläche gefunden wurden, herrschten *Leuconostocs* bei 10 °C (späte Phase) trotz Anwesenheit von *L. piscium* vor. Somit war das Verderbspotential von *L. piscium* vom Stamm abhängig (Andreevskaya et al., 2015). Bei der Betrachtung der Gesamtkeimzahlen war besonders auffällig, dass die Gesamtkeimzahl beim 10 °C Versuch (späte Phase) annähernd konstant blieb. Dies bedeutete, dass sich die Mikroorganismen in dem Untersuchungszeitraum nicht mehr vermehrten (stationäre Phase), sondern nur noch Stoffwechsel betrieben.

##### **Bildung von flüchtigen Stoffwechselprodukten**

Die Konzentrationen von 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon nahmen beim späten Spontanverderb bei 10 °C zwischen Tag 10 und 14 kontinuierlich ab. Wie in der Literatur beschrieben (siehe Kapitel 2.2.2), gehören diese Substanzen zu den wichtigsten flüchtigen Stoffwechselprodukten von Milchsäurebakterien. Sie werden aus Pyruvat (Glucose) bzw. Inosin gebildet. Wenn Glucose/Inosin der limitierende Faktor ist, beginnen die Mikroorganismen ihren Stoffwechsel zu ändern und verwerten andere Substrate wie Aminosäuren (siehe Kapitel 2.2). Daher lässt die Konzentrationsabnahme vermuten, dass diese Substanzen aufgrund von Substratmangel (Glucose und/oder Inosin) nicht mehr gebildet wurden.

Werden die detektierten Substanzen im Hinblick auf die Verwendung als mögliche Verderbsindikatoren betrachtet, war keine der detektierten Substanzen geeignet. Eine Konzentrationsänderung von Ethanol und 3-Hydroxy-2-butanon wurde nur bei 10 °C beobachtet. Zudem nahmen die Konzentrationen über den gesamten Versuchszeitraum nur um etwa 2 - 3 ppb<sub>v</sub> zu, so dass im Bereich um den kritischen Grenzwert von 10<sup>7</sup> KBE/cm<sup>2</sup> die gemessenen Konzentrationen sehr nah am Quantifizierungslimit lagen. Zudem wurden für die einzelnen Messpunkte sehr große Konfidenzintervalle berechnet. Somit war die Festlegung eines Schwellenwertes, der den Qualitätszustand bestimmt, nicht möglich.

Nur für 2,3-Butandion wurde entsprechend der Ergebnisse der nicht-linearen Regression eine Korrelation mit dem mikrobiellen Wachstum beobachtet. Diese Substanz stieg in ihrer Konzentration, als die Keimzahlen eine Größe um den kritischen Grenzwert von 10<sup>7</sup> KBE/cm<sup>2</sup> erreichten. Somit war der beginnende Konzentrationsanstieg dieser Substanz ein Indiz für erste Qualitätsveränderungen des Fleisches.

Jedoch war wie bereits bei den Spontanversuchen mit Hähnchenfleisch (siehe 4.4.1 und 4.4.2) die Festlegung eines Schwellenwertes zur Bestimmung des Qualitätszustandes anhand der Konzentration von 2,3-Butandion nicht möglich. Zum einen war die Bildung und Freisetzung von 2,3-Butandion von der Temperatur abhängig. So wurden deutliche höhere Konzentrationen bei 10 °C im Vergleich zu 4 °C detektiert. Zum anderen unterschieden sich die Konzentrationen beim 10 °C-Versuch quantitativ innerhalb der Dreifachbestimmung, obwohl die Proben vergleichbare "finale" Keimzahlen aufwiesen. Weiterhin wäre aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften von 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon die Entwicklung eines Frischeindikators auf Basis von 2,3-Butandion nicht möglich, da mögliche Kreuzreaktionen zwischen 3-Hydroxy-2-butanon und dem Frischeindikator nicht ausgeschlossen werden können.

## 4.8 Sensorische Untersuchung bei Rindfleisch

In dieser Arbeit ist zu beachten, dass das Fleisch nicht wie bei einer klassischen sensorischen Untersuchung von 10 (frisches Fleisch) bis 0 (verdorbenes Fleisch) bewertet wurde, sondern von 0 bis 10. Dabei entsprach eine Bewertung von 0 einem visuell und orthonasalen frischen Fleisch, eine Bewertung von 10 stand für ein visuell und orthonasal verdorbenes Fleisch.

### 4.8.1 Sensorische Untersuchung bei 4 °C

Mikrobiologische Ergebnisse zur sensorischen Untersuchung von Schutzgas-verpacktem Rindfleisch bei 4 °C sind in den Abbildungen 4.67 und 4.68 zusammengefasst. Bei Versuchsreihe 1 wurde die initiale Keimzahl mit  $3,6 \times 10^3$  KBE/cm<sup>2</sup> bestimmt. Die Gesamtkeimzahl blieb bis Tag 6 konstant und wies anschließend ein Wachstum bis auf  $1,3 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> bis Tag 14 auf. Zwischen Tag 14 und Tag 21 war die Keimzahl annähernd konstant. An Tag 0 bei Versuchsreihe 2 war das Fleisch mit einer Gesamtkeimzahl von  $2,7 \times 10^2$  KBE/cm<sup>2</sup> kontaminiert. Bis Tag 6 erhöhte sich die Gesamtkeimzahl auf  $9,7 \times 10^4$  KBE/cm<sup>2</sup> und veränderte sich zwischen Tag 6 und 11 kaum. Erst nach 11 Tagen stieg die Keimzahl bis Tag 14 auf  $8,9 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> an. Sowohl für Versuchsreihe 1 als auch für Versuchsreihe 2 war das auf der Packung angegebene Haltbarkeitsdatum an Tag 7 erreicht. Der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> wurde jedoch erst nach Tag 14 überschritten.

Die initiale Mikroflora bei Versuchsreihe 1 war durch *C. divergens* dominiert. *C. divergens* konnte seine Dominanz in den nächsten Tagen nicht weiter halten und wurde nur noch an den Tagen 7, 8 und 21 identifiziert. An den Tagen 6, 8, 11 und 14 dominierte *Lc. gelidum ssp. gasicomitatum* die Mikroflora. *Lc. gelidum ssp. gelidum* wurde ab Tag 6 auf der Fleischoberfläche gefunden. Dieser Mikroorganismus konnte sich ab Tag 8 immer mehr gegen die anderen Mikroorganismen durchsetzen bis er an Tag 21 die Mikrobiota dominierte.

Bei Versuchsreihe 2 war an Tag 0 die Mikroflora aus *C. divergens* und *L. piscium* zu gleichen relativen Häufigkeiten zusammengesetzt. *L. piscium* konnte sich an den anderen Tagen nicht gegen andere Mikroorganismen durchsetzen. *C. divergens* dominierte weiterhin an den Tagen 6, 7 und 11 die Mikroflora. An Tag 14 wurde *Lc. gelidum ssp. gelidum* als vorherrschender Mikroorganismus identifiziert. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten konnte für Tag 21 keine sensorische Untersuchung durchgeführt werden.

## 4.8 Sensorische Untersuchung bei Rindfleisch

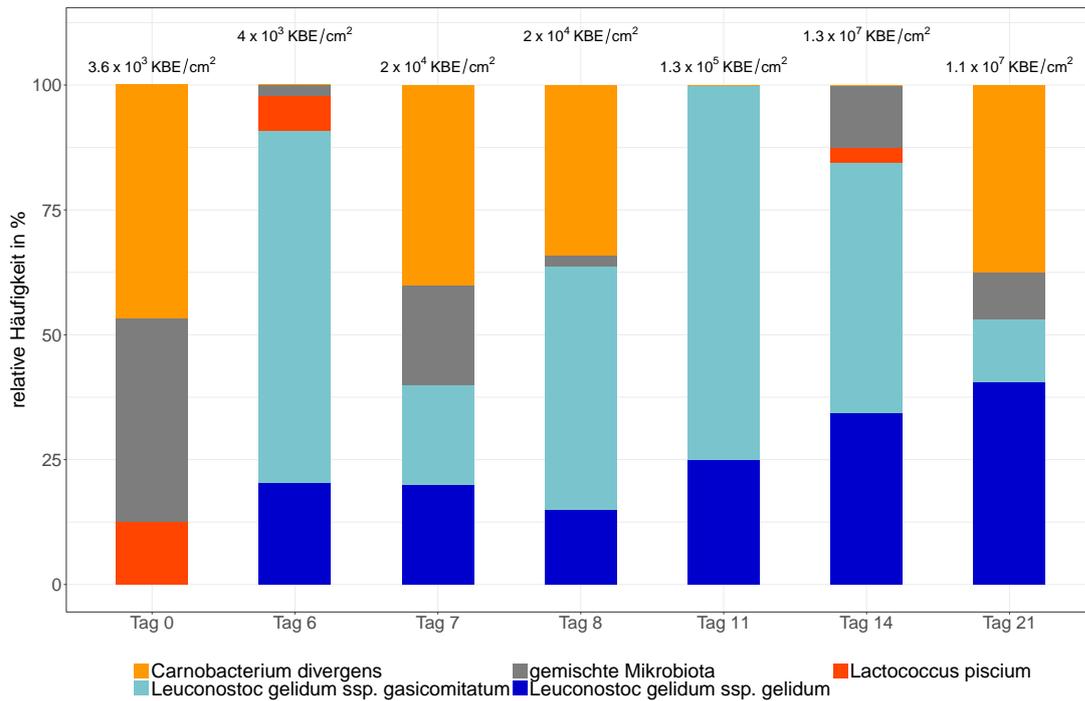


Abbildung 4.67: Mikrobiologische Ergebnisse zur sensorischen Untersuchung bei Rindfleisch (4 °C), Versuchssreihe 1

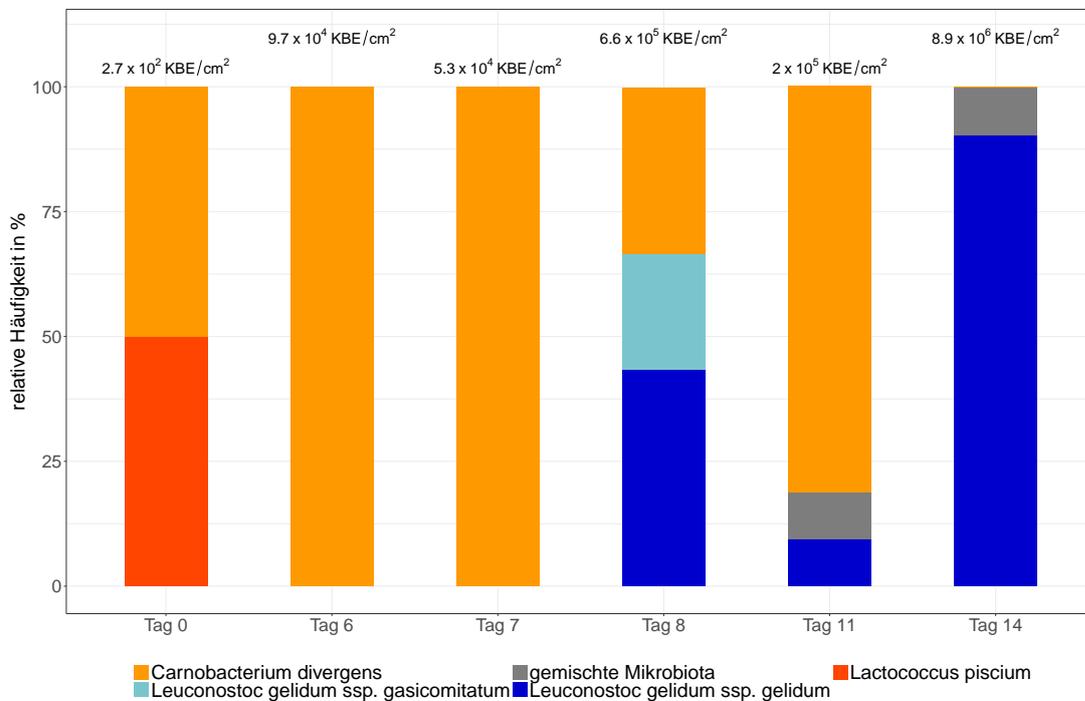


Abbildung 4.68: Mikrobiologische Ergebnisse zur sensorischen Untersuchung bei Rindfleisch (4 °C), Versuchssreihe 2

In Abbildung 4.69 sind die qualitativen Änderungen der Attribute grafisch dargestellt und entsprechend ihrer Ähnlichkeiten geclustert. Die horizontalen Linien des Dendrogramms geben die Ähnlichkeiten der Attribute wider. Je kürzer die Linien sind, desto näher sind die Abstände zwischen den verschiedenen Attributen und folglich desto mehr Ähnlichkeiten weisen die Attribute auf. Die Attribute konnten in insgesamt 4 Gruppen unterteilt werden:

- Gruppe 1: *Honig, vergoren, metallisch, fettig, stechend, schmierig, trocken*
- Gruppe 2: *Essig, käsig, Alkohol, schweflig, fischig, Saft*
- Gruppe 3: *Sauerrahm, Butter, orthonasaler Frischeeindruck, verdorben, Farbe und visueller Frischeeindruck*
- Gruppe 4: *fruchtig, Mango, Glanz*

Von allen Gruppen hatte Gruppe 3 den größten Einfluss auf die sensorische Bewertung, während sich die Attribute aus Gruppe 2, gefolgt von Gruppe 1, am wenigsten änderten. Der *visuelle* und *orthonasale Frischeeindruck* und *Glanz* des Fleisches nahmen mit steigender Lagerzeit ab, die Attribute *verdorben*, *buttrig* und *Sauerrahm* hingegen stiegen in ihrer sensorischen Bewertung.

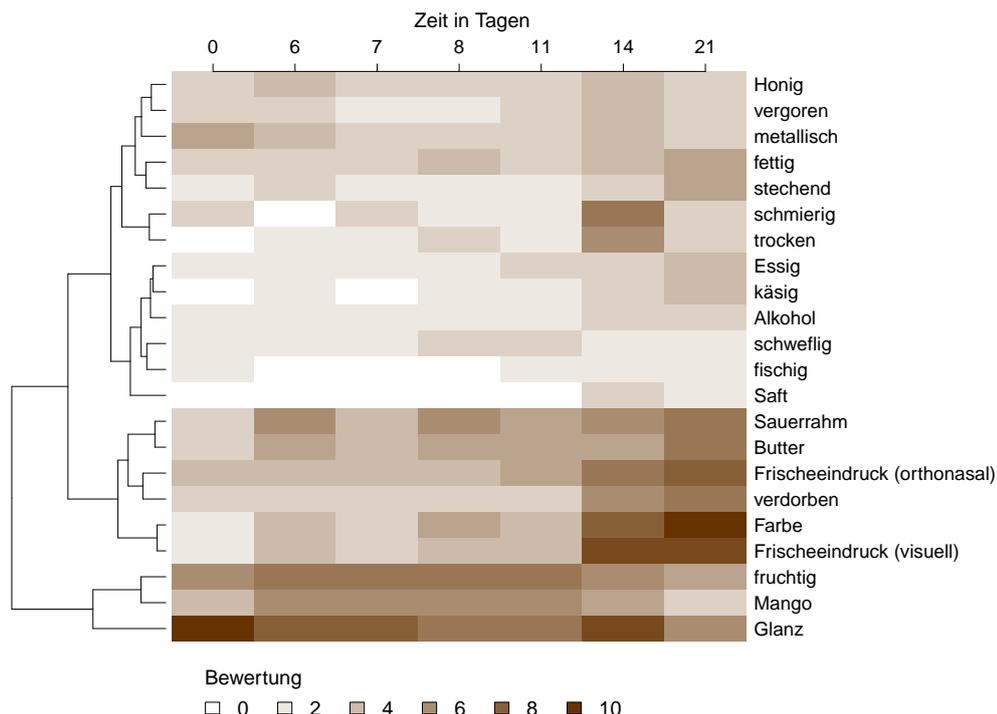


Abbildung 4.69: Grafische Darstellung der Attribute für Schutzgas-verpacktes Rindfleisch (30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub>) bei 4 °C

Die Ergebnisse zur sequentiellen logistischen Regression sind als rote horizontale Linien in Abbildung 4.70 ersichtlich. Zusätzlich wurde in Abbildung 4.70 die sensorische Bewertung des Panels als Boxplot dargestellt. Die sequentielle logistische Regression wurde verwendet, um die Aussagenschärfe für jedes einzelne Attribut zur Bestimmung des Qualitätszustandes von Fleisch zu bestimmen. In je mehr Qualitätsstufen (rote horizontale Linien) ein Attribut klassifiziert werden konnte, desto höher war seine Aussagenschärfe. Dabei wurde eine sensorische Bewertung von 5 als Grenzwert festgelegt, um den Einfluss von einzelnen Attributen auf den sensorischen Eindruck bestimmen zu können. Lag eine Qualitätsstufe bei einer sensorischen Bewertung  $< 5$ , war ein Attribut nicht wahrnehmbar, bei einer Bewertung  $> 5$  war das Attribut vorhanden und hatte somit einen Einfluss auf den sensorischen Eindruck von Fleisch.

Der *visuelle Frischeeindruck* konnte in 4 Stufen untergliedert werden. Die ersten beiden Stufen befanden sich unterhalb des Grenzwertes, die beiden letzten Stufen über dem Grenzwert. In den ersten 12 Tagen wurden keine Änderungen im *visuellen Frischeeindruck* festgestellt. Zwischen Tag 12 und 19 wurde das Fleisch als "stark verdorben" bewertet und ab Tag 19 als "sehr stark verdorben". Beim *orthonasalen Frischeeindruck* wurden 3 Qualitätsstufen gefunden. Während der ersten beiden Qualitätsstufen (Tag 0 bis 14) traten keine Änderungen in den geruchlichen Eigenschaften von frischem Fleisch auf. Erst ab Tag 14 erreichte die sensorische Bewertung einen Wert von 9 und das Fleisch galt orthonasal als "stark verdorben".

Für das Attribut *verdorben* wurden 2 Qualitätsstufen berechnet. Über einen Zeitraum von 19 Tagen war das Attribut so gut wie nicht vorhanden. Nach einer Lagerzeit von 19 Tagen stieg die sensorische Bewertung sprunghaft auf einen Wert von 9 an und wurde somit deutlich wahrgenommen. Das Attribut *Butter* war durch 4 Qualitätsstufen charakterisiert. Stufen 1 bis 3 befanden sich unterhalb des Grenzwertes, während Stufe 4 oberhalb des Grenzwertes zu finden war. Ein *buttriges* Aroma wurde zum ersten Mal an Tag 16 mit einer sensorischen Bewertung von 9 detektiert und blieb bis Tag 21 konstant. Für das Attribut *Sauerrahm* wurden 5 Qualitätsstufen ermittelt von jeweils einer Länge von 4 Tagen. Die ersten 3 Stufen waren unterhalb des Grenzwertes lokalisiert, während sich Stufen 4-5 oberhalb des Grenzwertes befanden. Somit wurde das Attribut *Sauerrahm* ab Stufe 4 (nach 12 Tagen) deutlich identifiziert.

Die Fleischfarbe wechselte während des Versuchszeitraums von einem "frischen Rot" hin zu einem "verdorbenen Braun". In den ersten 14 Tagen änderte sich die *Farbe* des Fleisches bereits in 3 Stufen, wobei die dritte Stufe auf dem Grenzwert lag. Erste Farbänderungen wurden jedoch erst nach 14 Tagen wahrgenommen, als der Grenzwert überschritten wurde. Das Attribut *trocken* wurde in 2 Qualitätsstufen untergliedert. In den ersten 20 Tagen war das Fleisch gekennzeichnet durch eine feuchte Oberfläche. Ab Tag 20 begann das Fleisch, visuell *trocken* zu werden.

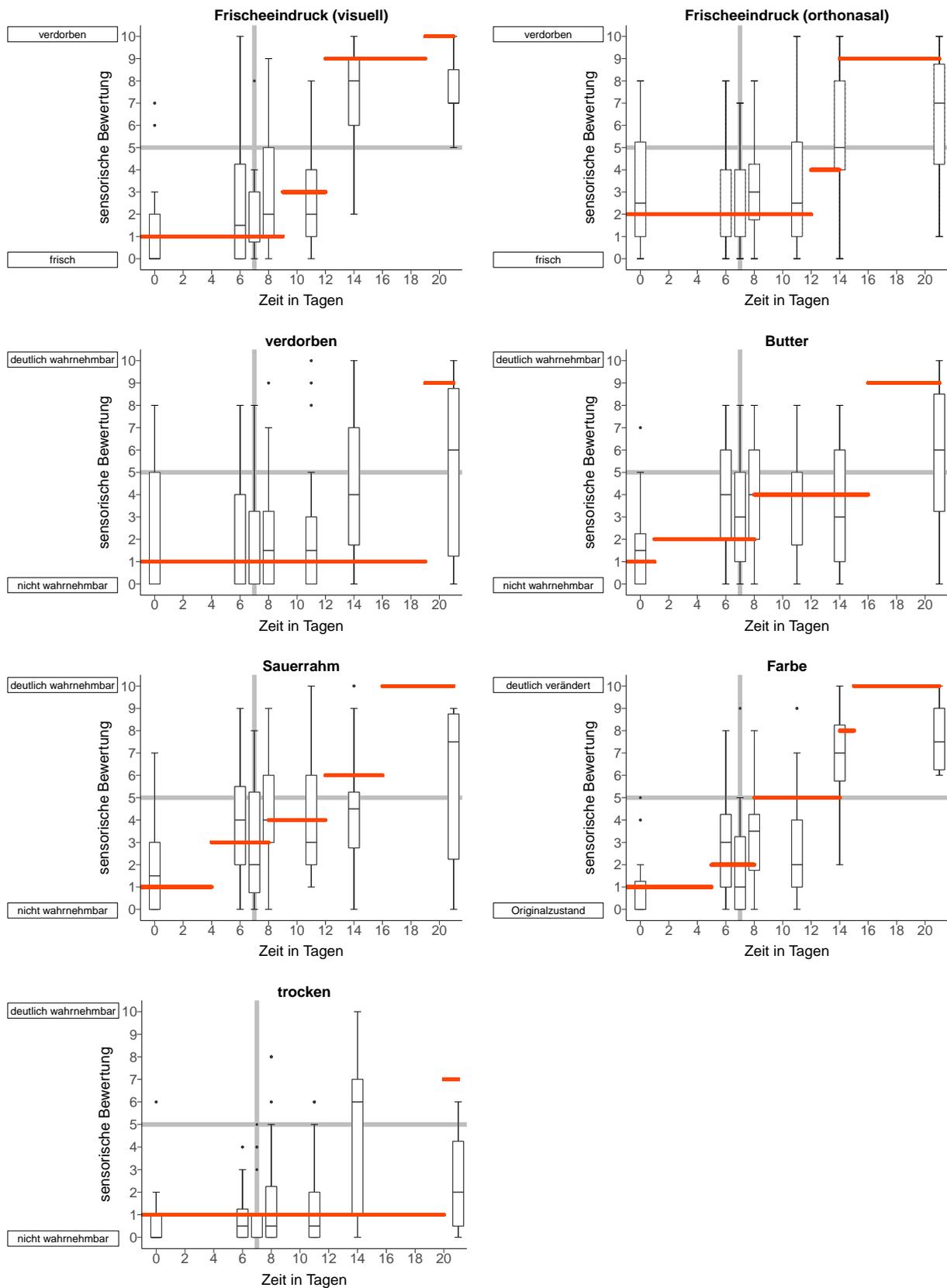


Abbildung 4.70: Ergebnisse der sequentiellen logistischen Regression (rote horizontale Linien) der wichtigsten Attribute von Schutzgas-verpacktem Rindfleisch (4 °C); Die horizontale graue Linie markiert den Schwellenwert zwischen "nicht wahrnehmbar" und "wahrnehmbar"; Die vertikale graue Linie kennzeichnet das vom Produzenten deklarierte Haltbarkeitsdatum

##### 4.8.2 Sensorische Untersuchung bei 10 °C

In den Abbildungen 4.71 und 4.72 sind die mikrobiologischen Ergebnisse von 2 Versuchsreihen dargestellt. In Versuchsreihe 1 hatte das Rindfleisch eine Anfangskeimzahl von  $3,6 \times 10^3$  KBE/cm<sup>2</sup>. Bis Tag 7 stiegen die Keimzahlen und erreichten einen Höchstwert von  $2 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>. Im weiteren Verlauf blieben die Keimzahlen bis Tag 14 annähernd konstant und nahmen anschließend bis Tag 21 wieder bis auf  $3,2 \times 10^5$  KBE/cm<sup>2</sup> ab. In Versuchsreihe 2 wurden an Tag 0 Keimzahlen von  $3 \times 10^2$  KBE/cm<sup>2</sup> bestimmt. In den nächsten 11 Tagen nahmen die Keimzahlen zu ( $4,5 \times 10^7$  KBE/cm<sup>2</sup>) und blieben bis zum Ende des Versuchszeitraumes weitestgehend gleich. Der kritische Grenzwert, ab dem ein Fleisch als verdorben gilt, wurde in Versuchsreihe 1 an Tag 7 und in Versuchsreihe 2 an Tag 11 überschritten.

Die initiale Mikroflora in Versuchsreihe 1 bestand hauptsächlich aus *C. divergens*. In den weiteren Tagen nahm die relative Häufigkeit von *C. divergens* ab und *Lc. gelidum ssp. gasicomitatum* setzte sich gegen die anderen Mikroorganismen durch. *Lc. gelidum ssp. gelidum* wurde ab Tag 7 mit einer geringen relativen Häufigkeit detektiert, die bis Tag 21 stieg. Ausnahme bildet Tag 11, an dem überwiegend *C. divergens* zusammen mit *L. piscium* dominierte. An diesem Tag war *Lc. gelidum ssp. gasicomitatum* nur mit einer relativen Häufigkeit präsent. An Tag 0 bei Versuchsreihe 2 war die Mikroflora durch *Lc. gelidum ssp. gelidum* geprägt. An den Tagen 7, 11 und 14 wurde *Lc. gelidum ssp. gelidum* (fast) komplett verdrängt und *Lc. gelidum ssp. gasicomitatum* dominierte die Mikroflora an Tag 14, zusammen mit *C. divergens* an den Tagen 7 und 11. *L. piscium* wurde nur an den Tagen 7 und 14 mit einer geringen relativen Häufigkeit gefunden. An Tag 21 wurden Milchsäurebakterien nur noch mit einer geringen Häufigkeit bestimmt. Die Mikroflora war geprägt durch Enterobakterien und *Serratia sp.*. Auch *Yersinia enterocolitica* wurde auf dem Fleisch gefunden.

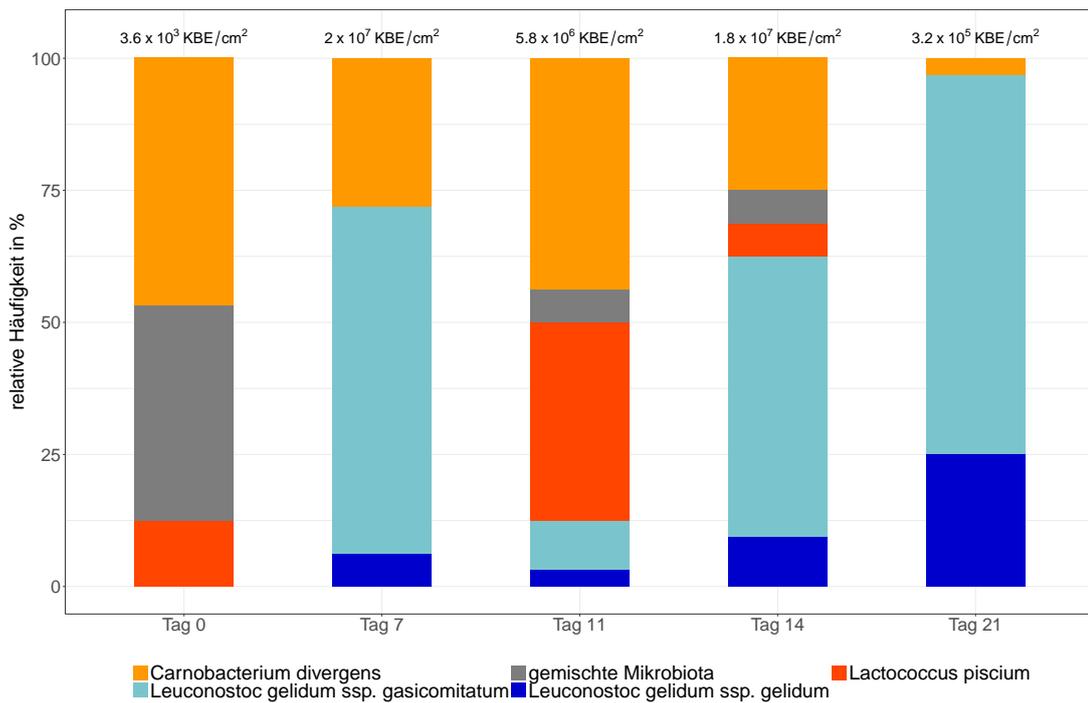


Abbildung 4.71: Mikrobiologische Ergebnisse zur sensorischen Untersuchung bei Rindfleisch (10 °C), Versuchssreihe 1

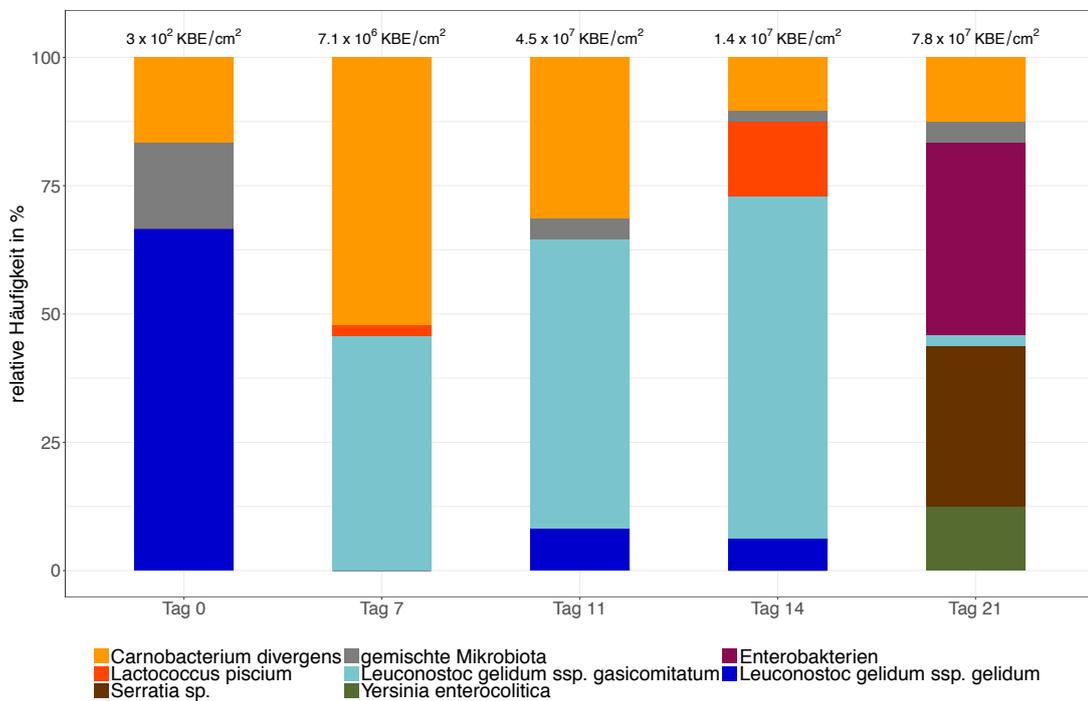


Abbildung 4.72: Mikrobiologische Ergebnisse zur sensorischen Untersuchung bei Rindfleisch (10 °C), Versuchssreihe 2

#### 4.8 Sensorische Untersuchung bei Rindfleisch

Abbildung 4.73 gibt einen ersten Überblick über die qualitativen Änderungen der Attribute. Die untersuchten Attribute wurden in insgesamt drei Gruppen unterteilt:

- Gruppe 1: *Sauerrahm, trocken, schmierig, Butter, fettig, vergoren, fruchtig, Mango*
- Gruppe 2: *Alkohol, Essig, Saft, stechend, käsig, fischig, schweflig, metallisch, Honig*
- Gruppe 3: *Farbe, visueller Frischeeindruck, orthonasaler Frischeeindruck, verdorben, Glanz*

Die Attribute aus Gruppe 3 änderten sich am stärksten in ihrer sensorischen Bewertung. Gruppe 2 zeigte keinen Einfluss auf den sensorischen Eindruck. Über den Versuchszeitraum wurde das Fleisch immer "matter", während der gesamte *Frischeindruck (visuell und orthonasal)* abnahm. Das Attribut *verdorben* nahm mit steigender Lagerzeit zu.

