

### **3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

#### Zielsetzung der Versuche:

- Marktanalyse zur Bestimmung des Qualitätsniveaus von geräuchertem, vakuumverpacktem Forellenfilet an verschiedenen Punkten der Herstellungs- und Vertriebskette; Probenahme im Herstellerbetrieb, Großhandel und Einzelhandel
- Ermittlung der Lagertemperatur in den Kühleinrichtungen der Verkaufsstätten zur Einschätzung der Lagerbedingungen in der Praxis
- Durchführung von Modell-Lagerversuchen unter den vorab ermittelten Kühltemperaturen, um den Einfluß dieses Faktors auf die Produktqualität zu erfassen

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Probenmaterial**

Die Untersuchungen zur Ermittlung des Qualitätsniveaus von vakuumverpackten Räucherforellenfilets wurden an Material unterschiedlicher Herkunft durchgeführt:

- 28 Proben direkt von nordhessischen Herstellern (Kleinbetriebe, mittelständische Betriebe) (n=12)
- 44 Proben aus dem Großhandel (n=12)
- 94 Proben aus dem Einzelhandel (n=32)

Der Transport zum Untersuchungsamt erfolgte direkt nach der Probenahme in einer Kühlbox (<5°C).

Die für die Lagerversuche bestimmten Proben stammten aus der laufenden Tagesproduktion eines mittelständischen Fischzuchtbetriebs, der sich in Vorversuchen durch ein gutes, gleichmäßiges Hygieneniveau seiner Produkte ausgezeichnet hatte. In dieser Teichwirtschaft werden die Forellen bis zu einem Endgewicht von 250-300 g gemästet, nach einer Hälterungszeit von 3-4 Tagen getötet und mit einer Forellenschlachtmaschine

ausgenommen. Anschließend werden die Fische über Nacht in eine 10%ige Salzlake eingelegt. Die Räucherung erfolgt in einem traditionellen Altonaer Ofen und dauert ca. 1,5 Stunden. Danach werden die Forellen in einem Kühlraum bei Temperaturen von 0-1 °C abgekühlt und am nächsten Tag von Hand filetiert, vakuumverpackt und bei 0-1 °C gelagert.

Zur Untersuchung wurden aus dem Kühlraum insgesamt 84 vakuumverpackte Räucherforellenfilets entnommen. Der Transport erfolgte in einer Kühlbox mit Kühlelementen bei ca. 2 °C. Nach Anlieferung im Amt wurden die Proben sofort bei der jeweils ausgewählten Versuchstemperatur gelagert.

### **3.1.2 Nährmedien**

- Lebensmittel-Keimzahlagar; ISO (Merck)
- Chromocult® Coliformen Agar (Merck)
- Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar; VRBD (Oxoid)
- Pseudomonas-Selektivnährboden C-F-C (Oxoid)
- Lactobacillus-Agar nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE; MRS (Oxoid)
- Hefeextrakt-Glucose-Oxytetracyclin-Selektivnährboden; OGYE (Oxoid)
- BAIRD-PARKER-Nährboden; BP (Oxoid)
- Bacillus-Cereus-Selektivnährboden; PEMBA (Oxoid)
- Leberbouillon (Merck)
- OPSP-Selektivnährboden (Oxoid)
- SHAHIDI-FERGUSON-Perfringens-Selektivnährboden; SFP (Oxoid)
- Listeria-Anreicherungsbouillon nach FDA/IDF-FIL (Merck)
- PALCAM-Listeria-Selektivagar nach VAN NETTEN et al. (Merck)
- Salmosyst® (Merck)
- Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT und VASSILIADIS (Merck)
- Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar; BPLS (Oxoid)
- Xylose-Lysin-Desoxyacholat-Agar; XLD (Oxoid)
- RAMBACH®-Agar (Merck)
- Peptonwasser, gepuffert (Oxoid)
- Blutagar (Oxoid)
- Kohlenhydratlösungen (Rhamnose, Xylose)

### 3.1.3 Reagenzien / Diagnostika

- Bactident<sup>®</sup>-Oxidase-Teststäbchen (Merck Art.Nr. 13300)
- Bactident<sup>®</sup>-Katalase (Merck Art.Nr. 11351)
- Staphylase-Test (Oxoid Art.Nr. DR 595)
- BBL<sup>®</sup> Enterotube<sup>™</sup> II (Becton-Dickinson)
- BBL<sup>®</sup> Minitek<sup>™</sup> Anaerobe II (Becton-Dickinson)
- Gram-Färbereagenzien:
  - Grams Kristallviolettlösung (Merck Art.Nr. 9218)
  - Lugolsche Lösung (Merck Art.Nr. 9261)
  - Fuchsin-Lösung (Chroma)

### 3.1.4 Chemikalien

- Perchlorsäure (0,6 molar)
- Natronlauge (32%ig)
- Borsäure (gesättigt)
- Salzsäure ( 0,05 molar)
- Kaliumhexacyanoferrat (II)-Lösung
- Zinkacetat-Lösung
- Salpetersäure (0,5 molar)
- Silbernitratlösung (0,1 molar)

### 3.1.5 Geräte

- Temperaturmessung:
  - Meßdaten-Speichergerät „testostor 171-4“ mit 4 externen Temperaturfühleranschlüssen
  - 2 Lebensmittelfühler aus Edelstahl (Länge 125mm, Durchmesser 4mm, an der Spitze 3mm)
  - 2 Luftfühler aus Edelstahl (Länge 40mm, Durchmesser 3mm)
  - Temperatur-Meßgerät „testo 112“ mit Fühler

- Mikrobiologische Untersuchung:

