

**Beiträge zur Qualitätssicherung von Fischprodukten am  
Beispiel des Schwarzen Heilbutts  
(*Reinhardtius hippoglossoides*)**

Von der Philosophischen Fakultät  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Philosophie  
Dr. phil.

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Berufspäd. Carolin Kütemeyer,  
geboren am 01.02.1974 in Itzehoe

Referentin: Frau Prof. Dr. Brita M. Watkinson

Koreferentin: Frau Prof. Dr. Karin Schwarz

Tag der Promotion: 12.12.2005

## **Abstract**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Verarbeitungsverfahrens am Beispiel des Schwarzen Heilbutts mit dem die Textur von ganzen Filets oder Carbonaden mittels des Enzyms Transglutaminase verfestigt wird. Dieses Verfahren sollte über die Minimierung von Verarbeitungs- und Transportverlusten zur Minimierung der Herstellungskosten und zu einer Schonung der natürlichen Ressource Fisch beitragen. Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Deutschen See GmbH & Co. KG, Bremerhaven, durchgeführt.

Wichtigstes Versuchsergebnis ist, dass mikrobielle Transglutaminase die Textur von Schwarzem Heilbutt verfestigt. Diese Verfestigung fiel jedoch schwächer als bei anderen Fischen aus und variierte zudem von Charge zu Charge. Als mögliche Gründe hierfür wurden der relativ hohe Fettgehalt, der schwankende Proteingehalt sowie die unterschiedlich lang andauernde Gefrierlagerung vor der Verarbeitung postuliert. Als optimale und auch innovative Transglutaminase-Applikation bei der Verarbeitung von Heilbutt-Carbonaden stellte sich das Einlegen der Fischstücke für 60 min in eine Lake aus Trinkwasser mit 0,5 % (w/v) Transglutaminase ( $350 \text{ IE l}^{-1}$ ) und 15 % (w/v) Natriumchlorid heraus. Die 15%-ige NaCl-Lake wirkte sich positiv auf die Aktivität der Transglutaminase aus und wird auch in der konventionellen Verarbeitung zum Salzen der Fischstücke eingesetzt. Andere Salze ( $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ) und Salzkonzentrationen konnten zwar ebenfalls die Aktivität der Transglutaminase steigern; die Transglutaminase-induzierte Texturverfestigung war jedoch in Anwesenheit von NaCl am stärksten.  $\text{CaCl}_2$  senkte die Transglutaminase-Aktivität in der Lake. Die in der industriellen Verarbeitung von Schwarzem Heilbutt vorgesehenen Prozessschritte können auch nach Einsatz von Transglutaminase in der üblichen Form beibehalten werden. Insgesamt konnte in zwei Versuchsreihen eine mittlere Texturverfestigung von 19 % bzw. 12 % durch die beschriebene Transglutaminase-Applikation erzielt werden. Diese Texturverfestigung führte zu einer Senkung der Verarbeitungs- und Transportverluste mit einem Einsparpotenzial durch Rohstoffersparnis von über 6.000 kg Schwarzem Heilbutt pro Jahr bzw. über 61.000 Euro pro Jahr. Damit erfüllt die Transglutaminase-Behandlung eines der Schutzziele der ökologischen Nachhaltigkeit, nämlich das Ziel der Schonung der natürlichen Ressource Fisch. Durch den industriellen Garprozess wurde die Transglutaminase sicher inaktiviert. Eine Beeinflussung der mikrobiologischen Qualität der Heilbutt-Carbonaden durch Transglutaminase konnte nicht festgestellt werden.

Gefördert wurde diese Arbeit von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt im Rahmen des Projektes „Modellhafter Einsatz des Biokatalysators Transglutaminase zur Texturverfestigung als Voraussetzung der Herstellung mikrobiologisch sicherer Fisch-Convenience-Produkte“, AZ 13053/07, Bearbeitungszeitraum August 2001 bis November 2004.

Schlüsselwörter: Transglutaminase, Schwarzer Heilbutt, Texturverfestigung

## **Abstract**

The object of this work was the development of a processing method to preserve the texture of whole fillets or carbonades of Greenland halibut by means of treatment with the enzyme transglutaminase. This process should also lead to a minimisation in losses incurred during processing and transport as well as to a minimisation of manufacturing costs and to the conservation of fish stocks. The experiments were carried out in co-operation with Deutsche See GmbH & Co. KG, Bremerhaven.

The most important result of the experiments is the finding that microbial transglutaminase preserves the texture of Greenland halibut. The degree of preservation was however, less than in the case of other species and varied from sample to sample. Possible reasons postulated for this include the relative high fat content, variations in protein content and differing lengths of time of storage in freezers. An optimal (and innovative) application of transglutaminase in the processing of halibut carbonades was found to consist of soaking the pieces of fish for 60 mins in a solution of tap water with 0.5 % (w/v) transglutaminase (350 IE l<sup>-1</sup>) and 15 % (w/v) sodium chloride.

The 15 % NaCl solution had a positive effect on transglutaminase activity and it is also used in conventional salting processing of fish pieces. Other salts (KCl, MgCl<sub>2</sub>) and salt concentrations were also able to increase the effectiveness of transglutaminase but the transglutaminase induced preservation of flesh texture was strongest in the presence of NaCl. CaCl<sub>2</sub> reduced the effectiveness of the transglutaminase solution. It was also possible to continue to use normal industrial processing methods for greenland halibut after the transglutaminase treatment. Altogether it was possible in two series of experiments to achieve a degree of texture preservation of 19 % and 12 % respectively using the transglutaminase application described above. These levels of preservation led to a reduction in processing and transport losses which indicate a potential for a saving in raw materials of 6,000 kg of Greenland halibut or 61,000 Euros per year. Thus the transglutaminase treatment meets one of the objectives of ecological sustainability in that it contributes to the conservation of fish stocks. The transglutaminase was safely neutralised during industrial cooking processes. No influence of the transglutaminase on the microbiological quality of halibut carbonades was detected.

This work was supported by the German Environmental Foundation (Deutsche Bundestiftung Umwelt) as part of the project, "A model for using the biological catalyst transglutaminase to preserve the texture of flesh as a precondition for the production of microbiologically safe fish convenience products, AZ 13053/07". The work was carried out during the period August 2001 to November 2004.

Key words: transglutaminase, Greenland halibut, preservation of texture

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr.-Ing. B. M. Watkinson für die Überlassung des interessanten und praxisnahen Themas, für die zahlreichen Diskussionen und die freundliche, intensive Betreuung während der gesamten Laufzeit des Forschungsprojektes.

Besonders möchte ich auch Janna Grotheer für die vielen gemeinsamen Stunden im Technikum und die große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken. Vieles wurde leichter!

Herrn Dr. rer. nat. H.-D. Werlein danke ich herzlich für die interessanten Gespräche und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. K. Schwarz danke ich für die hilfreichen, kritischen Diskussionen.

Bei Dipl. Oecotroph. Grazyna Schatton möchte ich mich für die Unterstützung im Labor und die große Hilfsbereitschaft bedanken. Hierfür danke ich ebenfalls Frau G. Gläser.

Nicht vergessen möchte ich die Studierenden des Instituts für Lebensmittelwissenschaft, die mich bei den experimentellen Arbeiten tatkräftig unterstützt haben.

Für die freundliche Zusammenarbeit, die Rohstofflieferungen und die Möglichkeit, Pilotversuche durchzuführen, möchte ich mich bei Frau Dr. M. Koch und Herrn M. Bontemps von der Deutschen See GmbH & Co. KG, Bremerhaven, bedanken.

Herrn A. Wille von der Firma Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, sei für die kostenlose Bereitstellung des Enzyms gedankt.

Der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU), Osnabrück, gilt mein Dank für die finanzielle Förderung.

Meinem Mann Jens möchte ich ganz herzlich für seine große Unterstützung, die aufmunternden Worte und die Unnachgiebigkeit danken.

Meinen Eltern und meiner Schwester Wiebke danke ich ganz herzlich dafür, dass sie immer für mich da waren, immer hinter mir standen und mich in jeder Form unterstützt haben.

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
II.	Abbildungsverzeichnis.....	10
III.	Tabellenverzeichnis.....	15
IV.	Abkürzungsverzeichnis.....	18
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>20</b>
1.1	Verarbeitungsschwierigkeiten des Schwarzen Heilbutts ( <i>Reinhardtius hippoglossoides</i> ).....	22
1.2	Wirkung und Einsatzmöglichkeiten von Transglutaminase .....	24
1.3	Transglutaminase-Einsatz in Fischprodukten.....	27
1.4	Zielsetzung.....	30
<b>2</b>	<b>Wirkung der Transglutaminase auf Heilbutt im Vergleich zu anderen Fischen</b> .....	<b>32</b>
2.1	Einleitung .....	32
2.2	Material und Methode.....	34
2.2.1	Rohware.....	34
2.2.2	Herstellung der Fischfarcen .....	35
2.2.3	Entfetten der Heilbuttmuskulatur.....	36
2.2.4	Texturmessung .....	36
2.2.5	Qualitative Darstellung der Vernetzungsaktivität der Transglutaminase mittels SDS-PAGE.....	36
2.2.6	Makronährstoffbestimmung von Heilbutt, Regenbogenforelle und Lachs .....	37
2.2.7	Statistische Auswertung.....	37
2.3	Ergebnisse .....	38
2.3.1	Verfestigung von Fischfarce durch Transglutaminase .....	38
2.3.2	Auswirkungen verschiedener Transglutaminase-Konzentrationen auf die Festigkeit des Schwarzen Heilbutts.....	39
2.3.3	Auswirkungen der Tiefgefrierlagerung auf die Festigkeit des Schwarzen Heilbutts .....	40
2.3.4	Modifizierung der Vernetzung der Heilbuttfarce durch Soja, Phosphat und Entfettung.....	41

2.3.5	Qualitative Darstellung der Vernetzungsaktivität der Transglutaminase mittels SDS-PAGE .....	47
2.3.6	Makronährstoffbestimmung.....	50
2.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	50
<b>3</b>	<b>Untersuchung der Transglutaminase auf proteolytische Aktivität .....</b>	<b>58</b>
3.1	Einleitung .....	58
3.2	Material und Methode.....	58
3.2.1	Proteinanalyse des Transglutaminase-Präparates Activa WM.....	58
3.2.2	Untersuchung des Transglutaminase-Präparates Activa WM auf proteolytische Aktivität .....	59
3.3	Ergebnisse .....	59
3.3.1	Proteinanalyse des Transglutaminase-Präparates Activa WM.....	59
3.3.2	Untersuchung des Transglutaminase-Präparates Activa WM auf proteolytische Aktivität .....	60
3.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	62
<b>4</b>	<b>Ermittlung von Aktivitätsparametern der Transglutaminase .....</b>	<b>63</b>
4.1	Einleitung .....	63
4.2	Material und Methoden.....	65
4.2.1	Aktivitätsermittlung der Transglutaminase mittels Hydroxamat-Test...65	
4.2.2	Herstellung der Heilbuttfarce mit verschiedenen Salzen.....	67
4.2.3	Statistische Auswertung.....	68
4.3	Ergebnisse .....	68
4.3.1	Auswirkung von Salzen auf die Aktivität und Hitzestabilität von Transglutaminase.....	68
4.3.2	Auswirkung verschiedener Salze auf die Festigkeit und den Gewichtsverlust von Heilbuttfarce .....	75
4.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	76
<b>5</b>	<b>Verarbeitung von Schwarzem Heilbutt unter Einsatz von Transglutaminase im Technikumsmaßstab .....</b>	<b>85</b>
5.1	Einleitung .....	85
5.1.1	Textur von Fisch.....	90
5.1.2	Texturmessung .....	90
5.2	Material und Methoden.....	92

5.2.1	Etablierung der Messmethode .....	92
5.2.2	Texturanalyse.....	94
5.3	Ergebnisse .....	95
5.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	96
5.5	Material und Methoden.....	100
5.5.1	Einlegdauer in Transglutaminase-Lösung / Zeitpunkt des Salzens...100	
5.5.2	Ermittlung der optimalen Transglutaminase-Konzentration in Verbindung mit der optimalen Applikationsmethode.....	102
5.5.3	Ermittlung optimaler Temperatur-Zeit-Bedingungen der Transglutaminase-Behandlung .....	103
5.5.4	Texturanalyse.....	104
5.5.5	Statistische Auswertung.....	104
5.6	Ergebnisse .....	105
5.6.1	Einlegdauer in Transglutaminase-Lösung / Zeitpunkt des Salzens...105	
5.6.2	Ermittlung der optimalen Transglutaminase-Konzentration in Verbindung mit der optimalen Applikationsmethode.....	106
5.6.3	Ermittlung optimaler Temperatur-Zeit-Bedingungen der Transglutaminase-Behandlung .....	110
5.7	Zusammenfassung und Diskussion.....	115
<b>6</b>	<b>Durchführung von Pilotversuchen in der industriellen Produktion zur Verarbeitung von Schwarzem Heilbutt unter Einsatz von Transglutaminase.....</b>	<b>119</b>
6.1	Einleitung .....	119
6.2	Material und Methoden.....	119
6.2.1	Pilotversuche I-V .....	119
6.2.2	Pilotversuche VI-X.....	120
6.2.3	Texturanalyse.....	120
6.2.4	Statistische Auswertung.....	120
6.2.5	Stoffstrombilanzierung .....	121
6.3	Ergebnisse .....	122
6.3.1	Pilotversuche I-V .....	122
6.3.2	Pilotversuche VI-X.....	127
6.3.3	Stoffstrombilanzierung .....	129

6.3.3.1	Standardverfahren .....	130
6.3.3.2	Lakebehandlung mit Transglutaminase .....	131
6.3.3.3	Umweltrelevante Bewertung .....	132
6.3.3.4	Ökonomische Bewertung .....	134
6.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	136
<b>7</b>	<b>Sicherheitsaspekte bezüglich des Einsatzes von Transglutaminase.....</b>	<b>140</b>
7.1	Einleitung .....	140
7.1.1	Mikrobiologische Aspekte zur Fischqualität.....	140
7.2	Material und Methoden.....	142
7.2.1	D- und z-Wert-Ermittlung der Transglutaminase .....	142
7.2.2	Mathematischer Nachweis der Inaktivierung der Transglutaminase durch den industriellen Garprozess.....	143
7.2.3	Experimenteller Nachweis der Inaktivierung der Transglutaminase im Fischmuskel durch den industriellen Garprozess .....	144
7.2.4	Mikrobiologische Qualität der rohen und gegarten Heilbutt-Car- bonaden .....	144
7.2.5	Statistische Auswertung .....	146
7.3	Ergebnisse .....	146
7.3.1	D- und z-Wert-Ermittlung der Transglutaminase .....	146
7.3.2	Mathematischer Nachweis der Inaktivierung der Transglutaminase durch den industriellen Garprozess.....	148
7.3.3	Experimenteller Nachweis der Inaktivierung der Transglutaminase im Fischmuskel durch den industriellen Garprozess .....	149
7.3.4	Mikrobiologische Qualität der rohen und gegarten Heilbutt-Car- bonaden .....	149
7.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	152
<b>8</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>156</b>
<b>9</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>158</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>179</b>
10.1	Kapitel 2 .....	179
10.2	Kapitel 4 .....	181
10.3	Kapitel 5 .....	185

## II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Bildung des Acyl-Enzymintermediates und dessen Reaktion mit einem primären Amin (modifiziert nach Pasternack, 1998) .....	26
Abb. 2.1: Festigkeit der gegarten Fischfarce (maximale Kompressionskraft) mit (15 IE 100 g <sup>-1</sup> Fischfarce) und ohne Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe) .....	38
Abb. 2.2: Festigkeit (maximale Kompressionskraft) und Gewichtsverlust (%) der gegarten Heilbuttfarce in Abhängigkeit von der eingesetzten Transglutaminase-Konzentration (n=10 pro Versuchsreihe) .....	39
Abb. 2.3: Auswirkung der Tiefgefrierlagerung auf die Festigkeit (maximale Kompressionskraft) gegarter Heilbuttfarce (n=10 pro Versuchsreihe) .....	41
Abb. 2.4: Veränderung der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) von gegarter Heilbuttfarce nach Zusatz von Soja und/oder Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe, HB: Heilbutt; TG: Transglutaminase) .....	42
Abb. 2.5: Veränderung der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) von gegarter Forellenfارce nach Zusatz von Soja und/oder Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe, FO: Forelle; TG: Transglutaminase) .....	42
Abb. 2.6: Veränderung der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) von gegarter Lachsfarce nach Zusatz von Soja und/oder Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe, TG: Transglutaminase) .....	43
Abb. 2.7: Veränderung der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) von gegarter Heilbuttfarce nach Zusatz von Phosphat und/oder Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe, HB: Heilbutt; TG: Transglutaminase; P: Phosphat) .....	44
Abb. 2.8: Mittlere Gewichtsverluste (g) der Heilbuttfarce pro Fischfarceförmchen (n=10 pro Versuchsreihe, HB: Heilbutt, TG: Transglutaminase, P: Phosphat) .....	44
Abb. 2.9: Festigkeit verschiedener Fischfarce (maximale Kompressionskraft) mit und ohne Transglutaminase im Vergleich (n=10 pro Versuchsreihe, FO: Forelle; TG: Transglutaminase; HB: Heilbutt) .....	45

Abb. 2.10: Veränderung der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) nach Entfettung der Heilbuttfarce (n=10 pro Versuchsreihe, HB: Heilbutt; TG: Transglutaminase).....	45
Abb. 2.11: SDS-PAGE der extrahierten Heilbuttproteine nach Behandlung der Farce mit unterschiedlichen Transglutaminase-Konzentrationen pro 100 g Fisch (S = Molekulargewichtsstandard, MHC = schwere Myosinketten).....	48
Abb. 2.12: SDS-PAGE der extrahierten Forellenproteine nach Behandlung der Farce mit Transglutaminase (S = Molekulargewichtsstandard, MHC = schwere Myosinketten).....	49
Abb. 2.13: SDS-PAGE der extrahierten Lachsproteine nach Behandlung der Farce mit Transglutaminase (S = Molekulargewichtsstandard, MHC = schwere Myosinketten).....	49
Abb. 3.1: SDS-PAGE der Transglutaminase Activa WM (Standard (Spur 1), 10 µl Probe (50 µg, Spur 2), 15 µl Probe (75 µg, Spur 3), 20 µl Probe (100 µg, Spur 4), Standard (Spur 6)).....	60
Abb. 3.2: SDS-PAGE von Rinderserumalbumin vor und nach Inkubation mit Transglutaminase Activa WM (Proben B und C); (Standard (Spur 1), 8 µl Probe vor der Inkubation (4 µg BSA, Spur 2), 8 µl Probe nach der Inkubation (4 µg BSA, Spur 3)).....	61
Abb. 3.3: SDS-PAGE von Rinderserumalbumin mit Transglutaminase und einem Proteaseinhibitormix; Standard (Spur 1), Probe 1 (Spur 2), Probe 2 (Spur 3), Probe 3.1 (Spur 4), Probe 3.2 (Spur 5), Standard (Spur 6) .....	62
Abb. 4.1: Enzymaktivität der Transglutaminase (IE g <sup>-1</sup> ) in Abhängigkeit vom Lösungsmedium und der Erhitzungstemperatur (n=6) .....	69
Abb. 4.2: Enzymaktivität der Transglutaminase (IE g <sup>-1</sup> ) in Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration des Lösungsmediums und der Erhitzungstemperatur (n=6) .....	72
Abb. 4.3: Enzymaktivität der Transglutaminase (IE g <sup>-1</sup> ) in Abhängigkeit von der Kaliumchloridkonzentration des Lösungsmediums und der Erhitzungstemperatur (n=6) .....	72

Abb. 4.4: Enzymaktivität der Transglutaminase (IE g <sup>-1</sup> ) in Abhängigkeit von der Magnesiumchloridkonzentration des Lösungsmediums und der Erhitzungstemperatur (n=6) .....	74
Abb. 4.5: Enzymaktivität der Transglutaminase (IE g <sup>-1</sup> ) in Abhängigkeit von der Calciumchloridkonzentration des Lösungsmediums und der Erhitzungstemperatur (n=6) .....	75
Abb. 4.6: Auswirkung verschiedener Salze auf die Festigkeit (maximale Kompressionskraft) und den Gewichtsverlust (g) von Heilbuttfarce mit (15 IE 100 g <sup>-1</sup> Fisch) und ohne Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe).....	76
Abb. 5.1: Prozessschema der industriellen Verarbeitung des Schwarzen Heilbutts.....	87
Abb. 5.2: Darstellung einer Heilbutt-Carbonade mit Muskelbauch .....	94
Abb. 5.3: Einfluss des Zeitpunktes des Salzens auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; TG=0,5 % (2,8 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein); NaCl=15 %).....	105
Abb. 5.4: Einfluss verschiedener Transglutaminase-Behandlungen auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; TG=0,5 % (2,8 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein); NaCl=15 %) .....	106
Abb. 5.5: Einfluss verschiedener Transglutaminase-Konzentrationen auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) lakebehandelter, gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; Lakebehandlung=60 min, 10-15 °C).....	107
Abb. 5.6: Einfluss verschiedener injizierter Transglutaminase-Konzentrationen auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; injizierte TG-Lösung=10-15 °C).....	108
Abb. 5.7: Einfluss der Abtrocknungstemperatur auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) lakebehandelter, gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; Lakebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein), 60 min, 10-15 °C).....	110
Abb. 5.8: Einfluss der Abtrocknungszeit auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) lakebehandelter, gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10;	

NaCl=15 %; Lakebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein), 60 min, 10-15 °C) .....	111
Abb. 5.9: Einfluss der Abtrocknungstemperatur auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) injektionsbehandelter, gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; Injektionsbehandlung=0,15 % TG (0,03 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein), 10-15 °C).....	112
Abb. 5.10: Einfluss der Abtrocknungszeit auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) injektionsbehandelter, gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; Injektionsbehandlung=0,15 % TG (0,03 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein), 10-15 °C) .....	112
Abb. 5.11: Auswirkung der Laketemperatur auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; Lakebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein)) .....	114
Abb. 6.1: Mittlere Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) der gegarten Heilbutt-Carbonaden der Pilotversuche I-V in Abhängigkeit von Applikationsverfahren und Transglutaminase-Konzentration (n=5; NaCl=15 %; Lakebehandlung= 60 min, 10-15 °C; Injektionslösung=10-15 °C) .....	124
Abb. 6.2: Prozentuale Veränderung der Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) der mit Transglutaminase behandelten Heilbutt-Carbonaden im Vergleich zum Standard ohne Transglutaminase in Abhängigkeit von Applikationsverfahren und Transglutaminase-Konzentration (n=5; Pilotversuche I-V) .....	126
Abb. 6.3: Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) der gegarten Heilbutt-Carbonaden (Lake 0,5 %) im Vergleich zum Standard der Pilotversuche VI-X (n=5).....	128
Abb. 6.4: Zusammenfassung der Gewichtsverluste der Heilbutt-Carbonaden, die durch das Garen und Herabfallen entstanden (n=5; Pilotversuche VI-X) .....	128
Abb. 6.5: Input- und Outputströme des Standardverfahrens der industriellen Heilbuttverarbeitung .....	131

Abb. 6.6: Input- und Outputströme der Innovationsmethode Lakebehandlung mit Transglutaminase .....	132
Abb. 6.7: Produktverluste bei der Heilbuttverarbeitung Standard vs. Innovationsmethode Transglutaminase-Lakebehandlung .....	133
Abb. 6.8: Gesamte Wertverluste am Produkt „Schwarzer Heilbutt“ bei der Lakebehandlung Standard und bei dem Innovationsherstellungsverfahren .....	136
Abb. 7.1: Logarithmierte Aktivität ( $\log \text{IE g}^{-1}$ ) der Transglutaminase nach stufenweiser Erhitzung bei 50 °C .....	146
Abb. 7.2: Logarithmierte Aktivität ( $\log \text{IE g}^{-1}$ ) der Transglutaminase nach stufenweiser Erhitzung bei 55 °C .....	147
Abb. 7.3: Logarithmierte Aktivität ( $\log \text{IE g}^{-1}$ ) der Transglutaminase nach stufenweiser Erhitzung bei 60 °C .....	147
Abb. 7.4: Logarithmierte Aktivität ( $\log \text{IE g}^{-1}$ ) der Transglutaminase nach stufenweiser Erhitzung bei 65 °C .....	147
Abb. 7.5: Logarithmierte D-Werte der Transglutaminase in Abhängigkeit von der Temperatur.....	148
Abb. 7.6: Aerobe Gesamtkeimzahlen ( $\log \text{KbE/g}$ ) der rohen Heilbutt-Carbonaden (n = 15) .....	151
Abb. 7.7: Aerobe Gesamtkeimzahlen ( $\log \text{KbE/g}$ ) der frisch gegarten Heilbutt-Carbonaden (n = 15) .....	151
Abb. 7.8: Aerobe Gesamtkeimzahlen ( $\log \text{KbE/g}$ ) der gegarten Heilbutt-Carbonaden nach 12-tägiger Lagerung bei 5 °C (n = 15) ...	151

### III. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Zunahme der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) der Fischfar- cen durch Transglutaminase (15 IE 100 g <sup>-1</sup> Fischfarce, n=10).....	39
Tab. 3.1: Zusammensetzung pro ml Probe.....	59
Tab. 4.1: Versuchsablauf des Hydroxamat-Tests.....	66
Tab. 4.2: Veränderung der mittleren Transglutaminase-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> ) in Ab- hängigkeit von Natrium- bzw. Kaliumchloridkonzentration im Ver- gleich zur Lösung in reinem Trinkwasser (n=6).....	70
Tab. 4.3: Veränderung der mittleren Transglutaminase-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> ) durch Erhitzung in Abhängigkeit von Natrium- bzw. Kaliumchloridkonzen- tration (n=6).....	71
Tab. 4.4: Veränderung der mittleren Transglutaminase-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> ) in Ab- hängigkeit von Magnesium- bzw. Calciumchloridkonzentration im Vergleich zur Lösung in reinem Trinkwasser (n=6).....	73
Tab. 4.5: Veränderung der mittleren Transglutaminase-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> ) durch Erhitzung in Abhängigkeit von Magnesium- bzw. Calciumchloridkon- zentration (n=6).....	74
Tab. 4.6: Zunahme der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) der mit ver- schiedenen Salzen hergestellten, gegarten Heilbuttfarce durch Transglutaminase (15 IE 100 g <sup>-1</sup> Fisch, n=10).....	76
Tab. 5.1: Verwendete Messvorsätze mit Probenvolumina und ermittelten Varia- tionskoeffizienten (n=10).....	95
Tab. 5.2: Eingesetzte Enzymeinheiten.....	103
Tab. 5.3: Veränderung der mittleren Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden in Anhängigkeit von Transglutami- nase-Behandlungsverfahren und -konzentration (n=10).....	109
Tab. 5.4: Gewichtsverlust der gegarten Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von Abtrocknungstemperatur und -zeit (n=10; NaCl=15 %; Injek- tionsbehandlung=0,15 % TG (0,03 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein), 10-15 °C; La- kebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein), 60 min, 10-15 °C)....	113
Tab. 5.5: Gewichtsverlust der gegarten Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von der Laketemperatur (NaCl=15 %; Lakebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g Fischprotein <sup>-1</sup> ), 60 min).....	115

Tab. 6.1: Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von Applikationsverfahren und Transglutaminase-Konzentration (Pilotversuche I-V) .....	123
Tab. 6.2: Prozentuale Veränderung der Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) Transglutaminase-behandelter Heilbutt-Carbonaden zum Standard (Pilotversuche I-V, n siehe Tab. 6.1).....	127
Tab. 6.3: Festigkeit der gegarten Heilbutt-Carbonaden (Kompressionskraft pro Gewicht), Veränderung der Festigkeit durch Transglutaminase im Vergleich zum Standard und Gewichtsverluste durch Garen und Herabfallen (Pilotversuche VI-X) .....	129
Tab. 6.4: Rohstoffverluste bei den einzelnen Schritten der Heilbuttverarbeitung bezogen auf ein Produktionsjahr .....	130
Tab. 6.5: Wertverluste am Rohstoff Fisch bei der Heilbuttverarbeitung bezogen auf ein Produktionsjahr.....	135
Tab. 7.1: Durchschnittliche Keimbelastung der aufgetauten Heilbutt-Carbonaden.	149
Tab. 10.1: Mittlere Festigkeit (maximale Kompressionskraft) der Fischfarcen mit (15 IE 100 g <sup>-1</sup> Fischfarce) und ohne Transglutaminase (n=10) .....	179
Tab. 10.2: Mittlere Festigkeit (maximale Kompressionskraft) und Gewichtsverlust (%) der gegarten Heilbuttfarce in Abhängigkeit von der eingesetzten Transglutaminase-Konzentration (n=10).....	179
Tab. 10.3: Mittlere Festigkeit (maximale Kompressionskraft) der gegarten Heilbuttfarce nach Verwendung frischer und tiefgefrorener Heilbuttmuskulatur mit (15 IE 100 g <sup>-1</sup> Fischfarce) und ohne Transglutaminase (n=10).....	179
Tab. 10.4: Mittlere Festigkeit (maximale Kompressionskraft) der Fischfarcen der Versuche 1, 2, 3 und 4 (n=10).....	180
Tab. 10.5: Mittlere Transglutaminase-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> ) in Abhängigkeit von Natrium- bzw. Kaliumchloridkonzentration (n=6).....	181
Tab. 10.6: Mittlere Transglutaminase-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> ) nach Erhitzung in Abhängigkeit von Natrium-bzw. Kaliumchloridkonzentration (n=6) .....	182
Tab. 10.7: Mittlere Transglutaminase-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> ) in Abhängigkeit von Magnesium- bzw. Calciumchloridkonzentration (n=6) .....	183

Tab. 10.8: Mittlere Transglutaminase-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> ) nach Erhitzung in Abhängigkeit von Magnesium bzw. Calciumchloridkonzentration (n=6) .....	184
Tab. 10.9: Festigkeit (maximale Kompressionskraft) gegarter Heilbuttfarcen mit verschiedenen Salzen mit (15 IE 100 g <sup>-1</sup> Fisch) und ohne Transglutaminase (n=10).....	184
Tab. 10.10: Mittlere Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Salzens (n=10; NaCl=15 %) .....	185
Tab. 10.11: Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von Transglutaminase-Behandlungsverfahren und -Konzentration (n=10; NaCl=15 %).....	185
Tab. 10.12: Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von Abtrocknungstemperatur und -zeit (n=10; NaCl=15 %; Injektionsbehandlung=0,15 % TG (0,03 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein), 10-15 °C; Lakebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein), 60 min, 10-15 °C).....	186
Tab. 10.13: Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) der gegarten Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von der Laketemperatur (n=10; NaCl=15 %; Lakebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g <sup>-1</sup> Fischprotein), 60 min) .....	187

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr
Abb.	Abbildung
BSA	Rinderserumalbumin
cm	Zentimeter
dest.	destillata
f	Frequenz
FO	Forelle
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
g	Gramm
GKZ	Gesamtkeimzahl
HB	Heilbutt
Hz	Hertz
IE	internationale Einheit
KbE	koloniebildende Einheit
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
l	Liter
M	Molarität
mA	Milliamper
MHC	myosin heavy chain, schwere Myosinketten
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Stichprobenumfang
N	Newton
N	Normalität
nm	Nanometer

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pH	negativ dekadischer Logarithmus der $H_3O^+$ - Ionenkonzentration
S	Molekulargewichtsstandard
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TCBS	Thiosulfat Citrat Galle Saccharose
TG	Transglutaminase
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1 Einleitung

Fisch ist aufgrund seiner textuellen Eigenschaften in vielerlei Hinsicht ein wesentlich empfindlicheres Lebensmittel als Schlachtfleisch. Genau wie andere Lebensmittel ist Fischfleisch strukturell und rheologisch ein komplexes Material. Es besteht sowohl aus festen als auch aus viskosen Komponenten. Die textuellen Charakteristika des Fisches ergeben sich aus den Eigenschaften und Konzentrationen der strukturellen Elemente der Gewebe und ihrer komplexen Anordnung innerhalb des Muskels. (Dunajski, 1979)

Wichtige Eigenschaften sowohl des Fischfleisches als auch des Schlachtfleisches sind auf die vorhandenen Muskelproteine zurückzuführen. Die Proteine bilden die natürliche Struktur des Muskels, seiner Zellen und Myofibrillen und immobilisieren bzw. binden das Wasser, welches die mengenmäßig am stärksten vertretene Komponente des Fleisches ist. Wasserbindung und Texturbildung beeinflussen das Verhalten des Rohstoffes und die Erzeugnisqualität. Durch die funktionellen Eigenschaften der Muskelproteine können Texturen entstehen, die von fest bis weichmusig reichen, ohne dass durch eine einfache quantitative Proteinbestimmung auf die textuellen Eigenschaften geschlossen werden kann. (Tülsner, 1994)

Im Vergleich zu höheren Tieren, die zahlreiche verschiedene Muskeln aufweisen, ist der Körperbau des Fisches relativ einfach gestaltet (Dunajski, 1979). Er setzt sich aus dem weißen Muskel, der sich beidseitig des Körpers vom Kopf bis zur Schwanzwurzel erstreckt, und dem roten Muskel, der direkt unter der Haut liegt und längs der Seitenlinie die Vertiefung zwischen Rücken- und Bauchteil ausfüllt, zusammen (Tülsner, 1994). Die Fischmuskeln haben eine typische metamerische Struktur. Sie sind aus Myomeren aufgebaut, die durch Bindegewebshüllen, den Myocommata (transversal) und den Myosepten (horizontal), getrennt werden (Belitz, Grosch, 2001). Das Bindegewebe des Fisches bildet im Gegensatz zu warmblütigen Tieren ein einheitlich strukturiertes Netzwerk (Dunajski, 1979). Während des Kochens gelatiniert das Bindegewebe und der Muskel zerfällt in schollenartige Segmente (Belitz, Grosch, 2001). Die Myocommata und Myosepten bestehen zum überwiegenden Teil aus Kollagen. Der Gesamtkollagenanteil des Fisches ist jedoch

mit 1-12 % des Rohproteingehaltes wesentlich geringer als bei Säugetierfleisch; dort beträgt der Anteil 20-25 % (Rehbein, Oehlschläger, 1996). Im reinen Muskelgewebe von Hering und Kabeljau wurden Kollagengehalte von nur 0,4-0,6 % bestimmt. Der restliche Kollagenanteil befindet sich in Haut, Schuppen und Gräten der Fische (Tülsner, 1994). Fische sind nicht in gleichem Maße auf die Stütz- und Haltefunktion des Bindegewebes angewiesen wie Säugetiere, da sie in ihrem Umgebungsmilieu, dem Wasser, weniger Kräfte aufnehmen müssen (Raeuber, 1993).

Fischkollagen besteht nur zu einem geringeren Teil aus Prolin und Hydroxyprolin als das Kollagen warmblütiger Tiere. Der geringere Anteil dieser beiden Aminosäuren, die wichtige strukturgebende Eigenschaften des Proteins vermitteln, führt zu geringerer Thermostabilität und verstärkter Löslichkeit des Kollagens, als es bei Schlachtfleisch der Fall ist. Bereits bei niedrigeren Temperaturen beginnt das Kollagen der Fische daher zu schrumpfen, und der Denaturierungsprozess setzt ein. (Dunajski, 1979)

Es hat sich gezeigt, dass das Kollagen von in antarktischen, kalten Gewässern lebenden Fischen bereits bei Temperaturen von 23-29 °C schrumpft (Rigby, 1968), während dies bei Fischen aus wärmeren Gewässern erst bei Temperaturen von 54-58 °C geschieht (Gustavson, 1956). Zudem enthält das Fischmuskelgewebe weniger Elastin als das Gewebe warmblütiger Tiere (Dunajski, 1979).

Aufgrund des geringen Anteils an Bindegewebe und der im Vergleich zu Schlachtfleisch differenzierten Zusammensetzung des Kollagens ist die Fischmuskulatur durch autolytische Prozesse, z. B. die Reifung, und durch hydrolytische Einflüsse, z. B. während des Garens, leichter angreifbar (Raeuber, 1993). Je nach Fischart können diese Besonderheiten zu mehr oder weniger ausgeprägten Problematiken während der Verarbeitung führen. Schwierigkeiten bereitet hier insbesondere der Schwarze Heilbutt (*Reinhardtius hippoglossoides*).

## **1.1 Verarbeitungsschwierigkeiten des Schwarzen Heilbutts (*Reinhardtius hippoglossoides*)**

Der Schwarze Heilbutt (*Reinhardtius hippoglossoides*) ist ein arcto-borealer, zur Ordnung der Plattfische gehörender Knochenfisch. Er ist in den tiefen Gewässern des Nordatlantik beheimatet. (Bowering, Nedreaas, 2001)

Heilbutt wird vielfach in Carbonaden geschnitten und zum Garen gespittet (auf Stäbe aufgespießt). Bei der Verarbeitung von Schwarzem Heilbutt ergeben sich gehäuft Probleme, die durch die Qualität der Rohware beeinflusst werden. Bereits 1975 berichteten Pribe und Reichstein von den durch Konsistenzmängel auftretenden Rohstoffverlusten bei der Herstellung heißgeräucherter Erzeugnisse aus Schwarzem Heilbutt. Beeinträchtigungen der Konsistenz gehören zu den weitverbreitetsten und gefürchtetsten Mängeln bei der Herstellung heißgeräucherter Produkte aus Schwarzem Heilbutt. In extremen Fällen sei die Muskulatur der Fische durch die Hitzeeinwirkung während des Räucherns so weich geworden, dass das Carbonadenstück insgesamt durch sein eigenes Gewicht abreißt und zu Boden fällt. Trotz jahrelanger Beobachtungen und Untersuchungen ließ sich das Auftreten dieses Konsistenzmangels an den Rohfischen in keine direkte Korrelation zu chemischen oder physikalischen Parametern bringen, so dass letztlich nur die Räucherprobe in der Lage war, Aufschluss über die Verarbeitungseigenschaften zu erbringen. Bei einigen Fischen konnte bereits visuell auf mangelnde Verarbeitungsfähigkeit geschlossen werden, andere Fische zeigten jedoch keine optischen Auffälligkeiten und waren trotzdem während und nach dem Räucherprozess von mangelnder Konsistenz. (Pribe, Reichstein, 1975)

Die schlaffe Beschaffenheit der Muskulatur und des Fischkörpers einiger Fische insgesamt führte dazu, dass man diese Fische als „Wasserheilbutt“ oder „Gummiheilbutt“ bezeichnete. Es stellte sich heraus, dass diese Konsistenzmängel vielfältige Ursachen haben können. Nicht allein die Zusammensetzung der Makronährstoffe, wie z. B. ein erhöhter Wassergehalt, deutet auf Konsistenzmängel hin. Auch die Fangkonditionen (z. B. Schleppen der Grundsleppnetze für lange Zeit über den Meeresboden - die Fische werden hierbei mechanisch so stark strapaziert, dass sie ihre Schuppen verlieren und gleichzeitig so abgehetzt sind, dass das Einsetzen der

Totenstarre ausbleibt; eine erfolgreiche Fischfleischreifung kann nicht stattfinden), die Größe, das Alter, ein mangelndes Nahrungsangebot und die Zahl der überstandenen Laichperioden können die Konsistenz der Fischmuskulatur beeinflussen. (Priebe, Reichstein, 1975)

Diese Faktoren sind von der fischverarbeitenden Industrie nicht oder nur kaum zu beeinflussen, so dass vielfach der Rohstoffverlust durch zerfallene Fischstücke in Kauf genommen werden muss.

Auch aus den Untersuchungen von Karnop (1980) geht hervor, dass die Beschaffenheit des geräucherten Fleisches vom Schwarzen Heilbutt im Rahmen sensorischer Analysen schlechter bewertet wurde, als es der Geruch und die Farbe des Fischstückes andeuteten. Das Fischfleisch wurde oft als zu weich, gallertig, wässrig oder breiig-musig bewertet. Teilweise zerfielen die Carbonaden beim Verrutschen in der Verpackung oder beim Herausnehmen aus dieser entlang der Metameren. Beim Verkosten wurde in diesen Fällen mehrfach eine strukturlose Konsistenz bemängelt. Neben einem eventuell unzureichenden Räucherprozess wurden diese Konsistenzmängel auf die Rohware, den partiell auftretenden Wasserheilbutt, zurückgeführt. (Karnop, 1980)

Die Problematik der schlechten Verarbeitungsfähigkeit des Wasserheilbutts besteht bis heute. Auch heute entstehen der fischverarbeitenden Industrie Verluste, die durch Qualitätsmängel des Schwarzen Heilbutts verursacht werden (persönliche Mitteilung der Deutschen See GmbH & Co. KG, Bremerhaven, 2000).

Für die Fischverarbeitung von Bedeutung wäre eine Behandlungsmethode, die die Verarbeitungseigenschaften von Fisch, insbesondere Heilbutt, verbessert und so auftretende Rohstoffverluste minimiert. Neben dem wirtschaftlichen Vorteil führen verminderte Fehlproduktionen zu einer intensiven Ressourcenschonung.

Der Einsatz von Transglutaminase könnte über eine texturstabilisierende Wirkung dazu beitragen, Rohstoffschwankungen und daraus resultierende Verluste zu reduzieren.

## 1.2 Wirkung und Einsatzmöglichkeiten von Transglutaminase

Transglutaminase ist ein Enzym, das die Ausbildung von kovalenten  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin-Bindungen katalysiert und somit die Gelbildung und dessen viskoelastische Eigenschaften beeinflusst (Seki et al., 1990; Sakamoto et al., 1995; Seguro et al., 1995). Es ist in Geweben und Körperflüssigkeiten von Mensch und Tier vorhanden. Auch in der Pflanzenwelt und in Mikroorganismen ist es nachgewiesen worden (Connellan et al., 1971; Folk, Chung, 1973; Folk, Finlayson, 1977; Folk, 1980; Kurth, Rogers, 1984; Icekson, Apelbaum, 1987; Margosiak et al., 1990; Ramanujam, Hageman, 1990; Seki et al., 1990; Kishi et al., 1991; Klein et al., 1992; Signorini et al., 1991; De Backer-Royer, Meunier, 1992; Araki, Seki, 1993; Kumazawa et al., 1993; Kuraishi et al., 2001). Besonders bekannt ist das Enzym als Faktor XIII, der durch die Vernetzung von Fibrin bei der Wundheilung von Bedeutung ist. (Aeschlimann, Paullson, 1994)

Bereits vor 20 Jahren wurde die Möglichkeit der Proteinmodifikation durch den Einsatz von Transglutaminase untersucht. Eingesetzt wurden hier vielfach die aus Meerschweinchenleber gewonnene Transglutaminase und der Faktor XIII. Die diffizile Aufbereitung, die Aktivität in einem begrenzten pH- und Temperaturbereich sowie die Abhängigkeit der Transglutaminase von reduzierenden Substanzen und Calciumionen verhinderten jedoch den kommerziellen Einsatz und die Produktion des Enzyms in großem Stil. 1989 wurde erstmals von einer calciumunabhängigen mikrobiellen (MTG) bzw. bakteriellen Transglutaminase (BTG) berichtet (Ando et al., 1989). Gewonnen wurde sie mittels des Bakterienstammes *Streptovercillium mobarense* (Ando et al., 1989; Nonaka et al., 1989; Washizu et al., 1994; Gerber et al., 1994) sowie *Streptovercillium ladakanum* (Tsai et al., 1996; Jiang et al., 2000). Ando et al. (1992) wiesen eine Transglutaminase-Produktion ebenfalls in Stämmen von *Streptomyces* nach. Seit 1993 wird Transglutaminase in Japan kommerziell eingesetzt (Nielsen, 1995); später auch in anderen Ländern (Budemann, 2003).

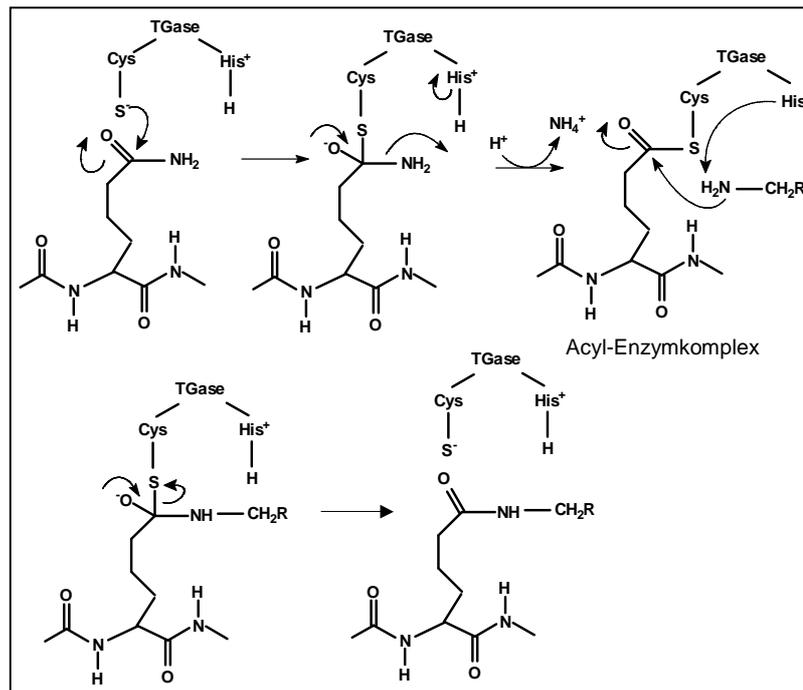
Die vielfältigen Effekte der Transglutaminase auf die technologischen Eigenschaften der Rohstoffe, wie Texturverfestigung, Erhöhung der Gel- und Bruchfestigkeit von Proteingelen sowie Erhöhung ihrer Temperaturstabilität, Stabilisierung von Emulsionen, verbesserte Aufschlagfähigkeit und Schaumbildung sowie ein verbessertes

Wasserbindungs- und -haltungsvermögen, führten zu einem Einsatz der Transglutaminase in vielen Sparten der Lebensmittelindustrie, wie z. B. der Fleisch-, Fisch- und Milchverarbeitung sowie in der pflanzenproteinverarbeitenden Industrie. (Motoki, Nio, 1983; Matheis und Whitaker, 1987; Kato et al., 1991; Nielsen, 1995; Seguro et al., 1995; Sakamoto et al., 1995; Zhu et al., 1995; Fuchsbauer, Pasternack, 1996; Lee et al., 1997; Kuraishi et al., 1997; Hammer, 1998; Færgemand et al., 1999; Zellner, 2000; Gómez-Guillén et al., 2001; Yokoyama et al., 2004; Truong et al., 2004; Eissa et al., 2004; Autio et al., 2005)

Aktuelle Einsatzgebiete des Enzyms in der Fleischindustrie sind der Zusatz zu Brühwurstartikeln zur Erhöhung der Sterilisations- und Slicestabilität sowie zur Stabilisierung von Einlagen (Budemann, 2003). Kuraishi et al. (2001) sehen in der vernetzenden Eigenschaft der Transglutaminase ein großes Potential zur Entwicklung neuer restrukturierter Lebensmittel mit hoher Qualität.

Transglutaminase (Protein-Glutamin  $\gamma$ -Glutamyltransferase, EC 2.3.2.13) gehört zur Gruppe der Transferasen und katalysiert die Acyl-Transfer-Reaktion zwischen  $\gamma$ -Carboxylamidgruppen von peptid- oder proteingebundenen Glutaminylresten und primären Aminen. (Hammer, 1998; Kuraishi et al., 1998)

Diese Reaktion verläuft über einen für Transferasen üblichen Ping-Pong-Mechanismus, der durch das alternierende Binden der Substrate und Freisetzen von Produkten gekennzeichnet ist. Zunächst wird ein binärer Komplex zwischen dem Glutamindonorprotein und der Transglutaminase gebildet. Hierbei entscheiden die Konformation und die dem Glutamin benachbarten Aminosäuren über die Akzeptanz als Substrat. In der ersten Halbreaktion wird ein intermediärer Acyl-Enzymkomplex gebildet, und es wird Ammoniak frei, das unter physiologischen Bedingungen zum Ammoniumion protoniert wird. In einem nächsten Schritt reagiert das Acyl-Enzymintermediat mit einem primären Amin (Abb. 1). Alternativ können hier die  $\epsilon$ -Aminofunktion eines Lysins, ein natürliches Polyamin oder synthetische Alkylamine als Akzeptor fungieren. (Pasternack, 1998)



**Abb. 1.1: Bildung des Acyl-Enzymintermediates und dessen Reaktion mit einem primären Amin (modifiziert nach Pasternack, 1998)**

Sind in diesem Reaktionssystem keine primären Amine verfügbar, so können Wassermoleküle als Acylakzeptoren dienen. Es kommt zur Hydrolyse des Intermediates und zu einer Desamidierung von Glutamin zu Glutaminsäure. Die hydrolytische Reaktion ist jedoch wesentlich langsamer als die Reaktion mit primären Aminen. Außerdem wird sie durch den Ausschluss von Wasser aus dem aktiven Zentrum des Enzyms weitgehend unterdrückt. (Pasternack, 1998)

Dient eine  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinseitenresten eines Proteins als Nucleophil, entstehen  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin-Bindungen. Diese sogenannten Isopeptidbindungen führen zu inter- und/oder intramolekularen Vernetzungen der Proteine (Seguro et al., 1995), unabhängig davon, ob eine zweite oder dieselbe Peptidkette als Amidonor beteiligt ist (Pasternack, 1998).

Alle Transglutaminasen besitzen die Thiofunktion eines Cysteins in ihrem aktiven Zentrum, die für die katalytische Funktion essentiell ist (Folk, Cole, 1966). Folglich

wirken sich Thiol-modifizierende Agenzien sowie Metallionen, wie z. B.  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ , negativ auf die Aktivität der Transglutaminase aus. (Pasternack, 1998)

### 1.3 Transglutaminase-Einsatz in Fischprodukten

Die Mehrzahl aller Studien zum Einsatz von Transglutaminase in der Fischverarbeitung beschäftigt sich mit der Herstellung von Surimi. Ein besonderes Qualitätsmerkmal von Surimi ist seine Textur. Um die Verbraucherakzeptanz zu gewährleisten, ist es entscheidend, ein festes und gleichzeitig elastisches Gel aus der zerkleinerten Fischmuskulatur herzustellen, das Deformationen standhält. Bisher konnte nur frischer, noch nicht tiefgefrorener Fisch für die Herstellung qualitativ hochwertigen Surimis mit optimaler Textur eingesetzt werden. (Zellner, 2000; Nielsen, 1995)

Die im Fisch enthaltenen endogenen Transglutaminasen wurden als wichtiger Faktor für die Herstellung und textuellen Eigenschaften von Surimi ermittelt (Tsukamasa, Shimizu, 1990; Kimura et al., 1991; Kamath et al., 1992; Sato et al., 1992; Tsukamasa et al., 1993; Wan et al., 1994; Motoki, Seguro, 1998). Araki und Seki (1993) ermittelten eine Aktivität der endogenen Transglutaminasen von 0,10-2,41 units  $\text{g}^{-1}$  Fisch.