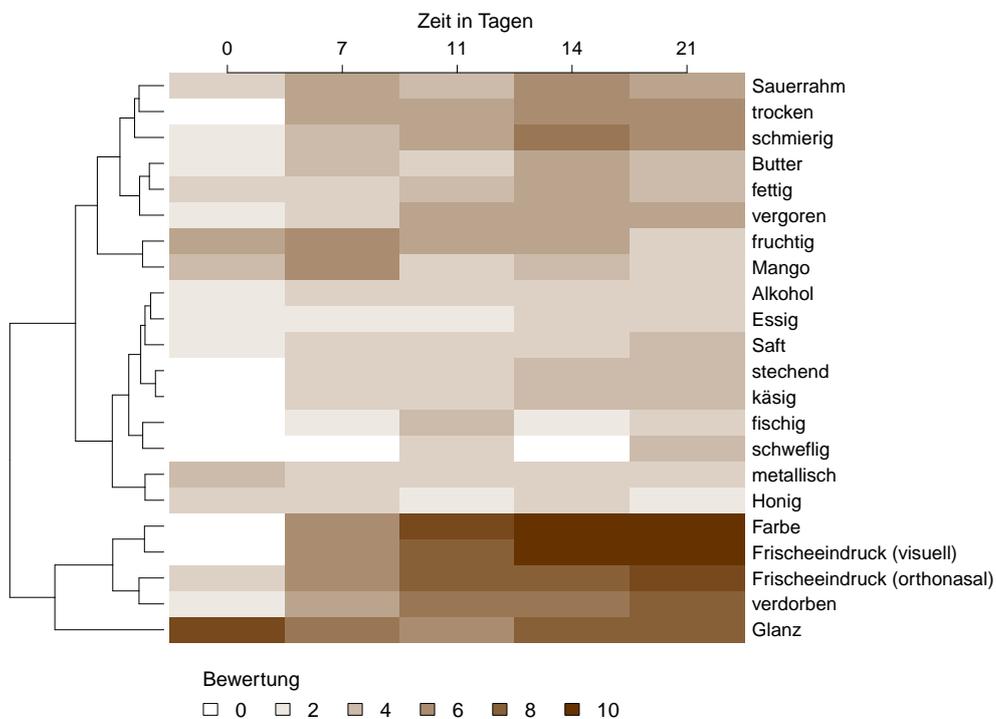


Abbildung 4.73: Grafische Darstellung der Attribute für Schutzgas-verpacktes Rindfleisch (30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub>) bei 10 °C

Die Ergebnisse der sequentiellen logistischen Regression (siehe 3.5.4) sind für die wichtigsten Attribute in Abbildung 4.74 dargestellt. Der *visuelle Frischeeindruck* konnte in insgesamt 5 Qualitätsstufen untergliedert werden. Die ersten beiden Stufen befanden sich unterhalb des Grenzwertes. Nach 6 Tagen wurde der festgelegte Grenzwert überschritten und das Fleisch galt als "nicht mehr frisch". Der *visuelle Frischeeindruck* nahm über zwei weitere Qualitätsstufen zu einem "verdorbenen Aussehen" hin ab. Für den *orthonasalen Frischeeindruck* wurden 3 Qualitätsstufen gefunden. Die ersten beiden Stufen lagen unterhalb des Grenzwertes und hatten eine Dauer von 8 Tagen, somit traten keine geruchlichen Veränderungen in dieser Zeit auf. Erst nach 8 Tagen wurde der Grenzwert überschritten, als beim Fleisch erste Fehlgerüche auftauchten.

Für das Attribut *verdorben* wurden 3 Qualitätsstufen bestimmt. Die ersten beiden Stufen waren unterhalb des Grenzwertes, während die letzte oberhalb des Grenzwertes zu finden war. Für die ersten 10 Tage wurde das Attribut *verdorben* von den Panelisten sensorisch nicht wahrgenommen. Nach 16 Tagen wurde der maximale Wert von 10 erreicht, was ein "sehr stark verdorbenes" Fleisch bedeutete. Die Wahrnehmung für das Attribut *Butter* stieg zwar im Beobachtungszeitraum in drei Stufen an, jedoch wurde der Grenzwert nicht überschritten. Somit gehörte das Attribut *Butter* nicht zum Aromaprofil von verdorbenem Fleisch. Das Attribut *vergoren* zeigte 4 Qualitätsstufen. Während der ersten zwei Stufen war das Attribut nicht präsent, während Stufe 3 auf dem Grenzwert lag. Erst nach 16 Tagen wurde der Grenzwert überschritten und das Fleisch bekam einen *vergorenen* Fehlgeruch. Für das Attribut *Sauerrahm* wurden 3 Qualitätsstufen berechnet. Qualitätsstufen 1 und 2 befanden sich unterhalb des Grenzwertes. Stufe 3 lag oberhalb des Grenzwertes und begann ab Tag 17. Ab diesem Tag gehörte das Attribut *Sauerrahm* zum sensorischen Profil des Fleisches.

Die *Fleischfarbe* konnte in 5 Stufen unterteilt werden. Die ersten beiden Stufen waren unterhalb des Grenzwertes, Stufen 3 - 5 lagen oberhalb des Grenzwertes. Bis Tag 5 wurden keine Änderungen in der Fleischfarbe festgestellt. Erst nach 5 Tagen veränderte sich die Fleischfarbe von einem "frischen Rot" hin zu einem "verdorbenen Braun". Dabei wurde ab Tag 12 die maximale sensorische Bewertung erreicht. Das Attribut *trocken* wurde in drei Stufen gegliedert. In den ersten 13 Tagen war das Attribut nicht vorhanden. Nach 13 Tagen wurde der Grenzwert überschritten und das Fleisch wurde als *trocken* bezeichnet.

## 4.8 Sensorische Untersuchung bei Rindfleisch

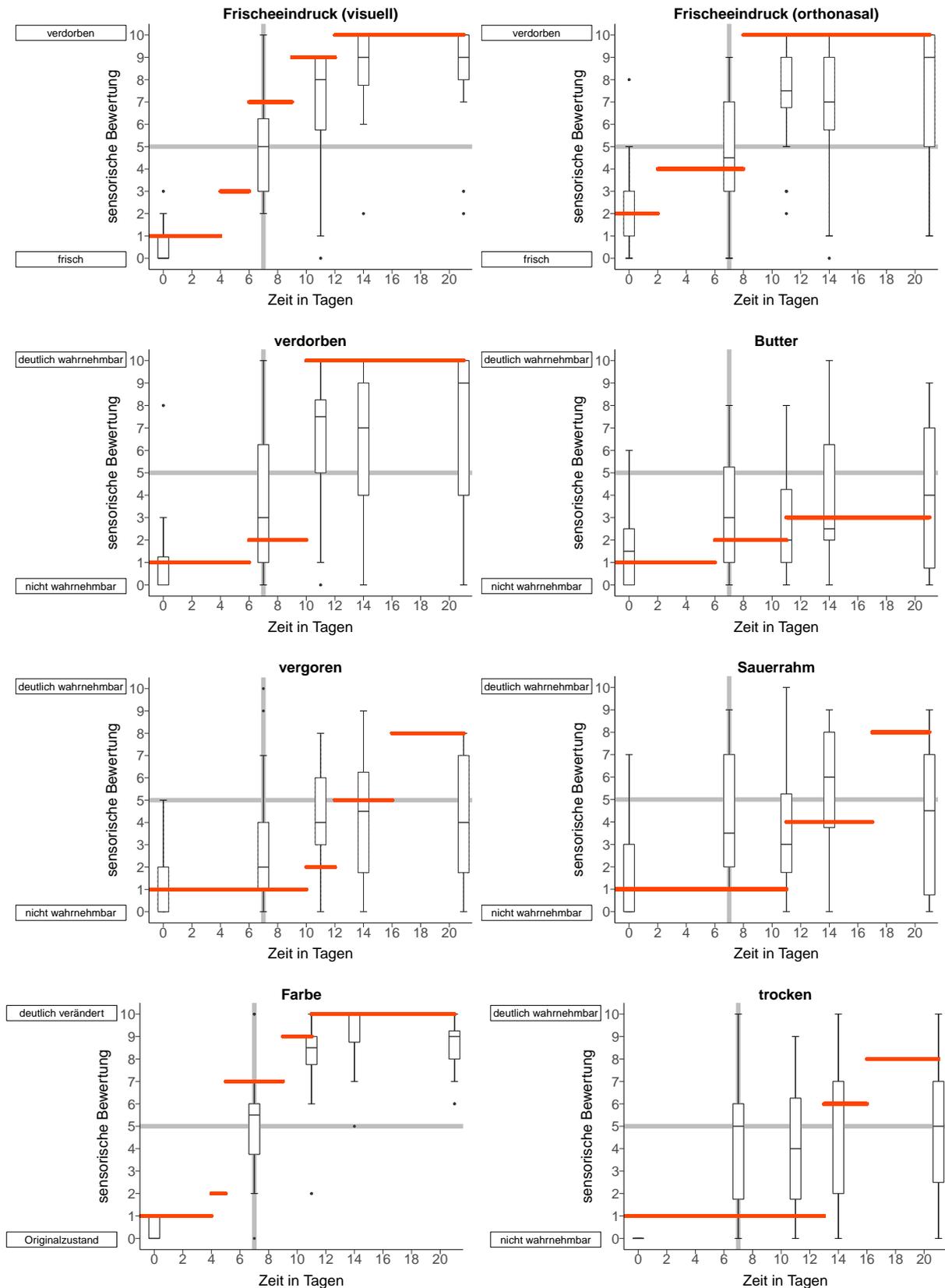


Abbildung 4.74: Ergebnisse der sequentiellen logistischen Regression (rote horizontale Linien) der wichtigsten Attribute von Schutzgas-verpacktem Rindfleisch (10 °C); Die horizontale graue Linie markiert den Schwellenwert zwischen "nicht wahrnehmbar" und "wahrnehmbar"; Die vertikale graue Linie kennzeichnet das vom Produzenten deklarierte Haltbarkeitsdatum

### 4.8.3 Diskussion

Nur wenige Attribute waren entscheidend für die Bestimmung des Qualitätszustandes von Fleisch. Vielmehr waren die Attribute *visueller Frischeeindruck* und *Sauerrahm* bei 4 °C sowie *visueller Frischeeindruck* und *Farbe* bei 10 °C der limitierende Faktor für die Haltbarkeitsbestimmung des Schutzgas-verpackten Rindfleisches, obwohl das untersuchte Fleisch aus mikrobieller Sicht noch verzehrbar war.

#### Wachstum

Für das in den sensorischen Untersuchungen verwendete Rindfleisch wird vom Produzenten eine Haltbarkeit von 8 Tagen ab Schlachtung angegeben, wenn es unter angemessenen Bedingungen gelagert wird. Einen Tag nach dem Schlachten und Verpacken wurde das Fleisch geliefert und bis zur sensorischen Untersuchung bei 4 und 10 °C gelagert. Somit hatte das Fleisch an Tag 0 der sensorischen Untersuchung bereits ein wirkliches Alter von 1 Tag und das Ende des Haltbarkeitsdatums wurde an Tag 7 der sensorischen Untersuchung erreicht. Der kritische Wert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> wurde bei beiden Versuchsreihen bei 4 °C erst nach 14 Tagen überschritten.

Bei den bei 10 °C gelagerten Proben unterschieden sich die Gesamtkeimzahlen zwischen den Versuchsreihen deutlich voneinander. Somit wurde der kritische Grenzwert an unterschiedlichen Tagen erreicht. Bei Versuchsreihe 1 wurde der Wert an Tag 7 überschritten, als das Haltbarkeitsdatum erreicht wurde. Bei Versuchsreihe 2 war das Fleisch mikrobiell erst an Tag 11 verdorben.

#### sensorische Bewertung

Den Ergebnissen der sequentiellen logistischen Regression entsprechend, waren die Attribute *orthonasaler* und *visueller Frischeeindruck* sowie *Farbe* und *Sauerrahm* am besten geeignet, um den Qualitätszustand der bei 4 °C gelagerten Rindfleischproben zu bestimmen. Andere Attribute wie *Mango*, *fruchtig*, *fettig*, *käsig/schweißig* und *fischig* hatten keinen Einfluss auf die sensorische Bewertung des Qualitätszustandes von Rindfleisch. Erste Anzeichen für den beginnenden Verderb traten bereits ab Tag 12 auf. Zu diesem Zeitpunkt waren deutliche Veränderungen in den Attributen *visueller Frischeeindruck* und *Sauerrahm* feststellbar. Veränderungen im *orthonasalen Frischeeindruck* wurden ab Tag 14 wahrgenommen, als auch der kritische Wert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> überschritten wurde. Das Fleisch wurde jedoch erst ab Tag 19 als "sensorisch verdorben" bezeichnet. Auch die sensorische Bewertung der *Fleischfarbe* korrelierte gut mit dem Erreichen des kritischen Grenzwertes für die Gesamtkeimzahl. Genau wie beim *orthonasalen Frischeeindruck* wurden deutliche Änderungen in der Fleischfarbe ab Tag 14 festgestellt. Dies bedeutete, dass Änderungen im *visuellen Frischeeindruck* beim Schutzgas-verpackten Rindfleisch die ersten Anzeichen dafür waren, dass das Fleisch verdirbt. Das Attribut *Butter*

wurde erst ab Tag 16 bemerkt, als die Mikroorganismen nicht mehr wuchsen und nur noch Stoffwechsel betrieben.

Die Ergebnisse der sequentiellen logistischen Regression zeigten, dass die Attribute *visueller* und *orthonasaler Frischeeindruck* sowie *Farbe* den größten Einfluss auf die sensorische Bewertung bei einer Lagerung bei 10 °C hatten. Erste Reduzierungen in der Fleischqualität wurden an Tag 5 durch das Attribut *Farbe* festgestellt. Änderungen im *visuellen Frischeeindruck* erfolgten einen Tag später, an Tag 6. Somit wurden diese sensorischen Veränderungen bereits vor Erreichen des kritischen Grenzwertes von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> wahrgenommen. Erste Fehlgerüche traten nach 8 Tagen auf. Als geruchlich *verdorben* wurde das Fleisch jedoch erst ab Tag 10 bezeichnet. Die Attribute *vergoren*, *Sauerrahm* und *trocken* waren erst von sensorischer Bedeutung, als das Haltbarkeitsdatum und die kritische Keimzahl bereits seit Tagen überschritten waren. Zusammengefasst hätte das Fleisch bei einer Lagerung von 10 °C aus mikrobiologischer Sicht eine Haltbarkeit von mindestens 8 Tage ab Schlachtung, jedoch waren die beiden Attribute *Farbe* und *visueller Frischeeindruck* die limitierenden Faktoren, wodurch die Haltbarkeit auf 6 Tage verkürzt werden müsste.

Werden die beiden sensorischen Untersuchungen (4 und 10°C) miteinander verglichen, erkennt man erwartungsgemäß, dass das bei 10 °C gelagerte Fleisch sowohl mikrobiell als auch sensorisch schneller verdorben war als Fleisch bei einer Lagertemperatur von 4 °C. Während bei 4 °C die ersten Anzeichen des Verderbs durch den *visuellen Frischeeindruck* gegeben waren, überschritt das Attribut *Farbe* bei einer Lagertemperatur von 10 °C als erstes Attribut den Grenzwert. Besonders auffällig war, dass bei 10 °C das Attribut *Butter* innerhalb des Versuchszeitraumes den Grenzwert nicht erreichte, bei 4 °C der Grenzwert jedoch ab Tag 16 überschritten wurde.

## 4.9 Schlussfolgerungen für die Verwendung von VOCs als mögliche Verderbsmarker und die Anwendung von “Frischeindikatoren” in Schutzgasverpackungen

Im Allgemeinen ist der Einsatz von intelligenten Systemen wie Frischeindikatoren eine sehr gute Idee, da sie zur Verbesserung der Qualität und Sicherheit von Lebensmitteln beitragen und die Echtzeitbestimmung des Fleischzustandes deutlich sicherer sein könnte als das angegebene Haltbarkeitsdatum. Derzeit gibt es jedoch kaum Beispiele auf dem Markt (Gründe siehe 2.6.5). Um Frischeindikatoren auf Basis von gebildeten und freigesetzten flüchtigen Verbindungen erfolgreich entwickeln zu können, müssen folgende Voraussetzungen gegeben sein, welche in Form von Hypothesen in dieser Arbeit überprüft wurden:

- Trotz natürlicher Schwankungen in der Fleischqualität ist die Detektion von einheitlichen Metabolitspektren möglich
- Die detektierten Metabolitspektren sind eindeutig, um das Ende der Haltbarkeit zu bestimmen
- Das Metabolitspektrum ist im Wesentlichen unabhängig von der Temperatur

Diese Hypothesen wurden jedoch in dieser Arbeit widerlegt. Somit konnten in dieser Arbeit keine Substanzen identifiziert werden, die als Basis für die Entwicklung von Frischeindikatoren dienen könnten. Einzelne Substanzen korrelierten zwar mit dem mikrobiellen Wachstum, da ihre Konzentration zu dem Zeitraum anstiegen, als die Gesamtkeimzahlen den kritischen Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> erreichten. Allerdings konnte kein Schwellenwert von einzelnen Substanzen abgeleitet werden, der das Haltbarkeitsende widerspiegelte.

Die Bildung und Freisetzung von flüchtigen Substanzen war von vielen Faktoren abhängig. Dazu zählten die Lagertemperatur und -dauer der Versuche, die initiale Mikrobiotazusammensetzung und die Fleischart. Zudem wiesen die gemessenen Werte in vielen Fällen hohe Konfidenzintervalle auf, so dass keine genaue Aussage über die tatsächliche Konzentration getroffen werden konnte.

Zusätzlich legten die Ergebnisse der sensorischen Untersuchungen dar, dass einzelne Attribute wie *Butter*, welche spezifischen VOCs zugeordnet werden können, nicht entscheidend für die Bestimmung des Qualitätszustandes von Fleisch waren. Vielmehr waren der *visuelle* und *orthonasale Gesamteindruck* und zusätzlich das Attribut *Farbe* bei Rindfleisch die kritischen Faktoren für die sensorische Akzeptanz des Fleisches.

Schlussfolgernd erscheint die Entwicklung von Frischeindikatoren für Schutzgas-verpacktes Frischfleisch auf Basis der Detektion von (einzelnen) flüchtigen Substanzen nicht möglich. Demnach sind wesentliche Änderungen der gegenwärtig diskutierten Strategien für Frischeindikatoren notwendig.



## 5 Zusammenfassung

Fleisch ist ein leicht verderbliches Lebensmittel, auf dessen Oberfläche eine Vielzahl von Mikroorganismen wachsen kann. Um die Haltbarkeit zu verlängern, wird Fleisch oft unter Schutzgasatmosphäre verpackt und unter Angabe einer empfohlenen Lagertemperatur mit einem Haltbarkeitsdatum versehen. Das Haltbarkeitsdatum wird derzeit durch konventionelle mikrobiologische und sensorische Analysen anhand von Stichproben ermittelt. Aufgrund der in natürlicherweise vorkommenden Variabilitäten des Fleisches lässt sich das Haltbarkeitsdatum mit diesen Methoden jedoch nur mit einer relativ großen Unsicherheit bestimmen. Daher wurden in den letzten Jahren nach Alternativen gesucht, den Verderbszustand für jedes individuelle Produkt genauer bestimmen zu können. Eine Alternative sind Frischeindikatoren (FFI). FFIs sollen mit flüchtigen organischen Verbindungen (VOCs) reagieren, welche sich während des Verderbsprozesses bilden und in den Kopfraum der Verpackung freigesetzt werden. Ein durch die Reaktion bedingter Farbumschlag soll dem Verbraucher den Qualitätszustand des Lebensmittels mitteilen. Jedoch gibt es bislang kaum Beispiele auf dem Markt.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, möglichst viele flüchtige Verbindungen zu identifizieren und quantifizieren, die während der Lagerung von Schutzgas-verpacktem (30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub>) Hähnchen- und Rindfleisch gebildet und in den Kopfraum freigesetzt werden. Zudem wurde überprüft, ob bzw. welche VOCs als mögliche Verderbsmarker zur Entwicklung von FFIs verwendet werden können. In einem ersten Schritt wurde Fleisch untersucht, welches mit Einzelstämmen von typischen Fleisch verderbenden Mikroorganismen beimpft wurde, um das metabolische Potential der beimpften Einzelstämme zu bestimmen. In einem zweiten Schritt wurde spontan verderbendes Fleisch gemessen. Zur Untersuchung der VOCs wurde eine in diesem Bereich neue Technik, die Protonentauschreaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS), eingesetzt. Hierfür wurde ein geeigneter Messaufbau entwickelt und evaluiert, der die Echtzeitbestimmung von VOCs ermöglicht. Zusätzlich erfolgten sensorische Analysen.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten, dass PTR-MS eine geeignete Technik ist, um die Freisetzung von VOCs während der Lagerung von MAP-Fleisch zu detektieren. Der in dieser Arbeit entwickelte Messaufbau erlaubte mit einer quasi-kontinuierlichen Messung der Kopfraum-Volumenkonzentrationen die Verfolgung der Freisetzungskinetiken von VOCs. Der Messaufbau wurde so entwickelt, dass er vielseitig einsetzbar war, indem beispielsweise eine Anpassung der Messintervalle, der Temperatur und der Schutzgaszusammensetzung an die zu untersuchende Probe erfolgen konnte. Die mit dem PTR-MS detektierten Substanzen wurden an repräsentativen

---

Proben mit Hilfe von HS-SPME GC-MS und anhand von Literaturrecherchen zu flüchtigen Substanzen in der Kopfraumatmosphäre identifiziert.

Für die Bestimmung des metabolischen Potentials von Einzelstämmen wurde Hähnchenfleisch jeweils mit *B. thermosphacta*, *C. divergens* und *Ps. fragi* beimpft. Rindfleisch wurde mit zwei verschiedenen Stämmen von *L. piscium* kontaminiert. Die Proben wurden bei 4 °C unter einer Schutzgasatmosphäre von 30 % CO<sub>2</sub> und 70 % O<sub>2</sub> über einen Zeitraum von 7 Tagen gelagert und die Kopfraumatmosphäre mit PTR-MS gemessen.

*B. thermosphacta* und *Ps. fragi* konnten sich bei Hähnchenfleisch gut gegen die Initialmikrobiota durchsetzen, jedoch bildete *Ps. fragi* weniger Stoffwechselprodukte als in einem Konsortium. *C. divergens* hingegen wurde von *B. thermosphacta* überwachsen. Bei Rindfleisch konnte sich nur einer der zwei beimpften Einzelstämme von *L. piscium* durchsetzen. Dies zeigte, dass es stammspezifische Unterschiede gibt. Somit konnte das metabolische Potential nur von *B. thermosphacta*, einem Stamm *L. piscium* und bedingt von *Ps. fragi* bestimmt werden. *B. thermosphacta* bildete vor allem 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon. Für *Ps. fragi* wurde lediglich ein Konzentrationsanstieg von 2-Propanon detektiert. Das Volatilom von *L. piscium* bestand im Wesentlichen aus 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon.

Für die Spontanversuche wurde frisches Hähnchen- und Rindfleisch bei 4 °C über einen Zeitraum von 12 bzw. 14 Tagen und bei 10 °C über einen Zeitraum von 7 Tagen gelagert und die Kopfraumatmosphäre mit PTR-MS gemessen. Zusätzlich wurde bei Rindfleisch die späte Phase des Verderbs bei 10 °C zwischen Tag 7 und 14 bestimmt. Hähnchenfleisch wurde bei 4 °C überwiegend durch *B. thermosphacta* verdorben, gefolgt von *C. divergens*. Auch bei 10 °C dominierte *B. thermosphacta* die Mikroflora, wobei die Mikrobiota heterogener als bei 4 °C war. Das flüchtige Metabolitspektrum bestand bei beiden Temperaturen aus 2-Propanon, Methylsulfanylmethan, 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon. Zusätzlich wurde bei 4 °C nach 7 Tagen Lagerung ein Konzentrationsanstieg von Ethanol beobachtet.

Auf Rindfleisch wuchsen bei 4 und 10 °C *L. piscium*, *C. divergens*, *Leuconostoc gelidum ssp. gelidum* und *Leuconostoc gelidum ssp. gasicomitatum*. Die relativen Häufigkeiten der einzelnen Mikroorganismen schwankten dabei innerhalb der untersuchten Proben. In der späten Phase des Verderbs bei 10 °C konnte zusätzlich *Hafnia alvei* hochwachsen. Bei 4 °C wurde nur von wenigen Substanzen eine Konzentrationsänderung beobachtet. Das flüchtige Metabolitspektrum war dabei durch 2-Propanon, 2,3-Butandion und Ethylacetat charakterisiert. Bei 10 °C stiegen Ethanol, Ethansäure, 2,3-Butandion und 3-Hydroxy-2-butanon in ihrer Konzentration. In der späten Verderbsphase bei 10 °C waren 2,3-Butandion, 3-Hydroxy-2-butanon, Ethanol, Ethylacetat und 2-Ethylfuran im Kopfraum der Proben präsent.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch keine flüchtigen Substanzen identifiziert werden, die als Verderbsindikatoren dienen können. Einige ausgewählte Substanzen korrelierten zwar mit dem mikrobiellen Wachstum, allerdings war die Festlegung eines Schwellenwertes, der das Haltbarkeitsende genau angibt, nicht möglich. Die Bildung und Freisetzung der VOCs war von vielen Faktoren abhängig wie Mikrobiotazusammensetzung, Gesamtkeimzahl, Fleischart, Temperatur und Lagerdauer.

Zudem zeigten die Ergebnisse der sensorischen Untersuchungen, dass sowohl bei Hähnchen- als auch bei Rindfleisch nur sehr wenige Attribute einen entscheidenden Einfluss auf den sensorischen Eindruck hatten. Spezifische Attribute wie *buttrig*, *verdorben*, *vergoren*, *säuerlich*, *Mango*, *Sauerrahm*, *fruchtig* und *fettig* waren nicht entscheidend für die sensorische Bewertung bzw. wurden erst wahrgenommen, als das vom Produzenten angegebene Haltbarkeitsdatum bzw. der kritische Grenzwert von  $10^7$  KBE/cm<sup>2</sup> bereits überschritten war. Vielmehr waren für die Bestimmung des Verderbszustands die Attribute *orthonasaler* und *visueller Frischeeindruck* sowie *Farbe* (bei Rindfleisch) entscheidend, da sie die Fleischqualität am besten widerspiegelten. Während bei Rindfleisch die ersten Anzeichen des Verderbs durch den *visuellen Frischeeindruck* gegeben waren (4 °C), wurde der Verderb bei Hähnchenfleisch durch den *orthonasalen Frischeeindruck* bestimmt. Das bei 10 °C gelagerte Rindfleisch wies eine erste Änderung des Qualitätszustandes durch das Attribut *Farbe* auf.



