

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in  
der Veterinärmedizin

Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und Gesundheitswesen in der  
Veterinärmedizin

Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med.vet. Martin Wagner, Dipl. ECVPH)

# **Einfluss des oberflächlichen Schockfrostens auf die mikrobielle Besiedlung, Farbe und Textur von Rind- und Schweinefleisch**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Sandra Reisenauer

Wien, im Dezember 2022

Betreuerin: Ass.-Prof. Mag. med.vet. Evelyne Selberherr, PhD  
Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und  
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin  
Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1.	<b>SCHOCKFROSTEN UND DER RESULTIERENDE KRISTALLISIERUNGSPROZESS IM FLEISCH</b>	7
1.1.1.	Faktoren und Auswirkung	7
1.2.	<b>FARBVERÄNDERUNGEN</b>	10
1.3.	<b>MIKROORGANISMEN AM FLEISCH</b>	11
1.3.1.	Zu erwartende Keimflora und Verderbserreger	11
1.3.1.1.	Verderbniserreger im aeroben verpackten Fleisch	11
1.3.1.2.	Verderbniserreger im vakuumverpackten Fleisch	12
1.3.1.3.	Verderbserreger in MAP (Modified Atmosphere Packaging)	12
1.3.2.	Pathogene Keime	13
1.3.2.1.	<i>Salmonella</i> spp.	13
1.3.2.2.	<i>Campylobacter</i> spp.	13
1.3.2.3.	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>	14
1.3.2.4.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	14
1.3.2.5.	<i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.3.2.6.	<i>Clostridium perfringens</i>	15
1.3.2.7.	<i>Bacillus cereus</i>	15
1.4.	<b>FRAGESTELLUNG FÜR DIE DIPLOMARBEIT</b>	16
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>16</b>
2.1.	<b>BETRIEB UND PROBENENTNAHME</b>	16
2.2.	<b>DER SCHOCKFROSTER</b>	18
2.3.	<b>PROBENVERARBEITUNG</b>	20
2.3.1.	Mikrobiologie	20
2.3.1.1.	Agarmedien	22
2.3.1.1.1.	TSA	22
2.3.1.1.2.	VRBD	22
2.3.1.1.3.	APT	22
2.3.1.2.	Berechnung von Kolonie bildenden Einheiten (KBE)	22
2.3.1.3.	Gewinnung von Isolaten	23
2.3.1.4.	Erstellung einer Stammsammlung	24
2.3.1.5.	DNA Isolierung mit Chelex	25
2.3.1.6.	16S rRNA Gen PCR	25
2.3.1.7.	Gelelektrophorese	27
2.3.1.8.	Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP	28
2.3.1.9.	Sanger Sequencing von Isolaten	29
2.3.2.0.	Statistik	30
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
3.1.	<b>FLEISCHFARBE VOR UND NACH DEM SCHOCKFROSTEN</b>	31
3.2.	<b>EINFRIERTIEFE DURCH DAS SCHOCKFROSTEN</b>	35
3.2.1.	Vergleich zwischen 6 Minuten zu 4 Minuten Schockfrosterbehandlung	36
3.2.2.	Vergleich zwischen Schweine- und Rindfleisch	37
3.3.	<b>MIKROBIOLOGIE ERGEBNISSE AM FLEISCH</b>	38
3.3.1.1.	Vergleich Kontrollen zu Proben	42
3.3.1.2.	Vergleich frische und vorgefrorene Proben	42
3.3.1.3.	Vergleich 4 und 6 Minuten im Schockfroster	43
3.4.	<b>SANGER SEQUENCING VON BAKTERIELLEN ISOLATEN</b>	44
3.4.1.	Vergleich der Sequenzen zur NCBI Datenbank	44
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>51</b>
4.1.	<b>GEBRAUCH UND ANWENDUNG DES SCHOCKFROSTENS</b>	51
4.2.	<b>KRISTALLISIERUNG – EIN WICHTIGER FAKTOR IN DER QUALITÄT</b>	51
4.3.	<b>FLEISCHFARBE- EIN WICHTIGER FAKTOR IM VERKAUF</b>	52

<b>4.4.</b>	<b>MIKROBIOLOGIE IN DER FLEISCHERZEUGUNG</b>	<b>54</b>
4.4.1.	Genus <i>Pseudomonas</i>	55
4.4.2.	Genus <i>Aeromonas</i>	55
4.4.3.	Genus <i>Brochothrix</i>	56
4.4.4.	Genus <i>Psychrobacter</i>	56
4.4.5.	Genus <i>Shewanella</i>	57
<b>4.5.</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>60</b>
<b>8.</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>64</b>
<b>ANHANG</b>	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich dem Schlachtbetrieb Großfurtner, insbesondere der Geschäftsführung, für die Möglichkeit der Erstellung dieser Arbeit und das stetige Interesse an den Forschungsergebnissen sowie der exzellenten Kooperation danken. Des Weiteren will ich Dr. Evelyne Selberherr danken für die gute Betreuung und die Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit. Sie stand mir immer mit Rat zur Seite und hatte stets ein offenes Ohr für mich, meine Sorgen und Vorschläge.

Weiters möchte ich Dr. rer. nat. Monika Dzieciol von Herzen dafür danken, dass sie mir während der gesamten Laborarbeit immer zur Seite stand, mich unterstützt und motiviert hat. Ein weiteres Dankeschön geht an Mag. med. vet. Franz- Ferdinand Roch, der mir sowohl während der Laborarbeit, als auch beim Verfassen des Statistikkapitels geholfen hat.

Außerdem möchte ich Tea Movsesijan danken, dafür dass sie mir während der Sammlung und Bearbeitung meiner Proben öfters zur Seite stand und geholfen hat, wann immer sie konnte.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern, meinem Freund Christoph und meinen Freunden danken, die mich während des gesamten Studiums unterstützt und motiviert haben, ohne Euch wäre das nicht möglich gewesen.

## Abkürzungen

g.....	Gramm
ml.....	Milliliter
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
TSA.....	Tryptic Soy Agar
APT.....	All Purpose Tween
VRBD.....	Violet Red Bile Dextrose Agar
rpm.....	Revolutions per minute
Aqua dest.....	Destilliertes Wasser
µl.....	Mikroliter
KBE.....	Kolonie bildende Einheiten
TAE.....	Tris Acetat EDTA Puffer
BHI.....	Brain Heart Infusion
RFLP.....	Restriction Fragment Length Polymorphism
NCBI.....	National Center for Biotechnology

# 1 Einleitung

## Fleischkonsum, wirtschaftliche und globale Aspekte

Der Fleischverbrauch in Österreich gehört mit über 100kg/ Kopf/ Jahr zu den höchsten der Welt (Chemnitz et al., 2021). Der in Summe gesehen weltweite Überkonsum von tierischen Nahrungsmitteln bringt globale Auswirkungen mit sich (Chemnitz et al., 2021).

Mit steigendem Fleischkonsum steigt auch der Bedarf an Futtermitteln an. In der Intensivtierhaltung stellt vor allem Soja einen wichtigen Bestandteil dar, Brasilien stellt mit 133 Millionen Tonnen pro Jahr das größte Anbauland dar (Chemnitz et al., 2021).

Laut Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO) trägt die Viehzucht insgesamt 58% der gesamten Treibhausgas- Emissionen aus. Außerdem trägt die landwirtschaftlich genutzte Fläche zu einem hohen Verlust der biologischen Vielfalt bei (Chemnitz et al., 2021).

In den vergangenen sechzig Jahren stieg der jährliche Fleischverbrauch in Österreich von 265.000 Tonnen auf 780.000 Tonnen, das entspricht einer Verdreifachung des österreichweiten Fleischkonsums (Willerstorfer et al., 2013). Berücksichtigt man bei diesen Zahlen das Bevölkerungswachstum, erhöhte sich in diesem Zeitraum der Verbrauch pro Kopf um den Faktor 2,5 (Willerstorfer et al., 2013).

Vor allem der Konsum von Schweinefleisch hat sich in den letzten sechzig Jahren mehr als verdoppelt, das entspricht 60% des gesamten konsumierten Fleisches in Österreich (Willerstorfer et al., 2013).

Der Konsum von Rindfleisch hat sich zwischen 1950 und 2010 nicht wesentlich gesteigert, das liegt an den höheren Produktionskosten. Im Vergleich zu Geflügel oder Schwein benötigen Rinder weitaus mehr Fläche und Nahrung pro Einheit Fleisch (Willerstorfer et al., 2013).

Der weltweite Fleischkonsum hat sich in den letzten 20 Jahren mehr als verdoppelt und erreichte bereits 2018 eine Konsummenge von 320 Tonnen/ Jahr (Chemnitz et al., 2021).

Die globale Nachfrage nach Fleisch steigt durch das Wirtschafts- und Bevölkerungswachstum an. Generell gilt: Je reicher ein Land ist, umso mehr Fleisch wird konsumiert (Chemnitz et al., 2021).

Neben der Fleischproduktion an sich gilt es die hygienischen und logistischen Herausforderungen entlang dieser Wertschöpfungskette zu beachten und vermehrt zukunftsorientierte Lösungen für eine sichere und nachhaltige Fleischproduktion zu finden.

## 1.1. Schockfrostern und der resultierende Kristallisierungsprozess im Fleisch

### 1.1.1. Faktoren und Auswirkung

Schockfrostung ist eine gängige Methode um vor oder nach dem Zerlegen von Fleisch die Temperatur schnell und effizient zu erniedrigen. Dieses Verfahren wird in der Fleischindustrie angewendet, um Fleisch haltbar zu machen. Das Verfahren beeinflusst die mikrobielle Dynamik am Endprodukt genauso wie durch den Kristallisierungsprozess eintretende Texturveränderungen, und damit die Fleischqualität (Leygonie et al., 2012; Lisistyn et al., 2019).

Bei der Schockfrostung wird eine Temperatur von nicht höher als minus 18°C angestrebt (Lisistyn et al., 2019).

Kristallisation kann hierbei die Qualität von gefrorenem Fleisch limitieren, da große Kristalle die Zellmembran und andere Muskelstrukturen zerstören, welche zu einem vermehrten Austritt von Fleischsaft und somit zu einem Qualitätsverlust führen (Sanz et al., 1999).

In der Literatur besteht die einheitliche Meinung, dass die Zartheit des Fleisches mit jedem Einfrier- und Auftauzyklus steigt (Farouk et al., 2003). Allerdings reduziert normales Einfrieren und Auftauen die Qualität des Fleisches durch den Verlust von Fleischsaft (Geschmack und Ansteigen der Keimzahl) und verursacht Schäden in der Ultrastruktur der Muskelzellen (Xia et al., 2012).

Mikroorganismen, die die Möglichkeit haben, den Frostungsprozess zu überleben, können unterteilt werden in

- Resistent gegenüber Kälteeinflüssen: *Listeria*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* spp., wo bis zu 50% dieser Gram positiven Bakterien überleben, sowie psychrophile Keime (zB. *Arthrobacter* sp. und *Psychrobacter* sp.)
- Mäßig resistent gegenüber Kälteeinflüssen: die meisten anderen Gram positiven Bakterien (zB. *Lactobacillus*), Pilze und einige Hefearten
- Sensitiv gegenüber Kälteeinflüssen: die meisten Gram negativen Bakterien, aber Einfrieren garantiert keine komplette Elimination.



Eine intensive Vermehrung von vermehrungsfähigen Mikroorganismen auf der Oberfläche des Fleisches während dem Auftauen tritt bei einer Fleischtemperatur ab 7°C auf (Lisistyn et al., 2019).

Bei der Aufbewahrung von Fleisch im Kühlschrank ist darauf zu achten, dass diese nicht überladen ist, da dies zu einem Anstieg der Temperatur führen kann (mehr als 5°C). Die optimale Temperatur für die Lagerung von Fleisch ist zwischen 0°C – 5°C. In einem großen kommerziell erhältlichen Kühlschrank, sollte Fleisch, Fisch und Geflügel in den untersten Fächern gelagert werden. Das hat zwei Gründe, der erste besteht darin, dass eventuell austretender Fleischsaft andere Lebensmittel nicht kontaminieren kann und zweitens ist der Kühlschrank unten am kältesten, hier geht Temperatur auch am langsamsten verloren, wenn die Kühlschranktür z.B. offen ist. Allgemein gilt, dass rohe Produkte unter gekochten Produkten im Kühlschrank aufbewahrt werden. Rohes Faschierfleisch kann 1-2 Tage, Steaks und Schweinefleisch 3-5 Tage bei einer Temperatur von maximal 5°C aufbewahrt werden (Foster et al, 2022).

In der Literatur wird folgende Schichtung von Lebensmitteln im Kühlschrank empfohlen (Tabelle 1):

Tabelle 1: Empfehlung für das richtige Schichten von Lebensmitteln im Kühlschrank

TEMPERATURZONE	DURCHSCHNITTSTEMPERATUR	LEBENSMITTELLAGERUNG
Oberer Bereich des Kühlschranks	8°C	Käse, Wurst, Vorgegartes und Geräuchertes
Mittlerer Bereich des Kühlschranks	5°C	Milchprodukte
Direkt über dem Gemüsefach	2°C	Schnell verderbliche Lebensmittel, wie rohes Fleisch und frischer Fisch
Gemüsefach	8°C	Obst und Gemüse
Tür	9°C	Getränke, Eier und Saucen

## 1.2. Farbveränderungen

Farbveränderungen am Fleisch können durch Faktoren wie pH- Wert, Temperatur, Oxidation von Myoglobin, aber auch Mikroorganismen beeinflusst werden (Meat Science Association, 2012). In Tabelle 2 sind die wichtigsten Mikroorganismen aufgelistet, die zu Farbveränderungen führen können.

Tabelle 2: Mögliche Veränderungen von Lebensmitteln und ihre mikrobiellen Ursachen

---

<b>Veränderungen</b>	<b>Mikrobielle Ursache</b>
Gelbe Verfärbung	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Cornelis et al., 2010)
Blaue Verfärbung	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Cornelis et al., 2010)
Grüne Verfärbung	Milchsäurebakterien ( <i>Hafnia alvei</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Weissella viridescens</i> ) (Cornelis et al., 2010)
Schleimbildung	<i>Lactobacillus sakei</i> und andere Milchsäurebakterien (Cornelis et al., 2010)
Fäulnisgeruch	<i>Pseudomonas</i> spp. (Casaburi et al., 2015)
Käsiger Geruch	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> spp. (Casaburi et al., 2015)
Gasbildner	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Clostridium</i> spp. (Casaburi et al., 2015)

---

### 1.3. Mikroorganismen am Fleisch

Das Muskelgewebe von gesunden, lebenden Tieren ist steril. Die mikrobielle Besiedlung von frischem Fleisch wird durch den physiologischen Zustand des Tieres während der Schlachtung, der Keimbelastung während der Schlachtung und von Umweltkeimen im Schlachthof beeinflusst (Erkmen et al., 2016).

Die Hauptkontamination des Fleisches findet während der Zerlegung statt, wenn die Karkassen eröffnet und die Innereien entfernt werden. Vor allem Bakterien von Magen- Darm-Trakt, Lymphknoten, Haut aber auch von Zerlegemesser und Handschuhen kann zu einer potentiellen Kontamination des Fleisches führen. Weiters stellt der Zerlegeprozess an sich ebenfalls eine mögliche Kontaminationsquelle dar (Nychas et al., 2008).

#### 1.3.1. Zu erwartende Keimflora und Verderbenserreger

Die gesamte mikrobielle Besiedelung von frischem Fleisch variiert von  $10^2$  bis zu  $10^5$  CFU/  $\text{cm}^2$  (Bell et al., 1997). Die Mikrobiota setzt sich meist zusammen aus *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Bacillus* sp., *Brochothrix thermosphacta*, *Clostridium*, *Flavovacterium*, *Cytophaga*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* Spezies (Bell et al., 1997).

Ob das Mikrobiom, also die Gesamtheit aller Mikroorganismen, zu einem Verderb des Fleisches führen kann, hängt auch mit der Art der Verpackung zusammen, da diese selektiven Druck auf die mikrobiellen Gemeinschaften ausübt. Frisches Fleisch kann mit 3 Arten verpackt werden: Aerob, unter Vakuum und mittels Modified Atmosphere Packaging (MAP). Jeder Verpackung stellt andere Umweltbedingungen für die Mikrobiota dar und so werden unterschiedliche Keime über die Zeit angereichert (Silva et al., 2011).

##### 1.3.1.1. Verderbniserreger im aeroben verpackten Fleisch

Fleisch- und Fleischprodukte stellen einen idealen Nährboden für Bakterien dar. Im Allgemeinen gelten vor allem Haut und Magen- Darm- Trakt während der Schlachtung, sowie Kontaminationen (darunter auch Kreuz- und Rekontaminationen) während Schlachtung und Zerlegung als Gefahrenquelle für mikrobielle Kontaminationen (Jay et al., 2005).

Mit der Fähigkeit, Proteine zu spalten, gelten *Pseudomonas* Spezies, speziell *P. fragi*, *P. putida*, *P. lundensis* und *P. fluorescens* als dominierende Flora im Zusammenhang mit Verderb von aerob verpacktem Fleisch (Doulgeraki et al., 2013).

Die Prävalenz von *Pseudomonas* wird gefolgt von anderen Gram- negativen Stämmen, darunter *Acinetobacter*, *Moraxella* und *Flavobacterium* (Ercolini et al., 2006).

Außer der Art der Verpackung, spielt auch die Temperatur eine wichtige Rolle in Zusammenhang mit Verderbniserregern in aerob verpacktem Fleisch. Wenn Fleisch bei einer Temperatur von 15°C bis 25°C aufbewahrt wird, zeigte Schweinefleisch eine hohe Besiedlung mit *Enterobacteriaceae* (*Kurthia*, *Enterobacter* und *Hafnia*) (Doulgeraki et al., 2013).

Auch Gram positive Keime spielen eine Rolle im Fleischverderb. In aerob verpacktem Fleisch stellt vor allem *Brochothrix* spp., ein psychrophiler Verderbniskeim, die dominante Flora dar (Huis in't Veld et al., 1996).

#### 1.3.1.2. Verderbniserreger im vakuumverpackten Fleisch

Vakuumverpackung beschreibt eine Möglichkeit der Verpackung, bei der das Fleisch in für Sauerstoff nicht- permeablen Material verpackt und diesem die Luft entzogen wird. Dies wird erreicht durch Füllung der Verpackung mit Carbondioxid. Die Verpackungsschicht soll eine Barriere zwischen der Umwelt und der Mikroflora im Inneren des Beutels bieten (Church et al., 1995).