Durch den Einsatz exogener Transglutaminase besteht die Möglichkeit, Fisch unterschiedlicher Qualität zu verarbeiten. Die Zugabe von exogener Transglutaminase führt zu einem Ansteigen der Gelstärke während der Surimi-Produktion. Besondere Frische und jahreszeitlich bedingte Qualität sind nicht mehr die wesentlichen Parameter für ein qualitativ hochwertiges Surimi. Die Gelbildung kann unabhängig davon gesteuert werden. Zudem besteht die Möglichkeit, auch tiefgefrorenen Fisch zu verwenden. Zusätzlich könnte eine Transglutaminase-Behandlung zu geringeren Verlusten während des Auftauens und Garens führen. (Nielsen, 1995)

Das Gel wird mit zunehmenden  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin-Bindungen fester und ist weniger deformierbar (Sakamoto et al., 1995; Seguro et al., 1996; Lee et al., 1997; Ni et al., 1998). Von Bedeutung bei der Surimiproduktion ist die Vorinkubation, das sogenannte „Setting“, bevor das Surimi gegart wird. In dieser Zeit können sich Isopeptid-Bindungen durch endogene oder zugesetzte Transglutaminase sowie Disulfid-

Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Zeit und Temperatur sind wesentliche Parameter des „Settings“. Sowohl bei einer Temperatur von 10 °C als auch bei 45 °C während der Vorinkubation konnten Seguro et al. (1995) eine Zunahme der Gelstärke mit steigender Transglutaminase-Konzentration feststellen. Seguro et al. (1996) zeigten, dass der Einsatz mikrobieller Transglutaminase zur Herstellung von Surimi aus Alaska Seelachs ab einer Konzentration von 0,03 % und das Auftreten von  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin-Bindungen bis zu 3  $\mu\text{mol } 100 \text{ g}^{-1}$  gute Geleigenschaften gewährleisten.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich der Einsatz mikrobieller Transglutaminase auf die Gelbildungseigenschaften und die Viskoelastizität von Gelatine aus Fischhaut auswirkt. Gómez-Guillén et al. (2001) stellten fest, dass die Gelstärke, die Schmelztemperatur und die Viskosität mit zunehmender Ausbildung von Isopeptid-Bindungen ansteigen. Zusätzlich wurde allerdings beobachtet, dass mit zunehmender Transglutaminase-Konzentration zwar die Elastizität und Kohäsivität zunehmen, dass jedoch die Festigkeit/Härte des Gels ihren maximalen Wert bei niedrigen Transglutaminase-Konzentrationen erreicht.

Natriumchlorid zeigt einen synergistischen Effekt zur Wirkung der Transglutaminase (Wan et al., 1992; Motoki, Seguro, 1998). Es führt zu einer Lösung der fibrillären Muskelproteine, die der Transglutaminase dann zur Vernetzung zur Verfügung stehen (Zellner, 2000). Kaliumchlorid zeigt diesen Effekt nicht (Wan et al. 1992).

Die katalytische Reaktion ist nicht nur von der Konzentration der Transglutaminase abhängig, sondern auch von der Herkunft des Enzyms und von ihrem Substrat bzw. von der Konformation ihres Substrates.

So stellten Araki und Seki (1993) fest, dass ein und dieselbe Transglutaminase unterschiedlich auf die Muskulatur verschiedener Fischarten wirkt. Sie zeigten, dass die enzymatisch induzierte Polymerisation hauptsächlich von der Konformation des Actomyosins bestimmt wird, die von Fischart zu Fischart variiert. (Araki, Seki, 1993)

Nishimoto et al. (1988), Torley und Lanier (1992) und Kim et al. (1993) stellten fest, dass die Bindung einer Pollack Surimi-Paste umso schlechter wurde, je mehr Lachsmuskulatur oder Rindfleisch zugesetzt wurde.

Aufschluss darüber, ob die Moleküle der verschiedenen Muskulaturen untereinander vernetzt wurden, oder ob sich die Bindungen nur innerhalb der einzelnen Muskulaturen ausbilden, gibt die Arbeit von Maruyama et al. (1995). Sie stellten fest, dass in einer Mixtur aus Myosin von Karpfen und Regenbogenforellen umso mehr große Polymere aus den Myosinketten gebildet wurden, je mehr Myosin aus Regenbogenforelle enthalten war. Bei einer Mischung aus Actomyosin von Makrelen und Regenbogenforellen zeigten sich bezüglich der Bildung großer Polymere nur geringe Unterschiede bei verschiedenen Mischungsverhältnissen. Sie stellten fest, dass das Actomyosin von Makrelen unter Zugabe von Transglutaminase mehr Monodansylcadaverin vernetzen kann als das Actomyosin von Regenbogenforellen. Die Autoren gehen daher davon aus, dass Makrelenactomyosin mehr reaktive Glutamin-Reste, die für die Vernetzung benötigt werden, besitzt als Regenbogenforellenactomyosin. Diese Ergebnisse, obwohl nicht direkt bewiesen, lassen die Autoren vermuten, dass die Myosinketten von Regenbogenforellen und Makrelen untereinander zu großen Co-Polymeren vernetzen, vorausgesetzt die Enzymkonzentration ist ausreichend und die Reaktionszeit ist angemessen. (Maruyama et al., 1995)

Ein weiteres mögliches Einsatzgebiet der Transglutaminase innerhalb der fischverarbeitenden Industrie ist, neben der Surimiherstellung, die Produktion von größeren Fischfilets aus kleineren Abschnitten (Motoki, Seguro, 1998), wie es auch analog mit Fleischteilen durchgeführt wird. Baker et al. (2000) führten die Restrukturierung von Fischabschnitten über eine Transglutaminase-vermittelte Bindung durch.

Auch ein texturstabilisierender Einsatz zur Verbesserung der Verarbeitungseigenschaften von ganzen Rohfischen und Fischfilets durch Einlegen in oder Injizieren von Transglutaminase-Lösung wäre denkbar (Armbrust et al., 2003 und 2003b) und soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

## 1.4 Zielsetzung

Wie unter 1 erwähnt, handelt es sich bei Fisch um einen in verschiedener Hinsicht texturlabilen Rohstoff. Auch die hohe mikrobiologische Anfälligkeit erfordert einen Fischverarbeitungsprozess, der diesen Faktoren Rechnung trägt. Die Notwendigkeit ausreichender thermischer Prozesse während der Verarbeitung von Fisch wird bei Betrachtung der Forderung des Verbrauchers nach mikrobiologisch sicheren Produkten mit längerer Haltbarkeit offensichtlich.

Durch die oftmals schlechte Verarbeitungsfähigkeit insbesondere des Schwarzen Heilbutts entstehen der Industrie große Verluste (persönliche Mitteilung der Deutschen See GmbH & Co. KG, Bremerhaven, 2000). Ein erhöhter Rohstoffeinsatz ist erforderlich, um den Bedarf der Verbraucher zu decken. Aber gerade dieser erhöhte Rohstoffeinsatz ist in Zeiten, in denen die Schonung der natürlichen Ressource Fisch mehr und mehr in den Vordergrund rückt, problematisch. So entwickelte die NAFO (Organisation für die Fischerei im Nordwestatlantik) 2003 einen langfristigen Bestandserholungsplan für Schwarzen Heilbutt im Nordwestatlantik. Ziel dieses Wiederauffüllungsplanes ist es, innerhalb der nächsten zehn bis 15 Jahre eine stabile Biomasse des Laicherbestandes von 14.000 t aufzubauen. Die Gesamtfangmenge wurde für das Jahr 2004 von 42.000 t auf 20.000 t gekürzt. Der EU-Anteil davon beträgt 8.203 t; dies bedeutet eine Kürzung um 55 %. Für die Jahre 2005-2007 wurden weitere Kürzungen der jährlichen Gesamtfangmenge noch unter 20.000 t festgelegt.

([http://europa.eu.int/comm/fisheries/news\\_corner/press/inf03\\_39\\_de.htm](http://europa.eu.int/comm/fisheries/news_corner/press/inf03_39_de.htm), 28.10.03)

In der vorliegenden Arbeit sollen die texturellen Auswirkungen der Transglutaminase auf Fisch, insbesondere auf Schwarzen Heilbutt, ermittelt werden. Die Auswirkungen der Transglutaminase werden am Modellmedium Fischfarce unterschiedlicher Fischarten untersucht.

Bisher sind keine Literaturdaten bekannt, die die Auswirkungen der Transglutaminase auf Fischfilets oder -Carbonaden darlegen. Entsprechend müssen im Technikummaßstab optimale Reaktionsbedingungen, wie Temperatur und Zeit der Transglutaminase-Behandlung, optimaler Ionenzusatz, optimale Transglutaminase-

Konzentrationen und Applikationsmethoden entwickelt werden. Diese Entwicklungen werden vor dem Hintergrund der optimalen Integration der Transglutaminase-Behandlung in den industriellen Produktionsprozess bewertet. Die im Technikum entwickelten Parameter werden hinsichtlich ihrer Auswirkungen und Durchführbarkeit im industriellen Produktionsmaßstab weiterentwickelt. Im Hinblick auf die Applikationsmethode wird die mikrobiologische Qualität der Fische und Fischprodukte bewertet. Zur texturellen Qualitätsbewertung wird ein standardisiertes Messverfahren experimentell erfasst und validiert. Zur Wahrung von Verbraucherschutzinteressen wird die Inaktivierung der Transglutaminase durch den thermischen Produktionsprozess nachgewiesen.

Mit den entwickelten Parametern soll ein qualitativ hochwertiges und zugleich sicheres Fischprodukt aus Schwarzem Heilbutt herstellbar sein. Durch die Verbesserung der Verarbeitungsfähigkeit und einer daraus resultierenden Minimierung der Fehlchargen und Verarbeitungsverluste soll eines der Schutzziele der ökologischen Nachhaltigkeit, nämlich das Ziel der Schonung der natürlichen Ressource Fisch, erfüllt werden.

## **2 Wirkung der Transglutaminase auf Heilbutt im Vergleich zu anderen Fischen**

### **2.1 Einleitung**

Zu Beginn der Untersuchungen sollte geklärt werden, ob grundsätzlich die Möglichkeit besteht, Schwarzen Heilbutt mittels Transglutaminase in seiner Textur zu verfestigen. Dieses wurde zum einen mittels instrumenteller Texturmessung überprüft. Zum anderen wurde die Vernetzungsaktivität der Transglutaminase mittels SDS-PAGE dargestellt. Hierzu wurde aus der Fischmuskulatur des Schwarzen Heilbutts eine Fischfarce hergestellt und in definierten Formen gegart, um reproduzierbare Ergebnisse während der instrumentellen Texturmessung zu erzielen. Neben Schwarzem Heilbutt wurden auch andere Fischarten untersucht, um die Stärke des Vernetzungsgrades vergleichen zu können. Aufgrund der bei diesen Vorversuchen erzielten Ergebnisse wurde es nötig zu klären, warum die Textur des Heilbutts im Vergleich zu anderen Fischen weniger stark verfestigt wird.

Literaturstudien sowie eigene Untersuchungen der Makronährstoffgehalte ergaben, dass der Heilbutt einen vergleichsweise hohen Fett- und niedrigen Lysingehalt (hier allerdings Weißer Heilbutt) aufweist (Souci et al., 2000). Auch Glutamin ist vielfach als Reaktionspartner der Transglutaminase-katalysierten Reaktion in zu geringer Konzentration vorhanden (Budemann, 2003).

Eigene Untersuchungen und Beobachtungen ergaben, dass das Fett in einer sehr heterogenen Verteilung im Heilbutt vorliegt, so dass der Fettgehalt innerhalb eines Fischfilets variiert. Die Einlagerung von Depotfett nimmt mit der Aktivität der Muskulatur ab. Daher befinden sich in der Regel im Schwanzteil geringere Fettgehalte als im Bauchteil. (Tülsner, 1994)

Diese Beobachtungen und Untersuchungsergebnisse führten zu der Annahme, dass das Fett einen maßgeblichen Einfluss auf die Ausbildung der Transglutaminase-induzierten Isopeptidbindungen ausübt. Um die ursächlichen Zusammenhänge sowie Lösungsansätze dieser Problematik zu erarbeiten, wurden analog zur industriellen Fleischverarbeitung Zusatzstoffe verwendet.

Um die heterogene Fettverteilung als Faktor für eine eingeschränkte Transglutaminase-Wirkung auszuschließen, wurden Fischfarce hergestellt. Für deren Herstellung wurden stets unterschiedliche Partien des Fisches herangezogen. Außerdem wurde die Heilbuttmuskulatur entfettet, um den Einfluss des Fettes zu erkennen.

Sojafineinmehl sollte zum einen den Gehalt an Lysin und Glutamin erhöhen; zum anderen dient der Einsatz von Fremdprotein der Verbesserung der Wasserbindung und Fettemulgierung (Sielaff, 1996; Tülsner, 1994).

Ziel des Phosphateinsatzes - auch aufgrund seiner synergistischen Wirkung zur Transglutaminase (Budemann, 2003; Motoki, Seguro, 1998) - war es, die wässrige Textur des Heilbutts durch Steigerung der Fett- und Wasserbindekapazität zu verbessern. Durch Phosphat kann der eritzungsbedingte Gelee- und Fettabsatz vermindert werden. Diphosphat wirkt spezifisch auf myofibrilläre Proteine, wie das Actomyosin. Es bedingt die Trennung in Actin und Myosin (Troeger, 1998) und trägt somit zu einer besseren Substratverfügbarkeit für die Transglutaminase bei.

Natriumchlorid, ein wesentlicher Rezepturbestandteil zur Herstellung von Fischerzeugnissen, wirkt oberhalb der physiologischen Salzkonzentration von ca. 1-5 % quellend und lösend auf myofibrilläre Proteine. Anfänglich sind davon nur freies Actin und Myosin betroffen - bei höheren Konzentrationen und längeren Einwirkzeiten auch Actomyosin. Durch die Salzeinwirkung beginnen die Myofibrillen zuerst zu quellen, die Zwischenräume zwischen den Filamenten werden größer. Wasser tritt ein und wird immobilisiert. Das Wasserbindungsvermögen wird durch diesen Prozess gesteigert. „Die gelösten Proteine als Grenzzustand der Quellung binden beim Erhitzen die gequollenen Proteine zu einem Netzwerk zusammen und stabilisieren dadurch die Textur und halten auch während eines Erhitzungsprozesses das Wasser im Fleisch“. (Honikel, Schwägele, 1998)

In einer Untersuchung von Nielsen et al. (1995) konnte die Festigkeit von Fleischfarce durch den Zusatz von 0,2 % Phosphat und 1,0 % Salz zusätzlich zur Transglutaminase (F XIIIa) deutlich erhöht werden als beim alleinigen Zusatz von Transglutaminase.

Lim und Haard (1984) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass die Gefrierlagerung von Schwarzem Heilbutt zu einem schnellen Verlust (etwa 50 % in 15 Tagen) der Salzlöslichkeit der myofibrillären Proteine führt. Dadurch könnte die Substratverfügbarkeit der Transglutaminase eingeschränkt werden, so dass im Rahmen der geplanten Versuche auch der Einfluss der Gefrierlagerung ermittelt werden sollte.

Die Auswirkungen der Zusatzstoffe, des Entfettens sowie der Gefrierlagerung auf die Festigkeit der Fischfarce wurden mittels instrumenteller Texturmessung bewertet. In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Überprüfung der textuellen Eigenschaften von Fischfarcen bzw. Surimi dargestellt. Lee et al. (1997) untersuchten die textuellen Eigenschaften ihrer Fischproteingele mittels Torsion. Benjakul et al. (2000) verwendeten für die Untersuchung der Eigenschaften ihrer Surimiprobe einen Druckstempel. Auch Gómez-Guillén et al. (2001) überprüften die Gelstärke/-festigkeit ihrer Proben mittels Druckstempel mit einem Stauchungsgrad von 70 %. Lee und Chung (1989) geben an, dass mittels Kompressionsmessung die Bindung eines Gels überprüft würde. Sakamoto et al. (1995) untersuchten ihre Surimiprobe in Abhängigkeit von der eingesetzten Transglutaminase-Konzentration mittels Penetration und durch Auflegen von spezifischen Gewichten. Sowohl Benjakul et al. (2000) als auch Sakamoto et al. (1995) stellten zylinderförmige Proben für die Untersuchung her. In eigenen Vorversuchen hatten sich die Kompressionsmessung mittels Druckstempel analog zu Gómez-Guillén et al. (2001) und zylindrische Probenformen analog zu Benjakul et al. (2000) und Sakamoto et al. (1995) als geeignet für die Texturanalyse der Fischfarce herausgestellt.

## **2.2 Material und Methode**

### **2.2.1 Rohware**

Der Schwarze Heilbutt, gefangen im Nordostatlantik, auf See ausgenommen und in Blöcken zu 20 kg tiefgefroren, wurde von der Deutschen See GmbH & Co. KG, Bremerhaven, bezogen. Der Fisch wurde dort aufgetaut, in Carbonaden (150-300 g) geschnitten und per Kühltransport auf Eis nach Hannover transportiert. Die übrigen Fische (Regenbogenforelle, Lachs, Kabeljau, Seelachs, Katfisch und Zander) wurden je nach Verfügbarkeit bei örtlichen Händlern (Nordsee und real, Hannover) bezogen. Um den Einfluss der Tiefgefrierlagerung auf die Texturfestigkeit zu ermit-

ten, wurde zusätzlich frischer, nicht tiefgefrorener Heilbutt vom Cuxhavener Seefischmarkt bezogen, der als Beifang angelandet wurde. Ein Teil dieses Beifanges wurde - wie im Folgenden beschrieben - sofort verarbeitet, der andere Teil des Fisches wurde zunächst für 6 Wochen bei -18 °C gelagert, bevor er ebenfalls zu Fischfarce verarbeitet wurde.

## 2.2.2 Herstellung der Fischfarcen

Zur Herstellung der Grundmasse wurde gekutterte (ST 11 Kutter mit dreier Standard-Messer, Volumen: 11 l, Drehzahl der Messerwelle: ca. 1400 U min<sup>-1</sup>, Kutterzeit: 2 min, ADE, Hamburg) Fischmuskulatur (Schwarzer Heilbutt, Regenbogenforelle, Lachs, Kabeljau, Seelachs, Kattfisch bzw. Zander) mit einem Zusatz von 2 g Natriumchlorid und 20 ml Wasser pro 100 g Fisch verwendet. Pro Charge betrug die Kuttermenge ca. 1000 g. Alternativ oder gekoppelt, je nach Versuchsreihe, wurden der Grundmasse weiterhin zugefügt:

- Transglutaminase Activa WM, Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, in der Konzentration 15 IE 100 g<sup>-1</sup> Fisch (entspricht der von Ajinomoto empfohlenen Konzentration zur Herstellung von Surimi) sowie in drei höheren Konzentrationen von 30, 100 und 150 IE 100 g<sup>-1</sup> Fisch (ausgehend von einer Aktivität der Transglutaminase laut Hersteller von 100 IE g<sup>-1</sup>)
- Phosphat, 0,3 g 100 g<sup>-1</sup> Fisch, Carnal 2110, Chemische Fabrik Budenheim
- Sojafineinmehl, 2 g 100 g<sup>-1</sup> Fisch, Fraso D, entfettet und getoastet, Georg Breuer GmbH Food Ingredients, Königstein

Zur Vergleichbarkeit wurde jeweils eine Probenreihe mit Transglutaminase und eine Probenreihe ohne Transglutaminase angelegt. Die Fischfarcen wurden in Plastikzylinder (Höhe: 30 mm, Durchmesser: 35 mm) gefüllt und während des 40-minütigen Settings in einem Klimaschrank (Mini-Subzero MC 81, Tabai, Osaka, Japan) bei 40 °C gelagert. Der Garprozess erfolgte im Konvektionsdämpfer (Combi-Dämpfer CC 101, Rational Großküchentechnik GmbH, Landsberg am Lech) im Dampf-Luft-Gemisch für 30 min bei 85 °C. Im Schockkühler (Foster BC 35, Geschäftsbereich der Hobart GmbH, Wuppertal) wurden die Fischfarcezyylinder mittels Luftkonvektion bei

einer Arbeitstemperatur von 0 °C auf 15 °C Kerntemperatur abgekühlt. An den abgekühlten Fischfarcen wurden die Garverluste sowie die Festigkeit ermittelt.

### 2.2.3 Entfetten der Heilbuttmuskulatur

Eine definierte Menge gekutterte Heilbuttmuskulatur wurde mit Petroleumbenzin vermengt und in ein Ultraschallbad (Sonorex RK 100,  $f = 50-60$  Hz, Bandelin, Berlin) für 7 min verbracht. Das Petroleumbenzin wurde dekantiert und der Vorgang wiederholt. Die so partiell entfettete Fischmuskulatur wurde mehrere Stunden unter dem Abzug bei Raumtemperatur getrocknet. Aus dem dekantierten Überstand (Petroleumbenzin) wurde nach Destillation des Lösungsmittels (Laborota 4002, Heidolph, Schwabach) die entzogene Fettmenge bestimmt. 60-70 % der Gesamtfettmenge wurden auf diese Weise entzogen. Das durch diesen Prozess ebenfalls entzogene Wasser wurde schrittweise während eines erneuten Kutterprozesses zusammen mit dem Salz wieder zugefügt. Setting, Gar- und Abkühlprozess erfolgten wie zuvor beschrieben.

### 2.2.4 Texturmessung

Die instrumentelle Texturmessung (Universal Texturprüfmaschine, Typ 4302, Instron-Wolpert GmbH, Darmstadt) erfolgte als Kompressionsmessung mittels Druckstempel (Durchmesser: 98 mm) mit einem Stauchungsgrad von 50 %, einer Querschnittsgeschwindigkeit von  $200 \text{ mm min}^{-1}$  und einer 100 N Kraftmessdose. Die Festigkeit der Fischfarcen wurde ausgedrückt als maximale Kompressionskraft in Newton (N), die erforderlich ist, um die Farce um 50 % zu stauchen.

### 2.2.5 Qualitative Darstellung der Vernetzungsaktivität der Transglutaminase mittels SDS-PAGE

Die Proteinanalyse der Heilbutt-, Regenbogenforellen und Lachsfarce mit und ohne Transglutaminase (siehe 2.2.2) wurde mittels eindimensionaler SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, EC 120 Mini Vertical Gel System, E-C Apparatus Corporation, Holbrook, NY) in Anlehnung an Lämmli (1970) durchgeführt. Es wurde

ein diskontinuierliches System mit einer Polyacrylamidkonzentration von 10 % (w/v) im Trenngel und 6 % (w/v) im Sammelgel verwendet.

Die Proteinextraktion aus den gegarten Fischfarcen erfolgte in Anlehnung an Etienne et al. (2000) mittels folgender Extraktionslösung:

2 % (w/v) SDS

2 % (v/v) 2-6-Mercaptoethanol

60 mM Tris-HCl (pH 7,5)

Aqua dest.

1 g gegarte Fischfarce wurde mit 10 ml Extraktionslösung homogenisiert (IKA Zerkleinerungsmühle, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau) und für 20 min in ein Ultraschallbad (Sonorex RK 100, f = 50-60 Hz, Bandelin, Berlin) verbracht. Die Proben wurden mit 12.000 x g für 15 min zentrifugiert und der Überstand mit Proben-Puffer (Glycerol 10 % (w/v), SDS 2 % (w/v), 2-6-Mercaptoethanol 1 % (v/v), Bromphenolblau 0,01 % (w/v), Tris-HCl (pH 6,8) 0,625 M) im Verhältnis 1:1 versetzt und vor der Elektrophorese für 5 min bei 100 °C erhitzt. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard diente der Roti<sup>®</sup>-Mark Standard (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Die Proteinkonzentration des Extraktes wurde photometrisch mittels Roti<sup>®</sup>-Quant nach Bradford (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) bestimmt. Pro Bahn wurden 0,5-1 µg Protein aufgetragen. Die Proteinbanden wurden durch Anfärben über Nacht mit Coomassie Brilliant Blau (Sigma, Taufkirchen) sichtbar gemacht.

## 2.2.6 Makronährstoffbestimmung von Heilbutt, Regenbogenforelle und Lachs

Die Makronährstoffe des essbaren Anteils der Fische wurden nach den amtlichen Methoden § 35 LMBG L 06.00-3 (Wasser), L 06.00-6 (Fett) und L 06.00-7 (Protein) bestimmt.

## 2.2.7 Statistische Auswertung

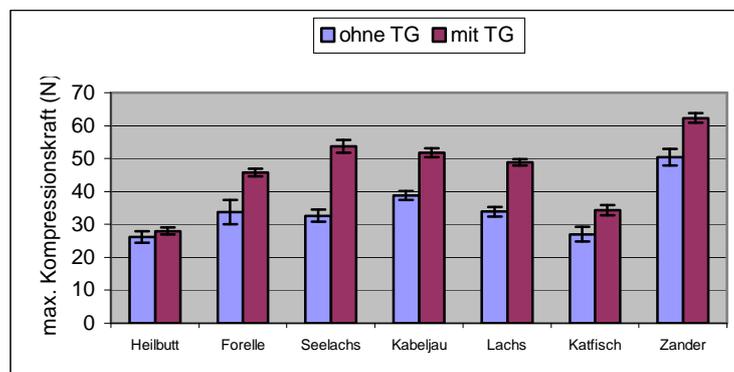
Aus den Daten der Untersuchungen wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Zur Überprüfung der Signifikanz des Unterschiedes

zweier Messreihen wurde der t-Test angewandt. Als signifikant unterschiedlich wurden die Mittelwerte zweier Messreihen dann bezeichnet, wenn  $p \leq 0,10$  war. In der graphischen Darstellung der Transglutaminase-Aktivitäten und der Texturergebnisse stellen die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Die Zahlenwerte zu den einzelnen Abbildungen mit Standardabweichungen befinden sich tabellarisch im Anhang.

## 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 Verfestigung von Fischfarce durch Transglutaminase

Die durch Transglutaminase ( $15 \text{ IE } 100 \text{ g}^{-1}$  Fischfarce) erreichte Texturverfestigung war signifikant und lag je nach Fischart zwischen etwa 7 und 65 % (Tab. 2.1). Es zeigte sich zwar, dass grundsätzlich die Möglichkeit besteht, eine Texturverfestigung des Schwarzen Heilbutts mittels Transglutaminase zu erzielen, dass diese jedoch deutlich geringer ausfällt als bei anderen Fischarten (Abb. 2.1). Es zeigte sich ebenfalls, dass die Ausgangsfestigkeit des Heilbutts ohne Transglutaminase (26,2 N) im Vergleich zu den anderen Fischen bereits geringer ist. Bezüglich der Textur- ausgangsfestigkeit war der Kattfisch (27,0 N) mit Heilbutt vergleichbar.



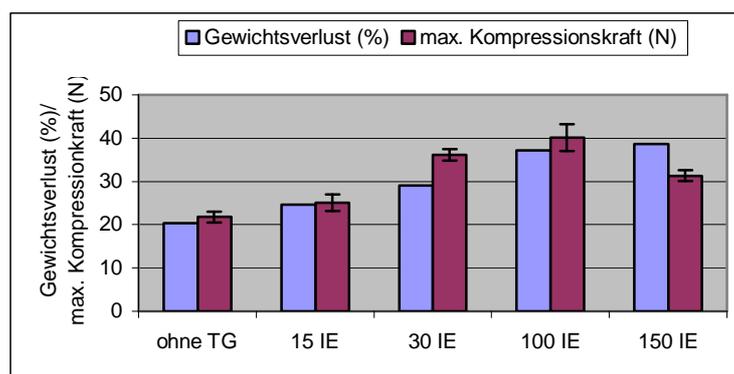
**Abb. 2.1: Festigkeit der gegarten Fischfarce (maximale Kompressionskraft) mit ( $15 \text{ IE } 100 \text{ g}^{-1}$  Fischfarce) und ohne Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe)**

**Tab. 2.1: Zunahme der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) der Fischfarce durch Transglutaminase (15 IE 100 g<sup>-1</sup> Fischfarce, n=10)**

	Zunahme der max. Kompressionskraft durch TG (%)
Schwarzer Heilbutt	6,9 (p≤0,01)
Regenbogenforelle	35,5 (p≤0,001)
Seelachs	64,5 (p≤0,001)
Kabeljau	33,5 (p≤0,001)
Lachs	44,0 (p≤0,001)
Katfisch	27,0 (p≤0,001)
Zander	23,6 (p≤0,001)

### 2.3.2 Auswirkungen verschiedener Transglutaminase-Konzentrationen auf die Festigkeit des Schwarzen Heilbutts

Bis zu einer Konzentration von 100 IE Transglutaminase 100 g<sup>-1</sup> Fisch ließ sich die Texturfestigkeit des Heilbutts von im Mittel 21,8 N auf 40,2 N steigern (Abb. 2.2). Eine höhere Konzentration (150 IE 100 g<sup>-1</sup> Fisch) bewirkte ein Absinken der Festigkeit auf im Mittel 31,3 N. Mit steigender Transglutaminase-Konzentration nahmen die Gewichtsverluste proportional zu. Aufgrund dieser Gewichtsverluste wurden die weiteren Versuche zur Fischfarce mit einer Transglutaminase-Konzentration von 15 IE 100 g<sup>-1</sup> Fisch durchgeführt.



**Abb. 2.2: Festigkeit (maximale Kompressionskraft) und Gewichtsverlust (%) der gegarten Heilbuttfarce in Abhängigkeit von der eingesetzten Transglutaminase-Konzentration (n=10 pro Versuchsreihe)**

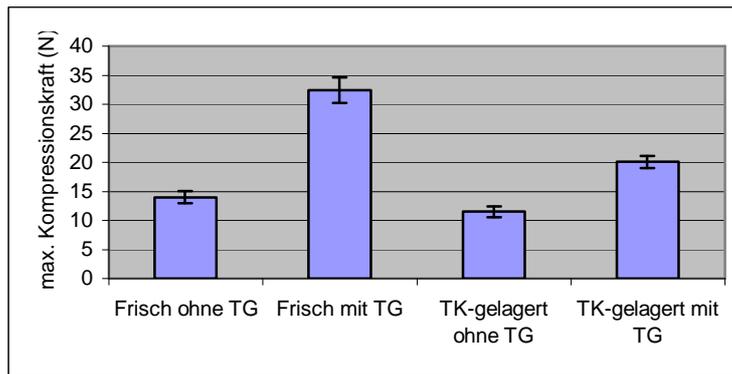
Zur weiteren Überprüfung und Absicherung der Daten bzw. zur Ermittlung der Schwankungsbreiten wurde die Möglichkeit der Texturverfestigung von Schwarzem Heilbutt durch Transglutaminase in einer Konzentration von 15 IE 100 g<sup>-1</sup> Fisch in fünf weiteren Versuchsreihen untersucht. Tabelle 2.2 gibt einen Ergebnisüberblick:

**Tab. 2.2: Festigkeit der gegarten Heilbuttfarce (maximale Kompressionskraft) mit (15 IE 100 g<sup>-1</sup> Fisch) und ohne Zusatz von Transglutaminase, Zunahme der Festigkeit der Farce durch Transglutaminase (n=10)**

Versuch	Heilbutt ohne TG (max. Kompressionskraft (N))	Heilbutt mit TG (max. Kompressionskraft (N))	Zunahme der max. Kompressionskraft durch TG (%)
1	26,2 ± 1,7	28,0 ± 1,0	6,9 (p≤0,01)
2	21,8 ± 0,8	25,1 ± 1,1	15,1 (p≤0,001)
3	19,0 ± 0,8	32,3 ± 1,5	70,0 (p≤0,001)
4	17,7 ± 0,7	27,6 ± 1,2	55,9 (p≤0,001)
5	17,5 ± 0,4	22,9 ± 1,0	30,9 (p≤0,001)
6	25,4 ± 0,7	33,5 ± 0,9	31,9 (p≤0,001)

### 2.3.3 Auswirkungen der Tiefgefrierlagerung auf die Festigkeit des Schwarzen Heilbutts

Der frische und der für 6 Wochen tiefgefrorene Heilbutt wiesen ohne Transglutaminase vergleichbare, jedoch sehr niedrige, maximale Kompressionskräfte auf (Abb. 2.3). Die Festigkeitszunahme des frischen Heilbutts durch Transglutaminase lag mit 131,4 % deutlich höher als die Festigkeitszunahme des zuvor tiefgefrorenen Heilbutts mit 74,8 % (Tab. 2.3).



**Abb. 2.3: Auswirkung der Tiefgefrierlagerung auf die Festigkeit (maximale Kompressionskraft) gegarter Heilbuttfarce (n=10 pro Versuchsreihe)**

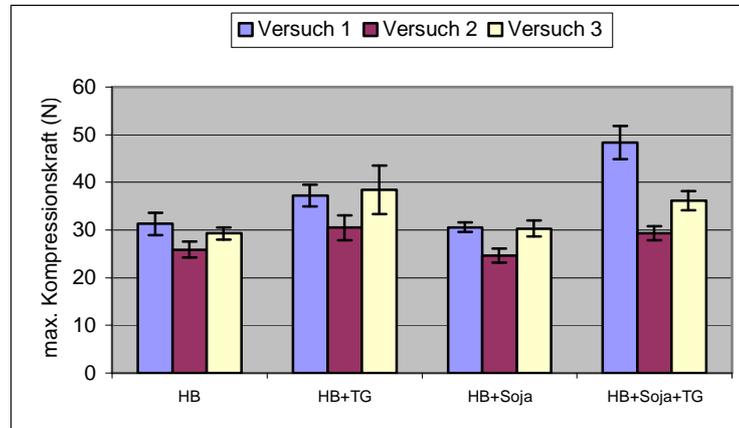
**Tab. 2.3: Zunahme der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) der gegarten Heilbuttfarce nach Verwendung frischer und tiefgefrorener Heilbuttmuskulatur durch Transglutaminase (n=10)**

	Zunahme der max. Kompressionskraft durch TG (%)
Frischer Heilbutt	131,4 (p≤0,001)
TK-gelagerter Heilbutt	74,8 (p≤0,001)

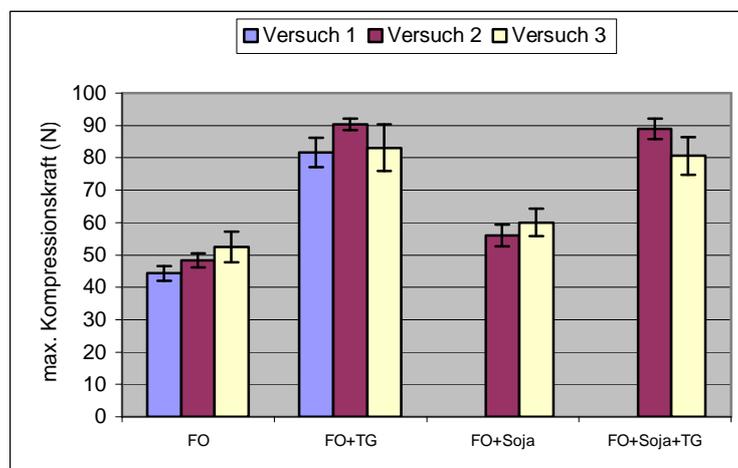
### 2.3.4 Modifizierung der Vernetzung der Heilbuttfarce durch Soja, Phosphat und Entfettung

Die folgenden Versuche wurden zur Absicherung der Daten jeweils bis zu viermal mit unterschiedlichen Fischchargen durchgeführt. Die alleinige Zugabe des Sojafinmehls zur Heilbuttfarce verringerte tendenziell die maximal aufzuwendende Kompressionskraft im Mittel um 1,3 % im Vergleich zur Heilbuttfarce ohne Zusätze (Abb. 2.4). Vergleicht man die Kraftwerte für Heilbuttfarce mit Transglutaminase mit denen für Heilbuttfarce mit Transglutaminase und Soja, konnte nur in Versuch 1 eine Verbesserung (Anstieg der maximalen Kompressionskraft um 30,1 %) der Festigkeit durch Soja festgestellt werden. Dieses Ergebnis konnte in zwei Versuchswiederholungen nicht bestätigt werden. Auch bei Verwendung von Forellenfارce führte die Zugabe von Soja zusätzlich zur Transglutaminase zu keinem weiteren Anstieg der Kraftwerte (Abb. 2.5). Es konnte tendenziell sogar eine geringe Festigkeitsabnahme im Mittel um 2,2 % festgestellt werden. Bei Einsatz von Lachsfarce konnte eine

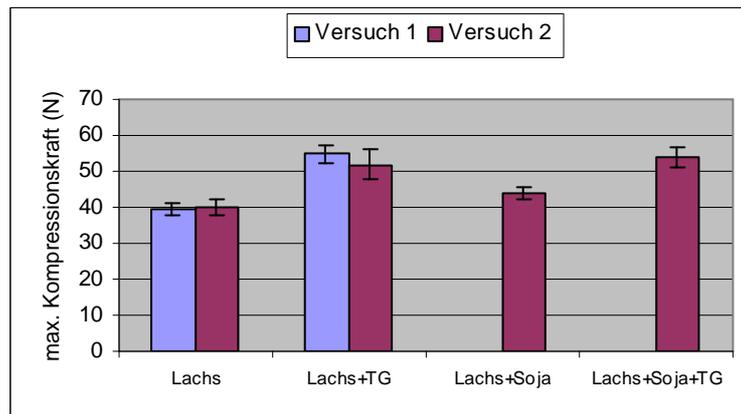
mittlere Festigkeitszunahme um 4,2 % ermittelt werden, wenn Sojafineinmehl zusätzlich zur Transglutaminase eingesetzt wurde (Abb. 2.6). Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen waren die beiden Farcen jedoch vergleichbar fest.



**Abb. 2.4: Veränderung der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) von gegarter Heilbuttfarce nach Zusatz von Soja und/oder Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe, HB: Heilbutt; TG: Transglutaminase)**

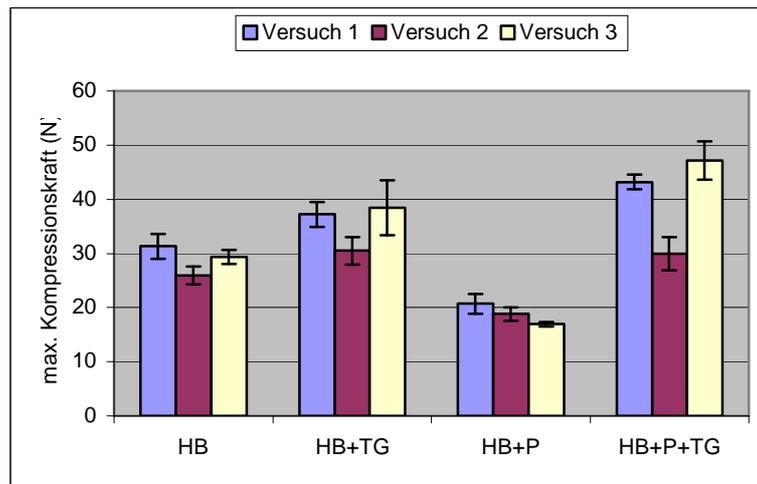


**Abb. 2.5: Veränderung der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) von gegarter Forellenfارce nach Zusatz von Soja und/oder Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe, FO: Forelle; TG: Transglutaminase)**

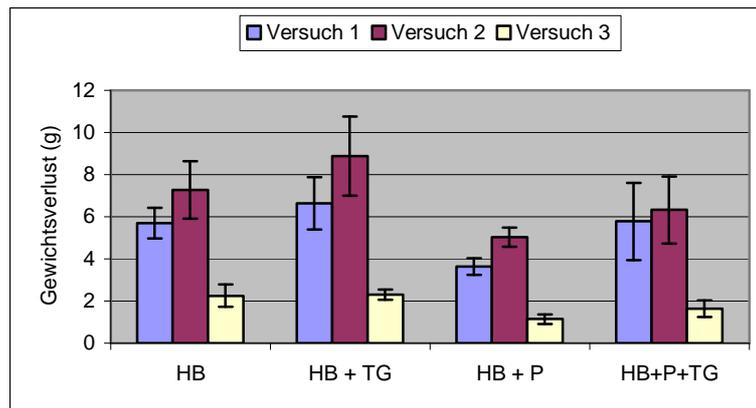


**Abb. 2.6: Veränderung der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) von gegarter Lachsfarce nach Zusatz von Soja und/oder Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe, TG: Transglutaminase)**

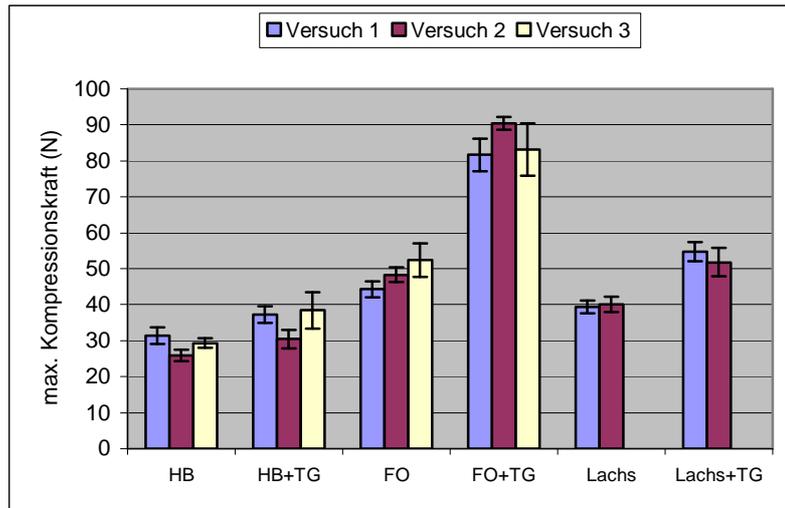
Die positive Wirkung des Phosphates zusätzlich zur Transglutaminase konnte bei Verwendung von Heilbutt in Versuch 1 und 3 durch eine signifikante Verfestigung der Farce ( $p \leq 0,001$ ) bestätigt werden (Abb. 2.7). Kraftzunahmen im Mittel um 19,4 % der Heilbuttfarce mit Transglutaminase und Phosphat im Vergleich zur Heilbuttfarce mit Transglutaminase ohne Phosphat waren zu verzeichnen. Zudem konnten die Gewichtsverluste während des Garens um im Mittel 5 % durch die Zugabe von Phosphat gesenkt werden (Abb. 2.8), während Transglutaminase die Gewichtsverluste erhöhte.



**Abb. 2.7: Veränderung der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) von gegarter Heilbuttfarce nach Zusatz von Phosphat und/oder Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe, HB: Heilbutt; TG: Transglutaminase; P: Phosphat)**

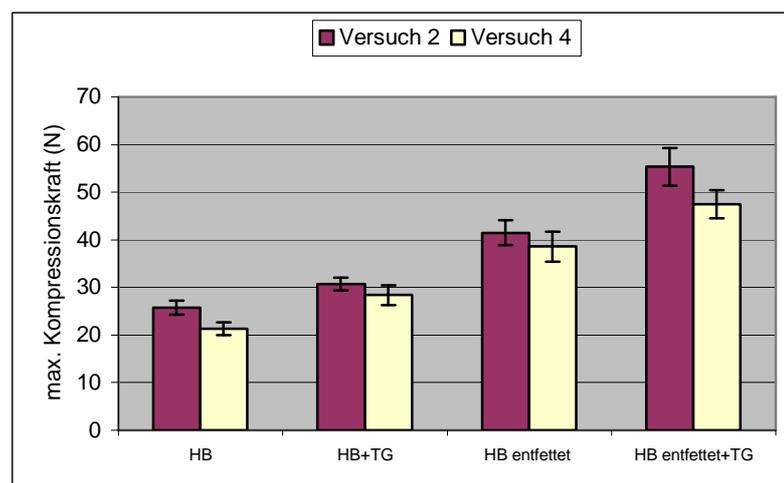


**Abb. 2.8: Mittlere Gewichtsverluste (g) der Heilbuttfarce pro Fischfarceförmchen (n=10 pro Versuchsreihe, HB: Heilbutt, TG: Transglutaminase, P: Phosphat)**



**Abb. 2.9: Festigkeit verschiedener Fischfarcen (maximale Kompressionskraft) mit und ohne Transglutaminase im Vergleich (n=10 pro Versuchsreihe, FO: Forelle; TG: Transglutaminase; HB: Heilbutt)**

Im Vergleich zu Heilbutt und Lachs wies die Farce aus Regenbogenforelle die stärkste durch Transglutaminase herbeigeführte Verfestigung auf (Abb. 2.9). Bei Heilbutt betrug die Verfestigung im Mittel 25,3 %, bei Lachs 34,4 % und bei der Regenbogenforelle sogar 76,6 %.



**Abb. 2.10: Veränderung der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) nach Entfettung der Heilbuttfarce (n=10 pro Versuchsreihe, HB: Heilbutt; TG: Transglutaminase)**

Durch das Entfetten wurde die Heilbuttfarce verfestigt - auch wenn keine Transglutaminase zugegeben wurde (Abb. 2.10). Diese Verfestigung konnte durch Transglutaminase weiter gesteigert werden. Hierbei wurden Kraftzunahmen um bis zu 15 N (33,5 %) erreicht.

**Tab. 2.4: Veränderung der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) von Fischfarce durch Zusatzstoffe und/oder Transglutaminase im Vergleich zur Fischfarce ohne Zusatzstoffe und ohne Transglutaminase der Versuche 1, 2, 3 und 4 (n=10)**

	Veränderung der max. Kompressionskraft durch Zusatzstoffe und/oder TG (%)			
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
Heilbutt	---	---	---	---
Heilbutt + TG	+ 18,8	+ 17,8	+ 31,1	+ 33,3
Heilbutt + Soja	- 2,2	- 4,6	+ 3,4	---
Heilbutt + Soja + TG	+ 54,6	+ 13,5	+ 23,5	---
Heilbutt + Phosphat	- 33,9	- 27,4	- 42,3	---
Heilbutt + Phosphat + TG	+ 38,0	+ 15,8	+ 61,1	---
Entfetteter Heilbutt	---	---	---	---
Entfetteter Heilbutt + TG	---	+ 33,5	---	+ 23,1
Forelle	---	---	---	---
Forelle + TG	+ 84,4	+ 87,2	+ 58,3	---
Forelle + Soja	---	+ 15,9	+ 14,3	---
Forelle + Soja + TG	---	+ 84,3	+ 53,7	---
Lachs	---	---	---	---
Lachs + TG	+ 39,4	+ 29,4	---	---
Lachs + Soja	---	+ 9,0	---	---
Lachs + Soja + TG	---	+ 34,7	---	---

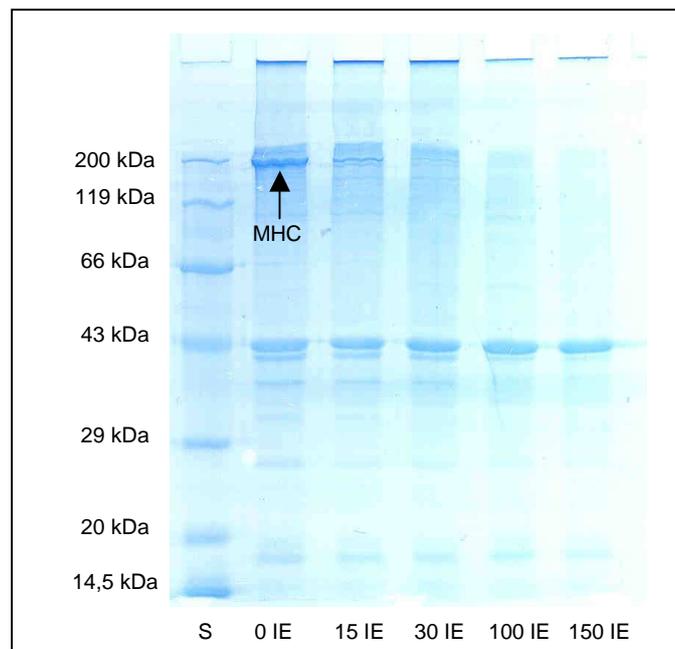
**Tab. 2.5: Festigkeit verschieden hergestellter Fischfarcen (maximale Kompressionskraft) sowie Veränderung der Festigkeit von Fischfarce durch Zusatzstoffe und/oder Transglutaminase im Vergleich zur Fischfarce ohne Zusatzstoffe und ohne Transglutaminase; Mittelwerte aus den Versuchen 1-4 (n=10 pro Versuch)**

	Max. Kompressionskraft (N)	Veränderung der max. Kompressionskraft durch Zusatzstoffe und/oder TG (%)
	Mittelwerte der Versuche 1-4	
Heilbutt	27,0	---
Heilbutt + TG	33,6	+ 25,3
Heilbutt + Soja	28,5	- 1,1
Heilbutt + Soja + TG	38,0	+ 30,5
Heilbutt + Phosphat	18,8	- 34,5
Heilbutt + Phosphat + TG	40,1	+ 38,3
Entfetteter Heilbutt	40,1	---
Entfetteter Heilbutt + TG	51,5	+ 28,3
Forelle	48,4	---
Forelle + TG	85,1	+ 76,6
Forelle + Soja	58,0	+ 15,1
Forelle + Soja + TG	84,9	+ 69,0
Lachs	39,7	---
Lachs + TG	53,4	+ 34,4
Lachs + Soja	43,7	+ 9,0
Lachs + Soja + TG	54,0	+ 34,7

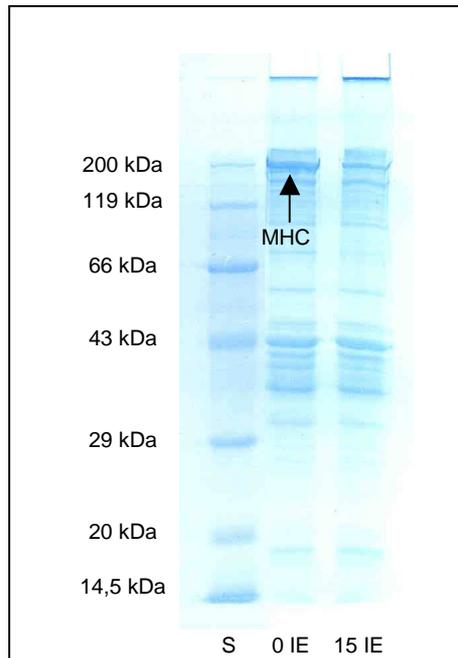
### 2.3.5 Qualitative Darstellung der Vernetzungsaktivität der Transglutaminase mittels SDS-PAGE

Abbildung 2.11 zeigt, dass die Bandenstärke der schweren Myosinketten (MHC, myosin heavy chain) abnimmt, wenn die Heilbuttfarce mit Transglutaminase behandelt wird. Zu diesem Ergebnis kamen auch Sakamoto et al. (1995), Tsai et al. (1996) und Seguro et al. (1995) bei Verwendung anderer Fischarten. Die Abnahme vergrößerte sich mit steigender Transglutaminase-Konzentration. Durch die Transglutaminase-Reaktion werden die schweren Myosinketten vernetzt und liegen nicht mehr in ihrer nativen Form vor. Tsai et al. (1996) kamen zu dem Ergebnis, dass die

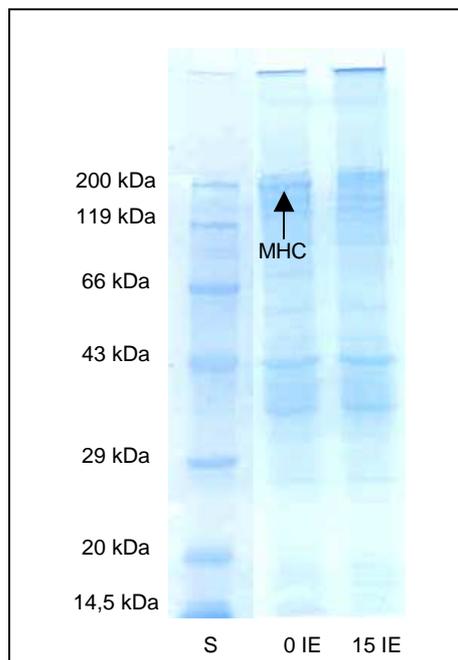
Transglutaminase hauptsächlich die schweren Myosinketten vernetzt, so dass das polymerisierte Myosin schlechter durch die Extraktionslösung gelöst wird. Auch bei Einsatz von Forellen- (Abb. 2.12) und Lachsфарce (Abb. 2.13) konnte eine Abnahme der Bandenstärke der schweren Myosinketten durch Transglutaminase festgestellt werden.



