

Bromatologie - Hygiene und Technologie der Nahrung

**Zur Eignung von Carbesterase als Indikator der ausreichenden Pasteurisation bei  
Erzeugnissen aus Putenfleisch**

Raphael Leebmann

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 Ernährungs- und Haushaltswissenschaften (Dr. oec. troph.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ. - Prof. Dr. Dr. J. Bauer
Prüfer der Dissertation:	1. Univ. - Prof. Dr. G. Pfeiffer, i. R.
	2. Univ. - Prof. Dr. G. Cerny

Die Dissertation wurde am 22.07.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 07.10.2003 angenommen.

## Danksagung

Für die Möglichkeit universitäre Bildung im eigentlichen und besten Sinn kennen zu lernen sowie für die intensiv genutzte wie erlebte gemeinsame Arbeitszeit möchte ich meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Gottfried Pfeiffer** ein inniges Dankeschön aussprechen.

Herrn **Prof. Dr. Gerhard Cerny** möchte ich danken für die Übernahme des Korreferates und das Interesse an der Arbeit sowie Herrn **Prof. Dr. Dr. Johann Bauer** für seine Tätigkeit als Vorsitzender der Prüfungskommission.

Für die weit über die Arbeitsthematik hinausführenden Diskussionen und für die herzliche Zusammenarbeit möchte ich mich bei meinen Kollegen/Innen Frau **Marcella Gutmann**, Frau **Barbara Gelhaus**, Frau **Ursula Spitzbart** und Herrn **Alexander Haag** bedanken.

Herrn **Andreas Witsch** sei an dieser Stelle besonders gedankt für die vielen Hinweise auf lebensmittelrechtliche, -hygienische und -technologische Besonderheiten der Putenfleischverarbeitung und – stellvertretend für die Höhenrainer Delikatessen GmbH – für die verlässliche Bereitstellung von Probengut.

Meinen Eltern

*Wir bemerkten nämlich die Flut der Zahlen und wie schwierig es wegen der Menge des Stoffes ist, sich ... einzuarbeiten. So nahmen wir uns vor, die, die gern lesen, zu unterhalten, denen, die mit Eifer auswendig lernen, zu helfen, allen aber, die das Buch auf irgendeine Weise in die Hand bekommen, zu nützen. Uns ist es allerdings nicht leicht gefallen, in mühseliger Arbeit diesen Auszug anzufertigen; es hat vielmehr Schweiß und durchwachte Nächte gekostet.*

(2 Makk 2, 24-26)

**Inhaltsverzeichnis**

A	Einleitung .....	18
B	Schrifttum .....	19
1	Retrospektive Erhitzungsnachweise bei Fleischerzeugnissen .....	21
1.1	Intrinsische Temperatur-Zeit-Indikatoren der Hitzebehandlung .....	21
1.1.1	Sensorische Kriterien .....	21
1.1.2	Mikrobiologische Kriterien.....	23
1.1.3	Chemische und chemisch-physikalische Temperatur-Zeit-Indikatoren.....	24
1.1.3.1	Nachweis durch Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIR) .....	24
1.1.3.2	Nachweis durch Dynamische Differenzkalorimetrie .....	25
1.1.3.3	Nachweis durch Koagulationstest.....	25
1.1.3.4	Nachweis durch Biuret-Assay und Kjeldahl-Verfahren.....	26
1.1.3.5	Nachweis durch HPLC- und GC-Chromatographie.....	27
1.1.3.6	Nachweis durch Elektrophorese .....	29
1.1.4	Nachweis durch Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA).....	31
1.1.5	Enzymatische Tests .....	34
1.1.5.1	Katalase .....	34
1.1.5.2	Triose-Phosphat-Isomerase .....	35
1.1.5.3	Glutamat-Oxalat-Transaminase/Glutamat-Pyruvat-Transaminase.....	36
1.1.5.4	Pyruvatkinase.....	37
1.1.5.5	Creatin-Phosphokinase .....	38
1.1.5.6	N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase .....	38
1.1.5.7	Saure Phosphatase .....	39
1.1.5.8	Leucin-Aminopeptidase .....	41
1.1.5.9	Laktatdehydrogenase .....	41
1.1.5.10	Carbesterase.....	43
2	Zu den wichtigsten Besonderheiten von Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) sive Carbesterase als Leitenzym des Esterase-Tests .....	46
2.1	Zur Reaktionskinetik und geweblichen Verteilung.....	47
2.2	Zu den tierartlichen Gegebenheiten.....	54
2.2.1	Geflügel.....	54
2.2.2	Schwein.....	55
2.2.3	Rind.....	56
2.2.4	Schaf.....	58
2.2.5	Pferd .....	58
C	Eigene Untersuchungen .....	60

---

1	Material und Methoden.....	61
1.1	Probenmaterial.....	61
1.2	Probenaufbereitung und Erhitzung.....	62
1.3	Bestimmung der Esterase-Restaktivität.....	62
1.4	Bestimmung des Keimgehalts.....	64
1.5	Bestimmung des Proteingehaltes der Probenextrakte für den Esterase-Test mittels des Bicinchoninsäure-(BC)-Assay (BCA).....	66
1.6	Isoelektrische Fokussierung von Esterase-Isozyme.....	67
2	Prüfung der methodischen Eignung des referierten Esterase-Tests bei Erzeugnissen aus Putenfleisch.....	71
2.1	Einfluss der Inkubationstemperatur.....	71
2.1.1	Probengut und Versuchsanordnung.....	71
2.1.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	72
2.2	Einfluss des Puffer-pH-Wertes.....	77
2.2.1	Probengut und Pufferbereitung.....	77
2.2.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	77
2.3	Einfluss der Substratkonzentration und Inkubationsdauer.....	82
2.3.1	Material und Methodik.....	82
2.3.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	82
2.4	Einfluss der unspezifischen Reaktion der enzymatischen Hydrolyseprodukte mit Inhaltsstoffen der Probenextrakte.....	91
2.4.1	Versuchsanordnung, Material und Methodik.....	91
2.4.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	92
2.5	Isozymmuster pasteurisierter Brustmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute..	99
2.5.1	Material und Methodik.....	99
2.5.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	100
2.6	Empfindlichkeit des Esterase-Tests und Möglichkeit einer Steigerung dieser durch die Korrelation (q) Restaktivität:Proteingehalt des Probenextraktes.....	102
2.6.1	Material und Methodik.....	102
2.6.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	103
3	Einfluss der Pasteurisation auf die Esterase-Restaktivität und den Restkeimgehalt bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute.....	111
3.1	Darstellung der Dynamik der Hitzeinaktivierung der Esterase.....	111
3.1.1	Material und Methodik.....	111
3.1.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	113
3.1.2.1	Brustmuskel.....	113
3.1.2.2	Flügel.....	116

---

3.1.2.3	Oberkeule.....	118
3.1.2.4	Unterkeule.....	121
3.1.2.5	Karkassenfleisch .....	123
3.1.2.6	Leber.....	126
3.1.2.7	Fettgewebe .....	128
3.1.2.8	Synopse .....	131
3.2	Einfluss der Pasteurisation bei 80°C/5 min auf die Esterase-Restaktivität und den Restkeimgehalt bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	139
3.2.1	Material und Methodik .....	139
3.2.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	139
4	Einfluss der Lagerung von Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute auf die Esterase-Aktivität.....	146
4.1	Einfluss der Gefrierlagerung des rohen Probengutes .....	146
4.1.1	Material und Versuchsanordnung.....	146
4.1.2	Ergebnisse und Besprechung.....	147
4.2	Einfluss der Kühlung Lagerung des pasteurisierten Probengutes auf die Esterase-Restaktivität.....	155
4.2.1	Material und Methodik .....	155
4.2.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	155
5	Einfluss mikrobieller Esterase auf die Esterase-Restaktivität.....	165
5.1	Material und Methodik .....	165
5.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	166
6	Einfluss der Rezeptur auf die Esterase-Restaktivität bei Erzeugnissen aus Putenfleisch.....	176
6.1	Einfluss von Nitritpökelsalz und Phosphat auf die Hitzeinaktivierung von Esterase .....	176
6.1.1	Material und Methodik .....	177
6.1.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	177
6.2	Einfluss der Esterase-Aktivität der von Pute stammenden Rezepturkomponenten auf die Restaktivität der Produkte .....	183
6.2.1	Probengut und Versuchsanordnung .....	183
6.2.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	183
7	Studien an Putenfleisch-Produkten des Handels und Empfehlung von Grenzwerten als Indikatoren einer ausreichenden Pasteurisation.....	188
7.1	Kochpökelware.....	188
7.1.1	Material und Methodik .....	188
7.1.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	189

---

7.2	Brühwurst .....	192
7.2.1	Material und Methodik .....	192
7.2.3	Ergebnisse und deren Besprechung.....	193
7.3	Leberwurst .....	196
7.3.1	Material und Methodik .....	196
7.3.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	197
7.4	Hackfleischerzeugnisse .....	200
7.4.1	Material und Methoden .....	201
7.4.2	Ergebnisse und deren Besprechung.....	201
D	Diskussion .....	205
E	Zusammenfassung .....	228
F	Literaturverzeichnis .....	231

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1:	Parameter der Isoelektrisch fokussierenden Elektrophorese .....	70
Tab. 2:	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min) .....	73
Tab. 3:	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min).....	74
Tab. 4:	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min).....	75
Tab. 5:	Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf das pH des Probenextraktes und die Kinetik der Esterase bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min).....	78
Tab. 6:	Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf das pH des Probenextraktes und die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min).....	79
Tab. 7:	Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf das pH des Probenextraktes und die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min).....	80
Tab. 8:	Einfluss der Substratkonzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min).....	83
Tab. 9:	Einfluss der Substratkonzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min).....	85
Tab. 10:	Einfluss der Substratkonzentration auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min).....	87
Tab. 11:	Einfluss des Probenextraktes auf die Extinktion des aus Naphthol und DBCC entstehenden N-DBCC-Farbkomplexes aus pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe .....	93
Tab. 12:	Einfluss des Probenextraktes auf die Extinktion des aus Naphthol mit DBCC entstehenden N-DBCC-Farbkomplexes bei Kochpökelfleisch, Brühwurst und Leberwurst aus Putenfleisch.....	94
Tab. 13:	Einfluss des Probenextraktes auf die wiederfindbare Menge von zugesetztem N-DBCC-Farbkomplex bei pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe .....	95
Abb. 18:	Einfluss des Probenextraktes auf die wiederfindbare Menge von zugesetztem N-DBCC-Farbkomplex bei pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) bei Brustmuskel, Leber und Fettgewebe .....	95
Tab. 14:	Einfluss des Probenextraktes auf die wiederfindbare Menge von zugesetztem Indigo bei pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe sowie aus Kochpökelfleisch, Brühwurst und Leberwurst.....	96

Tab. 15:	Einfluss des postmortalen Stadiums und der Erhitzung von Putenbrustmuskel bei $F_{80} = 5$ auf die Wiederholbarkeit der Ergebnisse des Esterase-Tests .....	103
Tab. 16:	Einfluss eines jeweils 5 min langen niedrig gestuften und Erhitzens von Brustmuskel der Pute bei 65°C bis 80°C auf die Esterase-Restaktivität, den Proteingehalt und auf das Verhältnis $q$ zwischen Restaktivität und Proteingehalt des Probenextraktes.....	104
Tab. 17:	Temperaturbedingte Differenz der Esterase-Restaktivität, Korrelationskoeffizient zwischen Erhitzungsintensität und Esterase-Restaktivität der Probenextrakte und Steigung der Regressionsgeraden der Aktivitätsverringerung beim Brustmuskel von Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen von 65 bis 70°C und 70 bis 80°C.....	105
Tab. 18:	Temperaturbedingte Differenz des Eiweißgehaltes, Korrelationskoeffizient zwischen Erhitzungsintensität und Eiweißgehalt der Probenextrakte und Steigung der Regressionsgeraden der Abnahme des Eiweißgehaltes beim Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei 67,5 bis 72,5°C und 72,5 bis 80°C.....	105
Tab. 19:	Verdünnung des rohen und erhitzten Probengutes bei der Extraktgewinnung ....	112
Tab. 20:	Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Brustmuskels der Pute auf die absolute Esterase-Restaktivität.....	114
Tab. 21:	Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Flügelmuskulatur auf die absolute Esterase-Restaktivität.....	116
Tab. 22:	Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Oberkeule auf die absolute Esterase-Restaktivität .....	119
Tab. 23:	Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Unterkeule auf die absolute Esterase-Restaktivität .....	121
Tab. 24:	Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Karkassenfleisches auf die absolute Esterase-Restaktivität.....	124
Tab. 25:	Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Leber auf die absolute Esterase-Restaktivität .....	126
Tab. 26:	Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Fettgewebes auf die absolute Esterase-Restaktivität .....	129
Tab. 27:	Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung von Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Restaktivität ....	131
Abb. 28:	Gehalt der Sammelproben von Brustmuskel, Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Karkassenfleisch, Leber und Fettgewebe an Rohprotein, Gesamtfettgehalt und Asche .....	141

Tab. 29: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Brustmuskel der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei $F_{80} = 5$ .....	142
Tab. 30: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Flügelmuskulatur der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei $F_{80} = 5$ .....	142
Tab. 31: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Oberkeule der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei $F_{80} = 5$ .....	143
Tab. 32: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Unterkeule der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei $F_{80} = 5$ .....	143
Tab. 33: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Karkassenfleisch der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei $F_{80} = 5$ .....	144
Tab. 34: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Leber der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei $F_{80} = 5$ .....	144
Tab. 35: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Fettgewebe der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei $F_{80} = 5$ .....	145
Tab. 36: Mittlere Esterase-Aktivität von Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei $F_{80} = 5$ in absteigender Reihenfolge .....	145
Tab. 37: Einfluss der Frostung auf die Esterase-Aktivität von roher Skelettmuskulatur, Leber und rohem Fettgewebe der Pute .....	148
Tab. 38: Einfluss der Frostung auf die Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute nach Pasteurisation bei $F_{80} = 5$ .....	151
Tab. 39: Einfluss einer 22 Stunden langen Kühllagerung bei 4°C auf die bei Brustmuskel, Leber und Fettgewebe der Pute nach Pasteurisation bei $F_{80} = 5$ nachweisbare Esterase-Restaktivität.....	156
Tab. 40: Einfluss einer 2 Wochen langen Lagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei $F_{80} = 5$ nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	159
Tab. 41: Einfluss einer 4 Wochen langen Lagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei $F_{80} = 5$ nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	160
Tab. 42: Einfluss der mikrobiellen Kontamination auf die Esterase-Aktivität und sensorische Beschaffenheit bei Puten-Brühwurst des Handels .....	167
Tab. 43: Einfluss der mikrobiellen Kontamination auf die Esterase-Aktivität und sensorische Beschaffenheit bei Puten-Leberwurst des Handels.....	168
Tab. 44: Einfluss der mikrobiellen Kontamination auf die Esterase-Aktivität und sensorische Beschaffenheit bei Puten-Kochpökelprodukten des Handels.....	169

Tab. 45: Einfluss von Nitritpökelsalz auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei $F_{80} = 5$ und auf die mit NA nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	178
Tab. 46: Einfluss von Nitritpökelsalz auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei $F_{80} = 5$ und auf die mit NB nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	178
Tab. 47: Einfluss von Nitritpökelsalz auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei $F_{80} = 5$ und auf die mit IA nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	179
Tab. 48: Einfluss von Phosphat auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei $F_{80} = 5$ und auf die mit NA nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	179
Tab. 49: Einfluss von Phosphat auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei $F_{80} = 5$ und auf die mit NB nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	180
Tab. 50: Einfluss von Phosphat auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei $F_{80} = 5$ und auf die mit IA nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	180
Tab. 51: Esterase-Restaktivität der bei $F_{80} = 5$ pasteurisierten und für die Bereitstellung der Zwei-Komponenten-Mischungen verwendeten Probenarten .....	184
Tab. 52: Analytisch bestimmte und rechnerisch extrapolierte Esterase-Restaktivität der Zwei-Komponenten-Mischungen aus den bei $F_{80} = 5$ pasteurisierten Probenarten .....	185
Tab. 53: Esterase-Restaktivität und Keimgehalt bei Kochpökelfleisch aus Putenfleisch des Handels .....	190
Tab. 54: Esterase-Restaktivität und Keimgehalt bei Brühwurst aus Putenfleisch des Handels .....	193
Tab. 55: Esterase-Restaktivität und Keimgehalt bei Putenleberwurst des Handels .....	197
Tab. 56: Esterase-Restaktivität und Keimgehalt bei Hackfleischerzeugnissen aus Putenfleisch des Handels .....	202

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min).....	73
Abb. 2:	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min).....	74
Abb. 3:	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min).....	75
Abb. 4:	Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min).....	78
Abb. 5:	Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min).....	79
Abb. 6:	Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min).....	80
Abb. 7:	Einfluss der NA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min).....	83
Abb. 8:	Einfluss der NB-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min).....	84
Abb. 9:	Einfluss der IA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min).....	84
Abb. 10:	Einfluss der NA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min).....	85
Abb. 11:	Einfluss der NB-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min).....	86
Abb. 12:	Einfluss der IA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min).....	86
Abb. 13:	Einfluss der NA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min).....	87
Abb. 14:	Einfluss der NB-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min).....	88
Abb. 15:	Einfluss der IA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min).....	88
Abb. 16:	Einfluss des Probenextraktes auf die Extinktion des aus Naphthol und DBCC entstehenden N-DBCC-Farbkomplexes bei pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe.....	93

Abb. 17: Einfluss des Probenextraktes auf die Extinktion des aus Naphthol und DBCC entstehenden N-DBCC-Farbkomplexes bei Kochschinken, Brühwurst und Leberwurst .....	94
Abb. 19: Einfluss des Probenextraktes auf die wiederfindbare Menge von zugesetztem Indigo bei pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe sowie aus Kochpökelfleisch, Brühwurst und Leberwurst .....	97
Abb. 20: IEF-PAG-Pherogramme der Esterase-Isozyme von 5 min bei 60, 65, 70, 75 und 80°C erhitztem Brustmuskel der Pute nach Darstellung mit NA.....	101
Abb. 21: IEF-PAG-Pherogramme der Esterase-Isozyme von 5 min lang bei 60, 65, 70, 75 und 80°C erhitzter Leber der Pute nach Darstellung mit NA .....	101
Abb. 22: IEF-PAG-Pherogramme der Esterase-Isozyme von 5 min bei 60, 65, 70, 75 und 80°C erhitztem Fettgewebe der Pute nach Darstellung mit NA.....	101
Abb. 23: pI-Markerproteine .....	101
Abb. 24: Mit NA ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei 65 bis 70°C und 70 bis 80°C und Regressionsgeraden der Aktivitätsverringung .....	106
Abb. 25: Mit NB ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei von 65 bis 70°C und 70 bis 80°C und Regressionsgerade der Aktivitätsverringung.....	106
Abb. 26: Mit IA ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei 65 bis 70°C und 70 bis 80°C und Regressionsgerade der Aktivitätsverringung .....	107
Abb. 27: Eiweißgehalte der 1:11-Extrakte von Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei 67,5 bis 72,5°C und 72,5 bis 80°C und Regressionsgeraden der Gehaltsverringung .....	107
Abb. 28: Eiweißgehalte der 1:4-Extrakte von Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei 67,5 bis 72,5°C und 72,5 bis 80°C und Regressionsgeraden der Gehaltsverringung .....	108
Abb. 29: Verhältnis q zwischen Restaktivität und Proteingehalt nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen von Brustmuskel der Pute bei 65 bis 80°C.....	108
Abb. 30: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Brustmuskels auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität.....	114
Abb. 31: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Brustmuskels auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität.....	115
Abb. 32: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Brustmuskels auf die mit IA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität .....	115

---

Abb. 33: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Flügelmuskulatur auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität.....	117
Abb. 34: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Flügelmuskulatur auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität.....	117
Abb. 35: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Flügelmuskulatur auf die mit IA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität .....	118
Abb. 36: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Oberkeule die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität .....	119
Abb. 37: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Oberkeule auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität .....	120
Abb. 38: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Oberkeule auf die mit IA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität.....	120
Abb. 39: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Unterkeule auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität .....	122
Abb. 40: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Unterkeule auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität .....	122
Abb. 41: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Unterkeule auf die mit IA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität.....	123
Abb. 42: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Karkassenfleisches auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität.....	124
Abb. 43: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Karkassenfleisches auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität.....	125
Abb. 44: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Karkassenfleisches auf die mit IA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität .....	125
Abb. 45: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Leber auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität.....	127
Abb. 46: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Leber auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität.....	127
Abb. 47: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Leber auf die mit IA nachgewiesene Esterase-Restaktivität .....	128
Abb. 48: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Fettgewebes auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität .....	129
Abb. 49: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Fettgewebes auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität .....	130
Abb. 50: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Fettgewebes auf die mit IA nachgewiesen absolute Esterase-Restaktivität.....	130

Abb. 51: Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung des Brustmuskels bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität.....	134
Abb. 52: Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung der Flügelmuskulatur bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität.....	134
Abb. 53: Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung der Oberkeule bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität .....	135
Abb. 54: Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung der Unterkeule bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität .....	135
Abb. 55: Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung des Karkassenfleisches bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität.....	136
Abb. 56: Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung der Leber bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität .....	136
Abb. 57: Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung des Fettgewebes bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität.....	137
Abb. 58: Einfluss der Frostung auf die mit NA nachweisbare Esterase-Aktivität von roher Skelettmuskulatur, Leber und rohem Fettgewebe der Pute .....	149
Abb. 59: Einfluss der Frostung auf die mit NB nachweisbare Esterase-Aktivität von roher Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	149
Abb. 60: Einfluss der Frostung auf die mit IA nachweisbare Esterase-Aktivität von roher Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	150
Abb. 61: Einfluss der Frostung auf die nach Pasteurisation mit NA nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	152
Abb. 62: Einfluss der Frostung auf die nach Pasteurisation mit NB nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	152
Abb. 63: Einfluss der Frostung auf die nach Pasteurisation mit IA nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	153
Abb. 64: Einfluss einer 22 Stunden langen Kühllagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei $F_{80} = 5$ beim Brustmuskel nachweisbare Esterase-Restaktivität .....	157
Abb. 65: Einfluss einer 22 Stunden langen Kühllagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei $F_{80} = 5$ bei Leber nachweisbare Esterase-Restaktivität.....	157
Abb. 66: Einfluss einer 22 Stunden langen Kühllagerung bei 4 – 6°C auf die nach Pasteurisation bei $F_{80} = 5$ bei Fettgewebe nachweisbare Esterase-Restaktivität .	158
Abb. 67: Einfluss einer 2 bis 4 Wochen langen Lagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei $F_{80} = 5$ mit NA nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	163

Abb. 68: Einfluss einer 2 bis 4 Wochen langen Lagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei $F_{80} = 5$ mit NB nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	163
Abb. 69: Einfluss einer 2 bis 4 Wochen langen Lagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei $F_{80} = 5$ mit IA nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute .....	164
Abb. 70: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Brühwurst 1 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Brühwurst des Handels .....	170
Abb. 71: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Brühwurst 2 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Brühwurst des Handels .....	170
Abb. 72: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Brühwurst 3 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Brühwurst des Handels .....	171
Abb. 73: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Leberwurst 1 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Leberwurst des Handels .....	171
Abb. 74: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Leberwurst 2 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Leberwurst des Handels .....	172
Abb. 75: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Leberwurst 3 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Leberwurst des Handels .....	172
Abb. 76: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Kochpökelprodukt 1 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Kochpökelpware des Handels.....	173
Abb. 77: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Kochpökelprodukt 2 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Kochpökelpware des Handels.....	173
Abb. 78: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Kochpökelprodukt 3 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Kochpökelpware des Handels.....	174
Abb. 79: Mit NA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Kochpökelpware aus Putenfleisch des Handels .....	191
Abb. 80: Mit NB bestimmte Esterase-Restaktivität bei Kochpökelpware aus Putenfleisch des Handels .....	191
Abb. 81: Mit IA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Kochpökelpware aus Putenfleisch des Handels .....	192
Abb. 82: Mit NA ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brühwurst aus Putenfleisch des Handels .....	194
Abb. 83: Mit NB ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brühwurst aus Putenfleisch des Handels .....	194
Abb. 84: Mit IA ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brühwurst aus Putenfleisch des Handels .....	195
Abb. 85: Mit NA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Putenleberwurst des Handels .....	198

---

Abb. 86: Mit NB bestimmte Esterase-Restaktivität bei Putenleberwurst des Handels .....	198
Abb. 87: Mit IA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Putenleberwürsten des Handels.....	199
Abb. 88: Mit NA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Hackfleischerzeugnissen aus Putenfleisch des Handels .....	201
Abb. 89: Mit NB bestimmte Esterase-Restaktivität bei Hackfleischerzeugnissen aus Putenfleisch des Handels .....	203
Abb. 90: Mit IA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Hackfleischerzeugnissen aus Putenfleisch des Handels .....	203

## A Einleitung

Fleischerzeugnisse zählen zu den zoonotisch generell bedenklichen Lebensmitteln. Bei den Erzeugnissen aus Geflügelfleisch gilt dies wegen des erhöhten Salmonellenrisikos in einem besonderen Maße. Die Hitzekonditionierung zählt bei dieser Produktgruppe deshalb zu denjenigen betrieblichen Maßnahmen und Kontrollen, denen im Ablauf des Fertigungsprozesses eine außerordentlich große Bedeutung zukommt.

In wieweit ein Erzeugnis aus Fleisch von Schwein und Rind als ausreichend pasteurisiert und dadurch nicht nur die pathogene, sondern auch die saprophytäre Bakterienflora als hinreichend inaktiviert angesehen werden kann, lässt sich an deren Esterase-Restaktivität sehr gut ermessen.

Ob und unter welchen methodischen Bedingungen sich der „Esterase-Test“ auch bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch eignet, ist bisher nicht gesichert. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, dies zu prüfen und vor allem auf folgende Fragen Antwort zu geben:

- 1 Ist die Esterase-Restaktivität auch bei Fleisch und Fleischerzeugnissen von Pute ein geeigneter Indikator der ausreichenden Pasteurisation? Lässt sich das von PFEIFFER und Mitarb. (1969) bei den Erzeugnissen von Schwein und Rind empfohlene Verfahren ohne weiteres auch bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch anwenden oder ist für diese eine Modifikation der Testmethodik erforderlich?
- 2 Wie wirken sich Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung bei Skelettmuskulatur, Fett- und Lebergewebe von Pute und bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch auf die Esterase-Aktivität des Probengutes aus? Inwieweit sind die Rezeptur und die Vorbehandlung der Rezepturkomponenten von Einfluss?
- 3 Unter welchen Voraussetzungen und wie verlässlich eignet sich die mittels des Esterase-Tests bestimmte Restaktivität des Leitenzyms bei Kochpökelfleisch, Hackfleischprodukten sowie Brüh- und Leberwurst aus Putenfleisch als Indikator einer wirksamen Pasteurisation?

Die für die Beantwortung dieser Fragen erforderlichen Untersuchungen werden in breiter angelegten Modellstudien und an Probengut der genannten Handelskategorien durchgeführt.

## B Schrifttum

Der Wiedergabe des Schrifttums seien zu dessen besseren Verständnis folgende Hinweise vorangestellt.

Lebensmittel werden erhitzt, um gesundheitliche Unbedenklichkeit, Verdaulichkeit, Genusswert und Haltbarkeit zu sichern. Dies gilt zumal bei Erzeugnissen aus Putenfleisch, die nicht nur in hohem Maße zoonotisch bedenklich sind, sondern auch zu den saprophytär besonders gefährdeten Lebensmitteln zählen. Ein Schnelltest, mit dem sich bei diesen Produkten verlässlich, rasch und möglichst einfach prüfen lässt, ob die vegetative Mikroflora durch die Hitzebehandlung hinlänglich inaktiviert und subletal dann meist auch die Bakteriensporen in einem beachtlichen Maße geschädigt wurden, bietet der Praxis sowohl auf Seiten der Produktion, als auch der amtlichen Lebensmittelüberwachung wichtige Vorteile.

Für den Hersteller besteht mittels eines solchen Tests die Möglichkeit, auch im einfachsten Minilabor zu prüfen, ob die bei den verschiedenen Produkten des Betriebes zum Schutz der Gesundheit des Verbrauchers vorgegebene Temperatur-Zeit-Relation der Hitzebehandlung mit hinreichender Sicherheit erfüllt wird. Die Prüfung hierauf wird in der laufenden Produktion auch für den Nachweis erforderlich, dass den betrieblichen Maßnahmen und Kontrollen gemäß §4(1) Lebensmittelhygieneverordnung schon gleich auch bei der Hitzekonditionierung der Produkte entsprochen und so nicht nur die Funktionstüchtigkeit, sondern auch die funktionsgerechte Anwendung des Temperaturschreibers kontrolliert wird. Im Rahmen der betrieblichen Produkt- und Verfahrensentwicklung dient der Test der raschen Optimierung des Temperatur-Zeit-Regimes einer etwa bei einer Produkt-Neuentwicklung, bei einer Verpackungsänderung oder bei einer vom Handel gewünschten Haltbarkeitsverlängerung eines stehenden Produktes erforderlichen Hitzebehandlung. Der amtlichen Lebensmittelüberwachung dient der Test im Falle einer Lebensmittelepidemie für die rasche Identifizierung derjenigen Produkte, die nach aller Wahrscheinlichkeit nicht als Quelle der Infektion oder Intoxikation in Frage kommen; des weiteren aber auch bei den Kontrollen, ob die für die Beherrschung des kritischen Kontrollpunktes Hitzekonditionierung vorgegebenen Verfahrens- und Arbeitsanweisungen der Betriebe verlässlich sind und verlässlich erfüllt werden. Für den Nachweis der ausreichenden Erhitzung von Erzeugnissen aus Putenfleisch hat der Schnelltest so eine den enzymatischen Erhitzungsnachweisen bei Konsummilch vergleichbare Bedeutung. Bei Milch schreibt der Gesetzgeber aufgrund des außerordentlichen Risikos, das bei einer unzureichenden Hitzebehandlung für den gesundheitlich labilen Personenkreis und insbesondere für Kleinkinder besteht, durch §4(5) in Verbindung mit Anlage 6, Nr. 2.1 bis 2.3 Milchverordnung ausdrücklich vor, erforderlichenfalls Kontrollen mittels des Phosphatase- und/oder Peroxidasetests durchzuführen.

Die Nutzung eines Leitenzyms für den Nachweis, dass ein für die Hitzekonditionierung eines Produktes vorgeschriebenes Temperatur-Zeit-Regime mit hinreichender Verlässlichkeit erfüllt wird, bietet gegenüber physikalisch-technischem Kontrollgerät den Vorteil, dass der Wirkungsgrad der Hitzebehandlung selbst und nicht lediglich dessen physikalische Voraussetzung als erfüllt, als möglicherweise nicht erfüllt oder als nicht erfüllt nachgewiesen wird. Nach PFEIFFER und Mitarb. (1970), SIEBENLIST (1992) und PFEIFFER (2002) bietet sich Esterase als Leitenzym für einen retrospektiven Erhitzungsnachweis bei Fleisch und Fleischerzeugnissen von Rind und Schwein in doppelter Hinsicht an. Zum einen, weil ein Teil der Esterase-Isozyme eine besonders hohe Hitzestabilität aufweist. Zum anderen, weil Esterase bei allen als Rezepturkomponenten genutzten Tierkörperteilen auch noch nach einem besonders vorhaltenden Pasteurisieren eine sehr hohe und bei allen Unterschieden zwischen Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber nicht zu differente Restaktivität aufweist. Angaben darüber, inwieweit diese Vorteile auch bei den von der Pute stammenden Rezepturkomponenten der Erzeugnisse aus Putenfleisch zutrifft, sind im Schrifttum nicht vorhanden.

Der Esterase-Test vereint die Vorteile von Esterase als Indikator für mikrobielle Hitzeinaktivierung auch insoweit mit der Einfachheit ihrer Aktivitätsbestimmung, als dem katalytischen Effekt der mit den Substraten Naphthylacetat (NA), Naphthylbutyrat (NB) und Indoxylacetat (IA) nachweisbaren Esterase eine Ein-Substrat-Reaktion ohne Konditionalreaktion zugrunde liegt. Dem Stand des referierten Wissens zufolge erweist sich der Screeningtest bei den Erzeugnissen aus Rind- und Schweinefleisch als sehr gut reproduzierbar und hinsichtlich der Abgrenzung einer statistisch ausreichenden von einer statistisch unzureichenden Erhitzung als sehr sicher. Bei den einfachen analysetechnischen Voraussetzungen des Bestimmungsverfahrens lässt sich der Esterase-Test auch von angelerntem Personal und auch unter einfachsten Rahmenbedingungen durchführen.

Im Folgenden wird der Stand des Wissens über die Eignung von Esterase als Kriterium eines Erhitzungsnachweises bei Fleisch und Fleischerzeugnissen aufgezeigt und eine Übersicht über die derzeit zur Anwendung gelangenden oder im Stadium Erprobung oder Entwicklung befindlichen Erhitzungsnachweise dargeboten.

## 1 Retrospektive Erhitzungsnachweise bei Fleischerzeugnissen

Die Intensität der Hitzebehandlung eines Lebensmittels lässt sich nach VAN LOEY und Mitarb. (1996) retrospektiv an deren Auswirkung auf intrinsische und extrinsische Indikatoren ermitteln. Intrinsische Indikatoren sind produktoriginäre Inhaltsstoffe. Extrinsische Indikatoren sind anorganische oder organische Stoffe, Mikroorganismen oder technische Sensoren, die dem Probengut vor dessen Hitzebehandlung beigegeben werden. Besonders wichtige extrinsische Indikatoren sind Bakterien, Enzyme, Vitamine oder bestimmte Indikatorsubstanzen, die mit lebensmitteloriginären oder beigegebenen Reaktionspartnern erhitzungsabhängig reagieren, so z.B. Peptide zu Maillardprodukten. Ein häufiger genutzter Indikatorkeim ist bei sterilisierten Lebensmitteln *Bacillus coagulans*, bei pasteurisierten Produkten meist eine Enterokokkenart. Spezielle Möglichkeiten für die Aufzeichnung von Temperatur-Zeit-Verläufen bieten heute hochsensitive Temperaturlogger.

### 1.1 Intrinsische Temperatur-Zeit-Indikatoren der Hitzebehandlung

Über eine besonders große Zahl sensorischer, mikrobiologischer, chemischer, chemisch-physikalischer, enzymchemischer oder immunologischer Kriterien, die als intrinsische Temperatur-Zeit-Indikatoren herangezogen werden, wird im Schrifttum über Fleisch und Fleischerzeugnisse berichtet.

#### 1.1.1 Sensorische Kriterien

Wie hoch etwa ein Bratenstück oder eine Frikadelle erhitzt wurde, lässt sich sensorisch nicht nur an der mechanischen Beschaffenheit insbesondere der Skelettmuskulatur und des kollagenen Bindegewebes taxieren, sondern vor allem auch an der Farbe des Fleisches und an der Farbe und Klarheit des Fleischsaftes. Wie wichtig diese Kriterien zumal im Tagesgeschäft der küchenmäßigen Zubereitung von Fleisch sind, bedarf keines weiteren Hinweises.

EYERMANN (1955) teilt mit, dass sich die Auswirkung einer Temperatur von 80°C bei Rind- bzw. Schweinefleisch nach OSTERTAG (1923) daran erkennen lässt, dass die Muskulatur grau bzw. grau-weiß verfärbt ist. Von der Schnittfläche abfließender Saft darf nicht mehr rötlich aussehen. Auch durch Erhitzen gemäß § 56 des Fleischbeschaugesetzes i.d.F. 1940 brauchbar gemachtes Fleisch ist dann als ausreichend erhitzt anzusehen, wenn diese Kriterien erfüllt sind. Nach GLÄSSER (1946a und b, 1951) und REUSS (1951) hingegen ist die

durch die Brauchbarmachung durch Erhitzen verursachte Grauverfärbung des Fleisches kein verlässliches Indiz für eine hinreichende Inaktivierung der pathogenen Mikroflora. NUSIMOVICH und Mitarbeiter (1979) objektivieren die Intensität der Hitzebehandlung von Fleisch durch eine instrumentelle Objektivierung der optischen Eigenschaften des Fleischsaftes. Nach SNYDER (1964) weist auf 79,4°C erhitztes Rindfleisch durch die Entstehung von Methmyoglobin eine maximale Absorption bei 584 nm auf. Eine hinreichende Objektivierung des Farbaussehens von Fleischsaft ist durch dessen Vergleich mit einem adäquaten Farbstandard auch visuell möglich. Nach HAGUE und Mitarb. (1994) weisen bei 55 - 66°C erhitzte Rinderbuletten roten bis dunkelroten, bei 71°C rosa-bräunlichen und bei 77°C bräunlichen bis ocker farbigen Fleischsaft auf. Erzeugnisse, deren Fleischsaft auch im Kern ockerfarben bis allenfalls bräunlich aussieht, können als ausreichend pasteurisiert beurteilt werden. Das USDA-FSIS (1989) ermisst den hygienischen Erfolg einer Hitzebehandlung von Fleisch nicht am Farbaussehen des Fleischsaftes, sondern an dessen Proteinkonzentration. Hackfleischerzeugnisse sollen so erhitzt werden, dass nach dem Garprozess ein relativ klarer Fleischsaft resultiert. HAGUE und Mitarb. (1994) teilen mit, dass eine vollständige Klärung des Fleischsaftes auch nicht nach einem Einwirken von 77°C erfolgt.

FOGG und HARRISON (1975) bringen Probengut vom *M. semitendinosus* des Rindes auf 25 und 45°C und prüfen hierauf den Zusammenhang zwischen dem Farbaussehen des Fleischsaftes und dessen Polyacrylamid-Elektropherogramm. Bei den 45°C-Proben ist der Farbton des Fleischsaftes ins gelbliche verschoben und die Zahl und Intensität der Proteinbanden des Pherogramms verringert. Zwischen dem Farbaussehen und der Ausprägung der Häm-Protein-Banden besteht keine engere Korrelation.

Gemäß USDA-FSIS (1989) sind Hackfleischerzeugnisse als ausreichend erhitzt anzusehen, wenn die Fleischstückchen auch im Kern der Produkte ein grau-braunes Aussehen aufweisen. Ein rötliches Aussehen darf beispielsweise bei einer Bulette auch nicht in noch so kleinen Partien bestehen. Nach HAGUE und Mitarb. (1994) ist die Beurteilung von Rinderbuletten auf ausreichende Erhitzung an diesem Kriterium nicht möglich, da eine unzureichende Hitzeinaktivierung pathogener Keime auch noch bei graubraun aussehendem Fleisch bestehen kann. Colorimetrisch lassen sich die auf eine Kerntemperatur von 71°C gebrachten Proben sowohl von den auf 77°C, als auch von den auf lediglich 66, 60 und 55°C erhitzten signifikant unterscheiden. Die drei letztgenannten Chargen sind von einander colorimetrisch nicht reproduzierbar unterschieden. LIU und BERRY (1996) teilen mit, dass sich colorimetrisch auch auf 71°C und 74°C im Kern erhitzte Rinderbuletten signifikant von einander unterscheiden lassen. DAVIS und FRANKS (1995) gelangen bei Putenoberkeule im Stück hingegen zur Feststellung, dass mittels des von LIU und BERRY (1996) angewandten colorimetrischen

Verfahrens auch das auf 60 und 66°C, auf 66 und 71°C sowie auf 71 und 77°C erhitzte Probengut signifikant unterschieden werden kann.

### 1.1.2 Mikrobiologische Kriterien

Für die Kontrolle des Erfolges einer Pasteurisation bei einer Temperatur von bis zu 90°C empfehlen INCZE und Mitarb. (1999) als Indikator-Mikroorganismen vegetative Keime, die eine hinreichend höhere Hitzeresistenz aufweisen, als die unerwünschte potentielle vegetative Flora. Da Streptokokken unter den nicht sporenbildenden Keimarten nach HOUBEN (1980), WOJCIECHOWSKI (1980), REICHERT und Mitarb. (1988) und MÜLLER (1989) die höchste Hitzeresistenz aufweisen, werden als Richtkeime für eine ausreichende Pasteurisation bei Fleischerzeugnissen meist *Streptococcus faecium* und *faecalis* verwendet. Die Streptokokken der Serogruppe D, zu deren Habitat neben Haut, Fell, Haaren, Federn und Hufen gerade auch der Verdauungskanal von Mensch und Tier zählt, rangieren in der Systematik der Bakterien seit einiger Zeit als Enterokokken.

Der von WOJCIECHOWSKI (1980) für *Str. faecalis* ermittelte  $D_{70^{\circ}\text{C}}$ -Wert beträgt bei nicht gepökeltem Fleisch 31,22 min, der z-Wert 37,5°C. REICHERT und Mitarb. (1979) teilen mit, dass in gepökeltem und auf eine Kerntemperatur von 55 bis 73°C gebrachtem Schweinefleisch die D-Streptokokken mit  $D_{70^{\circ}\text{C}} = 2,95$  min und  $z = 10^{\circ}\text{C}$  unter den Genera *Streptococcus*, *Micrococcus* und *Lactobacillus* die höchste Hitzeresistenz aufweisen. *Str. faecalis* hat nach REICHERT und Mitarb. (1988) in nicht umgerötetem Brühwurstbrät einen  $D_{70^{\circ}\text{C}}$ -Wert von 3,1 min und einen z-Wert von 10,67°C. Durch Zugabe von Nitritpökelsalz und Natriumdiphosphat verringert sich die Hitzeresistenz der Enterokokken. Während die von OTT und Mitarb. (1961), SPENCER (1967), ZAKULA (1969) und HOUBEN (1982) ermittelten D- und z-Werte von *Str. faecalis* und *Str. faecium* mit den von Reichert und Mitarb. referierten Daten übereinstimmen, gelangen MAGNUS und Mitarb. (1988) bei pasteurisiertem Kochschinken zur Feststellung, dass die Hitzeresistenz der Enterokokken sehr stark differieren und *Str. faecalis* so einen  $D_{66^{\circ}\text{C}}$ -Wert von 1,69 min, *Str. faecium* E-20 von 13,91 min und *Str. faecium* P-1A sogar von 29,04 min aufweisen kann. Die Autoren geben zu Bedenken, dass die D- und z-Werte keine konstanten Größen darstellen, sondern sehr milieuhängig und deshalb als Determinanten einer verlässlichen Pasteurisation sehr umsichtig vorzugeben sind.

### 1.1.3 Chemische und chemisch-physikalische Temperatur-Zeit-Indikatoren

Zu den chemischen Indikatoren der beim Haltbarmachen von Lebensmitteln zur Wirkung gelangenden Hitze zählen Parameter wie die Konzentration der beim Erhitzen entstandenen Maillardprodukte oder der hierbei denaturierten Proteine. Die Bestimmung dieser Parameter erfolgt z.T. durch Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIR), Dynamische Differenzkalorimetrie, Koagulationstests, chromatographische Verfahren oder elektro-phoretisch.

#### 1.1.3.1 Nachweis durch Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIR)

Da die Hitzebehandlung des Probengutes zu einer temperaturabhängigen Veränderung auch des Schwingungsspektrums von Molekülen im nahen Infrarotbereich führt, kann auch Infrarot-spektroskopisch auf die wirksam gewordene Temperatur rückgeschlossen werden.

ISAAKSON und Mitarb. (1989) bestimmen bei 2190 bis 3210 nm die Reflektion von Rinderhackfleisch nach Erhitzen auf Kerntemperaturen von 21 - 95°C. Sie teilen mit, dass die Messwerte mit der Hitzebehandlung sehr eng korreliert ( $r = 0,987$ ) und die Kerntemperaturen bei einem Intervall von 3,9°C signifikant zu unterscheiden sind. Die Sensitivität des Verfahrens lässt sich dadurch auf das Intervall von 2,5°C ( $r = 0,992$ ) steigern, dass das Probengut für die NIR-spektroskopische Bestimmung lyophilisiert wird. ELLEKJAER und ISAKSSON (1992) erhitzen von verschiedenen Rindern stammendes Hackfleisch auf 50 - 85°C im Kern und gelangen NIR-reflektionspektroskopisch zur Feststellung, dass sich die Hitzebehandlungen beim Intervall von 2 bis 2,1°C und nach Lyophilisieren des Probengutes beim Intervall von sogar nur 1,4°C signifikant unterscheiden lassen. CHEN und MARKS (1997) bestimmen die NIR-Reflektion unterschiedlich erhitzter Buletten aus Putenfleisch bei 400 bis 700 nm, 1100 bis 2500 nm und 400 bis 2500 nm. Den Mitteilungen von ELLEKJAER und ISAKSSON (1992) sehr nahekommend zeigt sich, dass der Einfluss unterschiedlicher Hitzeintensitäten am genauesten im Bereich von 400 bis 2500 nm unterschieden werden kann. Das Reflektionsspektrogramm hängt erwartungsgemäß nicht nur von der Höhe, sondern auch von der Dauer der Temperatureinwirkung ab. THYHOLT und Mitarb. (1998) bringen Rinderhackfleisch auf 65,6 bis 75,6°C und stellen am gefriergetrocknete Presssaft der Proben fest, dass die bei 400 bis 2500 nm resultierenden Reflektions-Spektrogramme mit der Temperatur der Hitzebehandlung sehr eng korreliert und die verschiedenen Erhitzungschargen beim Intervall von nur 1,5°C signifikant zu unterscheiden sind. Nach ELLEKJAER und ISAKSSON (1992), CHEN und MARKS (1997) und THYHOLT und Mitarb. (1998) lassen sich die hitzebedingten

chemischen Veränderungen in Fleisch besser durch NIR-Spektroskopie als durch NIT-Spektroskopie unterscheiden.

### **1.1.3.2 Nachweis durch Dynamische Differenzkalorimetrie**

Die Hitzedenaturierung von Protein ist ein endothermer Vorgang, der sich bei gestuft erhitztem Probengut differenzkalorimetrisch als Funktion des Temperaturanstiegs bestimmen lässt.

WRIGHT und Mitarb. (1977) teilen mit, dass das differenzkalorimetrische Thermogramm der rohen Skelettmuskulatur drei Haupt-Peaks aufweist, die bei Kaninchenmuskulatur bei 60°C, 67°C und 80°C liegen und die Denaturierungstemperatur des Myosins, Sarkoplasmaproteins und Aktins markieren. Nach STABURSVIK und MERTENS (1980), QUINN und Mitarb. (1980) und PARSONS und PATTERSON (1986) können diese Temperaturschwellen in Abhängigkeit von der Tierart, vom Gehalt des Muskelfleisches an Aktomyosin, Fett- und Bindegewebe sowie vom pH-Wert und Salzgehalt mehr oder weniger differieren. PARSONS und PATTERSON (1986) stellen bei Rindermuskulatur fest, dass die Peaks mit zunehmender Temperatur schließlich vollständig verflachen. Im Bereich von 40°C bis 72°C ist die Korrelation zwischen der einwirkenden Temperatur und dem differenzkalorimetrisch identifizierten Beginn der Denaturierung des Probenmaterials so eng, dass sich Temperaturunterschiede von 2,6°C bzw. 1,2°C gesichert feststellen lassen. ELLEKJAER (1992) teilt mit, dass sich differenzkalorimetrisch nicht nur der Beginn der Denaturierung der betreffenden Proteine bestimmen lässt, sondern auch die zur Einwirkung gelangte Höchsttemperatur.

### **1.1.3.3 Nachweis durch Koagulationstest**

Das methodische Prinzip der Koagulationstests beruht auf der Verringerung des wasserlöslichen Proteinanteils des Probengutes, die als Funktion der absorbierten Wärmemenge zunimmt.

CORETTI (1957) extrahiert bei 65 bis 66°C gegarten Kochschinken des Handels mit Wasser, erhitzt das Extrakt auf 65 bis 66°C und wertet die nach Filtration visuell erkennbare Trübung als Indiz für Unterkochung. Falsch-negative Ergebnisse sind bei diesem Prinzip nicht ausgeschlossen. TOWNSEND und Mitarb. (1984, 1985) berichten, dass die Aussagekraft des Koagulationstests weder durch die Art der Probenzerkleinerung, noch durch Extraktion mit

0,9%iger NaCl-Lösung anstelle von Wasser, noch durch die Porosität des Filters beeinträchtigt wird. Nach JOHNSTON (1980) und TOWNSEND (1983) lässt sich die beim Hitzegaren der Produkte wirksam gewordene Temperatur im Bereich von 54 bis 57°C mit einer Genauigkeit von 2 bis 3°C, im Bereich von 63 bis 67°C jedoch nur noch von 8 bis 10°C bestimmen. TOWNSEND und Mitarb. (1990) bestimmen den Einfluss der Hitzebehandlung auf die Proteinkoagulation an deren Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Schalleitung. Das Verfahren erweist sich als zu wenig sensibel und zu zeitaufwendig. UDDIN und Mitarb. (2000) prüfen die Eignung des Koagulationstests bei Fischfleisch und stellen an stufenweise auf 67°C erhitztem Filet vom Blauen Merlin fest, dass die jeweilige Hitzebehandlung bis auf 1 bis 12°C genau nachgewiesen werden kann. Die Genauigkeit der Resultate wird weder durch die Dauer der Temperatureinwirkung, noch durch die Art der Probenzerkleinerung beeinflusst. Die Trübung der Extrakte der auf 67°C erhitzten Proben wird nach Ergebnis der elektrophoretischen und chromatographischen Kontrollen durch Laktatdehydrogenase verursacht. Die genauesten Ergebnisse resultieren bei Extraktion mit 0,9%iger NaCl-Lösung.

#### **1.1.3.4 Nachweis durch Biuret-Assay und Kjeldahl-Verfahren**

Das methodische Prinzip dieser Verfahren beruht wie im Falle der Koagulationstests auf der der absorbierten Wärmemenge proportionalen Verringerung des Gehaltes der hitzegegarten Produkte an löslichen Stickstoffsubstanzen, deren Konzentration im Probenextrakt als Stickstoff-Äquivalent bestimmt wird.

Nach COHEN (1966) besteht bei Schinken, der im Kern auf 67 bis 92°C erhitzt wird, ein enger Zusammenhang zwischen der wirksam gewordenen Kerntemperatur und dem Gehalt des NaCl-Extraktes an biuret-positiver Substanz (BPS). Da die Hitzedenaturierung von Peptiden nicht nur eine Funktion der Kerntemperatur, sondern auch der Zeit ist, lässt sich die effektive Maximaltemperatur am Kriterium des BPS-Gehaltes nur annähernd bestimmen. CRESPO und OCKERMANN (1977a und b) bringen Probengut von Brustmuskel und Keule vom Huhn in Intervallen von 10°C auf eine Kerntemperatur von 40°C bis 80°C und bestimmen den Gehalt der Probenextrakte an Sarcoplasmprotein (SP), myofibrillärem Protein (MP) und Nicht-Protein-Stickstoff (NPN). Signifikante Unterschiede resultieren lediglich bei den 50-, 60- und 70°C-Proben und auch bei diesen nur bei den Gehalten an löslichem SP und relativ hitzelabilem MP. DAVIS und ANDERSON (1983) entnehmen bei sechs Schweinekarkassen vom *M. longissimus dorsi* pH-differentes Probengut, erhitzen es auf 40 bis 80°C und bestimmen den Gehalt der Aqua dest.-Extrakte an BPS jeweils vor und nach deren 15 min langem Erhitzen bei 70°C. Die Ergebnisse zeigen, dass die Konzentration von BPS zwar

sehr stark vom pH des Probengutes abhängt, die nachträgliche Hitzebehandlung des Extraktes aber eine Nivellierung der Konzentration auf annähernd 20,2% des Gehaltes der nicht hitzebehandelten Kontrollen zur Folge hat. Ob bei einem Probengut 70°C wirksam geworden sind, kann mit einer sehr hohen Sicherheit attestiert werden, wenn das Verhältnis  $q$  der BPS-Konzentration des Probenextraktes vor und nach dessen diagnostischer Erhitzung auf 70°C dem Wert  $q \geq 1,3$  entspricht. DAVIS und Mitarb. (1985) prüfen am Kriterium des BPS-Gehaltes der Aqua dest.-Extrakte vom *M. longissimus* des Schweins und *M. semimembranosus* des Rindes den Einfluss einer 7,5, 15 und 30 min langen Einwirkung einer Kerntemperatur von 60, 65, 67,5, 70 und 75°C. Die Ergebnisse zeigen, dass der BPS-Gehalt der Extrakte im Temperaturbereich von 60 bis 70°C mit zunehmender Dauer der Hitzeeinwirkung bis 30 min abnimmt, sich danach jedoch infolge von Inlösungen von Gelatine und Proteinhydrolyse erhöht. Die Autoren heben hervor, dass sich der BPS-Gehalt der Extrakte als Parameter der Erhitzungsintensität lediglich in der Verhältniszahl  $q$  eignet. Hinsichtlich des Einflusses der Pökellung auf den Gehalt an BPS und den  $q$ -Wert, stellen DAVIS und Mitarb. (1987) bei Schweinefleisch fest, dass die BPS-Gehalte um etwa die Hälfte unter den von DAVIS und ANDERSON (1983) referierten Konzentrationen liegen und  $q \geq 1,12$  ein signifikantes Indiz für eine Unterkochung ist. Da bei dieser Beurteilungsgrundlage falsch-positive Resultate nicht ausgeschlossen sind, postulieren die Autoren, vom BPS-Gehalt abgeleitete Aussagen über die bei einem Probengut wirksam gewordene Temperatur an einem zusätzlichen Parameter abzusichern. PARSONS und PATTERSON (1986) extrahieren auf 30, 50, 60, 70 und 88°C temperierte Rindermuskulatur mit 0,9%iger Kochsalzlösung und bestimmen nach Kjeldahl den Gehalt der gewonnenen Extrakte an stickstoffhaltiger Substanz. Am stärksten verringern sich die Stickstoffgehalte beim Erhitzen von 40 bis 70°C. Die Autoren erachten dieses Nachweisverfahren für die Praxis als sehr aussichtsreich, heben jedoch hervor, dass die von ihnen referierten Ergebnisse nicht an repräsentativem Probengut ermittelt sind und eine Vielzahl von Divergenzfaktoren der Überprüfung bedarf.

#### **1.1.3.5 Nachweis durch HPLC- und GC-Chromatographie**

Die Hitzebehandlung von Probengut hat bei verschiedenen Inhaltsstoffen eine Veränderung des Molekulargewichts und/oder der Molekülladung zur Folge. Die Veränderungen lassen sich chromatographisch nachweisen.

DAVIS und ANDERSON (1984) erhitzen Rinder- und Schweinemuskulatur bei Kerntemperaturen von 60 – 75°C unterschiedlich lange und bestimmen den Gehalt der Aqua dest.-Extrakte an wasserlöslichem Protein durch Size exclusion high performance liquid chroma-

tography (SEC-HPLC). Die Chromatogramme sind speziesspezifisch, hängen sehr stark von der Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung ab und weisen bei 280 nm 6 hitzelabile Proteine auf. Bei dem dem Regime 67,5°C/15 min entsprechenden Wärmeäquivalent verringert sich der Einfluss der Hitzeintensität auf die Chromatogramme bereits so sehr, dass bei einer Intensivierung der Hitzebehandlung nur mehr unwesentliche Veränderungen auftreten. So sind im Extrakt von Probengut, das 30 min bei der Kerntemperatur 70°C erhitzt wird, ebenso, wie bei den lediglich auf 75°C im Kern gebrachten und anschließend sofort gekühlten Vergleichsansätzen nur mehr 1% der hitzelabilen wasserlöslichen Proteine des rohen Muskels vorhanden. Eine Unterscheidung der beiden Temperatur-Zeit-Relationen ist also nicht möglich.

McCORMICK und Mitarbeiter (1987) studieren mittels Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) den Einfluss der Hitzebehandlung von Skelettmuskulatur vom Schwein auf den Gehalt des wässrigen Extraktes an Sarkoplasmprotein. Der größte Löslichkeitsverlust erfolgt bei den auf eine Kerntemperatur von 60 bis 65°C gebrachten und daraufhin sofort gekühlten Ansätzen. Wird die Temperatur 30 min lang gehalten, verringert sich der Gehalt der Extrakte an Sarkoplasmprotein auf etwa 50% des Gehalts vor dem Erhitzen. Die Extrakte der Proben, die nach Erreichen der Kerntemperatur 75°C sofort gekühlt werden, weisen nur noch 1% des Ausgangsgehaltes an Stickstoffsubstanz auf. Bei den löslich gebliebenen Eiweißfraktionen des Probengutes, das auf 65°C gebracht und dann sofort gekühlt wird, handelt es sich vorwiegend um Laktatdehydrogenase, sodann um Pyruvatkinase und Myoglobin. Die Gehalte der Extrakte vom *M. longissimus*, *M. serratus ventralis* und *M. psoas major* an Myoglobin, Laktatdehydrogenase, Aldolase, Pyruvatkinase, Enolase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglyceratmutase differieren signifikant.

ANG und HUANG (1993) untersuchen mittels Headspace-GC an Buletten aus Hähnchenkeule den Einfluss einer Erhitzung auf 60 bis 85°C und einer 14 Tage langen Lagerung der Produkte bei 4°C. Während sich die Hitzebehandlung auf den Gehalt an flüchtigen Komponenten kaum auswirkt, nimmt der Gehalt der auf 60 bis 70°C gebrachten Versuchschargen an flüchtigen Inhaltsstoffe im Verlaufe der Lagerung insbesondere bei den auf über 70°C erhitzten Ansätzen sehr stark zu. Diese Ergebnisse bestätigen sowohl die Mitteilung von ANG und LYON (1990), dass der gaschromatographisch ermittelte Gehalt des Brustmuskels, der Keule und der Haut von Hühnchen an flüchtigen Substanzen nach Erhitzen auf eine Kerntemperatur von 80°C und einer anschließenden 5 Tage langen Lagerung bei 2°C kontinuierlich ansteigt, und dass dies nach SU und Mitarb. (1991) auch bei Buletten aus Hähnchenfleisch zutrifft, die nach einem Erhitzen auf 83°C 3 Tage bei 3°C gelagert werden. ANG und HUANG (1993) erhitzen Hähnchen-Bulette auf 60, 65, 70, 75, 80 und 85°C und registrieren gaschromatographisch bei den 60°C-, 65°C- und 70°C-Proben nach 14 Tage langer Lagerung bei 4°C eine starke Zunahme flüchtiger Substanzen wie Hexanal, Heptanal und Pen-

tanal. Als Parameter für die retrospektive Beurteilung der Intensität einer Hitzebehandlung eignet sich der hitzeinduzierte Gehalt an flüchtigen Aromaverbindungen demnach allenfalls dann, wenn er unmittelbar nach der Pasteurisation bestimmt wird. Bei gestuft erhitzten Erzeugnissen aus Geflügelfleisch notieren ANG und LIU (1996a) eine enge Korrelation zwischen der absorbierten Wärmemenge und den gaschromatographisch erfassbaren flüchtigen Substanzen, bei denen es sich weithin um Sekundärprodukte der hitzekatalysierten Oxidation der reichlich vorhandenen ungesättigten Fettsäuren handelt. Beim Brustmuskel vom Huhn hingegen, der in 5°C-Intervallen auf 60 bis 80°C erhitzt wird, stellen ANG und LIU (1996b) fest, dass die Konzentration von 23 gaschromatographisch erfassten Substanzen bei den auf über 70°C erhitzten Proben mit Ausnahme einer einzigen Verbindung abnimmt.

### 1.1.3.6 Nachweis durch Elektrophorese

Die Hitzebehandlung des Probengutes hat bei einer Reihe von Inhaltsstoffen eine Veränderung des Molekulargewichts und/oder der Molekülladung zur Folge, die sich elektrophoretisch nachweisen lässt.

LAAKONEN und Mitarb. (1970) teilen mit, dass sich im Presssaft und im gefriergetrockneten wässrigen Extrakt von bis zu 10 h lang bei 37, 45, 60 und 80°C inkubiertem von *M. longissimus*, *M. rectus*, *M. femoris* und *M. semitendinosus* des Rindes durch Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) 17 Proteinbanden darstellen lassen und dass sich die Pherogramme von Presssaft und Extrakt zwar nur geringgradig, dennoch aber sehr markant unterscheiden. Die Konzentration der 4 Myoglobinbanden ist schon bei den auf 60°C erhitzten und dann sofort gekühlten Proben signifikant verringert. Bei den Ansätzen von 60 min bei 80°C erhitztem Probengut fehlen diese Fraktionen vollständig. CRESPO und OCKERMANN (1977a und b) teilen mit, dass sich die wässrigen Extrakte von 15 min bei 40 bis 80°C erhitztem „weißem“ Fleisch vom Brustmuskel und „rotem“ Fleisch von der Keule des Huhns hinsichtlich der Anzahl, Ausprägung und elektrophoretischen Mobilität der Proteinfractionen unterscheiden. Das Extrakt aus der Keule enthält auch nach 15 min langem Einwirken von 80°C noch 3 der ursprünglich 6 wasserlöslichen Proteinfractionen.

TINBERGEN und OLSMANN (1976) extrahieren rohe und bei 75 bis 110°C erhitzte Skelettmuskulatur vom Schwein, Rind, Pferd und Huhn mit Wasser und stellen mittels Isoelektrisch fokussierender Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGIF) fest, dass sich die isoelektrischen Punkte der Proteinfractionen durch die Hitzebehandlung erniedrigen. KING (1978) führt dies auf die Hydrolyse der Aminogruppen von Arginin und Glutamin zurück und empfiehlt die Bandenverschiebung als ein Kriterium der Hitzebehandlung.

LEE und Mitarb. (1974) unterziehen Probengut vom *M. semitendinosus*, *M. semimembranosus*, *M. biceps femoris* und *M. quadriceps femoris* vom Rind einer bis zu 30 min langen gestuften Erhitzung auf 65 bis 90°C und fraktionieren die im wässrigen Extrakt enthaltenen Proteine mittels Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Von den 6 Proteinfractionen geht bis zur Temperaturstufe 80°C mit jeder Temperaturerhöhung um 5°C bei bis zu 20 min langer Temperatureinwirkung jeweils eine Proteinfraction verloren, und zwar unabhängig von der anatomischen Provenienz und postmortalen Alterung des Proben-gutes. Ein Chromatogramm mit 4 oder weniger Banden wird als ein verlässliches Indiz dafür erachtet, dass eine Kerntemperatur von zumindest 70°C wirksam wurde. STEELE und LAMBE (1982) studieren mittels SDS-PAGE den Einfluss einer 20 min langen Einwirkung von 65, 70, 75, 80, 85 und 90°C auf Muskelfleisch von Rind, Pferd, Schwein, Hase, Huhn und Gans. Die Hitzebehandlung lässt sich bei allen Spezies in den genannten Abstufungen unterscheiden. Auf die Intensität der Banden ist ohne Einfluss, ob die jeweilige Temperatur nur 20 min oder bis zu 1 h einwirkt. CHANG und Mitarb. (2001) studieren an der Skelettmuskulatur der Regenbogenforelle mittels SDS-PAGE den Einfluss einer 15 sec bis 30 min langen Einwirkung von 59 bis 65°C. Das 30 min lange Einwirken von 63°C hat im Pherogramm den Schwund des Proteins 46 KD zur Folge. CALDIRONI und BAZAN (1980) erhitzen Skelettmuskulatur vom Rind stufenweise von 60 bis 90°C und fraktionieren mittels SDS-PAGE die im wässrigen Extrakt enthaltenen Proteine. Die densitometrische Auswertung der Pherogramme lässt im Temperaturbereich von 68 bis 74°C eine besonders hitzeempfindliche Fraktion D und eine besonders hitzeresistente Fraktion E erkennen. Ein dem Erreichen einer Kerntemperatur von 70°C vergleichbarer Effekt besteht dann, wenn das Verhältnis der Densitometerwerte D:E den Quotienten 1 überschreitet.

#### 1.1.4 Nachweis durch Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

Das Epitop der Nativität eines globulären Proteins ist nach IWABUCHI und SHIBASAKI (1981) nicht so sehr dessen Primärstruktur als vor allem dessen Tertiärstruktur. Parameter für retrospektive Aussagen über die Intensität der Hitzebehandlung eines bestimmten Proben-gutes kann so auch die aus einer Hitzeeinwirkung resultierende Veränderung der nativen Konformation eines Proteins und die hierdurch bedingte Verringerung der Antigenität sein.

MARIN und Mitarb. (1992) extrahieren *M. semimembranosus* und *M. adductor* des Rindes mit einem Phosphatpuffer von pH 7 mit 0,6 M NaCl und 1 mM MgCl<sub>2</sub>, erhitzen die Extrakte in 10°C-Intervallen jeweils 30 min lang von 40 bis 100°C und bestimmen mittels ELISA die Abnahme der Antigenität. Die Ergebnisse zeigen, dass die Restantigenität der hitzebehandelten

Extrakte mit der Intensität der Hitzebehandlung sehr eng und hochsignifikant korreliert ist. WANG und Mitarb. (1992) extrahieren auf 68,3, 69,7, 70,9 und 72,1°C erhitzten Brustmuskel der Pute mit Wasser und bestimmen den Proteingehalt, die LDH-Aktivität und durch Indirekt Kompetitiven ELISA mittels polyclonalen Antikörpern die LDH-Konzentration der Extrakte. Die Proteingehalte und die LDH-Aktivitäten der Extrakte von Probengut, das auf  $\geq 69,7^\circ\text{C}$  gebracht wird, unterscheiden sich voneinander nicht signifikant. Im Bereich von 68,3 bis 72,1°C lässt sich am Kriterium der LDH-Konzentration die jeweilige Hitzeeinwirkung auf 1,1 bis 1,2°C genau bestimmen. Eine noch höhere Genauigkeit erreichen ABOUZIED und Mitarb. (1993) mittels eines auf monoclonalen Antikörpern basierenden Sandwich ELISA-Verfahrens. WANG und Mitarb. (1993) bestimmen mittels Sandwich ELISA den Einfluss von NaCl, der Gefrierlagerung sowie der Erhitzung des Brustmuskels der Pute auf 68,3, 69,7, 70,9 und 72,1°C auf das extrahierbare Protein sowie auf die LDH-Aktivität und LDH-Konzentration. Während sich die Proteingehalte und die LDH-Aktivitäten der Extrakte von Probengut, das auf eine Temperatur  $\geq 68,3^\circ\text{C}$  gebracht wird, nicht signifikant unterscheiden, lässt sich auf 69,7°C erhitztes Probengut am Kriterium der LDH-Konzentration auch noch von Probengut signifikant unterscheiden, das auf 70,9°C erhitzt wird. Das Salzen des Brustmuskels mit NaCl ist auf die hitzebedingte Proteindenaturation nur von geringem Einfluss. Eine der Hitzebehandlung vorausgehende bis 42 Wochen lange Gefrierlagerung des Probenguts bei  $-12^\circ\text{C}$  ist zwar ohne Einfluss auf den Proteingehalt und die LDH-Konzentration der Extrakte des hitzebehandelten Probengutes, die LDH-Aktivität jedoch nimmt von der 16. Woche an zu. Wird mit 1,2% NaCl gesalzenes rohes Probengut sowohl roh als auch nach Erhitzen auf 68,3 bis 72,1°C bis zu 60 Wochen bei  $-12^\circ\text{C}$  gelagert, so verringert sich beim rohen Probengut im Gegensatz zum erhitzten mit dem Proteingehalt und der LDH-Konzentration auch deren Aktivität erheblich. In einer weiteren Studie bestimmen WANG und Mitarb. (1994) bei den Extrakten aus Putenkeule, die im Kern auf 68,9 bis 72,2°C erhitzt wird, den Proteingehalt sowie die LDH-Aktivität und mittels des Indirekt kompetitiven sowie des Sandwich ELISA-Verfahrens die Konzentration der LDH, des Serum-Proteins und des IgG. Während sich die Extrakte von Probengut, das auf 68,9 bis 72,2°C erhitzt wird, hinsichtlich des Gehalts an Protein und IgG nicht unterscheiden, bestehen hinsichtlich der Serum-Protein-Konzentration signifikante Unterschiede. Bei den 71,1°C-Proben von der Keule wird trotz besonders niedriger LDH-Ausgangskonzentration eine relativ hohe, gegenüber den 70°C-Proben von Keule und Brustmuskel nicht signifikant unterschiedene LDH-Restkonzentration nachgewiesen, die die LDH-Restkonzentration der 71,1°C-Proben vom Brustmuskel jedoch um das 20-fache übersteigt. Die Autoren erachten die geprüften Parameter als Indikatoren einer Erhitzung auf bis zu 71,1°C zwar nicht für geeignet, die LDH-Restkonzentration und LDH-Restaktivität jedoch aufgrund der relativ hohen Hitzestabilität der LDH-Isozyme der Keule als geeignet für den Nachweis einer entsprechend intensiveren Hit-

zebehandlung. SMITH und Mitarb. (1996) teilen mit, dass sich bei gekochtem Schinken aus Putenkeule von den Parametern lösliches Protein, LDH-Aktivität, mittels Sandwich ELISA nachweisbare LDH-Konzentration und mittels Indirekt kompetitiver ELISA ermittelbare IgG- und Serum-Albumin-(TSA)-Konzentration lediglich die IgG- und die LDH-Konzentration als Indikatoren einer ausreichenden Erhitzung eignen. Die IgG-Konzentration der auf  $> 68^{\circ}\text{C}$  erhitzten Proben liegt bei den gepökelten Ansätzen niedriger als bei den nicht gepökelten, und die LDH-Konzentration der pasteurisierten Proben nimmt im Verlaufe einer 12 Monate langen Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis auf das Doppelte zu. VEERAMUTHU und Mitarb. (1997) erhitzen Brustmuskel und Keule von Pute und Huhn sowie Brühwurst und andere Erzeugnisse aus Putenfleisch auf eine Kerntemperatur von  $65,5$  bis  $73,8^{\circ}\text{C}$  und bestimmen mittels Sandwich ELISA die LDH-Konzentration und mittels Indirekt kompetitiver ELISA die IgG- und Serum-Albumin-Konzentration des Probenguts. Die Konzentration der LDH, von IgG und des Serum-Albumins liegt bei den Proben von der Pute stets höher als bei den Vergleichsproben vom Huhn. Die Keule weist höhere Konzentrationen an Serum-Albumin und IgG auf als der Brustmuskel, die LDH-Konzentration hingegen liegt bei der Keule niedriger als beim Brustmuskel. Bei den zusammengesetzten Erzeugnissen aus Putenfleisch hängt die Konzentration der LDH, von IgG und des Serum-Albumins sehr stark von der Rezeptur und vom Produktvolumen ab, so dass als Indiz einer ausreichenden Erhitzung bei jedem Produkt eine spezifische Grenzkonzentration etabliert werden muss.

LEVIEUX und Mitarb. (1995) erhitzen das Extrakt von *M. longissimus dorsi* des Rindes 30 bis 780 min lang bei  $54$  bis  $70^{\circ}\text{C}$  und bestimmen mittels Single Radial Immunodiffusion den Einfluss der Hitzebehandlung auf den Gehalt an Myoglobin, LDH, Albumin Transferrin und IgG. An der LDH-Konzentration der 180 min lang bei  $55$  bis  $61^{\circ}\text{C}$  erhitzten Extrakte lässt sich die wirksam gewordene Temperatur auf  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , bei den bei  $63$  bis  $70^{\circ}\text{C}$  30 min lang erhitzten Proben auf  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  genau ermitteln.

WANG und Mitarb. (1996) bestimmen mittels Sandwich ELISA und polyclonalen Antikörpern gegen Rinder-LDH die LDH-Konzentration von Rinderhackfleischproben, die im Kern auf  $62$  bis  $74^{\circ}\text{C}$  erhitzt werden. Im Temperaturbereich von  $66$  bis  $74^{\circ}\text{C}$  nimmt die LDH-Konzentration im Intervall von  $2^{\circ}\text{C}$  signifikant ab. ORTA-RAMIREZ und Mitarb. (1996) bestätigen diese Feststellung und teilen mit, dass sich die Empfindlichkeit des Sandwich ELISA-Verfahrens um das 10-fache steigern lässt, wenn monoclonale anstelle von polyclonalen Antikörpern verwendet werden. Nach Ergebnis bei den auf  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzten Ansätzen ist eine Erhöhung des Fettanteils auf bis zu 20% und ein einmaliges Frosten und Auftauen des Probengutes vor dessen Erhitzen ohne Einfluss auf die LDH-Konzentration. Durch ein zweimaliges und ein mehrfach wiederholtes Frosten und Auftauen des Probengutes vor dem Erhitzen verringert sich die LDH-Konzentration hingegen erheblich.

### 1.1.5 Enzymatische Tests

Methodisches Prinzip der enzymatischen Erhitzungsnachweise ist die mit der absorbierten Wärmemenge zunehmende Denaturierung des Leitenzyms, dessen Restaktivität als Parameter des hygienischen und technologischen Effektes der Hitzebehandlung bestimmt wird.

#### 1.1.5.1 Katalase

EYERMANN (1955) bestimmt die Peroxidase-Aktivität von Skelettmuskelfleisch und Blut vom Rind, Kalb und Schwein nach Einwirken von 55 bis 100°C. Während die Fleischproben sensorisch schon nach 45 min langem Einwirken von 60°C als „durchgekocht“ befunden werden, besteht eine positive Peroxidase-Reaktion auch noch nach 90 bis 135 min langem Garen bei 60°C. Erhitztes Blut erweist sich auch noch nach Erhitzen auf maximal 100°C als peroxidasepositiv. Nach SCHEIBNER (1973) ist Peroxydase als Indikator für ausreichende Erhitzung bei Fleisch nicht geeignet, da Myoglobin und Hämoglobin als hitzeresistente Pseudoperoxydasen stören. Katalase, Peroxidase und Katalase-Peroxidase sind Hydroperoxydasen, die nach KING und WINFIELD (1963), WHITAKER (1972) und LEVY und Mitarb. (1992) die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  katalysieren. An der Umsetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  können jedoch auch sogenannte Pseudoperoxydasen wie Metmyoglobin beteiligt sein.

EYE (1982) nutzt Katalase als Leitenzym eines Erhitzungsnachweis bei Roastbeef, in dem das homogenisierte Probengut in einer 3%igen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung dispergiert wird, deren Oberflächenspannung mit Natrium-Lauryl-Sulfat herabgesetzt ist. Indiz einer unzureichenden Pasteurisation, bei der 62,8°C nicht in allen Probebezirken wirksam wurden, ist die Abspaltung von Sauerstoff aus  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das als  $\text{O}_2$  zu Schaumbildung und zur Flotation von Probenpartikeln führt. In gewissem Widerspruch hierzu wird von SPANIER und Mitarb. (1990) berichtet, dass die Katalase-Aktivität eines verdünnten Rindermuskelhomogenisates nach Erhitzen auf 74°C lediglich um 50% verringert wird. DAVIS und CYRUS (1998) bestimmen manometrisch die Katalase-Restaktivität von Rind- und Schweinefleisch, das – bei einem Teil der Proben auch nach einem vorherigen Frosten - 15 bis 120 s bei 65, 68,3 und 71°C erhitzt wird. Es lassen sich am Kriterium der Katalase-Restaktivität die Regimes 66,1°C/41 sec, 67,2°C/26 sec und 68,3°C/16 sec sicher voneinander unterscheiden. Die vor dem Erhitzen gefrosteten Proben weisen eine etwas geringere Restaktivität auf als die nicht gefrosteten. ANG und Mitarbeiter (1994) bestimmen die Katalase-Restaktivität von Brustmuskel und Keule des Huhns nach 5 bis 15 min langem Erhitzen des Probengutes bei 65 bis 75°C in 1°C-Intervallen und bei 69 bis 71,5°C in 0,5°C-Intervallen. Hierbei werden 2 g Probe in ein Reagenzglas eingewogen,

mit 4 ml einer 3%igen  $H_2O_2$ -Lösung vermischt, bei 23°C inkubiert und die Ergebnisse am Kriterium von Flotation oder Schaumbildung je nach Restaktivität nach 5, 10, 20, 30, 45, 90 oder 120 min abgelesen. Das Probengut erweist sich auch noch nach 15 min langem Einwirken von 68°C als katalasepositiv, die bei  $\geq 72^\circ C$  konditionierten Ansätze sind schon nach nur 5 min langer Hitzeeinwirkung negativ. Katalasepositive Resultate lassen sich auch bei den bei  $\geq 72^\circ C$  erhitzten Proben ggf. dadurch erzielen, dass die Inkubationstemperatur auf 37°C erhöht und die Inkubationszeit verlängert wird. ANG und Mitarb. (1996) stellen mittels dieses Nachweisverfahrens fest, dass sich handelsübliche Produkte aus Brustmuskel resp. Keule des Huhns nach Erhitzen auf dem Grill auf eine Kerntemperatur von maximal 69 resp. 68°C stets als katalasepositiv erweisen, bei der Kerntemperatur  $\geq 73^\circ C$  jedoch nur noch 3 von 12 resp. 1 von 17 Proben. Das Erreichen einer Kerntemperatur von  $\geq 73^\circ C$  lässt sich auf  $\pm 3$  bis  $4^\circ C$  genau bestimmen. LIU und Mitarb. (1996) weisen mittels des von ANG und Mitarb. (1994) empfohlenen Katalasetests am Brustmuskel des Huhns nach, wie sehr die Restaktivität des Leitenzyms nicht nur eine Funktion der Höhe und Dauer der Kerntemperatur ist, sondern insbesondere auch der Geschwindigkeit des zentripetalen Temperaturanstiegs. Die Autoren erinnern, dass die erhitzungsbedingte Restaktivität des Leitenzyms stets als integraler Gesamteffekt der Lethaleffekte in der Phase des Temperaturanstiegs (Aufheizphase), der Temperaturkonstanz (Haltephase) und der Temperaturabnahme (Abkühlphase) einer Hitzebehandlung in Betracht zu ziehen ist. LIU und Mitarb. (1997) stellen an sieben auf eine Kerntemperatur von 69, 69,5, 70, 70,5 und  $70^\circ C$  gebrachten Proben aus Brustmuskel des Huhns von unterschiedlichem Fett- und Wassergehalt fest, dass sich die nach Erreichen der Kerntemperatur resultierende Katalase-Restaktivität mit der Dauer der Temperatureinwirkung verringert, und zwar in Abhängigkeit vom Gehalt der Probe an Wasser und Fett in unterschiedlichem Maße.

#### 1.1.5.2 Triose-Phosphat-Isomerase

Die Auflagen der USDA-FSIS (1996) an die hygienische Konditionierung von Rindfleisch durch Erhitzen sind auf den z-Wert  $5,6^\circ C$  von Salmonella Senftenberg bezogen. ORTAMIREZ und Mitarb. (1997) ermitteln an *M. semitendinosus* des Rindes, der auf 53, 58, 63, 66 und  $68^\circ C$  erhitzt wird, den z-Wert der Sauren Phosphatase, Peroxidase, Lactatdehydrogenase, Phosphat-Glycerat-Mutase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Triose-Phosphat-Isomerase (TPI). TPI weist einen besonders niedrigen z-Wert von  $5,7^\circ C$  auf und wird von den Autoren deshalb als Leitenzym für ausreichende Wärmebehandlung empfohlen. VEERAMUTHU und Mitarb. (1998) ermitteln an Probengut der Putenkeule, die im Kern auf 55 bis  $70^\circ C$  erhitzt wird, den z-Wert von *S. Senftenberg*, Laktatdehydrogenase,

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Kreatin-Kinase, Triose-Phosphat-Isomerase und Saurer Phosphatase sowie von Serumalbumin und IgG. Der z-Wert von TPI liegt bei Probengut mit einem Fettgehalt von 4,3% bei 5,8°C resp. von 9,8% bei 5,4°C. Beide Werte liegen dem z-Wert 5,6 °C von S. Senftenberg am nächsten.

HSU und Mitarb. (1999) erhitzen *M. semimembranosus* des Rindes auf 48,9, 54,4, 60, 65,6 71,1 und 76,7°C und bestimmen die TPI-Aktivität sowie mittels SDS-PAGE und ELISA die TPI-Konzentration. Im SDS-PAGE-Chromatogramm der 71,1°C-Chargen werden TPI-Banden nicht mehr manifest, obwohl TPI nach Ergebnis der ELISA-Tests noch in einer Konzentration von 42,7% des bei den 48,9°C-Chargen bestehenden Gehaltes vorhanden ist. Da die TPI-Aktivität der 71,1°C-Chargen immer noch 5,1% der Aktivität der 48,9°C-Proben beträgt und relativ einfach nachzuweisen ist, wird von den Autoren empfohlen, den Erhitzungsnachweis bei Rindfleisch für die Gewährleistung einer hohen Sensitivität auf TPI als Leitenzym abzustellen. HSU und Mitarb. (2000) bestimmen die TPI-Aktivität von vorwiegend aus roten Muskelfasern bestehendem *M. trapezius* und *M. vastus intermedius* sowie von vorwiegend weiße Muskelfasern enthaltendem *M. longissimus dorsi* und *M. semimembranosus* von 3 Kühen und 3 Stieren. Das Probengut wird z.T. nach einem vorherigen Frosten sowohl im Wasserbad als auch im Ofen auf 48,9, 54,4, 60, 65,6, 71,1 und 67,7°C erhitzt. Während sich das Geschlecht der Tiere sowie die Frostung und die Art der Erhitzung auf die TPI-Restaktivität des Probengutes nicht auswirken, ist die von der anatomischen Provenienz der Proben abhängige Ausgangsaktivität des Leitenzyms z.T. von signifikantem Einfluss. Eine Verringerung der TPI-Aktivität resultiert beim *M. vastus intermedius* und *M. semimembranosus* schon von einer Temperatur von 65,7°C an, beim *M. trapezius* und *M. longissimus dorsi* hingegen erst bei 71,1°C. Als Indikatoren einer ausreichenden Erhitzung postulieren die Autoren bei den verschiedenen Produktarten die Festsetzung von TPI-Restaktivitäten, bei denen der Rezeptur der jeweiligen Probe Rechnung getragen ist.

### **1.1.5.3 Glutamat-Oxalat-Transaminase/Glutamat-Pyruvat-Transaminase**

TOWNSEND und DAVIS (1992) studieren an reproduzierbar erhitztem Rindfleisch mittels des klinischen Testkits SIGMA No. 505P Diagnostix Procedure Kit den Einfluss des zeitlichen Verlaufs des Temperaturanstiegs im Probengut, der Höhe und Wirkdauer der Temperatur im Probenkern und des Extraktionsmittels auf die Restaktivität von Glutamat-Oxalat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT). GPT erweist sich als Leitenzym für ausreichende Erhitzung als ungeeignet, da schon bei einer Temperatur von nur 57,2°C eine zu niedrige Restaktivität resultiert. GOT weist bei den 57,2°C-Chargen bei Ver-

wendung einer als Extraktionsmittel besser als Aqua dest. und Phosphatpuffer geeigneten 0,9%igen NaCl-Lösung eine ca. 10-fache höhere Aktivität auf als GPT. Durch ein 30 min langes Einwirken von 71,1 bzw. 79,4°C verringert sich die GOT-Aktivität um 56,2 bzw. 98,9% des Ausgangswertes. Bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 3,5°C/min verringert sich die GOT-Aktivität stärker als bei einer Geschwindigkeit von nur 0,35°C/min. Nach Erreichen der Kerntemperatur 71,1°C verringert sich die GOT-Aktivität des Probengutes im Verlaufe einer Haltezeit von 30 min lediglich bei der Aufheizgeschwindigkeit von 0,35°C/min noch in einem erheblichen Maße. Aufgrund der hohen Hitzestabilität von GOT und deren deshalb hoher Restaktivität bei den 71,1°C-Chargen empfehlen die Autoren das Enzym lediglich für den Nachweis einer Kerntemperatur von 79,4°C als Indikator. SEARCY und Mitarb. (1995) ermitteln mit dem SIGMA-Testkit Nr. 505P die GOT-Aktivität von *M. semimembranosus* des Rindes nach Einwirken von 71,1, 73,3, 75,6, 77,8, 78,9, 79,4, 80, 81,1 und 82,2°C. Im Bereich von 71,1 bis 82,2°C führt die Hitzebehandlung zu einer Abnahme der GOT-Aktivität um bis zu 99,8%, auf 78,9 und 79,4°C erhitztes Probengut lässt sich unter den Testbedingungen am Kriterium der GOT-Restaktivität jedoch signifikant unterscheiden. SENTER und Mitarb. (1996) bestimmen mit dem SIGMA-Testkit die GOT-Aktivität pasteurisierter Fleischerzeugnisse des Handels sowie von Probengut von Brustmuskel und Keule vom Huhn, das auf 70°C und im Intervall von 1°C bis 75°C erhitzt wird. Mit Ausnahme der 75°C-Chargen können nicht nur sämtliche Temperaturstufen signifikant voneinander unterschieden werden, sondern auch die vom Brustmuskel stammenden Proben von denjenigen von der Keule, deren Restaktivität um bis zum 2-fachen über den Vergleichswerten des Brustmuskels liegen kann. Die bei den Handelsprodukten nachgewiesenen Restaktivitäten liegen durchwegs in Bereichen, die bei Brustmuskel und Keule vom Huhn nach Einwirken von zumindest 74°C zu erwarten sind.

#### **1.1.5.4 Pyruvatkinase**

DAVIS und Mitarb. (1988) bestimmen bei gepökeltem und auf 65,6, 66,6, 67,2, 67,8, 68,3 und 68,9°C erhitztem *M. biceps femoris*, *M. semimembranosus*, *M. semitendinosus* und *M. quadriceps* vom Schwein die Restaktivität von Pyruvatkinase (PYK) mit dem klinischen Testkit SIGMA No. 205. Positive Ergebnisse resultieren beim *M. semimembranosus* und *M. quadriceps* bis zum Erhitzen auf 68,9°C, beim *M. biceps femoris* bis 69,5°C und beim *M. semitendinosus* bis 70°C. Es wird empfohlen, den Bestimmungen der PYK-Aktivität nicht ein Probenextrakt, sondern den Presssaft der Probe zu Grunde zu legen.

### 1.1.5.5 Creatin-Phosphokinase

Nach SPANIER und Mitarb. (1990) beträgt die Restaktivität von Creatin-Phosphokinase (CPK) bei *M. semimembranosus* des Rindes nach Erhitzen auf 65°C im Kern noch 50% der Ausgangsaktivität. BOGIN und Mitarb. (1992) teilen mit, dass sich die beim Brustmuskel der Pute nach bis zu 90 min langem Einwirken von 50 bis 70°C bestehende CPK-Restaktivität im Verlaufe einer 8-wöchigen Lagerung bei -12 bis -15°C um ca. 11% verringert. TOWNSEND und Mitarb. (1994) bestimmen mit dem klinischen Testkit SIGMA No. 661 die CPK-Aktivität pasteurisierter Handelserzeugnisse aus Fleisch von Huhn, Pute, Rind und Schwein sowie des Brustmuskels von Huhn und Pute nach deren Erhitzen auf 62,8, 66,7, 67,8, 68,9, 70, 71,1, 73,9 und 76,7°C. Beim Brustmuskel beider Tierarten nimmt die CPK-Restaktivität mit zunehmender Erhitzung bis zum Minimum bei 76,6°C kontinuierlich ab. Bei der Pute resultiert bei 62,8 und 66,7°C eine höhere, bei den höher erhitzten Proben dagegen eine niedrigere Restaktivität als beim Huhn. Die CPK-Restaktivitäten der Handelsprodukte aus Pute und Huhn liegen weit unter den Restaktivitäten der Produkte, die der Vorschrift der USDA-FSIS entsprechend auf eine Kerntemperatur von zumindest 71,1°C gebracht werden. Dasselbe gilt bei den Handelsprodukten aus Rind- und Schweinefleisch, deren Restaktivitäten im Gegensatz zu den Erzeugnissen aus Geflügelfleisch jedoch sehr stark streuen. Die Autoren führen diese Feststellungen auf Einflüsse der Rezeptur zurück und warnen so vor Fehlinterpretation der Testresultate bei Produkten, deren Zusammensetzung und Fertigungsweise nicht hinreichend bekannt ist.