In den meisten Fällen besteht die Mikroflora von vakuumverpacktem Fleisch aus Gram negativen fakultativ- anaeroben Keimen, wie *Hafnia*, *Serratia liquefaciens* und *Enterobacter* (Dainty et al., 1992). Weiters bilden Gram positive Keime wie *Lactobacillus* und *B. thermosphacta* ebenfalls einen Teil der Mikroflora (Enfors et al., 1979).

#### 1.3.1.3. Verderbenserreger in MAP (Modified Atmosphere Packaging)

MAP beschreibt eine Art der Verpackung von Fleisch, bei der ein bestimmtes Gas- Gemisch verwendet wird, um das mikrobielle Wachstum zu reduzieren (Young et al., 1988).

Die verwendeten Gase für das Gemisch sind Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>), Stickstoff (N<sub>2</sub>), Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Argon (Ar). Höhere Dosen von Kohlendioxid hemmen das Wachstum von *Lactobacillus*, begünstigen aber das Wachstum von *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas* (Gill et al., 1996).

Bei der Verwendung von 20% - 60% Kohlendioxid kommt es zur Stagnation des Wachstums von *Acinetobacter*, *Pseudomonas* und *Moraxella*, aber auch das Wachstum von *Lactobacillus* wird verzögert (Farkas et al., 2007).

### 1.3.2. Pathogene Keime

Fleisch ist ein idealer Nährboden für Mikroorganismen. Das Wachstum von pathogenen Keimen kann hierbei eine potentielle Gefahr für den Konsumenten darstellen.

Als pathogene Keime gelten für Fleischprodukte vor allem *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., enterohämorrhagische *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* und *Bacillus cereus*.

Da Frischfleisch normalerweise nicht roh verzehrt wird sondern vor Verzehr erhitzt werden sollte, gilt bei Einhaltung der Hygienekriterien während der Verarbeitung das Lebensmittelsicherheitsrisiko als gering (Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, 2005) . Auf den nächsten zwei Seiten werden die wichtigsten Fleisch-assoziierten Pathogene kurz beschrieben.

#### 1.3.2.1. *Salmonella* spp.

*Salmonellen* stellen in Österreich die zweithäufigsten Durchfallerreger, die durch Lebensmittel übertragen werden, dar (AGES, 2022).

Die Auswirkungen einer Salmonellen Infektion hängt stark von Alter und Umweltfaktoren des Erkrankten, der aufgenommenen Menge ab und von den Virulenzfaktoren der Bakterien ab. Zumindest 6 Serotypen von *Salmonella* (*Abortusovis*, *Choleraesuis*, *Dublin*, *Enteritidis*, *Fallinarum/ Pullorum* und *Typhimurium*) besitzen ein Virulenz Plasmid (Gordon et al., 2008).

Klinische Symptome einer Salmonelleninfektion reichen von Durchfall, über Fieber bis hin zu unspezifischen Symptomen (Gordon et al., 2008).

#### 1.3.2.2. *Campylobacter* spp.

*Campylobacter* verursacht 1,5 Millionen Krankheitsfälle jedes Jahr alleine in den Vereinigten Staaten. Menschen können sich durch den rohen Verzehr von Geflügelfleisch anstecken, aber auch durch kontaminierte Lebensmittel oder verunreinigtes Wasser. Symptome einer *Campylobacter* Infektion können Durchfall (oft blutig), Fieber, Bauchkrämpfe, Übelkeit und Erbrechen sein (Laughlin et al., 2019).

#### 1.3.2.3. Enterohämorrhagische *E.coli*

*Escherichia coli* sind Gram negative Stäbchen, welche die Eigenschaft zur Bildung von Shigatoxinen besitzen. Infektionen können auf vielfältige Arten übertragen werden, es handelt sich stets um eine fäkal- orale Übertragung, wie zum Beispiel bei Kontakt zu Wiederkäuern oder Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln. Auch Mensch- zu- Mensch Übertragungen sind möglich. Wiederkäuer, speziell Rinder, Schafe und Ziegen werden als Reservoir und Hauptinfektionsquelle beim Menschen gesehen (Robert- Koch Institut, 2019).

#### 1.3.2.4. *Yersinia enterocolitica*

*Yersinia enterocolitica* stellt nach *Campylobacter* und *Salmonella* den dritthäufigsten bakteriellen Erreger in Zusammenhang mit Darmerkrankungen dar (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2012). Nach einer 5-7 tägigen Inkubationszeit zeigen sich Symptome wie wässriger Durchfall, Fieber, Bauchschmerzen und Erbrechen.

Yersiniose des Menschen stellt eine zoonotische Erkrankung dar, hier kann die Übertragung direkt von Tier auf Mensch, aber auch indirekt durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln, stattfinden. Vor allem Schweine werden als Hauptinfektionsquelle genannt, da sie in den Tonsillen pathogene *Y. enterocolitica* aufweisen, welche beim Schlachtprozess das Fleisch kontaminieren können (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2012).

#### 1.3.2.5. *Listeria monocytogenes*

Bei Listerien handelt es sich um einen Genus, der insgesamt 10 Spezies umfasst. Eine davon ist *Listeria monocytogenes*, der Erreger der Listeriose (European Food Safety Authority, 2019). Listeriose Erkrankungen treten selten auf, nehmen aber meist schwere Verläufe an, die oft mit einer hohen Sterblichkeitsrate verbunden sind. Die Bakterien lassen sich durch Kochen bei einer Temperatur ab 65°C abtöten (European Food Safety Authority, 2019). Die Symptome bei einer Erkrankung variieren von leichten grippeähnlichen Symptomen, bis hin zu Hirnhautentzündungen und anderen lebensgefährlichen Komplikationen. Besonders gefährdet sind Menschen mit geschwächten Immunsystem, wie Ältere, Schwangere und Kinder (European Food Safety Authority, 2019).

Zur Vermeidung einer Kontamination ist eine gute Hygienepraxis während der Verarbeitung nötig (European Food Safety Authority, 2019).

#### 1.3.2.6. *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* zählt zu den anaeroben Sporenbildnern. Sie kommen überall in der Umwelt vor, vor allem aber im Boden und im Darmtrakt von Menschen und Tieren. Vor allem die hohe Hitzeresistenz der Sporen macht die Erreger hartnäckig. Nach der Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln werden im Darm Enterotoxine freigesetzt, die eine Erkrankung auslösen können. Häufige Übertragungswege stellen verzehrfertige Lebensmittel dar, die nicht ausreichend gekühlt/ erhitzt wurden (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2019).

#### 1.3.2.7. *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* ist ein sporenbildendes Bakterium, welches weltweit vorkommt. Durch die Verschmutzung von Lebensmitteln durch sporenhaltige Erde oder Staub, kann *B. cereus* auf Lebensmittel übertragen werden.

Bei der emetischen Erkrankung führt die Aufnahme von *B. cereus* innerhalb weniger Stunden zu Übelkeit und Erbrechen, die Erkrankung ist nach ein paar Tagen meist selbstlimitierend.

Bei der Durchfall Erkrankung treten nach 6- 24 Stunden nach Aufnahme durch das Auskeimen der Sporen im Dünndarm, Durchfall und Bauchkrämpfe auf. Auch diese Form gilt als selbstlimitierend (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2020).



## **1.4. Fragestellung für die Diplomarbeit**

In dieser Diplomarbeit wurden in einem österreichischen Schlachthof, zu dem auch ein Zerlegebetrieb gehört, die Auswirkungen des hauseigenen Schockfrosters auf die Mikrobiologie, Farbveränderungen und die Textur von Rind- und Schweinefleisch untersucht.

Es soll der Frage nachgegangen werden, welche Mikroben sich nach der Schockfrostung in vitalem (kultivierbaren) Zustand am Fleisch befinden, ob pathogene Keime detektierbar sind und wie sich die Farbe und Textur des Fleisches verändern. Unsere Hypothese ist, dass sich die kultivierbare mikrobielle Diversität am Fleisch nach dem Schockfrostern verändert (geringer wird), aber die Schockfrostung (Schockfrosttunnel, 4-6min bei  $-70^{\circ}\text{C}$  -  $-90^{\circ}\text{C}$ ) alleine für viele Kommensalen und Verderbs-verursachende Mikroorganismen nicht ausreicht, um sie abzutöten.

## **2. Material und Methodik**

### **2.1. Betrieb und Probenentnahme**

Auf einem österreichischen Schlachthof wurden insgesamt 80 Fleischproben entnommen, um die Auswirkungen des Schockfrostens auf Fleisch zu untersuchen. Das Fleisch wurde entsprechend der Charge, welcher sie entnommen wurden, sowie ihrem Zustand (vorgefroren vs. nicht vorgefroren) und der Dauer der Schockfrostung (4 Minuten vs. 6 Minuten) eingeteilt. Gruppe 1 beinhaltet 13 Proben, wovon Probe 1- 10 Rindfleischproben sind, welche 4 Minuten durch den Schockfroster bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelaufen sind. Bei Probe 11 bis 13 handelt es sich um Kontrollproben (auch Rindfleisch), die nicht durch den Schockfroster gelaufen sind. Gruppe 1 beinhaltet ausschließlich Hühnersteaks vom Jungstier (siehe Appendix Abbildung 1), 12 Tage nach Zerlegung. Die Steaks waren nicht vorgefroren.

Gruppe 2 beinhaltet 14 Proben (Probe 14 bis 25), wovon Probe 14- 23 Proben sind, die bereits vorgefroren waren, bei  $4^{\circ}\text{C}$  komplett aufgetaut wurden, um dann 4 Minuten bei  $-70^{\circ}\text{C}$  schockgefrostet zu werden. Probe 24 und 25 stellen wieder Kontrollproben (Proben von frischen Hühnersteaks) dar, die nicht durch den Schockfroster gelaufen sind. Gruppe 2 beinhaltet auch nur Hühnersteaks vom Jungstier (siehe Appendix Abbildung 2).

Gruppe 3 beinhaltet 10 Proben (Probe 26 bis 35). Die Steaks aus Gruppe 3 entspringen den selben Fleischstücken wie jene in Gruppe 1 (siehe ebenfalls Appendix Abbildung 1), das Fleisch wurde aber 6 Minuten (anstatt 4 Minuten in Gruppe 1) bei -70°C schockgefrostet. Kontrolliert wurden diese Gruppe zu denselben Kontrollproben wie Gruppe 1.

Gruppe 4 beinhaltet 10 Proben (Probe 36 bis 45). Diese Gruppe beschreibt Hüftsteaks vom Jungstier (siehe Appendix Abbildung 3), welche vorgefroren war und bei 6 Minuten bei -70°C schockgefrostet wurde. Kontrolliert wurde diese Gruppe zu den Kontrollgruppen von Gruppe 2.

Gruppe 5 beinhaltet 10 Proben (Probe 46 bis 55, zusätzlich Probe 55.1), wovon Probe 46- 52 Schweinefleischproben sind, welche nicht vorgefroren waren und als ganzer Schopf 6 Minuten bei -70°C schockgefrostet wurden. Probe 53 bis 55 sind Kontrollproben (auch Schweinefleisch), die nicht durch den Schockfroster liefen. Die Probe 55.1 gehört auch zu Gruppe 5, diese wurde nachträglich ins Nummerierungssystem eingefügt und ist von selber Qualität und Bearbeitung wie Proben 46- 52.

Gruppe 6 beinhaltet 3 Tupferproben (Probe 56 bis 58), die direkt vom Schockfroster (Abbildung 1) entnommen wurden, um den mikrobiologischen Zustand des Gerätes zu untersuchen. Probe 56 wurde am Förderband genommen (Abbildung 2), Probe 57 von der Plastikschürze (Abbildung 2) und Probe 58 von der Einlauftasse (Abbildung 3) unter dem Förderband des Schockfrusters.

Gruppe 7 beinhaltet 6 Proben (Probe 59 bis 64). Gruppe 7 beinhaltet Oberflächenstücke jener Hüftsteaks, die vorgefroren, aufgetaut und 6 Minuten bei -70°C schockgefrostet (Gruppe 4) wurden.

Gruppe 8 beinhaltet 16 Proben (Probe 65 bis 80). Die Gruppe beinhaltet ganze Steaks vom Rind (Probe 71- 76), und Schwein (Probe 65- 70), welche bei -90°C für 4 Minuten schockgefrostet wurden. Bei den Proben 66, 68, 70 handelt es sich um Schweinefleisch-Kontrollproben, die nicht durch den Schockfroster liefen. Probe 72, 74 und 76 sind Rindfleisch-Kontrollproben, die ebenfalls nicht durch den Schockfroster liefen.

Gruppe 9 beinhaltet 4 Proben (Probe 77 bis 80). Die Proben 77 und 78 wurden von den Oberflächen (Ober und Unterseite) eines ganzen Rostbratens (Rindfleisch) genommen (siehe Appendix Abbildung 4). Die Proben 79 und 80 beschreiben die Oberflächen (Ober- und Unterseite) eines ganzen Schopfes (Schwein) (siehe Appendix Abbildung 5).

Die Proben von Gruppe 8 und 9 wurden nachträglich entnommen um einen Vergleich zu den Ergebnissen der zuvor entnommenen Proben (Gruppe 1 bis 7) mit ganzen Schopfstücken (Gruppe 8 und 9) zu haben.

## 2.2. Der Schockfroster

Für die Schockfrostung wurde ein Kryogener Gefriertunnel des Typs L8-106 der Firma Linde (Abbildung 1, 2 und 3) verwendet, dabei handelt es sich um eine Sonderanfertigung für den Schlachtbetrieb.



Abbildung 1: Hauseigener Schcofroster in Seitenansicht

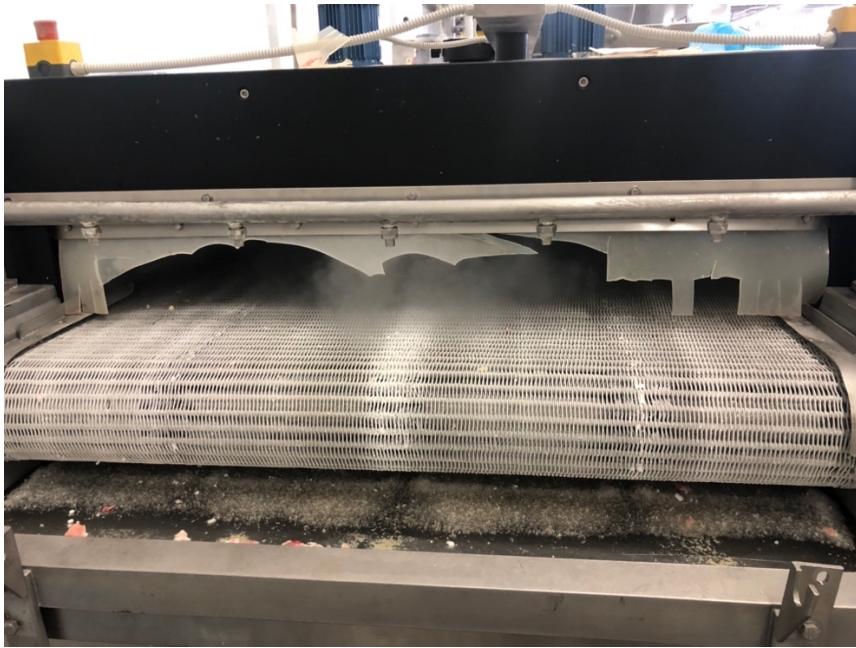


Abbildung 2: Nahaufnahme des beprobten Förderbandes und der Einlauftasse des Schockfrosters



Abbildung 3: Beprobte Plastikschürze und Einlauftasse des Schockfrosters

## **2.3. Probenverarbeitung**

Alle 80 Fleischproben wurden Vorort hinsichtlich ihrer Farbe und der Eindringtiefe der Kristallisierung beurteilt. Zur Farbbestimmung wurde nach ISO- Methode ein Pantone-Farbfächer benutzt. Unter Pantone- Farben versteht man ein weltweit eingesetztes Farbsystem der US- Firma Pantone LLC. Es dient der systemischen Einteilung von Farben und Pigmenten (Pantone.com).

Die Eindringtiefe der Kristallisierung wurde jeweils an der Ober- und Unterseite jeder Probe mittels Lineal vermessen. Im Zuge der Messungen wurden mit einem Skalpell Proben des Fleisches für die weitere Untersuchung entnommen und in sterile 50ml Falcon Tubes gefüllt. Die Proben wurden auf Eis gekühlt an die Veterinärmedizinische Universität zur weiteren Verarbeitung gebracht.

Im Labor wurde jede Probe gewogen und mit der entsprechenden Menge Peptonwasser (225 ml pro 25g) in einen Stomacher Beutel überführt. Gepufftes Peptonwasser wird für die Voranreicherung von Bakterien aus Lebensmitteln und anderen Lebensmittel verwendet. Das Nährmedium entspricht der ISO, der DIN EN 12824 und der DIN 38414 (DEV) und dem Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (wie vom Hersteller empfohlen; Oxoid Handbuch, S. 261). Anschließend wurde jeder Beutel mit der Einstellung „normal“ für 2x 2 Minuten mit einem Labor- Homogenisator (Stomacher) homogenisiert. Das resultierende Proben- Gemisch wurde anschließend aus den Stomacher Beutel in zwei 50ml Falcon Tubes überführt. Eine Hälfte der Probe dient der Weiterverarbeitung für mikrobiologische Untersuchungen, die andere Hälfte wurde für die spätere DNA Extraktion eingefroren.

### **2.3.1. Mikrobiologie**

Für die mikrobiologische Untersuchung der Proben wurde jede Probe im Verhältnis 1:10 verdünnt bis zu Verdünnungsstufe 6. Danach wurden die Proben mit entsprechender Verdünnungsstufe auf verschiedene Agar- Medien aufgetragen. Die Proben 1- 55, 55.1, 59- 64 wurden jeweils auf TSA, VRBD und APT Agar aufgetragen, die Proben 56- 58 (Tupferproben) nur auf TSA Agar, da für diese Proben in weiterer Folge eine Hochdurchsatzsequenzierung geplant ist.

Um die Keimzahl abschätzen zu können und so die optimale Verdünnungsstufe für die Ausplattierung auf den verwendeten Agarmedien zu ermitteln, wurde vor der Arbeit mit den richtigen Proben ein Vorversuch mit Testproben durchgeführt (Abbildung 4).