# Literatur

- Abschlussbericht IGF-Vorhaben 17803 N (2017). *Schlussbericht zu dem IGF-Vorhaben Identifikation und Wachstumsdynamik von fleischverderbenden Mikroorganismen sowie Nachweis ihrer flüchtigen Stoffwechselprodukte bei Frischfleisch in Schutzgasverpackungen*.
- Afzal, M. I., S. Delaunay, C. Paris, F. Borges, A.-M. Revol-Junelles und C. Cailliez-Grimal (2012). »Identification of metabolic pathways involved in the biosynthesis of flavor compound 3-methylbutanal from leucine catabolism by *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28«. In: *International Journal of Food Microbiology* 157(3), S. 332–339.
- Ahvenainen, R. und E. Hurme (1997). »Active and smart packaging for meeting consumer demands for quality and safety«. In: *Food Additives and Contaminants* 14(6-7), S. 753–763.
- Amoore, J. und E. Hautala (1983). »Odor as an aid to chemical safety: Odor thresholds compared with threshold limit values and volatiles for 214 industrial chemicals in air and water dilution«. In: *Journal of Applied Toxicology* 3(6), S. 272–290.
- Andreevskaya, M., P. Johansson, P. Laine, O.-P. Smolander, M. Sonck, R. Rahkila, E. Jääskeläinen, L. Paulin, P. Auvinen und J. Björkroth (2015). »Genome sequence and transcriptome analysis of meat-spoilage-associated lactic acid bacterium *Lactococcus piscium* MKFS47«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 81(11), S. 3800–3811.
- Arai, H., M. Hayashi, A. Kuroi, M. Ishii und Y. Igarashi (2005). »Transcriptional regulation of the flavohemoglobin gene for aerobic nitric oxide detoxification by the second nitric oxide-responsive regulator of *Pseudomonas aeruginosa*«. In: *Journal of Bacteriology* 187(12), S. 3960–3968.
- Argyri, A. A., A. Mallouchos, E. Z. Panagou und G.-J. E. Nychas (2015). »The dynamics of the HS/SPME–GC/MS as a tool to assess the spoilage of minced beef stored under different packaging and temperature conditions«. In: *International Journal of Food Microbiology* 193, S. 51–58.
- Artz, W. E., E. G. Perkins und L. Salvador-Henson (1993). »Characterization of the volatile decomposition products of oxidized methyl arachidonate«. In: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 70(4), S. 377–382.
- Axelsson, L. (2004). »Lactic acid bacteria: Classification and physiology«. In: *Lactic Acid Bacteria*. Herausgegeben von S. Salminen, A. von Wright und A. Ouwehand. Boca Raton: CRC Press, S. 1–66.
- Balamatsia, C. C., E. K. Paleologos, M. G. Kontominas und I. N. Savvaidis (2006). »Correlation between microbial flora, sensory changes and biogenic amines formation in fresh chicken

- meat stored aerobically or under modified atmosphere packaging at 4 °C: Possible role of biogenic amines as spoilage indicators«. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 89(1), S. 9–17.
- Balamatsia, C. C., A. Patsias, M. G. Kontominas und I. N. Savvaidis (2007). »Possible role of volatile amines as quality-indicating metabolites in modified atmosphere-packaged chicken fillets: Correlation with microbiological and sensory attributes«. In: *Food Chemistry* 104(4), S. 1622–1628.
- Bantleon, A. (2015). *mündliche Mitteilung beim Projekttreffen zum Forschungsvorhaben 17803N am 11.06.*
- Banwart, G. J. (1998). *Basic Food Microbiology*. Second edition. Boston, MA: Springer US.
- Baston, O. und O. Barna (2010). »Raw chicken leg and breast sensory evaluation«. In: *Annals Food Science and Technology* 11(1), S. 25–30.
- Bekhit, A. E.-D. A., D. L. Hopkins, F. T. Fahri und E. N. Ponnampalam (2013). »Oxidative processes in muscle systems and fresh meat: Sources, markers, and remedies«. In: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12(5), S. 565–597.
- Belitz, H.-D., W. Grosch und P. Schieberle (2009). *Food Chemistry*. Vierte, überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin: Springer-Verlag.
- Bem, Z. und H. Hechelmann (1994). »Kühlung und Kühllagerung von Fleisch: Mikrobiologische Vorgänge«. In: *Fleischwirtschaft* 74(9), S. 916–924.
- Bhattacharjee, P., S. Panigrahi, D. Lin, C. M. Logue, J. Sherwood, C. Doetkott und M. Marchello (2011). »A comparative qualitative study of the profile of volatile organic compounds associated with Salmonella contamination of packaged aged and fresh beef by HS-SPME/GC-MS«. In: *Journal of Food Science and Technology* 48(1), S. 1–13.
- Blake, R. S., P. S. Monks und A. M. Ellis (2009). »Proton-transfer reaction mass spectrometry«. In: *Chemical Reviews* 109(3), S. 861–896.
- Blickstad, E. und G. Molin (1984). »Growth and end-product formation in fermenter cultures of *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509 and two psychrotropic *Lactobacillus* spp. in different gaseous atmospheres«. In: *Journal of Applied Bacteriology* 57(2), S. 213–220.
- Blickstad, E. (1983). »Growth and End Product Formation of Two Psychrotrophic *Lactobacillus* spp. and *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509T at Different pH Values and Temperatures«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 46(6), S. 1345–1350.
- BMJV (2014). *Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln*. URL: [www.gesetze-im-internet.de/lmkv/BJNR016260981.html#BJNR016260981BJNG000101320](http://www.gesetze-im-internet.de/lmkv/BJNR016260981.html#BJNR016260981BJNG000101320) (Zuletzt geprüft am 30.05.2017).
- Borch, E., M.-L. Kant-Muermans und Y. Blixt (1996). »Bacterial spoilage of meat and cured meat products«. In: *Specific Spoilage Organisms* 33(1), S. 103–120.
- Borch, E. und G. Molin (1989). »The aerobic growth and product formation of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix*, and *Carnobacterium* in batch cultures«. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 30(1), S. 81–88.

- Bruyn, I. N. de, W. H. Holzapfel, L. Visser und A. I. Louw (1988). »Glucose metabolism by *Lactobacillus divergens*«. In: *Journal of General Microbiology* 134(8), S. 2103–2109.
- Budde, B. (2003). »*Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: Culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments«. In: *International Journal of Food Microbiology* 83(2), S. 171–184.
- Bunge, M., N. Araghipour, T. Mikoviny, J. Dunkl, R. Schnitzhofer, A. Hansel, F. Schinner, A. Wisthaler, R. Margesin und T. D. Märk (2008). »On-Line monitoring of microbial volatile metabolites by proton transfer reaction-mass spectrometry«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 74(7), S. 2179–2186.
- Calkins, C. R. und J. M. Hodgen (2007). »A fresh look at meat flavor«. In: *Meat Science* 77(1), S. 63–80.
- Campo, M. M., G. R. Nute, S. I. Hughes, M. Enser, J. D. Wood und R. I. Richardson (2006). »Flavour perception of oxidation in beef«. In: *Meat Science* 72(2), S. 303–311.
- Casaburi, A., F. de Filippis, F. Villani und D. Ercolini (2014). »Activities of strains of *Brochothrix thermosphacta* in vitro and in meat«. In: *Food Research International* 62, S. 366–374.
- Casaburi, A., A. Nasi, I. Ferrocino, R. Di Monaco, G. Mauriello, F. Villani und D. Ercolini (2011). »Spoilage-related activity of *Carnobacterium maltaromaticum* strains in air-stored and vacuum-packed meat«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77(20), S. 7382–7393.
- Casaburi, A., P. Piombino, G.-J. Nychas, F. Villani und D. Ercolini (2015). »Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage«. In: *Food Microbiology* 45(Part A), S. 83–102.
- Christensen, M. D. und C. S. Pederson (1958). »Factors affecting diacetyl production by lactic acid bacteria«. In: *Applied Microbiology* 6(5), S. 319–322.
- Cogan, T. M. und K. N. Jordan (1994). »Metabolism of *Leuconostoc* Bacteria«. In: 77(9), S. 2704–2717.
- Collins-Thompson, D. L., T. Sorhaug, L. D. Witter und Z. J. Ordal (1972). »Taxonomic Consideration of *Microbacterium lacticum*, *Microbacterium flavum*, and *Microbacterium thermosphactum*«. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 22(2), S. 65–72.
- Conte-Junior, C. A., B. T. Macedo, M. M. Lopes, R. M. Franco, M. Q. Freitas, M. Fernandez und S. B. Mano (2010). »Effect of modified atmosphere packaging on the growth/survival of *Yersinia enterocolitica* and natural flora on fresh poultry sausage«. In: *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Herausgegeben von A. Méndez-Vilas. Band Nr. 2. Microbiology book series. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, S. 1217–1223.
- Crank, J. (1975). *The mathematics of diffusion*. Zweite Auflage. Oxford [Eng]: Clarendon Press.
- Czerny, M., M. Christlbauer, M. Christlbauer, A. Fischer, M. Granvogl, M. Hammer, C. Hartl, N. M. Hernandez und P. Schieberle (2008). »Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions«. In: *European Food Research and Technology* 228(2), S. 265–273.

- Dainelli, D., N. Gontard, D. Spyropoulos, E. Zondervan-van den Beuken und P. Tobback (2008). »Active and intelligent food packaging: Legal aspects and safety concerns«. In: *Trends in Food Science & Technology* 19(S1), S. 103–112.
- Dainty, R. H., R. A. Edwards und C. M. Hibbard (1985). »Time course of volatile compound formation during refrigerated storage of naturally contaminated beef in air«. In: *Journal of Applied Bacteriology* 59(4), S. 303–309.
- Dainty, R. H., R. A. Edwards, C. M. Hibbard und J. J. Marnewick (1989). »Volatile compounds associated with microbial growth on normal and high pH beef stored at chill temperatures«. In: *Journal of Applied Bacteriology* 66, S. 281–289.
- Dainty, R. H. und C. M. Hibbard (1980). »Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media«. In: *Journal of Applied Bacteriology* 48(3), S. 387–396.
- (1983). »Precursors of the major end products of aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta*«. In: *Journal of Applied Bacteriology* 55(1), S. 127–133.
- Dainty, R. H. und F. Hofman (1983). »The influence of glucose concentration and culture incubation time on end-product formation during aerobic growth of *Brochothrix thermosphacta*«. In: *Journal of Applied Bacteriology* 55(2), S. 233–239.
- Dainty, R. H., B. G. Shaw, C. D. Harding und S. Michanie (1979). »The spoilage of vacuum-packed beef by cold-tolerant bacteria«. In: *Cold-tolerant microbes in spoilage and the environment*. Herausgegeben von A. D. Russel und R. Fuller. London: Academic Press, S. 83–100.
- D’Anna, B., A. Wisthaler, Ø. Andreasen, A. Hansel, J. Hjorth, N. R. Jensen, C. J. Nielsen, Y. Stenström und J. Viidanoja (2005). »Atmospheric chemistry of C3-C6 cycloalkanecarbaldehydes«. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 109(23), S. 5104–5118.
- Devlieghere, F., J. Debevere und J. van Impe (1998). »Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms«. In: *International Journal of Food Microbiology* 43(1–2), S. 105–113.
- DIN (2003). *Sensorische Prüfung - Ermittlung und Überprüfung der Mindesthaltbarkeit von Lebensmitteln, DIN 10968*.
- Doulgeraki, A. I., S. Paramithiotis, D. M. Kagkli und G. J. E. Nychas (2010). »Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions«. In: *Food Microbiology* 27(8), S. 1028–1034.
- Doulgeraki, A. I., S. Paramithiotis und G. J. E. Nychas (2011). »Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions«. In: *International Journal of Food Microbiology* 145(1), S. 77–83.
- Douliou, D., K. Tzia und V. Gekas (2000). »A knowledge base for the apparent mass diffusion coefficient (DEFF) of foods«. In: *International Journal of Food Properties* 3(1), S. 1–14.

- Duwat, P., S. Sourice, B. Cesselin, G. Lamberet, K. Vido, P. Gaudu, Y. Le Loir, F. Violet, P. Loubière und A. Gruss (2001). »Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival«. In: *Journal of Bacteriology* 183(15), S. 4509–4516.
- Edwards, R., R. Dainty und C. Hibbard (1987). »Volatile compounds produced by meat pseudomonads and relate reference strains during growth on beef stored in air at chill temperatures«. In: *Journal of Applied Bacteriology* 62(5), S. 403–412.
- EG Nr. 2073/2005 (2005). *Verordnung der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel*.
- Eilamo, M., A. Kinnunen, K. Latva-Kala und R. Ahvenainen (1998). »Effects of packaging and storage conditions on volatile compounds in gas-packed poultry meat«. In: *Food Additives and Contaminants* 15(2), S. 217–228.
- Ellis, A. M. und C. A. Mayhew (2014). *Proton transfer reaction mass spectrometry: Principles and applications*. Chichester: Wiley.
- Ellis, D. I. und R. Goodacre (2001). »Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: Current status and future trends«. In: *Trends in Food Science & Technology* 12(11), S. 414–424.
- Elsome, A. M. und E. Slade (2006). »Sensing gaseous substances using metal complexes«. US 7,153,532 B1.
- Ercolini, D., I. Ferrocino, A. Nasi, M. Ndagijimana, P. Vernocchi, A. La Stora, L. Laghi, G. Mauriello, M. E. Guerzoni und F. Villani (2011). »Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77(20), S. 7372–7381.
- Ercolini, D., F. Russo, A. Nasi, P. Ferranti und F. Villani (2009). »Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 75(7), S. 1990–2001.
- Ercolini, D., F. Russo, E. Torrieri, P. Masi und F. Villani (2006). »Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 72(7), S. 4663–4671.
- Ercolini, D., A. Casaburi, A. Nasi, I. Ferrocino, R. D. Monaco, P. Ferranti, G. Mauriello und F. Villani (2010). »Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers«. In: *International Journal of Food Microbiology* 142(1-2), S. 120–131.
- Esmer, O. K., R. Irkin, N. Degirmencioglu und A. Degirmencioglu (2011). »The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat«. In: *Meat Science* 88(2), S. 221–226.
- Evans, L. R. und A. Linker (1973). »Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*«. In: *Journal of Bacteriology* 116(2), S. 915–924.

- Eyles, M. J., C. J. Moir und J. A. Davey (1993). »The effects of modified atmospheres on the growth of psychrotrophic pseudomonads on a surface in a model system«. In: *International Journal of Food Microbiology* 20(2), S. 97–107.
- Farber, J. M. (1991). »Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology - a review«. In: *Journal of Food Protection* 54(1), S. 58–70.
- Franke, C., L. Höll, H.-C. Langowski, H. Petermeier und R. F. Vogel (2017). »Sensory evaluation of chicken breast packed in two different modified atmospheres«. In: *Food Packaging and Shelf Life* 13, S. 66–75.
- Franke, C. und J. Beauchamp (2017). »Real-Time Detection of Volatiles Released During Meat Spoilage: A Case Study of Modified Atmosphere-Packaged Chicken Breast Fillets Inoculated with *Br. thermosphacta*«. In: *Food Analytical Methods* 10(2), S. 310–319.
- Fraqueza, M. J., C. M. Alfaia und A. S. Barreto (2012). »Biogenic amine formation in turkey meat under modified atmosphere packaging with extended shelf life: Index of freshness«. In: *Poultry Science* 91(6), S. 1465–1472.
- Freeman, L. R., G. J. Silverman, P. Angelini, C. Jr. Merritt und W. B. Esselen (1976). »Volatiles produced by microorganisms isolated from refrigerated chicken at spoilage«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 32(2), S. 222–231.
- Gallas, L., E. Standarová, I. Steinhauserová, L. Steinhauser und L. Vorlová (2010). »Formation of biogenic amines in chicken meat stored under modified atmosphere«. In: *Acta Veterinaria Brno* 79(S9), S. 107–116.
- Gallo, L., R. E. Schmitt und W. Schmidt-Lorenz (1988). »Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers. I. Bacterial flora and growth during storage«. In: *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie* 21, S. 216–223.
- García de Fernando, G. D., G. J. Nychas, M. W. Peck und J. A. Ordóñez (1995). »Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmospheres«. In: *International Journal of Food Microbiology* 28(2), S. 221–231.
- García-Lopez, M. L., M. Prieto und A. Otero (1998). »The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products«. In: *The microbiology of meat and poultry*. Herausgegeben von A. Davies und R. G. Board. London und New York: Blackie Academic & Professional, S. 35–84.
- Geornaras, I., G. A. Dykes und A. von Holy (1995). »Biogenic amine formation by chicken-associated spoilage and pathogenic bacteria«. In: *Letters in Applied Microbiology* 24, S. 164–166.
- Gill, C. O. (1976). »Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces«. In: *Journal of Applied Bacteriology* 41, S. 401–410.
- (1986a). »Meat and poultry microbiology«. In: *Advances in meat research: The control of microbial spoilage in fresh meats*. Herausgegeben von A. M. Pearson und T. R. Dutson. New York: T.L. Macmillan, S. 444–452.

- 
- (1986b). »The control of microbial spoilage in fresh meats«. In: *Meat and poultry microbiology*. Herausgegeben von A. M. Pearson und T. R. Dutson. Basingstone: Macmillan, S. 49–88.
- (1996). »Extending the storage life of raw chilled meats«. In: *Meat Science* 43(S1), S. 99–109.
- Gill, C. O. und K. G. Newton (1977). »The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures«. In: *Journal of Applied Bacteriology* 43(2), S. 189–195.
- Gill, C. O. und K. H. Tan (1980). »Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 39(2), S. 317–319.
- Gouw, J. de, C. Warneke, T. Karl, G. Eerdeken, C. van der Veen und R. Fall (2003). »Sensitivity and specificity of atmospheric trace gas detection by proton-transfer-reaction mass spectrometry«. In: *International Journal of Mass Spectrometry* 223-224, S. 365–382.
- Grau, F. H. (1983). »End products of glucose fermentation by *Brochothrix thermosphacta*«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 45(1), S. 84–90.
- Groth Laursen, B., L. Bay, I. Cleenwerck, M. Vancanneyt, J. Swings, P. Dalgaard und J. J. Leisner (2005). »*Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: Phenotypic and genotypic characterization«. In: *Systematic and Applied Microbiology* 28(2), S. 151–164.
- Hanna, M. O., C. Vanderzant, G. Smith und J. W. Savell (1981). »Packaging of beef loin steaks in 75 % O<sub>2</sub> plus 25 % CO<sub>2</sub>: II. Microbiological properties«. In: *Journal of Food Protection* 44(12), S. 928–933.
- Heiss, R. und K. Eichner (1995). *Haltbarmachen von Lebensmitteln: Chemische, physikalische und mikrobiologische Grundlagen der Verfahren*. Dritte, überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Herbert, U., S. Rossaint, M.-A. Khanna und J. Kreyenschmidt (2013). »Comparison of argon-based and nitrogen-based modified atmosphere packaging on bacterial growth and product quality of chicken breast fillets«. In: *Poultry Science* 92(5), S. 1348–1356.
- Herbert, U. (2014). »Assessment of different packaging atmospheres for the poultry meat industry based on an overall quality index«. Dissertation. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Herbert, U. und J. Kreyenschmidt (2015). »Comparison of oxygen- and nitrogen-enriched atmospheres on the growth of *Listeria Monocytogenes* inoculated on poultry breast fillets«. In: *Journal of Food Safety*, S. 1–11.
- Hernández-Jover, T., M. Izquierdo-Pulido, M. T. Veciana-Nogués, A. Mariné-Font und M. C. Vidal-Carou (1997). »Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products«. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(6), S. 2098–2102.
- Hewitt, C. N., S. Hayward und A. Tani (2003). »The application of protontransfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS) to the monitoring and analysis of volatile organic compounds in the atmosphere«. In: *Journal of Environmental Monitoring* 5(1), S. 1–7.
-

- Hilgarth, M. (voraussichtliche Veröffentlichung 2018). »Spoilage-associated psychrotrophic and psychrophilic microbiota on modified atmosphere packaged beef«. Dissertation. Freising: Technische Universität München.
- Hitchener, B. J., A. F. Egan und P. J. Rogers (1979). »Energetics of *Microbacterium thermosphacta* in glucose-limited continuous culture«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 37, S. 1047–1052.
- Höll, L. (2018). »Identification and growth dynamics of meat spoilage microbiota in modified atmosphere packaged poultry meat«. Dissertation. Freising: Technische Universität München.
- Höll, L., J. Behr und R. F. Vogel (2016). »Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS«. In: *Food Microbiology* 60, S. 84–91.
- Huffman, K. L., M. F. Miller, L. C. Hoover und C. K. Wu. (1996). »Effect of beef tenderness on consumer satisfaction with steaks consumed in the home and restaurant«. In: *Journal of Animal Science* 74(1), S. 91–97.
- Hugenholtz, J. und J. C. Starrenburg (1992). »Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp.« In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, S. 17–22.
- Insausti, K., M. J. Beriain, C. Gorraiz und A. Purroy (2002). »Volatile compounds of raw beef from 5 local spanish cattle breeds stored under modified atmosphere«. In: *Journal of Food Science* 67(4), S. 1580–1589.
- Insausti, K., M. J. Beriain, A. Purroy, P. Alberti, C. Gorraiz und M. J. Alzueta (2001). »Shelf life of beef from local Spanish cattle breeds stored under modified atmosphere«. In: *Meat Science* 57(3), S. 273–281.
- Ioannidis, A. G., L. Kuuliala, M. Vanderroost, F. Devlieghere und B. de Meulenaer (2015). *The development of an integrated optical sensor for modified atmosphere food packaging: Shelf-life study on meat and fish (Poster)*. 15. - 17. September. *Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety*. Erding.
- Ionicon (2016). *7th International PTR-MS Conference 2016*. URL: <http://www.ionicon.com/information/events/7th-international-ptr-ms-conference-2016> (Zuletzt geprüft am 13. 10. 2016).
- Jääskeläinen, E., J. Hultman, J. Parshintsev, M.-L. Riekkola und J. Björkroth (2016). »Development of spoilage bacterial community and volatile compounds in chilled beef under vacuum or high oxygen atmospheres«. In: *International Journal of Food Microbiology* 223, S. 25–32.
- Jääskeläinen, E., S. Vesterinen, J. Parshintsev, P. Johansson, M.-L. Riekkola, J. Björkroth und C. A. Elkins (2015). »Production of buttery-odor compounds and transcriptome response in *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* LMG18811 T during growth on various carbon sources«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 81(6), S. 1902–1908.

- Jackson, T. C., G. R. Acuff, C. Vanderzant, T. R. Sharp und J. W. Savell (1992). »Identification and evaluation of volatile compounds of vacuum and modified atmosphere packaged beef strip loins«. In: *Meat Science* 31(2), S. 175–190.
- Jayasena, D. D., D. U. Ahn, K. C. Nam und C. Jo (2013). »Flavour chemistry of chicken meat: A review«. In: *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 26(5), S. 732–742.
- Jiménez, S. M., M. S. Salsi, M. C. Tiburzi, R. C. Rafaghelli, M. A. Tessi und V. R. Coutaz (1997). »Spoilage microflora in fresh chicken breast stored at 4 °C: Influence of packaging methods«. In: *Journal of Applied Microbiology* 83, S. 613–618.
- Jirovetz, L., D. Smith und G. Buchbauer (2002). »Aroma compound analysis of *Eruca sativa* ( Brassicaceae ) SPME headspace leaf samples using GC, GC–MS, and Olfactometry«. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(16), S. 4643–4646.
- Johansson, P., L. Paulin, E. Säde, N. Salovuori, E. R. Alatalo, K. J. Björkroth und P. Auvinen (2011). »Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium, *Leuconostoc gasiconmitatum* LMG 18811(T), in association with specific spoilage reactions«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77(13), S. 4344–4351.
- Jongberg, S., J. Wen, M. A. Tørngren und M. N. Lund (2014). »Effect of high-oxygen atmosphere packaging on oxidative stability and sensory quality of two chicken muscles during chill storage«. In: *Food packaging and shelf life* 1(1), S. 38–48.
- Joo, S. T. und G. D. Kim (2011). »Meat quality traits and control technologies«. In: *Control of meat quality*. Herausgegeben von S. T. Joo. Kerala: Research Signpost, S. 1–20.
- Juška, A., G. Gedminienė und R. Ivanec (2006). »Growth of microbial populations Mathematical modeling, laboratory exercises, and model-based data analysis«. In: *Biochemistry and Molecular Biology Education* 34(6), S. 417–422.
- Kandler, O. (1983). »Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria«. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 49, S. 209–224.
- Kaneko, T., P.-Y. Wang und A. Sato (1994). »Partition coefficients of some acetate esters and alcohols in water, blood, olive oil, and rat tissues«. In: *Occupational and Environmental Medicine* 51(1), S. 68–72.
- Keck, L., U. Oeh und C. Hoeschen (2007). »Corrected equation for the concentrations in the drift tube of a proton transfer reaction-mass spectrometer (PTR-MS)«. In: *International Journal of Mass Spectrometry* 264(1), S. 92–95.
- Kerry, J., M. O’Grady und S. Hogan (2006). »Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review«. In: *Meat Science* 74(1), S. 113–130.
- Kieronczyk, A., S. Skeie, T. Langsrud, D. Le Bars und M. Yvon (2004). »The nature of aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids«. In: *International Dairy Journal* 14(3), S. 227–235.

- King, A. D. und C. W. Nagel (1975). »Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*«. In: *Journal of Food Science* 40(2), S. 362–366.
- Koskela, J., J. Sarfraz, P. Ihalainen, A. Määttänen, P. Pulkkinen, H. Tenhu, T. Nieminen, A. Kilpelä und J. Peltonen (2015). »Monitoring the quality of raw poultry by detecting hydrogen sulfide with printed sensors«. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 218, S. 89–96.
- Koutsoumanis, K. P. und P. Taoukis (2005). »Meat safety, refrigerated storage and transport: Modeling and management«. In: *Improving the safety of fresh meat*. Herausgegeben von N. Sofos. Cambridge: Woodhead Publishing, S. 503–561.
- Krieg, N. und J. Holt (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 1*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Kröckel, L. (2013). »The role of lactic acid bacteria in safety and flavour development of meat and meat products«. In: *Lactic acid bacteria - R & D for food, health and livestock purposes*. Herausgegeben von J. M. Kongo. InTech.
- Kropf, D. H. (2004). »Packaging: Modified- and controlled-atmosphere«. In: *Encyclopedia of meat science*. Herausgegeben von W. K. Jensen, C. Devine und M. Dikeman. New York: Elsevier, S. 962–969.
- Kuswandi, B., R. Oktaviana, A. Abdullah und L. Y. Heng (2014). »A novel on-package sticker sensor based on methyl red for real-time monitoring of broiler chicken cut freshness«. In: *Packaging Technology and Science* 27(1), S. 69–81.
- La Valle Sansone, U., A. López Muñoz, E. Fernández García, J. Cortiella Martorell, N. Herranz Solana, I. Lorente Gómez, T. Calvo Vilanova, S. Aucejo Romero, R. Martínez Manéz, J. L. Vivancos Bono, P. y Zaragoza Torres und J. Vicente Ros Lis (2015). »Tinta indicadora de la frescura de alimentos y procedimiento para la fabricación de una tinta indicadora de la frescura de alimentos«. ES 2 540 786.
- Labuza, T. P. und B. Fu (1993). »Growth kinetics for shelf-life prediction: Theory and practice«. In: *Journal of Industrial Microbiology* 12(3), S. 309–323.
- Lecanu, L., V. Ducruet, C. Jouquand, J. J. Gratadoux und A. Feigenbaum (2002). »Optimization of headspace solid-phase microextraction (SPME) for the odor analysis of surface-ripened cheese«. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(13), S. 3810–3817.
- Legrum, W. (2015). *Riechstoffe, zwischen Gestank und Duft: Vorkommen, Eigenschaften und Anwendung von Riechstoffen und deren Gemischen*. Zweite, überarbeitete und erweiterte Auflage. Wiesbaden: Springer Spektrum.
- Leisner, J. J., B. G. Laursen, H. Prévost, D. Drider und P. Dalgaard (2007). »Carnobacterium: Positive and negative effects in the environment and in foods«. In: *FEMS Microbiology Reviews* 31(5), S. 592–613.
- Leonardos, G., D. Kendall und N. Barnard (1969). »Odor threshold determinations of 53 odorant chemicals«. In: *Journal of the Air Pollution Control Association* 19(2), S. 91–95.

- Lewis, C. (2002). *Food freshness and smart packaging*. Herausgegeben von FDA Consumer magazine. URL: [http://www.fda.gov/Fdac/features/2002/502\\_food.html](http://www.fda.gov/Fdac/features/2002/502_food.html) (Zuletzt geprüft am 14.09.2012).
- Lindinger, W. (1973). »Reaction-rate constants in steady-state hollow-cathode«. In: *Physical Review A* 7(1), S. 328–333.
- Lindinger, W., A. Hansel und A. Jordan (1998a). »On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS): Medical applications, food control and environmental research«. In: *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 173(3), S. 191–241.
- (1998b). »Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS): On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels«. In: *Chemical Society Reviews* 27(5), S. 347–354.
- Löwenadler, J. (1994). »Dissolved CO<sub>2</sub> and its growth inhibiting effect on microorganisms in MAP model systems«. Dissertation. Göteborg: Chalmers of Technology.
- Lund, M. N., M. Heinonen, C. P. Baron und M. Estevez (2011). »Protein oxidation in muscle foods: A review«. In: *Molecular nutrition & food research* 55(1), S. 83–95.
- Mayerl, J. und D. Urban (2010). *Binär-logistische Regressionsanalyse. Grundlagen und Anwendung für Sozialwissenschaftler*. URL: [www.uni-stuttgart.de/soz/institut/forschung/2010.SISS.3.pdf](http://www.uni-stuttgart.de/soz/institut/forschung/2010.SISS.3.pdf) (Zuletzt geprüft am 10.12.2017).
- Mayr, D., R. Margesin, E. Klingsbichel, E. Hartungen, D. Jenewein, F. Schinner und T. D. Märk (2003a). »Rapid detection of meat spoilage by measuring volatile organic compounds by using proton transfer reaction mass spectrometry«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69(8), S. 4697–4705.
- Mayr, D., R. Margesin, F. Schinner und T. D. Märk (2003b). »Detection of the spoiling of meat using PTR-MS«. In: *International Journal of Mass Spectrometry* 223-224, S. 229–235.
- McMeekin, T. A. (1982). »Developments in food microbiology«. In: *Microbial spoilage of meats*. Herausgegeben von R. Davies. London: Applied Science, S. 1–40.
- Miller, D. W. (1999). »Food quality indicator device«. WO 99/04256.
- Min, B. und D. U. Ahn (2005). »Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products - A review«. In: *Food Science and Biotechnology* 14(1), S. 152–163.
- Molin, G., A. Ternstrom und J. Ursing (1986). »Pseudomonas lundensis, a new bacterial species isolated from meat«. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 36(2), S. 339–342.
- Montel, M. C., F. Masson und R. Talon (1998). »Bacterial role in flavour development«. In: *Meat Science* 49(S1), S111–S123.
- Nagata, Y. (2003). *Measurement of odor threshold by triangle odor bag method*. URL: <http://cschi.cz/odour/files/world/Measurement%20of%20odor%20threshold%20by%20Triangle%20odor%20Bag%20Method.pdf> (Zuletzt geprüft am 10.10.2016).
- Nerin de la Puerta, M. C. C., L. Gutierrez Bartolome und C. Sanchez Jarabo (2012). »Smart packaging for detecting microorganisms«. WO 2010/128178.

