

Verbesserung der Fleischzartheit durch Elektroporation?

M. Hoffmann¹, H. Plettenberg¹, D. Sparborth², J. Unrath², J. Schönau³, M. Kühnel²,
H. Jäger⁴, S. Jahn²

¹ fzmb GmbH Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Bad Langensalza

² FFG Frankenförder Forschungsgesellschaft mbH, Luckenwalde

³ CE-LAB GmbH Prüfzentrum Ilmenau

⁴ TU Berlin, Fachgebiet Lebensmittelbiotechnologie und -prozesstechnik, Berlin

1 Einführung

Die Zartheit von Fleisch ist neben dem Geschmack, der Farbe und Saftigkeit ein zentrales Kriterium zur Beurteilung der Qualität. Durch die unterschiedliche gewebliche Zusammensetzung weisen die einzelnen Teilstücke Unterschiede in der Zartheit auf. Der Anteil wertvoller, zarter Fleischteile am Schlachtkörper ist begrenzt, wird aber von den Verbrauchern fast ausschließlich nachgefragt. Ein großes Interesse an einer Verbesserung der Fleischqualität ist offensichtlich, sowohl bei den Herstellern, als auch bei Industrie und Handel und ganz besonders beim Verbraucher. Dem steht jedoch noch kein industrietaugliches Verfahren gegenüber. Bekannte Technologien sind oft langwierig (z. B. Reifen), lebensmittelrechtlich problematisch (z. B. der Einsatz von Enzymen) oder verändern das Produkt zu stark (z. B. Steakern). Um einen höheren Anteil von Fleisch in steakfähiger Qualität mit hohem Qualitätsniveau zu erzeugen ist es das Ziel aktueller Forschungsarbeiten, eine Technologie zur Verbesserung der Fleischzartheit zu entwickeln, welche die oben genannten Nachteile überwindet. Ein Ansatzpunkt für eine derartige Technologie ist das Verfahren der Elektroporation (EP). Im Rahmen eines Forschungsvorhabens wurde ein Gerätesystem zur Durchführung von biomedizinischen Laborexperimenten zur Elektroporation in Form eines Funktionsmodells entwickelt und umfangreiche Versuchsreihen zur Eignung der Elektroporation zur Verbesserung der Fleischzartheit durch Elektroporation durchgeführt.

2 Fleischqualität

Die Fleischqualität ist die Summe aller sensorischen, ernährungsphysiologischen, hygienisch-toxikologischen und verarbeitungstechnologischen Eigenschaften des Fleisches. Im Folgenden ist eine Zusammenfassung von Parametern der Fleischqualität aufgeführt.

Sensorische Faktoren

- Aussehen (Farbe, Form, Marmorierung)
- Geruch
- Geschmack
- Saftigkeit
- Zartheit bzw. Festigkeit

Nährwert-Eigenschaften (Art und Menge)

- Proteine (Muskelprotein, Bindegewebe)
- Fette
- Vitamine (vor allem B-Vitamine)
- Mineralstoffe (z. B. Eisen)

Hygienisch-toxikologische Eigenschaften

- Mikroorganismen (Bakterien, Sporen, Schimmelpilze)
- Wachstumshemmende und -fördernde Faktoren: pH-Wert („Säuerungsgrad“), a_w -Wert (Wasseraktivität), Temperatur, Pökelsalze
- vorhandene Rückstände (Antibiotika, Hormone, Schwermetalle, Inhaltsstoffe des Räucherrauches)

Verarbeitungseigenschaften

- Gehalt und Zustand des Proteins
- Wasserbindung / Saftigkeit
- Gehalt und Zustand der Fette
- Gehalt an Bindegewebe
- Gewebestruktur
- pH-Wert („Säuerungsgrad“)
- Farbe

Es sind mehrere Verfahren zur Reduzierung der Zähigkeit und Förderung der Zartheit bekannt.

Reifung

Während einer längeren Fleischreifungsphase soll eine höhere Zartheit erreicht werden. In dieser Zeit wird das Bindegewebsprotein jedoch nicht angegriffen. Kollagenfasern des endomysialen Bindegewebes können aber bei guter Säuerung quellen. Hierdurch verlieren die Fasern an Festigkeit. Es tritt eine Auflockerung ein. Sofern die Fleischsäuerung mangelhaft ist, kann Oberflächenfäulnis eintreten. Eine längere Kühlung kann das Fleisch austrocknen [22].