Für den TSA Agar wurde Verdünnungsstufe 4 und 5 gewählt, für den APT Agar Verdünnungsstufe 4 und für den VRBD Agar Verdünnungsstufe 1 und 2.

Die TSA und APT Agarplatten wurden 24 Stunden bei 30°C aerob bebrütet. Die VRBD Agarplatten wurden 24 Stunden bei 37°C aerob bebrütet.

Nach der Bebrütung der Agar Platten wurden von den TSA Platten Kolonien ausgezählt um daraus die KBEs zu berechnen.

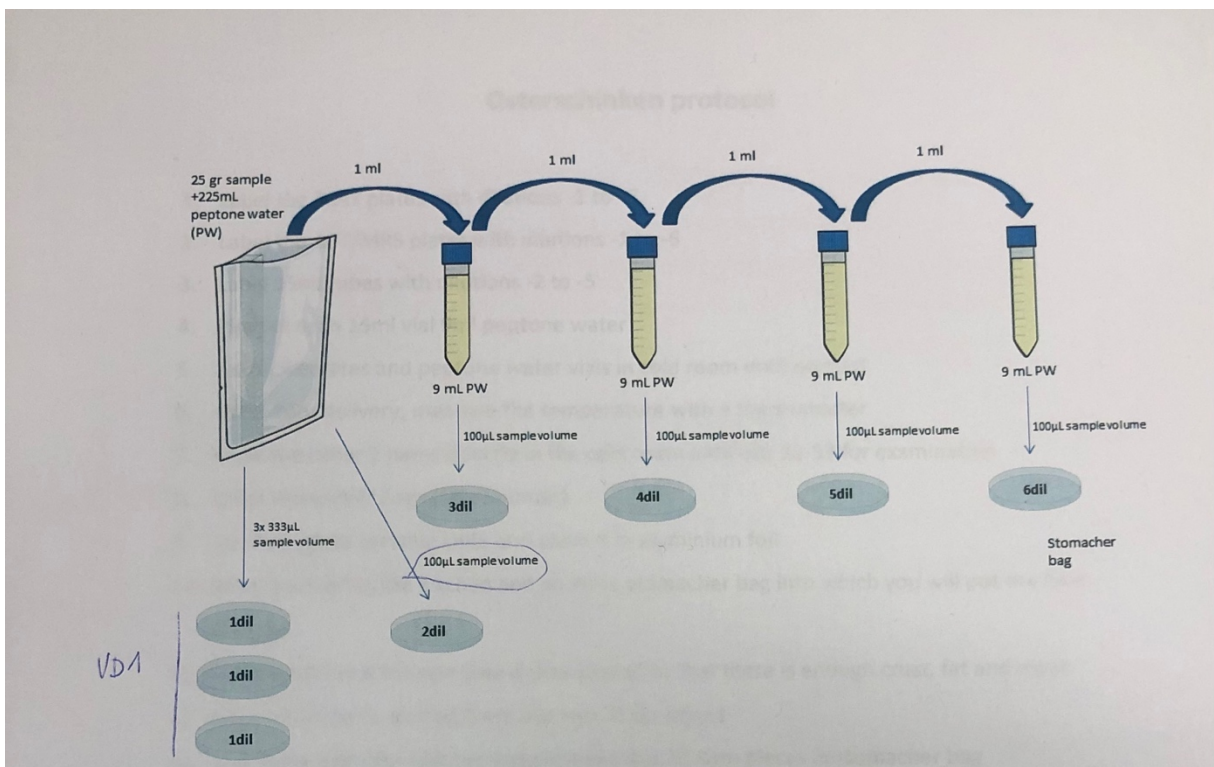


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Versuchsplanung für die Verdünnungsreihen die verwendet wurden, um bei Testproben den optimalen Verdünnungsfaktor für Ausplattierung zu finden. Verwendet wurden die 1., 2., 4. und 5. Verdünnungsreihen für die Ausplattierung.

### 2.3.1.1. Agarmedien

#### 2.3.1.1.1. TSA

Tryptic Soy Agar (TSA) wird verwendet für die Kultivierung von einem großen Spektrum an Mikroorganismen (darunter pathogene Keime wie *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* oder *Salmonella Typhimurium*). TSA gilt als unselektives Medium (United States Pharmacopeial Convention, 2007).

#### 2.3.1.1.2. VRBD

Violet Red Bile Glucose Agar (VRBD) ist ein selektives Medium und wird angewandt für die Kultivierung von *Enterobacteriaceae* in Lebensmitteln. Die Gruppe der *Enterobacteriaceae* beinhaltet Laktose-fermentierende coliforme Bakterien, nicht-Laktose fermentierende Stämme von *Escherichia coli* und nicht-Laktose fermentierende Spezies wie *Salmonella* und *Shigella* (United States Pharmacopeial Convention, 2007).

#### 2.3.1.1.3. APT

All Purpose Tween Agar (APT) ist ein selektives Medium und wird für die Kultivierung von *Lactobacillus* und anderen Organismen angewandt, welche Kohlenhydrate verstoffwechseln (Hall et al., 2001).

### 2.3.1.2. Berechnung von Kolonie bildenden Einheiten (KBE)

KBE oder CFU (Colony forming units) ist eine Einheit, welche die Anzahl von Mikroorganismen in einer Probe angibt. Um die koloniebildenden Einheiten zu berechnen wird folgende Formel angewandt:

$$\text{KBE/g} = (\text{CV}_n \times \text{V}_n + \text{CV}_{n+1} \times \text{V}_{n+1} + \text{CV}_{n+2} \times \text{V}_{n+2}) \div d$$

CV<sub>n</sub>.. Summe gezählter Kolonien aller Agar Platten einer Verdünnungsstufe

V<sub>n</sub> + x.. Verdünnungsfaktor der Verdünnungsstufe

d.. Anzahl aller Platten

### 2.3.1.3. Gewinnung von Isolaten

Um eine Übersicht über die mikrobielle Diversität in den Proben zu bekommen, wurde von Probe 5, 10, 16, 24, 35, 41, 45, 51, 53 und den Tupferproben 56, 57, 58 zusätzlich zu den KBE Bestimmungen Einzelkolonien gepickt und auf den jeweiligen Agarmedien in einem etwa 0,5 x 0,5 cm großen Feld ausgestrichen und neu bebrütet. Die VRBD Agarplatten (Abbildung 5) wurden bei 24 Stunden bei 37°C, die APT und TSA Agarplatten (Abbildung 6) 24 Stunden bei 30°C bebrütet. Insgesamt wurden 125 Isolate gepickt.

Nach Bebrütung wurden die Isolate visuell auf Kontaminationen überprüft und danach mit der Chelex Methode die DNA extrahiert.

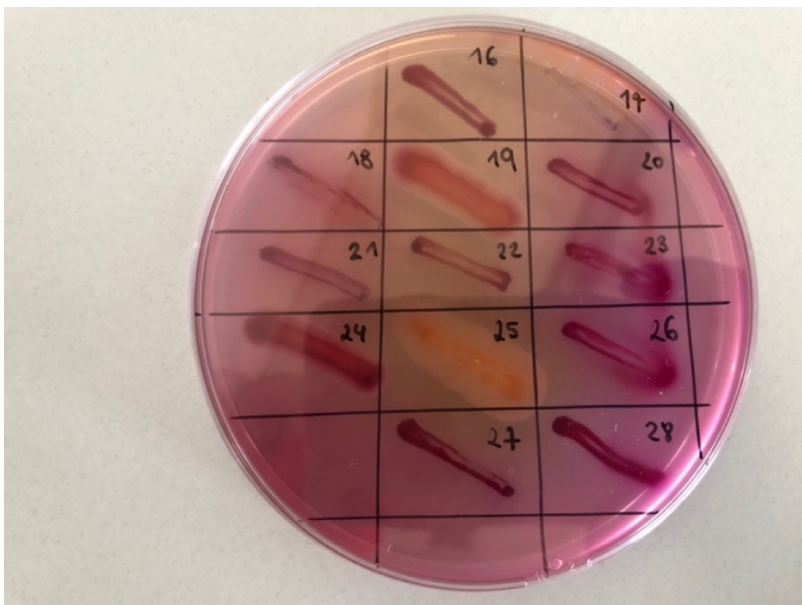


Abbildung 5: Einzelkolonien mit unterschiedlichen Morphologien auf dem VRBD Agar



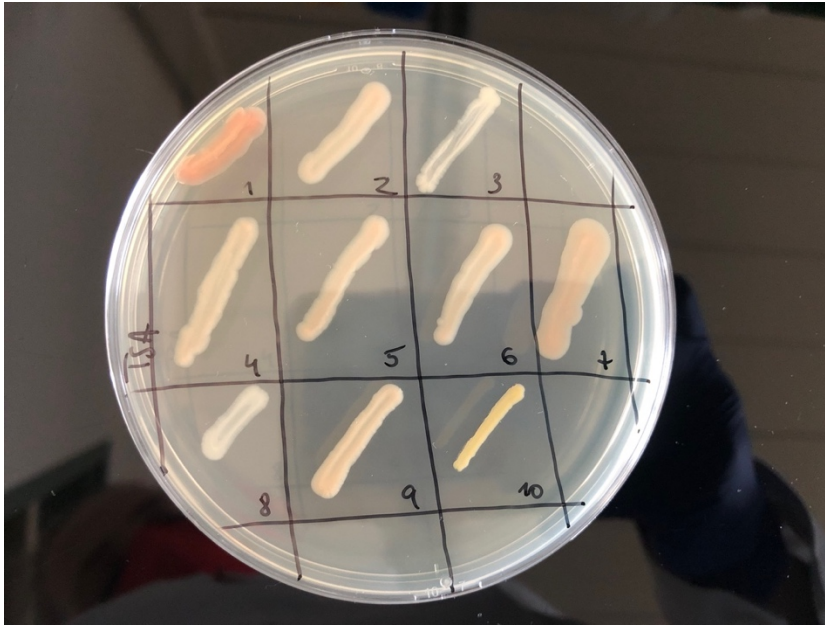


Abbildung 6: Einzelkolonien mit unterschiedlichen Morphologien auf dem TSA Agar

#### 2.3.1.4. Erstellung einer Stammsammlung

Für die Stammsammlung wurde jedes Isolat auf der Platte einzeln mit einer Öse vorsichtig von dem jeweiligen Feld abgehoben und in einem 2ml Tube mit 500µL 50% Glycerol und 500µL BHI (Brain Heart Infusion) vermischt und so zur Langzeit- Lagerung vorbereitet. Die fertige Stammsammlung wurde anschließend in einem Karton bei -80°C gelagert (Abbildung 7).

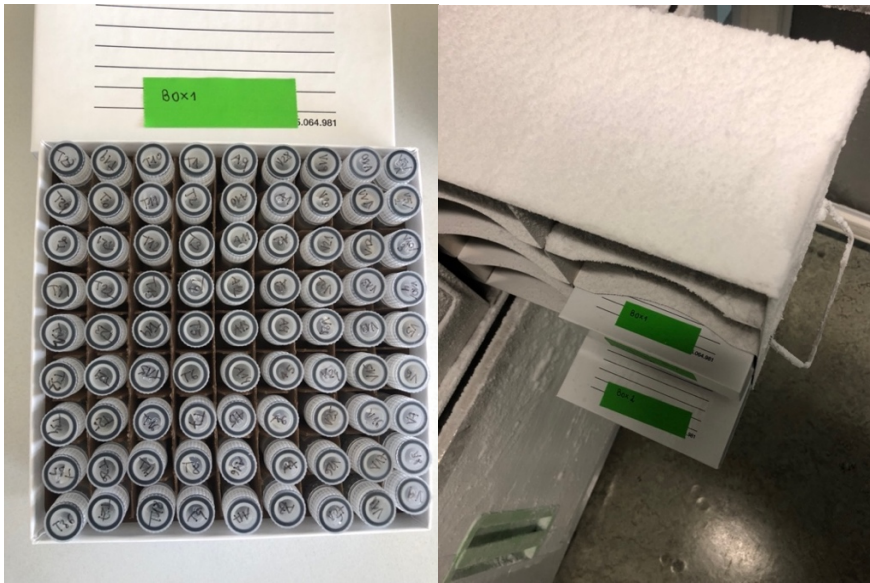


Abbildung 7: Stammsammlung, welche für Lagzeitlagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wird

#### 2.3.1.5. DNA Isolierung mit Chelex

Die DNA Isolierung mittels Chelex wurde parallel zur Stammsammlung durchgeführt, von jedem Isolat aus der Stammsammlung gibt es auch eine DNA Extraktion. Jedes Isolat wurde, wie schon bei der Stammsammlung beschrieben, einzeln mit einer Öse von dem jeweiligen Feld mit einer Kunststofföse vorsichtig abgehoben und in einem 2ml Tube mit 200  $\mu\text{L}$  Chelexlösung vermischt und gevortext. Anschließend wurde jedes Tube 10 Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und weiters 30 Sekunden bei 15.000 rpm zentrifugiert.

Nachdem die DNA eines jedes Isolates isoliert wurde, wurde eine 16S rRNA Gen PCR (Primerpaar: FP 616/ RP 1492) durchgeführt, um das Vorhandensein bakterieller DNA zu bestätigen.

#### 2.3.1.6. 16S rRNA Gen PCR

Für die PCR wurde ein Mastermix hergestellt. Dieser bestand aus Aqua dest., Puffer, Magnesiumchlorid, FP 616 (27F), RP 1492R, dNTPs und Taq Polymerase (Tabelle 3).

Die zuvor mittels der Chelexmethode extrahierten Proben werden hierfür verwendet. 2  $\mu\text{L}$  DNA Probe wurde mit 48  $\mu\text{L}$  des Mastermixes vermischt. Eine Positivkontrolle mit 2 $\mu\text{L}$  DNA von

*Listeria monocytogenes* und eine Negativkontrolle mit 2µL Aqua dest wurden angefertigt. Die fertig befüllten Tubes wurden in den Thermocycler eingesetzt und in einem PCR Programm mit folgenden Zyklen bearbeitet (Tabelle 4):

Tabelle 3: Herstellung eines Mastermix für die 16S rRNA Gen PCR

<b>Mastermix</b>	<b>End Konz.</b>	<b>Stock Konz.</b>	<b>1x (µL)</b>	<b>100x (µL)</b>
Aqua dest.			36,25	3625
10x puffer			5	500
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	50 mM	2	200
FP 616 (27F)	200 nM	10000 nM	1	100
RP 1492R	200 nM	10000 nM	1	100
dNTPs	0,25 mM	5 mM	2,5	250
Taq polymerase	0,625 U	5 U/µL	0,25	25
Gesamt			48	4800
Reaktionsvolumen			50	50

Tabelle 4: Ablauf der Zyklen der rRNA Gen PCR

<b>PCR Konditionen</b>	<b>Zyklen Anzahl</b>
95°C - 5 Minuten	1
94°C - 40 Sekunden	
52°C - 40 Sekunden	35
72°C - 1 Minute	
72°C - 7 Minuten	1
Lagerung bei 4°C	

### 2.3.1.7. Gelelektrophorese

Um die DNA in den Proben zu visualisieren, wurde im Anschluss an die 16S rRNA Gen PCR eine Gelelektrophorese durchgeführt (Abbildung 8).

Für diese wurde im ersten Schritt ein Gel angefertigt. Für das Gel wurden 1,5 g Agarose universal mit 100 ml TAE (Tris- Acetat- EDTA Puffer) in einem Reagenzglas zusammengefügt und 3 Minuten bei maximaler Hitze in der Mikrowelle erhitzt. Das Gemisch wurde anschließend unter kaltem Wasser abgekühlt, bevor 3,5  $\mu\text{L}$  PEK- Green hinzugefügt wurden, um die DNA sichtbar zu machen. Das Reagenzglas wurde kurz geschwenkt und anschließend in eine Form mit 2 Reihen mit je 20 Taschen, gefüllt und ausgekühlt.

Nach Festwerden der Gele, wurden diese mit ausreichend Flüssigkeit (TAE) in die Elektrophoresekammer gelegt, sodass ihre Oberfläche komplett unter Flüssigkeit steht.

Um die Proben zu beschweren, wurde jede Probe zu je 5 $\mu\text{L}$  mit jeweils 2 $\mu\text{L}$  SLB (Sample Loading Buffer) vermischt und anschließend fortlaufend mit je 5 $\mu\text{L}$  in die Geltaschen pipettiert.

Ein Marker mit 100 Basenpaaren (bp) wurde pro Reihe mit 5  $\mu\text{L}$  in die erste Tasche pipettiert.

In die letzte Tasche einer jeden Reihe wurde die Negativkontrolle zu 5 $\mu\text{L}$  pipettiert.

Wenn alle Proben in die Geltaschen eingefügt waren, wurde die Gelelektrophorese bei 120 Volt für 30 Minuten durchgeführt und die Gele anschließend fotografiert, um die Ergebnisse zu dokumentieren.

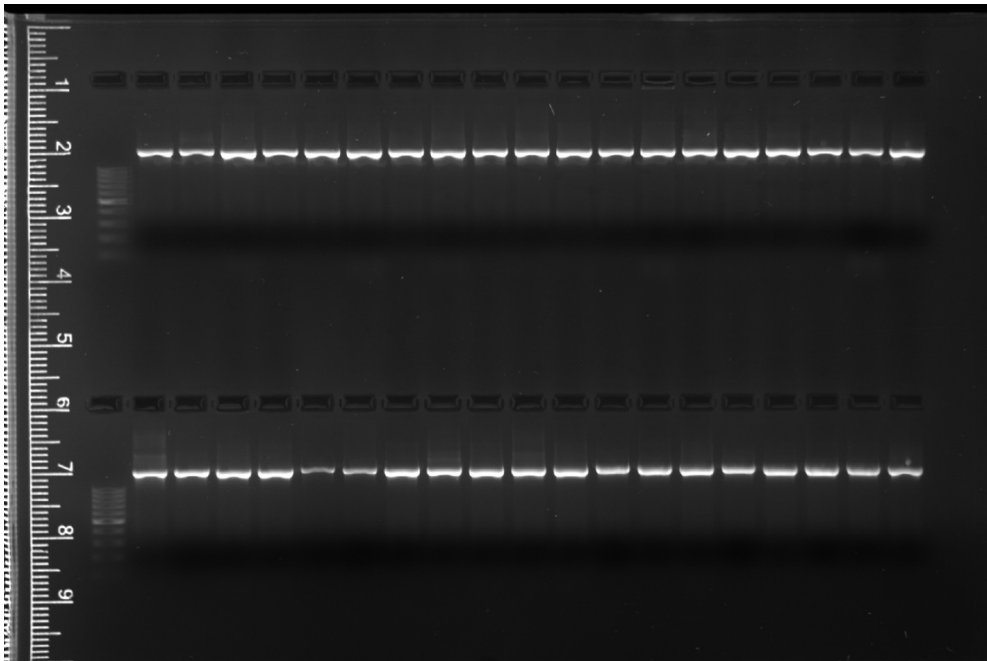


Abbildung 8: Um die Amplifikation der Proben DNA zu visualisieren, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt

Abbildung 8 zeigt deutlich, dass bei allen Proben 16S rRNA Amplifikate vorhanden sind.