- Gravimetrischer Diluter GD-150 (Spiral Systems Instruments, Inc.)
- Stomacher Lab Blender 400 (seward)
- Spiralplater Model C (Spiral Systems Instruments, Inc.)
- Anaerobier Werkbank (Don Whitley Scientific Limited)
- Brutschränke (30 °C, 37 °C, 42 °C) (Heraeus)

- Chemisch-physikalische Untersuchungen:

- Moulinette
- Ultra Turrax T 25
- Ultraschallbad (Sonorex Super RK 102 H)
- Destillationsapparatur (Büchi)
- Titroprozessor 686 (Metrohm)
- Silberelektrode, massiv (Metrohm)
- pH-Meter 761 Calimatic (Knick) mit „Ingold 406-M6“-Elektrode
- Hygroskop WA-14 TH (Rotronic)

### **3.1.6 Sonstige Materialien**

- DLG-Prüfschema für Räucherfisch – Ganze Erzeugnisse, auch Hälften (DEUTSCHE LANDWIRTSCHAFTS-GESELLSCHAFT, 1997)
- 3 DLG-Sachverständige als Prüfer

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Untersuchungen an geräucherten, vakuumverpackten Forellenfilets**

#### **3.2.1.1 Ablauf**

Falls Probenpaare (2 Packungen Forellenfilets vom gleichen Hersteller mit gleichen Haltbarkeitsdaten aus ein und demselben Geschäft bzw. Betrieb) vorlagen, wurde eine Probe sofort nach ihrer Anlieferung untersucht, während die zweite bis zum Ablauf des deklarierten Haltbarkeitsdatums bei 4 °C gelagert wurde.

Die Proben wurden nach Entnahme der entsprechenden Menge für die mikrobiologische Analyse sensorisch und chemisch (TVB-N-Gehalt) untersucht. Außerdem wurden stichprobenweise der Kochsalzgehalt, der pH-Wert und die Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert) ermittelt.

#### **3.2.1.2 Mikrobiologische Untersuchung**

Die mikrobiologische Untersuchung umfaßte neben der Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl den Nachweis verschiedener Mikroorganismengruppen, die einerseits zur normalen Fischflora zählen, andererseits Bedeutung für den mikrobiellen Verderb der Produkte besitzen.

Weiterhin wurden in die Untersuchung humanpathogene bzw. -toxinogene Mikroorganismen einbezogen, die als Ursache von Lebensmittelvergiftungen durch Räucherfisch in Frage kommen.

##### **3.2.1.2.1 Bestimmung der Keimzahl**

###### Probenaufbereitung:

Nach keimfreier Öffnung der Vakuumverpackung und steriler Entnahme der entsprechenden Probemenge für die Untersuchung auf Clostridien wurden von jeder Probe ca. 10 g Rückenmuskulatur in einen sterilen Stomacherbeutel mit Filtrierschlauch (Bagfilter<sup>®</sup>, Interscience) eingewogen. Der Probe wurde mit Hilfe des Gravimetrischen Diluters GD-150 die 9-fache Menge Verdünnungslösung (gepuffertes Peptonwasser,

Oxoid) beigegeben. Die verdünnte Probe wurde 4 Minuten in einem Stomacher homogenisiert und durch den Filtrierschlauch in ein Becherglas überführt.

Anschließend wurde eine dezimale Verdünnungsreihe des Probenhomogenisates in Höhe der zu erwartenden Keimzahlen angelegt. Dazu wurden mit einer sterilen Pipette 5 ml der Ausgangsverdünnung in eine Nährboden-Flasche mit 45 ml steriler Verdünnungslösung (gepuffertes Peptonwasser, Oxoid) überführt. Die Verdünnungen wurden vor ihrer weiteren Verwendung mit einer Metallkappe verschlossen und sorgfältig durchmischt.

#### Beimpfung der Nährböden:

Die Beimpfung der Nährböden (Tab. 13) mit der Ausgangsverdünnung (1:10) erfolgte im Spatelverfahren. Hierfür wurden mit einer sterilen Pipette jeweils 0,1 ml der Ausgangsverdünnung auf die Nährmedien gegeben und mit einem sterilen Glasspatel auf der Oberfläche der Nährböden in kreisender Bewegung gleichmäßig verteilt.

Zur Beimpfung mit den weiteren Dezimalverdünnungen (1:100, 1:10.000) diente die Spiralplattenmethode. Zunächst wurden die entsprechenden Nährböden für 30 Minuten bei 42 °C im Brutschrank vorgetrocknet. Beginnend mit der größten Verdünnungsstufe wurden jeweils 37 µl der Probenflüssigkeit vom Spiralplater aus einem sterilen Becher aufgezogen. Nach dem Aufsetzen des Verteilerarms auf die Oberfläche der rotierenden Nährbodenplatte wurde die Probenflüssigkeit automatisch in spiralförmiger Form von innen nach außen fortlaufend aufgetragen. Aus der Abgabe eines sich kontinuierlich verringernden Probenvolumens resultierten nach der Bebrütung gut abgetrennte Kolonien mit von innen nach außen wachsenden Abständen. Zwischen den einzelnen Proben wurde das Auftragesystem durch Ansaugen einer kleinen Menge Desinfektionsmittel und Nachspülen mit destilliertem Wasser gereinigt. Die Nährmedien wurden mit dem Boden der Petri-Schale nach oben entsprechend den Angaben der Hersteller bebrütet (Tab. 13).

#### Auswertung und Berechnung der Koloniezahl:

Es wurden jene Verdünnungsstufen zur Auswertung herangezogen, auf denen zwischen 10 und 100 klar voneinander abgegrenzte Kolonien gewachsen waren. Lagen auf der größten Verdünnungsstufe mehr als 100 Kolonien vor, so erfolgte die Zählung mit Hilfe eines speziellen, in Segmente gegliederten Zählnetzes und unter Berücksichtigung eines entsprechenden Umrechnungsfaktors bei der Koloniezahlbestimmung.