**Abb. 2.11: SDS-PAGE der extrahierten Heilbuttproteine nach Behandlung der Farce mit unterschiedlichen Transglutaminase-Konzentrationen pro 100 g Fisch (S = Molekulargewichtsstandard, MHC = schwere Myosinketten)**



**Abb. 2.12: SDS-PAGE der extrahierten Forellenproteine nach Behandlung der Farce mit Transglutaminase (S = Molekulargewichtsstandard, MHC = schwere Myosinketten)**



**Abb. 2.13: SDS-PAGE der extrahierten Lachsproteine nach Behandlung der Farce mit Transglutaminase (S = Molekulargewichtsstandard, MHC = schwere Myosinketten)**

### 2.3.6 Makronährstoffbestimmung

Heilbutt, Forelle und Lachs wiesen roh und unbearbeitet folgende Makronährstoffgehalte auf:

**Tab. 2.6: Makronährstoffgehalte von Heilbutt, Lachs und Regenbogenforelle**

	Wasser (%)	Protein (%)	Fett (%)
Schwarzer Heilbutt (n = 15)	66-75	15-21*	6-14
Regenbogenforelle (n = 4)	78-79	16-18	1-2
Lachs (n = 4)	68	18	5-6

\* bezüglich der Angabe der enzymatischen Einheiten wurde von einem mittleren Proteingehalt des Heilbutts von 19 % ausgegangen

Die Makronährstoffgehalte des Heilbutts waren stark schwankend, so dass aufgrund dieser Tatsache unterschiedliche Verarbeitungseigenschaften vermutet werden können. Zudem ist der Fettgehalt des Schwarzen Heilbutts höher als bei Regenbogenforelle und Lachs, so dass auf einen hinderlichen Effekt des Fettes bei der Ausbildung von Isopeptidbindungen geschlossen werden kann.

## 2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die verwendete instrumentelle Texturmessmethode eignete sich im Hinblick auf die zu ermittelnden Unterschiede der Fischfarcen mit und ohne Transglutaminase. Während Gómez-Guillén et al. (2001) den Druckstempel und einen Stauchungsgrad von 70 % verwendeten, erwies sich in eigenen Untersuchungen der Druckstempel mit einem Stauchungsgrad von 50 % als geeignet, so dass es nicht erforderlich war, innerhalb dieser Vorversuche andere Stauchungsgrade zu testen. Wichtig ist, dass die Probe bei der instrumentellen Texturmessung einen Strukturzusammenbruch erleidet (Schubring, 1999). Dies konnte mit einem Stauchungsgrad von 50 % erreicht werden.

Es konnte festgestellt werden, dass die Textur des Schwarzen Heilbutts weicher ist als die Textur anderer Fischarten. Transglutaminase verfestigte die Textur von Schwarzem Heilbutt; doch die Verfestigung variierte stark von Charge zu Charge

und war vielfach geringer als bei anderen Fischarten. Über Untersuchungen zur Verfestigung von Schwarzem Heilbutt mittels Transglutaminase wurde in der Literatur bisher nicht berichtet, so dass keine Vergleichsdaten verfügbar sind. Aufgrund der starken Schwankungen (hohe Variationen der Kompressionskraft chargenabhängig bei exakt gleicher Rezeptur) bestand nur die Möglichkeit, Vergleiche mit dem aus der jeweiligen Charge stammenden Standard anzustellen. Ein allgemeiner Standard kann erst durch zahlreiche Versuchswiederholungen mit verschiedenen Chargen ermittelt werden.

Durch eine Steigerung der Transglutaminase-Konzentration bestand zwar die Möglichkeit, die Textur des Heilbutts noch weiter zu verfestigen, wie bereits von Kuraishi et al. (2001) bei der Surimiherstellung mit anderen Fischarten beschrieben; diese zusätzliche Verfestigung ging jedoch mit höheren Gewichtsverlusten einher. Die Auswahl der geeigneten Transglutaminase-Konzentration stellt also einen Kompromiss zwischen Festigkeit und Gewichtsverlust dar (Armbrust et al., 2003a).

Wie von Tsai et al. (1996) beschrieben, zeigten auch die eigenen Untersuchungen mittels SDS-PAGE, dass das Myosin von Heilbutt, Forelle und Lachs durch die Transglutaminase vernetzt wird. Auch Zellner (2000) beschrieb die Reaktivität der Transglutaminase mit Myosin als sehr hoch. Folglich führte der Zusatz von Phosphat, das nach Angaben von Troeger (1998) eine Trennung des Actomyosinkomplexes in Actin und Myosin bewirkt, zu einer besseren Substratverfügbarkeit der Muskelproteine für die Transglutaminase. Dies konnte in zwei Versuchen (Versuch 1 und 3) insofern bestätigt werden, als dass durch den Zusatz von Phosphat zusätzlich zur Transglutaminase die Fischfarce stärker verfestigt werden konnte, als wenn nur Transglutaminase zugesetzt wurde. In Versuch 2 konnte dieses Ergebnis nicht erzielt werden. Hier waren die Festigkeiten der Farcen vergleichbar. Dieses Ergebnis ist nach Literaturbewertung ein Ausreißer. Dennoch ist dieses Ergebnis aufgeführt worden, da es die großen Schwankungsbreiten innerhalb der Heilbuttverarbeitung aufzeigt. Dieses wird auch durch die ermittelten Gewichtsverluste bestätigt: Betrachtet man die Gewichtsverluste aufgeführt in Abbildung 2.8, so ist hier die Versuchsreihe 3 ein Ausreißer, da in dieser Versuchsreihe signifikant geringere Gewichtsverluste ermittelt wurden als in den Versuchsreihen 1 und 2. Bei der Verarbeitung von

Heilbutt und Soja hingegen ist die Versuchsreihe 1 ein Ausreißer. Diese Schwankungen scheinen für den Heilbutt typisch zu sein und machten sich auch in folgenden Untersuchungen bemerkbar. Bei Verwendung von Regenbogenforelle und Lachs konnten diese Schwankungen nicht festgestellt werden.

Koch (1996) empfiehlt für die Herstellung von Fischpaste einen Phosphatzusatz von 0,3-0,5 %, um eine stabile Emulsion zu erhalten. Diese Konzentration, die auch analog zu den Herstellerempfehlungen des hier eingesetzten Präparates ist, wurde in dieser Untersuchung verwendet. Nielsen et al. (1995) stellten eine Fleischfarce unter Zusatz von 0,2 % Phosphat und 1 % Natriumchlorid zusätzlich zur Transglutaminase her und konnten damit die Festigkeit ihres Produktes steigern. Andere Konzentrationen an Phosphat und Natriumchlorid in kombinierter Zugabe wurden von den Autoren nicht eingesetzt. Allerdings untersuchten die Autoren die Konzentrationsbereiche 0,2-0,5 % Phosphat und 1-3 % NaCl jeweils separat unter Zugabe von Transglutaminase bezüglich der Auswirkungen auf die Festigkeit der Fleischfarce. Sie stellten fest, dass die größte Festigkeit zum einen durch einen Phosphatzusatz von 0,2 % erzielt werden konnte. Zum anderen konnte ermittelt werden, dass die Fleischfarce umso fester wurde, je mehr NaCl zugesetzt wurde. Wurde die Phosphatkonzentration erhöht (0,35 %), führte dies zu einer Abnahme der Festigkeit. Die Untersuchung von Nielsen et al. (1995) macht deutlich, dass bereits geringe Konzentrationsänderungen des Phosphates zu einer Veränderung der Textur des Produktes führen. In den eigenen Untersuchungen wurden keine weiteren als die eingesetzte Konzentration von 0,3 % Phosphat untersucht, da sich diese Konzentration als effektiv bezüglich einer zusätzlichen Verfestigung erwies.

In den Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass der Phosphatzusatz eine Reduzierung der Gewichtsverluste während des Garens der Farce bewirkt. Im Bereich der Kochschinkenherstellung wurden analoge Ergebnisse von Müller (2003) erzielt.

Auch Natriumchlorid führt nach Zellner (2000) und Honikel und Schwägele (1998) zu einer Lösung der myofibrillären Proteine. Die eingesetzte NaCl-Konzentration von 2 % wurde nach dem gustatorischen Kriterium gewählt. Eine Erhöhung der Salzkon-

zentration hätte zwar möglicherweise, wie in den Untersuchungen von Nielsen et al. (1995) und Zellner (2000), zu einer stärkeren Verfestigung der Farce geführt; doch im Hinblick auf die Zielsetzung der Arbeit, für die industrielle Fertigung handhabbare Produktionsbedingungen zu erarbeiten, wurde von einer Erhöhung der Salzkonzentration abgesehen.

In der Untersuchung zur Auswirkung der Tiefgefrierlagerung auf die Festigkeit des Schwarzen Heilbutts wäre zu erwarten gewesen, dass das zuvor tiefgefrorene Heilbuttfleisch eine größere Festigkeit ausweist als das frische Heilbuttfleisch, da es nach Gill et al. (1992) während der Tiefgefrierlagerung zu einer teilweisen Aggregation des Myosins kommt. Dies führt zu einer Zunahme der Festigkeit und einer Verminderung des Wasserhaltevermögens. Die Kombination aus einem Schrumpfen der Fasern und einer Aggregation der Proteine kann dazu führen, dass während des Auftauvorganges das ausgetretene Wasser nur beeinträchtigt reabsorbiert wird (Lampila, 1990). Der frische und der tiefgefrorene Heilbutt wiesen jedoch vergleichbare Festigkeiten nach dem Garen auf. Dies mag zum einen durch den Garprozess hervorgerufen worden sein, der die Festigkeiten ausgeglichen hat; zum anderen könnte der Grund in der Fischfarceherstellung (Zerkleinerung der Fischstruktur) zu sehen sein. Sigurgisladottir et al. (2000) konnten in ihren Untersuchungen feststellen, dass, entgegen ihrer Erwartung, die erforderliche Scherkraft zum Zerteilen tiefgefrorener, aufgetauter und geräucherter Lachsfilets signifikant geringer war als bei frischen, geräucherten Lachsfilets.

Dass die Fischfarce aus frischem Heilbutt eine stärkere Transglutaminase-induzierte Texturverfestigung als diejenige aus tiefgefrorenem Heilbutt zeigte, ist auf die von Lim und Haard (1984) ermittelte Tatsache zurückzuführen, dass die Gefrierlagerung zu einem schnellen Verlust der Salzlöslichkeit der myofibrillären Proteine beim Schwarzen Heilbutt führt. Die Salzlöslichkeit der Proteine ist bereits nach 15 Tagen Tiefgefrierlagerung um 50 % reduziert (Lim und Haard, 1984). Der in den eigenen Untersuchungen eingesetzte Heilbutt war bereits 6 Wochen tiefgefroren worden, so dass von einem deutlich über 50 % liegenden Verlust der Salzlöslichkeit auszugehen ist. Die Folge ist eine eingeschränkte Substratverfügbarkeit der Muskelproteinen für die Transglutaminase und damit eine weichere Fischfarce.

In der Untersuchung zur Auswirkung der Tiefgefrierlagerung auf die Transglutaminase-induzierte Verfestigung konnte die Zeitspanne der Tiefgefrierlagerung genau definiert werden, da der Fisch frisch bezogen wurde. Dies war bei dem von der Deutschen See GmbH & Co. KG bezogenen Fisch nicht möglich. Die Deutsche See GmbH & Co. KG erwirbt den Fisch tiefgefroren nach Verfügbarkeit und Bedarf und verarbeitet ihn nach Bedarf weiter. Dabei besteht nach Aussagen der Deutschen See GmbH & Co. KG durchaus die Möglichkeit, dass einige der Fischchargen bis zu mehreren Wochen tiefgefroren lagern, bevor sie weiterverarbeitet werden. Dies kann die Tatsache erklären, dass die unterschiedlichen Fischchargen, je nach Lagerdauer, unterschiedlich stark durch Transglutaminase verfestigt wurden.

Die ermittelten Makronährstoffgehalte der Fische Schwarzer Heilbutt, Regenbogenforelle und Lachs lagen überwiegend in den Bereichen, die auch von Tülsner (1994) für den essbaren Anteil der verschiedenen Fischarten angegeben wurden. Eine Ausnahme bildete der Proteingehalt des Schwarzen Heilbutts, der bei Tülsner (1994) mit 10-12 % der Rohmasse niedriger angegeben ist, als es die eigenen Untersuchungen ergaben (15-21 %). Diese unterschiedlichen Ergebnisse können z. B. auf die Herkunft der Fische, den Zeitpunkt des Fangs, das Nahrungsangebot oder die Zahl der überstandenen Laichperioden zurückzuführen sein (Priebe, Reichstein, 1975). Diese, die Makronährstoffgehalte beeinflussenden Faktoren, sind weder in der Angabe von Tülsner (1994) nachzuvollziehen noch im Detail für die in der eigenen Untersuchung verwendeten Fische ermittelbar. Möglicherweise sind auch unterschiedliche Faktoren zur Berechnung der Proteinmenge verwendet worden. In den eigenen Berechnungen wurde analog zur Methode § 35 L 06.00-7 ein Faktor von 6,25 eingesetzt.

Die ermittelten relativ großen Schwankungen des Proteingehaltes von 15-21 % liefern ebenfalls Hinweise dafür, dass die Transglutaminase-induzierte Verfestigung von Charge zu Charge in Abhängigkeit vom Proteingehalt unterschiedlich stark ausfallen kann. Untersuchungen hierzu wurden von anderen Autoren noch nicht durchgeführt.

Fett hat nach Angaben von Wille (2005, Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, persönliche Mitteilung) einen störenden Einfluss auf die Ausbildung von Isopeptidbindungen durch Transglutaminase. Die Makronährstoffbestimmung ergab, dass der Fettgehalt des Schwarzen Heilbutts mit 6-14 % höher liegt als bei Lachs mit 5-6 % und Forelle mit 1-2 %. Die Transglutaminase-induzierte Verfestigung (der letzten vier Versuchsreihen) war bei Heilbuttfarce mit im Mittel 25,3 % Verfestigung geringer als bei Lachs mit im Mittel 34,4 % und bei Forelle mit im Mittel 76,6 % Verfestigung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verfestigung durch Transglutaminase vom Fettgehalt des Produktes abhängen kann und werden von der Aussage von Wille (2005) bestätigt.

Weiterhin wurde der Einfluss des Fettes auf die Transglutaminase-Wirkung durch Entfetten der Heilbuttmuskulatur untersucht. Durch das Entfetten stieg die Festigkeit der Fischfarce. Bei zweimaliger Versuchsdurchführung konnte nur in einem Versuch die Transglutaminase-induzierte Verfestigung über den Wert gesteigert werden, der bereits in derselben Fischcharge ohne Entfettung erreicht wurde. So betrug die Transglutaminase-induzierte Verfestigung der nicht entfetteten Farce 17,6 %, die der entfetteten Farce derselben Charge 33,5 %. In der Versuchswiederholung mit einer anderen Fischcharge betrug die Transglutaminase-induzierte Verfestigung der nicht entfetteten Farce bereits 33 %, die der entfetteten Farce nur 23 %. Jedoch war die Ausgangsfestigkeit der entfetteten Farce bereits höher, als die der nicht entfetteten Proben. Diese höhere Festigkeit könnte zum einen auf den geringeren Fettgehalt der Farce zurückzuführen sein, könnte aber auch durch eine Proteinschädigung durch das Lösungsmittel während des Entfettens hervorgerufen worden sein. Da es hierzu keine vergleichbaren Studien gibt, ist das hier erzielte Ergebnis nur bedingt aussagekräftig. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Wasserbindefähigkeit der entfetteten Farce nicht vermindert im Vergleich zur nicht entfetteten Farce war. Die durch die Trocknung verlorene Wassermenge sowie zusätzlich das zur Fischfarceherstellung vorgesehene Wasser wurden von der entfetteten Farce aufgenommen. Das Ausmaß der Proteinschädigung wird daher gering gewesen sein. Weitere Untersuchungen hierzu wurden nicht durchgeführt, da der Fettgehalt des Schwarzen Heilbutts aus dem Wildfang ein Faktor ist, der von der fischverarbeitenden Industrie nicht beeinflusst werden kann. Der Transglutaminase-Einsatz muss also dahinge-

hend optimiert werden, dass trotz des relativ hohen Fettgehaltes eine Verfestigung durch Transglutaminase erzielt wird.

Die Zugabe von Soja zur Fischfarce - zusätzlich zur Transglutaminase - zur besseren Emulgierung und zum eventuellen Ausgleich des Mangels an den Reaktionspartnern, Glutamin und Lysin, führte zu keiner Steigerung der Festigkeit. Die eingesetzte Konzentration entsprach der Herstellerempfehlung für Fleischprodukte. Empfehlungen für Fischfarceprodukte gibt es gegenwärtig nicht.

Auch Katsaras und Peetz (1994) konnten bei der Brühwurstherstellung durch den Zusatz von Sojaprotein eine geringfügig niedrigere Festigkeit feststellen als in dem Produkt ohne Soja. Eine deutlich fettstabilisierende Wirkung war nach mikroskopischer Untersuchung nicht zu erkennen. Allerdings verwendeten sie keine Transglutaminase. Nach Hoogenkamp (1994) gewinnen Sojaproteine erst bei der Herstellung fettreduzierter Brühwürste an Bedeutung, da hier die gelbildenden Eigenschaften der Sojaproteine die Fleischproteinstrukturbildung unterstützen. Eine Verbesserung der Gelstärke trete nur ein, wenn das Sojaprotein vor der thermisch induzierten Gelbildung vollständig hydratisiert sei (Hoogenkamp 1994). Ein eventueller Ausgleich des Mangels an den Reaktionspartnern Glutamin und Lysin führte in dieser Form zu keiner zusätzlichen Texturverfestigung. Andere Transglutaminase-Präparate als das hier verwendete Activa WM enthalten teilweise zusätzlich Natriumcaseinat (z. B. Activa EB) als zusätzliche Proteinquelle. Transglutaminase zeigt eine sehr hohe Reaktivität mit Natriumcaseinat (Zellner, 2000). Daher wird es als eine Art „Kleber“ für die Restrukturierung von Fleisch- und Fischabschnitten eingesetzt (Motoki, Seguro, 1998). Auch Sojaprotein wird durch Transglutaminase vernetzt (Zellner, 2000). Eine stärkere Verfestigung konnte jedoch nicht erzielt werden. Vergleichbare Studien zum Einsatz von Sojaprotein und Transglutaminase wurden von anderen Autoren bisher nicht durchgeführt.

Insgesamt lieferten die Untersuchungen Hinweise dafür, dass die schwächere und in Abhängigkeit von der Charge wechselnde Verfestigung der Fischfarce aus Schwarzem Heilbutt durch Transglutaminase auf die vorhergehende Tiefgefrierlagerung, den relativ hohen Fettgehalt sowie einen schwankenden Proteingehalt zurückzuführen

ren ist. Anzunehmen ist, dass der hohe Fettgehalt einen störenderen Einfluss auf die Texturverfestigung ausübt als der schwankende Proteingehalt. Selbst wenn verhältnismäßig geringe Proteingehalte vorhanden sind, ist noch immer ausreichend Substrat für eine Ausbildung von Isopeptidbindungen durch Transglutaminase vorhanden. Wie später, z. B. in Kapitel 5, dargestellt wird, konnte in einigen Versuchsreihen keine Texturverfestigung des Heilbutts durch Transglutaminase erzielt werden. Ein geringerer Proteingehalt wird nicht ausreichen, um die Transglutaminase-Wirkung vollständig zu unterbinden. Ebenso kann eine lange Tiefgefrierlagerung dieses nicht bewirken. Dass ein hoher Fettgehalt hierzu in der Lage ist, scheint wahrscheinlicher.

Die genannten Faktoren sind von der fischverarbeitenden Industrie nicht oder nur kaum zu beeinflussen. Es kann weder auf die Tiefgefrierlagerung verzichtet noch der Fett- bzw. Proteingehalt von der fischverarbeitenden Industrie beeinflusst werden. Daher wurde auf weitere Untersuchungen zur Ursachenklärung der schwächeren Texturverfestigung beim Schwarzen Heilbutt durch Transglutaminase verzichtet.

Der Einsatz von Phosphat ist (auch aus lebensmittelrechtlichen Gründen) ausgeschlossen, so dass nur Natriumchlorid und Transglutaminase in Kombination zu einer praktisch handhabbaren Verfestigung des Schwarzen Heilbutts verwendet werden können. Daher wurde in den folgenden Untersuchungen die Aktivität der Transglutaminase in Verbindung mit Natriumchlorid und anderen Salzen untersucht.

Im Hinblick auf eine industrielle Verarbeitung des Schwarzen Heilbutts ist an dieser Stelle noch keine genaue Angabe der einzusetzenden Transglutaminase-Konzentration zu geben. Zu vermuten ist jedoch, dass aufgrund der höheren Gewichtsverluste auch hier mit niedrigen Konzentrationen zu arbeiten ist.

### **3 Untersuchung der Transglutaminase auf proteolytische Aktivität**

#### **3.1 Einleitung**

Neben den in Kapitel 2 diskutierten Gründen der unterschiedlich ausgeprägten Texturverfestigung der Heilbutt-Farce durch Transglutaminase besteht zudem die Möglichkeit, dass die Transglutaminase Verunreinigungen mit proteolytischer Aktivität aufweist. Diese proteolytische Aktivität könnte dazu führen, dass die Wirkung der Transglutaminase in der Heilbuttfarce alterniert und teilweise nur zu geringen Verfestigungen führt. Bauer et al. (2003) führten eine Proteinanalyse mittels SDS-PAGE eines von Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, bezogenen Enzympräparates durch und konnten keine weiteren Proteine außer der Transglutaminase selbst detektieren. Verunreinigungen auf Proteinbasis waren nicht vorhanden. Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob das Enzympräparat Activa WM Verunreinigungen enthält, und ob diese Verunreinigungen proteolytisch aktiv sind.

#### **3.2 Material und Methode**

##### **3.2.1 Proteinanalyse des Transglutaminase-Präparates Activa WM**

Die Proteinanalyse des Transglutaminase-Präparates Activa WM (Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg) wurde mittels SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Anlehnung an Lämmli (1970) durchgeführt. Es wurde ein diskontinuierliches System mit einer Polyacrylamidkonzentration von 12 % (w/v) im Trenngel und 5 % (w/v) im Sammelgel verwendet. Die Proteinkonzentration der Transglutaminase wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Die Proben wurden mit Probenpuffer (Glycerol 10 % (w/v), SDS 2 % (w/v), 2-6-Mercaptoethanol 1 % (v/v), Bromphenolblau 0,01 % (w/v), Tris-HCl (pH 6,8) 0,625 M) im Verhältnis 1:1 versetzt und vor der Elektrophorese für 10 min bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 10 mA der Proben im Sammelgel und von 20 mA der Proben im Trenngel durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Roti<sup>®</sup>-Mark Standard (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) aufgetragen. Unterschiedliche Probenmengen wurden auf das Gel aufgetragen. Die Proteinbanden wurden durch Anfärben über Nacht mit Coomassie Brilliant Blau (Sigma, Taufkirchen) sichtbar gemacht.

### 3.2.2 Untersuchung des Transglutaminase-Präparates Activa WM auf proteolytische Aktivität

Rinderserumalbumin wurde mit Transglutaminase Activa WM versetzt (Tab. 3.1) und vor und nach einer 40-minütigen Inkubation bei 40 °C mittels SDS-PAGE analysiert. Die elektrophoretische Auftrennung wurde wie unter 3.2.1 durchgeführt. Des Weiteren wurden Rinderserumalbumin, Rinderserumalbumin mit Transglutaminase Activa WM sowie Rinderserumalbumin mit Transglutaminase Activa WM und einem Proteaseinhibitormix (HP; AEBSF-HCL, Aprotinin, E-64 und Leupeptin, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) (Tab. 3.1) in Anlehnung an die Produktionsbedingungen für Heilbutt-Carbonaden für 5 Stunden bei 5 °C und anschließend für 1 Stunde bei 40 °C inkubiert. Die Proteinanalyse wurde wie unter 3.2.1 beschrieben durchgeführt - mit dem Unterschied, dass ein 14%-iges Trenngel verwendet wurde. 10 µg Protein wurden auf die einzelnen Bahnen des Gels aufgetragen.

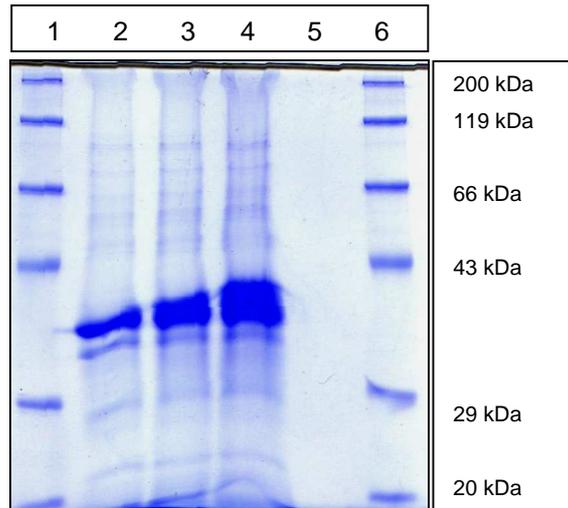
**Tab. 3.1: Zusammensetzung pro ml Probe**

Probe	BSA (µg)	Transglutaminase (Proteinmenge, µg)	Inhibitormix HP (µg)
B (vor der Inkubation)	1000	730 (0,07 IE)	-
C (nach der Inkubation)	1000	730 (0,07 IE)	-
1	1000	-	-
2	1000	2190 (0,21 IE)	-
3.1	1000	2190 (0,21 IE)	127
3.2	1000	2190 (0,21 IE)	635

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 Proteinanalyse des Transglutaminase-Präparates Activa WM

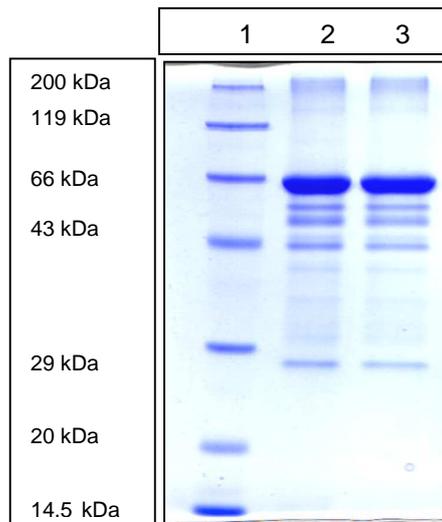
Das Transglutaminase-Präparat Activa WM wies einen Proteingehalt von 0,73 % auf. Neben der Hauptbande der Transglutaminase (38 kDa) zeigten sich mehrere schwächere Banden im Gel, so dass davon auszugehen ist, dass das Enzympräparat Verunreinigungen enthält (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: SDS-PAGE der Transglutaminase Activa WM (Standard (Spur 1), 10 µl Probe (50 µg, Spur 2), 15 µl Probe (75 µg, Spur 3), 20 µl Probe (100 µg, Spur 4), Standard (Spur 6))**

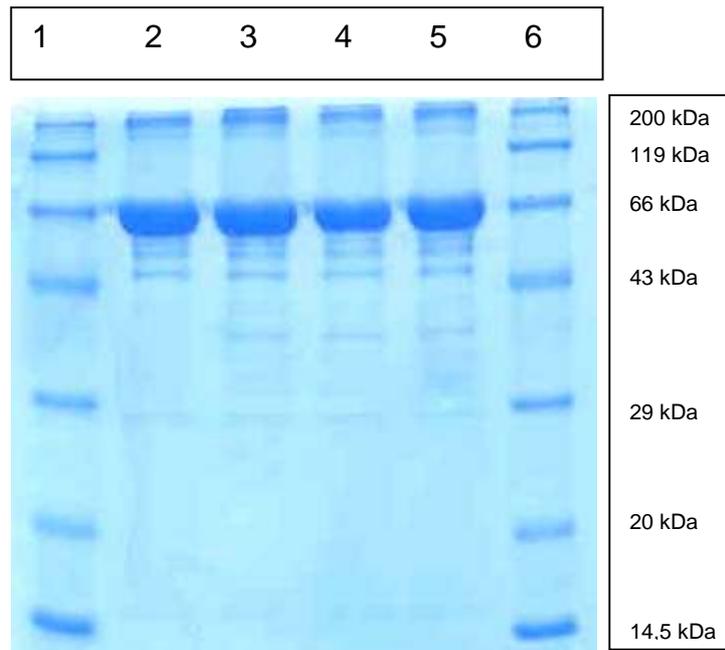
### 3.3.2 Untersuchung des Transglutaminase-Präparates Activa WM auf proteolytische Aktivität

Ein Unterschied im Bandenmuster des Rinderserumalbumins vor und nach Inkubation mit Transglutaminase konnte nicht festgestellt werden (Abb. 3.2). Eine Peptidaseaktivität (Auftreten neuer Banden) während der Inkubation zeigte sich hier nicht. Zwar könnten Moleküle mit einem Molekulargewicht unterhalb 14,5 kDa aufgrund proteolytischer Aktivität entstanden sein, die anhand dieses Gels nicht detektiert würden; da sich die Bandenstärke der Hauptbande jedoch nicht verringerte, ist zumindest von keiner nennenswerten Proteolyse auszugehen.



**Abb. 3.2: SDS-PAGE von Rinderserumalbumin vor und nach Inkubation mit Transglutaminase Activa WM (Proben B und C); (Standard (Spur 1), 8 µl Probe vor der Inkubation (4 µg BSA, Spur 2), 8 µl Probe nach der Inkubation (4 µg BSA, Spur 3))**

Die Bandenmuster des Rinderserumalbumins mit Transglutaminase und zwei verschiedenen Konzentrationen des Proteaseinhibitormixes (Abb. 3.3) unterschieden sich ebenfalls nicht voneinander, so dass auch an dieser Stelle kein Hinweis auf proteolytische Aktivität gegeben wurde.



**Abb. 3.3: SDS-PAGE von Rinderserumalbumin mit Transglutaminase und einem Proteaseinhibitormix; Standard (Spur 1), Probe 1 (Spur 2), Probe 2 (Spur 3), Probe 3.1 (Spur 4), Probe 3.2 (Spur 5), Standard (Spur 6)**

Im Bereich zwischen 29 und 43 kDa zeigten die Proben mit Transglutaminase (Spuren 3-5) eine Bande mehr als das Rinderserumalbumin ohne Zusätze (Spur 2). Anhand des Molekulargewichtes (ca. 38 kDa) lässt sich folgern, dass es sich hierbei um die Transglutaminase selbst handelt.

### **3.4 Zusammenfassung und Diskussion**

Im Gegensatz zu Bauer et al. (2003), die in einem von Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, bezogenen Enzympräparat keine Verunreinigungen auf Proteinbasis detektieren konnten, zeigten die eigenen Untersuchungen Verunreinigungen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist auszuschließen, dass die alternierende Wirkung der Transglutaminase auf Heilbuttfarce auf eine proteolytische Aktivität durch Verunreinigungen der Transglutaminase zurückzuführen ist. Zwar konnten Verunreinigungen detektiert werden, nicht jedoch zusätzliche nennenswerte proteolytische Aktivitäten, die sich durch das Auftreten zusätzlicher Banden bzw. durch eine Verringerung der Bandenstärke der Hauptbande bemerkbar gemacht hätten.

## 4 Ermittlung von Aktivitätsparametern der Transglutaminase

### 4.1 Einleitung

Bevor der Heilbutt dem industriellen Garprozess zugeführt wird, wird er in einer Natriumchloridlake gesalzen. In der Literatur wird von einem förderlichen bzw. synergistischen Effekt des Natriumchlorids zur Transglutaminase berichtet. (Wan et al., 1992; Nishimoto et al., 1987; Budemann, 2003) Untersucht werden sollte, ob auch andere Salze die Aktivität der Transglutaminase unterstützen und evtl. über das Maß des Natriumchlorids hinaus aktivitätsfördernd wirken bzw. in welcher Konzentration sie einzusetzen sind. Auf diese Weise könnten Pökel-Bedingungen geschaffen werden, die auf die Aktivität der Transglutaminase abgestimmt sind. Zusätzlich wurde die Hitzestabilität der Transglutaminase unter Zugabe der verschiedenen Salze ermittelt.

Wan et al. (1992) stellten Suwari- bzw. Surimi-Gele unter Zusatz von Natrium-, Kalium- und Ammoniumchlorid her. Dabei stellten sie fest, dass NaCl in jeder zugefügten Konzentration einen Einfluss auf das Setting bzw. auf die daraus resultierende Gelstärke ausübt. Die größte Festigkeit erreichten die Gele bei einer NaCl-Konzentration von 0,2 M. Die Autoren erklärten dieses Ergebnis mit der besseren Löslichkeit des Myosins in Verbindung mit NaCl. (Wan et al., 1992)

Durch die Lösung der Proteine durch NaCl in einer Fischfarce können diese ein räumliches, elastisches Netzwerk ausbilden. Bereits im rohen Produkt tritt hier eine deutliche Verfestigung ein. Die Fixierung und weitere Härtung erfolgt durch thermische Behandlung. Der Zusatz von NaCl stabilisiert das Produkt Surimi und optimiert seine funktionellen Eigenschaften Gelbildung, Vernetzbarkeit, Elastizität und Wasserbindung. (Tülsner, 1994)

Die von Wan et al. (1992) erzielten Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Nishimoto et al. (1987). Die Zugabe von KCl führte in jeder Konzentration zu einem wesentlich weicheren Gel, als es mit NaCl der Fall war. Die Unterschiede wurden evidenter, je höher die KCl-Konzentration war. Die Dauer des Settings spielte hierbei keine Rolle. Während NaCl einen förderlichen Einfluss auf die Aktivität

der Transglutaminase ausübt, schlossen die Autoren bei der Zugabe von KCl darauf, dass die reaktiven Seitenketten des Myosins in Anwesenheit von KCl der Transglutaminase nicht zugänglich seien. Durch die Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  konnte auch nach 6-stündigem Setting kein Gel ausgebildet werden. Der Grund hierfür sei die inhibierende Wirkung der  $\text{NH}_4^+$ -Ionen auf die Transglutaminase-katalysierte Reaktion. (Wan et al., 1992)

Die Aktivität der Transglutaminase unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen wurde mittels Hydroxamat-Test bestimmt. Diese Aktivitätsermittlungen wurden ohne den Zusatz von Fisch durchgeführt. Der Hydroxamat-Test beruht, wie auch andere zu verwendende Bestimmungsmethoden zur Ermittlung der Aktivität der Transglutaminase, auf der Umsetzung eines Modellsubstrates zu einem bekannten Produkt unter definierten Bedingungen. Es handelt sich hierbei um einen nicht kontinuierlichen Test, bei dem die Reaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt abgebrochen wird. Der Hydroxamat-Test quantifiziert den enzymkatalysierten Einbau von Hydroxylamin in das Modellsubstrat Carbobenzoxy-L-glutaminylglycin (CBZ-Gln-Gly). An der Glutamyl-Seitenkette des Dipeptidderivates wird Hydroxamsäure gebildet, welche mit Eisen(III)-Ionen komplexiert und spektralphotometrisch quantifiziert wird. (Pasternack, 1998)

Eine internationale Einheit (IE) ist definiert als die Enzymkonzentration, die 1  $\mu\text{mol}$  Reduktionsäquivalente pro Minute bei definierter Temperatur freisetzt. Für die Transglutaminase gilt (Pasternack, 1998):

$$1 \text{ IE} = 1 \mu\text{mol gebildete Hydroxamsäure min}^{-1}$$

Die mittels Hydroxamat-Test ermittelten Ergebnisse wurden im Rahmen der Versuchsreihe unter Einsatz von Heilbuttfarce auf ihre Übertragbarkeit überprüft, indem eine instrumentelle Texturprüfung durchgeführt wurde.

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Aktivitätsermittlung der Transglutaminase mittels Hydroxamat-Test

Zum Nachweis der Aktivität des Transglutaminase-Enzympräparates wurde der Hydroxamat-Test modifiziert nach Pasternack (1998) durchgeführt. Es wurden zwei Reagenzien (A und B) sowie die Probenlösung benötigt:

Reagenz A: (Substrat der Reaktion)

0,1 M Hydroxylaminhydrochlorid

10 mM Glutathion

30 mM Carbobenzoxy-L-Glutaminyl-Glycin (CBZ-Gln-Gly)

0,2 M Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan

in destilliertem Wasser gelöst, pH-Wert-Einstellung auf 6 mittels 3 N HCl (Haltbarkeit der Lösung im Kühlschrank: 3 Tage)

Reagenz B:

3 N HCl

12%-ige Trichloressigsäure (w/v)

5%-ige  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (w/v) in 0,1 N HCl

Alle drei Reagenzien wurden kurz vor Gebrauch in einem Volumenverhältnis von 1:1:1 gemischt.

Probenlösung:

1 g Transglutaminase (Activa WM, Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg) wurde jeweils in 50 ml Lösungsmedium gelöst. Folgende Lösungsmedien wurden eingesetzt:

- Tris-Acetat (0,2 M, pH 6)
- 5, 10, 15 und 20%-ige Natriumchloridlösung (w/v)
- 5, 10, 15 und 20%-ige Kaliumchloridlösung (w/v)
- 5, 10, 15 und 20%-ige Calciumchloridlösung (w/v)
- 5, 10, 15 und 20%-ige Magnesiumchloridlösung (w/v)
- Trinkwasser

Die Salze zur Herstellung des Lösungsmediums wurden ebenfalls in Trinkwasser gelöst, da dieses die Grundlage der Pökellake in der Lebensmittelindustrie darstellt.

Sowohl die Probenlösung als auch das Reagenz A wurden vor Einsatz auf eine Temperatur von 37 °C vortemperiert. Je nach Anzahl der Proben wurden jeweils 500 µl des Reagenz A in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Mit Ausnahme des Blanks bzw. Referenzwertes wurde dem Reagenz 50 µl Probenlösung (Enzymlösung) zugegeben, für einige Sekunden gevortext und für 10 min bei 37 °C inkubiert (Mini-Subzero MC 81, Tabai, Osaka, Japan). Nach der Inkubationsphase wurde die Reaktion mit jeweils 500 µl der stark sauren Reagenz B gestoppt. Dem Blank wurden, um die Absorption der Eigenfärbung der Probenlösung nicht zu vernachlässigen, ebenfalls 50 µl Probenlösung nach Zugabe von Reagenz B zugefügt. Die Lösungen wurden zum Abtrennen präzipitierter Proteine mit 10.000 x g für 5 min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus Instruments, Osterode). Die folgende Tabelle veranschaulicht den Versuchsablauf.

**Tab. 4.1: Versuchsablauf des Hydroxamat-Tests**

Blank bzw. Referenzwert	Probe
500 µl Reagenz A	500 µl Reagenz A
Inkubation für 10 min bei 37 °C	
	50 µl Probenlösung
Inkubation für 10 min bei 37 °C	
500 µl Reagenz B + 50 µl Probenlösung	500 µl Reagenz B
Zentrifugieren 10.000 x g für 5 min	

Direkt im Anschluss an das Zentrifugieren wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 525$  nm im Photometer (DU 640 Spectrophotometer, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bestimmt. Die Enzymaktivität berechnet sich aus der Extinktionsdifferenz zwischen Proben- und Referenzwert bzw. Blank.

Die Volumenaktivität berechnet sich folgendermaßen (Pasternack, 1998):

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot t}$$

Mit :

$\Delta E$	Extinktionsdifferenz zwischen Proben- und Referenzwert bzw. Blank
$V$	Gesamtvolumen (1,05 ml)
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient Eisen(III)-Glutamyhydroxamat (0,470 ml/ $\mu$ mol cm)
$d$	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
$v$	Probenvolumen (50 $\mu$ l)
$t$	Reaktionszeit (10 min)

Durch Einsetzen in die Gleichung ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz direkt die Volumenaktivität:

$$\text{Volumenaktivität [IE ml}^{-1}] = \Delta E \cdot 4,47 [\mu\text{mol min} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

Die Aktivitäten der hergestellten Probenlösungen wurden sowohl sofort als auch nach einer 10-minütigen Hitzebehandlung im Wasserbad (Typ 1092, GFL, Burgwedel) ermittelt. Hierzu wurde jeweils 1 ml Probenlösung in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und in Schwimmtrays verwahrt. Auf folgende Temperaturen wurde erhitzt: 50, 55, 60 und 65 °C. Sofort nach Ablauf der Erhitzungszeit wurden die Proben unter fließend kaltem Wasser für 5 min abgekühlt und die Enzymaktivität bestimmt. Ausgedrückt wurde die Enzymaktivität als internationale Einheiten pro Gramm Transglutaminase (IE g<sup>-1</sup>).

#### 4.2.2 Herstellung der Heilbuttfarce mit verschiedenen Salzen

Die Fischfarce wurde wie in Kapitel 2 beschrieben unter Einsatz von Muskulatur des Schwarzen Heilbutts hergestellt. Oben erwähnte Salze (NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>) wurden in einer Konzentration von 2 g pro 100 g Fisch zugefügt. Eine Probenreihe

zur Kontrolle ganz ohne Salz konnte nicht hergestellt werden, da sich die Masse ohne Salz nicht in die Plastikzylinder füllen ließ nachdem das Wasser zugefügt wurde. Es wurde jeweils eine Probenreihe der verschiedenen Salze mit und ohne Transglutaminase ( $15 \text{ IE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ Fisch}$ ) angelegt. Die Texturmessung erfolgte wie in Kapitel 2 (2.2.4) beschrieben. Die Festigkeit der Fischfarce wurde ausgedrückt als maximale Kompressionskraft in Newton (N), die erforderlich ist, um die Farce um 50 % zu stauchen. Auch hier wurden die Gewichtsverluste nach dem Gar- und Abkühlprozess bestimmt.

#### 4.2.3 Statistische Auswertung

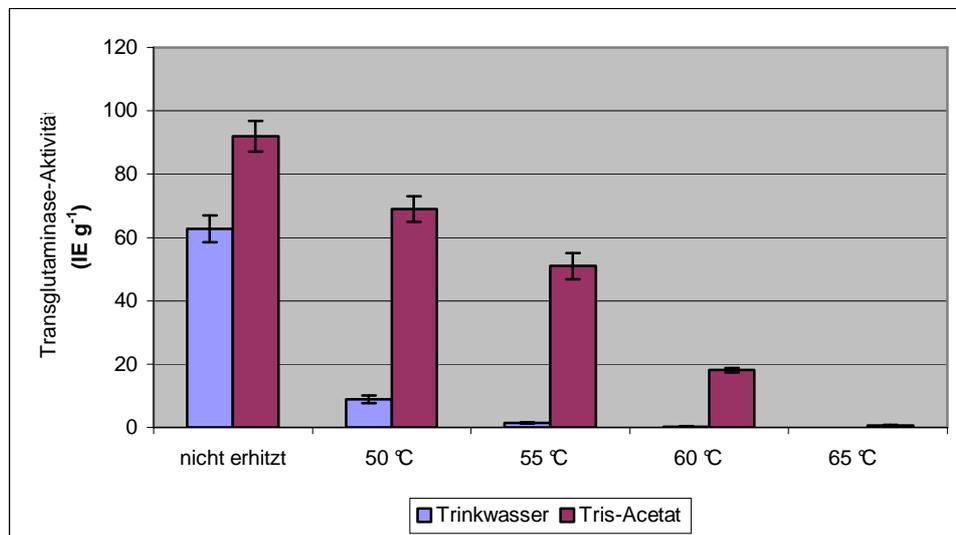
Aus den Daten der Untersuchungen wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Zur Überprüfung der Signifikanz des Unterschiedes zweier Messreihen wurde der t-Test angewandt. Als signifikant unterschiedlich wurden die Mittelwerte zweier Messreihen dann bezeichnet, wenn  $p \leq 0,10$  war. In der graphischen Darstellung der Transglutaminase-Aktivitäten und der Texturergebnisse stellen die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Die Zahlenwerte zu den einzelnen Abbildungen mit Standardabweichungen befinden sich tabellarisch im Anhang.

### 4.3 Ergebnisse

#### 4.3.1 Auswirkung von Salzen auf die Aktivität und Hitzestabilität von Transglutaminase

Das Enzympräparat Activa WM gelöst in Tris-Acetat-Puffer verfügte über eine durchschnittliche Aktivität von  $92,0 \text{ IE g}^{-1}$ . Laut Herstellerangaben seien es zwischen 80 und  $110 \text{ IE g}^{-1}$ . Wurde das Enzym in Trinkwasser gelöst, so betrug die Aktivität im Mittel lediglich  $62,7 \text{ IE g}^{-1}$  (Abb. 4.1). Eine Erhitzung der Enzympräparatlösungen führte in jedem Lösungsmedium zu einer Abnahme der Enzymaktivität (Abb.4.1-4.5). Diese Abnahme war von Lösungsmedium zu Lösungsmedium verschieden. Die größte Hitzestabilität wurde dem Enzympräparat durch Tris-Acetat als Lösungsmedium verliehen. Auch nach einer 10-minütigen Erhitzung der Proben bei  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  konnte noch eine geringe Restaktivität von im Mittel  $0,6 \text{ IE g}^{-1}$  festgestellt werden

(Abb. 4.1). Diente Trinkwasser als Lösungsmedium, so konnte nach 10-minütiger Erhitzung bei 60 °C keine Aktivität mehr festgestellt werden.



**Abb. 4.1: Enzymaktivität der Transglutaminase (IE g<sup>-1</sup>) in Abhängigkeit vom Lösungsmedium und der Erhitzungstemperatur (n=6)**

Die Zugabe von Natrium- bzw. Kaliumchlorid führte zu einer Zunahme der Enzymaktivität in jeder getesteten Konzentration (Abb. 4.2 und 4.3) gegenüber der in Trinkwasser gelösten Probe. Lediglich die Zugabe von 20 % Natriumchlorid zum Lösungsmedium führte zu einem nicht signifikanten Anstieg der Transglutaminase-Aktivität (Tab. 4.2).

**Tab. 4.2: Veränderung der mittleren Transglutaminase-Aktivität (IE g<sup>-1</sup>) in Abhängigkeit von Natrium- bzw. Kaliumchloridkonzentration im Vergleich zur Lösung in reinem Trinkwasser (n=6)**

Lösungsmedium	Veränderung der TG-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> ) im Vergleich zum Trinkwasser als Lösungsmedium (%)
Trinkwasser ohne Zusatz	---
Tris-Acetat	+ 46,7 (p ≤ 0,001)
Trinkwasser + 5 % Natriumchlorid	+ 14,4 (p ≤ 0,05)
Trinkwasser + 10 % Natriumchlorid	+ 14,0 (p ≤ 0,01)
Trinkwasser + 15 % Natriumchlorid	+ 13,1 (p ≤ 0,01)
Trinkwasser + 20 % Natriumchlorid	+ 1,8 (nicht signifikant)
Trinkwasser + 5 % Kaliumchlorid	+ 12,4 (p ≤ 0,01)
Trinkwasser + 10 % Kaliumchlorid	+ 14,2 (p ≤ 0,001)
Trinkwasser + 15 % Kaliumchlorid	+ 18,2 (p ≤ 0,01)
Trinkwasser + 20 % Kaliumchlorid	+ 11,0 (p ≤ 0,01)

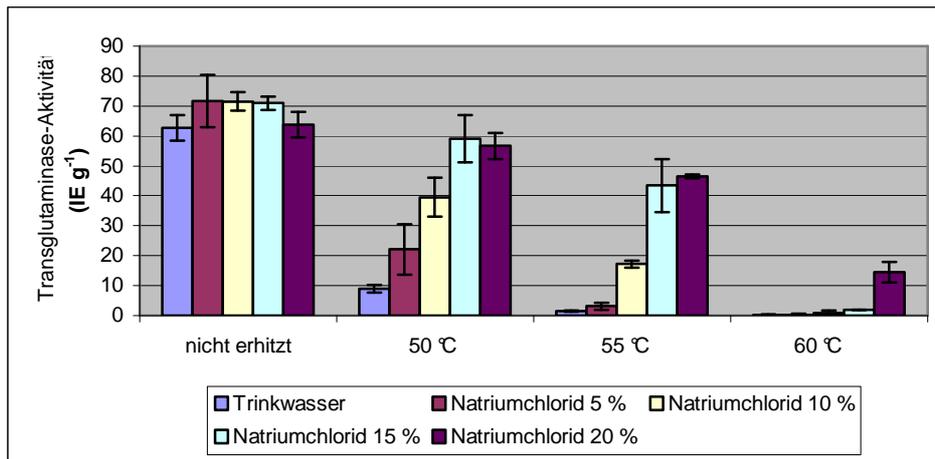
Zwar führte der Salzzusatz zum Trinkwasser zu keiner Transglutaminase-Aktivität in der Höhe, wie sie durch die Lösung der Transglutaminase in Tris-Acetat erzielt wurde, doch die Aktivität konnte um bis zu 18,2 % (Kaliumchlorid 15 %) bzw. 14,4 % (Natriumchlorid 5 %, Tab. 4.2) gesteigert werden im Vergleich zur Lösung in reinem Trinkwasser. Während die Zugabe von 5, 10 oder 15 % Natriumchlorid zu vergleichbaren Transglutaminase-Aktivitäten führte (70,9-71,7 IE g<sup>-1</sup>), zeigte sich, dass eine 20%-ige Zugabe zu Transglutaminase-Aktivitäten führte, die mit denen der Lösung in reinem Trinkwasser vergleichbar waren.