#### 2.3.1.8. Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP

Um möglichst diverse Isolate für die Sequenzierung auszuwählen, wurde eine RFLP durchgeführt. Für die RFLP wurden die gleichen PCR Produkte, wie für die zuvor durchgeführte Elektrophorese verwendet. RFLP ist eine Polymorphismus Detektion, welche aus Variationen in den DNA Sequenzen resultiert, und durch Restriktionsenzyme am Gel visualisiert wird (ThermoFisher Scientific). Mittels RFLP können die verschiedenen Längen der Fragmente visualisiert werden, nachdem die DNA mittels Verdauungsenzymen verdaut wurde. Für die Herstellung eines RFLP- Mix wurde Nuclease free water, 10x Fast Digest Green Buffer und Fast Digest enzyme (ALU I) gemischt.

Mit einer Multipipette wurden jeweils 20µL des RFLP Mix und dazu 10uL DNA (PCR Produkt) in jedes Tube pipettiert (insgesamt 108 Proben).

Anschließend wurden die Proben im Thermocycler mit dem RFLP Programm (15 Minuten 37°C, 5 Minuten 65°C) weiterverarbeitet. Danach wurden die Proben bis zur Weiterverwendung bei 4°C aufbewahrt.

Um die DNA zu visualisieren wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (Abbildung 9). Hierfür wurde ein 2%iges Gel (2g Argarose + 100ml TAE + 3,5µL Peq Green) hergestellt. In jedem Gel wurden 5µL eines 100bp Markers und je Kammer 10µL jeder Probe pipettiert. Insgesamt wurden 6 Gele angefertigt und 90 Minuten bei 80 Volt bearbeitet.

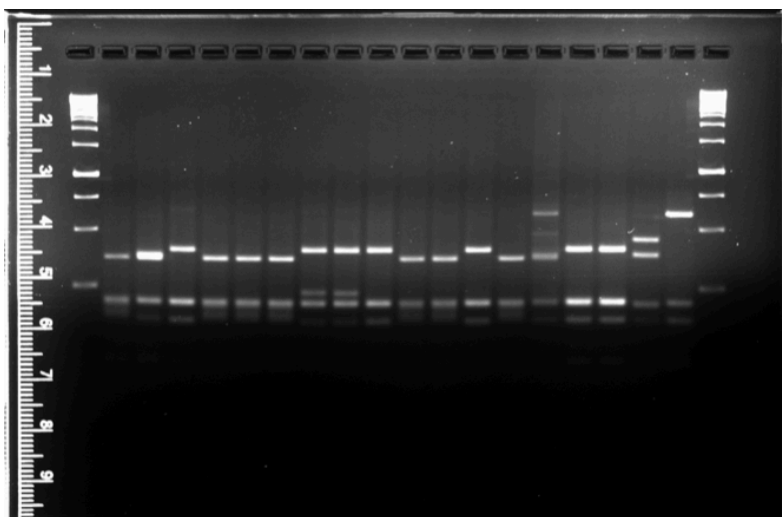


Abbildung 9: Um die Fragmente der RFLP zu visualisieren, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt

Abbildung 9 zeigt die fertige Gelelektrophorese nach durchgeführter RFLP. Die RFLP soll dazu dienen, genetisch gleiche Isolate (erkennbar an den Fragmentlängen) zu detektieren, um so die Auswahl für die spätere Sanger Sequenzierung einzugrenzen und möglichst taxonomisch diverse Isolate für die Sequenzierung zu verwenden. Als Orientierung für die Fragmentlängen wurde ein 100bp Marker (erste und letzte Tasche) verwendet. Für die Auswertung vergleicht man die Schnittbilder aller Proben miteinander.

#### 2.3.1.9. Sanger Sequencing von Isolaten

Die Sanger Sequenzierung ist nach Frederick Sanger (1918- 2013) benannt und wird hauptsächlich in der Genetik und Biochemie angewandt. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung der Basenabfolge in einem bestimmten DNA Molekül.

Der Sequenziervorgang kann in drei Schritte eingeteilt werden. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA durch Denaturierung (bei etwa 94°C, 1 Minute) aufgebrochen, um zwei Einzelstränge zu erhalten. Das Annealing wird bei 50°C 15 Sekunden lang durchgeführt. Bei

diesem Schritt wird, im Gegensatz zur PCR nur ein Primer eingesetzt, sodass entweder ein forward- primer oder ein reverse- primer binden kann. Bei der Extensionsreaktion wird die Temperatur für die taq- Polymerase wieder erhöht werden (auf 60°C für 4 Minuten). Neben der Polymerase setzte man einen Mix aus vier dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphat) und vier ddNTPs (Dideoxyribonukleosidtriphosphat) ein. Die ddNTPs sind hierbei mit Fluoreszenzmarkern markiert, sodass sie in in jeweils verschiedenen Farben erscheinen (rot, schwarz, grün, blau) (Furutani et al., 2022).

Von insgesamt 125 Isolaten wurden 60 Isolate über die RFLP ausgewählt und zum Sanger Sequencing verschickt (LGC Genomics, Berlin, Germany). Von den 60 eingeschickten Isolaten wiesen 54 Sequenzierungen eine gute Qualität auf und wurden in die unten angeführte Auswertung miteinbezogen.

#### 2.3.2.0. Statistik

Für die statistische Auswertung wurden nicht- parametrische Tests verwendet, da die Stichprobe nicht groß genug war, um Normalverteilung zu bestätigen. Von Signifikanz spricht man bei einem p- Wert von  $< 0,05$ .

Für die Auswertung der Einfriertiefe wurde ein Wilcox (Mann-Whitney U Test) durchgeführt.

Für die Auswertung der Gesamtkeimzahl wurde ein Kruskal Wallis Test durchgeführt, da mit diesem Test mehr als 2 Gruppen verglichen werden können.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Fleischfarbe vor und nach dem Schockfrost

Die farbliche Auswertung der Proben zeigt eine teilweise sehr deutliche Veränderung der Fleischfarbe nach dem Schockfrost. Die frischen, nicht vorgefrorenen Rindfleischstücke veränderten die Farbe nicht (Abbildung 10), im Gegensatz zu den bereits vorgefrorenen und aufgetauten Rindfleischstücken, welche nach dem Schockfrost eine deutlich dunklere Farbe hatten (Abbildung 11). Weiters zeigten insbesondere die vorgefrorenen Fleischstücke teils graue Farbveränderungen an manchen Stellen (Abbildung 12), welche allerdings nach ein paar Stunden wieder verblassten.

Von insgesamt 52 Proben wurde die Farbe vor und nach dem Schockfrost bestimmt. Von 52 Proben waren 51 Rindfleisch, die andere Probe war ein ganzer Schopf vom Schwein, da dieser als ganzes Stück schockgefrostet wurde.

Bei den Rindfleischproben war die vorherrschende Farbe vor dem Schockfrost mit 17 Stücken P7628 (Abbildung 13). Die zweithäufigste Farbe vor dem Schockfrost ist mit jeweils 6 Stücken P7626 und P7627, welche einer bis zwei helleren Nuancen entspricht. Nach dem Schockfrost wiesen 10 Rindfleischstücke, die zuvor die Farbe P7628 hatten, eine um 3 Nuancen dunklere Farbe auf (P7629) (Abbildung 13). Vor allem die Rindfleischstücke die 6 Minuten schockgefrostet wurden, waren von der Farbveränderung betroffen. 3 Rindfleischstücke der 17 Stücke mit der Farbe P7628 wiesen nach der Schockfrostung graue Verfärbungen mit der Farbe P7616 auf (Abbildung 13). Diese traten vor allem an der Oberseite auf, welche direkt vom Kältestrom des Schockfrosters getroffen wird. Betroffen von dieser Farbveränderung waren ausschließlich Rindfleischstücke, die vor dem Schockfrost schon einmal eingefroren und wieder aufgetaut wurden.

Der ganze Schopf vom Schwein wies zuvor eine Farbe von 7606 auf (siehe Abbildung 14, 15). Nach dem Schockfrost (6 Minuten bei -70°C) konnten multiple Stellen festgestellt werden, an denen sich die Farbe um 3 Nuancen dunkler (7609) verfärbt hat (Abbildung 14, 15).

Sowohl die Farbveränderungen des Rindfleisches, als auch die des Schweinefleisches sprechen dafür, dass eine längere Schockfrostung in Korrelation zu Farbveränderungen steht. Bei beiden Sorten Fleisch veränderte sich die Farbe nach 6 Minuten Schockfrostung um 3



Nuancen dunkler. Bei Fleisch, das zuvor eingefroren und aufgetaut wurde, konnten graue Farbveränderungen an der Oberseite festgestellt werden.



Abbildung 10: Keine Verfärbungen auf einem Hüftsteak vom Rind, das 4 Minuten schockgefrostet wurde



Abbildung 11: Sichtbare Veränderungen nach dem Schockfrostern auf einem Hüftsteak vom Rind, das vorgefroren war und 6 Minuten schockgefrostet wurde. Diese Veränderungen verschwanden nach ein paar Stunden wieder



Abbildung 12: Sichtbare graue Verfärbungen an den Hüftsteaks vom Rind, die vorgefroren waren und 6 Minuten schockgefrostet wurden. Auch hier verschwanden die Verfärbungen nach ein paar Stunden wieder





Hellste Farbe		Pantone 7625
Dünkleste Farbe		Pantone 7629
Häufigste Farbe		Pantone 7628
Graue Farbe		Pantone 7616

Abbildung 13: Farbvarianten des Rindfleisches im Überblick



Abbildung 14: Sichtbare farbliche Veränderungen am ganzen Schopf vom Schwein, der 6 Minuten schockgefrostet wurde






Hellste Farbe		Pantone 7606
		
Dünkleste Farbe		Pantone 7609
		
Häufigste Farbe		Pantone 7606

Abbildung 15: Farbvarianten des Schweinefleisches im Überblick

### 3.2. Einfriertiefe durch das Schockfrostern

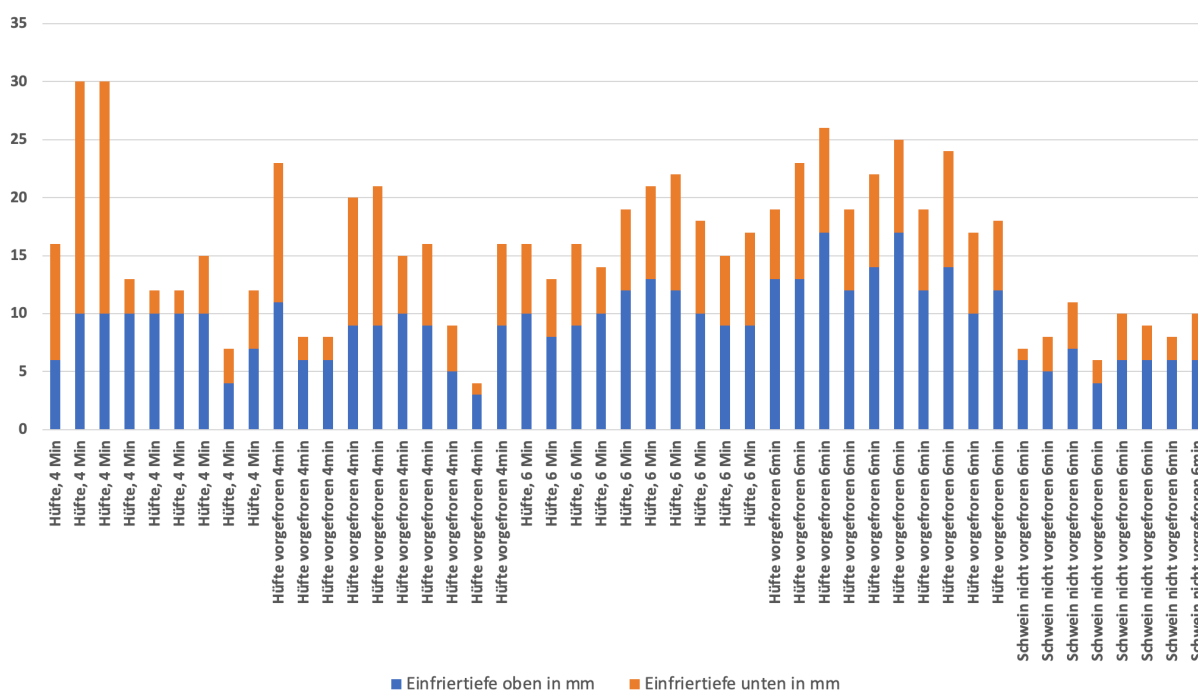


Abbildung 16: Gruppenweise Darstellung der Einfriertiefe

Vergleicht man die Einfriertiefe der Ober- und Unterseiten der Proben (Abbildung 16), fällt auf, dass die Oberseite eine höhere Eindringtiefe der Frostung zeigt, als die Unterseite des Fleisches.

Weiters ist erkennbar, dass die Hüftsteaks, die bereits vorgefroren und wieder aufgetaut waren, bei den meisten Proben eine höhere Eindringtiefe aufweisen.

Die Proben die 6 Minuten lang schockgefrostet wurden, zeigen bei der Mehrheit der Proben eine höhere Einfriertiefe, als die Proben, die 4 Minuten im Schockfroster waren.

Vergleicht man Rind- mit Schweinefleisch, zeigt das Schweinefleisch nach 6 Minuten Schockfrostung eine, fast um die Hälfte geringere, Einfriertiefe.

### 3.2.1. Vergleich zwischen 6 Minuten zu 4 Minuten Schockfrosterbehandlung

Im Vergleich der Rindfleischproben (4 Minuten und 6 Minuten im Schockfroster) zeigten die 6 Minuten- Proben (vorgefroren) eine signifikant höhere Einfriertiefe als die 4 Minuten- Proben ( $p= 0,0035$ ) (Abbildung 17).

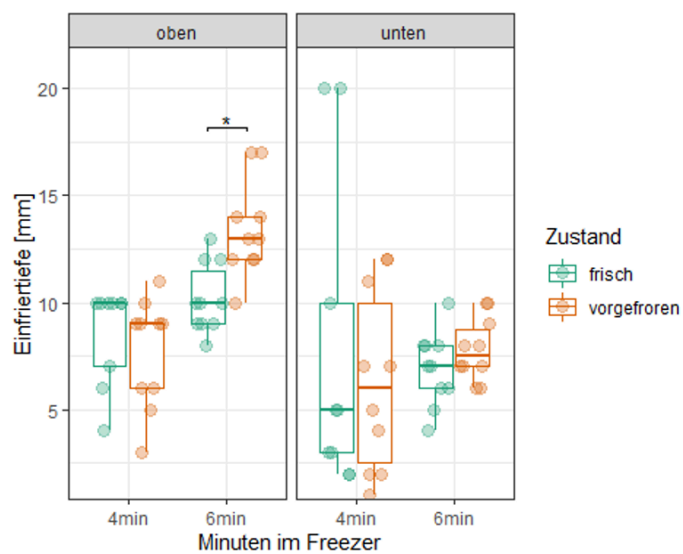


Abbildung 17: Statistischer Vergleich der Einfriertiefe von 4 Minuten zu 6 Minuten Schockfrostung

### 3.2.2. Vergleich zwischen Schweine- und Rindfleisch

Die Rindfleischproben zeigten eine signifikant höhere Einfriertiefe, als das Schweinefleisch ( $p=0,0004$ ) (Abbildung 18).