Tab. 13: Nährmedien zur Bestimmung des Keimgehaltes

Nährmedien [Keimspektrum]	Inkubationsbedingungen		
	Dauer (in h)	T (in °C)	Milieu
Lebensmittel-Keimzahlagar (ISO) [aerobe mesophile Gesamtkeimzahl]	72	30	aerob
Pseudomonas-Selektivnährboden C-F-C (CFC-103) [Pseudomonaden]	48	30	aerob
Chromocult <sup>R</sup> Coliformen Agar [coliforme Keime]	24	37	aerob
Lactobacillus-Agar nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (MRS) [Laktobazillen]	72	37	anaerob
Hefeextrakt-Glucose-Oxytetracyclin- Selektivnährboden (OGYE) [Hefen und Schimmelpilze]	96	25	aerob
BAIRD-PARKER-Nährboden (BP) [ <i>Staphylococcus aureus</i> ]	48	37	aerob
Bacillus-Cereus-Selektivnährboden (PEMBA) [ <i>Bacillus cereus</i> ]	24 24	37 Raum-T.	aerob aerob

Zur Eingruppierung der Kolonien in die entsprechende Keimgruppe wurden die spezifischen kulturmorphologischen Merkmale und weitere Bestätigungsreaktionen herangezogen, wie nachfolgende Aufstellung zeigt:

- GKZ:

Alle gewachsenen Kolonien wurden gezählt und hinsichtlich der taxonomischen Zugehörigkeit orientierend überprüft. Die Differenzierung erfolgte durch Gramfärbung, Ermittlung der Cytochromoxidase- oder Katalase-Aktivität sowie durch biochemische Reaktionen (BBL<sup>®</sup> Enterotube<sup>™</sup> II).

- **Pseudomonaden:**

Auf CFC-103 gewachsene Kolonien wurden nur dann gezählt, wenn sie sich als Cytochromoxidase-positiv erwiesen. Dazu wurde mit einer sterilen Impföse die zu prüfende Kolonie auf die Reaktionszone eines Oxidase-Teststäbchens aufgebracht und bei Blaufärbung als positiv gewertet.
- **Coliforme Keime:**

Alle rosa-roten Kolonien (Coliforme) sowie zusätzlich alle dunkelblau-violetten (E.coli) wurden auf Chromocult-Agar ausgezählt.
- **Laktobazillen:**

Alle Kolonien, die sich typischerweise sehr klein bis klein, grauweiß oder weiß darstellen, wurden auf dem MRS-Agar registriert.
- **Hefen / Schimmelpilze:**

Die Bestätigung des Hefewachstums auf dem OGYE-Nährboden erfolgte über die Gramfärbung. Gewachsene Schimmelpilze wurden mikroskopisch differenziert.
- ***Staphylococcus aureus*:**

Auf dem BP-Agar wurden alle charakteristischen Kolonien (Durchmesser 1,5-3 mm, schwarz, glänzend, gewölbt, mit schmalem weißem Rand und klarer Aufhellungszone) und auch ebenso große, schwarze Kolonien ohne Aufhellungszone (negative Eigelb-Reaktion) registriert und mit dem Staphylase-Test zum Nachweis des Clumping-Faktors (zellwand-gebundene Koagulase) überprüft.
- ***Bacillus cereus*:**

Auf dem PEMBA-Agar gewachsene Kolonien wurden nur dann gezählt, wenn sie folgende spezifische Morphologie aufwiesen: gezackte, ca. 5 mm große, türkis bis pfauenblau gefärbte Kolonien, die von einer ausgeprägten Eigelb-Präzipitation der gleichen Färbung umgeben waren.

Aus den ermittelten Koloniezahlen wurden für alle Keimarten jeweils die koloniebildenden Einheiten pro g (KbE/g) berechnet. Dabei wurde die Summe der ausgezählten Kolonien durch die untersuchte Substratmenge (0,1 bei der Ausgangsverdünnung bzw. 0,037 bei den weiteren Verdünnungsstufen) dividiert. Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor ergab sich schließlich die Zahl der KbE/g. Waren auf den angelegten Verdünnungsstufen keine Kolonien gewachsen, so lautete das Ergebnis: „Weniger als  $1,0 \times 10^2$  KbE/g“.



### 3.2.1.2.2 Qualitativer Nachweis von Clostridien (Presence-Absence-Test)

Weil in geräucherten Fischerzeugnissen Clostridien i.d.R. meist nur in sehr geringen Keimzahlen zu erwarten sind, wurde als Untersuchungsmethode der empfindlichere presence / absence-Test gewählt.

Dazu wurden jeweils 2 Röhrrchen mit je 10 ml Leberbouillon (und erstarrter Paraffinschicht) während 5 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt, um den restlichen Luft-sauerstoff auszutreiben. Unmittelbar nach Öffnung der Vakuumverpackung wurden aus der Tiefe der Fischmuskulatur jeweils eine Probe (ca. 1 g) entnommen, unter die Paraffinschicht gegeben und die Röhrrchen sofort aus dem Wasserbad geholt. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C über 10 Tage.

Bei Gasbildung und/oder Trübung in der Leberbouillon wurden Subkulturen auf 2 Blutplatten, 2 OPSP-Selektivnährböden sowie 2 SFP-Nährböden angelegt, wovon eine aerob, die andere anaerob (Anaerobier-Werkbank) bei 37 °C über 24 h inkubiert wurde. Nach vergleichender Bewertung der bebrüteten Nährböden wurden die strikt anaerob gewachsenen Kolonien zunächst mikroskopisch (Gramfärbung) identifiziert.