- Nilsson, L., L. Gram und H. H. Huss (1999). »Growthcontrol of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive Lactic Acid Bacteria flora«. In: *Journal of Food Protection* 62(4), S. 336–342.
- Nollet, L. (2004). *Handbook of food analysis: Physical characterization and nutrient analysis*. Band Bd. 1. CRC Press/ Llc.
- Nowak, A. und A. Czyzowska (2011). »In vitro synthesis of biogenic amines by *Brochothrix thermosphacta* isolates from meat and meat products and the influence of other microorganisms«. In: *Meat Science* 88(3), S. 571–574.
- Nychas, G. J. E., V. M. Dillon und R. G. Board (1988). »Glucose, the key substrate in the microbiological changes occurring in meat and certain meat products«. In: *Biotechnology and applied biochemistry* 10, S. 203–231.
- Nychas, G. J. E., P. N. Skandamis, C. C. Tassou und K. P. Koutsoumanis (2008). »Meat spoilage during distribution«. In: *Meat Science* 78(1-2), S. 77–89.
- Nychas, G. J., E. Drosinos und R. G. Board (1998a). »The microbiology of meat and poultry«. In: *Chemical changes in stored meat*. Herausgegeben von R. G. Board und A. R. Davies. London: Blackie Academic & Professional, S. 288–326.
- Nychas, G. J., D. Marshall und J. Sofos (2007). »Food microbiology: Fundamentals and frontiers«. In: *Meat poultry and seafood*. Herausgegeben von M. P. Doyle, L. R. Beuchat und T. J. Montville. Band dritte Edition. Washington, D.C.: ASM Press, S. 105–140.
- Nychas, G.-J. E., E. H. Drosinos und R. G. Board (1998b). »Chemical changes in stored meat«. In: *The microbiology of meat and poultry*. Herausgegeben von A. Davies und R. G. Board. London und New York: Blackie Academic & Professional, S. 288–326.
- Olivares, A., K. Dryahina, P. Spaněl und M. Flores (2012). »Rapid detection of lipid oxidation in beef muscle packed under modified atmosphere by measuring volatile organic compounds using SIFT-MS«. In: *Food Chemistry* 135(3), S. 1801–1808.
- O’Sullivan, M. G. (2017). *A handbook for sensory and consumer-driven new product development: Innovative technologies for the food and beverage industry*. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition. Duxford, United Kingdom und Cambridge, MA: Woodhead Publishing.
- Paczkowski, S. und S. Schütz (2011). »Post-mortem volatiles of vertebrate tissue«. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(4), S. 917–935.
- Pahl, M., W. Lindinger und F. Howorka (1972). »Massenspektrometrie am negativen Glimmlicht einer zylindrischen Hohlkathode«. In: *Zeitschrift für Naturforschung A* 27, S. 678–692.
- Paramithiotis, S., P. N. Skandamis und G.-J. E. Nychas (2009). »Insights into fresh meat spoilage«. In: *Safety of Meat and Processed Meat*. Herausgegeben von F. Toldrá. New York, NY: Springer New York.
- Pedersen, M. B., P. Gaudu, D. Lechardeur, M.-A. Petit und A. Gruss (2012). »Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology«. In: *Annual Review of Food Science and Technology* 3, S. 37–58.

- Pennsylvania State University (2017). *The proportional-odds cumulative logit model*. URL: <https://onlinecourses.science.psu.edu/stat504/node/176> (Zuletzt geprüft am 17. 11. 2017).
- Pérez, R. A., M. D. Rojo, G. González und C. de Lorenzo (2008). »Solid-phase microextraction for the determination of volatile compounds in the spoilage of raw ground beef«. In: *Journal of AOAC International* 91(6), S. 1409–1415.
- Pérez-Silva, A., E. Odoux, P. Brat, F. Ribeyre, G. Rodriguez-Jimenes, V. Robles-Olvera, M. A. García-Alvarado und Z. Günata (2006). »GC–MS and GC–olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans«. In: *Food Chemistry* 99(4), S. 728–735.
- Peterson, D. G. und G. A. Reineccius (2003). »Characterization of the volatile compounds that constitute fresh sweet cream butter aroma«. In: *Flavour and Fragrance Journal* 18(3), S. 215–220.
- Pettersen, M. K., H. Nissen, T. Eie und A. Nilsson (2004). »Effect of packaging materials and storage conditions on bacterial growth, off-odour, pH and colour in chicken breast fillets«. In: *Packaging Technology and Science* 17(3), S. 165–174.
- Pfaff, S. (2006). »Aus der Handlungsperspektive: Frische gut - alles gut?«. In: *Creativ Verpacken* 8, S. 26–27.
- Pikuta, E. V. und R. B. Hoover (2014). »The genus *Carnobacterium*«. In: *Lactic acid bacteria - Biodiversity and taxonomy*. Herausgegeben von W. H. Holzapfel und B. J. Wood. Chichester: Wiley.
- Pin, C., G. D. Garcia de Fernando und J. A. Ordóñez (2002). »Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 68(9), S. 4441–4447.
- Platter, W. J., J. D. Tatum, K. E. Belk, P. L. Chapman, J. A. Scanga und G. C. Smith (2003). »Relationships of consumer sensory ratings, marbling score, and shear force value to consumer acceptance of beef strip loin steaks«. In: *Journal of Animal Science* 81(11), S. 2741–2750.
- Pothakos, V., F. Devlieghere, F. Villani, K. J. Björkroth und D. Ercolini (2015). »Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage«. In: *Meat Science* 109, S. 66–74.
- Pothakos, V., C. Nyambi, B.-Y. Zhang, A. Papastergiadis, B. de Meulenaer und F. Devlieghere (2014). »Spoilage potential of psychrotrophic lactic acid bacteria (LAB) species: *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* and *Lactococcus piscium*, on sweet bell pepper (SBP) simulation medium under different gas compositions«. In: *International Journal of Food Microbiology* 178, S. 120–129.
- Poulin, P. und K. Krishnan (1996). »A tissue composition-based algorithm for predicting tissue: Air partition coefficients of organic chemicals«. In: *Toxicology and applied pharmacology* 136(1), S. 126–130.
- Rajamäki, T., H.-L. Alakomi, T. Ritvanen, E. Skyttä, M. Smolander und R. Ahvenainen (2006). »Application of an electronic nose for quality assessment of modified atmosphere packaged poultry meat«. In: *Food Control* 17(1), S. 5–13.

- Reddy, M. C., D. D. Bills und R. C. Lindsay (1969). »Ester production by *Pseudomonas fragi*: II. Factors influencing ester levels in milk cultures«. In: *Applied Microbiology* 17(6), S. 779–782.
- Regez, P., L. Gallo, R. E. Schmitt und W. Schmidt-Lorenz (1988). »Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers: III. Effect of storage temperature on the microbial association of poultry carcasses«. In: *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie* 21(229-233).
- Resconi, V. C., A. Escudero, J. A. Beltran, J. L. Olleta, C. Sanudo und M. d. M. Campo (2012). »Color, lipid oxidation, sensory quality, and aroma compounds of beef steaks displayed under different levels of oxygen in a modified atmosphere package«. In: *Journal of Food Science* 77(1), S10–8.
- Rokka, M., S. Eerola, M. Smolander, H.-L. Alakomi und R. Ahvenainen (2004). »Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions«. In: *Food Control* 15(8), S. 601–607.
- Rossaint, S., S. Klausmann und J. Kreyenschmidt (2015). »Effect of high-oxygen and oxygen-free modified atmosphere packaging on the spoilage process of poultry breast fillets«. In: *Poultry Science* 94(1), S. 93–103.
- Rothe, M., G. Wölm, L. Tunger und H.-J. Siebert (1972). »Schwellenkonzentrationen von Aromastoffen und ihre Nutzung zur Auswertung von Aromaanalysen«. In: *Food / Nahrung* 16(5), S. 483–495.
- Ruiz-Capillas, C. und F. Jiménez-Colmenero (2005). »Biogenic amines in meat and meat products«. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44(7-8), S. 489–599.
- Rukchon, C., A. Nopwinyuwong, S. Trevanich, T. Jinkarn und P. Suppakul (2014). »Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast«. In: *Talanta* 130(0), S. 547–554.
- Russo, F., D. Ercolini, G. Mauriello und F. Villani (2006). »Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups«. In: *Food Microbiology* 23(8), S. 797–802.
- Säde, E. (2011). »*Leuconostoc* spoilage of refrigerated, packaged foods«. Dissertation. Helsinki: Universität Helsinki.
- Safe Food Scientific (2017). *Food freshness monitors for your home!* URL: [www.sfsamerica.com](http://www.sfsamerica.com) (Zuletzt geprüft am 01.06.2017).
- Salinas, Y., J. V. Ros-Lis, J.-L. Vivancos, R. Martínez-Mañez, M. D. Marcos, S. Aucejo, N. Herranz und I. Lorente (2012). »Monitoring of chicken meat freshness by means of a colorimetric sensor array«. In: *The Analyst* 137(16), S. 3635.
- Sander, R. (2015). »Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent«. In: *Atmospheric Chemistry and Physics* 15(8), S. 4399–4981.
- Saraiva, C., I. Oliveira, J. A. Silva, C. Martins, J. Ventanas und C. García (2015). »Implementation of multivariate techniques for the selection of volatile compounds as indicators of sensory quality of raw beef«. In: *Journal of Food Science and Technology* 52(6), S. 3887–3898.

- Sato, S., S. Imamura, Y. Ozeki und A. Kawaguchi (1992). »Induction of enzymes involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation in *Pseudomonas fragi* B-0771 cells grown in media supplemented with fatty acid«. In: *Journal of Biochemistry* 111(1), S. 16–19.
- Sawaya, W. N., A. S. Elnawawy, A. S. Abu-Ruwaida, S. Khalafawi und B. Dashti (1995). »Influence of modified atmosphere packaging on shelf-life of chicken carcasses under refrigerated storage conditions«. In: *Journal of Food Safety* 15, S. 35–51.
- Schreiber, K., R. Krieger, B. Benkert, M. Eschbach, H. Arai, M. Schobert und D. Jahn (2007). »The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration«. In: *Journal of Bacteriology* 189(11), S. 4310–4314.
- Smolander, M., H.-L. Alakomi, T. Ritvanen, J. Vainionpää und R. Ahvenainen (2004a). »Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions. A. Time–temperature indicators as quality-indicating tools«. In: *Food Control* 15(3), S. 217–229.
- Smolander, M., E. Hurme, M. Koivisto und S. Kivinen (2004b). »Indicator«. WO 2004/102185 A1.
- Smolander, M., E. Hurme, K. Latva–Kala, T. Luoma, H.-L. Alakomi und R. Ahvenainen (2002). »Myoglobin-based indicators for the evaluation of freshness of unmarinated broiler cuts«. In: *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3(3), S. 279–288.
- Smolander, M. (2008). »Freshness indicators for food packaging«. In: *Smart packaging technologies for fast moving consumer goods*. Herausgegeben von J. Kerry und P. Butler. Chichester, West Sussex, Eng. und Hoboken, NJ: John Wiley, S. 111–127.
- Sneath, P. H., N. S. Mair, M. E. Sharpe und J. G. Holt (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Sofos, J. N. und G. C. Smith (2009). »The role of slaughter hygiene in food safety. Volume 2«. In: *Agricultural mechanization and automation*. Herausgegeben von P. McNulty und P. M. Grace. Oxford: Eolss Publishers Co Ltd, S. 393–412.
- Speckman, R. A. und E. B. Collins (1968). »Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*«. In: *Journal of Bacteriology* 95(1), S. 174–180.
- Stanborough, T., N. Fegan, S. M. Powell, M. Tamplin und S. P. Chandry (2017). »Insight into the genome of *Brochothrix thermosphacta*, a problematic meat spoilage bacterium«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 83(5), e02786–16.
- Stein, P. und S. Vollnhals (2011). *Grundlagen clusteranalytischer Verfahren*. URL: [https://www.uni-due.de/imperia/md/content/soziologie/stein/skript\\_clusteranalyse\\_2011.pdf](https://www.uni-due.de/imperia/md/content/soziologie/stein/skript_clusteranalyse_2011.pdf) (Zuletzt geprüft am 06.06.2017).
- Strotmann, C., T. von Mueffling, G. Klein und B. Nowak (2008). »Effect of different concentrations of carbon dioxide and oxygen on the growth of pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in ground pork packaged under modified atmospheres«. In: *Journal of Food Protection* 71(4), S. 845–849.

- The Good Scents Company (2015). *The Good Scents Company Information System*. URL: [www.thegoodscentscompany.com](http://www.thegoodscentscompany.com) (Zuletzt geprüft am 19. 08. 2015).
- Tier-LMHV (2007). *Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von bestimmten Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung)*.
- Tománková, J., G. Borilová, I. Steinhäuserová und L. Gallas (2012). »Volatile organic compounds as biomarkers of the freshness of poultry meat packaged in a modified atmosphere«. In: *Czech Journal of Food Sciences* 30(5), S. 395–403.
- Tsigarida, E., I. S. Boziaris und G. J. Nychas (2003). »Bacterial synergism or antagonism in a gel cassette system«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69(12), S. 7204–7209.
- Tsigarida, E. und G.-J. Nychas (2001). »Ecophysiological attributes of a *Lactobacillus* sp. and a *Pseudomonas* sp. on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability«. In: *Journal of Applied Microbiology* 90(5), S. 696–705.
- TUM (2011). *Hierarchisches Clustern*. URL: [https://www-m9.ma.tum.de/material/felix-klein/clustering/Methoden/Hierarchisches\\_Clustern.php](https://www-m9.ma.tum.de/material/felix-klein/clustering/Methoden/Hierarchisches_Clustern.php) (Zuletzt geprüft am 17. 11. 2017).
- Ullrich, F. und W. Grosch (1987). »Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid«. In: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 184(4), S. 277–282.
- University of Virginia (2017). *Fitting and interpreting a proportional odds model*. URL: <http://data.library.virginia.edu/fitting-and-interpreting-a-proportional-odds-model/> (Zuletzt geprüft am 17. 11. 2017).
- Urmila, K., H. Li, Q. Chen, Z. Hui und J. Zhao (2015). »Quantifying of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in chicken using a colorimetric sensor array and nonlinear regression tool«. In: *Analytical Methods* 7(13), S. 5682–5688.
- Verordnung (EG) Nr. 1935/2004 (2004). *Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Oktober 2004 über Materialien und Gegenstände, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen und zur Aufhebung der Richtlinien 80/590/EWG und 89/109/EWG*.
- Verordnung (EG) Nr. 450/2009 (2009). *Verordnung der Kommission vom 29. Mai 2009 über aktive und intelligente Materialien und Gegenstände, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen*.
- Verordnung (EG) Nr. 853/2004 (2004). *Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs*.
- Verordnung (EU) Nr. 10/2011 (2011). *Verordnung der Kommission vom 14. Januar 2011 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen*.

- Wang, L. C., B. W. Thomas, K. Warner, W. J. Wolf und W. F. Kwolek (1975). »Apparent odor thresholds of polyamines in water and 2 % soybean flour dispersions«. In: *Journal of Food Science* 40(2), S. 274–276.
- Wang, Y., C. Shen, J. Li, H. Jiang und Y. Chu (2012). »Proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS)«. In: *Mass spectrometry handbook*. Herausgegeben von M. S. Lee. Hoboken, New Jersey: Wiley.
- Williams, J. R., K. E. Myers, M. M. Owens und M. A. Bonne (2006). »Food quality indicator«. US 2006/0057022 A1.
- Zakrys-Waliwander, P. I., M. G. O’Sullivan, H. Walsh, P. Allen und J. P. Kerry (2011). »Sensory comparison of commercial low and high oxygen modified atmosphere packed sirloin beef steaks«. In: *Meat Science* 88(1), S. 198–202.
- Zhao, J. und R. Zhang (2004). »Proton transfer reaction rate constants between hydronium ion (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>) and volatile organic compounds«. In: *Atmospheric Environment* 38(14), S. 2177–2185.
- Zwietering, M. H., I. Jongenburger, F. M. Rombouts und K. van’t Riet (1990). »Modeling of the bacterial growth curve«. In: *Applied and Environmental Microbiology* 56(6), S. 1875–1881.



# 6 Veröffentlichungen

## 6.1 Für die Dissertation relevante Veröffentlichungen

### Artikel in wissenschaftlichen Zeitschriften

Franke, C. und J. Beauchamp (2017). »Real-time detection of volatiles released during meat spoilage: A case study of modified atmosphere-packaged chicken breast fillets inoculated with *Br. thermosphacta*«. In: *Food Analytical Methods* 10(2), S. 310-319.

Franke, C., L. Höll, H.-C. Langowski, H. Petermeier und R. F. Vogel (2017). »Sensory evaluation of chicken breast packed in two different modified atmospheres «. In: *Food Packaging and Shelf Life* 13, S. 66-75.

### Vorträge

#### Erstautorin

Franke, C. und J. Beauchamp (2016) »Real-time monitoring of volatile organic compounds as possible spoilage markers from modified atmosphere packaged chicken meat«. In: *7th International PTR-MS Conference*. 15.–19.02., Obergurgl.

Franke, C., J. Beauchamp und H.-C. Langowski (2015). »Dynamic detection of volatile organic compounds from modified atmosphere packaged chicken using proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS)«. In: *Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety*. 15.–17.09., Erding.

Keupp, C., L. Höll, J. Beauchamp und H.-C. Langowski (2015). »Online monitoring of volatile freshness indicators from modified atmosphere packaged chicken meat using PTR-MS«. In: *27th IAPRI Symposium*. 09.–11.06., Valencia.

Keupp, C. und S. Sänglerlaub (2013). »Active and intelligent packaging – Solutions on the market and current developments«. In: *European Coatings Conference – Packaging and can coating*. 11.-12.06., Düsseldorf.

#### Mitautorin

Langowski, H.-C., C. Keupp, L. Höll, und R. Vogel (2014). »Freshness Indicators – Requirements and current deficiencies«. In: *Shelf Life International Meeting (SLIM) 2014*, 11.–13.06., New Brunswick, New Jersey.

---

## **Posterpräsentationen**

### **Erstautorin**

Keupp, C., J. Beauchamp, E. Zardin und H.-C. Langowski (2013). »PTR-MS – an online tool to determine meat spoilage«. In: *Spoilers 2013*. 01.-03.07., Quimper.

### **Mitautorin**

Beauchamp, J., C. Franke, P. Silcock, E. Zardin, M. Zareian und P.J. Bremer (2016). »Monitoring meat quality deterioration on-line via volatile organic compound spoilage markers«. In: *First Food Chemistry Conference – Shaping the Future of Food Quality, Health and Safety*. 30.10.–01.11., Amsterdam.

## **6.2 Sonstige Veröffentlichungen während der Zeitdauer der Dissertation**

### **Vorträge**

#### **Erstautorin**

Keupp, C., E. Zardin, H. Schneiderbanger und J. Beauchamp (2014). »Aroma production in wheat beer wort during fermentation – Real-time analysis of dynamic changes«. In: *Young Scientists Symposium 2014*. 28.– 30.10., Ghent.

### **Posterpräsentationen**

#### **Erstautorin**

Keupp, C., E. Zardin, H. Schneiderbanger und J. Beauchamp (2014). »Monitoring of dynamic changes in the release of aroma compounds during fermentation of wheat beer«. In: *Trends in Brewing 2014*. 13.-17.04., Ghent.

#### **Mitautorin**

Schuster, L., C. Franke, P. Silcock, J. Beauchamp und P.J. Bremer (2016). »Volatile compounds present in vacuum-packed lamb chilled at 2 °C for 15 days«. In: *7th International PTR-MS Conference*. 15.–19.02., Obergurgl.

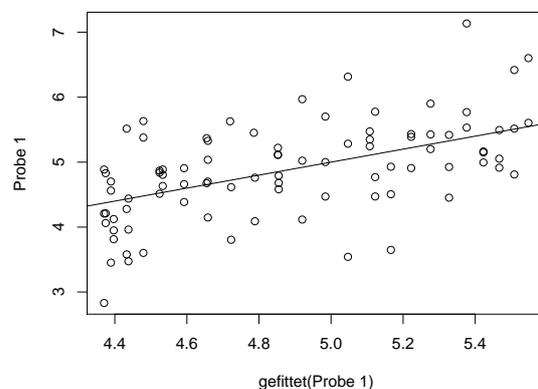
# A Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch

## A.1 *B. thermosphacta*

Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 47

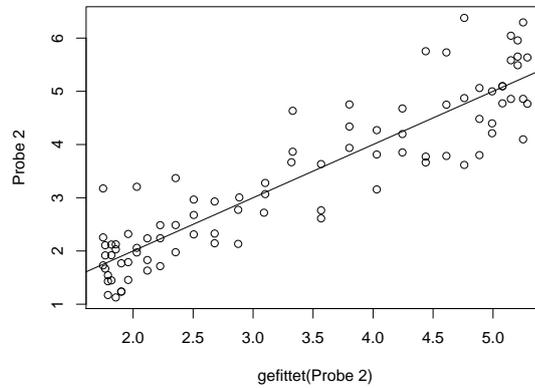
Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	6.10	1.07	5.69	0.0000002
w	0.35	0.24	1.47	0.1439028
b	2.43	0.71	3.43	0.0009166



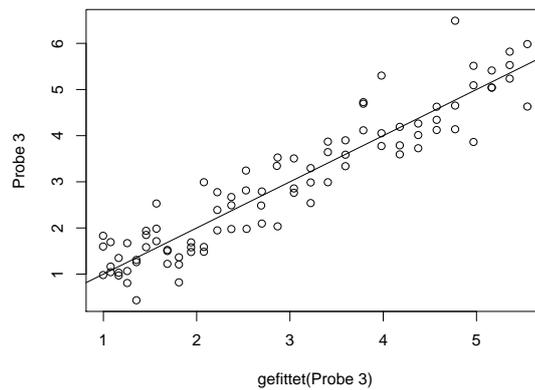
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	3.73	0.44	8.49	0
w	1.16	0.29	4.06	0.0001081
y	4.33	1.04	4.18	0.0000704
z	1.69	0.21	7.99	0



**Probe 3**

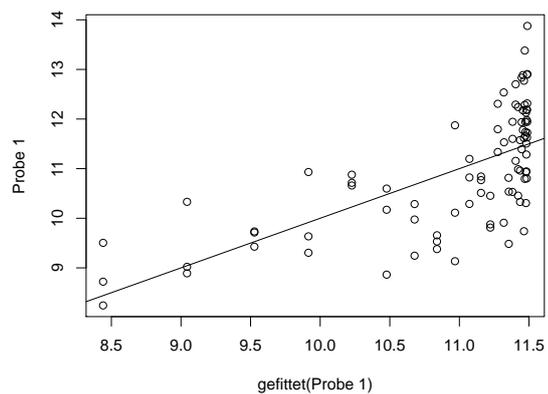
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	9.02	2.24	4.02	0.0001241
w	0.40	0.06	6.40	0
y	2.17	0.20	10.87	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 59**

**Probe 1**

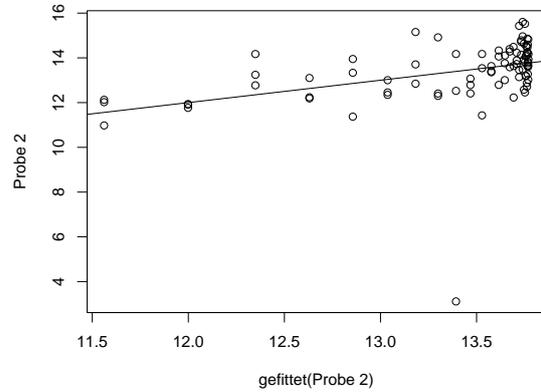
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	3.80	0.47	8.10	0
u	11.49	0.12	99.06	0



*A Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des  
Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch*

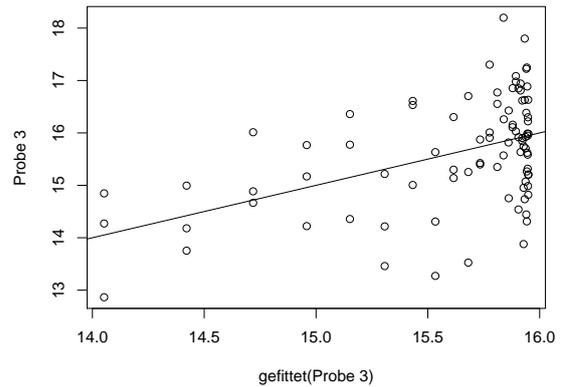
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	2.76	0.71	3.88	0.0002021
u	13.77	0.18	78.54	0



**Probe 3**

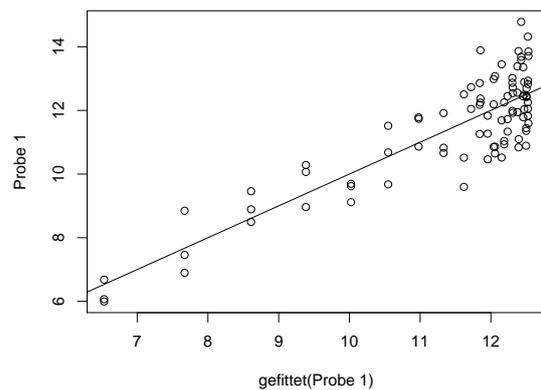
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	2.36	0.64	3.70	0.0003808
w	0.98	0.44	2.21	0.0294088
u	15.95	0.16	100.27	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 63**

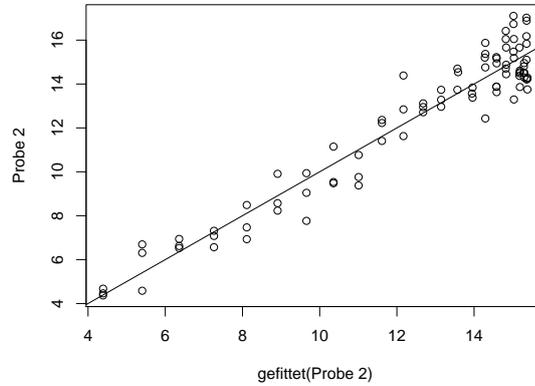
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	7.91	0.59	13.50	0
w	0.87	0.17	5.02	0.0000028
u	13.07	0.42	31.29	0
f	0.005	0	2.09	0.0398271



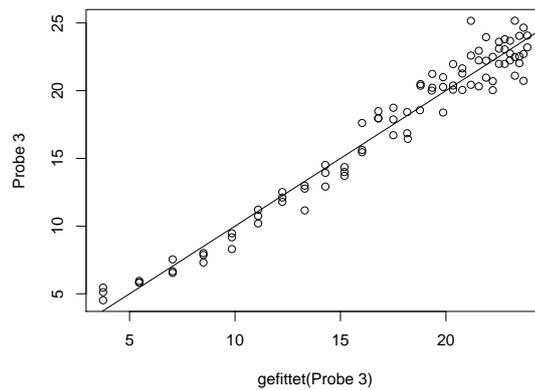
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	20.27	4.25	4.77	0.0000076
w	0.25	0.08	2.93	0.0043695
u	23.59	4.59	5.14	0.0000017
f	0.02	0.01	2.92	0.0044992



**Probe 3**

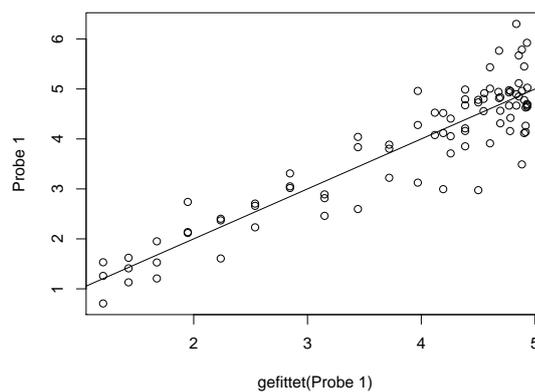
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	24.16	0.57	42.23	0
w	0.36	0.03	12.53	0
u	26.05	0.69	37.81	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 87**

**Probe 1**

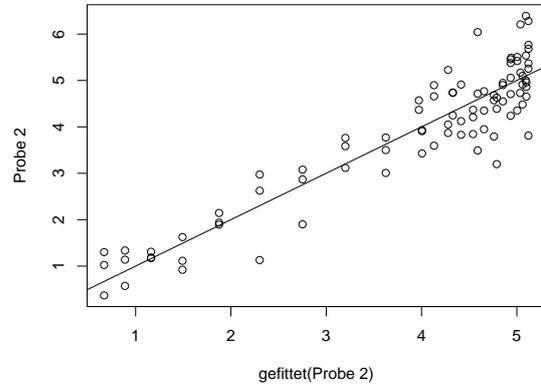
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	5.68	0.38	14.80	0
w	1.01	0.14	7.27	0
y	1.53	0.15	10.49	0
f	0.01	0	2.99	0.0036154