Druck

Fleischportionen werden unter Druck, insbesondere eines Flüssigkeitsdruckes, in Folien möglichst luftabschlussfrei verpackt. Anschließend erfolgen Kühlung oder Gefrieren im Flüssigkeits- und / oder Solebad (Offenlegungsschrift DE 102 45 603 A1). Zum Zartmachen von schlachtfischem Fleisch wird es in einen luftdicht verschließbaren Behälter gegeben und unter Druck (10 bar) gesetzt. Wenigstens zwei Druckphasen werden empfohlen (Offenlegungsschrift DE 199 32 371 A1).

Es wurde versucht, zähes Fleisch mittels Detonationsdruckwellen zarter zu machen. In einer Tonne wurde Schießpulver gezündet. Das Fleisch zerriss, wodurch die Zähigkeit abnahm [23]. Auch die Behandlung mit Hochdruck brachte keine durchschlagenden Erfolge. Die mit Hochdruck behandelten Fleischteile beim Rind wiesen einen Tag nach der Behandlung 10,5 % geringere Scherwerte vergleichend zum Kontrollfleisch auf, jedoch verlor sich der Effekt mit zunehmender Reifezeit des Fleisches. Die Garverluste waren sogar bei dem hochdruckbehandelten Fleisch höher und eine Verbesserung der Sensorik war nicht feststellbar [21].

Steakern / Steaker-Maschine

Die Fleischscheiben erhalten durch eine Steaker-Maschine zahlreiche Einschnitte. Zwei gegenläufige Walzen haben eng stehende Messer. Indem die Walzen sich drehen, ziehen sie die Scheiben durch die Schneidzone. Muskeln und Bindegewebe werden geschnitten. Der Erfolg ist, dass das Fleisch sich besser kauen lässt. Das Essgefühl entsteht, das Fleisch wäre zarter. Der Nachteil besteht darin, dass schädliche Keime, die an den Walzen hängen können, auf viele Fleischscheiben verteilt werden. Die Keime bleiben nicht nur an der Oberfläche der Scheiben, sondern werden durch die Messer in das Innere des Fleisches gedrückt. Es kommt zu einer Keimverschleppung in die Tiefe. Aus der Sicht der Produkthygiene ist das Verfahren sehr bedenklich und kann nur sehr kurz vor dem Verzehr empfohlen werden.

Tumbler

Der Tumbler arbeitet nach dem Prinzip einer Betonmaschine. Durch Rotation und Zentrifugalkraft werden die Fleischstücken an die Wandung des Gerätes gedrückt und fallen dann mit Druck auf den Boden des Gerätes. Von dort werden sie wieder nach oben bewegt. Durch den Aufprall werden Muskeln und Bindegewebe zerrissen. Die Gefahr ist groß, dass Druck und Scherkräfte das Fleisch zu Brei zerkleinern. Die Oberfläche der Fleischscheiben verschmiert infolge einer Proteinaufschäumung.

Ultraschall

Die Anwendung von Ultraschall bewirkt eine Verringerung der Scherkraft, was durch verbesserte sensorische Eigenschaften teilweise bestätigt wird. Positiv ist auch der nur geringfügig erhöhte Garverlust gegenüber den Kontrollproben. Nachteil ist jedoch die relativ geringe Eindringtiefe des Ultraschalls in das zu behandelnde Fleisch, die zu Einschränkungen hinsichtlich der Teilstückgröße und dem Zuschnitt führt.

Enzyme

Es wird eine enzymatisch-mechanische Vorbehandlung zum Zartmachen von Fleischstücken, insbesondere von Fleischscheiben empfohlen. Als Enzym kommt die Protease Thermitase aus *Thermoactinomyces vulgaris* zum Einsatz. Die Fleischscheiben werden mit einem Gemisch aus Thermitase und Kochsalz bestreut und mit einem Fleischmürber / Fleischsteaker behandelt. Ein Fleischklopfer kann auch zur Anwendung kommen (Patentschrift 155 482, DDR). Auch das Enzym Elastase kann angewandt werden, bringt jedoch keine große zartmachende Wirkung und erfordert eine lange Behandlung, die teuer ist (Patentschrift DE 694 20 894 T2). Als Fleischzartmacher wird eine Protease verwendet, z. B. Papain. Es macht jedoch Fleisch übermäßig zart und geschmacklos.