Der Verdacht „Anwesenheit von *Clostridium perfringens*“ wurde anhand des mikroskopischen Nachweises von grampositiven Stäbchen mit oder ohne Sporen sowie aufgrund der folgenden kulturmorphologischen Merkmale der obligat anaerob gewachsenen Kolonien geäußert:

- OPSP: schwarz, Durchmesser 2-4 mm
- SFP: schwarz, Durchmesser 2-4 mm, z.T. opaker Hof (Lezithinase-positiv)
- Blutagar: zweistufige Hämolyse ( $\beta$ -Hämolysezone, anschl. unvollständige Hämolyse)

Die Bestätigung verdächtiger Kolonien erfolgte mit dem Reverse-CAMP-Test sowie mit dem Minitek-System für Anaerobier. Für den Reverse-CAMP-Test wurde ein Referenzstamm (*Streptococcus agalactiae*,  $\beta$ -hämolsierend) in der Mitte einer Blutagar-Platte ausgestrichen. Im Abstand von 1 mm zu diesem Impfstrich wurden beidseitig im rechten Winkel parallel Impfstriche von vermuteten *Clostridium-perfringens*-Kulturen aufgetragen. Die Blutplatte wurde anaerob über 24 h bei 37 °C bebrütet. Als *Clostridium perfringens* galten Kulturen, die eine pfeilspitzenförmige Aufhellung ( $\beta$ -Hämolyse) im Bereich der im rechten Winkel zusammenführenden Impfstriche zeigten.

Auf der Basis biochemischer Reaktionen ermöglicht das Minitek-System für Anaerobier (Becton-Dickinson) eine Differenzierung von Clostridien. Dazu wurde die Minitek-Testplatte entsprechend den Angaben des Herstellers mit den Substratblättchen und der angesetzten Bakteriensuspension (mit typischen Einzelkolonien beimpfte Minitek-Bouillon) beschickt. Nach 48 stündiger anaerober Bebrütung bei 37 °C und Zusatz verschiedener Reagenzien erfolgte dann die Auswertung mittels eines Kodierbuches.

### 3.2.1.2.3 Nachweis von Salmonellen

Die qualitative Untersuchung auf Salmonellen erfolgte in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG „Untersuchung von Lebensmitteln; Nachweis von Salmonellen“ (L 00.00-20):

Von jeder Lagerprobe (d.h. bis zum Ablauf des deklarierten Haltbarkeitsdatums bei 4 °C aufbewahrt) wurden 25 g in eine Nährbodenflasche mit 225 ml Salmosyst<sup>®</sup>-Basisbouillon gegeben und in einen Stomacherbeutel (Stomacher ‘400’ bags, seward) überführt. Diese Voranreicherung wurde eine Minute in einem Stomacher gründlich vermischt und anschließend wieder in die Nährbodenflasche überführt. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C über 16-20 h.

Aus der bebrüteten Voranreicherung wurden 0,2 ml in ein Reagenzglas mit 10 ml RV-Bouillon gegeben sowie weitere 10 ml der Voranreicherung in ein Reagenzglas zu einer Tablette Salmosyst<sup>®</sup>-Selektivsupplement. Nach Durchmischung erfolgte die Bebrütung bei 42 °C für 48 h (RV-Bouillon) bzw. bei 37 °C für mindestens 18 h.

Nach der Inkubation wurde je Anreicherung eine Öse Material fraktioniert auf BPLS-, XLD- und RAMBACH<sup>®</sup>-Agar ausgestrichen und 18-24 h bei 37 °C bebrütet. Danach wurden die Platten auf salmonellaverdächtige Kolonien inspiziert. Auf BPLS-Agar erscheinen lactosenegative Salmonellen als blaßrosa Kolonien mit leuchtend rotem Hof, während sie auf XLD-Agar die Farbe des Nährbodens annehmen, mit z.T. schwarzem Zentrum. Auf RAMBACH<sup>®</sup>-Agar markieren sie sich kräftig rosa. Mit salmonellaverdächtigen Kolonien wurde eine Probeagglutination mit polyvalenten *Salmonella*-Antiseren durchgeführt.

#### 3.2.1.2.4 Listeriennachweis und Bestimmung der Listerienzahl

Der qualitative Listeriennachweis erfolgte in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (L 00.00-22), modifiziert nach MANGOLD (1991):

Von den Rand- und Außenbezirken der Probe wurden 25 g Material zu 225 ml *Listeria*-Anreicherungsbouillon gegeben und während einer Minute im Stomacher gründlich vermischt. Nach 24stündiger Bebrütung bei 30 °C wurde der pH-Wert der Anreicherungsbouillon mit NaOH (4mol) auf pH 7,0 bis 7,2 eingestellt. Anschließend wurden 0,1 ml der bebrüteten Bouillon für eine Subanreicherung entnommen und in 10 ml *Listeria*-Anreicherungsbouillon überführt. Sowohl der ursprüngliche Ansatz wie auch die Subanreicherung wurden weitere 24 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden aus beiden Anreicherungen je eine Öse Material fraktioniert auf PALCAM-Agar ausgestrichen und für 48 h bei 37 °C bebrütet. Als listerienverdächtig wurden äskulinhydrolysierende, grüngraue, flach gewölbte Kolonien mit dunklem, eingezogenem Zentrum und schwarzem Hof eingestuft. Zur Anzüchtung von Reinkulturen wurden mindestens 8 für *Listeria* charakteristische Kolonien auf je einem Blutagar fraktioniert ausgestrichen und 48 h bei 37 °C bebrütet.