### 1.1.5.6 N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase

SPANIER und Mitarb. (1990) berichten, dass N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAGase) des *M. semimembranosus* des Rindes durch ein Erhitzen auf 62°C zu 50% inaktiviert wird. TOWNSEND und Mitarb. (1993) bringen Probengut vom *M. semimembranosus* und *M. adductor* des Rindes, vom *M. longissimus* des Schweins sowie vom *M. pectoralis major*, -minor und von der Keule der Pute zum Teil nach einem vorläufigen Frosten auf 30 bis 80°C und prüfen die Eignung von NAGase als Leitenzym für den Nachweis der ausreichenden Erhitzung. Größere Unterschiede zwischen der NAGase-Aktivität des gefrosteten und des nicht gefrosteten Materials bestehen lediglich bei den auf maximal 50°C erhitzten Proben vom Rind. Auf 40 bis 70°C erhitztes Probengut vom Rind, Schwein und der Pute weist signifikant unterschiedliche NAGase-Aktivitäten auf. Ein Erhitzen der Probe auf 70°C verringert die NAGase-Aktivität beim Probengut vom Rind um 90%, vom Schwein um 98% und von der Pute um 93 bis 98%.

### 1.1.5.7 Saure Phosphatase

KÖRMENDY und GANTNER (1960) prüfen an Kochschinken vom Schwein zum einen den Einfluss von NaCl und Phosphat auf die Hitzeinaktivierung der Sauren Phosphatase (SPase) und die Auswirkung der Lagerung des Probengutes auf die Konstanz der Restaktivität; und zum anderen den Einfluss des pH-Wertes des Puffers und der Inkubationstemperatur der Analysenansätze auf die Nachweisbarkeit des Leitenzyms für ausreichende Erhitzung. Während die Hitzeinaktivierung von SPase durch einen Kochsalzzusatz von bis zu 8% gehemmt wird, wird sie durch einen Zusatz von 0,5% Phosphat um ca. 20% verstärkt. Wie sich bei den bis zu 240 min bei 60, 65, 70, 75 und 80°C erhitzten Chargen zeigt, weist die Hitzedenaturierung von SPase eine für jede Temperaturstufe typische Verlaufsform auf. So wird die SPase-Restaktivität beispielsweise bei den 60- und 65°C-Chargen bei einer über 90 min hinausgehenden Erhitzung auf unterschiedlichem Niveau nur mehr sehr protrahiert verringert. Die nach 3 min langem Einwirken von 70°C resultierende SPase-Restaktivität bleibt im Verlaufe einer Lagerung von 1 bis 2 d bei 37°C, von 1 bis 61 Tagen bei 18 bis 22°C, von 1 bis 172 Tagen bei 2 bis 5°C, von 1 bis 172 Tagen bei -10 bis -14°C und von 1 bis 172 Tagen bei -20°C konstant. Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu sichern, erfolgt die Inkubation der Analysenansätze beim SPase-Test bei reaktionskinetisch nicht optimalem pH und nicht optimaler Temperatur.

Hinsichtlich des Einflusses des pH-Wertes des Fleisches auf die Hitzeresistenz der SPase und des Zusatzes von anorganischem Phosphat zu Kochschinken auf die Reaktivität teilen KÖRMENDY und GANTNER (1967) mit, dass das Maximum der Hitzeresistenz dem reaktionskinetischen pH-Optimum von ca. 5,6 nahe liegt und anorganisches Phosphat aktivitätshemmend wirkt. In einem Folgebericht weisen GANTNER und KÖRMENDY (1968) auf die große Bedeutung hin, die beim SPase-Test als einem Schiedsverfahren für den Nachweis der ausreichenden Erhitzung bei Kochschinken einer standardisierten Probenhomogenisierung zukommt. Je nachdem, mit welchem Gerätetyp mit welchem Erfolg homogenisiert wird, sind Aktivitäts-Schwankungen von bis zu 25% möglich. Um dem hitzeprotektiven Einfluss von Kochsalz Rechnung zu tragen, wird von LIND (1968) empfohlen, die von der SPase-Restaktivität gemäß KÖRMENDY und GANTNER (1960) abgeleitete Kerntemperatur bei einer etwaigen Überschreitung des referenzgemäßen NaCl-Gehaltes von 3,5% um jeweils 0,53°C je 1% Überschreitung zu minimieren. RANDALL und BRATZLER (1970) teilen mit, dass sich die SPase-Aktivität bei Kochschinken durch das Räuchern der Produkte um bis zu 60% verringern kann.

Da die vorgegebene Kerntemperatur bei kleineren Schinkenstücken schneller erreicht wird und Unterkochungen bei einem auf kleinere Stückgrößen ausgelegten Hitzeregime leichter auftreten können, erachten KÖRMENDY und Mitarb. (1987) beim SPase-Test eine Methodik für erforderlich, die nicht nur der erreichten Kerntemperatur Rechnung trägt, sondern auch der Steig-, Halte- und Fallzeit des Temperatur-Zeit-Regimes der Kochung. Um die Sensitivität des 1960 empfohlenen SPase-Tests zu erhöhen, modifizieren KÖRMENDY und Mitarb. (1992) die Testmethodik durch Anpassung des pH-Wertes des Extraktionsmittels an das Optimum der SPase-Reaktivität und durch Erhöhung der Substratmenge. Zudem teilen die Autoren mit, dass bei einem Extraktionsverhältnis von 2,5 g Probe und 50 ml Puffer anstelle von 2,5 g Probe und nur 10 ml Puffer vermutlich deshalb höhere Testergebnisse resultieren, weil die Analysenansätze hierbei einen entsprechend niedrigeren Gehalt an Aktivität hemmendem anorganischem Phosphat und an Phenol - das Reaktionsprodukt der SPase - absorbierenden Extraktstoffen aus dem Probengut aufweist. Angesichts des teils gegenläufigen Einflusses insbesondere des pH-Wertes sowie des Gehaltes der Probe an Kochsalz und anorganischem Phosphat auf die Inaktivierung resp. Nachweisbarkeit der SPase wird des weiteren hervorgehoben, dass die Aussagekraft der Testresultate sehr entscheidend davon abhängt, dass die Proben standardisiert gefertigt sind. Die Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Phosphatase-Tests in der aktuellen Modifikation von KÖRMENDY und Mitarb. (1995) führt im Rahmen eines Ringversuchs an den Homogenisaten von 7 Kochschinken, die bei 70°C bis zu 200 min lang erhitzt wurde zur Feststellung, dass der Variationskoeffizient der Resultate je nach Intensität der Hitzebehandlung  $V_c = 12,6$  bis 43,5% betragen kann.

DAVIS und TOWNSEND (1994) bestimmen mittels des klinischen Testkits Advanced Instruments Fluorophos assay die SPase-Aktivität von Brustmuskel sowie von rotem Fleisch von Pute und Huhn, das auf 62,8, 65,6, 68,3, 71,1 und 73,9°C erhitzt wird. Die Frostung ist ohne signifikanten Einfluss auf die SPase-Restaktivität. Brustmuskel weist als weißes Fleisch stets signifikant höhere SPase-Restaktivitäten auf als das vergleichend geprüfte rote Fleisch. Beim Brustmuskel vom Huhn liegt die SPase-Aktivität sowohl des rohen als auch des bis 68°C erhitzten Probengutes höher, bei den auf 71,1 und 73,9 erhitzten Proben hingegen niedriger als bei den Vergleichsproben von der Pute. Die Autoren sind der Auffassung, dass bei der Festlegung einer SPase-Restaktivität als Indikator einer bestimmten Erhitzung der Rezeptur und Herstellungsweise der betreffenden Produktart Rechnung getragen werden muss.

### 1.1.5.8 Leucin-Aminopeptidase

TOWNSEND und BLANKENSHIP (1987a) bestimmen mittels des semi-quantitativen „API-ZYM“-Testkits der Fa. Analytab Products das Enzymmuster von rohem und erhitztem *M. semimembranosus* von Rind und Schwein und *M. pectoralis major* von Pute. Von den insgesamt 19 auf diese Weise nachweisbaren Enzymen werden bei den nicht hitzebehandelten Proben vom Rind 8, vom Schwein 11 und von der Pute 12 Enzyme manifest. Nach Erhitzen der Proben auf 60°C sind nur noch 4, 3 und 9 dieser Enzyme nachweisbar. Da sich bei den 71,1°C-Proben nur noch im Falle der Leucin-Aminopeptidase von Rind und Pute eine sei es auch nur minimale Restaktivität nachweisen lässt, empfehlen die Autoren dieses Enzym als Indikator einer ausreichenden Pasteurisation zu nutzen. In späteren Studien von TOWNSEND und BLANKENSHIP (1987b) lässt sich bei *M. semimembranosus* des Rindes, der auf 54, 60, 65 und 71,1°C erhitzt wird, lediglich bei den 65°C-Chargen noch eine schwache, mit verlängerter Haltezeit noch weiter verringerte Restaktivität von Leucin-Aminopeptidase feststellen. Mit 0,9%-iger NaCl Lösung als Extraktionsmittel gelingt dies besser als mit Wasser. Bei *M. longissimus* vom Schwein werden möglicherweise infolge rascheren Erreichens der vorgegebenen Kerntemperatur höhere Enzymaktivitäten nachgewiesen als beim Rind. TOWNSEND und BLANKENSHIP (1988) teilen mit, dass sich bei pasteurisierten Produkten des Handels unter bestimmten Voraussetzungen auch mit dem „APIZYM“-System nachweisen lässt, ob sie ausreichend erhitzt wurden.

### 1.1.5.9 Laktatdehydrogenase

STALDER und Mitarb. (1991) überprüfen an den Suspensionen von 15 Muskeln weiblicher und männlicher Rinder unterschiedlichen Alters die Eignung von Laktatdehydrogenase (LDH) als Leitenzym für den Nachweis einer der Vorschrift der USDA-FSIS (1989) entsprechenden Erhitzung auf eine Kerntemperatur von 62,8°C. Das im Verhältnis 1:10 in Wasser, in 1,5-, 3- und 4,5%-iger Kochsalzlösung und in 0,3%-prozentiger Na-Tripolyphosphat-Lösung suspendierte Probengut wird auf ein pH von jeweils 4,8, 5,6 und 6,4 gebracht und anschließend auf 57, 60, 63 und 66°C erhitzt. Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgt am homogenisierten und zentrifugierten Probengut durch photometrische Bestimmung von NADH/H<sup>+</sup>, das beim enzymatischen Umsatz von Pyruvat zu Laktat zu NAD<sup>+</sup> oxidiert wird. Wie sich beim rohen Probengut zeigt, kann die LDH-Aktivität von Muskel zu Muskel je nach Muskeltyp bis zum 5-fachen differieren. Mit Erreichen des 6. Lebensmonats beginnt sie anzusteigen. Die Hitzeresistenz von LDH wird durch NaCl und Phosphat bei allen pH-Werten

verringert. Der höchste Aktivitätsverlust erfolgt bei pH 6,4 und je nach Muskel im Temperaturbereich von 60°C bis 63°C.

COLLINS und Mitarb. (1991a) prüfen am *M. semimembranosus* und *M. adductor* des Rindes den Einfluss einer Elektrostimulation, Kühlung, Frostung und Gefrierlagerung auf die Hitzeinaktivierung von LDH durch ein 121 min langes Einwirken von 54,5°C im Kern und im Vergleich hierzu den Einfluss der Erhitzung des Probengutes auf die Kerntemperatur 60, 62,8 und 65,6°C und der hierauf sofortigen Kühlung des Probengutes auf Umgebungstemperatur. Die Autoren stellen fest, dass sich die Ausgangsaktivität der LDH durch die Erhitzung auf 60, 63 und 66°C um 33,7, 77,1 und 96,5% verringert und der Quotient  $q$  von Enzymaktivität und Proteingehalt des Extraktes bis zur Schwelle von 60°C vergrößert, bei höherem Erhitzen hingegen rapide verringert. COLLINS und Mitarb. (1991b) gehen bei Kochschinken der Frage nach, inwieweit sich die Restaktivität folgender Enzyme als Indikator einer gemäß Vorschrift der USDA-FSIS (1989) vorgenommenen Erhitzung auf 68,9°C im Kern eignen könnte: Adenylat-Kinase, Aldolase, Aspartat-Aminotransferase, Citrat-Synthase, Kreatin-Kinase, Glutamat-Oxalat-Transaminase, Isocitrat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Pyruvat-Kinase, LDH. Wie die Ergebnisse beim nicht gepökelten Probengut zeigen, werden die genannten Enzyme mit Ausnahme von LDH schon durch ein ledigliches Erhitzen auf nur 64,5°C weitestgehend inaktiviert. Die LDH-Restaktivität der auf 65, 68 und 71°C im Kern gebrachten und bei dieser Temperatur jeweils 8, 23 und 38 min lang gehaltenen Proben von *M. biceps femoris*, *M. rectus femoris*, *M. semimembranosus* und *M. semitendinosus* hängt nicht nur vom jeweiligen Hitzeregime ab, sondern auch von der anatomischen Provenienz der Muskeln sowie von deren Vorbehandlung durch Kühlung, Frosten und Pökeln. Die Haltezeit der Kerntemperatur hat auf die LDH-Restaktivität zumal bei den 68°C- und 71°C-Chargen geringere Auswirkung als die Temperaturhöhe. Als Leitenzym für den Nachweis der mikrobiologisch ausreichenden Erhitzung wird jedoch auch LDH für nicht geeignet befunden, da sich das Enzym bei gepökeltem Schinken schon nach 23 min langem Einwirken von nur 63°C nicht mehr nachweisen lässt. WANG und Mitarb. (1996) erhitzen Frikadellen aus Rindfleisch durch Grillen auf eine Kerntemperatur von 63, 66, 68 und 71°C und bestimmen die Restaktivität von LDH, Phosphoglycerat-Mutase (PGAM), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Saurer Phosphatase (SP) und Triose-Phosphat-Isomerase (TPI). Eine statistisch signifikante Unterscheidung der genannten Kerntemperaturen ist lediglich am Kriterium der Restaktivitäten von LDH und TPI möglich. Nach STALDER und Mitarb. (1997) ermöglicht die LDH-Restaktivität bei *M. semimembranosus*, *M. longissimus* und *M. infraspinatus*, die von Rindern unterschiedlichen Alters stammen und auf die Kerntemperatur von 57, 60, 63 und 66°C erhitzt werden, eine signifikante Unterscheidung der 60-, 63- und 66°C-Chargen. Bei der Kerntemperatur 60°C hat eine Haltezeit von 12 min einen Aktivitätsverlust von 50% zur Folge.

Mit Salzlake perfundiertes Probengut weist geringere LDH-Restaktivitäten auf als die ohne Kochsalzzusatz erhitzten Chargen. Die LDH-Aktivität und das LDH-Isoenzymmuster sind sowohl vom Muskeltyp als auch vom Alter der Schlachttiere signifikant abhängig. Bei den parallel durchgeführten in vitro-Studien über die Hitzeinaktivierung der LDH im Phosphatpuffer-Extrakt zeigt sich, dass hierbei höhere Restaktivitäten resultieren als beim Erhitzen des Probengutes im Stück.

#### 1.1.5.10 Carbesterase

MATHIES (1966) entwickelt an Milch ein auch für die Anwendung bei Fleisch und Fleischerzeugnissen empfohlenes Verfahren für die Bestimmung der Esterase-Restaktivität als Indikator der ausreichenden Pasteurisation. Beispielsweise wird bei rohem Rindfleisch die Proben einwaage im Mörser zerrieben, in einem größeren Volumen von Aqua dest. suspendiert, die Suspension mit Trispuffer auf pH 7,6 eingestellt und nach Zugabe von Indoxylacetat als Substrat 15 min bei 25°C inkubiert. Das während dessen entstehende Indigo wird mittels einer Dimethylformamid-Chloroform-Lösung eluiert und spektralphotometrisch bestimmt. Als eine möglicherweise nicht vernachlässigbare Fehlerquelle erachtet der Autor das Manko, dass das Indigo aus dem suspendierten Probengut nicht quantitativ eluiert wird.

Für den Nachweis der Intensität einer vorausgegangenen Hitzeeinwirkung auf Fleisch und Fleischerzeugnisse wird von PFEIFFER und Mitarb. (1969) ein Carbesterase-Test empfohlen, bei dem mit hochmolarem Citrat-Phosphat-Puffer von pH 6,6 gewonnenes Probenextrakt nach Zugabe von Indoxylacetat 1 – 3 h bei 25°C inkubiert, anschließend mit N-Methyl- $\alpha$ -pyrrolidon vermischt und nach hinreichendem Ausfällen des nicht Löslichen zentrifugiert wird. Die überstehende Indigolösung wird photometrisch gemessen. Gewerbeüblich gepökelter M. supra spinam vom Schwein weist nach Pasteurisation bei  $F_{75} = 25$  min noch deutliche Restaktivitäten auf. Eine vollständige Inaktivierung des Leitenzyms resultiert nach einer 15 min langen Einwirkung von 80°C. Eine ganz besondere Beachtung gewinnt der Esterase-Test zum einen durch die Feststellung, dass selbst Brühwurstherzeugnisse aus Freibankfleisch verarbeitenden Betrieben z.T. untragbar hohe beachtliche Esterase-Restaktivitäten aufweisen können und dass zum anderen sehr schwache Restaktivitäten gelegentlich auch noch bei „high-short“-erhitzten Dosenwürstchen des Handels bestehen. GLATZL (1970) bestimmt die Carbesterase-Restaktivität von Kochschinken des Handels sowie von M. supra spinam vom Schwein, der – in Parallelansätzen nach Pökelung – im Wasserbad von 76,5, 81,5 und 83,5°C in ca. 15, 20 und 25 min auf die Kerntemperatur von 75, 80 und 82°C gebracht und dann unter fließendem Leitungswasser sofort auf Zimmertemperatur gekühlt wird. Während bei den 75°C-Ansätzen vom nicht gepökelten Probengut noch eine ausgeprägtere

Esterase-Restaktivität besteht, trifft dies beim gepökelten Probengut nur abgeschwächt und bei den 80°C-Ansätzen kaum noch zu. Die 82°C-Ansätze sind durchwegs negativ. Die mittels des Carbesterase-Tests bei Kochschinken des Handels nachgewiesene Restaktivität weist eine große Streubreite auf. SINGRÜN (1970) modifiziert den von PFEIFFER und Mitarb. (1969) empfohlenen Carbesterase-Test dahingehend, dass das Probenextrakt aus der Probensuspension abfiltriert, den Analysenansätzen anstelle von Indoxylacetat als Substrat 1-Naphthylacetat zugesetzt, die Inkubation nach 60 min durch Inaktivieren des Enzymsrestes mit Ethanol beendet und das Spaltprodukt Naphthol für die photometrische Bestimmung mit Dibromchinonchlorimid in einen blauen Azofarbstoff überführt wird. Bei *M. supra spinam* vom Schwein, bei dem im Kern 80°C ca. 3 min lang einwirken, lässt sich mit dem Verfahren eine im Grenzbereich der Nachweisbarkeit liegende, nach PFEIFFER (2002) jedoch auch visuell noch als solche objektivierbare Restaktivität nachweisen. Durch einen Zusatz von Nitritpökelsalz in einer Menge von zumindest 2,5% wird die Hitzeinaktivierung der Carbesterase anscheinend leicht beschleunigt. Bei 20 Schlachtschweinen entnommener, gewolfter und mit 2,3% NaCl vermengter *M. supra spinam* weist nach jeweils ca. 3 min langem Einwirken von 80°C relativ konstante Restaktivitäten von  $E_{617} = 0,065 - 0,110$  auf.

PFEIFFER und Mitarb. (1970) erweitern den Carbesterase-Test in der Modifikation für Indoxylacetat durch Verwendung von Indoxylbutyrat als Substrat und stellen an roher Muskulatur von Schwein und Rind fest, dass der Gehalt an unspezifischer Esterase selbst innerhalb eines Muskels von Partie zu Partie erheblich differieren kann, dass myoglobinreichere Muskeln offenbar höhere Gehalte aufweisen als myoglobinärmere und dass die Esterase-Aktivität von rohem Speck durchschnittlich doppelt so hoch liegt wie bei rohem Skelettmuskelfleisch. Kochsalzgehalte von bis zu 4% bewirken bei Skelettmuskelfleisch eine meist deutliche Verzögerung der Hitzeinaktivierung. Bei Brühwurst unterschiedlicher Rezeptur, die in Dosen abgefüllt, im Wasserbad von 85 und 95°C auf 80 und 85°C im Kern erhitzt, dann sofort gekühlt und z.T. im unmittelbaren Anschluss, z.T. erst nach 3 Monate langer Lagerung bei Zimmertemperatur untersucht wird, zeigt sich, dass nicht irreversibel denaturierte Carbesterase offenbar zumindest zu einem bestimmten Teil reaktiviert werden kann. Die Autoren stellen auf dieser Basis fest, dass eine Brühwurstkonserve dann als nicht ausreichend erhitzt zu beurteilen ist, wenn sie am Tag der Herstellung eine Restaktivität der Extinktion  $E_{NA} > 0,015$  bzw.  $E_{IA} > 0,000$  aufweist und nach einer mehrwöchigen Lagerung eine Restaktivität von  $E_{NA} > 0,060$  bzw.  $E_{IA} > 0,020$ .

Aufgrund einer sehr langjährigen Erprobung des Carbesterase-Tests an einem sehr breiten Spektrum von parallel zum Carbesterase-Test routinemäßig auch mikrobiologisch validierter Erzeugnisse aus einsehbarer Produktion haben sich für PFEIFFER (2002) eine Vielzahl von Erfahrungsergebnissen ergeben, die bezüglich der Festsetzung und Validität von Grenzwerten auch in der

Perspektive einer potentiellen Reaktivierung von unvollständig inaktivierter Esterase zu folgenden Feststellungen führen:

Fleischerzeugnisse – wie schiere Bratenstücke, Buletten, Kochschinken oder Brühwurst vom Typ einer Kalbfleischwurst, Jagdwurst oder eines Bierschinkens – sind statistisch als „mit höherer Wahrscheinlichkeit nicht ausreichend pasteurisiert“ zu beurteilen, wenn mit NA und NB unter den jeweiligen Testbedingungen die Extinktion  $E_{617} \geq 0,090$  bzw. mit IA und IB die Extinktion  $E_{617} \geq 0,030$  resultiert. Nach den Ergebnissen von PFEIFFER und Mit. (1970) sowie nach allen späteren Erfahrungen von PFEIFFER (2002) an Probengut sehr vielfältiger Art ist der reaktivierbare Teil von hitzedenaturierter Esterase so gering, dass sich selbst im Verlaufe einer längeren Lagerung nur eine den genannten Grenzwerten auch schon unmittelbar nach der Hitzebehandlung nahekommende Restaktivität von  $E_{NA} \geq 0,050$  auf eine Restaktivität von  $E_{NA} \leq 0,120$  erhöhen kann.

Einen Anlass zu gravierenderen Bedenken bezüglich einer hinlänglichen Inaktivierung insbesondere der pathogenen vegetativen Mikroflora geben nach PFEIFFER (2002) bei den sehr konservativ festgesetzten Grenzwerten selbst Restaktivitäten von  $E_{NA} = 0,120$  bis  $0,150$  nicht, sofern folgende Voraussetzungen erfüllt sind: Die Rezeptur der betreffende Probe darf hinsichtlich ihrer Rezeptur vom Brauch des realen Gewerbes nicht extrem abweichen. Die mikrobielle Belastung des Rohproduktes darf die obere Grenze des Streubereichs der gewerblichen Norm nicht zu weit überschreiten. Die Probe darf nach der Pasteurisation nicht rekontaminiert worden sein. Die Kühlkette während der Lagerung der Probe für die Kommissionierung und den Verkauf darf nicht in einem hygienisch bedenklicheren Maße unterbrochen worden sein.

Nach HOTTENROTH (1974) bestehen bei handelsüblich sterilisierten Produkten des Typs Corned Beef, Gulasch, Blutwurst und Leberwurst keine mit Indoxylacetat nachweisbaren Carbesterase-Aktivitäten, und zwar auch nicht nach einer längeren Lagerung. BREHMER und FORSCHNER (1974) vereinfachen den Carbesterase-Test für Leber- und Brühwürste zur Tüpfelplatten-Probe, bei der das Probengut lediglich zerdrückt, mit Citrat-Phosphat-Puffer überschichtet und nach Zugabe von Naphtylacetat 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert wird. Nach anschließendem Zusatz von Dibromchinonchlorimid tritt bei den im Kern auf 70 bis 80°C erhitzten Modellproben eine hinsichtlich ihrer Intensität mit der Intensität der Hitzebehandlung korrespondierende Blaufärbung auf. Anhaltspunkte für eine Reaktivierung der Carbesterase werden auch nach einer 12 – 14 Tage langen Kühlung der Proben nicht manifest.

SIEBENLIST (1992) bestimmt mittels des Esterase-Tests und mit Naphthylacetat und Naphthylbutyrat sowie Indoxylacetat und Indoxylbutyrat als Substrat die Restaktivität von Muskulatur, Fettgewebe, Niere und Leber von Schwein und Rind vor und nach einem 5 min

langen Einwirken von 80°C im Kern, von Leberwurst-Modellbräten unterschiedlicher Rezeptur vor und nach einem 10 min langen Einwirken von 80°C im Kern und von 57 Leberwürsten des Handels. Leber und Niere weisen beim rohen Probengut die mit Abstand höchsten Aktivitäten auf. Die Carbesterase-Aktivitäten der rohen Modellbräte hängen so zwar v.a. vom Lebergehalt ab, durch die Pasteurisation wird jedoch der Einfluss unterschiedlicher Leberanteile aufgrund der Hitzelabilität des weitaus größten Teils der Isozyme weitestgehend aufgehoben. Die Feststellung, dass die Indoxylester als Substrate gegenüber den beiden Naphthylestern keine wichtigeren Zusatzinformationen liefern, führt zur Empfehlung, den Carbesterase-Test bei Leberwurst auf die beiden Naphthylester abzustellen und als Grenzwerte einer ausreichenden Erhitzung Restaktivitäten von  $E_{NA} \leq 0,090$  und  $E_{NB} \leq 0,390$  zugrunde zu legen.

## **2 Zu den wichtigsten Besonderheiten von Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) sive Carbesterase als Leitenzym des Esterase-Tests**

Die Klassifizierung der International Union of Biochemistry (IUB) unterteilt die Enzyme seit 1961 in die Hauptklassen 1. Oxidoreduktasen, 2. Transferasen, 3. Hydrolasen, 4. Lyasen, 5. Isomerasen und 6. Ligasen und identifiziert sie ihrer Unterklasse und Subunterklasse entsprechend mit einer seriellen Kennnummer. Die Kennnummer „EC-Nr. 3.1.1.1“ von Carboxylesterase ergibt sich so aus der Zugehörigkeit des Enzyms zur Hauptklasse der Hydrolasen, zur Unterklasse der Esterbindungen spaltenden Hydrolasen und zur Subunterklasse der Carboxylester-Hydrolasen, in der es an erster Stelle steht. Nach LUPPA und ANDRÄ (1983) sind die Carboxylester-Hydrolasen meist nicht nur zur Hydrolyse, sondern auch zur Synthese von Carboxylestern geeignet und katalysieren so Reaktionen der Gleichung

$$\text{RCOOR}' + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RCOOH} + \text{R}'\text{OH}.$$

Neben der IUB-Klassifikation existieren nicht immer eindeutige historische, für das Verständnis des älteren Schrifttums nichtsdestoweniger relevante Einteilungen. ALDRIGE (1953a; 1953b) unterteilt die Carboxylester-Hydrolasen nach ihrem Verhalten gegenüber Organophosphatinhibitoren wie Diethyl-4-nitrophenylphosphat (= Paraoxon, E 600) in 2 Gruppen: Bei den A-Esterasen handelt es sich um Arylesterasen der aktuellen Klassifizierung EC 3.1.1.2, die hauptsächlich Aromatische Ester und unter diesen bevorzugt Acetyler hydrolysieren. Die A-Esterasen werden durch Organophosphate nicht nur nicht gehemmt, sondern hydrolysieren diese als Substrat. Als Inhibitoren wirken Sulfhydryl-Gruppen enthaltende Verbindungen. Die B-Esterasen sind Enzyme der Klassifizierung EC 3.1.1.1, die bevorzugt kurz-kettige aliphatische und aromatische Butyryler hydrolysieren, relativ unempfindlich gegen

Sulfhydryl-Gruppen sind und vorwiegend als Desmo-Esterasen vorliegen. Carboxylesterasen dieser Gruppe werden durch Organophosphate gehemmt, weil sie diese kovalent an das Serin des aktiven Zentrums binden. B-Esterasen, zu denen nach EINARSSON und Mitarb. (1996) auch Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) und Cholinesterase (EC 3.1.1.8) zählen, werden im älteren Schrifttum auch als Unspezifische Esterasen, Carbesterasen, Aliesterasen und Serinhydrolasen bezeichnet. LUPPA und ANDRÄ (1983) teilen mit, dass häufig unter Carboxylesterase auch Arylesterase und die als C-Esterase bezeichnete Acetylesterase verstanden wird.

ALDRIDGE (1953a,b), COATES und Mitarb. (1975), sowie LUPPA und ANDRÄ (1983) gehen davon aus, dass C-Esterasen aromatische und aliphatische Acetylester spalten und durch Eserin, Organophosphate und Sulfhydryl-Gruppen nicht gehemmt werden. Esterasen werden nicht nur nach Substrat- und Inhibitorspezifität, elektrophoretischer Mobilität und Verteilung im Gewebe unterschieden, sondern auch an molekularbiologischen, insbesondere genetischen Merkmalen. So teilen DEIMLING und WIENKER (1992) mit, dass bei den 12 Carboxylesterase-Isozymen der Maus bereits mehr als 80 genetisch unterschiedliche Allele der sogenannten Chromosom-8-Esterasen bekannt und benannt sind.

Lipasen und Esterasen unterscheiden sich nach SARDA und DESNUELLE (1958) dadurch, dass Lipasen ihre maximale Aktivität erst durch Übersättigung einer Öl-in-Wasser-Emulsion und den daraus resultierenden Anstieg der Wasser-Lipid-Grenzschichten erreichen, wogegen Esterasen schon bei sehr niedriger Konzentration der Öl-Phase und ohne Aktivität steigenden Einfluss einer Grenzflächenzunahme ihre maximale Aktivität erreichen. TSUJITA und Mitarb. (1988) unterteilen die Carboxylester-Hydrolasen in Esterasen, deren Aktivität bei steigendem Öl-Anteil hyperbol zunimmt, und in Esterasen, deren Aktivität sich bei steigendem Öl-Anteil erheblich verringert.

## 2.1 Zur Reaktionskinetik und geweblichen Verteilung

Carboxylesterase wird im Schrifttum mit einer höchst verwirrenden Vielfalt teils unterschiedlichster Bezeichnungen benannt, und zwar nach IKEDA (1977) nach ihrer Substratspezifität, nach MENTLEIN und Mitarb. (1980, 1984) auch nach ihrem isoelektrischen Punkt und weiteren Kriterien und nach DEIMLING und WIENKER (1992) nach den codierenden Genloci.

Synonyme: Ali-Esterase, B-Esterase, Monobutyrase, Cocaine esterase, Procaine esterase, Methylbutyrase, Vitamin A esterase, Butyryl esterase, Carboxyesterase, Carboxylate esterase, Carboxylic esterase, Serine esterase, Methylbutyrate esterase, Triacetin esterase, Butyrate esterase, Carboxylic acid esterase, Alpha-Carboxylesterase, Carboxyl ester hydrolase,

Propionyl esterase, Albumin-Esterase, Nonspecific carboxylesterase, Esterase D, Esterase B, Esterase A.

COATES und Mitarb. (1975) und OTTO und Mitarb. (1981) führen dieses „Durcheinander“ darauf zurück, dass sich die enzymkinetischen und molekularen Eigenschaften der Enzyme sehr stark überschneiden, SCHOMBURG und SALZMANN (1991) und die ENZYME NOMENCLATURE (1992) auf die geringe Substratspezifität der Enzymgruppe. Von KRISCH (1971), HEYMANN (1980) und MENTLEIN und Mitarb. (1984) wird moniert, dass die Nomenklatur der Carboxylesterasen bis heute nicht zufrieden stellt.

### Katalysierte Reaktion

Carboxylesterasen wirken, wie von KRISCH (1971) und STOOPS und Mitarb. (1975) berichtet wird, vor allem hydrolytisch. Bei den Substraten handelt es sich um ein weites Spektrum von Carbonsäureestern, Thioestern und einigen aromatischen Amidien. Aliphatische und aromatische Ester mit kürzerem Fettsäureanteil werden nach ALDRIDGE und REINER (1972), SOBEK und GÖRISCH (1988), GAUSTAD und Mitarb. (1991) sowie LITH und Mitarb. (1993) bevorzugt gespalten. KRISCH (1971) und MENTLEIN (1980) teilen mit, dass Carboxylesterasen auch die Transacylierung von Gruppen auf nucleophile Akzeptoren katalysieren.

### Lokalisation der Carboxylesterase

Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) ist, wie ARNDT und Mitarb. (1973) berichten, in faktisch jeder lebenden Zelle in einer Vielzahl von primären wie sekundären Isozymen vorhanden, die sich nicht nur hinsichtlich ihrer Kinetik und ihrer Reaktivität gegenüber den verschiedenen Substraten und Inhibitoren von einander unterscheiden, sondern auch bezüglich ihres Synthesortes, ihrer geweblichen und intrazellulären Verteilung und der Lokalisation der Isozyme.

Die **gewebliche Verteilung** von Carboxylesterase ist sehr vielfältig untersucht.

Nach KRISCH (1971), LUPPA und ANDRÄ (1983) und LITH (1993) sind Carboxylesterasen bei den Säugetieren als gut lösliche Lyoesterasen oder als schwer lösliche bzw. strukturgebundene Desmoesterasen spezies- und organspezifisch vor allem in Leber, Niere, Duodenum, Hoden, Blutserum, Blutplasma und Gehirn nachzuweisen. COATES und Mitarb. (1975) weisen beim Menschen 5 Butyrylsterasen nach, die in unterschiedlicher Verteilung in Leber, Niere, Herz, Skelettmuskel, Gastrointestinaltrakt, Milz, Fettgewebe, Lunge, Gehirn, Hoden, Eierstöcke, Plazenta, Leukozyten, Erythrozyten, Lymphgefäße, Fibroblasten und Retina enthalten sind. TSUJITA und Mitarb. (1988) finden Carboxylesterase bei der Ratte vor allem in der Leber, darüber hinaus – mit abnehmender Aktivität – auch im Fettgewebe, Dünndarm

und Hoden, in Lunge und Nieren sowie im Magen, Blutserum, Herzmuskel, Gehirn und in der Milz. KIRKEBY und Mitarb. (1990) teilen mit, dass bei der Maus die Aktivität von Carboxylesterasen der Skelettmuskulatur mit deren Gehalt an Mitochondrien und mit dem oxidativen Metabolismus korreliert ist. Beim Huhn besteht die nach QUIN-WEI und XUE (1991) in Herz- und Skelettmuskulatur, Leber, Lunge, Niere, Hoden und Hirnrinde durch isoelektrischer Gelelektrophorese differenzierbare Carboxylesterase aus bis zu 50 Isozymen. Hinsichtlich der Isozymmuster und der Isozym-Aktivitäten können nicht nur zwischen den verschiedenen Geweben, sondern auch zwischen verschiedenen Bezirken desselben Muskels erhebliche Unterschiede bestehen.

Hinsichtlich der **intrazellulären** Verteilung der Carboxylesterase wird im Schrifttum folgendes berichtet:

Die höchste Carboxylesterase-Aktivität weist nach KRISCH (1971), JUNGE und Mitarb. (1974) und TSUJITA und Mitarb. (1988) die durch Dispergieren des Endoplasmatischen Retikulums darstellbare *mikrosomale* Fraktion insbesondere der Leber auf. IKEDA und Mitarb. (1977) teilen mit, dass ca. 40% der Carboxylesterase-Aktivität der Rattenleber in der mikrosomalen Fraktion lokalisiert sind. Von MENTLEIN und Mitarb. (1980) werden in den Mikrosomen der Rattenleber mehr als 20 verschiedene Serin-Hydrolasen nachgewiesen. HEYMANN (1980) berichtet, dass Mikrosomen häufig an ihrer äußeren Oberfläche hohe Carboxylesterase-Aktivität aufweisen. BEAUFAY und Mitarb. (1974), GRATZL und Mitarb. (1975), RAFTELL und Mitarb. (1977), MENTLEIN (1984) und HARANO und Mitarb. (1988) geben bekannt, dass Carboxylesterase im rauen und im glatten Endoplasmatischen Retikulum sowohl luminal als auch zum Cytoplasma hin lokalisiert sein kann. Nach HARANO und Mitarb. (1988) ist bei der Maus Carboxylesterase E1 des Endoplasmatischen Retikulums der Leber intrazisternal lokalisiert und weder in der Golgi-Fraktion noch im Serum nachweisbar. LITH und Mitarb. (1989) stellen fest, dass beim Kaninchen 38% bis 52% der Carboxylesterase-ES-1A-Gesamtaktivität der Leberzelle mikrosomalen Ursprungs sind.

Hohe Carboxylesterase-Aktivität finden IKEDA und Mitarb. (1977) in den *Lysosomen* der Rattenleber. Nach TANAKA und Mitarb. (1987) liegt die lysosomale Carboxylesterase der Kaninchenleber im Gegensatz zum mikrosomalen Enzym ungebunden vor. Von LITH und Mitarb. (1989) wird berichtet, dass 12 bis 14% der Carboxylesterase-ES-1A-Aktivität der Leberzelle des Kaninchens in den Lysosomen enthalten ist. KIRKEBY und Mitarb. (1990) lokalisieren Carboxylesterase der Skelettmuskulatur der Ratte neben anderen Zellkompartimenten auch in den Lysosomen.

An *Mitochondrien* gebundene Esterase macht nach KOEPPEN und Mitarb. (1969) bei der Ratte zumindest 12% der Aktivität der unspezifischen Esterase des Gehirns aus. JUNGE und Mitarb. (1974) teilen mit, dass die Lyoesterase der Mitochondrien der menschlichen Le-

berzelle an deren Gesamtaktivität lediglich geringen Anteil hat. Dies gilt nach IKEDA und Mitarb. (1977) auch bei Rattenleber. KIRKEBY und Mitarb. (1990) teilen mit, dass mitochondriale Carboxylesterase der Skelettmuskulatur der Ratte locker gebunden und nicht in jedem Mitochondrium vorhanden ist.

Im *Cytoplasma* der menschlichen Leberzelle enthaltenen Carboxylesterase hat nach JUNGE und Mitarb. (1974) an der heparozellulären Gesamtaktivität nur einen geringen Anteil. Von AXENFORS und Mitarb. (1979) wird Carboxylesterase im Cytoplasma von Erythrocyten des Menschen, von KIRKEBY und Mitarb. (1990) im Sarkoplasma von Skelettmuskulatur der Ratte nachgewiesen. Bei der Lunge der Ratte bestehen nach GAUSTAD und Mitarb. (1991) die höchsten Aktivitäten an Carboxylesterase im Gegensatz zur Leber im Cytosol.

Im *Zellkern* der menschlichen Leberzelle wird Carboxylesterase von JUNGE und Mitarb. (1974), bei der Ratte von IKEDA und Mitarb. (1977) nachgewiesen.

DREXLER und Mitarb. (1985) berichten darüber hinaus über das Vorkommen von Carboxylesterasen auf der Ektomembran von *Monocyten* des Menschen, HARANO und Mitarb. (1988) im *Serum* und der *Golgi-Fraktion* der Leber der Ratte und KIRKEBY und Mitarb. (1990) in *Fetttröpfchen* der Skelettmuskulatur der Ratte.

LUPPA und ANDRÄ (1983) teilen mit, dass die Esterase-Aktivität des Endoplasmatischen Retikulums, Perinuclearbereichs und des Cytoplasmas vorwiegend auf B-Esterasen, diejenige des Golgi-Apparates, der Mitochondrien und der Lysosomen dagegen auf Paraoxon-resistenten unspezifischen Esterasen beruht. Nach KIRKEBY und Mitarb. (1988) ist die Esterase-Aktivität der Muskelfasern mit der Aktivität der Succinat-Dehydrogenase direkt korreliert.

#### Physikochemische und enzymatische Eigenschaften der Carboxylesterase

Carboxylesterase besteht nach SCHOMBURG und SALZMANN (1991) aus 1 bis 4 Untereinheiten und weist **Molekulargewichte** auf, die je nach Bestimmungsmethode, Spezies und Isozym 38 bis 360 kDa betragen.

Das Molekulargewicht von Carboxylesterase der *menschlichen Leber* beträgt nach JUNGE und Mitarb. (1974) bei Bestimmung durch Gelfiltration 181 kDa, bei Bestimmung durch SDS-PAGE 61 kDa. Als Monomer weist Carboxylesterase der menschlichen Leber gelchromatographisch nach COATES und Mitarb. (1976) ein Molekulargewicht von 20 kDa auf, nach KLEINGEIST und Mitarb. (1998) als Polymer von 170 kDa und als Monomer von 59 kDa. AXENFORS und Mitarb. (1979) sowie HOJRING und Mitarb. (1988) teilen mit, dass Carboxylesterase der *Erythrozyten des Menschen* ein Molekulargewicht von 320 kDa und 4 Untereinheiten aufweist.

IKEDA und Mitarb. (1977) isolieren aus den Mikrosomen der *Rattenleber* 2 Isozyme, deren durch Gelfiltration bzw. SDS-PAGE bestimmtes Molekulargewicht bei 70 und 160 kDa bzw.

70 und 80 kDa liegt. MENTLEIN und Mitarb. (1980) geben bekannt, dass Carboxylesterase pl 6 der Rattenleber nach Ergebnis der Gelfiltration und SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 180 kDa, die Untereinheiten von 68 kDa aufweisen. MENTLEIN und Mitarb. (1984) stellen gelchromatographisch fest, dass Rattenleber 5 Serinhydrolasen enthält, deren Molekulargewichte 58 bis 61 kDa betragen. Nach HARANO und Mitarb (1988) ist das Molgewicht der identisch trimeren C1-Esterase der Leber 175 kDa. Nach LITH und Mitarb. (1989) bzw. FONNUM und Mitarb. (1985) betragen die Molgewichte einer ebenfalls trimeren Leberesterase gelchromatographisch 183 bzw. 180 kDa, diejenigen der Untereinheiten bei Bestimmung durch SDS-PAGE 63 bzw. 60 kDa.

SCHMITT (1980) weist in der *Lunge der Ratte* eine monomere unspezifische Esterase von 48 kDa nach, OEHM und Mitarb. (1982) bei Lungenesterase 6A<sup>3</sup> ein Molgewicht von 178 kDa und bei deren Trimeren von 60 kDa. Ebenfalls durch Gelelektrophorese und SDS-PAGE weisen GAUSTAD und Mitarb. (1991) in der Rattenlunge eine trimere gleichgewichtige Carboxylesterase von 180 kDa nach.

ARNDT und Mitarb (1973) teilen mit, dass es sich bei Carboxylesterase der *Muskelzelle der Ratte* nach Ergebnis der analytischen Ultrazentrifugation und der SDS-PAGE um ein Trimer von 177 kDa bzw. jeweils 61 kDa handelt.

GÖPPINGER und Mitarb. (1978) weisen bei *Rattenniere* gelchromatographisch die monomere Carboxylesterase 9A mit einem Molekulargewicht von 51 kDa nach, LEXOW und Mitarb. (1980) eine Carboxylesterase von 56 kDa und TSUJITA und Mitarb. (1988) von 60 kDa.

*Rattenplasma* enthält nach LITH und Mitarb. (1993) die Esterase ES-1A von 59 kDa. ALEXSON und Mitarb. (1994) stellen Ionenaustausch-chromatographisch fest, dass das Molekulargewicht von *Serum*-Carboxylesterase der Ratte 70 kDa beträgt, das von OTTO und Mitarb. (1981) durch SDS-PAGE bestimmte Molekulargewicht der monomeren Esterase F1 75 kDa.

Das von GOULLET und Mitarb. (1984) durch Gelfiltration bestimmte Molekulargewicht einer Carboxylesterase aus *E. coli* beträgt 57 kDa. SOBEK und GÖRISCH (1988) teilen mit, dass *Sulfolobus acidocaldarius* Carboxylesterasen des Molgewichtes 117 bis 128 kDa (Gelfiltration) und Untereinheiten von 32 kDa (SDS-PAGE) produziert.

Dass es sich bei den Carboxylesterasen sehr oft um **Glykoproteine** handelt, wird mittels Neuraminidase von ARNDT und Mitarb. (1973), GÖPPINGER und Mitarb. (1978), AXENFORS und Mitarb. (1979), OTTO und Mitarb. (1981), OEHM und Mitarb. (1982), MENTLEIN und Mitarb. (1984), HARANO und Mitarb. (1988), LITH und Mitarb. (1989) und KRISHNASAMY und Mitarb. (1998) nachgewiesen.

Das **pH-Optimum** der Carboxylesterase-Isozyme ist nach SCHOMBURG und SALZMANN (1991), GÖPPINGER und Mitarb. (1978), SCHMITT (1980), OTTO und Mitarb. (1981), OEHM und Mitarb. (1982), TANAKA und Mitarb. (1987), SOBEK und GÖRISCH, (1988), TSUJITA und Mitarb. (1988) und LITH und Mitarb. (1993) vom Substrat abhängig und liegt meist bei pH 6 bis 9.

Der **Isoelektrische Punkt** der Carboxylesterasen liegt je nach Isozym und Spezies bei pH 3,9 bis 8,7. Berichtet wird dies neben anderen von ARNDT und Mitarb. (1973), COATES und Mitarb. (1976), IKEDA und Mitarb. (1977), GÖPPINGER und Mitarb. (1978), AXENFORS und Mitarb. (1979), LEXOW und Mitarb. (1980), SCHMITT (1980), OTTO und Mitarb. (1981), FONNUM und Mitarb. (1985), HARANO und Mitarb. (1988), HOJRING und Mitarb. (1988), SOBEK und GÖRISCH (1988), TSUJITA und Mitarb. (1988), KETTERMANN und Mitarb. (1989), LITH und Mitarb. (1989), GAUSTAD und Mitarb. (1991), LITH und Mitarb. (1993).

Die **Temperaturstabilität** von Carboxylesterase kann in Abhängigkeit von der Spezies nach SCHOMBURG und SALZMANN (1991) sehr stark differieren.

GOULLET und Mitarb. (1984) teilen mit, dass die Carboxylesterase-Aktivität von *Escherichia coli* durch ein 10 min langes Einwirken von 60, 65 bzw. 70°C um 0%, 50% bzw. 100% abnimmt. MURAKAWA und Mitarb. (1987) berichten, dass eine Enzyminaktivierung – wie bei bestimmten Isozymen etwa von *Emericella unguis* – auch schon bei Temperaturen > 30°C eintreten kann. Gereinigte Carboxylesterase der Kaninchenleber verliert nach TANAKA und Mitarb. (1987) etwa 90% ihrer Aktivität schon durch ein 3 min langes Einwirken von 60°C, hingegen Carboxylesterase des Bakteriums *Sulfolobus acidocaldarius* nach SOBEK und GÖRISCH (1988) selbst nach 60 min langer Einwirkung von 90 bzw. 100°C lediglich 8% bzw. 50% und Plasmaesterase der Ratte nach LITH und Mitarb. (1993) bei 55°C in 25 min 24% und bei 65°C in 7 min 88%.

Die **Michaelis-Menten-Konstante** hängt nach SCHOMBURG und SALZMANN (1991) sehr stark vom Isoenzym, Substrat und von den Testbedingungen ab und liegt zwischen 0,0013 mM bei p-Nitrophenylacetat und 4,9 mM bei Butyrylthiocholin.

GOULLET und Mitarb. (1984) ermitteln bei Carboxylesterase von *E. coli* mit 1-Naphthylacetat eine  $K_m$ -Konzentrationen von 0,032 bis 1 mM, HOJRING und Mitarb. (1988) bei Carboxylesterase menschlicher Erythrozyten mit 1-Naphthylbutyrat von 7,6  $\mu$ M. Substrate, deren Fettsäure aus mehr als 5 C-Atomen besteht, weisen nach SOBEK und GÖRISCH (1988) und LITH und Mitarb. (1993) höhere  $K_m$ -Werte auf, als Substrate mit kürzerkettigen Fettsäuren.

### Physiologische Bedeutung der Carboxylesterase

Die physiologische Bedeutung von Carboxylesterase ist bislang noch nicht zufriedenstellend geklärt, da sich deren Substratspezifität wie im Falle der Carboxylesterase (EC 3.1.1.1), Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7), Cholesterolesterase (EC 3.1.1.13) und Butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) weithin überschneidet. Nachdem jedoch die meisten Substrate im Intermediärstoffwechsel nicht vorkommen, gehen LEITES (1963), KRISCH (1971), COATES und Mitarb. (1975), MENTLEIN (1980), BÖCKING und DEIMLING (1982), HEYMANN (1982), OEHM und Mitarb. (1982), MENTLEIN und Mitarb. (1985), ALDRIDGE (1993), ALEXSON und Mitarb. (1994), SATOH und HOSOKAWA (1995) und SOGORB und Mitarb. (1996) von der Hypothese aus, dass Carboxylesterase dem Fettstoffwechsel und der Entgiftung insbesondere von Xenobiotika dient. Diese Annahme sehen BRANDT und Mitarb. (1980) dadurch gestützt, dass Versuchstiere selbst bei einer 90-%igen Hemmung der Leberesterasen keinen Schaden nehmen. BOSKOVIC (1979), FONNUM und STERRI (1981), STERRI und Mitarb. (1981), CLEMENT (1984), FONNUM und Mitarb. (1984), AAS und Mitarb. (1985) und FONNUM (1985) geben bekannt, dass Carboxylesterasen als sogenannte „Scavenger“ toxische Organophosphor-Verbindungen wie Soman (Methylfluorosphorsäurepinakolyester) oder Sarin (Methylfluorosphorsäureisopropylester) unter Verlust ihrer Aktivität binden und so zur Detoxifikation beitragen. Bei neuromuskulären Erkrankungen ändert sich die Aktivität der Carboxylesterasen nach KAR und PEARSON (1978), KAR und PEARSON (1979), BIANCHI und Mitarb. (1982), KIRKEBY und MOE (1987) und KIRKEBY und Mitarb. (1989) auch qualitativ.

Carboxylesterase des menschlichen Foetus unterscheidet sich nach COATES und Mitarb. (1975) qualitativ und quantitativ von derjenigen des Erwachsenen. Nach FONNUM und Mitarb. (1985) ist Carboxylesterase-Aktivität auch geschlechtsabhängig.

DREXLER und Mitarb. (1985) stellen fest, dass menschliche T-Zellen je nach Differenzierungsgrad unterschiedliche Isozymmuster aufweisen.

KRISHNASAMY und Mitarb. (1998) identifizieren sog. „surfactant convertase“ als eine Carboxylesterase, die an der Umsetzung der Lammellar-Körperchen in der Stabilität der Lungenbläschen dienendes Tubuläres Myelin beteiligt ist. Sollte diese Feststellung bestätigt werden, wäre dies die erste Carboxylesterase von erwiesener physiologischer Funktion. Dies dürfte – zum zweiten – auch für die Retinylesterhydrolase der Leber des Menschen und des Schweins gelten, bei der es sich nach SCHINDLER und Mitarb. (1998) um eine Carboxylesterhydrolase handelt, die durch Freisetzung von Retinol in der Leber die Plasma-Vitamin-A-Homöostase gewährleistet.

### Substrate

Carboxylesterase sive Unspezifische Esterase hydrolisiert eine Vielzahl von Carboxylestern. Da eine enge Präzisierung des Enzyms aufgrund dessen geringer Substratspezifität nicht möglich ist, soll nachstehend lediglich die nach SCHOMBURG und SALZMANN (1991) und ENZYME NOMENCLATURE (1992) bislang am häufigsten verwendeten Substrate in englischer Bezeichnung benannt sein: Phenylthioacetate, p-nitrophenylvalerate, p-nitrophenylacetate, phenylthiopropionate, phenylthiobutyrate, phenylthiovalerate, phenylthioisobutyrate, o-nitrophenylacetate, o-nitrophenylpropionate, o-nitrophenylbutyrate, m-nitrophenylbutyrate, p-nitrophenylbutyrate, phenylbutyrate, ethylbutyrate, butylbutyrate, methylumbelliferyl acetate, alpha-naphtyl butyrate, alpha-naphtyl acetate, bis(2-ethylhexyl)phthalate, indoxyl acetate, indoxyl butyrate.

### Inhibitoren

SCHOMBURG und SALZMANN (1991) sowie ENZYME NOMENCLATURE (1992) nennen folgende zweckmäßigerweise in ihrer englischen Bezeichnung benannten Stoffe: N-Ethylmaleimide; p-Chloromercuribenzoate,  $\text{HgCl}_2$ , Iodoacetate, Phenylmethylsulfonyl fluoride, Diethyl p-nitrophenyl phosphate, Diisopropyl fluorophosphate, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoate), Organophosphates, Aldicarb, Carbaryl, Eserine, Trichlorfon,  $\text{Zn}^{2+}$ , Bis(p-nitrophenyl)phosphate,  $\text{Cd}^{2+}$ , Mipaflox,  $\text{F}^-$ , Physostigmine, p-Hydroxymercuribenzoate, 2-Chloromercuri-4-nitrophenol, Aniline, Paraoxon,  $\text{AgNO}_3$ .

## **2.2 Zu den tierartlichen Gegebenheiten**

Von besonderem Interesse sind im Rahmen dieser Arbeit die Eigenschaften von Carboxylesterase derjenigen Tiere, von denen Fleisch im Sinne der FleischhygieneV (§4) gewonnen wird.

### **2.2.1 Geflügel**

Die im Schrifttum referierten Untersuchungen über Carboxylesterase des Geflügels erstrecken sich bislang auf das Huhn, und zwar wie bei Rind, Schwein, Pferd und Schaf meist über die Isozyme der Leber.

AUGUSTEYN und Mitarb. (1969) bestimmen die Aminosäurezusammensetzung des aktiven Zentrums Carboxylesterase der Leber von Schwein, Schaf, Rind und Huhn. Während Schwein und Schaf eine identische Sequenz von 8 Aminosäuren aufweisen, ist beim Huhn und Rind jeweils eine dieser Aminosäuren substituiert. SCOTT und ZERNER (1975) stellen

hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung von Carboxylesterase der Leber von Rind, Schwein, Pferd, Schaf und Huhn fest, dass die Esterasen von Rind, Schwein und Schaf weithin übereinstimmen, die Esterase des Huhns und in geringerem Maße auch des Pferdes von diesen jedoch stärker abweichen.

INKERMANN und Mitarb. (1975a) differenzieren Lebercarboxylesterase mittels PAG-Elektrophorese und notieren 4 esteraseaktive Banden. Das durch Titration mit bis-Nitrophenol-Phosphat bestimmte Equivalentgewicht beträgt  $67000 \pm 1000$ . Zu ähnlichen Ergebnissen gelangen INKERMANN und Mitarb. (1975b), die durch Gelfiltration und Gelelektrophorese feststellen, dass das Molekulargewicht des Monomers von Leberesterase 66 - 77 kDa beträgt und unter Einfluss von SDS und Elektrophorese 50% des Enzyms zu Fraktionen von 28 und 30 kDa dissoziieren. Nach INKERMANN und Mitarb. (1975b) liegt der isoelektrische Punkt der Leberesterase des Huhns bei 4,9 - 5,1, nach KEOUGH und Mitarb. (1985) bei 4,75.

STOOPS und Mitarb. (1975) bestimmen die Michaelis-Menten-Konstante der Carboxylesterase der Leber vom Huhn. Die  $K_m$ -Konzentrationen betragen mit dem Buttersäureester des Methanols, Ethanols, Phenols, o-Nitrophenols, p-Nitrophenols und mit Phenylacetat als Substrat 0,028 – 1,8 mM. Carboxylesterase der Leber weist nach KEOUGH und Mitarb. (1985) mit Ethylbutyrat eine  $K_m$ -Konzentration von 0,52 mM auf. Nach BERNDT und Mitarb. (1996) resultiert mit Phenylbenzoat eine  $K_m$ -Konzentration von 4,48, mit p-Nitrophenylbenzoat von 17,4 und mit o-Nitrophenylbenzoat von 4,07  $\mu\text{M}$ . Bei Phenylbutyrat erfolgt im pH-Bereich von 3 bis 6 mit zunehmendem pH ein deutlicher Anstieg der  $K_m$  und bei Ethylbutyrat bei Konzentrationen  $> 13,4 \times 10^{-3}$  M Substrathemmung.

### 2.2.2 Schwein

Der isoelektrische Punkt der Leberesterase liegt nach INKERMANN und Mitarb. (1975b) bei  $pI = 5,0$ , nach SATHOH und HOSOKAWA (1995) bei  $pI = 5,2 - 5,4$ . JUNGE und HEYMANN (1979) teilen mit, dass das pH-Optimum von Leber-Carboxylesterase I mit Methylhexanoat als Substrat bei  $pH = 8$  und von Leber-Carboxylesterase V bei  $pH = 6,5$  liegt. Von anderen Autoren wird bei wenig gereinigter Carbesterase aufgrund der unterschiedlichen Affinität der Isozyme zum jeweiligen Substrat über erheblich weiter divergierende pH-Optima berichtet. SCHINDLER und Mitarb. (1998) teilen mit, dass die Retinylesterhydrolase von  $pH 4,5$  bis  $9,5$  und optimal bei  $pH 8,2$  aktiv ist.

Die Michaelis-Menten-Konstante der Leber-Esterase beträgt nach STOOPS und Mitarb. (1975), DUDMANN und ZERNER (1975a) und JUNGE und HEYMANN (1979) bei Ethylbutyrat 0,25 – 18,5 mM, bei Phenylbutyrat 0,061 – 0,333 mM, bei Phenylacetat 0,028 – 1,8 mM,

bei o-Nitrophenylbutyrat 0,024 – 0,17 mM, bei 2,4-Dinitrophenylbutyrat 0,01 – 0,11 mM, bei p-Nitrophenylbutyrat 0,007 – 1,6 mM bzw. bei p-Nitrophenylacetat 0,0013 – 2,3 mM. SCHINDLER und Mitarb. (1998) teilen mit, dass die  $K_m$ -Konzentration der Retinylesterhydrolyase der Leber bei Retinylpalmitat 27,5  $\mu$ M beträgt und dass sich die Aktivität des Enzyms mit Detergenzien wie Triton X-114 bis zum 1,7-fachen erhöhen lässt. Retinylesterhydrolyase der Leber weist nach SCHINDLER und Mitarb. (1998) ein mit SDS-PAGE ermitteltes Molekulargewicht von 65 kDa auf. Das Enzym ist nach NAPOLI und BECK (1984), NAPOLI und Mitarb. (1984), HARRISON und GAD (1989) und SCHINDLER und KUHN (1989) auch in Niere, Darm, Lunge, Pankreas, Hoden und vasculärem Endothel enthalten.

INKERMANN und Mitarb. (1975b) gehen bei Leberesterase von einer trimeren Struktur aus. Sie stellen mittels SDS-PAGE fest, dass das Molekulargewicht der Monomere 65 kDa beträgt und das Monomer-Polymer-Gleichgewicht sehr pH-abhängig ist. FARB und JENCKS (1980) teilen mit, dass die Trimere der Leberesterase ein Molekulargewicht von 60 – 70 kDa aufweisen. Nach SATHOH und HOSOKAWA (1995) ist Carboxylesterase P1 der Leber ein Tetramer, dessen Monomere ein Molekulargewicht von 58 – 62 kDa aufweisen.

### 2.2.3 Rind

McRAE und RANDALL (1965) weisen in den Stärkegel-Elektropherogrammen von 4 verschiedenen Muskeln mit 1-Naphthylacetat- und 1-Naphthylbutyrat als Substrat 18 wasserlösliche Isozyme nach, von denen 14 als Carboxylesterasen identifiziert werden. Die Esterase-Aktivität des Probengutes nimmt maßgeblich der Pherogramme in der Reihenfolge *M. obliquus abdominus externus* sowie *M. flexor carpi ulnaris*, *M. longissimus dorsi* und *M. psoas major* ab. Während nach einer 40 min langen Erhitzung des wässrigen Extrakts bei 60°C noch 4 Banden sichtbar sind, hat ein 10 min langes Einwirken von 80°C eine vollständige Inaktivierung des Enzyms zur Folge.

DUDMANN und ZERNER (1975b) teilen mit, dass das gelchromatographisch bestimmte Molekulargewicht des Enzyms 16 bis 20 kDa beträgt. Nach SATHOH und HOSOKAWA (1995) liegt das Molekulargewicht der Untereinheiten der trimeren Lebercarboxylesterase bei 59 kDa und der Isoelektrische Punkt des Enzyms bei  $pI = 6,0$ .

Die  $K_m$ -Konzentration der Leber-Esterase beträgt nach STOOPS und Mitarb. (1975) und nach DUDMAN und ZERNER (1975b) mit Phenylbutyrat 0,061 – 0,333, mit o-Nitrophenylbutyrat 0,024 – 0,17 und mit p-Nitrophenylbutyrat 0,007 – 1,6 mM.

SCHARMA und Mitarb. (1994) bestimmen die Carboxylesterase-Aktivität des Muskelextrakts von Rind, Schaf, Ziege, Schwein, Kaninchen und Huhn. Die höchste Aktivität wird bei Rinder-Carboxylesterase registriert.

### 2.2.4 Schaf

INKERMANN und Mitarb. (1975a) prüfen gereinigte Carboxylesterase der Leber mittels Polyacrylamidelektrophorese. Es resultiert nur eine esteraseaktive Bande, deren Monomere nach Ergebnis der Gelelektrophorese, der Gelfiltration und der Titration mit bis-Nitrophenylphosphat ein Molekulargewicht von 66 – 77 kDa aufweisen. Die von EINARSSON und Mitarb. (1996) mittels Gelfiltration und SDS-PAGE bestimmten Molekulargewichte der Leberesterase betragen 182 und 58 kDa.

Das reaktionskinetische pH-Optimum der Leber liegt nach EINARSSON und Mitarb. (1996) bei Verwendung von p-Nitrophenylacetat und  $\beta$ -Naphthylacetat als Substrate bei pH 7,5. Die im Bereich von pH 7 bis 8,5 bzw. 6 bis 9 registrierten Aktivitäten betragen 80% der Maximalaktivität.

Wie von STOOPS und Mitarb. (1975) sowie INKERMAN und Mitarb. (1975a) berichtet wird, beträgt die Michaelis-Menten-Konstante von gereinigter Carboxylesterase der Leber mit dem Buttersäureester des Methanols 0,26 – 218 mM, des Ethanols 0,25 – 18,5 mM, des Phenols 0,061 – 0,333 mM, des o-Nitrophenols 0,024 – 0,017 mM, des 2,4-Dinitrophenols 0,01 – 0,11 mM, des p-Nitrophenols 0,007 – 1,6 mM und mit Phenylacetat 0,028 – 1,8 mM. EINARSSON und Mitarb. (1996) ermitteln mit p-Nitrophenylacetat eine  $K_m$ -Konzentration von 0,66 mM.

Substrathemmung erfolgt nach STOOPS und Mitarb. (1975) beim Buttersäureester des Phenols bei  $3,7 \times 10^{-3}$  M, des Ethanols bei  $3,4 \times 10^{-3}$  M, des Methanols bei  $2,8 \times 10^{-3}$  M, des p-Nitrophenols bei  $7,3 \times 10^{-3}$  M, des o-Nitrophenols bei  $42 \times 10^{-3}$  M und bei Phenylacetat resp. Phenylvalerat bei  $0,23 \times 10^{-3}$  bzw.  $3,7 \times 10^{-3}$  M.

Die nach 20 min langem Einwirken von 58°C notierte Restaktivität der Leberesterase beträgt nach EINARSSON und Mitarb. (1996) 50% und nach 20 min langem Einwirken von mehr als 62°C 0% der Ausgangsaktivität.

### 2.2.5 Pferd

INKERMANN und Mitarb. (1975a) stellen bei PAGE elektrophoretisch als gereinigt erwiesener Carboxylesterase der Leber durch Titration mit bis-Nitrophenyl-Phosphat fest, dass das Equivalentgewicht des Enzyms 70 kDa beträgt. TORRES und Mitarb. (1988) bestimmen mittels HPLC und SDS-PAGE Molekulargewichte von monomerer Serum-Esterase und notieren hierbei ca. 72 kDa.

Die Michaelis-Menten-Konstante der gereinigten Leberesterase liegt nach TORRES und Mitarb. (1988) sehr niedrig. Die  $K_m$ -Konzentrationen betragen, wie von STOOPS und Mitarb. (1975) berichtet wird, beim Buttersäureester des Phenols 0,77 mM, des p-Nitrophenols 1,1

mM, des o-Nitrophenols 0,5 mM, des 2,4-Dinitrophenols 0,29 mM, des Ethanol 10,6 mM und des Methanol 58,9 mM. In einer homologen Reihe von Phenylestern nimmt die Affinität der Leberesterase zum jeweiligen Substrat mit Zunahme der Kettenlänge der Acylgruppen deutlich zu. Mit Phenylbutyrat als Substrat manifestiert sich im pH-Bereich von 3 bis 6 ein deutlicher Anstieg der  $K_m$ -Konzentration.

Eine Substrathemmung tritt, wie STOOPS und Mitarb. (1975) berichtet, lediglich bei Verwendung von o-Nitrophenylbutyrat und Phenylacetat in sehr hoher Konzentration ein.

## C Eigene Untersuchungen

Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist es zu prüfen, ob und inwieweit sich der von PFEIFFER und Mitarb. (1969) empfohlene und auf dem Nachweis von Carbesterase als Leitenzym beruhende Erhitzungsnachweis für Fleisch und Fleischerzeugnisse auch bei pasteurisierten Erzeugnissen aus Putenfleisch eignet.

Die Arbeit gibt Antwort insbesondere auf folgende Fragen:

- 1 Ist bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch eine Modifikation der Methodik des Esterase-Tests erforderlich?
- 2 Wie wirken sich Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung bei Skelettmuskulatur, Fett- und Lebergewebe von Pute und bei den Erzeugnissen hieraus auf die Esterase-Aktivität des Probengutes aus? Inwieweit sind Rezeptur und Vorbehandlung des Probengutes von Einfluss?
- 3 Unter welchen Voraussetzungen und wie verlässlich eignet sich die mittels des Esterase-Tests ermittelte Restaktivität von Carbesterase bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch der Kategorie Kochpökelfleisch, Hackfleischprodukte, Brühwurst und Leberwurst als Indikator einer wirksamen Pasteurisation?

## 1 Material und Methoden

Nachstehende Angaben zu Material und Methodik gelten bei sämtlichen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen. Soweit sich bei bestimmten Fragestellungen Abweichungen hiervon gebieten, werden sie bei der Beschreibung der betreffenden Versuchsanordnung benannt.

### 1.1 Probenmaterial

Das Probenmaterial von Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe stammt jeweils von Puten, die 1 bis 2 Tage vor Anlieferung des Probenmaterials ans Institut in derselben Putenschlächterei geschlachtet worden waren. Hinsichtlich der anatomischen Provenienz und der technologischen Besonderheiten der Proben, die bei der Anlieferung Temperaturen von stets  $\leq 4^{\circ}\text{C}$  aufweisen, ist folgendes von Wichtigkeit:

Brustmuskel: Die hellfarbigen Muskeln sind in toto einzeln abgepackt.

Flügelmuskulatur: Die Abpackungen enthalten jeweils zwei von den Spitzen befreite Flügel von je ca. 450 g samt Haut und Knochen. Beim Ablösen der hellroten Skelettmuskulatur vom Knochen werden die Cutis, Subcutis und etwaige Blutgerinnsel sorgfältig entfernt.

Oberkeule: Es sind jeweils zwei Oberkeulen von je ca. 750 g samt Haut und Knochen abgepackt. Beim Schieren der dunkelroten Skelettmuskulatur werden Haut, Knochen, Fettgewebe, größere Sehnen und Fascien sowie Blutgerinnsel entfernt.

Unterkeule: Die Gebinde enthalten jeweils zwei Unterkeulen, die einzeln mit Haut und Knochen ca. 550 g wiegen. Beim Schieren der dunkelroten Muskulatur wird wie bei den Oberkeulen verfahren.

Karkassenfleisch: Das beim maschinellen Entbeinen als gröbere Paste anfallende Produkt besteht aus knochenahem Fleisch, Fettgewebe und einer unbedeutend geringen Menge von technisch nicht vermeidbarem Knochenmark. Das zu ca. 500 g abgepackte Probengut weist ein rötlich-weißes Aussehen auf.

Leber: Eine Packung enthält jeweils 5 bis 7 Lebern.

Fettgewebe: Das zu ca. 500 g abgepackte Probengut besteht zum größten Teil aus Haut mit fettgewebsreichem Unterhautgewebe und anhaftender Muskulatur. Bei der Präparation des Probengutes wird lediglich das Muskelfleisch, nicht jedoch die Haut entfernt.

## 1.2 Probenaufbereitung und Erhitzung

Das gemäß 1.1 *Probenmaterial* gescherte Probengut wird jeweils am Tag der Anlieferung durch die 4-mm-Scheibe gewolft, manuell vorvermischt, mittels Moulinette in entsprechenden Teilmengen homogenisiert und in Portionen von je  $30 \pm 0,5$  g in hitzestabile, 19 x 30 cm große Beutel aus PE-Folie der Dicke 100  $\mu\text{m}$  eingewogen. Die Beutel werden nach Absaugen der Luft mittels eines haushaltsüblichen Folienschweißgerätes hermetisch verschlossen und das Probengut gleichmäßig auf eine Dicke von etwa 2 mm verteilt.

Das auf diese Weise standardisierte und chargierte Probengut wird sofort auf  $-18^\circ\text{C}$  gebracht und für die jeweiligen Studien bei dieser Temperatur maximal aber 4 Wochen vorgehalten. Für die Hitzebehandlung im Wasserbad werden die Folienbeutel nach Auslagerung aus der Tiefkühltruhe durch jeweils 2 h langes Liegenlassen auf dem Labortisch auf Zimmertemperatur erwärmt, anschließend für die jeweilige Dauer der Hitzebehandlung flach auf den Boden des auf  $80 \pm 0,1^\circ\text{C}$  temperierten Wasserbads gegeben, danach sofort in Eiswasser 5 min gekühlt und bis zur Untersuchung 24 bis 56 h im Kühlschrank bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

## 1.3 Bestimmung der Esterase-Restaktivität

### Methodisches Prinzip

Im Homogenisat von Fleisch und Fleischerzeugnissen enthaltene, nicht hitzeinaktivierte Esterase wird mit höher molarem Citrat-Phosphat-Puffer extrahiert und mit den Substraten NA, NB und IA bestimmt, indem die enzymatischen Hydrolyseprodukte Naphthol mit Dibromchinonchlorimid und Indoxyl durch spontane Oxidation durch Luftsauerstoff in einen photometrisch bei jeweils 617 nm quantifizierbaren blauen Farbkomplex überführt werden.

### Chemikalien:

Citronensäure-Monohydrat (Merck Nr. 744 K 00745841)  
di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Riedel- de Haen AG Nr. 04272)  
1-Naphthylacetat (Serva Nr. 30040)  
Indoxylacetat (Serva Nr. 26230)  
1-Naphthylbutyrat (Serva Nr. 30069)  
2,6-Dibromchinon-4-chlorimid (Merck Nr. 3035)  
Ethanol  
1-Methyl-2-pyrrolidon (Merck Nr. 806072)  
1-Naphthol (Aldrich Nr. N199-2)

### Geräte und Hilfsmittel:

Ultra-Turrax mit Schaft TP 18/2N (Janke und Kunkel)  
Magnetrührer  
Mettler Analysenwaage AE 200: Wägebereich 205 g; Wägegenauigkeit 0,1 mg

Scaltec Präzisionswaage SBA 52: Wägebereich 2200 g; Wäagegenauigkeit: 0,01 g  
Beckmann Spektralphotometer UV-DU 62: Messbereich 200 – 700 nm  
Lauda Präzisionswasserbad S8/12: Temperierbereich 20 – 100°C; Genauigkeit 0,1°C  
Julabo SW-20C Schüttelwasserbad: Temperierbereich 20 – 100°C;  
Universal Küchenmaschine Typ MUM 6010 (Bosch)  
Microprocessor pH/ION Meter pMX3000 (WTW)  
Folienschweißautomat FS201 vacuplus (Electricpetra)  
Vortex Reagenzglasrüttler (Bender & Hobein AG)  
Moulinette (Moulinex)  
Erlenmeyerkolben: 200 ml  
Homogenisierbeutel Whirl-Pak (Roth)  
Messzylinder: 250 ml  
Trichter mit Filter Nr. 520 h ½ und 597 ½ (Schleicher & Schüll)  
Reagenzröhrchen mit Ständer  
Pasteurpipetten: 0,2 ml; 5 ml

#### Reagentien:

##### *Citrat-Phosphat-Pufferlösung, pH 6,6*

Im 1 l-Messkolben werden in 950 ml destilliertem Wasser nacheinander 21,02 g Citronensäure-Monohydrat und 35,5 g di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat in Lösung gebracht, mit 6 N NaOH auf pH 6,6 eingestellt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

##### *Substratlösungen*

25 mg NA, IA und NB werden in jeweils 2 ml Ethanol gelöst. Die Lösungen sind bei 4 bis 8°C 3 Tage haltbar.

##### *2,6-Dibromchinon-4-chlorimid-Lösung*

5 mg DBCC werden in 2 ml Ethanol gelöst. Die Lösung ist jeweils frisch anzusetzen.

#### Bestimmungsverfahren:

##### *Probenaufbereitung:*

Das definiert erhitzte, gekühlte und im Kühlschrank vorgehaltene Probengut wird im Folienbeutel zunächst durch intensives Massieren, und nach Öffnen des Beutels durch erneutes Verrühren mit dem Spatel homogenisiert.

##### *Gewinnung des Probenextraktes:*

In 200 ml-Erlenmeyerkolben werden bei den Ansätzen mit NA 5 g Homogenisat in 50 ml, bei den Ansätzen mit NB und IA 25 g Homogenisat in 75 ml Citrat-Phosphat-Puffer von 40°C jeweils 15 sec lang mit dem Ultra-Turrax dispergiert. Anschließend wird das Probenextrakt durch Filtration der Probendispersion durch das Filter Nr. 520 h ½ gewonnen.

##### *Herstellen der Ansätze:*

Für die Herstellung der Probenansätze werden jeweils 3,5 ml Extrakt in ein Reagenzglas gegeben und nach 10 min langer Vorinkubation bei 25°C mit 0,1 ml der jeweiligen Substratlösung durch intensives Schütteln mittels Vortex vermischt. Mit jedem Substrat wird ein Doppelansatz hergestellt. Die Blindproben bestehen ebenfalls aus 3,5 ml Extrakt und aus 0,1 ml

der jeweiligen Substratlösung, die jedoch erst nach Enzyminaktivierung - bei den Ansätzen mit NA und NB durch 5 ml Ethanol und bei den Ansätzen mit IA durch 5 ml Methylpyrrolidon - zugesetzt wird. Die Blindproben dienen der Kontrolle einer womöglich nicht durch Esterase, sondern unspezifisch, bei geräucherten Produkten beispielsweise auch durch Phenole des Rauchs bedingten Testreaktion. Die Nullwertkontrollen bestehen aus 3,5 ml Pufferlösung und 0,1 ml Substratlösung und dienen der Kontrolle einer womöglich infolge von Authydrolyse der Substrate fälschlich positiven Reaktion der Probenansätze.

#### *Inkubation der Ansätze:*

Die Inkubation der Probenansätze, Blindproben und Nullwertkontrollen erfolgt im Wasserbad bei  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Sie dauert bei den Ansätzen mit NA 60 min, bei den Ansätzen mit NB und IA 180 min. Beendet wird die Inkubation bei den Ansätzen mit NA und NB durch Zumischen von 5 ml Ethanol, bei den IA-Ansätzen von 5 ml Methylpyrrolidon auf dem Vortex. Die NA- und NB-Ansätze können sofort durch das 597 h  $\frac{1}{2}$ -Filter filtriert und für die photometrische Bestimmung aufbereitet werden. Die IA-Ansätze werden vor dem Filtrieren für die Gewährleistung des vollständigen in Lösunggehens des Indigos und einer nachhaltigen Vorklärung 1 h bei Zimmertemperatur abgestellt.

#### *Aufbereitung der Ansätze für die photometrische Bestimmung:*

Die Filtrate der NA- und NB-Ansätze werden mit 0,1 ml DBCC-Lösung vermischt, für die Reaktion des Naphthols mit DBCC zum Farbkomplex 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend durch das Filter Nr. 597 h  $\frac{1}{2}$  in ein Reagenzglas klarfiltriert. Die Filtration der IA-Ansätze wird auf gleiche Weise durchgeführt.

#### *Photometrische Bestimmung:*

Die Bestimmung der Extinktion erfolgt sowohl bei den Probenansätzen mit NA und NB, als auch mit IA bei 617 nm, und zwar dann gegen die Nullwertkontrolle statt gegen die Blindprobe, wenn die Blindprobe eine geringere Absorption aufweist als die Nullwertkontrolle.

## **1.4 Bestimmung des Keimgehalts**

#### Methodisches Prinzip:

Die Bestimmung der Keimzahlen erfolgt mittels Oberflächen-Spatelverfahren. 0,1 ml der Probe der jeweiligen Verdünnungsstufe werden auf eine gut getrocknete Nährbodenplatte aufgegeben und mit einem sterilen Drigalski-Spatel gleichmäßig ausgestrichen. Nach vorschriftsmäßigen Bebrüten werden die koloniebildenden Einheiten (KBE) gezählt.

Glaswaren und Geräte:

Erlenmeyerkolben: 250 ml  
Reagenzgläser mit Verschlusskappen  
Eppendorf-Pipetten und Spitzen (100 µl)  
Petrischalen  
Brutschränke (Memmert)  
Wasserbad (Köttermann)  
Mettler Analysenwaage AE 200: Wägebereich 205 g; Wägegenauigkeit 0,1 mg  
Ultra-Turrax mit Schaft TP 18/2N (Janke und Kunkel)  
Vortex Reagenzglasrüttler (Bender & Hobein AG)  
Spatel, Löffel, Messer

Verdünnungslösung:

Ringerlösung (MERCK Nr. 115525)

Nährböden:

Plate-Count-(PC)-Agar (MERCK Nr. 105463) für die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl und der aeroben Sporenbildner. 22,5 g Plate-Count-Agar werden in 1 l Aqua dest. gelöst und nach Sterilisation im Autoklaven in Petrischalen ausgegossen.

Citrat-Azid-Tween-Carbonat-(CATC)-Agar (MERCK Nr. 110279) für den Nachweis von *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*. 56 g Citrat-Azid-Tween-Carbonat-Agar werden in 1 l Aqua dest. gelöst und im Autoklaven sterilisiert. Vor dem Ausgießen werden einem Liter Nährboden 20 ml 10%-ige Natriumcarbonatlösung (MERCK Nr. 106392), 10 ml 1%-ige 2,3,5,-Triphenyltetrazoliumchloridlösung (MERCK Nr. 108380) und 4 ml 10%-ige Natriumazidlösung (MERCK Nr.106688) zugesetzt. Die Lösungen werden sterilfiltriert

Durchführung der Keimgehaltsbestimmungen:Probennahme:

Die im sterilen Folienbeutel pasteurisierten Probenhomogenate werden vor der Probennahme mit einem sterilen Spatel vermischt. Bei den stückigen Proben erfolgt die Entnahme unter sterilen Kautelen im Bereich des geometrischen Mittelpunkts der Probe. Wurstwaren werden hierfür ggf. nach Anritzen der Hülle mit einem sterilen Messer aufgebrochen.

Probenaufbereitung und Verdünnung

Für die Erstverdünnung werden 10 g Probe unter sterilen Kautelen in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben eingewogen und nach Zugabe von 90 ml Ringerlösung mit dem Ultra-Turrax 30 sec lang dispergiert. Für die Zweitverdünnung wird nach 5 min langem Aufräumen des Fettigen und Sedimentieren des Gröberen aus der feindispersen Zwischenphase der Erstverdünnung 1 ml Probensuspension entnommen und mit 9 ml Ringerlösung im Reagenzglas auf dem Rüttler vermischt. Analog werden je nach erwarteter Keimzahl höhere Verdünnungsstufen angesetzt und von diesen 0,1 ml auf die Nährböden aufgebracht. Für die Ermittlung der aeroben Sporen werden die Reagenzgläser der betreffenden Verdünnungsstufen vor Aufbringen der Probe auf die Nährböden 10 min im Wasserbad von 70°C erhitzt.

Inkubation und Auswertung der Ansätze:

Zur Ermittlung der aeroben Gesamtkeimzahl sowie der aeroben Sporen werden die Ansätze auf PC-Agar 72 h bei 30°C bebrütet. Ausgewertet werden nur Platten mit 10 bis 300 Kolonien.

Der CATC-Agar wird zunächst 24 h bei 37°C, danach 24 h bei Raumtemperatur bebrütet. Ausgezählt werden Platten mit 10 bis 150 rotgefärbten Enterococcus-Kolonien. Helle, weiße und rosa Kolonien < 1 mm werden nicht gezählt.

### 1.5 Bestimmung des Proteingehaltes der Probenextrakte für den Esterase-Test mittels des Bicinchoninsäure-(BC)-Assay (BCA)

Methodisches Prinzip:

Im Citrat-Phosphat-Puffer-Extrakt enthaltenes Protein enthält u.a. die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan, die - wie Peptidbindungen überhaupt -  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduzieren.  $\text{Cu}^+$  bildet mit BC einen photometrisch bei 562 nm quantifizierbaren violetten Farbkomplex.

Chemikalien:

Citronensäure-Monohydrat (Merck Nr. 744 K 00745841)  
di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Riedel- de Haen AG Nr. 04272)  
Trichloressigsäure (TCA)  
Natriumdodecylsulfat (SDS)  
BC-Reagenz (Testkit der Firma Interchim)

Geräte und Hilfsmittel:

Zentrifuge  
Wasserbad  
Ultra-Turrax mit Schaft TP 18/2N (Janke und Kunkel)  
Magnetrührer  
Beckmann Spektralphotometer UV-DU 62: Messbereich 200 – 700 nm  
Vortex Reagenzglasrüttler (Bender & Hobein AG)  
Trichter mit Filter Nr. 520 h ½ und 597 ½ (Schleicher & Schüll)  
Reagenzröhrchen mit Ständer

Bestimmungsverfahren:Probenaufbereitung:

30 ml des gemäß 1.3 Bestimmung der Esterase-Restaktivität gewonnenen Citrat-Phosphat-Puffer-Extraktes werden bei 20.000 g und 4°C 20 min zentrifugiert. 1ml mit 80 µl 10%iger SDS-Lösung versetztes Zentrifugat wird mit 1 ml 20%iger TCA-Lösung vermischt, die Mischung bei 10.000 g und 4°C 30 min zentrifugiert. Für die Bereitstellung der Probelösung wird das Zentrifugat in 1 ml 0,1 mol NaOH durch 60 min langes Inkubieren bei Zimmertemperatur in Lösung gebracht.

*Aufbereitung des Eichproteins:*

Aus einer 0,2%igen (G/V) Rinderserumalbumin-Standardlösung werden Verdünnungen von je 300 µl und mit einem Proteingehalt von 0,008, 0,016, 0,024 und 0,32% (G/V) hergestellt, jeweils mit 24 µl einer 10%igen SDS-Lösung, dann mit 300 µl einer 20%iger TCA-Lösung auf dem Vortex vermischt und bei 10.000 g und 4°C 30 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wird in 1 ml einer 0,1 mol NaOH durch 60 min langes Inkubieren bei Raumtemperatur gelöst.

*Eiweiß-Bestimmung:*

Mit 0,1 ml Probelösung bzw. Eichlösung der Proteinkonzentration der Probelösung werden 2 ml BCA-Reagenz, das aus 50 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B des Testkits zubereitet wird, auf dem Vortex vermischt. Als Blindproben werden analog 3 Ansätze mit 0,1 mol NaOH anstelle von Probenlösung verwendet. Nach 30 min langem Inkubieren bei 37°C und Abkühlen auf 20°C werden die Ansätze bei 562 nm photometriert. Nach Abzug des arithmetisch gemittelten Blindwertes vom Probenwert wird die Proteinkonzentration an der Eichgeraden abgelesen.

**1.6 Isoelektrische Fokussierung von Esterase-Isozyme**Methodisches Prinzip:

Gemäß 1.3 *Bestimmung der Esterase-Restaktivität* gewonnenes Citrat-Phosphat-Puffer-Extrakt wird nach Abzentrifugieren des nicht Gelösten dialysiert. Die nicht dialysierbaren Proteine werden lyophilisiert und mittels isoelektrisch fokussierender Polyacrylamidgel-Elektrophorese differenziert. Die Darstellung der Esterase-Isozyme erfolgt mit einer Lösung von Naphthylacetat als Substrat und Echtblausalz als Kupplungsreagenz für Naphthol.

Chemikalien:

Acrylamid (MERCK Nr. 100209)  
N,N'-Methylendiacylamid (MERCK Nr. 1546)  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MERCK Nr. 108382)  
HCl 4 N (BAKER Nr. 6081)  
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin TEMED (PHARMACIA BIOTECH Nr. 17-1345-01)  
Ammoniumpersulfat 40% (MERCK Nr. 101201)  
1,1,1-Trichloethan 98% (BAKER Nr. 7309)  
Dichlordimethylsilan 2% (MERCK Nr. 803452)  
Glycerin (MERCK Nr. 1.04092.1000)  
Sorbit (MERCK Nr. 1.07759.0100)  
Harnstoff (MERCK Nr. 1.08487.0500)  
Ampholyt pH 4 – 7 (SERVA Nr. 42948)  
Methanol (MERCK Nr. 1.06009.1000)  
Essigsäure 99,8% (MERCK Nr. 33209)  
1-Naphthylacetat (SERVA Nr. 30040)  
Protein Test Mixture for pI-Determination (SERVA, pH 3 – 10)

Aceton (MERCK Nr. 1.00014.1000)  
Ethanol (MERCK Nr. 1.00983.1000)  
Echtblausalz B (MERCK Nr. 103191)  
Citrat-Phosphat-Puffer pH 7,6  
Colloidal Blue Staining Kit Stainer A/B (NOVEX Nr. LC 6025)  
Anodenflüssigkeit (SERVA Nr. 42984.03)  
Kathodenflüssigkeit (SERVA Nr. 42986.03)  
Ammoniumperoxodisulfat 40% (MERCK Nr. 101201)

Geräte und Hilfsmittel:

Elektrophoresekammer (LKB BROMMA 2117 Multiphor II Electrophoresis Unit)  
Netzteil (LKB BROMMA 2297 Macrodrive 5)  
Lyophilisator (CHRIST Reta)  
Kühlgerät (JULABO Paratherm FT 40 PS electronic)  
Vakuumpumpe (KNF Neuberger)  
Magnetrührer (IKA – Combimag)  
Kolbenhubpipette 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl  
Festvolumenpipette 20µl 500µl, 1 ml  
Pipettenspitzen (SERVA Nr. 44114)  
Pipettenspitzen 50-1000µl (MERCK Nr. 612F5734)  
Pipettenspitzen 10-100µl (MERCK Nr. 612F5724)  
Pipettenspitzen 0,1-20µl (MERCK Nr. 612F5714)  
Pasteurpipette  
Eppendorfreaktionsgefäße 1,5 ml (MERCK Nr. 612Q6640)  
Becherglas 1 l  
Witt'scher Topf  
Gießkassette  
Folien-Walze  
Elektrophoresepapier (WHATMAN Nr. 3030917)  
Gelfolie (Gel-Fix for PAG, SERVA Nr. 42999)  
Kassettenklammern  
Standard-Verschlussklammer (ROTH Nr. H277.1)  
Becherglas 50 ml  
Messkolben 25 ml  
Slotformer oder Dymoband

Reagenzien:

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung:

Im 25 ml-Messkolben werden 7,2 g Acrylamid und 0,3 g Bisacrylamid in Wasser gelöst, der Kolben aufgefüllt und die Lösung bis zur Verwendung bei 6°C gelagert.