*A Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des  
Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch*

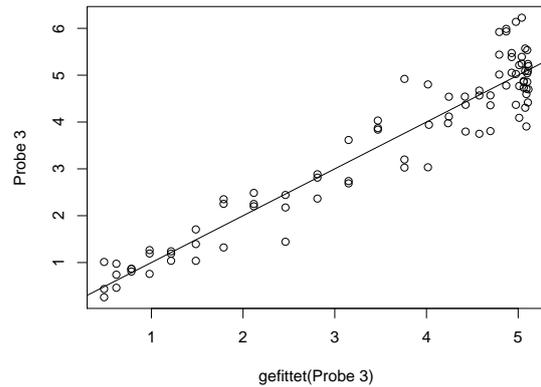
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	5.63	0.24	23.76	0
w	1.49	0.17	8.77	0
y	2.33	0.23	10.29	0
f	0.01	0	4.24	5.64e-05



**Probe 3**

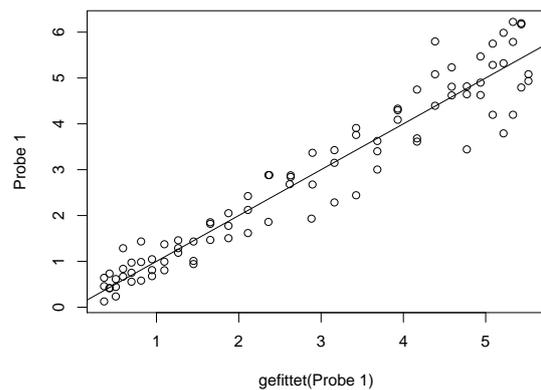
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	5.13	0.11	47.37	0
w	1.24	0.11	11.35	0
y	2.53	0.21	12.01	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 89**

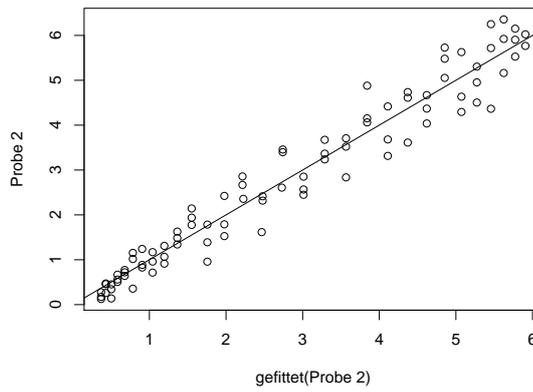
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	6.02	0.32	18.87	0
w	0.81	0.07	10.94	0
y	2.92	0.17	16.72	0



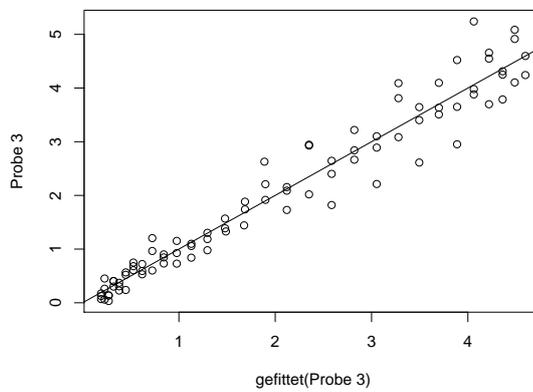
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	6.79	0.38	17.67	0
w	0.74	0.06	13.01	0
y	3.02	0.13	22.93	0



**Probe 3**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	5.26	0.31	16.78	0
w	0.82	0.07	12.32	0
y	3.45	0.17	20.23	0

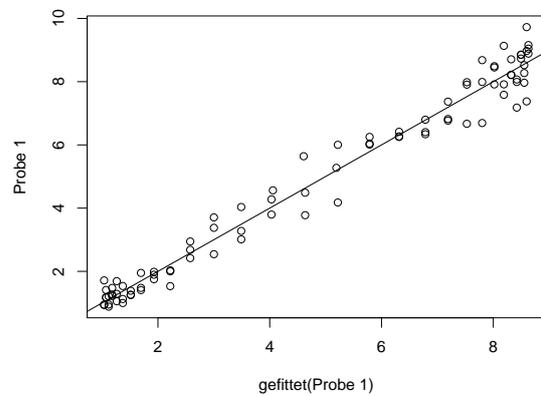


## A.2 *C. divergens*

### Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 47

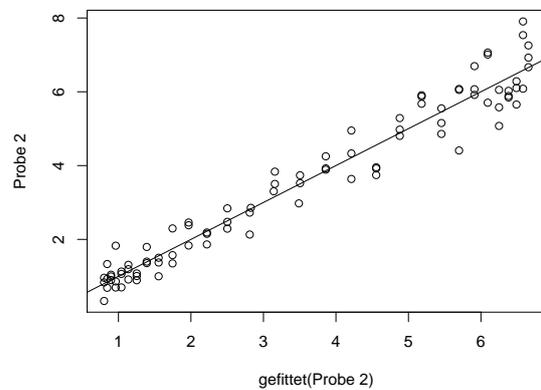
#### Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	7.78	0.25	30.98	0
w	1.37	0.11	12.58	0
y	4.64	0.38	12.26	0
z	0.94	0.15	6.12	0



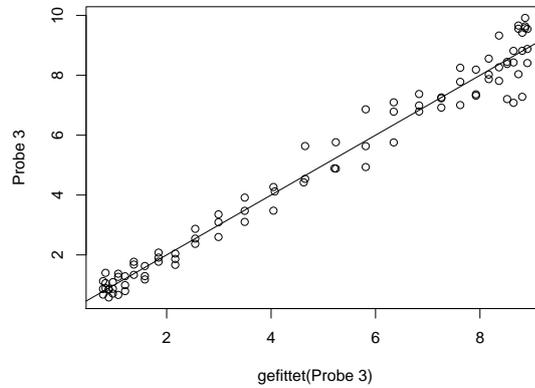
#### Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	6.34	0.43	14.90	0
w	1.02	0.13	7.77	0
y	3.78	0.47	7.98	0
z	0.63	0.21	3.04	0.0031579



**Probe 3**

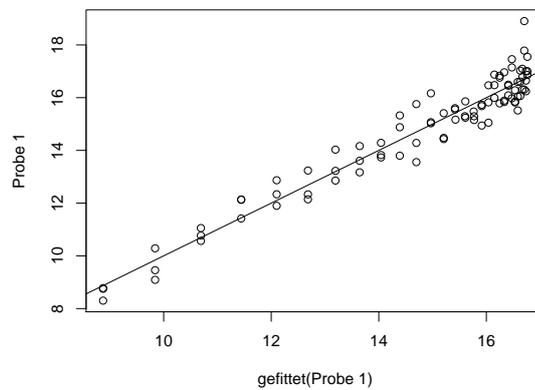
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	8.41	0.30	27.83	0
w	1.27	0.11	11.98	0
y	4.31	0.37	11.64	0
z	0.64	0.18	3.50	0.0007359



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 59**

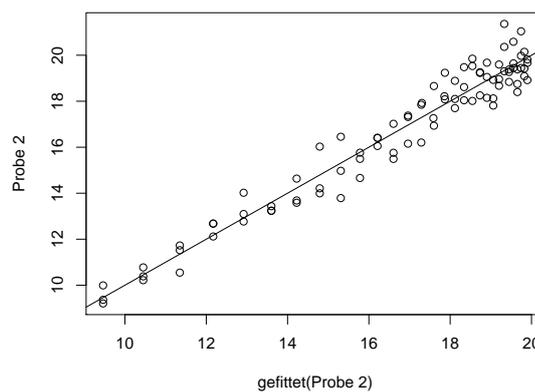
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	9.19	0.28	33.09	0
w	0.58	0.04	13.19	0
u	16.96	0.16	103.29	0



**Probe 2**

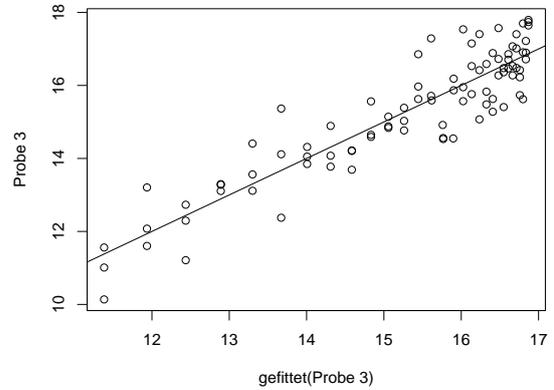
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	12.29	0.31	39.95	0
w	0.42	0.03	12.17	0
u	20.67	0.32	65.16	0



*A Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch*

**Probe 3**

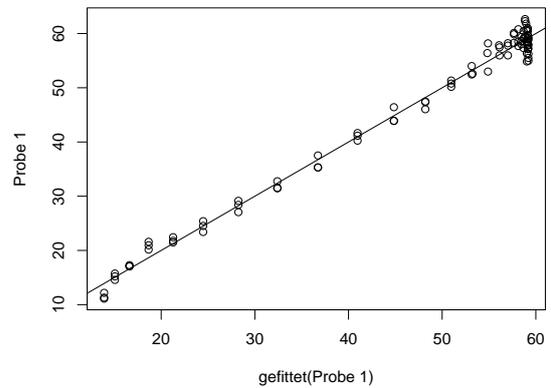
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	6.41	0.31	20.72	0
w	0.46	0.07	6.66	0
u	17.18	0.28	61.20	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 63**

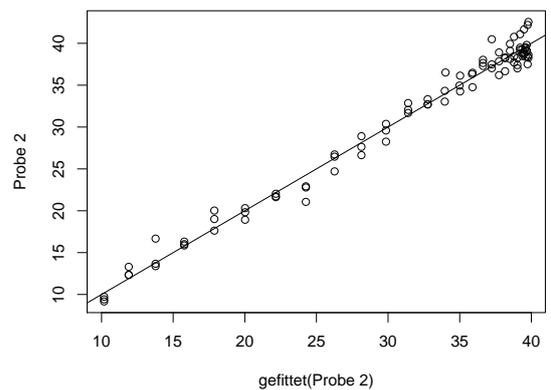
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	48.22	1.24	38.97	0
w	1.64	0.08	19.49	0
y	3.11	0.21	14.94	0
z	11.01	1.11	9.93	0



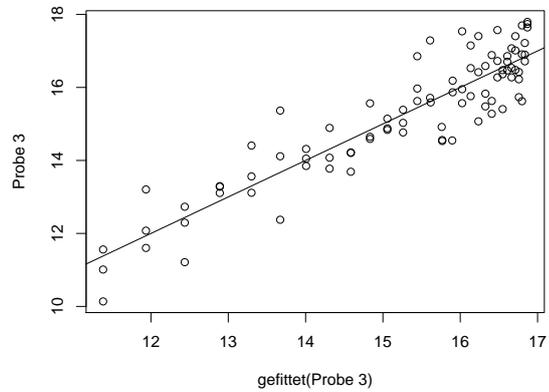
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	40.02	0.27	150.63	0
w	0.98	0.03	31.25	0
y	1.29	0.05	28.64	0



**Probe 3**

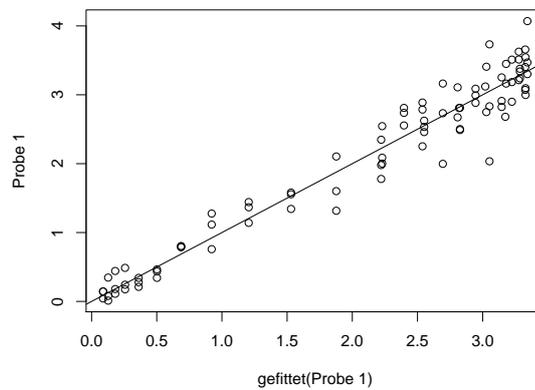
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	19.88	1.04	19.09	0
w	1.46	0.12	12.58	0
y	2.33	0.29	7.97	0
z	6.68	0.97	6.91	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 87**

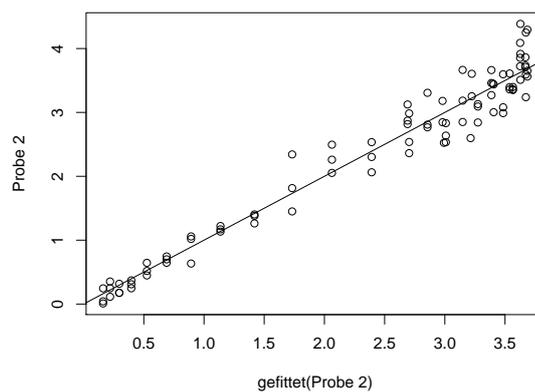
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	3.98	0.15	26.25	0
w	1.71	0.13	12.96	0
y	4.16	0.27	15.26	0
f	0.01	0	7.78	0



**Probe 2**

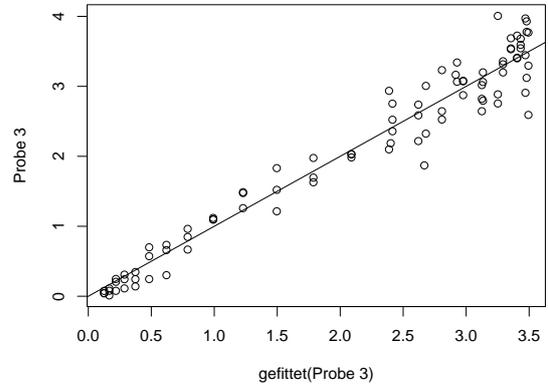
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	4.46	0.18	24.78	0
w	1.46	0.10	14.64	0
y	3.60	0.19	18.66	0
f	0.01	0	7.06	0



A Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch

**Probe 3**

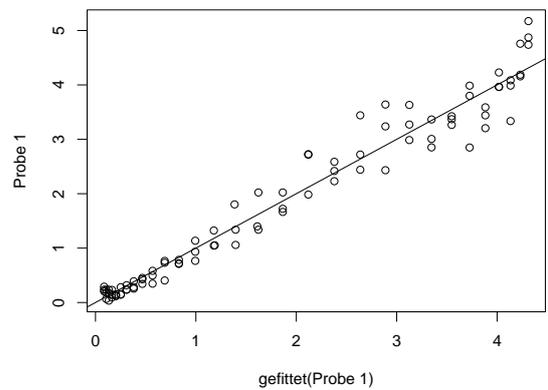
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	4.69	0.28	16.90	0
w	1.34	0.10	13.92	0
y	3.89	0.20	19.26	0
f	0.01	0	6.57	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 89**

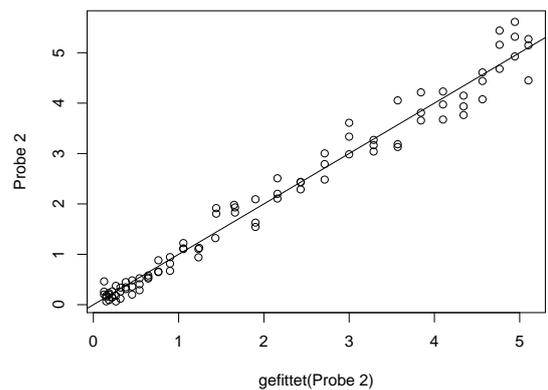
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	4.67	0.19	24.97	0
w	1.01	0.07	14.05	0
y	4.20	0.22	18.81	0



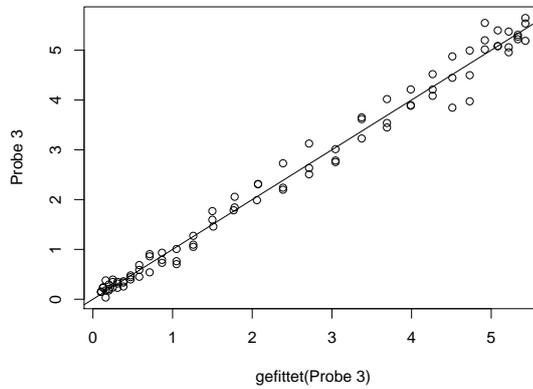
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	6.02	0.27	22.49	0
w	0.87	0.05	18.16	0
y	4.04	0.14	29.22	0



**Probe 3**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	5.83	0.12	47.14	0
w	1.04	0.04	25.37	0
y	4.25	0.13	33.30	0

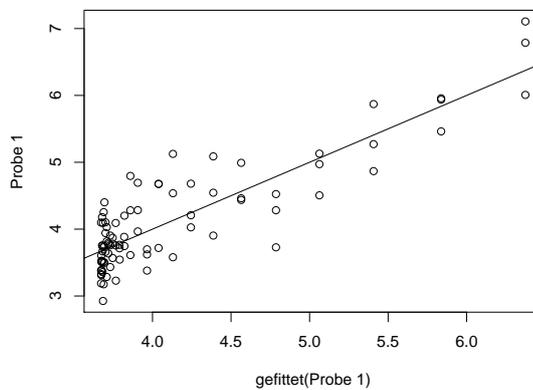


**A.3 *Ps. fragi***

**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 41**

**Probe 1**

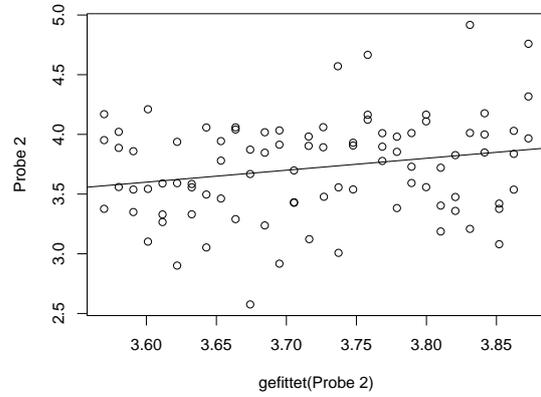
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	3.67	0.07	55.53	0
b	3.37	0.28	12.17	0
w	1.00	0.14	7.42	0



*A Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des  
Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch*

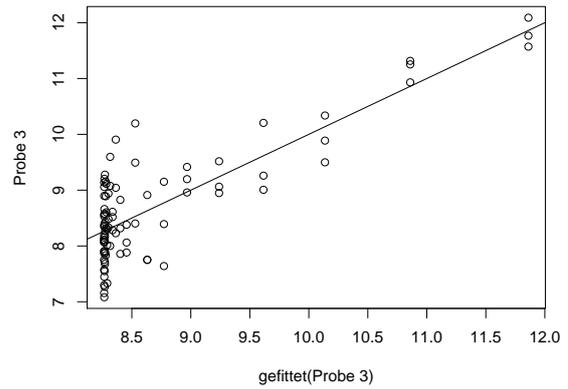
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	3.88	0.09	43.98	0
d	-0.05	0.02	-2.10	0.0385021



**Probe 3**

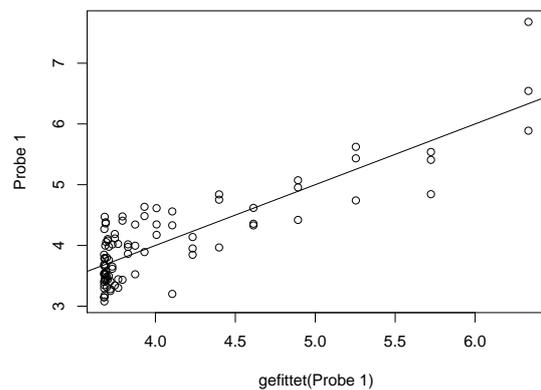
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	8.26	0.08	100.60	0
b	4.98	0.57	8.72	0
w	1.48	0.23	6.36	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 43**

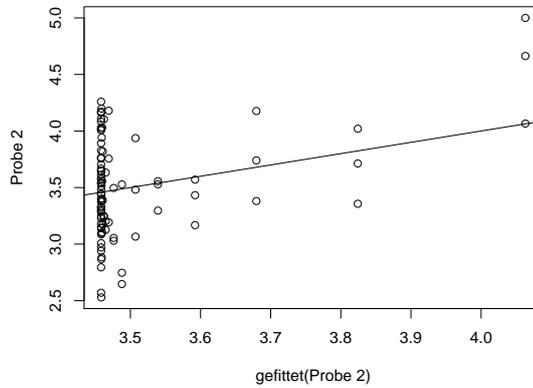
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	3.68	0.06	59.62	0
b	3.45	0.32	10.66	0
w	1.19	0.17	7.07	0



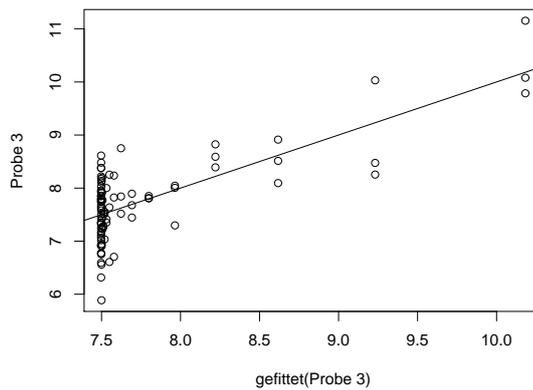
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	3.46	0.05	67.74	0
w	2.28	0.91	2.52	0.0136357



**Probe 3**

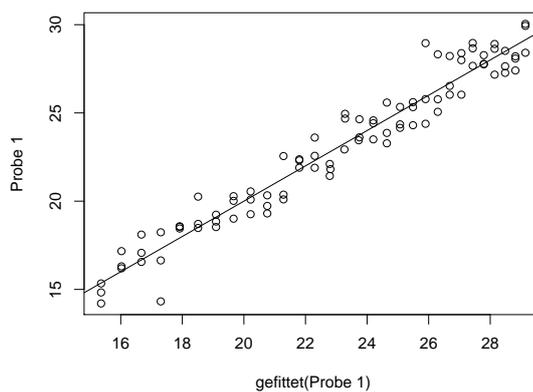
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	7.50	0.07	106.33	0.0e+00
b	4.16	0.71	5.89	1.0e-07
w	1.99	0.41	4.80	6.6e-06



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 59**

**Probe 1**

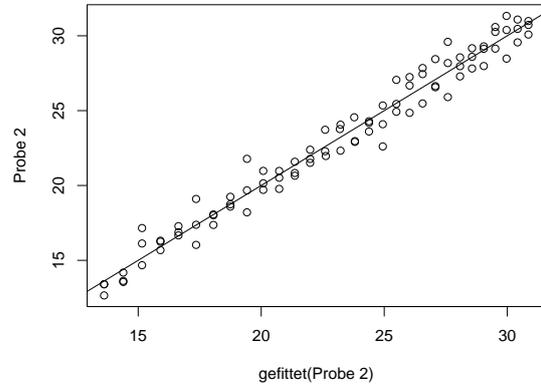
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	27.08	4.62	5.87	0.0000001
w	0.12	0.03	3.82	0.0002493
u	41.77	4.87	8.57	0



*A Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Hähnchenfleisch*

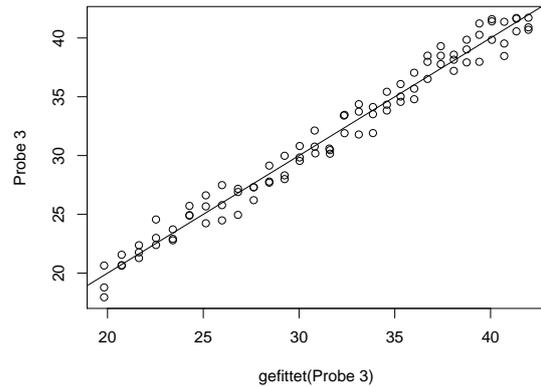
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	39.39	6.47	6.08	0
w	0.09	0.02	4.34	3.87e-05
u	52.21	6.70	7.79	0



**Probe 3**

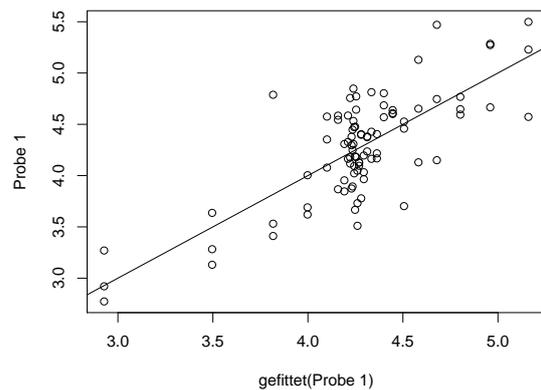
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	69.34	17.34	4.00	0.0001332
w	0.06	0.02	3.21	0.0018448
u	88.23	17.61	5.01	0.0000028



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 63**

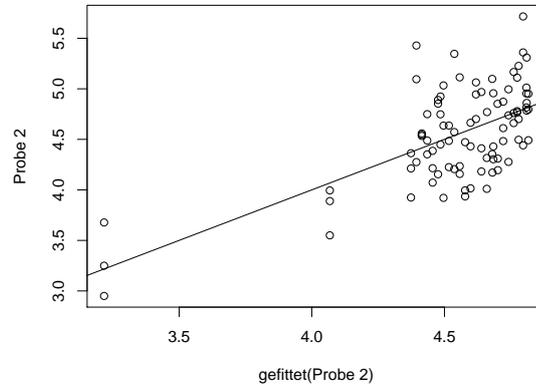
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	2.31	0.60	3.83	0
w1	2.60	0.82	3.17	0
u	4.23	0.07	57.63	0
w2	1.11	0.42	2.64	0.01
x	6.68	0.16	41.02	0



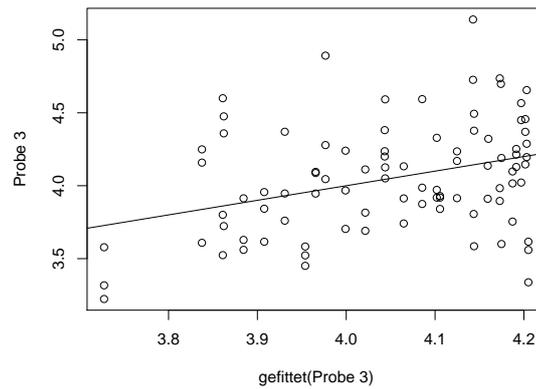
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	3.48	0.85	4.08	0
w	3.13	0.91	3.45	0
d	0.09	0.03	3.24	0
u	4.99	0.12	39.99	0



**Probe 3**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
d	0.11	0.02	5.54	0
u	4.55	0.08	59.66	0



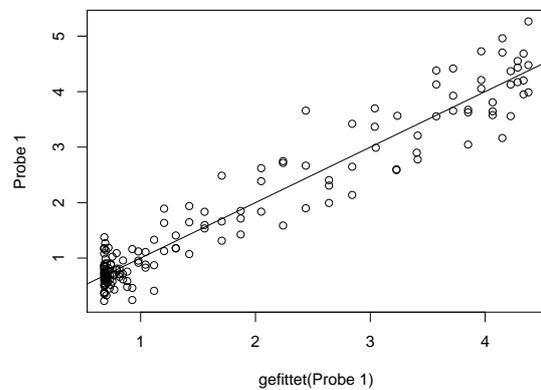
# B Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Hähnchenfleisch

## B.1 Spontanverderb bei 4 °C

Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 47

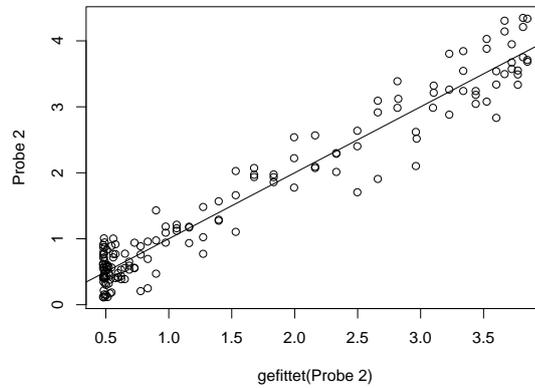
Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	3.89	0.20	19.81	0
w	0.95	0.10	9.57	0
y	8.03	0.77	10.49	0
z	0.68	0.05	13.69	0



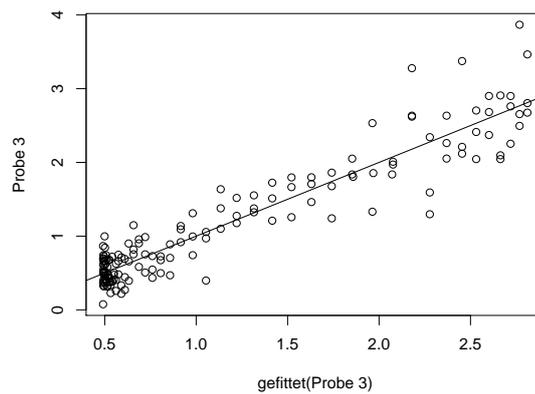
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	3.55	0.16	22.40	0
w	0.86	0.08	10.86	0
y	7.05	0.59	11.94	0
z	0.47	0.04	10.74	0



**Probe 3**

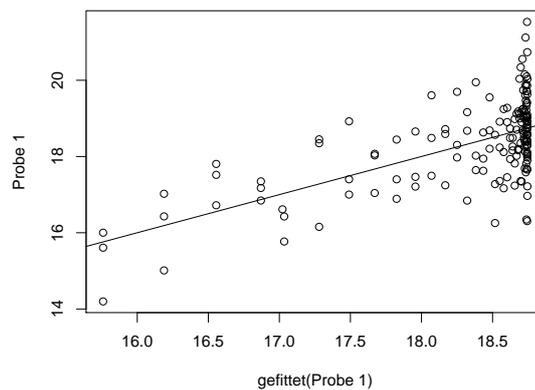
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	2.58	0.23	11.10	0
w	0.79	0.11	6.91	0
y	6.93	0.86	8.09	0
z	0.49	0.04	11.29	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 59**