Im nächsten Schritt wurden folgende Bestätigungsreaktionen zur Identifizierung und Differenzierung der Reinkulturen durchgeführt:

- Gramfärbung:  
Mit Kolonien der Blutplatten wurde eine Gramfärbung durchgeführt. *Listeria* sind gram-positiv, kurze Stäbchen.
- Katalase-Test:  
Eine typische Kolonie wurde auf einen Objektträger übertragen und mit einem Tropfen Katalase-Reagenz (3%ige Wasserstoffperoxidlösung) überschichtet. *Listeria* verhalten sich Katalase-positiv (Bläschenbildung).
- Oxidase-Test:  
Eine verdächtige Kolonie wurde mittels einer Impföse auf der Reaktionszone eines Oxidase-Teststäbchens verrieben. *Listeria* sind Oxidase-negativ (keine Blaufärbung).
- CAMP-Test (Abb. 2):  
Ein  $\beta$ -Hämolysin-bildender *Staphylococcus aureus*-Teststamm sowie ein *Rhodococcus equi*-Teststamm wurden strichförmig quer über je eine Blutagar-Platte

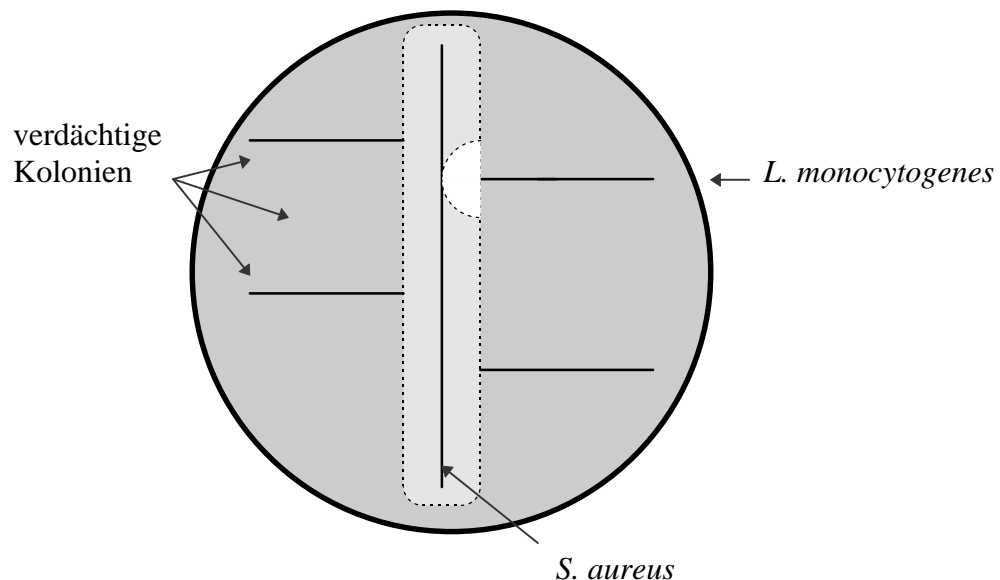
ausgeimpft. Verdächtige Einzelkolonien wurden dann im rechten Winkel so aufgetragen, daß der Impfstrich knapp neben dem der Teststämme begann. Die Bebrütung erfolgte für 24 h bei 37 °C.

*Listeria monocytogenes* ist im CAMP-Test positiv gegen *Staphylococcus aureus* (vollständige, schüsselförmige Hämolysezone im Bereich der  $\beta$ -Hämolysezone des *S. aureus*-Stammes).

*Listeria ivanovii* ist im CAMP-Test positiv gegen *Rhodococcus equi* (schüsselförmige Hämolyse in Nähe des *Rhodococcus equi*-Impfstriches).

*Listeria innocua* bildet keinerlei Hämolysezonen aus.

**Abb. 2: Verlauf der Impfstriche beim CAMP-Test mit *S.aureus***



- Kohlenhydratspaltung:

Xylose- und rhamnosehaltige Nährmedien wurden beimpft und 7 Tage bei 37 °C bebrütet. Als positiv war eine deutliche Gelbfärbung des Mediums zu bewerten. *Listeria monocytogenes* ist Rhamnose-positiv sowie Xylose-negativ und läßt sich auf diese Art von *Listeria seelegeri* abgrenzen, welche im CAMP-Test gegen *S. aureus* ebenfalls positiv reagiert.

Für einige der isolierten *Listeria monocytogenes*-Stämme wurde eine Serotypisierung im BgVV-Dessau durchgeführt.

Zur quantitativen Untersuchung auf Listerien wurde mit einer sterilen Kapillare 0,1 ml aus der homogenisierten Probe (25 g Probe + 225 ml Anreicherungsbouillon) entnommen und auf einer PALCAM-Platte ausgespatelt. Nach 48stündiger Bebrütung bei 37 °C wurde die Platte auf listerienverdächtige Kolonien (s.o.) untersucht und alle für Listerien charakteristische Kolonien gezählt. Die Berechnung der Keimzahl erfolgte nach Feststellung der Anzahl der verdächtigen Kolonien und nach Durchführung der Bestätigungsreaktionen (Tab. 14).

**Tab. 14: Bewertung der Ergebnisse**

<b>Ergebnis</b>	<b>Bewertung</b> (unter Angabe der Spezies)
a) keine Listerien in 25 g b) keine Listerien c) —	Listerien nicht nachweisbar in 25 g
a) Listerien positiv in 25 g b) keine Listerien c) positiv	Listerien nachgewiesen in 25 g, aber < 10 <sup>2</sup> /g Lebensmittel
a) Listerien positiv in 25 g b) < 4 bestätigte Listerien-Kolonien c) positiv	Listerien nachgewiesen in 25 g, aber < 10 <sup>2</sup> /g Lebensmittel
a) Listerien positiv in 25 g b) ≥ 4 bestätigte Listerien-Kolonien c) > 80 % positiv	alle im Direktausstrich gezählten Listerien-Kolonien x 100 = Koloniezahl
a) Listerien positiv in 25 g b) ≥ 4 bestätigte Listerien-Kolonien c) < 80 % positiv	alle im Direktausstrich gezählten Listerien-Kolonien x prozentualer Anteil positiver Bestätigungsreaktionen x 100 = Koloniezahl