Tris-HCL-Pufferlösung (0,5 M, pH 8,0):

1,5 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan werden in 20 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung wird mit 4 N HCl auf pH 8,0 gebracht und bis zur Verwendung bei 6°C gelagert.

Gelstammlösung:

2ml Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, 1,5 ml Tris-HCl-Pufferlösung und 11,5 ml Aqua dest. werden auf dem Magnetrührer vermischt und im Witt'schen Topf entgast.

Repel-Silane-Lösung:

Die Lösung wird aus 98% 1,1,1-trichlorethan und 2% Dichlordimethylsilan bereitet.

Imprägnierlösung:

Im Messkolben werden 2 g Glycerin und 1 g Sorbit in 1 l Aqua dest. gelöst.

**Rehydratationslösung:**

Je Gelportion wird eine Lösung aus 2,5 g Glycerin, 3,6 g Harnstoff, 12 ml Aqua dest. und 1,4 ml Ampholyt pH 4 - 7 hergestellt und im Witt'schen Topf entgast.

**Fixier-Entfärbelösung:**

Im Messkolben werden 20 ml Methanol und 10 ml Essigsäure 99,8% in 1 l Aqua dest gelöst.

**Konservierungslösung:**

Im Messkolben werden 100 ml Essigsäure 99,8% und 50 ml Glycerin in 1 l Aqua dest. gelöst.

**Substratfärbelösung:**

60 mg Naphthylacetat werden in 5 ml Aceton und 100 mg Echtblausalz B in 5 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösungen werden vor Gebrauch mit 250 ml Citrat-Phosphat-Puffer (pH 7,6) vermischt.

**Coomassie-Färbung:**

20 ml Stainer A, 2 ml Stainer B und 20 ml Methanol werden mit 58 ml Aqua dest. gemischt.

**Herstellen der Gießkassette**

Die 0,45 mm dicken, 24 cm langen und 10 cm breiten Gele werden nach WESTERMEIER (1990) folgenderweise hergestellt: Glasplatte 1 wird randständig in U-Form 9-lagig mit „Tesa-film“ und an den späteren Probeauftragstellen mit Platzhaltern aus „Dymoband“ beklebt. Nach Hydrophobisieren der Glasplatte 1 mittels Repel-Silane unter dem Abzug und nach Aufwalzen der Trägerfolie auf die Glasplatte 2 vermittelt weniger Tropfen Aqua dest. als Adhäsionsmittel werden die beide Glasplatten einander deckungsgleich angelegt und so an einander mittels Klammern fixiert.

**Gießen, Waschen, Imprägnieren und Trocknen des Gels**

15 ml entgaste Gelstammlösung werden mit 6 µl TEMED und 11,5 µl APS vermischt und mittels Gradientenmischer langsam in die senkrecht stehende Gießkassette gegeben. Das polymerisierte Gel wird nach 2 Stunden bei Raumtemperatur aus der Gießkassette entnommen und 4 x 15 min in Aqua dest. gewaschen. Vor dem Trocknen wird das Gel 30 min mit Imprägnierlösung behandelt. Getrocknet wird das Gel unter staubfreien Bedingungen bei Raumtemperatur.

**Rehydratisieren des Gels**

Das Rehydratisieren des Gels erfolgt in einer der Gießkassette analog hergestellten Kassette mit einem 0,5 mm tiefen U-Rand und ohne die Platzhalter für den Probenauftrag. Das getrocknete Gel wird auf die Glasplatte 2 vermittelt weniger Tropfen Aqua dest. als Adhäsionsmittel aufgerollt und mit Glasplatte 1 zur Kassette zusammengesetzt. Mittels Gradientenmischer wird die Rehydratisierlösung in die Kassette gegeben. Nach 2 Stunden kann das Gel entnommen, mittels fusselfreiem Tuch abgetupft und zur elektrophoretischen Trennung eingesetzt werden.

Elektrophoretische Trennung

Das rehydratisierte Gel wird dem auf 10°C temperierten Kühlblock der Trennkammer so aufgelegt und vermittle weniger Tropfen Aqua dest. verhaftet, dass die Probeauftragstellen auf der anodischen Seite liegen. Im Abstand von exakt 10 cm wird dem Gel am anodischen bzw. kathodischen Rand diesem parallel mit elektrodenhomologem Puffer durchtränktes Elektrophoresepapier aufgelegt. Durch das Schließen der Kammer wird das Gel mit den innseitig des Deckels liegenden Elektroden verbunden. Der pH-Gradient wird bei 2500 V durch 30 min langen Stromfluss von 15 mA und 4 W erzeugt. Im Anschluss an das Vorfokussieren werden je 25 µl Probe in die hierfür vorgesehenen Vertiefungen pipettiert und unter den aus Tab. 1 ersichtlichen Bedingungen zur Auftrennung gebracht.

**Tab. 1: Parameter der Isoelektrisch fokussierenden Elektrophorese**

Phase	U (V)	I (mA)	P (W)	t (min)
1	600	15	4	20
2	2500	15	4	40
3	3000	6	20	60
4	3000	7	25	60

Färberische Darstellung der Esterase-Isozyme und der Markerproteine

Im unmittelbaren Anschluss an die Elektrophorese wird das Gel mit den Markerprotein-Bahnen vom Gel mit den Probenprotein-Bahnen getrennt. Das Markerprotein-Gel wird in der Fixierlösung 60 min, in der Coomassie-Lösung 30 min und in Aqua dest. 7 h inkubiert. Vor der Trocknung werden die Gele jeweils 10 min mit Konservierungslösung behandelt. Das Probeprotein-Gel wird in der Substratfärbelösung von 37°C je nach Probe 5 sec bis 5 min inkubiert. Vor dem Trocknen wird das Gel 15 min in Fixier-Entfärbelösung und darauf 10 min in Konservierungslösung behandelt.

## **2 Prüfung der methodischen Eignung des referierten Esterase-Tests bei Erzeugnissen aus Putenfleisch**

Kriterien der Prüfung sind der Einfluss der Substratkonzentration, der Inkubationstemperatur und –dauer sowie der Verfügbarkeit der Spaltprodukte Naphthol und Indoxyl für die bestimmungsgemäße Farbbildung auf die jeweils resultierende Extinktion. Darüber hinaus soll die Unterscheidungsschärfe des Testverfahrens ermittelt werden.

Die Ermittlung dieser Parameter erfolgt an Brustmuskel, Fettgewebe und Leber der Pute.

### **2.1 Einfluss der Inkubationstemperatur**

Zu prüfen steht zunächst die Frage, ob sich die Inkubationstemperatur 25°C, die bei den Erzeugnissen aus Rind- und Schweinefleisch empfohlen wird, auch bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch eignet.

#### **2.1.1 Probengut und Versuchsanordnung**

Die Studien erfolgen an Ansätzen mit 5 min bei 80°C erhitztem Probengut von Brustmuskel, Fettgewebe und Leber der Pute, die bei 20, 25, 30, 35 und 40°C inkubiert werden. Um auch für etwaige Versuchswiederholungen repräsentatives Probengut in hinreichender Menge verfügbar zu haben, wird jeweils von mehreren Tieren stammendes Probenmaterial in etwa gleichen Anteilen zu Sammelproben von je 400 g vereint. Für die Gewährleistung der erforderlichen Homogenität wird das gewolfte Probengut manuell gründlich vorgemischt und danach in Portionen von ca. 120 bis 150 g in der Moulinette feinzerkleinert. Die weitere Behandlung der Proben erfolgt gemäß *1.2 Probenaufbereitung und Erhitzung*.

## 2.1.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Der Einfluss der geprüften Inkubationstemperaturen auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei Brustmuskel, Leber Fettgewebe der Pute ist aus den Tabellen 2, 3 und 4 und aus den Abbildungen 1, 2 und 3 ersichtlich.

Die Ergebnisse lassen folgende Feststellungen zu.

Die Authydrolyse von NA und IA nimmt, wie die Nullwerte zeigen, mit steigender Inkubationstemperatur kontinuierlich zu. NB erweist sich hingegen auch bei 40°C als stabil.

Die mit Abstand höchsten Extinktionen resultieren trotz etwa dreifach höherer Extraktverdünnung und etwa dreifach kürzerer Inkubationsdauer bei den NA-Ansätzen. Dies dürfte z.T. sicherlich auch auf die relativ gute Löslichkeit des Substrates zurückzuführen sein. Bei 5 min bei 80°C erhitzter Leber (Tab. 2; Abb. 1) erhöht sich die Hydrolyserate der Esterase-Restaktivität mit steigender Inkubationstemperatur sowohl bei NA als auch bei NB kontinuierlich. Bei den Ansätzen mit IA manifestiert sich dieser Effekt erst bei 35 und 40°C. Dass bei den Ansätzen mit IA sehr viel niedrigere Extinktionen resultieren als bei NB – und nicht zuletzt auch in Relation zur höheren Extraktverdünnung und kürzeren Inkubationsdauer schon gleich bei NA - ist darauf zurückzuführen, dass sich IA in den Ansätzen faktisch nur in soweit dispers genug verteilen lässt, als dies durch das sofortige und intensive Schütteln der Ansätze nach Zugabe der ethanolischen Substratlösung gewährleisten lässt. Während die Blindwerte bei den Ansätzen mit NA und IA faktisch konstant bleiben, nehmen sie bei den Ansätzen mit NB mit zunehmender Temperatur sicherlich durch Reaktion mit Leberinhaltsstoffen kontinuierlich ab.

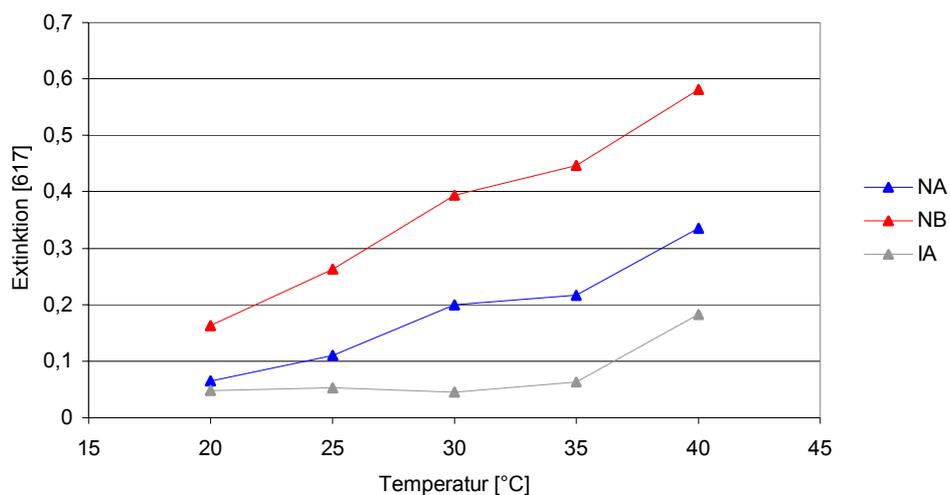
Bei 5 min bei 80°C erhitztem Brustmuskel (Tab. 3; Abb. 2) erhöht sich die Kinetik der Esterase mit zunehmender Inkubationstemperatur bei allen 3 Substraten kontinuierlich, bei den Ansätzen mit NA infolge von Substratauthydrolyse in beachtlichem Maße auch der Null- und Blindwert, bei den Ansätzen mit IA der Nullwert.

Im Gegensatz zu Leber und Brustmuskel verursacht die beim Fettgewebe (Tab. 4; Abb. 3) nach 5 min langem Einwirken von 80°C bestehende Esterase-Restaktivität erst bei einer Inkubationstemperatur > 30°C und auch nur bei den Ansätzen mit NB und IA höhere Extinktionen. Dass sich bei NA mit zunehmender Temperatur sowohl die Nullwerte als auch die Blindwerte und bei IA nur die Nullwerte erhöhen, dürfte auf die bei steigender Temperatur höhere Authydrolyse der Substrate und bei IA auf die Reaktion des enzymatischen Hydrolyseprodukts Indoxyl auch mit Inhaltsstoffen der Extrakte zurückzuführen sein.

**Tab. 2: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min)**

Substrat		Extinktion [ $E_{617}$ ] bei der Inkubationstemperatur				
		20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
NA	Nullwert	0,067	0,082	0,096	0,119	0,166
	Blindwert	0,134	0,121	0,126	0,123	0,137
	Ansatz 1	0,201	0,231	0,310	0,340	0,517
	Ansatz 2	0,198	0,232	0,342	0,341	0,485
	MW	0,065	0,110	0,200	0,217	0,335
NB	Nullwert	0,199	0,201	0,199	0,188	0,188
	Blindwert	0,184	0,176	0,166	0,149	0,150
	Ansatz 1	0,365	0,460	0,601	0,635	0,779
	Ansatz 2	0,359	0,469	0,585	0,635	0,760
	MW	0,163	0,263	0,394	0,447	0,581
IA	Nullwert	0,058	0,067	0,088	0,107	0,124
	Blindwert	0,060	0,064	0,060	0,063	0,066
	Ansatz 1	0,111	0,120	0,135	0,018	0,297
	Ansatz 2	0,105	0,120	0,132	0,152	0,317
	MW	0,048	0,053	0,045	0,063	0,183

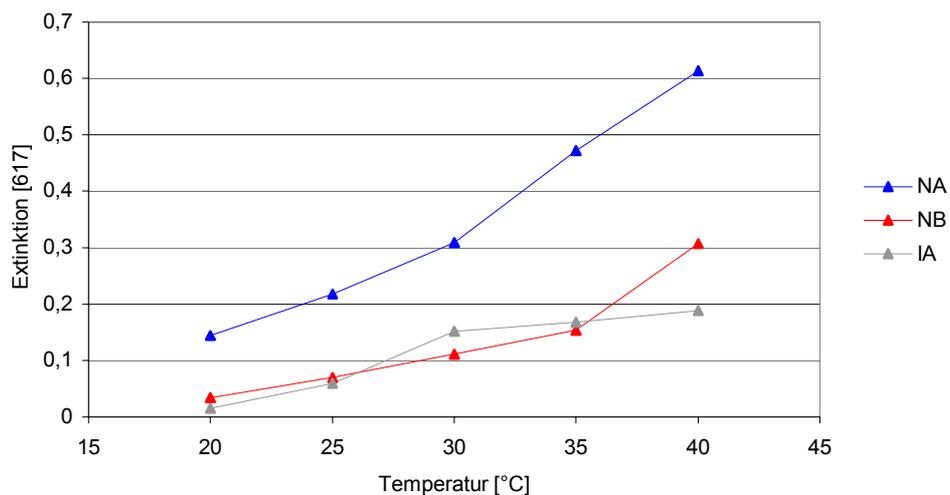
Erklärungen: MW = Endwert resp. Blindwert- bzw. Nullwert-bereinigter arithmetischer Mittelwert von Ansatz 1 und Ansatz 2

**Abb.1: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min)**

**Tab. 3: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min)**

Substrat		Extinktion [ $E_{617}$ ] bei der Inkubationstemperatur				
		20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
NA	Nullwert	0,071	0,081	0,100	0,126	0,171
	Blindwert	0,083	0,095	0,112	0,130	0,143
	Ansatz 1	0,224	0,308	0,420	0,595	0,772
	Ansatz 2	0,230	0,319	0,423	0,609	0,797
	MW	0,144	0,218	0,309	0,472	0,613
NB	Nullwert	0,198	0,181	0,203	0,186	0,189
	Blindwert	0,207	0,198	0,211	0,194	0,208
	Ansatz 1	0,237	0,269	0,319	0,349	0,518
	Ansatz 2	0,245	0,268	0,326	0,347	0,512
	MW	0,034	0,070	0,111	0,154	0,307
IA	Nullwert	0,060	0,068	0,089	0,109	0,124
	Blindwert	0,051	0,051	0,052	0,052	0,053
	Ansatz 1	0,075	0,129	0,243	0,270	0,299
	Ansatz 2	0,075	0,125	0,240	0,284	0,326
	MW	0,015	0,059	0,152	0,168	0,188

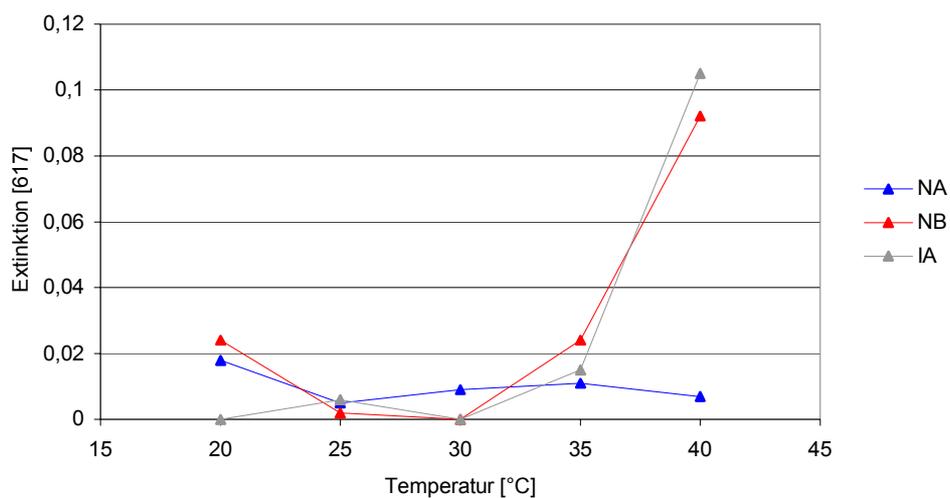
Erklärungen: MW = Endwert resp. Blindwert- bzw. Nullwert-bereinigter arithmetischer Mittelwert von Ansatz 1 und Ansatz 2

**Abb. 2: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min)**

**Tab. 4: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min)**

Substrat		Extinktion [ $E_{617}$ ] bei der Inkubationstemperatur				
		20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
NA	Nullwert	0,069	0,079	0,092	0,111	0,150
	Blindwert	0,069	0,076	0,082	0,095	0,112
	Ansatz 1	0,091	0,084	0,096	0,119	0,153
	Ansatz 2	0,083	0,085	0,106	0,126	0,162
	MW	0,018	0,005	0,009	0,011	0,007
NB	Nullwert	0,172	0,174	0,178	0,183	0,189
	Blindwert	0,198	0,217	0,228	0,205	0,215
	Ansatz 1	0,216	0,220	0,202	0,229	0,307
	Ansatz 2	0,228	0,218	0,234	0,229	0,307
	MW	0,024	0,002	0	0,024	0,092
IA	Nullwert	0,058	0,068	0,093	0,109	0,124
	Blindwert	0,068	0,056	0,058	0,057	0,062
	Ansatz 1	0,063	0,078	0,086	0,120	0,229
	Ansatz 2	0,061	0,071	0,083	0,129	0,229
	MW	0	0,006	0	0,015	0,105

Erklärungen: MW = Endwert resp. Blindwert- bzw. Nullwert-bereinigter arithmetischer Mittelwert von Ansatz 1 und Ansatz 2

**Abb.3: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min)**

Hinsichtlich der Nachweisbarkeit sehr geringer Restaktivitäten mittels des Esterase-Tests sei bei den Ergebnissen dieser Versuchsreihe festgehalten, dass ein gewisser Teil des enzymatisch freigesetzten Naphthols und Indoxyls mit Inhaltsstoffen des jeweiligen Probenextraktes auch unspezifisch reagieren kann. Bei den diese Arbeit abschließenden Grenzwert-Empfehlungen (siehe *7 Studien an Putenfleisch-Produkten des Handels und Empfehlung von Grenzwerten als Indikatoren einer ausreichenden Pasteurisation*) ist diesem Umstand Rechnung getragen.

Aus dem Dargestellten folgt:

Ein Anheben der Inkubationstemperatur auf  $> 25^{\circ}\text{C}$  führt bei jeden der drei Substrate zu einer Beschleunigung der enzymatischen Reaktion. Eine Verkürzung des Bestimmungsverfahrens durch eine Erhöhung der beim referierten Testverfahren empfohlenen Inkubationstemperatur ist aufgrund der Thermolabilität vor allem von NA und IA nicht möglich.

## 2.2 Einfluss des Puffer-pH-Wertes

Zur Frage steht, ob sich das bei den Erzeugnissen aus Fleisch von Schwein und Rind bewährte pH 6,6 des höher molaren Citrat-Phosphat-Puffers auch bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch eignet oder ob sich für die Gewinnung des Probenextraktes oder für die Gestaltung der reaktionskinetischen Bedingungen der Esterase-Bestimmung Abänderungen gebieten oder empfehlen. Zudem soll festgestellt werden, wie sich das Probengut beim Extraktionsverhältnis von 1:4 bei den Ansätzen mit NB und IA und 1:11 bei NA auf das pH der Probenextrakte auswirkt.

Eine Prüfung auch des Einflusses der Puffermolarität auf die Extrahierbarkeit insbesondere auch von etwa okkludierter Carbesterase ist verzichtbar, da sich die Erzeugnisse aus Putenfleisch von denjenigen aus Rind- und Schweinefleisch diesbezüglich weder biochemisch noch technologisch wesentlich unterscheiden.

Die Studien dieser Versuchsreihe werden an Brustmuskel, Fettgewebe und Leber durchgeführt.

### 2.2.1 Probengut und Pufferbereitung

Die Besonderheiten des Probengutes sowie dessen Aufbereitung für die genannten Recherchen sind unter *1.1 Material und Methoden* dargelegt. Für die Herstellung des Citrat-Phosphat-Puffers in Chargen von pH 5,8 bis 9,0 werden ca. 900 ml destilliertes Wasser in einen 1 l-Messkolben gegeben und hierin 21,04 g Citronensäure-Monohydrat und 35,5 g di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat in Lösung gebracht. Nach Einstellen der pH-Werte mit 6 N NaOH auf 5,8 bis 9,0 in Intervallen von jeweils 0,4 Einheiten wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

### 2.2.2 Ergebnisse und deren Besprechung

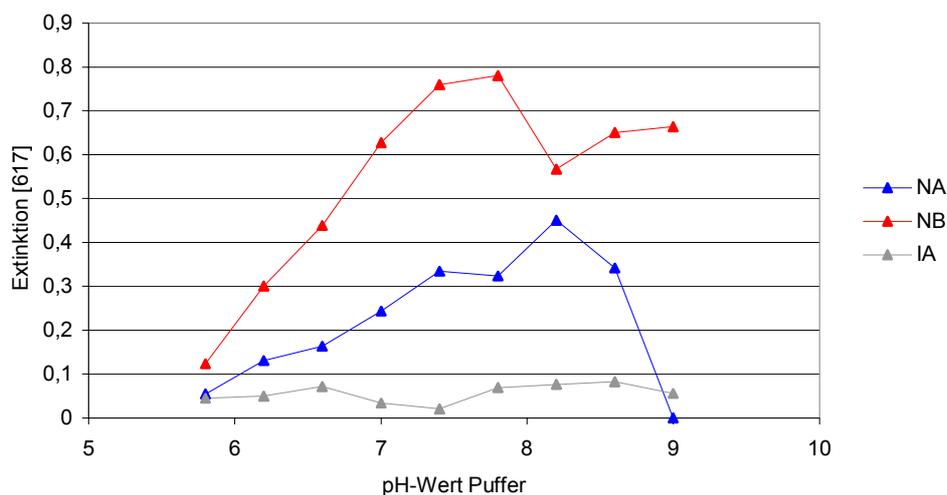
Die Einflüsse des pH-Wertes des Citrat-Phosphat-Puffers sowie des Extraktionsverhältnisses zwischen Probeneinwaage und Puffervolumen auf das pH der Probenextrakte und auf die Hydrolyserate der Esterase bei Brustmuskel, Fettgewebe und Leber der Pute nach 5 min langem Einwirken von 80°C sind aus den Tabellen 5 bis 7 und Abbildungen 4 bis 6 zu ersehen.

**Tab. 5: Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf das pH des Probenextraktes und die Kinetik der Esterase bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min)**

pH Puffer	pH Probenextrakt 1:4 1:11	Extinktion [ $E_{617}$ ]								
		NA			NB			IA		
		N B	A1 A2	E	N B	A1 A2	E	N B	A1 A2	E
5,8	5,9	0,060	0,136	0,055	0,104	0,225	0,123	0,053	0,101	0,045
	5,4	0,082	0,138		0,101	0,230		0,058	0,105	
6,2	6,2	0,068	0,233	0,131	0,144	0,451	0,300	0,084	0,135	0,050
	6,2	0,104	0,237		0,124	0,437		0,062	0,133	
6,6	6,6 <sup>a)</sup>	0,085	0,272	0,164	0,208	0,641	0,438	0,070	0,143	0,072
	6,6 <sup>b)</sup>	0,121	0,299		0,158	0,651		0,060	0,142	
7,0	6,9	0,110	0,389	0,240	0,249	0,878	0,630	0,129	0,165	0,030
	7,0	0,120	0,337		0,180	0,876		0,058	0,161	
7,4	7,2	0,141	0,453	0,334	0,266	1,028	0,759	0,155	0,176	0,021
	7,3	0,138	0,498		0,199	1,023		0,060	0,176	
7,8	7,4	0,200	0,550	0,323	0,348	1,123	0,780	0,158	0,232	0,069
	7,6	0,146	0,497		0,192	1,133		0,059	0,225	
8,2	7,4	0,332	0,836	0,451	0,295	0,852	0,567	0,142	0,220	0,076
	7,8	0,195	0,730		0,254	0,900		0,082	0,216	
8,6	7,5	0,520	0,879	0,341	0,322	1,000	0,650	0,139	0,227	0,082
	7,8	0,210	0,844		0,261	0,964		0,080	0,215	
9	7,5	0,862	0,888	0	0,378	1,028	0,664	0,155	0,223	0,056
	8,0	0,226	0,826		0,269	1,056		0,083	0,200	

Erklärungen: N = Nullwert; B = Blindwert; A1, A2 = Ansatz 1 und 2; E = Endwert als Blindwert-bereinigter arithmetischer Mittelwert von A1 und A2

a) bzw. b) pH des Blindwertes nach Ethanolzugabe 7,4 bzw. 7,6



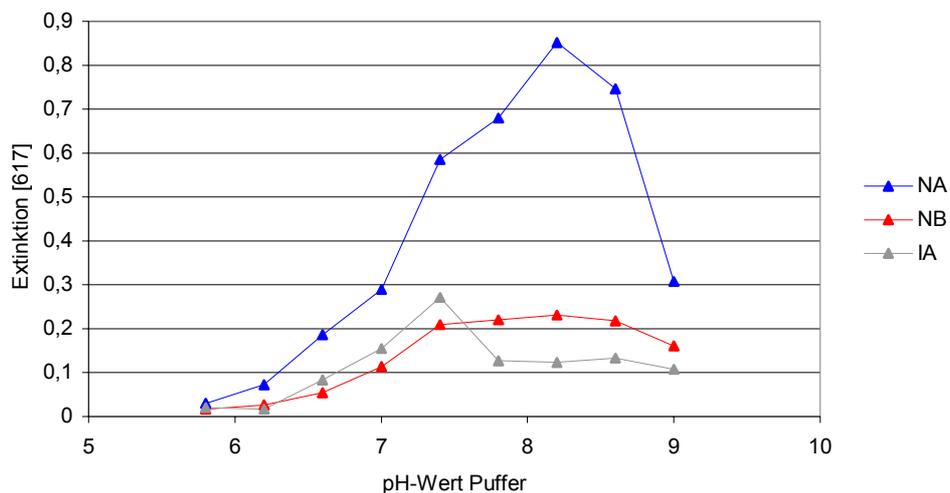
**Abb. 4: Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min)**

**Tab. 6: Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf das pH des Probenextraktes und die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min)**

pH Puffer	pH Probenextrakt 1:4 1:11	Extinktion [ $E_{617}$ ]								
		NA			NB			IA		
		N B	A1 A2	E	N B	A1 A2	E	N B	A1 A2	E
5,8	5,9	0,057	0,093	0,030	0,102	0,139	0,017	0,051	0,073	0,020
	5,8	0,062	0,091		0,122	0,140		0,052	0,072	
6,2	6,2	0,067	0,141	0,073	0,144	0,177	0,027	0,076	0,093	0,017
	6,2	0,070	0,145		0,150	0,178		0,051	0,094	
6,6	6,6 <sup>a)</sup>	0,083	0,281	0,186	0,193	0,257	0,055	0,066	0,146	0,083
	6,6 <sup>b)</sup>	0,094	0,280		0,202	0,258		0,051	0,153	
7,0	7,0	0,107	0,389	0,290	0,240	0,356	0,110	0,118	0,282	0,160
	7,0	0,107	0,406		0,241	0,355		0,052	0,265	
7,4	7,0	0,145	0,725	0,585	0,143	0,430	0,209	0,074	0,350	0,271
	7,3	0,121	0,735		0,217	0,422		0,052	0,340	
7,8	7,1	0,191	0,872	0,680	0,288	0,503	0,220	0,138	0,262	0,127
	7,5	0,130	0,870		0,239	0,513		0,052	0,269	
8,2	7,2	0,293	1,145	0,852	0,306	0,533	0,231	0,148	0,273	0,124
	7,6	0,188	1,145		0,251	0,541		0,052	0,271	
8,6	7,2	0,473	1,211	0,746	0,338	0,557	0,218	0,149	0,282	0,133
	7,7	0,144	1,228		0,248	0,555		0,052	0,282	
9	7,2	0,869	1,203	0,308	0,388	0,552	0,161	0,201	0,307	0,108
	7,7	0,199	1,152		0,312	0,546		0,052	0,311	

Erklärungen: N = Nullwert; B = Blindwert; A1, A2 = Ansatz 1 und 2; E = Endwert als Blindwert-bereinigter arithmetischer Mittelwert von A1 und A2

a) bzw. b) pH des Blindwertes nach Ethanolzugabe 7,4 bzw. 7,6



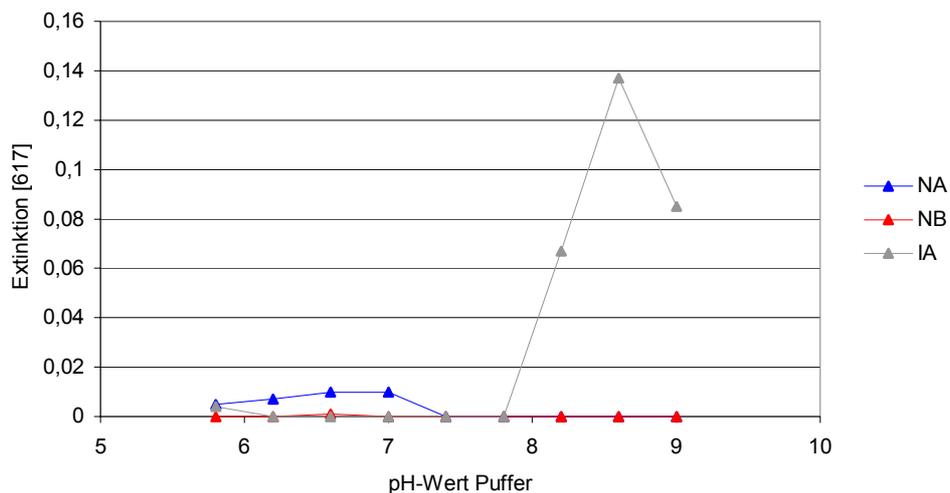
**Abb. 5: Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min)**

**Tab. 7: Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf das pH des Probenextraktes und die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min)**

pH Puffer	pH Probenextrakt 1:4 1:11	Extinktion [ $E_{617}$ ]								
		NA			NB			IA		
		N B	A1 A2	E	N B	A1 A2	E	N B	A1 A2	E
5,8	5,8	0,057	0,066	0,005	0,102	0,102	0,000	0,051	0,054	0,004
	5,8	0,060	0,064		0,106	0,104		0,051	0,056	
6,2	6,2	0,064	0,077	0,007	0,145	0,147	0,000	0,086	0,072	0,000
	6,2	0,068	0,074		0,150	0,148		0,053	0,074	
6,6	6,6 <sup>a)</sup>	0,078	0,088	0,010	0,207	0,226	0,001	0,072	0,068	0,000
	6,6 <sup>b)</sup>	0,076	0,089		0,225	0,226		0,052	0,068	
7,0	7,0	0,102	0,117	0,010	0,248	0,263	0,000	0,132	0,117	0,000
	7,0	0,103	0,109		0,267	0,267		0,058	0,117	
7,4	7,3	0,149	0,128	0,000	0,268	0,278	0,000	0,157	0,146	0,000
	7,4	0,120	0,128		0,288	0,281		0,055	0,150	
7,8	7,6	0,185	0,143	0,000	0,288	0,287	0,000	0,145	0,103	0,000
	7,7	0,141	0,142		0,306	0,278		0,061	0,114	
8,2	7,8	0,307	0,205	0,000	0,303	0,306	0,000	0,140	0,203	0,067
	8,0	0,133	0,205		0,335	0,305		0,064	0,210	
8,6	8,0	0,501	0,234	0,000	0,334	0,329	0,000	0,144	0,281	0,137
	8,2	0,171	0,238		0,340	0,332		0,060	0,281	
9	8,0	0,832	0,440	0,000	0,389	0,346	0,000	0,146	0,232	0,085
	8,3	0,144	0,450		0,345	0,330		0,060	0,230	

Erklärungen: N = Nullwert; B = Blindwert; A1, A2 = Ansatz 1 und 2; E = Endwert als Blindwert-bereinigter arithmetischer Mittelwert von A1 und A2

a) bzw. b) pH des Blindwertes nach Ethanolzugabe 7,4 bzw. 7,6



**Abb. 6: Einfluss von Puffer-pH und Extraktionsverhältnis auf die Kinetik der Esterase bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min)**

Die in den Tabellen 5 bis 7 und den Abbildungen 4 bis 6 zusammengestellten Ergebnisse führen zu folgenden Feststellungen:

Bei den NA- und NB-Ansätzen der Leber (Tab. 5; Abb. 4) nimmt die Kinetik der Esterase-Restaktivität bis zu einem Puffer-pH von 8,2 bzw. 7,8 kontinuierlich zu, bei einer weiteren pH-Erhöhung ab. Bei NB nehmen die Extinktionen in wesentlich geringerem Maße ab als bei NA. Bei den Ansätzen mit IA wirkt sich deren pH auf die enzymatische Hydrolyse des Substrates kaum aus. Inwieweit die Feststellungen bei NA und NB auf eine pH-bedingte Veränderung des Löslichkeitsproduktes der Substrate oder die katalytische Wirkung des Enzyms zurückzuführen ist, kann dahingestellt bleiben.

Bei der Brustmuskulatur (Tab. 6; Abb. 5) besteht bei den Ansätzen mit NA und NB bis zu einem Puffer-pH von 8,2 eine sehr ähnliche Situation wie bei der Leber. Bei den IA-Ansätzen besteht das reaktionskinetische Optimum bei einem Puffer-pH von 7,4.

Beim Fettgewebe resultiert nach einem 5 min langen Einwirken von 80°C nur noch eine sehr schwache und mit Ausnahme der IA-Ansätze von pH 8,2 bis 9,0 lediglich bei den NA-Ansätzen von pH 5,8 bis 7,4 soeben noch nachweisbare Esterase-Restaktivität. Bei den IA-Ansätzen resultiert bei pH 5,8 eine faktisch negative, bei pH 6,2 bis 7,8 negative und pH 8,2 bis 9 sehr ausgeprägte Reaktion mit einem sehr hohen Maximum bei pH 8,6.

Hervorgehoben sei zudem, dass der N/B-Quotient aus „Extinktion des Nullwertes:Extinktion des Blindwertes“ bei den NB-Ansätzen der Leber generell  $> 1$  ist, bei der Brustmuskulatur und dem Fettgewebe dagegen erst von pH 7,4 bzw. 9 an. Dies könnte insofern von Bedeutung sein, als ein N/B-Quotient  $< 1$  möglicherweise auch dadurch bedingt sein könnte, dass in einem Extrakt mit einem sehr hohen Gehalt an Inhaltsstoffen des Probengutes in Lösung gegangenes Substrat und möglicherweise auch dessen Spaltprodukte in einem größeren Maße von den Extraktstoffen gebunden und dadurch der enzymatischen Hydrolyse bzw. der Reaktion zum Ergebnis bestimmenden Farbkomplex entzogen wird. Mit NA und IA ist der N/B-Quotient sowohl bei der Leber, als auch bei der Brustmuskulatur und dem Fettgewebe generell  $> 1$ .

Aus dem Dargestellten folgt:

Ein gezieltes Anheben des pH-Wertes des Puffers kann bei allen drei Substraten eine Beschleunigung der katalytischen Reaktion bewirken. Da jedoch mit Anhebung des Puffer-pH-Wertes die Autohydrolyse der Substrate sehr stark zunimmt, empfiehlt sich die Beibehaltung des referierten Puffer-pH 6,6.

## **2.3 Einfluss der Substratkonzentration und Inkubationsdauer**

Zu prüfen steht die Frage, ob die Substrate NA, NB und IA bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch in derselben Konzentration zur Anwendung gelangen können, wie beim referierten Testverfahren für Erzeugnisse aus Fleisch von Schwein und Rind.

### **2.3.1 Material und Methodik**

Probengut und Probenaufbereitung entsprechen den Angaben unter Ziffer 1.1 *Material und Methoden*. Jeweils 240 g Homogenisat von Leber, Brustmuskel und Fettgewebe der Pute wird in Einzelportionen von 30 g im Folienbeutel so erhitzt, dass 80°C im gesamten Probengut exakt 5 min lang wirksam sind. Anschließend werden die Portionen in Eiswasser raschestens gekühlt und durch sorgfältiges Vermischen mit dem Spatel zur Probe vereint. Für die Gewinnung der Extrakte für die Ansätze mit NA werden 30 g Probe in 330 ml Puffer und für die Ansätze mit NB und IA 80 g Probe in 320 ml Puffer dispergiert und filtriert. Für die Bestimmung des Einflusses der Substratkonzentration auf die Hydrolyserate der Esterase-Restaktivität werden die Substrate jeweils in einer Menge zugegeben, die dem 0,05-, 0,25-, 0,50-, 2- und 3-fachen der Substratkonzentration des referierten Testverfahrens entspricht. Um festzustellen, welche Inkubationsdauer sich für die Bestimmung derjenigen Esterase-Restaktivität empfiehlt, die signifikant für eine hinreichende Inaktivierung der vegetativen Mikroflora ist, wird geprüft, welche Extinktion bei den NA-Ansätzen nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min und bei den NB- und IA-Ansätzen nach 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min resultiert.

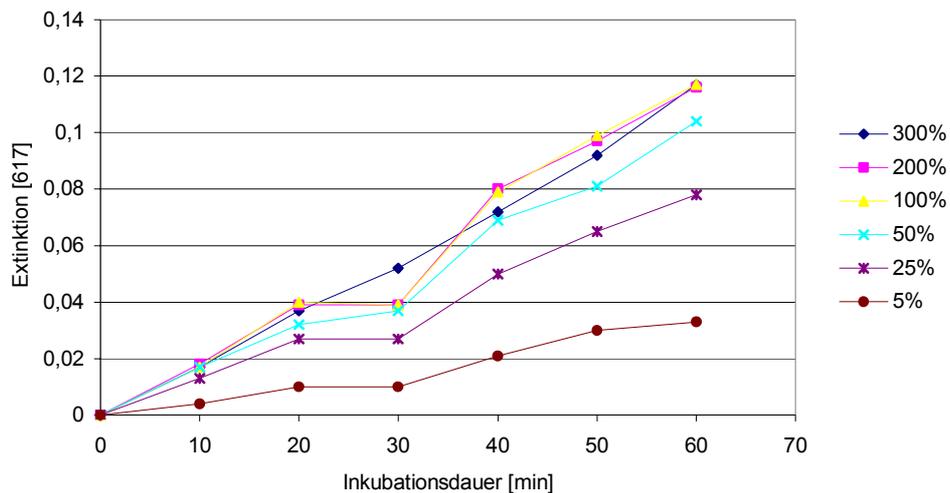
### **2.3.2 Ergebnisse und deren Besprechung**

Der Einfluss von Substratkonzentration und Inkubationsdauer auf die bei Leber, Brustmuskel und Fettgewebe nach 5 min langem Pasteurisieren bei 80°C unter den methodischen Bedingungen des Esterase-Tests bestehende Restaktivität des Leitenzyms ist aus den Tabellen 8 bis 10 und den Abbildungen 7 bis 15 ersichtlich.

**Tab. 8: Einfluss der Substratkonzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min)**

Substrat	Inkubationszeit [min]	Extinktion [ $E_{617}$ ] bei Substratkonzentration [%] <sup>1)</sup>					
		300	200	100	50	25	5
NA	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	10	0,017	0,018	0,017	0,017	0,013	0,004
	20	0,037	0,039	0,040	0,032	0,027	0,010
	30	0,052	0,039	0,039	0,037	0,027	0,010
	40	0,072	0,080	0,079	0,096	0,050	0,020
	50	0,092	0,097	0,099	0,081	0,065	0,030
	60	0,117	0,116	0,117	0,104	0,078	0,033
NB	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	30	0,000	0,000	0,058	0,047	0,040	0,024
	60	0,000	0,000	0,163	0,091	0,085	0,053
	90	0,000	0,000	0,219	0,148	0,134	0,063
	120	0,000	0,000	0,278	0,264	0,150	0,083
	150	0,000	0,013	0,317	0,302	0,250	0,086
	180	0,000	0,000	0,319	0,301	0,260	0,084
IA	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	30	0,017	0,021	0,013	0,015	0,010	0,003
	60	0,057	0,062	0,023	0,034	0,024	0,004
	90	0,088	0,089	0,071	0,060	0,047	0,010
	120	0,098	0,086	0,067	0,077	0,041	0,008
	150	0,093	0,099	0,075	0,065	0,053	0,010
	180	0,093	0,104	0,079	0,081	0,059	0,008

<sup>1)</sup> Bezogen auf die Substratkonzentration beim referierten Testverfahren

**Abb. 7: Einfluss der NA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min)**

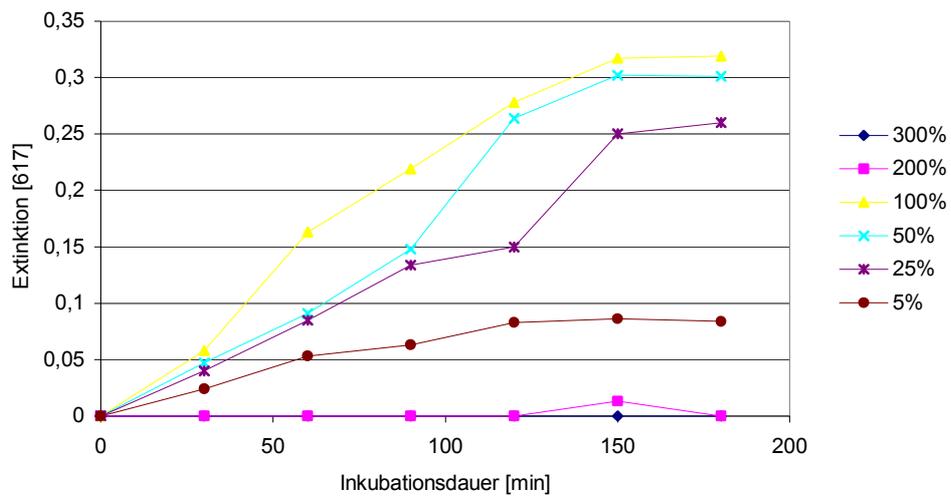


Abb. 8: Einfluss der NB-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min)

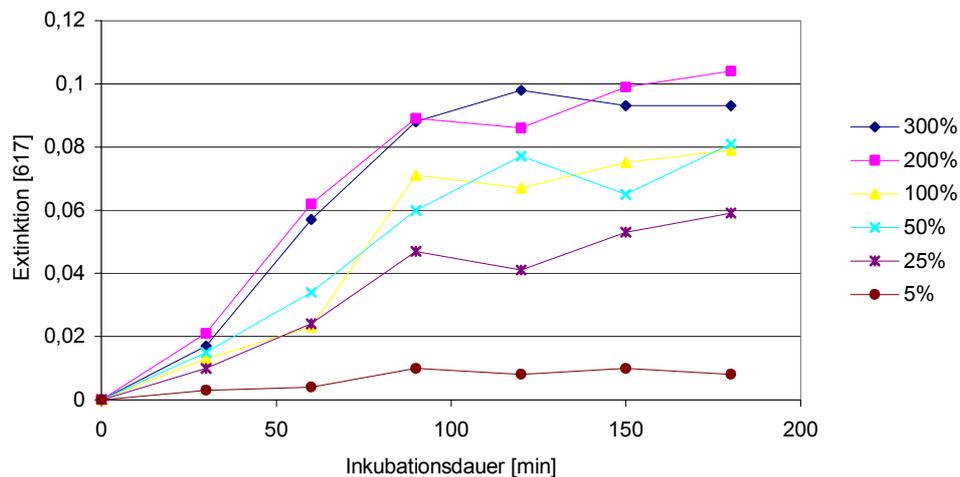
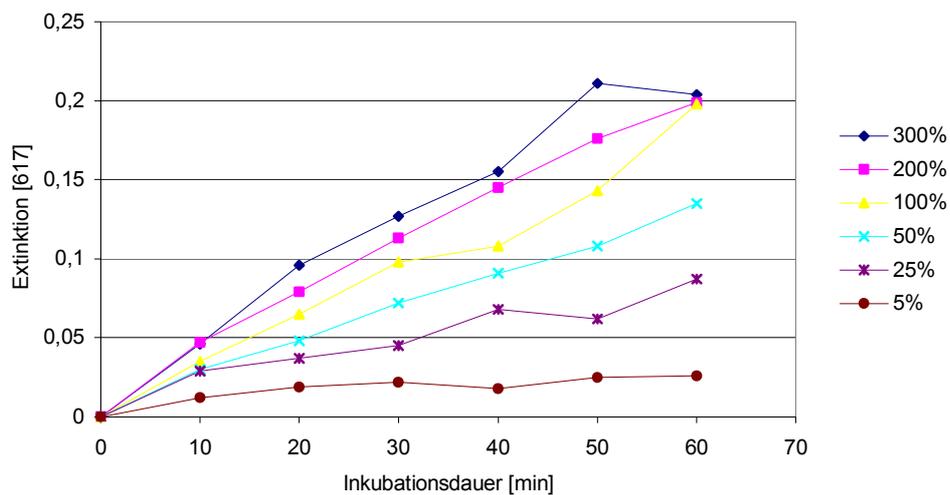


Abb. 9: Einfluss der IA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisierter Leber (80°C/5 min)

**Tab. 9: Einfluss der Substratkonzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min)**

	Inkubationszeit [min]	Extinktion [ $E_{617}$ ] bei Substratkonzentration [%] <sup>1)</sup>					
		300	200	100	50	25	5
NA	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	10	0,046	0,047	0,035	0,030	0,029	0,012
	20	0,096	0,079	0,065	0,048	0,037	0,019
	30	0,127	0,113	0,098	0,072	0,045	0,022
	40	0,155	0,145	0,108	0,091	0,068	0,018
	50	0,211	0,176	0,143	0,108	0,062	0,025
	60	0,204	0,199	0,198	0,135	0,087	0,026
NB	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	30	0,000	0,000	0,000	0,008	0,008	0,001
	60	0,000	0,000	0,007	0,018	0,019	0,000
	90	0,008	0,033	0,027	0,047	0,046	0,012
	120	0,000	0,043	0,050	0,047	0,037	0,012
	150	0,023	0,035	0,068	0,066	0,049	0,018
	180	0,006	0,04	0,080	0,071	0,059	0,018
IA	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	30	0,030	0,013	0,006	0,002	0,001	0,002
	60	0,058	0,046	0,021	0,004	0,002	0,002
	90	0,172	0,078	0,041	0,015	0,006	0,006
	120	0,209	0,118	0,083	0,033	0,009	0,001
	150	0,179	0,152	0,084	0,049	0,020	0,003
	180	0,275	0,170	0,114	0,062	0,025	0,002

<sup>1)</sup> Bezogen auf die Substratkonzentration beim referierten Testverfahren

**Abb. 10: Einfluss der NA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min)**

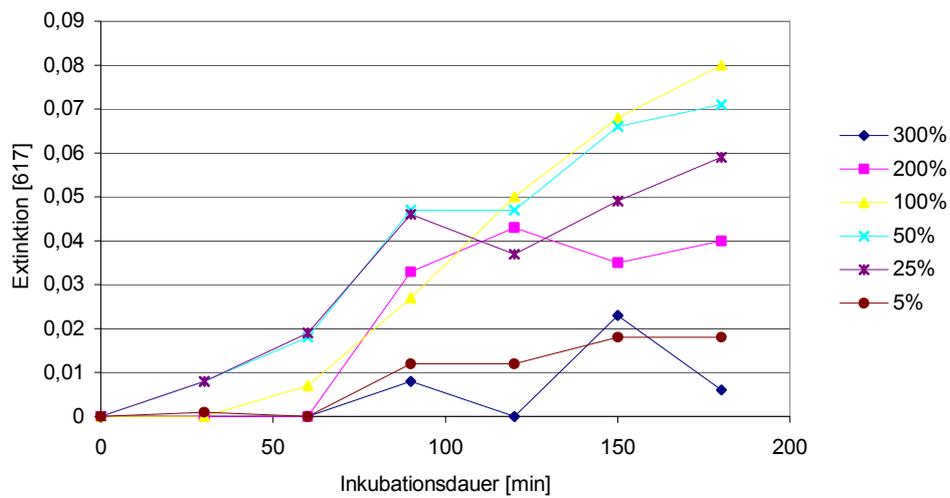


Abb. 11: Einfluss der NB-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min)

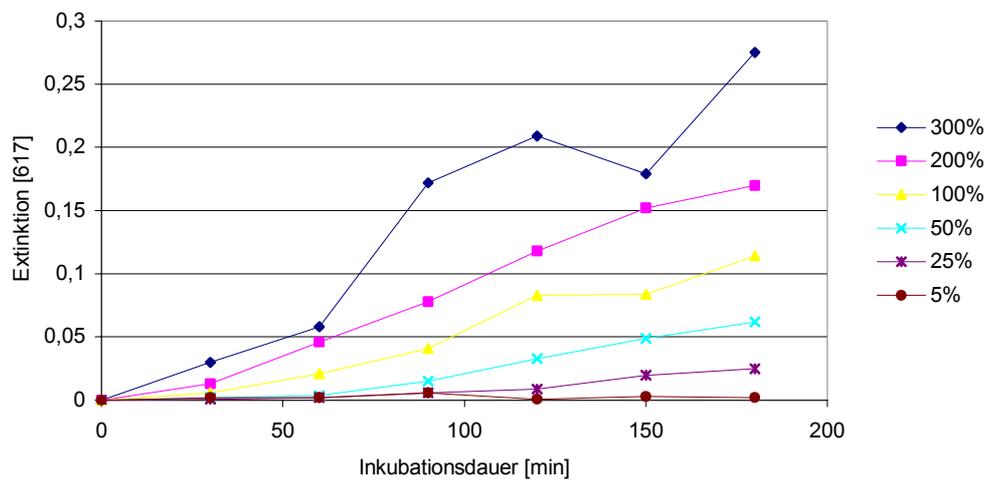
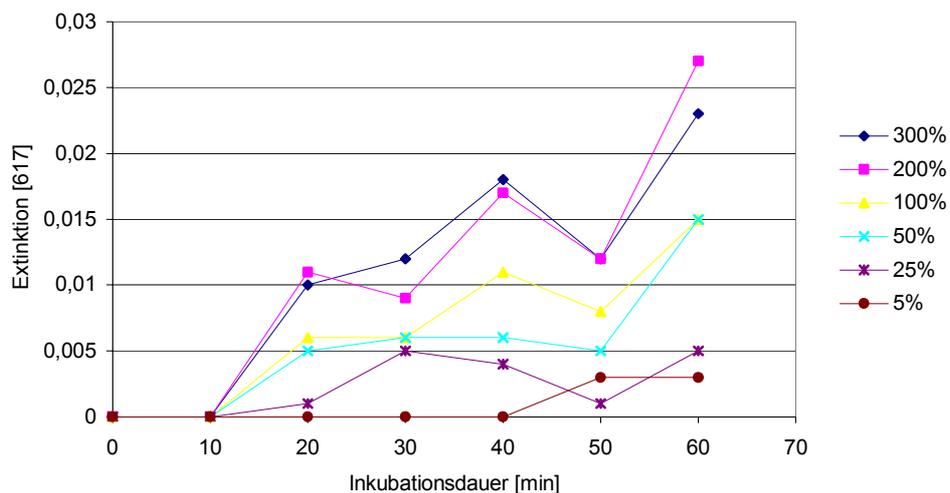


Abb. 12: Einfluss der IA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Brustmuskel (80°C/5 min)

**Tab. 10: Einfluss der Substratkonzentration auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min)**

	Inkubationszeit [min]	Extinktion [ $E_{617}$ ] bei Substratkonzentration [%] <sup>1)</sup>					
		300	200	100	50	25	5
NA	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	20	0,010	0,011	0,006	0,005	0,001	0,000
	30	0,012	0,009	0,006	0,006	0,005	0,000
	40	0,018	0,017	0,011	0,006	0,004	0,000
	50	0,012	0,012	0,008	0,005	0,001	0,003
	60	0,023	0,027	0,015	0,015	0,005	0,003
NB	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	60	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	120	0,010	0,000	0,008	0,000	0,001	0,000
	150	0,020	0,007	0,003	0,003	0,000	0,000
	180	0,018	0,009	0,007	0,001	0,000	0,000
IA	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	90	0,035	0,036	0,012	0,000	0,000	0,000
	120	0,028	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000
	150	0,036	0,024	0,000	0,000	0,000	0,000
	180	0,052	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000

<sup>1)</sup> Bezogen auf die Substratkonzentration beim referierten Testverfahren

**Abb. 13: Einfluss der NA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min)**

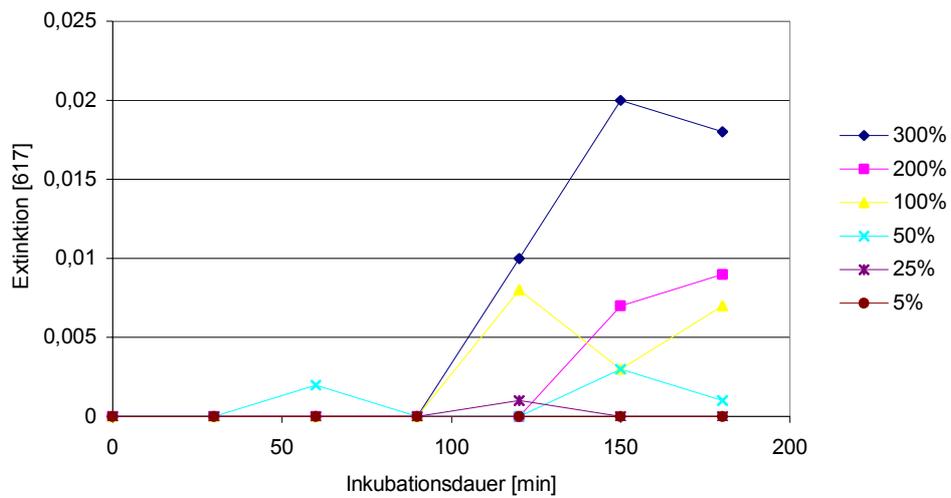


Abb. 14: Einfluss der NB-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min)

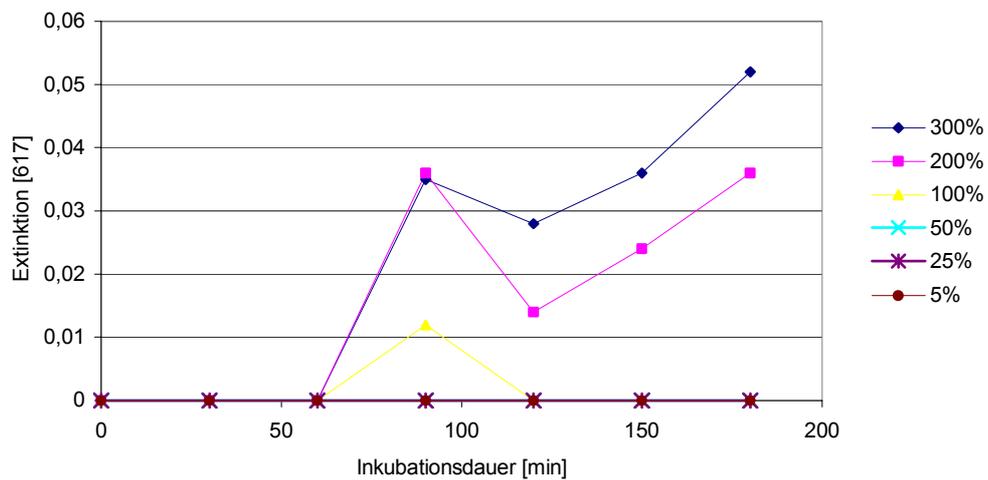


Abb. 15: Einfluss der IA-Konzentration und Inkubationsdauer auf die Kinetik der Esterase-Restaktivität bei pasteurisiertem Fettgewebe (80°C/5 min)

Beim Probengut Leber (Tab. 8; Abb. 7 - 9) ergeben sich bei den Ansätzen mit **NA** die höchsten Hydrolyseraten bei den Substratkonzentrationen 50 bis 300%. Mit zunehmender Inkubationsdauer nimmt die Substrathydrolyse bei allen Substratkonzentrationen offensichtlich linear und bei den Konzentrationen 100, 200 und 300% kongruent zu. Mit **NB** bestehen die höchsten Hydrolyseraten bei den Substratkonzentrationen bei 25 bis 100%, die höchste bei 100%. Bei den Konzentrationen 200% und 300% kommt es offensichtlich zu einer so weitgehenden Substrathemmung, dass NB unter den Bedingungen des Esterase-Tests nicht mehr nachweislich hydrolysiert wird. Bei **IA** resultieren die höchsten Hydrolyseraten bei den Substratkonzentrationen 100, 200 und 300%. Bei allen Substratkonzentrationen nimmt die Hydrolyserate in den ersten 90 min der Inkubation proportional zu, danach vermutlich in Folge von Produkthemmung ab. Die Hydrolyserate bei der Substratkonzentration von 200% ist mit derjenigen von 300% faktisch identisch.

Beim Brustmuskel (Tab. 9; Abb. 10 - 12) ergeben sich mit **NA** bei den Substratkonzentrationen 100, 200 und 300% faktisch identische Hydrolyseraten. Die Extinktionen nehmen bei allen Substratkonzentrationen proportional zur Inkubationsdauer zu. Bei **NB** bestehen die höchsten Hydrolyseraten bei den Substratkonzentrationen 25, 50 und 100%. Die Hydrolyseprodukte nehmen – wenn von den methodisch bedingten Unschärfen abgesehen wird – bei allen Substratkonzentrationen zeitproportional zu. Dass die Hydrolyseraten bei den Substratkonzentrationen 200 und 300% niedriger sind als bei 25%, dürfte auf eine Substrathemmung zurückzuführen sein. Bei **IA** resultiert die höchste Hydrolyserate bei der Substratkonzentration 300%. Dass sie mehr als das Doppelte der Hydrolyserate der Konzentration 100% beträgt, dürfte nach aller Erfahrung auch in anderen Versuchsreihen dieser Arbeit darauf zurückzuführen sein, dass das in alkoholischer Lösung zugegebene, in Wasser sehr schlecht lösliche IA in den Ansätzen trotz sofortigen Schüttelns mit dem Vortex-Rüttler nicht dispers genug verteilt wird oder in der erzielten Dispersität nicht lange genug verteilt bleibt. Angesichts dieser Problematik sollten die Ansätze auch während der Inkubation durch intermittierendes Schütteln in guter Vermischung gehalten werden.

In der Versuchsreihe mit Fettgewebe (Tab. 10; Abb. 13 - 15) liegt die Hydrolyserate bei den **NA-Ansätzen** bei den Substratkonzentrationen von 200 und 300% am höchsten, bei 100% und auch bei 50% jedoch nicht wesentlich niedriger. Dass die Substrathydrolyse bei diesem Probengut besonders unstet zu erfolgen scheint, ist angesichts der minimalen Restaktivität und der deshalb extremen Auswirkung geringster Methodenfehler erklärlich. Um wie viel mehr sich durch die geringe Löslichkeit von NB und IA bedingte Methodenfehler bei sehr geringen Restaktivitäten auswirken können, wird auf Grund des geringen Gehaltes an Substratdispersität stabilisierendem Protein schon gleich bei den Extrakten aus dem Fettgewebe

ersichtlich. Bei den **NB-Ansätzen** zeichnen sich die höchsten Hydrolyseraten zwar bei 300% und bei den **IA-Ansätzen** bei 300 und 200% ab, es bestehen jedoch keine Zweifel, dass sich bei einem mehrmaligen intensiveren Schütteln der Ansätze während der Inkubation auch die Substratkonzentration 100% als sättigend erweist.

So sehr sich die dargelegte Erklärung aus den Erfahrungen an den verschiedenen Probenarten aufdrängt, so wenig soll aber als Ursache des abnormen Hydrolyseverlaufs bei den NB- und NA-Ansätzen die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Esterase-Isozymen des Fettgewebes im Gegensatz zu den Isozymen von Leber und Brustmuskulatur um allosterische sive sigmoide Enzyme handelt. Der auch bei NA irreguläre Hydrolyseverlauf wäre in diesem Fall dadurch bedingt, dass die geprüften Substrate als positive Modulatoren fungieren und so als molekulares Signal die Kinetik des Enzyms steigern.

Aus dem Dargestellten folgt:

Die Substratkonzentrationen des referierten Testverfahrens können beigehalten werden. Um bei den IA-Ansätzen eine optimale Dispersität zu gewährleisten, müssen diese auch während der Inkubation durch ein häufiger wiederholtes Schütteln in ausreichender Vermischung gehalten werden.

## 2.4 Einfluss der unspezifischen Reaktion der enzymatischen Hydrolyseprodukte mit Inhaltsstoffen der Probenextrakte

In den Versuchsreihen 2.1 *Einfluss der Inkubationstemperatur* und 2.2 *Einfluss des Puffer-pH-Wertes* zeigt sich, dass durch Esterase freigesetztes Naphthol und Indoxyl der photometrischen Quantifizierung durch Reaktion mit Extraktkomponenten aus dem Probenmaterial bis zu einem gewissen Teil entgehen kann. Um festzustellen, inwieweit sich hierdurch die als Esterase-Restaktivität resultierende Extinktion [ $E_{617}$ ] verringern kann, werden mit Naphthol – stellvertretend auch für Indoxyl – in reinem Puffer sowie in verschiedenen Extrakten Eichgeraden erstellt. Desgleichen wird geprüft, ob und in wie weit womöglich auch der aus Naphthol und Indoxyl entstehende Farbkomplex mit Inhaltsstoffen des Probenextraktes reagieren und dadurch der photometrischen Erfassung ebenfalls verloren gehen kann.

### 2.4.1 Versuchsanordnung, Material und Methodik

Die Kontrollen auf unspezifische Reaktion von Naphthol und Indigo mit Inhaltsstoffen des Probengutes erfolgen an den Probenextrakten aus den Homogenisaten von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe der Pute, die nach Frostlagerung gemäß 1 *Material und Methoden* bei  $F_{80} = 5$  erhitzt werden, sowie an den Extrakten aus Putenfleisch gefertigter Kochpökelfwaren, Brühwurst und Leberwurst des Handels. Bei den von Lebensmittelgeschäften in Freising und Umgebung bezogenen Handelsprodukten handelt es sich bei den Brühwürsten um Putenwiener (BW 1), Puten-Schinkenwurst (BW 2), Puten-Bierschinken (BW 3), Putendebreziner (BW 4), Putenwiener (BW 5), bei den Leberwürsten (LW 1 bis LW5) um Gourmet-Leberwurst und bei den Kochpökelfwaren um „Putenkochschinken“ (KS 1), „Truthahnbrust natur“ (KS 2), „Truthahnbrust mit Honig“ (KS 3) und um „Putenbrust gepökelt“ (KS 4, KS 5). Der Fleischanteil der Produkte stammt deklarationsgemäß gänzlich von Pute. Die Proben werden bei ca. 4°C transportiert und bis zur Untersuchung max. 3 Tage bei 4 bis 6°C gelagert. Die Extraktion erfolgt gemäß der Methodik des Esterase-Tests, die Prüfung der Parameter in Versuchsreihe A und B.

**Versuchsreihe A:** Bei den Ansätzen mit Naphthol werden 3,5 ml Extrakt jeweils mit 5 ml Ethanol vermischt, in denen 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30 und 40 µg Naphthol gelöst sind. Nach 60 min langer Inkubation der Ansätze bei 25°C und anschließender Zugabe von 100 µl Ethanol mit 0,25 mg DBCC wird bei 617 nm die Extinktion bestimmt.

**Versuchsreihe B:** Parallel zu Versuchsreihe A wird geprüft, ob auch aus Naphthol (N) und DBCC entstandener Azofarbstoff (N-DBCC-Farbkomplex) durch Reaktion mit Komponenten des Probenextraktes der photometrischen Bestimmung entzogen werden. Hierfür werden

1,75 ml aus doppelter Probeneinwaage gewonnener Probenextrakt von Homogenisaten von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe der Pute, die gemäß *1 Material und Methoden* vorab gefrosten und dann 5 min bei 80°C erhitzt werden, mit 1,75 ml Puffer und jeweils 5 ml Ethanol vermischt, denen für die Generierung steigender Mengen von N-DBCC-Farbkomplex bis 40 µg Naphthol und 0,25 mg DBCC zugegeben werden. Nach 60 min langer Inkubation bei 25°C wird der Farbstoffgehalt der Ansätze bei 617 nm photometrisch bestimmt. Diese Versuchsanordnung gebietet sich so nicht nur für die Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Versuchsreihe A und B, sondern vor allem auch deshalb, weil die Reaktion von Naphthol und DBCC zum sichtbaren Farbkomplex in reinem Ethanol nicht erfolgt.

Inwieweit womöglich auch **Indigo** durch Reaktion mit Extraktstoffen aus dem Probengut der photometrischen Bestimmung entgehen kann, wird geprüft, indem den Probenextrakten der Versuchsreihe A mit jeweils 5 ml Methylpyrrolidon mit 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30 und 40 µg Indigo zugesetzt wird.

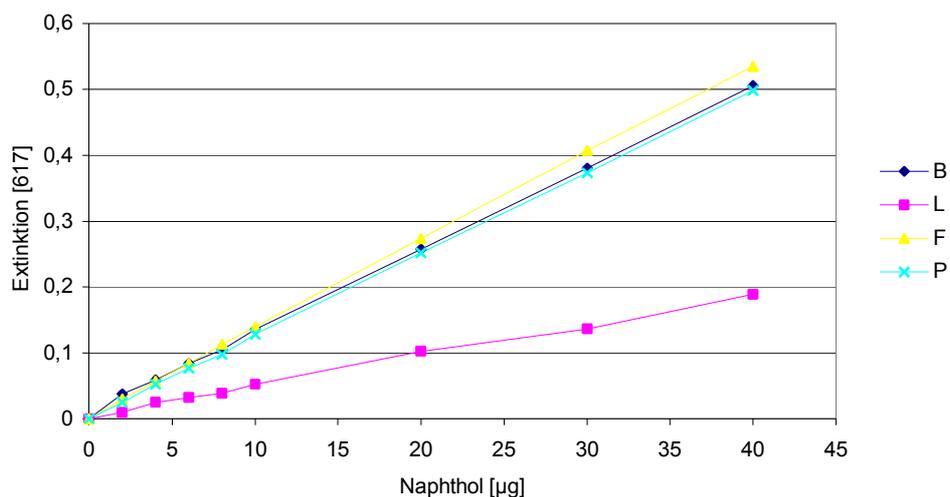
#### **2.4.2 Ergebnisse und deren Besprechung**

Die Ergebnisse der Versuchsreihe A über den potentiellen Einfluss etwaiger Reaktionen von Naphthol und Indigo mit Komponenten des Probenextraktes auf die photometrisch nachweisbare Menge von N-DBCC-Farbkomplex bzw. von Indigo sind in den Tabellen 11 bis 14 und den Abbildungen 16 bis 19 zusammengestellt.

**Tab. 11: Einfluss des Probenextraktes auf die Extinktion des aus Naphthol und DBCC entstehenden N-DBCC-Farbkomplexes aus pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe (Versuchsreihe A)**

	Extinktion [ $E_{617}$ ] des entstehenden N-DBCC-Farbkomplexes								
	Naphthol [ $\mu\text{g}$ ]								
	0	2	4	6	8	10	20	30	40
Puffer 1	0	0,026	0,050	0,076	0,099	0,125	0,248	0,375	0,496
Puffer 2	0	0,024	0,052	0,076	0,090	0,131	0,253	0,353	0,474
Puffer 3	0	0,026	0,055	0,078	0,105	0,13	0,256	0,391	0,524
MW	0	0,025	0,052	0,077	0,098	0,129	0,252	0,373	0,498
Brustmuskel 1	0	0,036	0,056	0,08	0,101	0,132	0,256	0,381	0,506
Brustmuskel 2	0	0,037	0,057	0,081	0,104	0,133	0,256	0,379	0,503
Brustmuskel 3	0	0,041	0,063	0,091	0,11	0,142	0,262	0,381	0,508
MW	0	0,038	0,059	0,084	0,105	0,136	0,258	0,380	0,506
Leber 1	0	0,007	0,018	0,024	0,032	0,035	0,06	0,084	0,134
Leber 2	0	0,007	0,031	0,033	0,045	0,061	0,114	0,158	0,208
Leber 3	0	0,015	0,025	0,04	0,04	0,062	0,133	0,167	0,224
MW	0	0,010	0,025	0,032	0,039	0,053	0,102	0,136	0,189
Fettgewebe 1	0	0,027	0,058	0,086	0,114	0,143	0,273	0,412	0,533
Fettgewebe 2	0	0,036	0,062	0,086	0,116	0,141	0,279	0,413	0,538
Fettgewebe 3	0	0,027	0,053	0,08	0,108	0,135	0,269	0,397	0,532
MW	0	0,030	0,058	0,084	0,113	0,140	0,274	0,407	0,534

Erklärungen: MW = arithmetischer Mittelwert

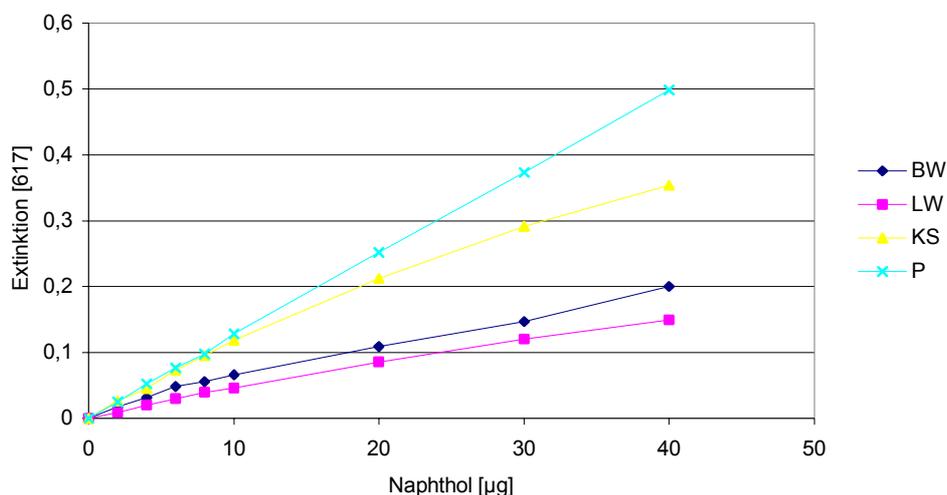


**Abb. 16: Einfluss des Probenextraktes auf die Extinktion des aus Naphthol und DBCC entstehenden N-DBCC-Farbkomplexes bei pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) von Brustmuskel (B), Leber (L) und Fettgewebe (F) (Versuchsreihe A; P = Puffer)**

**Tab. 12: Einfluss des Probenextraktes auf die Extinktion des aus Naphthol mit DBCC entstehenden N-DBCC-Farbkomplexes bei Kochpökelware, Brühwurst und Leberwurst aus Putenfleisch (Versuchsreihe A)**

Probenart <sup>1)</sup>	Extinktion [ $E_{617}$ ] des entstehenden N-DBCC-Farbkomplex								
	Naphthol [ $\mu\text{g}$ ]								
	0	2	4	6	8	10	20	30	40
Kochschinken 1	0	0,020	0,036	0,069	0,096	0,138	0,251	0,354	0,473
Kochschinken 2	0	0,017	0,038	0,069	0,089	0,118	0,202	0,285	0,349
Kochschinken 3	0	0,025	0,042	0,068	0,085	0,108	0,207	0,303	0,376
Kochschinken 4	0	0,037	0,055	0,083	0,095	0,103	0,161	0,215	0,245
Kochschinken 5	0	0,033	0,056	0,080	0,110	0,127	0,240	0,299	0,324
MW	0	0,026	0,045	0,074	0,095	0,119	0,212	0,291	0,353
Brühwurst 1	0	0,013	0,010	0,044	0,041	0,048	0,096	0,143	0,181
Brühwurst 2	0	0,035	0,042	0,059	0,060	0,072	0,102	0,117	0,16
Brühwurst 3	0	0,009	0,040	0,051	0,065	0,080	0,164	0,206	0,311
Brühwurst 4	0	0,015	0,027	0,032	0,051	0,059	0,090	0,165	0,219
Brühwurst 5	0	0,015	0,037	0,058	0,063	0,073	0,095	0,103	0,132
MW	0	0,017	0,031	0,049	0,056	0,066	0,109	0,147	0,201
Leberwurst 1	0	0,002	0,028	0,044	0,057	0,061	0,128	0,177	0,219
Leberwurst 2	0	0,011	0,023	0,023	0,032	0,042	0,064	0,099	0,117
Leberwurst 3	0	0,007	0,016	0,026	0,032	0,037	0,079	0,105	0,148
Leberwurst 4	0	0,014	0,021	0,036	0,052	0,064	0,103	0,149	0,176
Leberwurst 5	0	0,011	0,014	0,020	0,024	0,028	0,056	0,070	0,088
MW	0	0,009	0,020	0,030	0,039	0,046	0,086	0,120	0,150

Erklärungen: <sup>1)</sup> Es handelt sich jeweils um 5 verschiedene Produkte; MW = arithmetischer Mittelwert

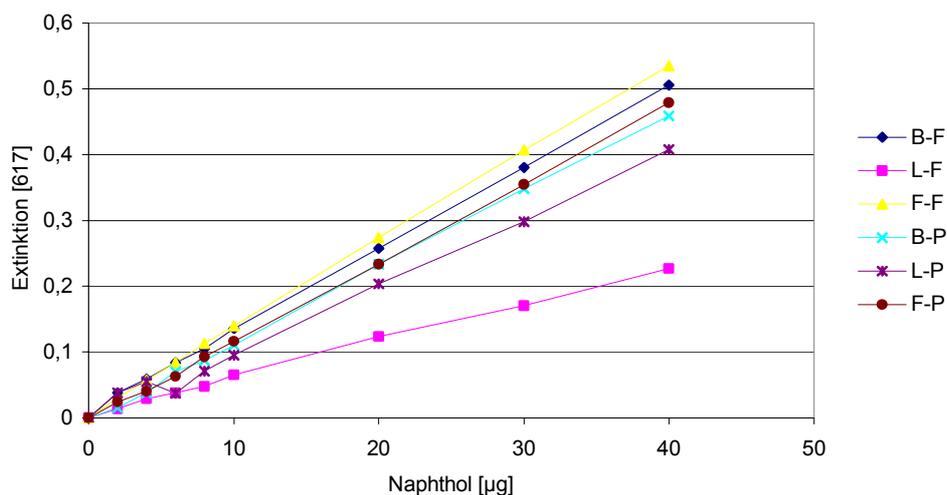


**Abb. 17: Einfluss des Probenextraktes auf die Extinktion des aus Naphthol und DBCC entstehenden N-DBCC-Farbkomplexes bei Kochschinken (KS), Brühwurst (BW) und Leberwurst (LW) (Versuchsreihe A; P = Puffer)**

**Tab. 13: Einfluss des Probenextraktes auf die wiederfindbare Menge von zugesetztem N-DBCC-Farbkomplex bei pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe (Versuchsreihe B)**

Probenart		Extinktion [ $E_{617}$ ] des wiederfindbaren N-DBCC-Farbkomplexes								
		Basismenge Naphthol [ $\mu\text{g}$ ]								
		0	2	4	6	8	10	20	30	40
Brustmuskel 1	Extrakt <sup>1)</sup>	0	0,036	0,056	0,080	0,101	0,132	0,256	0,381	0,506
	Puffer <sup>2)</sup>	0	0,015	0,041	0,064	0,086	0,109	0,211	0,356	0,459
Brustmuskel 2	Extrakt	0	0,037	0,057	0,081	0,104	0,133	0,256	0,379	0,503
	Puffer	0	0,018	0,047	0,078	0,090	0,116	0,245	0,343	0,481
Brustmuskel 3	Extrakt	0	0,041	0,063	0,091	0,110	0,142	0,262	0,381	0,508
	Puffer	0	0,013	0,025	0,069	0,085	0,107	0,243	0,346	0,436
Leber 1	Extrakt	0	0,018	0,031	0,040	0,058	0,073	0,124	0,187	0,248
	Puffer	0	0,067	0,089	- <sup>3)</sup>	0,099	0,123	0,233	0,26	0,345
Leber 2	Extrakt	0	0,007	0,031	0,033	0,045	0,061	0,114	0,158	0,208
	Puffer	0	0,009	0,032	0,055	0,062	0,094	0,210	0,349	0,463
Leber 3	Extrakt	0	0,015	0,025	0,040	0,040	0,062	0,133	0,167	0,224
	Puffer	0	- <sup>3)</sup>	0,044	0,019	0,053	0,069	0,168	0,284	0,415
Fettgewebe 1	Extrakt	0	0,027	0,058	0,086	0,114	0,143	0,273	0,412	0,533
	Puffer	0	0,025	0,037	0,067	0,097	0,121	0,233	0,354	0,472
Fettgewebe 2	Extrakt	0	0,036	0,062	0,086	0,116	0,141	0,279	0,413	0,538
	Puffer	0	0,030	0,039	0,062	0,092	0,116	0,238	0,346	0,465
Fettgewebe 3	Extrakt	0	0,027	0,053	0,080	0,108	0,135	0,269	0,397	0,532
	Puffer	0	0,017	0,044	0,059	0,090	0,112	0,229	0,363	0,499

Erklärungen: <sup>1)</sup> N-DBCC-Farbkomplexbildung in Filtrat; <sup>2)</sup> N-DBCC-Farbkomplexbildung in Puffer; <sup>3)</sup> Technisch bedingtes Fehlresultat

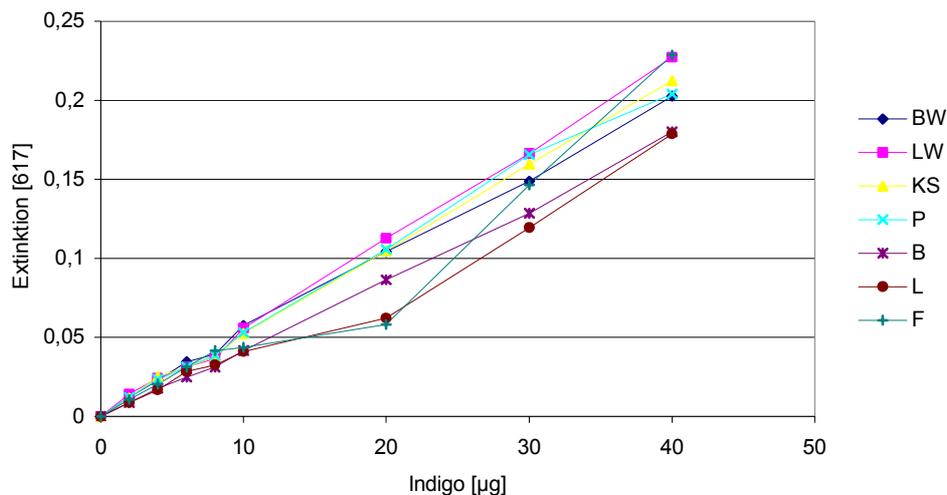


**Abb. 18: Einfluss des Probenextraktes auf die wiederfindbare Menge von zugesetztem N-DBCC-Farbkomplex bei pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) bei Brustmuskel (B), Leber (L) und Fettgewebe (F) (Versuchsreihe B); N-DBCC-Farbkomplexbildung in Filtrat: -F; N-DBCC-Farbkomplexbildung in Puffer: -P**

**Tab. 14: Einfluss des Probenextraktes auf die wiederfindbare Menge von zugesetztem Indigo bei pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe sowie aus Kochpökelware, Brühwurst und Leberwurst**

Probenart	Extinktion [ $E_{617}$ ] des wiederfindbaren Indigo <sup>1)</sup>								
	zugesetzte Menge an Indigo [ $\mu\text{g}$ ]								
	0	2	4	6	8	10	20	30	40
Puffer 1	0	0,009	0,016	0,025	0,030	0,045	0,093	0,154	0,188
Puffer 2	0	0,021	0,024	0,035	0,040	0,055	0,109	0,163	0,205
Puffer 3	0	0,009	0,029	0,031	0,038	0,047	0,110	0,155	0,194
Puffer 4	0	0,012	0,030	0,032	0,041	0,051	0,100	0,180	0,203
Puffer 5	0	0,010	0,019	0,034	0,044	0,068	0,116	0,176	0,230
Brustmuskel 1	0	0,008	0,015	0,029	0,033	0,044	0,088	0,134	0,184
Brustmuskel 2	0	0,010	0,022	0,025	0,032	0,042	0,087	0,133	0,183
Brustmuskel 3	0	0,008	0,017	0,021	0,029	0,039	0,084	0,119	0,173
Leber 1	0	0,004	0,012	0,019	0,024	0,030	0,055	0,106	0,155
Leber 2	0	0,007	0,013	0,021	0,029	0,032	0,061	0,113	0,156
Leber3	0	0,015	0,025	0,046	0,045	0,061	0,071	0,139	0,225
Fettgewebe 1	0	0,009	0,018	0,034	0,046	0,048	0,072	0,157	0,223
Fettgewebe 2	0	0,011	0,024	0,031	0,043	0,043	0,049	0,143	0,208
Fettgewebe 3	0	0,012	0,020	0,029	0,036	0,040	0,054	0,139	0,254
Kochschinken 1	0	0,013	0,030	0,036	0,039	0,050	0,099	0,157	0,204
Kochschinken 2	0	0,010	0,029	0,034	0,042	0,055	0,106	0,163	0,218
Kochschinken 3	0	0,012	0,022	0,031	0,041	0,053	0,105	0,176	0,221
Kochschinken 4	0	0,010	0,020	0,023	0,032	0,049	0,098	0,133	0,189
Kochschinken 5	0	0,014	0,025	0,031	0,036	0,056	0,116	0,169	0,229
Leberwurst 1	0	0,011	0,021	0,032	0,041	0,052	0,101	0,154	0,207
Leberwurst 2	0	0,012	0,021	0,024	0,030	0,049	0,099	0,134	0,193
Leberwurst 3	0	0,013	0,028	0,032	0,039	0,059	0,120	0,172	0,250
Leberwurst 4	0	0,012	0,024	0,034	0,035	0,059	0,117	0,184	0,243
Leberwurst 5	0	0,023	0,027	0,035	0,039	0,061	0,126	0,187	0,243
Brühwurst 1	0	0,014	0,022	0,049	0,041	0,059	0,091	0,154	0,211
Brühwurst 2	0	0,015	0,026	0,028	0,039	0,068	0,112	0,158	0,205
Brühwurst 3	0	0,016	0,027	0,037	0,049	0,067	0,125	0,188	0,255
Brühwurst 4	0	0,006	0,021	0,034	0,033	0,050	0,096	0,123	0,174
Brühwurst 5	0	0,009	0,018	0,025	0,035	0,044	0,098	0,121	0,167

Erklärungen: <sup>1)</sup> Bei den Angaben bei reinem Puffer handelt es sich jeweils um Einzelbestimmungen, bei den Angaben bei den Probenextrakten jeweils um den Mittelwert einer Doppelbestimmung.



**Abb. 19: Einfluss des Probenextraktes auf die wiederfindbare Menge von zugesetztem Indigo bei pasteurisiertem Homogenisat (80°C/5 min) von Brustmuskel (B), Leber (L) und Fettgewebe (F) sowie aus Kochpökelware (KS), Brühwurst (BW) und Leberwurst (LW) (P = Puffer)**

Die in Versuchsreihe A bei Brustmuskel und Fettgewebe resultierenden Extinktionen (Tab. 11; Abb. 16) sind mit denjenigen beim Puffer faktisch identisch, die bei Leber ermittelten Werte liegen hingegen deutlich unter den Vergleichswerten beim Puffer. Die Eichgeraden mit den Extrakten von Kochpökelware, Brühwurst und Leberwurst (Tab. 12; Abb. 17) liegen ausnahmslos unter der Eichgeraden mit Puffer. Die maximalen Extinktionen, die bei den Kochpökelwaren ermittelt werden, betragen ca. 70%, bei den Brühwürsten ca. 40% und bei den Leberwürsten sogar nur ca. 30% der bei den Ansätzen mit Puffer bestehenden Extinktionen. Dass die Extinktionen auch im oberen Bereich der Messreihen von Produkt zu Produkt selbst innerhalb der jeweiligen Probenkategorie um über 100% differieren können, ist durch den in Relation zur geringen Farbstoffkonzentration sehr hohen Methodenfehler begründet.

Wie sich in der Versuchsreihe B zeigt, resultieren aus dem Zusatz von 2 bis 40 µg Naphthol entsprechendem N-DBCC-Farbkomplex bei den Extrakten von pasteurisiertem Brustmuskel und Fettgewebe faktisch ebenso hohe und von  $E_{617} = 0,027$  bis 0,538 linear ansteigende Gehalte an N-DBCC-Farbkomplex wie bei den Ansätzen mit reinem Puffer (Tab. 13; Abb. 18). Die bei Leber gemessenen Extinktionen liegen bei allen Naphthylkonzentrationen um mehr als die Hälfte unter den Werten bei Brustmuskel und Fettgewebe.