Zur Verbesserung der Konsistenz von Fleisch findet ein Gemisch aus einer Protease und Zusatzstoffen Anwendung. Es können auch Würzstoffe wie Pfeffer, Sellerie, Paprika, Glutamat

und ätherische Öle sein. Des Weiteren dienen dazu Propylenglycol, Glykol, Glukose und Stärke. Als Proteasen finden vor allem pflanzliche Enzyme Verwendung wie Papain und Bromelin sowie Proteasen aus Mikroorganismen. Das Wirkungsoptimum der Proteasen liegt bei einer Temperatur von ca. 50 °C, so dass ihr Einsatz für Frischfleisch nicht infrage kommt.

Die Zartmacher wirken in erster Linie auf das Bindegewebe. Dieses Gewebe wird im Verlauf der küchentechnischen Zubereitung des Fleisches teilweise abgebaut, so dass es zarter wird. Die Verwendung von Enzymen oder Enzympräparaten zur Verbesserung der Zartheit ist nach derzeitiger Rechtslage in Deutschland nur im haushaltsüblichen Umfang erlaubt. Nach § 17 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände - Gesetzes liegt beim Inverkehrbringen von derartig behandeltem Fleisch der Tatbestand der Täuschung und Irreführung des Verbrauchers vor, so dass die Enzymanwendung nicht gestattet ist.

3 Elektroporation

Begriff

Gepulste elektrische Felder mit elektrischen Feldstärken im Bereich von 1 - 100 kV/cm können zu irreversiblen Porenöffnungen in der Membran biologischer Zellen führen. Dieser mit Elektroporation (EP) bezeichnete Vorgang kann zur effektiven Gewinnung der Inhaltsstoffe pflanzlicher Zellen und zur Abtötung von Mikroorganismen verwendet werden. Neben der Bezeichnung Elektroporation sind in der Literatur auch folgende Begriffe und Umschreibungen gebräuchlich:

- Elektroimpulsverfahren
- Anwendung starker gepulster elektrischer Felder
- Verfahren mit elektrischen Hochspannungsimpulsen
- Hochspannungsimpulsverfahren (HSI)
- pulsed electric field (PEF)
- high intensity electric field pulses (HELP)
- electroinjection
- electroporabilisation

Anwendungen

Seit der ersten Beschreibung der Wirkung gepulster elektrischer Felder auf biologische Materialien in den 1960er Jahren [12] wurden zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Lebensmittelverarbeitung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Anwendung gepulster elektrischer Felder die Extraktion intrazellulärer Bestandteile, die Gewinnung von Frucht- und Gemüsesäften oder die Trocknung pflanzlicher und tierischer Produkte beschleunigt werden kann [1], [2], [13]. Auch zur Keimabtötung [3] und Konservierung können hohe gepulste elektrische Felder zur Anwendung kommen [4], [5].

In [6], [7] wird der Aufschluss von Zuckerrübenzellen mit Hilfe starker gepulster elektrischer Felder beschrieben. In dieser Anwendung können der Energieverbrauch reduziert und damit die Kosten bei der Zuckergewinnung gesenkt werden. Herzstück des Elektroporationsverfahrens ist

ein im Forschungszentrum Karlsruhe weiterentwickelter Marx-Generator, welcher Hochspannungsimpulse von bis zu 300 kV mit Impulsraten von bis zu 20 Hz erzeugen kann. Die Pulsdauer liegt typischer Weise im Mikrosekundenbereich. Die Pulsenergie beträgt bis zu 1 kJ.

An der Technischen Universität Berlin, FG Lebensmitteltechnologie und Prozesstechnik, wurde ein Verfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen durch Elektroporation in Flüssigkeiten im Durchfluss entwickelt [8]. Nachgewiesen wurde die Zerstörung von *Echerichia coli* im elektrischen Feld. Bei der Behandlung von Apfelsaft konnten bei einem Energieeintrag von 40 - 70 kJ/kg eine Keimreduktion um bis zu 6 Log-Stufen erzielt werden.

Am Deutschen Institut für Lebensmitteltechnologie (DIL) e. V. wird an einem Verfahren zur Beschleunigung der Trocknung von Rohprodukten durch gepulste elektrische Felder gearbeitet [9]. Erste Untersuchungen bei Feldstärken zwischen 3 - 4 kV/cm und einem Energieeintrag bis 20 kJ/kg zeigen, dass für einen Gewichtsverlust von 25 % die Trockenzeit auf 30 - 50 % reduziert werden kann. Durch die beschleunigte Trocknung können Lagerzeiten und Lagerkapazitäten verringert und durch schnellere Absenkung des a_w - und pH- Wertes eine Hemmung des Wachstums von pathogenen Keimen erreicht werden.