**Probe 1**

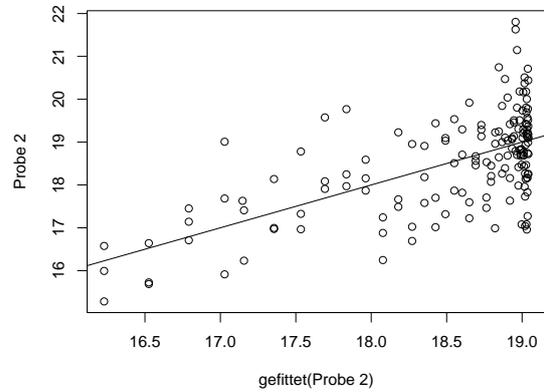
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	3.49	0.48	7.24	0
w	0.70	0.15	4.56	1.03e-05
u	18.75	0.10	186.80	0



B Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von  
Hähnchenfleisch

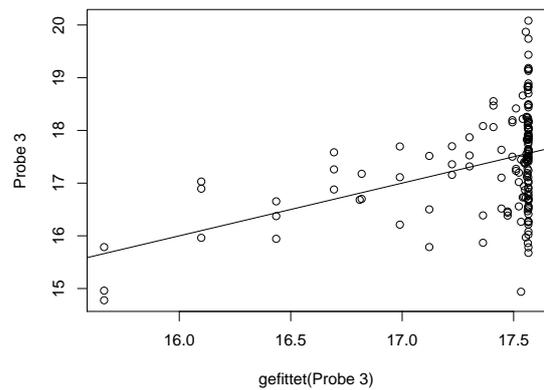
Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	3.15	0.40	7.91	0
w	0.50	0.12	4.21	4.24e-05
u	19.05	0.13	149.94	0



Probe 3

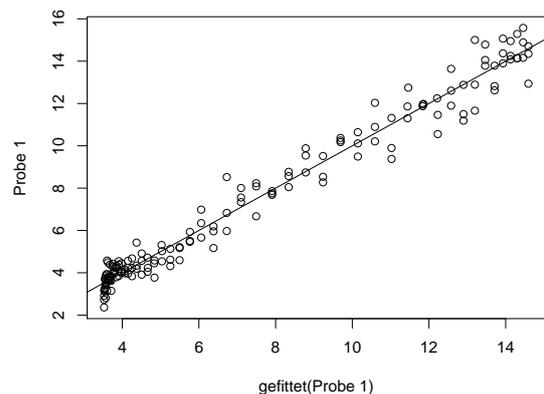
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	2.47	0.70	3.53	0.000537
w	1.18	0.45	2.65	0.008888
u	17.57	0.08	208.26	0



Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 63

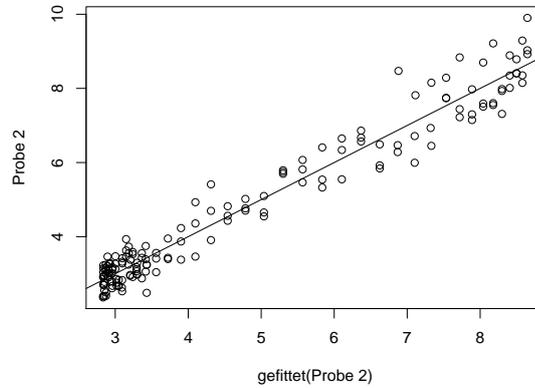
Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	12.04	0.44	27.13	0
w	0.69	0.05	15.21	0
y	5.48	0.31	17.39	0
z	3.47	0.12	28.66	0



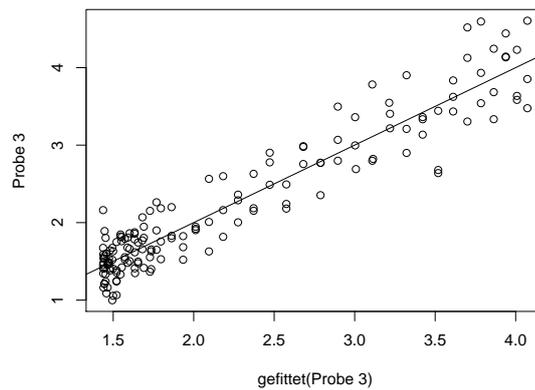
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	8.20	0.61	13.43	0
w1	0.67	0.07	9.44	0
y	5.34	0.57	9.44	0
b	3.46	0.14	24.38	0
w2	0.10	0.03	3.25	0.0013964



**Probe 3**

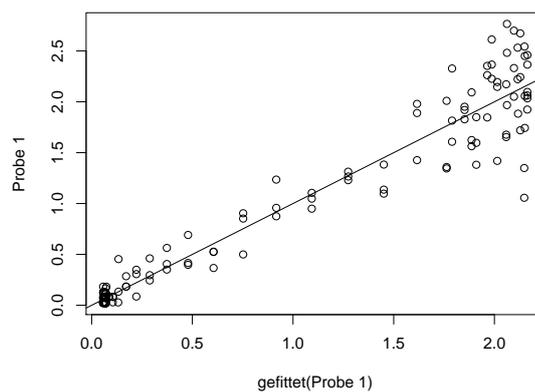
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	4.50	0.71	6.33	0
w1	0.50	0.11	4.74	0.0000048
y	4.29	0.82	5.24	0.0000005
b	1.75	0.09	19.42	0
w2	0.13	0.06	2.18	0.0306572



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 87**

**Probe 1**

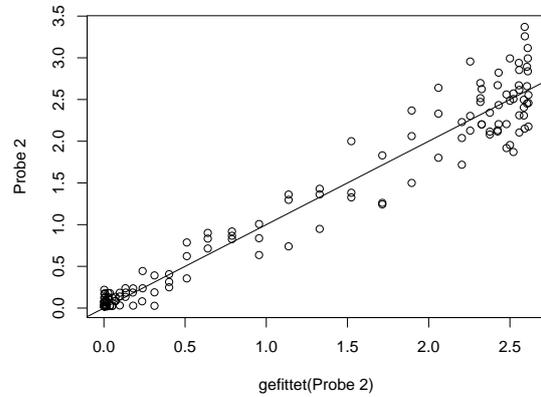
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	2.91	0.34	8.52	0
w	1.30	0.16	8.04	0
y	9.53	1.09	8.76	0
z	0.07	0.03	2.29	0.0234172
f	0.0007	0	3.00	0.0031031



B Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Hähnchenfleisch

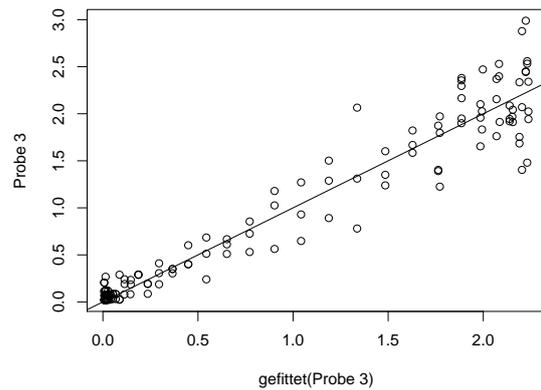
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	3.50	0.33	10.60	0
w	1.15	0.10	11.10	0
y	8.17	0.64	12.79	0
f	0.0008	0	3.20	0.0016878



**Probe 3**

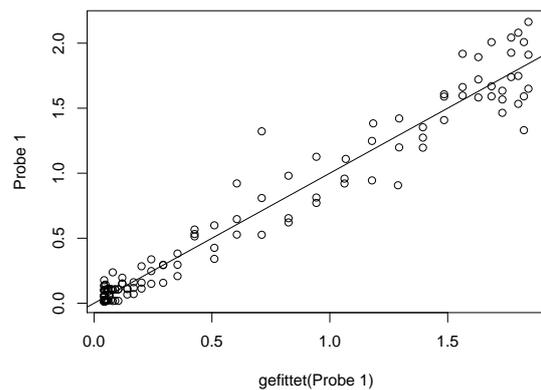
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	4.81	0.96	5.00	0.0000015
w	0.85	0.08	10.48	0
y	6.80	0.48	14.14	0
f	0.002	0	3.17	0.0018424



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 89**

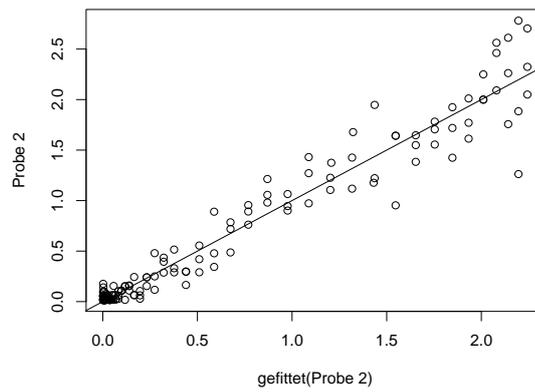
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	1.87	0.06	30.79	0
w	1.16	0.09	13.40	0
y	10.22	0.71	14.33	0
z	0.04	0.02	2.78	0.0060694



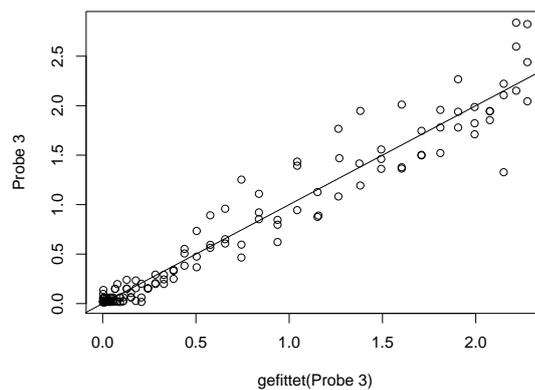
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	2.51	0.13	19.59	0
w	0.83	0.06	13.13	0
y	7.53	0.47	16.11	0



**Probe 3**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	2.67	0.16	16.44	0
w	0.77	0.06	13.21	0
y	7.14	0.42	17.17	0

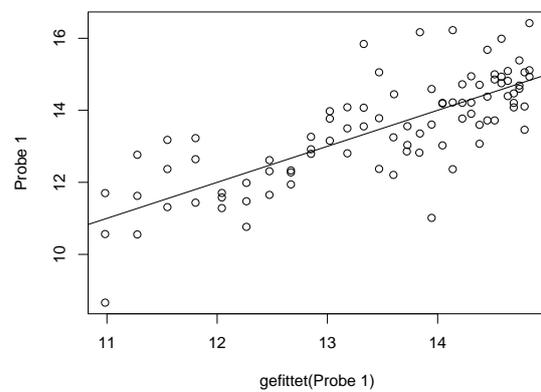


## B.2 Spontanverderb bei 10 °C

### Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 59

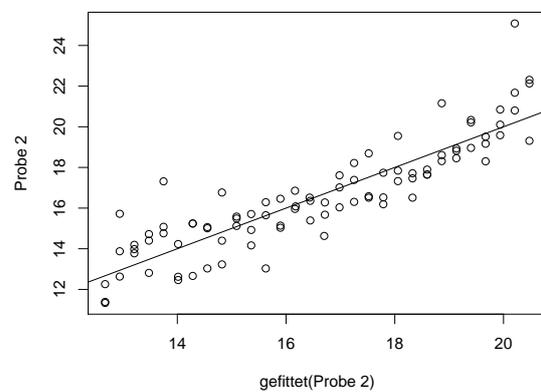
#### Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	4.79	0.57	8.43	0
w	0.31	0.11	2.69	0.0086112
u	15.47	0.72	21.40	0



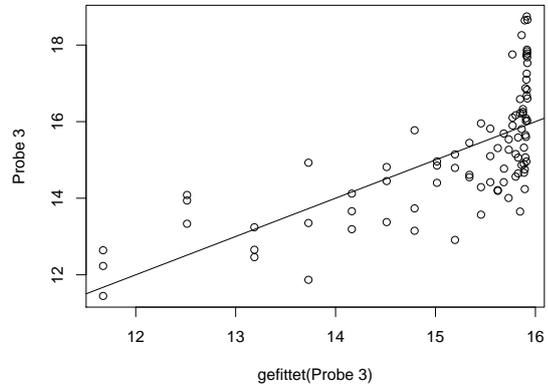
#### Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	12.40	0.27	46.56	0
d	1.22	0.07	17.94	0



**Probe 3**

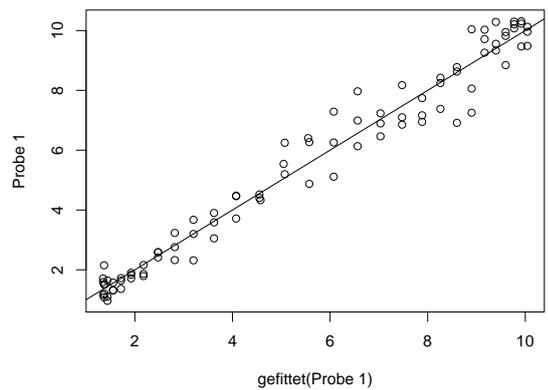
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	5.30	0.61	8.76	0
u	15.93	0.15	107.17	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 63**

**Probe 1**

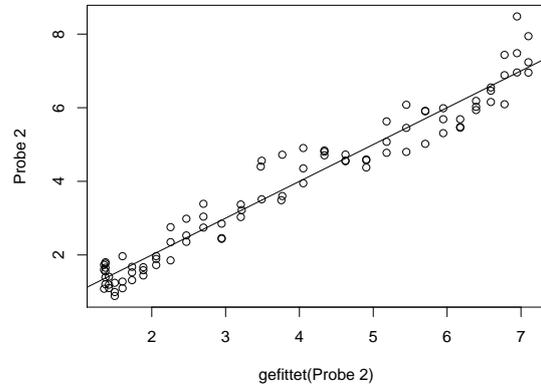
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	10.68	0.32	33.83	0
w	0.87	0.06	14.25	0
y	2.99	0.16	18.32	0
b	0.96	0.35	2.73	0.0077072



*B Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von  
Hähnchenfleisch*

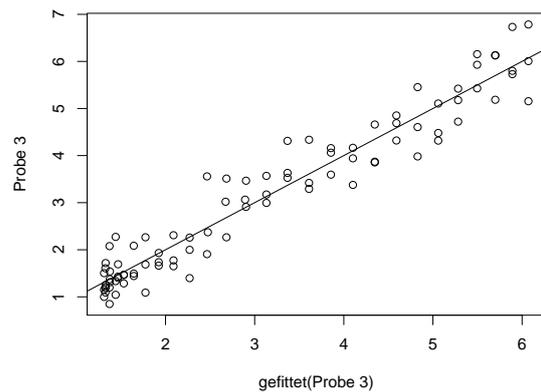
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	8.35	0.55	15.14	0
w	0.63	0.07	9.51	0
y	2.43	0.14	17.51	0
b	0.76	0.33	2.30	0.0236457



**Probe 3**

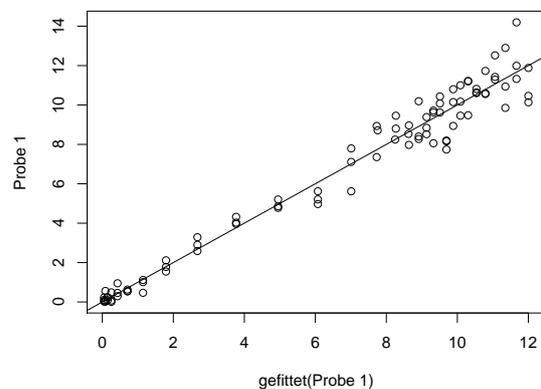
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	7.84	0.85	9.20	0
w	0.58	0.07	7.96	0
y	2.59	0.13	19.70	0
b	1.06	0.31	3.45	0.0008605



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 87**

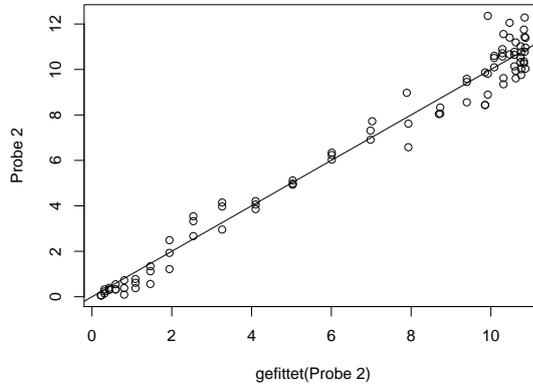
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	8.53	0.29	29.04	0
w	2.44	0.25	9.72	0
y	5.67	0.55	10.38	0
f	-0.01	0	-7.06	0



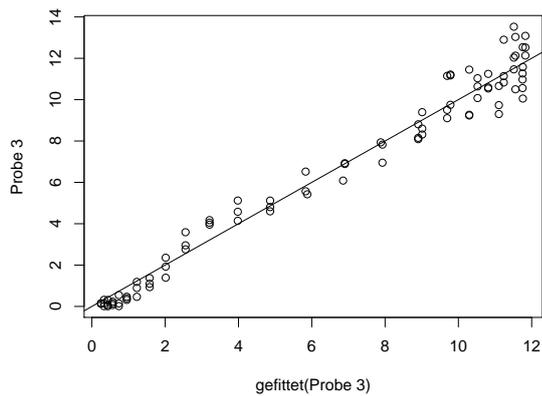
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	12.45	0.56	22.40	0
w	1.51	0.10	15.72	0
y	4.31	0.22	20.03	0
f	0.01	0	3.50	0.0007303



**Probe 3**

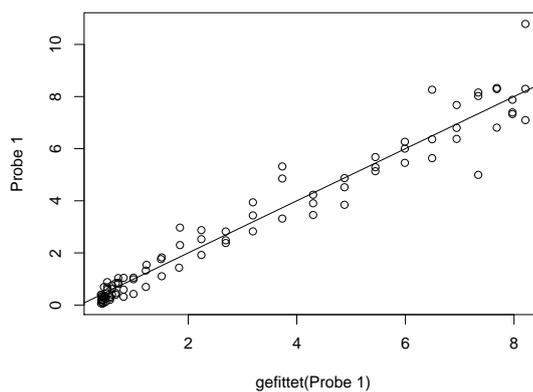
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	17.25	1.17	14.71	0
w	1.31	0.08	17.17	0
y	4.50	0.18	25.05	0
f	0.03	0	6.16	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 89**

**Probe 1**

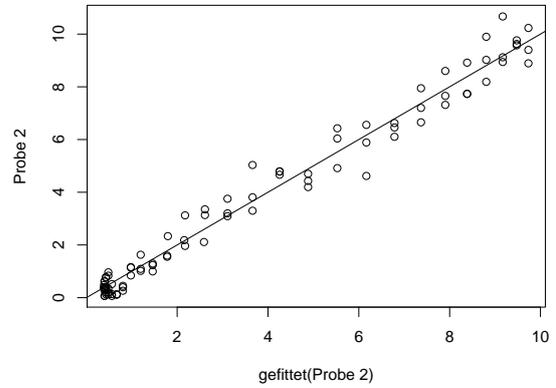
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	9.16	0.52	17.50	0
w	1.15	0.10	11.09	0
y	5.45	0.38	14.46	0
b	0.82	0.29	2.86	0.0052851



*B Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Hähnchenfleisch*

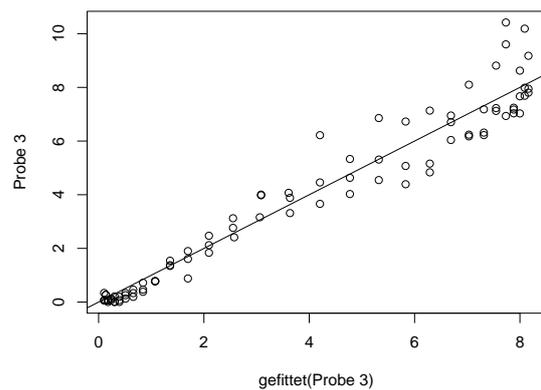
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	10.83	0.41	26.35	0
w	1.08	0.07	16.27	0
y	4.98	0.23	21.58	0
b	0.49	0.24	2.02	0.0466917



**Probe 3**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	8.40	0.28	29.97	0
w	1.24	0.11	11.67	0
y	4.65	0.34	13.62	0





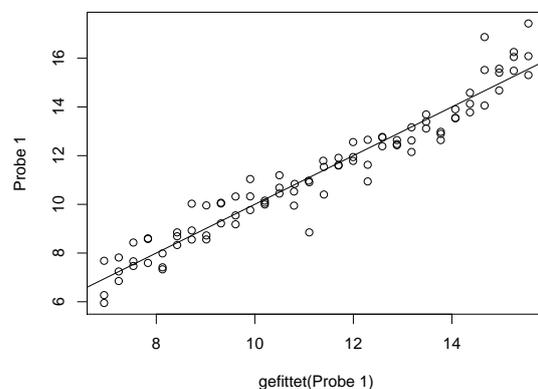
# C Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Rindfleisch

## C.1 *L. piscium* 9.3

### Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 59

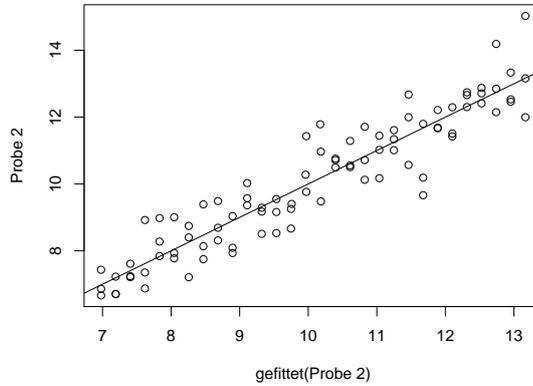
Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	6.64	0.15	45.24	0
d	1.35	0.04	35.89	0



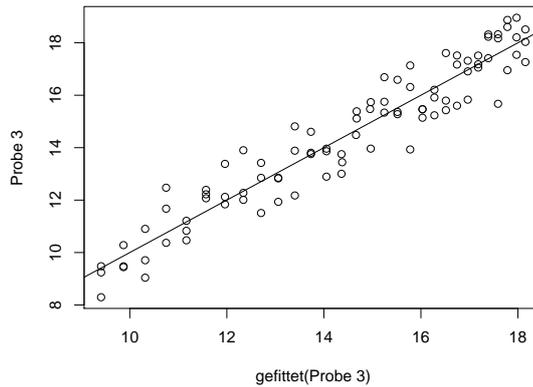
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	6.77	0.15	44.92	0
d	0.97	0.04	25.15	0



**Probe 3**

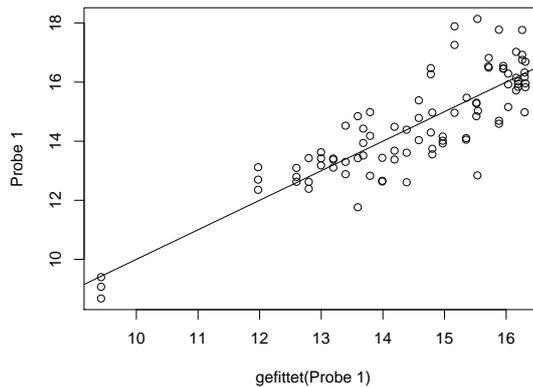
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	14.61	2.19	6.68	0
w	0.15	0.04	3.77	0.0003016
u	23.54	2.39	9.83	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 63**

**Probe 1**

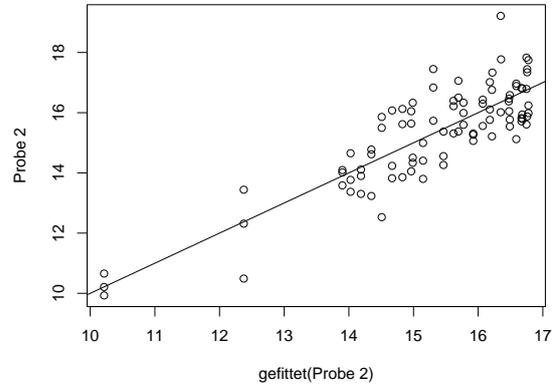
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	12.92	1.03	12.48	0
w	1.66	0.25	6.60	0
z	18.58	0.50	37.05	0
d	0.91	0.10	8.65	0



*C Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des  
Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Rindfleisch*

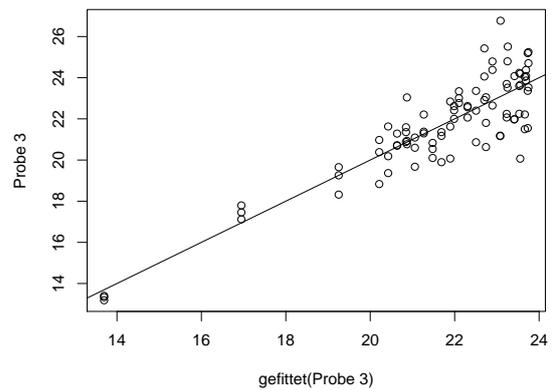
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	11.69	0.86	13.66	0
w	1.45	0.22	6.45	0
z	18.87	0.54	35.01	0
d	0.73	0.11	6.71	0



**Probe 3**

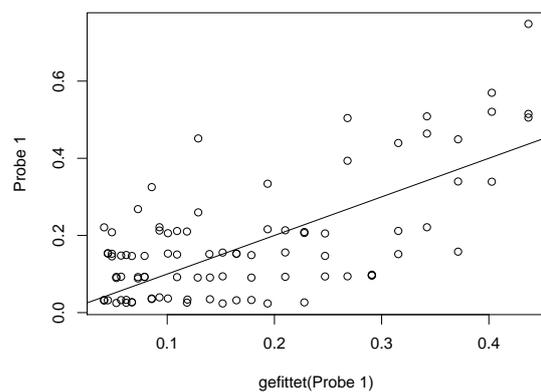
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	17.44	1.13	15.44	0
w	1.45	0.20	7.29	0
z	26.58	0.71	37.31	0
d	0.96	0.14	6.68	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 87**

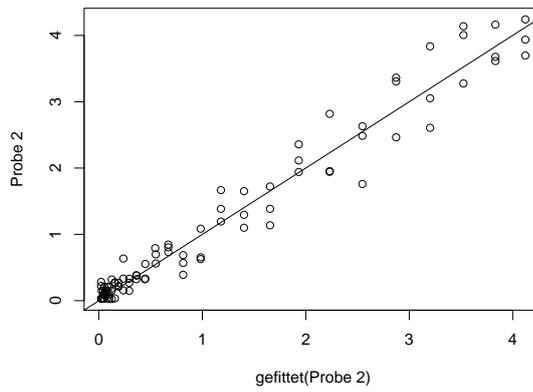
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	0.04	0.01	3.65	0.0004467
w	0.37	0.05	7.49	0



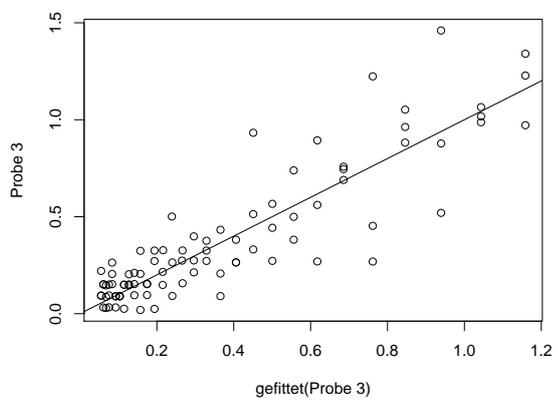
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	5.92	0.70	8.46	0
w	1.01	0.09	11.62	0
y	5.84	0.28	20.50	0



**Probe 3**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	0.05	0.01	5.01	2.8e-06
w	0.48	0.03	13.78	0

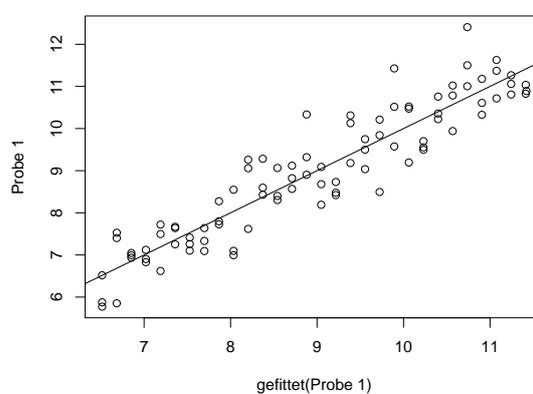


## C.2 *L. piscium* 14

### Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 59

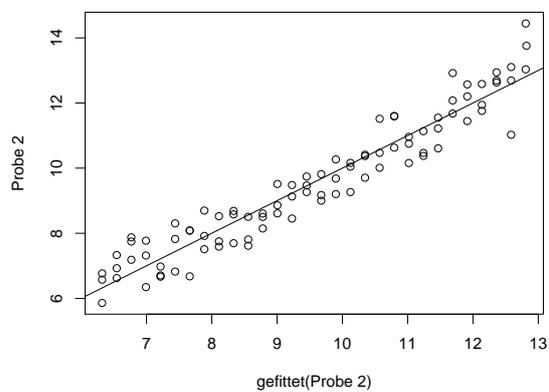
#### Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	6.35	0.13	49.99	0
d	0.77	0.03	23.63	0



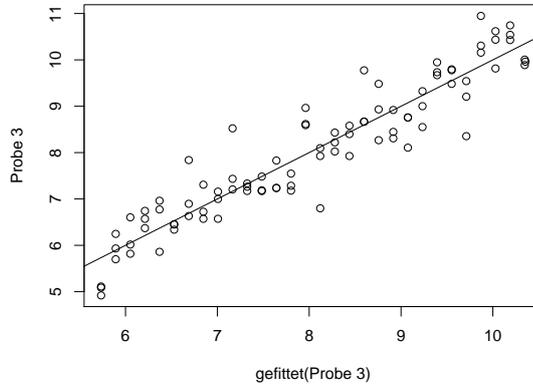
#### Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	6.10	0.13	47.66	0
d	1.02	0.03	31.05	0