Bei den mit vorab in reinem Puffer erzeugtem N-DBCC-Farbkomplex vermischten Ansätzen der Versuchsreihe B ergeben sich beim Extrakt aus pasteurisiertem Brustmuskel und Fett-

gewebe im Extinktionsbereich  $E_{617} > 0,100$  um ca. 14% höhere, beim Extrakt aus pasteurisierter Leber hingegen um ca. 36% niedrigere Extinktionen als bei den Vergleichsansätzen mit Puffer (Tab. 13; Abb. 18).

Die mit Indigo bei den Extrakten von pasteurisiertem Brustmuskel, Leber und Fettgewebe sowie von Brühwurst, Leberwurst und Kochschinken aus Putenfleisch erstellten Eichgeraden unterscheiden sich von den Eichgeraden mit Puffer nur sehr geringgradig und offenbar zufällig (Tab. 14; Abb. 19).

Aus Versuchsreihe A und B ergeben sich folgende für den Esterase-Test wichtigen Schlussfolgerungen.

Sowohl das enzymatische Hydrolyseprodukt Naphthol, als auch dessen Farbkomplex mit DBCC können bis zu einem gewissen Anteil mit Inhaltsstoffen des Probenextraktes reagieren und dadurch der photometrischen Bestimmung entgehen. Am ausgeprägtesten ist dies bei den Extrakten von pasteurisierter Leber und Leberwurst.

Auf gleiche Weise geht – wie sich aus den Versuchen *2.1 Einfluss der Inkubationstemperatur* ergibt – auch ein gewisser Teil des Indoxyls der photometrischen Quantifizierung als Indigo verloren. Bereits zu Indigo oxidiertes Indoxyl hingegen verbleibt auf Grund der hohen Polarität von N-Methyl-2-pyrrolidon in diesem quantitativ in Lösung. Bei den idealen Lösungseigenschaften N-Methyl-2-pyrrolidon bestehen keine Zweifel, dass im wässrigen Milieu der Testansätze aus enzymatisch freigesetztem Indoxyl entstandenes und an affinen Molekülen und Aggregaten des Probenextraktes gebundenes Indigo im Lösemittel quantitativ in Lösung geht. Hierfür spricht visuell auch der Befund, dass die beim Klarfiltrieren der inkubierten Testansätze für die photometrische Bestimmung der Restaktivität im Filter verbleibenden Rückstände bei keiner der geprüften Proben ein intensiveres Blau erkennen lassen als die Filtrate.

Aus dem Dargestellten folgt:

Sowohl Naphthol als auch Indoxyl kann von affinen Inhaltsstoffen des Probenextraktes gebunden werden und so der Reaktion zum Ergebnis bestimmenden Farbkomplex entgehen. Bei der Festsetzung der für eine unzureichende Pasteurisation kennzeichnenden Grenzwerte des Esterase-Tests ist diesem Zusammenhang vorhaltend Rechnung zu tragen.

## 2.5 Isozymmuster pasteurisierter Brustmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute

Für die Beurteilung der Aussagekraft der Esterase-Restaktivität eines Erzeugnisses aus Putenfleisch als Korrelat der absorbierten Wärme und deren pathogene und saprophytäre Bakterien inaktivierenden Effektes, ist wichtig zu wissen, ob und wodurch sich das Isozymmuster der Esterase enthaltenden Rezepturkomponenten der betreffenden Probe unterscheidet. Dies gilt bei einem Bratenstück und einer Kochpökelware nicht weniger als bei einem Hackfleischprodukt oder einer Brüh- oder Leberwurst, die aus mageren und fetten Abschnitten unterschiedlichster anatomischer Provenienz zusammengesetzt sein können.

In dieser Versuchsreihe wird an Brustmuskel, Fettgewebe und Leber der Pute untersucht, wie sich eine gestufte Erhitzung des Probengutes auf die jeweiligen Pherogramme auswirkt. Von besonderer Wichtigkeit ist hierbei die Frage, ob hinsichtlich der Inaktivierungstemperatur der einzelnen Isozyme bei den geprüften Rezepturkomponenten Unterschiede bestehen, die die Aussagekraft des Esterase-Tests in Frage stellen können. Auf die Darstellung des Isozymmusters mit NB und IA wird verzichtet, nachdem sich in orientierenden Vorversuchen zeigt, dass zwar nicht alle NA-positiven Banden auch mit den unvergleichlich schwerer löslichen Substraten NB und IA darstellbar sind, jedoch alle NB- und IA-positiven Isozyme mit dem vergleichsweise gut löslichem NA.

### 2.5.1 Material und Methodik

Je 500 g Brustmuskel, Leber und Fettgewebe der Pute werden gemäß 2.1.1 *Probengut und Versuchsanordnung* homogenisiert, in Einheiten von je 30 g gemäß 1.2 *Probenaufbereitung und Erhitzung* im maximal  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  differierenden Wasserbad bei 60, 65, 70, 75 und  $80^\circ\text{C}$  jeweils 5 min lang erhitzt, danach sofort in Eiswasser 5 min lang gekühlt und 24 h bei 4 bis  $6^\circ\text{C}$  zwischengelagert. Das für die elektrophoretische Differenzierung erforderliche Probenextrakt wird aus dem pasteurisierten Homogenisat gemäß 1.3 *Bestimmung der Esterase-Restaktivität* im Verhältnis 1:4 (G/V) gewonnen, in Einheiten von jeweils 15 ml gegen 1,5 l Aqua dest. 12 h im Turnus von 1 h dialysiert, anschließend bei 20.000 g und  $4^\circ\text{C}$  20 min zentrifugiert, im Witt'schen Topf entgast und dann in Einheiten von 5 ml lyophilisiert. Für die elektrophoretische Darstellung der Isozyme und deren Hitzestabilität wird das Lyophilisat in 60  $\mu\text{l}$  Aqua dest. gelöst und in Teilmengen von jeweils 25  $\mu\text{l}$  gemäß 1.6 *Isoelektrische Fokussierung der Esterase-Isozyme* differenziert.

## 2.5.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Die Pherogramme der jeweils 5 min lang bei 60°C bis 80°C erhitzten Homogenisate von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe sind in den Abbildungen 20 bis 23 wiedergegeben.

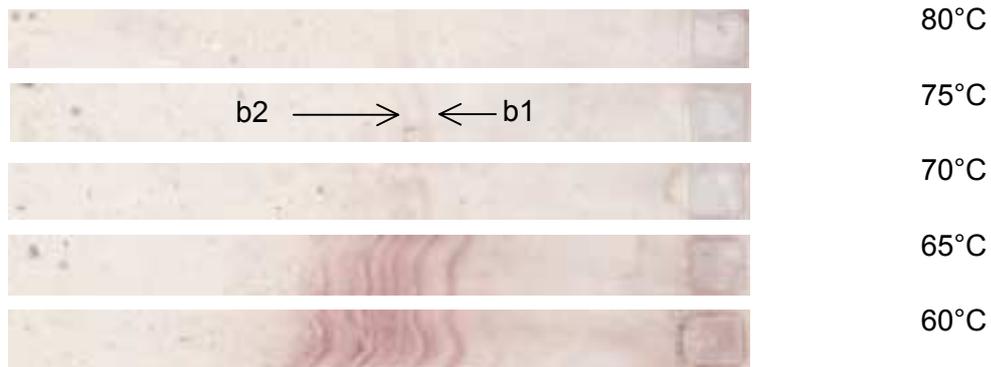
Die Pherogramme der Carbesterase von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe der Pute zeigen hinsichtlich der Zahl, der pI-Werte und der Hitzestabilität der Isozyme folgendes:

Die esteraseaktiven Banden der geprüften Probenart liegen im pH-Bereich von pH 4,5 und pH 6.

Brustmuskel (Abb. 20) weist nach Erhitzen bei  $F_{60} = 5$  je nach Pherogramm 12 bis 14, bei  $F_{65} = 5$  9 und bei  $F_{70} = 5$  nur noch 3 esteraseaktive Banden auf. Die Steigerung der Hitzebehandlung von 70°C auf 75°C und 80°C hat bei den Banden b1 und b2 eine anscheinend nur geringe Abschwächung zur Folge. Die Banden b1 und b2 dürften insofern auf eine besonders hohe Temperaturstabilität schließen lassen, als sie auch schon bei 60°C und 65°C eine nur mittelstarke Ausprägung aufweisen.

Die von Fettgewebe (Abb. 23) nach 5 min langem Einwirken von 60°C und 65°C gewonnenen Pherogramme sind voneinander kaum unterschieden. Ein 5 min langes Pasteurisieren führt schon von 70°C an zu einem faktisch vollständigen Schwund der Banden.

Bei der Leber (Abb. 21) muss die Inkubation der Pherogramme der 60°C/5 min-Chargen in der Substratlösung wegen der sehr hohen Esterase-Aktivität auf wenige Sekunden begrenzt werden. Der Temperatureffekt von 65°C/5 min hat zwar bereits eine sehr starke Abschwächung der Banden zur Folge, bei den 70°C/5 min-Chargen manifestieren sich jedoch immer noch 15 bis 18 gut differenzierbare esteraseaktive Banden. Während sich selbst bei den 75°C/5 min-Chargen - wenn z.T. auch kaum mehr erkennbar - noch 3 bis 5 Isozyme zeigen, sind esteraseaktive Banden bei den 80°C-Chargen in keinem der mehrfach wiederholten Versuche noch zu erkennen.



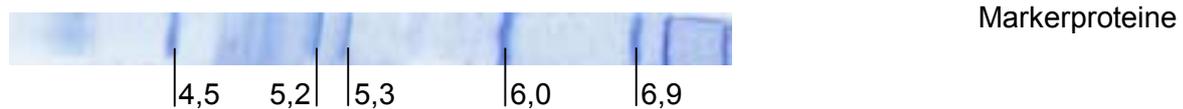
**Abb. 20: IEF-PAG-Pherogramme der Esterase-Isozyme von 5 min bei 60, 65, 70, 75 und 80°C erhitztem Brustmuskel der Pute nach Darstellung mit NA**



**Abb. 21: IEF-PAG-Pherogramme der Esterase-Isozyme von 5 min lang bei 60, 65, 70, 75 und 80°C erhitzter Leber der Pute nach Darstellung mit NA**



**Abb. 22: IEF-PAG-Pherogramme der Esterase-Isozyme von 5 min bei 60, 65, 70, 75 und 80°C erhitztem Fettgewebe der Pute nach Darstellung mit NA**



**Abb. 23: pI-Markerproteine**

## **2.6 Empfindlichkeit des Esterase-Tests und Möglichkeit einer Steigerung dieser durch die Korrelation (q) Restaktivität:Proteingehalt des Probenextraktes**

An Brustmuskel der Pute soll zum einen an entsprechend geringgradig unterschiedlich erhitzten Probenchargen die Unterscheidungsschärfe des Esterase-Tests bestimmt werden. Hierbei ist insbesondere auch von Wichtigkeit, ob sich unterschiedliche Stadien der postmortalen Muskelphysiologie auf die Restaktivität auswirken und mit welchem der in vorliegender Arbeit einbezogenen Substrate Esterase-Restaktivität in welchem Temperaturbereich am besten zu bestimmen ist. Zum anderen soll festgestellt werden, ob sich die Aussagekraft des Tests bezüglich der minimal wirksam gewordenen Wärmemenge möglicherweise dadurch steigern lässt, dass die Proteinkonzentration des Probenextraktes als ein anderer Parameter der Hitzedenaturation mitbewertet wird.

### **2.6.1 Material und Methodik**

Etwa 1500 g Brustmuskel werden, wie unter *2.1.1 Probengut* beschrieben, homogenisiert. Für die Sensitivitätsprüfung wird ein Teil des Homogenisates an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils in 9 Beuteln zu 30 g gemäß *1.2 Probenaufbereitung und Erhitzung* 5 min bei 80°C im maximal um  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  differierenden Wasserbad erhitzt, danach sofort in Eiswasser 5 min lang gekühlt und bis zur Bestimmung der Esterase-Restaktivität gemäß *1.3 Bestimmung der Esterase-Restaktivität* 24 h bei 4 bis 6°C zwischengelagert. Nach Vereinen und eingehenden Vermischen der Tageschargen mittels Spatel wird deren Esterase-Restaktivität im Neunfachansatz bestimmt. Der andere Teil des Homogenisates wird ebenfalls in Portionen von 30 g jeweils 5 min bei 65, 67,5, 68, 69, 70, 71, 72,5, 75 und 80°C erhitzt, gekühlt und nach maximal zweitägiger Zwischenlagerung bei 4°C gemäß *1.3 Bestimmung der Esterase-Restaktivität* und *1.5 Bestimmung des Proteingehaltes mit Bicinchoninsäure* untersucht.

## 2.6.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Die an 5 min bei 80°C erhitztem Brustmuskel ermittelte Wiederholbarkeit des Esterase-Tests ist aus Tabelle 15 zu ersehen. Die für den Nachweis der Sensitivität des Screeningtests mit NA, NB und IA ermittelte Esterase-Restaktivität und der mit dieser korrespondierende Proteingehalt der von jeweils 5 min bei 65°C bis 80°C erhitztem Brustmuskel der Pute stammenden Probenextrakte sind in den Tabellen 16 bis 18 und den Abbildungen 24 bis 29 dokumentiert.

**Tab. 15: Einfluss des postmortalen Stadiums und der Erhitzung von Putenbrustmuskel bei  $F_{80} = 5$  auf die Wiederholbarkeit der Ergebnisse des Esterase-Tests**

Tag	Probe	Extinktion [ $E_{617}$ ]		
		NA	NB	IA
Tag 1	1	0,196	0,050	0,066
	2	0,198	0,056	0,077
	3	0,205	0,050	0,080
	4	0,205	0,056	0,073
	5	0,206	0,055	0,072
	6	0,202	0,054	0,072
	7	0,201	0,053	0,074
	8	0,205	0,054	0,074
	9	0,202	0,054	0,076
	MW	0,202	0,054	0,074
	s	0,003	0,002	0,004
VK	1,7	4,2	5,3	
Tag 2	1	0,193	0,054	0,066
	2	0,201	0,046	0,068
	3	0,199	0,046	0,065
	4	0,194	0,051	0,065
	5	0,188	0,040	0,073
	6	0,190	0,042	0,076
	7	0,190	0,046	0,075
	8	0,185	0,047	0,069
	9	0,187	0,048	0,073
	MW	0,192	0,047	0,070
	s	0,005	0,004	0,004
VK	2,8	9	6,2	
Tag 3	1	0,205	0,050	0,080
	2	0,205	0,051	0,083
	3	0,206	0,053	0,083
	4	0,213	0,048	0,086
	5	0,203	0,056	0,081
	6	0,198	0,056	0,077
	7	0,191	0,058	0,083
	8	0,193	0,054	0,066
	9	0,196	0,050	0,066
	MW	0,201	0,053	0,078
	s	0,007	0,003	0,007
VK	3,5	6,4	9,5	

Erklärungen: MW = arithmetischer Mittelwert; s = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient

**Tab. 16: Einfluss eines jeweils 5 min langen niedrig gestuften und Erhitzens von Brustmuskel der Pute bei 65°C bis 80°C auf die Esterase-Restaktivität, den Proteingehalt und auf das Verhältnis q zwischen Restaktivität und Proteingehalt des Probenextraktes**

[°C]	Probe	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Proteingehalt [ $\mu\text{g/ml}$ ]		q		
		NA	NB	IA	1:11 <sup>1)</sup>	1:4 <sup>1)</sup>	NA	NB	IA
65	1	0,850	0,560	0,787	500	1642	0,1700	0,0341	0,0479
	2	0,857	0,554	0,802	615	1877	0,1393	0,0295	0,0427
	3	0,861	0,561	0,791	531	1738	0,1621	0,0323	0,0455
	MW	0,856	0,558	0,793	549	1753	0,1572	0,0320	0,0454
	VK	0,7	0,7	1,0	10,9	6,7	10,1	7,2	5,7
67,5	1	0,542	0,356	0,313	474	1565	0,1143	0,0227	0,0200
	2	0,590	0,354	0,349	518	1465	0,1139	0,0242	0,0238
	3	0,586	0,375	0,352	488	1554	0,1201	0,0241	0,0227
	MW	0,573	0,362	0,338	493	1528	0,1161	0,0237	0,0222
	VK	4,7	3,2	6,4	4,6	3,6	3,0	3,4	8,8
68	1	0,532	0,369	0,262	420	1265	0,1267	0,0292	0,0207
	2	0,561	0,405	0,264	458	1469	0,1225	0,0276	0,0180
	3	0,514	0,383	0,255	477	1469	0,1078	0,0261	0,0174
	MW	0,536	0,386	0,260	452	1401	0,1190	0,0276	0,0187
	VK	4,4	4,7	1,8	6,4	8,4	8,4	5,6	6,6
69	1	0,393	0,340	0,201	349	1046	0,1126	0,0325	0,0192
	2	0,378	0,336	0,182	392	1219	0,0964	0,0276	0,0149
	3	0,373	0,329	0,194	398	1265	0,0937	0,0260	0,0153
	MW	0,381	0,335	0,192	380	1177	0,1009	0,0287	0,0165
	VK	2,7	1,7	5,0	7,1	9,8	10,1	11,8	14,3
70	1	0,285	0,314	0,106	268	927	0,1063	0,0339	0,0114
	2	0,284	0,310	0,114	315	777	0,0902	0,0399	0,0147
	3	0,284	0,304	0,095	249	962	0,1141	0,0316	0,0099
	MW	0,284	0,309	0,105	277	888	0,1035	0,0351	0,0120
	VK	0,2	1,6	9,1	12,3	11,0	11,8	12,2	20,4
71	1	0,290	0,212	0,103	202	769	0,1436	0,0276	0,0134
	2	0,287	0,234	0,106	211	704	0,1360	0,0332	0,0151
	3	0,284	0,251	0,102	234	638	0,1214	0,0393	0,0160
	MW	0,287	0,232	0,104	215	704	0,1337	0,0334	0,0148
	VK	1,0	8,4	2,0	7,7	9,3	8,4	17,6	8,9
72,5	1	0,231	0,220	0,060	137	442	0,1686	0,0498	0,0136
	2	0,224	0,243	0,073	158	581	0,1418	0,0418	0,0126
	3	0,225	0,236	0,066	171	569	0,1316	0,0415	0,0116
	MW	0,227	0,233	0,066	155	531	0,1473	0,0444	0,0126
	VK	1,7	5,1	9,8	11,0	14,5	13,0	10,6	7,9
75	1	0,231	0,120	0,067	123	423	0,1878	0,0284	0,0158
	2	0,225	0,113	0,061	137	523	0,1642	0,0216	0,0117
	3	0,226	0,110	0,068	142	465	0,1592	0,0237	0,0146
	MW	0,227	0,114	0,065	134	471	0,1704	0,0245	0,0140
	VK	1,4	4,5	5,8	7,2	10,7	9,0	14,1	15,3
80	1	0,212	0,060	0,058	88	350	0,2409	0,0171	0,0166
	2	0,214	0,059	0,070	146	488	0,1466	0,0121	0,0143
	3	0,215	0,059	0,063	108	465	0,1991	0,0127	0,0135
	MW	0,214	0,059	0,064	114	435	0,1955	0,0140	0,0148
	VK	0,7	1,0	9,5	26,1	17,1	24,2	19,8	10,6

Erklärungen: q = ( Esterase-Restaktivität : Eiweißgehalt ) x 100; MW = arithmetischer Mittelwert; VK = Variationskoeffizient; <sup>1)</sup> Extraktionsverhältnis (G/V);

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der in Tabelle 16 zusammengestellten Daten sind aus den Tabellen 17 und 18 ersichtlich.

**Tab. 17: Temperaturbedingte Differenz der Esterase-Restaktivität, Korrelationskoeffizient zwischen Erhitzungsintensität und Esterase-Restaktivität der Probenextrakte und Steigung der Regressionsgeraden der Aktivitätsverringierung beim Brustmuskel von Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen von 65 bis 70°C und 70 bis 80°C**

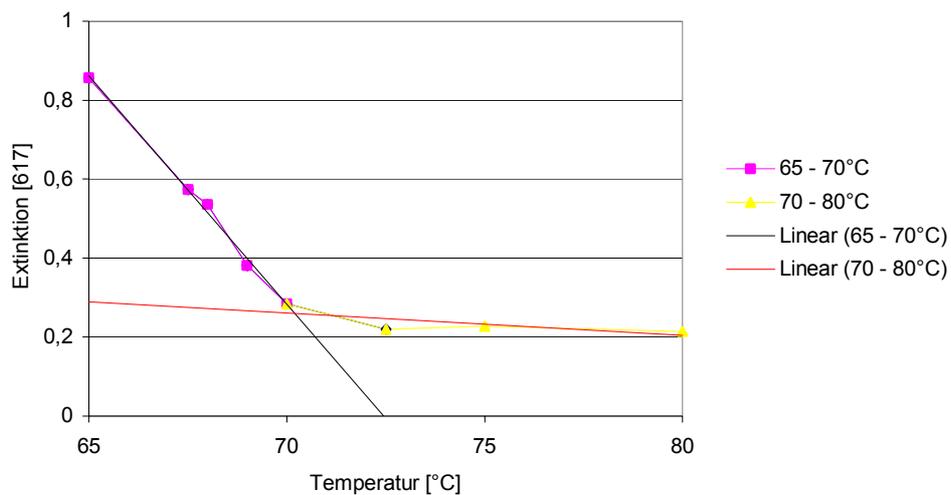
Substrat	Temperaturbereich	$\Delta$	r	a
NA	65 – 70°C	0,572	-0,998	-0,115
	70 – 80°C	0,070	-0,817	-0,005
NB	65 – 70°C	0,249	-0,955	-0,049
	70 – 80°C	0,250	-0,949	-0,025
IA	65 – 70°C	0,688	-0,977	-0,139
	70 – 80°C	0,041	-0,754	-0,003

Erklärungen:  $\Delta$  = Differenz zwischen der minimalen und der maximalen Restaktivität [E 617] des jeweiligen Temperaturbereichs; r = Pearson Korrelationskoeffizient; a = Steigung der Regressionsgeraden der erhitzungsbedingten Abnahme der Esterase-Restaktivität

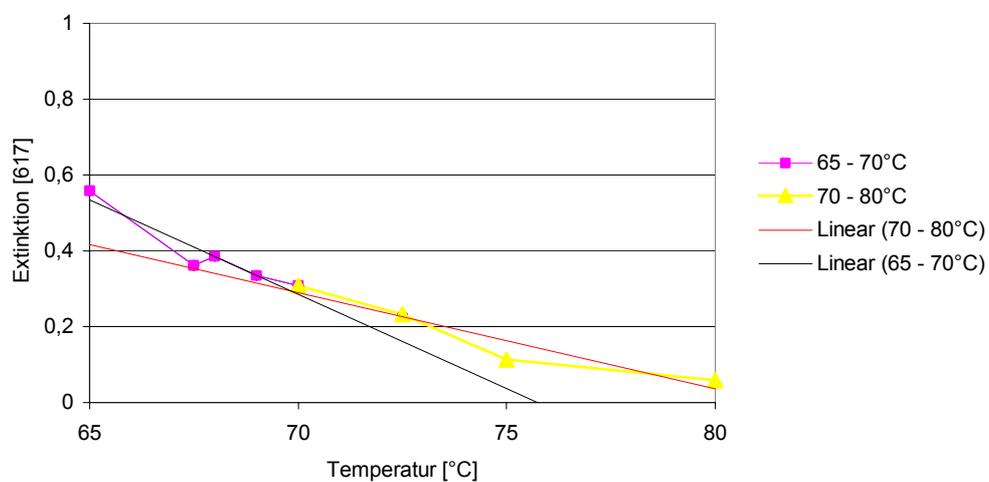
**Tab. 18: Temperaturbedingte Differenz des Eiweißgehaltes, Korrelationskoeffizient zwischen Erhitzungsintensität und Eiweißgehalt der Probenextrakte und Steigung der Regressionsgeraden der Abnahme des Eiweißgehaltes beim Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei 67,5 bis 72,5°C und 72,5 bis 80°C**

Verdünnung	Temperaturbereich	$\Delta$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	r	a
1:11	67,5 – 72,5°C	338	-0,988	-70,3
	72,5 – 80°C	41	-0,977	-5,3
1:4	67,5 – 72,5°C	997	-0,988	-207
	72,5 – 80°C	96	-0,944	-12

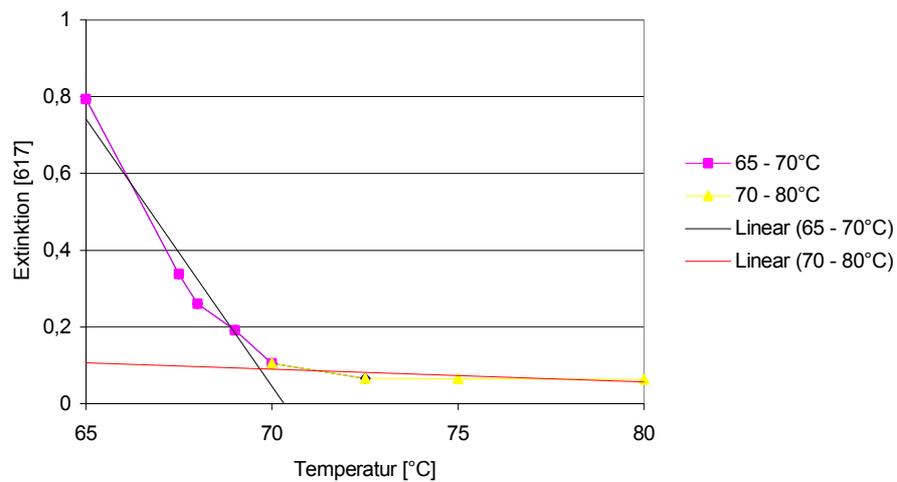
Erklärungen:  $\Delta$  = Differenz zwischen dem minimalen und dem maximalen Eiweißgehalt der Probenextrakte des jeweiligen Temperaturbereichs; r = Pearson Korrelationskoeffizient; a = Steigung der Regressionsgeraden der erhitzungsbedingten Abnahme des Proteingehaltes der Probenextrakte



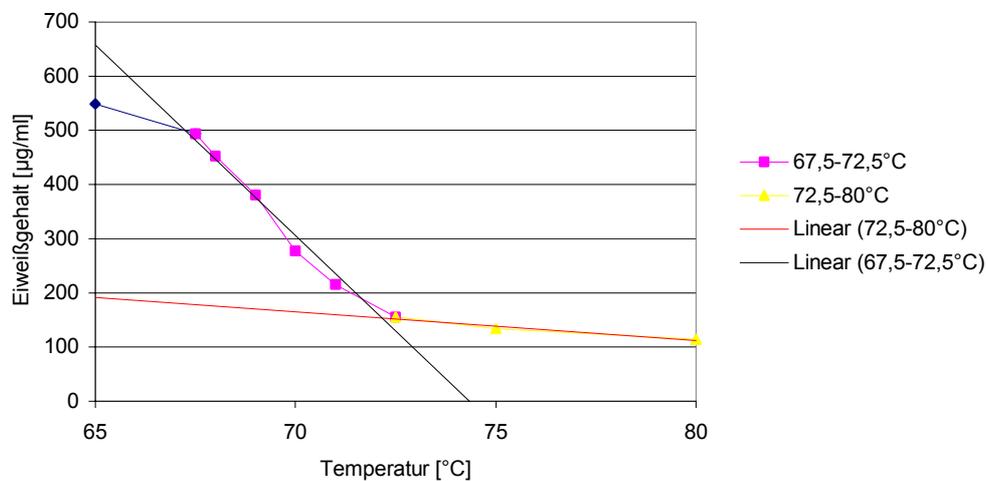
**Abb. 24:** Mit NA ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei 65 bis 70°C und 70 bis 80°C und Regressionsgeraden der Aktivitätsverringering



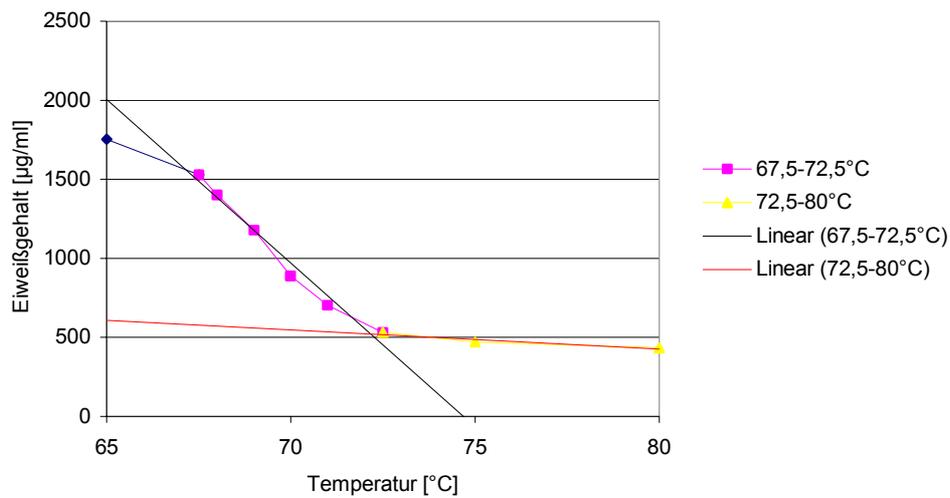
**Abb. 25:** Mit NB ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei von 65 bis 70°C und 70 bis 80°C und Regressionsgerade der Aktivitätsverringering



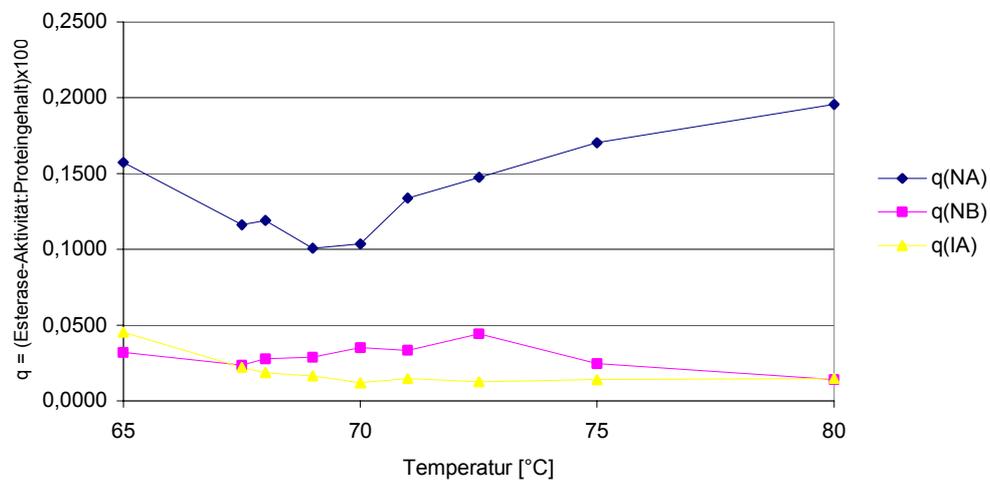
**Abb. 26:** Mit IA ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei 65 bis 70°C und 70 bis 80°C und Regressionsgerade der Aktivitätsverringern



**Abb. 27:** Eiweißgehalte der 1:11-Extrakte von Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei 67,5 bis 72,5°C und 72,5 bis 80°C und Regressionsgeraden der Gehaltsverringern



**Abb. 28:** Eiweißgehalte der 1:4-Extrakte von Brustmuskel der Pute nach jeweils 5 min langem und niedrig gestuftem Erhitzen bei 67,5 bis 72,5°C und 72,5 bis 80°C und Regressionsgeraden der Gehaltsverringerung



**Abb. 29:** Verhältnis q zwischen Restaktivität und Proteingehalt nach jeweils 5 min langen und niedrig gestuftem Erhitzen von Brustmuskel der Pute bei 65 bis 80°C

Wie der Tabelle 15 zu entnehmen ist, resultiert bei 5 min bei 80°C erhitztem Brustmuskel bei den NA-Ansätzen (n = 9) ein Variationskoeffizient von VK = 1,7 bis 3,5, bei den NB-Ansätzen (n = 9) von VK = 4,2 bis 9 und bei den IA-Ansätzen (n = 9) von VK = 5,3 bis 9,5. Die höchste Reproduzierbarkeit besteht somit bei den Ansätzen mit NA. Bezüglich des Einflusses der biochemischen post mortem-Prozesse zeigt sich, dass sich die ca. 24 h nach Schlachtung am „1. Tag“ bestehende Restaktivität im Verlaufe der um weitere 2 Tage verlängerten Lagerung bei 4 bis 6°C nicht nennenswert ändert.

Hinsichtlich der Eignung des Esterase-Tests, geringgradig unterschiedlich erhitztes Proben-gut als solches anzuzeigen, lassen die Esterase-Restaktivitäten der 5 min bei 65 bis 80°C erhitzten Homogenisate von Brustmuskel der Pute folgende Feststellungen zu. Wie sich dem Resümee von Tabelle 16 entnehmen lässt, verringert sich die Esterase-Restaktivität bei den NA-Ansätzen von 65 bis 70°C linear ( $r = -0,998$ ) und relativ steil ( $a = -0,115$ ) von  $E_{617} = 0,856$  auf 0,284. Die Extinktionsabnahme je 1°C Temperaturerhöhung beträgt  $\sim E_{617} = 0,114$ . Im Bereich von 70 bis 80°C verringert sich die Esterase-Restaktivität immerhin noch um insgesamt  $E_{617} = 0,070$  ( $a = -0,005$ ) auf  $E_{617} = 0,241$ . Dass die Variationskoeffizienten z.T. etwas größer sind als die in Tabelle 15 dokumentierten, ist durch die wesentlich kleinere Zahl von 3 Messwerten bedingt. Auch bei den NB-Ansätzen nimmt die Esterase-Restaktivität von 65 bis 80°C nahezu linear ab ( $r = -0,955$  und  $0,949$ ), und zwar von  $E_{617} = 0,558$  bei 65°C je 1°C Temperaturerhöhung um lediglich  $E_{617} \sim 0,049$  auf  $E_{617} = 0,309$  bei 70°C ( $a = -0,049$ ) und weiter um  $E_{617} \sim 0,025$  je 1°C Temperaturerhöhung ( $a = -0,025$ ) auf  $E_{617} = 0,059$  bei 80°C. Die Esterase-Restaktivität der IA-Ansätze nimmt von  $E_{617} = 0,793$  bei 65°C je 1°C Temperaturerhöhung linear ( $r = -0,977$ ) um  $E_{617} \sim 0,137$  ( $a = -0,139$ ) auf  $E_{617} = 0,105$  bei 70°C ab. Im Temperaturbereich von 70 bis 80°C verringert sich die Esterase-Restaktivität nur noch sehr geringgradig ( $a = -0,003$ ) von  $E_{617} = 0,105$  auf 0,064 ( $r = -0,754$ ).

Der aus den Tabellen 16 bis 18 und den Abbildungen 24 bis 29 ersichtliche Einfluss einer 5 min langen Einwirkung von 65°C bis 80°C auf den Proteingehalt der für die NA-Ansätze im Probe-Puffer-Verhältnis 1:11 und für die NB- und IA-Ansätze 1:4 gewonnenen Brustmuskel-Extrakte führt zu folgenden Feststellungen.

Bei den 1:11-Extrakten nimmt der Proteingehalt sowohl von 67,5 bis 72,5°C ( $r = -0,988$ ), als auch von 72,5 bis 80°C ( $r = -0,977$ ) linear ab, und zwar von 493 µg/ml bei 67,5°C je 1°C Temperaturerhöhung um durchschnittlich jeweils 67,6 µg/ml auf 155 µg/ml bei 72,5°C ( $a = -70,3$ ). Bei der weiteren Temperaturerhöhung verringert sich der Proteingehalt je 1°C durchschnittlich um nur noch 5,46 µg/ml auf 114 µg/ml bei 80°C ( $a = -5,3$ ). Bei der Extrakt-Verdünnung 1:4 nimmt der Proteingehalt sowohl im Temperaturbereich von 67,5°C bis 72,5°C ( $r = -0,988$ ), als auch von 72,5°C bis 80°C ( $r = -0,944$ ) linear ab. Durch Erhöhung der Temperatur um jeweils 1°C verringert sich der Proteingehalt der Extrakte von 1528 µg/ml bei

67,5°C um durchschnittlich 199 µg/ml auf 531 µg/ml bei 72,5°C ( $a = -207$ ) und bei weiterer Erhöhung der Temperatur um jeweils 9,2 µg/ml auf 435 µg/ml bei 80°C ( $a = -12$ ).

Bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem Proteingehalt und der Esterase-Restaktivität der Extrakte ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- Die Proteingehalte der Proben weisen mit Ausnahme des 1:4- und 1:11-Extraktes der 67,5°C-Charge meist sehr viel höhere Variationskoeffizienten auf als die Esterase-Restaktivitäten.
- Das Verhältnis  $q$  von Esterase-Restaktivität:Proteingehalt bleibt bei den NB- und IA-Ansätzen von 65 bis 80°C annähernd konstant, bei den NA-Ansätzen nimmt es bis zur Temperaturstufe 69°C ab und von 71 bis 80°C sehr stark zu (Abb. 29).

Die Ergebnisse der Versuchsreihe lassen so die Feststellung zu, dass sich die Auswirkung der Hitzebehandlung eines fraglichen Produktes am Parameter  $q$  allenfalls dann noch differenzierter als mit dem Esterase-Test beurteilen lässt, wenn die Rezeptur des Erzeugnisses verlässlich genug bekannt ist.

### 3 Einfluss der Pasteurisation auf die Esterase-Restaktivität und den Restkeimgehalt bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute

Um von der Esterase-Restaktivität etwa eines gebratenen Putenschnittzels, einer gepökelten Oberkeule, einer Frikadelle, Lyoner, Leberwurst oder eines anderen pasteurisierten Erzeugnisses aus Putenfleisch auf das potentielle mikrobiologisch-hygienische Risiko des Produktes schließen zu können, muss auch hinreichend bekannt sein, wie sich die Esterase-Aktivität der rohen Rezepturkomponenten, die beim Hitzegaren des Produktes aufgenommene Wärmemenge und eine womöglich ausgeprägtere Prävalenz der Substrataffinität der hitzestabileren Isozyme auf die mit NA, NB und IA resultierende Restaktivität auswirken.

Ziel der nachstehend beschriebenen Versuchsreihe ist es,

- den Einfluss der Hitzebehandlung der als Bestandteile der betreffenden Erzeugnisse aus Putenfleisch wichtigsten Putenteile auf die Dynamik der Inaktivierung von Esterase und der Mikroflora als einer Funktion von Temperatur und Zeit zu bestimmen;
- die Aussagekraft des Esterase-Tests bezüglich der Inaktivierung der vegetativen Mikroflora des Probengutes zu eruieren.

#### 3.1 Darstellung der Dynamik der Hitzeinaktivierung der Esterase

Die nachfolgend beschriebenen Studien erstrecken sich auf die Probenarten Skelettmuskulatur von Brustmuskel, Flügel, Oberkeule, Unterkeule und sogenanntes Karkassenfleisch sowie auf Leber und Fettgewebe der Pute.

##### 3.1.1 Material und Methodik

Das Probenmaterial wird in Einheiten von je 1000 g, im Falle des Brustmuskels von 2000 g gemäß 2.1.1 *Probengut* homogenisiert. Die Erhitzung des einen Teils der Homogenisate erfolgt bei 65, 72,5 und 80°C, und zwar bei 65°C für die Dauer von 5, 10, 30, und 60 min, bei 72,5°C von 2,5, 5, 10, und 30 min und bei 80°C von 1, 5 und 10 min für Ansätze mit NA und NB und von 2,5, 5 und 10 min für die Ansätze mit IA. Der andere Teil des Probengutes wird jeweils 5 min bei 67,5, 70 und 85°C erhitzt. Um dem Lambert-Beer-Gesetz entsprechend Extinktionen von  $E_{617} \leq 0,600$  zu sichern, werden die Extrakte für die NA-Ansätze im Probe:Puffer – Verhältnis (G/V) von 1:11 und für die NB- und IA-Ansätze von 1:4 gewonnen und auf die aus Tabelle 19 ersichtlichen Endverdünnungen gebracht.

**Tab. 19: Verdünnung des rohen und erhitzten Probengutes bei der Extraktgewinnung**

Probenart		Extraktionsverhältnis [G/V]		
		NA	NB	IA
roh	Skelettmuskulatur	1:11011	1:34441	1:3311
	Leber	1:1112111	1:667711	1:334411
	Fettgewebe	1:11011	1:34441	1:3311
65 - 67,5°C	Skelettmuskulatur	1:121	1:561	1:44
	Leber	1:33033	1:77077	1:7777
	Fettgewebe	1:121	1:561	1:44
70 - 72,5°C	Skelettmuskulatur	1:11	1:4	1:4
	Leber	1:121	1:561	1:44
	Fettgewebe	1:11	1:4	1:4
75 - 85°C	Skelettmuskulatur	1:11	1:4	1:4
	Leber	1:11	1:4	1:4
	Fettgewebe	1:11	1:4	1:4

Erklärungen: G = Gewicht; V = Volumen

In der Perspektive einer bei den Putenfleischprodukten etwa erforderlichen methodischen Optimierung des Esterase-Tests hat in dieser Versuchsreihe vor allem auch zu interessieren, ob und erforderlichenfalls wie den je nach Probenart und Prävalenz der integralen Substrat-affinität des jeweiligen Isozymsystems z.T. sehr stark differierenden NA-, IA- und NB-Aktivitäten Rechnung zu tragen ist. Um die mit NA, NB und IA beim jeweiligen Probengut nach dessen gestuftem Erhitzen resultierenden Restaktivitäten direkt vergleichen zu können, werden die als relative Bezugswerte „gemessenen Extinktionen“ der den Testansätzen zu Grunde liegenden Verdünnung der Probeneinwaage entsprechend in direkt vergleichbare, die Bezugsverdünnung von 1:11 bei NA und 1:4 bei NB und IA repräsentierende „absolute Extinktionswerte“ (**aEw**) umgerechnet. Bei den in den Tabellen 20 bis 27 genannten Daten muss so im Auge behalten werden, dass sich beim Aufrechnen der z.T. extremen Probenverdünnung (siehe Tab. 19) schon kleinste subjektiv und objektiv bedingte Analysenfehler extrem vervielfachen und dadurch nur scheinbare Unstimmigkeiten bedingt sein können. Beim direkten Vergleich der bei den verschiedenen Substraten errechneten absoluten Extinktionswerte könnte je nach Fragestellung auch noch zu berücksichtigen sein, dass die NA-Ansätze jeweils nur 1 h, die NB- und IA-Ansätze dagegen 3 h inkubiert werden.

### 3.1.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Der Einfluss einer bis zu 60, 30 bzw. 10 min langen Erhitzung von Skelettmuskelfleisch, Leber und Fettgewebe bei 65, 72,5 bzw. 80°C auf die Inaktivierung der Esterase ergibt sich aus den Tabellen 20 bis 26 und den Abbildungen 30 bis 50, der Einfluss einer jeweils 5 min langen Einwirkung von 65, 67,5, 70, 72,5, 80 und 85°C aus den Tabellen 27 und den Abbildungen 51 bis 57.

#### 3.1.2.1 Brustmuskel

Das rohe Probengut weist mit NA einen absoluten Extinktionswert (aEw) von ca. 73, mit NB von 228 und mit IA von 22 auf. Bei diesen Angaben ist nicht beglichen, dass die Inkubationsfrist bei den NA-Ansätzen 60 min und bei den Ansätzen mit IA und NB 180 min beträgt.

Der bei den NA-Ansätzen vom rohen Brustmuskel-Homogenisat bestehende aEw von 73,073 verringert sich beim Hitzeregime 65°C/5 min (Tab. 20 und Abb. 30 bis 32) auf 0,913, also auf eine Restaktivität von ca. 1,2% des Ausgangswertes, beim Regime 65°C/60 min auf ca. 0,5% und bei 72,5°C/5 min sowie 80°C/5 min auf die als Indikator einer ausreichende Pasteurisation anzusehende Restaktivität von jeweils ca. 0,2%.

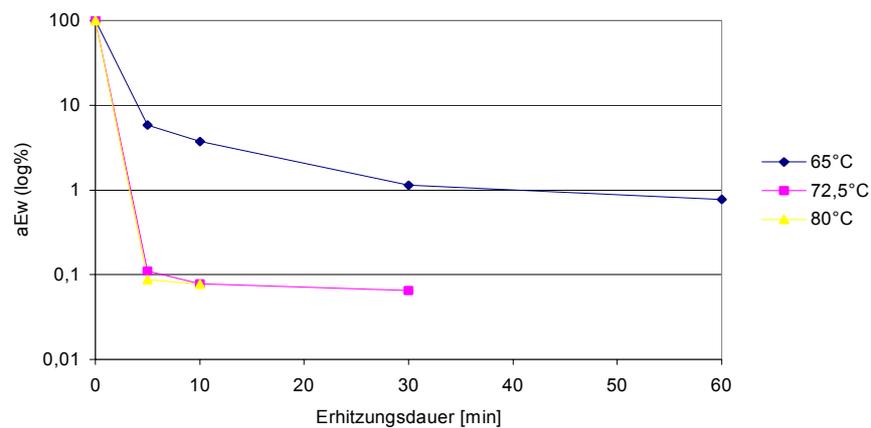
Die bei den NB-Ansätzen bei 65°C erkennbare Dynamik der Esterase-Inaktivierung und die bei 65°C/5 min, 65°C/60 min, 72,5°C/5 min und 80°C/5 min bestehenden Restaktivitäten von ca. 1,5 bzw. 0,8% bzw. jeweils ca. 0,1% der Ausgangsaktivität liegen im Größenbereich der bei den NA-Ansätzen ermittelten Restaktivitäten.

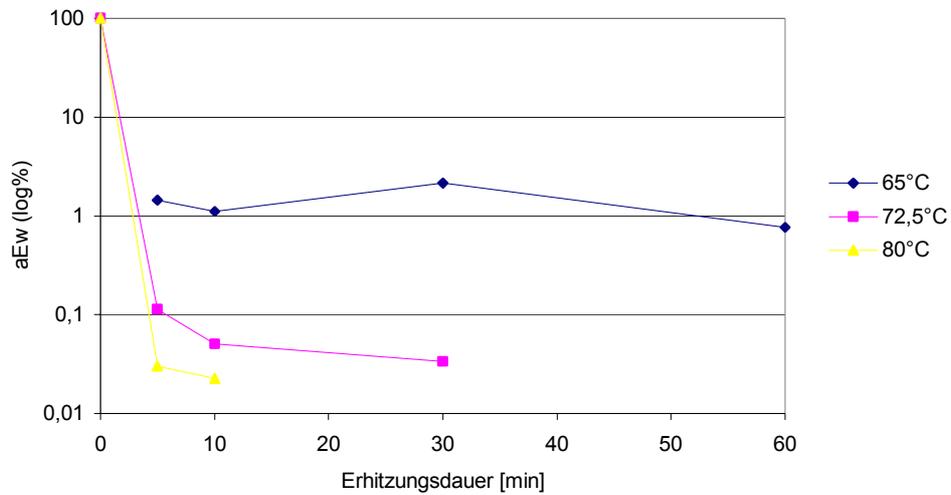
Mit IA wird bei 65°C/5 min noch eine Esterase-Restaktivität von 5,1%, bei 65°C/60 min von 1,3%, bei 72,5°C/5 min von 0,6% und selbst bei 80°C/ 5 min noch von 0,4% der Ausgangsaktivität nachgewiesen.

**Tab. 20: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Brustmuskels der Pute auf die absolute Esterase-Restaktivität**

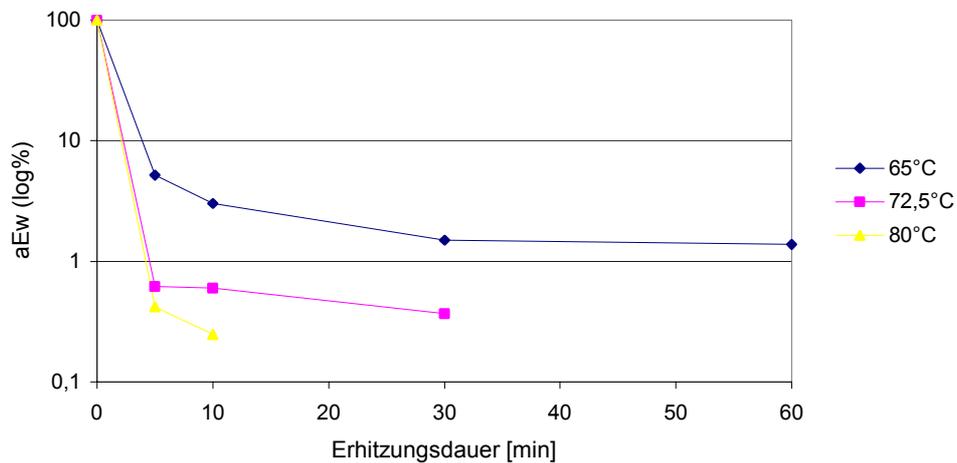
Dauer [min]	Absoluter Extinktionswert (aEw) <sup>1)</sup>								
	65°C (rohes Probengut)			72,5°C			80°C		
	NA (73,073)	NB (228,172)	IA (21,935)	NA	NB	IA	NA	NB	IA
1							0,237	0,251	
2,5				0,278	0,303	0,142			0,138
5	0,913	3,296	1,133	0,204	0,259	0,136	0,204	0,069	0,093
10	0,663	2,525	0,660	0,187	0,116	0,131	0,161	0,052	0,054
30	0,446	4,909	0,330	0,187	0,077	0,081			
60	0,407	1,753	0,303						

Erklärung: <sup>1)</sup> siehe Ausführungen unter 3.1.1 *Material und Methodik*

**Abb. 30: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Brustmuskels auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität**



**Abb. 31:** Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Brustmuskels auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität



**Abb. 32:** Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Brustmuskels auf die mit IA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität

### 3.1.2.2 Flügel

Die Esterase-Aktivität des rohen Probenhomogenisates liegt mit einem aEw von 148 bei NA, 396 bei NB und 52 bei IA etwa doppelt so hoch wie beim Brustmuskel.

Die Hitzeinaktivierung der Esterase der Flügelmuskulatur verläuft aufgrund der höheren Ausgangsaktivität - wie sich bei den NA-Ansätzen der 65°C-Proben (Tab. 21 und Abb. 33 bis 35) besonders deutlich zeigt – sehr viel protrahierter als beim Brustmuskel. So besteht bei der 65°C/5 min-Charge eine Restaktivität von 5,5% und bei 65°C/60 min von 1,5% der Ausgangsaktivität. Die bei 72,5°C/5 min und 80°C/ 5 min resultierende Restaktivität liegt jeweils bei ca. 0,1%.

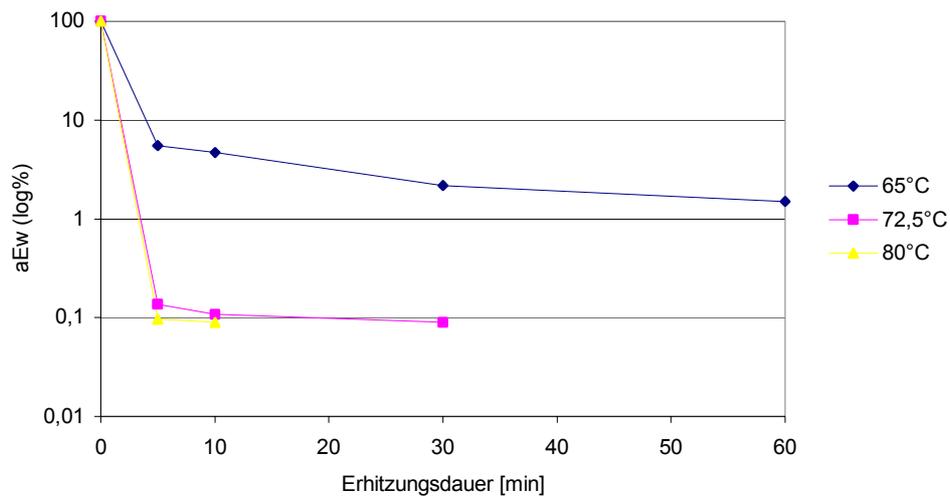
**Tab. 21: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Flügelmuskulatur auf die absolute Esterase-Restaktivität**

Dauer [min]	Absoluter Extinktionswert (aEw) <sup>1)</sup>								
	65°C (rohes Probengut)			72,5°C			80°C		
	NA (148,148)	NB (396,072)	IA (51,734)	NA	NB	IA	NA	NB	IA
1							0,216	0,210	0,132
2,5				0,266	0,305	0,195			
5	8,140	79,382	5,473	0,203	0,187	0,122	0,144	0,002	0,086
10	6,969	77,138	3,724	0,159	0,052	0,119	0,133	0,014	0,107
30	3,234	29,242	1,689	0,134	0,025	0,099			
60	2,228	13,674	1,128						

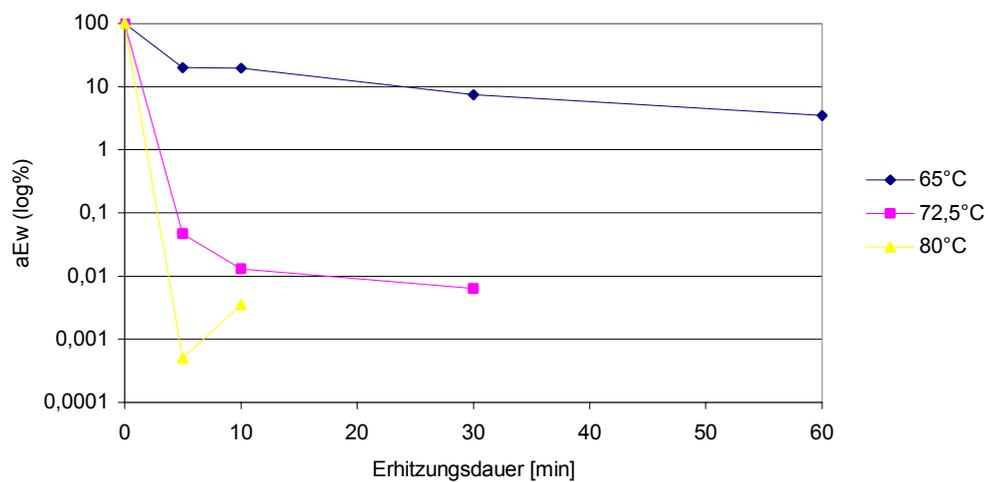
Erklärung: <sup>1)</sup> siehe Ausführungen unter 3.1.1 *Material und Methodik*

Bei den NB-Ansätzen der 65°C-Proben manifestiert sich der sehr protrahierte Verlauf der Hitzeinaktivierung noch ausgeprägter als bei den NA-Ansätzen. Bei 65°C/5 min besteht so eine Restaktivität von 20%, bei 65°C/60 min von 3,4%. Bei 72,5°C/5 min und 80°C/5 min hingegen erweist sich auch die Esterase der Flügelmuskulatur als so instabil, dass nur noch Restaktivitäten der Größenordnung 0,04 und 0,001% gemessen werden.

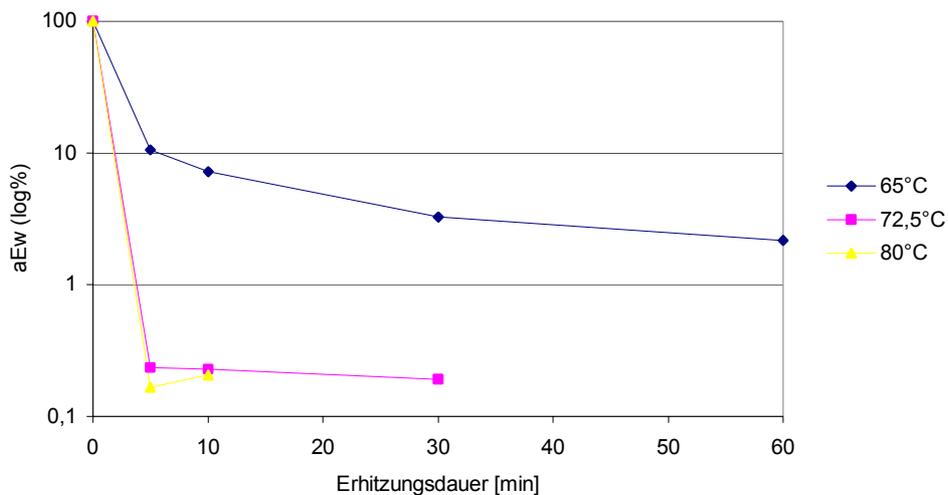
Bei den IA-Ansätzen lässt sich ähnlich wie beim Brustmuskel eine ausgeprägte Restaktivität auch noch nach mehrere min langem Einwirken von 72,5 und 80°C nachweisen. Die bei 65°C/5 min ermittelte Restaktivität beträgt 10,5%, bei 65°C/60 min 2,1%, bei 72,5°C/5 min 0,2% und bei 80°C/5 min 0,1% der Ausgangsaktivität.



**Abb. 33:** Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Flügelmuskulatur auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität



**Abb. 34:** Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Flügelmuskulatur auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität



**Abb. 35: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Flügelmuskulatur auf die mit IA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität**

### 3.1.2.3 Oberkeule

Nimmt man die potentielle Fehlerbelastung der absoluten Extinktionswerte ins Kalkül, so entspricht der beim rohen Probenhomogenisat mit NA resultierende aEw etwa demjenigen des Brustmuskels und der mit NB ermittelte aEw etwa demjenigen der Flügelmuskulatur. Der mit IA nachgewiesene aEw liegt über dem Mittelwert des aEw von Brustmuskel und Flügelmuskulatur.

Die bei den NA-Ansätzen errechneten absoluten Extinktionswerte (Tab. 22; Abb. 36 bis 38) liegen bei jeder der 3 Temperaturen knapp unter den bei der Flügelmuskulatur ermittelten Werten. Die nach 5 min langem Einwirken von 65, 72,5 und 80°C resultierende Restaktivität beträgt 5,1, 0,09 und 0,06% der Ausgangsaktivität.

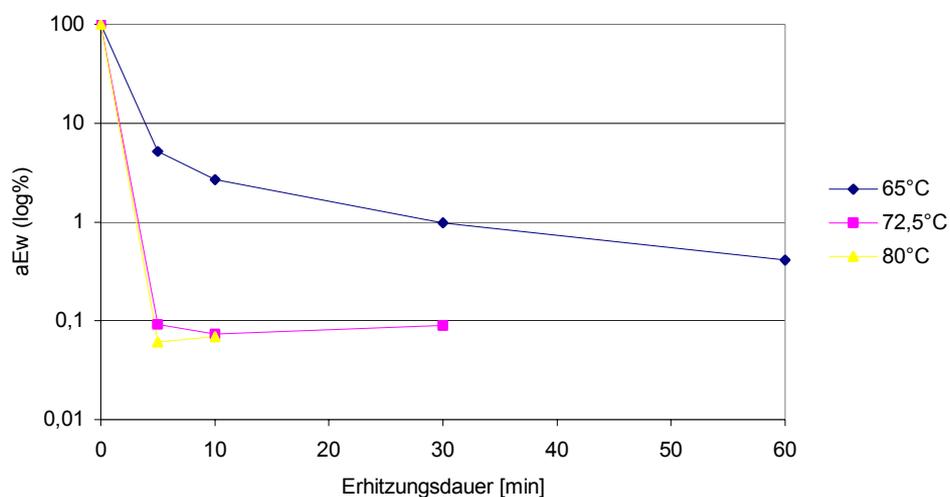
Bei den NB-Ansätzen entspricht die Dynamik der Esterase-Inaktivierung etwa derjenigen bei der Flügelmuskulatur. Der absolute Extinktionswert der 65°C/5 min-Probe liegt jedoch mit 6,9% der Ausgangsaktivität sehr viel niedriger. Die bei 72,5°C/10 min und 80°C/5 min bestehende Restaktivität lässt sich aufgrund der kleinen Messwertzahl nicht näher taxieren.

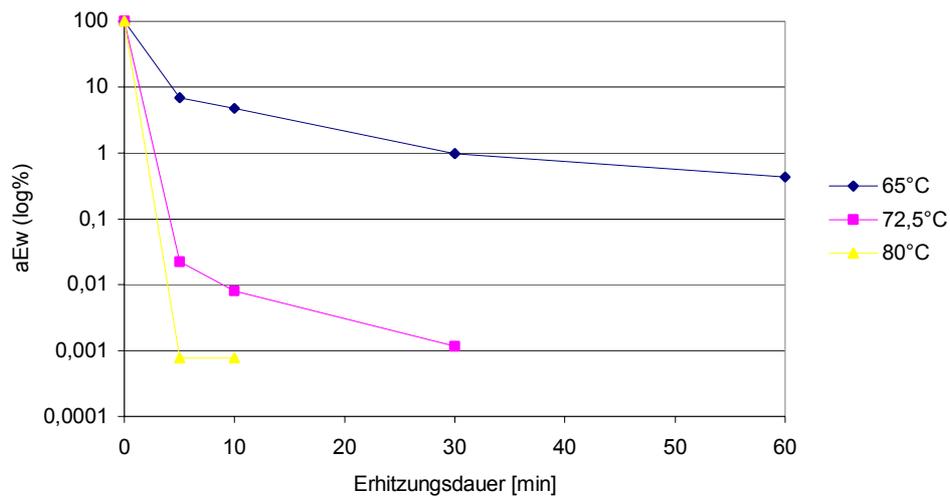
**Tab. 22: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Oberkeule auf die absolute Esterase-Restaktivität**

Dauer [min]	Absoluter Extinktionswert (aEw) <sup>1)</sup>								
	65°C (rohes Probengut)			72,5°C			80°C		
	NA (83,083)	NB (387,461)	IA (37,663)	NA	NB	IA	NA	NB	IA
1							0,169	0,298	0,073
2,5				0,209	0,087	0,133			
5	4,268	26,788	2,404	0,076	0,031	0,028	0,051	0,003	0,009
10	2,219	18,373	1,397	0,062	0,005	0,019	0,058	0,003	0,005
30	0,820	3,787	0,517	0,075	0,007	0,023			
60	0,341	1,683	0,198						

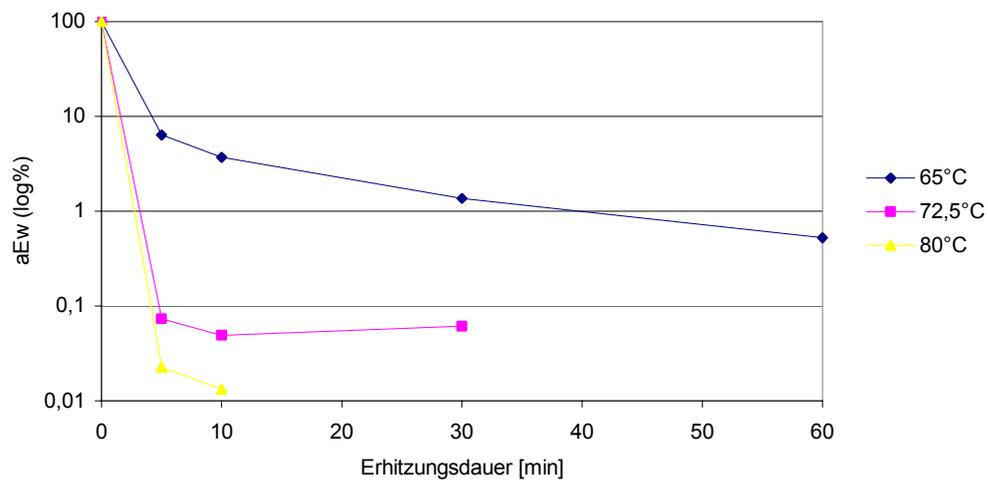
Erklärung: <sup>1)</sup> siehe Ausführungen unter 3.1.1 *Material und Methodik*

Bei den IA-Ansätzen der 65°C/60 min-Proben resultiert wie beim Brustmuskel eine Restaktivität von 0,5% der Ausgangsaktivität, die somit über derjenigen der Vergleichsansätze mit NA und NB liegt. Die Restaktivitäten der 72,5°C/5 min- und 80°C/5 min-Proben liegen mit 0,07 und 0,02% über den Vergleichswerten der NB-Ansätze.

**Abb. 36: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Oberkeule die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität**



**Abb. 37: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Oberkeule auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität**



**Abb. 38: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Oberkeule auf die mit IA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität**

### 3.1.2.4 Unterkeule

Die Esterase-Aktivität des rohen Probenhomogenisates der Unterkeule stimmt mit derjenigen der Oberkeule sehr gut überein.

Desgleichen verläuft bei den NA-Ansätzen auch die Hitzeinaktivierung in einer sehr ähnlichen Weise wie bei der Oberkeule (Tab. 23; Abb. 39 bis 41). Die bei 60°C/5 min bestehende Restaktivität liegt bei 5,8%, bei 65°C/60 min bei 0,7%, bei 72,5°C/5 min bei 0,1% und bei 80°C/5 min bei 0,08% der Ausgangsaktivität.

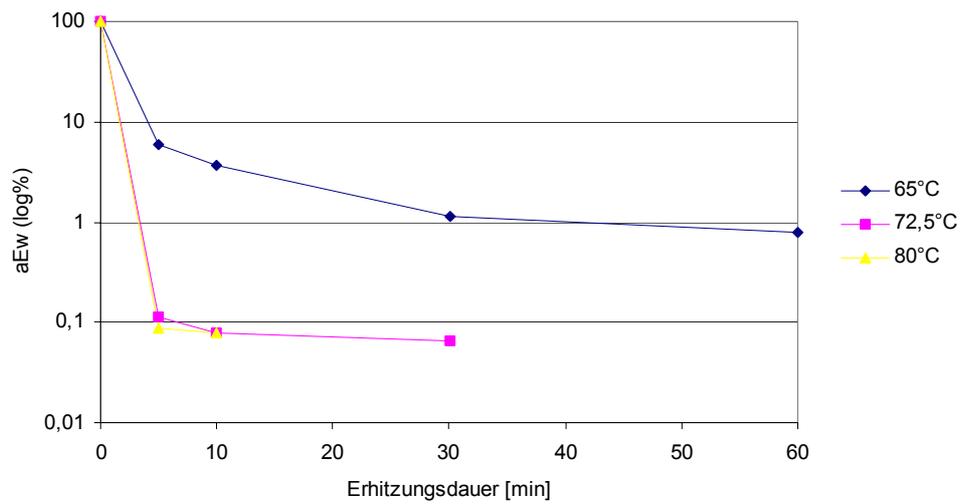
**Tab. 23: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Unterkeule auf die absolute Esterase-Restaktivität**

Dauer [min]	Absoluter Extinktionswert (aEw) <sup>1)</sup>								
	65°C (rohes Probengut)			72,5°C			80°C		
	NA (87,588)	NB (378,851)	IA (32,282)	NA	NB	IA	NA	NB	IA
1							0,167	0,303	0,090
2,5				0,250	0,329	0,137		0,053	
5	5,104	47,545	2,343	0,097	0,054	0,066	0,077	0,000	0,031
10	3,281	28,541	1,174	0,069	0,015	0,033	0,068	0,000	0,013
30	0,996	9,888	0,325	0,057	0,007	0,035			
60	0,682	7,503	0,209						

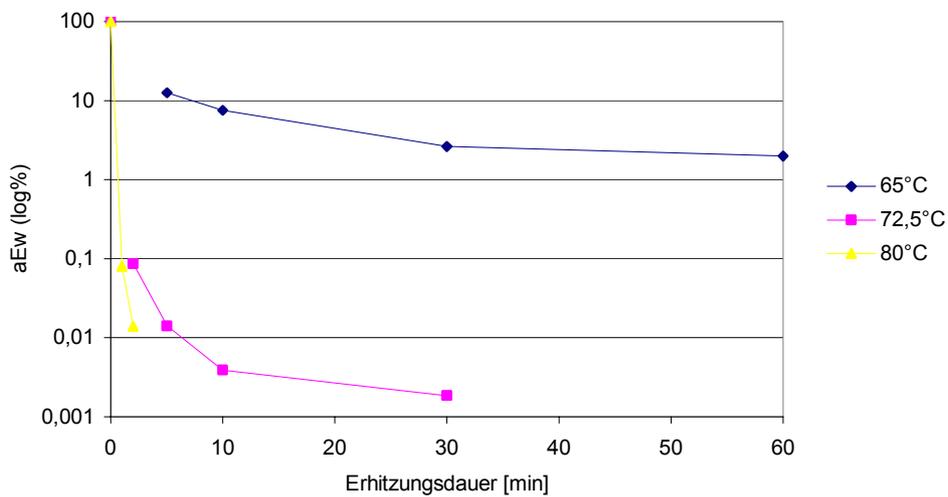
Erklärung: <sup>1)</sup> siehe Ausführungen unter 3.1.1 *Material und Methodik*

Bei den NB-Ansätzen resultieren bei 65°C/5 min mit 12,5% und bei 65°C/60 min mit 1,9% besonders hohe Restaktivitäten, die um mehr als das Doppelte über den NA- und IA-Ansätzen liegen. Bei der 72,5°C-Probe hingegen besteht wie bei Brustmuskulatur, Flügel und Oberkeule eine besonders niedrige Restaktivität. Die Absorption einer dem Regime 80°C/5 min näherkommenden Wärmemenge führt bereits zu einer so weitgehenden Inaktivierung der Esterase, dass unter den Bedingungen des Esterase-Tests ein negatives Ergebnis resultiert.

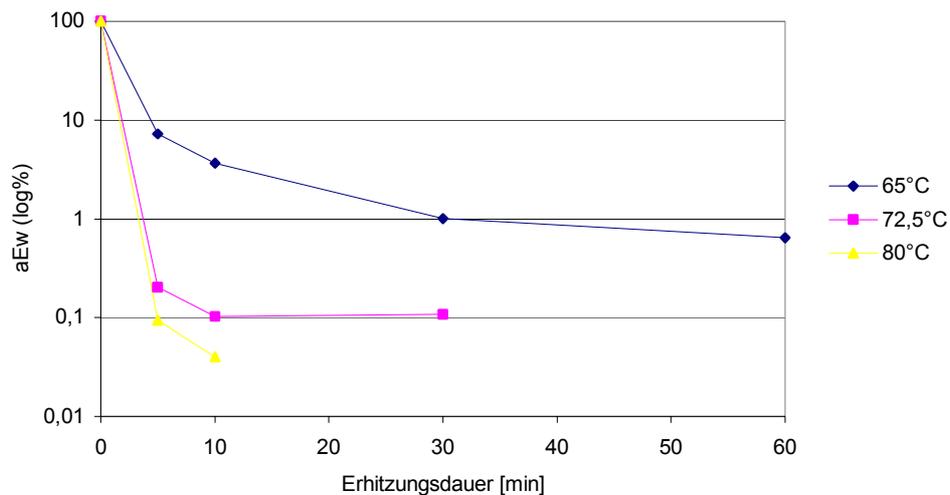
Während die IA-Ansätze bei den 65°C/5 min- und 65°C/60 min-Proben relativ niedrige Restaktivitäten zu erkennen geben, die mit 7,2 und 0,6% der Ausgangsaktivität unter den Vergleichsansätzen mit NA und NB liegen, werden bei 72,5°C/5 min und 80°C/5 min Restaktivitäten von 0,2 und 0,09% notiert.



**Abb. 39:** Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Unterkeule auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität



**Abb. 40:** Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Unterkeule auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität



**Abb. 41: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Unterkeule auf die mit IA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität**

### 3.1.2.5 Karkassenfleisch

Rohes Karkassenfleisch weist unter den geprüften Probenarten die dritthöchste NA- und NB-Aktivität auf, und zwar im Falle von NA mit einem aEw von 106,6 nach Leber und Flügel-muskulatur und im Falle von NB mit einem aEw von 486,4 nach Fettgewebe und Leber. Die IA-Ausgangsaktivität entspricht mit  $aEw = 31,4$  etwa dem Durchschnitt der IA-Ausgangsaktivitäten der geprüften Skelettmuskel-Proben.

Die Hitzeinaktivierung der Esterase verläuft bei den NA-Ansätzen des Karkassenfleisches ähnlich wie bei der Muskulatur von Flügel, Oberkeule und Unterkeule (Tab. 24; Abb. 42 bis 44). Die nach 5 min langem Einwirken von 65, 72,5 und 80°C errechnete Restaktivität beträgt 8,1, 0,1 und 0,09% der Ausgangsaktivität.

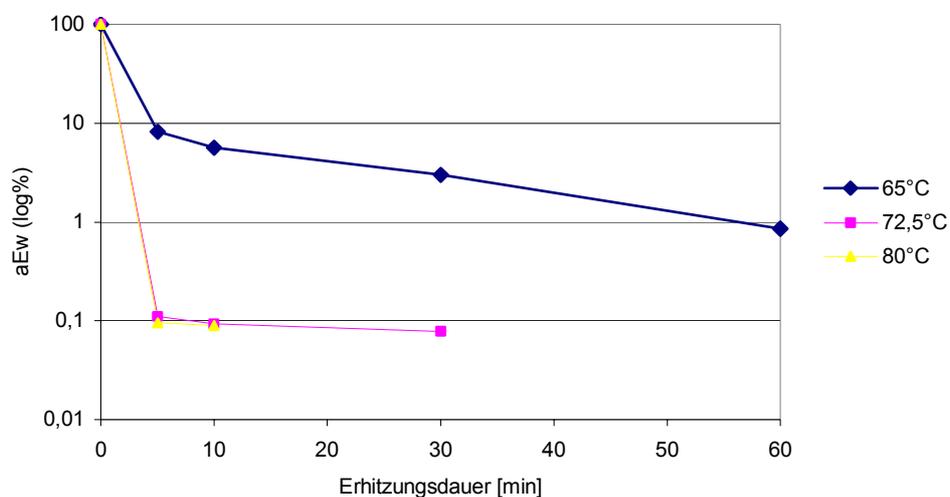
Auch der mit NB nachgewiesene Inaktivierungsverlauf ähnelt demjenigen bei Flügelmuskulatur, Oberkeule und Unterkeule. Durch ein 5 min langes Einwirken von 65°C verringert sich die Ausgangsaktivität auf 11%, von 72,5°C auf 0,03% und von 80°C auf 0,008%.

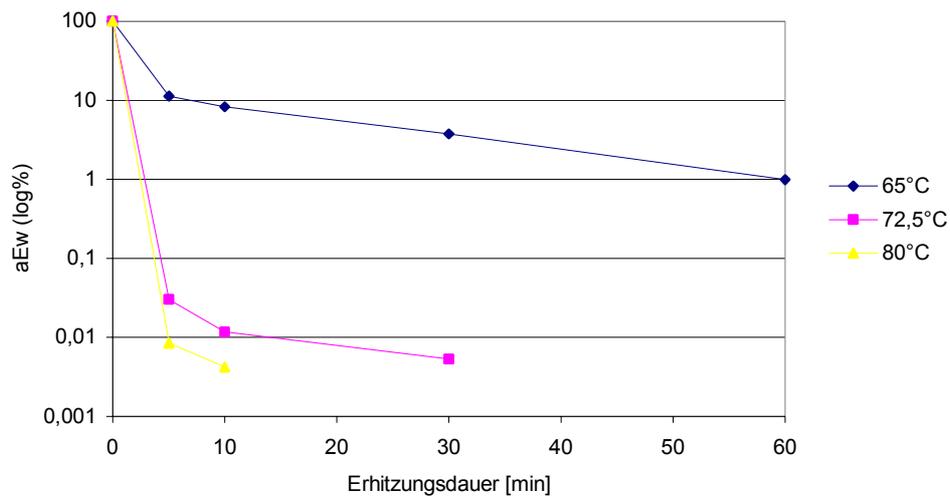
**Tab. 24: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Karkassenfleisches auf die absolute Esterase-Restaktivität**

Dauer [min]	Absoluter Extinktionswerte (aEw) <sup>1)</sup>								
	65°C			72,5°C			80°C		
	NA (106,607)	NB (486,479)	IA (31,455)	NA	NB	IA	NA	NB	IA
1							0,173	0,167	0,084
2,5				0,292	0,352	0,159			
5	8,679	54,557	7,656	0,119	0,147	0,053	0,102	0,041	0,034
10	5,984	40,392	4,752	0,099	0,057	0,033	0,096	0,021	0,027
30	3,179	18,092	2,343	0,083	0,026	0,018			
60	0,913	4,839	0,215						

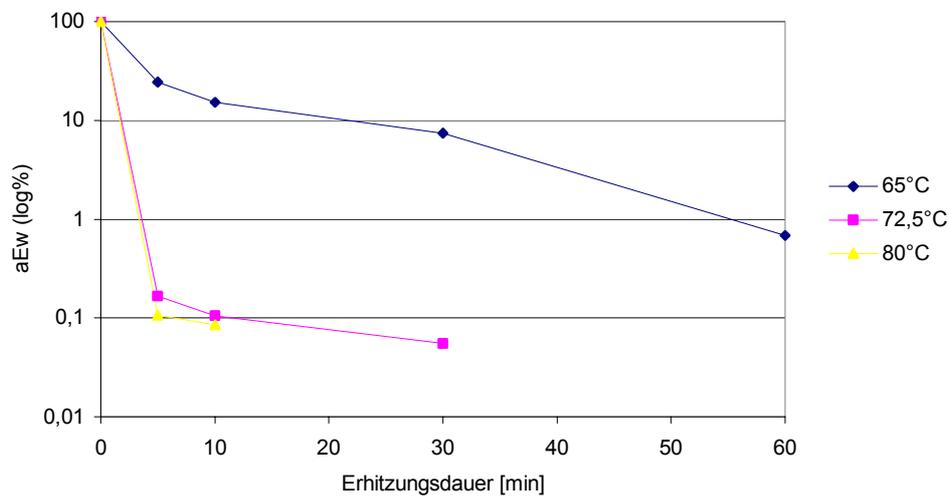
Erklärung: <sup>1)</sup> siehe Ausführungen unter 3.1.1 *Material und Methodik*

Bei den IA-Ansätzen ist vor allem hervorzuheben, dass die Restaktivität von 24% bei der 65°C/5 min-Probe weit über den Vergleichswerten mit NA und NB liegt und derjenigen von Fettgewebe gleichkommt. Die Restaktivität der 5 min bei 72,5°C und 80°C erhitzten Proben beträgt 0,16 und 0,1%.

**Abb. 42: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Karkassenfleisches auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität**



**Abb. 43:** Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Karkassenfleisches auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität



**Abb. 44:** Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Karkassenfleisches auf die mit IA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität

### 3.1.2.6 Leber

Leber weist mit  $aE_{W_{NA}} = 6975,96$ ,  $aE_{W_{NB}} = 5592,08$  und  $aE_{W_{IA}} = 2549,88$  zwar bei allen drei Substraten die mit sehr großem Abstand höchsten Ausgangsaktivitäten auf. Diese verringern sich jedoch schon durch ein 30 min langes Einwirken von 65°C und ein jeweils nur 5 min langes Einwirken von 72,5 und 80°C (Tab. 25; Abb. 45 bis 47) auf Restaktivitäten, die bei jedem der drei Substrate unter den Vergleichswerten des Brustmuskels liegen.

Die bei den NA-Ansätzen resultierende Restaktivität beträgt bei 65°C/5 min 13%, bei 65°C/60 min 1,5%, bei 72,5°C/5 min 0,5% und bei 80°C/5 min 0,007%.

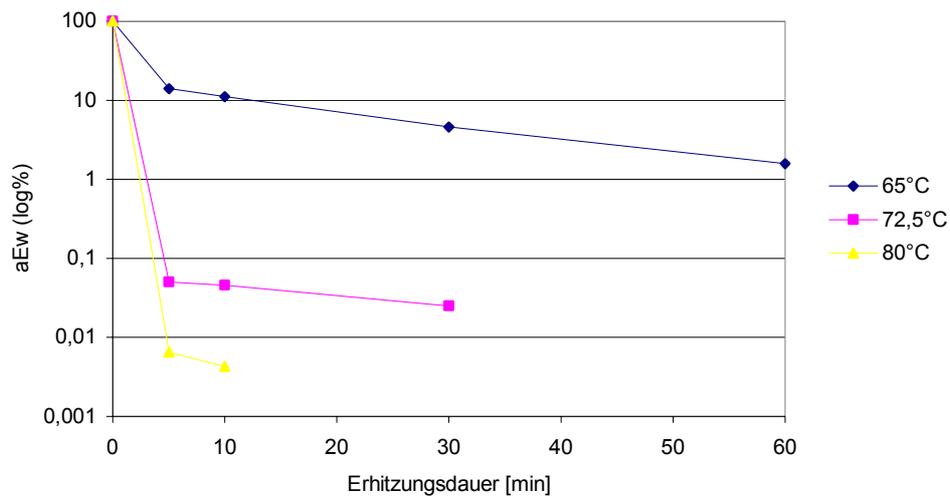
**Tab. 25: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Leber auf die absolute Esterase-Restaktivität**

Dauer [min]	Absoluter Extinktionswert (aEw) <sup>1)</sup>								
	65°C			72,5°C			80°C		
	NA (6975,96)	NB (5592,08)	IA (2549,88)	NA	NB	IA	NA	NB	IA
1							0,745	0,735	0,419
2,5				4,340	113,252	4,626			
5	968,468	1040,54	257,613	3,498	18,386	2,195	0,456	0,549	0,113
10	768,768	1464,46	120,544	3,190	10,710	0,985	0,298	0,470	0,180
30	319,820	77,077	46,662	1,738	4,437	0,550	0,132	0,251	0,029
60	109,610	173,423	34,024	1,095	4,310	1,463	0,083	0,208	0,013

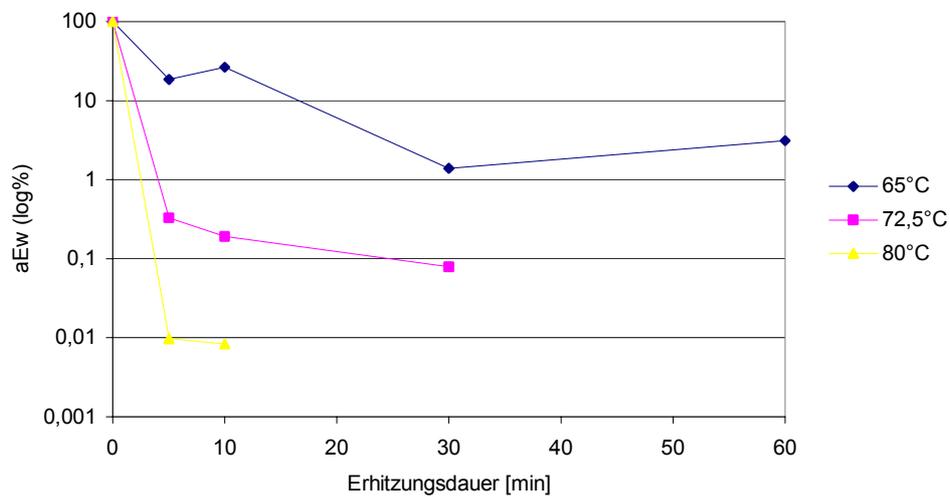
Erklärung: <sup>1)</sup> siehe Ausführungen unter 3.1.1 *Material und Methodik*

Wird von der erheblich längeren Inkubationsfrist der NB-Ansätze abgesehen, weisen diese bei hitzebehandelter Leber höhere Restaktivitäten auf als die NA-Ansätze. Sie betragen nach Einwirken von 65°C für die Dauer von 5 min 18%, und von 60 min 3,1% und nach einem 5 min langen Einwirken von 72,5 und 80°C 0,3 und 0,01%.

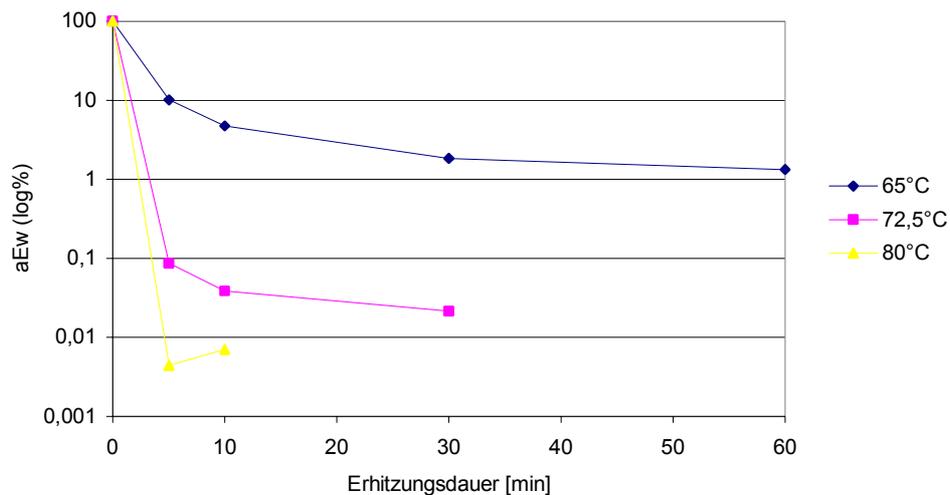
Die IA-Restaktivität beträgt bei 65°C/5 min 10%, bei 65°C/60min 1,3%, bei 72,5°C/5 0,08% und bei 80°C/5 min 0,004%.



**Abb. 45: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Leber auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität**



**Abb. 46: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Leber auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität**



**Abb. 47: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung der Leber auf die mit IA nachgewiesene Esterase-Restaktivität**

### 3.1.2.7 Fettgewebe

Die beim rohen Fettgewebe mit NA und IA resultierenden absoluten Extinktionswerte liegen mit 32,5 und 14,1 deutlich unter den Vergleichswerten der Skelettmuskelproben, mit NB nachgewiesene aEw von 1254,0 überschreitet hingegen die Vergleichswerte der geprüften Skelettmuskulatur erheblich.

Die mit NA bei der 65°C/5 min-Probe ermittelte Restaktivität liegt mit 27% außerordentlich hoch, mit 0,25% bei 72,5°/5 min und mit 0,05% bei 80°C/5 min hingegen meist sehr nahe bei den Vergleichswerten der Skelettmuskulatur.

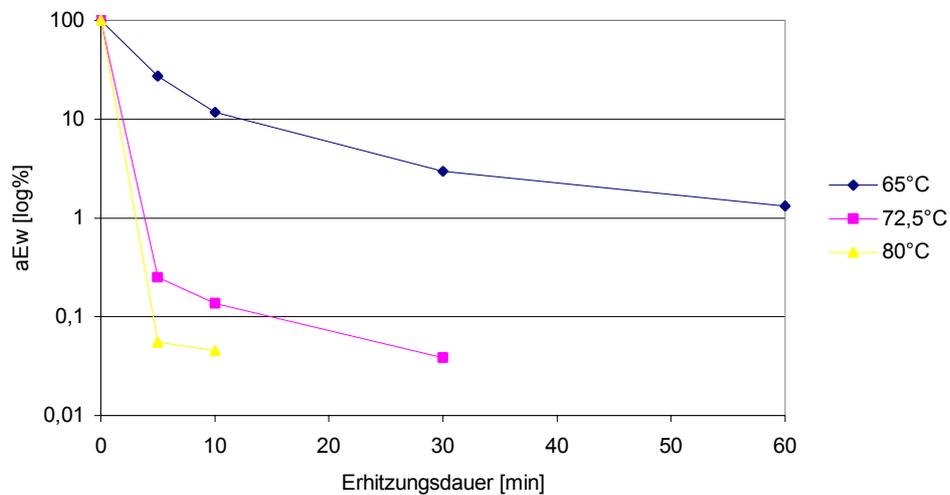
Mit NB resultieren beim hitzebehandelten Probengut generell geringere Restaktivitäten als mit NA. Sie betragen bei den jeweils 5 min bei 65, 72,5 und 80°C erhitzten Proben 7, 0,02 und 0,002% der Ausgangsaktivität.