Am National Food Center (UK) wurden Versuchsreihen zur Keimreduzierung (*E. coli* O157:H7) bei Beef Burger durchgeführt [10]. Sowohl die Anwendung von organischen Säuren, das Einfrieren als auch die Anwendung starker gepulster elektrischer Felder hat sich in diesen Untersuchungen als ungeeignet hinsichtlich der Keimreduzierung bei Beef Burger erwiesen.

Der Einfluss gepulster elektrischer Felder auf Liposomen und Membranen pflanzlicher, tierischer und mikrobieller Zellen wurde an der Technischen Universität Berlin Fakultät III – Prozesswissenschaften – untersucht [11]: „Eine Reihe von Pulsmodulatoren und Behandlungszellen wurde realisiert, um den Einfluss unterschiedlicher Anlagen-, Prozess- und Produktparameter zu bewerten. Für pflanzliche und tierische Zellen wurden kritische Feldstärken im Bereich von 0,3 bis 0,5 kV/cm, für Mikroorganismen im Bereich von 10 bis 15 kV/cm beobachtet. Das Ausmaß der Membranpermeabilisierung wurde mittels Impedanzanalyse für pflanzliche und tierische Gewebe und mittels Durchflusszytometrie für Mikroorganismen und Liposomen bestimmt. Die Auswirkung auf Stofftransportvorgänge in Geweben wurde im Labor- und technischem Maßstab untersucht. Eine Steigerung der Extrahierbarkeit intrazellulärer Substanzen sowie der Ausbeute von Frucht- und Gemüsesäften bis zu 7 % bei äquivalenter Produktqualität konnte im Vergleich zu Kontrollproben gezeigt werden. Versuche in technischem Maßstab zeigten den Einfluss einer Elektroporation auf die Maischestruktur. Durch eine Behandlung von Fleischwaren konnte deren Trocknung, Marination oder Pökeln beschleunigt werden, durch verbesserte Verteilung wasserbindender Agenzien innerhalb des Gewebes konnte eine Reduktion des Garverlustes erreicht werden. Die Inaktivierung von Mikroorganismen wurde am Beispiel von Fruchtsäften und Milch untersucht, die Anwendbarkeit des Verfahrens zur schonenden Haltbarmachung wurde gezeigt. Eine Kombination mit milder Hitze führte zu einer deutlichen Verbesserung der Energieeffizienz. Anhand von Laktoperoxidase in Milch wurde die Inaktivierung von Enzymen ermittelt, es wurde ein lediglich geringer direkter Einfluss elektrischer Felder beobachtet. Zusätzlich wurde die Eignung zur Reduktion der Überschussschlammmenge bei der biologischen Abwasserbehandlung und zur Konservierung von Algenextrakten untersucht. Der Energiebedarf für eine Permeabilisierung unterschiedlicher

biologischer Membranen in Abhängigkeit vom induzierten Membranpotential wurde verglichen. Eine Effizienzanalyse zeigte deutliche Kosten- und Zeitvorteile bei einer Anwendung einer PEF-Behandlung als Zellaufschlussverfahren tierischer und pflanzlicher Gewebe im Vergleich zu konventionellen Technologien. Eine Anwendung als Konservierungsverfahren führte auch nach energetischer Optimierung zu höheren Behandlungskosten als eine thermische Behandlung, jedoch können diese durch Verbesserung der Produktqualität bei Premium- oder thermolabilen Produkten gerechtfertigt werden. Der Zellaufschluss bei Fleischwaren, Frucht- und Gemüsemaischnen konnte als vielversprechendste Einsatzmöglichkeit des Verfahrens identifiziert werden.“