**Probe 3**

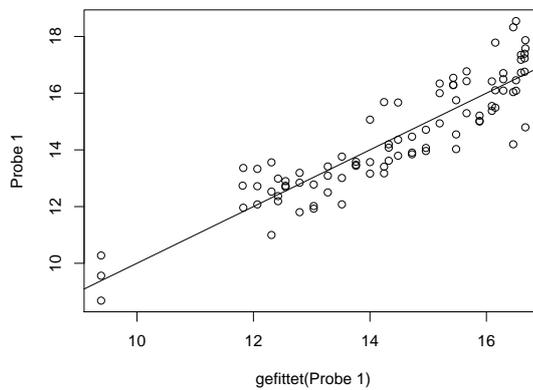
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	5.58	0.11	51.01	0
d	0.72	0.03	25.83	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 63**

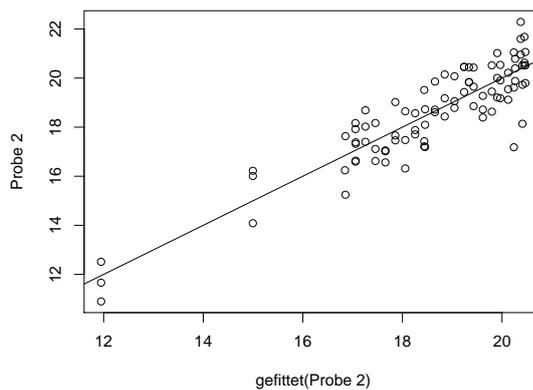
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	14.48	1.08	13.37	0
w	1.94	0.24	7.97	0
d	1.10	0.08	12.96	0
u	19.09	0.39	48.38	0



**Probe 2**

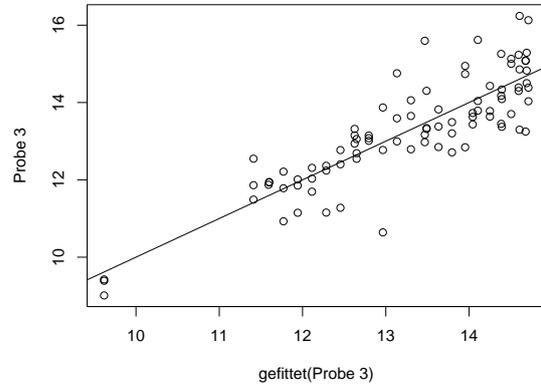
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	15.38	0.96	16.08	0
w	1.64	0.20	8.39	0
d	0.91	0.10	9.16	0
u	22.87	0.48	47.89	0



C Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Rindfleisch

**Probe 3**

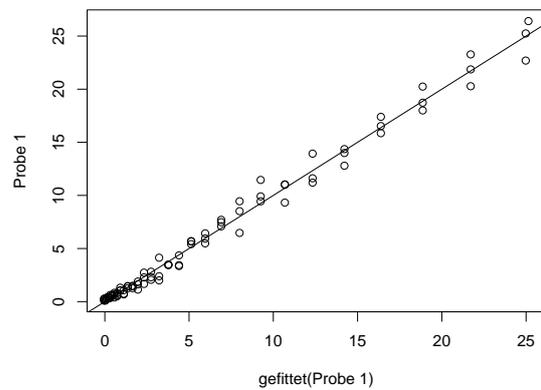
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	9.69	0.72	13.46	0
w	1.51	0.23	6.56	0
d	0.78	0.09	9.04	0
u	16.74	0.42	39.73	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 87**

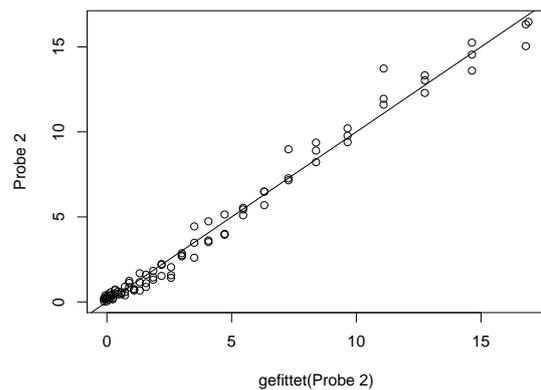
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	-0.52	0.18	-2.83	0.005809
b	0.42	0.05	8.59	0
w	0.62	0.02	35.06	0



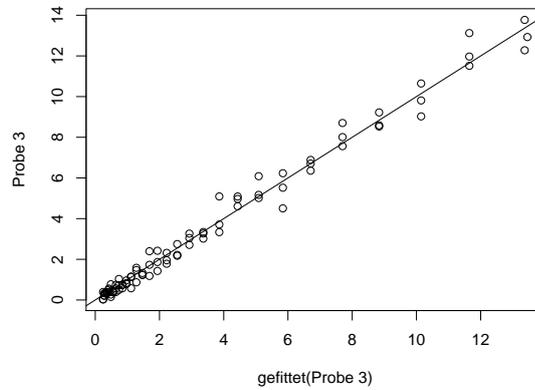
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	-0.47	0.15	-3.05	0.003051
b	0.31	0.04	7.24	0
w	0.61	0.02	28.86	0



**Probe 3**

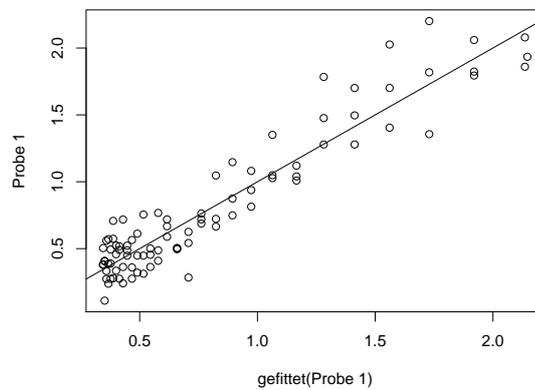
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	0.21	0.01	14.43	0
w	0.63	0.01	53.98	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 89**

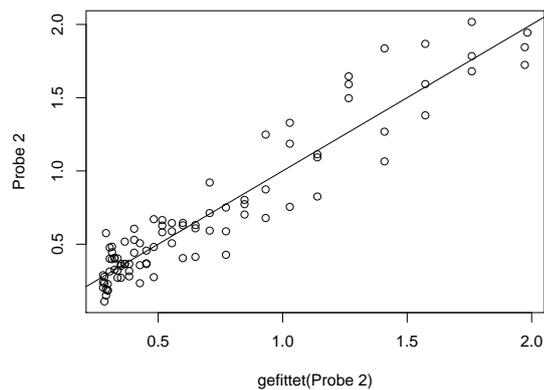
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	0.30	0.05	5.79	0.0000001
b	0.04	0.02	2.62	0.0103258
w	0.57	0.06	9.84	0



**Probe 2**

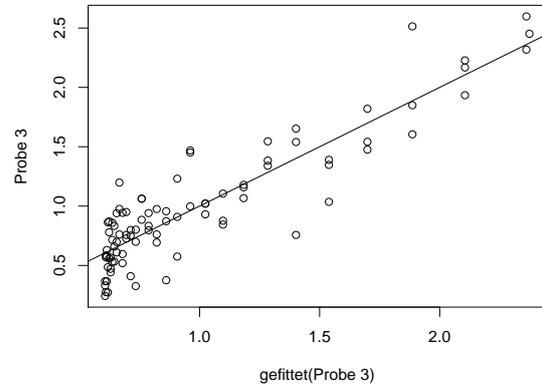
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	0.24	0.04	5.48	0.0000004
b	0.03	0.01	2.64	0.0097570
w	0.60	0.06	10.37	0



*C Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zur Bestimmung des Metabolitspektrums von Einzelstämmen bei Rindfleisch*

**Probe 3**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	0.59	0.05	11.33	0
b	0.02	0.01	1.72	0.0897447
w	0.71	0.09	7.88	0





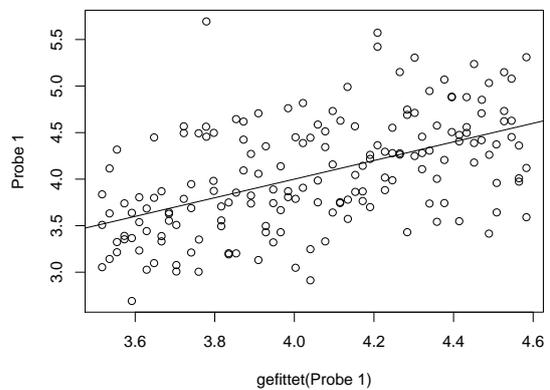
# D Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Rindfleisch

## D.1 Spontanverderb bei 4 °C

### Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 33

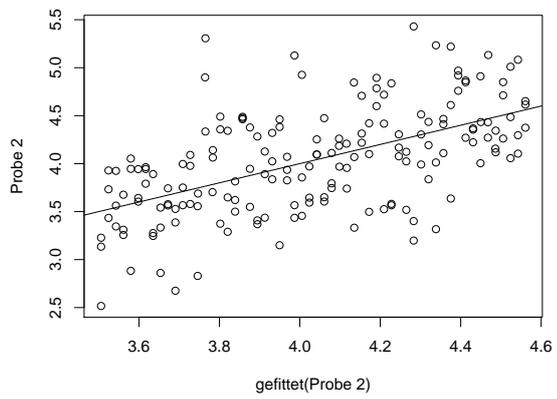
#### Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	3.50	0.08	44.22	0
d	0.08	0.01	8.02	0



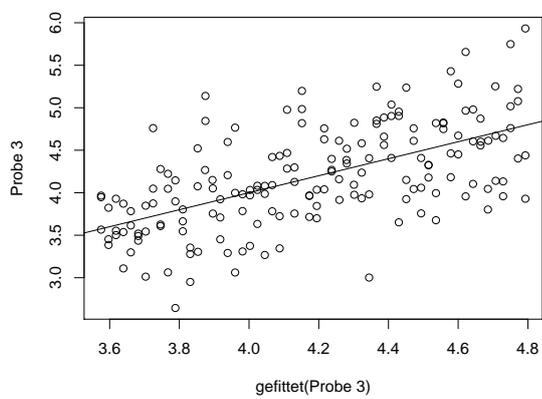
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	3.49	0.07	49.14	0
d	0.08	0.01	8.84	0



**Probe 3**

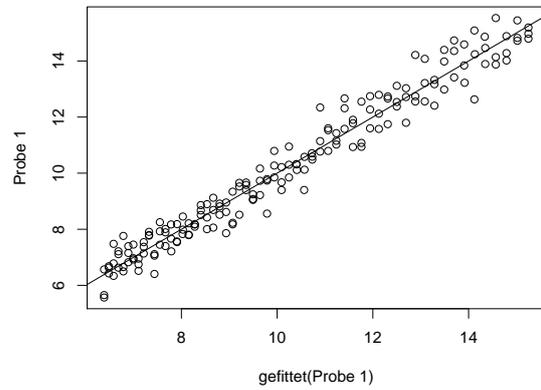
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	3.55	0.07	48.09	0
d	0.10	0.01	9.80	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 59**

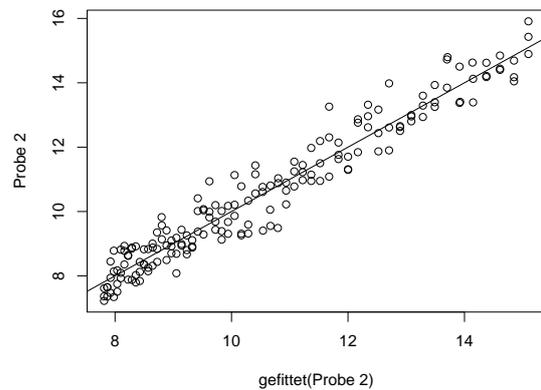
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	6.29	0.06	101.90	0
w	0.07	0	63.36	0



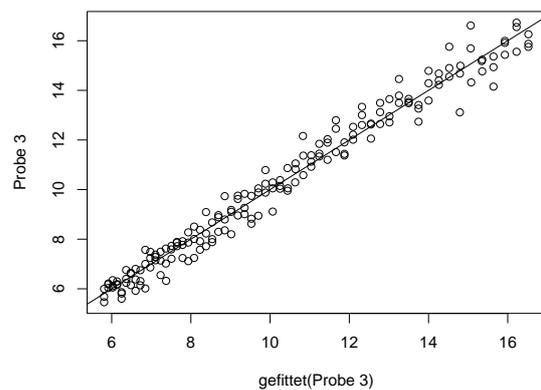
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	5.84	0.46	12.57	0
b	1.92	0.38	5.08	1e-06
w	0.12	0.01	10.01	0



**Probe 3**

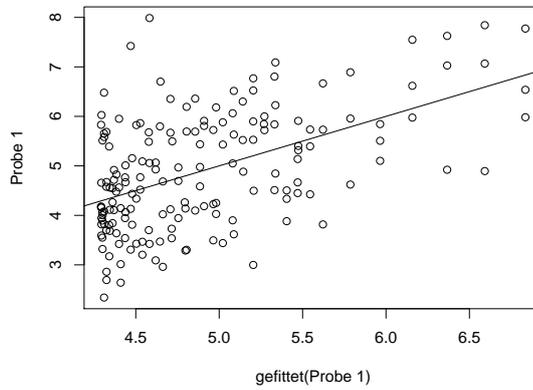
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	5.70	0.06	99.60	0
w	0.08	0	76.47	0



## Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 61

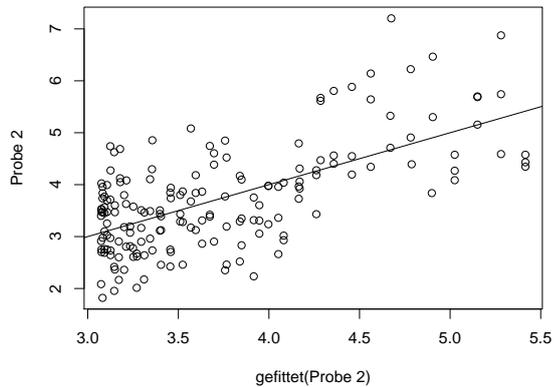
### Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b1	4.77	0.73	6.51	0
w1	0.29	0.11	2.60	0.0102132
b2	2.33	0.88	2.65	0.0087515
w2	0.07	0.03	2.23	0.0273155



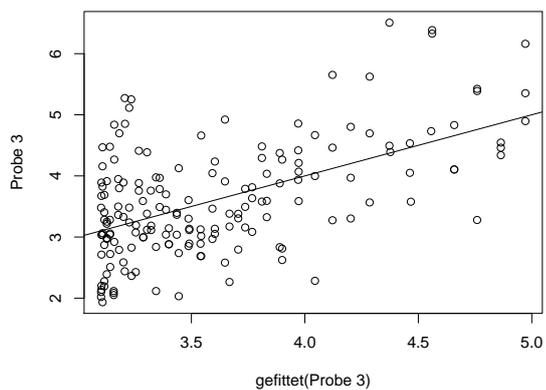
### Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b1	3.41	0.23	14.93	0
w1	0.21	0.03	8.11	0
w2	0.13	0	42.86	0



### Probe 3

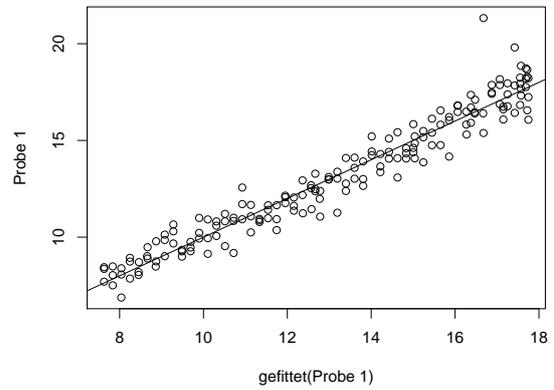
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b1	3.06	0.22	14.08	0
w1	0.17	0.03	6.63	0
w2	0.12	0	31.07	0



Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 63

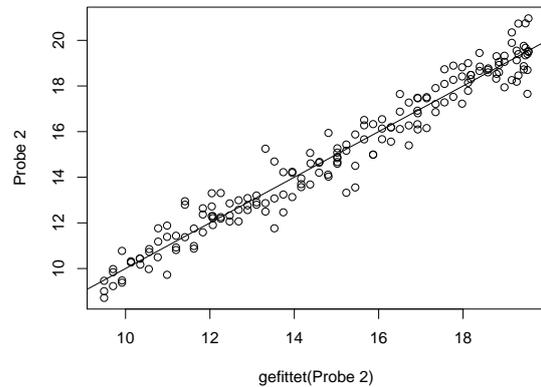
Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	10.80	1.14	9.51	0
w	2.17	0.29	7.47	0
d	0.93	0.02	44.36	0
u	19.57	0.17	115.08	0



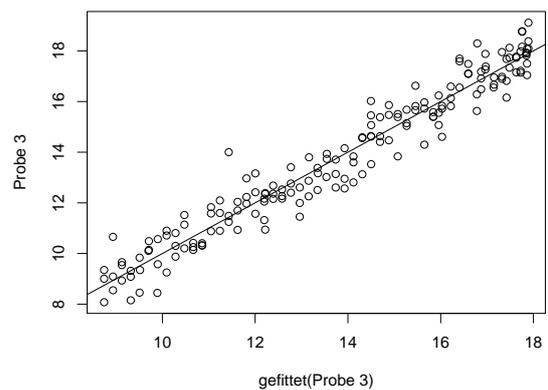
Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	14.26	0.79	17.95	0
w	1.83	0.14	13.01	0
d	0.96	0.02	51.88	0
u	21.81	0.15	143.24	0



Probe 3

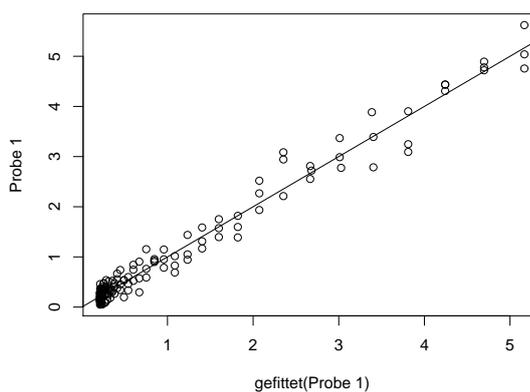
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	11.16	0.80	13.88	0
w	1.83	0.18	10.05	0
d	0.87	0.02	46.19	0
u	19.87	0.15	128.62	0



## Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 87

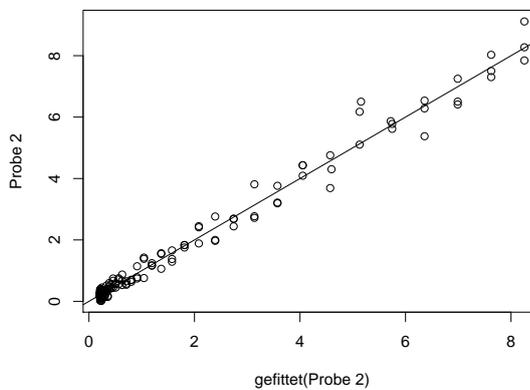
### Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	11.33	2.24	5.07	1e-06
w	0.78	0.05	14.74	0
y	10.19	0.38	26.81	0
z	0.21	0.02	10.05	0



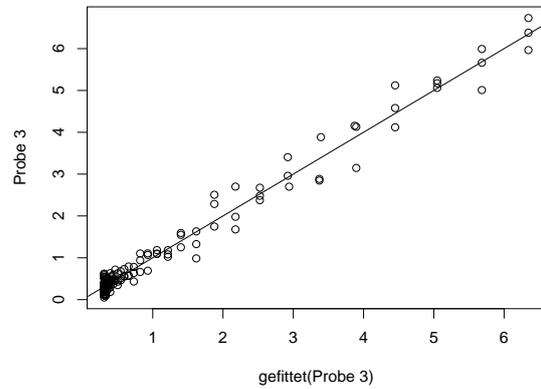
### Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	14.22	1.41	10.06	0
w	0.81	0.04	19.53	0
y	10.12	0.34	29.33	0
z	0.21	0.03	7.50	0



**Probe 3**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	13.58	2.39	5.67	1e-07
w	0.91	0.06	16.22	0
y	11.87	0.45	26.45	0
z	0.31	0.02	14.59	0

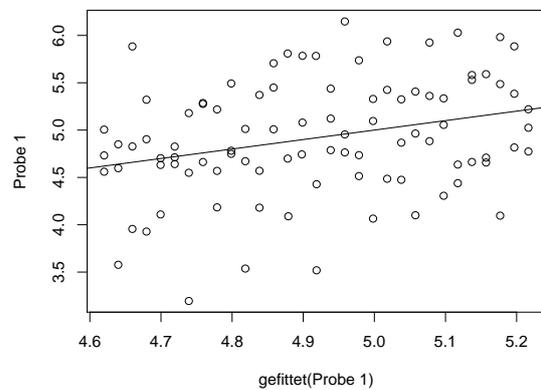


**D.2 Spontanverderb bei 10 °C**

**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 33**

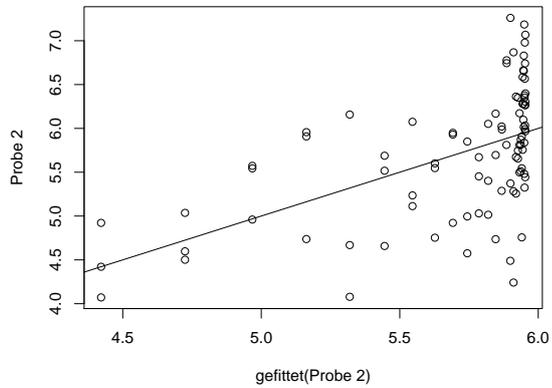
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	4.60	0.12	36.92	0
d	0.09	0.03	2.93	0.0043372



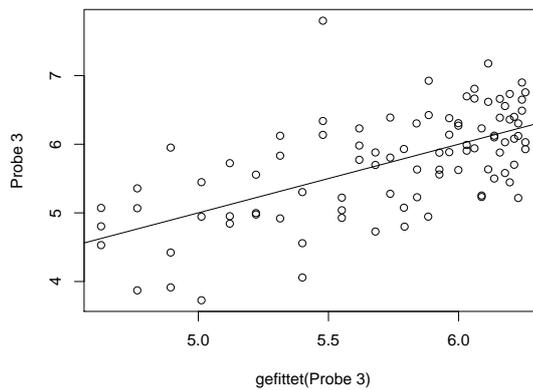
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	1.91	0.32	6.03	0
u	5.96	0.08	77.77	0



**Probe 3**

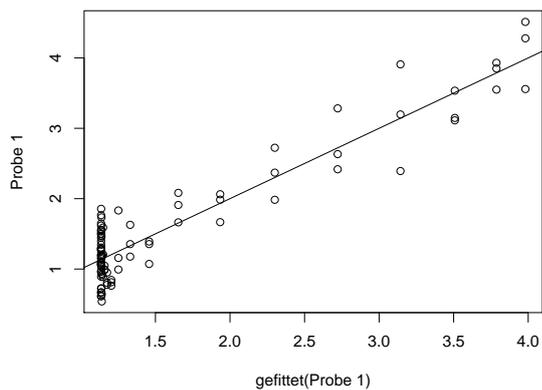
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	1.94	0.27	7.06	0
w	0.37	0.18	2.09	0.039008
u	6.41	0.32	20.30	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 47**

**Probe 1**

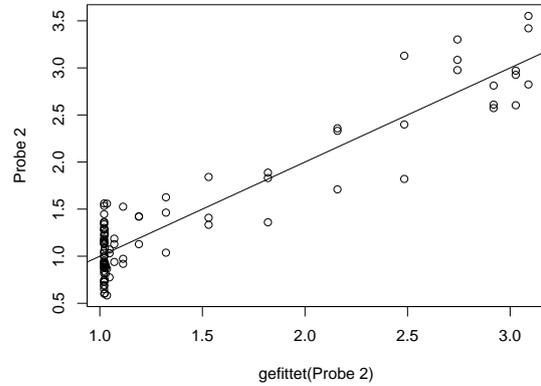
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	3.16	0.38	8.40	0
w	2.48	0.50	5.01	2.7e-06
y	14.76	2.71	5.44	5.0e-07
z	1.14	0.05	25.05	0



D Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Rindfleisch

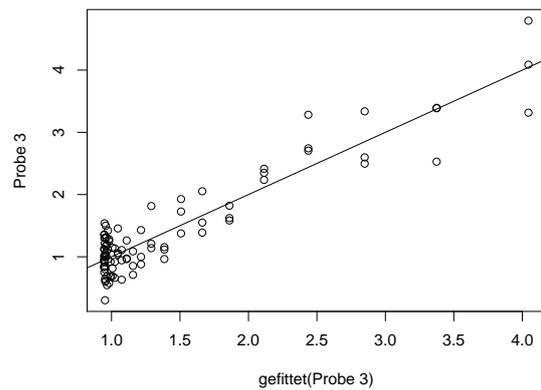
Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	2.14	0.17	12.29	0
w	2.93	0.59	4.93	3.8e-06
y	16.66	3.24	5.14	1.6e-06
z	1.02	0.04	27.71	0



Probe 3

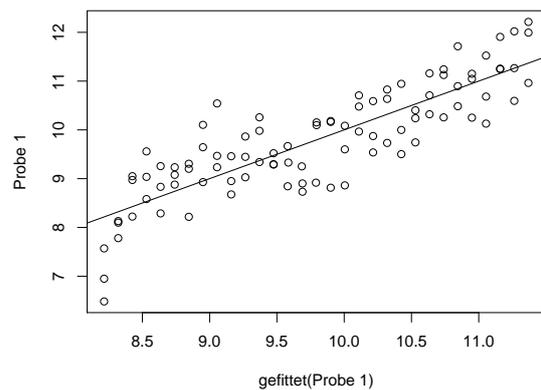
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	0.94	0.05	19.51	0
b	0.002	0	1.45	0.1494563
w	1.11	0.10	10.71	0



Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 59

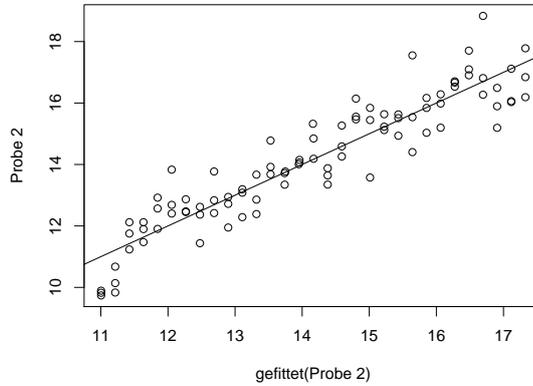
Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	8.11	0.13	64.42	0
d	0.48	0.03	15.31	0



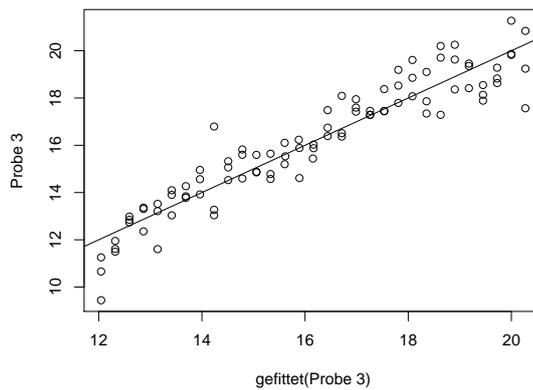
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	10.79	0.16	65.91	0
d	0.96	0.04	23.59	0



**Probe 3**

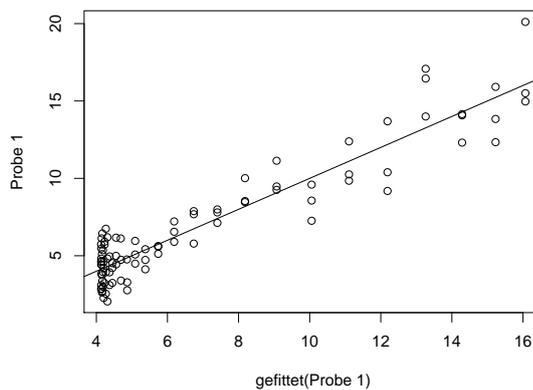
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	11.77	0.19	62.55	0
d	1.24	0.05	26.71	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 61**

**Probe 1**

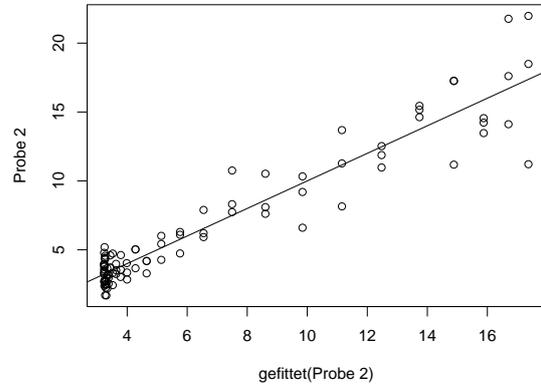
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	15.63	3.25	4.81	0
w	1.26	0.26	4.80	0
y	7.45	1.17	6.35	0
z	4.12	0.26	15.90	0



D Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Rindfleisch

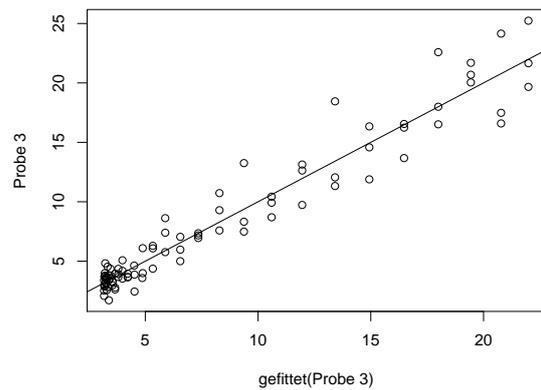
Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	16.20	1.91	8.46	0
w	1.49	0.26	5.78	0
y	8.27	1.22	6.78	0
z	3.23	0.27	11.94	0