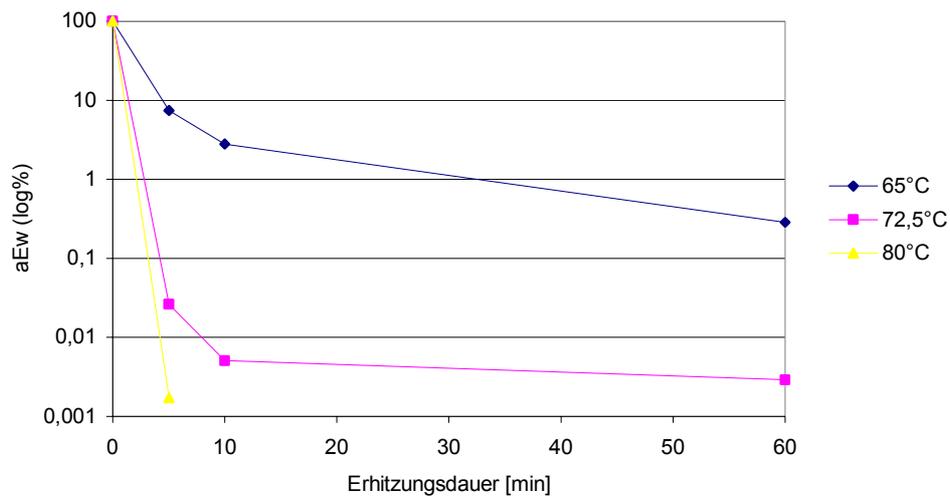
Bei 65°C/5 min besteht mit 26% die höchste aller in dieser Arbeit mit IA ermittelten Restaktivitäten. Die Restaktivität von 5 min bei 72,5 und 80°C erhitztem Fettgewebe liegt immerhin noch im Größenbereich von 0,9 bzw. 0,2%.

**Tab. 26: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Fettgewebes auf die absolute Esterase-Restaktivität**

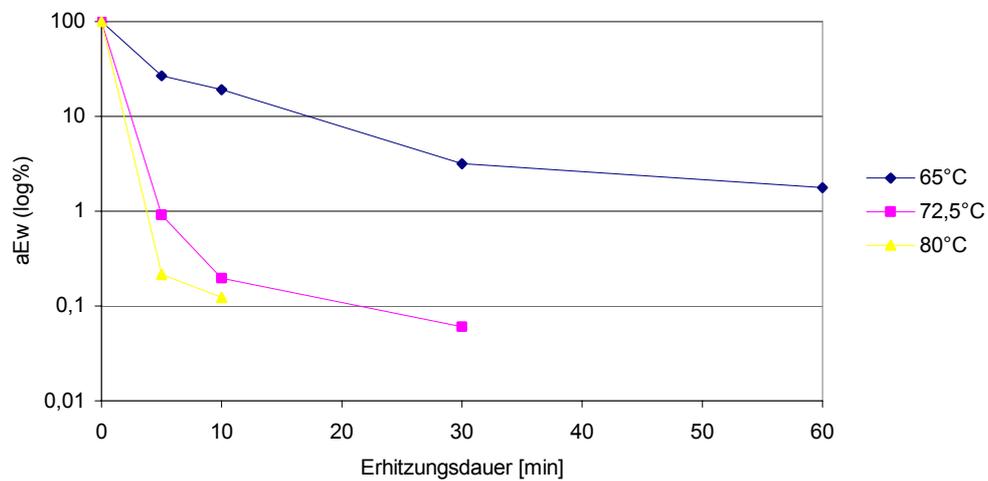
Dauer [min]	Absoluter Extinktionswert (aEw) <sup>1)</sup>								
	65°C			72,5°C			80°C		
	NA (32,533)	NB (1254,04)	IA (14,072)	NA	NB	IA	NA	NB	IA
1							0,194	0,407	0,141
2,5				0,238	0,721	0,212			
5	8,844	93,266	3,768	0,082	0,332	0,129	0,018	0,022	0,030
10	3,795	35,133	2,679	0,045	0,064	0,028	0,016	0,000	0,017
30	0,963	5,876	0,446	0,013	0,000	0,009			
60	0,429	3,576	0,248						

Erklärung: <sup>1)</sup> siehe Ausführungen unter 3.1.1 *Material und Methodik*

**Abb. 48: Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Fettgewebes auf die mit NA nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität**



**Abb. 49:** Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Fettgewebes auf die mit NB nachgewiesene absolute Esterase-Restaktivität



**Abb. 50:** Einfluss von Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung des Fettgewebes auf die mit IA nachgewiesenen absolute Esterase-Restaktivität

### 3.1.2.8 Synopse

Der Verlauf der Hitzeinaktivierung der Carbesterase als Funktion einer jeweils 5 min langen und in niedriger Temperaturstufe erfolgenden Hitzebehandlung der geprüften Probenarten bei 65 bis 85°C und die hierbei resultierenden absoluten Extinktionswerte sind aus Tabelle 27 und den Abbildungen 51 bis 57 zu ersehen.

**Tab. 27: Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung von Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Restaktivität**

Temperatur [°C]	Absoluter Extinktionswert (aEw) <sup>1)</sup>						
	Brustmuskel	Flügel	Oberkeule	Unterkeule	Karkasse	Leber	Fettgewebe
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	NB IA	NB IA	NB IA	NB IA	NB IA	NB IA	NB IA
Kontrolle (roh)	73,07	148,1	83,08	87,58	106,6	6975	32,53
	228,1	396,0	387,4	378,8	486,4	5592	1254
	21,39	51,73	37,66	32,28	31,45	2549	14,07
65	0,913	8,140	4,268	5,104	8,679	968,4	8,844
	3,296	79,38	26,78	47,54	54,55	1040	93,26
	1,133	5,473	2,404	2,343	7,656	257,4	3,768
67,5	0,495	3,823	1,936	3,190	3,581	507,5	3,548
	1,893	30,22	15,42	27,84	20,33	655,1	32,25
	0,182	2,750	1,106	1,199	2,283	85,54	2,057
70	0,288	0,382	0,381	0,497	0,354	41,02	0,273
	0,278	0,392	0,675	0,497	0,371	327,5	0,773
	0,170	0,339	0,295	0,313	0,176	17,49	0,346
72,5	0,204	0,203	0,076	0,097	0,119	3,498	0,082
	0,259	0,187	0,087	0,054	0,147	18,386	0,332
	0,136	0,122	0,028	0,066	0,053	2,195	0,129
80	0,204	0,144	0,051	0,077	0,102	0,456	0,018
	0,069	0,002	0,003	0,000	0,041	0,549	0,022
	0,093	0,086	0,009	0,031	0,034	0,113	0,030
85	0,162	0,137	0,064	0,050	0,082	0,201	0,017
	0,056	0,021	0,001	0,007	0,038	0,205	0,000
	0,057	0,102	0,026	0,000	0,035	0,061	0,002

Erklärung: <sup>1)</sup> siehe Ausführungen unter 3.1.1 *Material und Methodik*

Von den für die Aussagekraft des Esterase-Tests bei Erzeugnissen aus Putenfleisch besonders wichtigen Ergebnissen der Versuchsreihe 3.1 *Darstellung der Dynamik der Hitzeinaktivierung der Esterase* ist hinsichtlich des Einflusses der Pasteurisation auf die Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute folgendes hervorzuheben:

Die mit außerordentlich großem Abstand höchste Ausgangsaktivität weist mit jedem der geprüften Substrate gemäß Tabelle 27 Leber auf, danach mit NB das Fettgewebe. Beim Ske-

lettmuskelfleisch bestehen bezüglich der mit NA, NB und IA nachweisbaren Ausgangsaktivitäten keine sonderlich großen Unterschiede.

Werden die beim rohen Probengut durch ihre Extinktion definierten Esterase-Aktivitäten der jeweiligen Verdünnung der Probeneinwaage entsprechend in direkt vergleichbare absolute Extinktionswerte ( $aE_w$ ) umgerechnet, so ergeben sich maßgeblich der Daten in Tabelle 27 folgende der Bezugsverdünnung 1:11 bzw. 1:4 entsprechende Ausgangsaktivitäten:

Brustmuskel:	$aE_{w_{NA}} = 73,073,$	$aE_{w_{NB}} = 228,1,$	$aE_{w_{IA}} = 21,935,$
Flügel:	$aE_{w_{NA}} = 148,148,$	$aE_{w_{NB}} = 396,072,$	$aE_{w_{IA}} = 51,737,$
Oberkeule:	$aE_{w_{NA}} = 83,083,$	$aE_{w_{NB}} = 387,461,$	$aE_{w_{IA}} = 37,663,$
Unterkeule:	$aE_{w_{NA}} = 87,588$	$aE_{w_{NB}} = 378,851,$	$aE_{w_{IA}} = 32,282.$
Karkassenfleisch:	$aE_{w_{NA}} = 106,607,$	$aE_{w_{NB}} = 486,479,$	$aE_{w_{IA}} = 31,455,$
Leber:	$aE_{w_{NA}} = 6975,96,$	$aE_{w_{NB}} = 5592,08,$	$aE_{w_{IA}} = 2549,88,$
Fettgewebe:	$aE_{w_{NA}} = 32,533,$	$aE_{w_{NB}} = 1254,04,$	$aE_{w_{IA}} = 14,072.$

In diese absoluten Extinktionswerte nicht eingerechnet ist zu Gunsten des dadurch erleichterten Vergleichs beim Taxieren der Resultate in den anderen Versuchsreihen, dass die Ansätze mit NA nur 1 h, diejenigen mit NB und IA hingegen 3 h inkubiert werden.

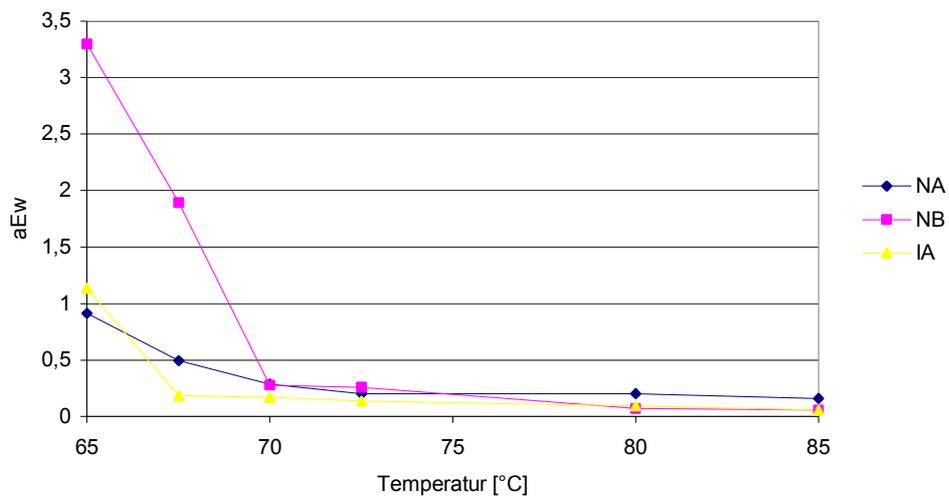
Nach Vorschrift der USDA-FSIS (1996) sind Erzeugnisse aus Putenfleisch dann als ausreichend pasteurisiert zu beurteilen, wenn im Kern eine Mindesttemperatur von  $71,1^\circ\text{C}$  auch nur soeben erreicht wird. Beim Esterase-Test weisen die Restaktivitäten der  $72,5^\circ\text{C}/2,5$  min-Chargen nachstehende absoluten Extinktionswerte auf:

Brustmuskel:	$AE_{w_{NA}} = 0,278,$	$aE_{w_{NB}} = 0,303,$	$aE_{w_{IA}} = 0,142$
Flügelmuskulatur:	$aE_{w_{NA}} = 0,266,$	$aE_{w_{NB}} = 0,305,$	$aE_{w_{IA}} = 0,195$
Oberkeule:	$aE_{w_{NA}} = 0,209,$	$aE_{w_{NB}} = 0,087,$	$aE_{w_{IA}} = 0,133$
Unterkeule:	$aE_{w_{NA}} = 0,250,$	$aE_{w_{NB}} = 0,329,$	$aE_{w_{IA}} = 0,137$
Karkassenfleisch:	$aE_{w_{NA}} = 0,292,$	$aE_{w_{NB}} = 0,352,$	$aE_{w_{IA}} = 0,159$
Leber:	$aE_{w_{NA}} = 4,340,$	$aE_{w_{NB}} = 113,252,$	$aE_{w_{IA}} = 4,626$
Fettgewebe:	$aE_{w_{NA}} = 0,238,$	$aE_{w_{NB}} = 0,721,$	$aE_{w_{IA}} = 0,212$

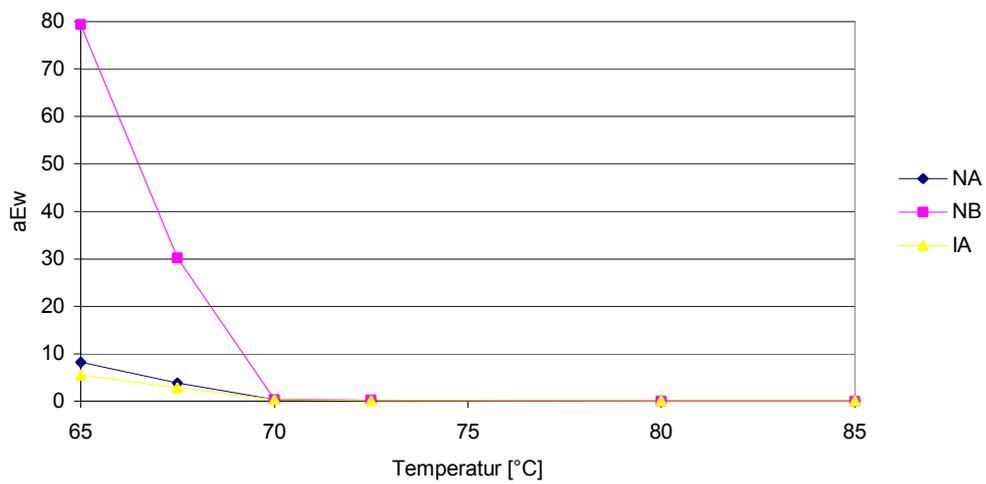
Für die Gewährleistung sowohl eines vorhaltend hohen Maßes an gesundheitlicher Sicherheit als auch der vom Handel geforderten Mindesthaltbarkeit von 2 bis 3 Wochen wird das pasteurisierte Fleischwaren-Sortiment schon seit langem wesentlich intensiver als lediglich auf eine Kerntemperatur von  $71,1^\circ\text{C}$  erhitzt. Die Auswirkung einer auf diese Sicherheiten besonders konservativ ausgelegten Hitzebehandlung bei  $F_{80} = 5$  auf die bei den geprüften Probenarten mit NA, NB und IA resultierenden Extinktionswerte ist nachstehender Gegenüberstellung zu entnehmen.

---

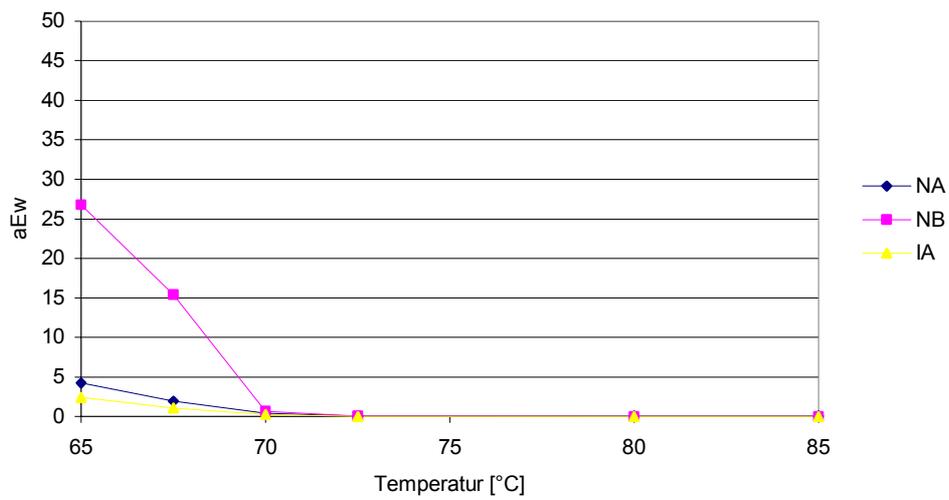
Brustmuskel:	$E_{NA} = 0,204,$	$E_{NB} = 0,069,$	$E_{IA} = 0,093$
Flügel:	$E_{NA} = 0,144$	$E_{NB} = 0,002$	$E_{IA} = 0,086$
Oberkeule:	$E_{NA} = 0,051$	$E_{NB} = 0,003$	$E_{IA} = 0,009$
Unterkeule:	$E_{NA} = 0,077$	$E_{NB} = 0,000$	$E_{IA} = 0,031$
Karkassenfleisch:	$E_{NA} = 0,102,$	$E_{NB} = 0,041,$	$E_{IA} = 0,034$
Leber:	$E_{NA} = 0,456,$	$E_{NB} = 0,549,$	$E_{IA} = 0,113$
Fettgewebe:	$E_{NA} = 0,018,$	$E_{NB} = 0,022,$	$E_{IA} = 0,030$



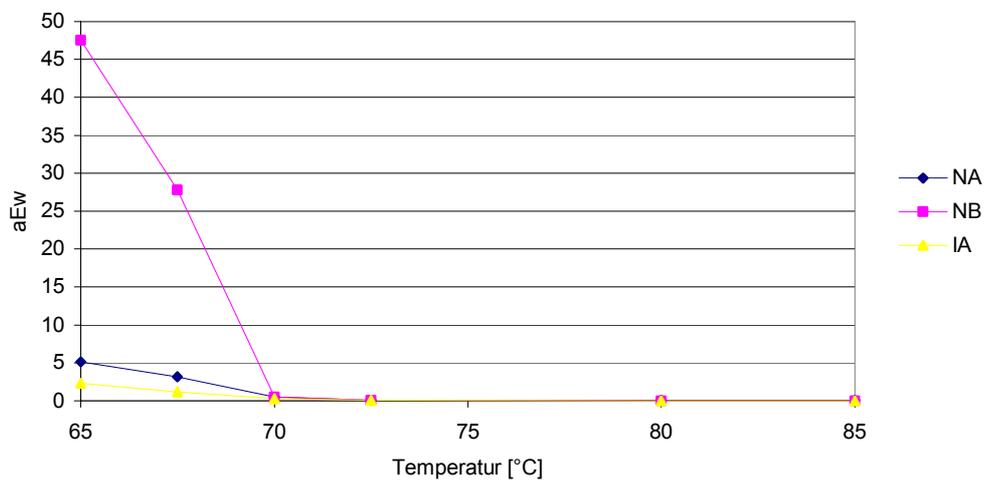
**Abb. 51:** Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung des Brustmuskels bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität



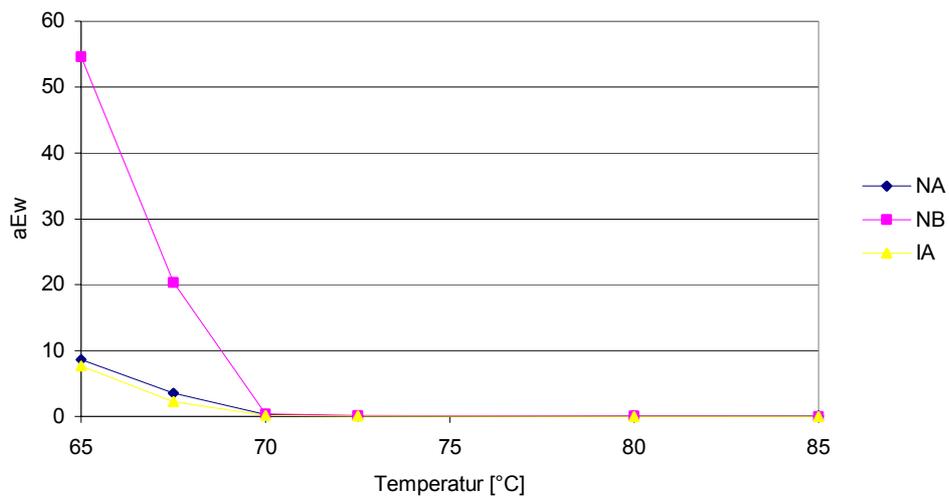
**Abb. 52:** Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung der Flügelmuskulatur bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität



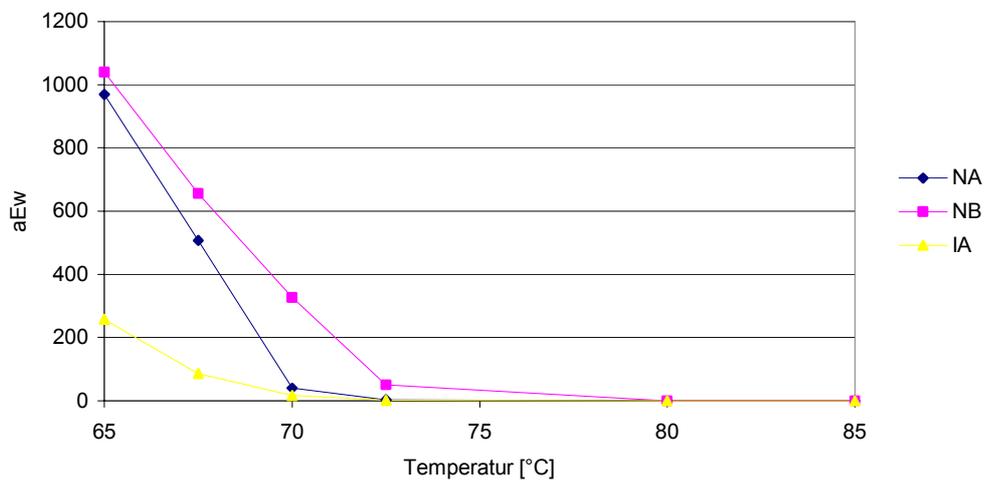
**Abb. 53:** Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung der Oberkeule bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität



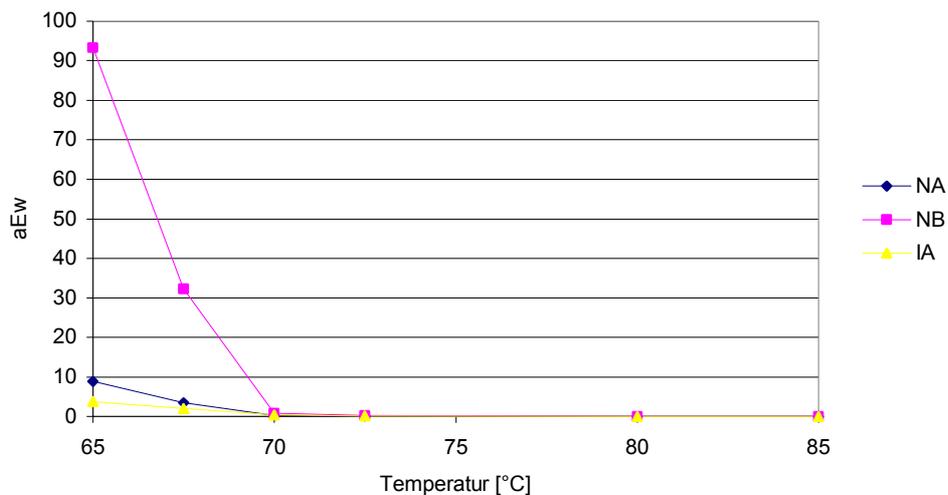
**Abb. 54:** Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung der Unterkeule bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität



**Abb. 55:** Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung des Karkassenfleisches bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität



**Abb. 56:** Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung der Leber bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität



**Abb. 57: Einfluss einer 5 min langen gestuften Erhitzung des Fettgewebes bei 65 bis 85°C auf die absolute Esterase-Aktivität**

Wie sich aus Tabelle 27 und den Abbildungen 51 bis 57 des weiteren ersehen lässt, verringert sich die Esterase-Restaktivität in Folge des jeweils 5 min langen Erhitzens bei Temperaturen von 65 bis 85°C bis zur Schwelle von 70°C bei jeder Probenart und – mit Ausnahme der IA-Ansätze von Brustmuskel und der NB-Ansätze von Leber – bei jedem Substrat faktisch linear. Die Steigerung der Hitzebehandlung auf 75 bis 85°C führt je nach Probengut und Substrat zu folgenden Feststellungen.

Bei den **NA-Ansätzen** führt die Erhöhung der Temperatur von 70 auf 72,5°C bei der Leber zu einer Verringerung des aEw von 41 auf 3,5, bei den anderen Probenarten zu einer Verringerung um einen aEw –Betrag von 0,080 bis 0,400. Die lediglich bei der Leber noch sehr hohe und nur noch bei der Flügelmuskulatur und dem Brustmuskel noch deutlich nachweisbare Restaktivität verringert sich bei der Leber infolge der Temperaturerhöhung auf 85°C von aEw = 3,5 auf 0,201 und bei den beiden Skelettmuskelproben von aEw = 0,204 auf 0,162 bzw. von aEw = 0,203 auf 0,137.

Die bei den **NB-Ansätzen** resultierende Differenz der absoluten Extinktionswerte der Esterase-Restaktivität liegt im Gegensatz zu den NA-Ansätzen sowohl zwischen 70 und 72,5°C als auch zwischen 72,5 und 85°C stets über aEw = 0,080. Geringere Differenzen resultieren zwischen 70 und 72,5°C lediglich beim Brustmuskel und zwischen 72,5 und 85°C bei der Unterkeule. Beachtlichere Aktivitätsverluste manifestieren sich im Temperaturbereich über 80°C nur noch bei der Leber. Die absoluten Extinktionswerte des 5 min bei 65 bis 70°C erhitzten Probengutes liegen bei den NB-Ansätzen größtenteils über denjenigen der Vergleichsansätze mit NA, hingegen bei den 72,5°C-Ansätzen von Flügel und Unterkeule und –

mit Ausnahme der Leber - bei den auf  $\geq 80^{\circ}\text{C}$  erhitzten Ansätzen unter den Ergebnissen mit NA.

Bei den **IA-Ansätzen** hat die Temperaturerhöhung von  $70$  auf  $72,5^{\circ}\text{C}$  beim Brustmuskel eine Verringerung der absoluten Extinktionswerte um  $aEw = 0,034$ , bei den anderen Probenarten um  $aEw \sim 0,200$  zur Folge. Eine weitere Erhöhung auf  $80^{\circ}\text{C}$  führt bei den Skelettmuskel-Proben zu einer Verringerung des absoluten Extinktionswertes um  $aEw = 0,019$  bis  $0,045$ , bei der Leber um  $aEw = 2,082$  und beim Fettgewebe um  $aEw = 0,099$ .

Von besonderer Bedeutung sind folgende Feststellungen:

Die höchsten Restaktivitäten resultieren – wenn von Leber abgesehen wird – von der Temperaturschwelle  $72,5^{\circ}\text{C}$  an beim Brustmuskel und der Flügelmuskulatur, und zwar sowohl mit NA als auch mit IA, von  $80^{\circ}\text{C}$  an zusätzlich mit NB. Bei der Flügelmuskulatur liegen die mit IA ermittelten Extinktionswerte bei den auf  $85^{\circ}\text{C}$  erhitzten Chargen sogar über denjenigen der Vergleichsansätze mit Leber.

Die beim Brustmuskel höchsten Extinktionen werden – cum grano salis und Leber wiederum ausgenommen – mit NA bei den auf zumindest  $72,5^{\circ}\text{C}$ , mit NB auf zumindest  $80^{\circ}\text{C}$  und mit IA auf  $72,5$  bis  $80^{\circ}\text{C}$  erhitzten Chargen gemessen.

Dass die höchsten Restaktivitäten nach der Leber beim Brustmuskel bestehen, ist hinsichtlich der Aussagekraft des Esterase-Tests bei zusammengesetzten Erzeugnissen aus zerkleinertem Putenfleisch grundsätzlich insofern von Bedeutung, als die mit NA und IA beim rohen Brustmuskel nachgewiesene Ausgangsaktivität unter den 6 anderen Probenarten am zweitniedrigsten und die mit NB nachgewiesene Ausgangsaktivität sogar am niedrigsten liegt.

Die bei Fettgewebe mit NB nachweisbare Esterase-Restaktivität liegt bei der  $72,5^{\circ}\text{C}$ -Charge im Größenordnungsbereich der Skelettmuskulatur, bei der  $80^{\circ}\text{C}$ -Charge darunter.

Die des öfteren auftretenden Unregelmäßigkeiten in den Kurvenverläufen können sowohl auf subjektiv wie objektiv bedingte Fehler zurückzuführen sein. Zu den mit Abstand wichtigsten Fehlermöglichkeiten zählen nach der Entmischung der schwerer löslichen Substrate NB und IA subjektiv bedingte Fehler beim Homogenisieren und Hitzekonditionieren der Modellchargen.

### 3.2 Einfluss der Pasteurisation bei 80°C/5 min auf die Esterase-Restaktivität und den Restkeimgehalt bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute

Ziel jeglicher Pasteurisation ist die Inaktivierung der vegetativen Mikroflora, bei Lebensmitteln insbesondere der nicht Sporen bildenden pathogenen Bakterien. Während Fleisch und Fleischerzeugnisse für die Haltbarmachung mit Wirkung einer effizienten Pasteurisation nach REICHERT und Mitarb. (1979; 1988) hierfür dem Erhitzungsregime von  $F_{70} = 30$  bis 80 entsprechend hitzegegart werden müssen, schreiben die Richtlinien der USDA-FSIS (1996) bei hitzegegartem Erzeugnissen aus Putenfleisch unabhängig von deren jeweiligem geometrischem Querschnitt lediglich das Erreichen einer Mindesttemperatur von 71,1°C im Kern vor. In den nachstehend dargelegten Studien wird geprüft, welche Esterase-Restaktivitäten und welche Restkeimgehalte bei pasteurisierter Skelettmuskulatur verschiedener anatomischer Provenienz sowie bei Leber und Fettgewebe der Pute resultieren, nachdem das Probengut jeweils dem Hitzeeffekt von  $F_{80} = 5$  entsprechend hitzebehandelt wurde.

#### 3.2.1 Material und Methodik

Gemäß 2.1.1 *Probengut* wird aus der laufenden Produktion eines Pute verarbeitenden Unternehmens von zumindest 5 Puten stammendes Probenmaterial von Brustmuskel, Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Karkasse, Leber und Fettgewebe unter hygienischen Kautelen zu 5 homogenen Sammelproben von je 1000 g aufbereitet. Die Proben werden bei  $F_{80} = 5$  – dies kommt einem  $F_{70} = 50$  gleich - erhitzt. Um sicherzustellen, dass die Temperatur des Wasserbades beim Einbringen des Probenbeutels nicht auch nur für wenige Sekunden unter 80°C fällt, wird das Wasserbad vorhaltend auf  $81 \pm 0,5^\circ\text{C}$  eingestellt. Die auf diese Weise standardisierten Sammelproben werden vor und nach dem Erhitzen auf ihre Esterase-Aktivität und gemäß 1.4 *Bestimmung des Keimgehaltes* auf ihren Gehalt an aeroben mesophilen Keimen, an Streptokokken des Serotyps D sowie an aeroben Sporen untersucht. Zudem wird von jeder Sammelprobe der Gehalt an Rohprotein, Gesamtfettgehalt und Trockenmasse gemäß L06.00.7, L06.00.6 und L06.00.3 der Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG bestimmt.

#### 3.2.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Der Gehalt der Sammelproben an Rohprotein, Gesamtfettgehalt und Asche ist in Tabelle 28 wiedergegeben, der Einfluss der Pasteurisation des Probengutes auf die Esterase-

Restaktivität und den Restkeimgehalt in den Tabellen 29 bis 36. Den Daten ist folgendes zu entnehmen.

Wird beim nicht erhitzten Probengut von der Ausnahme abgesehen, dass die beim Brustmuskel mit NB ermittelten Ausgangsaktivitäten über den Vergleichswerten bei der Oberkeule liegen, so nimmt sowohl die mit NA, als auch mit NB und IA ermittelte Esterase-Aktivität in der Reihenfolge Leber, Flügel, Karkasse, Unterkeule, Oberkeule, Brustmuskel und Fettgewebe ab. Bei den 5 min bei 80°C pasteurisierten Proben hingegen lautet die Reihenfolge - mit Ausnahme der beim Fettgewebe sehr geringgradig höheren NB-Resultate als beim Karkassenfleisch - Leber, Brust, Flügel, Karkasse, Oberkeule, Unterkeule und Fettgewebe.

Die mit extremem Abstand höchsten Esterase-Aktivitäten ergeben sich mit jedem der 3 Substrate bei roher sowie pasteurisierter Leber, die niedrigsten - mit Ausnahme der NB-Ansätze des hitzebehandelten Probengutes - beim rohen und hitzebehandelten Fettgewebe. Die Esterase-Aktivitäten der rohen resp. erhitzten Leber liegen bei den NA-Ansätzen gegenüber den Vergleichswerten beim Fettgewebe um das 532- resp. 25-fache, bei den NB-Ansätzen um das 91- resp. 70-fache und bei den IA-Ansätzen um das 160- resp. 81-fache höher. Die mit NA ermittelten Esterase-Aktivitäten streuen mit Ausnahme der Leber deutlich weniger als mit NB und insbesondere IA. Dies zeigt sich besonders deutlich beim Brustmuskel, bei dem die Variationskoeffizienten der NA-, NB- und IA-Resultate mit VK = 4,8, 9,9 und 17,1 am niedrigsten liegen.

Ein Zusammenhang zwischen der Esterase-Restaktivität des Probengutes und insbesondere dessen Gesamtfettgehalt wird nicht manifest.

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung des rohen und beim Regime 80°C/5 min sehr vorhaltend pasteurisierten Probengutes zeigen, dass die höchste Kontamination bei einer aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl von  $5,8 \times 10^7$  KBE/g bei roher Karkasse besteht, und der mit  $2,2 \times 10^5$  KBE/g höchste Gehalt an aeroben Sporenbildnern und mit  $1,1 \times 10^4$  KBE/g an D-Streptokokken beim rohen Fettgewebe. Durch die Pasteurisation des Probengutes verringert sich die Gesamtkeimzahl inklusive der Sporen auf 0 bis  $7 \times 10^2$  KBE/g, die Zahl der aeroben Sporen auf 0 bis  $6 \times 10^2$  KBE/g und die Zahl der D-Streptokokken auf 0 KBE/g.

**Abb. 28: Gehalt der Sammelproben von Brustmuskel, Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Karkassenfleisch, Leber und Fettgewebe an Rohprotein, Gesamtfettgehalt und Asche**

Probe	Nr.	Rohprotein [%]	Gesamtfettgehalt [%]	Trockenmasse [%]
Brustmuskel	1	25,53	1,28	26,81
	2	24,8	0,9	25,66
	3	24,5	0,96	26
	4	24,8	1,2	26,2
	5	24,86	3,07	28,1
	MW	24,90	1,48	26,55
Flügelmuskulatur	1	25,53	1,28	26,81
	2	24,8	0,9	25,66
	3	24,5	0,96	26
	4	24,8	1,2	26,2
	5	24,86	3,07	28,1
	MW	24,90	1,48	26,55
Oberkeule	1	19,65	12,25	32,41
	2	19,61	8,41	29,11
	3	18,49	14,22	33,67
	4	19,1	10,56	30,05
	5	19,04	11,04	31,23
	MW	19,18	11,30	31,29
Unterkeule	1	19,01	10,54	30,33
	2	18,46	7,64	26,78
	3	17,65	11,5	30,18
	4	19,28	7,68	27,95
	5	18,87	7,95	27,3
	MW	18,65	9,06	28,51
Karkassenfleisch	1	16,13	19,87	37,02
	2	16,22	19,86	37,29
	3	15,9	20,1	37,58
	4	16,06	20,38	37,57
	5	15,86	20,73	38,01
	MW	16,034	20,188	37,494
Leber	1	20,76	3,79	26,73
	2	20,68	3,7	25,95
	3	20,27	3,7	25,44
	4	21,4	3,52	28,94
	5	20,11	6,23	27,66
	MW	20,64	4,19	26,94
Fettgewebe	1	5,71	62,16	69,08
	2	7,71	59,67	69,16
	3	9,42	57,63	68,4
	4	8,22	59,85	69,83
	5	6,34	63,65	72,43
	MW	7,48	60,592	69,78

Erklärung: MW = arithmetischer Mittelwert

**Tab. 29: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Brustmuskel der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei  $F_{80} = 5$** 

	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Keimgehalt [KBE/g]			
	NA	NB	IA	GKZ	S	D	
roh	1	51,051 <sup>1)</sup>	198,035 <sup>1)</sup>	9,105 <sup>1)</sup>	$1 \times 10^6$	$4,8 \times 10^3$	$4,5 \times 10^1$
	2	52,052	232,476	32,282	$1,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$	$9,4 \times 10^2$
	3	60,06	215,256	10,76	$5,3 \times 10^6$	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^2$
	4	56,056	241,087	31,454	$5,3 \times 10^6$	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^2$
	5	47,047	232,476	25,66	$9,3 \times 10^5$	$4,2 \times 10^3$	$2 \times 10^1$
	MW	53,25	223,87	21,85			
	VK	9,3	7,7	51,2			
erhitzt	1	0,190 <sup>2)</sup>	0,053 <sup>2)</sup>	0,081 <sup>2)</sup>	$7 \times 10^2$	$6 \times 10^2$	0
	2	0,171	0,051	0,068	$1 \times 10^2$	$2 \times 10^2$	0
	3	0,181	0,042	0,057	$1 \times 10^2$	$2 \times 10^2$	0
	4	0,170	0,051	0,072	$1 \times 10^2$	$5 \times 10^2$	0
	5	0,173	0,055	0,053	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^2$	0
	MW	0,177	0,050	0,066			
	VK	4,8	9,9	17,1			

Erklärungen: <sup>1)</sup> absoluter Extinktionswert gemäß 3.1.1 *Material und Methodik*; <sup>2)</sup> gemessene Extinktion; GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; S = aerobe Sporenbildner; D = D-Streptokokken (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*); MW = arithmetischer Mittelwert; VK = Variationskoeffizient

**Tab. 30: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Flügelmuskulatur der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei  $F_{80} = 5$** 

	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Keimgehalt [KBE/g]			
	NA	NB	IA	GKZ	S	D	
roh	1	125,125 <sup>1)</sup>	464,953 <sup>1)</sup>	113,401 <sup>1)</sup>	$9 \times 10^5$	$4 \times 10^1$	$3,8 \times 10^2$
	2	99,099	249,697	87,741	$6,3 \times 10^4$	$1 \times 10^1$	$6 \times 10^1$
	3	73,073	749,091	69,531	$1,8 \times 10^5$	$1 \times 10^1$	$2,6 \times 10^2$
	4	109,109	198,035	174,655	$1,2 \times 10^6$	$3,6 \times 10^1$	$6 \times 10^2$
	5	101,101	439,122	88,569	$8,7 \times 10^5$	$1 \times 10^1$	$3 \times 10^1$
	MW	101,5	420,1	106,7			
	VK	18,6	51,7	38,4			
erhitzt	1	0,142 <sup>2)</sup>	0,019 <sup>2)</sup>	0,015 <sup>2)</sup>	0	$1 \times 10^1$	0
	2	0,12	0,059	0,059	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^2$	0
	3	0,083	0,03	0,04	0	0	0
	4	0,097	0,023	0,046	$2 \times 10^1$	0	0
	5	0,1	0,029	0,053	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	0
	MW	0,108	0,032	0,042			
	VK	21,2	49,2	39,9			

Erklärungen: <sup>1)</sup> absoluter Extinktionswert gemäß 3.1.1 *Material und Methodik*; <sup>2)</sup> gemessene Extinktion; GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; S = aerobe Sporenbildner; D = D-Streptokokken (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*); MW = arithmetischer Mittelwert; VK = Variationskoeffizient

**Tab. 31: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Oberkeule der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei  $F_{80} = 5$** 

	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Keimgehalt [KBE/g]			
	NA	NB	IA	GKZ	S	D	
roh	1	45,045 <sup>1)</sup>	309,969 <sup>1)</sup>	28,971 <sup>1)</sup>	$5,8 \times 10^4$	$6 \times 10^2$	$8,1 \times 10^1$
	2	73,073	284,138	24,832	$6,3 \times 10^4$	$3,6 \times 10^2$	0
	3	58,058	266,917	32,282	$3,110^5$	$8 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$
	4	29,029	51,661	41,387	$1,6 \times 10^5$	$8,1 \times 10^2$	$6,1 \times 10^2$
	5	73,073	180,815	10,76	$9 \times 10^4$	$8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
	MW	55,6	218,7	27,6			
	VK	34,0	48,1	40,6			
erhitzt	1	0,045 <sup>2)</sup>	0,017 <sup>2)</sup>	0,012 <sup>2)</sup>	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	0
	2	0,048	0,022	0,012	$2 \times 10^2$	0	0
	3	0,041	0,023	0,009	$5,4 \times 10^1$	$4 \times 10^1$	0
	4	0,036	0,012	0,016	0	0	0
	5	0,038	0,014	0,013	$1,4 \times 10^2$	$5,4 \times 10^1$	0
	MW	0,041	0,017	0,012			
	VK	11,8	27,4	20,2			

Erklärungen: <sup>1)</sup> absoluter Extinktionswert gemäß 3.1.1 *Material und Methodik*; <sup>2)</sup> gemessene Extinktion; GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; S = aerobe Sporenbildner; D = D-Streptokokken (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*); MW = arithmetischer Mittelwert; VK = Variationskoeffizient

**Tab. 32: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Unterkeule der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei  $F_{80} = 5$** 

	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Keimgehalt [KBE/g]			
	NA	NB	IA	GKZ	S	D	
roh	1	58,058 <sup>1)</sup>	266,917 <sup>1)</sup>	25,66 <sup>1)</sup>	$1,4 \times 10^5$	0	$1,5 \times 10^2$
	2	61,061	361,63	38,076	$6,3 \times 10^4$	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^2$
	3	62,062	258,307	35,593	$4 \times 10^4$	0	$1,5 \times 10^2$
	4	69,069	292,748	25,66	$6,3 \times 10^4$	0	$2 \times 10^1$
	5	69,069	361,63	26,488	$9 \times 10^5$	0	$9 \times 10^1$
	MW	63,8	308,2	30,2			
	VK	7,8	16,3	19,9			
erhitzt	1	0,040 <sup>2)</sup>	0,003 <sup>2)</sup>	0,009 <sup>2)</sup>	$9 \times 10^1$	$6 \times 10^1$	0
	2	0,037	0,013	0,007	$1,8 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	0
	3	0,03	0,027	0,014	$1,6 \times 10^2$	0	0
	4	0,039	0	0,009	$1,3 \times 10^2$	0	0
	5	0,031	0,002	0,01	$1 \times 10^2$	0	0
	MW	0,035	0,009	0,009			
	VK	13,0	125,0	26,4			

Erklärungen: <sup>1)</sup> absoluter Extinktionswert gemäß 3.1.1 *Material und Methodik*; <sup>2)</sup> gemessene Extinktion; GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; S = aerobe Sporenbildner; D = D-Streptokokken (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*); MW = arithmetischer Mittelwert; VK = Variationskoeffizient

**Tab. 33: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Karkassenfleisch der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei  $F_{80} = 5$** 

	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Keimgehalt [KBE/g]			
	NA	NB	IA	GKZ	S	D	
roh	1	95,095 <sup>1)</sup>	516,615 <sup>1)</sup>	29,799 <sup>1)</sup>	$4,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$
	2	97,097	284,138	28,143	$5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^4$	$1 \times 10^3$
	3	88,088	516,615	20,693	$2,3 \times 10^7$	$1 \times 10^3$	$2 \times 10^3$
	4	60,06	215,256	43,043	$5,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^3$	$8,1 \times 10^2$
	5	62,062	146,374	32,282	$2,7 \times 10^7$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^2$
	MW	80,4	335,7	30,7			
	VK	22,4	51,3	26,3			
erhitzt	1	0,083 <sup>2)</sup>	0,016 <sup>2)</sup>	0,028 <sup>2)</sup>	$2 \times 10^1$	$6 \times 10^1$	0
	2	0,075	0	0,014	0	$6 \times 10^1$	0
	3	0,07	0,01	0,022	$2 \times 10^1$	0	0
	4	0,071	0,005	0,022	$8,1 \times 10^1$	$6 \times 10^2$	0
	5	0,073	0,012	0,019	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	0
	MW	0,074	0,008	0,021			
	VK	7,0	72,4	24,3			

Erklärungen: <sup>1)</sup> absoluter Extinktionswert gemäß 3.1.1 *Material und Methodik*; <sup>2)</sup> gemessene Extinktion; GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; S = aerobe Sporenbildner; D = D-Streptokokken (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*); MW = arithmetischer Mittelwert; VK = Variationskoeffizient

**Tab. 34: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Leber der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei  $F_{80} = 5$** 

	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Keimgehalt [KBE/g]			
	NA	NB	IA	GKZ	S	D	
roh	1	12435 <sup>1)</sup>	16025 <sup>1)</sup>	2090 <sup>1)</sup>	$1,2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^2$	$1 \times 10^1$
	2	15266	13521	2591	$2,5 \times 10^5$	$3,4 \times 10^2$	$1 \times 10^1$
	3	11424	13187	2006	$8 \times 10^4$	$5,1 \times 10^1$	$3 \times 10^1$
	4	12940	14856	2173	$4,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$
	5	13951	17026	2340	$4 \times 10^5$	$6,7 \times 10^2$	$5 \times 10^1$
	MW <sup>1)</sup>	13203	14923	2240			
	VK	11,1	10,9	19,5			
erhitzt	1	0,278 <sup>2)</sup>	0,549 <sup>2)</sup>	0,077 <sup>2)</sup>	0	0	0
	2	0,244	0,498	0,068	0	0	0
	3	0,264	0,572	0,076	0	0	0
	4	0,357	0,666	0,109	0	0	0
	5	0,262	0,525	0,077	0	0	0
	MW	0,281	0,562	0,081			
	VK	15,7	11,4	19,5			

Erklärungen: <sup>1)</sup> absoluter Extinktionswert gemäß 3.1.1 *Material und Methodik*; <sup>2)</sup> gemessene Extinktion; GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; S = aerobe Sporenbildner; D = D-Streptokokken (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*); MW = arithmetischer Mittelwert; VK = Variationskoeffizient

**Tab. 35: Esterase-Aktivität und Keimgehalt der Sammelproben von Fettgewebe der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei  $F_{80} = 5$** 

	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Keimgehalt [KBE/g]			
	NA	NB	IA	GKZ	S	D	
roh	1	35,035 <sup>1)</sup>	241,087 <sup>1)</sup>	12,416 <sup>1)</sup>	$1,7 \times 10^7$	$3,8 \times 10^4$	$5,6 \times 10^3$
	2	23,023	146,374	21,521	$1 \times 10^7$	$3 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$
	3	24,024	60,271	12,416	$2,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$
	4	20,02	43,051	10,76	$2,3 \times 10^7$	$1,8 \times 10^5$	$5 \times 10^2$
	5	22,022	327,189	13,244	$1,7 \times 10^7$	$2,2 \times 10^5$	$9,9 \times 10^2$
	MW	24,8	163,5	14,0			
	VK	23,8	73,8	30,3			
erhitzt	1	0,017 <sup>2)</sup>	0,031 <sup>2)</sup>	0 <sup>2)</sup>	$5 \times 10^1$	$5 \times 10^1$	0
	2	0,013	0,029	0,001	$3 \times 10^2$	$8,1 \times 10^1$	0
	3	0,01	0,025	0	$2 \times 10^1$	0	0
	4	0,008	0,003	0	$2 \times 10^2$	0	0
	5	0,011	0,007	0,004	$3,2 \times 10^2$	0	0
	MW	0,011	0,019	0,001			
	VK	29,0	68,6	173,2			

Erklärungen: <sup>1)</sup> absoluter Extinktionswert gemäß 3.1.1 *Material und Methodik*; <sup>2)</sup> gemessene Extinktion; GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; S = aerobe Sporenbildner; D = D-Streptokokken (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*); MW = arithmetischer Mittelwert; VK = Variationskoeffizient

**Tab. 36: Mittlere Esterase-Aktivität von Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute vor und nach dem Pasteurisieren bei  $F_{80} = 5$  in absteigender Reihenfolge**

	NA		NB		IA	
	roh [aEw] <sup>1)</sup> (VK)	erhitzt [ $E_{617}$ ] <sup>2)</sup> (VK)	roh [aEw] <sup>1)</sup> (VK)	erhitzt [ $E_{617}$ ] <sup>2)</sup> (VK)	roh [aEw] <sup>1)</sup> (VK)	erhitzt [ $E_{617}$ ] <sup>2)</sup> (VK)
1	L 13203 (11,1)	L 0,281 (15,7)	L 14923 (10,9)	L 0,562 (11,4)	L 2240 (19,5)	L 0,081 (19,5)
2	FI 101,5 (18,6)	B 0,177 (4,8)	FI 420,1 (51,7)	B 0,050 (9,9)	FI 106,7 (38,4)	B 0,066 (17,1)
3	K 80,4 (22,4)	FI 0,108 (21,2)	K 335,7 (51,3)	FI 0,032 (49,2)	K 30,7 (26,3)	FI 0,042 (39,9)
4	UK 63,8 (7,8)	K 0,074 (7,0)	UK 308,2 (16,3)	F 0,019 (68,6)	UK 30,2 (19,9)	K 0,021 (24,3)
5	OK 55,6 (34,0)	OK 0,041 (11,8)	B 223,8 (7,7)	OK 0,017 (27,4)	OK 27,6 (40,6)	OK 0,012 (20,2)
6	B 53,2 (9,3)	UK 0,035 (13,0)	OK 218,7 (48,1)	UK 0,009 (125)	B 21,8 (51,2)	UK 0,009 (26,4)
7	F 24,8 (23,8)	F 0,011 (29,0)	F 163,5 (73,8)	K 0,008 (72,4)	F 14 (30,3)	F 0,001 (173)

Erklärungen: <sup>1)</sup> absoluter Extinktionswert gemäß 3.1.1 *Material und Methodik*; <sup>2)</sup> Gemessene Extinktion; VK = Variationskoeffizient; B = Brustmuskel, F = Flügelmuskulatur, OK = Oberkeule, UK = Unterkeule, K = Karkasse, L = Leber, F = Fettgewebe

## 4 Einfluss der Lagerung von Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute auf die Esterase-Aktivität

Für die Beurteilung der Aussagekraft des Erhitzungsnachweises für Erzeugnisse aus Putenfleisch ist wichtig zu wissen, ob und wie sehr sich die Esterase-Aktivität der betreffenden Rezepturkomponenten durch deren Behandlung nach dem Schlachten verändert. Zu den in diesem Zusammenhang wichtigsten Einflüssen zählen die Temperatur und Dauer der Lagerung.

### 4.1 Einfluss der Gefrierlagerung des rohen Probengutes

Brühwurst, Kochwurst und Frikadellen aus Putenfleisch werden nicht selten aus variierenden Partien gefrosteten Ausgangsmaterials gefertigt. In nachstehend dargelegter Recherche wird an rohem und pasteurisiertem Probengut geprüft, wie sich ein Frosten und Auftauen auf die Esterase-Aktivität auswirkt.

#### 4.1.1 Material und Versuchsanordnung

Brustmuskel, Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Karkasse, Leber und Fettgewebe von Pute werden gemäß 2.1.1 *Probengut* zu je 5 Sammelproben von 1000 g aufbereitet. Jede Sammelprobe besteht aus zumindest von 5 Puten stammendem Probengut, das gemäß 1.2 *Probenaufbereitung und Erhitzung* nach sorgfältigem Homogenisieren in 6 Probenbeutel abgefüllt wird. Von jeder der 5 Sammelproben wird je 1 Beutel dazu verwendet, die Esterase-Ausgangsaktivität des rohen Probengutes vor und nach dessen Frosten und die Restaktivität nach dessen Pasteurisieren bei  $F_{80} = 5$  zu bestimmen. Die restlichen 4 Probenbeutel werden sofort nach dem Befüllen in die Gefrierzelle gegeben und 7 Tage bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach dem Auftauen bei Zimmertemperatur wird 1 Beutel dazu verwendet, den Einfluss des Frostens und Auftauens auf die Esterase-Aktivität des rohen Probengutes zu bestimmen. Die verbleibenden 3 Probenbeutel werden bei  $F_{80} = 5$  erhitzt, danach im Eiswasserbad raschestens gekühlt und zum einen für die Bestimmung des Einflusses dieser Vorbehandlungen auf die Esterase-Restaktivität verwendet, zum anderen gemäß 4.2 *Einfluss der Kühllagerung des pasteurisierten Probengutes auf die Esterase-Restaktivität* für die Bestimmung des Einflusses einer anschließenden Kühllagerung bei  $4 - 6^{\circ}\text{C}$  für die Dauer von 1 Tag sowie 2 und 4 Wochen vorgehalten.

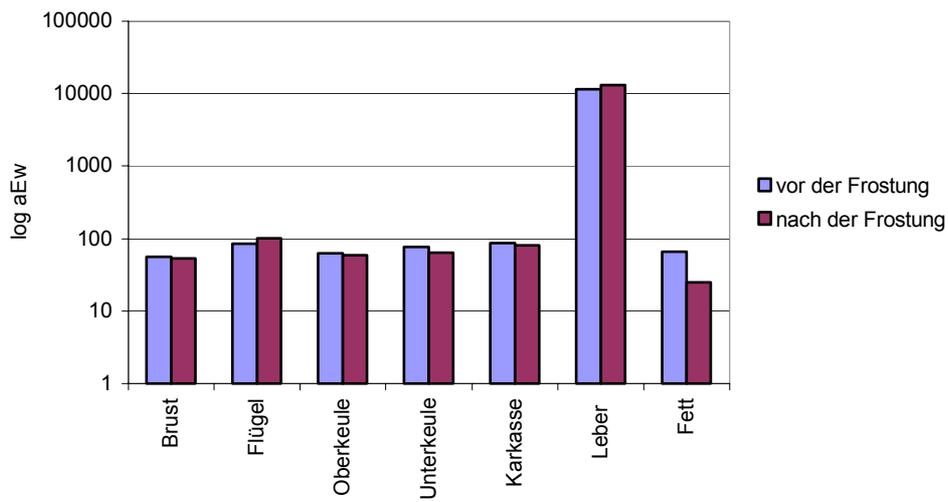
#### **4.1.2 Ergebnisse und Besprechung**

Der Einfluss der Frostung auf die Esterase-Aktivität des rohen Probengutes ist aus der Tabelle 37 und den Abbildungen 58 bis 60 ersichtlich, der Einfluss der Frostung und 7 Tage langen Frostlagerung auf die Esterase-Restaktivität des nach der Frostlagerung pasteurisierten Probengutes aus Tabelle 38 und den Abbildungen 61 bis 63.

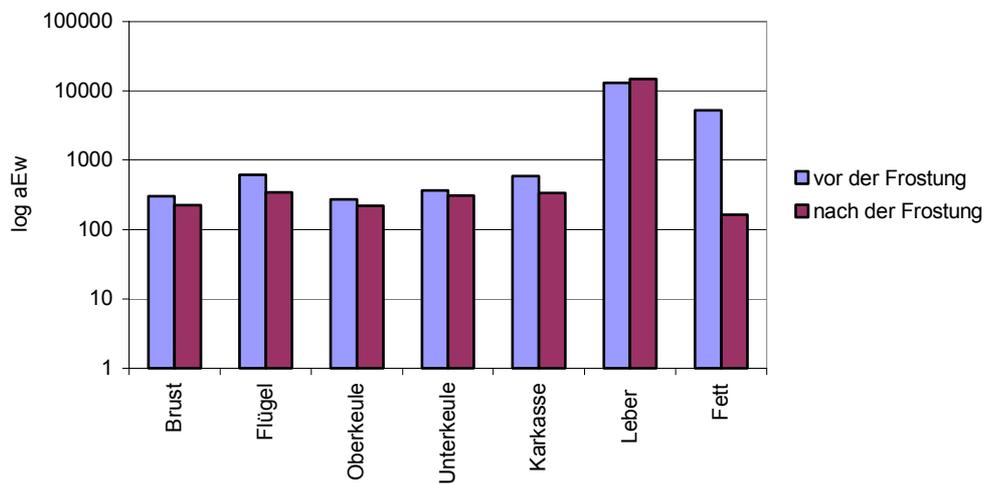
**Tab. 37: Einfluss der Frostung auf die Esterase-Aktivität von roher Skelettmuskulatur, Leber und rohem Fettgewebe der Pute**

Probengut		Absoluter Extinktionswert (aEw) <sup>1)</sup> des rohen Probengutes					
		vor der Frostung			nach der Frostung		
	Nr.	NA	NB	IA	NA	NB	IA
Brustmuskel	1	62,1	206,6	25,7	51,1	198,0	9,1
	2	65,1	387,5	38,1	52,1	232,5	32,3
	3	41,0	292,7	37,2	60,1	215,3	10,8
	4	56,1	223,9	47,2	56,1	241,1	31,5
	5	57,1	396,1	15,7	47,0	232,5	25,7
	MW	56,3	301,4	32,8	53,3	223,9	21,9
Flügel	1	109,1	542,4	82,8	125,1	465,0	113,4
	2	73,1	585,5	31,5	99,1	249,7	87,7
	3	84,1	637,2	55,5	73,1	370,2	69,5
	4	88,1	714,7	35,6	109,1	198,0	174,7 <sup>2)</sup>
	5	69,1	585,5	52,1	101,1	439,1	88,6
	MW	84,7	613,0	51,5	101,5	344,4 <sup>3)</sup>	89,8 <sup>3)</sup>
Oberkeule	1	74,1	301,4	23,2	63,1	310,0	29,0
	2	63,1	310,0	36,4	73,1	284,1	24,8
	3	57,1	241,1	40,6	58,1	266,9	32,3
	4	55,1	241,1	32,3	29,0	51,7	41,4
	5	66,1	275,5	48,8	73,1	180,8	35,6
	MW	63,1	273,8	36,3	59,3	218,7	32,6
Unterkeule	1	98,1	456,3	47,2	58,1	266,9	25,7
	2	87,1	310,0	53,0	61,1	361,6	38,1
	3	67,1	258,3	48,0	62,1	258,3	35,6
	4	62,1	275,5	31,5	69,1	292,7	25,7
	5	74,1	533,8	46,4	69,1	361,6	26,5
	MW	77,7	366,8	45,2	63,9	308,2	30,3 <sup>3)</sup>
Karkasse	1	94,1	757,7	66,2	95,1	516,6	29,8
	2	73,1	499,4	51,3	97,1	284,1	28,1
	3	113,1	559,7	49,7	88,1	516,6	20,7
	4	81,1	465,0	56,3	60,1	215,3	43,0
	5	72,1	706,0	53,8	62,1	146,4	32,3
	MW	86,7	597,6	55,5	80,5	335,8	30,8 <sup>3)</sup>
Leber	1	13244	14355	4012	12435	16025	2090
	2	9301	11351	3260	15266	13521	2591
	3	9503	11184	3427	11424	13187	2006
	4	13951	13187	6103	12940	14856	2173
	5	11121	15858	4598	13951	17026	2340
	MW	11424	13187	4280	13203	14923	2240 <sup>3)</sup>
Fettgewebe	1	58,1	4391,2	33,9	35,0	241,1	12,4
	2	64,1	6104,7	42,2	23,0	146,4	21,5
	3	87,1	5906,6	38,9	24,0	60,3	12,4
	4	75,1	4675,4	47,2	20,0	43,1	10,8
	5	49,0	5200,6	47,2	22,0	327,2	13,2
	MW	66,7	5255,7	41,9	24,8 <sup>3)</sup>	163,6 <sup>3)</sup>	14,1 <sup>3)</sup>

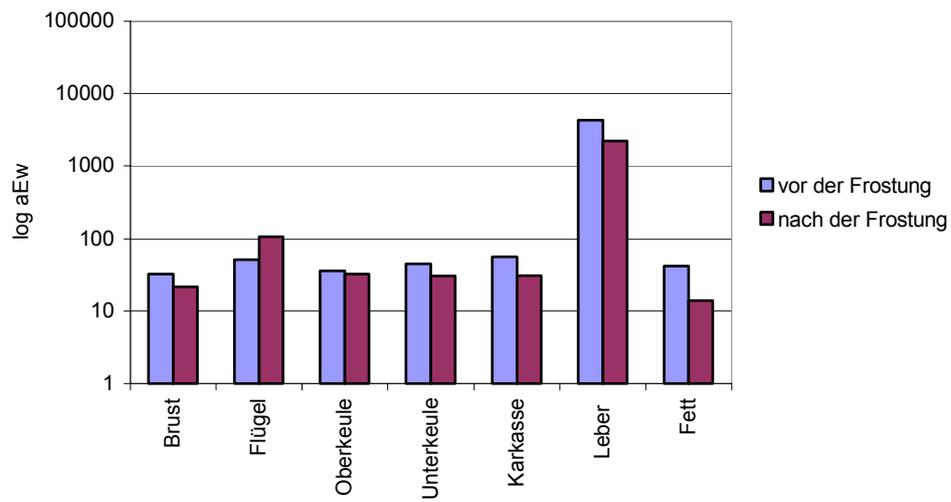
Erklärungen: <sup>1)</sup> siehe Ausführungen zu 3.1.1 *Material und Methodik*; <sup>2)</sup> Nach Dixon-Test handelt es sich um einen Ausreißerwert; <sup>3)</sup> Nach Mann und Whitney-Test signifikant ( $p < 0,05$ ); MW = arithmetischer Mittelwert



**Abb. 58:** Einfluss der Frostung auf die mit NA nachweisbare Esterase-Aktivität von roher Skelettmuskulatur, Leber und rohem Fettgewebe der Pute



**Abb. 59:** Einfluss der Frostung auf die mit NB nachweisbare Esterase-Aktivität von roher Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute



**Abb. 60:** Einfluss der Frostung auf die mit IA nachweisbare Esterase-Aktivität von roher Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute

**Tab. 38: Einfluss der Frostung auf die Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute nach Pasteurisation bei  $F_{80} = 5$** 

Probengut	Extinktion [ $E_{617}$ ] nach Pasteurisation						
	Nr.	vor der Frostung			nach der Frostung		
		NA	NB	IA	NA	NB	IA
Brustmuskel	1	0,184	0,091	0,045	0,190	0,053	0,081
	2	0,162	0,088	0,046	0,171	0,051	0,068
	3	0,191	0,079	0,046	0,181	0,042	0,057
	4	0,208	0,071	0,043	0,170	0,051	0,072
	5	0,216	0,066	0,042	0,173	0,055	0,053
	MW	0,192	0,079	0,044	0,177	0,050 <sup>2)</sup>	0,066 <sup>2)</sup>
Flügel	1	0,122	0,162 <sup>1)</sup>	0,043	0,142	0,019	0,015
	2	0,119	0,041	0,017	0,120	0,059	0,059
	3	0,116	0,033	0,039	0,083	0,030	0,040
	4	0,116	0,024	0,033	0,097	0,023	0,046
	5	0,138	0,038	0,047	0,100	0,029	0,053
	MW	0,122	0,034	0,035	0,108	0,032	0,042
Oberkeule	1	0,068	0,022	0,041	0,045	0,017	0,012
	2	0,069	0,013	0,041	0,048	0,022	0,012
	3	0,078	0,019	0,036	0,041	0,023	0,009
	4	0,075	0,067 <sup>1)</sup>	0,024	0,036	0,012	0,016
	5	0,062	0,007	0,010	0,038	0,014	0,013
	MW	0,070	0,015	0,030	0,041 <sup>2)</sup>	0,017	0,012
Unterkeule	1	0,074	0,013	0,003	0,040	0,003	0,009
	2	0,059	0,010	0,018	0,037	0,013	0,007
	3	0,056	0,024	0,007	0,030	0,027	0,014
	4	0,062	0,013	0,023	0,039	0	0,009
	5	0,057	0,016	0,018	0,031	0,002	0,010
	MW	0,061	0,015	0,013	0,035 <sup>2)</sup>	0,009	0,009
Karkasse	1	0,400 <sup>1)</sup>	0,107 <sup>1)</sup>	0,063	0,083	0,016	0,028
	2	0,134	0,058	0,045	0,075	0	0,014
	3	0,102	0,058	0,029	0,070	0,010	0,022
	4	0,102	0,048	0,020	0,071	0,005	0,022
	5	0,104	0,063	0,032	0,073	0,012	0,019
	MW	0,110	0,056	0,037	0,074 <sup>2)</sup>	0,008 <sup>2)</sup>	0,021
Leber	1	0,497	0,432	0,179	0,278	0,549	0,077
	2	0,310	0,435	0,092	0,244	0,498	0,068
	3	0,418	0,492	0,122	0,264	0,572	0,076
	4	0,305	0,437	0,114	0,357 <sup>1)</sup>	0,666	0,109
	5	0,239	0,368	0,091	0,262	0,525	0,077
	MW	0,353	0,432	0,119	0,262	0,562 <sup>2)</sup>	0,081 <sup>2)</sup>
Fettgewebe	1	0,021	0,014	0,029	0,017	0,031	0
	2	0,021	0,009	0,013	0,013	0,029	0,001
	3	0,024	0,010	0,014	0,010	0,025	0
	4	0,018	0,015	0,015	0,008	0,003	0
	5	0,024	0,007	0,007	0,011	0,007	0,004
	MW	0,021	0,011	0,015	0,011 <sup>2)</sup>	0,019	0,001 <sup>2)</sup>

Erklärung: <sup>1)</sup> Nach Dixon-Test handelt es sich um einen Ausreißerwert; <sup>2)</sup> Nach Mann und Whitney-Test signifikant ( $p < 0,05$ ); MW = arithmetischer Mittelwert

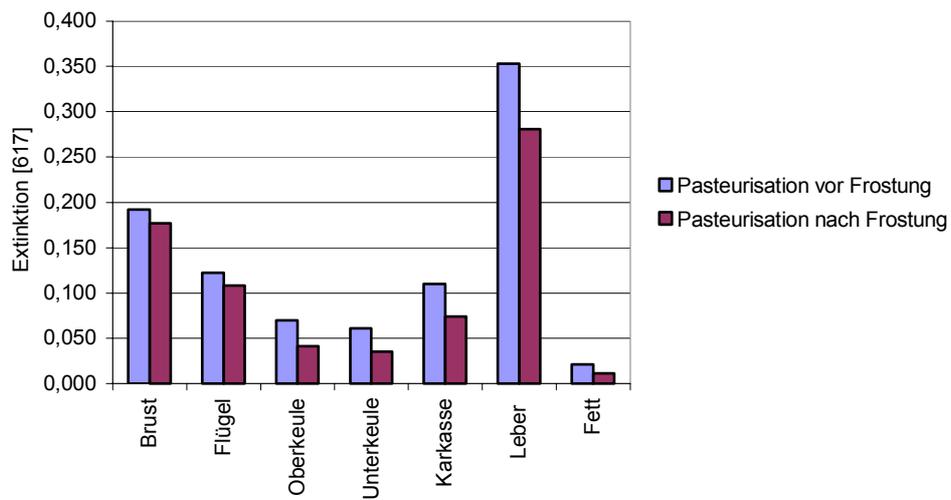


Abb. 61: Einfluss der Frostung auf die nach Pasteurisation mit NA nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute

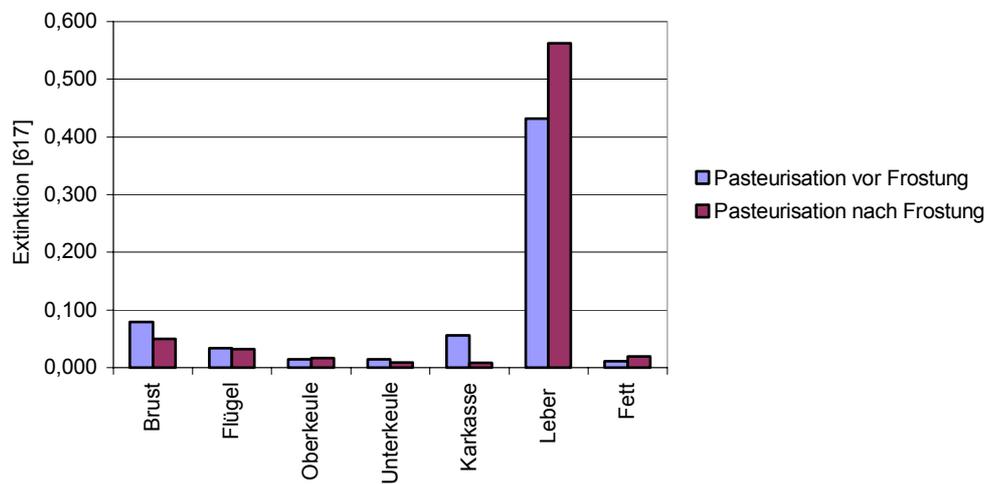
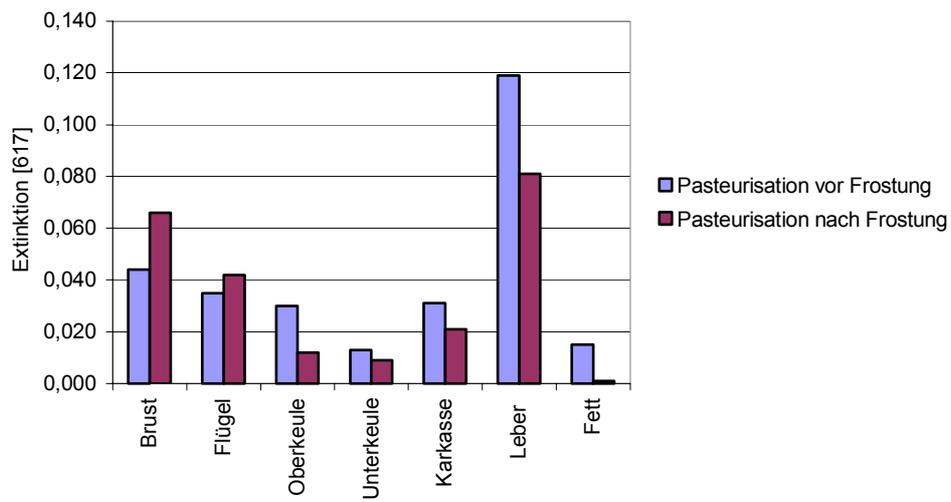


Abb. 62: Einfluss der Frostung auf die nach Pasteurisation mit NB nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute



**Abb. 63: Einfluss der Frostung auf die nach Pasteurisation mit IA nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute**

Wie aus der Tabelle 37 und den Abbildungen 58 bis 60 zu ersehen ist, verringert sich die Esterase-Aktivität der Proben durch das Frosten und Auftauen nur relativ geringgradig. Statistisch bei jedem der 3 Substrate signifikant ist die Verringerung lediglich beim Fettgewebe. Gegenüber dem Frostprozess am labilsten erweisen sich offenbar die IA-affinen Isozyme.

Bei den NA-Ansätzen führt das Frosten bei 5 der 7 Probenarten zu einer Verringerung der Enzym-Ausgangsaktivität, statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) jedoch nur beim Fettgewebe. Bei der Flügelmuskulatur und Leber resultiert ein geringgradiger, statistisch jedoch signifikanter Anstieg. Bei den NB-Ansätzen nimmt die Esterase-Aktivität durch das Frosten nur bei 6 Probenarten etwas ab, statistisch signifikant ist dies jedoch nur bei der Flügelmuskulatur und beim Fettgewebe. Bei den IA-Ansätzen verringert sich die Enzymaktivität durch die Frostung bei 6 Probenarten, und zwar bei 4 Probenarten signifikant. Bei der Flügelmuskulatur resultiert ein geringgradiger, jedoch statistisch signifikanter Anstieg.

Aus der Tabelle 38 und den Abbildungen 61 bis 63 geht hervor, dass vor dem Pasteurisieren bei  $F_{80} = 5$  gefrostenes Probengut meist nur sehr geringgradig niedrigere Esterase-Restaktivitäten aufweist, als die ohne vorheriges Frosten pasteurisierten Kontrollen. Bei den NA-Ansätzen gilt dies bei jeder der 7 Probenarten, statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) jedoch nur bei Oberkeule, Unterkeule, Karkasse und dem Fettgewebe. Bei den NB-Ansätzen bleibt die Restaktivität des pasteurisierten Probengutes durch das vorherige Frosten bei Flügel, Oberkeule, Unterkeule und Fettgewebe anscheinend unverändert, wogegen sie sich bei Karkasse und Brustmuskel, relativ geringgradig erniedrigt und bei Leber erhöht. Bei den mit IA ermittelten Restaktivitäten liegen bei den vorgefrosten Probenarten Oberkeule, Unterkeule, Karkasse, Leber und Fettgewebe geringgradig niedriger, beim Brustmuskel und Flügel hingegen geringgradig höher als bei den vorab nicht gefrostenen Vergleichsansätzen. Signifikant ist die Verringerung der Restaktivität lediglich bei Leber und Fettgewebe und die Erhöhung lediglich beim Brustmuskel.

Aus dem Dargestellten folgt:

Bei Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber der Pute kann sich durch ein Frosten die Esterase-Aktivität sowohl des rohen als auch des nach Auftauen bei Zimmertemperatur pasteurisierten Probengutes signifikant verändern.

## **4.2 Einfluss der Kühlung des pasteurisierten Probengutes auf die Esterase-Restaktivität**

In nachstehend beschriebener Versuchsreihe interessiert besonders auch die Frage, ob und wie sehr sich die Restaktivität des hitzebehandelten Probengutes im Verlaufe der ersten 22 h einer bis zur 4 Wochen langer Kühlung verändert.

### **4.2.1 Material und Methodik**

Der Einfluss einer 22 h langen Kühlung des Probengutes nach der Pasteurisation auf die Esterase-Restaktivität wird an Brustmuskel, Leber und Fettgewebe geprüft. Das Probengut wird hierfür gemäß 2.1.1 *Probengut* zu je einer homogenen Sammelprobe aufbereitet, je Probenart in Teilmengen von 500 g in vorsorglich 16 Probenbeutel gegeben, gemäß 1.2 *Probenaufbereitung und Erhitzung* im Wasserbad bei  $F_{80} = 5$  erhitzt und nach anschließender Kühlung im Eiswasserbad im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die nach der Pasteurisation resultierende Esterase-Restaktivität wird jeweils unmittelbar nach Abkühlung des Probengutes im Eiswasser, sodann in den ersten 22 h der Kühlung im Intervall von 1 h und im weiteren Verlauf im Abstand von 2 und 4 Wochen bestimmt.

### **4.2.2 Ergebnisse und deren Besprechung**

Der Einfluss der 22-stündigen sowie der 2- und 4-wöchigen Kühlung bei 4°C auf die Esterase-Restaktivität des bei  $F_{80} = 5$  erhitzten Probengutes ist in den Tabellen 39 bis 41 und den Abbildungen 64 bis 69 zu ersehen.

**Tab. 39: Einfluss einer 22 Stunden langen Kühlung bei 4°C auf die bei Brustmuskel, Leber und Fettgewebe der Pute nach Pasteurisation bei  $F_{80} = 5$  nachweisbare Esterase-Restaktivität**

Lagerdauer	Extinktion [ $E_{617}$ ]								
	Brustmuskel			Leber			Fettgewebe		
[h]	NA	NB	IA	NA	NB	IA	NA	NB	IA
0	0,170	0	0,052	0,057	0	0,041	0,006	0,001	0,001
2	0,163	0	0,032	0,050	0	0,054	0,007	0	0
4	0,158	0	0,039	0,073	0	0,036	0,005	0	0,006
6	0,150	0,029	0,046	0,035	0	0,032	0,009	0,018	0,005
8	0,162	0,039	0,070	0,032	0	0,033	0,015	0	0,005
10	0,167	0,017	0,057	0,040	0	0,035	0,002	0	0,002
12	0,138	0,029	0,023	0,040	0,017	0,036	0,008	0	0,006
14	0,164	0,040	0,038	0,033	0,010	0,039	0,009	0,001	0
16	0,145	0,047	0,039	0,026	0	0,029	0,010	0	0
18	0,153	0,033	0,032	0,026	0	0,031	0,012	0	0,003
20	0,142	0,040	0,032	0,030	0,026	0,036	0,001	0	0
22	0,142	0,044	0,035	0,027	0	0,023	0,010	0	0,002
r	-0,666	0,834	-0,389	-0,774	0,408	-0,655	0,102	0,240	-0,239

Erklärungen: r = Pearsonscher Korrelationskoeffizient

Bei den aus Tabelle 39 und den Abbildungen 64 bis 66 ersichtlichen Restaktivitäten könnte auf den ersten Blick zwar nicht ausgeschlossen werden, es zeichne sich bei den NA- und IA-Ansätzen von Brustmuskel und Leber schon im Verlaufe der ersten 22 h der Kühlung bei 4°C eine geringgradige Abnahme und zumindest bei den NB-Ansätzen des Brustmuskels eine geringgradige Zunahme der unmittelbar nach der Pasteurisation nachweisbaren Restaktivität ab; denn die NA- resp. IA-Aktivität scheint sich beispielsweise beim Brustmuskel von  $E_{NA} = 0,170$  auf  $0,142$  resp. von  $E_{IA} = 0,052$  auf  $0,035$  zu verringern und die NB-Aktivität von  $E_{NB} = 0$  auf  $0,044$  zu erhöhen. Eine gewisse Korrelation zeichnet sich für diesen Einfluss der Kühlung jedoch lediglich bei den NB-Ansätzen vom Brustmuskel ( $r = -0,834$ ) und den NA-Ansätzen von Leber ( $r = -0,774$ ) ab.

Die in Relation zu den anderen in dieser Arbeit bei  $F_{80} = 5$  resultierenden Vergleichswerten extrem niedrig liegenden Restaktivitäten der Leber könnten ein Hinweis darauf sein, dass im vorliegenden Kapitel eventuell eine über  $F_{80} = 5$  liegende Pasteurisation der Leber zur Anwendung kam.

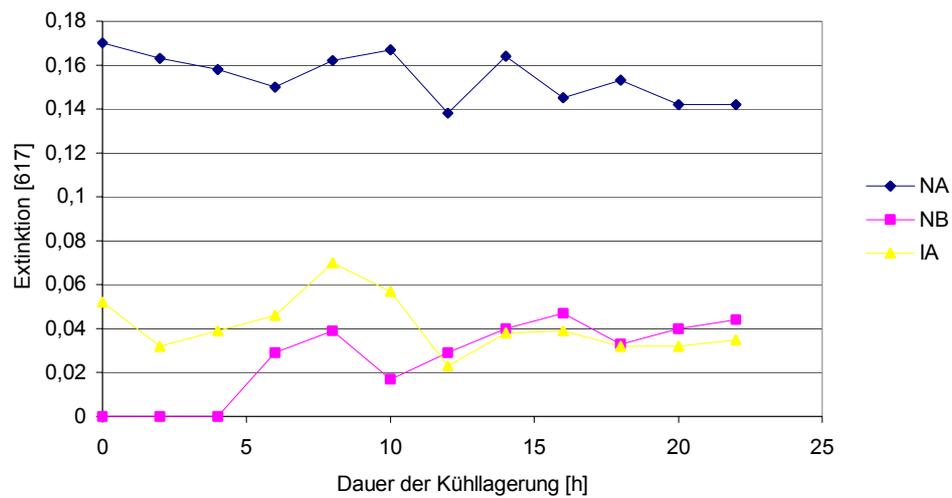


Abb. 64: Einfluss einer 22 Stunden langen Kühlung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei  $F_{80} = 5$  beim Brustmuskel nachweisbare Esterase-Restaktivität

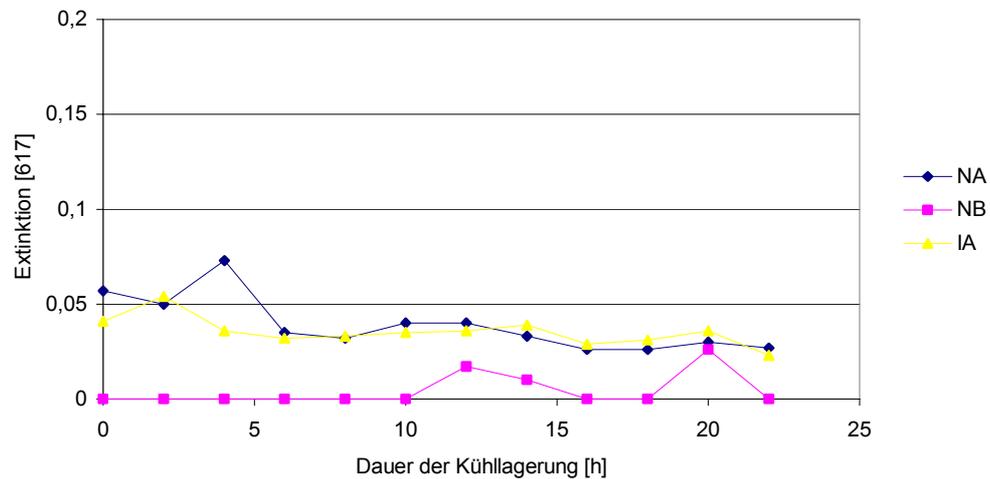
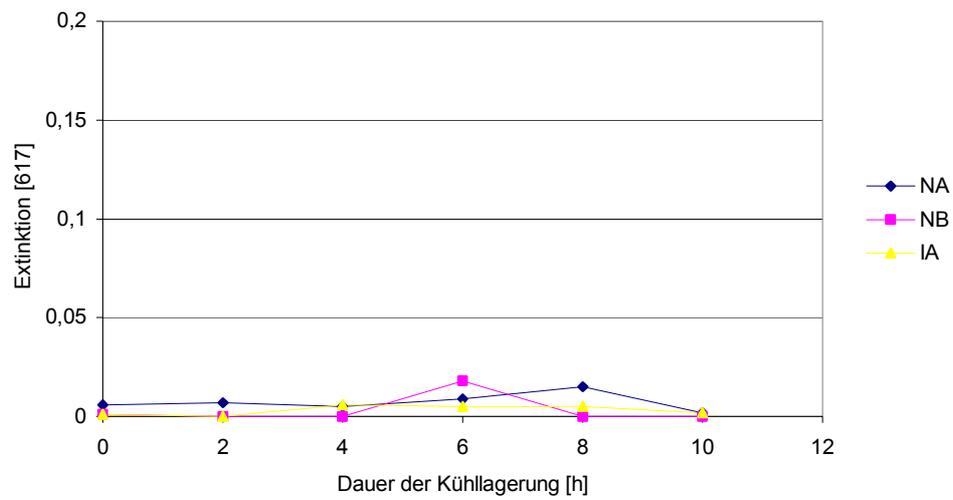


Abb. 65: Einfluss einer 22 Stunden langen Kühlung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei  $F_{80} = 5$  bei Leber nachweisbare Esterase-Restaktivität



**Abb. 66: Einfluss einer 22 Stunden langen Kühlung bei 4 – 6°C auf die nach Pasteurisation bei  $F_{80}=5$  bei Fettgewebe nachweisbare Esterase-Restaktivität**

**Tab. 40: Einfluss einer 2 Wochen langen Lagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei  $F_{80} = 5$  nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute**

Probe Nr.		Extinktion [ $E_{617}$ ]						
		Brust-muskel	Flügel	Oberkeule	Unterkeule	Karkasse	Leber	Fett-gewebe
		NA NB IA	NA NB IA	NA NB IA	NA NB IA	NA NB IA	NA NB IA	NA NB IA
nicht gelagert	1	0,190	0,124	0,045	0,040	0,083	0,278	0,017
		0,053	0,019	0,017	0,003	0,016	0,549	0,031
		0,081	0,015	0,012	0,009	0,028	0,077	0,000
	2	0,171	0,120	0,048	0,037	0,075	0,244	0,013
		0,051	0,059 <sup>1)</sup>	0,022	0,013	0,000	0,498	0,029
		0,068	0,059	0,012	0,007	0,014	0,068	0,001
	3	0,181	0,083	0,041	0,030	0,070	0,264	0,010
		0,042	0,030	0,023	0,027	0,010	0,572	0,025
		0,057	0,040	0,009	0,014	0,022	0,076	0,000
	4	0,170	0,097	0,036	0,039	0,071	0,357	0,008
		0,051	0,023	0,012	0,000	0,005	0,666	0,003
		0,072	0,046	0,016	0,009	0,022	0,109	0,000
5	0,173	0,100	0,038	0,031	0,073	0,262	0,011	
	0,055	0,029	0,014	0,002	0,012	0,525	0,007	
	0,053	0,053	0,013	0,010	0,019	0,077	0,004	
MW	0,177	0,108	0,042	0,035	0,074	0,281	0,012	
	0,050	0,032	0,018	0,009	0,009	0,562	0,019	
	0,066	0,043	0,012	0,010	0,021	0,081	0,001	
2 Wochen gelagert	1	0,130	0,116	0,057	0,050	0,093	0,490	0,011
		0,043	0,040	0,025	0,009	0,026	0,779	0,018
		0,083	0,062	0,057	0,028	0,045	0,150	0,009
	2	0,124	0,093	0,047	0,051	0,086	- <sup>3)</sup>	0,011
		0,042	0,033	0,028	0,009	0,031	- <sup>3)</sup>	0,027
		0,076	0,064	0,057	0,027	0,048	- <sup>3)</sup>	0,009
	3	0,126	0,098	0,060	0,044	0,091	0,537	0,013
		0,043	0,036	0,027	0,028	0,017	0,849	0,018
		0,064	0,054	0,050	0,022	0,043	0,141	0,015
	4	0,119	0,105	0,065	0,047	0,090	0,565	0,013
		0,027	0,038	0,021	0,015	0,030	0,834	0,022
		0,075	0,060	0,045	0,027	0,042	0,186	0,014
	5	0,122	0,108	0,070	0,044	0,086	0,509	0,016
		0,052	0,032	0,023	0,017	0,032	0,849	0,016
		0,061	0,065	0,057	0,041	0,038	0,128	0,013
	MW	0,124	0,104	0,060 <sup>2)</sup>	0,047 <sup>2)</sup>	0,089 <sup>2)</sup>	0,525 <sup>2)</sup>	0,013
		0,041	0,036 <sup>2)</sup>	0,025 <sup>2)</sup>	0,016	0,027 <sup>2)</sup>	0,828 <sup>2)</sup>	0,020
		0,072	0,061 <sup>2)</sup>	0,053 <sup>2)</sup>	0,029 <sup>2)</sup>	0,043 <sup>2)</sup>	0,151 <sup>2)</sup>	0,012 <sup>2)</sup>

Erklärungen: <sup>1)</sup> Nach DIXON-Test handelt es sich um einen Ausreißerwert; <sup>2)</sup> Die Abnahme resp. Zunahme der Restaktivität erweist sich beim MANN und WHITNEY-Unterschiedstest als signifikant ( $p < 0,05$ ); <sup>3)</sup> Der Probenbeutel dieser Charge war beim Einlegen in das Wasserbad geplatzt, eine Wiederholung war mangels Probengutes nicht möglich.