- a) Selektivanreicherung
- b) Direktausstrich
- c) Bestätigungsreaktionen

### 3.2.1.3 Sensorische Untersuchung

Die sensorische Untersuchung der Forellenfilets wurde nach Art der DLG-Prüfung durchgeführt. Zur Anwendung gelangte das Prüfschema für Räucherfisch – Ganze Erzeugnisse, auch Hälften (DEUTSCHE LANDWIRTSCHAFTS-GESELLSCHAFT, 1997), dessen Mängelliste um den Fehler modriger Geruch und Geschmack erweitert werden mußte. Die Beurteilung durch eine Gruppe von 3 DLG-Sachverständigen erfolgte jeweils sofort nach steriler Entnahme der Proben für die mikrobiologischen Untersuchungen. Bei der Auswertung wurde zwischen den durch Überlagerung erzeugten Mängeln und den materialbedingten, bereits bei Produktionsende bestehenden Fehlern differenziert, so daß schließlich zwei Qualitätszahlen – einerseits für den Lagerfehler, andererseits für den Gesamtfehler incl. Lagerfehler – berechnet werden konnten.

### 3.2.1.4 TVB-N-Bestimmung (Total-Volatile-Basis-N)

Die Untersuchung erfolgte als Doppelbestimmung je Probe in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG „Untersuchung von Lebensmitteln; Bestimmung des Gehaltes von flüchtigen stickstoffhaltigen Basen (TVB-N) in Fischen und Fischerzeugnissen (Referenzverfahren)“ (L 10.00-3): Für die Extraktion der flüchtigen stickstoffhaltigen Basen wurden ca. 40 g grobzerkleinerte Fischmuskulatur mit 160 ml 0,6molarer Perchlorsäure versetzt, homogenisiert und filtriert. 50 ml dieses Filtrates wurden danach in eine zur Wasserdampfdestillation geeignete Apparatur gegeben und unmittelbar vor Beginn der Destillation mit 15 ml Natronlauge (32%ig) versetzt. Als Vorlage dienten 25 ml gesättigter Borsäure. Das so gewonnene Destillat wurde anschließend unter Rühren mit 0,05molarer Salzsäure titriert (Titroprozessor 686 Metrohm).

Der TVB-N-Gehalt in mg/kg Probe wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{mg TVB-N/kg Probe} = \text{ml HCl} \times 0,05 \times 14 \times 10 \times 10$$

ml HCl: Verbrauch der Salzsäure in ml bei pH 4,8

0,05: Molarität der Salzsäure

14: Molmasse von Stickstoff

10: 10 g Fisch/50 ml (Wert variiert je nach Gesamteinwaage)

10: Umrechnungsfaktor

### **3.2.1.5 Kochsalzbestimmung**

Die Bestimmung des Kochsalzgehaltes erfolgte in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG „Untersuchung von Lebensmitteln; Bestimmung des Kochsalzgehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen“ (L 06.00-5): Es wurden zunächst ca. 10 g der gut homogenisierten Probe mit heißem Wasser extrahiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe der zwei Reagenzien Kaliumhexacyanoferrat (II)-Lösung und Zinkacetat-Lösung ausgefällt. Nach Filtration und Ansäuern wurde die Probe mit 0,1molarer Silbernitratlösung potentiometrisch titriert und der Chloridgehalt als Natriumchlorid-Gehalt in g/100 g der Probe berechnet.

### **3.2.1.6 Ermittlung des pH-Wertes**

Zur pH-Wert-Bestimmung wurde das pH-Meter Calimatic der Fa. Knick mit der Elektrode „Ingold 406-M 6“ verwendet. Vor jeder Messung wurde das pH-Meter unter Verwendung von zwei Pufferlösungen (pH 4,01 bzw. pH 7,00) kalibriert. Die Messung erfolgte durch Einstechen der Elektrode in die Rückenmuskulatur, und zwar vor der Grobzerkleinerung des Materials für die TVB-N-Bestimmung. Der angezeigte Wert wurde auf eine Stelle hinter dem Komma ab- bzw. aufgerundet.

### **3.2.1.7 $a_w$ -Wert-Messung**

Die Bestimmung der Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert) wurde mit dem Hygroskop WA-14 TH der Fa. Rotronic durchgeführt. Nach Kalibrierung des  $a_w$ -Meßgerätes wurde das zerkleinerte Probenmaterial in die  $a_w$ -Meßstation eingebracht und nach ca. einer Stunde der Wert abgelesen.

### **3.2.2 Lagertemperaturmessung in Verkaufskühlmöbeln**

Zur Überprüfung, inwieweit die deklarierte Lagertemperatur unter Praxisbedingungen eingehalten wird, wurden in verschiedenen offenen Verkaufskühlmöbeln des Einzel- (n=9) und Großhandels (n=3) Langzeitmessungen an geräucherten, vakuumverpackten Forellenfilets durchgeführt.