Probe 3

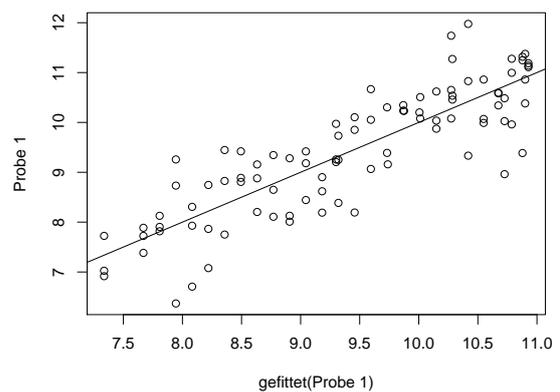
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	24.97	3.79	6.59	0
w	1.12	0.17	6.69	0
y	6.55	0.71	9.23	0
z	3.13	0.32	9.64	0



Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 63

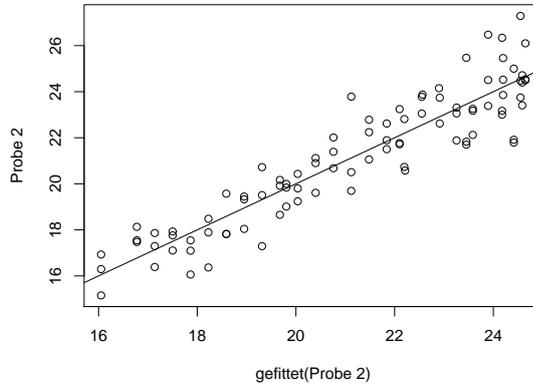
Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	8.43	1.37	6.17	0
w	2.89	0.58	4.98	3.1e-06
d	0.63	0.05	12.52	0
u	11.94	0.23	52.90	0



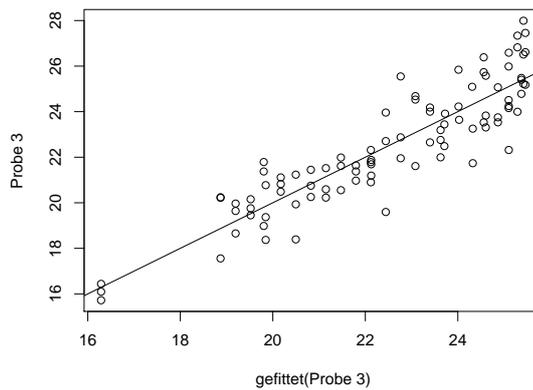
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	17.99	1.42	12.66	0
w	1.99	0.25	7.83	0
d	1.65	0.10	16.66	0
u	28.03	0.47	59.57	0



**Probe 3**

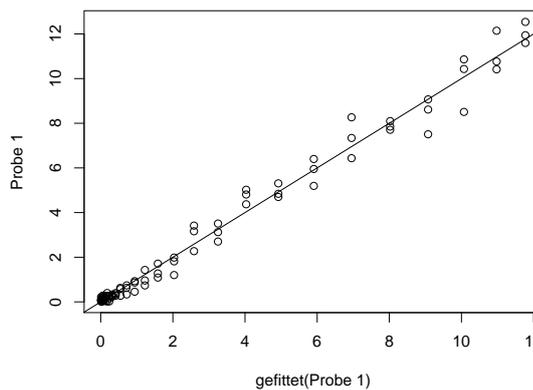
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	17.94	1.26	14.20	0
w	1.69	0.22	7.75	0
d	1.48	0.12	12.79	0
u	28.98	0.57	51.11	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 87**

**Probe 1**

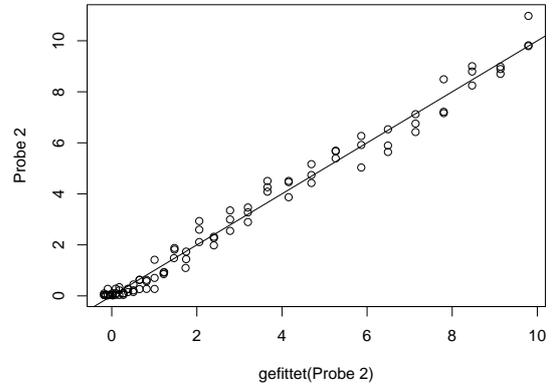
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	15.13	0.81	18.73	0
w	1.29	0.07	19.34	0
y	7.54	0.28	26.64	0



*D Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Rindfleisch*

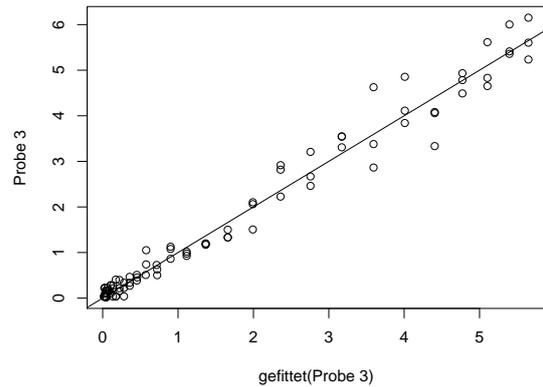
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	17.50	2.68	6.53	0
w	0.69	0.07	9.84	0
y	4.40	0.20	21.68	0
z	-0.43	0.16	-2.63	0.0100731



**Probe 3**

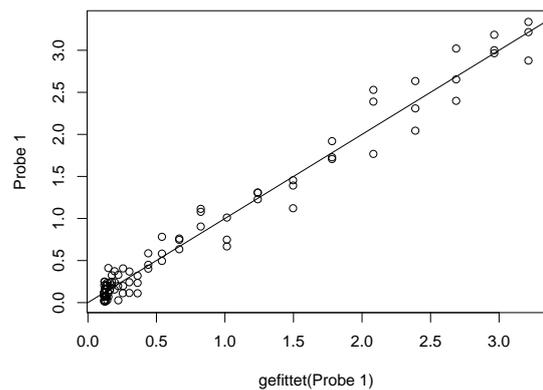
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	6.76	0.37	18.42	0
w	1.14	0.07	15.54	0
y	6.13	0.29	21.49	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 89**

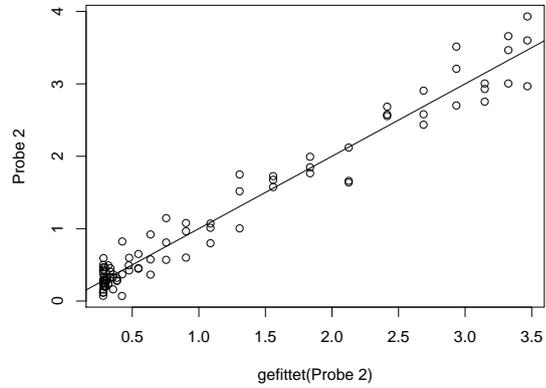
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	4.15	0.40	10.45	0
w	1.34	0.12	11.13	0
y	8.10	0.55	14.73	0
z	0.12	0.03	4.37	3.36e-05



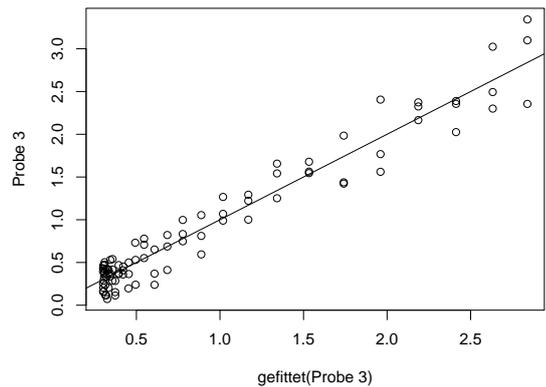
**Probe 2**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	3.64	0.25	14.57	0
w	1.46	0.15	9.84	0
y	8.01	0.69	11.56	0
z	0.28	0.04	7.59	0



**Probe 3**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	3.78	0.74	5.14	1.6e-06
w	1.09	0.16	6.69	0
y	6.74	0.66	10.16	0
z	0.30	0.04	7.41	0

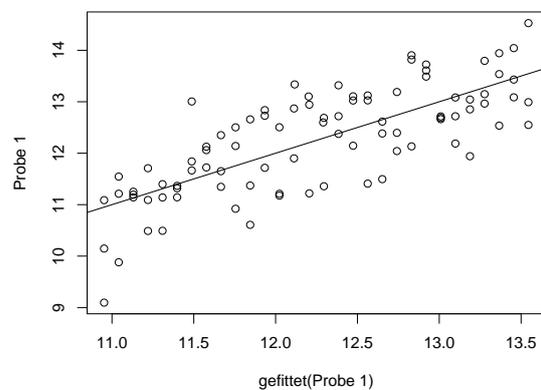


### D.3 Spontanverderb bei 10 °C (späte Phase)

#### Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 33

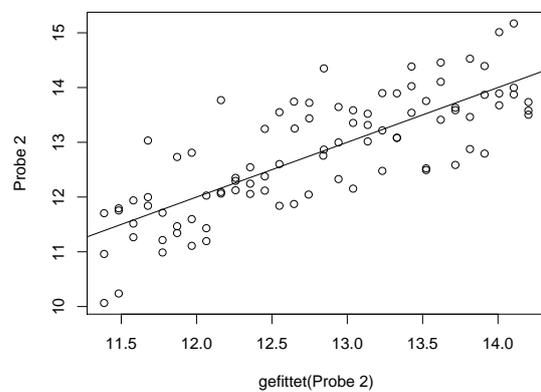
##### Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
d	0.41	0.04	10.83	0
z	8.02	0.40	20.22	0



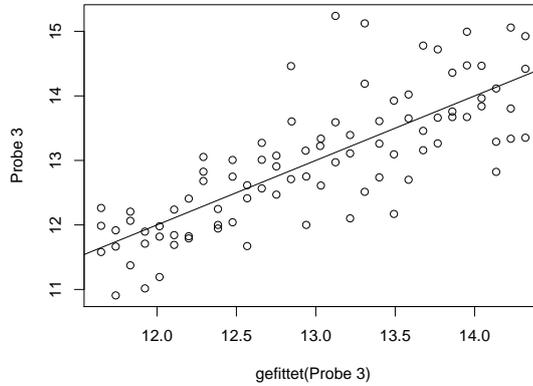
##### Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
d	0.44	0.04	12.15	0
z	8.20	0.38	21.36	0



**Probe 3**

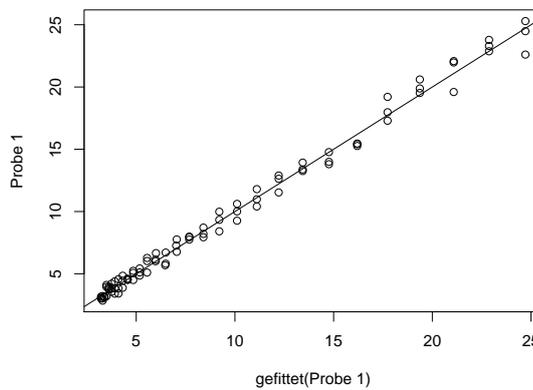
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
d	0.42	0.04	11.81	0
z	8.63	0.37	23.02	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 47**

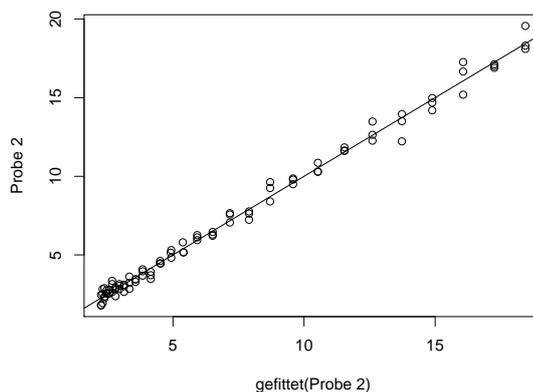
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	49.95	9.46	5.28	9e-07
w	0.69	0.06	12.30	0
y	9.60	0.47	20.33	0
z	2.74	0.25	11.18	0



**Probe 2**

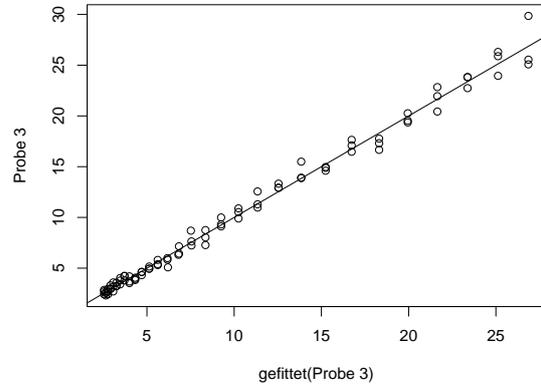
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	29.73	3.38	8.79	0
w	0.73	0.05	14.46	0
y	9.68	0.48	20.32	0
z	1.91	0.17	11.31	0



D Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Rindfleisch

Probe 3

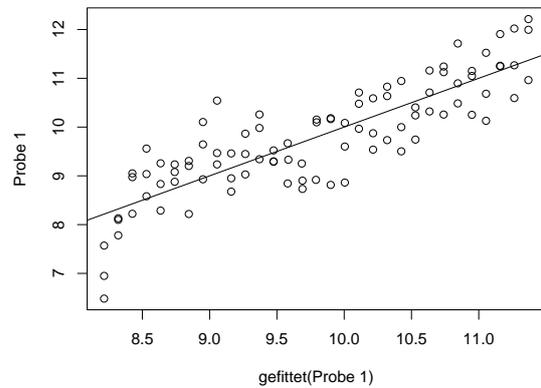
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
u	45.54	6.02	7.57	0
w	0.70	0.06	12.56	0
y	9.30	0.52	17.97	0
z	1.91	0.31	6.27	0



Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 59

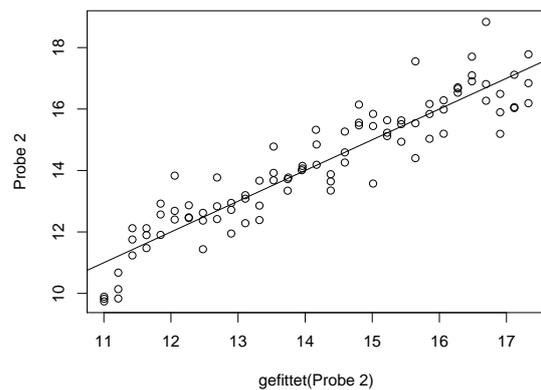
Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	18.06	0.98	18.52	0
w1	0.63	0.11	5.85	1e-07
w2	0.44	0.01	42.30	0
u	71.38	1.06	67.55	0



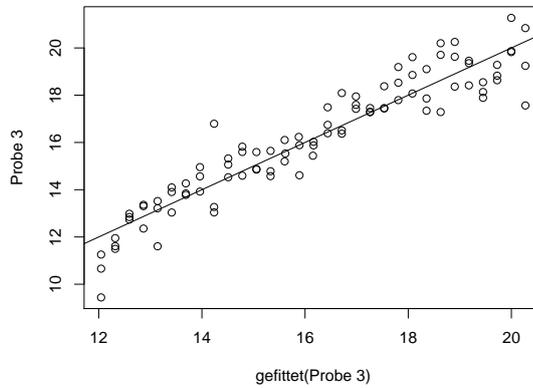
Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
w	0.98	0.15	6.44	0
b	6.93	0.65	10.71	0
u	35.53	0.16	222.18	0



**Probe 3**

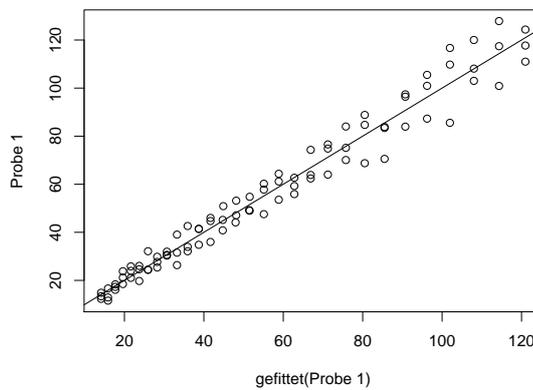
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
w	0.43	0.08	5.31	8e-07
b	33.29	5.53	6.02	0
u	77.39	5.93	13.04	0
d	6.04	0.74	8.21	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 61**

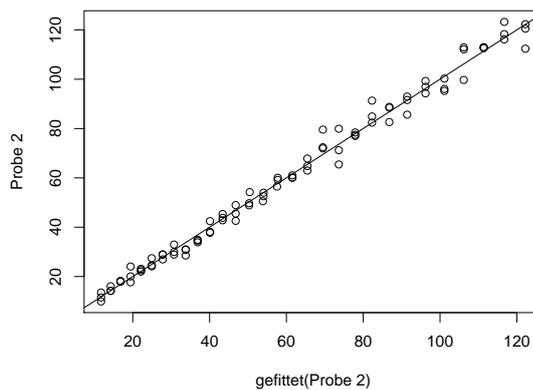
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	-21.51	8.49	-2.53	0.0130898
b	7.45	2.81	2.65	0.0095703
w	0.22	0.02	9.00	0



**Probe 2**

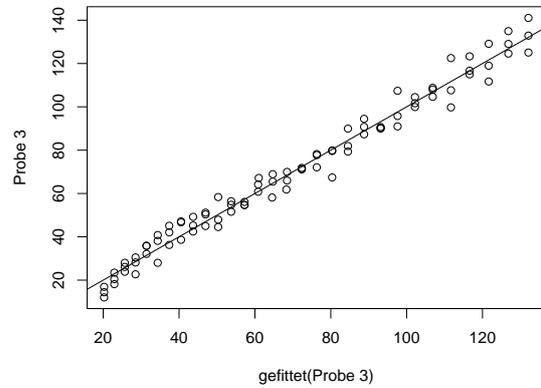
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	-74.90	13.18	-5.68	2.00e-07
b	34.24	8.06	4.25	5.34e-05
w	0.13	0.01	10.16	0



D Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Rindfleisch

Probe 3

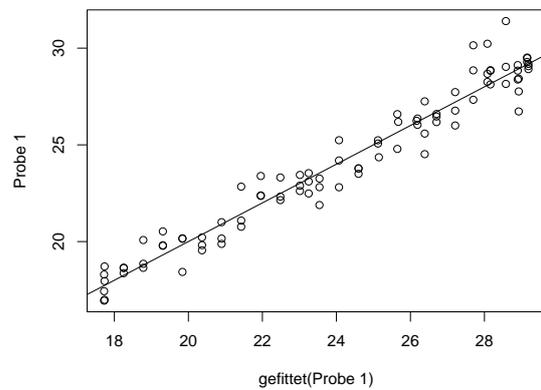
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
z	-90.28	26.49	-3.41	0.0009922
b	50.16	18.12	2.77	0.0068993
w	0.11	0.02	6.02	0



Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 63

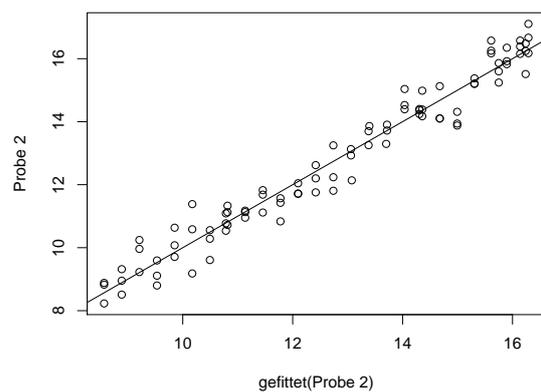
Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	25.32	1.30	19.44	0
w	2.27	0.17	13.10	0
d	2.41	0.08	31.15	0
u	33.62	0.35	96.01	0



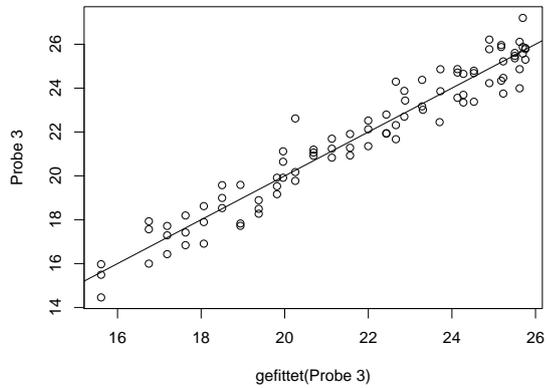
Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	15.47	1.42	10.92	0
w	3.54	0.35	10.08	0
d	1.46	0.04	38.84	0
u	18.21	0.16	112.63	0



**Probe 3**

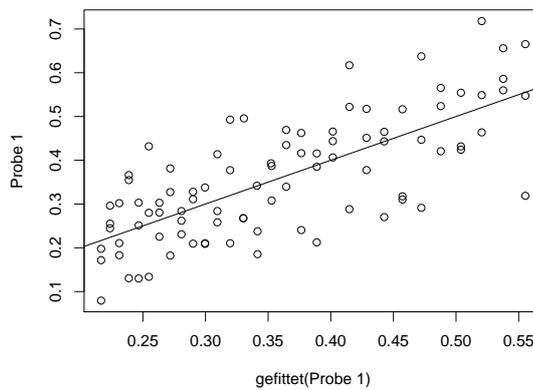
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	21.19	0.96	22.06	0
w	1.93	0.15	13.11	0
d	1.99	0.08	26.32	0
u	29.91	0.35	84.85	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 75**

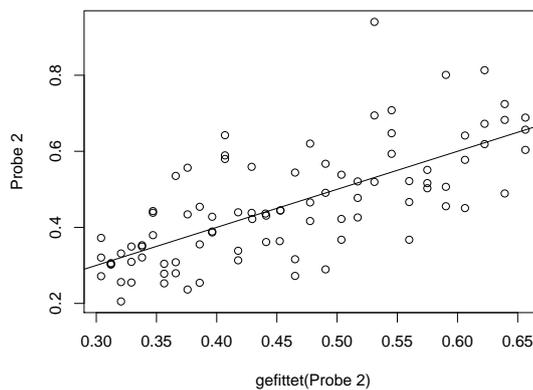
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	0.07	0.01	5.69	2e-07
w	0.15	0.02	9.69	0



**Probe 2**

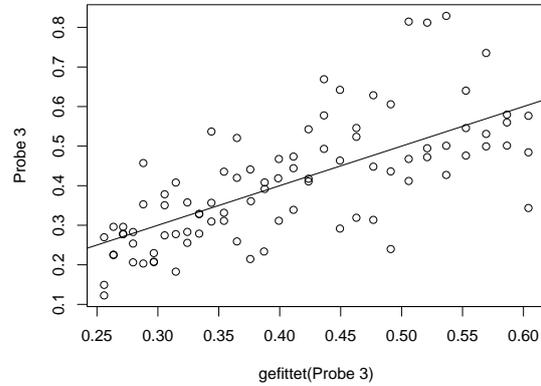
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	0.13	0.02	6.63	0
w	0.12	0.01	9.11	0



D Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Rindfleisch

Probe 3

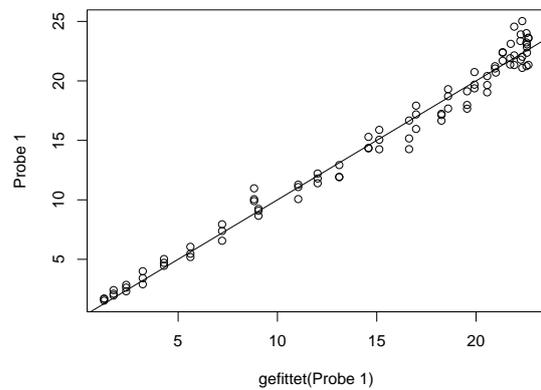
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	0.10	0.02	5.59	2e-07
w	0.13	0.02	8.63	0



Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 87

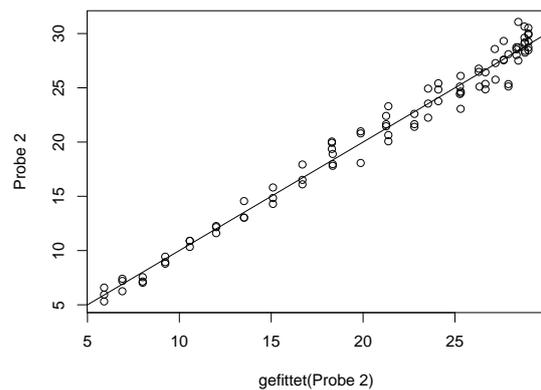
Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
x	10.01	0.04	274.57	0
u	25.09	0.31	80.79	0
w	1.53	0.06	26.66	0
y	17.91	0.69	25.78	0



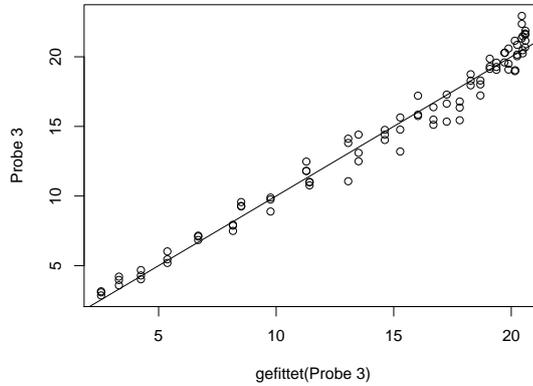
Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
x	9.95	0.06	177.72	0
u	34.36	0.67	51.23	0
w	0.87	0.03	25.33	0
y	10.25	0.44	23.05	0



**Probe 3**

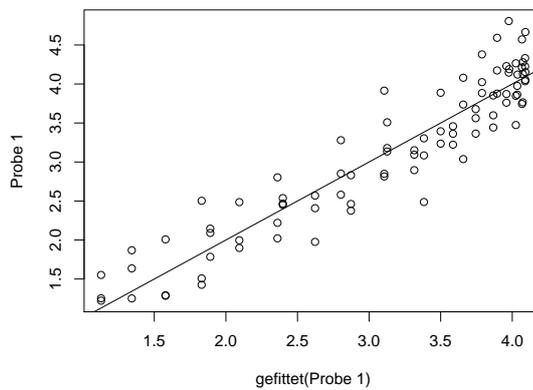
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
x	9.87	0.04	258.01	0
u	22.63	0.28	80.70	0
w	1.36	0.05	24.96	0
y	16.42	0.68	24.15	0



**Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 89**

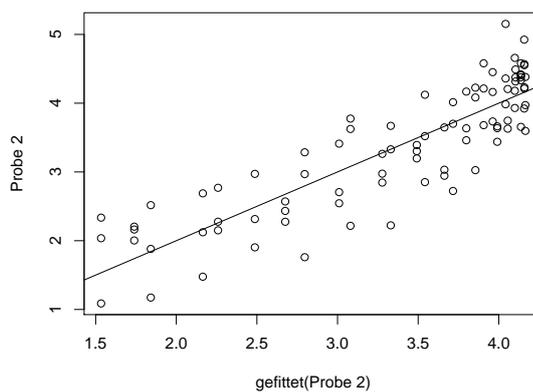
**Probe 1**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
x	8.17	0.08	97.81	0
u	4.49	0.12	37.62	0
w	1.09	0.10	10.41	0
y	13.78	1.36	10.13	0



**Probe 2**

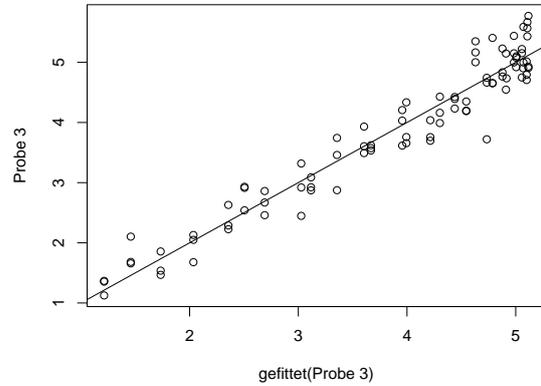
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
x	8.19	0.10	85.91	0
u	4.37	0.11	38.45	0
w	1.36	0.20	6.64	0
y	17.87	2.68	6.66	0



D Ergebnisse der nicht-linearen Regression für die Versuche zum Spontanverderb von Rindfleisch

Probe 3

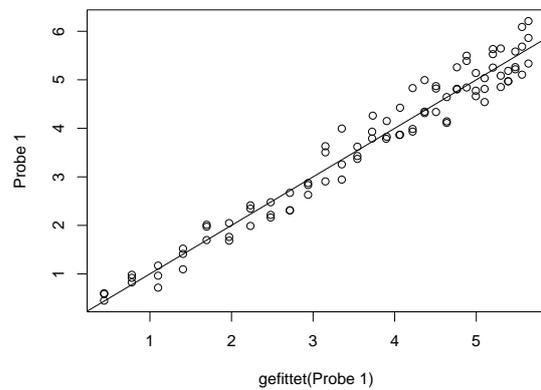
	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
x	8.36	0.07	128.20	0
z	5.65	0.12	49.03	0
w	1.10	0.07	14.90	0
y	13.65	0.95	14.39	0



Ergebnisse der nicht-linearen Regression von m/z 97

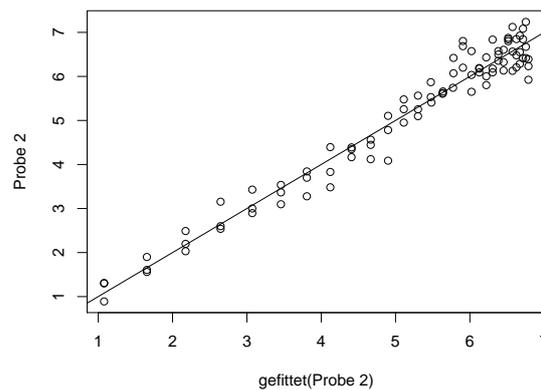
Probe 1

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	37.07	5.52	6.71	0
w	0.24	0.03	8.94	0
u	7.09	0.38	18.73	0



Probe 2

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	161.76	35.12	4.61	1.39e-05
w	0.46	0.03	14.82	0
u	7.12	0.13	54.08	0



**Probe 3**

	Schätzung	SE	t-Wert	Pr(> t )
b	29.51	1.89	15.61	0
w	0.13	0.03	4.88	4.7e-06
u	12.27	1.62	7.58	0