**Tab. 41: Einfluss einer 4 Wochen langen Lagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei  $F_{80} = 5$  nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute**

Probe Nr.		Extinktion [ $E_{617}$ ]						Fettgewebe
		Brust-muskel	Flügel	Oberkeule	Unterkeule	Karkasse	Leber	
		NA NB IA	NA NB IA	NA NB IA	NA NB IA	NA NB IA	NA NB IA	
4 Wochen gelagert	1	0,174	0,127	0,049	0,058	0,068	0,591	0,013
		0,053	0,032	0,033	0,010	0,011	0,786	0,012
		0,108	0,124	0,006	0,019	0,063	0,135	0,016
	2	0,182	0,122	0,051	0,057	0,071	0,603	0,014
		0,070	0,034	0,022	0,012	0,031	0,792	0,008
		0,104	0,115	0,001	0,024	0,059	0,148	0,010
	3	0,168	0,123	0,059	0,053	0,072	0,582	0,010
		0,066	0,042	0,036	0,030	0,019	0,781	0,021
		0,123	0,116	0,011	0,017	0,058	0,119	0,009
	4	0,167	0,120	0,044	0,045	0,087	0,603	0,012
		0,062	0,033	0,026	0,016	0,031	0,793	0,009
		0,119	0,128	0,012	0,016	0,057	0,176	0,008
	5	0,176	0,125	0,046	0,048	0,092	0,619	0,012
		0,066	0,036	0,025	0,012	0,028	0,771	0,015
		0,104	0,119	0,007	0,017	0,058	0,157	0,015
	MW	0,173	0,123	0,050	0,052 <sup>2)</sup>	0,078	0,600 <sup>2)</sup>	0,012
		0,063 <sup>2)</sup>	0,035 <sup>2)</sup>	0,028 <sup>2)</sup>	0,016	0,024 <sup>2)</sup>	0,785 <sup>2)</sup>	0,013
		0,112 <sup>2)</sup>	0,120 <sup>2)</sup>	0,007	0,019 <sup>2)</sup>	0,059 <sup>2)</sup>	0,147 <sup>2)</sup>	0,012 <sup>2)</sup>

Erklärungen: <sup>1)</sup> Nach DIXON-Test handelt es sich um einen Ausreißerwert; <sup>2)</sup> Die Abnahme resp. Zunahme der Restaktivität erweist sich gemäß MANN und WHITNEY-Unterschiedstest als signifikant ( $p < 0,05$ ).

Den Tabellen 40 und 41 und den Abbildungen 67 bis 69 lässt sich hinsichtlich des Einflusses einer 2 bzw. 4 Wochen langen Kühlung von pasteurisierter Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe bei 4°C auf die nach der Pasteurisation ermittelte Esterase-Restaktivität folgendes entnehmen.

Die mit NA bei Leber im Durchschnitt der 5 Sammelproben nachweisbare Restaktivität erhöht sich im Verlaufe der 2 Wochen langen Kühlung in einem außerordentlichen Maße. Ob sich der Anstieg der Restaktivität von durchschnittlich  $E_{617} = 0,281$  nach Pasteurisation auf  $E_{617} = 0,525$  nach 2 Wochen noch mit Reaktivierung begründen lässt, könnte in Frage gestellt werden. Ein methodischer Fehler etwa infolge einer mangelnden Homogenität des Probengutes, auf Grund der Entstehung mikrobieller Esterase oder wegen eines bei der Durchführung der Esterase-Tests systematisch begangenen Fehlers lässt sich jedoch trotz sorgsamer Suche nicht erkennen. Bei Oberkeule, Unterkeule und Karkasse nimmt die Restaktivität hingegen nur relativ geringgradig, meist jedoch statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu.

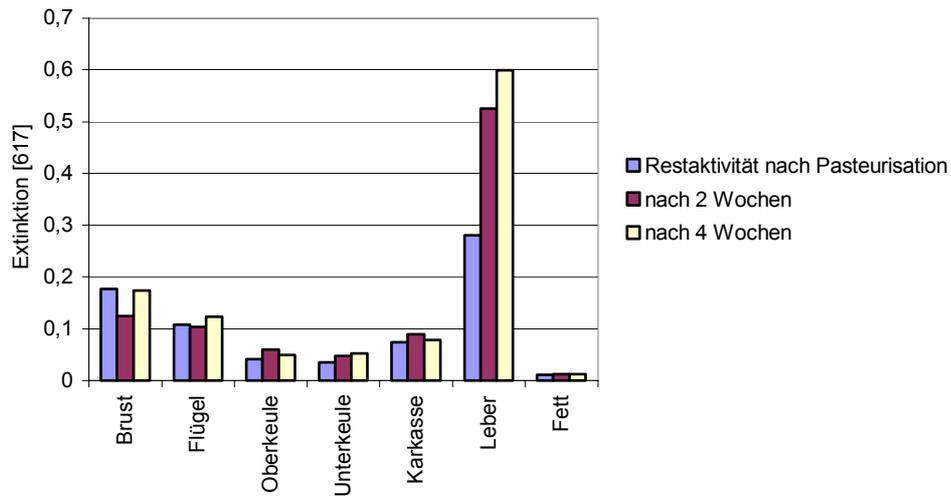
Bei den 4 Wochen kühlengelagerten Proben liegen die Restaktivitäten der NA-Ansätze lediglich bei der Flügelmuskulatur und statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) bei der Unterkeule und in einem außerordentlichen Maße bei der Leber höher als vor der Kühlung. Beim Brustmus-

kel, der Oberkeule, Karkasse und dem Fettgewebe bleiben die Restaktivitäten im Verlaufe der 4-wöchigen Kühllagerung unverändert. Bei den Ansätzen mit NB liegt die nach 2 Wochen nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Karkasse nur sehr geringgradig, bei der Leber hingegen wesentlich höher als vor Beginn der Lagerung. Während sich im Verlaufe der 4 Wochen langen Kühllagerung die Restaktivitäten beim Probengut von Flügel, Unterkeule und Fettgewebe faktisch konstant bleiben, kommt es bei Brustmuskel, Oberkeule und Karkasse zu einem unbedeutenden, bei Leber hingegen relativ ausgeprägteren Anstieg. Bei den Ansätzen mit IA liegt die Esterase-Restaktivität nach 2 Wochen beim Brustmuskel nächst der Ausgangskonzentration, bei Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Karkasse und Fettgewebe geringgradig, bei der Leber deutlich höher. Nach 4 Wochen langer Kühllagerung erweist sich die Restaktivität von Oberkeule, Unterkeule und Fettgewebe gegenüber der Anfangsaktivität als faktisch unverändert, bei Brustmuskel, Flügel, Karkasse und Leber als deutlich erhöht.

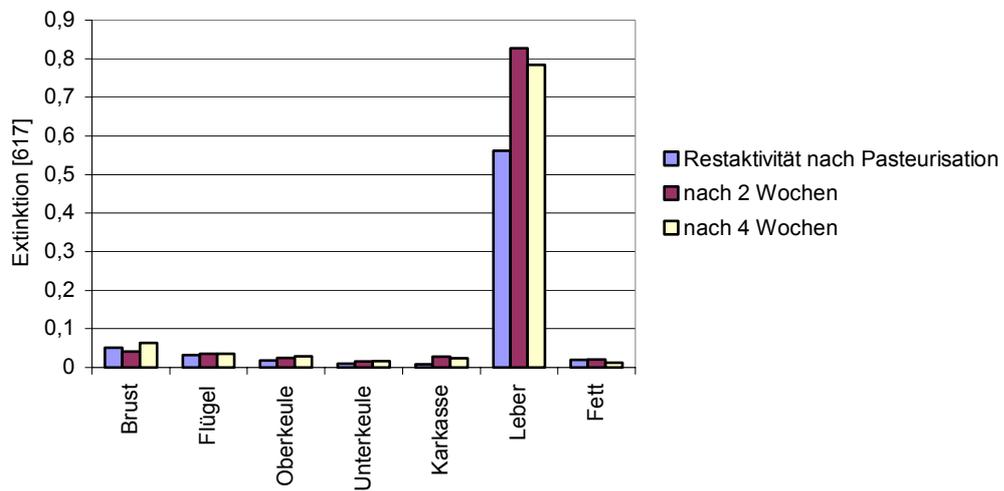
Aus dem Besprochenen folgt, dass in Skelettmuskulatur und Fettgewebe von Pute enthaltene Esterase zu einem geringen Teil offenbar auch durch Hitze, die eine sehr effektive Pasteurisation bewirkt, nicht irreversibel inaktiviert wird. Dies kann bei  $F_{80} = 5$  nach Erhitzen beispielsweise bei Unterkeule dazu führen, dass sich die mit NA ermittelte Restaktivität im Verlaufe einer 4 Wochen langen Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  von  $E_{617} = 0,035$  auf  $0,052$  erhöht; im Falle der NB-Ansätze bei Brustmuskel von  $E_{617} = 0,050$  auf  $0,063$ , bei Flügelmuskulatur von  $E_{617} = 0,032$  auf  $0,035$ , bei Oberkeule von  $E_{617} = 0,018$  auf  $0,028$ , bei Karkasse von  $E_{617} = 0,009$  auf  $0,024$ ; und bei den IA-Ansätzen von Brustmuskel von  $E_{617} = 0,066$  auf  $0,112$ , von Flügel von  $E_{617} = 0,043$  auf  $0,120$  und von Karkasse von  $E_{617} = 0,021$  auf  $0,059$ . Bei Leber wirkt sich die Reaktivierung in Relation zu der auch unmittelbar nach Pasteurisation gegenüber allen anderen Probenarten unvergleichlich höheren Restaktivität wesentlich markanter aus.

Bezüglich des Einflusses einer je nach Rezeptur und Vorbehandlung der Rezepturkomponenten eines Putenfleischproduktes womöglich stärkeren oder schwächeren Reaktivierung des Indikatorenzyms auf die Aussagekraft des Esterase-Tests sei ausdrücklich auf folgendes hingewiesen.

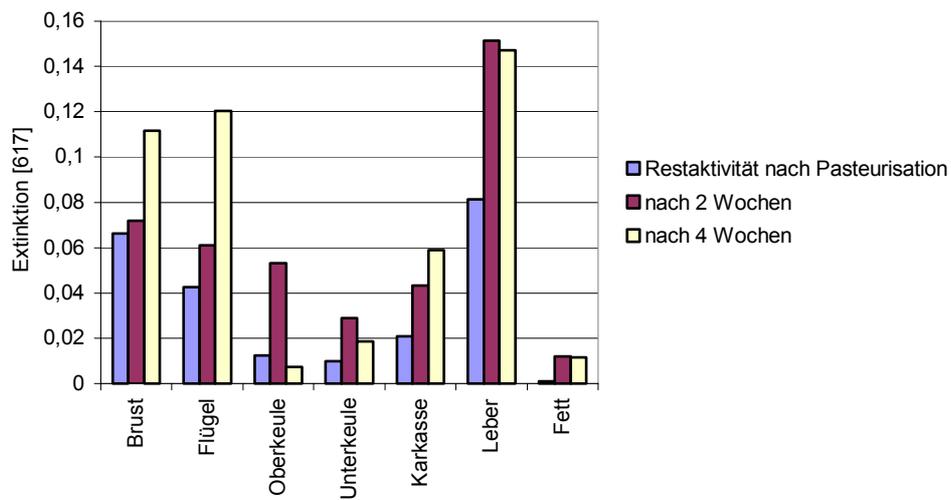
Pökelwaren werden stets aus faktisch schlachtfrischen Teilstücken und zusammengesetzte Produkte aus maximal wenige Tage kühlgelagerten oder aus gefrosteten Fleischabschnitten von anatomisch jeweils sehr unterschiedlicher Provenienz gefertigt. Hackfleischprodukte und Wurst aus Pute sind hinsichtlich des Esterase-Gehaltes der garfertigen Produkte deshalb selbst in kleinen Betrieben, die das Ausgangsmaterial als standardisiertes Zwischenprodukt zukaufen, stets sehr homogene Gemenge. Zudem ist hervorzuheben, dass aus einer Reaktivierung von nicht irreversibel denaturierter Esterase unter der Voraussetzung adäquater Grenzwerte allenfalls ein fälschlich positives, d.h. ein unzutreffenderweise für eine mangelhafte Pasteurisation sprechendes Testergebnis folgen kann, nicht jedoch ein fälschlich negatives Testresultat.



**Abb. 67:** Einfluss einer 2 bis 4 Wochen langen Lagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei  $F_{80} = 5$  mit NA nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute



**Abb. 68:** Einfluss einer 2 bis 4 Wochen langen Lagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei  $F_{80} = 5$  mit NB nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute



**Abb. 69:** Einfluss einer 2 bis 4 Wochen langen Lagerung bei 4°C auf die nach Pasteurisation bei  $F_{80} = 5$  mit IA nachweisbare Esterase-Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute

## 5 Einfluss mikrobieller Esterase auf die Esterase-Restaktivität

Bei der Produktion zusammengesetzter Erzeugnisse aus Putenfleisch werden mit Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe in das jeweilige Gemenge Bakterien eingebracht, die zur Synthese mehr oder weniger hitzestabiler Esterase in unterschiedlichem Maße befähigt sind. Ob und inwieweit mikrobielle Esterase die Aussagekraft des Esterase-Tests beeinträchtigen kann, hängt so möglicherweise nicht nur von der Gesamtkeimzahl der Produkte vor deren Pasteurisation ab, sondern sicherlich auch von der speziesspezifischen Zusammensetzung der Mikroflora.

### 5.1 Material und Methodik

In nachstehend beschriebener Versuchsreihe soll Antwort auf die Frage gegeben werden, ob und inwieweit die Ergebnisse des Esterase-Tests bei Kochpökelerde, Hackfleischprodukten sowie Brühwurst und Leberwurst aus Putenfleisch auch durch die Mikroflora der Rezepturkomponenten der garfertigen Gemenge und nicht zuletzt aber auch der hitzekonditionierten Fertigprodukte beeinflusst wird. Die Studien werden auf jeweils 3 Handelsprodukte der Kategorie Brühwurst, Leberwurst und Kochpökelerde begrenzt, die folgenderweise bezeichnet sind:

- a) Brühwurst 1: „Geflügelfleischwurst mit Geflügelschinkenwurst grob, Spitzenqualität“; Brühwurst 2: „Geflügelfleischwurst mit Geflügelschinkenwurst grob, Spitzenqualität“; Brühwurst 3: „Geflügelwiener“.
- b) Leberwurst 1: „Geflügelleberwurst fein, ohne Nitritpökelsalz“; Leberwurst 2: „Puten-Gourmet-Leberwurst“; Leberwurst 3: „Puten-Gourmet-Leberwurst“.
- c) Kochpökelerde 1: „Münsterländer Putenkochschinken“; Kochpökelerde 2: „Putenbrust“; Kochpökelerde 3: „Putenbrust gegart und geräuchert“.

Die Erzeugnisse werden nach jeweils 12 h langer Vorinkubation bei Raumtemperatur mittels Moulinette homogenisiert. Vom Homogenisat werden ca. 100 g für die Bestimmung der Esterase-Restaktivität sowie der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl abgezweigt, ca. 20 g werden für die spätere Verwendung als Inokulum bei 4°C asserviert. Etwa 250 g Homogenisat werden zur Inaktivierung der in diesem Stadium bestehenden Esterase-Restaktivität und des Restkeimgehaltes 2 h lang bei 121°C autoklaviert, nach Abkühlen mit einem Teil des Asservates im Verhältnis 1:10 beimpft und nach sorgfältigem Vermischen des Inokulums zur Diversifizierung der inokulierten Bakterienpopulation 3 Tage bei 37°C, 10 Tage bei 20°C und

14 Tage bei 8°C inkubiert. Im Anschluss an die jeweilige Inkubation wird die Esterase-Restaktivität und die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl des Probengutes bestimmt.

## **5.2 Ergebnisse und deren Besprechung**

Die in den verschiedenen Prozessstadien der Studie bestehenden Restaktivitäten und Keimgehalte der 12 Putenfleischprodukte sind aus den Tabellen 43 bis 45 und den Abbildungen 70 bis 78 zu ersehen. Hinsichtlich des Einflusses der verschiedenen Bakterienkollektive auf die Esterase-Aktivität der verschiedenen Matrices lassen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe insbesondere folgende Feststellungen zu.

**Tab. 42: Einfluss der mikrobiellen Kontamination auf die Esterase-Aktivität und sensorische Beschaffenheit bei Puten-Brühwurst des Handels**

Probengut	Extinktion [ $E_{617}$ ]			GKZ [KBE/g]	Sensorische Beschaffenheit
	NA	NB	IA		
Brühwurst 1 nach					
Vorinkubation bei 20°C/24 h	0,023	0	0,045	$4 \cdot 10^6$	
Inkubation bei 37°C /3 d	0,641	0,314	0,614	$> 10^{12}$	Extremer Fäulnisgeruch, Fadenziehen
Inkubation bei 20°C /10 d	0,948	0,821	1,683	$> 10^{12}$	schwacher Fäulnisgeruch, Hefen, Schimmel
Inkubation bei 8°C /14 d	0,144	0	0,103	$> 10^{12}$	Deutlicher, ranziger Fehlgeruch, zahlreiche Hefe-, Schimmel- und Bakterienkolonien
Brühwurst 2 nach					
Vorinkubation bei 20°C/24 h	0,028	0	0,048	$6 \cdot 10^6$	
Inkubation bei 37°C /3 d	0,601	0,369	0,921	$> 10^{12}$	Extremer Fäulnisgeruch, Fadenziehen
Inkubation bei 20°C /10 d	0,937	0,581	1,414	$> 10^{12}$	Schwacher Fäulnisgeruch, Hefen, Schimmel
Inkubation bei 8°C /14 d	0,069	0,090	0,089	$> 10^{12}$	Deutlicher, ranziger Fehlgeruch, zahlreiche Hefe-, Schimmel- und Bakterienkolonien
Brühwurst 3 nach					
Vorinkubation bei 20°C/24 h	0,080	0,039	0,024	$5 \cdot 10^6$	
Inkubation bei 37°C /3 d	0,035	0,009	0,031	$6 \cdot 10^7$	Etwas abgetrocknet, minimal veränderter Geruch, keine Kolonien
Inkubation bei 20°C /10 d	1,044	0,758	1,243	$> 10^{12}$	Starker Fäulnisgeruch, Schimmel
Inkubation bei 8°C /14 d	0,208	0,602	0,289	$> 10^{12}$	Schwacher Fehlgeruch, kleine Kolonien

Erklärungen: GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; KBE = Kolonie bildende Einheiten

**Tab. 43: Einfluss der mikrobiellen Kontamination auf die Esterase-Aktivität und sensorische Beschaffenheit bei Puten-Leberwurst des Handels**

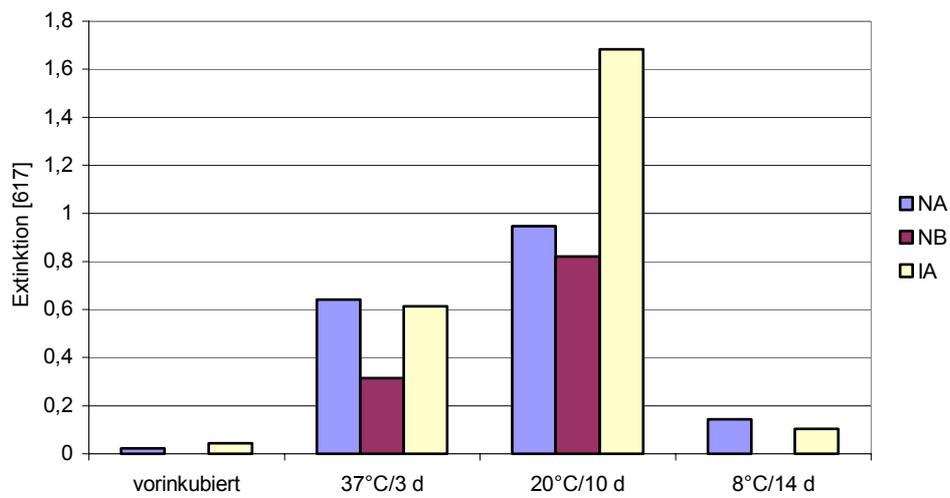
Probengut	Extinktion [ $E_{617}$ ]			GKZ [KBE/g]	Sensorische Beschaffenheit
	NA	NB	IA		
Leberwurst 1 nach					
Vorinkubation bei 20°C/24 h	0,095	0,092	0,035	$2 \cdot 10^4$	
Inkubation bei 37°C /3 d	0,444	<sup>1)</sup>	0,449	$> 10^{12}$	Extremer Fäulnisgeruch, Fadenziehen
Inkubation bei 20°C /10 d	1,046	0,854	0,771	$> 10^{12}$	Starker Fäulnisgeruch, verflüssigt, zahlreiche Schimmelkolonien
Inkubation bei 8°C /14 d	0,926	0,685	0,691	$> 10^{12}$	Deutlicher Fehlgeruch, zahlreiche Schimmelkolonien
Leberwurst 2 nach					
Vorinkubation bei 20°C/24 h	0,011	0	0,024	$5,5 \cdot 10^4$	
Inkubation bei 37°C /3 d	0,643	<sup>1)</sup>	0,557	$> 10^{12}$	Starker Fäulnisgeruch, Fadenziehen
Inkubation bei 20°C /10 d	1,076	1,010	0,627	$> 10^{12}$	Fäulnisgeruch, verflüssigt, zahlreiche Schimmelkolonien
Inkubation bei 8°C /14 d	1,011	0,602	0,432	$> 10^{12}$	Deutlicher Fehlgeruch, Schimmelkolonien
Leberwurst 3 nach					
Vorinkubation bei 20°C/24 h	0,009	0	0,036	$9 \cdot 10^4$	
Inkubation bei 37°C /3 d	0,815	0,644	0,205	$> 10^{12}$	Starker Fäulnisgeruch, Fadenziehen
Inkubation bei 20°C /10 d	1,026	0,056	1,021	$> 10^{12}$	Geringer Verderbsgeruch, Fadenziehen
Inkubation bei 8°C /14 d	0,507	0,4	0,242	$> 10^{12}$	Deutlicher Fehlgeruch, Schimmel

Erklärungen: GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; KBE = Kolonie bildende Einheit; <sup>1)</sup> Es wurde versäimt, den Ansätzen Substrat zuzusetzen

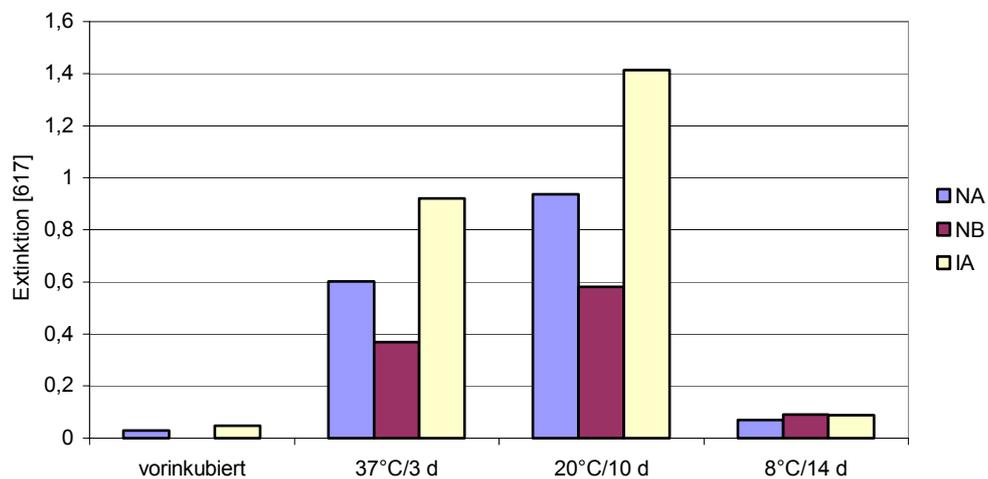
**Tab. 44: Einfluss der mikrobiellen Kontamination auf die Esterase-Aktivität und sensorische Beschaffenheit bei Puten-Kochpökelfprodukten des Handels**

Probengut	Extinktion [ $E_{617}$ ]			GKZ [KBE/g]	Sensorische Beschaffenheit
	NA	NB	IA		
Kochpökelfprodukt 1 nach					
Vorinkubation bei 20°C/24 h	0,168	0	0,116	$1,9 \cdot 10^7$	
Inkubation bei 37°C /3 d	0,480	0,300	0,608	$> 10^{12}$	Schwacher Fehlgeruch
Inkubation bei 20°C /10 d	0,900	0,850	1,052	$> 10^{12}$	Leichter Fäulnisgeruch, Schimmel, Hefen
Inkubation bei 8°C /14 d	0,201	0,077	0,107	$> 10^{12}$	Leicht ranziger Fehlgeruch
Kochpökelfprodukt 2 nach					
Vorinkubation bei 20°C/24 h	0,338	0	0,625	$2,9 \cdot 10^8$	
Inkubation bei 37°C /3 d	0,295	0,162	0,053	$> 10^{12}$	Schwacher Fehlgeruch
Inkubation bei 20°C /10 d	0,088	0,722	0,418	$> 10^{12}$	Leichter Fäulnisgeruch, leicht verflüssigt
Inkubation bei 8°C /14 d	0,629	0,227	0,365	$> 10^{12}$	Leicht ranziger Fehlgeruch
Kochpökelfprodukt 3 nach					
Vorinkubation bei 20°C/24 h	0,119	0	0,105	$3,9 \cdot 10^8$	
Inkubation bei 37°C /3 d	0,077	0	0,022	$> 10^{12}$	Schwacher Geruch, eingetrocknet
Inkubation bei 20°C /10 d	1,018	0,674	0,329	$> 10^{12}$	Mäßiger Fehlgeruch
Inkubation bei 8°C /14 d	0,459	0,229	0,141	$> 10^{12}$	Leichter Fehlgeruch

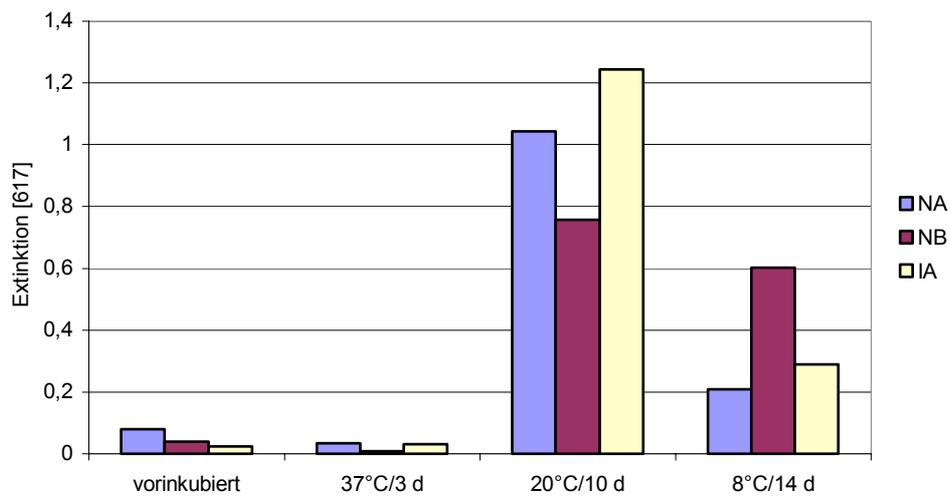
Erklärungen: GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; KBE = Kolonie bildende Einheit



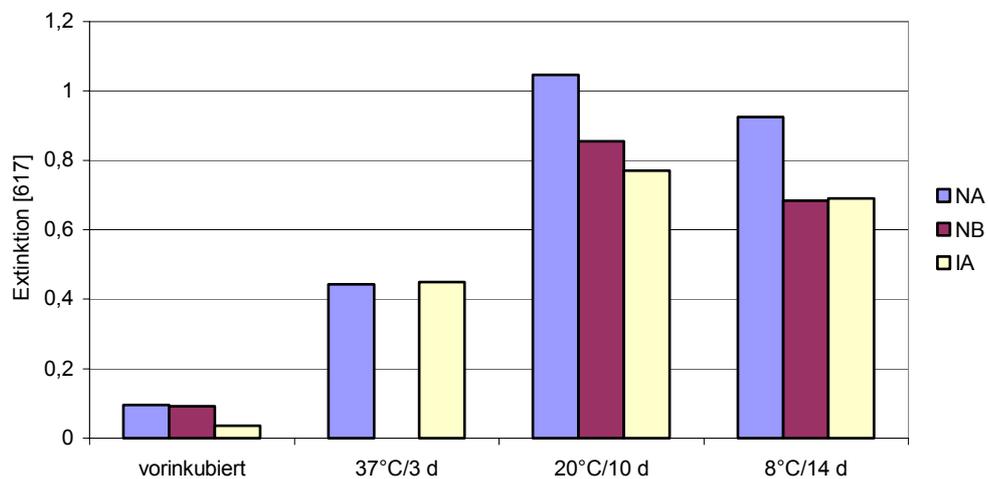
**Abb. 70: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Brühwurst 1 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Brühwurst des Handels**



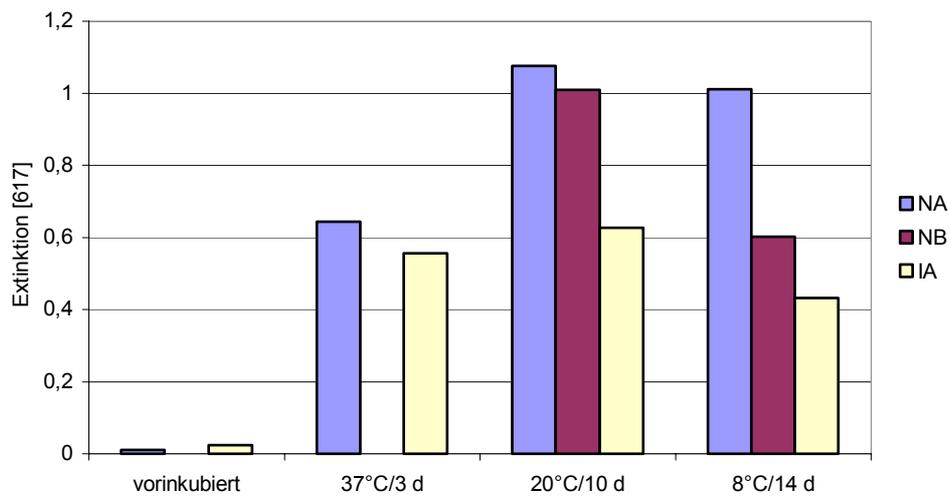
**Abb. 71: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Brühwurst 2 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Brühwurst des Handels**



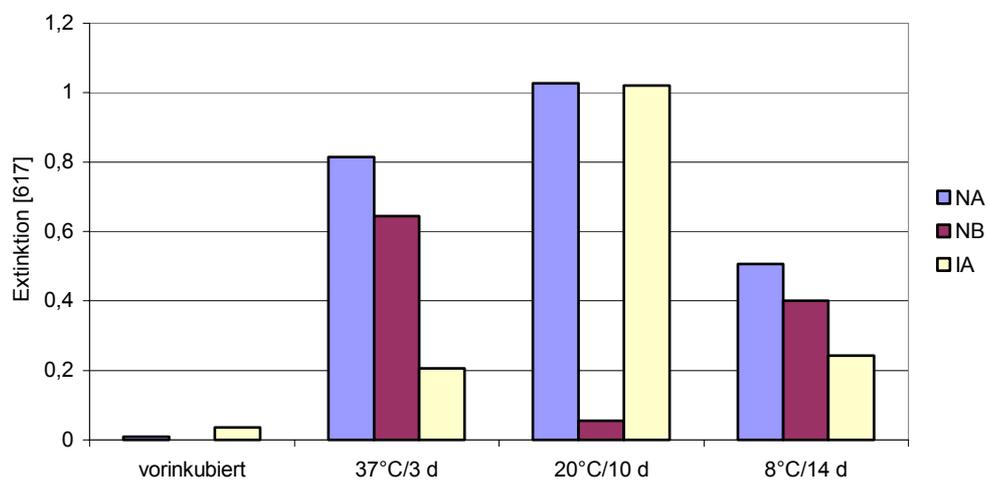
**Abb. 72: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Brühwurst 3 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Brühwurst des Handels**



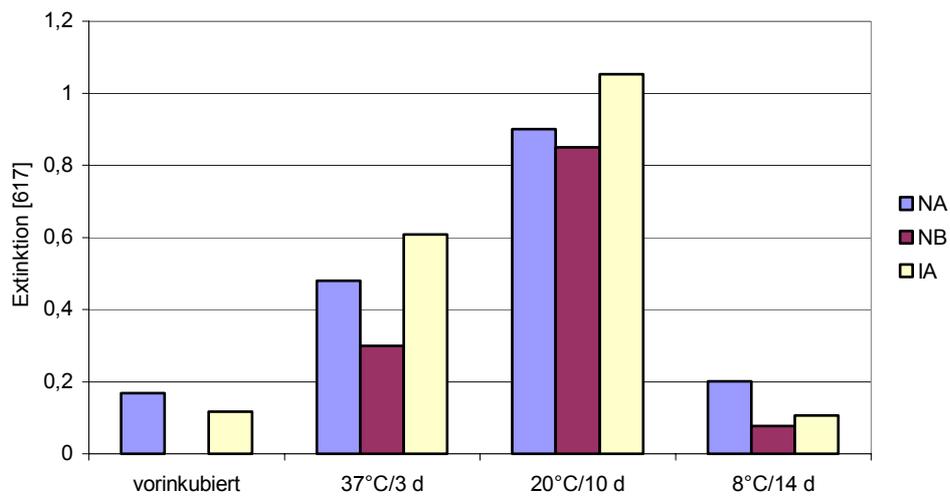
**Abb. 73: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Leberwurst 1 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Leberwurst des Handels**



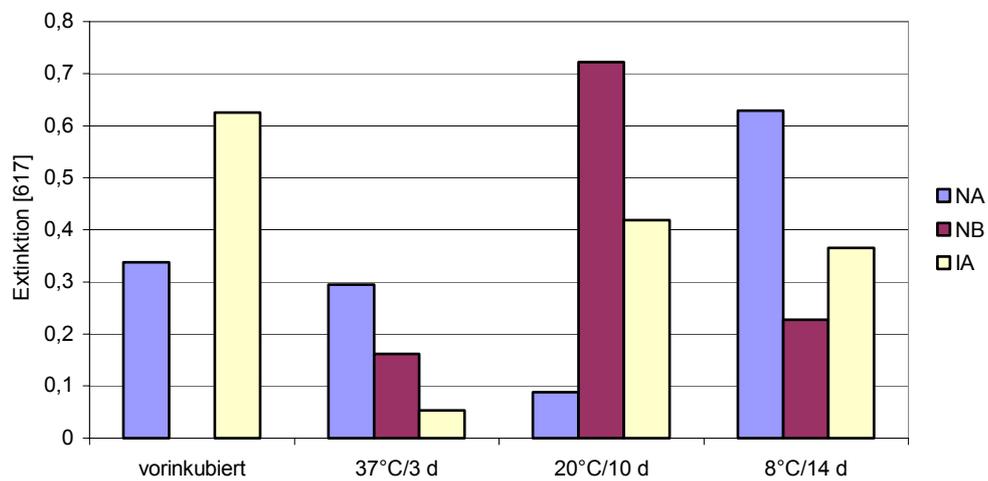
**Abb. 74: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Leberwurst 2 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Leberwurst des Handels**



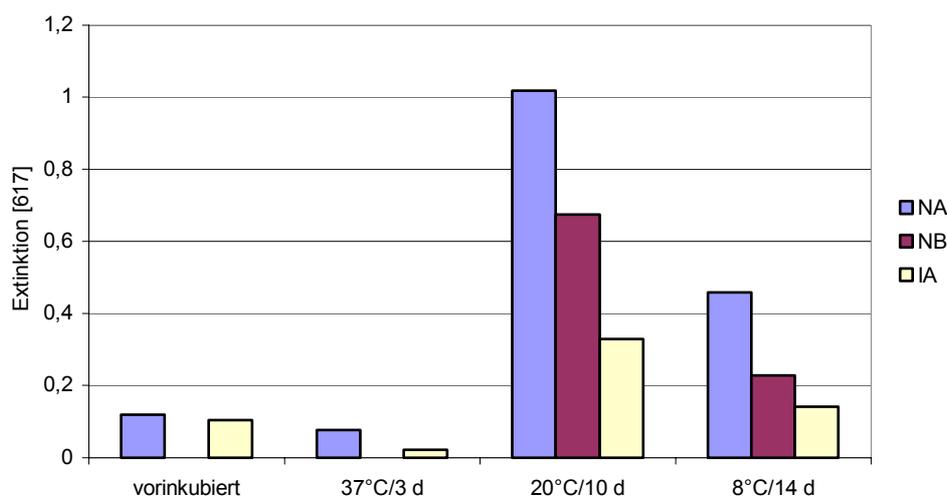
**Abb. 75: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Leberwurst 3 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Leberwurst des Handels**



**Abb. 76: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Kochpökelprodukt 1 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Kochpökelware des Handels**



**Abb. 77: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Kochpökelprodukt 2 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Kochpökelware des Handels**



**Abb. 78: Einfluss der mikrobiellen Kontamination von Kochpökelprodukt 3 auf die Esterase-Aktivität bei Puten-Kochpökelpware des Handels**

Bei den Brühwurstproben resultiert nach 10 Tage langer Inkubation bei 20°C bei einer Gesamtkeimzahl von  $> 10^{12}$  KBE/g ein höchst sinnfälliger mikrobieller Verderb und eine mikrobielle Esterase-Aktivität, die mit  $E_{NA} \sim 1,000$ ,  $E_{NB} \sim 0,700$  und  $E_{IA} \sim 1,400$  um das 13- bis 51-fache über der fleischoriginären Aktivität der vorinkubierten Probe liegt. Die bei den anderen Inkubationsbedingungen bestehenden Aktivitäten mikrobieller Esterase sind erheblich geringer. Dass bei der Brühwurst 3 eine nach 3 Tage langer Inkubation bei 37°C wegen einer Abtrocknung des Probenansatzes resultierende Gesamtkeimzahl von nur  $6 \times 10^7$  KBE/g Quelle einer Esterase-Aktivität von nur  $E_{NA} = 0,035$ ,  $E_{NB} = 0,030$  und  $E_{IA} = 0,031$  ist, ist plausibel. Dass dieser Befund mit einem „minimal veränderten“ Geruch der Probe korreliert ist, ist angesichts der niedrigen Keimzahl ebenfalls verständlich.

Auch bei den rückbeimpften Leberwurst-Proben resultiert das Maximum der mikrobiellen Esterase-Aktivität nach einer Inkubation von 10 Tagen bei 20°C. Die mit einer Gesamtkeimzahl von  $> 10^{12}$  KBE/g korrelierte mikrobielle Esterase-Aktivität beträgt – wenn von den NB-Ansätzen bei Leberwurst 3 abgesehen wird - mit  $E_{NA} \geq 1,026$ ,  $E_{NB} \geq 0,854$  und  $E_{IA} \geq 0,627$  das 4- bis 114-fache der nach der Vorinkubation ermittelten Aktivität. Nachdem die niedrige NB-Aktivität bei Probe 3 analytisch nicht in Zweifel steht, sei sie als Beispiel dafür benannt, wie sehr auch mikrobielle Esterase hinsichtlich ihrer Substrataffinität differieren kann.

Abgesehen von den NA-Ansätzen von Probe 2, bei denen das Maximum der mikrobiellen Esterase-Aktivität bei der 8°C/14 d-Population besteht, resultiert auch bei den Kochpökelprodukten die mit  $E_{NA} \sim 0,960$ ,  $E_{NB} \sim 0,750$  und  $E_{IA} \sim 0,600$  höchste Aktivität mikrobieller Esterase ebenfalls bei der nach 10 Tage langer Inkubation bei 20°C entstandenen Bakterienpopulation der Gesamtkeimzahl von  $> 10^{12}$  KBE/g. Ursache dafür, dass bei den Kochpökelprodukten nach der Vorinkubation mit  $10^7$  bis  $10^8$  KBE/g höhere Gesamtkeimzahlen als bei den Ansätzen mit Brühwurst und Leberwurst resultieren, dürfte primär auf eine entsprechend höhere Ausgangskontamination der Produkte zurückzuführen sein. Dass beim Kochpökelprodukt 2 nach 10 Tage langer Inkubation bei 20°C bei gewissermaßen gleicher Gesamtkeimzahl von  $> 10^{12}$  KBE/g mit  $E_{IA} = 0,418$  und zumal mit  $E_{NA} = 0,088$  eine sehr viel niedrigere Esterase-Aktivität resultiert als und mit  $E_{IA} = 1,052$  bei „Kochschinken 1“ und mit  $E_{NA} = 1,018$  bei „Kochschinken 3“, ist Folge der speziesspezifisch unterschiedlichen Zusammensetzung der inokulierten originären Mikroflora und des Einflusses der Inkubationsbedingungen auf die quantitative Spezieszusammensetzung der Population und die spezielle Stoffwechsellleistung der verschiedenen Bakterienarten. Besonders deutlich wird dieser Zusammenhang auch angesichts der nach 3 Tage langer Inkubation bei 37°C substratspezifisch sehr stark divergierenden Esterase-Aktivitäten der 3 Kochpökelprodukte.

Hervorgehoben seien von den Ergebnissen dieser Versuchsreihe folgende bezüglich des Einflusses von mikrobieller Esterase auf die Esterase-Restaktivität eines Fleischerzeugnisses besonders elementare Feststellungen: Aerobe mesophile Bakterien können in einer Keimzahl von  $10^{12}$  KBE/g sehr hohe Esterase-Aktivitäten bedingen. Die Substrataffinität mikrobieller Esterase kann von Spezies zu Spezies und möglicherweise auch in Abhängigkeit von deren milieubedingter Stoffwechsellkondition mehr oder weniger differieren. Gehalte an mikrobieller Esterase, die unter den Bedingungen des Esterase-Tests an dessen Grenzwerte auch nur annähernd heranreichen, setzen Keimgehalte voraus, die die Produkte geruchlich und schon gleich geschmacklich sinnfällig verdorben machen.

## 6 Einfluss der Rezeptur auf die Esterase-Restaktivität bei Erzeugnissen aus Putenfleisch

Wie sich bei den Hitze regimes mit schwachem Pasteurisationseffekt besonders deutlich zeigt, ist die Esterase-Restaktivität bei den Erzeugnissen aus Fleisch nicht nur eine Funktion der Hitzebehandlung, sondern vor allem auch der Rezeptur. In der folgenden Versuchsreihe soll der Einfluss der Mengenanteile der von der Pute stammenden Rezepturkomponenten sowie die Auswirkung der bei Kochpökelfleischprodukten, Hackfleischprodukten und Wurst elementaren Zusatzstoffe Nitritpökelsalz und Phosphat auf die Hitzeinaktivierung von Esterase ermittelt werden.

### 6.1 Einfluss von Nitritpökelsalz und Phosphat auf die Hitzeinaktivierung von Esterase

Im Sinne von Ziffer 2.3 der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse sind gegarte Pökelfleischerzeugnisse „umgerötete und gegarte, meist geräucherte Fleischerzeugnisse, denen kein Brät zugesetzt ist, soweit dieses nicht zur Bindung großer Fleischteile dient“ (z.B. bei „Kaiserfleisch“, 2.342.4). Solche Kochpökelfleischwaren enthalten wie umgerötete Brüh- und Leberwurst ca. 1.8 bis ausnahmsweise ca. 3,3% Nitritpökelsalz und wie Brühwurst meist auch 0,3% Phosphat. Brühwürste sind gemäß Ziffer 2.22 der Leitsätze „durch Brühen, Backen, Braten oder auf andere Weise hitzebehandelte Wurstwaren, bei denen zerkleinertes rohes Fleisch mit Kochsalz (auch in Form von Nitritpökelsalz...) und ggf. anderen Kutterhilfsmitteln meist unter Zusatz von Wasser ganz oder teilweise aufgeschlossen wurde und deren Muskeleiweiß bei der Hitzebehandlung mehr oder weniger zusammenhängend koaguliert ist, so dass die Erzeugnisse bei etwaigem erneuten Erhitzen schnittfest bleiben. ...“. Zu den anderen „Kutterhilfsmitteln“ zählen insbesondere die hierfür zugelassenen Phosphate. Leberwürste sind maßgeblich der Ziffer 2.23 der Leitsätze Kochwürste, d.h. „hitzebehandelte Wurstwaren, die vorwiegend aus gekochtem Ausgangsmaterial hergestellt werden. ...“ Die Konsistenz der Kochstreichwürste beruht nach Ziffer 2.231 auf erstarrtem Fett oder zusammenhängend koaguliertem Lebereiweiß.

In nachstehend beschriebenen Versuchen wird an pasteurisierter Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber von der Pute zunächst der Einfluss des Zusatzes von 1,5, 2,5 und 3,5% Nitritpökelsalz sowie von 0,3 bis 0,5% Phosphat auf die Hitzeinaktivierung von Carbesterase geprüft.

### 6.1.1 Material und Methodik

Vom Homogenisat der je 2 Sammelproben von Brustmuskel, Flügelmuskulatur, Oberkeule, Unterkeule, Karkasse sowie von Leber und Fettgewebe der Pute werden gemäß *1.2 Probenaufbereitung und Erhitzung* ca. 600 g vorbereitet, bei  $-18^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und bei dieser Temperatur für die Dauer der Versuchsreihe 24 h bis 7 Tage vorgehalten. Für die Bereitstellung der verschiedenen Versuchschargen werden von den jeweils auf Raumtemperatur gebrachten Sammelproben Teilmengen von ca. 40 g im Mörser homogen mit 0,3 und 0,5 % Phosphat als einem Gemisch aus 2 Teilen Tetranatriumdiphosphat und 1 Teil Natriumdi-hydrogenphosphat (MERCK Nr. 6591, Riedel-de Haen AG Nr. 04272) vermengt, hiervon jeweils  $30\text{ g} \pm 0,5\text{ g}$  der Proben in Folienbeutel abgefüllt, gemäß *1.2 Probenaufbereitung und Erhitzung* 5 min lang bei  $80 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  erhitzt, danach sofort im Eiswasserbad gekühlt und dann bis zur Bestimmung der Esterase-Restaktivität bei 0 bis  $4^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert. Auf gleiche Weise werden die Versuchschargen mit 1,5, 2,5 und 3,5 % Nitritpökelsalz bereitgestellt.

### 6.1.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Der Einfluss von Nitritpökelsalz (NPS) und Phosphat auf die Hitzeinaktivierung der Esterase ergibt sich aus Tabelle 45 bis 50.

**Tab. 45: Einfluss von Nitritpökelsalz auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei  $F_{80} = 5$  und auf die mit NA nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute**

Probengut		Extinktion [ $E_{617}$ ] mit NA bei NPS-Zusatz [%]				r
		0	1,5	2,5	3,5	
Brustmuskel	Probe 1	0,156	0,155	0,143	0,140	-0,912
	Probe 2	0,149	0,153	0,119	0,135	-0,627
	MW	0,152	0,154	0,131	0,138	-0,756
Flügel	Probe 1	0,094	0,095	0,081	0,085	-0,754
	Probe 2	0,089	0,096	0,083	0,095	0,091
	MW	0,092	0,096	0,082	0,090	-0,406
Oberkeule	Probe 1	0,078	0,060	0,047	0,045	-0,976
	Probe 2	0,070	0,060	0,056	0,049	-0,996
	MW	0,074	0,060	0,052	0,047	-0,991
Unterkeule	Probe 1	0,045	0,044	0,051	0,039	-0,255
	Probe 2	0,079	0,057	0,059	0,061	-0,736
	MW	0,062	0,051	0,055	0,051	-0,791
Karkasse	Probe 1	0,085	0,062	0,040	0,050	-0,882
	Probe 2	0,093	0,078	0,061	0,060	-0,971
	MW	0,089	0,071	0,051	0,055	-0,930
Leber	Probe 1	0,143	0,152	0,125	0,117	-0,788
	Probe 2	0,136	0,110	0,120	0,111	-0,764
	MW	0,140	0,131	0,123	0,115	-0,995
Fettgewebe	Probe 1	0,020	0,015	0,008	0,009	-0,920
	Probe 2	0,020	0,016	0,007	0,011	-0,830
	MW	0,020	0,016	0,008	0,010	-0,880

Erklärungen: MW = arithmetischer Mittelwert; r = Pearsonscher Korrelationskoeffizient

**Tab. 46: Einfluss von Nitritpökelsalz auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei  $F_{80} = 5$  und auf die mit NB nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute**

Probengut		Extinktion [ $E_{617}$ ] mit NB bei NPS-Zusatz [%]				r
		0	1,5	2,5	3,5	
Brustmuskel	Probe 1	0,038	0,017	0,009	0	-0,989
	Probe 2	0,039	0,029	0,013	0,003	-0,986
	MW	0,038	0,023	0,011	0,002	-0,999
Flügel	Probe 1	0,020	0,001	0,014	0,008	-0,427
	Probe 2	0,023	0,006	0,005	0	-0,948
	MW	0,022	0,004	0,010	0,004	-0,774
Oberkeule	Probe 1	0,005	0	0,009	0	-0,146
	Probe 2	0,011	0,007	0,001	0	-0,976
	MW	0,008	0,004	0,005	0	-0,871
Unterkeule	Probe 1	0	0	0,005	0	0,279
	Probe 2	0,018	0	0	0	-0,837
	MW	0,009	0	0,003	0	-0,806
Karkasse	Probe 1	0,031	0	0	0	-0,837
	Probe 2	0,043	0	0	0	-0,837
	MW	0,037	0	0	0	-0,837
Leber	Probe 1	0,309	0,229	0,159	0,058	-0,988
	Probe 2	0,256	0,158	0,120	0,114	-0,949
	MW	0,283	0,194	0,140	0,086	-0,999
Fettgewebe	Probe 1	0,008	0,008	0	0	-0,890
	Probe 2	0,012	0,023	0,012	0	-0,560
	MW	0,010	0,016	0,006	0	-0,724

Erklärungen: MW = arithmetischer Mittelwert; r = Pearsonscher Korrelationskoeffizient

**Tab. 47: Einfluss von Nitritpökelsalz auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei  $F_{80} = 5$  und auf die mit IA nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute**

Probengut		Extinktion [ $E_{617}$ ] mit IA bei NPS-Zusatz [%]				r
		0	1,5	2,5	3,5	
Brustmuskel	Probe 1	0,026	- <sup>1)</sup>	0,026	0,015	-
	Probe 2	0,046	0,032	0,030	0,008	-0,940
	MW	0,036	0,163	0,028	0,011	-0,893
Flügel	Probe 1	0,045	0,034	0,040	0,025	-0,801
	Probe 2	0,059	0,042	0,050	0,026	-0,838
	MW	0,052	0,038	0,046	0,026	-0,824
Oberkeule	Probe 1	0,028	0,034	0,030	0,019	-0,565
	Probe 2	0,027	0,036	0,023	0,012	-0,679
	MW	0,028	0,035	0,027	0,016	-0,644
Unterkeule	Probe 1	0,003	0,008	0,015	0,005	0,418
	Probe 2	0,015	0,013	0,022	0,014	0,185
	MW	0,009	0,010	0,018	0,010	0,335
Karkasse	Probe 1	0,042	0,034	0,028	0,025	-0,993
	Probe 2	0,038	0,040	0,032	0,019	-0,827
	MW	0,040	0,038	0,030	0,022	-0,954
Leber	Probe 1	0,055	0,046	0,034	0,032	-0,973
	Probe 2	0,036	0,033	0,045	0,037	0,365
	MW	0,045	0,039	0,039	0,034	-0,962
Fettgewebe	Probe 1	0,012	0,002	0,002	- <sup>1)</sup>	-
	Probe 2	0,008	0	0,001	0	-0,830
	MW	0,010	0	0	0	-0,890

Erklärungen: MW = arithmetischer Mittelwert; r = Pearsonscher Korrelationskoeffizient; <sup>1)</sup> Unfallwert

**Tab. 48: Einfluss von Phosphat auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei  $F_{80} = 5$  und auf die mit NA nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute**

Probengut		Extinktion [ $E_{617}$ ] mit NA bei Phosphat-Zusatz [%]			r
		0	0,3	0,5	
Brustmuskel	Probe 1	0,156	0,161	0,170	0,961
	Probe 2	0,148	0,162	0,147	0,027
	MW	0,152	0,162	0,159	0,730
Flügel	Probe 1	0,094	0,091	0,082	-0,923
	Probe 2	0,089	0,095	0,096	0,979
	MW	0,092	0,093	0,090	-0,564
Oberkeule	Probe 1	0,078	0,071	0,072	-0,888
	Probe 2	0,070	0,077	0,057	-0,571
	MW	0,074	0,074	0,065	-0,803
Unterkeule	Probe 1	0,045	0,055	0,040	-0,240
	Probe 2	0,079	0,073	0,075	-0,737
	MW	0,062	0,064	0,058	-0,597
Karkasse	Probe 1	0,085	0,072	0,078	-0,665
	Probe 2	0,093	0,089	- <sup>1)</sup>	-
	MW	0,089	0,081	0,078	-
Leber	Probe 1	0,143	0,177	0,155	0,468
	Probe 2	0,136	0,153	0,163	0,999
	MW	0,140	0,165	0,159	0,809
Fettgewebe	Probe 1	0,020	0,037	0,014	-0,133
	Probe 2	0,020	0,019	0,015	-0,854
	MW	0,020	0,028	0,014	-0,282

Erklärungen: MW = arithmetischer Mittelwert; r = Pearsonscher Korrelationskoeffizient; <sup>1)</sup> Unfallwert

**Tab. 49: Einfluss von Phosphat auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei  $F_{80} = 5$  und auf die mit NB nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute**

Probengut		Extinktion [ $E_{617}$ ] mit NB bei Phosphat-Zusatz [%]			r
		0	0,3	0,5	
Brustmuskel	Probe 1	0,037	0,041	0,040	0,705
	Probe 2	0,038	0,036	0,042	0,515
	MW	0,038	0,039	0,041	0,915
Flügel	Probe 1	0,020	0,013	0,012	-0,940
	Probe 2	0,023	0,016	0,031	0,432
	MW	0,022	0,015	0,022	-0,084
Oberkeule	Probe 1	0,004	0	0	-0,918
	Probe 2	0,011	0	0	-0,918
	MW	0,008	0	0	-0,918
Unterkeule	Probe 1	0	- <sup>1)</sup>	0	-
	Probe 2	0,018	0	0	-0,918
	MW	0,009	0	0	-0,918
Karkasse	Probe 1	0,031	0,014	0,028	-0,300
	Probe 2	0,043	0,023	0,020	-0,953
	MW	0,037	0,019	0,024	-0,757
Leber	Probe 1	0,309	0,242	0,256	-0,821
	Probe 2	0,256	0,257	0,237	-0,776
	MW	0,283	0,250	0,247	-0,945
Fettgewebe	Probe 1	0,008	0,012	0,023	0,919
	Probe 2	0,012	0,006	0,043	0,712
	MW	0,010	0,009	0,033	0,780

Erklärungen: MW = arithmetischer Mittelwert; r = Pearsonscher Korrelationskoeffizient; <sup>1)</sup> Unfallwert

**Tab. 50: Einfluss von Phosphat auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei  $F_{80} = 5$  und auf die mit IA nachweisbare Restaktivität bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute**

Probengut		Extinktion [ $E_{617}$ ] mit IA bei Phosphat-Zusatz [%]			r
		0	0,3	0,5	
Brustmuskel	Probe 1	0,026	0,053	0,056	0,954
	Probe 2	0,045	0,056	0,060	0,985
	MW	0,036	0,055	0,058	0,965
Flügel	Probe 1	0,045	0,052	0,040	-0,308
	Probe 2	0,059	0,071	0,065	0,557
	MW	0,052	0,062	0,053	0,138
Oberkeule	Probe 1	0,028	0,055	0,054	0,904
	Probe 2	0,027	0,032	0,025	-0,165
	MW	0,028	0,044	0,040	0,793
Unterkeule	Probe 1	0,002	0,054	0,020	0,450
	Probe 2	0,015	0,024	0,038	0,971
	MW	0,009	0,039	0,029	0,745
Karkasse	Probe 1	0,042	0,029	0,040	-0,286
	Probe 2	0,038	0,048	0,050	0,957
	MW	0,040	0,039	0,045	0,644
Leber	Probe 1	0,055	0,044	0,044	-0,918
	Probe 2	0,035	0,059	0,061	0,943
	MW	0,045	0,052	0,053	0,961
Fettgewebe	Probe 1	0,012	0,006	0,007	-0,808
	Probe 2	0,008	0	0	-0,918
	MW	0,010	0,003	0,003	-0,876

Erklärungen: MW = arithmetischer Mittelwert; r = Pearsonscher Korrelationskoeffizient

Zufolge den in den Tabellen 45 bis 47 zusammengestellten Daten über den Einfluss von NPS auf die Hitzeinaktivierung von Esterase bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute, resultiert mit NA bei den Ansätzen mit 3,5% NPS im Durchschnitt sämtlicher Probenarten eine mittlere Abnahme der Enzymaktivität um  $E_{617} = 0,018$ . Die durch den Zusatz von 3,5% NPS bewirkte maximale Verringerung der Restaktivität um  $E_{617} = 0,034$  wird beim Probengut Karkasse notiert, die mit  $E_{617} = 0,002$  geringste bei der Flügelmuskulatur. Der jeweils auf dem Mittelwert von Probe 1 und 2 basierende Korrelationskoeffizient von NPS-Gehalt und Esterase-Restaktivität liegt - bei Ausschluss der Probe 2 von Flügel - bei allen Probenarten zwischen  $r = -0,756$  und  $r = -0,995$ . Mit Ausnahme der Probe 1 von Unterkeule zeichnet sich als Folge des Zusatzes von 3,5% NPS auch mit NB bei allen Proben eine geringgradige Abnahme der Esterase-Aktivität ab. Bei Skelettmuskulatur und Fettgewebe beträgt die Abnahme durchschnittlich  $E_{617} = 0,020$ , bei Leber hingegen bei Probe 1  $E_{617} = 0,251$  und bei Probe 2  $E_{617} = 0,142$ . Der Korrelationskoeffizient liegt mit  $r = -0,724$  beim Fettgewebe am niedrigsten und mit  $r = -0,999$  beim Brustmuskel am höchsten. In Folge des Zusatzes von NPS verringert sich auch die mit IA nachweisbare Esterase-Restaktivität geringgradig, so dass beim Zusatz 3,5% eine mittlere Abnahme um  $E_{617} = 0,017$  erfolgt. Der niedrigste und einzige positive Korrelationskoeffizient wird mit  $r = 0,335$  bei Unterkeule, der höchste mit  $r = -0,962$  bei Leber nachgewiesen.

Der Einfluss des Phosphat-Zusatzes manifestiert sich, wie aus den Tabellen 48 bis 50 zu ersehen ist, wesentlich uneinheitlicher. So resultieren zwischen dem Phosphat-Zusatz und den Mittelwerten der NA-Ansätze bei Brustmuskel ein positiver Korrelationskoeffizient von  $r = 0,730$ , bei der Leber von  $r = 0,809$  und bei Flügelmuskulatur, Oberkeule, Unterkeule und Fettgewebe negative Korrelationskoeffizienten von minimal  $r = -0,282$  beim Fettgewebe und maximal  $r = -0,803$  bei der Oberkeule. Die durch 0,5% Phosphat bei Brustmuskel und Leber bewirkte mittlere Hemmung und die bei den anderen Probenarten resultierende mittlere Beschleunigung der Esterase-Inaktivierung entspricht einer Restaktivitätsdifferenz von  $E_{617} = 0,009$ . Auch bei den Ansätzen mit NB führt der Zusatz von 0,5% Phosphat meist zu einer Beschleunigung, bei einigen Probenarten aber auch zu einer Hemmung der Esterase-Inaktivierung, die einer mittleren Extinktionsdifferenz von  $E_{617} \approx 0,015$  entsprechen. Der Korrelationskoeffizient zwischen der Phosphat-Konzentration und mittleren Restaktivität von Probe 1 und 2 beträgt beim Brustmuskel  $r = 0,915$ , beim Fettgewebe  $r = 0,780$  und bei Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Karkasse und Leber von  $r = -0,084$  bis  $-0,945$ . Bei den IA-Ansätzen nimmt die durchschnittliche Esterase-Restaktivität beim Fettgewebe um  $E_{617} = 0,007$  ab, bei den anderen Probenarten um  $E_{617} = 0,001$  bis  $E_{617} = 0,022$  zu. Der Korrelationskoeffizient zwischen dem Phosphatzusatz und der mittleren Restaktivität beträgt minimal  $r = 0,138$  bei der Flügelmuskulatur und maximal  $r = 0,965$  beim Brustmuskel.

Aus dem dargestellten folgt:

Ein Zusatz von Nitritpökelsalz in einer Höhe von 3,5% kann zu einer geringen Beschleunigung der Enzym-Inaktivierung führen. Diesem Umstand ist beim Vorschlag eines potentiellen Grenzwertes einer ausreichenden Pasteurisation Rechnung zu tragen.

## **6.2 Einfluss der Esterase-Aktivität der von Pute stammenden Rezepturkomponenten auf die Restaktivität der Produkte**

Sensorische, hygienische und technologische Beschaffenheit bei Lebensmitteln beruht generell auf Rezeptur und Herstellungsweise. Wie die Produkte aus Rind- und Schweinefleisch können sich hinsichtlich ihrer Rezeptur auch die Erzeugnisse aus Putenfleisch selbst bei gleicher Sortenzugehörigkeit nicht unerheblich von einander unterscheiden. In nachstehend beschriebener Versuchsreihe soll deshalb der Einfluss unterschiedlicher Gemenge aus Skelettmuskulatur verschiedener anatomischer Provenienz, Leber und Fettgewebe von Pute auf die Restaktivitäten der Mischungen nach dem Erhitzen am Erschwernisfall von Gemengen aus nur zwei und rezepturanteilig gleichgewichtigen Komponenten ermittelt werden.

### **6.2.1 Probengut und Versuchsanordnung**

Von Brustmuskel, Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Karkasse, Leber und Fettgewebe werden gemäß *1.2 Probenaufbereitung und Erhitzung* jeweils Sammelproben von ca. 1000 g homogenisiert und hiervon je 5 Proben von  $30 \pm 0,5$  g in Probenbeutel gefüllt. Zusätzlich wird das Homogenisat einer jeden Probenart im Verhältnis 1:1 mit dem Homogenisat einer jeweils anderen Probenart mittels Moulinette zu einer Zwei-Komponenten-Mischung gemischt, von der jeweils 3 Portionen von  $30 \pm 0,5$  g in den Probenbeutel gewogen werden. Die Versuchschargen werden 7 bis 14 d bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert, für die Untersuchung auf Zimmertemperatur gebracht, dann 5 min im Wasserbad von  $80 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  erhitzt, nach 5 min langem Kühlen in Eiswasser in den Kühlschrank von  $4^{\circ}\text{C}$  gegeben und tags darauf auf Esterase-Restaktivität untersucht. Aus den Mittelwerten der Restaktivität der einzelnen Probenarten wird rechnerisch die Restaktivität der jeweiligen Mischung extrapoliert und vergleichsweise dem Mittelwert der analytisch bestimmten Restaktivitäten gegenübergestellt.

### **6.2.2 Ergebnisse und deren Besprechung**

Die analytisch bestimmten Esterase-Restaktivitäten der einzelnen Probenarten sind in Tabelle 51, die analytisch ermittelten und rechnerisch extrapolierten Restaktivitäten der Zwei-Komponenten-Mischungen in Tabelle 51 wiedergegeben.

**Tab. 51: Esterase-Restaktivität der bei  $F_{80} = 5$  pasteurisierten und für die Bereitstellung der Zwei-Komponenten-Mischungen verwendeten Probenarten (vgl. Tab. 52)**

Probenart	Probe Nr.	Extinktion [ $E_{617}$ ]		
		NA	NB	IA
Brustmuskel	1	0,138	0,029	0,073
	2	0,130	0,062	0,061
	3	0,125	0,062	0,044
	4	0,102	0,042	0,043
	5	0,109	0,030	0,034
	MW	0,121	0,045	0,051
Flügel	1	0,105	0,021	0,047
	2	0,095	0,032	0,033
	3	0,094	0,027	0,040
	4	0,098	0,016	0,039
	5	0,098	0,019	0,032
	MW	0,098	0,023	0,038
Oberkeule	1	0,060	0,009	0,003
	2	0,055	0,004	0,002
	3	0,055	0,011	0,004
	4	0,048	0,010	0,002
	5	0,053	0,007	0,003
	MW	0,054	0,008	0,003
Unterkeule	1	0,046	0,000	0,014
	2	0,043	0,000	0,035
	3	0,047	0,097	0,027
	4	0,047	0,080	0,017
	5	0,034	0,000	0,014
	MW	0,043	0,035	0,021
Karkasse	1	0,095	0,000	0,037
	2	0,091	0,000	0,033
	3	0,086	0,006	0,040
	4	0,085	0,006	0,040
	5	0,092	0,003	0,027
	MW	0,090	0,003	0,035
Leber	1	0,158	0,251	0,062
	2	0,122	0,255	0,059
	3	0,139	0,231	0,064
	4	0,141	0,198	0,056
	5	0,089	0,133	0,061
	MW	0,129	0,214	0,060
Fettgewebe	1	0,017	0,007	0,019
	2	0,022	0,008	0,002
	3	0,019	0,004	0,008
	4	0,025	0,013	0,011
	5	0,023	0,010	0,007
	MW	0,021	0,008	0,009

Erklärungen: MW = arithmetischer Mittelwert

**Tab. 52: Analytisch bestimmte und rechnerisch extrapolierte Esterase-Restaktivität der Zwei-Komponenten-Mischungen aus den bei  $F_{80} = 5$  pasteurisierten Probenarten (vgl. Tab. 51)**

Zwei-Komponenten-Mischung (1:1)	Probe Nr.	Extinktion [ $E_{617}$ ]					
		NA		NB		IA	
		gemessen	errechnet	gemessen	Errechnet	gemessen	errechnet
Brustmuskel + Flügel	1	0,103		0,011		0,036	
	2	0,100		0,008		0,019	
	3	0,089		0,003		0,020	
	MW	0,097	0,109	0,007	0,034	0,025	0,044
Brustmuskel + Oberkeule	1	0,045		0,003		0,024	
	2	0,050		0,008		0,012	
	3	0,042		0,002		0,019	
	MW	0,046	0,087	0,004	0,026	0,018	0,027
Brustmuskel + Unterkeule	1	0,045		0,000		0,013	
	2	0,065		0,006		0,020	
	3	0,032		0,000		0,021	
	MW	0,047	0,082	0,002	0,040	0,018	0,036
Brustmuskel + Karkasse	1	0,069		0,000		0,043	
	2	0,072		0,000		0,038	
	3	0,071		0,004		0,036	
	MW	0,071	0,105	0,001	0,024	0,039	0,043
Brustmuskel + Leber	1	0,090		0,103		0,061	
	2	0,101		0,075		0,056	
	3	0,095		0,071		0,063	
	MW	0,095	0,125	0,083	0,129	0,060	0,055
Brustmuskel + Fettgewebe	1	0,021		0,024		0,040	
	2	0,018		0,026		0,026	
	3	0,017		0,026		0,022	
	MW	0,019	0,071	0,025	0,026	0,029	0,030
Flügel + Oberkeule	1	0,040		0,004		0,002	
	2	0,032		0,015		0,016	
	3	0,035		0,000		0,001	
	MW	0,036	0,076	0,006	0,015	0,006	0,020
Flügel + Unterkeule	1	0,058		0,015		0,002	
	2	0,053		0,011		0,014	
	3	0,058		0,015		0,009	
	MW	0,056	0,070	0,014	0,029	0,008	0,029
Flügel + Karkasse	1	0,030		0,000		0,008	
	2	0,027		0,000		0,016	
	3	0,026		0,002		0,010	
	MW	0,028	0,094	0,001	0,013	0,011	0,036
Flügel + Leber	1	0,037		0,093		0,069	
	2	0,041		0,064		0,055	
	3	0,038		0,141		0,072	
	MW	0,039	0,113	0,099	0,118	0,065	0,049
Flügel + Fettgewebe	1	0,042		0,020		0,009	
	2	0,035		0,031		0,010	
	3	0,038		0,019		0,009	
	MW	0,038	0,059	0,023	0,015	0,009	0,023

Siehe Fortsetzung auf nächster Seite

## Fortsetzung von Tab. 52

Zwei-Komponenten-Mischung (1:1)	Probe Nr.	Extinktion [ $E_{617}$ ]					
		NA		NB		IA	
		gemessen	errechnet	gemessen	errechnet	gemessen	errechnet
Oberkeule + Unterkeule	1	0,030		0,000		0,000	
	2	0,024		0,000		0,001	
	3	0,028		0,000		0,000	
	MW	0,027	0,048	0,000	0,021	0,000	0,012
Oberkeule + Karkasse	1	0,021		0,000		0,007	
	2	0,022		0,000		0,007	
	3	0,022		0,000		0,008	
	MW	0,022	0,072	0,000	0,005	0,007	0,019
Oberkeule + Leber	1	0,042		0,136		0,055	
	2	0,049		0,120		0,046	
	3	0,050		0,111		0,044	
	MW	0,047	0,091	0,122	0,111	0,048	0,031
Oberkeule + Fettgewebe	1	0,026		0,025		0,011	
	2	0,025		0,025		0,011	
	3	0,031		0,025		0,015	
	MW	0,027	0,037	0,025	0,008	0,012	0,006
Unterkeule + Karkasse	1	0,025		0,000		0,008	
	2	0,024		0,000		0,002	
	3	0,021		0,000		0,009	
	MW	0,023	0,066	0,000	0,019	0,006	0,028
Unterkeule + Leber	1	0,133		0,171		0,049	
	2	0,130		0,177		0,057	
	3	0,107		0,215		0,057	
	MW	0,123	0,086	0,187	0,124	0,054	0,040
Unterkeule + Fettgewebe	1	0,012		0,012		0,023	
	2	0,018		0,013		0,010	
	3	0,013		0,018		0,010	
	MW	0,014	0,032	0,014	0,021	0,014	0,015
Karkasse + Leber	1	0,068		0,128		0,062	
	2	0,070		0,313		0,057	
	3	0,070		0,121		0,062	
	MW	0,069	0,109	0,187	0,108	0,060	0,047
Karkasse + Fettgewebe	1	0,010		0,008		0,006	
	2	0,006		0,005		0,005	
	3	0,006		0,008		0,011	
	MW	0,007	0,055	0,007	0,005	0,007	0,022
Leber + Fettgewebe	1	0,053		0,164		0,064	
	2	0,071		0,163		0,067	
	3	0,068		0,155		0,074	
	MW	0,064	0,075	0,161	0,111	0,068	0,069

Erklärungen: MW = arithmetischer Mittelwert

Wie sich aus Tabelle 51 ersehen lässt, liegen die bei den einzelnen Probearten mit NA, NB und IA bestimmten Esterase-Restaktivitäten weitest hin im Schwankungsbereich der unter *3.2 Einfluss der Pasteurisation bei 80°C/5 min auf die Esterase-Restaktivität und den Restkeimgehalt bei Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute* dokumentierten Werte. Erheblich niedrigere Werte ergeben sich lediglich bei den NA- und NB-Ansätzen von Brustmuskel und Leber, bei denen die Differenz zwischen den NA-Ergebnissen  $E_{617} = 0,056$  und  $E_{617} = 0,152$  und bei den NB-Ansätzen der Leber sogar  $E_{617} = 0,348$  beträgt.

Die bei den NA-Ansätzen der Zwei-Komponenten-Mischungen gemessenen Restaktivitäten liegen mit Ausnahme von Unterkeule + Leber durchwegs unter den extrapolierten. Die im Durchschnitt aller Versuchschargen resultierende Differenz beträgt  $E_{617} = 0,035$ , die mit  $E_{617} = 0,010$  kleinste Differenz besteht bei der Mischung Oberkeule + Fettgewebe, die mit  $E_{617} = 0,074$  größte bei Flügel + Leber. Im Durchschnitt der Mischungen aus Skelettmuskulatur ergibt sich eine maximale Differenz von  $E_{617} = 0,066$  und eine minimale von  $E_{617} = 0,012$ , bei der Mischung aus Skelettmuskulatur und Fettgewebe von  $E_{617} = 0,052$  und  $E_{617} = 0,010$ , aus Skelettmuskulatur und Leber von  $E_{617} = 0,074$  und  $E_{617} = 0,030$ .

Bei den NB-Ansätzen liegen die Esterase-Restaktivitäten bei 14 der 21 Zwei-Komponenten-Mischungen unter den rechnerisch taxierten Werten, und zwar am weitesten mit  $E_{617} = 0,046$  bei der Mischung Brustmuskel + Leber. Unter den die errechneten Restaktivitäten überschreitenden analytisch ermittelten Werten besteht die größte Differenz mit  $E_{617} = 0,079$  bei Karkasse + Leber. Die im Durchschnitt sämtlicher Chargen bestehende Abweichung beträgt  $E_{617} = 0,024$ .

Bei den IA-Ansätzen besteht bei Brustmuskel + Leber, Brustmuskel + Fettgewebe, Unterkeule + Fettgewebe und Leber + Fettgewebe zwischen den gemessenen und den extrapolierten Werten faktisch kein Unterschied, bei 16 der 21 Zwei-Komponenten-Mischungen liegen die Esterase-Restaktivitäten unter den errechneten Werten. Wie bei den NB-Ansätzen übersteigen auch bei den IA-Ansätzen von Oberkeule + Fettgewebe und Unterkeule + Leber die gemessenen Restaktivitäten die extrapolierten. Die mit  $E_{617} = 0,025$  maximale Überschreitung des errechneten gegenüber des gemessenen Wertes wird bei der Mischung Flügel + Karkasse notiert, die mit  $E_{617} = 0,017$  maximale Unterschreitung bei der Mischung Oberkeule + Leber. Die mittlere Abweichung beträgt  $E_{617} = 0,012$ .

## **7 Studien an Putenfleisch-Produkten des Handels und Empfehlung von Grenzwerten als Indikatoren einer ausreichenden Pasteurisation**

Pasteurisierte Erzeugnisse aus Putenfleisch gelangen als Kochpökelfwaren, Hackfleischerzeugnisse, Brühwürste und Kochwürste in den Handel. Nachfolgend wird über die Untersuchung einer größeren Zahl dieser Produkte auf Esterase-Restaktivität und korrespondierenden Gehalt an aeroben mesophilen Bakterien, aeroben Sporenbildnern und an Streptokokken des Serotyps D berichtet. In der Perspektive der vorausgegangenen Modellversuchen werden auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe Grenzwerte für eine statistisch als ausreichend zu beurteilende Erhitzung empfohlen.

### **7.1 Kochpökelfware**

Kochpökelfwaren sind umgerötete und gegarte, zum Teil geräucherte, gewachsene oder aus größeren Zuschnitten zusammengefügte Fleischstücke, denen Brät nach „quantum satis-Prinzip“ allenfalls in einer Menge zugesetzt wird, die für die Bindung des Gefüges benötigt wird. Bei der heute beispielsweise auch beim Schinken vom Schwein „wie gewachsen“ gängigen beschleunigten Herstellungsweise wird das hierfür parierte Ausgangsmaterial nach Lakeinjektion gepoltet, danach einige Stunden in Pökellake durchgebrannt und 15 bis 20 min bei 40 bis 60°C getrocknet. Anschließend wird bis zu 6 h bei 30 bis 50°C kalt oder 20 bis 45 min bei 65 bis 85°C heiß geräuchert und hierauf gekocht, wobei zur Vermeidung von übermäßigem Gewichtsverlust und einer unerwünschten Verleimung von Kollagen eine Kerntemperatur von 69°C nicht überschritten wird. Die pasteurisierten Produkte werden abschließend auf unter 5°C gekühlt. (FISCHER, 1988; MÜLLER, 1989; BÖHMER und HILDEBRANDT, 1996)

#### **7.1.1 Material und Methodik**

Es werden 30 Handelsprodukte mit NPS gepökelter gekochter Putenbrust von Freisinger und Münchener Geschäften bezogen. Das für die Bestimmung der Esterase-Restaktivität und Restkeimzahl gemäß *1 Material und Methoden* erforderliche Probenmaterial wird unter sterilen Bedingungen aus dem thermischen Mittelpunkt der Erzeugnisse entnommen.

### 7.1.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Die Esterase-Restaktivitäten und der Keimgehalt der durchwegs aus Brustmuskel der Pute gefertigten und sensorisch einwandfreien Kochpökelprodukte sind in der Tabelle 53 und den Abbildungen 79 bis 81 zusammengestellt.

Die Auswertung der Esterase-Restaktivität der Kochpökelprodukte, von der die Ausreißer ausgeschlossen werden, ergibt bei den NA-Ansätzen den Mittelwert (MW) = 0,091, die Variationsbreite (VB) = 0,010 bis 0,353 und die Standardabweichung (s) = 0,075 und bei den IA-Ansätzen MW = 0,094, VB = 0,060 bis 0,133 und s = 0,022.

Die außerordentlich hohe Restaktivität von  $E_{617} = 0,353$  bei den NA-Ansätzen der Probe 15, die mit dem ebenfalls bei dieser Probe höchsten IA-Resultat von  $E_{617} = 0,839$  korreliert, ist dadurch bedingt, dass es sich bei diesem Produkt sensorisch sinnfällig um ein für die definierte Zubereitung im Haushalt des Verbrauchers bestimmtes und so lediglich intensiver vorblanchiertes Erzeugnis handelt.

Bei den NB-Ansätzen ergibt sich ausschließlich bei Probe 1 eine positive und mit  $E_{617} = 0,095$  sehr markante Restaktivität. Der Befund muss dahingestellt bleiben, da er weder als tierartige Besonderheit, noch technologisch durch einen Analysenfehler erklärbar ist.

Unerwartet hoch liegen mit  $E_{617} = 0,060$  bis zumindest 0,133 nach aller Erfahrung aus den Modellstudien auch die Ergebnisse der IA-Ansätze, von denen 16 Proben eine Restaktivität von  $E_{617} \leq 0,100$  und immerhin 28 Proben eine Restaktivität von  $E_{617} \leq 0,133$  aufweisen.

Der Gehalt der Produkte an aeroben mesophilen Bakterien beträgt in der Gesamtheit der Stichprobe  $1 \times 10^3$  bis  $5,7 \times 10^7$  KBE/g, an aeroben Sporenbildner 0 bis  $1,5 \times 10^5$  KBE/g sowie an Streptokokken des Serotyps D 0 bis  $1,8 \times 10^2$  KBE/g. Dass bei Probe 2 mit einer Restaktivität von nur  $E_{NA} = 0,085$  und  $E_{IA} = 0,097$  ein Vorkommen von D-Streptokokken in einer Gesamtzahl von immerhin 180 KGE/g korreliert ist, darf in Relation zu den bei allen anderen Proben negativen Befunden auf eine entsprechend hohe Ausgangskontamination durch die Spezies und wie im Falle von Probe 13 und 14 vor allem auch auf die kurze Restlaufzeit von wenigen Tagen zurückgeführt werden.

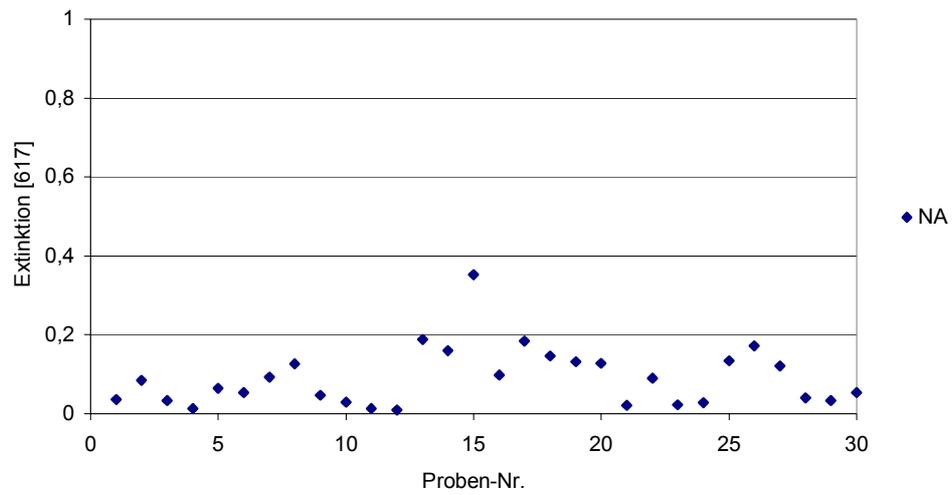
Als Indikator für eine ausreichende Pasteurisation bei Kochpökelwaren von Pute empfiehlt sich bei den Ansätzen mit NA maßgeblich der in Tabelle 53 zusammengestellten Ergebnisse ein Grenzwert von  $E_{617} \leq 0,170$ , bei den Ansätzen mit NB von  $E_{617} = 0,000$  und bei den Ansätzen mit IA von  $E_{617} \leq 0,130$ . Grundlage dieser Empfehlung ist die Tatsache, dass Gesamtkeimzahlen der Größenordnung von  $10^6$  generell als gesundheitlich nicht bedenklich anzusehen sind. Solche Keimgehalte sind bei Produkten, die bereits über 1 Woche zum Verkauf angeboten werden auch bei ausreichend pasteurisierten Produkten keine sehr große

Seltenheit. Dass sich zum anderen von den Produkten mit Keimzahlen der Größenordnung  $10^7$  die Proben 18 und 30 bei den empfohlenen Grenzwerten mit keinem der Substrate als „esterase-positiv“, d.h. als „potentiell unzureichend erhitzt“ erweisen, stellt die Grenzwerte insofern nicht in Frage, als die Restlaufzeit beider Produkte zum Zeitpunkt der Untersuchung nur noch 3 Tage beträgt. Dafür, dass die vegetative Ausgangsflora der beiden Produkte durch die Pasteurisation im lebensmittelhygienisch gebotenen Maße inaktiviert wurde, spricht auch die Feststellung, dass D-Streptokokken bei keiner der beiden Proben nachweisbar sind.

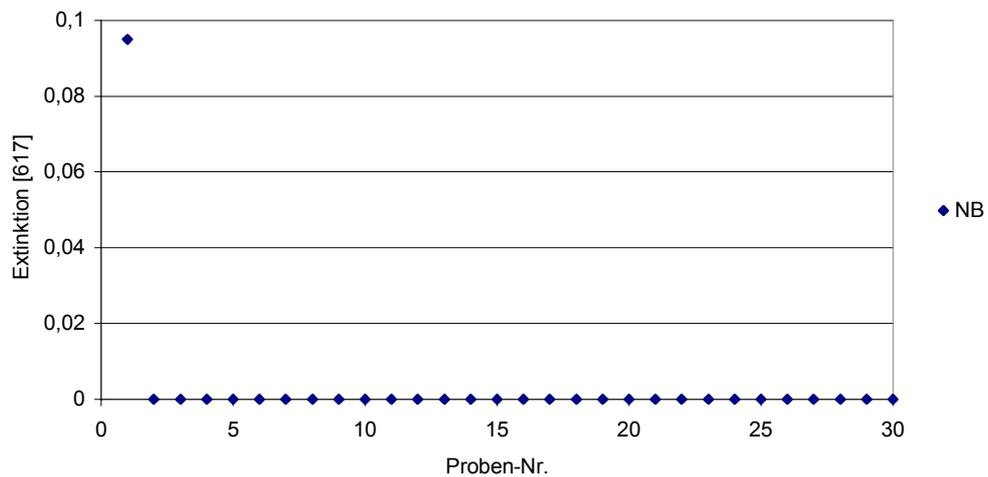
**Tab. 53: Esterase-Restaktivität und Keimgehalt bei Kochpökelware aus Putenfleisch des Handels**

Nr.	Probe Verkehrsbezeichnung	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Keimgehalt [KBE/g]		
		NA	NB	IA	GKZ	S	D
1	Putenbrust	0,036	0,095 <sup>1)</sup>	0,097	$7 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^2$	0
2	Putenbrust	0,085	0	0,071	$6 \cdot 10^6$	0	$1,8 \cdot 10^2$
3	Truthahnbrust	0,033	0	0,060	$4,2 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	0
4	Truthahnbrust	0,014	0	0,085	$6 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	0
5	Putenbrust	0,065	0	0,087	$2 \cdot 10^3$	0	0
6	Putenbrust	0,054	0	0,103	$1 \cdot 10^3$	0	0
7	Putenbrust	0,093	0	0,067	$8 \cdot 10^3$	0	0
8	Putenbrust	0,127	0	0,068	$1 \cdot 10^3$	0	0
9	Delikateß Putenbrust	0,047	0	0,111	$5,4 \cdot 10^4$	0	0
10	Delikateß Putenbrust	0,030	0	0,072	$2,7 \cdot 10^4$	0	0
11	Delikateß Putenbrust	0,013	0	0,071	$3,6 \cdot 10^4$	0	0
12	Delikateß Putenbrust	0,010	0	0,070	$2,4 \cdot 10^4$	0	0
13	Putenbrust	0,189	0	0,103	$1,3 \cdot 10^7$	0	70
14	Putenbrust	0,159	0	0,229 <sup>1)</sup>	$4,8 \cdot 10^6$	0	20
15	Putenbrust	0,353	0	0,839 <sup>1)</sup>	$1,4 \cdot 10^7$	80	0
16	Putenbrust	0,098	0	0,105	$1,7 \cdot 10^5$	0	0
17	Putenbrust	0,185	0	0,110	$2 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^2$	0
18	Putenbrust	0,147	0	0,113	$1,4 \cdot 10^7$	0	0
19	Putenbrust	0,132	0	0,113	$1,1 \cdot 10^6$	0	0
20	Putenbrust	0,128	0	0,088	$5 \cdot 10^3$	0	0
21	Truthahnbrust	0,021	0	0,120	$1,5 \cdot 10^5$	0	0
22	Truthahnbrust	0,090	0	0,133	$1,4 \cdot 10^5$	0	0
23	Truthahnbrust	0,023	0	0,075	$2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$	0
24	Truthahnbrust	0,028	0	0,082	$2 \cdot 10^3$	0	0
25	Putenbrust	0,134	0	0,093	$3 \cdot 10^3$	0	0
26	Putenbrust	0,172	0	0,127	$2 \cdot 10^3$	10	0
27	Putenbrust	0,121	0	0,067	$3 \cdot 10^3$	0	0
28	Putenbrust	0,041	0	0,089	$6,3 \cdot 10^6$	10	0
29	Truthahnbrust	0,034	0	0,133	$5,7 \cdot 10^7$	0	0
30	Truthahnbrust	0,054	0	0,108	$4,6 \cdot 10^7$	0	0

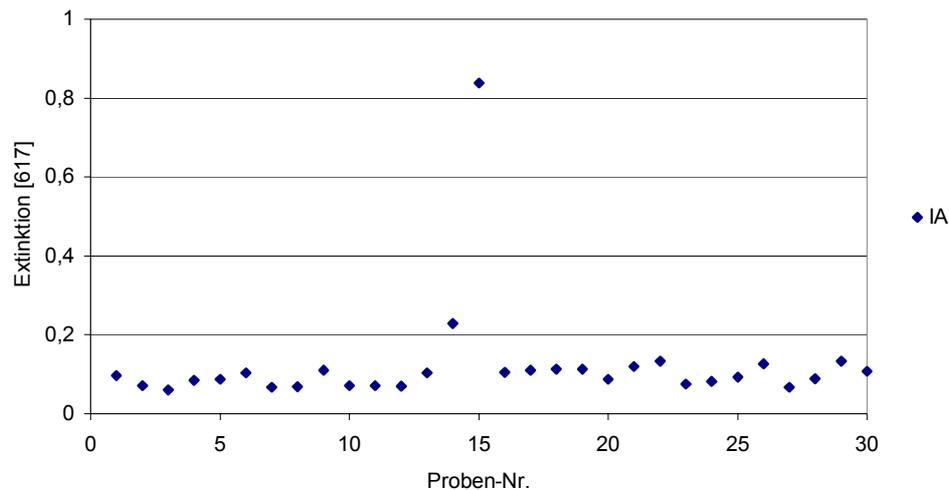
Erklärungen: GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; S = aerobe Sporenbildner; D = Streptokokken des Serotyps D; <sup>1)</sup> Ausreißer nach DAVID, HARTLEY und PEARSON



**Abb. 79: Mit NA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Kochpökelware aus Putenfleisch des Handels**



**Abb. 80: Mit NB bestimmte Esterase-Restaktivität bei Kochpökelware aus Putenfleisch des Handels**



**Abb. 81: Mit IA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Kochpökelfleisch aus Putenfleisch des Handels**

## 7.2 Brühwurst

Brühwurstherzeugnisse sind Wurstwaren, bei denen zerkleinertes rohes Fleisch meist unter Zusatz von Trinkwasser oder Eis, mit Kochsalz meist in Form von Nitritpökelsalz und ggf. mit Kutterhilfsmitteln, wie insbesondere Phosphat, zu einem Brät verarbeitet und durch Brähen, Backen, Braten oder eine andere Hitzebehandlung zu zusammenhängender Koagulation gebracht wird. Brühwurstbrät wird je nach Reihenfolge der Materialzugabe in der Verfahrensweise des Magerbrät- oder Fettbrät- oder Gesamtbrätverfahrens gefertigt, in Därme, Dosen oder offene Backformen gefüllt und in diesen auf eine Kerntemperatur von mindestens 70°C gebracht. Im allgemeinen werden die Produkte je nach Kaliber und angestrebter Mindesthaltbarkeit 20 min bis 2 h bei 70 bis 80°C gehalten. Daraufhin wird das pasteurisierte Erzeugnis umgehend auf 4 bis 7°C gekühlt. (FISCHER, 1988; MÜLLER, 1989; FRIES, 1996)

### 7.2.1 Material und Methodik

Es werden 30 Brühwurstherzeugnisse aus Geschäften in Freising, München und Umgebung bezogen. Die für die Untersuchungen erforderliche Probenmenge wird den Produkten unter sterilen Bedingungen aus dem thermischen Mittelpunkt entnommen.