**Tab. 4.3: Veränderung der mittleren Transglutaminase-Aktivität (IE g<sup>-1</sup>) durch Erhitzung in Abhängigkeit von Natrium- bzw. Kaliumchloridkonzentration (n=6)**

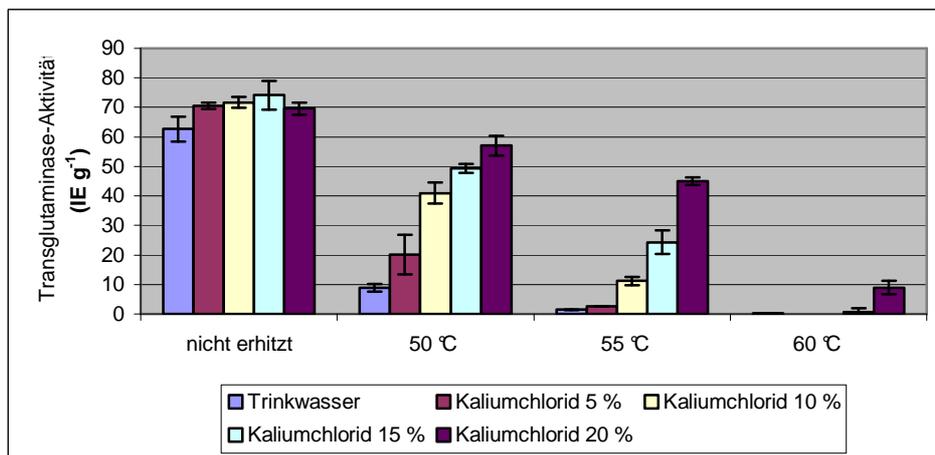
Lösungsmedium	Veränderung der TG-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> ) im Vergleich zum Trinkwasser als Lösungsmedium (%)			
	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C
Trinkwasser ohne Zusatz	---	---	---	---
Tris-Acetat	+ 675 (p ≤ 0,001)	+ 3293 (p ≤ 0,001)	+ 3133 (p ≤ 0,001)	---
Trinkwasser + 5 % Natriumchlorid	+ 149 (p ≤ 0,001)	+ 106 (p ≤ 0,001)	0 (n.s.*)	---
Trinkwasser + 10 % Natriumchlorid	+ 344 (p ≤ 0,001)	+ 1047 (p ≤ 0,001)	+ 200 (p ≤ 0,001)	---
Trinkwasser + 15 % Natriumchlorid	+ 564 (p ≤ 0,001)	+ 2793 (p ≤ 0,001)	+ 533 (p ≤ 0,001)	---
Trinkwasser + 20 % Natriumchlorid	+ 537 (p ≤ 0,001)	+ 3000 (p ≤ 0,001)	+ 4733 (p ≤ 0,001)	---
Trinkwasser + 5 % Kaliumchlorid	+ 126 (p ≤ 0,001)	+ 73 (p ≤ 0,001)	---	---
Trinkwasser + 10 % Kaliumchlorid	+ 361 (p ≤ 0,001)	+ 647 (p ≤ 0,001)	---	---
Trinkwasser + 15 % Kaliumchlorid	+ 454 (p ≤ 0,001)	+ 1520 (p ≤ 0,001)	+ 167 (p ≤ 0,001)	---
Trinkwasser + 20 % Kaliumchlorid	+ 540 (p ≤ 0,001)	+ 2907 (p ≤ 0,001)	+ 2867 (p ≤ 0,001)	---

\*n.s.=nicht signifikant

Im Vergleich zur Lösung in Trinkwasser ohne Zusatz wiesen die Proben gelöst in Natrium- und Kaliumchloridlösung eine zum Teil deutlich stärkere Hitzeresistenz auf (Tab. 4.4). Diese war vielfach umso stärker, je höher die Salzkonzentration war. Nach einer Erhitzung der Proben für 10 min bei 60 °C konnte noch Transglutaminase-Aktivität bei den Proben Natriumchlorid 15 % (1,9 IE g<sup>-1</sup>), Natriumchlorid 20 % (14,5 IE g<sup>-1</sup>), Kaliumchlorid 15 % (0,8 IE g<sup>-1</sup>) und Kaliumchlorid 20 % (8,9 IE g<sup>-1</sup>) ermittelt werden (Abb. 4.2 und 4.3). Bei geringerer Salzmenge konnte bei eben genannter Temperatur-Zeit-Konstellation keine Enzymaktivität mehr festgestellt werden. Eine Erhitzung der Proben für 10 min auf 65 °C bewirkte unabhängig von der Salzkonzentration eine vollständige Enzyminaktivierung der Transglutaminase.



**Abb. 4.2: Enzymaktivität der Transglutaminase (IE g<sup>-1</sup>) in Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration des Lösungsmediums und der Erhitzungstemperatur (n=6)**



**Abb. 4.3: Enzymaktivität der Transglutaminase (IE g<sup>-1</sup>) in Abhängigkeit von der Kaliumchloridkonzentration des Lösungsmediums und der Erhitzungstemperatur (n=6)**

Die Zugabe von Magnesiumchlorid zum Lösungsmedium Trinkwasser (Abb. 4.4) führte in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration zu einem mittleren im Bereich von 0,5 % bis 11,0 % liegenden Anstieg der Enzymaktivität im Vergleich zur Aktivität des Enzympräparates, das in reinem Trinkwasser gelöst wurde (Tab. 4.4). Signifikant war der Anstieg der Aktivität nur bei Zugabe von 5 % und 15 % Magnesiumchlorid. Damit lag die aktivitätssteigernde Wirkung des Magnesiumchlorids unter der von Natrium- und Kaliumchlorid. Calciumchlorid (Abb. 4.5) senkte die Enzymaktivität signifikant in jeder getesteten Konzentration. Die Enzymaktivität war im Mittel umso geringer, je höher die eingesetzte Calciumchloridkonzentration war (Tab. 4.4).

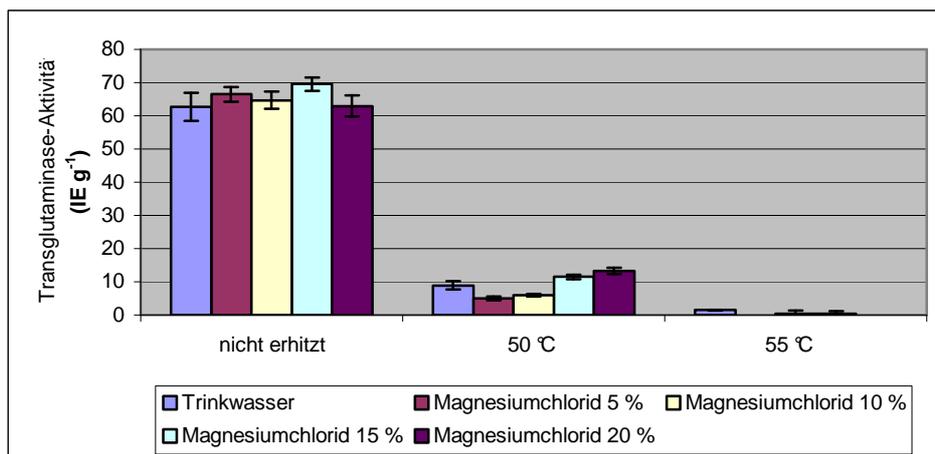
**Tab. 4.4: Veränderung der mittleren Transglutaminase-Aktivität (IE g<sup>-1</sup>) in Abhängigkeit von Magnesium- bzw. Calciumchloridkonzentration im Vergleich zur Lösung in reinem Trinkwasser (n=6)**

Lösungsmedium	Veränderung der TG-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> ) im Vergleich zum Trinkwasser als Lösungsmedium (%)
Trinkwasser ohne Zusatz	---
Trinkwasser + 5 % Magnesiumchlorid	+ 6,1 (p ≤ 0,10)
Trinkwasser + 10 % Magnesiumchlorid	+ 3,2 (nicht signifikant)
Trinkwasser + 15 % Magnesiumchlorid	+ 11,0 (p ≤ 0,01)
Trinkwasser + 20 % Magnesiumchlorid	+ 0,5 (nicht signifikant)
Trinkwasser + 5 % Calciumchlorid	- 8,3 (p ≤ 0,05)
Trinkwasser + 10 % Calciumchlorid	- 10,0 (p ≤ 0,01)
Trinkwasser + 15 % Calciumchlorid	- 12,1 (p ≤ 0,01)
Trinkwasser + 20 % Calciumchlorid	- 15,3 (p ≤ 0,001)

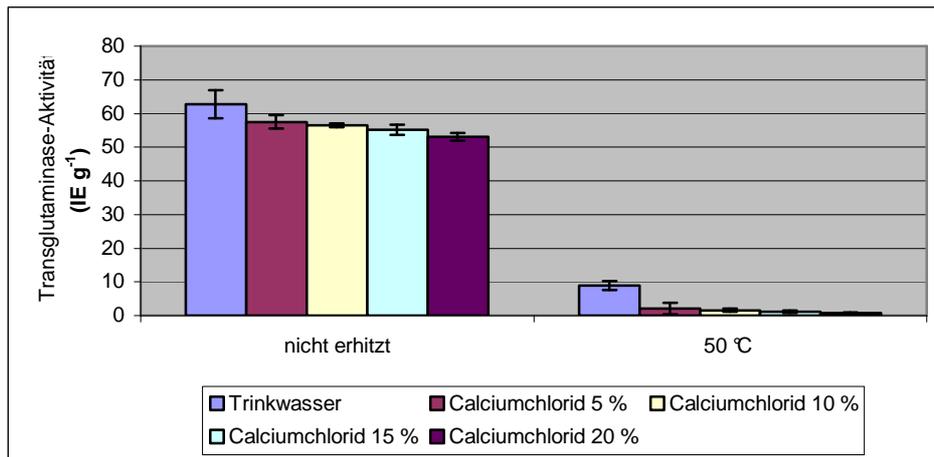
Die Zugabe von Magnesiumchlorid zum Trinkwasser in einer Konzentration von 15 % (11,5 IE g<sup>-1</sup>) und 20 % (13,2 IE g<sup>-1</sup>) führte im Mittel zu einer signifikanten Zunahme der Hitzestabilität des Enzympräparates bei 50 °C im Vergleich zur Probe in reinem Trinkwasser (8,9 IE g<sup>-1</sup>). Nach einer Erhitzung der Magnesiumchlorid-enthaltenden Proben bei 55 °C konnte nur noch bei der 10%- und 15%-igen Konzentration eine geringe Restaktivität ermittelt werden; diese Restaktivität lag unter 1 IE g<sup>-1</sup>, so dass bei dieser Temperatur keine Steigerung der Hitzestabilität festgestellt werden konnte. Nach der Erhitzung bei 60 °C konnte keine Enzymaktivität ermittelt werden. Die Hitzestabilität des Enzympräparates wurde durch die Zugabe von Calciumchlorid beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigung war im Mittel umso stärker, je höher die Calciumchloridkonzentration war. Bereits nach Wärmebehandlung bei 55 °C für 10 min war keine Aktivität mehr zu ermitteln.

**Tab. 4.5: Veränderung der mittleren Transglutaminase-Aktivität ( $\text{IE g}^{-1}$ ) durch Erhitzung in Abhängigkeit von Magnesium- bzw. Calciumchloridkonzentration (n=6)**

Lösungsmedium	Veränderung der TG-Aktivität ( $\text{IE g}^{-1}$ ) im Vergleich zum Trinkwasser als Lösungsmedium (%)			
	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C
Trinkwasser ohne Zusatz	---	---	---	---
Trinkwasser + 5 % Magnesiumchlorid	- 44 ( $p \leq 0,001$ )	---	---	---
Trinkwasser + 10 % Magnesiumchlorid	- 33 ( $p \leq 0,001$ )	- 67 ( $p \leq 0,001$ )	---	---
Trinkwasser + 15 % Magnesiumchlorid	+ 29 ( $p \leq 0,001$ )	- 67 ( $p \leq 0,001$ )	---	---
Trinkwasser + 20 % Magnesiumchlorid	+ 48 ( $p \leq 0,001$ )	---	---	---
Trinkwasser + 5 % Calciumchlorid	- 76 ( $p \leq 0,001$ )	---	---	---
Trinkwasser + 10 % Calciumchlorid	- 82 ( $p \leq 0,001$ )	---	---	---
Trinkwasser + 15 % Calciumchlorid	- 88 ( $p \leq 0,001$ )	---	---	---
Trinkwasser + 20 % Calciumchlorid	- 92 ( $p \leq 0,001$ )	---	---	---



**Abb. 4.4: Enzymaktivität der Transglutaminase ( $\text{IE g}^{-1}$ ) in Abhängigkeit von der Magnesiumchloridkonzentration des Lösungsmediums und der Erhitzungstemperatur (n=6)**

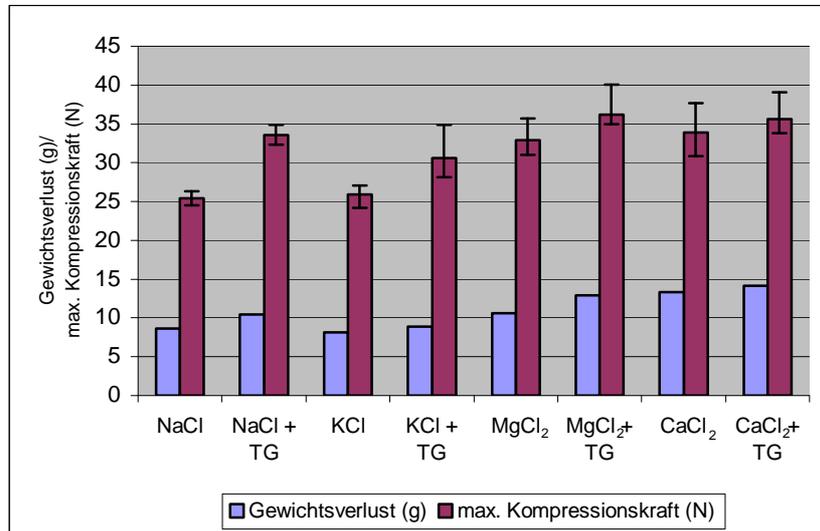


**Abb. 4.5: Enzymaktivität der Transglutaminase ( $\text{IE g}^{-1}$ ) in Abhängigkeit von der Calciumchloridkonzentration des Lösungsmediums und der Erhitzungstemperatur ( $n=6$ )**

#### 4.3.2 Auswirkung verschiedener Salze auf die Festigkeit und den Gewichtsverlust von Heilbuttfarce

Unabhängig von der Art des zugefügten Salzes führte der Transglutaminase-Zusatz zu einer Erhöhung der Festigkeit der Heilbuttfarce (Abb. 4.6). Dieser Anstieg war bei der mit Natriumchlorid gesalzenen Fischfarce am stärksten mit einem mittleren Zuwachs von 32,0 %. Bei der Kaliumchlorid-enthaltenden Fischfarce stieg die maximale Kompressionskraft um im Mittel 18,1 % durch den Zusatz von Transglutaminase. Die Magnesium- und Calciumchlorid-enthaltenden Fischfarce zeigten einen geringeren Anstieg der mittleren maximalen Kompressionskraft um 10 % bzw. 5 % durch Transglutaminase. Im Gegensatz zu den anderen Farce war die mittlere Zunahme der Festigkeit der Farce mit Calciumchlorid durch Transglutaminase nicht signifikant (Tab. 4.6). Die Farce mit  $\text{MgCl}_2$  bzw.  $\text{CaCl}_2$  zeigten bereits ohne Zugabe von Transglutaminase eine höhere Ausgangsfestigkeit als die Farce mit NaCl und KCl, so dass die Farce mit der größten Festigkeit aus dem Zusatz von Magnesium- bzw. Calciumchlorid und Transglutaminase mit einer mittleren maximal aufzuwendenden Kompressionskraft von 36,2 N bzw. 35,6 N resultierten. Die Heilbuttfarce mit Natrium- bzw. Kaliumchlorid und Transglutaminase wiesen mittlere maximal aufzuwendende Kompressionskräfte von 33,5 N bzw. 30,6 N auf. Die höheren maximal aufzuwendenden Kompressionskräfte der Heilbuttfarce mit Magnesium- bzw. Calciumchlorid können auf die höheren Gewichtsverluste während des Garens

zurückzuführen sein. Lagen diese bei Zusatz von Natrium- bzw. Kaliumchlorid und Transglutaminase bei 33,3 % bzw. 26,4 %, so waren diese beim Zusatz von Magnesium- bzw. Calciumchlorid mit 42,0 % bzw. 45,5 % höher.



**Abb. 4.6: Auswirkung verschiedener Salze auf die Festigkeit (maximale Kompressionskraft) und den Gewichtsverlust (g) von Heilbuttfarce mit (15 IE 100 g<sup>-1</sup> Fisch) und ohne Transglutaminase (n=10 pro Versuchsreihe)**

**Tab. 4.6: Zunahme der Festigkeit (maximale Kompressionskraft) der mit verschiedenen Salzen hergestellten, gegarten Heilbuttfarce durch Transglutaminase (15 IE 100 g<sup>-1</sup> Fisch, n=10)**

Matrix	Zunahme der max. Kompressionskraft durch TG (%)
Heilbuttfarce+ NaCl	32,0 (p ≤ 0,001)
Heilbuttfarce + KCl	18,1 (p ≤ 0,01)
Heilbuttfarce + MgCl <sub>2</sub>	10,0 (p ≤ 0,05)
Heilbuttfarce + CaCl <sub>2</sub>	5,0 (nicht signifikant)

#### 4.4 Zusammenfassung und Diskussion

Um den industriellen Produktionsablauf zur Herstellung gegarter Heilbutt-Carbonaden durch die Transglutaminase-Behandlung nicht zu verlängern, wäre es von Vorteil, die Transglutaminase-Behandlung in den Prozessschritt „Salzen“ zu

integrieren. Die bei der Deutschen See GmbH & Co. KG verwendete Lake zum Salzen der Heilbutt-Carbonaden weist eine NaCl-Konzentration von 15 % auf. Es bestünde die Möglichkeit, diese Konzentration in gewissen Grenzen zu verändern, wenn die Transglutaminase keine optimale Aktivität in dieser Lake zeigt. Bei einer Konzentrationsveränderung müsste dann entsprechend die Dauer des Einlegens der Fischstücke in der Lake angepasst werden.

Untersucht wurde zum einen die Aktivität der Transglutaminase in 15%-iger (w/v) NaCl-Lösung, zum anderen wurden zwei niedrigere Konzentrationen von 5 und 10 % sowie eine höhere Konzentration von 20 % (w/v) untersucht. Diese zusätzlich untersuchten Konzentrationen an NaCl sind für den Einsatz in der industriellen Produktion denkbar. Verglichen wurden die hierbei ermittelten Aktivitäten mit der Aktivität der Transglutaminase gelöst in reinem Trinkwasser. In den gleichen Konzentrationen wie das NaCl wurden auch andere Salze hinsichtlich ihrer Beeinflussung der Transglutaminase-Aktivität untersucht.

Sowohl Natrium- als auch Kaliumchlorid (monovalente Ionen) vermochten die Enzymaktivität der Transglutaminase-Präparation, Activa WM, im Vergleich zur Enzymaktivität in reinem Trinkwasser konzentrationsabhängig um bis zu 14-18 % zu steigern. Dabei war die Enzymaktivität in einer 15%-igen Kaliumchloridlösung mit im Mittel  $74,1 \text{ IE g}^{-1}$  am höchsten. Die höchste Aktivität wies das Transglutaminase-Präparat gelöst in Tris-Acetat auf. Die hierbei ermittelte Aktivität von im Mittel  $92,0 \text{ IE g}^{-1}$  entspricht den Angaben des Enzymherstellers Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, wonach das Präparat eine Aktivität von  $80-110 \text{ IE g}^{-1}$  aufweist. Magnesiumchlorid steigerte die Enzymaktivität nur um bis zu 11 %, wohingegen Calciumchlorid die Enzymaktivität nicht steigern konnte. Dieses Ergebnis bestätigt die Aussage von Motoki und Seguro (1998), dass mikrobielle Transglutaminase Calcium-unabhängig sei. Ho et al. (2000) geben an, dass Kalium-, Natrium-, Calcium- und Magnesiumionen die Aktivität mikrobieller Transglutaminase steigern können. Mit Ausnahme der Aktivitätssteigerung durch Calciumionen ergaben die eigenen Untersuchungen das gleiche Ergebnis. Laut Information der Firma Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, ist die Aktivitätsbeeinflussung mikrobieller Transglutaminase durch NaCl und KCl vergleichbar. Es wird jedoch von einer ge-

ringfügig niedrigeren Aktivität der Transglutaminase durch KCl gesprochen. Zumindest in den getesteten Konzentrationen konnte dieses Ergebnis nur insoweit von den eigenen Untersuchungen bestätigt werden, als dass die Aktivität der Transglutaminase in Anwesenheit von NaCl und KCl vergleichbar ist.

Wan et al. (1992) untersuchten die Aktivität von Transglutaminase in Anwesenheit von NaCl bzw. KCl in den Konzentrationen 0-0,6 M. Sie stellten fest, dass bis zu einer NaCl-Konzentration von 0,3 M die Aktivität der Transglutaminase nicht beeinflusst wird. Ab einer Konzentration von 0,4 M NaCl im Lösungsmedium konnte die Aktivität der Transglutaminase gesteigert werden. Eine weitere Steigerung der NaCl-Konzentration auf 0,6 M steigerte auch die Aktivität der Transglutaminase weiter. Höhere NaCl-Konzentrationen wurden von den Autoren nicht eingesetzt. Obwohl die von Wan et al. (1992) getesteten NaCl-Konzentrationen unterhalb der in der eigenen Untersuchung eingesetzten NaCl-Konzentrationen blieben, wird bestätigt, dass sich Natriumchlorid förderlich auf die Aktivität der Transglutaminase auswirkt. In einer Untersuchung von Zellner (2000) wurde NaCl in vergleichbaren Konzentrationen (10,7-17,2 %) wie in den erwähnten eigenen Untersuchungen, einer Transglutaminase-Lake zum Tumbeln von Fleischabschnitten zur Herstellung restrukturieren Fleisches zugesetzt. Zellner bestimmte zwar nicht die Aktivität der Transglutaminase in der Tumbellake, aber er überprüfte die Gelfestigkeit seines Fleisches in Abhängigkeit von der zugefügten Salzmenge. Er stellte fest, dass die Gelfestigkeit des Proteinnetzwerkes umso stärker wurde, je mehr NaCl zugefügt wurde. Diese Untersuchung stützt die Ergebnisse, dass auch höhere NaCl-Konzentrationen die Transglutaminase-Aktivität positiv beeinflussen.

Nach Wan et al. (1992) beeinflusst KCl die Aktivität der Transglutaminase insofern, als dass es sie senkt. Diese Absenkung war bei allen getesteten KCl-Konzentrationen (0,1-0,6 M) gleich. In den eigenen Untersuchungen konnte die Aktivität der Transglutaminase in Trinkwasser durch den Zusatz von KCl in den Konzentrationen 5-20 % gesteigert werden. Neben den unterschiedlichen Salz-Konzentrationen, die bei Wan et al. (1992) und in den eigenen Untersuchungen eingesetzt wurden (Wan et al. testeten mögliche Salz-Konzentrationen für die Herstellung eines Surimiproduktes – in eigenen Untersuchungen wurden mögliche Salz-

Konzentrationen für die Herstellung einer Pökellake untersucht), handelte es sich bei Wan et al. (1992) um Transglutaminase isoliert aus Seelachs; in eigenen Untersuchungen wurde mikrobielle Transglutaminase verwendet. Die Eigenschaften mikrobieller Transglutaminase unterscheiden sich signifikant von denen tierischer Transglutaminase (Fuchsbauer, Pasternack, 1996), so dass die beiden Untersuchungen nur bedingt vergleichbar und damit die teils unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären sind.

Natrium- und Kaliumchlorid steigerten im Gegensatz zu Magnesium- und Calciumchlorid die Hitzestabilität des Transglutaminase-Präparates erheblich. Zur Veränderlichkeit der Hitzestabilität mikrobieller Transglutaminase liegen von anderen Autoren bisher keine veröffentlichten Ergebnisse vor.

Gerade im Bereich der Surimi-Produktion wird Salz (NaCl) als wichtiger Zusatzstoff der Fischmatrix zugesetzt, um die Löslichkeit und Dispersion der Proteine zu steigern. Dadurch kann die Transglutaminase besser zu einer Vernetzung der Proteine und damit zu einem festen Gel führen (Zellner, 2000). Bei Einsatz der Salze NaCl bzw. KCl zu einem Surimiprodukt aus Seelachs stellten Wan et al. (1992) fest, dass das festeste Gel bei einer NaCl-Konzentration von 0,2 M erreicht wird. Diese NaCl-Konzentration ist etwa um die Hälfte geringer als die in den eigenen Untersuchungen eingesetzte Konzentration von 2 %. Eine Steigerung der NaCl-Konzentration auf 0,4 M (vergleichbar mit den eingesetzten 2 %), führte bereits zu einem weicheren Gel. Zu einem anderen Ergebnis, wie bereits in Kapitel 2 erwähnt, kamen Nielsen et al. (1995). Ihre mit Transglutaminase hergestellte Fleischfarce wurde umso fester, je mehr NaCl (1-3 %) sie zusetzten. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es sich bei Wan et al. (1992) und Nielsen et al. (1995) um unterschiedliche Produkte handelt. Zudem gaben Nielsen et al. Transglutaminase (Faktor XIIIa) zu ihrer Fleischfarce hinzu, während Wan et al. (1992) nur die endogen im Seelachsmuskel vorkommende Transglutaminase nutzten.

In den eigenen Untersuchungen wurde nur eine NaCl-Konzentration (2 %) eingesetzt, da hierdurch bereits eine deutliche Verfestigung der rohen Fischfarce erzielt

wurde. Diese Konzentration wurde auch hier (vgl. Kapitel 2) wieder nach dem gustatorischen Kriterium gewählt. Eine Vergleichsprobe ohne Salz konnte nicht hergestellt werden, da sich die Fischfarce ohne Salz aufgrund ihrer Weichheit nicht in die Zylinder füllen ließ.

Durch den Zusatz von KCl zu einem Surimiprodukt in den Konzentrationen 0,1-0,8 M konnten Wan et al. (1992) die Festigkeit ihrer Produkte nicht steigern. Die Produkte waren deutlich weicher als bei Zusatz von NaCl. Gimeno et al. (1999) stellten fermentierte Würste unter Zugabe der Salze NaCl, KCl und  $\text{CaCl}_2$  in Kombination her und verglichen diese texturell mit Würsten, die nur unter Zugabe von NaCl hergestellt wurden. Sie stellten fest, dass die Würste, die nur NaCl enthielten, deutlich fester waren, als die Proben, die ein Gemisch der drei Salze enthielten. Gewichtsverluste während des Herstellungsprozesses wurden in dieser Untersuchung nicht ermittelt.

In den eigenen Untersuchungen war die Festigkeit der Farcen mit NaCl und KCl jeweils ohne exogene Transglutaminase vergleichbar. Die Zugabe von Transglutaminase zu den Farcen erhöhte die Festigkeit der Farce mit NaCl um 32,0 %. Diese Verfestigung durch Transglutaminase war signifikant höher ( $p \leq 0,10$ ) als die Verfestigung durch Transglutaminase in der KCl-enthaltenden Farce mit 18,1 %. Die NaCl- und KCl-Konzentrationen lagen dabei in dem von Wan et al. (1992) getesteten Bereich. Aufgrund ihrer Ergebnisse vermuteten Wan et al. (1992), dass die reaktiven Seitenketten des Myosins des Seelachses in Anwesenheit von KCl nicht für die Transglutaminase zugänglich seien. Die Autoren räumten ein, dass es hierzu noch Untersuchungsbedarf gäbe. Auch die eigenen Untersuchungen lieferten Hinweise darauf, dass KCl die Ausbildung von Isopeptidbindungen in der Fischmatrix einschränkt. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Aktivität mikrobieller Transglutaminase an sich durch KCl nicht beeinträchtigt wird.

Durch den Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  zu Surimi konnten Benjakul und Visessanguan (2003), Morales et al. (2001) sowie Benjakul et al. (2000) die Gelfestigkeit ihrer Produkte steigern. Diese Festigkeitszunahme erklärten die Autoren mit der Abhängigkeit der endogen im Fischmuskel vorhandenen Transglutaminase von Calciumionen. Auch

Park (2000) berichtete, dass der Einsatz von Calciumionen in der Surimiproduktion weit verbreitet sei, ohne dass genau bekannt sei, wie die Ionen im Surimi wirkten. Ofstad et al. (1993) stellten fest, dass die Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$  in Kombination während des Waschprozesses zur Surimiherstellung aus Dorsch zu einem festeren Gel führte, als wenn auf diese Salze verzichtet wurde. Die Autoren erklärten dieses Ergebnis ebenfalls mit dem Vorkommen von endogener Transglutaminase im Fischmuskel. Wan et al. (1994) stellten jedoch fest, dass die Aktivierung der endogenen Transglutaminase nicht allein durch Magnesiumionen hervorgerufen werden kann. Calciumionen sind in jedem Fall erforderlich.

Auch in den eigenen Untersuchungen waren die Farcen mit  $\text{CaCl}_2$  bzw.  $\text{MgCl}_2$  ohne Transglutaminase fester als die Farcen mit  $\text{NaCl}$  oder  $\text{KCl}$  ohne Transglutaminase. Dies kann auf eine Aktivierung der endogenen Heilbutt-Transglutaminase durch Calciumionen zurückzuführen sein. Da die Farcen mit  $\text{MgCl}_2$  bzw.  $\text{CaCl}_2$  eine vergleichbare Festigkeit aufwiesen,  $\text{MgCl}_2$  jedoch nach Wan et al. (1994) allein nicht in der Lage ist, die Transglutaminase zu aktivieren, kann auch ein Salz-bedingter Gewichtsverlust zu der Verfestigung geführt haben. Die Farcen mit  $\text{MgCl}_2$  bzw.  $\text{CaCl}_2$  wiesen einen höheren Gewichtsverlust als die Farcen mit  $\text{NaCl}$  bzw.  $\text{KCl}$  auf. Höhere Gewichtsverluste durch  $\text{MgCl}_2$  bzw.  $\text{CaCl}_2$  stellten bereits andere Autoren fest: McFarlane und Unruh (1996) stellten höhere mittlere Gewichtsverluste (Tropfsaft- und Garverluste) bei Schweinefleisch, dem  $\text{CaCl}_2$ -Lake vor dem Garprozess injiziert wurde, fest. Dieses stellten Wheeler et al. (1992) auch bei Einsatz von Rindfleisch fest. Young et al. (1991) untersuchten den Einfluss verschiedener Ionen auf Hähnchenbrustfilet. Sie stellten fest, dass die Absorption von Flüssigkeit sowie die Gewichtsverluste durch den Garprozess höher sind, wenn die Filets vor Ablauf der Totenstarre mit einer  $\text{CaCl}_2$ - bzw. einer  $\text{MgCl}_2$ -Lösung behandelt wurden.

Colmenero et al. (2005) stellten fest, dass der Gewichtsverlust während des Garens von Frankfurter Würsten signifikant höher ist, wenn diese etwa 1,1 %  $\text{KCl}$  und 0,8 % mikrobielle Transglutaminase enthalten, als wenn diese nur unter Zugabe von 2,8 %  $\text{NaCl}$  hergestellt wurden. Die Autoren untersuchten keine vergleichbaren Konzentrationen an  $\text{NaCl}$  und  $\text{KCl}$ , sondern nur diese beiden Versuchsreihen, so dass ein Vergleich mit den eigenen Untersuchungen, die ergaben, dass die Gewichtsverluste

der Farcen mit NaCl und KCl vergleichbar waren, nur bedingt vorgenommen werden kann. In den eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Zugabe von Transglutaminase den Gewichtsverlust erhöht, als wenn nur das jeweilige Salz zugegeben wurde. Colmenero et al. (2005) konnten feststellen, dass der Gewichtsverlust während des Garens um ein Vielfaches höher ist, wenn Frankfurter Würste nur mit Transglutaminase hergestellt werden, als wenn diese nur NaCl enthalten. Wurde den Transglutaminase-enthaltenden Würsten zusätzlich KCl zugefügt, konnte der Gewichtsverlust reduziert werden. Dieses Ergebnis bestätigt zwar nicht direkt die eigenen Ergebnisse, liefert jedoch Hinweise dafür, dass Transglutaminase den Gewichtsverlust im Gegensatz zu Salz erhöhen kann.

Mikrobielle Transglutaminase ist Calcium-unabhängig (Motoki, Seguro, 1998), so dass hier keine positive Beeinflussung durch  $\text{CaCl}_2$  zu erwarten ist. Zudem sehen Motoki und Seguro (1998) und Seguro (1999) den Einsatz von Calciumionen bei Verwendung mikrobieller Transglutaminase zur Verfestigung und Modifizierung von Proteinen als problematisch. Viele Lebensmittelproteine, wie z. B. Casein aus Milch oder Myosin, würden in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  präzipitiert und seien dann schlechter durch die mikrobielle Transglutaminase vernetzbar. In den eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Farce mit  $\text{CaCl}_2$  bezüglich der Festigkeit mit der Farce mit  $\text{CaCl}_2$  und Transglutaminase vergleichbar war. Dieses kann, wie von Motoki und Seguro (1998) beschrieben, auf eine Präzipitation der Proteine zurückzuführen sein.

Wie von vielen Autoren beschrieben, kann frisches Fleisch in einer  $\text{CaCl}_2$ -Lake mariniert bzw. diese Lake in das Fleisch injiziert werden, um die Fleischtextur zarter zu machen (Jaturasitha et al., 2004; Lawrence et al., 2003; Polidori et al., 2000; Perez et al., 1998).  $\text{CaCl}_2$  aktiviert das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige proteolytische enzymatische System (Calpain) und führt damit zu einer zarteren Textur (McFarlane, Unruh, 1996). Dieser Effekt konnte auch nach vorheriger Gefrierlagerung des Fleisches beobachtet werden (Wheeler et al., 1992). Die Enzyme des Fisches entsprechen in Art und Eigenschaften weitestgehend denen warmblütiger Tiere (Tülsner, 1994), so dass ein ähnlicher Effekt in Fischmuskulatur nicht auszuschließen ist. Im Gegensatz zur Rolle des Calpains in Säugetiermuskeln ist die Rolle des Calpains in Fisch weniger unter-

sucht (Kang, Lanier, 2000). Dennoch konnten Taneda et al. (1983) und Toyohara und Makinodan (1989) Calpain, welches durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert wird, aus Karpfen isolieren. Papa et al. (1997) isolierten Calpain aus Meerforelle und Wolfsbarsch. Makinodan et al. (1983) wiesen proteolytische Aktivität auch in Schwarzem Heilbutt nach.

In den eigenen Untersuchungen war die Zeitspanne zwischen  $\text{CaCl}_2$ -Zugabe zur Fischfarce und dem Erhitzungsprozess relativ kurz (ca. 40 min), so dass die Auswirkungen einer eventuellen Proteolyse – wenn überhaupt – nur gering sein können und folglich nicht bemerkt werden. Bei der industriellen Verarbeitung der Heilbutt-Carbonaden kann die Zeitspanne zwischen dem Salzen und dem Garen jedoch wesentlich länger sein, so dass sich der Einsatz von  $\text{CaCl}_2$  nicht anbietet, da eine Aktivierung des proteolytischen Systems stattfinden könnte.

Für den Einsatz der Transglutaminase-Präparation in Fisch und Fischprodukten lässt sich folgern, dass das vorherige Lösen der Enzympräparation in Salzwasser (NaCl und KCl) positiv für dessen Aktivität ist. Der Einsatz von  $\text{CaCl}_2$  oder  $\text{MgCl}_2$  erscheint nach diesen Untersuchungen nicht sinnvoll, da zwar feste Gele erzeugt werden können, diese jedoch mit höheren Gewichtsverlusten während des Garens einhergehen.

Die in der Praxis übliche Handhabe, den Heilbutt vor dem Garprozess in einer 15%-igen Natriumchloridlake zu salzen, erwies sich bezüglich der Transglutaminase-Aktivität als weiterhin durchführbar und positiv. Jedoch wird durch das zugefügte Salz die Hitzestabilität erhöht, was bei der Inaktivierung der Transglutaminase beachtet werden muss. Auch der Einsatz von Kaliumchlorid wäre hinsichtlich der Aktivität der Transglutaminase denkbar (Armbrust et al., 2005), jedoch kann sich KCl hinderlich auf die Ausbildung von Isopeptidbindungen in Fisch auswirken.

Der Prozessschritt der Transglutaminase-Behandlung sollte mit dem Prozessschritt des Salzen kombiniert werden. Ist dies nicht möglich, sollte die Salzbehandlung zeitlich vor der Transglutaminase-Behandlung terminiert sein, um die positive Wirkung des Natriumchlorids auf die Aktivität der Transglutaminase auszunutzen. Die

Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Verarbeitung von Heilbutt-Carbonaden wird in Kapitel 5 überprüft.

## **5 Verarbeitung von Schwarzem Heilbutt unter Einsatz von Transglutaminase im Technikumsmaßstab**

### **5.1 Einleitung**

In der industriellen Verarbeitung des Schwarzen Heilbutts werden ganze Fische, bereits ausgenommen und in 20-kg-Blöcken tiefgefroren, in der Produktionsstätte angeliefert. Diese werden nach Bedarf aufgetaut und in Carbonaden (150-300 g) geschnitten. Die Carbonaden werden von Hand nach Größe sortiert und weiter gesäubert, um die beim ersten Ausnehmen nicht entfernten Eingeweidereste vollständig zu entfernen. Bevor der Fisch dem Garprozess zugeführt wird, werden die Carbonaden in eine 15%-ige (w/v) Natriumchloridlösung für 40 bis 60 Minuten eingelegt. Im Anschluss daran werden die Carbonaden entweder gespittet (auf Metallspieße gezogen) oder auf Roste verteilt. Je nach Größe wird entschieden, ob der Garprozess der Carbonaden im Hängen oder im Liegen durchgeführt wird. Bei besonders großen Carbonaden (zumeist Carbonadenstücke aus der kranialen Hälfte) ist die Gefahr des Abfallens von den Metallstäben während des Garens größer, so dass diese meist auf Rosten liegend gegart werden. Kleinere Stücke und Schwanzstücke werden zum Garen gespittet und können so hängend gegart werden. Das Hängen hat den Vorteil, dass eine besonders gleichmäßige Garung erzielt wird und der Fisch keine Auflagefläche aufweist.

Die so vorbereiteten Carbonaden werden auf den Rosten bzw. auf den Metallstäben in Hordengestellwagen verbracht, mit Trinkwasser abgespült und für fünf Stunden bei 5 °C gelagert. Diese Ruhephase bewirkt zum einen, dass eine gleichmäßige Diffusion des Salzes innerhalb der Carbonaden stattfindet, und zum anderen, dass die Oberfläche abtrocknet und der hängende Fisch dadurch den Garprozess mit geringeren Verlusten durch Abfallen von den Stäben und mit festerer Textur übersteht. Der Garprozess findet bei einer Temperatur von 67 °C innerhalb von 3 Stunden statt. Die Carbonaden erreichen hierbei eine Kerntemperatur von 65 °C am Ende des Garprozesses. Nach dem Garen werden die Carbonaden auf ca. 5 °C Kerntemperatur abgekühlt, indem die Hordengestellwagen für ca. 6 Stunden in den Kühlraum geschoben werden. Anschließend werden die Carbonaden unter Schutzgasatmosphäre (max. 5 % O<sub>2</sub>, 45 % CO<sub>2</sub>, 50 % N<sub>2</sub>) in Kartonagen verpackt und mit

Barrierekunststoffolie versiegelt. So verpackt weist der Heilbutt eine Haltbarkeit von mindestens 12 Tagen bei 5 °C auf.

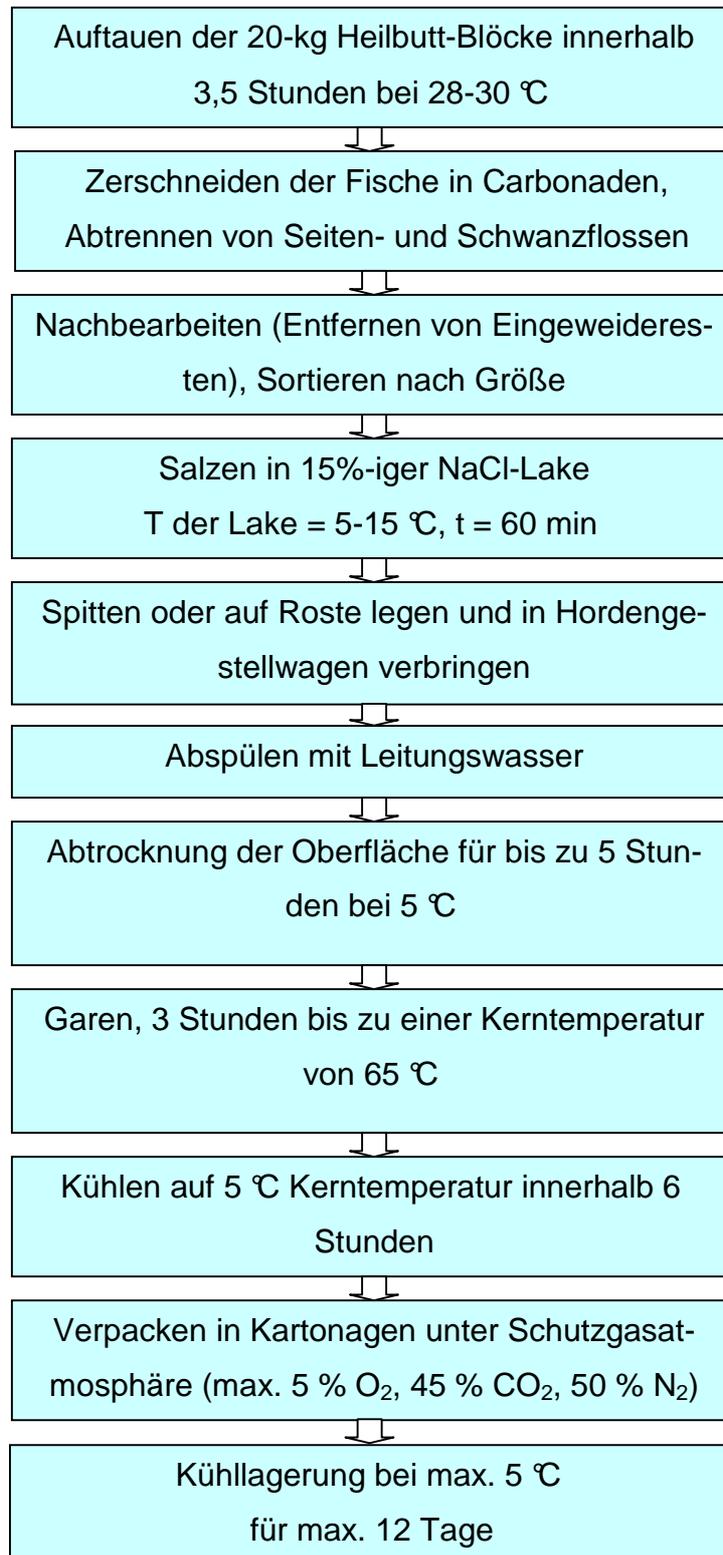


Abb. 5.1: Prozessschema der industriellen Verarbeitung des Schwarzen Heilbutts

Die im Folgenden dargestellten Untersuchungen orientieren sich in ihrer Durchführung am industriellen Verarbeitungsprozess. Die Untersuchungen sollten klären, mit welcher Methode (Diffusion der Transglutaminase-Lösung durch Einlegen in Lake oder Injektion von Transglutaminase-Lösung) und in welcher Konzentration die Transglutaminase in den Fisch einzubringen ist. Das Injektionsverfahren kann sowohl in der Fleischindustrie (Müller, 2003) als auch in der Fischindustrie (persönliche Mitteilung der Deutschen See GmbH & Co. KG, Bremerhaven, 2000) mit Erfolg zur Applikation von Natriumchloridlösung eingesetzt werden. Ob sich der Einsatz auch für Schwarzen Heilbutt eignet, soll in den folgenden Versuchen ermittelt werden.

Nach Angaben des Enzymherstellers Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, sollte Transglutaminase in einer Konzentration von etwa einer IE pro Gramm Protein eingesetzt werden; dies ist jedoch abhängig vom eingesetzten Lebensmittel und der Applikationsmethode. In der Literatur wird von unterschiedlichen Einsatzmengen an mikrobieller Transglutaminase in Abhängigkeit von der Fischart berichtet. Sakamoto et al. (1995) konnten nach Einsatz von 1-2 IE Transglutaminase pro Gramm Seelachs die stärkste Verfestigung nachweisen, während Tsai et al. (1996) die stärkste Verfestigung bei Makrele nach Einsatz von 0,34 IE pro Gramm erzielten. Ni et al. (1999) verwendeten 5 IE pro Gramm bei Einsatz von Karpfen und Lachs mit gutem Erfolg. Jiang et al. (2000) konnten bei Einsatz von 0,35 - 0,6 IE pro Gramm bei der Verarbeitung von Degenfisch die stärkste Verfestigung erzielen. Hierbei ist zu beachten, dass die Autoren Surimiprodukte herstellten.

Die Transglutaminase-Behandlung sollte zusammen mit dem Salzen stattfinden, um den positiven Einfluss des Natriumchlorids auf die Aktivität der Transglutaminase zu nutzen (s. Kapitel 4). Inwieweit der Zeitpunkt des Salzens für die Wirkung der Transglutaminase bei der Bearbeitung von Heilbutt-Carbonaden tatsächlich von Bedeutung ist, wurde im Folgenden ermittelt.

Weitere Parameter für die Wirkung der Transglutaminase sind die Inkubationszeit und -temperatur, in der die Transglutaminase ihre optimale Wirkung entfaltet. Das Temperaturoptimum mikrobieller Transglutaminase liegt nach Motoki und Seguro

(1998) bei 50 °C. Die eigenen Untersuchungen ergaben jedoch, dass bei dieser Temperatur bereits die Aktivität der Transglutaminase in 15%-iger NaCl-Lösung eingeschränkt wird. Während Motoki und Seguro (1998) und Seguro (1999) angeben, dass die mikrobielle Transglutaminase auch bei Temperaturen von 10 °C und sogar noch knapp über dem Gefrierpunkt Aktivität zeigt, stellten Nielsen et al. (1995) nach einer Inkubationszeit von 23 Stunden bei 10 °C nur eine schwache Texturverfestigung ihrer Fleischfarceproben durch Transglutaminase fest. Die Autoren verwendeten allerdings keine mikrobielle Transglutaminase sondern Faktor XIIIa. Paardekooper und Wijngaards (1986) gelang die Restrukturierung von Fleisch mittels mikrobieller Transglutaminase bei einer Temperatur von 0-4 °C. Seguro et al. (1995) konnten nach Inkubation ihrer Kamabokoproben bei Temperaturen von 10 und 45 °C jeweils einen Anstieg der Bruchfestigkeit durch Transglutaminase feststellen.

Diese Temperatur-Zeit-Bedingungen werden in der Surimiproduktion „Setting“ genannt und sollten sich in den Produktionsprozess für Schwarzen Heilbutt einfügen. Um die Oberfläche der Heilbutt-Carbonaden abtrocknen zu lassen, werden diese bei 5 °C für 5 Stunden kühlgelagert. Dieser Prozessschritt könnte für das Setting modifiziert werden, indem sowohl die Temperatur als auch die Zeit erhöht bzw. verlängert werden. Da während der thermischen Behandlung innerhalb des industriellen Garprozesses eine wirkaktive Temperatur der Transglutaminase (37-40 °C) für eine Dauer von etwa 60 Minuten durchlaufen wird, besteht die Möglichkeit, dass ein Setting, in der Form wie es in der Surimiproduktion durchgeführt wird, nicht erforderlich ist. Unter diesen Umständen könnte der Abtrocknungsprozess in der ursprünglichen Form beibehalten werden und die langsame Erhitzung während des Garens das Setting ersetzen.

Die Auswirkungen der Transglutaminase auf die Carbonaden des Schwarzen Heilbutts wurden mittels instrumenteller Texturanalyse und durch Ermittlung von Gewichtsverlusten überprüft. Zu diesem Zweck wurde eine Texturprüfmethode entwickelt, mit der die Textur des gegarten Schwarzen Heilbutts zuverlässig und schnell überprüft werden konnte.

### 5.1.1 Textur von Fisch

Bei Fischmuskulatur handelt es sich um eine schwierig zu analysierende, inhomogene Matrix (Coppes et al., 2002). Sie besteht aus verschiedenen Fasern mit unterschiedlichen Ausmaßen und weist keine uniforme Textur auf (Dunajski, 1979). Dicke und Länge der Muskelfasern hängen nicht nur von der Fischart sondern auch vom Alter der Tiere ab. Aufgrund biologischer Einflussfaktoren, wie z. B. Alter, Reifezyklus oder Futterangebot, bestehen selbst zwischen Exemplaren einer Art deutliche Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Fischmuskulatur und damit ebenfalls in den textuellen Eigenschaften. Auch innerhalb eines einzigen Individuums bestehen textuelle Unterschiede in Abhängigkeit von der Probenahmestelle. Bei allen Fischen nimmt die Dicke der Myomeren zum Schwanz hin ab. Das bedeutet eine Zunahme des Anteils an Bindegewebe und eine insgesamt festere Textur dieser Muskelpartien. (Tülsner, 1994)

Plattfische können zudem Unterschiede in ihrer chemischen Zusammensetzung des rechten und linken Filets aufweisen, was zu größeren Schwankungen in der Texturmessung führen kann (Dunajski, 1979). Diese gesamten Faktoren erschweren die Entnahme einer Durchschnittsprobe und können bei der Texturanalyse zu so großen Streuungen der Messwerte führen, dass eine Deutung der Ergebnisse nicht mehr zulässig ist (Raeuber, 1993).

### 5.1.2 Texturmessung

Die einschlägige Literatur führt eine Vielzahl von Methoden, Geräten bzw. Messvorsätzen zur instrumentellen Fischtexturanalyse auf – darüber, welches die beste Methode sei, herrscht jedoch keine einheitliche Meinung. Coppes et al. (2002) zufolge findet die Kramersche Scherzelle mit vier oder zehn Scherblättern die häufigste Verwendung. Botta (1995) zufolge sind das Scheren und der Einsatz des Druckstempels die am häufigsten verwendeten physikalischen Texturprüfmethoden für gegarte Fischprodukte. Während für die Texturanalyse von rohem Fisch analoge Methoden zur Schlachtfleischuntersuchung eingesetzt werden können, ergeben sich bei der Analyse gegarter Fischmuskulatur Schwierigkeiten aufgrund der besonders weichen Textur (Dunajski, 1979). Nicht jede Methode ist hier einsetzbar.

Dunajski (1979) hält den Einsatz des Penetrometers zur Fischtexturuntersuchung, wie es beispielsweise Main et al. (1972) einsetzen, sowie eine Texturanalyse durch Extrusion, wie Voisey (1972) sie durchführt, aufgrund der geringen Größe der Muskelfasern für ungeeignet. Ebenso sei das Zerschneiden, beispielsweise mittels Warner-Bratzler-Scherblatt, wie es Gadd und Buttkus (1964), Bailey (1972), Buck et al. (1986) oder Sigurgisladottir et al. (2000) durchführten, ungeeignet, da das Messergebnis stets von der Schärfe des Scherblattes abhängig und die Positionierung der Probe im Hinblick auf die Ausrichtung der Fasern zum Scherblatt äußerst schwierig sei. Dunajski (1979) hält die Kramersche Scherzelle, wie sie auch bei Botta et al. (1987), LeBlanc et al. (1988) oder Krueger und Fennema (1989) eingesetzt wird, für die beste Methode bzw. für den besten Messvorsatz, um die Zartheit von Fischmuskel zu analysieren. Aufgrund der Rohstoffschwankungen gelte dabei grundsätzlich: Je größer das Probenvolumen, desto reproduzierbarer das Messergebnis. Dennoch bestehe die bei der Kramerschen Scherzelle aufgezeichnete Kraft nicht nur aus Scherkraft sondern auch aus Kompressions-, Reibungs- und Extrusionskräften. Diese zusätzlichen Kräfte wiederum seien durch eine Verringerung des Probenvolumens zu reduzieren. (Dunajski, 1979)

Chamberlain et al. (1993) erachteten hingegen die Kramersche Scherzelle als ungeeignet für die Untersuchung von Fischproben. Für die texturale Untersuchung von Schlachtfleisch sei diese einsetzbar, nicht jedoch für das weiche Fischfleisch. Zudem benötige man für jede Messung mit der Kramerschen Scherzelle ein unnötig großes Probenvolumen. Die Autoren entwickelten einen Messvorsatz („fish shearing device“), der ähnlich dem Warner-Bratzler-Scherblatt definierte Probenstücke zerschneidet, und erzielten hiermit reproduzierbare Messergebnisse. (Chamberlain et al., 1993)

Schubring (1999) verwendete die Texturprofilanalyse zur Untersuchung von Salzheringfilet und Schellfischfarce. Neben verschiedenen anderen Texturparametern, wie z. B. Kaubarkeit oder Gummiartigkeit, untersuchte er die Härte seiner Prüfproben, die er als „Kraft zur Erreichung einer vorgegebenen Deformation“ definierte. Diese Textureigenschaft ist mittels Druckstempel und einmaliger Kompression zu ermitteln.