Erste Untersuchungen zur Anwendung der Elektroporation zur Optimierung der Zartheit von Rindfleisch werden in [21] dargestellt. Die Behandlung mit Hochspannung bewirkt hier eine deutliche Verringerung der mittleren maximalen Scherkraft. Die behandelten Proben weisen mittlere maximale Scherwerte auf, die um 21,7 % bzw. 23,3 % niedriger sind als die Scherwerte der entsprechenden Kontrollproben. Bezogen auf den Garverlust konnte festgestellt werden, dass die mit Hochspannung behandelten Proben einen mittleren Garverlust von 31,4 % aufwiesen, während die dazugehörigen Kontrollproben lediglich Garverluste im Bereich von 25,9 bis 27,2 % hatten. Der pH-Wert für die unbehandelten Proben liegt bei 5,63. Für die behandelten Proben wurden geringfügig höhere Werte von 5,73 bis 5,79 verzeichnet. Die von fünf unabhängigen Prüfern durchgeführte sensorische Bewertung fiel uneinheitlich aus. Auf einer vorgegebenen Skala von 1 bis 6 wurden die mit Hochspannung behandelten Proben in den Bereich 3 eingeordnet. Die Behandlung mit Hochspannung führte zu einer geringfügigen Farbaufhellung der Proben. Die Struktur des Fleisches war spürbar gelockert. Die behandelten Proben fühlten sich weicher und lockerer an als die unbehandelten Proben. Abweichungen hinsichtlich Geruch, Geschmack oder Aroma wurden seitens der Prüfer nicht festgestellt.

Die Frankenförder Forschungsgesellschaft führte gemeinsam mit der Technischen Universität Berlin, FG Lebensmitteltechnologie und Prozesstechnik in den Jahren 2003 bis 2007 Untersuchungen zur Beeinflussung der Textur und des Reifungsprozesses bei Rohwurst mit Hilfe der Elektroporation durch [24]. Zu diesem Zweck wurden Fleisch- und Fettpartien einer Vorbehandlung mit elektrischen Feldimpulsen unterzogen. Die Feldimpulse variierten in ihrer Stärke und lagen zwischen 1 und 4 kV/cm. Der spezifische Energieeintrag betrug dementsprechend 1,5 bis 19,2 kJ/kg. Diese Parameter führten zur Ausprägung von unterschiedlich starken Poren in den Rohstoffen. Mit Hilfe von chemischen, physikalischen sowie sensorischen Analysen wurde der Erfolg der Behandlung bei streichfähigen und festen Rohwürsten untersucht, wodurch eine schnellere Reifung und eine bessere Konsistenz bei den elektroporierten Chargen bestätigt wurden.

Wirkung

Biologische Zellen sind abgeschlossene Systeme, deren innere Strukturen (Zellkern, Zytosol, etc.) durch eine „dichte“ Membran gegen die Außenwelt abgeschirmt sind. Die Grundstruktur

dieser Membran besteht aus einer elektrisch isolierenden Phospholipid-Doppelschicht. Im Gegensatz dazu ist das durch die Membran eingeschlossene Zytoplasma elektrolytisch leitend. Befindet sich die Zelle in einem wässrigen, ebenfalls elektrolytisch leitenden Milieu, so kommt es beim Anlegen eines elektrischen Feldes zur Ionenwanderung und damit zur Polarisierung (Abb. 3.1 links). Überschreitet die Energie eines Feldimpulses einen kritischen Wert, bilden sich irreversibel Poren in den Zellmembranen. Die Anforderungen an Form, Stärke oder Dauer des Impulses sind dabei abhängig von Zelleigenschaften wie Membranstärke, Zellgröße oder Umgebungsmedium (Abb. 3.1, rechts). [18]