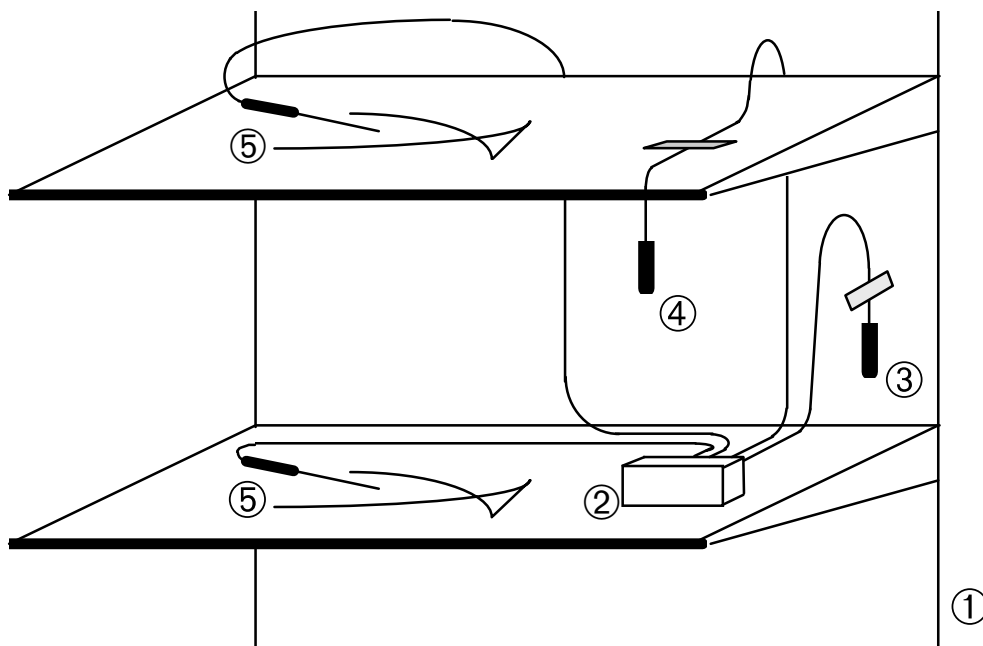
Zu Beginn der Untersuchung wurden die in den Kühlregalen eingebauten Thermometer abgelesen und der angezeigte Wert mit dem Temperatur-Meßgerät „testo 112“ vergleichend überprüft. Darüber hinaus wurden Art, Zustand und Beladung der Kühleinrichtungen registriert sowie die auf den Packungen angegebene Lagertemperatur und das Mindesthaltbarkeitsdatum notiert.

Für die Temperaturmessungen wurde das Meßdaten-Speichergerät „testostor 171-4“ mit vier externen Temperaturfühleranschlüssen zur gleichzeitigen Temperaturerfassung an verschiedenen Stellen eingesetzt. Einerseits wurde die Produkttemperatur mit zwei geeichten Lebensmittelfühlern erfaßt, andererseits wurden der Kaltluftstrom bzw. die Umgebungstemperatur mit zwei Luftfühlern gemessen. Die Programmierung des Meßdaten-Speichergeräts erfolgte über einen Personalcomputer (PC); dabei wurden den einzelnen Meßkanälen die Temperaturfühler zugeordnet sowie der Meßtakt (alle 10 Min.) und der Meßstart festgelegt. Nach Abschluß der Erhebung wurden die gespeicherten Daten ausgelesen, als Dateien im PC gespeichert und mit dem Programm MS-Excel 7.0 ausgewertet.

Folgende Versuchsanordnung wurde gewählt (Abb. 3): Mit den beiden Luftfühlern wurde die Temperatur der gekühlten Luft im Bereich der Luftzufuhr und die Umgebungstemperatur am vorderen Rand der Regale gemessen. Zur Bestimmung der Kerntemperatur der geräucherten Forellenfilets wurden die beiden Packungen je nach Platzierung der Ware vor Ort entweder in zwei Regalabteilungen unterschiedlicher Höhe oder jeweils an der Rückwand und am vorderen Rand eines Regals gelagert. Das Meßdaten-Speichergerät und die restlichen Kabel wurden in einer kleinen, angebohrten Geldkassette untergebracht, die mit einem Kabelschloß an dem Kühlregal befestigt wurde. Die Messungen wurden über jeweils 5-6 Tage unter Einbeziehung des Wochenendes durchgeführt, da in den Kühlmöbeln an verkaufsfreien Tagen häufig andere Temperaturverhältnisse (z.B. durch fehlende Nachtdeckung) herrschen.



Abb. 3: Versuchsanordnung (Schemazeichnung)



- ① offenes Verkaufskühlmöbel mit zwei Regalabteilungen
- ② Meßdaten-Speichergerät „testostor 171-4“
- ③ Luftfühler (Kaltluftzufuhr)
- ④ Luftfühler (Umgebungstemperatur)
- ⑤ Lebensmittelfühler im vakuumverpackten Forellenfilet