Hierbei beeinflusst die Stärke der Kompression die Härte der Fischprodukte signifikant. (Schubring 1999)

Bei der Härtebestimmung sollte beachtet werden, dass die Kompression in einer Stärke gewählt wird, bei der nicht nur die Oberfläche des Prüfgutes eine Deformation erfährt, sondern bei der die gesamte Probe einen signifikanten Strukturzusammenbruch erleidet (Schubring 1999; Hamann, 1988; Shama und Sherman, 1973). Grundsätzlich sei dies bei einer Kompression von mindestens 70 % gewährleistet. Zudem korreliere die Kraft, die erforderlich sei, um die Proben um 70-80 % zu komprimieren, mit der sensorisch bestimmten Zartheit und Härte. Die Bestimmung der Härte sollte mit einem Druckstempel durchgeführt werden, dessen Durchmesser deutlich größer als die Prüfprobe ist, um eine zusätzliche Scherung der Probe auszuschließen. Insgesamt konnte Schubring eine signifikante Korrelation zwischen den an Fischprodukten ermittelten Texturparametern Härte, Gummiartigkeit und Kaubarkeit ermitteln. (Schubring, 1999)

In einer weitergehenden Untersuchung konnte Schubring (2000) feststellen, dass die Messgeschwindigkeit zwar die Härte bei den Stauchungsgraden von 40 % und 80 % beeinflusst – eine allgemeingültige Abhängigkeit verschiedener Texturparameter von den Messgeschwindigkeiten 24-144 mm min<sup>-1</sup> konnte er jedoch nicht feststellen. Auch Hatae et al. (1984) untersuchten die Festigkeit/Härte ihrer Fischproben mittels Druckstempel. Sie verwendeten jedoch die wesentlich höhere Messgeschwindigkeit von 750 mm min<sup>-1</sup>. Shama und Sherman (1973) untersuchten Messgeschwindigkeiten im Bereich von 198-960 mm min<sup>-1</sup>. Sie erachteten 198 mm min<sup>-1</sup> als eine geeignete Messgeschwindigkeit.

Unter Berücksichtigung der Aspekte der Literaturdaten wurden, wie im Folgenden beschrieben, unterschiedliche Methoden zur Texturanalyse erprobt.

## **5.2 Material und Methoden**

### **5.2.1 Etablierung der Messmethode**

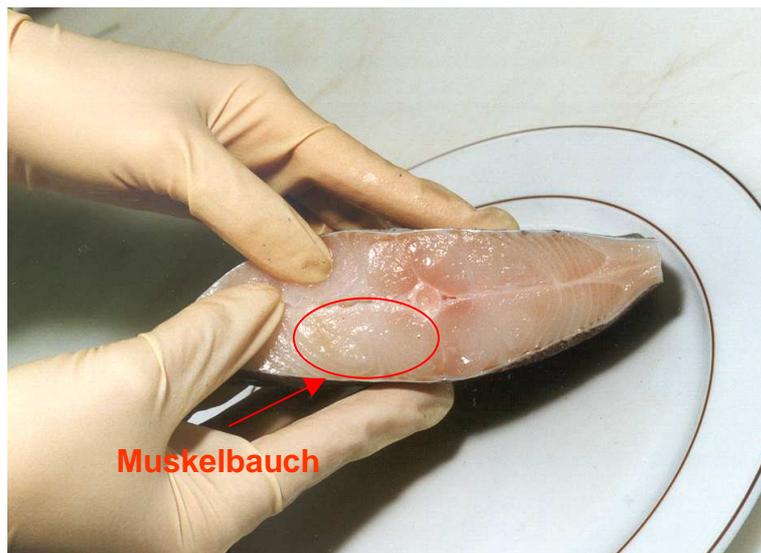
Aufgetauter und in Carbonaden geschnittener Schwarzer Heilbutt wurde von der

Deutschen See GmbH & Co. KG, Bremerhaven, bezogen. Die Heilbutt-Carbonaden (4-5 °C) wurden für 60 Minuten in 15%-ige (w/v) Natriumchloridlake (10-15 °C) eingelegt. Zur Überprüfung des Unterschiedes zwischen Transglutaminase-behandeltem und -unbehandeltem Fisch wurde ein Teil des Fisches nach dem Einlegen in Natriumchloridlösung über Nacht in eine 0,5%-ige (w/v) Transglutaminase-Lösung (315 IE l<sup>-1</sup>, ausgehend von einer mittleren Aktivität der Transglutaminase von 63 IE g<sup>-1</sup> in Trinkwasser gelöst, siehe Kapitel 4) (Activa WM, Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg) eingelegt. Pro kg Fisch wurden 1,5 l Transglutaminase-Lösung verwendet. Der Garprozess erfolgte im Konvektionsdämpfer (Combi-Dämpfer CC 101, Rational Großküchentechnik GmbH, Landsberg am Lech) im Dampf-Luft-Gemisch bei 70 °C bis zu einer Kerntemperatur von 65 °C. Die gegarten Heilbutt-Carbonaden wurden auf 15 °C temperiert. Als Messvorsätze wurden verwendet:

- Druckstempel (Durchmesser 98 mm) mit zylindrischem Probenbehälter
- Druckstempel (Durchmesser 98 mm) ohne Probenbehälter
- Druckstempel (Durchmesser 35 mm) mit zylindrischem Probenbehälter
- Warner-Bratzler-Scherblatt
- Kramersche Scherzelle

Die Messungen mittels Druckstempel wurden mit einem Stauchungsgrad von 70 % durchgeführt. Zur Beurteilung der Messmethodik wurden die Streuung der Messwerte in Form der Variationskoeffizienten, der Rohstoffverbrauch sowie die Praktikabilität (Probenvorbereitung, Beschickung der Messzellen, Zeitaufwand pro Messung) herangezogen. Ein wichtiges Auswahlkriterium für die Texturmessmethode war, dass die Heilbutt-Carbonaden vor der Texturprüfung möglichst nicht zurechtgeschnitten werden müssen; denn die grobe Struktur dieses Fisches mit seinen großen und nur locker verbundenen Muskelsegmenten wird selbst bei der Bearbeitung mit einem sehr scharfen Messer leicht zerdrückt, so dass eine Texturanalyse diese Vorschäden zwangsläufig mitberücksichtigt. Das Filetieren nach dem Garen bereitet hingegen keine Schwierigkeiten; die Haut lässt sich problemlos entfernen, ebenso können die Filets von der Gräte abgehoben werden. Um vergleichbare Probenstücke für die Messung mittels großem Druckstempel ohne Probenbehälter, mittels kleinem

Druckstempel mit Probenbehälter und mittels Warner-Bratzler-Scherblatt zu erhalten, wurden aus den Filets einzelne Muskelbäuche (Abb. 5.2) herausgelöst. Dieses war möglich, ohne ein Messer zu Hilfe zu nehmen. Nur für den kleineren Druckstempel mit Probenbehälter wurden pro Messung zwei Muskelbäuche übereinander gelegt (der Probenbehälter war damit vollständig befüllt; das Gewicht betrug 50-60 g), ansonsten wurde nur ein Muskelbauch pro Messung texturrell untersucht.



**Abb. 5.2: Darstellung einer Heilbutt-Carbonade mit Muskelbauch**

Um die Kramersche Scherzelle möglichst gleichmäßig zu befüllen, wurden zwei Filets auf die Größe der Kramerschen Scherzelle zurechtgeschnitten und eingefüllt. Die Kramersche Scherzelle wurde vollständig ausgefüllt, um evtl. rohstoffbedingte Schwankungen auszugleichen. Das Probengewicht betrug etwa 150-200 g. Ein noch größeres Probenvolumen wurde für den großen Druckstempel in Verbindung mit dem Probenbehälter verwendet. Der Probenbehälter wurde mit vier Fischfilets befüllt. Die Füllhöhe betrug 3-4 cm; das Probengewicht lag bei 300-350 g. Pro Messvorsatz wurden 10 Messungen durchgeführt.

### 5.2.2 Texturanalyse

Die Texturmessung erfolgte mit der Universal Texturprüfmaschine, Typ 4302, Instron-Wolpert GmbH, Darmstadt, als Kraft-Weg-Messung mit einer Querhauptge-

schwindigkeit von 200 mm min<sup>-1</sup>. Die verwendete Kraftmessdose war in der Lage, Kräfte bis 100 N aufzuzeichnen.

### 5.3 Ergebnisse

Wie in der Tabelle 5.1 ersichtlich, wies jede der Messmethoden einen relativ hohen Variationskoeffizienten auf. Dies ist, wie schon im Kapitel 2 gezeigt, auf die starken Rohstoffschwankungen, die sich in unterschiedlicher Texturfestigkeit bemerkbar machen, zurückzuführen. Es wäre zu erwarten gewesen, dass ein höheres Probenvolumen pro Messung zu einem geringern Variationskoeffizienten führt. Diese Erwartung wurde nicht vollumfänglich erfüllt. Bei Verwendung der Kramerschen Scherzelle war der Variationskoeffizient jedoch am geringsten, so dass dieser Messvorsatz in weitere Versuche einbezogen wurde. Bezüglich der Praktikabilität ist der Druckstempel (98 mm) ohne Messdose die einfachste Messvariante bei zugleich geringem benötigtem Probenvolumen. Daher wurde auch dieser Messvorsatz für weitere Untersuchungen verwendet.

**Tab. 5.1: Verwendete Messvorsätze mit Probenvolumina und ermittelten Variationskoeffizienten (n=10)**

Messvorsatz	Variationskoeffizient	Probenvolumen
Kramersche Scherzelle (6,5 x 6,5 x 6,5 cm)	9,46	Zwei Filets (150-200 g)
Warner-Bratzler-Scherblatt	22,58	Ein Muskelbauch (20-40 g)
Druckstempel (98 mm) ohne zylindrischen Probenbehälter	19,04	Ein Muskelbauch (20-40 g)
Druckstempel (98 mm) mit zylindrischem Probenbehälter	15,05	Vier Filets (300-350 g)
Druckstempel (35 mm) mit zylindrischem Probenbehälter	19,18	Zwei Muskelbäuche (50-60 g)

Im Weiteren wurde überprüft, ob die Messmethoden in der Lage sind, einen Unterschied zwischen Transglutaminase-behandeltem und -unbehandeltem Fisch aufzuzeigen. Dabei konnte festgestellt werden, dass mit der Kramerschen Scherzelle kein Unterschied zwischen Transglutaminase-behandeltem und -unbehandeltem Fisch zu ermitteln war. Die Messergebnisse waren nahezu identisch. Die Druckstempelme-

thode konnte die spezifischen Unterschiede in der Kompressionskraft widerspiegeln. Dieses Ergebnis sowie die Praktikabilität und der geringe Rohstoffverbrauch führten dazu, dass die Druckstempelmethode ohne Probenbehälter in allen folgenden Versuchen angewandt wurde.

#### 5.4 Zusammenfassung und Diskussion

⇒ Aufgrund der guten Praktikabilität (einfache Probenvorbereitung, einfache Durchführung des Messvorganges), des geringen Rohstoffverbrauches sowie der Möglichkeit, Texturveränderungen durch Transglutaminase festzustellen, wurde in weiteren Versuchen die Texturanalytik als Kraft-Weg-Messung wie folgt durchgeführt:

- Verwendung eines Druckstempels mit einem Durchmesser von 98 mm ohne Probenbehälter
- Verwendung eines ausgelösten Muskelbauches (20-40 g) pro Messung

Die übrigen Parameter (Querhauptgeschwindigkeit von 200 mm min<sup>-1</sup>; Kraftmessdose von 100 N; Probentemperatur von 15 °C) wurden wie unter Material und Methoden (5.2.2) beibehalten.

Die instrumentelle Texturanalyse des Schwarzen Heilbutts bestätigte die Aussage von Coppes et al. (2002), dass es sich bei Fischmuskulatur um eine schwierig zu analysierende Matrix handelt. Dies drückte sich in den relativ hohen Variationskoeffizienten jeder einzelnen Messmethode aus. Die Untersuchungen bestätigten ebenfalls die Aussage von Tülsner (1994), dass selbst innerhalb eines Individuums texturale Unterschiede in Abhängigkeit von der Probenahmestelle bestehen. Während beim Schwarzen Heilbutt die Unterschiede zwischen rechtem und linkem Filet zu vernachlässigen waren, bestanden große Unterschiede zwischen den Bereichen um die Mittelgräte und den äußeren Bereichen entlang der Seitenflossen. Die Bereiche entlang der Seitenflossen wiesen einen deutlich höheren Fettgehalt auf. Der höhere Fettgehalt führte zu einer weicheren Textur.

In umfangreichen Untersuchungen von Werlein (1997) an gegartem Schweinefleisch mittels Warner-Bratzler-Scherblatt lag der Variationskoeffizient der meisten Ver-

suchsreihen im Bereich von 10. In den eigenen Untersuchungen mittels Warner-Bratzler-Scherblatt wurde ein Variationskoeffizient von 22,58 ermittelt. Obwohl das Warner-Bratzler-Scherblatt von mehreren Autoren mit Erfolg zur textuellen Analyse von Fisch eingesetzt wurde (Gadd und Buttkus, 1964; Bailey, 1972; Buck et al., 1986; Sigurgisladottir et al., 2000), gibt Dunajski (1979) zu bedenken, dass die Ausrichtung der Fischfasern zum Scherblatt schwierig sei. Diese Schwierigkeit machte sich auch in der eigenen Untersuchung bemerkbar mit dem Ergebnis eines hohen Variationskoeffizienten. Das Warner-Bratzler-Scherblatt wurde folglich für weitere Analysen des Schwarzen Heilbutts nicht mehr eingesetzt.

Die Kramersche Scherzelle zeigte im Vergleich zu den anderen verwendeten Messvorsätzen den geringsten Variationskoeffizient von 9,46. Viele Autoren setzten die Kramersche Scherzelle zur Analyse gegarter Fischproben ein (Botta, 1995; Coppes et al., 2002); Dunajski (1979) hielt sie für Fischproben für den besten Messvorsatz. Chamberlain et al. (1993) hingegen hielten sie für weiche Fischproben für ungeeignet. Zudem führten sie als Nachteil ein großes benötigtes Probenvolumen an. Bei vollständiger Befüllung mit dem Ziel, Rohstoffschwankungen auszugleichen, wie es in der eigenen Untersuchung durchgeführt wurde, ist das Probenvolumen mit zwei Filets pro Messung tatsächlich relativ hoch im Vergleich zur Verwendung von ein bis zwei Muskelbäuchen mit anderen Messvorsätzen. Nachteilig ist ebenfalls, dass Reinigung und Trocknung der Kramerschen Scherzelle nach jeder Messung relativ aufwendig sind. Weiterhin wird die Tatsache als nachteilig erachtet, dass die Fischstücke auf die Größe der Kramerschen Scherzelle zurecht geschnitten werden müssen, um eine gleichmäßige Befüllung zu gewährleisten. Dies erhöht zum einen den Arbeitsaufwand, zum anderen beeinflusst das Zerschneiden das Messergebnis des Heilbutts, da selbst ein sehr scharfes Messer immer auch einige Muskelsegmente zerdrückte. Zum Ausschluss der Kramerschen Scherzelle führte jedoch die Tatsache, dass mit diesem Messvorsatz der Unterschied zwischen Transglutaminase-behandelten und -unbehandelten Heilbutt-Carbonaden nicht festgestellt werden konnte.

Die Variationskoeffizienten der Messvorsätze Druckstempel (98 mm) ohne zylindrischen Probenbehälter und Druckstempel (35 mm) mit zylindrischem Probenbehälter

waren vergleichbar hoch. Auch der Variationskoeffizient des Messvorsatzes Druckstempel (98 mm) mit zylindrischem Probenbehälter bewegte sich in gleicher Größenordnung. Bei den Messvorsätzen mit zylindrischem Probenbehälter erwies es sich als schwierig, den Probenbehälter gleichmäßig auszufüllen ohne größere Lücken entstehen zu lassen. Problematisch beim kleineren Druckstempel (35 mm) war, wie bereits von Schubring (1999) erwähnt, dass die Probenstücke aufgrund der geringen Größe des Druckstempels zusätzlich geschert wurden. Daher wurde dieser Druckstempel (35 mm) auch nicht ohne Probenbehälter, der das Scheren zumindest teilweise verhinderte, verwendet. Auch aufgrund des geringen Probenvolumens wurde der Druckstempel (98 mm) ohne Probenbehälter den Druckstempeln mit Probenbehälter vorgezogen. Bezüglich der Praktikabilität ist der Druckstempel (98 mm) ohne Probenbehälter die einfachste Messvariante. Die Muskelbäuche sind einfach aus dem Fischfilet herauszulösen, zudem ist der Druckstempel ohne Probenbehälter nach jeder Messung problemlos zu reinigen, ohne ihn vom Kraftaufnehmer abschrauben zu müssen. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass ein höheres Probenvolumen nicht automatisch die texturellen Schwankungen zwischen den Probenstücken im Messergebnis ausgleicht. Es zeigte sich jedoch, dass die beiden Messvarianten mit den größten Probenvolumina (Kramersche Scherzelle, Druckstempel (98 mm) mit Probenbehälter) die geringsten Variationskoeffizienten aufwiesen. Auch Dunajski (1979) empfiehlt grundsätzlich ein großes Probenvolumen pro Messung. Durch ein erhöhtes Probenvolumen kann jedoch bei gleichem Materialeinsatz nur eine geringere Anzahl an Messungen durchgeführt werden. Eine erhöhte Anzahl an Messungen ist angesichts der insgesamt hohen Variationskoeffizienten von Vorteil. Da auch ein großes Probenvolumen zu relativ hohen Variationskoeffizienten führte, kann statistische Sicherheit nur über eine hohe Anzahl von Messungen erzielt werden. Dies bestätigen insbesondere die Pilotversuche in Kapitel 6.

Zum weiteren Einsatz kam der große Druckstempel (98 mm) auch deshalb, weil mit ihm Unterschiede zwischen Transglutaminase-behandelten und –unbehandelten Heilbutt-Carbonaden zu ermitteln waren. Botta (1995) zufolge ist der Druckstempel, genauso wie die Kramersche Scherzelle, ein häufig verwendeter Messvorsatz zur

instrumentellen Texturanalyse von Fischproben, der sich auch in den eigenen Untersuchungen bewährte.

In der Literatur werden verschiedene Messgeschwindigkeiten zur Komprimierung von Fischproben als geeignet angegeben (Schubring, 2000; Hatae et al., 1984; Shama und Sherman, 1973). In der eigenen Untersuchung wurde nur eine Messgeschwindigkeit von  $200 \text{ mm min}^{-1}$  verwendet. Auch Werlein (1997) verwendete die Messgeschwindigkeit von  $200 \text{ mm min}^{-1}$  mit gutem Erfolg zur Texturanalyse verschiedener Lebensmittel. Eine vergleichbare Geschwindigkeit erachteten Shama und Sherman (1973) ebenfalls als geeignet. In zahlreichen unveröffentlichten Vorversuchen am Institut für Lebensmittelwissenschaft der Universität Hannover war die Messgeschwindigkeit von  $200 \text{ mm min}^{-1}$  für die Texturanalyse von Fischproben als geeignet erachtet worden und wurde daher für weitere Untersuchungen beibehalten.

Der Stauchungsgrad wurde nach dem von Schubring (1999) als wichtig erachteten Aspekt, der Probe einen signifikanten Strukturzusammenbruch zuzufügen, gewählt. Dieses war bei einem Stauchungsgrad von 70 % der Fall. Da zudem auch sensorische Analysen mittels humanem Prüfpanel durchgeführt wurden (nicht Bestandteil dieser Arbeit), wurde der Stauchungsgrad von 70 % gewählt, weil die erforderliche Kraft zum Komprimieren der Probe um 70 % laut Schubring (1999) mit der sensorisch bestimmten Festigkeit der Proben korrelierte.

## 5.5 Material und Methoden

### 5.5.1 Einlegedauer in Transglutaminase-Lösung / Zeitpunkt des Salzens

Die Ergebnisse in Kapitel 4 lassen vermuten, dass das Salzen – sofern es nicht mit der Transglutaminase-Behandlung gleichzeitig durchgeführt werden kann, weil längere Einwirkzeiten der Transglutaminase-Lösung erforderlich sind – vorzugsweise vor der Transglutaminase-Behandlung stattfinden sollte. Die Dauer des Einlegens der Fischstücke in Transglutaminase-Lösung sowie der Zeitpunkt des Salzens sind nicht immer voneinander getrennt ermittelbar. Werden beispielsweise die Heilbutt-Carbonaden für mehrere Stunden in Transglutaminase-Lösung eingelegt, so kann nicht auch gleichzeitig Natriumchlorid in 15%-iger (w/v) Konzentration in die Lake gegeben werden, da die Fischstücke durch die lange Einlegedauer versalzen würden. Soll die Dauer des Einlegens in Transglutaminase-Lösung daher auf über 60 Minuten hinausgehend ausgedehnt werden, so muss das Salzen der Fischstücke entweder vor oder nach der Transglutaminase-Behandlung stattfinden.

Folgende Versuche sollten die Relevanz des Zeitpunktes des Salzens sowie die optimale Einwirkdauer der Transglutaminase-Lösung ermitteln:

Aufgetaute Heilbutt-Carbonaden wurden unten genannter Natriumchlorid- und Transglutaminase-Behandlung unterzogen:

- Salzen vor TG: Einlegen der Fischstücke für 60 Minuten in 15%-ige (w/v) NaCl-Lösung (entspricht der industriellen Salzbehandlung), danach Einlegen der Fischstücke in 0,5%-ige (w/v) Transglutaminase-Lösung ( $315 \text{ IE l}^{-1}$ , ausgehend von einer Aktivität der Transglutaminase in reinem Trinkwasser von  $63 \text{ IE g}^{-1}$ ) für > 12 Stunden.
- Salzen nach TG: Einlegen der Fischstücke in 0,5%-ige (w/v) Transglutaminase-Lösung ( $315 \text{ IE l}^{-1}$ ) für > 12 Stunden, danach Einlegen in 15%-ige (w/v) NaCl-Lösung für 60 Minuten.
- Standard: Einlegen der Fischstücke in 15%-ige (w/v) NaCl-Lösung für 60 Minuten.

Der Versuch wurde in gleicher Weise zweimal durchgeführt.

In einem weiteren Versuch wurden folgende Behandlungen der Heilbutt-Carbonaden durchgeführt:

- Salzen vor TG: s.o.
- Salzen zusammen mit TG: Fischstücke für 60 Minuten in Lake mit 15 % (w/v) NaCl und 0,5 % (w/v) Transglutaminase (350 IE l<sup>-1</sup>, ausgehend von einer Aktivität der Transglutaminase in 15%-iger NaCl-Lösung von 70 IE g<sup>-1</sup>) einlegen.
- Standard: s. o.

Die Lösungen zum Einlegen der Fischstücke wurden aus Leitungswasser mit dem Zusatz von Transglutaminase (Activa WM, Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg) und/oder Natriumchlorid hergestellt. Beide Bestandteile wurden mit dem Schneebesen bis zur vollständigen Lösung eingerührt. Nach dem Einlegen der Fischstücke wurden die Lake-Behältnisse mit Deckeln verschlossen. Die Fischstücke waren komplett mit Lake bedeckt. Hierfür war, ausgehend vom Fischgewicht, die 1,5-fache Menge an Lake erforderlich. Die Laketemperatur betrug 10-15 °C.

Im Anschluss an die Transglutaminase-Salz-Behandlung wurden die Carbonaden gespittet, und es fand das Abtrocknen der Oberfläche für 5 Stunden bei 5 °C in hängendem Zustand im Kühlschrank statt. Der Garprozess wurde im Konvektionsdämpfer (Combi-Dämpfer CC 101, Rational Großküchentechnik GmbH, Landsberg am Lech) im Wärmeübertragungsmedium Luft simuliert. Die Anströmgeschwindigkeit betrug 2-6 m s<sup>-1</sup>. Zunächst wurden die Carbonaden für 1 Stunde einer Temperatur von 40 °C ausgesetzt; dann wurden sie innerhalb von 2 Stunden bei einer Arbeitstemperatur von 70 °C auf eine Kerntemperatur von 65 °C erhitzt. Diese Temperatur-Zeit-Bedingungen wurden eingehalten, da sie maßgeblich die Vernetzungsreaktion der Transglutaminase beeinflussen können. Bei 40 °C weist die Transglutaminase eine hohe Aktivität auf, so dass diese Temperaturbedingung in jedem Fall auch während der Simulation erreicht werden sollte. Nach dem Garprozess wurden die Carbonaden im Schockkühler (Foster BC 35, Geschäftsbereich der Hobart GmbH, Wuppertal) bei einer Arbeitstemperatur von 0 °C auf eine Kerntemperatur von 15 °C mittels Luftkonvektion abgekühlt. Alle Bearbeitungsschritte einschließlich der Temperaturführung während des Garens simulieren den industriellen Produktionsprozess.

### 5.5.2 Ermittlung der optimalen Transglutaminase-Konzentration in Verbindung mit der optimalen Applikationsmethode

Aufgetaute Heilbutt-Carbonaden (4-5 °C) wurden mittels zweier unterschiedlicher Methoden mit Transglutaminase (Activa WM, Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg) behandelt. Ziel beider Methoden war es, die Transglutaminase-Behandlung optimal in den industriellen Produktionsprozess zu integrieren:

- Lakebehandlung: Die aufgetauten Carbonaden wurden für 60 Minuten in eine Lake aus 15 % (w/v) Natriumchlorid und Transglutaminase in unterschiedlichen Konzentrationen (0,15; 0,3; 0,5; 1,0 und 1,5 % (w/v)) eingelegt. Pro kg Fisch wurden 1,5 Liter Lake verwendet.
- Injektionsbehandlung: Pro Carbonade wurden 10 ml einer Lösung (etwa 50 ml kg<sup>-1</sup> Fisch) aus 15 % (w/v) Natriumchlorid und Transglutaminase in unterschiedlichen Konzentrationen (0,15; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 und 5,0 % (w/v)) von Hand mittels Einwegspritze injiziert. Die Lösungsmenge wurde auf 20 Einstichstellen mit je 0,5 ml verteilt.

Parallel zu den beiden Behandlungsverfahren wurde ein Standard ohne Transglutaminase verarbeitet. Hierfür wurde der Fisch in 15%-ige (w/v) Natriumchloridlake ohne Zusatz von Transglutaminase für 60 Minuten eingelegt. Die Temperatur des Lakebades betrug jeweils 10-15 °C.

Bei einer durchschnittlichen Aktivität der Transglutaminase Activa WM von 70 IE pro Gramm in 15%-iger Natriumchloridlake und einem durchschnittlichen Proteingehalt des Schwarzen Heilbutts von 19 % ist hier von folgenden Enzymeinheiten pro Gramm eingesetztem Fischprotein bzw. pro Liter auszugehen:

**Tab. 5.2: Eingesetzte Enzymeinheiten**

TG-Behandlungsverfahren und -Konzentration	Internationale Enzymeinheiten (IE) pro Liter Lake/Injektionslösung <sup>1</sup>	Internationale Enzymeinheiten (IE) pro Gramm Fischprotein <sup>2</sup>
Lake 0,15 %*	105	0,8
Lake 0,3 %*	210	1,7
Lake 0,5 %*	350	2,8
Lake 1,0 %*	700	5,5
Lake 1,5 %*	1050	8,3
Injektion 0,15 %**	105	0,03
Injektion 0,3 %**	210	0,06
Injektion 0,5 %**	350	0,09
Injektion 1,0 %**	700	0,2
Injektion 1,5 %**	1050	0,3
Injektion 2,0 %**	1400	0,4
Injektion 3,0 %**	2100	0,6
Injektion 4,0 %**	2800	0,7
Injektion 5,0 %**	3500	0,9

\* Bei der Lakebehandlung werden pro 1 kg Fisch 1,5 l Lake verwendet.

\*\* Bei der Injektionsbehandlung werden pro 1 kg Fisch etwa 50 ml Lake verwendet.

<sup>1</sup> ausgehend von einer durchschnittlichen Aktivität der TG in 15%-iger NaCl-Lösung von 70 IE g<sup>-1</sup>

<sup>2</sup> bezogen auf eine durchschnittliche Proteinmenge von 19 %

Abhängen und Garprozess wurden wie unter 5.5.1 beschrieben durchgeführt.

Bei der Injektionsbehandlung wurde nicht über die Enzym-Hersteller-Empfehlung (1 IE g<sup>-1</sup> Protein) hinaus Transglutaminase appliziert, da Einstichabstände in den Carbonaden unterhalb eines Zentimeters gewählt wurden. Eine Diffusion des Enzyms innerhalb des Fisches sollte somit sichergestellt und gegenüber der Lakebehandlung vereinfacht werden. Die Auswahl der geeigneten Konzentration ist verfahrensabhängig.

### 5.5.3 Ermittlung optimaler Temperatur-Zeit-Bedingungen der Transglutaminase-Behandlung

Folgende Parameter wurden mit dem Ziel einer optimalen Vernetzung durch Transglutaminase modifiziert:

- Temperatur-Zeit-Bedingungen des Abtrocknens der Oberfläche (5 °C / 5 Stunden; 20 °C / 5 Stunden; 40 °C / 5 Stunden; 5 °C / 8 Stunden; 5 °C / > 12 Stunden)
- Temperatur-Bedingungen des Einlegens in Transglutaminase-Lösung (60 Minuten bei 10-15 °C; 60 Minuten bei 20 °C; 60 Minuten bei 30 °C)

Die Heilbutt-Carbonaden wurden wie unter 5.5.1 beschrieben verarbeitet. Neben dem Einlegen der Heilbutt-Carbonaden in ein Lakebad bei der Temperatur von 10-15 °C wurden weitere Einlegtemperaturen von 20 °C und 30 °C überprüft. Neben dem Abtrocknen der Oberfläche bei 5 °C für 5 Stunden wurde die Temperatur auf 20 °C bzw. 40 °C erhöht. Die Zeit wurde von 5 Stunden auf 8 Stunden und > 12 Stunden ausgedehnt. Für die Untersuchung der Abtrocknungsbedingungen wurden sowohl das Injektionsverfahren als auch die Lakebehandlung verwendet. Für die Lakebehandlung wurde eine Transglutaminase-Konzentration von 0,5 % (w/v) und für das Injektionsverfahren von 0,15 % (w/v) gewählt. Beide Konzentrationen hatten im Versuch zuvor zu einer mittleren Texturverfestigung geführt. Parallel zu jeder Versuchsreihe wurde ein Standard ohne Transglutaminase textuell untersucht. Vergleichend wurden die Gewichtsverluste nach dem Abhängen und Garen von allen Versuchsreihen ermittelt.

#### 5.5.4 Texturanalyse

Die Texturanalyse wurde wie unter 5.4 zusammengefasst durchgeführt. Die Festigkeit der Muskelbäuche wurde ausgedrückt als Kompressionskraft pro Gewicht ( $\text{N g}^{-1}$ ), die erforderlich ist, um die Muskelbäuche um 70 % zu stauchen.

#### 5.5.5 Statistische Auswertung

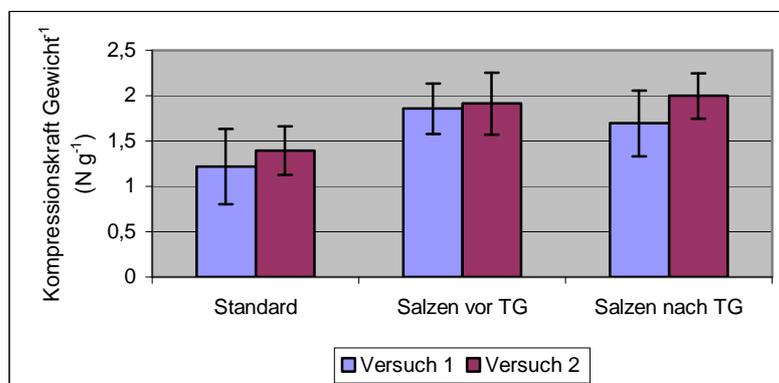
Aus den Daten der Untersuchungen wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Zur Überprüfung der Signifikanz des Unterschiedes zweier Messreihen wurde der t-Test angewandt. Als signifikant unterschiedlich wurden die Mittelwerte zweier Messreihen dann bezeichnet, wenn  $p \leq 0,10$  war. In der graphischen Darstellung der Texturergebnisse stellen die Fehlerbalken die

Standardabweichung dar. Die Zahlenwerte zu den einzelnen Abbildungen mit Standardabweichungen befinden sich tabellarisch im Anhang.

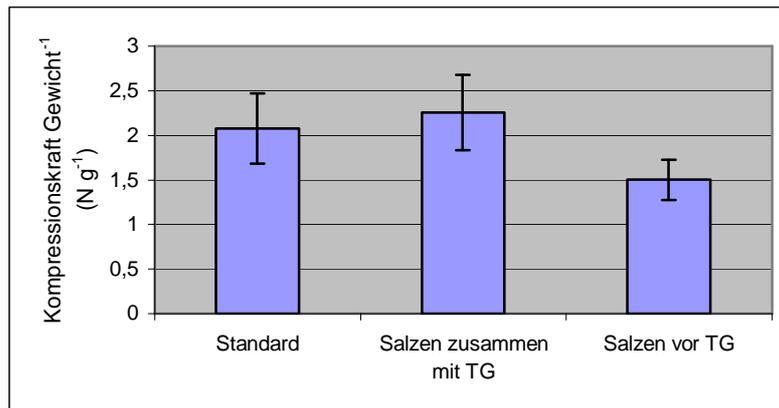
## 5.6 Ergebnisse

### 5.6.1 Einlegedauer in Transglutaminase-Lösung / Zeitpunkt des Salzens

In den ersten beiden Versuchsdurchführungen konnte festgestellt werden, dass die Transglutaminase-Behandlung zu einer signifikanten Verfestigung des Heilbutts im Vergleich zum Standard führte, und zwar unabhängig davon, wann die Salzbehandlung durchgeführt wurde (Abb. 5.3). Die Festigkeiten der Heilbuttstücke unterschieden sich nicht signifikant voneinander, wenn das Salzen vor oder nach der Transglutaminase-Behandlung stattfand. Allerdings konnte in der ersten Versuchsdurchführung eine im Mittel tendenziell festere Textur der gegarten Heilbutt-Carbonaden festgestellt werden, wenn das Salzen vor der Transglutaminase-Behandlung durchgeführt wurde. Dieses Ergebnis konnte in der Versuchswiederholung nicht bestätigt werden. In diesem Versuch wiesen die Fischstücke, die nach der Transglutaminase-Behandlung gesalzen wurden, die tendenziell festere Textur auf.



**Abb. 5.3:** Einfluss des Zeitpunktes des Salzens auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; TG=0,5 % (2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein); NaCl=15 %)



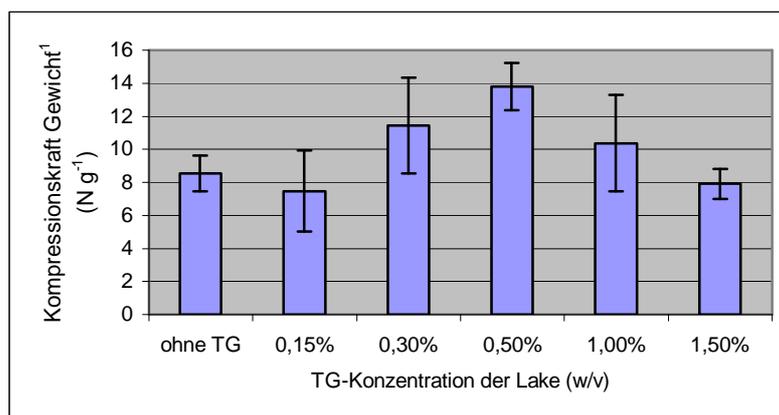
**Abb. 5.4: Einfluss verschiedener Transglutaminase-Behandlungen auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; TG=0,5 % (2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein); NaCl=15 %)**

Während in zwei Untersuchungen die Versuchsreihe „Salzen vor TG“ jeweils zu einer signifikanten Verfestigung der Textur im Vergleich zum Standard ohne Transglutaminase geführt hatte, zeigte sich in einem weiteren Versuch (Abb. 5.4) eine signifikante Texturerweichung. Dies zeigte, dass das Einlegen der Fischstücke in Transglutaminase-Lösung für > 12 Stunden nicht in jedem Fall eine positive Auswirkung auf die Festigkeit der gegarten Heilbutt-Carbonaden hat. In dieser Versuchsdurchführung zeigte sich ebenfalls, dass auch kurze Transglutaminase-Einwirkzeiten zu einer Texturverfestigung führten und dass die Kombination von NaCl und Transglutaminase in einer Lake einen tendenziell positiven Effekt ausübt (Abb. 5.4). Dieses Ergebnis führte dazu, dass in folgenden Versuchen die Kurzeit-einwirkung der Transglutaminase in Kombination mit Salz für 60 min weiter untersucht wurde, da sich diese Durchführung am besten in den industriellen Herstellungsprozess integrieren ließe.

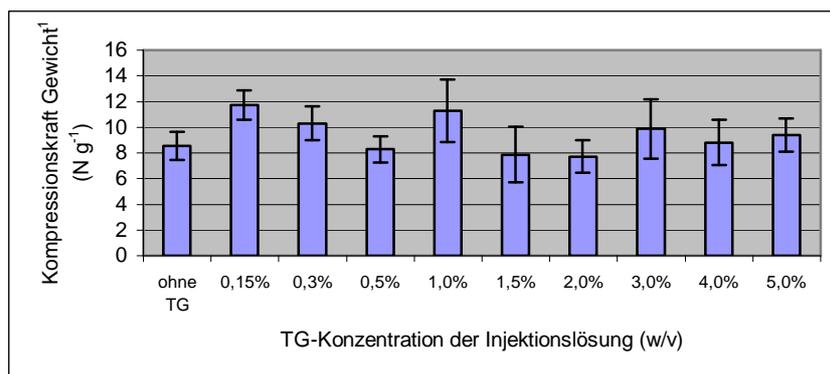
#### 5.6.2 Ermittlung der optimalen Transglutaminase-Konzentration in Verbindung mit der optimalen Applikationsmethode

Wie bereits in Kapitel 2 (Fischfarceherstellung) ermittelt, zeigte sich auch bei der Lakebehandlung tendenziell eine Texturverfestigung der Heilbutt-Carbonaden proportional zur eingesetzten Transglutaminase-Konzentration (Abb. 5.5). Die Lake mit einer Transglutaminase-Konzentration von 0,15 % (w/v) führte zu keiner signifi-

kanten Veränderung der Festigkeit der Heilbutt-Carbonaden. Eine signifikante Verfestigung im Vergleich zur Probe ohne Transglutaminase konnte erst ab einer Transglutaminase-Konzentration von 0,3 % (w/v) ermittelt werden (Tab. 5.3). Durch eine Konzentrationserhöhung auf 0,5 % (w/v) Transglutaminase in der Lake konnte die Festigkeit nochmals signifikant ( $p \leq 0,05$ ) gegenüber der Probe mit 0,3 % (w/v) Transglutaminase gesteigert werden. Hier war die stärkste Kompressionskraft erforderlich, um die Muskelbäuche um 70 % zu stauchen. Eine mittlere Texturverfestigung um 62,4 % konnte im Vergleich zum Standard erzielt werden. Die Festigkeit der Heilbutt-Carbonaden war im Mittel wieder abnehmend bei einer weiteren Erhöhung der Transglutaminase-Konzentration. Die höchste getestete Konzentration von 1,5 % (w/v) Transglutaminase in der Lake führte zu keiner signifikanten Veränderung der Textur gegenüber der Probe ohne Transglutaminase.



**Abb. 5.5: Einfluss verschiedener Transglutaminase-Konzentrationen auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) lakebehandelter, gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; Lakebehandlung=60 min, 10-15 °C)**



**Abb. 5.6: Einfluss verschiedener injizierter Transglutaminase-Konzentrationen auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; injizierte TG-Lösung=10-15 °C)**

Eine Texturverfestigung der Heilbutt-Carbonaden proportional zur injizierten Transglutaminase-Konzentration konnte nicht festgestellt werden (Abb. 5.6). Das erste Maximum (37,6 % Verfestigung) war im niedrigsten Konzentrationsbereich bei 0,15 % (w/v) Transglutaminase zu verzeichnen (Tab.5.3). Das zweite Maximum lag bei 1,0 % (w/v) Transglutaminase. Eine weitere Steigerung der Transglutaminase-Konzentration erhöhte die Texturfestigkeit der Heilbutt-Carbonaden nicht. Darüber, welches Behandlungsverfahren mit welcher Transglutaminase-Konzentration die Textur von Heilbutt-Carbonaden signifikant im Vergleich zum Standard veränderte, informiert die Tabelle 5.3.

**Tab. 5.3: Veränderung der mittleren Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden in Anhängigkeit von Transglutaminase-Behandlungsverfahren und -konzentration (n=10)**

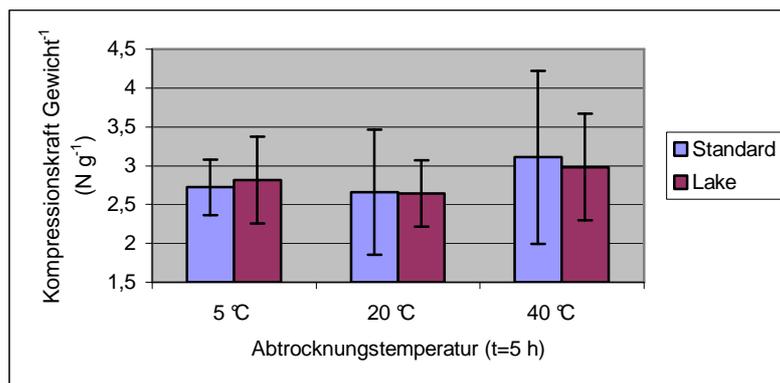
TG-Behandlungsverfahren	Veränderung der Kompressionskraft Gewicht <sup>-1</sup> zum unbehandelten Standard (%)
Lake 0,15 %	-11,8 (nicht signifikant)
Lake 0,3 %	+34,1 (p ≤ 0,01)
Lake 0,5 %	+62,4 (p ≤ 0,001)
Lake 1,0 %	+22,4 (p ≤ 0,10)
Lake 1,5 %	-7,1 (nicht signifikant)
Injektion 0,15 %	+37,6 (p ≤ 0,001)
Injektion 0,3 %	+21,2 (p ≤ 0,01)
Injektion 0,5 %	-2,4 (nicht signifikant)
Injektion 1,0 %	+32,9 (p ≤ 0,01)
Injektion 1,5 %	-7,1 (nicht signifikant)
Injektion 2,0 %	-9,4 (nicht signifikant)
Injektion 3,0 %	+16,5 (p ≤ 0,10)
Injektion 4 %	+3,5 (nicht signifikant)
Injektion 5 %	+10,6 (nicht signifikant)

Vergleicht man die beiden untersuchten Transglutaminase-Applikationsverfahren - Lake und Injektion -, so ist durch die Lakebehandlung im Maximum eine Texturverfestigung von 62,4 % bei Heilbutt-Carbonaden zu erzielen. Durch das Injektionsverfahren ist die Texturfestigkeit um 37,6 % im Maximum zu erhöhen. Bei beiden Verfahren wird die Textur stärker im niedrigen Konzentrationsbereich bis 1,0 % (w/v) Transglutaminase verfestigt.

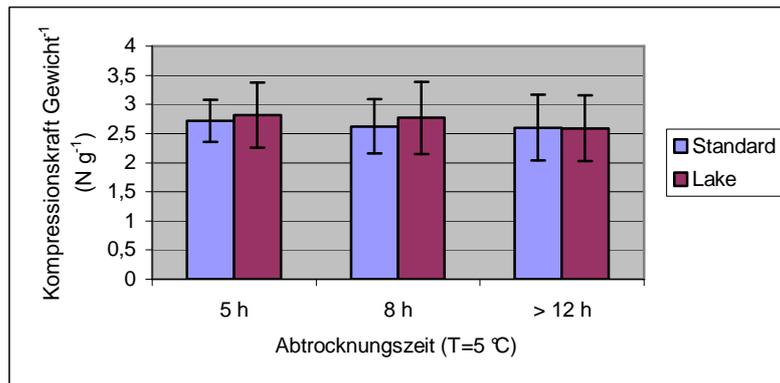
Für die Untersuchung des Transglutaminase-Einsatzes in der industriellen Produktion wurde an dieser Stelle keine endgültige Entscheidung über die einzusetzende Konzentration gefällt. Weitere Versuche mit der Transglutaminase-Applikation „Lake“ wurden mit Transglutaminase-Konzentrationen von 0,3, 0,5 und 1,0 % (w/v) durchgeführt. Beim Injektionsverfahren wurden die Konzentrationen 0,15, 0,5 und 1,0 % (w/v) verwendet.

### 5.6.3 Ermittlung optimaler Temperatur-Zeit-Bedingungen der Transglutaminase-Behandlung

Eine Erhöhung der Abtrocknungstemperatur von 5 °C auf 20 °C (Abb. 5.7) führte nicht zu einer Erhöhung der Texturfestigkeit gegarter Heilbutt-Carbonaden nach Lakebehandlung mit Transglutaminase. Die Erhöhung auf 40 °C führte zwar im Vergleich zu 5 °C zu einer tendenziell stärkeren Verfestigung; diese ging jedoch mit hohen Gewichtsverlusten einher und war nicht direkt auf die verfestigende Wirkung der Transglutaminase zurückzuführen. Bei dieser Temperatur setzen erste Denaturierungsvorgänge der Fischproteine ein. Dies hatte zur Folge, dass neben hohem Wasseraustritt, der eine Verfestigung bewirkt, die Carbonaden zerfielen. Auch aus mikrobiologischer Sicht ist es ungünstig, die Carbonaden bei einer Temperatur von 40 °C abzutrocknen.



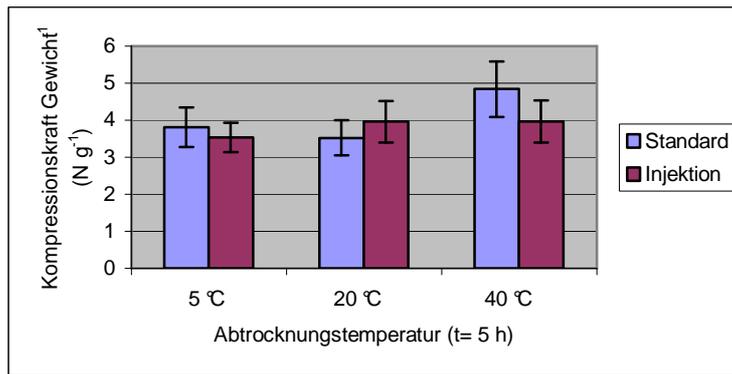
**Abb. 5.7:** Einfluss der Abtrocknungstemperatur auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) lakebehandelter, gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; Lakebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein), 60 min, 10-15 °C)



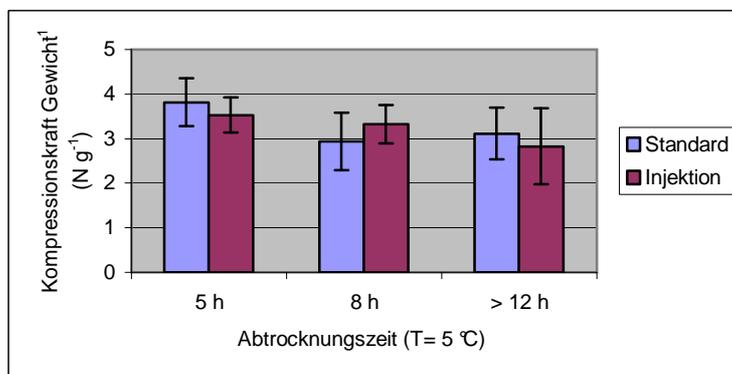
**Abb. 5.8: Einfluss der Abtrocknungszeit auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) lakebehandelter, gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; Lakebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein), 60 min, 10-15 °C)**

Eine Ausdehnung der Abtrocknungszeit von 5 Stunden auf 8 Stunden bzw. > 12 Stunden ergab keine Texturverfestigung im Vergleich zu den Proben, die für 5 Stunden abgetrocknet wurden (Abb. 5.8). Aus unerklärlichen Gründen konnte bei dieser Fischcharge keine Texturverfestigung durch Transglutaminase erzielt werden.

Die Variation von Abtrocknungstemperatur und -zeit führte bei der Injektionsbehandlung der Heilbutt-Carbonaden zu keinem einheitlichen Bild. Bei üblichen Abtrocknungstemperatur-Zeit-Bedingungen von 5 °C für 5 Stunden konnte in dieser Versuchsreihe keine Transglutaminase-induzierte Texturverfestigung festgestellt werden. Eine Erhöhung der Abtrocknungstemperatur auf 20 °C führte zu einer geringfügigen Zunahme der mittleren Texturfestigkeit (Abb. 5.9). Die Erhöhung auf 40 °C führte bereits dazu, dass die hängenden Carbonaden weitgehend zerfielen und auch der Gewichtsverlust nicht mehr ermittelbar war. Zudem wiesen die Proben ohne Transglutaminase eine größere Festigkeit als die Transglutaminase-behandelten Proben auf. Eine Verlängerung der Abhängzeit führte zu keiner weitergehenden Texturverfestigung (Abb. 5.10).