Die Bestimmung der Esterase-Restaktivität sowie der aeroben Gesamtkeimzahl, der aeroben Sporenbildner sowie der Streptokokken des Serotyps D erfolgt gemäß *1 Material und Methoden*.

### 7.2.3 Ergebnisse und deren Besprechung

Die Esterase-Restaktivitäten und die mit diesen korrelierten Keimgehalte des Probenkollektivs sind aus der Tabelle 54 und den Abbildungen 82 bis 84 zu ersehen.

**Tab. 54: Esterase-Restaktivität und Keimgehalt bei Brühwurst aus Putenfleisch des Handels**

Nr.	Probe Verkehrsbezeichnung	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Keimgehalt [KBE/g]		
		NA	NB	IA	GKZ	S	D
1	Paprikawurst	0,028	0	0	$2,7 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$	0
2	Gelbwurst	0,100	0,054	0,049	$4 \times 10^2$	$4 \times 10^2$	0
3	Fleischwurst	0,007	0	0,073	$1,6 \times 10^4$	20	0
4	Regensburger	0,001	0	0,067	$7,2 \times 10^4$	$8,1 \times 10^3$	0
5	Wiener	0,014	0	0,103	$1 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	0
6	Fleischwurst	0,233	0,356	0,162	$3 \times 10^4$	$7,2 \times 10^3$	0
7	Gelbwurst	0,099	0	0,027	$3,8 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	0
8	Wiener	0,099	0,032	0,113	$1,1 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$	0
9	Fleischwurst	0,190	0,313	0,111	$9,3 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	0
10	Wiener	0,003	0	0,081	$2 \times 10^6$	$3 \times 10^3$	0
11	Regensburger	0	0	0,117	$3,6 \times 10^7$	$1 \times 10^4$	0
12	Regensburger	0	0	0,117	$1,8 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	0
13	Wiener	0,056	0,045	0,054	$4,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^4$	0
14	Wiener	0,028	0,029	0,084	$8,9 \times 10^7$	$9 \times 10^2$	0
15	Fleischwurst	0,043	0	0,084	$1,8 \times 10^6$	$1 \times 10^3$	0
16	Fleischwurst	0,015	0	0,075	$2,2 \times 10^7$	40	0
17	Gelbwurst	0,088	0	0,024	$5,3 \times 10^5$	$9 \times 10^2$	0
18	Gelbwurst	0,076	0,003	0,034	$9 \times 10^4$	$2,7 \times 10^3$	0
19	Paprikawurst	0	0	0,076	$5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	0
20	Paprikawurst	0	0	0,083	$3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	0
21	Gelbwurst	0,098	0,015	0,002	$7,3 \times 10^5$	$1 \times 10^2$	0
22	Gelbwurst	0,108	0,008	0,009	$2,1 \times 10^6$	40	0
23	Gelbwurst	0,093	0,021	0,014	$1,2 \times 10^4$	$2 \times 10^2$	0
24	Gelbwurst	0,107	0,035	0,060	$2,8 \times 10^4$	$4,9 \times 10^3$	0
25	Wiener	0	0	0,074	$9,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	0
26	Wiener	0,022	0	0,059	$5 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	0
27	Wiener	0,078	0,037	0,066	$8,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^4$	0
28	Fleischwurst	0,012	0	0,072	$5 \times 10^3$	10	0
29	Paprikawurst	0	0	0,052	$1,8 \times 10^8$	$5 \times 10^2$	0
30	Gelbwurst	0,086	0,031	0,092	$1,6 \times 10^4$	$9 \times 10^2$	0

Erklärungen: GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; S = aerobe Sporenbildner; D = Streptokokken des Serotyps D;

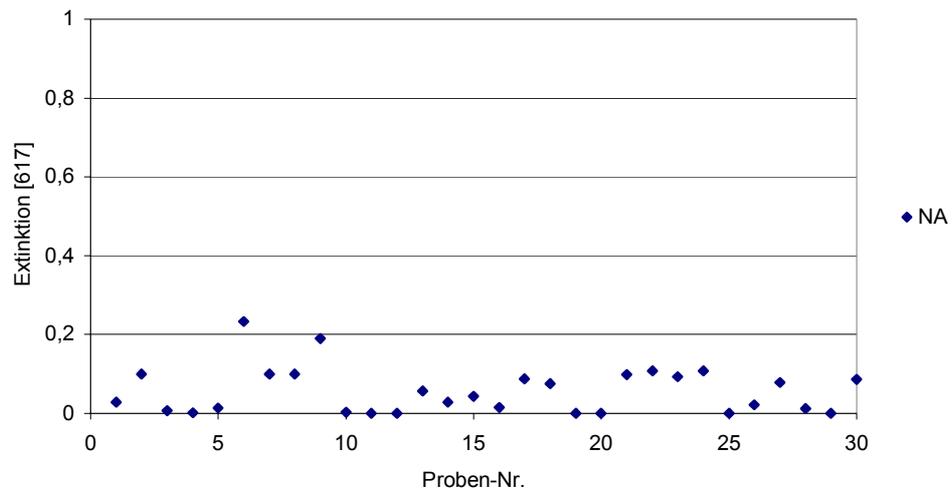


Abb. 82: Mit NA ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brühwurst aus Putenfleisch des Handels

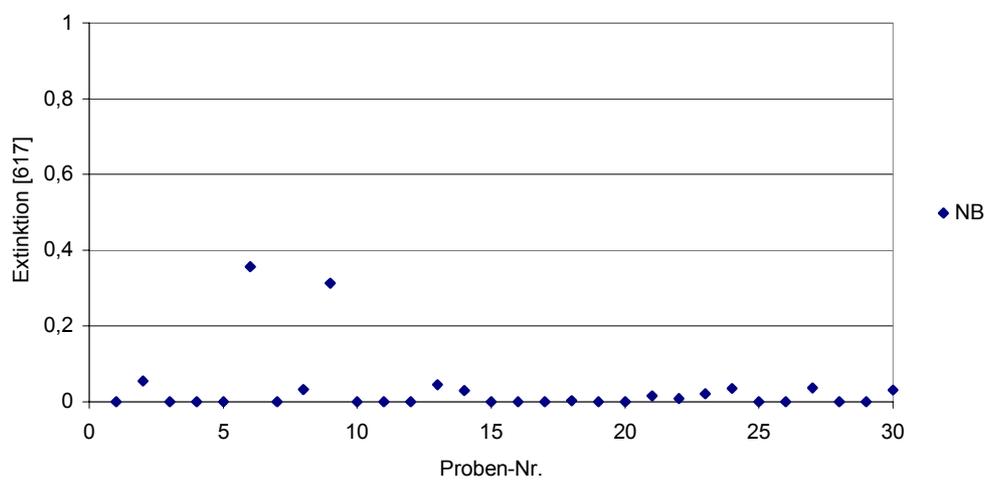
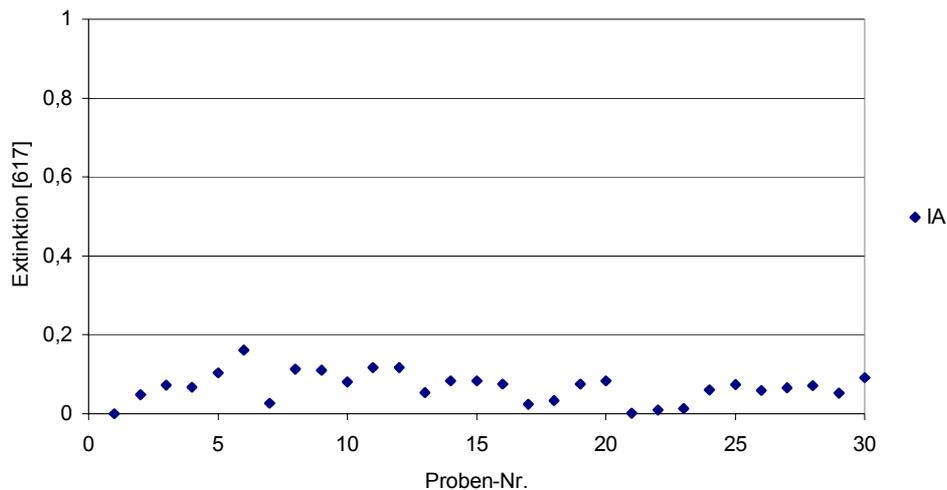


Abb. 83: Mit NB ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brühwurst aus Putenfleisch des Handels



**Abb. 84: Mit IA ermittelte Esterase-Restaktivität bei Brühwurst aus Putenfleisch des Handels**

Die mit NA bestimmte Restaktivität der 30 Brühwürste entspricht einem Mittelwert (MW) von  $E_{617} = 0,056$ , einer Variationsbreite (VB) von  $E_{617} = 0,000$  bis  $0,233$  und einer Standardabweichung ( $s$ ) von  $E_{617} = 0,059$ , mit NB einem MW =  $0,033$ , einer VB =  $0,000$  bis  $0,356$  und einer  $s = 0,084$ , mit IA einem MW =  $0,068$ , einer VB =  $0,000$  bis  $0,162$  und einer  $s = 0,038$ .

Nach Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung weist die untersuchte Stichprobe Gesamtkeimzahlen von nur  $4 \times 10^2$  bei Probe 2 bis maximal  $1,8 \times 10^8$  KBE/g bei Probe 29 und einen Gehalt an Sporenbildnern in Höhe von 10 bei Probe 28 bis  $3,6 \times 10^4$  KBE/g bei Probe 5 auf. Dass sich D-Streptokokken selbst bei der Probe 29 nicht nachweisen lassen, ist ein wichtiges Indiz für den Letaleffekt eines Hitzeregimes, bei dem die vegetativen Pathogenen jedenfalls unter der Voraussetzung als hinreichend inaktiviert angesehen werden können, dass ihre Ausgangskeimzahl die obere Grenze des Streubereichs der Norm nicht extrem überschreitet. Bei den Keimzahlen von  $2,2$  bis  $8,9 \times 10^7$  KBE/g bei den Proben 11, 13, 14 und 16, deren Mindesthaltbarkeitsfrist bereits weitest hin verstrichen ist, dürfte es sich nach aller Erfahrung der Praxis um Lactobazillen handeln. Der Keimgehalt von  $1,8 \times 10^8$  KBE/g der offensichtlich besonders intensiv pasteurisierten Paprikawurst ist auf einen entsprechend hohen Ausgangsgehalt vor allem auch an aeroben Sporen zurückzuführen, die durch den Zusatz der überdurchschnittlich großen Menge an Gewürzpaprika in das Produkt eingebracht werden. Ursache dafür, dass bei Probe 2, die sich sowohl mit NA als auch mit NB soeben schon als esterase-positiv erweist, eine aerobe mesophile Gesamtkeimzahl von nur  $4 \times 10^2$  KBE/g besteht, kann nach aller Erfahrung aus den Modellversuchen nur sein, dass eine besonders geringe Ausgangskontamination bestanden hatte. Als Indikatoren einer ausreichen-

den Erhitzung werden bei Brühwurst aus Putenfleisch aus den bei den Kochpökelwaren angesprochenen Gründen die Grenzwerte  $E_{NA} \leq 0,100$ ,  $E_{NB} \leq 0,050$  und  $E_{IA} \leq 0,100$  empfohlen. Bei diesen Grenzwerten erweisen sich mit NA 5, mit NB 3 und mit IA 6 Proben als esterase-positiv, davon übereinstimmend die Proben 6 und 9 mit allen 3 Substraten.

### 7.3 Leberwurst

Leberwürste sind maßgeblich der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse hitzebehandelte Kochwürste, die größtenteils aus gebrühtem oder gekochtem Ausgangsmaterial hergestellt werden. Die Konsistenz der Kochstreichwürste beruht auf erstarrtem Fett und dreidimensional vernetztem koaguliertem Eiweiß, insbesondere Lebereiweiß. Der Leberanteil beträgt je nach Gehalt an Skelettmuskelfleisch 10% und 30%, bei bestimmten in den Leitsätzen genannten Sorten kann der Gehalt auch darunter oder darüber liegen.

Das für Leberwurst bestimmte Ausgangsmaterial wird in der Regel 12 bis 24 h gepökelt und dann durch mehr oder weniger intensives Blanchieren bis Kochen auf eine Temperatur gebracht, bei der im Kutter eine Gemengetemperatur von 65°C und während des weiteren Zerkleinern und Mischens alsbald von 55°C resultiert, bei der die allenfalls leicht blanchierte Leber zugegeben wird. Das Wurstgut wird bei einer Temperatur von nicht unter 40°C in Wursthüllen abgefüllt, auf eine Kerntemperatur von 75°C gebracht und anschließend bei 16 bis 18°C geräuchert. (FISCHER, 1988; MÜLLER, 1989) Die Mindesthaltbarkeit der pasteurisierten Handelsprodukte beträgt beim Stand von Technik und Hygiene bei 2 bis 4°C größtenteils zumindest 18 Tage.

#### 7.3.1 Material und Methodik

Es werden 30 Leberwürste des Handels von Geschäften in Freising, München und Umgebung bezogen. Die für die Bestimmung der Esterase-Restaktivität, der aeroben Gesamtkeimzahl, der aeroben Sporenbildner und der Streptokokken des Serotyps D erforderliche Probenmenge wird unter sterilen Bedingungen im Bereich um den thermischen Mittelpunkt der Proben entnommen und gemäß *1 Material und Methoden* verwendet.

### 7.3.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Die Esterase-Restaktivität und der Keimgehalt der aus dem Handel bezogenen Putenleberwürste sind aus Tabelle 55 und den Abbildungen 85 bis 87 zu ersehen.

**Tab. 55: Esterase-Restaktivität und Keimgehalt bei Putenleberwurst des Handels**

Nr.	Probe Verkehrsbezeichnung	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Keimgehalt [KBE/g]		
		NA	NB	IA	GKZ	S	D
1	Grob	0,035	0	0,038	$2,3 \times 10^4$	$7 \times 10^2$	0
2	Fein	0,031	0	0,033	$5,1 \times 10^3$	$2 \times 10^2$	0
3 <sup>2)</sup>	Fein	0,118	0,247	0,096	$2,1 \times 10^3$	$2 \times 10^2$	0
4	Fein	0,019	0	0,050	$1,5 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$	0
5 <sup>2)</sup>	Fein	0,210	0,052	0,109	$1,6 \times 10^4$	$6,3 \times 10^3$	0
6	Grob	0,022	0	0,033	$1,3 \times 10^4$	$6,3 \times 10^3$	0
7	Grob	0,148	0,005	0,054	$6 \times 10^3$	$4,5 \times 10^2$	0
8	Grob	0,146	0,005	0,061	$6 \times 10^3$	$4,5 \times 10^2$	0
9	Grob	0,067	0,009	0,060	$5,6 \times 10^4$	$4,5 \times 10^2$	0
10	Fein	0,104	0,060	0,190 <sup>1)</sup>	$5,6 \times 10^4$	$4,5 \times 10^2$	0
11	Fein	0,029	0,003	0,037	$4,2 \times 10^4$	0	0
12	Fein	0,033	0,006	0,038	$3,1 \times 10^4$	10	0
13	Grob	0,036	0,010	0,070	$5,4 \times 10^4$	$1 \times 10^2$	0
14	Grob	0,034	0,001	0,064	$5,4 \times 10^4$	0	0
15	Fein	0,045	0,032	0,036	$5,4 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	0
16	Fein	0,047	0,033	0,036	$2,3 \times 10^4$	$2 \times 10^3$	0
17	Fein	0,046	0,013	0,030	$3,5 \times 10^4$	10	0
18	Fein	0,046	0,013	0,030	$4,2 \times 10^4$	0	0
19 <sup>2)</sup>	Fein	0,639	0,590	0,614	$4,5 \times 10^4$	$5,4 \times 10^3$	0
20 <sup>2)</sup>	Fein	0,639	0,587	0,623	$1,4 \times 10^4$	$2 \times 10^3$	0
21	Fein	0,005	0	0,014	$1,2 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	0
22	Fein	0,016	0	0,006	$1,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$	0
23	Fein	0,015	0	0,045	$3,6 \times 10^4$	$6,1 \times 10^3$	0
24	Fein	0,016	0	0,045	$2,9 \times 10^4$	$5,3 \times 10^3$	0
25	Fein	0,015	0	0,032	$4 \times 10^4$	$7,5 \times 10^3$	0
26	Fein	0,004	0	0,063	$4,9 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3$	0
27	Grob	0,037	0	0,058	$5,4 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3$	0
28	Grob	0,041	0	0,063	$4 \times 10^4$	$8,1 \times 10^3$	0
29 <sup>2)</sup>	Fein	0,664	0,556	0,595	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	0
30 <sup>2)</sup>	Fein	0,642	0,519	0,573	$2,1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	0

Erklärungen: GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; S = aerobe Sporenbildner; D = Streptokokken des Serotyps D; <sup>1)</sup> Ausreißer nach DAVID, HARTLEY und PEARSON; <sup>2)</sup> Es handelt sich um sogenannte Bio-Produkte mit überdurchschnittlichem Lebergeschmack, die ohne NPS gefertigt sind und eine überdurchschnittlich kurze Mindesthaltbarkeit von nur 10 Tagen aufweisen.

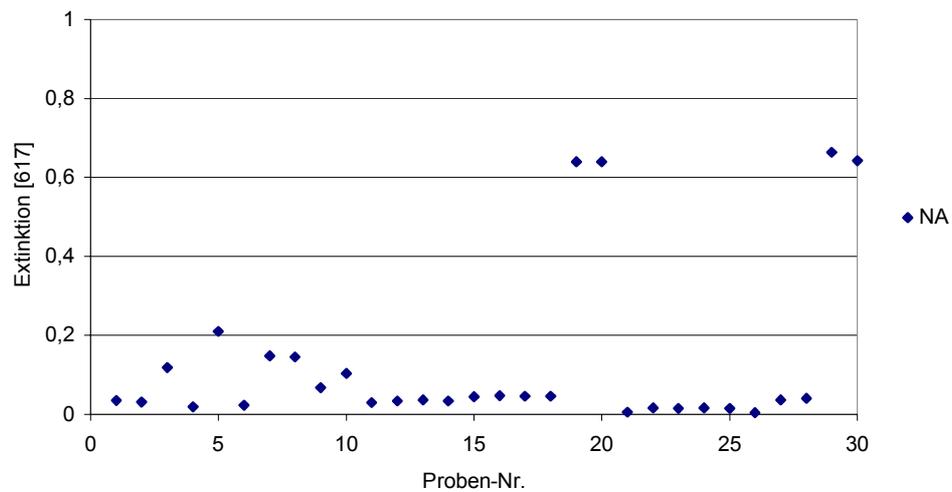


Abb. 85: Mit NA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Putenleberwurst des Handels

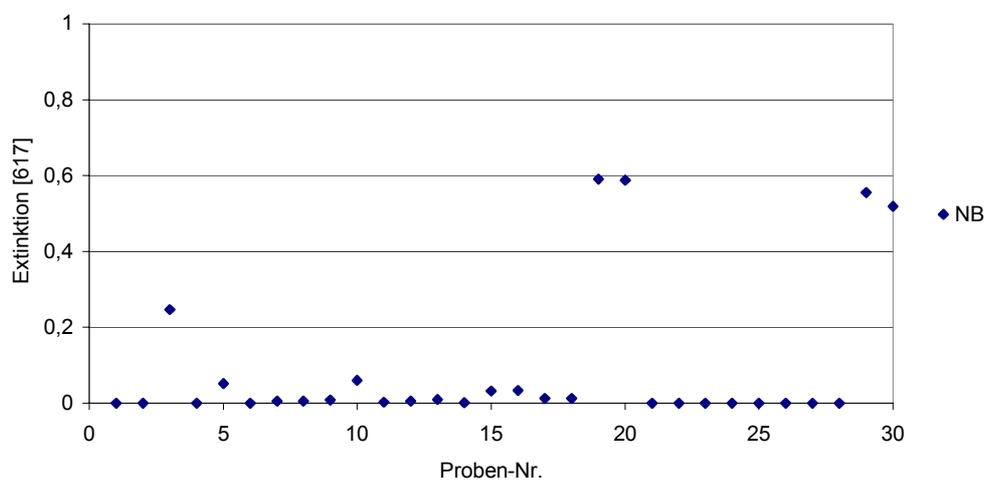
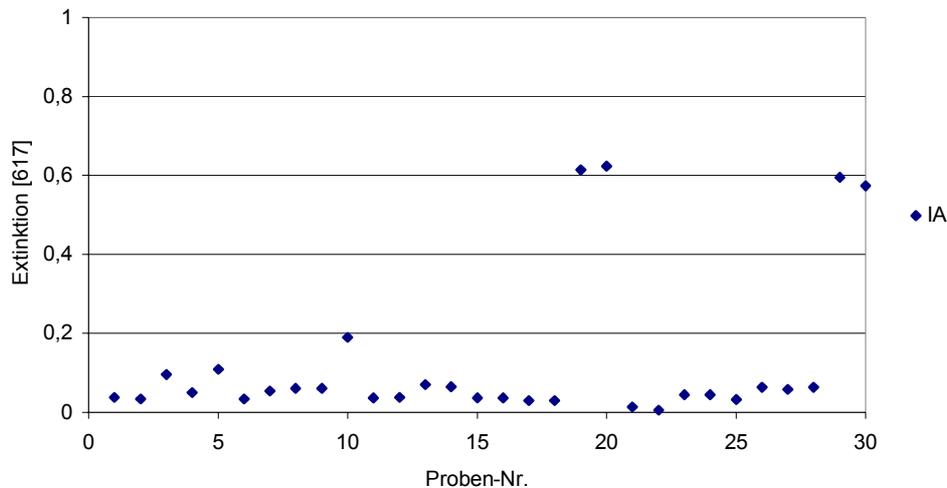


Abb. 86: Mit NB bestimmte Esterase-Restaktivität bei Putenleberwurst des Handels



**Abb. 87: Mit IA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Putenleberwürsten des Handels**

Die Esterase-Restaktivitäten der Stichprobe der Leberwürste weisen – wenn die „Bio-Produkte“ 3, 5, 19, 20, 29 und 30 ausgenommen werden - mit NA einen Mittelwert (MW) von  $E_{617} = 0,043$ , eine Variationsbreite (VB) von  $E_{617} = 0,004$  bis  $0,148$  und eine Standardabweichung (s) von  $E_{617} = 0,038$  auf, mit NB einen MW von  $E_{617} = 0,008$ , eine VB von  $E_{617} = 0,000$  bis  $0,060$  und eine s von  $E_{617} = 0,014$ , mit IA einen MW von  $E_{617} = 0,043$ , eine VB von  $E_{617} = 0,006$  bis  $0,070$  und eine s von  $E_{617} = 0,017$ .

Bei den NA-Ansätzen der 24 konventionell gefertigten Produkte besteht bei 21 Proben eine Restaktivität von  $E_{617} \leq 0,067$  und bei 3 Proben von  $E_{617} = 0,104$  bis  $0,148$ , bei den nach Sinnenbefund meist mit einem höheren Leberanteil gefertigten und vor allem auch wesentlich schonender gegarten „Bio-Produkten“ hingegen von  $E_{617} = 0,118$  bis  $0,664$ . Bei den NB-Ansätzen der konventionellen Produkte werden bei 12 Proben Restaktivitäten von  $E_{617} = 0$ , bei 23 Proben von  $E_{617} \leq 0,033$  und bei Probe Nr. 10 von  $E_{617} = 0,060$  notiert, bei den „Bio-Produkten“ mit Ausnahme der Probe Nr. 5 von  $E_{617} = 0,247$  bis  $0,590$ . Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den Kochpökelprodukten und bei Brühwurst liegen Esterase-Restaktivitäten der IA-Ansätze bei 23 der 24 Leberwürste aus konventioneller Fabrikation bei  $E_{617} \leq 0,070$ , bei den „Bio-Produkten“ 3 und 5 bei  $E_{617} = 0,096$  und  $E_{617} = 0,109$ , bei den anderen bei  $E_{617} = 0,573$  bis  $E_{617} = 0,623$ .

Die aeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen der Stichprobe reichen von  $1,5 \times 10^3$  bis  $5,6 \times 10^4$ , bei den „Bio-Produkten“ von  $2,1 \times 10^3$  bis  $4,5 \times 10^4$  KBE/g. Die Zahl der aeroben Sporenbildner beläuft sich auf 0 bis  $1 \times 10^4$  KBE/g. Dass Streptokokken des Serotyps D trotz deren in Relation zur generellen vegetativen Flora besonders hohen Hitzeresistenz auch bei den schonend erhitzten „Bio-Produkten“ nicht nachzuweisen sind, dürfte sich auf die bekannt hohe Prozesshygiene des betreffenden Herstellungsbetriebes zurückführen lassen. Hervorzuheben ist desgleichen die Feststellung, dass auch die Produkte mit kurzer Restlaufzeit keine besonders hohen Keimgehalte aufweisen, und dies bei einer deklarierten Mindesthaltbarkeit von 3 Wochen bei 0 bis 4°C. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Stichprobe bestätigen so auch die Erfahrung, dass Geflügelleberwurst aus konventioneller Fabrikation auf Grund des speziell bei Geflügelleber als besonders hoch erachteten Salmonellen-Risikos besonders vorhaltend pasteurisiert werden.

Hinsichtlich der Frage, welche Esterase-Restaktivitäten sich als Indikatoren einer ausreichenden Pasteurisation bei Leberwurst aus konventioneller Fertigung benennen lassen, erlauben die Ergebnisse der untersuchten Stichprobe und die auch bei den Proben mit nur kürzerer Restlaufzeit sehr niedrigen Keimgehalte die Empfehlung der Grenzwerte von  $E_{NA} \leq 0,100$ ,  $E_{NB} \leq 0,050$  und  $E_{IA} \leq 0,100$ . Maßgeblich der NA-Ansätze stünde bei diesen Grenzwerten bei 3 und bei den NB- und IA-Ansätzen bei je einem der 24 konventionell gefertigten Erzeugnissen in Frage, ob die beim Pasteurisieren wirksam gewordene Hitze für eine hinreichende Inaktivierung insbesondere der pathogenen vegetativen Flora ausgereicht hat.

#### **7.4 Hackfleischerzeugnisse**

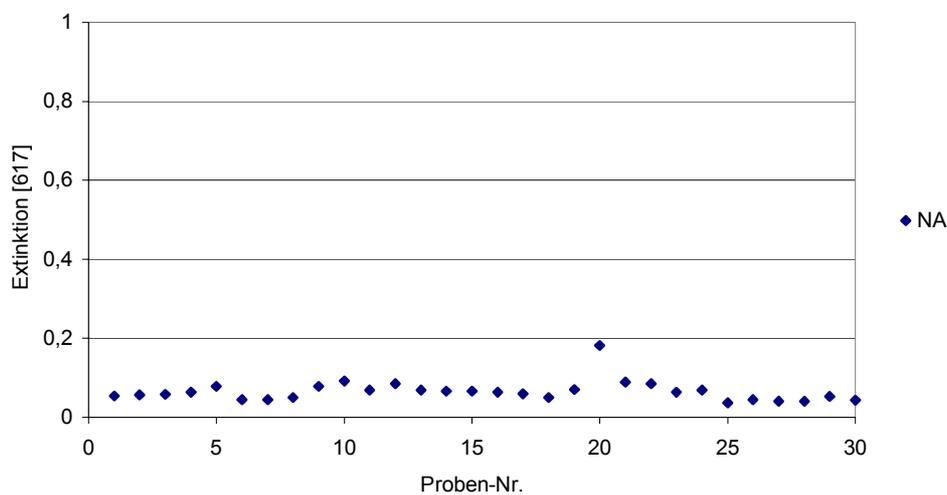
Maßgeblich der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse wird Hackfleisch aus sehnenarmem oder grobentsehtem, frischem oder gefrostenem Fleisch durch Wolfen hergestellt. Hackfleisch aus Geflügelfleisch darf nach §2 (2) HackfleischV nicht in rohem Zustand an den Verbraucher abgegeben werden. Die sonstigen Erzeugnisse nach §1 der Verordnung, die wie z.B. Fleischklöße, Fleischfüllungen, Bratwürste, Brühwursthalbfabrikat, Fleischbräte und gestückeltes Fleisch für die Zubereitung durch Erhitzen bestimmt sind, dürfen wegen des generellen Salmonellenrisikos nur in gefrostenem Zustand in den Verkehr gebracht werden.

### 7.4.1 Material und Methoden

Aus Geschäften in Freising, München und Umgebung werden insgesamt 30 hitzegegart und größtenteils von verschiedenen Herstellern stammende Hackfleischerzeugnisse vom Typ der Frikadelle, Cevapcici und der aus gestückeltem Fleisch zusammengesetzten und geformten Scheiben und Stücke beschafft. Die für die Untersuchungen erforderliche Probenmenge wird unter sterilen Kautelen bestmöglich aus dem Bereich des thermischen Mittelpunktes der Probe entnommen. Die Esterase-Restaktivität sowie die Zahl der aeroben Mesophilen, der aeroben Sporenbildner und der Streptokokken des Serotyps D werden gemäß 1 *Material und Methoden* bestimmt.

### 7.4.2 Ergebnisse und deren Besprechung

Die mit NA, NB und IA ermittelte Esterase-Restaktivität und die Keimgehalte der aus dem Handel bezogenen Hackfleischprodukte sind in Tabelle 56 und den Abbildungen 88 bis 90 wiedergegeben.

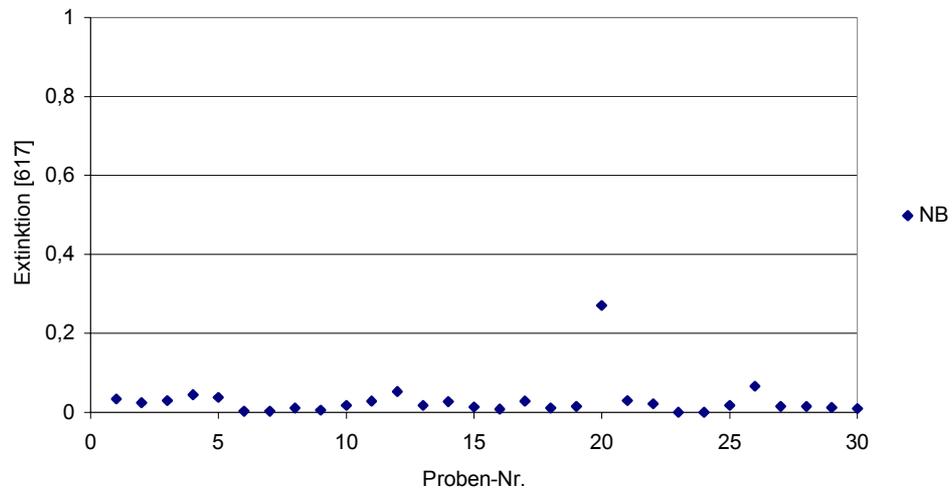


**Abb. 88:** Mit NA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Hackfleischerzeugnissen aus Putenfleisch des Handels

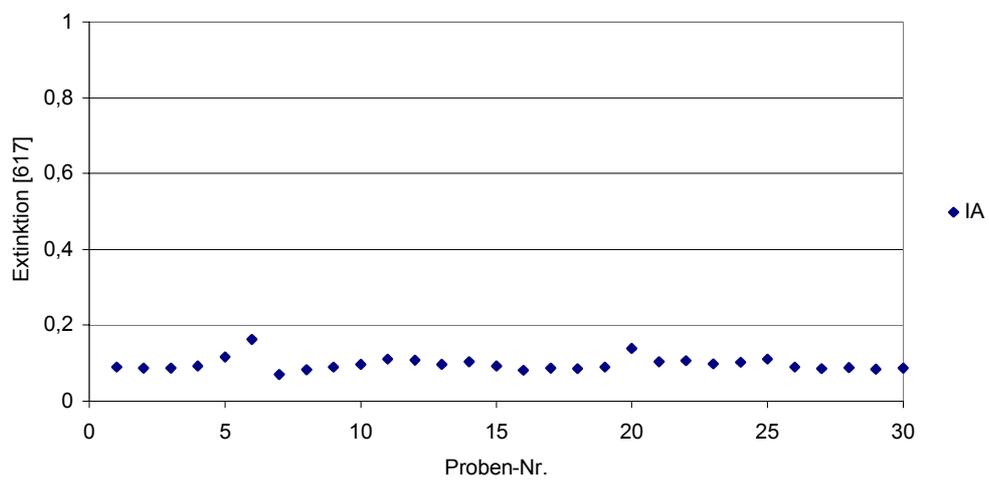
**Tab. 56: Esterase-Restaktivität und Keimgehalt bei Hackfleischerzeugnissen aus Putenfleisch des Handels**

Nr.	Probe Verkehrsbezeichnung	Extinktion [ $E_{617}$ ]			Keimgehalt [KBE/g]		
		NA	NB	IA	GKZ	S	D
1	Geflügelfrikadellen	0,054	0,033	0,090	$1,8 \times 10^5$	$2,3 \times 10^3$	0
2	Geflügelfrikadellen	0,057	0,024	0,087	$2,7 \times 10^5$	$7,2 \times 10^3$	0
3	Geflügelfrikadellen	0,058	0,030	0,087	$6,3 \times 10^4$	$2,9 \times 10^3$	0
4	Geflügelfrikadellen	0,063	0,044	0,092	$9,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	0
5	Puten-Cevapcici	0,078	0,038	0,117	$5,3 \times 10^5$	$9 \times 10^3$	0
6	Putenfrikadellen	0,045	0,003	$0,163^{1)}$	$7,9 \times 10^4$	$5 \times 10^2$	0
7	Putenfrikadellen	0,045	0,003	0,070	$8,2 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	0
8	Putenfrikadellen	0,050	0,011	0,083	$1,8 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	0
9	Puten Schnitte Wiener Art	0,078	0,006	0,090	$1,7 \times 10^3$	-	0
10	Puten Schnitte Wiener Art	0,092	0,017	0,097	$1 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	0
11	Putenfrikadellen	0,068	0,028	0,111	$2,9 \times 10^4$	$7,2 \times 10^2$	0
12	Putenfrikadellen	0,085	0,052	0,108	$3 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	0
13	Putenfrikadellen	0,068	0,017	0,097	$1,9 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	0
14	Putenfrikadellen	0,066	0,027	0,104	$7,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^2$	0
15	Putenfrikadellen	0,066	0,014	0,093	$4,7 \times 10^3$	$2 \times 10^2$	0
16	Putenfrikadellen	0,063	0,008	0,081	$1 \times 10^4$	$1,3 \times 10^2$	0
17	Putenfrikadellen	0,059	0,028	0,087	$4,1 \times 10^2$	$6 \times 10^1$	0
18	Putenfrikadellen	0,050	0,011	0,085	$9 \times 10^3$	$1,9 \times 10^2$	0
19	Putenfrikadellen	0,070	0,015	0,090	$3,8 \times 10^4$	$1 \times 10^2$	0
20	Putenfrikadellen	$0,182^{1)}$	$0,270^{1)}$	0,139	$3 \times 10^4$	$4,5 \times 10^2$	0
21	Knusper-Bärchen	0,089	0,030	0,104	$4,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^2$	0
22	Knusper-Bärchen	0,085	0,021	0,106	$1 \times 10^3$	$3,6 \times 10^1$	0
23	Puten-Schnitte Wiener Art	0,063	0	0,098	$9 \times 10^1$	$2 \times 10^1$	0
24	Puten-Schnitte Wiener Art	0,069	0	0,103	$2 \times 10^1$	-	0
25	Puten-Frikadelle	0,036	0,017	0,111	$3 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	0
26	Puten-Frikadelle	0,044	0,066	0,090	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	0
27	Puten-Frikadelle	0,041	0,015	0,086	$5 \times 10^2$	$1 \times 10^2$	0
28	Puten-Frikadelle	0,041	0,015	0,089	$1,9 \times 10^3$	$6,3 \times 10^1$	0
29	Puten-Frikadelle	0,052	0,012	0,084	$9 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$	0
30	Puten-Frikadelle	0,043	0,010	0,087	$6,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	0

Erklärungen: GKZ = aerobe mesophile Gesamtkeimzahl; S = aerobe Sporenbildner; D = Streptokokken des Serotyps D; <sup>1)</sup> Ausreißer nach DAVID, HARTLEY und PEARSON



**Abb. 89: Mit NB bestimmte Esterase-Restaktivität bei Hackfleischerzeugnissen aus Putenfleisch des Handels**



**Abb. 90: Mit IA bestimmte Esterase-Restaktivität bei Hackfleischerzeugnissen aus Putenfleisch des Handels**

Die in Tabelle 56 und den Abbildungen 88 bis 90 zusammengefassten Ergebnisse führen zu folgenden Feststellungen.

Die Restaktivitäten der Stichprobe von Hackfleischerzeugnissen weisen bei Ausschluss der Ausreißer bei den NA-Ansätzen einen Mittelwert (MW) von  $E_{617} = 0,061$ , eine Variationsbreite (VB) von  $E_{617} = 0,036$  bis  $0,092$  und eine Standardabweichung (s) von  $E_{617} = 0,016$  auf, bei den NB-Ansätzen einen MW von  $E_{617} = 0,021$ , eine VB von  $E_{617} = 0,000$  bis  $0,066$  und eine s von  $E_{617} = 0,016$  und bei den IA-Ansätzen einen MW von  $E_{617} = 0,095$ , eine VB von  $E_{617} = 0,070$  bis  $0,139$  und eine s von  $E_{617} = 0,014$ .

Die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl der Stichprobe liegt im Bereich von  $1 \times 10^2$  bis  $4,5 \times 10^6$  KBE/g, die Zahl der aeroben Sporen im Bereich von 0 bis  $1,2 \times 10^4$  KBE/g. Streptokokken des Serotyps D sind auch nicht bei Probe Nr. 21 nachweisbar, die eine Restlaufzeit von nur noch 2 Tagen und sicherlich auch deshalb diesen relativ hohen Keimgehalt aufweist.

Als Indikatoren einer für eine verlässliche Inaktivierung insbesondere der vegetativen pathogenen Flora ausreichenden Pasteurisation werden maßgeblich der Ergebnisse dieser Stichprobe und der Feststellungen in den vorausgegangenen Modellversuchen die Grenzwerte  $E_{NA} = 0,100$ ,  $E_{NB} = 0,050$  und  $E_{IA} = 0,140$  empfohlen. Bei starrer Anwendung dieser Grenzwerte erweisen sich mit NA die Probe 20, mit NB die Proben 12, 20 und 26 und mit IA die Probe 6 und 20 als unzureichend hitzekonditioniert.

## D Diskussion

Die Nachfrage nach Geflügelfleisch hat auch in jüngster Zeit noch zugenommen, so z.B. die Haushaltseinkäufe im 1. Quartal 2000 gegenüber dem Vorjahr um etwa 10%. Die Nachfrage nach Putenfleisch, das mit ca. 26000 t etwa die Hälfte der Haushaltseinkäufe von Hähnchenfleisch ausmacht, hat sich in der genannten Zeit um 16% und somit um das doppelte der Zunahme bei Hähnchenfleisch erhöht (NN, 2002). Die Wachstumszunahme bei Putenfleisch wird weitest hin dem den Erzeugnissen hieraus als bedeutsamste Teil-Qualität beigemesenen Gesundheitswert zugeschrieben.

Die hygienische Beschaffenheit der Erzeugnisse aus Putenfleisch hängt sehr entscheidend von deren mikrobiologischem Status ab. Lebensmittelhygienisch ist hierbei hervorzuheben, dass an der Spitze der alimentär übertragenen Erkrankungen in Deutschland seit einigen Jahren vor allem durch Salmonella oder Campylobacter verursachte Magen-Darm-Infektionen rangieren und Quelle der Infektionen sehr oft Putenfleischprodukte sind (BRAUN, 2001). So wird bei einer routinemäßigen Untersuchung von 419 Teilstücken der Pute des Handels festgestellt, dass 6% der Proben mit Salmonella und 6,2% der Proben mit Campylobacter kontaminiert sind (FRANCK, 2001). Bei dieser Kontaminationsrate ist zum einen davon auszugehen, dass es bei den Wursterzeugnissen aus Putenfleisch kaum eine Charge eines rohen Bräts oder Leberwurstgutes geben dürfte, das nicht mit pathogenen Keimen kontaminiert ist. Diese können im Prozessablauf der Produktion bei allem Bemühen um betriebliche Qualitätssicherung immer wieder auch in einem kritischeren Maße zur Vermehrung gelangen und so zur Ursache einer gewissermaßen relativen Unterkochung werden. Zum anderen lassen sich angesichts des hygienisch, sensorisch und hinsichtlich der Einsparung von Kochverlusten auch wirtschaftlich begründeten Prinzips, Fleischerzeugnisse generell so intensiv wie nötig und so schonend wie möglich zu garen auch absolute Unterkochungen nicht ausschließen. Die Notwendigkeit eines retrospektiven Erhitzungsnachweises bedarf so weder aus betrieblicher Sicht, noch aus der Perspektive der staatlichen Lebensmittelüberwachung einer eingehenderen Begründung.

Die im Schrifttum empfohlenen Verfahren für den Nachweis einer stattgehabten Erhitzung sind meist zu zeitraubend, zu ungenau oder zu teuer (TOWNSEND und BLANKENSHIP, 1989; STALDER und Mitarb., 1991). Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb geprüft werden, ob und inwieweit sich die Esterase-Aktivität pasteurisierter Erzeugnisse aus Pute als Indikator für ausreichende Erhitzung nutzen lässt. Insbesondere soll Antwort auf folgende Fragen gefunden werden:

- 1 Ist bei Fleisch und Fleischerzeugnissen von der Pute eine Modifikation der Methodik des im Schrifttum referierten Esterase-Tests erforderlich?
- 2 Wie wirken sich Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung bei Skelettmuskulatur, Fett- und Lebergewebe von Pute und bei den Erzeugnissen hieraus auf die Esterase-Aktivität des Probengutes aus? Inwieweit sind Rezeptur und Vorbehandlung der betreffenden Rezepturkomponenten von Einfluss?
- 3 Unter welchen Voraussetzungen und wie verlässlich eignet sich die mittels des Esterase-Tests bestimmte Restaktivität des Leitenzyms auch bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch als Indikator einer wirksamen Pasteurisation?

### **1 Ist bei Fleisch und Fleischerzeugnissen von der Pute eine Modifikation der Methodik des Esterase-Tests erforderlich?**

Inwieweit sich das von PFEIFFER und Mitarb. (1969) für den Nachweis einer ausreichenden Erhitzung bei Fleisch und Fleischerzeugnissen vom Rind und Schwein empfohlene Verfahren auch bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch eignet, wird an Leber, Brustmuskulatur und Fettgewebe der Tierart geprüft. Kriterien der Prüfung sind der Einfluss des pH-Wertes des Puffers, mit dem das Probengut extrahiert und die Esterase-Restaktivität bestimmt wird, sowie der Einfluss der Substratkonzentration, der Inkubationstemperatur und die Verfügbarkeit der Spaltprodukte Naphthol und Indoxyl für die die Esterase-Restaktivität anzeigende Farb- bildung des Nachweisverfahrens.

Der als Extraktionsmittel verwendete Puffer bestimmt unmittelbar auch das Reaktionsmilieu der Ansätze. Er vereint durch hohen Gehalt an Phosphat- und Citrationen den Vorteil einer bestmöglichen Extraktion von Esterase aus dem hitzeokoagulierten Probengut mit dem durch den Protonengehalt bedingten Vorteil adäquater Reaktionsbedingungen für die enzymatische Hydrolyse bei weitest gehender Vermeidung von autohydrolytischem Substratzerfall. Dass mit 0,3 m Citrat-Phosphat-Puffer von pH 6,6 sowohl im Hitzeokoagulat okkludierte Lysoesterase cytoplasmatischen Ursprungs, als sicherlich auch membrangebundenen Desmoesterase beispielsweise aus Mitochondrien maximal zu eluieren sind, folgt auch aus den Feststellungen von GLATZL (1970) und SINGRÜN (1970).

Da das pH-Optimum der hitzeresistenteren Esterase-Isozyme der Pute nicht bekannt ist, wird in vorliegender Arbeit zunächst der Einfluss des pH-Wertes des Citrat-Phosphat-Puffers auf die Testergebnisse geprüft. Dies geschieht unter den Bedingungen des Esterase-Tests an Probengut von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe, das jeweils bei  $F_{80} = 5$  erhitzt wird. Da sich die Esterase nach ARNDT (1973) bei 37 bis 55°C am effizientesten extrahieren

lässt, gelangt das Probengut in Puffer von 40°C zur Extraktion. Wie die Ergebnisse der Studien über den Einfluss des Puffer-pH zeigen, resultieren maximale Esterase-Aktivitäten bei den NA-Ansätzen von Brustmuskel und Leber bei einem pH-Wert der Ansätze von 7,2 und 7,4, bei den NB-Ansätzen bei pH 7,6. Während das Puffer-pH bei den IA-Ansätzen von Leber anscheinend ohne größeren Einfluss ist, erweist sich ein pH von 7,3 beim Brustmuskel deutlich als optimal. Beim Fettgewebe liegen die Esterase-Aktivitäten außerordentlich niedrig. Bei den IA-Ansätzen, bei denen differenziertere Aussagen nicht möglich sind, manifestiert sich das Maximum der Esterase-Reaktion bei pH 8,2. Diesen Feststellungen steht die Mitteilung von SCHOMBURG und SALZMANN (1991) gegenüber, wonach das reaktionskinetische pH-Optimum von Carboxylesterase je nach tierartlicher und anatomischer Provenienz in Abhängigkeit von Substrat und anderen Milieufaktoren bei pH 6 bis 9 liegt. Das reaktionskinetische Optimum von Carboxylesterase von *E. coli* wird von GOULLET und Mitarb. (1984) mit 1-Naphthylacetat als Substrat bei pH 7,4 nachgewiesen.

Aus dem Dargestellten folgt:

Bei Anhebung des pH-Wertes der Testansätze auf pH 7,4 ließe sich die Inkubationsdauer des Esterase-Tests zwar erheblich verkürzen. Da sich jedoch die Autohydrolyse von NA, NB und IA schon bei pH 7 gegenüber pH 6,6 nahezu verdoppelt, könnte sich u.U. auch das Puffervermögen des Probengutes auf das Reaktionsmilieu der Testansätze in einem Maße auswirken, das vermittels des Nullwertansatzes nicht mehr zufriedenstellend kompensiert wäre. Diese Feststellungen legen nahe, das bei den Erzeugnissen von Rind und Schwein bewährte Puffer-pH von 6,6 bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch auch zu Gunsten einer gewissen tierartlichen Vergleichbarkeit der Testergebnisse beizubehalten.

Eine ähnliche Situation besteht hinsichtlich der Inkubationstemperatur. Wie sich bei Erhöhung der Temperatur von 20°C auf 40°C in Stufen von jeweils 5°C zeigt, ist Esterase von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe der Pute bis zu einer Inkubationstemperatur von 40°C stabil. Während bei Brustmuskulatur und Leber mit jedem der drei geprüften Substrate ein stetiger und erheblicher Anstieg der Esterase-Aktivität resultiert, erfolgt dies beim Fettgewebe erst von 30°C an. SINGRÜN (1970) gelangt bei Carboxylesterase des Schweinemuskels mit NA zu ähnlichen Ergebnissen. GLATZL (1970) registriert mit IA zwar eine größere Aktivitätssteigerung bei Erhöhung der Temperatur von 20°C auf 25°C, nicht mehr jedoch von 25°C auf 30°C. Nach SCHÄR und Mitarb. (1988) liegt das mit p-Nitrophenylacetat bestimmte Temperaturoptimum von Carboxylesterase von *Nocardia mediterranei* bei 35°C, die Stabilität dieses mikrobiellen Enzyms reicht jedoch nur bis 40°C. Von GOULLET und Mitarb. (1984) wird berichtet, dass die Aktivität von Carboxylesterase von *E. coli* durch die Temperaturein-

wirkung von  $F_{60} = 10$  nicht verringert wird, wogegen Carboxylesterase von Kaninchenleber bei  $F_{60} = 3$  nach TANAKA und Mitarb. (1987) bereits einem Aktivitätsverlust von 90% und Carboxylesterase des Blutplasmas der Ratte bei  $F_{55} = 55$  nach LITH und Mitarb. (1993) von 76% unterliegen. MURAKAWA und Mitarb. (1987) teilen mit, dass sich Carboxylesterase des Ascomyceten *Emericella unguis* schon gegenüber Temperaturen  $\geq 30^\circ\text{C}$  als instabil erweist.

Die Inkubationstemperatur ist jedoch nicht nur bezüglich der Enzymkinetik von Bedeutung, sondern vor allem auch bezüglich der Substratstabilität. Im Gegensatz zu NA und zumal IA, die schon bei wenig mehr als  $25^\circ\text{C}$  einer im Verlaufe von 60 min bzw. 180 min untragbaren Authydrolyse unterliegen, erweist sich NB als stabil.

Aus dem Dargestellten folgt:

Während die Inkubationstemperatur von  $25^\circ\text{C}$  bei Verwendung von NA und IA als Substrat aus den auch für die Beibehaltung des Puffer-pH sprechenden Gründen nicht erhöht werden sollte, könnte sich dies im Falle von NB durchaus empfehlen.

Die Ermittlung der bei Leber, Brustmuskel und Fettgewebe nach Pasteurisation bei  $F_{80} = 5$  optimalen Substratkonzentration und Inkubationsdauer erfolgt an Ansätzen, denen jeweils 5, 25, 50, 100, 200 und 300% derjenigen Substratmenge zugesetzt werden, die bei den Erzeugnissen aus Rind- und Schweinefleisch zur Anwendung gelangen. Die Inkubationsdauer erstreckt sich bei NA im 10 min-Intervall von 10 bis 60 min, bei IA und NB im 30 min-Intervall von 30 bis 180 min.

Während mit zunehmender Inkubationsdauer die Esterase-Aktivität bei den NA-Ansätzen von Leber und Brustmuskel faktisch linear ansteigt und eine Erhöhung der Substratkonzentration auf über 100% zu keiner Reaktionssteigerung führt, nimmt die Hydrolyserate bei Fettgewebe durch eine Erhöhung des Substratzusatzes auf 200% erheblich zu. Bei den IA-Ansätzen führt die Anhebung der Substratkonzentration auf über 100% bei jeder der geprüften Probenarten zu einer Steigerung der Reaktionskinetik. Dass sich der Anstieg bei den Ansätzen von Leber nach 90 min langer Inkubation deutlich verlangsamt, könnte möglicherweise auf eine Produkthemmung zurückzuführen sein.

Eine Substrathemmung resultiert bei NA in Übereinstimmung mit den Feststellungen von SINGRÜN (1970) auch nicht bei Erhöhung der Substratzugabe auf 300%, hingegen eine z.T. sogar vollkommene Hemmung mit NB bei den Ansätzen von Brustmuskel und Leber schon bei Substratkonzentrationen  $> 100\%$ . Dass durch Methyl- und Ethylbutyrat in hoher Konzentration auch Carboxylesterase der Leber vom Huhn gehemmt wird, berichten STOOPS und Mitarb. (1975). SARDA und DESNUELLE (1958) teilen mit, dass Carboxylesterase der Rat-

tenlunge durch 4-Nitrophenylacetat und 4-Nitrophenylbutyrat in Konzentrationen  $> 1,6$  mM inhibiert wird. Nach MATHIES (1966) unterliegt Milch-Esterase gegenüber IA sowohl einer Substrathemmung als bei höherer Substratkonzentration und einer Inkubationszeit von zumindest 15 min auch einer Produkthemmung. GLATZL (1970) registriert bei Muskel-Esterase des Schweins auch bei hohen IA-Konzentrationen weder eine Substrathemmung noch eine Produkthemmung.

Aus dem Dargestellten folgt:

Während die Reaktionskinetik der die Pasteurisation persistierende Esterase durch die Erhöhung der NA-Konzentration weder gesteigert, noch gehemmt wird, führt eine Erhöhung der NB-Konzentration zu einer Aktivitätshemmung. Bei IA besteht der Anschein, dass eine Substratsättigung weder bei den Ansätzen von Leber und Brustmuskel, noch von Fettgewebe gewährleistet ist. Nach Erfahrungen von PFEIFFER (2002) könnte dies jedoch auch darauf zurückzuführen sein, dass nicht die Menge des zugegebenen Substrates zu gering ist, sondern aufgrund der geringen Löslichkeit und hohen Koaleszenz von IA im wässrigen Milieu der Testansätze dessen Dispersität. Diese ließe sich dadurch zufriedenstellend sichern, dass die Ansätze während der Inkubation intensiver geschüttelt werden oder dass sie am einfachsten mit dem Substrat ca. 10% Glycerin als Lösungsvermittler und Dispersionsstabilisator zugesetzt bekommen. Da sehr vieles für diese Erklärung spricht, wird empfohlen, den IA-Ansätzen künftig auch bei den Erzeugnissen aus Rind und Schwein ca. 10% Glycerin zuzusetzen.

Hinsichtlich der Korrelation zwischen Esterase-Aktivität und der Konzentration der als Indikatoren der Esterase-Aktivität resultierenden Hydrolyseprodukte ist von Wichtigkeit, dass Naphthol und Indoxyl, desgleichen aber auch Indigo mit Inhaltsstoffen des Probenextraktes reagieren und dadurch dem quantitativen Nachweis entgehen können. Nach MATHIES (1966) und GLATZL (1970) kann beispielsweise an Fleischfaser gebundenes Indigo selbst mit einer Chloroform-Dimethylformamid-Lösung nicht vollständig eluiert werden. KÖRMENDY und Mitarb. (1992) berichten, dass je nach Probe-Puffer-Verhältnis 0,8% bis 83,3% (!) des aus Phenylphosphat durch Phosphatase des Schweineschinkens freigesetzten Phenols im Sinne des Phosphatase-Tests unspezifisch reagieren.

In welchem Maße Naphthol - und in einem sicherlich vergleichbarem Maße auch Indoxyl - der Erfassung als Parameter der Esterase-Restaktivität entgehen, wird am methodisch einfacheren Beispiel Naphthol ermittelt, indem mit reinem Puffer sowie mit dem Extrakt von pasteurisierter Leber, Brustmuskulatur und Fettgewebe sowie von Kochschinken, Brühwurst und Leberwurst mit Naphthol und DBCC Eichgeraden erstellt werden. Eine faktisch quantitative

Reaktion von Naphthol mit DBCC zum bestimmungsgemäßen Azofarbkomplex erfolgt nur im Extrakt von Brustmuskel und Fettgewebe. Beim Extrakt von Leber gelangen nur etwa 50% des Naphthols zur Reaktion mit DBCC, bei Kochschinken ca. 70%, bei Brühwurst ca. 40% und bei Leberwurst sogar nur ca. 30%. Dass das Hydrolyseprodukt Naphthol und nicht etwa der Azofarbstoff an Inhaltsstoffe aus dem Probengut gebunden wird, wird an Leberextrakt nachgewiesen. Die Ansätze, denen in Pufferlösung gebildete Azofarbstoff-Lösung zugegeben wird, weisen eine etwa doppelt so hohe Extinktion auf wie die Ansätze, bei denen dem Extrakt zunächst Naphthol und nach 15 min langer Inkubation für die Bestimmung des verfügbar gebliebenen Teiles DBCC zugegeben wird. Dass auch Indoxyl nicht zur Gänze zu Indigo reagiert, sondern zu einem offensichtlich markanten Teil mit Inhaltsstoffen des Probenextraktes ergibt sich in den Studien des Kapitels 2.1 *Einfluss der Inkubationstemperatur* aus der Feststellung, dass die mit der Inkubationstemperatur zunehmende Autohydrolyse von IA bei den aus reinem Puffer und IA bestehenden Nullwertansätzen stets höhere Extinktionen zur Folge hat, wie bei den parallel mitgeführten Blindwertansätzen aus Probenextrakt und IA. Dass in der Hauptsache nicht Indigo und auch nicht dessen aus 2 Molekülen Indoxyl bestehende Leukoform mit den hierfür in Frage kommenden Bestandteilen des Probenextraktes reagiert, sondern Indoxyl, folgt daraus, dass sich die Eichgerade mit Indigo und Puffer von der Eichgerade mit Extrakt aus Brustmuskel, Leber, Fettgewebe, Kochschinken, Brühwurst und Leberwurst in einem so geringen Maße unterscheiden, dass der Unterschied auch nur methodisch bedingt sein könnte.

Aus dem Dargestellten folgt:

Sowohl Naphthol als auch Indoxyl kann von affinen Inhaltsstoffen des Probenextraktes gebunden und dadurch der Reaktion zum Ergebnis bestimmenden Farbkomplex entzogen werden. Ein fälschlich negatives Testresultat kann bei einer entsprechend vorhaltenden Festlegung der Inkubationsdauer sowie des für eine potentiell unzureichende Erhitzung symptomatischen und an einer repräsentativen Auswahl von Produkten des Betriebes resp. des Handels verifizierten Grenzwertes nicht resultieren.

Bei Anwendung des Esterase-Tests im Rahmen der innerbetrieblichen Qualitätssicherung bereitet dieser Zusammenhang keine Probleme; denn den Beauftragten sind die Rezeptur und das in der betrieblichen Verfahrensanweisung vorgeschriebene Regime der Hitzebehandlung bekannt und dadurch für eine produktionsbegleitend besonders exakte Kalibrierung des Screeningtests beste Voraussetzungen gegeben. In der amtlichen Lebensmittelüberwachung kann es bei hygienisch nicht in einem speziellen Zusammenhang besonders bedenklichem Probengut in aller Regel beim negativen Ergebnis des Esterase-Tests belassen bleiben. Wenn im Extremfall von „gesundheitlicher Gefahr im Verzuge“ ein bei aller vorhaltenden Grenzwertsetzung als „fälschlich negativ“ befürchtetes Ergebnis als solches erhär-

tet werden soll, so kann dies dadurch geschehen, dass der Gehalt des Probenextraktes an Naphthol-affinen Stoffen mittels einer Naphthol-Eichgeraden mit Extrakt sowie mit reinem Puffer überprüft wird.

Die Unterscheidungsschärfe des Esterase-Tests und die Bedeutung der Korrelation zwischen Esterase-Aktivität und Eiweißgehalt des Probenextraktes für eine etwaige Präzisierung der Testresultate wird an Brustmuskulatur geprüft, die jeweils 5 min bei 65, 67,5, 68, 69, 70, 71, 72,5, 75 und 80°C erhitzt wird.

Wie sich unter den Modellbedingungen der Versuchsanordnung zeigt, sind im Bereich von 65 bis 70°C selbst die Temperaturerhöhungen um jeweils nur 0,5°C mit jedem der drei Substrate nachweisbar. Während im Temperaturbereich von 70 bis 80°C mit NA und IA lediglich die Hitzeeffekte von 71°C/5 min und 72,5°C/5 min voneinander sicher unterschieden werden können, gilt dies mit NB auch für die Regimes 70°C/5 min, 71°C/5 min, 75°C/5 min und 80°C/5 min. Die Eiweißgehalte der Probenextrakte streuen jedoch selbst im Falle des ausschließlich aus Brustmuskulatur bestehenden Probengutes so sehr, dass sie für die Beurteilung der Effektivität einer Pasteurisation schon gleich bei den zusammengesetzten Produkten etwa der Kategorie Bulette oder Brühwurst ohne Bedeutung sind. Vermittels des Quotienten  $q$  aus Restaktivität und Eiweißgehalt lassen sich im Falle der NA-Ansätze allerdings auch die Hitzeeffekte einer jeweils 5 min langen Hitzebehandlung bei 72,5, 75 und 80°C voneinander unterscheiden.

Über Esterase-Restaktivität bei praxismäßig pasteurisiertem Probengut von Schwein und Rind sowie bei hieraus gefertigter Leberwurst wird im Schrifttum mehrfach berichtet. Nach GLATZL (1970) lässt sich auf 75°C erhitztes Probengut vom M. supra spinam vom Schwein mit IA deutlich von den auf 80°C gebrachten Vergleichsansätzen unterscheiden. BREHMER und FORSCHNER (1974) stellen fest, dass gewerbeüblicherweise bei der Kerntemperatur 76 und 80°C pasteurisierte Leberwurst im Tüpfelplattentest mit NA Reaktionen von signifikant gestufter Stärke gibt. Das Gleiche gibt bei 74 und 76°C im Kern pasteurisierte Brühwurst zu erkennen. PFEIFFER (2002) teilt mit, dass von Fett- und Bindegewebe sorgfältig befreites und nach Wolfen durch die 2 mm-Scheibe homogenisiertes Verarbeitungsfleisch von Schwein und Rind nach einem durchschnittlich 16, 19 bzw. 21 min langen definierten Erhitzen im Wasserbad von 71,5, 76,5 bzw. 81,5°C auf eine Kerntemperatur von 70, 75 bzw. 80°C und nach anschließend sofortigem Kühlen in ca. 13, 14 bzw. 16 min auf 20°C sowohl mit IA als auch mit NA der Hitzebehandlung entsprechend signifikant gestufte Esterase-Restaktivitäten aufweist. Während dies beim Schweinefleisch auch für die Tests mit Indoxylbutyrat (IB) und NB zutrifft, resultiert mit IB bei einer von 5 Rindfleischproben bei der 80°C-Charge eine visuell soeben noch als positiv erkennbare Reaktion der Extinktion  $E_{615} = 0,009$ .

Ursache hierfür dürfte sein, dass das für die Tests bezogene Ausgangsmaterial einer unzureichend vermischten und deshalb nicht Schlachttier-repräsentativen Grundgesamtheit entnommen worden war. Für diese Erklärung spricht der Mitteilung zufolge auch die Erfahrung, dass die Esterase-Aktivität bei rohem wie erhitztem M. supra spinam von Muskelbezirk zu Muskelbezirk sehr stark – bei rohem Material um bis zu 100% - differieren kann. Die Hitzebehandlung des diesen Feststellungen zugrunde liegenden Probengutes erfolgt in 200 x 30 mm großen Reagenzgläsern, nachdem die Einwaage zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Wärmeleitung mit 20% Aqua. dest. überschichtet und so von Luftblasen befreit wurde. Hinsichtlich des Verhältnisses  $q$  zwischen Esterase-Restaktivität und Eiweißgehalt fällt auf, dass dieses bei den IA- und NB-Ansätzen von gestuft von 70 auf 80°C erhitzter Brustmuskulatur im Gegensatz zu den NA-Ansätzen faktisch konstant bleibt. Bei den NA-Ansätzen nimmt  $q$  mit steigender Erhitzungsintensität deutlich zu, da sich infolge des Temperaturanstiegs auf über 72,5°C zwar der Proteingehalt, kaum mehr jedoch die mit NA ermittelte Esterase-Restaktivität verringert. Ursache der relativ hohen Restaktivitäten bei den NA-Ansätzen könnte - von der höheren Löslichkeit und Dispersität von NA abgesehen - zum einen sein, dass die besonders hitzestabilen Isozyme für NA eine höhere Affinität aufweisen als für IA und NB. Zum anderen könnte die mit zunehmender Wärmeabsorption in Korrelation zum Proteingehalt erfolgende Verringerung der mit NB und IA resultierenden Esterase-Restaktivität auch darauf zurückzuführen sein, dass die Restaktivität vorwiegend membran-gebundenen Desmoesterasen zukommt, die bei der Filtration im des Puffer dispergierten Probenhomogenisates zu einem entsprechend großen Teil im Filtrerrückstand verbleiben.

Aus dem Dargelegten folgt:

Ob die beim Pasteurisieren des Probengutes wirksam gewordene Hitze zumindest einer 5 min langen Einwirkung von 72,5°C entspricht oder nicht, lässt sich beim Brustmuskel der Pute mit NA und IA gesichert nachweisen, mit NB auch noch der Pasteurisationseffekt einer zumindest 5 min langen Einwirkung von 75°C. Unter den Modellbedingungen der Studie können im Bereich von 65°C bis 70°C selbst Intervalle von nur 0,5°C mit jedem der drei Substrate sehr gut unterschieden werden. Mit NA als Substrat lässt sich die Nachweisschwelle des Esterase-Tests auf zumindest 80°C/5 min erhöhen, wenn der Nachweis auf das Verhältnis  $q$  zwischen Esterase-Aktivität und Eiweißgehalt des Probenextraktes abgestellt wird.

## **2 Wie wirken sich Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung bei Skelettmuskulatur, Fett- und Lebergewebe von Pute und bei den Erzeugnissen hieraus auf die Esterase-Restaktivität des Probengutes aus? Inwieweit sind Rezeptur und Vorbehandlung des Probengutes von Einfluss?**

SCHLEUSENER und Mitarb. (1982) unterscheiden folgende 4 Verlaufsformen der Inaktivierung von Enzymen: 1) Die Inaktivierung verläuft gemäß einer Reaktion 1. Ordnung, 2) Im Verlauf der Inaktivierung resultiert ein Knickpunkt, 3) Der Inaktivierungsverlauf weist eine Phase der Stimulierung auf, 4) Die Inaktivierung verläuft nicht irreversibel, so dass Reaktivierung folgt. Um bei Brustmuskel, Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Karkasse, Leber und Fettgewebe von Pute die Verlaufsweise der Hitzeinaktivierung der Esterase als Funktion der Erhitzungsdauer zu ermitteln, werden die Probenhomogenisate bei 65°C 5, 10, 30, und 60 min, bei 72,5°C 2,5, 5, 10, und 30 min und bei 80°C für die Ansätze mit NA und NB für die Dauer von 1, 5 und 10 min und für die Ansätze mit IA für die Dauer von 2,5, 5 und 10 min erhitzt. Die Studien führen zu folgenden Feststellungen:

Die Inaktivierung von Esterase von Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber verläuft im halblogarithmischen Aktivität-Zeit-Diagramm nicht gemäß einer Reaktion 1. Ordnung linear, sondern gemäß dem o.a. Inaktivierungsverlauf 2) mit einem Knickpunkt in der Inaktivierungskurve (Tab. 20 – 24, 26; Abb. 30 – 44, 48 – 50).

Bei Skelettmuskulatur mit Ausnahme des Brustmuskels und bei Leber sinkt die Esterase-Aktivität in der 1. Phase bei 65°C schon in den ersten 5 min auf etwa 10%, beim Brustmuskel auf 1 bis 10% und beim Fettgewebe auf etwa 10 bis 27% der Ausgangsaktivität. Bei 72,5 und 80°C sinkt die Esterase-Aktivität in der 1. Phase von bis zu 2,5 min mit Ausnahme der NB-Ansätze bei der Leber und der IA-Ansätze beim Fettgewebe bei jedem Probengut und bei jedem der drei Substrate faktisch linear auf unter 1% der Ausgangsaktivität. In der 2. Phase der Hitzedenaturation erfolgt bei den 65-, 72,5- und 80°C-Proben eine vergleichsweise nur mehr sehr geringe Abnahme der Esterase-Restaktivität.

Die Hitzeinaktivierung der unter den Bedingungen des Esterase-Tests erfassten Esterase der Pute verläuft demnach trotz der Vielzahl der sie bildenden Isozyme in gleicher Weise, wie nach Mittelung von HOTTENROTH (1974) die Hitzedenaturation von Lipase EC 3.1.1.3, die hinsichtlich der Substratspezifität der Carboxylesterase EC 3.1.1.1 sehr nahe steht. Von KÖRMENDY und GANTNER (1960), GANTNER und KÖRMENDY (1968) und KÖRMENDY und Mitarb. (1992) wird berichtet, dass auch die Hitzeinaktivierung von saurer Phosphatase der Skelettmuskulatur des Schweins auf sehr ähnliche Weise erfolgt. Nach TOWNSEND und BLANKENSHIP (1989) wird die Restaktivität der sauren Phosphatase bei Dosenschinken

vom Food Safety and Inspection Service (FSIS) der USA als Indikator für ausreichende Pasteurisation zugrunde gelegt.

Da die Inaktivierung der Esterase im Gegensatz zu der annähernd gemäß einer Reaktion 1. Ordnung erfolgenden Inaktivierung von Bakterien in zumindest zwei von einander durch unterschiedliche Inaktivierungsgeschwindigkeit und unterschiedlichen z-Wert abgegrenzten Phasen verläuft, ist eine Extrapolation von F-Werten für die Gewährleistung eines bestimmten Ausmaßes der Inaktivierung von Esterase etwa als Indiz für die Abtötung vegetativer Bakterien nicht möglich. So ist auch verständlich, dass nach REICHERT (1980) die vegetative Bakterienflora durch ein 10 min langes Einwirken von 72°C gleich effektiv inaktiviert wird, wie durch ein 39 min langes Einwirken von 65°C, dass die Inaktivierung der Esterase von Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber der Pute bei 65°C und 72,5°C hierzu jedoch keine Parallele erkennen lässt.

Aus dem Dargestellten folgt:

Die Inaktivierung von Esterase des Brustmuskels, der Leber und des Fettgewebes von Pute verläuft bei 72,5 bzw. 80°C in der Weise zweiphasig, als sich die Inaktivierung nach einer etwa 2,5 min langen Einwirkung dieser Temperatur hochgradig verzögert. Ein zweiphasiger Inaktivierungsverlauf mit Knickpunkt nach etwa 5 min zeichnet sich auch bei 65°C ab. Da die Inaktivierung in der 2. Phase unvergleichlich schwächer erfolgt als in der 1. Phase, ist erklärlich, dass selbst sehr geringe in der 1. Phase persistierende Esterase-Restaktivitäten in der 2. Phase erst im Verlaufe einer längeren Hitzeinaktivierung soweit verringert werden, dass sie bei den methodischen Bedingungen des Esterase-Tests nicht mehr nachweisbar sind.

Über die Temperaturstabilität von Geflügel-Esterase wird im Schrifttum kaum berichtet. Über Carboxylesterase des Rindermuskels wird von McRAE und RANDALL (1965) mitgeteilt, dass eine vollständige Inaktivierung des Enzyms nach Ergebnis der elektrophoretischen Studien mit Stärkegel eine einem  $F_{80} = 10$  entsprechende Hitzeeinwirkung voraussetzt. PFEIFFER und Mitarb. (1969) berichten, dass eine völlige Inaktivierung von Carboxylesterase bei gepökeltem M. supra spinam des Schweins erst nach etwa 15 min langem Einwirken von 80°C resultiert. GLATZL (1970) stellt fest, dass ein Erreichen von 82°C im Kern genügt, um die Carboxylesterase des M. supra spinam vom Schwein vollständig zu inaktivieren. Nach TANAKA und Mitarb. (1987) verliert gereinigte Carboxylesterase der Kaninchenleber durch ein 3 min langes Einwirken von 60°C etwa 90% ihrer Aktivität. LITH und Mitarb. (1993) geben bekannt, dass Plasmaesterase der Ratte nach 25 min langem Einwirken von 55°C 24% und nach 7 min langem Einwirken von 65°C 88% der Ausgangsaktivität verliert. Nach EINARSSON und Mitarb. (1996) wird Carboxylesterase der Schafleber schon durch ein Erhitzen auf 62°C vollständig inaktiviert.

Um die eigenen Ergebnisse über den Verlauf der Hitzeinaktivierung der Esterase von Brustmuskel, Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Karkasse, Leber und Fettgewebe der Pute zu validieren, werden die Probenhomogenisate jeweils 5 min von 65 bis 72,5°C im Intervall von 2,5°C und zusätzlich bei 80 und 85°C erhitzt. Parallel zur Bestimmung der Restaktivität werden mittels isoelektrisch fokussierender Polyacrylamidgel-Elektrophorese von den im 5°C-Intervall auf 60 bis 80°C erhitzten Chargen von Brustmuskel, Fettgewebe und Leber Esterase-Pherogramme erstellt.

Die Studien führen zu folgenden Feststellungen:

Wie sich den Aktivität-Temperatur-Diagrammen von Brustmuskel, Leber und Fettgewebe bei allen drei Substraten zeigt und bei den mit NA dargestellten Isozym-Pherogrammen bestätigt, tritt im Verlaufe des Temperaturanstiegs von 70 bis 72°C ein für die Probenart spezifischer Knickpunkt auf, von dem an die Inaktivierung deutlich verzögert verläuft, jedoch selbst bei 85°C/5 min noch nicht vollständig abgeschlossen ist.

Neben Carbesterase zeigt sich auch bei anderen auf ihre Eignung als Indikatoren einer ausreichenden Pasteurisation untersuchten Enzymen, das deren Hitzeinaktivierung nicht linear verläuft. Nach STALDER und Mitarb. (1991) und LEVIEUX und Mitarb. (1995) beginnt sich die Inaktivierung von Laktatdehydrogenase und nach DAVIS und Mitarb. (1994) von saurer Phosphatase schon bei einer niedrigeren, die Inaktivierung von Glutamat-Oxalat-Transaminase hingegen nach SEARCY und Mitarb. (1995) erst bei einer höheren Temperatur als bei Esterase der Pute zu verzögern. Der Mitteilung von HSU und Mitarb. (2000) zu Folge liegt der Knickpunkt der Hitzeinaktivierung bei Triose-Phosphat-Isomerase der Muskulatur vom Rind in Abhängigkeit vom Muskeltyp bei gleicher Temperatur wie bei Esterase der Pute oder niedriger.

Die Verlangsamung der Hitzeinaktivierung eines Enzyms oder eines Komplexes von Isozymen kann unterschiedlich verursacht sein. So könnte z.B. die im Bereich von 70 bis 72,5°C eintretende Verlangsamung der Hitzeinaktivierung von Carboxylesterase EC 3.1.1.1 nach HOTTENROTH (1974) auf das Bestehen von enzymfunktional elementaren Molekülzentren von unterschiedlicher Hitzestabilität oder/und auf die hitzebedingte Entstehung einer für diese Funktionszentren hitzeprotektiven Molekül-Konfiguration zurückzuführen sein. Bei Isozymkomplexen könnte die Hitzeinaktivierung auch deshalb scheinbar phasenweise unterschiedlich rasch verlaufen, weil sich die Isozyme nicht nur hinsichtlich ihrer Hitzeresistenz, sondern auch hinsichtlich ihrer Aktivität unter den jeweiligen Reaktionsbedingungen stark unterscheiden können. Die letztgenannten Unterschiede zeichnen sich sehr deutlich auch bei den eigenen elektrophoretischen Untersuchungen ab. Bei der Interpretation solcher Pherogramme muss allerdings auch im Auge behalten werden, dass die eine oder andere Isozymbande physiologisch möglicherweise nicht existent, sondern als sogenannte Sekundärbande das methodisch bedingte Artefakt einer realen Primärbande ist. Elektrophoretische

Sekundärbanden können nach LITH und Mitarb. (1989) durch den Verlust von Kohlenhydratresten, nach ARNDT (1973) und KETTERMANN und Mitarb. (1989) durch eine Neukombination vorhandener Untereinheiten, nach TSUJITA und Mitarb. (1988) durch Desaminierung und nach KETTERMANN und Mitarb. (1989) sowie EINARSSON und Mitarb. (1996) auch durch eine Interaktion zwischen Enzym und Ampholyt entstehen.

Aus dem Dargestellten folgt:

Wie Esterase des Schweins und Rindes weist auch Esterase der Pute eine unter den Enzymen der Wirbeltiere vergleichsweise hohe Temperaturstabilität auf. Für den Verlauf der Hitzeinaktivierung von Putenesterase ist kennzeichnend, dass sich die Enzymaktivität infolge einer durch Temperaturerhöhung intensivierten Hitzebehandlung bis zu einer Temperatur von 70 bis 72°C zunächst sehr stark und bei einer Intensivierung der Hitzebehandlung über die betreffende Temperaturschwelle hinaus nur noch sehr protrahiert verringert. In der 2. Phase verzögert sich die Enzyminaktivierung aufgrund der hohen Hitzeresistenz der besonders hitzestabilen Isozyme bei jeder der geprüften 7 Probenarten so sehr, dass eine sei es auch noch so schwache positive Esterase-Reaktion auch noch nach einem 5 min langen Einwirken von 85°C mit zumindest einem der drei Substrate nachzuweisen ist.

Für die Aussagekraft des Esterase-Tests bei Erzeugnissen aus Putenfleisch ist auch die Frage von Wichtigkeit, wie sich ein Frosten und Gefrierlagern der Rezepturkomponenten auf die Esterase-Restaktivität der pasteurisierten Fertigprodukte auswirkt. Dieser Frage wird bei roh gefrostedem und nach Auftauen bei Zimmertemperatur pasteurisiertem Probengut von je 5 Sammelproben von Brustmuskel, Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Karkassenfleisch, Fettgewebe und Leber nachgegangen.

Wie die Mittelwerte der Sammelproben zeigen, führt das Frosten beim rohen wie beim pasteurisierten Probengut bei 33 der insgesamt 42 Versuchschargen zu einer leichten Verringerung der Esterase-Restaktivität. Die Verringerung erweist sich jedoch nur bei 15 Ansätzen als statistisch signifikant.

Ursache dafür, dass beispielsweise vor dem Pasteurisieren gefrostete Skelettmuskulatur eine etwas geringere Restaktivität aufweist als nicht gefrostete, könnte möglicherweise sein, dass die hitzestabileren Isozyme durch die Frostbehandlung infolge von Dehydratisierung oder – soweit sie als Desmoesterase etwa an Mitochondrien gebunden sind – infolge der Desaggregation leichter denaturiert werden. Dass sich die Enzymaktivität durch ein Frosten verringern kann, wird von ORTA-RAMIREZ und Mitarb. (1996) auch bei Laktatdehydrogenase des Rindermuskels festgestellt, von COLLINS und Mitarb. (1991b) bei Laktatdehydrogenase des Schweinemuskels und von WANG und Mitarb. (1993) bei Laktatdehydrogenase

des Putenmuskels. In Studien von COLLINS und Mitarb. (1991a) und von ORTA-RAMIREZ und Mitarb. (1996) zeigt sich, dass dieser Frosteffekt nicht immer, sondern nur unter bestimmten biochemischen Voraussetzungen eintritt. Über den Einfluss der Frostung auf die Aktivität weiterer als Indikatoren einer ausreichenden Erhitzung untersuchter Enzyme wird von TOWNSEND und Mitarb. (1993) bei Glucosaminidase, von DAVIS und TOWNSEND (1994) bei saurer Phosphatase, von TOWNSEND und DAVIS (1992) bei Transaminase und von DAVIS und CYRUS (1998) bei Katalase berichtet.

Am Beispiel von Glutamat-Oxalat-Transaminase wird von HAMM und Mitarb. (1969) berichtet, dass das Frosten von Fleisch eine ausgeprägte und elektrophoretisch als Indiz der Frostung nachweisbare Desaggregation membrangebundener Isozyme verursachen kann. Ursache der hohen Esterase-Aktivität beim NB-Ansatz von Leber und beim IA-Ansatz vom Brustmuskel, die vor dem Pasteurisieren jeweils gefrostet wurden, ist sicherlich nicht eine vermehrte Elution von membrangebundener oder im Gelgefüge okkludierter Esterase. Hiergegen spricht die bei allen Probenarten sehr effiziente Proteindissoziation durch den deshalb so hochmolar angesetzten Citrat-Phosphat-Puffer. Die auch beim IA-Ansatz von nicht gefroster roher Flügelmuskulatur außergewöhnlich hohe Esterase-Aktivität dürfte vielmehr durch eine besonders hohe und während der Inkubation besonders lange beständige Dispersität der in Wasser nur sehr begrenzt löslichen Substrate bedingt sein. Die Verteilung von NB und mehr noch von IA im Testansatz während der Inkubation hängt allerdings nicht nur von der Intensität ab, mit der das in alkoholischer Lösung zugegebene Substrat mit dem Vortex im Ansatz verteilt wird, sondern ganz besonders auch vom Gehalt des jeweiligen Probenextraktes an gelösten und dispergierten Stoffen, die den anfänglichen Verteilungsgrad des Substrates mehr oder weniger effizient stabilisieren. Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse hängt in dieser Sicht also auch von einer standardisierten Gewinnung der Probenextrakte ab.

Aus dem Dargestellten folgt:

Durch ein Frosten kann sich die Esterase-Aktivität bei Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber der Pute sowohl beim rohen, als auch beim pasteurisierten Probengut signifikant verringern. Um bei der Festlegung von Esterase-Restaktivitäten als Indikatoren für ausreichende Pasteurisation sicher zu gehen, werden die in vorliegender Arbeit bei den verschiedenen Produktkategorien empfohlenen Grenzwerte von vorab gefrostenem Probengut abgeleitet.

Die Ansätze mit Naphthylbutyrat und schon gleich mit Indoxylacetat sollten auf Grund der geringen Löslichkeit und der starken Tendenz dieser Substrate in wässrigem Milieu zu assoziieren nicht nur unmittelbar nach der Substratzugabe, sondern auch während der Inkubation im Turnus von etwa 20 min geschüttelt werden. Das Schütteln sollte kräftiger erfolgen als es in den meisten Schüttelwasserbädern geschehen kann. Von großem Vorteil wäre es auch,

NB und zumal IA den Ansätzen in einer dafür ausreichenden Menge von Glycerin zuzusetzen, dass nicht nur eine effiziente Löslichkeitsvermittlung, sondern auch eine adäquate Stabilisierung der Substratverteilung gewährleistet ist. Möglicherweise ließe sich auf diese Weise auf ein Schütteln der Ansätze während der Inkubation verzichten.

Den Produktionsbetrieben sind durch § 4 LMHV Betriebliche Maßnahmen und Kontrollen vorgeschrieben, die sich insbesondere auch auf die Hitzekonditionierung der Produkte erstrecken. Ob die betrieblich vorgegebenen Regimes der Hitzebehandlung erfüllt werden, wird prozessbegleitend mittels des Temperaturschreibers kontrolliert. Dem Prinzip von HACCP entsprechend muss jedoch immer wieder auch retrospektiv geprüft werden, ob die den kritischen Kontrollpunkt Hitzegaren betreffenden betrieblichen Vorgaben verlässlich erfüllt werden. Sollen diese Kontrollen nicht mikrobiologisch, sondern zur Einsparung von Zeit und Kosten vorzugsweise mittels eines enzymatischen Erhitzungsnachweises erfolgen, stellt sich aus betrieblicher Sicht die Frage, ob und inwieweit sich die unmittelbar nach der Hitzekonditionierung der Produkte bestehende Restaktivität im Verlaufe der Kühlung für die Kommissionierung oder für den Endverkauf verändern kann. Um diesbezüglich zu gesicherten Aussagen zu gelangen, wird an Brustmuskel, Leber und Fettgewebe geprüft, ob und wie sehr sich die Restaktivität im 2-h-Intervall der ersten 22 h nach der Pasteurisation verändert. Darüber hinaus wird an jeweils 5 pasteurisierten Sammelproben von Brustmuskel, Flügelmuskulatur, Oberkeule, Unterkeule, Karkassenfleisch, Fettgewebe und Leber geprüft, ob sich die Restaktivität auch noch im Verlaufe einer 2 bis 4 Wochen langen Kühlung gravierender verändern kann.

Die Recherchen führen zu folgenden Feststellungen.

Eine geringe Reaktivierung von Esterase zeichnet sich in den ersten 22 h nach Pasteurisation lediglich bei den NB-Ansätzen von Brustmuskel ab. Im Verlaufe einer Kühlung von 2 bzw. 4 Wochen hingegen nimmt die Esterase-Restaktivität bei 18 bzw. 17 von insgesamt 21 Versuchschargen zu, und zwar bei 14 bzw. 13 Chargen signifikant. Ein besonders ausgeprägter Anstieg der Restaktivität manifestiert sich bei den NA- und NB-Ansätzen der Leber. Dass Enzyme nach einer nicht irreversiblen Hitzedenaturation reaktiviert werden können, wird von SCHWIMMER (1981) an den Beispielen von alkalischer Phosphatase, Phenolase, Peroxidase und Katalase aufgezeigt. Die Möglichkeit einer gewissen Reaktivierung des Leitenzym wird als Ursache einer scheinbar erhöhten Carboxylesterase-Restaktivität bei den NA- und IA-Ansätzen von pasteurisierten, 4 bis 12 Wochen kühl gelagerten und sensorisch auch nach 12 Wochen als einwandfrei befundenen Modellbräten auch von PFEIFFER und Mitarb. (1970) in Betracht gezogen. BREHMER und FORSCHNER (1974) prüfen im Tüpfelplatten-Test Leberwurst am Kriterium der Carbesterase-Restaktivität auf vorschriftsmäßige

Erhitzung und im Verlaufe einer 12- bis 14-tägigen Kühllagerung auf Reaktivierung. Eine Reaktivierung wird unter den Bedingungen des Tüpfelplatten-Tests nicht manifest. Vollkonserven von Gulasch, Corned beef, Blutwurst, Leberpastete und Leberwurst erweisen sich nach HOTTENROTH (1974) mit IA auch nach längerer Lagerung als Carboxylesterase-Hydrolase-inaktiv. SIELAFF (1983) gelangt zur Feststellung, dass Carbesterase des Fleisches reaktivierbar ist.