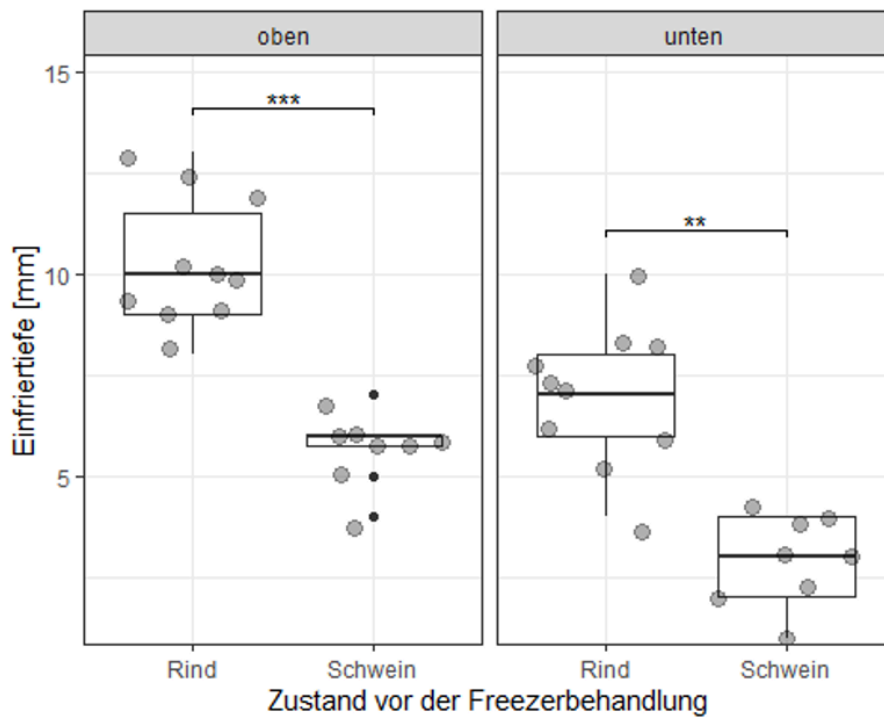


Abbildung 18: Statistischer Vergleich der Einfriertiefe von Rind- und Schweinefleisch nach 6 Minuten Schockfrostung

### 3.3. Mikrobiologie Ergebnisse am Fleisch

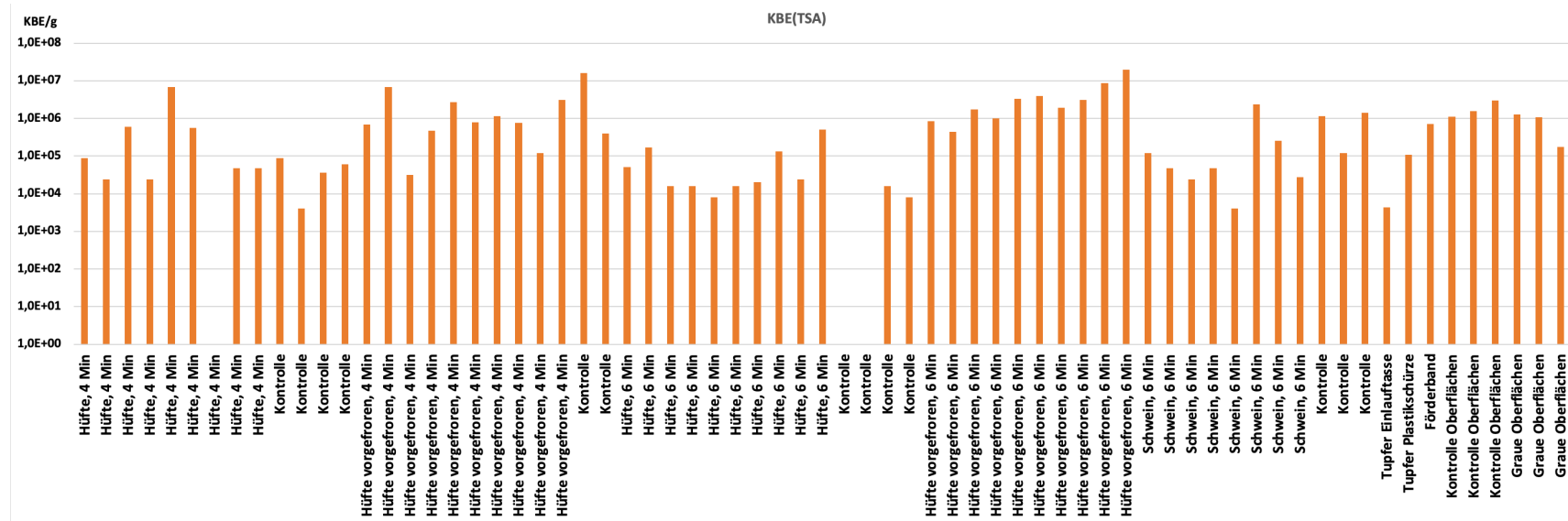


Abbildung 19: KBEs am TSA Agar

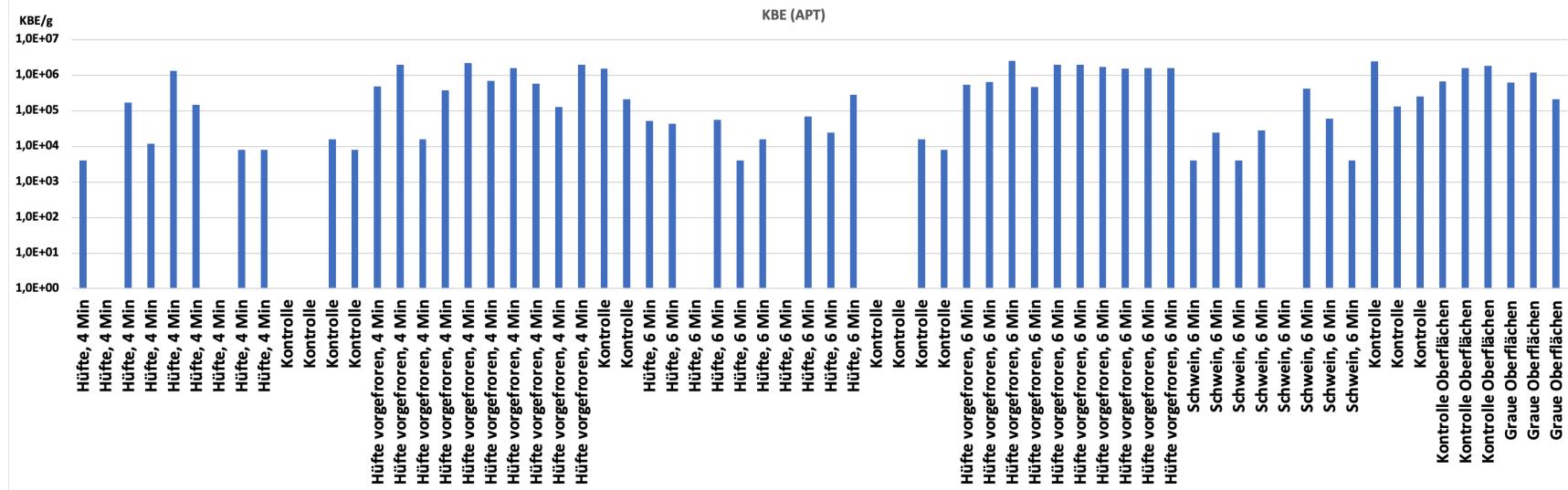


Abbildung 20: KBEs am APT Agar



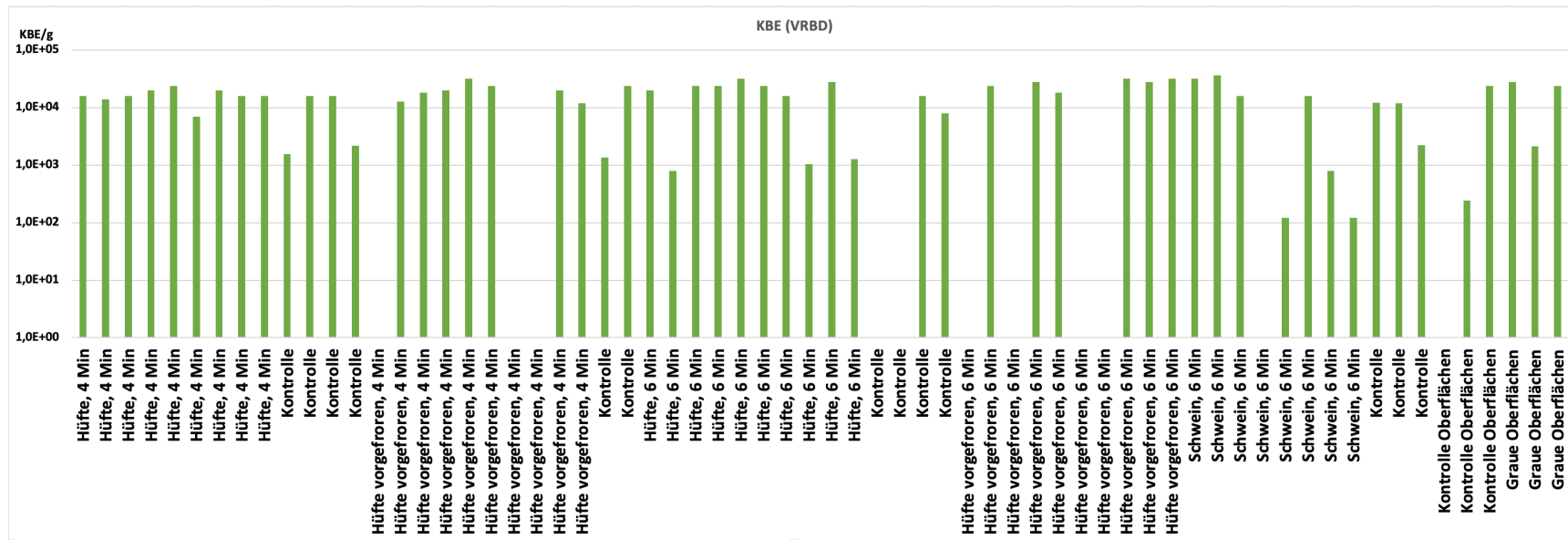


Abbildung 21: KBEs am VRBD Agar

Die mikrobiologische Auswertung der Proben zeigt, dass auf dem TSA- Agar zwischen  $10^7$  und  $10^8$  KBE gewachsen sind (Abbildung 19), auf dem APT- Agar zwischen  $10^6$  und  $10^7$  (Abbildung 20) und auf dem VRBD- Agar zwischen  $10^4$  und  $10^5$  (Abbildung 21).

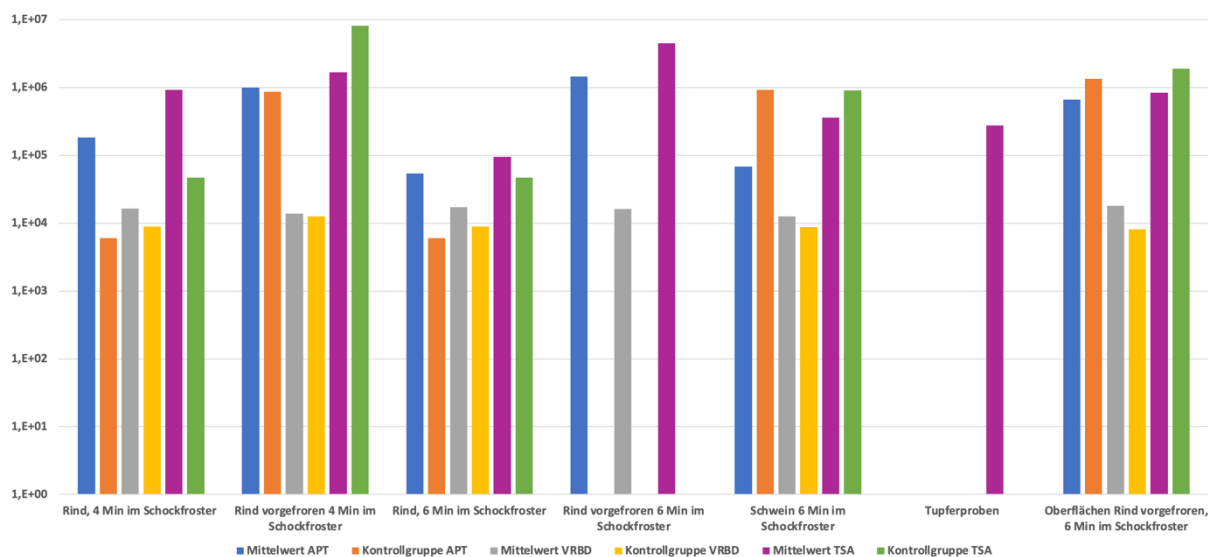


Abbildung 22: Gruppenweise Darstellung und Vergleiche der Proben und Mittelwerte der KBEs aller Agarmedien

Vergleicht man die KBEs gruppenweise miteinander (Abbildung 22), zeigen die Proben die 6 Minuten im Schockfroster waren, eine höhere Keimbelastung, als die Proben, die nur 4 Minuten schockgefrostet wurden. Weiters zeigen die Proben, die vor der Schockfrostung schon einmal eingefroren waren, eine höhere Keimbelastung, als die frischen Fleischstücke.

Die Keimbelastung der Tupferproben liegt zwischen  $10^3$  und  $10^7$  KBEs (Abbildung 22).

Die grau verfärbten Stellen der Fleischproben, zeigen keine höheren KBE Werte (Abbildung 19, 20, 21, 22).

### 3.3.1.1. Vergleich Kontrollen zu Proben

Die Kontrollproben zeigen eine niedrigere Keimbelastung, als die Proben, die schockgefrostet wurden. Der Vergleich weist aber keine Signifikanz auf (Abbildung 23).

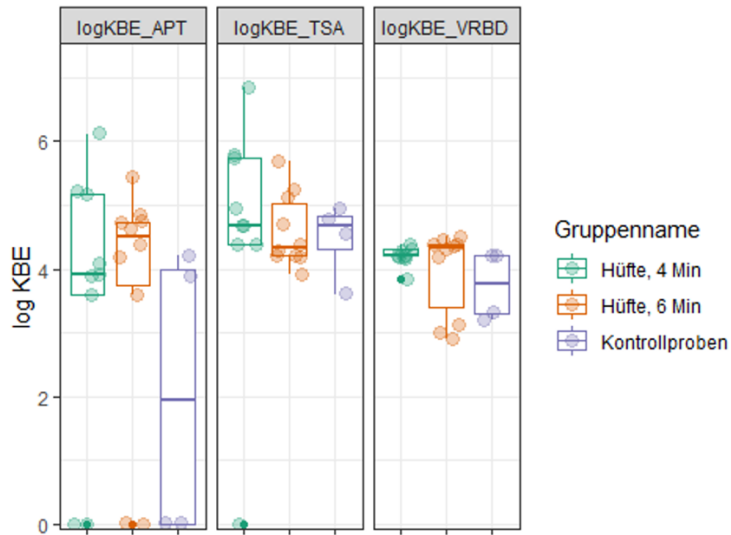


Abbildung 23: Statistischer Vergleich der KBEs von Kontrollen zu Proben

### 3.3.1.2. Vergleich frische und vorgefrorene Proben

Die vorgefrorenen Proben zeigen eine signifikant höhere Keimbelastung ( $p=0,0001$ ), als die frischen Proben (Abbildung 24).

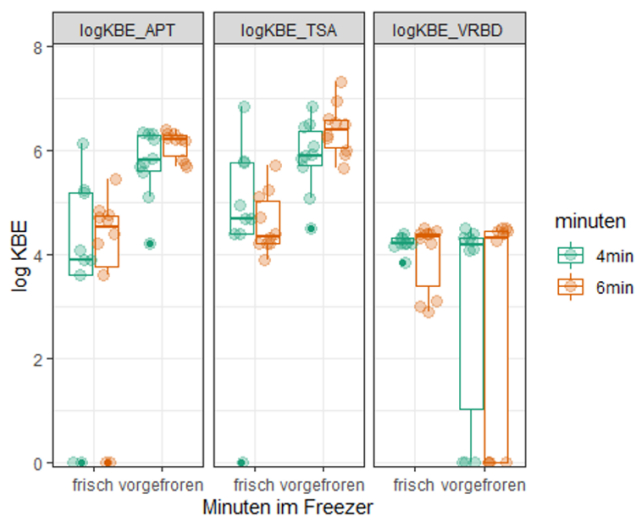


Abbildung 24: Statistischer Vergleich der KBEs von frischen und vorgefrorenen Proben, nach 4 und 6 Minuten Schockfrostung

### 3.3.1.3. Vergleich 4 und 6 Minuten im Schockfroster

Die Fleischproben, die 6 Minuten im Schockfroster waren zeigen eine höhere Keimbelastung, als die Proben, die 4 Minuten schockgefrostet wurden (Abbildung 25). Der Unterschied ist aber nicht signifikant.

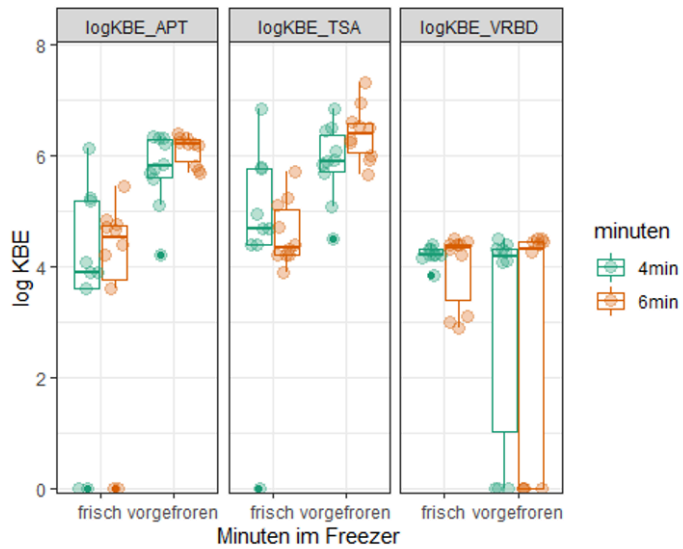


Abbildung 25: Statistischer Vergleich der KBEs von 4 und 6 Minuten Schockfrostung

### 3.4. Sanger Sequencing von bakteriellen Isolaten

#### 3.4.1. Vergleich der Isolat Sequenzen zur NCBI Datenbank

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mittels NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information) ausgewertet und in der unten angeführten Tabelle gezeigt (Tabelle 5).

Die Auswertung lässt eine Einteilung in die verschiedenen bakteriellen Genera zu (Abbildung 27). Mit 44% ist *Pseudomonas* am häufigsten vertreten, *Sphingobacter* folgt mit 11%. *Aeromonas*, *Psychrobacter* und *Carnobacterium* sind mit je 9% zu gleichen Teilen vertreten. Danach folgen *Brochothrix* und *Shewanella* mit je 4% und *Leuconostoc*, *Chryseobacterium*, *Glutamicibacter* und *Pseudoclavibacter* mit je 2% Anteil.

Es wurden verschiedene Verderbskeime isoliert, jedoch keine human Pathogene.