**Abb. 5.9: Einfluss der Abtrocknungstemperatur auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) injektionsbehandelter, gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; Injektionsbehandlung=0,15 % TG (0,03 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein), 10-15 °C)**



**Abb. 5.10: Einfluss der Abtrocknungszeit auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) injektionsbehandelter, gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; Injektionsbehandlung=0,15 % TG (0,03 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein), 10-15 °C)**

Bei Betrachtung der Gewichtsverluste durch den Garprozess (Tab. 5.4) zeigte sich, dass die lakebehandelten Heilbutt-Carbonaden im Vergleich zu ihrem jeweiligen Standard ohne Transglutaminase einen geringeren mittleren Gewichtsverlust aufwiesen. Lediglich bei den Proben, die bei 20 °C abgetrocknet wurden, war dies nicht der Fall. Wurden die Proben mit Hilfe des Injektionsverfahrens behandelt, so war der Gewichtsverlust stets größer als bei den Standardproben ohne Transglutaminase. Beachtet werden muss hier allerdings, dass es sich bei den verwendeten Fischen beim Lake- und beim Injektionsverfahren um zwei verschiedene Fischchargen handelt. Mit dieser Tatsache sind auch die unterschiedlichen Gewichtsverluste der

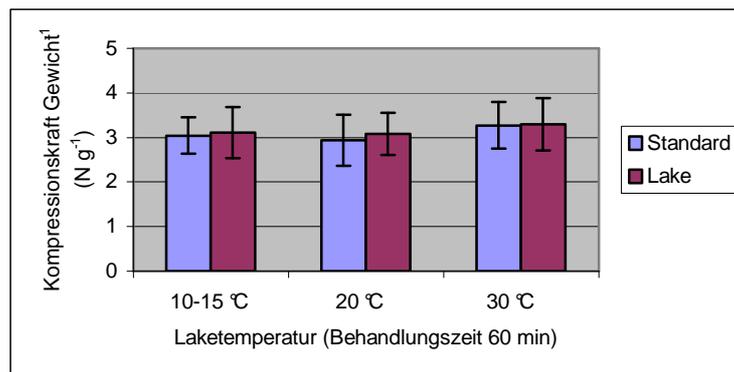
Standardproben der beiden Versuchsreihen zu erklären, die sich in ihrer Verarbeitung nicht voneinander unterscheiden.

**Tab. 5.4: Gewichtsverlust der gegarten Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von Abtrocknungstemperatur und -zeit (n=10; NaCl=15 %; Injektionsbehandlung=0,15 % TG (0,03 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein), 10-15 °C; Lakebehandlung=0,5 % TG ( 2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein), 60 min, 10-15 °C)**

Behandlungsverfahren	Gewichtsverlust (%)
Standard (5 h, 5 °C)	18,5
Lake (5 h, 5 °C)	16,3
Standard (5 h, 20 °C)	16,9
Lake (5 h, 20 °C)	17,8
Standard (5 h, 40 °C)	25,9
Lake (5 h, 40 °C)	24,0
Standard (8 h, 5 °C)	17,7
Lake (8 h, 5 °C)	16,1
Standard (> 12 h, 5 °C)	17,4
Lake (> 12 h, 5 °C)	17,8
Standard (5 h, 5 °C)	13,5
Injektion (5 h, 5 °C)	20,0
Standard (5 h, 20 °C)	15,2
Injektion (5 h, 20 °C)	18,5
Standard (5 h, 40 °C)	nicht ermittelbar
Injektion (5 h, 40 °C)	nicht ermittelbar
Standard (8 h, 5 °C)	15,2
Injektion (8 h, 5 °C)	19,6
Standard (> 12 h, 5 °C)	16,4
Injektion (> 12 h, 5 °C)	16,8

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist es nicht sinnvoll, die Abtrocknungsparameter Temperatur und Zeit zu modifizieren. Eine Abtrocknung bei 5 °C für 5 Stunden kann beibehalten werden. Die injektionsbehandelten Proben ließen bezüglich der Wirkung der Transglutaminase keine Abhängigkeit von den Versuchsvariablen erkennen. Zudem wiesen sie höhere Gewichtsverluste als die lakebehandelten Proben auf, so dass ein Ausschluss des Injektionsverfahrens in Betracht kommen kann.

In der Versuchsreihe zur Überprüfung der Auswirkungen der Laketemperatur wird tendenziell die stärkste Verfestigung der gegarten Heilbutt-Carbonaden durch ein Einlegen in 30 °C temperierte Lake erzielt (Abb. 5.11). Signifikante Unterschiede der Festigkeiten ergaben sich jedoch nicht. Es zeigte sich kein Unterschied zum Standard, so dass die Verfestigung nicht als Transglutaminase-spezifischer Effekt zu interpretieren ist. Insgesamt sind die Auswirkungen der Transglutaminase-Behandlung in dieser Versuchsreihe sehr gering.



**Abb. 5.11: Auswirkung der Laketemperatur auf die Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden (n=10; NaCl=15 %; Lakebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein))**

**Tab. 5.5: Gewichtsverlust der gegarten Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von der Laketemperatur (NaCl=15 %; Lakebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein), 60 min)**

Behandlungsverfahren, Laketemperatur	Gewichtsverlust (%)
Standard, 10-15 °C	16,23
Lake, 10-15 °C	15,07
Standard, 20 °C	16,78
Lake, 20 °C	15,92
Standard, 30 °C	18,09
Lake, 30 °C	15,23

Unabhängig von der Laketemperatur wiesen die Heilbutt-Carbonaden der Standardreihe um 1-3 % höhere Gewichtsverluste als die jeweiligen Stücke der Lakebehandlung mit Transglutaminase auf (Tab. 5.5). Mit steigender Laketemperatur stieg der Gewichtsverlust der Standardreihe. Die Gewichtsverluste der Lakereihe mit Transglutaminase zeigten keine Temperaturabhängigkeit.

Es kann geschlussfolgert werden, dass eine Temperatur von 10-15 °C im Lakebad bei Einhaltung der Garparameter keine negative Auswirkung auf die Vernetzungsreaktion der Transglutaminase ausübt. Eine Erhöhung der Temperatur des Lakebades ist zudem aus mikrobiologischer Sicht nicht empfehlenswert.

## 5.7 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel fand ein Wechsel der Darstellungsweise der textuellen Ergebnisse von maximaler Kompressionskraft in Newton (N), wie in Kapitel 2 und 4, zu Kompressionskraft pro Gewicht (N g<sup>-1</sup>) statt. Dieser Wechsel ist damit zu begründen, dass es sich in Kapitel 2 und 4 um definierte Probenstücke (Fischfarcezyylinder) mit stets gleicher Größe und vergleichbarem Gewicht handelte. Der spezifische Einfluss des Gewichtes der Probenstücke auf das Ergebnis jeder Messung ist daher zu vernachlässigen. In diesem Kapitel wurden zwar auch definierte Probenstücke, nämlich ausgelöste Muskelbäuche verwendet, doch wie aus Tabelle 5.1 ersichtlich, schwankt das Gewicht eines Muskelbauches zwischen 20 und 40 g. Durch die Einbeziehung des jeweiligen Gewichtes in das Ergebnis lassen sich die Schwankungen der Texturanalyse verringern. Auf andere Weise war dieser Einflussfaktor nicht

zu eliminieren. Das Zurechtschneiden der Muskelbäuche oder anderer Teilstücke des Heilbutts auf die gleiche Größe, um damit vergleichbare Gewichte der Probenstücke zu erzielen, erwies sich als nicht praktikabel. Die Textur wurde hierdurch zu stark geschädigt.

Die vorliegenden Ergebnisse können nicht mit Literaturdaten verglichen werden. Die angewandten Verfahren „Lakebehandlung“ und „Injektion“ zur Applikation von Transglutaminase zur Verfestigung ganzer Fischstücke ist innovativ und bisher nicht untersucht. Die vorliegende Literatur beschäftigt sich im wesentlichen mit der Herstellung von Surimi und der Restrukturierung mittels Transglutaminase. Die dort angegebenen Transglutaminase-Konzentrationen und Setting-Parameter konnten für die eigenen Untersuchungen lediglich als Anhaltspunkt dienen. Zwar wurden bezüglich der einzusetzenden Transglutaminase-Konzentration die Ergebnisse von z. B. Sakamoto et al. (1995), Tsai et al. (1996), Ni et al. (1999) und Jiang et al. (2000), die Transglutaminase-Konzentrationen von 0,34-5,00 IE pro g einsetzten, berücksichtigt, zusätzlich wurden jedoch auch höhere und niedrigere Konzentrationen eingesetzt.

Erwartungsgemäß hängt die benötigte Transglutaminase-Konzentration von dem angewandten Applikationsverfahren ab. Beim Injektionsverfahren, bei dem die Transglutaminase direkt in den Fischmuskel eingebracht wird, ist es zu erwarten, dass eine geringere Konzentration erforderlich ist, um die Fischtextur zu verfestigen als bei der Lakebehandlung. Diese Vermutung wurde bestätigt. Durch eine Lakebehandlung mit 0,5%-iger Transglutaminase-Konzentration sowie durch eine Injektionsbehandlung mit 0,15%-iger Transglutaminase-Konzentration konnte jeweils eine signifikante Texturverfestigung um im Mittel 62,4 % bzw. 37,6 % erzielt werden. Andere Konzentrationen führten nicht zu derart starken mittleren Verfestigungen. Auffällig hierbei ist, dass durch das Injektionsverfahren keine Texturverfestigungen in der Stärke erzielt werden konnten, wie durch die Lakebehandlung. Zur weiteren Klärung sollte das Injektionsverfahren auch in den Pilotversuchen angewandt werden.

Ökonomisch betrachtet ist das Injektionsverfahren zur Applikation der Transglutaminase aufgrund des deutlich geringeren Transglutaminase-Verbrauchs pro kg Fisch

der Lakebehandlung vorzuziehen. Jedoch fallen bei der „von Hand“-Injektion sehr hohe Personalkosten und bei der maschinellen Injektion hohe Investitionskosten für Injektionsmaschinen an. Zudem war die Verfestigung durch das Injektionsverfahren nicht so hoch wie bei der Lakebehandlung.

Wie die Versuche zeigten, sind lange Einwirkzeiten > 12 Stunden der Transglutaminase-Lake nicht erforderlich. Eine 60-minütige Lakebehandlung ist ausreichend, um die Textur der Heilbutt-Carbonaden signifikant zu verfestigen.

Das Erhöhen der Temperatur während des Abtrocknens sowie eine Verlängerung der Abtrocknungszeit konnten keine Steigerung der Transglutaminase-Wirkung herbeiführen. Das Injektionsverfahren lieferte vielfach nicht zu erklärende Ergebnisse; es wurden tendenzielle Texturerweichungen genauso wie Texturverfestigungen festgestellt. Obwohl die Transglutaminase durch eine Temperaturerhöhung der Lake bzw. der Umgebung auf 20 °C, 30 °C oder 40 °C näher an ihr Temperaturoptimum heranreicht, konnte dennoch keine höhere Festigkeit der Carbonaden ermittelt werden. Dieses kann zum einen mit der Tatsache erklärt werden, dass nach Motoki und Seguro (1998) mikrobielle Transglutaminase auch bei Temperaturen von 10 °C noch aktiv ist; zum anderen durchlaufen die Carbonaden innerhalb ihres Garprozesses eine für die Transglutaminase wirkaktive Temperatur, so dass das vorherige Temperieren in Form eines Settings nicht erforderlich ist. Die Auswirkungen der Transglutaminase auf die Festigkeit der Heilbutt-Carbonaden waren in dieser Versuchsdurchführung aus im Detail ungeklärten Gründen äußerst gering. Wie bereits in Kapitel 2 ausgeführt, sind diese Rohstoffschwankungen typisch für den Schwarzen Heilbutt und nicht vollständig zu unterbinden.

Für die Pilotversuche in der industriellen Produktion wurden folgende Parameter beibehalten:

- Natriumchlorid und Transglutaminase werden kombiniert in einer Lake appliziert
- Die Einwirkzeit der kombinierten Lake beträgt 60 Minuten
- Transglutaminase-Konzentration für die Lakebehandlung:
  - 0,3 % (1,7 IE g Fischprotein<sup>-1</sup>)
  - 0,5 % (2,8 IE g Fischprotein<sup>-1</sup>)
  - 1,0 % (5,5 IE g Fischprotein<sup>-1</sup>)
- Transglutaminasekonzentration für die Injektionsbehandlung:
  - 0,15 % (0,03 IE g Fischprotein<sup>-1</sup>)
  - 0,5 % (0,09 IE g Fischprotein<sup>-1</sup>)
  - 1,0 % (0,2 IE g Fischprotein<sup>-1</sup>)
- Abtrocknung bei 5 °C für 5 Stunden
- Laketemperatur 10-15 °C

## **6 Durchführung von Pilotversuchen in der industriellen Produktion zur Verarbeitung von Schwarzem Heilbutt unter Einsatz von Transglutaminase**

### **6.1 Einleitung**

Nach Durchführung der Untersuchungen im Technikumsmaßstab schlossen sich zehn Pilotversuche bei der Deutschen See GmbH & Co. KG in Bremerhaven an. Innerhalb der ersten fünf Pilotversuche (I-V) sollte die Übertragbarkeit der Labor- bzw. Technikumsversuche auf die industrielle Produktion in Bezug auf die Versuchsvariablen Applikationsverfahren und Transglutaminase-Konzentration überprüft werden. Die im Technikum erzielten Ergebnisse gaben Hinweise auf beide Fragestellungen, lieferten jedoch noch keine statistisch abgesicherten Daten. Ziel weiterer fünf Pilotversuche (VI-X) war die Überprüfung ökonomischer und ökologischer Aspekte des Transglutaminase-Einsatzes. Dieses wurde anhand einer vergleichenden Stoffstrombilanzierung des Transglutaminase-Behandlungsverfahrens und der konventionellen Verarbeitung des Schwarzen Heilbutts vom Institut für Umweltverfahrenstechnik der Universität Bremen durchgeführt. Es wurde überprüft, ob durch die Rohstoffoptimierung des Schwarzen Heilbutts eine Schonung und bessere Nutzung der natürlichen Nahrungsquelle Fisch ermöglicht werden kann. Weiteres Ziel war die statistische Absicherung der ermittelten Texturverfestigung.

### **6.2 Material und Methoden**

#### **6.2.1 Pilotversuche I-V**

Für jeden Pilotversuch wurden etwa 100 kg Schwarzer Heilbutt - bereits aufgetaut (4 °C) und in Carbonaden zurechtgeschnitten - verwendet. Die Verarbeitung erfolgte analog zum Prozessschema in Abbildung 5.1. Die Transglutaminase wurde kombiniert mit NaCl wie in Kapitel 5 beschrieben, sowohl mittels Lakebehandlung als auch mittels Injektionsverfahren, in den Fisch eingebracht. Folgende Konzentrationen der Transglutaminase wurden verwendet:

- Lake 0,3 % (w/v; 1,7 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein)
- Lake 0,5 % (w/v; 2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein)

- Lake 1,0 % (w/v; 5,5 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein)
- Injektion 0,15 % (w/v; 0,03 IE g<sup>-1</sup>Fischprotein)
- Injektion 0,5 % (w/v; 0,09 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein)
- Injektion 1,0 % (w/v; 0,2 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein)

Parallel dazu wurde ein Standard ohne Transglutaminase hergestellt. Für die Pilotversuche wurden alle Carbonaden auf Metallstäbe gespittet und hängend dem Abtrocknungs- und Garprozess zugeführt. Nach dem Abkühlen auf 5 °C wurden die Carbonaden in Kartonagen unter Schutzgasbeaufschlagung verpackt und per Kühltransport (5 °C) durch die Deutsche See GmbH & Co. KG nach Hannover gebracht. Dort fand die weitere Untersuchung statt.

#### 6.2.2 Pilotversuche VI-X

Die Verarbeitung der Heilbutt-Carbonaden – jeweils 100 kg pro Pilotversuch - erfolgte analog zu den Pilotversuchen I-V. Neben der Standardreihe ohne Transglutaminase wurde als einziges Transglutaminase-Behandlungsverfahren

- Lake 0,5 % (w/v; 2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein)

durchgeführt. Die verarbeiteten Heilbutt-Carbonaden wurden ebenfalls zur weiteren Verarbeitung per Kühltransport nach Hannover geschickt.

#### 6.2.3 Texturanalyse

Die Texturanalyse wurde, wie unter 5.4 beschrieben, 48 Stunden nach dem Garprozess durchgeführt. Die Festigkeit der Muskelbäuche wurde ausgedrückt als Kompressionskraft pro Gewicht (N g<sup>-1</sup>), die erforderlich ist, um die Muskelbäuche um 70 % zu stauchen.

#### 6.2.4 Statistische Auswertung

Aus den Daten der Untersuchungen wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Zur Überprüfung der Signifikanz des Unterschiedes

zweier Messreihen wurde der t-Test angewandt. Als signifikant unterschiedlich wurden die Mittelwerte zweier Messreihen dann bezeichnet, wenn  $p \leq 0,10$  war. In der graphischen Darstellung der Texturergebnisse stellen die Fehlerbalken die Standardabweichung dar. Die Zahlenwerte zu den einzelnen Abbildungen mit Standardabweichungen befinden sich tabellarisch im Anhang.

#### 6.2.5 Stoffstrombilanzierung

Die ökologisch/ökonomische Bewertung des Transglutaminase-Einsatzes in Heilbutt-Carbonaden wurde vom Institut für Umweltverfahrenstechnik (IUV) der Universität Bremen unter der Leitung von Herrn Prof. Rübiger durchgeführt. Zur Bewertung bestehender sowie geplanter Verfahren und Prozesse wurde ein Methodenkonzept entwickelt, das einen ökonomischen und ökologischen Vergleich von Systemen, Prozessen und Prozesslinien ermöglicht. Hierbei wurden umweltrelevante Faktoren, die sowohl ökologische als auch human- und ökotoxikologische Auswirkungen berücksichtigten, umfassend einbezogen. Das entwickelte Methodenkonzept orientiert sich in seiner Vorgehensweise an der Erstellung von Ökobilanzen (DIN EN ISO 14040 ff.) und setzt sich aus folgenden Modulen zusammen:

- Zieldefinition
- Sachbilanz
- Bewertungsmethode
- Schwachstellendefinition und Optimierungsanalyse
- Ökonomische Betrachtung.

Als Datengrundlage dienten die im Rahmen der Fischproduktion bei der Deutschen See GmbH & Co. KG, Bremerhaven, ein- und ausgehenden Stoffströme. Die Auswertung bzw. Abschätzung der produktionsspezifischen Daten bei der Herstellung von gegartem Heilbutt nach dem Standardverfahren und im Vergleich zum Texturverfestigungsverfahren durch Transglutaminase erfolgte anhand von Bilanzdaten der Deutschen See GmbH & Co. KG und der Ergebnisse aus eigenen Laboruntersuchungen. Hierzu wurden Gewichtsverluste an unterschiedlichen Punkten des Produktions- und Transportgeschehens ermittelt: Neben der Ermittlung der Gewichtsverluste während des Garens wurde zum einen überprüft, wie viele

Fischstücke jeder Reihe sich während des Garprozesses von den Metallstäben lösten (gewichtsmäßig sind diese Fischstücke in den Garverlust integriert), und zum anderen wurde überprüft, wie viele Fischstücke durch die mechanische Belastung während des Transportes nach Hannover Schäden aufwiesen.

## **6.3 Ergebnisse**

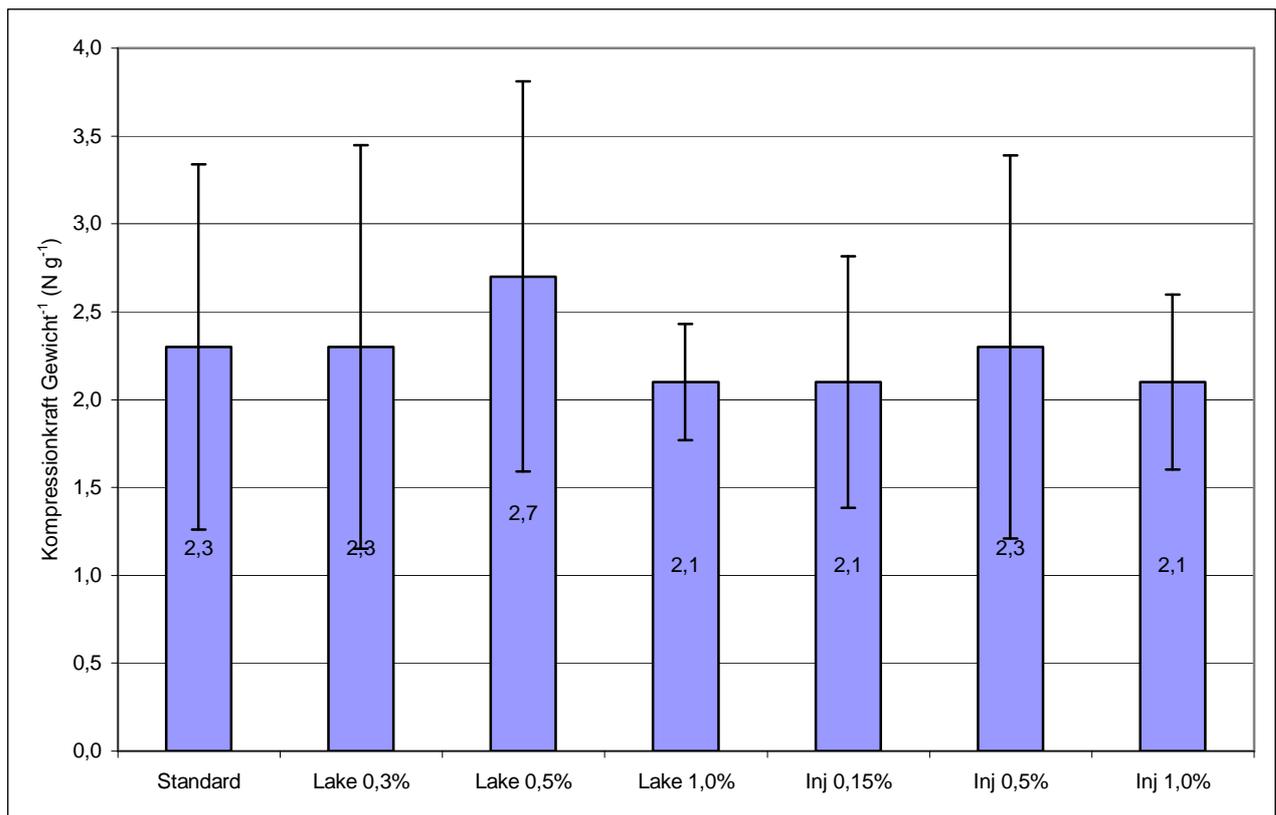
### **6.3.1 Pilotversuche I-V**

Wie aus Abb. 6.1 ersichtlich, wies der mittels Lake und einer Transglutaminase-Konzentration von 0,5 % behandelte Heilbutt im Mittel aller fünf Pilotversuche die stärkste Texturverfestigung (18,7 %) im Vergleich zum Standard auf. In allen fünf Pilotversuchen lieferte diese Behandlung positive Ergebnisse im Sinne einer Texturverfestigung (Tab. 6.1). In vier Pilotversuchen war diese Verfestigung signifikant im Vergleich zum Standard ohne Transglutaminase. Dieses Ergebnis konnte nicht für jede Probenreihe erzielt werden, selbst wenn die mittlere Kompressionskraft aus den fünf Pilotversuchen mit der des Standards vergleichbar war, wie es beispielsweise bei Injektion 0,5 % der Fall war. In zwei Pilotversuchen führte diese Behandlung zu einer signifikanten Texturverfestigung, in zwei anderen Pilotversuchen zu einer signifikanten Texturerweichung (Tab. 6.2).

**Tab. 6.1: Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von Applikationsverfahren und Transglutaminase-Konzentration (Pilotversuche I-V)**

Pilotversuch	Standard	Lake 0,3 %*	Lake 0,5 %*	Lake 1,0 %*	Inj. 0,15 %*	Inj. 0,5 %*	Inj. 1,0 %*
	Kompressionskraft Gewicht <sup>-1</sup> (N g <sup>-1</sup> )						
I	4,1 ± 1,1 (n=112)	4,3 ± 1,4 (n=126)	4,5 ± 1,3 (n=118)	---	3,3 ± 1,1 (n=147)	4,2 ± 1,2 (n=123)	---
II	2,3 ± 0,5 (n=67)	2,3 ± 0,5 (n=95)	3,0 ± 0,6 (n=96)	2,5 ± 0,6 (n=102)	1,4 ± 0,4 (n=95)	1,5 ± 0,4 (n=148)	2,7 ± 0,6 (n=107)
III	1,6 ± 0,4 (n=43)	1,8 ± 0,6 (n=115)	1,8 ± 0,5 (n=51)	2,0 ± 0,6 (n=87)	2,0 ± 0,6 (n=75)	2,1 ± 0,6 (n=103)	2,1 ± 0,7 (n=129)
IV	1,8 ± 0,4 (n= 101)	1,3 ± 0,4 (n=20)	1,9 ± 0,6 (n=77)	1,8 ± 0,7 (n=20)	1,6 ± 0,4 (n=70)	1,5 ± 0,5 (n=122)	1,5 ± 0,4 (n=72)
V	1,7 ± 0,3 (n=150)	2,0 ± 0,5 (n=218)	2,3 ± 0,4 (n=148)	1,9 ± 0,6 (n=123)	2,1 ± 0,5 (n=108)	2,3 ± 0,6 (n= 128)	2,1 ± 0,5 (n=146)
<b>Mittelwert</b>	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>	<b>2,7</b>	<b>2,1</b>	<b>2,1</b>	<b>2,3</b>	<b>2,1</b>

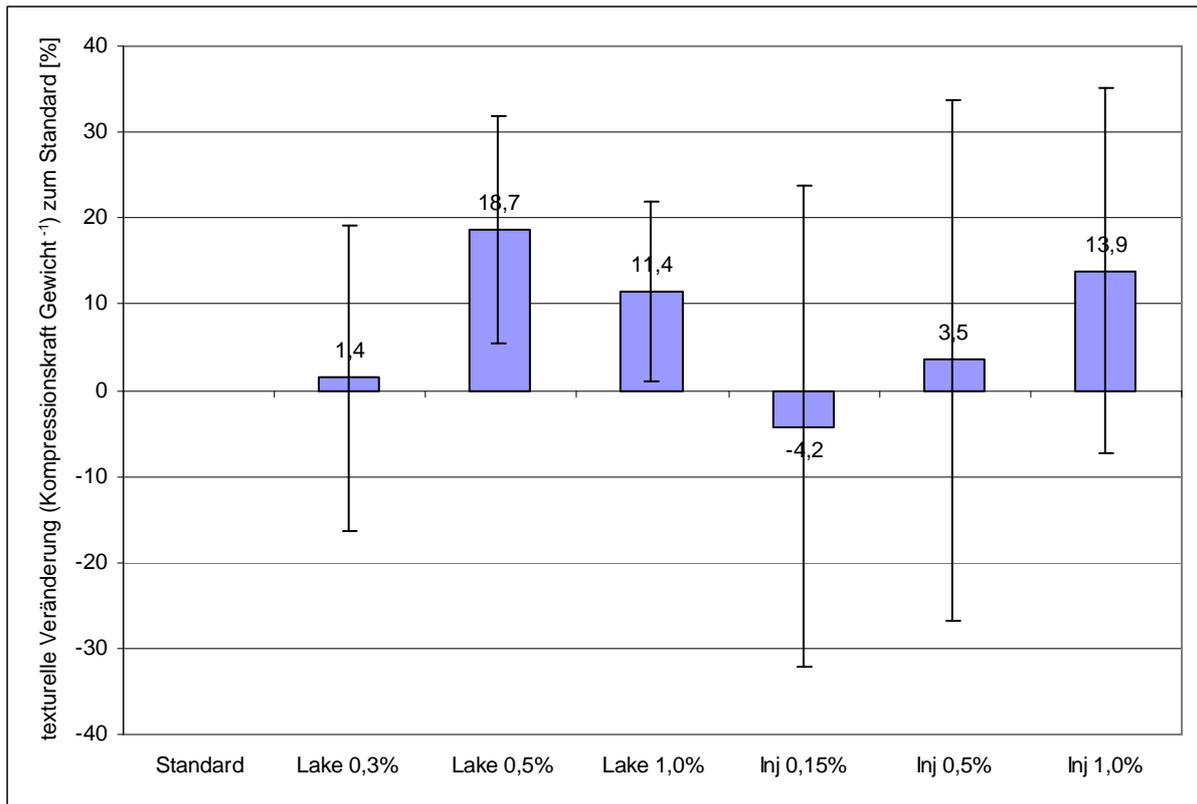
\* IE siehe Kapitel 5, Tab. 5.2



**Abb. 6.1: Mittlere Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) der gegarten Heilbutt-Carbonaden der Pilotversuche I-V in Abhängigkeit von Applikationsverfahren und Transglutaminase-Konzentration (n=5; NaCl=15 %; Lakebehandlung= 60 min, 10-15 °C; Injektionslösung=10-15 °C)**

Bei Abbildung 6.1 muss allerdings berücksichtigt werden, dass im Pilotversuch I die Proben der Lakebehandlung und des Injektionsverfahrens mit einer Transglutaminase-Konzentration von 1,0 % während des Verpackens versehentlich vom Versandpersonal vertauscht wurden. Folglich mussten beide Probenreihen dieses Versuches ausgeschlossen werden. Da dieser Pilotversuch I im Vergleich zu den anderen Pilotversuchen II-V eine vergleichsweise hohe Festigkeit des Fisches aufwies, führte dieser Ausschluss zwangsläufig zu niedrigeren Mittelwerten bei den Probenreihen Injektion und Lake 1,0 %. Hieraus ergibt sich die missverständliche Darstellung der Probenreihe Lake 1,0 % in Abbildung 6.1 im Vergleich zu Abbildung 6.2. Aus Abbildung 6.2 geht richtigerweise hervor, dass die Behandlung der Heilbutt-Carbonaden mit 1,0%-iger Transglutaminase-Lake in keinem Versuch zu einer Erweichung der Textur im Vergleich zum Standard geführt hat. Trotzdem liegt der Mittelwert dieser

Probenreihe aufgrund des Ausschlusses in Abbildung 6.1 unterhalb des Mittelwertes des Standards. Abbildung 6.2 liefert insoweit aussagekräftigere Ergebnisse. Abbildung 6.2 macht deutlich, dass die Fischproben, die mittels Injektionsverfahren behandelt wurden, extreme Schwankungsbreiten aufwiesen. Im Vergleich zum Standard wurden sowohl Texturverfestigungen um bis zu 35 % als auch Erweichungen um bis zu 39 % erzielt. Sensorische Verkostungen ergaben, dass die mittels Injektionsverfahren behandelten Heilbuttstücke einen ungleichmäßigen Salzgehalt und geleegefüllte Einstichkanäle aufwiesen (Grotheer, persönliche Mitteilung, 2004). Die Injektionslösung war also nicht gleichmäßig diffundiert und zudem erschwerten die Geleekanäle die Texturmessung, da sie das Probenstück weich erscheinen ließen und von außen nicht zu sehen waren.



**Abb. 6.2: Prozentuale Veränderung der Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) der mit Transglutaminase behandelten Heilbutt-Carbonaden im Vergleich zum Standard ohne Transglutaminase in Abhängigkeit von Applikationsverfahren und Transglutaminase-Konzentration (n=5; Pilotversuche I-V)**

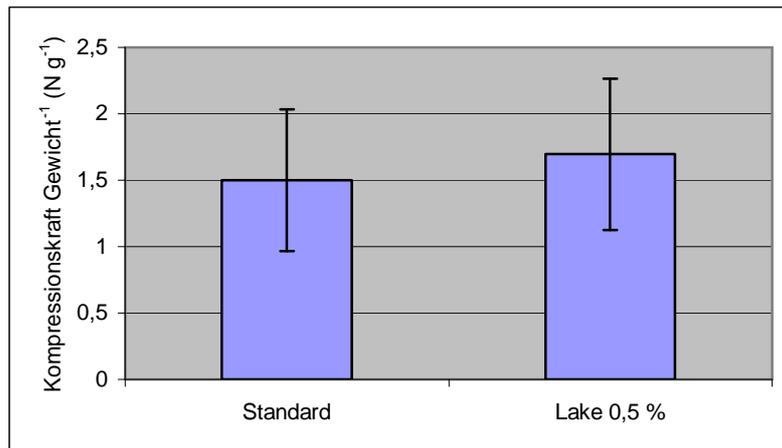
**Tab. 6.2: Prozentuale Veränderung der Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) Transglutaminase-behandelter Heilbutt-Carbonaden zum Standard (Pilotversuche I-V, n siehe Tab. 6.1)**

	Lake 0,3 %*	Lake 0,5 %*	Lake 1,0 %*	Inj. 0,15 %*	Inj. 0,5 %*	Inj. 1,0 %*
Pilotversuch	Veränderung der Kompressionskraft Gewicht <sup>-1</sup> zum Standard (%)					
I	+ 4,9 (n.s.)	+ 9,8 (p ≤ 0,02)	---	- 19,5 (p ≤ 0,001)	+ 2,4 (n.s.)	---
II	0 (n.s.)	+ 30,4 (p ≤ 0,001)	+ 8,7 (p ≤ 0,05)	-39,1 (p ≤ 0,001)	- 34,8 (p ≤ 0,001)	+ 17,4 (p ≤ 0,001)
III	+ 12,5 (p ≤ 0,02)	+ 12,5 (p ≤ 0,05)	+ 25,0 (p ≤ 0,001)	+ 25,0 (p ≤ 0,001)	+ 31,3 (p ≤ 0,001)	+ 31,3 (p ≤ 0,001)
IV	- 27,8 (p ≤ 0,001)	+ 5,6 (n.s.)	0 (n.s.)	- 11,1 (p ≤ 0,01)	- 16,7 (p ≤ 0,001)	- 16,7 (p ≤ 0,001)
V	+ 17,6 (p ≤ 0,001)	+ 35,3 (p ≤ 0,001)	+ 11,8 (p ≤ 0,01)	+ 23,5 (p ≤ 0,001)	+ 35,3 (p ≤ 0,001)	+ 23,5 (p ≤ 0,001)
<b>Mittelwert</b>	<b>+ 1,4</b>	<b>+ 18,7</b>	<b>+ 11,4</b>	<b>- 4,2</b>	<b>+ 3,5</b>	<b>+ 13,9</b>

\* IE siehe Kapitel 5, Tab. 5.2; n.s.=nicht signifikant

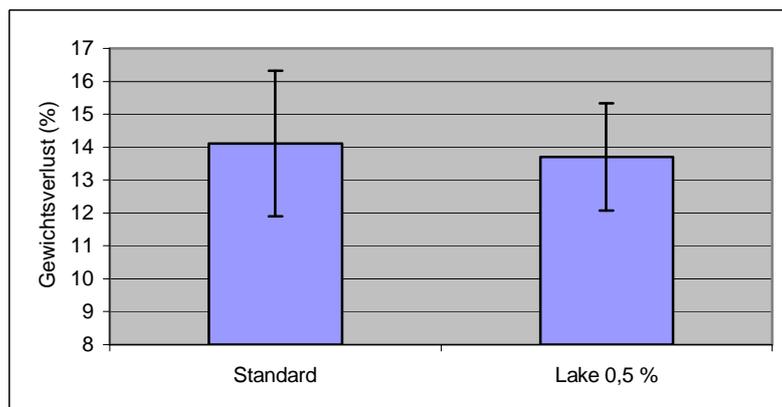
### 6.3.2 Pilotversuche VI-X

Nach Durchführung dieser fünf Pilotversuche konnte festgestellt werden, dass sich die Textur der mit 0,5%-iger Transglutaminase-Lake behandelten Heilbutt-Carbonaden im Mittel um 11,9 % verfestigen ließ (Abb. 6.3). Es konnte in drei der fünf Pilotversuche eine signifikante Texturverfestigung durch die Transglutaminase-Behandlung festgestellt werden (Tab. 6.3).



**Abb. 6.3: Festigkeit (Koppressionskraft pro Gewicht) der gegarten Heilbutt-Carbonaden (Lake 0,5 %) im Vergleich zum Standard der Pilotversuche VI-X (n=5)**

Die Gewichtsverluste während des Garens der mit 0,5%-iger Transglutaminase-Lake behandelten Heilbutt-Carbonaden konnten im Vergleich zu den unbehandelten Carbonaden um 0,4 % gesenkt werden (Abb. 6.4).



**Abb. 6.4: Zusammenfassung der Gewichtsverluste der Heilbutt-Carbonaden, die durch das Garen und Herabfallen entstanden (n=5; Pilotversuche VI-X)**

**Tab. 6.3: Festigkeit der gegarten Heilbutt-Carbonaden (Kompressionskraft pro Gewicht), Veränderung der Festigkeit durch Transglutaminase im Vergleich zum Standard und Gewichtsverluste durch Garen und Herabfallen (Pilotversuche VI-X)**

Pilotversuch	Kompressionskraft Gewicht <sup>-1</sup> (N g <sup>-1</sup> )		Veränderung der Kompressionskraft Gewicht <sup>-1</sup> durch TG (%)	Gewichtsverlust durch Garen und Herabfallen (%)	
	Standard	Lake 0,5 %*		Standard	Lake 0,5 %*
VI	2,1 ± 0,6 (n=256)	2,4 ± 0,5 (n=193)	+ 14,3 (p ≤ 0,001)	14,4	14,7
VII	1,0 ± 0,3 (n=172)	1,0 ± 0,2 (n=164)	0 (n.s.)	17,1	14,1
VIII	1,2 ± 0,3 (n=220)	1,7 ± 0,4 (n=161)	+ 41,7 (p ≤ 0,001)	15,2	15,7
IX	1,2 ± 0,25 (n=171)	1,3 ± 0,3 (n=158)	+ 8,3 (p ≤ 0,01)	12,2	11,8
X	2,1 ± 0,4 (n=104)	2,0 ± 0,4 (n=143)	- 4,8 (p ≤ 0,10)	11,7	12,3
<b>Mittelwert</b>	<b>1,5</b>	<b>1,7</b>	<b>11,9</b>	<b>14,1</b>	<b>13,7</b>

\* 2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein; n.s.=nicht signifikant

### 6.3.3 Stoffstrombilanzierung

Die Auswirkungen der beiden Verarbeitungsverfahren auf die Verluste beim Heilbutt während des gesamten Herstellungsprozesses sind in der Tabelle 6.4 aufgeführt bzw. gegenübergestellt. Pro Jahr werden ca. 400 t roher Heilbutt bei der Deutschen See GmbH & Co. KG, Bremerhaven, verarbeitet.

**Tab. 6.4: Rohstoffverluste bei den einzelnen Schritten der Heilbuttverarbeitung bezogen auf ein Produktionsjahr**

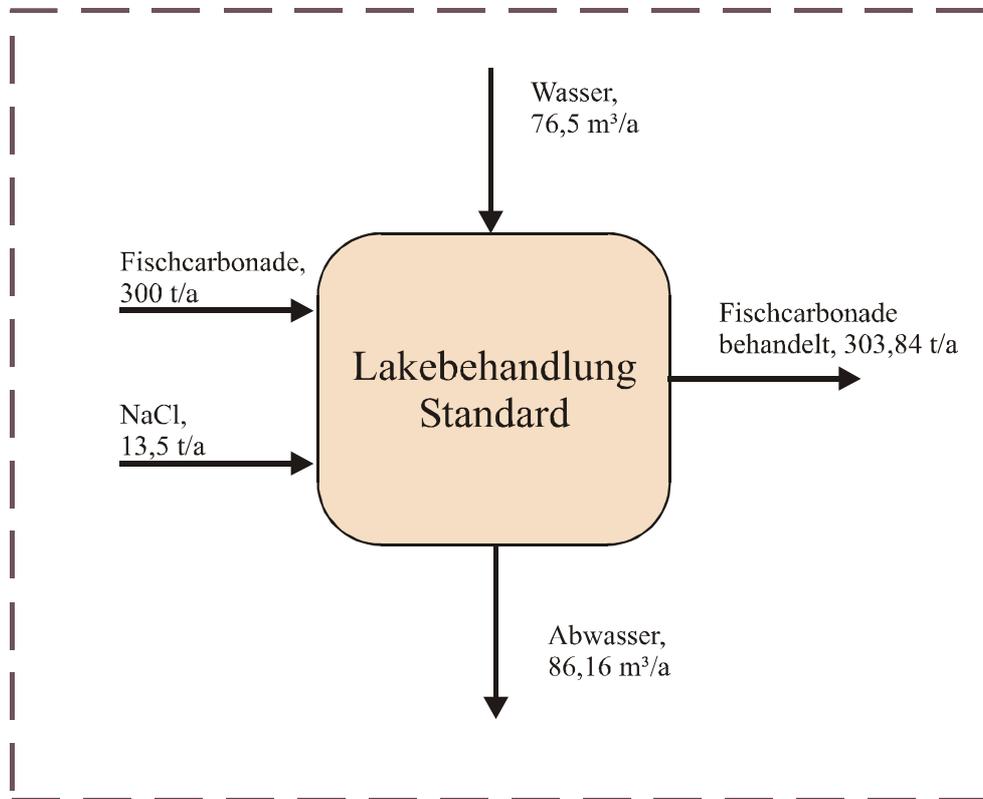
Prozessschritt	Rohstoffverluste			
	Lakebehandlung Standard		Lakebehandlung mit Transglutaminase	
	%	kg/a	%	kg/a
Auspacken	25,00%	100.000,00	25,00%	100.000,00
Auftauen				
Schneiden				
Lakebehandlung	-	-	-	-
Aufhängen	-	-	-	-
Duschen				
Kühlung/ Zwischenlagerung				
Garen	14,113%	42.339,00	13,708%	41.124,00
Heruntergefallene Stücke (Anteil der fertig gegarten Ware)	0,392%	1.010,03	0,089%	230,40
Kühlung mit flüssigem Stickstoff	-	-	-	-
Verpacken	-	-	-	-
Transportschäden (Anteil der fertig gegarten Ware)	2,747%	7.077,95	1,063%	2.751,85
<b>Gesamtausfall</b>		<b>150.426,98</b>		<b>144.106,25</b>

Von der Rohware bis zum fertigen Garprodukt sind Produktverluste von bis zu 37 % bzw. 36 % zu verzeichnen; wobei die größten Verluste bei den Prozessschritten Auspacken, Auftauen und Schneiden auftreten.

### 6.3.3.1 Standardverfahren

Beim Standardverfahren werden die aufgetauten und zugeschnittenen Heilbutt-Carbonaden (300 t/a) für 60 Minuten in eine 15%-ige Natriumchloridlake eingelegt. Für die Behandlung von einem kg Fisch-Carbonaden werden 1,5 l Natriumchloridlake benötigt; wobei diese fünfmal verwendet werden kann, bevor sie verworfen wird. Die Möglichkeit der fünffachen Verwendung der Lake beruht auf Erfahrungswerten

der Deutschen See GmbH & Co. KG, Bremerhaven. Die In- und Outputströme bezogen auf ein Produktionsjahr sind für die Standardbehandlung in der Abbildung 6.5 angegeben.



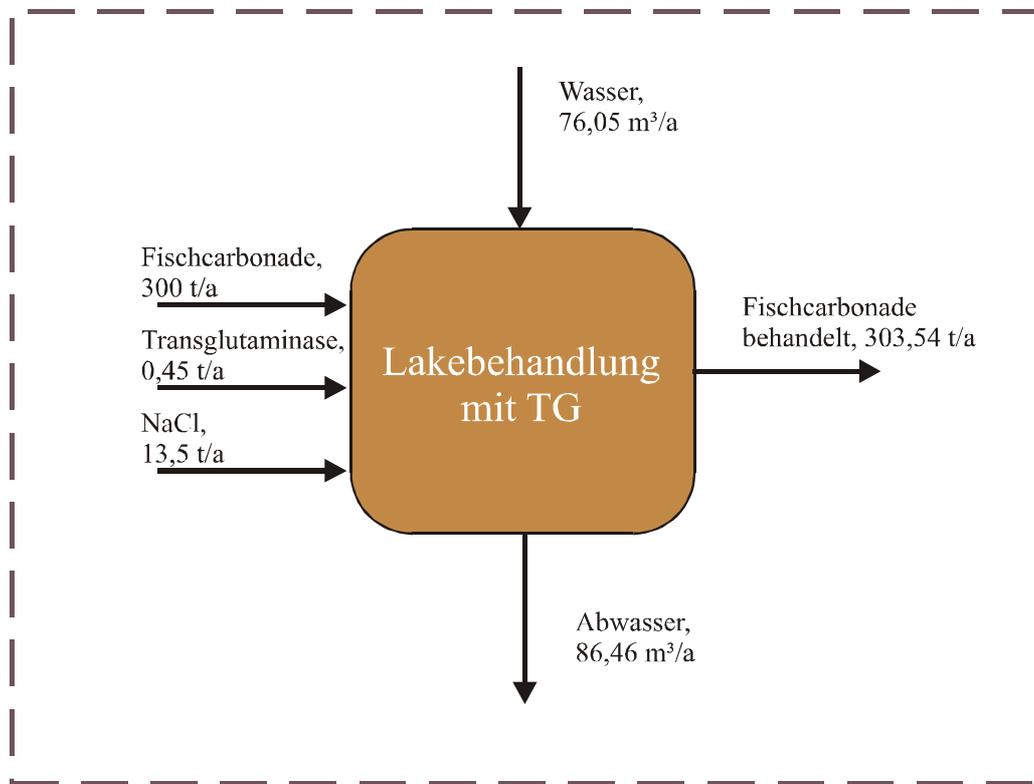
**Abb. 6.5: Input- und Outputströme des Standardverfahrens der industriellen Heilbuttverarbeitung**

Nach Ende der Standard-Lakebehandlung haben die Heilbuttstücke um 1,28 % an Gewicht zugenommen.

#### 6.3.3.2 Lakebehandlung mit Transglutaminase

Bei der Lakebehandlung mit Einsatz von Transglutaminase wird neben der 15%-igen Natriumchloridlake 0,5 % Transglutaminase zugesetzt, die ebenfalls fünfmal verwendet werden kann. Die Möglichkeit der fünffachen Verwendung der Lake wurde experimentell überprüft; diese Überprüfung ergab, dass auch nach fünffacher Verwendung ausreichend Enzymaktivität vorhanden ist. Für die Behandlung von einem kg Fisch-Carbonaden werden 1,5 l Lake benötigt. Die In- und Outputströme für die

Lakebehandlung mit Transglutaminase sind für ein Produktionsjahr in der Abbildung 6.6 angegeben.



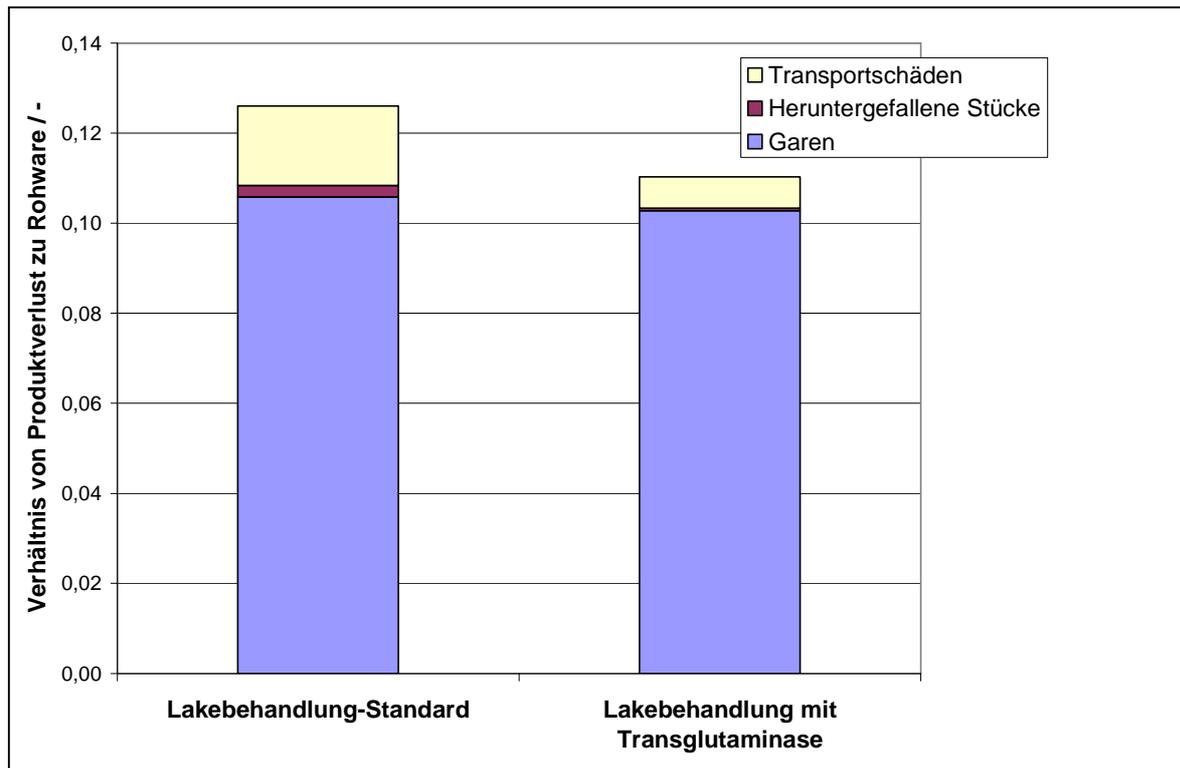
**Abb. 6.6:** Input- und Outputströme der Innovationsmethode Lakebehandlung mit Transglutaminase

Nach Ende der Lakebehandlung mit Transglutaminase haben die Heilbuttstücke um 1,18 % an Gewicht zugenommen

### 6.3.3.3 Umweltrelevante Bewertung

Zur umweltrelevanten Bewertung der betrachteten Behandlungsverfahren bei der Verarbeitung von Schwarzem Heilbutt werden mit den in der Sachbilanz erhobenen Daten Kennzahlen für die Umweltsleistungsbewertung gebildet.

Die Abbildung 6.7 verdeutlicht die Vorteile der Heilbuttverarbeitung bei Einsatz des Enzyms Transglutaminase.



**Abb. 6.7: Produktverluste bei der Heilbuttverarbeitung Standard vs. Innovationsmethode Transglutaminase-Lakebehandlung**

Der Produktverlust an Schwarzem Heilbutt innerhalb eines Produktionsjahres beträgt bei der zur Zeit angewandten industriellen Verarbeitungsmethode etwa 37,6 % (ca. 150.427 kg). Hingegen konnte der Produktverlust durch den Einsatz von Transglutaminase auf 36 % (auf ca. 144.106 kg) reduziert werden. Dies führt zu einer Einsparung von 6.321 kg/a. Insbesondere bei der Auslieferung der Ware (Transportschäden) konnte der Produktverlust aufgrund der Verfestigung des Fischfleisches erheblich minimiert werden. Damit erfüllt die Transglutaminase-Lakebehandlung eines der Schutzziele der ökologischen Nachhaltigkeit, nämlich das Ziel der Schonung der natürlichen Ressource Fisch.

Beim Vergleich der beiden Varianten im Prozessschritt „Lakebehandlung“ sind die In- und Outputströme, d.h. die Wasser- und Abwasserströme, in etwa gleich. Die anfallenden Abwasserströme bestehen hauptsächlich aus Prozess- sowie Reinigungsabwässern, wobei über die enthaltenen Inhaltsstoffe keine Analysendaten vorliegen. Aus diesen Gründen ist eine Belegung der aufgenommenen Stoffdaten mit dem Funktionswert für umweltrelevante Wirkungen hier nicht sinnvoll, da aus-

schließlich für das Enzym Transglutaminase eine Wirkungsabschätzung vorgenommen werden kann.