Aus dem Dargestellten folgt:

Nach Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist davon auszugehen, dass hitzedenaturierte Esterase schon im Verlaufe weniger Tage reaktiviert werden kann.

Während bei Verwendung von NA und IA als Substrat unter der Voraussetzung einer adäquaten Grenzwertfestlegung auch schon die im unmittelbaren Anschluss an die Pasteurisation ermittelte Restaktivität als ein verlässliches Indiz für eine hinreichende Inaktivierung der vegetativen Mikroflora angesehen werden kann, ist dies bei Verwendung von NB als Substrat nur im Falle positiver d.h. den Grenzwert überschreitender Resultate der Fall.

Inwieweit eine mittels des Esterase-Test bestimmte Restaktivität durch mikrobielle Carbesterase bedingt sein kann, wird am autoklavierten, rückbeimpften und daraufhin unterschiedlich inkubierten Probengut von je 3 Leberwürsten, Brühwürsten und Kochschinken untersucht.

Die Ergebnisse führen zur Feststellung, dass je nach Probengut, Inkubationstemperatur und Inkubationsdauer auch sehr hohe Esterase-Aktivitäten und je nach kontaminierender Bakterienpopulation unterschiedliche Substratspezifitäten resultieren können. Auffällig sind insbesondere die hohen Aktivitäten bei den NB-Ansätzen, obwohl vor dem Autoklavieren lediglich 2 der 9 Probenhomogenisate mit NB eine positive Reaktion ergeben. Von elementarer Bedeutung ist die Erkenntnis, dass mikrobielle Esterase unter den Bedingungen des Carbesterase-Tests erst von Keimzahlen von etwa  $10^8$  KBE/g an und so auch immer nur bei Probengut nachweisbar ist, das schon sensorisch unstrittig als verdorben wahrgenommen wird. Wie sich in der Versuchsreihe des weiteren zeigt, kann bei extrem verdorbenem Probengut, wie es nach einer Inkubation von 37°C/3 d oder 20°C/10 oder 8°C/14 d vorliegt, mikrobielle Esterase in einer Menge enthalten sein, die die primäre Restaktivität der Handelsprodukte bis um das 114-fache übersteigt.

Aus dem Dargestellten folgt:

Esterase mikrobieller Herkunft ist hinsichtlich der Aussagekraft des Esterase-Tests bei sensorisch unauffälligem Probengut ohne jede Bedeutung. Ein ins Gewicht fallender Beitrag von

mikrobieller Esterase zur Esterase-Gesamtaktivität ist nur bei sensorisch extrem verdorbenem Probengut möglich.

Hinsichtlich des Einflusses von Kochsalz resp. Nitritpökelsalz und Phosphat auf die mittels des Esterase-Tests bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch nach Pasteurisation bestimmbare Restaktivität zeigt sich nach Zusatz von 1,5, 2,5 und 3,5% Nitritpökelsalz (NPS) sowie 0,3 und 0,5% Tetranatriumdiphosphat zu den Homogenisaten Brustmuskel, Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Leber und Fettgewebe folgendes:

Während sich das Phosphat bezüglich der Hitzedenaturation bei den genannten Probengutarten als inert erweist, führt NPS mit steigender Zugabemenge außer bei den IA-Ansätzen von Unterkeule bei allen Versuchschargen zu einer zunehmenden Beschleunigung der Enzym-Inaktivierung. Die durch den Zusatz von 3,5% NPS bedingte mittlere Abnahme der Esterase-Aktivität beträgt bei den NA-Ansätzen  $E_{617} = 0,021$ , bei den NB-Ansätzen – ausgenommen Leber -  $E_{617} = 0,020$  und bei den IA-Ansätzen  $E_{617} = 0,017$ . Da die Hitzeinaktivierung von NB-affiner Esterase der Putenleber durch NPS in einem besonders hohen Maße verstärkt wird, könnten sich stärker differierende NPS-Gehalte bei zusammengesetzten Erzeugnissen aus Putenfleisch auf die mit NB resultierenden Ergebnisse umso stärker auswirken, je höher deren Lebergehalt ist. Für diese Erwartung könnte auch die Feststellung sprechen, dass Diät-Leberwurst des Handels, die ohne NPS gefertigt ist, mit NB signifikant höhere Esterase-Restaktivitäten aufweist als die mit NPS gefertigten Produkte des allgemeinen Verzehrs. Von GLATZL (1970) wird berichtet, dass auch bei den IA-Ansätzen von gepökeltem und auf 75°C erhitztem M. supra spinam vom Schwein eine um bis zu  $E_{617} = 0,013$  geringere Restaktivitäten besteht als bei den nicht gepökelten Vergleichsproben. SINGRÜN (1970) teilt demgegenüber mit, dass mit 0, 1,5, 2,5 und 3,5% NPS gepökelt und wie von GLATZL (1970) auf 80°C erhitzter M. supra spinam vom Schwein mit NA bei der 1,5% NPS-Charge eine um  $E_{617} = 0,017$  höhere, bei der 3,5% NPS-Charge hingegen um mit  $E_{617} = 0,036$  niedrigere Carbesterase-Restaktivität aufweist als die Kontrolle ohne NPS. Während mit zunehmendem Kochsalzgehalt nach STALDER und Mitarb. (1991) sowie WANG und Mitarb. (1993) auch die Hitzeinaktivierung von Laktatdehydrogenase der Muskulatur vom Rind und Schwein zunehmend beschleunigt wird, wird die Hitzeinaktivierung der sauren Phosphatase der Muskulatur vom Schwein nach KÖRMENDY und GANTNER (1960) verzögert und durch Zusatz von Phosphat um 32% erhöht.

Aus dem Dargestellten folgt:

Ein Phosphatzusatz von bis zu 0,5% hat offenbar keinen Einfluss auf die Hitzestabilität der Carboxylester-Hydrolasen von Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute. Ein Zu-

satz von bis zu 3,5% NPS kann die Hitzeinaktivierung von NB-affiner Esterase vor allem bei Leber so sehr verstärken, dass als Indikator für eine ausreichende Pasteurisation bei den kochsalzfrei gefertigten Diätprodukten mit höherem Lebergehalt zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse höhere Grenzwerte anzusetzen sind wie beispielsweise bei Leberwurst des allgemeinen Verzehrs, die mit ca. 2% Kochsalz oder NPS gefertigt ist.

Um gewissermaßen am jeweiligen Erschwernisfall zu prüfen, in welchem Maße sich die Rezeptur einer Brüh- oder Leberwurst auf das Ergebnis des Esterase-Tests auswirkt, wird Probengut von jeweils nur zwei verschiedenen Probenarten im Verhältnis 1:1 vermischt. Durch Bestimmung der Esterase-Restaktivität wird kontrolliert, wie treffend sich die analytisch bestimmten Restaktivitäten der Gemische rechnerisch aus den analytisch ermittelten Restaktivitäten der beiden Mischungskomponenten prognostizieren lassen. Basis dieser Studie sind die Probenhomogenisate von Brustmuskel, Flügel, Oberkeule, Unterkeule, Karkassenfleisch, Leber und Fettgewebe der Pute.

Wie die Ergebnisse der Versuchsreihe zeigen, besteht zwischen den Analysenergebnissen und den rechnerischen Ergebnissen die Diskrepanz, dass die analytisch bestimmten Restaktivitäten der Mischungen im Durchschnitt durchwegs unter den rechnerisch ermittelten Vergleichswerten liegen, und zwar um  $E_{NA} = 0,035$ ,  $E_{NB} = 0,024$  und  $E_{IA} = 0,013$ . So wenig wahrscheinlich es angesichts der originären Esterase-Aktivitäten der einzelnen Mischungskomponenten zu sein scheint, dass die Einheitlichkeit dieses Unterschiedes zufällig bedingt ist, so wenig lässt sich ein subjektiv oder objektiv bedingter systematischer Fehler als Ursache dieses für die Aussagekraft des Esterase-Tests ohnehin eher belanglosen Ergebnisses finden.

Differenziertere Angaben über den Einfluss von Rezeptur auf die nach Hitzebehandlung der Produkte bestehende Esterase-Restaktivität sind im Schrifttum nicht referiert. PFEIFFER und Mitarb. (1970) teilen lediglich mit, dass sich der auffallend streuende Gehalt der Rezepturkomponenten von Jagd-, Bier-, Gelb- und Fleischwurst an Azetyl- sowie Butyryl-esterase weder auf die betreffenden Gehalte des jeweiligen rohen, noch des bei  $F_{80^{\circ}\text{C}} \sim 10$  min pasteurisierten Bräts stärker auswirkt. Zu dieser Feststellung gelangen bei der Untersuchung von Kochwurst und Brühwurst mittels des an den Esterase-Test angelehnten Tüpfelplatten-Tests auch BREHMER und FORSCHNER (1974). Von SIEBENLIST (1992) wird mitgeteilt, dass rohe Leber zwar einen außerordentlich hohen Gehalt an Esterase aufweist und dass sich deshalb schon sehr geringe Unterschiede im Lebergehalt auf die Esterase-Aktivität des „rohem“ Leberwurstgutes sehr markant auswirken; dass dies auf die Restaktivität des pasteurisierten Probengutes und für die Aussagekraft des Esterase-Tests jedoch deshalb ohne fundamentalen Einfluss ist, weil es sich auch bei der Leberesterase um weitestgehend hitze-

labile Isozyme handelt. Diese Feststellung bestätigt sich auch bei den Modelleberwürsten der eigenen Bereitstellung, bei denen sich Leberanteile von 30, 40 und 50% auf die Restaktivität der hitzebehandelten Produkte faktisch nicht auswirken.

### **3 Unter welchen Voraussetzungen und wie verlässlich eignet sich die mittels des Esterase-Tests bestimmte Restaktivität des Leitenzyms bei Erzeugnissen aus Putenfleisch als Indikator einer wirksamen Pasteurisation?**

Die Pasteurisation von Fleisch und Fleischerzeugnissen erfolgt im allgemeinen in einer Dampfatmosfera von maximal 100°C in Kochschränken. Der Prozessablauf der Hitzekonditionierung umfasst die Abschnitte Erwärmungsphase sive Steigzeit, Temperaturhaltephase und Abkühlphase sive Fallzeit. Nicht selten wird „auf Kerntemperatur“ erhitzt, d.h. unmittelbar nach dem Erreichen der vorgegebenen Kerntemperatur mit dem Kühlen begonnen.

Erzeugnisse aus Putenfleisch sind maßgeblich der Vorschrift der USDA-FSIS (1996) ausreichend pasteurisiert, wenn sie auf eine Kerntemperatur von zumindest 71,1°C gebracht werden. Da die gewerbliche Praxis ein sehr prinzipielles Kautel für gesundheitliche Sicherheit und Haltbarkeit bei Fleischerzeugnissen darin sieht, diese bei Wahrung auch eines hohen Maßes von Gewissheit so vorhaltend wie möglich zu erhitzen, werden schon gleich Erzeugnisse aus Geflügelfleisch generell etwas intensiver erhitzt, als dies unter der Voraussetzung einer dem guten Herstellungsbrauch entsprechenden Produktionshygiene erforderlich wäre. Für diesen Grundsatz spricht neben dem generellen Zoonosenrisiko zum einen die Tatsache, dass mikrobiell im Bereich der tolerierbaren Hygienenorm hoch belastete Rohstoffe auch in sehr gut geführten Betrieben zur Verarbeitung gelangen können, und zum anderen die Erfahrung, dass die vom Verbraucher erworbenen Produkte im Privathaushalt hygienisch nicht immer pfleglich behandelt werden. Bei der Hitzekonditionierung der Erzeugnisse geht es den Herstellern deshalb nicht nur darum, die vegetative Flora umfassend zu inaktivieren, sondern auch die als Sporen vorliegenden Keime möglichst nachhaltig zu schädigen.

Für die Gewährleistung einer wirksamen Pasteurisation werden Fleisch und Fleischerzeugnisse nach REICHERT und Mitarb. (1979; 1988) einem Erhitzungsregime von je nach hygienischer Belastung der Rohprodukte  $F_{70}^{10} = 30$  bis 80 entsprechend gegart. Um den Zusammenhang zwischen Esterase-Restaktivität und Restgehalt an vegetativen Bakterien insbesondere an Proben mit einer nach Ergebnis des Esterase-Tests allenfalls sehr schwachen Esterase-Restaktivität zu prüfen, wird Probengut von Brustmuskel, Fettgewebe und Leber bei  $F_{80} = 5$  hitzebehandelt und anschließend auf Esterase-Restaktivität und Restkeimgehalt

untersucht. Das Wärmeäquivalent von  $F_{80} = 5$  entspricht nach REICHERT und Mitarb. (1979) demjenigen von beispielsweise  $F_{70} \sim 50$

Leber von Pute weist nach 5 min langem Einwirken von  $80^{\circ}\text{C}$  eine mittlere Esterase-Restaktivität auf, die bei einer Extinktion von  $E_{\text{NA}} = 0,281$ ,  $E_{\text{NB}} = 0,562$  und  $E_{\text{IA}} = 0,081$  bei jedem der 3 Substrate weit über den Vergleichswerten von Skelettmuskulatur und Fettgewebe liegt, deren mittlere Restaktivitäten  $E_{\text{NA}} = 0,011$  bis  $0,177$ ,  $E_{\text{NB}} = 0,008$  bis  $0,050$  und  $E_{\text{IA}} = 0,001$  bis  $0,066$  betragen. Die bei  $F_{80} = 5$  resp. 30 erhitzter Skelettmuskulatur und Leber mit IA ermittelte Restaktivität liegt über der von GLATZL (1970) bei M. supra spinam vom Schwein nach 20 min langem Temperaturanstieg auf  $80^{\circ}\text{C}$  im Kern und daraufhin sofortiger Kühlung auf  $16^{\circ}\text{C}$  mit IA nachgewiesenen Restaktivität. Die von SINGRÜN (1970) mit NA bei M. supra spinam von 20 Schweinen nach 3 min langem Einwirken von  $80^{\circ}\text{C}$  ermittelte Restaktivität von durchschnittlich  $E_{\text{NA}} = 0,086$  liegt niedriger als die Restaktivität bei der Flugmuskulatur und höher als die Restaktivität bei der Laufmuskulatur der Pute. SIEBENLIST (1992) ermittelt bei 5 Proben Muskelfleisch vom Schwein, die jeweils von einem anderen Tier stammen, topographisch heterogener zusammengesetzt sind und jeweils bei  $F_{80} = 5$  erhitzt werden, Esterase-Restaktivitäten von  $E_{\text{NA}} = 0,063$  bis  $0,604$ , von  $E_{\text{NB}} = 0,095$  bis  $0,659$  und von  $E_{\text{IA}} = 0,014$  bis  $0,124$ . Im Parallelversuch mit Rindfleisch resultieren die Extinktionen  $E_{\text{NA}} = 0,026$  bis  $0,104$ ,  $E_{\text{NB}} = 0,029$  bis  $0,070$  und  $E_{\text{IA}} = 0,026$  bis  $0,030$ .

Aus dem Dargelegten folgt:

Die bei Leber der Pute nach Pasteurisieren bei  $F_{80} = 5$  mit NA, IA und NB resultierende Esterase-Restaktivität liegt weit über derjenigen bei den Vergleichsansätzen von Skelettmuskulatur und Fettgewebe. Da in Abhängigkeit vom Myoglobingehalt und selbst von der intramuskulären Provenienz des Probengutes auch Skelettmuskulatur von der Pute nach einer mikrobiell zwar effizienten, dabei jedoch möglichst Produkt schonend ausgelegten Pasteurisation in beachtlichem Maße differierende Esterase-Restaktivitäten aufweisen kann, soll an pasteurisierten Erzeugnissen des Handels nachgewiesen werden, wie sehr die bei den verschiedenen Produktkategorien bestehenden Restaktivitäten streuen, wie Restaktivität und Restkeimgehalt korreliert sind und welche Restaktivitäten als verlässliche Indikatoren einer ausreichende Pasteurisation zu objektivieren sind.

Die bei je 30 Handelprodukten aus Putenfleisch mit **NA** nachgewiesene mittlere Esterase-Restaktivität (Variationsbreite) beträgt bei Kochpökelerde  $E_{617} = 0,091$  ( $\text{VB} = 0,010 - 0,353$ ), bei Brühwurst  $E_{617} = 0,056$  ( $\text{VB} = 0,000 - 0,233$ ), bei Leberwurst  $E_{617} = 0,043$  ( $\text{VB} = 0,004 - 0,664$ ) und bei den Hackfleischerzeugnissen  $E_{617} = 0,065$  ( $\text{VB} = 0,036 - 0,182$ ). Dass die Esterase-Restaktivität bei den „Kochschinken“-Produkten am höchsten liegt, steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Modellversuche, in denen homogenisierter und bei  $F_{72,5} = 30$  erhitzter Putenbrustmuskel vergleichbar hohe Werte aufweist. Desgleichen

stimmen die relativ niedrigeren Esterase-Restaktivitäten bei Brühwurst, Leberwurst und den Hackfleischprodukten mit den in den Modellversuchen bei den verschiedenen Probenarten nach Hitzebehandlung des Probengutes bei  $F_{80} = 5$  resultierenden Restaktivitäten überein. Dass die Brüh- und Leberwürste geringgradig niedrigere Werte aufweisen als die Hackfleischerzeugnisse, dürfte vor allem darauf zurückzuführen sein, dass die Würste für die Gewährleistung einer etwas längeren Mindesthaltbarkeit meist etwas intensiver erhitzt werden als Buletten.

Mit **NB** als Substrat resultieren bei den Kochpökelfwaren von Pute mittlere Esterase-Restaktivitäten von  $E_{617} = 0,000$ , bei Brühwurst von  $E_{617} = 0,033$  ( $VB = 0,000 - 0,356$ ), bei Leberwurst von  $E_{617} = 0,008$  ( $VB = 0,000 - 0,590$ ) und bei den Hackfleischerzeugnissen von  $E_{617} = 0,029$  ( $VB = 0,000 - 0,270$ ). Die mit  $E_{617} = 0,425$  sehr hohe mittlere Restaktivität der Bio-Leberwürste dürfte zum einen – bis zu einem gewissen Grad – auf der NPS-freien Herstellung dieser Produkte beruhen, zum anderen vor allem aber auf den bei dieser Produktkategorie meist höheren Gehalt an Leber und auf der schonenderen Erhitzung.

Die mit **IA** nachgewiesenen mittleren Restaktivitäten liegen bei den Kochpökelfwaren bei durchschnittlich  $E_{617} = 0,098$  ( $VB = 0,060 - 0,839$ ), bei den Brühwürsten bei  $E_{617} = 0,068$  ( $VB = 0,000 - 0,162$ ), bei den Leberwürsten bei  $E_{617} = 0,049$  ( $VB = 0,006 - 0,623$ ) und bei den Hackfleischerzeugnissen bei  $E_{617} = 0,098$  ( $VB = 0,070 - 0,163$ ). Hervorgehoben sei hier lediglich die Feststellung, dass die durchschnittliche Restaktivität der Kochpökelfwaren auch bei Verwendung von IA als Substrat gut mit den bei Brustmuskel nach Einwirken von  $72,5^{\circ}\text{C}/30$  min resultierenden Wert übereinstimmt, und dass die in den Modellstudien bei den verschiedenen Probenarten ermittelten Restaktivitäten in Relation zu den mit IA resultierenden mittleren Restaktivitäten der Handelsprodukte deshalb niedriger liegen, weil sie auf gefrorenem, durch Homogenisieren malträtierem und nicht zuletzt mit besonderem Bedacht auf eine vorsorglich eher etwas vorhaltende Erfüllung des Erhitzungsregimes hitzebehandeltem Probenmaterial beruhen.

GLATZEL (1970) weist mit IA bei handelsüblichem Kochschinken vom Schwein Restaktivitäten nach, die mit durchschnittlich  $E_{617} = 0,039$  ( $VB = 0,000 - 0,200$ ) relativ weit unter dem bei den Kochpökelfwaren von der Pute bestehenden Durchschnittswert liegt. Dieser Unterschied ist sicherlich nicht so sehr auf den geringeren Gehalt von Schweinefleisch an hitzestabilerer Esterase zurückzuführen, als viel mehr auf die Tatsache, dass heute Fleischerzeugnisse aufgrund des elementaren hygienischen Fortschritts der vergangenen Jahrzehnte trotz Gewährleistung der vom Handel geforderten Mindesthaltbarkeiten von bis zu 3 Wochen bei  $4^{\circ}\text{C}$  generell schonender erhitzt werden können als in früherer Zeit. SIEBENLIST (1992) notiert bei 57 aus Fleisch von Schwein und Rind bestehenden Leberwürsten des Handels eine mittlere Restaktivität von  $E_{NA} = 0,170$  ( $VB = 0,000 - 1,042$ ),  $E_{NB} = 0,246$  ( $VB = 0,000 - 0,855$ ) und

$E_{IA} = 0,160$  ( $VB = 0,000 - 1,653$ ). Nicht nur die mittlere Restaktivität, sondern auch deren Variationsbreite ist so bei jedem der verwendeten Substrate größer als bei den aus Putenfleisch gefertigten Leberwürsten. Besonders hingewiesen sei auch auf die vergleichsweise hohen NB-Werte, die bei den unter Modellbedingungen pasteurisierten Rezepturbestandteilen Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe von Rind und Schwein bestehen. Sie zeigen, dass Esterase von Rind und Schwein zu NB eine erheblich höhere Affinität aufweist als Esterase von Pute.

Erzeugnisse aus Fleisch von Rind und Schwein mit Ausnahme von Leberwurst sind nach PFEIFFER, WELLHÄUSER und GEHRA (1970) sowie nach PFEIFFER (2002) dem Effekt einer Hitzebehandlung bei  $F_{80} = 10$  entsprechend als ausreichend pasteurisiert zu beurteilen, wenn die Esterase-Restaktivität des Produktes  $E_{NA/NB} \leq 0,090$  und  $E_{IA} \leq 0,030$  beträgt. Bei Leberwurst von Schwein und Rind kann nach SIEBENLIST (1992) von einer ausreichenden Pasteurisation bei einer Restaktivität von  $E_{NB} \leq 0,390$  ausgegangen werden. PFEIFFER (2002) teilt mit, dass unter Hunderten von Fleischerzeugnissen der Kategorie Braten, Kochpökelware, Hackbraten, Boulette, Brühwurst - und in allerdings weit weniger repräsentativer Zahl auch Leberwurst - mit jeweils verlässlich bekannter Rezeptur und Hitzebehandlung nicht ein einziges Produkt vorgefunden wird, das sich bei einer Restaktivität von  $E_{NA} \leq 0,090$  oder  $E_{IA} \leq 0,030$  bezüglich der Inaktivierung der vegetativen Mikroflora als fragwürdig erwiesen hätte; des gleichen nicht – wenn Leberwurst wegen zu geringer Probenzahl von dieser Feststellung ausgenommen wird – bei zumindest 60% derjenigen Proben, deren Restaktivität um gut ein Drittel über dem Grenzwert von  $E_{NA} = 0,090$  bzw.  $E_{IA} = 0,030$  liegt.

Nach Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen sind die von PFEIFFER und Mitarb. (1970), PFEIFFER (2002) sowie von SIEBENLIST (1992) für die genannten Produkte aus Rind- und Schweinefleisch vorgeschlagenen Grenzwerte bei den in vorliegender Arbeit geprüften Produktkategorien aus Putenfleisch nur zum Teil geeignet. Sollen auf der Basis der eigenen Studien für die geprüften Erzeugnisse aus Putenfleisch Grenzwerte benannt werden, die bei den methodischen Bedingungen des Esterase-Tests und unter der Voraussetzung einer den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse mit Maßen entsprechenden Rezeptur als Indikator einer ausreichenden Pasteurisation aufs erste schon als brauchbar erscheinen, so sind dies nachweislich der mikrobiologischen Kontrollen der betreffenden Handelsprodukte die nachstehend genannten Restaktivitäten.

Kochschinken:  $E_{NA} \leq 0,170$   
 $E_{NB} = 0,000$   
 $E_{IA} \leq 0,130$

Leberwurst:  $E_{NA} = 0,100$   
 $E_{NB} \leq 0,050$   
 $E_{IA} \leq 0,100$

Brühwurst:  $E_{NA} = 0,100$   
 $E_{NB} \leq 0,050$   
 $E_{IA} \leq 0,100$

Hackfleischprodukte:  $E_{NA} = 0,100$   
 $E_{NB} \leq 0,050$   
 $E_{IA} \leq 0,140$

Dass bei diesen Grenzwerten vor allem keine fälschlich negativen Testresultate zu befürchten sind, ergibt sich auch daraus, dass nach dem Erhitzen des Probengutes bei  $F_{72,5} = 2,5$  in sozusagen dünnster Schicht, bei der die Kerntemperatur gewissermaßen ohne Aufwärmphase wirksam wird, beim Brustmuskel eine mittlere Restaktivität von  $E_{NA} = 0,278$ ,  $E_{NB} = 0,303$  und  $E_{IA} = 0,142$  ergeben, beim Fettgewebe von  $E_{NA} = 0,238$ ,  $E_{NB} = 0,721$  und  $E_{IA} = 0,212$  und bei Leber von  $E_{NA} = 4,340$ ,  $E_{NB} = 113,252$  und  $E_{IA} = 4,626$  ermittelt wird.

Was die Häufigkeit betrifft, in der mit den verschiedenen Substraten bei den zur Untersuchung gelangten Stichproben der verschiedenen Handelsprodukte positive, d.h. für eine potentiell unzureichende Pasteurisation sprechende Testresultate nachgewiesen werden, ist auf folgendes hinzuweisen:

Mit NB resultieren positive Testresultate bei jeder der geprüften Produktkategorie seltener als mit NA, und zudem auch immer nur dann, wenn sich auch mit NA ein positives Ergebnis ergibt. Bei den Hackfleischerzeugnissen wären bei starrer Anordnung des Grenzwertes  $E_{NB} \leq 0,050$  Probe 26 mit  $E_{NB} = 0,066$  und Probe 12 mit  $E_{NB} = 0,057$  zwar als unzureichend erhitzt zu beurteilen, obwohl sie sich maßgeblich einer Restaktivität von  $E_{NA} = 0,044$  bzw.  $E_{NA} = 0,085$  als negativ erweisen. Wird hierbei jedoch respektiert, dass der Überschreitung des vorhaltend festgesetzten NB-Grenzwertes  $E_{NB} \leq 0,050$  um nur  $E_{NB} = 0,016$  bzw.  $E_{NB} = 0,002$  faktisch keine Bedeutung zukommt, erscheint das Mitführen von Ansätzen mit NB als Substrat bei der Prüfung der Erzeugnisse aus Putenfleisch auf ausreichende Pasteurisation als verzichtbar. Diese Folgerung kann im Rahmen des betrieblichen Qualitätsmanagements und auch der staatlichen Lebensmittelüberwachung jedenfalls solange gelten, solange es jeweils nur um den Nachweis geht, dass eine Kerntemperatur von zumindest  $72,5^{\circ}\text{C}$  erreicht wurde.

Das für NB gesagte gilt analog auch für IA; denn im Gegensatz zu Brühwurst wird auch bei den Kochpökelwaren, Hackfleischerzeugnissen und bei Leberwurst mit IA seltener als mit NA und auch mit IA immer nur dann ein positives Test-Resultat erzielt, wenn das Probengut auch mit NA als potentiell unzureichend erhitzt erkannt wird. Dieser Auffassung steht auch

nicht entgegen, dass unter den Kochpökelwaren bei den Proben 22 und 29 eine Grenzwertüberschreitung zwar bei den Ansätzen mit IA, nicht jedoch mit NA nachgewiesen wird; denn die Grenzwertüberschreitungen bei den IA-Ansätzen sind mit jeweils  $E = 0,003$  ohne Bedeutung. Bei den Brühwurstergebnissen sind es die Proben 5, 8, 11 und 12, die mit NA für ausreichend, mit IA jedoch für potentiell unzureichend erhitzt befunden werden. Da in Relation zur konservativen Festsetzung des Grenzwertes  $E_{IA} \leq 0,100$  dessen Überschreitung um maximal  $E = 0,017$  jedoch ebenfalls unwesentlich ist, kann auf die Mitführung von IA-Ansätzen generaliter auch bei Brühwurst verzichtet werden.

Aus dem Dargelegten folgt:

Pasteurisierte Erzeugnisse aus Pute lassen sich mit dem Esterase-Test als ausreichend erhitzt beurteilen, wenn mit NA als Substrat bei den Kochpökelprodukten eine Extinktion von  $E_{617} \leq 0,170$  und bei den Hackfleischerzeugnissen sowie bei Brüh- und Leberwurst eine Extinktion von  $E_{617} \leq 0,100$  resultiert. Bei allem im Rahmen dieser Arbeit durch das Studium des Schrifttums erworbenen Wissen und bei aller durch eigenes Experimentieren und durch die vielen Diskurse über die jeweils erzielten Ergebnisse gewonnenen Erfahrungen bestehen auch keine Zweifel, dass sich mit dem Esterase-Test bei einem Erzeugnis aus Putenfleisch gewiss nicht weniger verlässlich als mit dem Phosphatase-Test beispielsweise nachweisen lässt, ob die durch die USDA-FSIS – Vorschrift (1996) geforderte Kerntemperatur  $71,1^{\circ}\text{C}$  bei dem betreffenden Produkt wirksam wurde oder nicht.

## E Zusammenfassung

Wie Lebensmittel überhaupt, werden auch Erzeugnisse aus Fleisch aus dreifachem Grunde erhitzt: Für die Gewährleistung von Genussfähigkeit, Genusswert und Haltbarkeit. Da jedes zu intensive Erhitzen den Genusswert des Produktes mindert und vielleicht auch den Gewichtsverlust erhöht, wird das Maß der Hitzebehandlung meist auf den Effekt einer Pasteurisation begrenzt. Ob die hierbei einwirkende Temperatur auch in mikrobiologischer Sicht als statistisch ausreichend beurteilt werden kann, lässt sich dem Schrifttum zufolge bei den Erzeugnissen aus Fleisch von Rind und Schwein am Kriterium der Esterase-Restaktivität gesichert nachweisen.

Durch vorliegende Arbeit soll mit den Substraten Naphthylacetat (NA), Naphthylbutyrat (NB) und Indoxylacetat (IA) nachgewiesen werden, ob und wie verlässlich sich der Esterase-Test auch bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch eignet.

Hierbei stellen sich vor allem die Fragen,

- ob sich bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch eine Modifikation der Methodik des referierten Bestimmungsverfahrens empfiehlt oder gebietet;
- wie sich die Vorbehandlung der Rezepturkomponenten, die Rezeptur, das Regime der Hitzebehandlung und ein potentiell höherer Gehalt der Produkte an Esterase mikrobiellen Ursprungs auf die Esterase-Restaktivität der Erzeugnisse auswirken;
- wie weit die Esterase-Restaktivität der Putenfleisch-Produkte des Handels streut;
- welche Esterase-Restaktivität bei den geprüften Erzeugnissen als verlässliches Indiz einer ausreichenden Pasteurisation empfohlen werden kann.

Die Ergebnisse der Untersuchungen führen zur Feststellung, dass die für die Erzeugnisse aus Rind- und Schweinefleisch konzipierte Test-Methodik bei den Erzeugnissen aus Putenfleisch ohne jede Abänderung anwendbar ist. Wie sich zeigt, resultiert im Falle von NA und IA weder aus einer Verringerung, noch aus einer Erhöhung der Substratkonzentration ein Vorteil. Bei NB hat eine Konzentrationserhöhung eine deutliche Verringerung der Hydrolyse-rate zur Folge. Eine Verkürzung des Bestimmungsverfahrens ist auf Grund der Instabilität der Substrate weder durch eine dem Reaktionsoptimum der ausschlaggebenden Esterase-Isozyme entsprechende Erhöhung des pH, noch der Temperatur des Reaktionsmilieus möglich.

Die Gehalte von Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe der Pute an Esterase unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich deren Ausgangsaktivität, sondern auch bezüglich der Anzahl,

Ausprägung und Hitzeresistenz der isoelektrisch in Polyacrylamid-Gel fokussierten Isozymbanden.

Ein Frosten und Gefrierlagern kann sowohl beim rohen als auch beim 5 min bei 80°C erhitzten Probengut eine geringgradige, statistisch jedoch signifikante Verringerung der Esterase-Restaktivität zur Folge haben. Dies trifft bei etwa 30 bis 40 % der Versuchschargen zu. Bei pasteurisiertem Probengut kann schon ein wenige Tage langes Kühllagern bei 4°C bei etwa 60 % der Versuchschargen zu einem zwar relativ geringen, statistisch jedoch signifikanten Anstieg der Esterase-Restaktivität führen.

Mit dem Esterase-Test lassen sich im Temperaturbereich von 65 bis 70°C unter den Modellbedingungen der Versuchsanordnung Intervalle von 0,5°C mit jedem der drei Substrate unterscheiden. Esterase-Restaktivitäten, die bei Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber von Pute nach Pasteurisieren bei  $F_{72,5} = 5$  bestehen, sind unter den methodischen Bedingungen des Tests mit NA und IA sehr gut nachweisbar, mit NB auch die beim Hitzeeffekt von  $F_{75} = 5$  persistierenden Aktivitäten.

Ein Erzeugnis aus Putenfleisch lässt sich dann als statistisch ausreichend pasteurisiert beurteilen, wenn bei Kochpökelfleisch die Grenzwerte  $E_{NA} = 0,170$ ,  $E_{NB} = 0,000$ ,  $E_{IA} = 0,130$ , bei den Hackfleischerzeugnissen  $E_{NA} = 0,100$ ,  $E_{NB} = 0,050$ ,  $E_{IA} = 0,140$ , bei Brühwurst und Leberwurst  $E_{NA} = 0,100$ ,  $E_{NB} = 0,050$ ,  $E_{IA} = 0,100$  nicht überschritten sind.

Dass die Grenzwerte bei den Hackfleischprodukten und Wurst mit Ausnahme der Grenzwerte mit NB und bei den Hackfleischprodukten mit IA etwas niedriger liegen als bei den Kochpökelfleisch, dürfte auf die Forderung des Handels zurückzuführen sein, dass die Hitzekonditionierung insbesondere von Brüh- und Leberwurst auf relativ lange Mindesthaltbarkeiten von 18 Tagen bis zu 3 Wochen ausgelegt ist.

Bei nicht sinnfälligem Keimstatus bestehende Gehalte an mikrobieller Esterase sind bezüglich der Aussagekraft des Esterase-Tests ohne Bedeutung. Eine mit entsprechend hohem Keimwachstum verbundene Überlagerung von rohem oder hitzegegartem Probengut kann ein positives Testresultat nur bei sehr sinnfällig verdorbenen Produkten bedingen.

Die Validierung der Grenzwerte auch bezüglich ihrer Praktikabilität ergibt, dass bei ihrer Anwendung

- mit NA 3 bis 13 %, mit NB 3 bis 10 % und mit IA 3 bis 20 % der 120 Handelsprodukte einer randomisierten Stichprobe von Kochpökelfleisch, Hackfleischprodukten sowie Brüh- und Leberwurst als statistisch nicht ausreichend pasteurisiert zu beurteilen sind;

- mit IA und NB bei sehr wenigen Ausnahmen nur dann ein positives Test-Ergebnis resultiert, wenn dies auch mit NA der Fall ist;
- etwa 90 % der NA-positiven Handelsprodukte auch mit IA und NB positiv reagieren;
- bei etwa 10 % der untersuchten Handelsprodukte mit NB und/oder IA positive, mit NA hingegen negative Test-Ergebnisse resultieren;
- ein routinemäßiges Mitführen von Ansätzen mit NB und IA insofern keinen weiteren Informationszugewinn bedeutet, als die Grenzwertüberschreitung bei den Ansätzen mit NB und IA durch die sehr vorhaltende Grenzwertfestsetzung aufgefangen sind.

Als Fazit der Arbeit ist festzustellen, dass sich der Esterase-Test für den raschen retrospektiven Nachweis der ausreichenden Pasteurisation bei Erzeugnissen aus Putenfleisch hervorragend eignet. Er wird für die Gefahrenkontrolle, Gefahrenidentifizierung und Gefahrenbewertung gemäß den Vorschriften über "Betriebseigene Maßnahmen und Kontrollen" des § 4 LMHV nicht nur den Beauftragten für die betriebliche Qualitätssicherung, sondern auch den Verantwortlichen der amtlichen Lebensmittelüberwachung als ein sehr probates Screeningverfahren empfohlen.

**F Literaturverzeichnis**

- AAS, P.; STERRI, S.H.; HJERMSTAD, H.P.; FONNUM, F.:** A method for generating toxic vapors of soman: Toxicity of soman by inhalation in rat. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 80 (1985), 437–755
- ABOUZIED, M.M.; WANG, C.H.; PESTKA, J.J.; SMITH, D.M.:** Lactate dehydrogenase as safe endpoint cooking indicator in poultry breast rolls: development of monoclonal antibodies and application to sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In: *J. Food Prot.* 56 (1993), 120–124
- ALDRIDGE, W.N.; REINER, E.:** Enzyme inhibitors as substrates: interaction of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids. Amsterdam: North-Holland (1972). Nach: GAUSTAD, R.; SLETTEN, K.; LOVHAUG, D.; FONNUM, F.: Purification and characterization of carboxylesterases from rat lung. In: *Biochem. J.* 274 (1991), 693–697
- ALDRIDGE, W.N.:** 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. In: *Biochem.* 53 (1953a), 110–117
- ALDRIDGE, W.N.:** An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. In: *Biochem.* 53 (1953b), 117–124
- ALDRIDGE, W.N.:** The esterases: perspectives and problems. In: *Chem. Biol. Interact.* 87 (1993), 5–13
- ALEXSON, S.E.; FINLAY, T.H.; HELLMAN, U.; SVENSSON, L.T.; DICZFALUSY, U.; EGGERTSEN, G.:** Molecular cloning and identification of a rat serum carboxylesterase expressed in the liver. In: *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 17118–17124
- ANG, C.Y.W.; LYON, B.G.:** Evaluations of warmed-over flavor during chill storage of cooked broiler breast, thigh and skin by chemical, instrumental and sensory methods. In: *J. Food Sci.* 55 (1990), 644–648
- ANG, C.Y.W.; HUANG, Y.W.:** Internal temperature and packaging system affect stability of cooked chicken leg patties during refrigerated storage. In: *J. Food Sci.* 58 (1993), 265–269
- ANG, C.Y.W.; LIU, F.; TOWNSEND, W.E.; FUNG, D.Y.C.:** Sensitive catalase test for end-point temperature of heated chicken meat. In: *J. Food Sci.* 59 (1994), 494–497
- ANG, C.Y.W.; LIU, F.:** Influence of heating end-point temperature on volatiles from poultry meat – a review. In: *J. Muscle Foods* 7 (1996a), 291–302
- ANG, C.Y.W.; LIU, F.:** Static headspace capillary GC method for determining changes of volatiles from heated chicken breast meat. In: *J. Muscle Foods* 7 (1996b), 131–138

- ANG, C.Y.W.; LIU, F.; HUANG, Y.W.:** Catalytic activity as an indicator of end-point temperatures in breaded, heat processed chicken patties. In: *J. Muscle Foods* 7 (1996), 345–354
- ARNDT, R.; HEYMANN, E.; JUNGE, W.; KRISCH, K.:** Purification and molecular properties of an unspecific carboxylesterase (E1) from rat-liver microsomes. In: *Eur. J. Biochem.* 36 (1973), 120–128
- AUGUSTEYN, R.C.; JERSEY de, J.; WEBB, E.C.; ZERNER, B.:** On the homology of the active-site peptides of liver carboxylesterases. In: *Biochim. Biophys. Acta* 171 (1969), 128–137
- AXENFORS, B.; ANDERSSON, I.; AUGUSTINSSON, K-B.:** Isolation and characterization of a butyryl-esterase from human erythrocytes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 570 (1979), 74–87
- BEAUFAY, H.; AMAR-COSTESECC, A.; THINES-SEMPOUX, D.; WIBO, M.; RABBI, M.; BERTHET, J.:** In: *J. Cell Biol.* 61 (1974), 213 – 231. Nach: HARANO, T.; MIYATA, T.; LEE, S.; AOYAGI, H.; OMURA, T.: Biosynthesis and localization of rat liver microsomal carboxylesterase E1. In: *J. Biochem.* 103 (1988), 149-155
- BERGMEYER, H.U.:** Bestimmung der Aktivität von Enzymen. In: *Methoden der enzymatischen Analyse.* BERGMEYER, H.U. (Hrsg.); Weinheim: Verlag Chemie (1974), 129–140
- BERNDT, M.C.; BOWLES, M.R.; KING, G.J.; ZERNER, B.:** Inhibition of chicken liver carboxylesterase by activated carbonyls and carbonyl hydrates. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1268 (1996), 159–166
- BIANCHI, R.; PARO, M.; GHIDOTTI, G.; MUSSINI, E.:** Changes in muscle esterases in genetically dystrophic and control littermate mice. In: *Muscle and Nerve* 5 (1982), 485–489
- BÖCKING, A.; DEIMLING van, O.:** In: *Histochemistry* 75 (1982), 377–385. Nach: OEHM, H-C.; LOOZE de, S.; RONAI, A.; DEIMLING von, O.: Purification and characterization of esterase 6A, a trimeric esterase of the house mouse (*mus musculus*). In: *Eur. J. Biochem.* 129 (1982), 157–163
- BOGIN, E.; ISRAELI, B.A.; KLINGER, I.:** Evaluation of heat treatment of turkey breast meat by biochemical methods. In: *J Food Prot.* 55 (1992), 787–791
- BOSKOVIC, B.:** The influence of 2-O-cresyl-4H-1:3:2 benzadioxaphosphorine-2-oxide (CBDP) on organophosphate poisoning and its therapy. In: *Arch. Toxicol.* 42 (1979), 207–216
- BÖHMER, L.; HILDEBRANDT, G.:** Mikrobiologie der Kochpökelfleischwaren. In: *Mikrobiologie der Lebensmittel – Fleisch und Fleischerzeugnisse.* WEBER, H. (Hrsg.); Hamburg: Behr's (1996), 249–281
- BRANDT, E.; HEYMANN, E.; MENTLEIN, R.:** Selective inhibition of rat liver carboxylesterases by various organo-phosphorus diesters in vivo and in vitro. In: *Biochem. Pharmac.* 29 (1980), 1927–1931

- BRAUN, P.:** Sicherheit durch hohe Hygienestandards. In: Fleischwirtschaft (2001), 17–18
- BREHMER, H.; FORSCHNER, E.:** Ein modifizierter Carbesterase-Erhitzungsnachweis als Screening-Test bei Leber- und Brühwürsten. In: Fleischwirtschaft 54 (1974), 84–85
- CALDIRONI, H.A.; BAZAN, N.G.:** Quantitative determination of low-salt soluble protein patterns of bovine muscles cooked at different temperatures, by sodium dedecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: J. Food Sci. 45 (1980), 901–904
- CHANG, S.H.; HUANG, Y.W.; GATES, K.W.:** Thermostable proteins of hot-processed rainbow trout as affected by cooking temperature, time and salt level. In: [www.confex.com](http://www.confex.com). Center for food safety and quality enhancement, Dept. of Food Science and Technology, University of Georgia, Athens, GA, 30602, USA. (2001)
- CHEN, H.; MARKS, B.P.:** Evaluating previous thermal treatment of chicken patties by visible/near-infrared spectroscopy. In: J. Food Sci. 62 (1997), 753–756
- CLEMENT, J.G.:** Role of aliesterase in organophosphate poisoning. In: Fundam. Appl. Toxicol. 4 (1984), 96–105
- COATES, P.M.; MESTRINER, M.A.; HOPKINSON, D.A.:** A preliminary genetic interpretation of the esterase isozymes of human tissues. In: Annals of human genetics 39 (1975), 1–20
- COATES, P.M.; EDWARDS, Y.H.; HOPKINSON, D.A.:** Purification and properties of an esterase B4 from human liver. In: Eur. J. Biochem. 61 (1976), 331–335
- COHEN, E.H.:** Protein changes related to ham processing temperatures. 1. Effect of time-temperature on amount and composition of soluble proteins. In: J. Food Sci. 31 (1966), 746–750
- COLLINS, S.S.; KEETON, J.T.; SMITH, S.B.:** Lactate dehydrogenase activity in bovine muscle as a potential heating endpoint indicator. In: J. Agric. Food Chem. 39 (1991a), 1291–1293
- COLLINS, S.S.; KEETON, J.T.; SMITH, S.B.:** Lactate dehydrogenase enzyme activity in raw, cured, and heated porcine muscle. In: J. Agric. Food Chem. 39 (1991b), 1294–1297
- CORETTI, K.:** Eine Schnellmethode zum Nachweis der ausreichenden Erhitzung in Dosen-schinken. In: Fleischwirtschaft 9 (1957), 113–115
- CRESPO, F.L.; OCKERMAN, H.W.:** Effect of heat on sarcoplasmic proteins of light and dark avian muscle tissue. In: J. Food Prot. 40 (1977a), 174–177
- CRESPO, F.L.; OCKERMAN, H.W.:** Effect of heating avian muscle tissue on solubility of nitrogen fractions and pH values of breast and leg muscle. In: J. Food prot. 40 (1977b), 178–180
- DAVIS, C.E.; ANDERSON, J.B.:** Effect of heat on biuret-positive water-extractable porcine muscle proteins. In: J. Food Prot. 46 (1983), 947–949

- DAVIS, C.E.; ANDERSON, J.B.:** Size exclusion/HPLC of heated water soluble bovine and porcine muscle proteins. In: *J. Food Sci.* 49 (1984), 598–602
- DAVIS, C.E.; BRACEWELL, A.J.; ANDERSON, J.B.; REAGAN, J.O.:** Time temperature heating effect on biuret-positive water-extractable porcine and bovine muscle proteins. In: *J. Food Prot.* 48 (1985), 215–220
- DAVIS, C.E.; CYRUS, S.:** Evaluation of a rapid method for measurement of catalase activity in cooked beef and sausage. In: *J. Food Prot.* 61 (1998), 253–256
- DAVIS, C.E.; FRANKS, D.L.:** Effect of end-point temperature and storage time on color and denaturation of myoglobin in broiler thigh meat. In: *Poultry Sci.* 74 (1995), 1699–1702
- DAVIS, C.E.; LYON, B.G.; REAGA, J.O.; TOWNSEND, W.E.:** Effect of heating on water soluble biuret-positive compounds of canned cured pork picnic shoulder. In: *J. Food Prot.* 50 (1987), 681–684
- DAVIS, C.E.; SEARCY, G.K.; BLANKENSHIP, L.C.; TOWNSEND, W.E.:** Pyruvate kinase activity as an indicator of temperature attained during cooking of cured pork. In: *J. Food Prot.* 51 (1988), 773–777
- DAVIS, C.E.; TOWNSEND, W.E.:** Rapid fluorometric analysis of acid Phosphatase activity in cooked poultry meat. In: *J. Food Prot.* 57 (1994), 1094–1097
- DEIMLING von, O.; WIENKER, T.F.:** Chromosome 8 controlled esterases of the house mouse. In: *Advances in electrophoresis – Volume 5.* CHRAMBACH, A.; DUNN, M.J.; RADOLA, B.J. (Hrsg.); Weinheim: VCH (1992), 288–345
- DREXLER, H.G.; GAEDICKE, G.; MINOWADA, J.:** Isozyme studies in human leukemia-lymphoma cell lines – 1. carboxylic esterase. In: *Leukemia Research* 9 (1985), 209–229
- DUDMAN, N.P.B.; ZERNER, B.:** In: *Methods Enzymol.* 35B (1975a), 190–208. Nach: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[BRENDA-id:3.1.1.1\\_Pig\\*\]](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[BRENDA-id:3.1.1.1_Pig*])
- DUDMAN, N.P.B.; ZERNER, B.:** In: *Methods Enzymol.* 35B (1975b), 190–208. Nach: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[BRENDA-id:3.1.1.1\\_Bovine\\*\]](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[BRENDA-id:3.1.1.1_Bovine*])
- EINARSSON, J.M.; SIGMUNDSSON, K.; FILIPPUSON, H.:** Purification and some properties of a carboxylesterase from ovine liver. In: *Comp. Biochem. Physiol.* 114 (1996), 41–48
- ELLEKJAER, M.R.:** Assessment of maximum cooking temperatures of previously heat treated beef. Part 2: Differential scanning calorimetry. In: *J. Sci. Food Agric.* 60 (1992), 225–261
- ELLEKJAER, M.R.; ISAKSSON, T.:** Assessment of maximum cooking temperatures in previously heat treated beef. Part 1: Near infrared spectroscopy. In: *J. Sci. Food Agric.* 59 (1992), 335–343
- ENZYME NOMENCLATURE:** Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology (1992)

- EYE, J.G.:** A rapid procedure for the detection of under-processing of roast beef. Annual Meeting of the Food Research Institute, Univ. of Wisconsin, Madison, May 25 (1982)
- EYERMANN, K.:** Über den Nachweis ausreichender Erhitzung gemäßregelter Fleisches. Vet. Med. Diss., München (1955)
- FARB, D.; JENCKS, W.P.:** Different forms of pig liver esterase. In: Archs. Biochem. Biophys. 203 (1980), 214–226
- FISCHER, A.:** Produktbezogene Technologie – Herstellung von Fleischerzeugnissen. In: Fleisch – Technologie und Hygiene der Gewinnung und Verarbeitung. PRÄNDL, O.; FISCHER, A.; SCHMIDHOFER, T.; SINELL, H.-J. (Hrsg.); Stuttgart: Ulmer (1988), 488–594
- FOGG, N.E.; HARRISON, D.L.:** Relationships of electrophoretic patterns and selected characteristics of bovine skeletal muscle and internal temperature. In: J. Food Sci. 40 (1975), 28–34
- FONNUM, F.; STERRI, S.H.:** Factors modifying the toxicity of organophosphorous compounds including soman and sarin. In: Fundam. Appl. Toxicol. 1 (1981), 143–147
- FONNUM, F.; AAS, P.; STERRI, S.H.; HELLE, K.B.:** Modulation of the cholinergic activity of bronchial muscle during inhalation of soman. In: Fundam. Appl. Toxicol. 4 (1984), 52–57
- FONNUM, F.; STERRI, S.H.; AAS, P.; JOHNSEN, H.:** Carboxylesterases, importance for detoxification of organophosphorus anticholinesterases and trichothecenes. In: Fundam. Appl. Toxicol. 5 (1985), 29–38
- FRANCK, S.:** Dumme Pute. In: ÖKO-Test (2001), 10-13
- FRIES, R.:** Mikrobiologie erhitzter Erzeugnisse. In: Mikrobiologie der Lebensmittel – Fleisch und Fleischerzeugnisse. WEBER, H. (Hrsg.); Hamburg: Behr's (1996), 371–392
- GANTNER, G.; KÖRMENDY, L.:** Verfahren zur Bestimmung der ausreichenden Erhitzung von Fleischerzeugnissen mit dem Phosphatase-Test. In: Fleischwirtschaft 48 (1968), 188–192
- GAUSTAD, R.; SLETTEN, K.; LOVHAUG, D.; FONNUM, F.:** Purification and characterization of carboxylesterases from rat lung. In: Biochem. J. 274 (1991), 693–697
- GLÄSSER, K.:** Fleischbeschauliche Beurteilungen der Not- und Krankschlachtungen. In: D. T. W. 53 (1946a), 4. Nach: Eyermann, K.: Über den Nachweis ausreichender Erhitzung gemäßregelter Fleisches. Vet. Med. Diss., München (1955)
- GLÄSSER, K.:** „Ergänzungen zu meinem Artikel Fleischbeschauliche Beurteilung der Not- und Krankschlachtungen in Nr. 1 und 2 des 53. Jahrg. der D. T. W.“ In: D. T. W. 54 (1946b), 113. Nach: Eyermann, K.: Über den Nachweis ausreichender Erhitzung gemäßregelter Fleisches. Vet. Med. Diss., München (1955)
- GLÄSSER, K.:** Zu den Fleischvergiftungen durch Salmonellen mit einer Bemerkung von W. Schoene zu meinen Arbeiten auf diesem Gebiet in Nr. 2 dieser Monatshefte. In: F. f. Vet. 6

- (1951), 380. Nach: Eyer mann, K.: Über den Nachweis ausreichender Erhitzung gemäßregel-ten Fleisches. Vet. Med. Diss., München (1955)
- GLATZEL, P.:** Ein einfacher Test zum Nachweis von Indoxylacetat spaltender Esterase im Fleisch – Orientierende Überprüfung seiner Brauchbarkeit als Erhitzungsnachweis bei Kochschinken. Vet. Med. Diss., München (1970)
- GÖPPINGER, A.; RIEBSCHLÄGER, M.; RONAI, A.; DEIMLING van, O.:** Purification and characterization of esterase 9A of mouse kidney. In: Biochim. Biophys. Acta 525 (1978), 74–86
- GOULLET, B.; PICARD, B.; LAGET, P.F.:** Purification and properties of carboxylesterase B of escherichia coli. In: Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 135A (1984), 375–387
- GRATZL, M.; NASTAINCZYK, W.; SCHWAB, D.:** In: Cytobiologie 11 (1975), 123–132. Nach: HARANO, T.; MIYATA, T.; LEE, S.; AOYAGI, H.; OMURA, T.: Biosynthesis and Localization of rat liver microsomal carboxy-esterase E1. In: J. Biochem. 103 (1988), 149-155
- HAGUE, M.A.; WARREN, K.E.; HUNT, M.C.; KROPF, D.H.; KASTNER, C.L.; STRODA, S.L.; JOHNSON, D.E.:** Endpoint temperature, internal cooked color, and expressible juice color relationships in ground beef patties. In: J. Food Sci. 59 (1994), 465–470
- HAMM, R.; KÖRMENDY, L.; GANTNER, G.:** Transaminases of skeletal muscle. 1. The activity of transaminase in post-mortem bovine and porcine muscles. In: J. Food Sci. 34 (1969), 446
- HARANO, T.; MIYATA, T.; LEE, S.; AOYAGI, H.; OMURA, T.:** Biosynthesis and Localization of rat liver microsomal carboxy-esterase E1. In: J. Biochem. 103 (1988), 149-155
- HARRISON, E.H.; GAD, M.Z.:** Hydrolysis of retinyl palmitate by enzymes of rat pancreas and liver: differentiation of bile salt-dependent and bile salt-independent, neutral retinyl ester hydrolase. In: J. Biol. Chem. 264 (1989), 17142–17147
- HEYMANN, E.:** In: Enzymatic basis of detoxication. JAKOBY, W.B. (Hersg.); New York/London: Academic Press (1980), 291–323. Nach: MENTLEIN, R.; SCHUMANN, M.; HEYMANN, E.: Comparative chemical and immunological characterization of five lipolytic enzymes (carboxylesterases) from rat liver microsomes. In: Archs. Biochem. Biophys. 234 (1984a), 612–621
- HEYMANN, E.:** Hydrolysis of carboxylic esters and amides. In: Metabolic Basis of Detoxication. JAKOBY, W.B.; BEND, J.R.; CALDWELL, J. (Hrsg.); New York: Academic Press (1982), 229–245
- HOJRING, N.; SVENSMARK, O.:** Molecular and catalytic properties of a butyrylesterase from human red cells and brain. In: Archs. Biochem. Biophys. 260 (1988), 351–358
- HOTTENROTH, B.:** Über die Hitzeinaktivierung der Lipase und anderer Carboxylester-Hydrolasen in fettreichen Vollkonserven. In: Fleischwirtschaft 54 (1974), 1071–1077

- HOUBEN, J.H.:** Thermoresistentie van Streptococcus faecium in pasteurisiertem Ham. Dissertation, Utrecht (1980)
- HOUBEN, J.H.:** Hitzeresistenz von Streptococcus faecium in pasteurisiertem Schinken. In: Fleischwirtschaft 62 (1982), 511–514
- HSU, Y.C.; PESTKA, J.J.; SMITH, D.M.:** ELISA to quantify triose phosphate isomerase to potentially determine processing adequacy in ground beef. In: J. Food Sci. 64 (1999), 623–628
- HSU, Y.C.; SAIR, A.I.; BOOREN, A.M.; SMITH, D.M.:** Triose phosphate isomerase as an endogenous time-temperature integrator to verify adequacy of roast beef processing. In: J. Food Sci. 65 (2000), 236–240
- IKEDA, Y.; OKAMURA, K.; ARIMA, T.; FUJII, S.:** Purification and characterization of two types of esterase from rat liver microsomes. In: Biochim. Biophys. Acta 487 (1977), 189–203
- INCZE, K.; KÖRMENDY, L.; KÖRMENDY, I.; ZSARNOCZAY, G.:** Considerations of critical microorganisms and indicator enzymes in connection with the pasteurization of meat products. In: Meat Science 51 (1999), 115–121
- INKERMANN, P.A.; SCOTT, K.; RUNNEGAR, M.T.C.; HAMILTON, S.E.; BENNET, E.A.; ZERNER, B.:** Carboxylesterases (EC 3.1.1). Purification and titration of chicken, sheep, and horse liver carboxylesterases. In: Can. J. Biochem. 58 (1975a), 536–548
- INKERMANN, P.A.; WINZOR, D.J.; ZERNER, B.:** Carboxylesterases (EC 3.1.1). The molecular size of chicken and pig liver carboxylesterases. In: Can. J. Biochem. 53 (1975b), 547–560
- ISAKSSON, T.; ELLEKJAER, M.H.R.; HILDRUM, K.I.:** Determination of the previous maximum temperature of heat treated minced meat by near infrared reflectance spectroscopy. In: J. Sci. Food Agric. 49 (1989), 385–387
- IWABUCHI, S.; SHIBASAKI, K.:** Immunochemical studies of the effect of ionic strength on thermal denaturation of soybean 11S globulin. In: Agric. Biol. Chem. 45 (1981), 285–293
- JOHNSTON, R.W.:** Personal communication. USDA-FSQS, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD (1980). Nach: TOWNSEND, W.E.; BLANKENSHIP, L.C.: Methods for detecting processing temperatures of previously cooked meat and poultry products – a review. In: J. Food. Prot. 52 (1989), 128–135
- JUNGE, W.; HEYMANN, E.:** Characterization of the isozymes of pig-liver esterase. In: Eur. J. Biochem. 95 (1979), 519–525
- JUNGE, W.; HEYMANN, E.; KRISCH, K.; HOLLANDT, H.:** Human liver carboxylesterase – Purification and molecular properties. In: Archs. Biochem. Biophys. 165 (1974), 749–763
- KAR, N.C.; PEARSON, C.M.:** Acetyl-DL-phenylalanine  $\beta$ -naphthyl esterase activity in human muscle disease. In: Biochemical Medicine 20 (1978), 63–69

- KAR, N.C.; PEARSON, C.M.:** Activity of some proteolytic enzymes in normal and dystrophic human muscle. In: Clin. Biochem. 12 (1979), 37–39
- KEOUGH, D.T.; JERSEY de, J.; ZERNER, B.:** The relationship between the Carboxylesterase and monoacylglycerol lipase activities of chicken liver microsomes. In: Biochim. Biophys. Acta 829 (1985); 164–172
- KETTERMANN, A.J.; BOWLES, M.R.; POND, S.M.:** Purification and characterization of two human liver carboxylesterases. In: Int. J. Biochem. 21 (1989), 1303–1312
- KING, N.K.; WINFIELD, M.E.:** The mechanism of metmyoglobin oxidation. In: J. Biol. Chem. 238 (1963), 1520–1528
- KING, N.L.R.:** Isoelectric variants of actin in raw and cooked meat. In: Meat science (1978), 313-321
- KIRKEBY, S.; MOE, D.:** Esterase in normal and dystrophic muscle. In: Cell. Mol. Biol. 33 (1987), 11–19
- KIRKEBY, S.; MOE, D.; VILMANN, H.:** Esterase profile of human masseter muscle. In: J. Anat. 157 (1988), 79–87
- KIRKEBY, S.; MOE, D.; VILMANN, H.:** Non-specific esterases and esterproteases in masticatory muscles from the muscular dystrophic mouse. In: Neurochem. Res. 14 (1989), 7–11
- KIRKEBY, S.; MOE, D.; ZELANDER, T.:** Carboxylic ester hydrolases in mitochondria from rat skeletal muscle. In: Histochemical Journal 22 (1990), 95–101
- KLEINGEIST, B.; BÖCKER, R.; GEISLINGER, G.; BRUGGER, R.:** Isolation and pharmacological characterization of microsomal human liver flumazenil Carboxylesterase. In: J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 1 (1998), 38–46
- KOEPPE, A.H.; BARRON, K.D.; BERNSOHN, J.:** In: BBA 183 (1969), 253. Nach: KRISCH, K.: Carboxylic Ester Hydrolases. In: The enzyme – Volume 5. BOYER, D.P. (Hrsg.); New York: Academic Press (1971), 43–69
- KÖRMENDY, L.; GANTNER, G.:** Über die saure Phosphatase des Fleisches. In: Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung 113 (1960), 13–22
- KÖRMENDY, L.; GANTNER, G.:** Neuere Angaben über die saure Phosphomonoesterase des Fleisches. In: Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung 134 (1967), 141–149
- KÖRMENDY, L.; REKASI, E.; FETTER, I.:** Determination of the extent of heat treatment in canned hams by use of the phosphatase test. In: Meat Science 19 (1987), 77–79
- KÖRMENDY, L.; ZSARNOCZAY, G.; CATTANEO, P.; CANTONI, C.; CONSIGLIERI, C.; CASAGRANDE, G.; SAVIO, G.; WENZEL, S.; KÜHNE, M.; BALINT, G.; PACTHECO, E.; GAUGEZ, J.; GIMESI, A.; HERMAN, A.; FEKETE, Z.; JUHASZ, S.; SZENTGYÖRGYI, M.; MAJOR-FÖLDI, K.; SZABO, A.S.; SIMON, A.; FARKAS, J.:** Modified acid Phosphatase

assay for assessing the extent of heating of canned picnics and hams: interlaboratory study. In: *J. AOAC International* 78 (1995), 1205–1210

**KÖRMENDY, L.; ZSARNO CZAY, G.; MIHALYI, V.:** A new, modified acid Phosphatase assay for determining the extent of heat treatment in canned hams. In: *Food Chem.* 44 (1992), 367-375

**KRISCH, K.:** Carboxylic Ester Hydrolases. In: *The enzyme – Volume 5.* BOYER, D.P. (Hrsg.); New York: Academic Press (1971), 43–69

**KRISHNASAMY, S.; TENG, A.L.; DHAND, R.; SCHULTZ, R.M.; GROSS, N.J.:** Molecular cloning, characterization, and differential expression pattern of mouse lung surfactant convertase. In: *American journal of physiology* 275 (1998), 969–975

**LAAKKONEN, E.; SHERBON, J.W.; WELLINGTON, G.H.:** Low-temperature, long-time heating of bovine muscle. 2. Changes in electrophoretic patterns. In: *J. Food Sci.* 35 (1970), 178–180

**LEE, Y.B.; RICKANSRUD, D.A.; HAGBERG, E.C.; BRISKEY, E.Y.:** Application of SDS-acrylamide gel electrophoresis for determination of the maximum temperature to which bovine muscles have been cooked. In: *J. Food Sci.* 39 (1974), 428–429

**LEITES, F.L.:** Changes in nonspecific esterase activity in experimental disturbance of fat metabolism. In: *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya* 7 (1963), T12–T14

**LEVIEUX, D.; LEVIEUX, A.; VENIEN, A.:** Immunochemical quantification of heat denaturation of bovine meat soluble proteins. In: *J. Food Sci.* 60 (1995), 678–684

**LEVY, E.; EYAL, Z.; HOCHMANN, A.:** Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *septoriz tritici*. In: *Archs. Biochem. Biophys.* 269 (1992), 321–327

**LEXOW, U.; RONAI, A.; DEIMLING van, O.:** In: *Eur. J. Biochem.* 107 (1980), 123–130. Nach: OTTO, F.; RONAI, A.; DEIMLING von, O.: Purification and Characterization of esterase 1F, the albumin esterase of the house mouse. In: *Eur. J. Biochem.* 116 (1981), 285–291

**LIND, J.:** The determination of the acid phosphatase activity in canned meat. In: *Alimenta* (1968), 155

**LITH van, H.A.; BIEMAN den, M.; ZUTPHEN van, B.F.M.:** Purification and molecular properties of rabbit liver esterase ES-1A. In: *Eur. J. Biochem.* 184 (1989), 545–551

**LITH van, H.A.; HALLER, M.; HOOF van, I.J.M.; WOUW van der, M.J.A.:** Characterization of rat plasma esterase ES-1A concerning its molecular and catalytic properties. In: *Archs. Biochem. Biophys.* 301 (1993), 265–274

**LIU, F.; ANG, C.Y.W.; HUANG, Y-W.; TOLEDO, R.T.:** Fat and water composition affects residual catalatic activity in chicken breast heated to specific end-point temperatures. In: *J. Food Sci.* 62 (1997), 66–68

- LIU, F.; ANG, C.Y.W.; TOLEDO, R.T.; HUANG, Y.W.:** Total process lethality as related to residual catalase activity in cooked chicken breast. In: *J. Food Sci.* 61 (1996), 213–216
- LIU, M.N.; BERRY, B.W.:** Variability in color, cooking times, and internal temperature of beef patties under controlled cooking conditions. In: *J. Food Prot.* 59 (1996), 969–975
- LOEY van, A.; HENDRICKX, M.; CORDT de, S.; HAENTJENS, T.; TOBBACK, P.:** Quantitative evaluation of thermal processes using time-temperature integrators. In: *Trends in Food Science & Technology* 7 (1996), 16–26
- LUPPA, H.; ANDRÄ, J.:** The histochemistry of carboxylester hydrolases: problems and possibilities. In: *Histochemical Journal* 15 (1983), 111–137
- MacRAE, H.F.; RANDALL, C.J.:** Hydrolytic enzymes in bovine skeletal muscle – 1. starch gel electrophoretic separation and properties of soluble esterases. In: *Can. J. Biochem.* 43 (1965), 1776–1786
- MAGNUS, C.A.; McCURDY, A.R.; INGLEDEW, W.M.:** Further Studies on the thermal resistance of streptococcus faecalis in pasteurised ham. In: *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 21 (1988), 209–212
- MARIN, M.L.; CASAS, C.; CAMBERO, M.I.; SANZ, B.:** Study of the effect of heat (treatments) on meat protein denaturation as determined by ELISA. In: *Food Chem.* 43 (1992), 147–150
- MATHIES, P.:** Entwicklung eines quantitativen und qualitativen Esterase-Nachweises mit Indoxylacetat, ausgearbeitet an Milch, mit einem Anhang für Fleisch. *Vet. Med. Diss., München* (1966)
- McCORMICK, R.J.; KROPF, K.H.; REECK, G.R.; HUNT, M.C.; KASTNER, C.L.:** Effect of heating temperature and muscle type on porcine muscle extracts as determined by reverse phase high performance liquid chromatography. In: *J Food Sci.* 52 (1987), 1481–1485
- MENTLEIN, R.; HEILAND, S.; HEYMANN, E.:** Simultaneous purification and comparative characterization of six serine hydrolases from rat liver microsomes. In: *Archs. Biochem. Biophys.* 200 (1980), 547–559
- MENTLEIN, R.; REUTER, G.; HEYMANN, E.:** Specificity of two different purified acylcarnitine hydrolases from rat liver, their identity with other carboxylesterases, and their possible function. In: *Archs. Biochem. Biophys.* 240 (1985), 801–810
- MENTLEIN, R.; SCHUMANN, M.; HEYMANN, E.:** Comparative chemical and immunological characterization of five lipolytic enzymes (carboxylesterases) from rat liver microsomes. In: *Archs. Biochem. Biophys.* 234 (1984a), 612–621
- MÜLLER, W-D.:** Erhitzen und Räuchern von Kochwurst und Kochpökelware. In: *Fleischwirtschaft* 69 (1989), 308–319

- MURAKAWA, S.; NAKAMURA, T.; KOMAGATA, D.; SUNAGAWA, E.; ENDO, A.:** Purification and properties of Carboxylesterase from *emerella unguis* that catalyses the conversion of ML-236B (Compactin) to ML-236A. In: *Agic. Biol. Chem.* 51 (1987), 1879–1884
- NAPOLI, J.L.; BECK, C.D.:**  $\alpha$ -tocopherol and phylloquinone as non-competitive inhibitors of retinyl ester hydrolysis. In: *Biochem. J.* 223 (1984), 267–270
- NAPOLI, J.L.; McCORMICK, A.M.; O'MEARA, B.; DRATZ, E.A.:** Vitamin A metabolism:  $\alpha$ -tocopherol modulates tissue retinol levels in vivo, and retinyl palmitate hydrolysis in vitro. In: *Archs. Biochem. Biophys.* 230 (1984), 19–202
- N.N.:** In: [www.gefluegel-info.de](http://www.gefluegel-info.de) (2002)
- NUSIMOVICH, A.D.; CELMI, R.A.; PAGLIARO, A.F.:** Colour determination of beef juices as an indicator of beef cooking temperatures. In: *Meat Science* (1979), 233–244
- OEHM, H-C.; LOOZE de, S.; RONAI, A.; DEIMLING von, O.:** Purification and characterization of esterase 6A, a trimeric esterase of the house mouse (*mus musculus*). In: *Eur. J. Biochem.* 129 (1982), 157–163
- ORTA-RAMIREZ, A.; PRICE, J.F.; HSU, Y-C.; VEERAMUTHU, G.J.; CHERRY-MERRITT, J.S.; SMITH, D.M.:** Thermal inactivation of *escherichia coli* O157:H7, *Salmonella senftenberg*, and enzymes with potential as time-temperature indicators in ground beef. In: *J. Food Prot.* 60 (1997), 471–475
- ORTA-RAMIREZ, A.; WANG, C.H.; ABOUZIED M.M.; VEERAMUTHU, G.J.; PRICE, J.F. PESTKA, J.J.; SMITH, D.M.:** Lactate dehydrogenase monoclonal antibody sandwich ELISA to determine cooking temperature of ground beef. In: *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996), 4048–4051
- OSTERTAG von, R.:** *Handbuch der Fleischbeschau*. Stuttgart: Enke (1923), 56–1043. Nach: Eyermann, K.: Über den Nachweis ausreichender Erhitzung gemäßregelten Fleisches. *Vet. Med. Diss.*, München (1955)
- OTT, T.M.; EL-BISI, H.M.; ESSELEN, W.B.:** Thermal destruction of *Streptococcus faecalis* in prepared frozen foods. In: *J. Food Sci.* 26 (1961), 1–10
- OTTO, F.; RONAI, A.; DEIMLING von, O.:** Purification and Characterization of esterase 1F, the albumin esterase of the house mouse. In: *Eur. J. Biochem.* 116 (1981), 285–291
- PARSONS, S.E.; PATTERSON, R.L.S.:** Assessment of the previous heat treatment given to meat products in the temperature range 40° - 90°C. Part 2: Differential scanning calorimetry, a preliminary study. In: *J. Food Technol.* 21 (1986), 123–131
- PARSONS, S.E.; PATTERSON, R.L.S.:** Assessment of the previous heat treatment given to meat products in the temperature range 40° - 90°C. Part 1: Soluble nitrogen analysis. In: *J. Food Tech.* 21 (1986), 117–122
- PFEIFFER, G.:** Persönliche Mitteilung. (2002)

- PFEIFFER, G.; KOTTER, L.; BÖHM, D.; GLATZEL, P.:** Zum Nachweis der vorausgegangenen Hitzeeinwirkung auf Fleisch und Fleischerzeugnisse mittels eines neuentwickelten Carbesterasetests. In: *Fleischwirtschaft* 49 (1969), 209–211
- PFEIFFER, G.; WELLHÄUSER, R.; GEHRA, H.:** Weitere Erfahrungen mit dem Carbesterase-Erhitzunsnachweis bei brühwurstartigen Fleischprodukten. In: *Archiv für Lebensmittelhygiene* 21 (1970), 250–252
- QIN-WEI, Y.; XUE, S.:** Histo-electrophoretic analysis of the microheterogeneity and region-specificity of isozymes. In: *Applied and theoretical electrophoresis* 2/3 (1991), 79–86
- QUINN, J.R.; RAYMOND, D.P.; HARWALKAR, V.R.:** Differential scanning calorimetry of meat proteins as affected by processing treatment. In: *J. Food Sci.* 45 (1980), 1146–1149
- RAFTELL, M.; BERZINS, K.; BLOMBERG, F.:** In: *Arch. Biochem.* 181 (1977), 534–541. Nach: HARANO, T.; MIYATA, T.; LEE, S.; AOYAGI, H.; OMURA, T.: Biosynthesis and Localization of rat liver microsomal carboxy-esterase E1. In: *J. Biochem.* 103 (1988), 149–155
- RANDALL, C.J.; BRATZLER, L.J.:** Effect of smoke upon acid phosphatase activity of smoked meat. In: *J. Food Sci.* 35 (1970), 250
- REICHERT, J.:** Zur F-Wert-Ermittlung. In: *Fleischerei* 31 (1980), 92–94
- REICHERT, J.E.; BREMKE, H.; BAUMGART, J.:** Zur Ermittlung des Erhitzungseffektes für Kochschinken (F-Wert). In: *Fleischerei* 30 (1979), 624–633
- REICHERT, J.E.; THUMEL, H.; LÜCHTEFELD, G.:** Zur Pasteurisation von Fleischerzeugnissen. In: *Fleischerei* 39 (1988), 199–203
- REUSS, U.:** Tuberkelbakterien im Fleisch eutertuberkulöser Kühe und ihre bakteriologischen Nachweismöglichkeiten. In: *Lebensmitteltierarzt* 2 (1951), 67. Nach: Eyermann, K.: Über den Nachweis ausreichender Erhitzung gemäßregelten Fleisches. *Vet. Med. Diss., München* (1955)
- SARDA, P.; DESNUELLE, P.:** In: *Biochim. Biophys. Acta* 30 (1958), 513–521. Nach: TSUJITA, T.; MIYADA, T.; OKUDA, H.: Purification of rat kidney carboxylesterase and its comparison with other tissue esterases. In: *J. biochem.* 103 (1988), 327–331
- SATOH, T.; HOSOKAWA, M.:** Molecular aspects of Carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases. In: *Toxicology Letters* 82/83 (1995), 439–445
- SCHÄR, H-P.; GYGAX, D.; TOMBO, G.M.R.; GHISALBA, O.:** Purification and properties of an acetyl specific carboxylesterase from nocardia mediterranei. In: *Appl Microbiol. Biotechnol.* 27 (1988), 451–456
- SCHARMA, N.K.; SRIVASTAVA, A.K.; GILL, J.P.S.; JOSHI, D.V.:** Differentiation of meat from food animals by enzyme assay. In: *Food control* 5 (1994), 219–221
- SCHEIBNER, G.:** Die Anwendung von Hilfsmethoden bei der Lebensmitteluntersuchung in der Praxis. In: *Monatshefte für Veterinärmedizin* 29 (1973), 299–302

- SCHINDLER, R.; KUHN C.:** Evidence for a retinyl ester hydrolase activity in the pig vascular endothelium. In: *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 59 (1989), 419–420
- SCHINDLER, R.; MENTLEIN, R.; FELDHEIM, W.:** Purification and characterization of retinyl ester hydrolase as a member of the non-specific Carboxylesterase supergene family. In: *Eur. J. Biochem.* 251 (1998), 863–873
- SCHLEUSENER, H.; SIELAFF, H.; PETERS, H.:** Zur Modellierung der thermischen Inaktivierung von Enzymen. In: *Lebensmittelindustrie* 29 (1982), 439–443
- SCHMITT, B.:** Isolierung und Charakterisierung der Esterase 7B der Hausmaus, *Mus musculus*. Med. Diss., Freiburg i. Br. (1980)
- SCHOMBURG, D.; SALZMANN, M.:** *Enzyme handbook*; Berlin: Springer (1991)
- SCHWIMMER, S.:** Regeneration of enzyme activity. In: *Source book of food enzymology*. SCHWIMMER, S. (Hrsg.); Westport: The Avi Publishing Company (1981), 212–217
- SCOTT, K.; ZERNER, B.:** Carboxylesterases (EC 3.1.1). Amino acid composition of liver Carboxylesterases. In: *Can. J. Biochem.* 53 (1975), 561–564
- SEARCY, G.K.; SENTER, S.D.; WILSON, R.L.:** Glutamic-oxaloacetic Transaminase activity: a potential end-point-temperature indicator for imported cooked beef. In: *J Food Prot.* 58 (1995), 686–688
- SENER, S.D.; SEARCY, G.K.; YOUNG, L.L.:** Glutamic-Oxaloacetic transaminase activity in commercially processed chicken: an indicator of product end-point temperature. In: *J. Food Prot.* 59 (1996), 1230–1232
- SIEBENLIST, H.:** Einfluss von Rezeptur und Herstellungsweise auf Carbesterase-Restaktivität und Reistkeimgehalt bei Leberwurst. Diss., München-Weihenstephan (1992)
- SIELAFF, H.:** Inaktivierung von Enzymen durch Wärmebehandlung. In: *Fleisch* 37 (1983), 67–70
- SINGRÜN, B.:** Ein einfacher Carbesterasetest zum Nachweis der stattgehabten Erhitzung von Fleisch mit Naphthylacetat als Substrat. Vet. Med. Diss., München (1970)
- SMITH, D.M.; DESROCHER, L.D.; BOOREN, A.M.; WANG, C.H.; ABOUZIED, M.M.; PESTKA, J.J.; VEERAMUTHU, G.J.:** Cooking temperature of turkey ham affects lactate dehydrogenase, serum albumin and immunoglobulin G as determined by ELISA. In: *J. Food Sci.* 61 (1996), 209–212
- SNYDER, H.E.:** Analysis of pigments at the surface of fresh beef with reflectance spectrophotometry. In: *J. Food Sci.* 30 (1964), 457
- SOBEK, H.; GÖRISCH, H.:** Purification and characterization of a heat-stable esterase from the thermoacidophilic archaebacterium *sulfolobus acidocaldarius*. In: *Biochem. J.* 250 (1988), 453–458

- SOGORB, M.A.; VILANOVA, E.; QUINTANAR, J.L.; VINIEGRA, S.:** Bovine chromaffin cells in culture show carboxylesterase activities sensitive to organophosphorus compounds. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28 (1996), 983–989
- SPANIER, A.M.; McMILLIN, K.W.; MILLER, J.A.:** Enzyme activity levels in beef: effect of postmortem aging and end-point cooking temperature. In: *J. Food Sci.* 55 (1990), 318–322
- SPENCER, R.:** Heat resistance of microorganisms. In: *Food Manuf.* 42 (1967), 29–34
- STABURSVIK, E.; MARTENS, H.:** Thermal denaturation of proteins in post rigor muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry. In: *J. Sci. Food Agric.* 31 (1980), 1034–1042
- STALDER, J.W.; SMITH, G.L.; KEETON, J.T.; SMITH, S.B.:** Lactate dehydrogenase activity in bovine muscle as a means of determining heating endpoint. In: *J. Food Sci.* 56 (1991), 895–898
- STALDER, J.W.; SMITH, G.L.; KEETON, J.T.; SMITH, S.B.:** Lactate dehydrogenase activity as an endpoint heating indicator in cooked beef. In: *J. Food Sci.* 62 (1997), 316–320
- STEELE, P.; LAMBE, W.J.:** SDS-gradient gel electrophoretic separation of muscle polypeptides for the estimation of maximum cooking temperatures in meat. In: *J. Food Prot.* 45 (1982), 59–62
- STERRI, S.H.; LYNGAAS, S.; FONNUM, F.:** Toxicity of soman after repetitive infection of sublethal doses in guinea-pig and mouse. In: *Acta Pharmacol. Toxicol.* 49 (1981), 8–13
- STOOPS, J.K.; HAMILTON, S.E.; ZERNER, B.:** Carboxylesterases (EC 3.1.1). A comparison of some kinetic properties of horse, sheep, chicken, pig and ox liver carboxylesterases. In: *Can. J. Biochem* 53 (1975), 565–573
- SU, Y.; ANG, C. Y. W.; LILLARD, D.A.:** Precooking method affects warmed-over flavor of broiler breast patties. In: *J. Food Sci.* 56 (1991), 881–883
- TANAKA, M; ILO, T.; TABATA, T.:** Purification and Characterization of a carboxylesterase from rabbit liver lysosomes. In: *J. Biochem.* 101 (1987), 619–624
- THYHOLT, K.; ENERSEN, G.; ISAKSSON, T.:** Determination of endpoint temperatures in previously heat treated beef using reflectance spectroscopy. In: *Meat Science* 48 (1998), 49–63
- TINBERGEN, B.J.; OLSMAN, W.J.:** Isoelectric focusing as a species identification technique in the inspection of food products. In: *Fleischwirtschaft* (1976), 1501–1504
- TORRES, J.L.; RUSH, R.S.; MAIN, A.R.:** Physical and chemical characterization of a horse serum Carboxylesterase. In: *Archs. Biochem. Biophys.* 267 (1988), 271–279
- TOWNSEND, W.E.:** Unpublished data. USDA-ARS. Richard B. Russell Agric. Res. Ctr., Athens, GA (1983). Nach: TOWNSEND, W.E.; BLANKENSHIP, L.C.: Methods for detecting processing temperatures of previously cooked meat and poultry products – a review. In: *J. Food. Prot.* 52 (1989), 128–135

- TOWNSEND, W.E.; BLANKENSCHIP, L.C.:** Assessment of previous heat treatment of laboratory heat-processed meat and poultry using a commercial enzyme system. In: *J. Food Sci.* 52 (1987b), 1445–1448
- TOWNSEND, W.E.; BLANKENSCHIP, L.C.:** Assessment of previous heat treatment to semi-commercially and commercially prepared meat and poultry products using the “Apizym” system. In: *J. Food Sci.* 53 (1988), 649–651
- TOWNSEND, W.E.; BLANKENSHIP, L.C.:** Enzyme profile of raw and heat-processed beef, pork and turkey using the “Apizym” system. In: *J. Food Sci.* 52 (1987a), 511–512
- TOWNSEND, W.E.; BLANKENSHIP, L.C.:** Methods for detecting processing temperatures of previously cooked meat and poultry products – a review. In: *J. Food. Prot.* 52 (1989), 128–135
- TOWNSEND, W.E.; DAVIS, C.E.:** Transaminase (AST/GOT and ALT/GPT) activity in ground beef as a means of determining end-point temperature. In: *J. Food Sci.* 57 (1992), 555–557
- TOWNSEND, W.E., DAVIS, C.E.; WILSON, R.L.:** Evaluation of a sound velocity analyzer for estimating maximum internal temperature to which meat products have been heat processed. In: *J. Food Prot.* 53 (1990), 680–684
- TOWNSEND, W.E.; SEARCY, G.K.; DAVIS, C.E.; WILSON jr., R.L.:** End-point temperature (EPT) affects N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase activity in beef, pork and turkey. In: *J. Food Sci.* 58 (1993), 710–712
- TOWNSEND, W.E.; SEARCY, G.K.; DAVIS, C.E.; WILSON jr., R.L.:** Evaluation of creatine phosphokinase activity as a means of determining cooking end-point temperature. In: *J. Food Prot.* 57 (1994), 159–162
- TOWNSEND, W.E.; THOMSON, J.E.; HUTCHINS, J.R.:** Coagulation test for cooked meat temperature: effect of variations in filtration. In: *J. Food Sci.* 49 (1984), 853–858
- TOWNSEND, W.E.; THOMSON, J.E.; HUTCHINS, J.R.:** Coagulation test for cooked meat temperature: effect of sample preparation methods. In: *J. Food Sci.* 50 (1985), 1179–1180
- TSUJITA, T.; MIYADA, T.; OKUDA, H.:** Purification of rat kidney carboxylesterase and its comparison with other tissue esterases. In: *J. biochem.* 103 (1988), 327-331
- UDDIN, M.; ISHIZAKI, S.; TANAKA, M.:** Coagulation test for determining end-point temperature of heated blue marlin meat. In: *Fisheries Science* 66 (2000), 153–160
- USDA-FSIS:** Performance standard for the production of certain meat and poultry products. U.S. Department of Agriculture. Food Safety Inspection Service. Washington. DC. Fed. Reg. 61 (86):19564 (1996)
- USDA-FSIS:** Pre-cooked patties: A guide for food service institutions. Food Safety and Inspection Service. USDA. Washington, DC. (1989)

- VEERAMUTHU, G.J.; BOOREN, A.M.; SMITH, D.M.:** Species, muscle type, and formulation influence the residual concentrations of three endpoint temperature indicators in poultry products. In: *Poultry Sci.* 76 (1997), 642–648
- VEERAMUTHU, G.J.; PRICE, J.F.; DAVIS, C.E.; BOOREN, A.M.; SMITH, D.M.:** Thermal inactivation of escherichia coli O157:H7, Salmonella senftenberg, and enzymes with potential as time-temperature indicators in ground turkey thigh meat. In: *J. Food Prot.* 61 (1998), 171–175
- WALKER, C.H.; MACKNESS, M.I.:** In: *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983), 3265–3269. Nach: SOBEK, H.; GÖRISCH, H.: Purification and characterization of a heat-stable esterase from the thermoacidophilic archaebacterium *sulfolobus acidocaldarius*. In: *Biochem. J.* 250 (1988), 453–458
- WANG, S.F.; ABOUZIED, M.M.; SMITH, D.M.:** Proteins as potential endpoint temperature indicators for ground beef patties. In: *J. Food Sci.* 61 (1996), 5–7
- WANG, C-H.; ABOUZIED, M.M.; PESTKA, J.J.; SMITH, D.M.:** Antibody development and enzyme-linked immunosorbent assay for the protein marker lactate dehydrogenase to determine safe cooking end-point temperatures of turkey rolls. In: *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992), 1671–1676
- WANG, C-H.; ABOUZIED, M.M.; PESTKA, J.J.; SMITH, D.M.:** Lactate dehydrogenase polyclonal antibody sandwich ELISA for determination of endpoint heating temperatures of ground beef. In: *J. Food Prot.* 59 (1996), 51–55
- WANG, C.H.; BOOREN, A.M.; ABOUZIED, M.M.; PESTKA, J.J.; SMITH, D.M.:** ELISA determination of turkey roll endpoint temperature: effects of formulation, storage, and processing. In: *F. Food Sci.* 58 (1993), 1258–1261
- WANG, C.H.; PESTKA, J.J.; BOOREN, A.M.; SMITH, D.M.:** Lactate dehydrogenase, serum protein, and immunoglobulin G content of uncured turkey thigh rolls as influenced by endpoint cooking temperature. In: *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994), 1829–1833
- WHITAKAR, J.R.:** Catalase and peroxidase, Ch. 24. in: *Principles of enzymology for the food sciences*. New York: Marcel Dekker (1972)
- WOJCIECHOWSKI, J.:** Charakteristik und Bewertung der technologischen Verwendbarkeit thermobakteriologischer Pasteurisierungstests von Fleischkonserven. In: *Fleischwirtschaft* 60 (1980), 1726–1731
- WRIGHT, D.J.; LEACH, I.B.; WILDING, P.:** Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. In: *J. Sci. Food. Agric.* 28 (1977), 557–564
- ZAKULA, R.:** Results on investigations of thermoresistance of some bacteria suspended in meat, lard and tallow. In: *Eur. Meet. Meat. Res. Workers* 15 (1969), 157–163