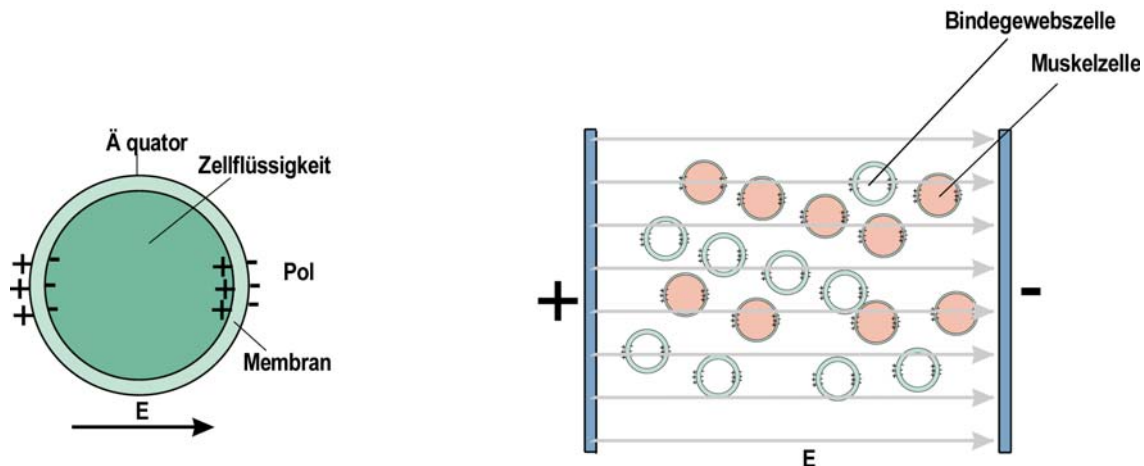


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Wirkprinzips der Elektroporation [18]

Die Porenbildung wird in [14] wie folgt beschrieben: „Poren entstehen, wachsen und verschließen sich unter dem Einfluss thermischer Fluktuationen und lokaler elektrischer Felder. Man nimmt gegenwärtig an, dass hydrophile, wasserdurchlässige für den Stoffaustausch geeignete Poren in einem zweistufigen Prozess entstehen. Sie treten zunächst als wasserundurchlässige hydrophobe Poren in Erscheinung, deren Bildungsrate von der Temperatur und dem Membranpotential abhängt. Erreicht ihr Radius einen ersten kritischen Wert, wandeln sie sich instantan in hydrophile Poren um. Letztere können unter dem Einfluss des elektrischen Feldes wachsen. Überschreitet ihr Radius während der Pulsdauer einen zweiten kritischen Wert r_{krit} , ist die Öffnung irreversibel.“

Die Entwicklung des Porenradius hängt von der freien Energie der Porenbildung ab und kann mit einer diffusionsartigen Differentialgleichung beschrieben werden. Die Abb. 3.2 zeigt Kurven der freien Energie für drei verschiedene Membranpotentiale. Falls der Porenradius während der Wirkung der gepulsten elektrischen Felder über den kritischen Wert r_{krit} hinaus wächst, bleibt die Porenöffnung irreversibel und die Zelle stirbt.

Dieses Modell beschreibt die beobachtete Zerstörung von einzelligen Organismen wie Bakterien unter der Wirkung starker elektrischer Felder qualitativ und quantitativ relativ zufriedenstellend. Insbesondere lässt sich aus diesem Modell ein Zusammenhang zwischen der Feldstärke und der für irreversible Elektroporation notwendigen Mindestpulsdauer ableiten. Dadurch ergibt sich auch der erforderliche Energieeinsatz, der ein breites Minimum für Pulsdauern zwischen 100 ns und 2 μ s besitzt. Ob dieses Modell auch für die Beschreibung der Elektroporation von pflanzlichen

Zellen mit Zellwand und im Zellverband göltig ist, wurde bisher nicht untersucht.“