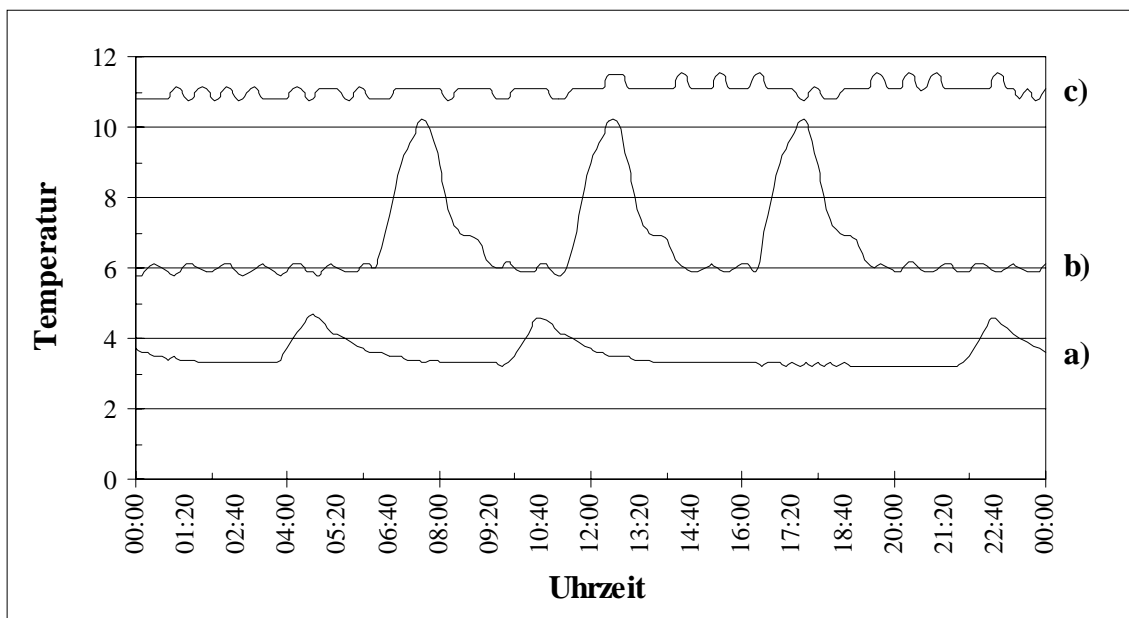
### 3.2.3 Lagerversuche

In mehrwöchigen Versuchen sollte die Lagerfähigkeit vakuumverpackter Räucherforellenfilets bei den vorab in der Praxis ermittelten Kühltemperaturen untersucht werden. Insbesondere war zu prüfen, welche Auswirkungen die häufig nicht sachgerechte Aufbewahrung bei höheren bzw. stark schwankenden Temperaturen auf die Produktqualität besitzt.

Letztlich sah die Versuchsanordnung eine Lagerung der Forellenfilets unter drei verschiedenen Kühlbedingungen vor: Die Lagertemperatur von 3,5 °C wurde gewählt, weil sie in Anbetracht der potentiellen Kontamination von Räucherfisch mit *Cl. botulinum* Typ E vom ROBERT-KOCH-INSTITUT (1997) sowie dem ARBEITSKREIS LEBENS-

MITTELHYGIENISCHER TIERÄRZTLICHER SACHVERSTÄNDIGER (1997) zur Risikominimierung vorgeschlagen wurde. Die Aufbewahrung bei einer Temperatur von 11 °C entsprach dagegen Kühlbedingungen, wie sie teilweise in den Kühlmöbeln des Handels angetroffen wurden. Zur Simulation einer nicht sachgerechten, mit starken Temperaturschwankungen verbundenen Lagerung wurden bei 6 °C gelagerte Forellenfilets an jedem Werktag dreimal für eine Stunde einer Temperatur von 11 °C ausgesetzt (Abb. 4).

**Abb. 4:** Graphische Darstellung der ausgewählten Lagertemperaturen über 24 Stunden



a) Lagerung bei 3,5 °C,      b) Lagerung bei 6 °C (11 °C),      c) Lagerung bei 11 °C

Auf der Basis einer handelsüblichen Haltbarkeitsfrist von 3-4 Wochen wurden insgesamt 84 vakuumverpackte Räucherforellenfilets bis zum 29. Tag bzw. 33. Tag nach Herstellungsabschluß gelagert. Die Untersuchungszeitpunkte sind in Tab. 15 schematisch dargestellt.

An den einzelnen Versuchstagen wurden jeweils 3 Proben aus jedem Temperaturbereich überprüft. Dabei erfolgte die mikrobiologische Analyse nach der schon beschriebenen Methodik. Der Salmonellennachweis konnte aufgrund der begrenzten Materialmenge (125 g-Packungen) nur an einer Probe je Lagertemperatur-Gruppe durchgeführt werden.

**Tab. 15: Schematische Darstellung der Untersuchungszeitpunkte**

Lager- temperatur [°C]	Versuchstag nach Herstellungsabschluß									
	1	5	8	12	15	19	22	26	29	33
3,5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6 (11)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	–
11	x	x	x	x	x	x	x	x	x	–

Die sensorische Begutachtung wurde wiederum von 3 Prüfern in Anlehnung an das DLG-Prüfschema für Räucherfisch - Ganze Erzeugnisse, auch Hälften (DEUTSCHE LANDWIRTSCHAFTS-GESELLSCHAFT, 1997) durchgeführt. Einen Tag nach Herstellungsabschluß wurden außerdem NaCl-Gehalt, pH- und  $a_w$ -Wert bestimmt. Darüber hinaus wurde an 28 Proben geprüft, ob sich die Bestimmung des flüchtigen Basenstickstoffs (TVB-N) als chemischer Parameter für die Beurteilung des Frischezustandes eignet.

### 3.2.4 Statistische Auswertung

Für die Daten der verschiedenen Untersuchungen wurden die Kenngrößen Median ( $x_{50}$ ), arithmetisches Mittel ( $\bar{x}$ ), 25%-Quartil ( $x_{25}$ ), 75%-Quartil ( $x_{75}$ ) sowie z.T. die Standardabweichung ( $s$ ) berechnet. Um die Lage- und Streuungsverhältnisse der ermittelten TVB-N-Werte (Kap. 4.1.3) zu veranschaulichen, wurden verschiedene statistische Kenngrößen in einer Graphik, dem Box- und Whisker-Plot, zusammengefaßt.

Als Ausreißer wurden Werte klassifiziert, deren Abstand vom 25%-Quartil nach unten bzw. vom 75%-Quartil nach oben zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen der Boxhöhe lag. Der Abstand extremer Werte von dem 25%-Quartil oder dem 75%-Quartil betrug mehr als das 3fache der Boxhöhe (BROSIUS, 1995) (Abb. 5, siehe Anhang).

Außerdem wurden aus den Daten der TVB-N-Bestimmung und den Ergebnissen der sensorischen und mikrobiologischen Untersuchungen der jeweilige Korrelationskoeffizient (Maßkorrelationskoeffizient  $r$ ) als statistische Kenngröße für den Zusammenhang von Merkmalen berechnet.