Tabelle 5: Ergebnisse der NCBI Auswertung

ISOLAT- NR.	WISSENSCHAFTLICHER NAME DES „BEST BLAST HITS“ (NCBI)	ACCESSION NR.	ÄHNLICHKEIT ZUM „BEST BLAST HITS“
V7	<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i>	NR_148764.1	99,48%
V9	<i>Pseudomonas peli</i>	NR_042451.1	98,84%
V11	<i>Aeromonas encheleia</i>	LR134376.1	99,74%
V17	<i>Psychrobacter sanguinis</i>	CP085990.1	99,83%
V21	<i>Pseudomonas ludensis</i>	KX186958.1	99,67%
V22	<i>Aeromonas salmonicida</i>	CP022426.1	99,75%
V28	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	LT629702.1	99,91%
A1	<i>Pseudomonas shahriarae</i>	CP077085.1	99,75%
A3	<i>Pseudomonas bubulae</i>	KX186949.2	99,49%
A5	<i>Pseudomonas gessardii</i>	KU657670.1	99,58%
A6	<i>Pseudomonas bubulae</i>	KX186949.2	99,67%
A7	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	KX186965.1	99,50%
A9	<i>Leuconostoc gelidum</i>	LC483550.1	100%
A10	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	LC065032.1	99,75%
A11	<i>Pseudomonas bubulae</i>	KX186949.2	99,66%
A12	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	NR_113587	99,75%
A15	<i>Carnobacterium divergens</i>	LC145556.1	99,92%
T1	<i>Shewanella putrefaciens</i>	NR_113582.1	99,06%
T5	<i>Pseudomonas bubulae</i>	KX186949.2	99,67%
T6	<i>Pseudomonas fragi</i>	LT629783.1	99,59%
T7	<i>Aeromonas encheleia</i>	LR134376.1	99,66%
T9	<i>Pseudomonas versuta</i>	CP012676.1	99,35%
T11	<i>Carnobacterium divergens</i>	LC145556.1	100%
T16	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	NR_113587.1	99,58%
T17	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	LC065032.1	99,83%
T20	<i>Pseudomonas paraversuta</i>	KX186982.1	99,84%
T22	<i>Psychrobacter arcticus</i>	NR_075054.1	99,49%
T24	<i>Carnobacterium divergens</i>	LC145556.1	99,16%
T25	<i>Chryseobacterium aahli</i>	NR_133722.1	98,74%
T29	<i>Shewanella putrefaciens</i>	NR_044863.1	98,98%
T32	<i>Psychrobacter luti</i>	NR_025532.1	99,49%
T34	<i>Pseudomonas brenneri</i>	KU647658.1	99,91%
T39	<i>Epilithonimonas ginsengisoli</i>	NR_149177.1	98,42%
T44	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	KX186965.1	99,50%
T48	<i>Aeromonas salmonicida</i>	CP022426.1	99,92%
T51	<i>Aeromonas encheleia</i>	LR134376.1	99,83%
T52	<i>Sphingobacterium faecium</i>	NR_113744.1	99,00%

T53	<i>Pseudomonas peli</i>	NR_042451.1	99,75%
T55	<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i>	NR_041636.1	98,27%
T56	<i>Psychrobacter maritimus</i>	NR_027225	99,40%
T57	<i>Sphingobacterium anhuiense</i>	NR_044477.1	98,78%
T58	<i>Glutamicibacter bergerei</i>	MK424284.1	99,53%
T59	<i>Sphingobacterium anhuiense</i>	NR_044477.1	99,07%
T60	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	NR_075055.1	99,83%
T61	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	LT629702.1	99,91%
T64	<i>Pseudomonas shahriarae</i>	CP077085.1	100%
T68	<i>Pseudomonas shahriarae</i>	CP077085.1	99,83%
T69	<i>Pseudoclavibacter terrae</i>	MW578410.1	99,59%
T70	<i>Sphingobacterium faecium</i>	NR_113744.1	99,15%
T71	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LC463170.1	99,66%
T74	<i>Pseudomonas shahriarae</i>	CP077085.1	99,51%
T76	<i>Pseudomonas shahriarae</i>	CP077085.1	99,27%
T79	<i>Pseudomonas shahriarae</i>	CP077085.1	99,74%
T80	<i>Sphingobacterium anhuiense</i>	NR_044477.1	98,62%

---

Betrachtet man die Verteilung von bakteriellen Genera nach Entnahmeort (Abbildung 26) kann man auf die Besiedlung der einzelnen Entnahmeorte zurückschließen. Auf der Tupferprobe der Einlauftasse des Schockfrosters konnte *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Epilithonimonas* und *Pseudoclavibacter* isoliert werden. Die Tupferprobe des Förderbandes des Schockfrosters zeigte *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Shewanella* und *Sphingobacterium*. Von der Plastikschrürze des Schockfrosters konnte *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Sphingobacterium* und *Glutamicibacter* isoliert werden.

Die Fleischproben der Rindersteaks wiesen *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Psychrobacter*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Brochothrix* und *Shewanella* auf. Von den Fleischproben des Schweineschopfes konnte *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Psychrobacter*, *Carnobacterium* und *Brochothrix* isoliert werden. Weiters wurden auch die Kontrollproben sequenziert, diese wiesen die selben Keime auf, wie die Fleischproben, die durch den Schockfroster liefern.

Die Auswertung spricht dafür, dass sich vor allem *Sphingobacterium*, *Glutamicibacter*, *Epilithonimonas* und *Pseudoclavibacter* ausschließlich auf dem Umfeld des Schockfrosters befindet und unter Verwendung des Schockfrosters zum Fleisch transferiert wird.

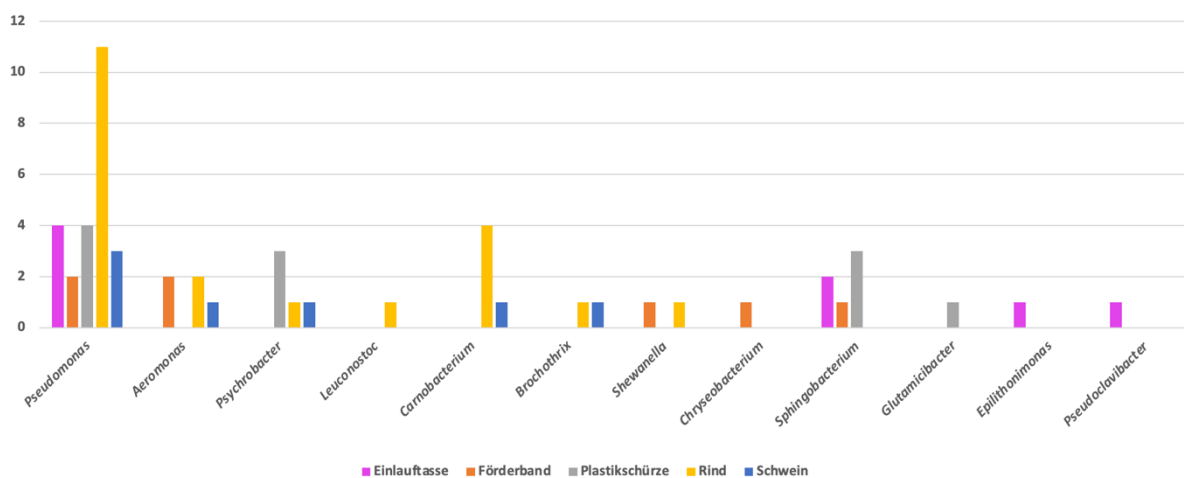


Abbildung 26: Verteilung bakterieller Genera nach Entnahmeort



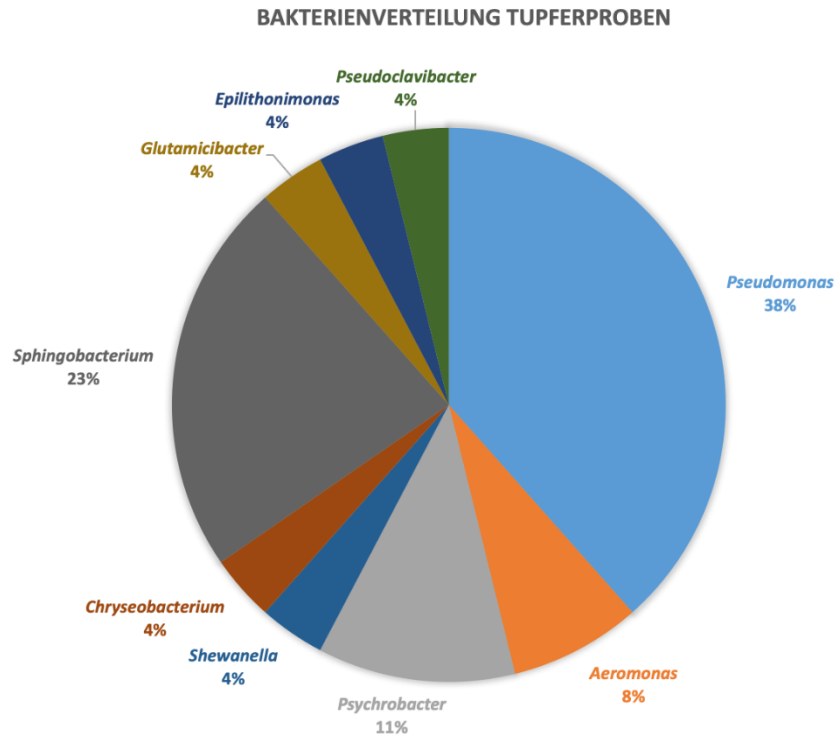


Abbildung 27: Anteile bakterieller Genera in den Tupferproben

Die Verteilung der bakteriellen Genera der Tupferproben des Schockfrosters (Abbildung 27) gehörten zu folgenden bakteriellen Genera. Mit 38% ist *Pseudomonas* am häufigsten vertreten, dicht gefolgt von *Sphingobacterium* mit 23%. Danach folgen *Psychrobacter* mit 11%, *Aeromonas* mit 8%, und *Pseudoclavibacter*, *Epilithonimonas*, *Glutamicibacter*, *Chryseobacterium* und *Shewanella* zu je 4%.

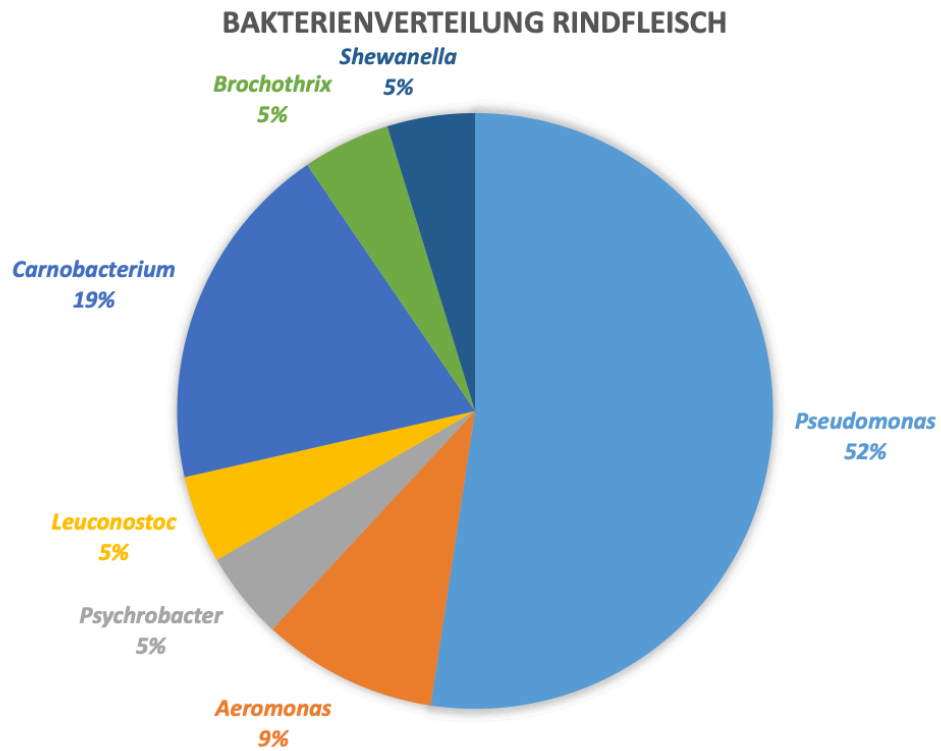


Abbildung 28: Anteile bakterieller Genera am Rindfleisch

Die Anteile der bakteriellen Genera des beprobten Rindfleisches (Abbildung 28) zeigte mit 52% Besiedlung mit *Pseudomonas* den vorherrschenden Bakterienstamm, gefolgt von *Carnobacterium* mit 19%. Danach folgen *Aeromonas* mit 9% und *Shewanella*, *Brochothrix*, *Leuconostoc* und *Psychrobacter* mit je 5%.

### BAKTERIENVERTEILUNG SCHWEINEFLEISCH

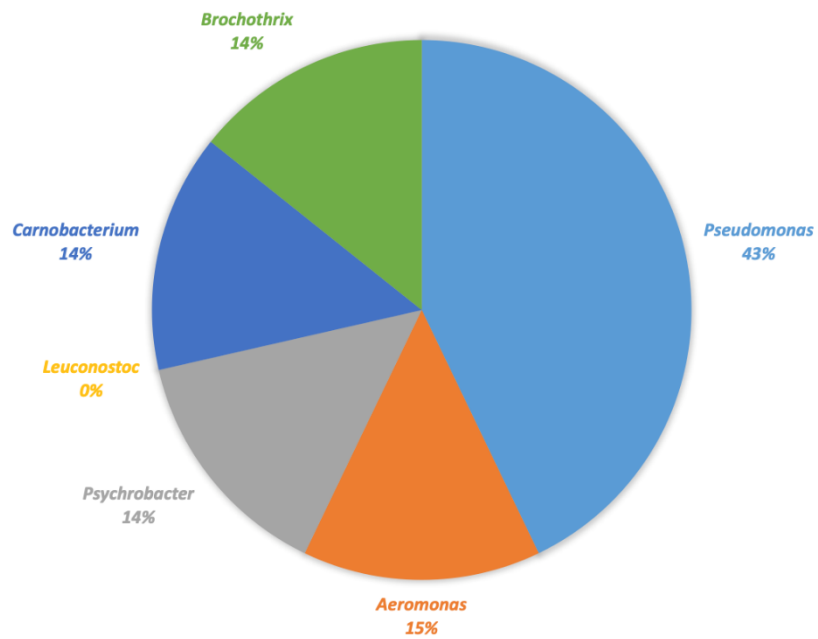


Abbildung 29: Anteile bakterieller Genera am Schweinefleisch

Das beprobte Schweinefleisch zeigte Anteile bakterieller Genera (Abbildung 29) von 43% *Pseudomonas*, 14% *Aeromonas*, gefolgt von *Brochothrix*, *Carnobacterium* und *Psychrobacter* zu je 14%.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Gebrauch und Anwendung des Schockfrostens**

Schockfrostern und Kühlen spielt in Bezug auf die Qualität eine entscheidende Rolle in der Lebensmittelindustrie. Schockfrostung gilt als optimales und sicheres Mittel, um Lebensmittel, vor allem Fleisch, haltbar zu machen (Shinbayeva et al., 2017).

Auch am Schlachthof kann Schockfrostern angewendet werden. Ein großer Vorteil der Schockfrostung liegt darin, dass die Lebensmittel in ihrer Frische, Textur, Geschmack und Vitamingehalt erhalten bleiben (Lisistyn et al., 2019).

### **4.2. Kristallisierung – ein wichtiger Faktor in der Qualität**

Der Kristallisierungsprozess von Fleisch während der Schockfrostung kann durch Zerstörung der Muskelfasern zu Veränderungen der Textur des Fleisches führen (Lisistyn et al., 2019).

Moderne Schnellfrostmethoden sollen eine einheitliche Kristallisation durch kleine Kristalle erreichen, als auch eine sekundäre Kristallisation (Nachkristallisation zu einem späteren Zeitpunkt) vermeiden. Große Kristalle zerstören die Zellstruktur der Muskelfasern, was einen vermehrten Austritt von Fleischsaft und somit eine Verringerung der Zartheit des Fleisches zu Folge hat. Große Kristalle sind hierbei länger haltbar als kleine Kristalle (0,1mm- 3mm).

Kristallbildung wird von der Schnelligkeit, mit der Fleisch gefroren wird, beeinflusst. Man unterscheidet hier zwischen slow, intense und rapid. Schnelles Einfrieren fördert die Kristallisierung von Wasser in den Zellen und die Entstehung von kleinen Kristallen, welche der Schädigung der Zellen entgegenwirken (Lisistyn et al., 2019).

Sorapukdee et al. (2018) beschreibt, dass Fleisch mit höherem Fettgehalt schneller friert, als fettärmeres Fleisch. Auch in dieser Arbeit wurde ein deutlicher Unterschied in der Schockfrostung zwischen Schweine- und Rindfleisch festgestellt. Schweinefleisch hatte nach der selben Zeit bei selber Temperatur eine doppelt so tiefe Kristallisierungstiefe als Rindfleisch. Daraus ist zu schließen, dass Schweinefleisch eine kürzere Zeit im Schockfroster benötigt, als Rindfleisch, um die gleiche Einfriertiefe zu erzielen.

Weiters konnte beobachtet werden, dass die Oberseite der Fleischstücke, sowohl bei Rind- als auch bei Schweinefleisch meist doppelt so tief gefroren war, als die Unterseite, welche Kontakt zum Förderband hatte. Zu erklären ist dies dadurch, dass der Kältestrom des

Schockfrosters von oben wirkt und die Fleischstücke während der Schockfrostung so mit der Oberseite unmittelbar dem direkten Kältestrom ausgesetzt sind.

Leygonie et al. (2012) beschreibt, dass aufgetautes Fleisch durch seine geringere Wasserhaltekapazität schneller einfriert, als frisches Fleisch. Die Hypothese konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Fleischstücke, welche zuvor eingefroren und wieder aufgetaut wurden, bevor sie durch den Schockfroster liefen, wiesen eine höhere Kristallisierungstiefe auf, als die Fleischstücke, die frisch waren. Die Größe der Fleischstücke dürfte hierbei keine Rolle spielen. In der Literatur finden sich keine vergleichbaren Angaben dazu.

### **4.3. Fleischfarbe- ein wichtiger Faktor im Verkauf**

Studien zeigen, dass Kunden auf zwei Eigenschaften achten, wenn sie Fleisch kaufen. Dazu zählen Textur und Farbe, wobei die Farbe das wichtigste Kriterium ist (Bekhit et al., 2005).

Myoglobin (Mb) ist ein wasserlösliches Protein, welches für die Fleischfarbe verantwortlich ist. In der Fleischindustrie kann eine Farbveränderung irreführend sein, da Farbveränderungen meist nicht mit chemischen Veränderungen einhergehen. Es gibt mehrere Faktoren, die eine Farbveränderung von Fleisch verursachen können. Dazu zählen extrinsische Faktoren, wie die Genetik des Tieres, Geschlecht, Alter, Fütterung, Stress, aber auch das Kühlungs- und Verpackungsmanagement nach der Schlachtung. Diese Faktoren könne durch pH- Wert Änderungen oder Proteindenaturierung beeinflusst und somit verändert werden. Zu den intrinsischen Faktoren zählen der pH- Wert, der Muskeltyp, die Muskelfasern, Myoglobin Konzentration, der Wasseranteil, die mikrobielle Belastung und der Temperaturverlauf (Meat Science Association, 2010).

Mb ist das Hauptprotein des Sarcoplamas und gehört zur Gruppe der Albumine. Dieses Protein ist das Hauptpigment von Muskelgewebe. Muskelgewebe kann sich reversibel rot färben mittel Bindung von O<sub>2</sub>. Mb dient hierbei als ein Depot für die O<sub>2</sub> Metabolisierung in den Muskelfasern (Livingston et al., 1982).