Für die Berechnung der Wirkungsindikatoren der einzelnen Stoffe bedarf es stoffspezifischer Werte, die den gängigen Sicherheitsdatenblättern entnommen werden können. Dem Sicherheitsdatenblatt für das Enzym Transglutaminase Activa WM der Firma Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, konnte entnommen werden, dass dieses Enzym als „*Non-Toxic*“ klassifiziert wird. Nach der 5-maligen Benutzung der Transglutaminase-Lake ist noch eine Restaktivität der Transglutaminase vorhanden. Dabei ist aber zu beachten, dass die Transglutaminase vor der Entsorgung nicht inaktiviert werden muss, da sie in der starken Verdünnung nach dem Entsorgen nach Angaben des Enzymherstellers Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, sehr schnell oxidiert und somit inaktiviert wird. Entsprechend dem Sicherheitsdatenblatt sind außerdem keine „*ungünstigen ökologischen Effekte*“ zu erwarten.

#### 6.3.3.4 *Ökonomische Bewertung*

Neben der umweltrelevanten Betrachtung stellt die ökonomische Betrachtung der untersuchten Innovationsmethode ein wesentliches Kriterium für die Investitionsentscheidung dar. Die Abbildung der betrieblichen Kostensituation dient als Hilfsmittel zur Beurteilung der Situation sowie zur Vorbereitung von Entscheidungen.

Zur Betrachtung der ökonomischen Aspekte werden - aufbauend auf der Ist-Stand-Analyse - den aufgenommenen Stoffströmen Wertkomponenten (Preise) zugeordnet (Tab. 6.5). Dabei wird hier insbesondere auf die entstehenden monetären Rohstoffverluste sowie auf das mögliche Gewinnpotenzial der innovativen gegenüber dem standardisierten Heilbutt-Verarbeitungsverfahren eingegangen.

**Tab. 6.5: Wertverluste am Rohstoff Fisch bei der Heilbuttverarbeitung bezogen auf ein Produktionsjahr**

Prozessschritt	Lakebehandlung Standard		Lakebehandlung mit Transglutaminase	
	Menge [kg/a]	Preis [Euro/a]	Menge [kg/a]	Preis [Euro/a]
<b>Gewichtsverlust beim Auspacken/Auftauen/Schneiden, (a)</b>	100.000,00	<b>350.000,00</b>	100.000,00	<b>350.000,00</b>
<b>Gewichtsverlust beim Garen, (b)</b>	42.339,00	<b>635.085,00</b>	41.124,00	<b>616.860,00</b>
<b>Heruntergefallene Stücke, (c)</b>	1.010,03	<b>15.150,45</b>	230,40	<b>3.456,00</b>
<b>Transportschäden, (d)</b>	7.077,95	<b>106.169,25</b>	2.751,85	<b>41.277,75</b>
<b>Gesamtverlust</b>	150.426,98	<b>1.106.404,70</b>	144.106,25	<b>1.011.593,75</b>

Anmerkungen: - Einkaufspreise der Rohware:

ca. 3,50 €/kg

- Verkaufspreise der fertigen Garware:

ca. 15,00 €/kg

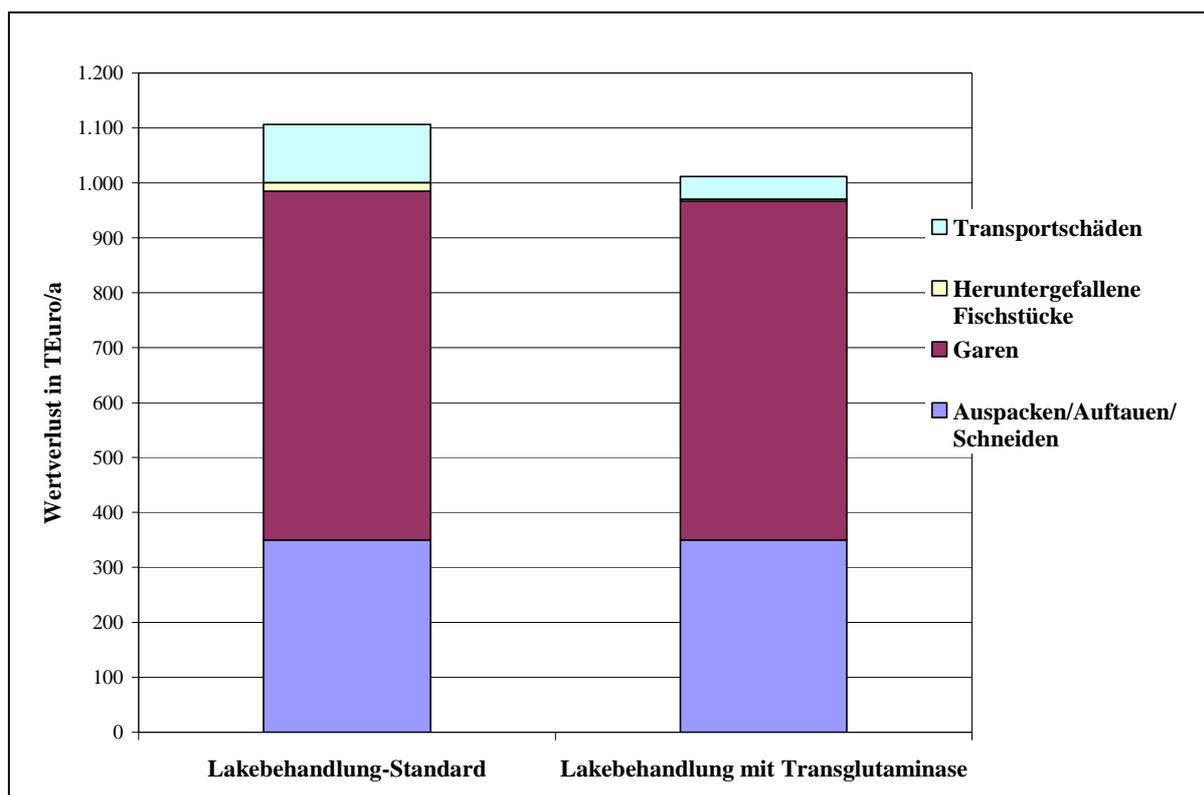
(a)  $\text{Gewichtsverlust, kg} \cdot \text{Einkaufspreis, €/kg} = \text{Wertverlust beim Auspacken/Auftauen/Schneiden}$

(b)  $\text{Gewichtsverlust, kg} \cdot \text{Verkaufspreis, €/kg} = \text{Wertverlust beim Garen}$

(c)  $\text{Gewichtsverlust, kg} \cdot \text{Verkaufspreis, €/kg} = \text{Wertverlust durch heruntergefallene Fischstücke}$

(d)  $\text{Gewichtsverlust, kg} \cdot \text{Verkaufspreis, €/kg} = \text{Wertverlust durch Transportschäden}$

Für die Varianten „Standard-Heilbuttverarbeitung“ und „Heilbuttverarbeitung mit Transglutaminase-Einsatz“ sind die Wertverluste am Rohstoff Fisch in der Abbildung 6.8 gegenübergestellt.



**Abb. 6.8: Gesamte Wertverluste am Produkt „Schwarzer Heilbutt“ bei der Lakebehandlung Standard und bei dem Innovationsherstellungsverfahren**

Bei der Betrachtung beider Varianten der Heilbuttverarbeitung gehen der Deutschen See GmbH & Co. KG bei der herkömmlichen Herstellungsmethode etwa **1.106.404,70 Euro** pro Produktionsjahr allein an Fisch verloren; dagegen kann der Fischwertverlust bei Anwendung der Transglutaminase auf **1.011.593,75 Euro** pro Produktionsjahr reduziert werden (Tab. 6.5). Unter Berücksichtigung der anfallenden Kosten für den Hilfsstoff „Transglutaminase“, die sich auf **33.750,00 Euro** pro Produktionsjahr belaufen (Transglutaminase Activa WM kostet 75,- €/kg), beträgt der Gewinn durch Rohstoffersparnis bei der innovativen Heilbutt-Verarbeitungsmethode ca. **61.060,95 Euro/a**.

#### 6.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die Behandlung von ganzen Fisch-Carbonaden mit Transglutaminase stellt eine Innovation dar, so dass vergleichbare Literatur derzeit nicht verfügbar ist.

Die Ergebnisse der ersten fünf Pilotversuche stellten die Lakebehandlung mit einer Transglutaminase-Konzentration von 0,5 % (w/v, 2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein) als optima-

les Behandlungsverfahren heraus. Im Mittel konnte eine Texturverfestigung von 18,7 % im Vergleich zum Standard erzielt werden. Die mittels Injektionsverfahren behandelten Heilbutt-Carbonaden wiesen bezüglich ihrer Texturfestigkeit starke Schwankungsbreiten zwischen den einzelnen Pilotversuchen auf. Sowohl Verfestigungen als auch Erweichungen um bis zu 35 % bzw. 39 % konnten festgestellt werden. Unabhängig davon, wie viel Transglutaminase-Natriumchloridlösung injiziert wurde, bildeten sich geleeartige Kanäle innerhalb der Fisch-Carbonaden. Auch bei Einstichabständen, die unterhalb eines Zentimeters lagen, fand keine gleichmäßige Diffusion der injizierten Lösung in den Fischmuskel statt. Dies konnte zum einen bei einer sensorischen Verkostung festgestellt werden, weil der Salzgehalt innerhalb des Fischstückes trotz gleichmäßiger Injektion stark schwankte; zum anderen zeigte sich bei der instrumentellen Texturmessung, dass auch die Transglutaminase nicht gleichmäßig diffundiert war, weil die Fischstücke vielfach weicher waren – und zwar besonders bei Texturmessungen an Stücken, die einen geleegefüllten Einstichkanal aufwiesen.

In den folgenden fünf Pilotversuchen (VI-X) wurde ausschließlich die Lakebehandlung mit 0,5%-iger (w/v) Transglutaminase-Konzentration ( $2,8 \text{ IE g}^{-1}$  Fischprotein) parallel zur Standardprobe ohne Transglutaminase angewandt. Insgesamt konnte eine 11,9%-ige Verfestigung durch die Lakebehandlung im Vergleich zum Standard festgestellt werden. Warum die Verfestigung in den Pilotversuchen VI-X im Mittel geringer ausfiel, als in den Pilotversuchen I-V ist ungeklärt. Aber bereits in Kapitel 2 konnte gezeigt werden, dass die Verfestigung des Schwarzen Heilbutts durch Transglutaminase großen Schwankungen unterworfen ist. Diese Schwankungen sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht zu eliminieren, da der Heilbutt äußerlich kaum Hinweise auf seine Verarbeitungsfähigkeit und damit auf seine zu erwartende Verfestigung durch Transglutaminase liefert. Dieser Umstand muss bei Verarbeitung des natürlichen Rohstoffes Schwarzer Heilbutt aus dem Wildfang in Kauf genommen werden.

Die Gewichtsverluste während des Garens konnten durch die Transglutaminase-Behandlung im Vergleich zum Standard um 0,4 % gesenkt werden. Auch Nielsen (1995) vermutete, dass die Injektion bzw. das Tumbeln von Fisch mit Transglutami-

nase-Lösung zu reduzierten Auftau- und Garverlusten führen würde. Engel et al. (2000) verwiesen ebenfalls auf ein verbessertes Wasserhaltevermögen durch die Transglutaminase-Behandlung. Dies könnte zu reduzierten Gewichtsverlusten führen. Diese Reduzierung der Gewichtsverluste steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Kapitel 4. Hier konnte bei der Fischfarceherstellung unter Verwendung der verschiedenen Salze festgestellt werden, dass die Zugabe von Transglutaminase jeweils die Gewichtsverluste während des Garens erhöhte. Hier muss berücksichtigt werden, dass sich das Einlegen von Fischstücken in Transglutaminase-Lake evident von der Fischfarceherstellung mit Transglutaminase unterscheidet, so dass sich hierdurch die unterschiedlichen Gewichtsverlust erklären lassen. Zudem wurden innerhalb der Pilotversuche die Fischstücke als Gewichtsverlust durch Garen erfasst, die während des Garens von den Stäben gefallen sind. Durch die Texturverfestigung sind weniger Transglutaminase-behandelte Stücke zerfallen als nicht Transglutaminase-behandelte. Dies erhöhte den Gewichtsverlust der Standardreihe.

Für jeden Pilotversuch wurde eine andere Fischcharge, die jeweils über eine andere Ausgangsfestigkeit verfügte, verwendet. Eine Ergebniszusammenfassung von jeweils fünf Chargen erhöht die Schwankungsbreiten und ist Grund für die erheblichen Standardabweichungen in den Abbildungen 6.1, 6.2 und 6.3. Dennoch sind die Standardabweichungen auch innerhalb der einzelnen Pilotversuche nicht unerheblich, so dass signifikante Unterschiede der einzelnen Messreihen nur über einen großen Stichprobenumfang (n) festgestellt werden konnten.

Innerhalb der Pilotversuche zeigte sich erwartungsgemäß, dass keine Verfestigung der Heilbutt-Carbonaden in der Stärke erreicht werden konnte, wie sie bei der Fischfarceherstellung zum Teil erreicht wurde. Die Wirkmöglichkeit der Transglutaminase ist in einem bereits zerkleinerten Muskel besser als in einem intakten.

Es wurde deutlich, dass die Texturverfestigung durch den Einsatz von Transglutaminase zu Verarbeitungsvorteilen führt. Nach dem Garprozess und anschließendem Abkühlen werden die Heilbutt-Carbonaden in Kartonagen unter Schutzgasatmosphäre verpackt. Aufgrund der nicht immer kurzen Transportwege von der Produktionsstätte ins Zwischenlager und zum Verkaufstresen sind die Heilbuttstücke erheblichen

mechanischen Belastungen ausgesetzt. Die vielfach weiche Textur des Heilbutts führte dazu, dass einige Stücke nach Ankunft in der Verkaufsstätte bereits verworfen werden mussten bzw. zumindest nicht mehr über ein ansprechendes Äußeres verfügten und somit den Verbraucherwunsch nach gleichbleibend guter Qualität nicht erfüllten. Dennoch handelt es sich bei Heilbutt-Carbonaden um ein gern gegessenes Fischstück, das von vielen Verbrauchern aufgrund seiner zarten Textur bevorzugt wird. Mit dem Einsatz von Transglutaminase in einer Konzentration von 0,5 % (2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein) ist es gelungen, die Heilbutt-Carbonaden derart zu verfestigen, dass die transportbedingten Schäden zurückgegangen sind. Die Textur verliert durch diese Behandlung allerdings nicht ihre vom Kunden gewünschte Zartheit (Grotheer, persönliche Mitteilung, 2004).

Das Einsparpotenzial durch die Transglutaminase-Behandlung der Heilbutt-Carbonaden konnte in der Stoffstrombilanzierung festgestellt werden. Das Innovationsverfahren Transglutaminase-Lakebehandlung erfüllt nachweislich eines der Schutzziele der ökologischen Nachhaltigkeit, nämlich das Ziel der Schonung der natürlichen Ressource Fisch durch Verringerung der Verarbeitungs- und Transportverluste um 1,6 %. Das entspricht, bezogen auf das jetzige Verarbeitungsvolumen von 400 t/a einem Gewinn durch Rohstoffersparnis von ca. 61.060,95 Euro/a.

Das Sicherheitsdatenblatt für das Enzym Transglutaminase Activa WM der Firma Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, stuft dieses Enzym als „*Non-Toxic*“ ein. Im Abwasser sind keine „*ungünstigen ökologischen Effekte*“ zu erwarten.

## **7 Sicherheitsaspekte bezüglich des Einsatzes von Transglutaminase**

### **7.1 Einleitung**

Bei Transglutaminase handelt es sich um einen Verarbeitungshilfsstoff im Sinne der Richtlinie 89/107/EWG vom 21.12.1988. Das Enzym wird aus technologischen Gründen zugesetzt und braucht nicht deklariert zu werden, wenn es im Endprodukt keine technologische Wirkung ausübt.

In Abhängigkeit von Produkt- und Herstellungstechnologie können die industriell angewandten Temperatur-Zeit-Bedingungen variieren. Diese wirken sich auf die Inaktivierung aus, so dass reaktionskinetische Daten für die Inaktivierung von Transglutaminase erforderlich sind. Im Sinne des Verbraucherschutzes ist es von Bedeutung, die Transglutaminase vor Verzehr der behandelten Produkte zu inaktivieren. In den folgenden Untersuchungen wurden die D-Werte und der z-Wert der Transglutaminase ermittelt. Mit Hilfe der D-Werte und des z-Wertes besteht die Möglichkeit, anhand eines Temperaturprotokolls, das während des Garprozesses des Schwarzen Heilbutts aufgezeichnet wird, zu überprüfen, ob eine vollständige Inaktivierung der Transglutaminase stattfindet. Zusätzlich zu der mathematischen Gewährleistung der Inaktivierung wurde die Fischmuskulatur nach dem Garprozess auf Restaktivität der Transglutaminase untersucht. Eine entsprechende Methode wurde hierfür entwickelt.

In einem weiteren Schritt wurde die mikrobiologische Qualität der Transglutaminase-behandelten und –unbehandelten gegarten Heilbutt-Carbonaden über den Lagerzeitraum untersucht.

#### **7.1.1 Mikrobiologische Aspekte zur Fischqualität**

Fisch gehört aufgrund seiner Rohstoffeigenschaften zu den schnell verderblichen Lebensmitteln. Neben der zumeist aus psychrophilen Mikroorganismen bestehenden Primärflora der Fische aus kälteren Gewässern, wie dem Schwarzen Heilbutt, kommt es nach Anlandung - verursacht durch Kontakt mit Lagerungsbehältnissen

und Arbeitsgeräten - zu einer quantitativen Keimzunahme sowie zu einer qualitativen Veränderung der Flora. Die einsetzenden Autolyseprozesse begünstigen die mikrobielle Infektion des sonst üblicherweise keimarmen Fischfleisches. (Tülsner, 1994)

Auf lebendem oder frisch geschlachtetem Fisch befinden sich Mikroorganismen auf der Haut und auf den Kiemen sowie im Intestinaltrakt. Der Bereich der Besiedelung der Haut liegt bei  $10^2$ - $10^7$  KbE/cm<sup>2</sup>. Kiemen und Intestinaltrakt weisen normalerweise einen höheren Keimzahlbereich von  $10^3$ - $10^9$  KbE/g auf. In Abhängigkeit vom Lebensraum kann die Keimzahl stark variieren. (Huss, 1995)

Die Fangmethodik ist für die mikrobielle Belastung von Bedeutung. Fisch, der auf dem Meeresboden lebt und mit Hilfe von Grundsleppnetzen gefangen wird, wie es beim Schwarzen Heilbutt der Fall ist, weist auf seiner Haut eine höhere Keimzahl auf, als Fisch, der mit pelagischen Schleppnetzen oder mittels Angel gefangen wird (Sikorski, Kolodziejska, 2002).

Die Fische nördlicher Breiten - sauberes, nicht verunreinigtes Wasser vorausgesetzt - sind zumeist von psychrotrophen, gram-negativen Mikroorganismen der Gattungen *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* und *Flavobacterium* besiedelt. Auch Vibrionen und Aeromonaden sind typische Mikroorganismen der natürlichen Fischflora. (Huss, 1995)

Durch die Kühlung von frischgefangenem Fisch auf Eis (0-2 °C) wird gegenüber den natürlichen Lebensbedingungen, aufgrund der zumeist vorkommenden primären psychrophilen Keimflora, kaum eine Verzögerung des Keimwachstums bewirkt. Die Aufbewahrung bei Kühlschranktemperaturen bedeutet sogar häufig für viele Fischarten eine Erhöhung der Temperatur im Vergleich zum natürlichen Lebensraum. Es kann zu rascher Keimentwicklung und zu schnellem Verderb der Fische kommen. (Tülsner, 1994)

Fisch, der für verschiedene Verarbeitungsprozesse vorgesehen ist, ist vielfach aufgetauter Fisch, der bereits auf See gefrostet wurde (Sikorski, Kolodziejska, 2002). Im Gewebe von aufgetautem Schwarzen Heilbutt ermittelte Karnop (1980) aerobe

Gesamtkeimzahlen von  $10^3$ - $10^5$  KbE/g; auf der Haut wurden  $10^4$ - $10^6$  KbE/cm<sup>2</sup> nachgewiesen.

Die thermische Belastung während des Garprozesses ist üblicherweise ausreichend, um viele der nicht sporenbildenden Bakterien zu eliminieren. Es muss jedoch beachtet werden, dass während des Garprozesses vielfach Kerntemperaturen der Fischwaren nicht über 65 °C erreicht werden, so dass hohe Hygienestandards während der Produktion sowie gute Rohwarenqualitäten dringend erforderlich sind. Der Effekt der thermischen Belastung hängt von verschiedenen Faktoren, wie der Zusammensetzung der Fische, dem Salzgehalt, der Feuchtigkeit, der Temperatur und der Dauer des Garprozesses, ab. (Sikorski, Kolodziejska, 2002)

In frisch geräuchertem Fleisch von Schwarzem Heilbutt, Bückling und Aal fand Karnop (1980) aerobe Gesamtkeimzahlen unter  $10^3$  KbE/g; auffällig war jedoch, dass die Keimzahlen im Bereich des Spittloches 2 log höher lagen als die durchschnittliche Keimzahl des übrigen Fischfleisches. Kleickmann und Schellhaas (1979) stellten fest, dass die Keimzahl von Räucherfischwaren ohne sensorisch feststellbare Abweichungen in 80 % der untersuchten Proben unterhalb von  $10^6$  KbE/g lag.

Innerhalb der Fischverarbeitung spielt die hygienische Prozessgestaltung eine wichtige Rolle, um Kontaminationen des rohen Fisches oder der gegarten Fischwaren zu vermeiden. Eklund et al. (1995) demonstrierten diese Notwendigkeit am Beispiel von *Listeria monocytogenes*: Im Fleisch von frischem, ganzem Lachs konnten sie dieses Bakterium nicht nachweisen, wohl aber nach dem Filetieren und Pökeln des Lachses. In diesem Zusammenhang nannten die Autoren das Injektionsverfahren zur Applikation von Pökellake als besondere Gefahr für den Eintrag pathogener Mikroorganismen in das Innere des Fischfleisches. (Eklund et al., 1995)

## **7.2 Material und Methoden**

### **7.2.1 D- und z-Wert-Ermittlung der Transglutaminase**

Transglutaminase Activa WM (Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg) wurde in einer Konzentration von 70 IE 100 ml<sup>-1</sup> in 15%-iger (w/v) Natriumchloridlö-

sung gelöst. Analog zur industriellen Produktion gegarter Heilbutt-Produkte wurde Leitungswasser als Lösungsmedium verwendet. Die Enzymlösung wurde abgestuften, definierten Erhitzungsbedingungen im Wasserbad (50, 55, 60 und 65 °C) ausgesetzt, wobei jeweils alle Variablen mit Ausnahme der Zeit konstant gehalten wurden. Die enzymatische Aktivität wurde mittels Hydroxamat-Test, wie in Kapitel 4 beschrieben, ermittelt. Auch hier wurde die Aktivität ausgedrückt als internationale Einheiten pro Gramm Transglutaminase ( $\text{IE g}^{-1}$ ). Aus den gewonnenen Daten wurden die D-Werte und der z-Wert nach DIN EN 866-1 ermittelt. Die Untersuchung wurde dreifach als Doppelprobe durchgeführt.

### 7.2.2 Mathematischer Nachweis der Inaktivierung der Transglutaminase durch den industriellen Garprozess

In Carbonaden geschnittener Heilbutt wurde für 60 min in 15%-ige (w/v) Natriumchloridlösung mit einem Zusatz von 0,5 % (w/v) Transglutaminase Activa WM ( $350 \text{ IE l}^{-1}$ ), Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, analog den industriellen Produktionsbedingungen eingelegt und wie in Kapitel 5, Abb. 5.1, beschrieben weiterverarbeitet. Während des Garprozesses wurde die Kerntemperatur der Heilbutt-Carbonaden mittels Hamster 2000 Regeltron, Adelberg, minütlich ermittelt und aufgezeichnet. Aus dem hieraus entstandenen Temperaturprotokoll ist der Bereich zur Berechnung herangezogen worden, bei dem eine Inaktivierung der Transglutaminase stattfindet. Dieser Bereich beginnt, wie unter 4.3.1 gezeigt, bei einer Temperatur von 50 °C. Jede der minütlich aufgeführten Temperaturen bewirkt eine schrittweise Inaktivierung der Transglutaminase. Die Höhe der Inaktivierung wird durch Einsetzen in folgende Gleichung ermittelt:

$$E = \int_{t_0}^t \cdot 10^{\frac{T-100}{z}} dt \text{ [min]}$$

T = jeweilige Kerntemperatur der Heilbutt-Carbonaden

100 = Referenztemperatur in °C

z = 10,14 °C

### 7.2.3 Experimenteller Nachweis der Inaktivierung der Transglutaminase im Fischmuskel durch den industriellen Garprozess

Industriell verarbeiteter und gegarter Heilbutt (Standard und Lake 0,5 % (2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein)), wie in Kapitel 5 beschrieben hergestellt, wurde jeweils filetiert und für 2 min gekuttert (ST 11 Kutter mit dreier Standard-Messer, Volumen: 11 l, Drehzahl der Messerwelle: ca. 1400 U min<sup>-1</sup>, Kutterzeit: 2 min, ADE, Hamburg). Von den beiden gekutterten Massen wurden pro Versuchsdurchführung jeweils dreimal 10 g abgewogen und in Zentrifugenröhrchen überführt. Um das Enzym aus der Fischmatrix herauszulösen, wurde Tris-Acetat (0,2 M, pH 6) nach Froeck (1999) verwendet. Jeweils 20 ml wurden zu den Proben hinzugefügt und mit Hilfe eines Vortex vermischt. Die Proben wurden für 5 min in ein Ultraschallbad (Sonorex RK 100, f = 50-60 Hz, Bandelin, Berlin) verbracht. Es schloss sich eine Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad an. Danach wurden die Proben zentrifugiert (3000 U min<sup>-1</sup>, 10 min; GS-15R Centrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Der Überstand wurde dann direkt mittels Hydroxamat-Test (Kapitel 4) auf enzymatische Restaktivität untersucht. Diese Untersuchung wurde als Dreifachbestimmung begleitend zu jedem Pilotversuch durchgeführt.

### 7.2.4 Mikrobiologische Qualität der rohen und gegarten Heilbutt-Carbonaden

Aufgetaute und zurechtgeschnittene Heilbutt-Carbonaden wurden in der Produktionsstätte der Deutschen See GmbH & Co. KG in Bremerhaven in Kühlboxen verpackt und innerhalb von 2 Stunden nach Hannover transportiert. Dort wurde sofort das Keimspektrum auf der Haut und im Muskelfleisch analysiert. Dieses wurde auf das Auftreten der folgenden Keime mit den Methoden nach § 35 LMBG und DIN untersucht:

- Aerobe, mesophile und psychrophile Gesamtkeimzahlen, anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl (L 06.00-18)
- Enterobacteriaceen (L 05.00-5)
- Coliforme Keime und *E. coli* (L 01.00-3 / DIN 10183 Teil 1)
- Streptokokken der Gruppe D (DIN 10106)
- *Salmonella* spp. (L 00.00-20)

- Vibrionen (Screening mittels TCBS-Cholera-Agar, Oxoid GmbH, Wesel)
- Koagulase-positve Staphylokokken (DIN 10163 Teil 2)
- *Clostridium perfringens* (L 06.00-20)
- Mesophile sulfitreduzierende Clostridien und Clostridien Sporen (L 06.00-39)
- *Pseudomonas* spp. (DIN ISO 13720)
- Hefen und Schimmelpilze (DIN 10186 / L 01.00-37)

Insgesamt wurden drei Heilbuttchargen mit jeweils fünf Carbonaden als Doppelprobe untersucht.

Zur Bestimmung der mikrobiologischen Qualität der Fischprodukte wurden folgende Probenreihen (je 5 Carbonaden pro Probenreihe und Pilotversuch) während der Pilotversuche III-V (siehe Kapitel 6) untersucht:

- Standard
- Lake 1,0 % (5,5 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein)
- Injektion 1,0 % (0,2 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein)

Diese Probenreihen wurden gewählt, da sie die höchste Konzentration der Transglutaminase in den Pilotversuchen aufwiesen. Sollten sich Unterschiede bezüglich der mikrobiologischen Qualität durch den Einsatz von Transglutaminase zeigen, so könnten sie hier aufgezeigt werden.

Es wurden die unbehandelte Rohware, die Rohware nach Lake- und nach Injektionsbehandlung, die frisch gegarte Ware aller drei Probenreihen sowie die gegarte Ware aller drei Probenreihen am letzten Tag der Mindesthaltbarkeit (12. Tag) untersucht. Von jedem Probenstück wurde eine aerobe Gesamtkeimzahlbestimmung nach § 35 LMBG L 06.00-18 des Muskelfleisches und der Haut als Doppelprobe auf Plate-Count-Agar (VWR International, Darmstadt) durchgeführt. Die Proben wurden für 48 Stunden bei 30 °C inkubiert.

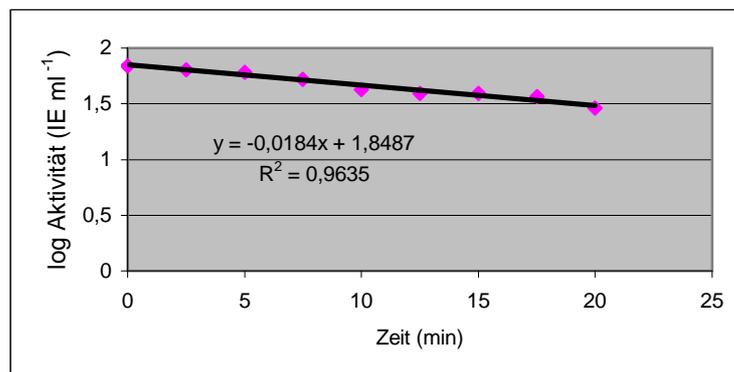
## 7.2.5 Statistische Auswertung

Aus den Daten der Untersuchungen wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. In der graphischen Darstellung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen stellen die Fehlerbalken die Standardabweichung dar.

## 7.3 Ergebnisse

### 7.3.1 D- und z-Wert-Ermittlung der Transglutaminase

Der D-Wert wurde durch grafische Darstellung der  $\log_{10}$ -Werte der verbliebenen Transglutaminase-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt. Die am besten angepasste Gerade ist durch Regressionsrechnung mit der Methode der kleinsten Quadrate zu bestimmen. Der Reziprokwert der Neigung der erhaltenen Geraden ist gleich dem D-Wert in Minuten.



**Abb. 7.1: Logarithmierte Aktivität ( $\log \text{IE g}^{-1}$ ) der Transglutaminase nach stufenweiser Erhitzung bei 50 °C**

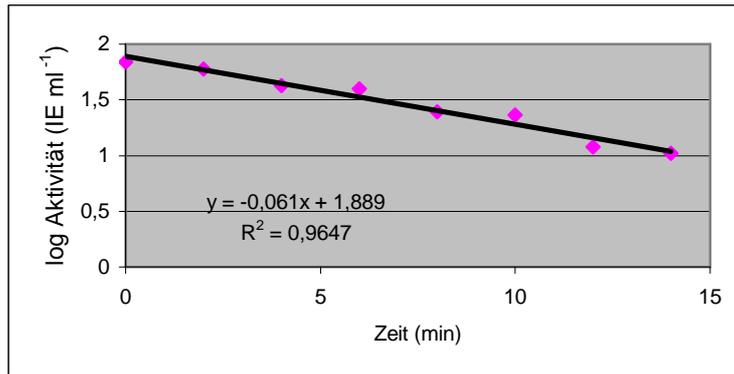


Abb. 7.2: Logarithmierte Aktivität ( $\log \text{IE g}^{-1}$ ) der Transglutaminase nach stufenweiser Erhitzung bei 55 °C

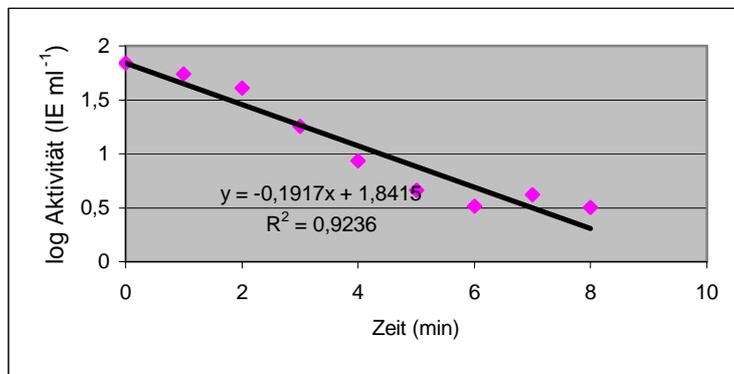


Abb. 7.3: Logarithmierte Aktivität ( $\log \text{IE g}^{-1}$ ) der Transglutaminase nach stufenweiser Erhitzung bei 60 °C

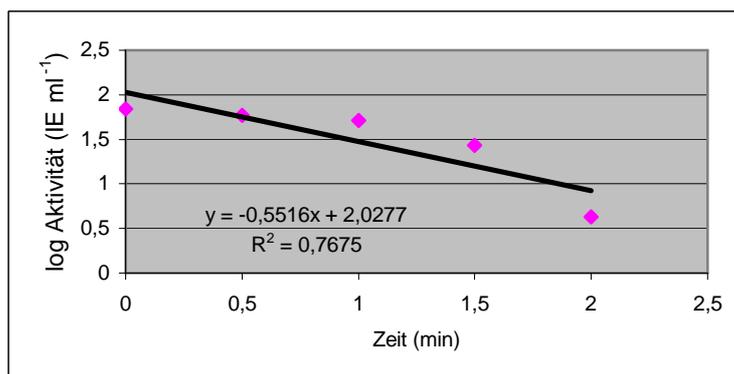


Abb. 7.4: Logarithmierte Aktivität ( $\log \text{IE g}^{-1}$ ) der Transglutaminase nach stufenweiser Erhitzung bei 65 °C

Es konnten folgende D-Werte in Abhängigkeit von der Temperatur ermittelt werden:

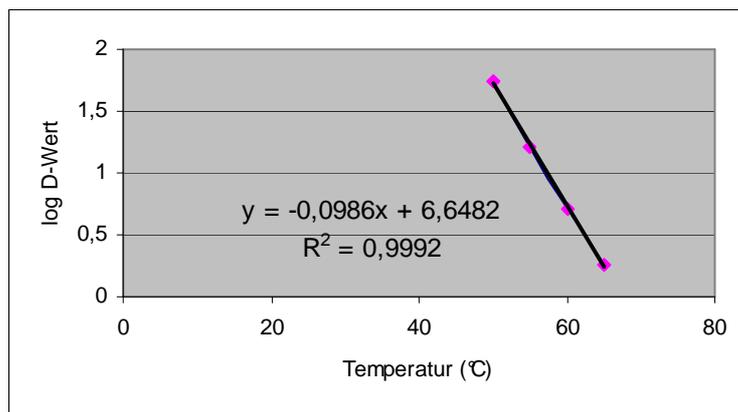
$$D_{50\text{ °C}} = 54,35 \text{ min}$$

$$D_{60\text{ °C}} = 5,55 \text{ min}$$

$$D_{55\text{ °C}} = 16,39 \text{ min}$$

$$D_{65\text{ °C}} = 1,81 \text{ min}$$

Um den z-Wert zu ermitteln, wurden die  $\log_{10}$ -Werte der D-Werte in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt (Abb. 7.5). Die Neigung der Regressionsgeraden ergibt den z-Wert in °C. Er beträgt 10,14 °C.



**Abb. 7.5: Logarithmierte D-Werte der Transglutaminase in Abhängigkeit von der Temperatur**

### 7.3.2 Mathematischer Nachweis der Inaktivierung der Transglutaminase durch den industriellen Garprozess

Aus der in Abbildung 7.5 dargestellten Funktion ( $y = -0,0986x + 6,6482$ ) lassen sich die D-Werte für beliebige Temperaturen ermitteln. Für die Berechnung der noch vorhandenen Enzymaktivität ist der D-Wert bei 100 °C von Interesse, da bei der Enzyminaktivierung von einer Referenztemperatur von 100 °C auszugehen ist (siehe angegebene Integral-Formel). Dieser beträgt:  $D_{100\text{ °C}} = 0,00061 \text{ min}$ . Da der D-Wert die Verringerung der Transglutaminase-Aktivität nur um ein Zehntel angibt, muss dieser Wert mit 10 multipliziert werden, um die gesamte Inaktivierung zu gewährleisten. Dieser hierbei erhaltene Wert von **0,0061 min** ist der Wert, den die Summierung der Erhitzungseffekte mindestens ergeben muss, um die Inaktivierung der Transglutaminase sicherzustellen.

Die Summierung der Erhitzungseffekt nach Temperaturprotokoll ergibt einen Wert von **0,006119 min**, so dass von einer Inaktivierung sicher auszugehen ist.

### 7.3.3 Experimenteller Nachweis der Inaktivierung der Transglutaminase im Fischmuskel durch den industriellen Garprozess

Es konnte nach dem industriellen Garprozess keine Enzymaktivität im Fischmuskel mittels Hydroxamat-Test festgestellt werden.

### 7.3.4 Mikrobiologische Qualität der rohen und gegarten Heilbutt-Carbonaden

Bei der Erfassung des Keimspektrums konnte festgestellt werden, dass sich coliforme Keime und speziell auch *Escherichia coli* auf und in den rohen Heilbutt-Carbonaden befanden. Die Keimzahl auf der Haut und im Muskelfleisch lag bei  $2,3 \times 10^1$  KbE/g. Vibrionen konnten nur im Muskelfleisch, nicht auf der Haut nachgewiesen werden. Eine Differenzierung der Vibrionen wurde nicht vorgenommen, da diese Untersuchung orientierenden Charakter hatte. Auch Pseudomonaden konnten im Muskelfleisch detektiert werden. Tabelle 7.1 gibt einen Ergebnisüberblick.

**Tab. 7.1: Durchschnittliche Keimbelastung der aufgetauten Heilbutt-Carbonaden**

Aerob	Muskelfleisch (KbE/g)	Haut (KbE/g)
Aerobe mesophile GKZ	$6,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
Aerobe psychrophile GKZ	$1,9 \times 10^5$	$6,9 \times 10^4$
Enterobacteriaceen	$4,5 \times 10^2$	$6,7 \times 10^1$
Coliforme Keime	$3,5 \times 10^2$	$3,5 \times 10^1$
<i>Escherichia coli</i>	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$
Streptokokken der Gruppe D	$< 1,5 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$
<i>Salmonella</i> spp.	n.n.	n.n.
Vibrionen	$1,4 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^2$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$
<i>Pseudomonas</i> spp.	$7,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$
Hefen und Schimmelpilze	$5,7 \times 10^2$	$8,6 \times 10^2$
<b>Anaerob</b>		
Anaerobe GKZ	$8,8 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3$
<i>Clostridium perfringens</i>	---	---
Mesophile sulfitreduzierende Clostridien	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$
Mesophile sulfitreduzierende Clostridien Sporen	n.n.	n.n.

In den folgenden Untersuchungen, die begleitend zu den Pilotversuchen III-V durchgeführt wurden, lag die mikrobiologische Belastung des rohen, in Carbonaden geschnittenen Schwarzen Heilbutts im Bereich von  $10^3$  (Fleisch) und  $10^4$  (Haut) KbE/g (Abb. 7.6). Die Keimzahlen des Fleisches lagen somit im Mittel eine Zehnerpotenz niedriger als in der vorangegangenen Untersuchung des Keimspektrums. Durch das Einlegen der Carbonaden in 15%-ige Salzlake für 60 min konnte die Keimzahl insbesondere der Haut leicht gesenkt werden. Diese positive Beeinflussung konnte durch die Injektionsbehandlung nicht erzielt werden. Bei Untersuchung des frisch gegarten und des 12 Tage gelagerten Heilbutts war zu erkennen, dass die Keimzahl der Haut des mit dem Injektionsverfahren behandelten Fisches tendenziell über der des Standards (Behandlung mit Salzlake) und des lakebehandelten (Behandlung mit Salzlake in Kombination mit Transglutaminase) Fisches lag (Abb. 7.7 und 7.8). Aus diesen Ergebnissen ist abzuleiten, dass das Injektionsverfahren eine gute Rohwarenqualität erfordert, da eine Reduktion der Keimzahl durch die Salzbehandlung auf der Haut fehlt.

Nach 12-tägiger Lagerung der Heilbutt-Carbonaden unter Schutzgasatmosphäre bei 5 °C war die aerobe Gesamtkeimzahl der Haut und des Fleisches angestiegen; eine Einschränkung der Verzehrbarkeit gab es aufgrund dieser Keimzahlen jedoch nicht. Der Spittlochbereich zeigte stets höhere Keimzahlen als das Fleisch und die Haut. Trotz der höheren Belastung des Spittlochbereiches bei den mittels Transglutaminase-Lake behandelten Carbonaden konnten in diesen Stücken im Fischfleisch die geringsten Keimzahlen von allen drei Probenreihen nachgewiesen werden.

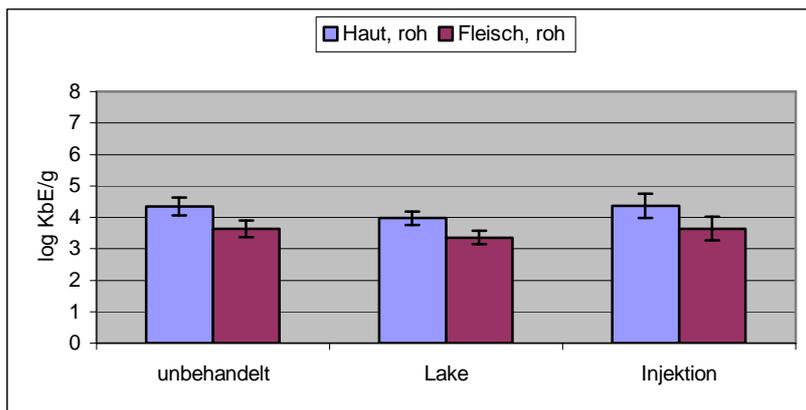


Abb. 7.6: Aerobe Gesamtkeimzahlen (log KbE/g) der rohen Heilbutt-Carbonaden (n = 15)

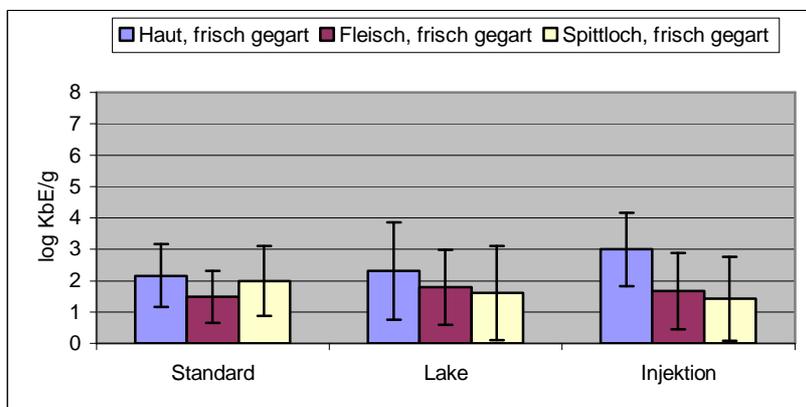


Abb. 7.7: Aerobe Gesamtkeimzahlen (log KbE/g) der frisch gegarten Heilbutt-Carbonaden (n = 15)

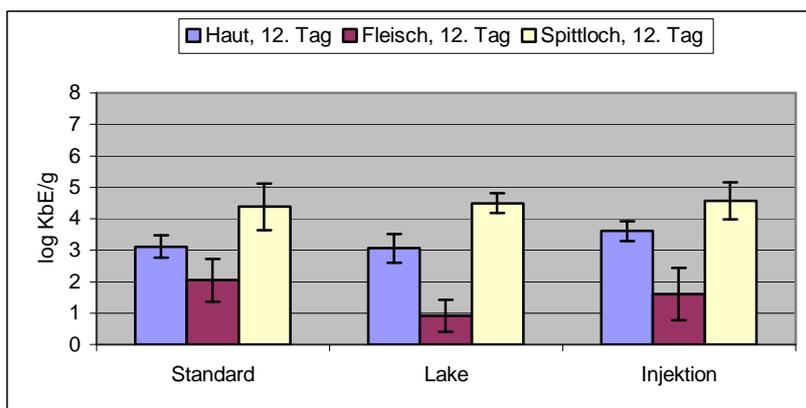


Abb. 7.8: Aerobe Gesamtkeimzahlen (log KbE/g) der gegarten Heilbutt-Carbonaden nach 12-tägiger Lagerung bei 5 °C (n = 15)

#### 7.4 Zusammenfassung und Diskussion

Für das Transglutaminase-Präparat Activa WM in 15%-iger (w/v) Natriumchloridlösung wurden die D-Werte im Temperaturbereich 50-65 °C ermittelt:

$D_{50\text{ °C}} = 54,35\text{ min}$ ;  $D_{55\text{ °C}} = 16,39\text{ min}$ ;  $D_{60\text{ °C}} = 5,55\text{ min}$ ;  $D_{65\text{ °C}} = 1,81\text{ min}$ .

Der z-Wert beträgt 10,14 °C. Die Summierung der Erhitzungseffekte ergab, dass die Transglutaminase durch den industriellen Garprozess inaktiviert wird. Nach dem industriellen Garprozess konnte auch experimentell keine Transglutaminase-Aktivität im Fischmuskel nachgewiesen werden. Um die Transglutaminase während des Garprozesses sicher zu inaktivieren, ist es erforderlich, eine Kerntemperatur von mindestens 65 °C zu erreichen.

Die Angaben in der Literatur zum Temperaturoptimum und zur Inaktivierung mikrobieller Transglutaminase durch Hitze sind vielfach vage und differierend. So schreiben Motoki und Seguro (1998), dass das Temperaturoptimum mikrobieller Transglutaminase bezüglich seiner Aktivität bei 50 °C liege. Inaktiviert werde die Transglutaminase durch eine Erhitzung auf 70 °C innerhalb weniger Minuten. Seguro (1999) gibt bezüglich der optimalen Temperatur den Bereich von 45-55 °C an. Nach einer Erwärmung auf 50 °C für 10 min sei noch die vollständige Aktivität vorhanden. Nach Yokoyama et al. (2004) liege das Temperaturoptimum mikrobieller Transglutaminase bei 55 °C. Die vollständige Aktivität des Enzyms werde jedoch auch bei einer Temperatur von 40 °C aufrechterhalten; bei 70 °C sei das Enzym innerhalb weniger Minuten inaktiviert. Der Enzymhersteller, Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, gibt an, dass seine mikrobiellen Transglutaminase-Präparate in Würsten bei einer Kerntemperatur von 65 °C innerhalb von wenigstens zwei Stunden inaktiviert würden. Bei einer Kerntemperatur von 70 °C seien es 15 min bis zur Inaktivierung. D- und z-Wert werden vom Enzymhersteller nicht angegeben. Nach Ho et al. (2000) liegt das Temperaturoptimum mikrobieller Transglutaminase bei 40 °C.

Analog zu Ho et al. (2000) konnte in den eigenen Untersuchungen festgestellt werden, dass bereits bei einer Temperatur von 50 °C eine Inaktivierung der Transglutaminase stattfindet. Die Angaben des Enzymherstellers Ajinomoto zur

Inaktivierung entsprechen nicht den eigenen Ergebnissen. Die eigenen Untersuchungen ergaben eine wesentlich geringere Hitzestabilität. Zwar muss hierbei beachtet werden, dass sich die Transglutaminase bei den Untersuchungen des Enzymherstellers in Wurst befand; in den eigenen Untersuchungen war das Enzym in 15%-iger (w/v) NaCl-Lösung gelöst, so dass von Matrixeffekten auf die Inaktivierung auszugehen ist. Doch auch in den eigenen Untersuchungen wurde der Transglutaminase-behandelte Fisch nach dem Garen auf Restaktivität untersucht. Es konnte keine Restaktivität ermittelt werden, wenn der Fisch während des Garprozesses eine Kerntemperatur von 65 °C erreichte.

Die Haut der rohen Heilbutt-Carbonaden wies eine aerobe Gesamtkeimzahl von  $10^3$ - $10^4$  KbE/g auf. Diese Werte liegen im Bereich dessen, was Huss (1995) für die Besiedelung der Haut frisch geschlachteter Fische angibt. Karnop (1980) untersuchte, wie in den eigenen Untersuchungen, ebenfalls die Haut aufgetauten Schwarzen Heilbutts und konnte aerobe Gesamtkeimzahlen von  $10^4$ - $10^6$  KbE/g ermitteln. Seine Werte lagen also teilweise über den in den eigenen Untersuchungen ermittelten Werten. Im Gewebe des Schwarzen Heilbutts ermittelte Karnop (1980) aerobe Gesamtkeimzahlen von  $10^3$ - $10^5$  KbE/g. Die eigenen Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse. Erhöhte Keimzahlen auf der Haut des Schwarzen Heilbutts, hervorgerufen durch den Einsatz von Grundschieppnetzen, wie es nach Sikorski und Kolodziejaska (2002) der Fall sein könne, konnten nicht festgestellt werden.

Nach ICMSF (1986) liegt der Richtwert für *E. coli* in frischem und tiefgefrorenem Fisch bei 11 KbE/g, der Warnwert liegt bei 500 KbE/g. Damit liegt die in den eigenen Untersuchungen ermittelte Keimzahl für *E. coli* zwischen Richt- und Warnwert.

Nach Huss (1995) gehören Pseudomonaden zur typischen Keimflora der Fische aus nördlichen Breiten. Auch in den eigenen Untersuchungen konnten Pseudomonaden im Muskelgewebe des Schwarzen Heilbutts ermittelt werden, nicht jedoch auf der Haut.

Die ICMSF (1986) legt den Richtwert für *Vibrio parahaemolyticus* bei  $10^2$  KbE/g und den Warnwert bei  $10^3$  KbE/g fest. Eine Bewertung für Vibrionen allgemein wird nicht

festgelegt, so dass an dieser Stelle keine Bewertung der erhaltenen Keimzahl vorgenommen werden kann. Festzuhalten ist, dass die Vibrionen in dieser Untersuchung zum dominierenden Genus in aufgetauten Heilbutt-Carbonaden gehörten - trotz der Tatsache, dass Vibrionen zumeist auf Fischen aus wärmeren Gewässern zu finden sind. Es muss allerdings beachtet werden, dass lediglich ein Screening mittels TCBS-Cholera-Agar stattgefunden hat; weitere Bestätigungsreaktionen wurden nicht durchgeführt.

An den ersten Untersuchungen zur Ermittlung des Keimspektrums war auffällig, dass das Muskelfleisch zumeist eine höhere Keimzahl aufwies als die Haut. In frisch geschlachteten Fischen ist das Muskelgewebe üblicherweise nahezu keimfrei (Huss, 1995). Die Ursache dieses Ergebnisses ist in dem Zerschneiden des Heilbutts in Carbonaden zu sehen. Das Zerschneiden geschieht mittels rotierendem Sägeblatt. Das Sägeblatt befindet sich längere Zeit im Einsatz, bevor es gereinigt wird. Auf diese Weise kann das Muskelfleisch in dieser Untersuchung kontaminiert worden sein. Beachtet werden muss allerdings, dass auch die hierbei ermittelten Keimzahlen nicht zu einer Beanstandung des Produktes führen. Laut ICMSF (1986) liegt der Richtwert (aerobe Koloniezahl) für Frischfisch und gefrorenen Fisch bei  $5 \times 10^5$  KbE/g und der Warnwert bei  $10^7$  KbE/g. Diese Keimzahlen wurden nicht erreicht. In den nachfolgenden Untersuchungen, die parallel zu den Pilotversuchen III-V durchgeführt wurden, wies die Haut hingegen erwartungsgemäß stets eine höhere aerobe Gesamtkeimzahl auf als das Muskelfleisch. Das Sägeblatt wurde künftig häufiger während der Betriebszeiten gereinigt.