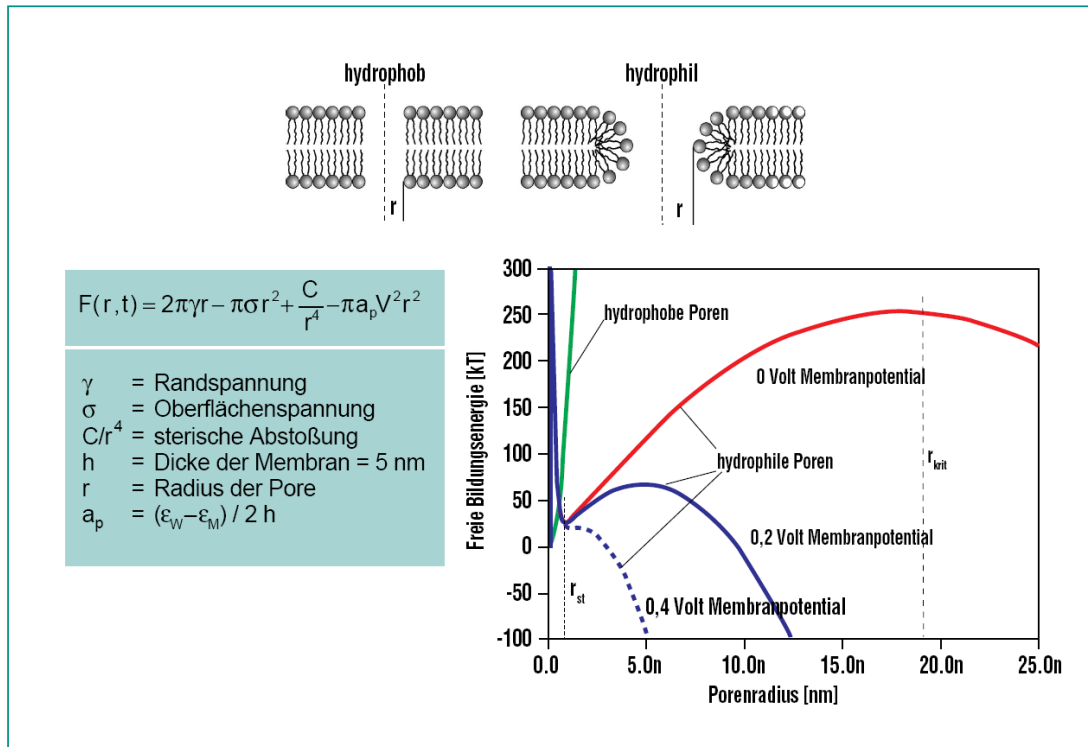


Abb. 3.2: Freie Energie der Porenbildung [18]

Die Wirkungen starker gepulster elektrischer Felder auf Zellen ist vielfältig (siehe Abb. 3.3) und wird mit den existierenden Modellen nur unvollständig beschrieben. Die Untersuchung dieser Phänomene ist Gegenstand aktueller Forschung [19], [20]. So wird in [15] eine Hypothese zur lokalen nanoskalen Membranzerstörung durch starke gepulste elektrische Felder vorgestellt. Angersbach et. al. stellen in [17] ein elektrophysiologisches Modell intakter und prozessierter Pflanzenzellen vor. Ein Überblick über den aktuellen Wissenstand wird in [16] vermittelt.

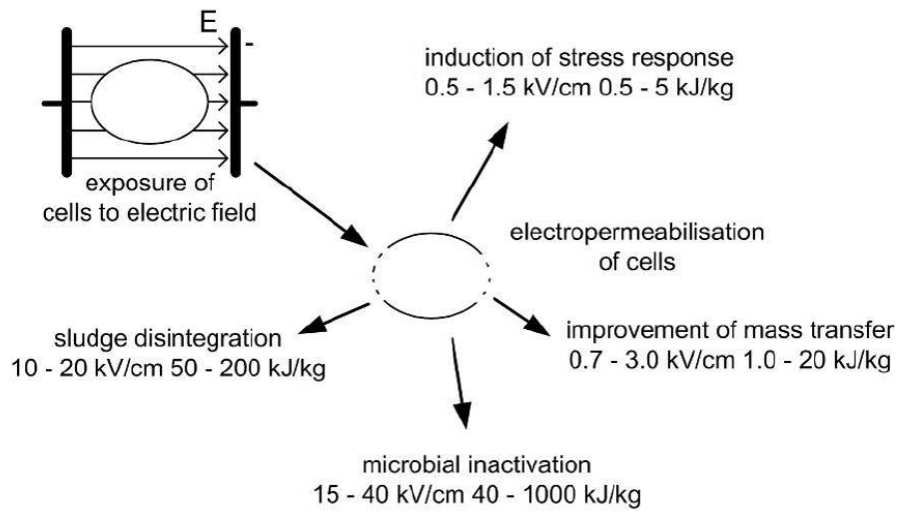


Abb. 3.3: Biologische Auswirkungen elektrischer Felder auf Zellen bei typischen Feldstärken und Energieeinträgen [11]

4 Elektrodenanordnungen

In Simulationsrechnungen wurden die Eignung verschiedener Elektrodenanordnungen und Ausführungsformen sowie die Auswirkungen von Einflussgrößen wie Leitfähigkeit oder Dielektrizitätskonstante aber auch von Störgrößen wie Luftblasen oder Isolationsschichten auf die Felddausbreitung untersucht. In Abb. 4.1 ist die Felddausbreitung zwischen zwei kreisförmigen Plattenelektroden mit einer lokalen Luftblase (1 mm stark, 20 mm breit) bei der Elektroporation im Wasserbad bei einer Elektrodenspannung von 24 kV dargestellt. Im Bereich des Luftspaltes treten extreme Feldstärkeüberhöhungen auf, die im vorliegenden Simulationsmodell Werte bis etwa 32 kV/cm (höher als die elektrische Durchschlagfestigkeit von Luft!) erreichen. Der Luftspalt führt zu einer Abschattung des E-Feldes, d. h. zu einer drastischen Feldstärkereduzierung, in den angrenzenden Volumenbereichen. Eine homogene Behandlung der Probe ist damit nicht mehr gewährleistet.