Post mortem Farbveränderungen von Fleisch sind ebenfalls Folgen von Myoglobin (Mb). In frischem Fleisch existiert Mb in verschiedenen Formen: die wichtigsten Formen sind Deoximyoglobin (DMb), Oximyoglobin (OMb) und Metmyoglobin (MMb). Die oxigenierte Form von Mb ist OMb und ist verantwortlich für eine kräftige rote Farbe, während die oxidierte Form (MMb) für eine bräunliche Farbe verantwortlich ist (Bekhit et al., 2001).

CO<sub>2</sub> ist essentiell für die Erhaltung der roten Farbe des Fleisches in der Verpackung, da es eine 20- fach höhere Bindungsaffinität mit Mb zeigt, als O<sub>2</sub>. O<sub>2</sub> ruft chemische Reaktionen vor, wie zum Beispiel Fettoxidation, was zu einer Braun- bis Graufärbung des Fleisches zur Folge hat (Bekhit et al., 2001).

Auch in dieser Arbeit konnte der Prozess der Farbveränderung bestätigt werden. Die Untersuchung der Farbe der Rindfleischproben zeigte bei den Proben, die nicht vorgefroren waren und 4 bzw 6 Minuten durch den Schockfroster liefen, keine Farbveränderungen nach der Schockfrostung. Die Rindfleischproben, die vorgefroren und wieder aufgetaut wurden, bevor sie durch den Schockfroster liefen, wiesen farbliche Veränderungen nach der Schockfrostung auf. Diese wiesen graue Farbveränderungen auf, sowohl auf der Ober- als auch auf der Unterseite. Die Unterseiten der Fleischstücke war stärker betroffen, da diese direkten Kontakt mit dem Förderband hatten. Weiters konnte beobachtet werden, dass die grauen Farbveränderungen nach etwa 2 Stunden, auf Eis gekühlt, wieder verschwanden. Die Ursache dafür liegt unter Anderem in der Oxidation von Myoglobin, aufgrund von übermäßiger Sauerstoffexposition, zu Metmyoglobin. Metmyoglobin (MMb) führt zu grau- braunen Farbveränderungen im Fleisch. Wenn das Fleisch auftaut, wird der innere, postmortale Pool an NADH (Nicotinamid Adenin Dinucleotid Hydrid) freigesetzt und wandelt somit das Metmyoglobin (MMb) zu Deoxymyoglobin (verursacht die gewünschte rote Farbe des Fleisches) (Meat Science Association, 2012). In weiteren Forschungen könnte man untersuchen, ob die grauen Farbveränderungen nach weiterer Zeit wiederkehren würden.

Auch die Temperatur ist bei der Farbveränderungen von Fleisch ein wichtiger Faktor. Das, in Vitrinen gelagerte Fleisch, in Supermärkten ist durch die Beleuchtung von Glühbirnen und UV-Licht Wärme ausgesetzt, welche die Verfärbungsrate der Fleischstücke erhöht. Die aus Licht gewonnene Energie kann eine Pigmentautoxidation verursachen, welche zu Farbveränderungen führt. Dunkel gelagertes Fleisch weist in anderen Studien eine bessere Farbstabilität auf, aufgrund der verzögerten Oxidationsrate von Myoglobin.

Temperaturänderungen während des Einfrierens kann die Intensität der roten Farbe des Fleisches reduzieren, besonders nach 60 Tagen Lagerung. Auch die Verpackung, insbesondere der CO<sub>2</sub> Gehalt kann bei Farbveränderungen ausschlaggebend sein (Tomasevic et al., 2021).

MAP (Modified Atmosphere Packaging) mit möglichst hohem O<sub>2</sub> Gehalt in Kombination mit optimaler Temperaturverhältnissen und entsprechender Verarbeitungshygiene ist der

effektivste Weg, um die Haltbarkeit von frischem Kühlfleisch zu verlängern und die Produktqualität zu erhalten.

Eine weitere Möglichkeit der Farbveränderung von Fleisch stellt die mikrobielle Besiedlung dar. Viele Farbveränderungen bei Fleisch werden durch chemische Veränderungen von Myoglobin hervorgerufen, ohne Beteiligung von Verderbniserregern. Bakterien, die zu einer Zerstörung des Myoglobins führen, verursachen eine graue/ grüne Verfärbung des Fleisches bis hin zu gelb/ grünen Pigmenten. Grau/ grüne Verfärbungen deuten oft auf Vorhandensein von *Lactobacillus* hin. Außerdem sind auch *L. sakei*, *Hafnia alvei* und *S. putrefaciens* oft an einer Grünfärbung des Myoglobins beteiligt (Dušková et al., 2013).

Mikrobiell bedingte Farbveränderungen sind auch in Zusammenhang mit *Pseudomonas*, Schimmel und *Cladosporium*, *Sporotrichium* und *Penicillium* zu beobachten. Diese können variieren zwischen blauen, grünen, gelben, schwarzen und weißen Farbveränderungen. Gelbe Pigmente werden mit *P. fluorescens* in Zusammenhang gebracht. Blaue Farbveränderungen durch *P. fluorescens* führen zu verdorbenen blauem Rind- und Schweinefleisch (Cornelis et al., 2010).

#### **4.4. Mikrobiologie in der Fleischerzeugung**

Der Verderb von Fleisch ist ein komplexer Vorgang, in dem die Kombination aus biologischen und chemischen Prozessen zur Ungenießbarkeit des Fleisches für den Menschen führt (Erkmen et al., 2016). Die mikrobielle Qualität des Fleisches kann durch den Zustand des Schlachttieres, den Schlachtvorgang und der Lagerung beeinflusst werden. Auch die Schockfrostung kann zu einer Kontamination des Fleisches am Ende der Verarbeitungskette führen (Casaburi et al., 2015). Die Kontamination des Schockfrosters mit lebensmittelhygienisch relevanten Keimen konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Weiters konnte gezeigt werden, dass 6 Minuten im Schockfroster zu einer signifikanten Mehrbelastung (Keimzahlanstieg von  $10^3$  zu  $10^7$ ) am Fleisch führen.

Die mikrobielle Diversität auf Schlachthöfen besteht aus unterschiedlichen Umweltkeimen, darunter besonders abundant sind *Staphylococcus* spp., *Brochothix* spp., *Psychrobacter* spp., *Acinetobacter* spp. und *Lactobacillus*. Zusätzlich dominieren Proteobakterien, speziell *Pseudomonas* spp., und einige Arten von *Enterobacteriaceae* die mikrobielle Flora der Karkassen (Stellato et al., 2016).

Als pathogene Keime gelten *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., enterohämorrhagische *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* und *Bacillus cereus*.

#### 4.4.1. Genus *Pseudomonas*

Lebensmittel sind die häufigste Quelle dieses Mikroorganismus, wo es signifikant zum Verderb führt. Vor allem *P. fragi* ist im Verderb von frischen und gefrorenen Lebensmitteln beteiligt (Wiedmann et al., 2000). Erst später stellte sich heraus, dass *P. fragi* auch beim Verderb von Fleisch und Fleischprodukten beteiligt ist (Ercolini et al., 2007).

Die Umgebung von frischem Fleisch bietet den optimalen Nährboden für *Pseudomonaden*, insbesondere von *P. fragi* (Ercolini et al., 2007).

Die Ausbildung von Biofilmen durch *Pseudomonas* spp., vor allem durch *P. paraversuta* in der Lebensmittelindustrie eine wichtige Rolle (Lick et al., 2021), da diese die gesamte Produktionskette gefährden, zu einem schnelleren Verderb der Produkte führen und Grundlage für das Wachstum von anderen Mikroorganismen wie zum Beispiel *Campylobacter jejuni* sein können (Ercolini et al., 2006).

Bezugnehmend auf die Literatur wird *Pseudomonas* vorrangig in der Milchindustrie und in Rindfleisch nachgewiesen, aber auch in Schweinefleisch kann *Pseudomonas* vorkommen. Auch in dieser Arbeit bestätigten sich diese Angaben, *Pseudomonas* konnte zum größten Teil in Rindfleisch nachgewiesen werden, zu kleineren Anteilen auch in Schweinefleisch.

#### 4.4.2. Genus *Aeromonas*

*Aeromonas* spp. gehört zu der Familie der *Aeromonadaceae* und beschreibt eine Gruppe von Gram negativen Bakterien (Janda et al., 2010). *Aeromonas* konnte unter Anderem vor allem von Fleisch und Fleischprodukten isoliert werden. *Aeromonas* kann bei niedrigen Temperaturen zwischen 2°C und 10°C überleben (Lamy et al., 2010).

Auf Fleisch werden *A. veronii*, *A. salmonicida* und *A. hydrophila* als prävalente Spezies beschrieben. Diese können zum Verderb des Fleisches und bei Verzehr zu Durchfall beim Menschen führen (Fernández-Bravo et al., 2020). In dieser Arbeit wurde *Aeromonas* vor allem in der Tupferprobe vom Förderband des Schockfrosters, aber auch in Rind- und Schweinefleisch gefunden. Bezugnehmend auf schon vorhandene Literatur können wir daraus



schließen, dass *Aeromonas* aufgrund seiner kälteliebenden Eigenschaften ein Problem bei der Fleischlagerung darstellen kann.

#### **4.4.3. Genus *Brochothrix***

*Brochothrix* spp. gehört zu der Familie der *Listeriaceae* und beschreibt Gram positive Bakterien, die vor allem in der Fleischindustrie von Bedeutung sind, da sie zum Verderb von Fleisch führen können (Blaszyk et al., 1998).

Vor allem *B. thermosphacta* konnte aus Karkassen von Schweine- und Rindfleisch isoliert werden und gilt als Hauptverursacher von frühzeitigem Verderb von kontaminiertem Fleisch (Blaszyk et al. 1998). In dieser Arbeit wurde *Brochothrix* in gleichen Maßen in Schweine- und Rindfleisch nachgewiesen. Vergleichend mit der Literatur erfolgt die Kontamination durch *Brochothrix* vor allem während des Zerlegungsprozesses über die Haut und Eingeweide der Schlachtkörper. Daraus erschließt sich, dass die Hygienemaßnahmen auf dem Schlachthof streng eingehalten und gegebenenfalls verbessert werden müssen (häufigerer Messertausch, regelmäßiges und gründliches Säubern der Handschuhe, etc), um zukünftig die Kontamination durch *Brochothrix* einzudämmen oder gar verhindern zu können.

#### **4.4.4. Genus *Psychrobacter***

*Psychrobacter* spp. gehört zu der Familie der *Moraxellaceae* und beschreibt eine Gruppe von Gram negativen Bakterien, die in Zusammenhang mit dem Verderb von Fleisch gebracht werden (Betts et al., 2006).

*Psychrobacter* spp. kann bei niedrigen Temperaturen von 4°C überleben (Bowann et al., 2001).

*Psychrobacter* wurde in dieser Arbeit ausschließlich auf der Einlauffasse des Schockfrosters nachgewiesen. Um eine Kontamination durch *Psychrobacter* in Zukunft zu vermeiden, sollte die Einlauffasse regelmäßig gewechselt werden.

#### **4.4.5. Genus *Shewanella***

*Shewanella* spp. gehört zu der Familie der *Shewanellaceae* und beschreibt Gram negative Bakterien und zählen zu den Verderbskeimen in der Lebensmittelindustrie (Satomi et al., 2014) Vor allem *S. putrefaciens* gilt seit den frühen 1930 Jahren als wichtiges Bakterium im Zusammenhang mit dem Verderb von Fleisch (Satomi et al., 2014).

In dieser Arbeit wurde *Shewanella* vor allem auf dem Förderband, aber auch auf Rindfleisch nachgewiesen. Vermutlich erfolgte die Kontamination des Rindfleisches über das Förderband des Schockfrosters. Um eine Kontamination zu vermeiden ist es empfehlenswert das Förderband regelmäßig mit geeigneten Reinigungsmitteln und unter mechanischem Druck zu reinigen.

#### **4.5. Ausblick**

Bezugnehmend auf den beprobten Schlachthof könnte das Hygienemanagement in ein paar Punkten verbessert werden , indem man beispielsweise das Förderband des Schockfrosters regelmäßig mit geeigneten Reinigungsmitteln, aber auch zusätzlich mechanisch (mit Bürsten, um die Zwischenräume besser zu erreichen) reinigt, um mögliche Fleischrückstände zu entfernen und die Kontaminationsgefahr zu verringern.

Weiters könnte man die Plastischürze des Schockfrosters regelmäßig austauschen und erneuern, da diese das Fleisch bei jedem Schockfrostungsdurchgang berührt und somit eine Kontaminationsquelle für das Fleisch darstellt.

Zukünftig könnte man den Schockfroster, aber auch das darin geschockfrostete Fleisch regelmäßig erneut beproben um den möglichen Erfolg des Hygienemanagements verfolgen und ,wenn notwendig, adaptieren kann.

In Bezug auf die Farbveränderungen des Fleisches nach der Schockfrostung könnte in einer weiteren Arbeit untersucht werden, ob die Farbveränderungen, welche nach dem Schockfrostern auftraten und wieder verschwanden, erneut auftreten.

Studien zeigen, dass die Mehrheit der befragten Menschen nicht wissen, wie sie Fleisch im Kühlschrank richtig lagern sollten. Um die optimalen Temperaturverhältnisse für die Fleischlagerung bei den Konsumenten zu gewährleisten, sollte es in Zukunft ein verbessertes Kühlschrankmonitoring geben und/ oder eine Information für Konsumenten wie sie Fleisch richtig aufbewahren (beispielsweise als Beipackzettel mit einer kurzen Anleitung).

## 5. Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit wurde ein hauseigener Schockfroster des Zerlegebetriebs eines österreichischen Schlachthofs evaluiert und geprüft, ob die Schockfrostung Auswirkungen auf die Farbe, die Textur und die mikrobielle Besiedlung des Fleisches hatte. Dafür wurden insgesamt 80 Fleischproben entnommen. Um die Keimzahl der einzelnen Proben zu untersuchen, wurden Verdünnungsstufen auf 3 Agarmedien (TSA, APT, VRBD) aufgetragen und bebrütet. Anschließend wurden die Kolonie bildenden Einheiten gezählt. Weiters wurden 125 Isolate mit der Chelex- Extraktionsmethode und 16S rRNA Gen PCR weiter untersucht. 60 Isolate wurden zur Sequenzierung geschickt und mittels NCBI Blast ausgewertet. Bei der farblichen Auwertung zeigten sich sowohl bei Rind- als auch bei Schweinefleisch deutliche Farbveränderungen. Die Vermessung der Kristallisierungstiefe zeigte, dass Rindfleisch eine doppelt so tiefe Kristallisierung aufwies als Schweinefleisch. Die Mikrobiologie zeigte eine stärkere Keimbelastung der geschockfrosteten Proben gegenüber der Kontrollproben, was für eine Kontamination des Schockfrusters spricht. Die Kontamination mit lebensmittelhygienisch relevanten Keimen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Weiters konnte gezeigt werden, dass 6 Minuten im Schockfroster zu einer signifikanten Mehrbelastung (Keimzahlanstieg von  $10^3$  zu  $10^7$ ) am Fleisch führen. Nach der Isolatsequenzierung wurden die Sequenzen mittels NCBI Blast taxonomisch zugeordnet. Es konnten verschiedene bakterielle Genera, wie *Aeromonas* und *Pseudomonas* nachgewiesen werden. Schon vom Betrieb vorgefrorene Proben zeigten eine signifikant höhere Keimbelastung ( $p= 0,0001$ ) als frischen Proben, die durch den Schockfroster liefen. Durch ein verbessertes Hygiene- und Reinigungsmanagement des Schockfrusters können Kontaminationen in Zukunft vermindert werden.

## 6. Summary

In this diploma thesis, an in-house shock freezer of the cutting plant of an Austrian slaughterhouse was evaluated and it was checked whether shock freezing had any effect on the colour, texture and microbial colonization of the meat. A total of 80 meat samples were taken for this purpose. In order to examine the bacterial counts of the samples, dilution series were applied to 3 agar media (TSA, APT, VRBD) and colony-forming units were counted. Furthermore, 125 isolates were examined using the Chelex extraction method and 16S rRNA gene PCR. 60 isolates were sent for sequencing and analyzed using NCBI Blast. The color evaluation showed clear color changes in both beef and pork. Measurement of the depth of crystallization showed that beef had twice the depth of crystallization than pork. The microbiology showed a higher bacterial load of the shock-frozen samples compared to the control samples, proposing a contamination of the shock freezer. The contamination with bacteria relevant to food hygiene could be shown in this work. Furthermore, it was shown that 6 minutes in the shock freezer led to a significant increase in the load on the meat (bacterial count increase from  $10^3$  to  $10^7$ ). After isolate sequencing, the sequences were assigned taxonomically using NCBI Blast. Various bacterial genera such as *Aeromonas* and *Pseudomonas* could be detected. Samples that were already pre-frozen in the facility showed a significantly higher germ load ( $p= 0.0001$ ) than fresh samples that were used for shock freezing. Improved hygiene and cleaning management of the shock freezer could reduce contamination scenarios in future.