Sikorski und Kolodziejska (2002) konnten feststellen, dass der Garprozess bis zu einer Kerntemperatur von 65 °C viele der nicht spor enbildenden Bakterien zu eliminieren vermag. Dieses bestätigte auch die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen der frisch gegarten Heilbutt-Carbonaden. Der Garprozess senkte die aerobe Gesamtkeimzahl deutlich. Dies konnte auch Karnop (1980) in seiner Untersuchung der geräucherten Heilbutt-Carbonaden feststellen.

Die mikrobiologischen Untersuchungen ergaben, dass der Bereich des Spittloches als sensibel einzuschätzen ist. Im Bereich des Spittloches konnten stets etwas

höhere, jedoch noch nicht zu beanstandende Keimzahlen nachgewiesen werden. Auch Karnop (1980) konnte feststellen, dass die Keimzahlen im Bereich des Spittloches beim Heilbutt 2 log höher lagen, als die durchschnittliche Keimzahl des übrigen Fischfleisches.

Bei Untersuchung des frisch gegarten und des 12 Tage gelagerten Heilbutts war zu erkennen, dass die Keimzahl der Haut des mit dem Injektionsverfahren behandelten Fisches tendenziell über der des Standards (Behandlung mit Salzlake) und des lakebehandelten (Behandlung mit Salzlake in Kombination mit Transglutaminase) Fisches lag. Aus diesen Ergebnissen ist abzuleiten, dass das Injektionsverfahren eine gute Rohwarenqualität erfordert, da eine Reduktion der Keimzahl durch die Salzbehandlung auf der Haut fehlt. Eine erhöhte Kontamination des Fischfleisches durch das Injektionsverfahren, wie von Eklund et al. (1995) beschrieben, konnte in den eigenen Untersuchungen nicht festgestellt werden.

## 8 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Einsatz von Transglutaminase zur Verbesserung der Verarbeitungsfähigkeit von Schwarzem Heilbutt beiträgt. Durch die verfestigte Textur entstehen geringere Transportverluste; zudem entstehen durch den Transglutaminase-Einsatz geringere Gewichtsverluste beim Garen. Die Reduzierung von Verlusten führt auch unter Berücksichtigung der Kosten für Transglutaminase zu einer positiven ökologischen und ökonomischen Bilanzierung des Transglutaminase-Einsatzes bei Schwarzem Heilbutt.

Aus Sicht der fischverarbeitenden Industrie ist positiv zu bewerten, dass die Prozesslinie zur Verarbeitung des Schwarzen Heilbutts durch den Einsatz der Transglutaminase nicht umgestellt werden muss. Sämtliche Prozessschritte können in der herkömmlichen Gestaltung beibehalten werden; lediglich die Salzlake wird zusätzlich mit Transglutaminase versetzt. Kostenintensive Anschaffungen (z. B. Injektionsmaschinen) oder prozessverlängernde Schritte sind nicht erforderlich, um die Textur des Heilbutts zu verbessern.

Überträgt man die Ergebnisse des Schwarzen Heilbutts auf andere Fische, so ist zu erwarten, dass das Einsparpotenzial durch Transglutaminase dort noch höher ausfallen wird, da der Heilbutt hinsichtlich seiner Verarbeitung und auch hinsichtlich des Transglutaminase-Einsatzes als sehr schwierig zu bewerten ist. Vergleichbare Untersuchungen wurden unter Verwendung von Regenbogenforellen von Grotheer (persönliche Mitteilung, 2004) durchgeführt. Hier zeigte sich zum einen, dass die Verfestigung der Forellenfilets mittels Transglutaminase stärker, und dass zum anderen die Schwankungsbreite der Texturverfestigung deutlich geringer ausfiel. Zudem bestand dort die Möglichkeit, die verwendete Transglutaminase-Konzentration deutlich unter die beim Heilbutt benötigte Konzentration zu senken. Durch den Transglutaminase-Einsatz wird die Möglichkeit eröffnet, neue Fischarten verarbeiten und anbieten zu können, deren Fleisch bisher für den kommerziellen Einsatz als zu weich galt.

Grundsätzlich besteht durch den Einsatz von Transglutaminase die Möglichkeit, die Gartemperatur zu erhöhen, ohne höhere Produktverluste, z. B. durch zerfallene

Fischfilets, akzeptieren zu müssen. Auf diese Weise kann die mikrobiologische Sicherheit von Fischprodukten vergrößert werden.

Insgesamt wiesen die Texturergebnisse bei der Verarbeitung des Schwarzen Heilbutts große Schwankungsbreiten auf. Dies ist mit der Tatsache zu erklären, dass es sich bei den Heilbutt-Carbonaden um einen natürlichen Rohstoff handelt. Die ungleichmäßige Fett- und Proteinverteilung, die für den Schwarzen Heilbutt typisch ist, erschwert die zielgenaue Applikation der Transglutaminase. Der relativ hohe Fettgehalt, der schwankende Proteingehalt sowie die ungleichmäßige Fettverteilung konnten als Faktoren ermittelt werden, die die Wirkung der Transglutaminase beeinträchtigen können. Fettbarrieren können die gleichmäßige Verteilung der Transglutaminase im Fischmuskel erschweren. Ein weiterer möglicher Faktor, der zu ungleichmäßiger Wirkung der Transglutaminase von Charge zu Charge führt, ist die unterschiedlich lang andauernde Gefrierlagerung des Heilbutt vor seiner Verarbeitung. Im Vergleich zu anderen Fischen ist die Texturverfestigung durch Transglutaminase aufgrund dieser Tatsachen beim Schwarzen Heilbutt erschwert. Diese Faktoren sind von der fischverarbeitenden Industrie kaum zu beeinflussen, so dass Schwankungen in der Verfestigung in Kauf genommen werden müssen. Durch den Einsatz von Transglutaminase gelingt es zwar, die Festigkeit zu erhöhen, nicht jedoch eine standardisierte Festigkeit vom Kopf bis zur Schwanzflosse und von Fisch zu Fisch herzustellen.

## 9 Literatur

Aeschlimann, D.; Paulsson, M. (1994)

Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thromb. Haemostasis* 71, 402-415.

Ando, H.; Matsura, A.; Susumu, H. (1992)

Manufacture of transglutaminase with *Streptomyces*. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP* 04108381.

Ando, H.; Adachi, M.; Umeda, K.; Matsuura, A.; Nonaka, M.; Uchio, R.; Tanaka, H.; Motoki, K. (1989)

Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 53, 2613-2617

Araki, H.; Seki, N. (1993)

Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosins. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 711-719.

Armbrust, C.; Werlein, H.-D.; Watkinson, B. M. (2003)

Transglutaminase – Einsatz und Wirkung in Fischprodukten. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* 99, 181-187.

Armbrust, C.; Werlein, H.-D.; Watkinson, B. M. (2003a)

Einfluss der Transglutaminase auf die Textur von Fischfarcen. GDL-Kongress Lebensmitteltechnologie, 25.-27. September 2003, Stuttgart-Hohenheim.

Armbrust, C.; Werlein, H.-D.; Spauka, R.; Watkinson, B. M. (2003b)

Influence of transglutaminase and various salts on the processing character of Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). 4<sup>th</sup> International Conference on Predictive Modelling in Foods, 15.-19. Juni 2003, Quimper, France.

- Armbrust, C.; Froeck, M.; Werlein, H.-D.; Watkinson, B. M. (2005)  
The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial Transglutaminase. *Food Control* 16, 735-737.
- Autio, K.; Kruus, K.; Knaapila, A.; Gerber, N.; Flander, L.; Buchert, J. (2005)  
Kinetics of transglutaminase-induced cross-linking of wheat proteins in dough. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1039-1045.
- Bailey, A. J. (1972)  
The basis of meat texture. *J. Food Sci.* 23, 995-1007.
- Baker, K. H.; Lanier, T. C.; Green, D. P. (2000)  
Cold restructuring of seafood using transglutaminase-mediated binding. IFT Annual Meeting 2000. [http://ift.confex.com/ift/2000/techprogram/paper\\_4365.htm](http://ift.confex.com/ift/2000/techprogram/paper_4365.htm)
- Bauer, N.; Koehler, P.; Wieser, H.; Schieberle, P. (2003)  
Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat. I. Biochemical analysis. *Cereal Chem.* 80, 781-786.
- Belitz, H.D.; Grosch, W. (1992)  
*Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Benjakul, S.; Visessanguan, W. (2003)  
Transglutaminase-mediated setting in bigeye snapper surimi. *Food Res. Int.* 36, 253-266.
- Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Tanaka, M.; Ishizaki, S.; Suthidham, R.; Sungpech, O. (2000)  
Effect of chitin and chitosan on gelling properties of surimi from barred garfish (*Hemiramphus far*). *J. Sci. Food Agric.* 81, 102-108.

Botta, J. R. (1995)

Evaluation of Seafood Freshness Quality. VCH Publishers Inc., New York, USA.

Botta, J. R.; Bonnell, G.; Squires, B. E. (1987)

Effect of method of catching and time of season on sensory quality of fresh Atlantic cod (*Gadus morhua*). J. Food Sci. 52, 928-932.

Bowering, W. R.; Nedreaas, K. H. (2001)

Age validation and growth of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum)): A comparison of populations in the Northwest and Northeast Atlantic. Sarsia 86, 53-68.

Buck, E. M.; Borhan, M.; Hultin, H. O.; Damon Jr., R. A. (1986)

Changes in texture and flavour of red hake sticks as effected by frozen storage form. J. Food Sci. 51, 1063-1064.

Budemann, A. (2003)

Enzyme – die Katalysatoren des Lebens. Vortrag GDL-Kongress, Juni 2003, Osna-brück.

Chamberlain, A. I.; Kow, F.; Balasubramaniam, E. (1993)

Instrumental method for measuring texture of fish. Food Australia 45, 439-443.

Colmenero, J. F.; Ayo, M. J.; Carballo, J. (2005)

Physicochemical properties of low sodium frankfurter with added walnut: effect of transglutaminase combined with caseinate, KCl and dietary fibre as salt replacers. Meat Sci. 69, 781-788.

Connellan, J. M.; Chung, S. I.; Whetzel, N. K.; Bradley, L. M.; Folk, J. E. (1971)

Structural properties of guinea pig liver transglutaminase. J. Biol. Chem. 246, 1093-1095.

Coppes, Z.; Pavlisko, A.; De Vecchi, S. (2002)

Texture measurements in fish and fish products. J. Aquat. Food Prod. Technol. 11, 89-105.

De Backer-Royer, C.; Meunier, J.-C. (1992)

Effect of temperature and pH on factor XIIIa from human placenta. Biochem. 24, 637-642.

DIN 10106

Bestimmung von Enterococcus faecalis und Enterococcus faecium; Spatelverfahren. September 1991.

DIN 10163 Teil 2

Bestimmung Koagluase-positiver Staphylokokken; Tropfplatten-Verfahren. Juni 1985.

DIN 10183 Teil 1

Bestimmung der Escherichia coli; Verfahren mit flüssigem Nährmedium. Mai 1991.

DIN 10186

Bestimmung der Anzahl von Hefen und Schimmelpilzen; Referenzverfahren. November 1991.

DIN EN 866-1

Biologische Systeme für die Prüfung von Sterilisatoren und Sterilisationsverfahren; Teil 1: Allgemeine Anforderungen. Mai 1997.

DIN EN ISO 14040

Umweltmanagement – Ökobilanz – Prinzipien und allgemeine Anforderungen. August 1997.

DIN EN ISO 14041

Umweltmanagement – Ökobilanz – Festlegung des Ziels und des Untersuchungsrahmens sowie Sachbilanz. November 1998.

DIN EN ISO 14042

Umweltmanagement – Ökobilanz – Wirkungsabschätzung. Juli 2000.

DIN EN ISO 14043

Umweltmanagement – Ökobilanz – Auswertung. Juli 2000.

DIN ISO 13720

Zählung von *Pseudomonas* spp. Mai 1998.

Dunajski, E. (1979)

Texture of fish muscle. *J. Texture Stud.* 10, 301-318.

Eissa, A. S.; Bisram, S.; Khan, S. A. (2004)

Polymerisation and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4456-4464.

Eklund, M. W.; Poysky, F. T.; Paranjpye, R. N.; Lashbrook, L. C.; Peterson, M. E.; Pelroy, G. A. (1995)

Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold smoked fishery products and processing plants. *J. Food Prot.* 58, 502-508.

Engel, K.-H.; Moreano, F.; Sakamoto, J. (2000)

Mikrobielle Transglutaminase in der Lebensmittelindustrie – Grundlagen. In: *Enzyme in der Lebensmitteltechnologie*. Lösche, K. (Hrsg.), Behr's Verlag, Hamburg.

Etienne, M.; Jérôme, M.; Fleurence, J.; Rehbein, H.; Kündiger, R.; Mendes, R.; Costa, H.; Pérez-Martín, R.; Pineiro-González, C.; Craig, A.; Mackie, I.; Yman, I. M.; Ferm, M.; Martínez, I.; Jessen, F.; Smelt, A.; Luten, J. (2000)

Identification of fish species after cooking by SDS-PAGE and Urea IEF: A collaborative study. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2653-2658.

Færgemand, M.; Sørensen, M. V.; Jørgensen, U.; Budolfsen, G.; Qvist, K. B. (1999)  
Transglutaminase: effect on instrumental and sensory texture of set style yoghurt. *Milchwissensch.* 54, 563-566.

Folk, J. E.; Cole, P. W. (1966)

Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 241, 5518-5525.

Folk, J. E. (1980)

Transglutaminases. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 517-531.

Folk, J. E.; Chung, S. I. (1973)

Molecular and catalytic properties of transglutaminases. *Adv. Enzymol.* 38, 109-191.

Folk, J. E.; Finlayson, J. S. (1977)

The  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminase. *Adv. Protein Chem.* 31, 1-133.

Froeck, M. (1999)

Methodische Arbeiten zur Entwicklung verbesserter Enzymaktivitätsbestimmungen von Xylanasen und Glucanasen in komplexen Proben (Futtermittel und Digesta). Dissertation, Berlin.

Fuchsbaier, H.-L.; Pasternack, R. (1996)

Transglutaminasen – Biologische Proteinvernetzer für Produkte von morgen. Querschnitt, Beiträge aus Forschung und Entwicklung der Fachhochschule Darmstadt. 10. Ausgabe, April 1996, 92-103.

Gadd, R. E. A.; Buttkus, H. (1964)

Shear force changes in thawed raw and cooked fish muscle. FAO Symposium on the Significance of Fundamental Research in the Utilisation of Fish. Husum, WP (III)1.

Gerber, U.; Jucknischke, U.; Putzien, S.; Fuchsbauer, H. L. (1994)

A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. Biochem. J. 299, 825-829.

Gill, T.; Chan, J. K.; Phonchareon, K. F.; Paulson, A. T. (1992)

Effect of salt concentration and temperature on heat-induced aggregation and gelation of fish myosin. Food Res. Int. 25, 333-341.

Gimeno, O.; Astiasarán, I.; Bello, J. (1999)

Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl<sub>2</sub> on texture and color of dry fermented sausages. J. Agric. Food Chem. 47, 873-877.

Gómez-Guillén, M. C.; Sarabia, A. I.; Solas, M. T.; Montero, P. (2001)

Effect of microbial transglutaminase on the functional properties of megrim (*Lepidorhombus boschii*) skin gelatin. J. Sci. Food Agric. 81, 665-673.

Gustavson, K. H. (1956)

The chemistry and reactivity of collagen. Academic Press, New York.

Hamann, D. D. (1988)

Rheology as a means of evaluating muscle functionality of processed foods. Food Technol. 42, 66-71.

Hammer, F. G. (1998)

Mikrobielle Transglutaminase und Diphosphat bei feinzerkleinerter Brühwurst. Fleischwirtsch. 78, 1155-1162.

Hatae, K.; Yoshimatsu, F.; Matsumoto, J. J. (1984)

Discriminative characterization of different texture profiles of various cooked fish muscles. *J. Food Sci.* 49, 721-726.

Ho, M. L.; Leu, S. Z.; Hsieh, J. F.; Jiang, S. T. (2000)

Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial Transglutaminase produced from *Streptovorticillium ladakanum*. *J. Food Sci.* 65, 76-80.

Hoogenkamp, H. W. (1994)

Coextrusion. Funktionelle Bedeutung fleischfremder Ingredientien. *Fleischwirtsch.* 74, 476-483.

Honikel, K.-O.; Schwägele, F. (1998)

Biochemische Prozesse der Fleischbildung. In: *Qualität von Fleisch und Fleischwaren*, Bd. 2. Branscheid, W.; Honikel, K.-O.; von Lengerken, G.; Troeger, K. (Hrsg.). Deutscher Fachverlag, Frankfurt am Main.

Huss, H. H. (1995)

Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper 348*, Food and Agriculture Organisation of the United Nations.

Icekson, I.; Apelbaum, A. (1987)

Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiol.* 84, 972-974.

ICMSF (1986)

*Microorganisms in Foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications.* 2<sup>nd</sup> Ed. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. University of Toronto Press, Toronto.

Jaturasitha, S.; Thirawong, P.; Leangwunta, V.; Kreuzer, M. (2004)

Reducing toughness of beef from *Bos indicus* draught steers by injection of calcium chloride: Effect of concentration and time postmortem. *Meat Sci.* 68, 61-69.

Jiang, S.-T.; Hsieh, J.-F.; Ho, M.-L.; Chung, Y.-C. (2000)

Microbial transglutaminase affects gel properties of golden threadfin-bream and pollack surimi. *J. Food Sci.* 65, 694-699.

Kamath, G. G.; Lanier, T. C.; Foegeding, E. A.; Hamann, D. D. (1992)

Nondisulfide covalent cross-linking of myosin heavy chain in „setting“ of Alaska pollock and Atlantic croaker surimi. *J. Food Biochem.* 16, 151-172.

Kang, I.-S.; Lanier, T. C. (2000)

Heat-induced softening of surimi gels by proteinases. In: *Surimi and surimi seafood*. Park, J. W. (ed.). Marcel Dekker Inc., New York

Karnop, G. (1980)

Qualität und Lagerverhalten heiß geräucherter Fischereiprodukte. I. Sensorische und mikrobiologische Beschaffenheit von rauchfrischem Heilbutt, Bückling und Aal. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* 76, 42-47.

Kato, A.; Wada, T.; Kobayashi, K.; Seguro, K.; Motoki, M. (1991)

Ovomucin-food protein conjugates prepared through the transglutaminase reaction. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1027-1031.

Katsaras, K.; Peetz, P. (1994)

Sojaproteine. Wirkung auf die technologischen und morphologischen Eigenschaften von Brühwurst. *Fleischwirtsch.* 74, 855-860.

Kim, S.-H.; Carpenter, J. A.; Lanier, T. C.; Wicker, L. (1993)

Setting response of Alaska pollock surimi compared with beef myofibrils. *J. Food Sci.* 58, 531-534.

Kimura, I.; Sugimoto, M.; Toyoda, K.; Seki, N.; Arai, K.; Fujita, T. (1991)

A study on the cross-linking reaction of myosin in kamaboko „suwari“ gels. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 1389-1396.

Kishi, H.; Nozawa, H.; Seki, N. (1991)

Reactivity of muscle transglutaminase on carp myofibrils and myosin B. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 1203-1210.

Kleickmann, A.; Schellhaas, G. (1979)

Zum Keimgehalt von Räucherfischen. *Arch. Lebensm. Hyg.* 30, 26-29.

Klein, J. D.; Guzman, E.; Kuehn, G. D. (1992)

Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. *J. Bacteriol.* 174, 2599-2605.

Koch, W. (1996)

Technologie der Zusatzstoffe – Phosphate – Anwendung und Wirkung in Lebensmitteln. Band 3 der Schriftenreihe Lebensmittelchemie und Lebensmittelqualität. Lebensmittelchemische Gesellschaft – Fachgruppe der GDCh (Hrsg.). 2. Auflage. Behr's Verlag, Hamburg.

Krueger, D. J.; Fennema, O. (1989)

Effect of chemical additives on toughening of fillets of frozen Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*). *J. Food Sci.* 54, 1101-1106.

Kumazawa, Y; Numazawa, T.; Seguro, K.; Takamura, M.; Motoki, M. (1993)

Participation of transglutaminase in the manufacturing process of "kamaboko". Paper no. 124A, 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Institute of Food Technologists, Chicago, IL, July 10-14.

Kuraishi, C.; Yamazaki, K.; Susa, Y. (2001)

Transglutaminase: its utilisation in the food industry. *Food Rev. Int.* 17, 221-246.

Kuraishi, C.; Sakamoto, J.; Soeda, T. (1998)

Anwendung von Transglutaminase für die Fleischverarbeitung. *Fleischwirtsch.* 78, 657-660.

Kuraishi, C.; Sakamoto, J.; Yamazaki, K.; Susa, Y.; Kuhara, C.; Soeda, T. (1997)  
Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. J. Food Sci. 62, 488-490.

Kurth, L.; Rogers, P. J. (1984)

Transglutaminase-catalyzed cross-linking of myosin to soy protein, casein and gluten. J. Food Sci. 49, 573-589.

L 00.00-20

Untersuchung von Lebensmitteln; Horizontales Verfahren für den Nachweis von Salmonellen. September 1998.

L 01.00-3

Untersuchung von Lebensmitteln; Bestimmung der coliformen Keime in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis. März 1987.

L 01.00-37

Untersuchung von Lebensmitteln; Bestimmung der Anzahl von Hefen und Schimmelpilzen in Milch und Milchprodukten. Dezember 1991.

L 05.00-5

Untersuchung von Lebensmitteln; Bestimmung von Enterobacteriaceae in Eiern, Eiprodukten, Mayonnaisen, emulgierten Soßen und kalten Fertigsoßen. Juni 1990.

L 06.00-3

Untersuchung von Lebensmitteln; Bestimmung der Trockenmasse in Fleisch und Fleischerzeugnissen. September 1980.

L 06.00-6

Untersuchung von Lebensmitteln; Bestimmung des Gesamtfettgehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen. September 1980.

L 06.00-7

Untersuchung von Lebensmitteln; Bestimmung des Rohproteingehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Dezember 1989.

L 06.00-18

Untersuchung von Lebensmitteln; Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Mai 1984.

L 06.00-20

Untersuchung von Lebensmitteln; Bestimmung von *Clostridium perfringens* in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Mai 1984.

L 06.00-39

Untersuchung von Lebensmitteln; Bestimmung von mesophilen sulfitreduzierenden Clostridien in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Mai 1994.

Lämmli, U.-K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680.

Lampila, L. E. (1990)

Comparative microstructure of red meat, poultry and fish muscle. *J. Muscle Foods* 1, 247-267.

Lawrence, T. E.; Dikeman, M. E.; Hunt, M. C.; Kastner, C. L.; Johnson, D. E. (2003)

Effects of calcium salts on beef longissimus quality. *Meat Sci.* 64, 299-308.

LeBlanc, E.; LeBlanc, R. J.; Blum, I. E. (1988)

Prediction of quality in frozen cod (*Gadus morhua*) fillets. *J. Food Sci.* 53, 999-1004.

Lee, H. G.; Lanier, T. C.; Hamann, D. D.; Knopp, J. A. (1997)

Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J. Food Sci.* 62, 20-24.

Lee, C. M.; Chung, K. H. (1989)

Analysis of surimi gel properties by compression and penetration tests. *J. Texture Stud.* 20, 363-377.

Lim, H. K.; Haard, N. F. (1984)

Protein insolubilization in frozen Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *J. Food Biochem.* 8, 163-167.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951)

Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 19, 265-275.

Main, G.; Ross, R. I.; Sutton, A. H. (1972)

A texturometer for measuring the toughness of cooked fish. *Lab. Pract.* 21, 185-188.

Makinodan, Y.; Toyohara, H.; Ikeda, S. (1983)

On the existence of acid, neutral and alkaline proteinases in fish muscle. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49, 109-112.

Margosiak, S. A.; Alavarets, M. E.; Louie, D.; Kuhlen, G. D. (1990)

Identification of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Plant Physiol.* 92, 88-96.

Maruyama, N.; Nozawa, H.; Kimura, I.; Satake, M.; Seki, N. (1995)

Transglutaminase-induced polymerisation of a mixture of different fish myosins. *Fish. Sci.* 61, 495-500.

Matheis, G.; Whitaker, J. R. (1987)

A Review: Enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *J. Food Biochem.* 11, 309-327.

McFarlane, B. J.; Unruh, J. A. (1996)

Effects of blast chilling and postmortem calcium chloride injection on tenderness of pork longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 74, 1842-1845.

Morales, O. G.; Ramirez, J. A.; Vivanco, D. I.; Vazquez, M. (2001)

Surimi of the species from the Gulf of Mexico: evaluation of the setting phenomenon. *Food Chem.* 75, 43-48.

Motoki, M.; Seguro, K. (1998)

Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 204-210

Motoki, M.; Nio, N. (1983)

Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. *J. Food Sci.* 48, 561-566.

Müller, W.-D. (2003)

Einfluss der Verwendung von Phosphat und Transglutaminase auf Qualitätsparameter von Kochschinken. 38. Kulmbacher Woche, 6. – 7. Mai 2003, Kurzfassungen der Fachvorträge, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach. ([http://www.bfa-fleisch.de/kuwo2003\\_gesamt.htm](http://www.bfa-fleisch.de/kuwo2003_gesamt.htm))

Ni, S.; Nozawa, H.; Seki, N. (1999)

The combined effect of transglutaminase and protease inhibitors on the thermal gelation of actomyosin sol from carp and salmon muscles. *Fish. Sci.* 65, 606-612.

Ni, S.; Nozawa, H.; Seki, N. (1998)

Effect of microbial transglutaminase on thermal gelation of carp actomyosin sol. *Fish. Sci.* 64, 434-438.

Nielsen, P. M. (1995)

Reactions and potential industrial applications of Transglutaminase. *Food Biotechnol.* 9, 119-156.

Nielsen, G. S.; Petersen, B. R.; Møller, A. J. (1995)

Impact of salt, phosphate and temperature on the effect of a transglutaminase (F XIIIa) on the texture of restructured meat. *Meat Sci.* 41, 293-299.

Nishimoto, S.; Hashimoto, N.; Seki, N.; Kimura, I.; Toyoda, K.; Fujita, T.; Arai, K. (1987)

Influencing factors on changes in myosin heavy chain and jelly strength of salted meat paste from Alaska pollack during setting. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53, 2011-2020.

Nishimoto, S.; Hashimoto, A.; Seki, N.; Arai, K. (1988)

Setting of mixed salted meat paste of two fish species in relation to crosslinking reaction of myosin heavy chain. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54, 1227-1235.

Nonaka, M.; Tanaka, H.; Okiyama, A.; Motoki, M.; Ando, H.; Umeda, K.; Matsuura, A. (1989)

Polymerization of several proteins by  $\text{Ca}^{2+}$ -independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 53, 2619-2623.

Ofstad, R.; Grahlmsden, E.; Gundersen, B.; Lauritzen, K.; Solberg, T.; Solberg, C. (1993)

Stability of cod (*Gadus Morhua* L) surimi processed with  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  added to the wash water. *Int. J. Food Sci. Technol.* 28, 419-427.

Paardekooper, E. J. C.; Wijngaards, G. (1986)

Composite meat product and method for the manufacture thereof. *Eur. Pat. Appl.*, Publication Number: 0 201 975.

Papa, I.; Alvarez, C.; Verrei-Bagnis, V.; Fleurence, J.; Benjamin, Y. (1997)

Evidence for time dependent alpha-actinin delocalisation and proteolysis from post mortem fish white muscle (*Dicentrarchus labrax* and *Salmo trutta*). In: *Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality*. Luten, J. B.; Borresen, T.; Oehlenschläger, J. (eds.). Elsevier Science, New York.

Park, J. W. (2000)

Ingredient technology and formulation development. In: Surimi and surimi seafood. Park, J. W. (ed.). Marcel Dekker, New York.

Pasternack, R. (1998)

Mikrobielle Transglutaminase von *Streptoverticillium* spezies: Nachweis, Charakterisierung und Regulationsmechanismus der Enzyme. Dissertation, Darmstadt.

Perez, M. L.; Escalona, H.; Guerriero, I. (1998)

Effect of calcium marination on calpain and quality characteristics of meat from chicken, horse, cattle and rabbit. Meat Sci. 48, 125-134.

Polidori, P.; Marinucci, M. T.; Fantuz, F.; Renieri, C.; Polidori, F. (2000)

Tenderization of wether lambs meat through pre-rigor infusion of calcium ions. Meat Sci. 55, 197-200.

Priebe, K.; Reichstein, K. (1975)

Beobachtungen und Untersuchungen zum Problem von Konsistenzmängeln bei geräuchertem Schwarzen Heilbutt (*Reinhardtius hippoglossoides*). Arch. Lebensm. Hyg. 26, 121-128.

Raeuber, H.-J. (1993)

Fleisch, Fisch und deren Produkte. In: Rheologie der Lebensmittel. Weipert, D.; Tscheuschner, H.-D.; Windhab, E. (Hrsg.). Behr's Verlag, Hamburg.

Ramanujam, M. V.; Hageman, J. H. (1990)

Intracellular transglutaminase (EC 2.3.2.13) in a procaryote: Evidence from vegetable and sporulating cells of *Bacillus subtilis* 168. FASEB J. 4, A3630.

Rehbein, H.; Oehlenschläger, J. (1996)

Fische und Fischerzeugnisse, Krebs- und Weichtiere. In: Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Franzke, C. (Hrsg.). Behr's Verlag, Hamburg.

Richtlinie 89/107/EWG

Zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Zusatzstoffe, die in Lebensmitteln verwendet werden dürfen; vom 21.12.1988 (ABl. Nr. 1140/72, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1882/2003, ABl. Nr. L 284).

Rigby, B. J. (1968)

Amino acid composition and thermal stability of skin collagen of the Antarctic icefish. *Nature* 219, 166-167.

Sakamoto, H.; Kumazawa, Y.; Ohtsuka, T.; Toiguchi, S.; Motoki, M. (1995)

Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture. *J. Food Sci.* 60, 300-304.

Sato, K.; Tsukamasa, Y.; Imai, C.; Ohtsuki, K.; Shimizu, Y.; Kawabata, M. (1992)

Improved method for identification and determination of  $\epsilon$  ( $\gamma$ -glutamyl)lysine cross-link in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by high-performance liquid chromatography separation. *J. Agric. Food Chem.* 40, 806-810.

Schubring, R. (1999)

Untersuchung von Einflußfaktoren auf die instrumentelle Texturprofilanalyse (TPA) von Fischerzeugnissen, 1. Einfluß der Kompression. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* 95, 373-386.

Schubring, R. (2000)

Untersuchung von Einflußfaktoren auf die instrumentelle Texturprofilanalyse (TPA) von Fischerzeugnissen, 2. Einfluß von Messgeschwindigkeit und Kompression. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* 96, 45-50.

Seki, N.; Uno, H.; Lee, N.-H.; Kimura, I.; Toyoda, K.; Fujita, T.; Arai, K. (1990)

Transglutaminase activity in Alaska pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin B. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56, 125-132.

Seguro, K.; Kumazawa, Y.; Ohtsuka, T.; Toiguchi, S.; Motoki, M. (1995)  
Microbial transglutaminase and  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine crosslink effects on elastic properties of kamaboko gels. *J. Food Sci.* 60, 305-311.

Seguro, K.; Kumazawa, Y.; Kuraishi, C.; Sakamoto, H.; Motoki, M. (1996)  
The  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine moiety in crosslinked caseins is an available source of lysine for rats. *J. Nutr.* 126, 2557-2562.

Seguro, K.; Nio, N.; Motoki, M. (1996)  
Some characteristics of a microbial protein cross-linking enzyme: Transglutaminase. In: *Macromolecular Interactions in Food Technology (ACS Symposium Series 650)*, 271-280, American Chemical Society.

Seguro, K. (1999)  
Transglutaminase. In: *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Bioanalysis and Bioseparation*. Flickinger, M.; Drew, S. W. (eds.). John Wiley & Sons, Inc.

Shama, F.; Sherman, P. (1973)  
Evaluation of some textural properties of foods with the Instron Universal testing machine. *J. Texture Stud.* 3, 344-352.

Sielaff, H. (1996)  
*Fleischtechnologie*. 1. Auflage. Behr's Verlag, Hamburg.

Signorini, M.; Beninati, S.; Bergamini, C. M. (1991)  
Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Plant Physiol.* 137, 547-552.

Sigurgisladottir, S.; Ingvarsdottir, H.; Torrissen, O. J.; Cardinal, M.; Hafsteinsson, H. (2000)

Effects of freezing/thawing on the microstructure and the texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Res. Int.* 33, 857-865.

Sikorski, Z. E.; Kolodziejska, I. (2002)

Microbial Risks in Mild Hot Smoking of Fish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 35-51.

Souci, S. W.; Fachmann, W.; Kraut, H.; Scherz, H.; Senser, F. (2000)

Die Zusammensetzung der Lebensmittel - Nährwert-Tabellen. medpharm CRC Press, Stuttgart.

Taneda, T.; Watanabe, T.; Seki, N. (1983)

Purification and some properties of a calpain from carp muscle. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49, 219-228.

Torley, P. J.; Lanier, T. C. (1992)

Setting ability of salted beef/pollock surimi mixtures. In: *Seafood Science and Technology*. Bilgh, E. G. (ed.). Fishing News Books, Ltd., Oxford, 305-316.

Toyohara, H.; Makinodan, Y. (1989)

Comparison of calpain I and II from carp muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B, 577-581.

Troeger, K. (1998)

Brühwurst. In: *Qualität von Fleisch und Fleischwaren*, Bd. 2. Branscheid, W.; Honikel, K.-O.; von Lengerken, G.; Troeger, K. (Hrsg.). Deutscher Fachverlag, Frankfurt am Main.

Truong, V.-D.; Clare, D. A.; Catignani, G. L.; Swaisgood, H. E. (2004)

Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1170-1176.

Tsai, G.-J.; Lin, S.-M.; Jiang, S.-T. (1996)

Transglutaminase from *Streptovercillium ladakanum* and application to minced fish product. *J. Food Sci.* 61, 1234-1238.

Tsukamasa, Y.; Shimizu, Y. (1990)

Factors effecting the transglutaminase-associated setting phenomenon in fish meat sol. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 535-540.

Tsukamasa, Y.; Sato, K.; Imai, C.; Shimizu, Y.; Sugiyama, M.; Minegishi, Y.; Kawabata, M. (1993)

$\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine crosslink formation in sardine myofibril sol during setting at 25 °C. *J. Food Sci.* 58, 785-787.

Tülsner, M. (1994)

Fischverarbeitung. Rohstoffeigenschaften von Fisch und Grundlagen der Verarbeitungsprozesse. Behr's Verlag, Hamburg.

Voisey, P. W. (1972)

The texture of canned herrings. Rept. 7022-1, Eng. Rs. Service., Canada Agriculture, Ottawa.

Wan, J.; Miura, J.; Seki, N. (1992)

Effects of monovalent cations on cross-linking of myosins in suwari gels from walleye pollack. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 583-590.

Wan, J.; Kimura, I.; Satake, M.; Seki, N. (1994)

Effect of calcium ion concentration on the gelling properties and transglutaminase activity of walleye pollack surimi paste. *Fish. Sci.* 60, 107-113.

Washizu, K.; Ando, K.; Koikeda, S.; Hirose, S.; Matsuura, A.; Takagi, H.; Motoki, M.; Takeuchi, K. (1994)

Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovercillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 82-87.

Werlein, H.-D. (1997)

Die Sous-Vide Technologie. Bewertung der Qualität mittels instrumenteller und sensorischer Verfahren. Cuvillier Verlag, Göttingen.

Wheeler, T. L.; Crouse, J. D.; Koohmaraie, M. (1992)

The effect of postmortem time of injection and freezing on the effectiveness of calcium chloride for improving beef tenderness. J. Anim. Sci. 70, 3451-3457.

Yokoyama, K.; Nio, N.; Kikuchi, Y. (2004)

Properties and applications of microbial transglutaminase. Appl. Microbiol. Biotechnol 64, 447-454.

Young, L. L.; Garcia, J. M.; Papa, C. M. (1991)

Effect of divalent cations on biochemical and functional parameters of pre- und postrigor chicken breast fillets. Poult. Sci. 70, 2354-2358.

Zellner, M. (2000)

Transglutaminase – Proteine natürlich vernetzen. In: Enzyme in der Lebensmitteltechnologie. Lösche, K. (Hrsg.). Behr's Verlag, Hamburg.

Zhu, Y.; Rinzema, A.; Tramper, J.; Bol, J. (1995)

Microbial transglutaminase – a review of its production and application in food processing. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 277-282

### **Internetadressen**

[http://europa.eu.int/comm/fisheries/news\\_corner/press/inf03\\_39\\_de.htm](http://europa.eu.int/comm/fisheries/news_corner/press/inf03_39_de.htm), 28.10.03

## 10 Anhang

### 10.1 Kapitel 2

**Tab. 10.1: Mittlere Festigkeit (maximale Kompressionskraft) der Fischfarce mit (15 IE 100 g<sup>-1</sup> Fischfarce) und ohne Transglutaminase (n=10)**

	Max. Kompressionskraft der Fischfarce ohne TG (N)	Max. Kompressionskraft der Fischfarce mit TG (N)
Schwarzer Heilbutt	26,1 ± 1,7	28,0 ± 1,0
Regenbogenforelle	33,8 ± 3,6	45,8 ± 1,2
Seelachs	32,7 ± 1,8	53,8 ± 1,9
Kabeljau	38,8 ± 1,4	51,8 ± 1,3
Lachs	33,9 ± 1,5	48,8 ± 1,0
Katfisch	27,0 ± 2,3	34,3 ± 1,5
Zander	50,4 ± 2,5	62,3 ± 1,5

**Tab. 10.2: Mittlere Festigkeit (maximale Kompressionskraft) und Gewichtsverlust (%) der gegarten Heilbuttfarce in Abhängigkeit von der eingesetzten Transglutaminase-Konzentration (n=10)**

Maximale Kompressionskraft (N) / Gewichtsverlust (%) in Abhängigkeit von der eingesetzten TG-Konzentration				
Ohne TG	15 IE 100 g <sup>-1</sup> Fisch	30 IE 100 g <sup>-1</sup> Fisch	100 IE 100 g <sup>-1</sup> Fisch	150 IE 100 g <sup>-1</sup> Fisch
21,76 N ± 1,2/ 20,34 %	25,05 N ± 1,9/ 24,61 %	36,13 N ± 1,4/ 28,99 %	40,15 N ± 3,1/ 37,14 %	31,28 N ± 1,3/ 38,62 %

**Tab. 10.3: Mittlere Festigkeit (maximale Kompressionskraft) der gegarten Heilbuttfarce nach Verwendung frischer und tiefgefrorener Heilbuttmuskulatur mit (15 IE 100 g<sup>-1</sup> Fischfarce) und ohne Transglutaminase (n=10)**

	Max. Kompressionskraft (N)
Frischer Heilbutt ohne TG	14,01 ± 1,0
Frischer Heilbutt mit TG	32,43 ± 2,2
TK-gelagerter Heilbutt ohne TG	11,51 ± 1,0
TK-gelagerter Heilbutt mit TG	20,06 ± 1,0

**Tab. 10.4: Mittlere Festigkeit (maximale Kompressionskraft) der Fischfarcen der Versuche 1, 2, 3 und 4 (n=10)**

	Max. Kompressionskraft der Fischfarcen (N)			
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
Heilbutt	31,3 ± 2,3	25,9 ± 1,7	29,3 ± 1,3	21,3 ± 1,3
Heilbutt + TG	37,2 ± 2,3	30,5 ± 2,6	38,4 ± 5,1	28,4 ± 2,1
Heilbutt + Soja	30,6 ± 1,1	24,7 ± 1,5	30,3 ± 1,7	---
Heilbutt + Soja + TG	48,4 ± 3,5	29,4 ± 1,5	36,2 ± 2,0	---
Heilbutt + Phosphat	20,7 ± 1,9	18,8 ± 1,2	16,9 ± 0,4	---
Heilbutt + Phosphat + TG	43,2 ± 1,3	30,0 ± 3,1	47,2 ± 3,6	---
Entfetteter Heilbutt	---	41,5 ± 2,6	---	38,6 ± 3,2
Entfetteter Heilbutt + TG	---	55,4 ± 4,0	---	47,5 ± 3,0
Forelle	44,3 ± 2,2	48,3 ± 2,1	52,5 ± 4,7	---
Forelle + TG	81,7 ± 4,6	90,4 ± 1,8	83,1 ± 7,3	---
Forelle + Soja	---	56,0 ± 3,4	60,0 ± 4,3	---
Forelle + Soja + TG	---	89,0 ± 3,2	80,7 ± 5,8	---
Lachs	39,3 ± 1,8	40,1 ± 2,1	---	---
Lachs + TG	54,8 ± 2,7	51,9 ± 4,0	---	---
Lachs + Soja	---	43,7 ± 1,7	---	---
Lachs + Soja + TG	---	54,0 ± 2,7	---	---

## 10.2 Kapitel 4

**Tab. 10.5: Mittlere Transglutaminase-Aktivität (IE g<sup>-1</sup>) in Abhängigkeit von Natrium- bzw. Kaliumchloridkonzentration (n=6)**

Lösungsmedium	Mittlere Transglutaminase-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> )
Trinkwasser ohne Zusatz	62,7 ± 4,2
Tris-Acetat	92,0 ± 4,9
Trinkwasser + 5 % Natriumchlorid	71,7 ± 8,7
Trinkwasser + 10 % Natriumchlorid	71,5 ± 3,1
Trinkwasser + 15 % Natriumchlorid	70,9 ± 2,3
Trinkwasser + 20 % Natriumchlorid	63,8 ± 4,2
Trinkwasser + 5 % Kaliumchlorid	70,5 ± 1,1
Trinkwasser + 10 % Kaliumchlorid	71,6 ± 1,8
Trinkwasser + 15 % Kaliumchlorid	74,1 ± 4,9
Trinkwasser + 20 % Kaliumchlorid	69,6 ± 2,0

**Tab. 10.6: Mittlere Transglutaminase-Aktivität (IE g<sup>-1</sup>) nach Erhitzung in Abhängigkeit von Natrium-bzw. Kaliumchloridkonzentration (n=6)**

Lösungsmedium	Mittlere Transglutaminase-Aktivität nach Erhitzung (IE g <sup>-1</sup> )			
	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C
Trinkwasser ohne Zusatz	8,9 ± 1,3	1,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0
Tris-Acetat	69,0 ± 4,0	50,9 ± 4,1	9,7 ± 0,7	0,6 ± 0,3
Trinkwasser + 5 % Natriumchlorid	22,2 ± 8,4	3,1 ± 1,2	0,3 ± 0,4	0
Trinkwasser + 10 % Natriumchlorid	39,5 ± 6,5	17,2 ± 1,2	0,9 ± 0,8	0
Trinkwasser + 15 % Natriumchlorid	59,1 ± 7,8	43,4 ± 8,9	1,9 ± 0,1	0
Trinkwasser + 20 % Natriumchlorid	56,7 ± 4,4	46,5 ± 0,6	14,5 ± 3,5	0
Trinkwasser + 5 % Kaliumchlorid	20,1 ± 6,7	2,6 ± 0,0	0	0
Trinkwasser + 10 % Kaliumchlorid	41,0 ± 3,7	11,2 ± 1,5	0	0
Trinkwasser + 15 % Kaliumchlorid	49,3 ± 1,5	24,3 ± 4,0	0,8 ± 1,3	0
Trinkwasser + 20 % Kaliumchlorid	57,0 ± 3,3	45,1 ± 1,3	8,9 ± 2,3	0

**Tab. 10.7: Mittlere Transglutaminase-Aktivität (IE g<sup>-1</sup>) in Abhängigkeit von Magnesium- bzw. Calciumchloridkonzentration (n=6)**

Lösungsmedium	Mittlere Transglutaminase-Aktivität (IE g <sup>-1</sup> )
Trinkwasser ohne Zusatz	62,7 ± 4,2
Trinkwasser + 5 % Magnesiumchlorid	66,5 ± 2,2
Trinkwasser + 10 % Magnesiumchlorid	64,7 ± 2,5
Trinkwasser + 15 % Magnesiumchlorid	69,6 ± 2,0
Trinkwasser + 20 % Magnesiumchlorid	63,0 ± 3,2
Trinkwasser + 5 % Calciumchlorid	57,5 ± 2,0
Trinkwasser + 10 % Calciumchlorid	56,4 ± 0,6
Trinkwasser + 15 % Calciumchlorid	55,1 ± 1,5
Trinkwasser + 20 % Calciumchlorid	53,1 ± 1,2

**Tab. 10.8: Mittlere Transglutaminase-Aktivität (IE g<sup>-1</sup>) nach Erhitzung in Abhängigkeit von Magnesium bzw. Calciumchloridkonzentration (n=6)**

Lösungsmedium	Mittlere Transglutaminase-Aktivität nach Erhitzung (IE g <sup>-1</sup> )			
	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C
Trinkwasser ohne Zusatz	8,9 ± 1,3	1,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0
Trinkwasser + 5 % Magnesiumchlorid	5,0 ± 0,5	0	0	0
Trinkwasser + 10 % Magnesiumchlorid	6,0 ± 0,4	0,5 ± 0,9	0	0
Trinkwasser + 15 % Magnesiumchlorid	11,5 ± 0,7	0,5 ± 0,7	0	0
Trinkwasser + 20 % Magnesiumchlorid	13,2 ± 0,9	0	0	0
Trinkwasser + 5 % Calciumchlorid	2,1 ± 1,7	0	0	0
Trinkwasser + 10 % Calciumchlorid	1,6 ± 0,6	0	0	0
Trinkwasser + 15 % Calciumchlorid	1,1 ± 0,4	0	0	0
Trinkwasser + 20 % Calciumchlorid	0,7 ± 0,3	0	0	0

**Tab. 10.9: Festigkeit (maximale Kompressionskraft) gegarter Heilbuttfarce mit verschiedenen Salzen mit (15 IE 100 g<sup>-1</sup> Fisch) und ohne Transglutaminase (n=10)**

	Max. Kompressionskraft (N)
Heilbuttfarce + NaCl	25,4 ± 0,9
Heilbuttfarce + NaCl + TG	33,5 ± 1,3
Heilbuttfarce + KCl	25,9 ± 1,2
Heilbuttfarce + KCl + TG	30,6 ± 4,3
Heilbuttfarce + MgCl <sub>2</sub>	32,9 ± 2,7
Heilbuttfarce + MgCl <sub>2</sub> + TG	36,2 ± 3,9
Heilbuttfarce + CaCl <sub>2</sub>	33,9 ± 3,8
Heilbuttfarce + CaCl <sub>2</sub> + TG	35,6 ± 3,5

## 10.3 Kapitel 5

**Tab. 10.10: Mittlere Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Salzens (n=10; NaCl=15 %)**

Behandlungsverfahren	Kompressionskraft Gewicht <sup>-1</sup> (N g <sup>-1</sup> )
Versuch 1	
Standard	1,2 ± 0,4
Salzen vor TG	1,9 ± 0,3
Salzen nach TG	1,7 ± 0,4
Versuch 2	
Standard	1,4 ± 0,3
Salzen vor TG	1,9 ± 0,3
Salzen nach TG	2,0 ± 0,2

**Tab. 10.11: Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von Transglutaminase-Behandlungsverfahren und -Konzentration (n=10; NaCl=15 %)**

TG-Behandlungsverfahren und -Konzentration	Kompressionskraft Gewicht <sup>-1</sup> (N g <sup>-1</sup> )
Standard ohne TG	8,6 ± 1,1
Lake 0,15 %	7,5 ± 2,5
Lake 0,3 %	11,4 ± 2,9
Lake 0,5 %	13,8 ± 1,4
Lake 1,0 %	10,4 ± 2,9
Lake 1,5 %	7,9 ± 0,9
Injektion 0,15 %	11,7 ± 1,2
Injektion 0,3 %	10,3 ± 1,3
Injektion 0,5 %	8,3 ± 1,0
Injektion 1,0 %	11,3 ± 2,4
Injektion 1,5 %	7,9 ± 2,2
Injektion 2,0 %	7,7 ± 1,3
Injektion 3,0 %	9,9 ± 2,3
Injektion 4,0 %	8,8 ± 1,7
Injektion 5,0 %	9,4 ± 1,3

**Tab. 10.12: Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) gegarter Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von Abtrocknungstemperatur und –zeit (n=10; NaCl=15 %; Injektionsbehandlung=0,15 % TG (0,03 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein), 10-15 °C; Lakebehandlung=0,5 % TG ( 2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein), 60 min, 10-15 °C)**

Behandlungsverfahren	Kompressionskraft Gewicht <sup>-1</sup> (N g <sup>-1</sup> )
Standard (5 h, 5 °C)	2,7 ± 0,4
Lake (5 h, 5 °C)	2,8 ± 0,6
Standard (5 h, 20 °C)	2,7 ± 0,8
Lake (5 h, 20 °C)	2,6 ± 0,4
Standard (5 h, 40 °C)	3,1 ± 1,1
Lake (5 h, 40 °C)	3,0 ± 0,7
Standard (8 h, 5 °C)	2,6 ± 0,5
Lake (8 h, 5 °C)	2,8 ± 0,6
Standard (> 12 h, 5 °C)	2,6 ± 0,6
Lake (> 12 h, 5 °C)	2,6 ± 0,6
Standard (5 h, 5 °C)	3,8 ± 0,5
Injektion (5 h, 5 °C)	3,5 ± 0,4
Standard (5 h, 20 °C)	3,5 ± 0,5
Injektion (5 h, 20 °C)	4,0 ± 0,6
Standard (5 h, 40 °C)	4,8 ± 0,8
Injektion (5 h, 40 °C)	4,0 ± 0,6
Standard (8 h, 5 °C)	2,9 ± 0,6
Injektion (8 h, 5 °C)	3,3 ± 0,4
Standard (> 12 h, 5 °C)	3,1 ± 0,6
Injektion (> 12 h, 5 °C)	2,8 ± 0,9

**Tab. 10.13: Festigkeit (Kompressionskraft pro Gewicht) der gegarten Heilbutt-Carbonaden in Abhängigkeit von der Laketemperatur (n=10; NaCl=15 %; Lakebehandlung=0,5 % TG (2,8 IE g<sup>-1</sup> Fischprotein), 60 min)**

Behandlungsverfahren, Lake- temperatur	Kompressionskraft Gewicht <sup>-1</sup> (N g <sup>-1</sup> )
Standard, 10-15 °C	3,0 ± 0,4
Lake, 10-15 °C	3,1 ± 0,6
Standard, 20 °C	2,9 ± 0,6
Lake, 20 °C	3,1 ± 0,5
Standard, 30 °C	3,3 ± 0,5
Lake, 30 °C	3,3 ± 0,6