## 7. Literaturverzeichnis

- Amtsblatt der Europäischen Union. Verordnung (EG) Nr. 2073/ 2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. Europäische Union, 2005;L338.
- Bekhit, A. E. D., & Faustman, C. Metmyoglobin reducing activity. *Meat Sci.* 2005;71:3,407–439. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.032>
- Bekhit, A. E. D., Geesink, G. H., Morton, J. D., & Bickerstaße. Metmyoglobin reducing activity and colour stability of ovine longissimus muscle. 2001;57:4, [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00121-2)
- Bell, R. G. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. *J. Appl. Microbiol.*, 1997; 82(3), 292–300
- Betts et al. *Food Spoilage Microorganism*. Woodhead Publisher, 2006
- Blaszyk, M., & Holley, R. A. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998; 39
- Bowann, J. Methods for psychrophilic bacteria. *Methods in Microbiology*, 2001; 591–614
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G. J., Villani, F., & Ercolini, D. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 2015; 45, 83–102 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.002>
- Chemnitz, C. *Fleischatlas*. 2021; 22–24
- Church, I. J., & Parsons, A. L. Modified atmosphere packaging technology: A review, *J. Sci. Food Agric.*, 1995; 67, 2, 143–152 <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740670202>
- Cornelis, P. Iron uptake and metabolism in *Pseudomonas*, *Appl. Microbiol. Biotech.*, 2010
- Dainty, R. H. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage process. *J. Appl. Microbiol. Internat.*, 1992
- Doulgeraki, A. I., & Nychas, G. J. E. Monitoring the succession of the biota grown on a selective medium for pseudomonads during storage of minced beef with molecular-based methods. *Food Microbiology*, 2013; 34, 62–69 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.017>
- Dušková, M., Kameník, J., & Karpíšková, R. *Weissella viridescens* in meat products - A review. In *Acta Veterinaria Brno*, 2013; V 82, 3, 237–241 <https://doi.org/10.2754/avb201382030237>
- Enfors, S. O. Effect of packaging under Carbon Dioxide, Nitrogen or Air on the microbial flora of pork stored at 4°C. *J. Appl. Microbiol. Internat.*, 1979
- Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., & Villani, F. Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 2007 2354–2359. <https://doi.org/10.1128/AEM.02603-06>
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., & Villani, F. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* , 2006; 4663–4671 <https://doi.org/10.1128/AEM.00468-06>
- Erkmen, O. *Spoilage of meat and meat products. J. Food Microbiol.: Principles into Practice*, 2016
- Farkas, J. *Physical methods of food preservation*. ASM Press, 2007
- Farouk, M. M., & Wieliczko, K. J. Effect of diet and fat content on the functional properties of thawed beef
- Fernández-Bravo, A., & Figueras, M. J. An update on the genus *Aeromonas*: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. In *Microorganisms* 2020; 8, 1 <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>
- Foster. *Storing Fish, Meat and Poultry Safely on a Commercial Scale*, 2022

- Furutani, S. Rapid DNA Sequencing Technology based on the Sanger Method for Bacterial Identification. *J. Clinic. Microbiol.*, 2022
- Gill, C. Extending the Storage Life of Raw Chilled Meats. In *Meat Science* 1996; 43, 5
- Gordon, M. A. Salmonella infections in immunocompromised adults. *Int. J. Infect.*, 2008; 56, 6, 413–422 <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.03.012>
- Hall. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 2001
- Huis in't Veld. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996; 2–3
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. In *Clinical Microbiology Reviews* 2010; 23, 1, 35–73 <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
- Jay, J. M. *Modern Food Microbiology*, Seventh Edition, 2005
- Lamy, B., Laurent, F., Verdier, I., Decousser, J. W., Lecaillon, E., Marchandin, H., Roger, F., Tigaud, S., de Montclos, H., & Kodjo, A. Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical *Aeromonas* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2010; 61, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.012>
- Laughlin, M. E. *Campylobacteriosis*. *Manual of Clinical Microbiology*, 2019
- Leygonie, C. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. *J. Food Biochem.*, 2012; 91, 93–98
- Lick, S. *Pseudomonas paraversuta* sp. isolated from refrigerated dry-aged-beef. *Int. J. System. Evolut. Microbiol.*, 2021
- Lisistyn, A. B. To the question about meat freezing. Review. *Theory and Practice of Meat Processing*, 2019; 27–28
- Livingston, D. J. The chemistry of myoglobin and its reactions. *Food Technology*, 1982
- Meat Science Association, A. *AMSA Meat Color Measurement Guidelines*, 2018 <http://www.meatscience.org>
- Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 2008; 78, 77–89 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020>
- Sanz, P. D., de Elvira, C., Martino, M., Zaritzky, N., Otero, L., & Carrasco, J. A. Freezing rate simulation as an aid to reducing crystallization damage in foods.
- Satomi, M. The family Shewanellaceae. *The Microbiological Quality of Food*, 2014
- Shinbayeva, A., Arkharov, I., Aldiyarov, A., Drobyshev, A., Zhubaniyazova, M., & Kurnosov, V. Experimental Investigation of Thermal Conductivity of Meat During Freezing. *J. Low Temp. Phys.*, 2017; 187, 172–181 <https://doi.org/10.1007/s10909-017-1754-6>
- Silva, A. R., Paulo, É. N., Sant'Ana, A. S., Chaves, R. D., & Massaguer, P. R. Involvement of *Clostridium gasigenes* and *C. algidicarnis* in “blown pack” spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011; 148, 3, 156–163 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.016>
- Sorapukdee, S. Quality of steak restructured from beef trimmings containing microbial transglutaminase and impacted by freezing and grading by fat level. *Asian- Australas. J. Anim. Sci.*, 2018
- Stellato, G., la Storia, A., de Filippis, F., Borriello, G., Villani, F., & Ercolini, D. Overlap of spoilage-associated microbiota between meat and the meat processing environment in small-scale and large-scale retail distributions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016; 82, 4045–4054. <https://doi.org/10.1128/AEM.00793-16>
- Tomasevic, I., Djekic, I., Font-i-Furnols, M., Terjung, N., & Lorenzo, J. M. Recent advances in meat color research. In *Current Opinion in Food Science* 2021; 41, 81–87 <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.012>

- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R., & Boor, K. J. Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from Milk. In applied and environmental microbiology 2000; 66, 5 <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Willerstorfer, T. , Dissertation, Der Fleischverbrauch in Österreich von 1950- 2010. Institute of Social Ecology, 2013
- Xia, X., Kong, B., Liu, J., Diao, X., & Liu, Q. Influence of different thawing methods on physicochemical changes and protein oxidation of porcine longissimus muscle. LWT, 2012; 46, 1, 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.018>
- Young, L. L. Fresh red meats: A place to apply modified atmospheres. Symposium: Is Current Modified/ Controlled Atmosphere Packaging Technology Applicable to the U.S. Food Market?, 1988

## 7.1. Internetquellen

Bundesinstitut für Risikobewertung, Mikrobielle Risiken von Lebensmitteln – *Bacillus cereus*. 2020. Available from: [https://www.bfr.bund.de/de/bacillus\\_cereus-54344.html](https://www.bfr.bund.de/de/bacillus_cereus-54344.html)

European Food Safety Authority, *Listerien*. 2019 Available from: <https://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/listeria>

Pantone LLC, About Pantone, 2022. Available from: <https://www.pantone.com/about-pantone>

Messelhäußer, Erkrankung durch *Clostridium perfringens* in Lebensmitteln, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit 2008 (last update Februar 2019) Available from: [https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/hygiene/bakterien/clostridium\\_perfringens/index.htm](https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/hygiene/bakterien/clostridium_perfringens/index.htm)

Neogen Corporation, Tryptic Soy Agar (7100), 2020 Available from: [https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10001/7100\\_pi.pdf](https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10001/7100_pi.pdf)

Neogen Corporation, Violet Red Bile Dextrose AGAT (VRBD), 2020. Available from: <https://www.neogen.com/categories/microbiology/violet-red-bile-glucose-agar/>

Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES), *Salmonella* spp., 2021 (last update August 2022). Available from: <https://www.ages.at/mensch/krankheit/krankheitserreger-von-a-bis-z/salmonellen>

Robert Koch Institut, Infektionsschutz – EHEC Erkrankung, 2011 (last update Juni 2019). Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_EHEC.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_EHEC.html)

Schulze, Erkrankung durch *Yersinia enterocolitica* in Lebensmitteln, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit 2009 (last update April 2012). Available from: [https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/hygiene/bakterien/yersinia\\_enterocolitica/index.htm](https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/hygiene/bakterien/yersinia_enterocolitica/index.htm)



## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis:

ABBILDUNG 1: HAUSEIGENER SCHOCKFROSTER IN SEITENANSICHT .....	18
ABBILDUNG 2: NAHAUFNAHME DES BEPROBTEN FÖRDERBANDES UND DER EINLAUFTASSE DES SCHOCKFROSTERS .....	19
ABBILDUNG 3: BEPROBTE PLASTIKSCHÜRZE UND EINLAUFTASSE DES SCHOCKFROSTERS .....	19
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERSUCHSPLANUNG FÜR DIE VERDÜNNUNGSREIHEN, DIE VERWENDET WURDEN, UM BEI TESTPROBEN DEN OPTIMALEN VERDÜNNUNGSFAKTOR FÜR AUSPLATTIERUNG ZU FINDEN. VERWENDET WURDEN DIE 1., 2., 4. UND 5. VERDÜNNUNGSREIHEN .....	21
ABBILDUNG 5: EINZELKOLONIEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN MORPHOLOGIEN AUF DEM VRBD AGAR.....	23
ABBILDUNG 6: EINZELKOLONIEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN MORPHOLOGIEN AUF DEM TSA AGAR.....	24
ABBILDUNG 7: STAMMSAMMLUNG, WELCHE FÜR LAGZEITLAGERUNG BEI -80°C GELAGERT WIRD .....	25
ABBILDUNG 8: UM DIE AMPLIFIKATION DER PROBEN DNA ZU VISUALISIEREN, WURDE EINE GELELEKTROPHORESE DURCHFÜHRT ..	28
ABBILDUNG 9: UM DIE FRAGMENTE DER RFLP ZU VISUALISIEREN, WURDE EINE GELELEKTROPHORESE DURCHFÜHRT .....	29
ABBILDUNG 10: KEINE VERFÄRBUNGEN AUF EINEM HÜFTSTEAK VOM RIND, DAS 4 MINUTEN SCHOCKGEFROSTET WURDE .....	32
ABBILDUNG 11: SICHTBARE VERÄNDERUNGEN NACH DEM SCHOCKFROSTEN AUF EINEM HÜFTSTEAK VOM RIND, DAS VORGEFROREN WAR UND 6 MINUTEN SCHOCKGEFROSTET WURDE. DIESE VERÄNDERUNGEN VERSCHWANDEN NACH EIN PAAR STUNDEN WIEDER.....	32
ABBILDUNG 12: SICHTBARE GRAUE VERFÄRBUNGEN AN DEN HÜFTSTEAKS VOM RIND, DIE VORGEFROREN WAREN UND 6 MINUTEN SCHOCKGEFROSTET WURDEN. AUCH HIER VERSCHWANDEN DIE VERFÄRBUNGEN NACH EIN PAAR STUNDEN WIEDER.....	32
ABBILDUNG 13: FARBVARIANTEN DES RINDFLEISCHES IM ÜBERBLICK.....	33
ABBILDUNG 14: SICHTBARE FARBBLICHE VERÄNDERUNGEN AM GANZEN SCHOPF VOM SCHWEIN, DER 6 MINUTEN SCHOCKGEFROSTET WURDE .....	33
ABBILDUNG 15: FARBVARIANTEN DES SCHWEINEFLEISCHES IM ÜBERBLICK .....	34
ABBILDUNG 16: GRUPPENWEISE DARSTELLUNG DER EINFRIERTIEFE .....	35
ABBILDUNG 17: STATISTISCHER VERGLEICH DER EINFRIERTIEFE VON 4 MINUTEN ZU 6 MINUTEN SCHOCKFROSTUNG.....	36
ABBILDUNG 18: STATISTISCHER VERGLEICH DER EINFRIERTIEFE VON RIND- UND SCHWEINEFLEISCH NACH 6 MINUTEN SCHOCKFROSTUNG .....	37
ABBILDUNG 19: KBES AM TSA AGAR .....	38
ABBILDUNG 20: KBES AM APT AGAR .....	39
ABBILDUNG 21: KBES AM VRBD AGAR .....	40
ABBILDUNG 22: GRUPPENWEISE DARSTELLUNG UND VERGLEICHE DER PROBEN UND MITTELWERTE DER KBES ALLER AGARMEDIEN.....	41
ABBILDUNG 23: STATISTISCHER VERGLEICH DER KBES VON KONTROLLEN ZU PROBEN .....	42
ABBILDUNG 24: STATISTISCHER VERGLEICH DER KBES VON FRISCHEN UND VORGEFRORENEN PROBEN, NACH 4 UND 6 MINUTEN SCHOCKFROSTUNG .....	42
ABBILDUNG 25: STATISTISCHER VERGLEICH DER KBES VON 4 UND 6 MINUTEN SCHOCKFROSTUNG.....	43
ABBILDUNG 26: VERTILUNG BAKTERIELLER GENERA NACH ENTNAHMEORT .....	47
ABBILDUNG 27: ANTEILE BAKTERIELLER GENERA IN DEN TUPFERPROBEN.....	48
ABBILDUNG 28: ANTEILE BAKTERIELLER GENERA AM RINDFLEISCH .....	49
ABBILDUNG 29: ANTEILE BAKTERIELLER GENERA AM SCHWEINEFLEISCH.....	50
ABBILDUNG 1 APPENDIX: FLEISCHETIKETTEN DER BEPROBTEN RINDFLEISCHSTEAKS VON GRUPPE 1 UND 3 .....	66
ABBILDUNG 2 APPENDIX: FLEISCHETIKETTEN DER BEPROBTEN RINDFLEISCHSTEAKS VON GRUPPE 2.....	66
ABBILDUNG 3 APPENDIX: FLEISCHETIKETTEN DER BEPROBTEN RINDFLEISCHSTEAKS VON GRUPPE 4.....	67
ABBILDUNG 4 APPENDIX: FLEISCHETIKETTEN DES BEPROBTEN RINDFLEISCHES VON GRUPPE 8 UND 9 .....	67
ABBILDUNG 5 APPENDIX: FLEISCHETIKETTEN DES BEPROBTEN SCHWEINEFLEISCHES VON GRUPPE 8 UND 9.....	68

Tabellenverzeichnis:

TABELLE 1: EMPFEHLUNG FÜR DAS RICHTIGE SCHLICHTEN VON LEBENSMITTELN IM KÜHLSCHRANK .....	9
TABELLE 2: MÖGLICHE VERÄNDERUNGEN VON LEBENSMITTELN UND IHRE MIKROBIELLEN URSACHEN.....	10
TABELLE 3: HERSTELLUNG EINES MASTERMIX FÜR DIE 16S rRNA GEN PCR.....	26
TABELLE 4: ABLAUF DER ZYKLEN DER rRNA GEN PCR .....	26
TABELLE 5: ERGEBNISSE DER NCBI AUSWERTUNG .....	45

## 9. Anhang



Abbildung 30 Appendix: Fleischetiketten der beprobten Rindfleischsteaks von Gruppe 1 und 3



Abbildung 31 Appendix: Fleischetiketten der beprobten Rindfleischsteaks von Gruppe 2



Abbildung 32 Appendix: Fleischetiketten der beprobten Rindfleischsteaks von Gruppe 4



Abbildung 33 Appendix: Fleischetiketten des beprobten Rindfleisches von Gruppe 8 und 9

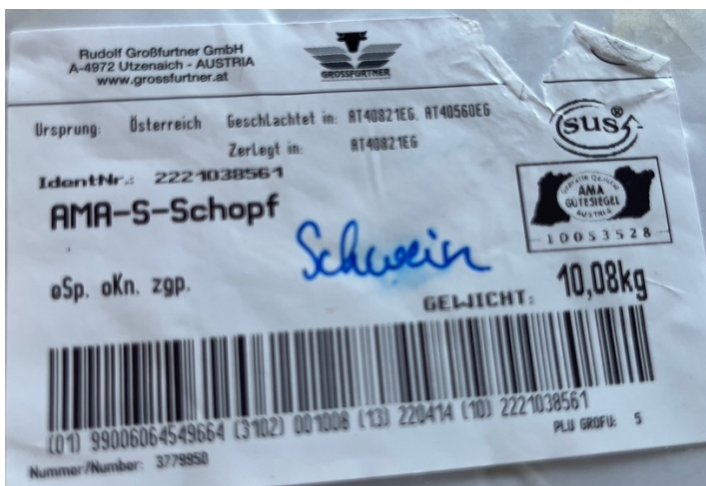














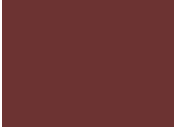



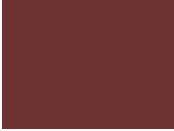






















Abbildung 34 Appendix: Fleischetiketten des beprobten Schweinefleisches von Gruppe 8 und 9




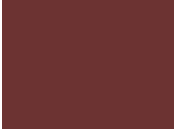

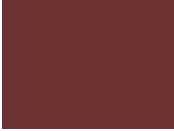



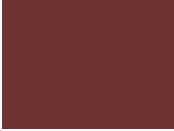

Probennummer:	1	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7621	
Probennummer:	2	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	3	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7626	
Probennummer:	4	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7226	
Probennummer:	5	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7626	
Probennummer:	6	










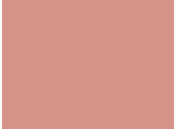

Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	7	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7627	
Probennummer:	8	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	9	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	10	
Datum der Farbbestimmung:	16.02.22	
Farbnummer:	7622	
Probennummer:	11	
Datum der Farbbestimmung:	16.02.22	
Farbnummer:	7622	
Probennummer:	12	
Datum der Farbbestimmung:	16.02.22	
Farbnummer:	7622	
Probennummer:	13	
Datum der Farbbestimmung:	16.02.22	
Farbnummer:	7622	
Probennummer:	14	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7629	
Probennummer:	15	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7629	
Probennummer:	16	

Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	17	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7629	
Probennummer:	18	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7629	
Probennummer:	19	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7619	
Probennummer:	20	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	21	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7626	
Probennummer:	22	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7625	
Probennummer:	23	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	24	
Datum der Farbbestimmung:	16.02.22	
Farbnummer:	7623	
Probennummer:	25	
Datum der Farbbestimmung:	16.02.22	
Farbnummer:	7607	
Probennummer:	26	

Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7627	
Probennummer:	27	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7627	
Probennummer:	28	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	29	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	30	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.28	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	31	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7626	
Probennummer:	32	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7627	
Probennummer:	33	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	34	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7627	
Probennummer:	35	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7627	
Probennummer:	36	



Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	37	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	38	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7626	
Probennummer:	39	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7629	
Probennummer:	40	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7629	
Probennummer:	41	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7629	
Probennummer:	42	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7629	
Probennummer:	43	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7630	
Probennummer:	44	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	45	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7629	
Probennummer:	46	

Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7625	
Probennummer:	47	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7609	
Probennummer:	48	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7608	
Probennummer:	49	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7608	
Probennummer:	50	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7608	
Probennummer:	51	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7609	
Probennummer:	52	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7608	
Probennummer:	53	
Datum der Farbbestimmung:	16.02.22	
Farbnummer:	7607	
Probennummer:	54	
Datum der Farbbestimmung:	16.02.22	
Farbnummer:	7606	
Probennummer:	55	
Datum der Farbbestimmung:	16.02.22	
Farbnummer:	7606	
Probennummer:	55.1	








Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7609	
Probennummer:	59	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	60	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	61	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7628	
Probennummer:	62	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7616	
Probennummer:	63	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7616	
Probennummer:	64	
Datum der Farbbestimmung:	17.02.22	
Farbnummer:	7616	

Abbildung 6 Appendix: Überblick der Farbvarianzen von Schweine- und Rindfleisch nach dem Schockfrostern