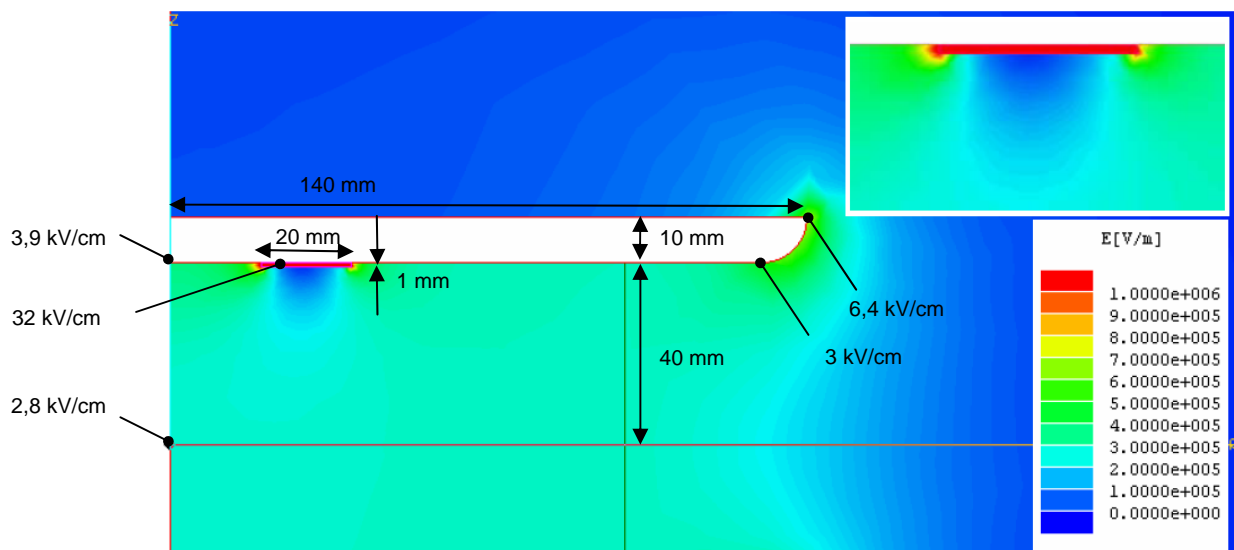


Abb. 4.1: Felddausbreitung zwischen zwei Plattenelektroden mit einer lokalen Luftblase bei der Elektroporation im Wasserbad (Metallelektroden, Durchmesser 280 mm, Plattenabstand 80 mm, Elektrodenspannung 24 kV)

Diese Untersuchungen zeigten, dass eine berührungslose Auslegung der Elektrodenanordnung bzw. die Elektroporation in der Verpackung technisch nicht realisierbar ist. Schon minimale Luft-einschlüsse führen zu starken lokalen Feldüberhöhungen, was die angestrebte Wirkung der Poration im zu behandelnden Fleisch reduziert und lokal zu unerwünschten thermischen Effekten führen kann. Schlussfolgernd wurden alle Versuche mit Kontaktelektroden oder im Wasserbad durchgeführt, wobei auch bei direktem Elektrodenkontakt eine offene Fleischstruktur mit Lufteinschlüssen zwischen den Fleischfasern bzw. Unebenheiten an

Schnittkanten zu Inhomogenitäten in der Behandlung führen können.

5 BioPulser I

Das entwickelte EP-Gerät ist ausgeführt als kompakter Hochspannungs-Impulsgenerator zur Durchführung von biomedizinischen Laborexperimenten der Elektroporation (siehe Abb. 5.1).



Abb. 5.1: Funktionsmuster Hochspannungs-Impulsgenerator BioPulser I

Der Generator erzeugt aus kapazitiver Energiespeicherung repetierende Hochspannungsimpulse, die einen doppelt-exponentiellen Verlauf aufweisen und die in Impulsbreite, Spannungsmaximalwert und Folgefrequenz variabel bzw. einstellbar sind. Die maximale Impulsspannung beträgt 35 kV, die maximale Pulsenergie 35 J. Bei Entwurf und Aufbau des Gerätes wurde erhöhte Aufmerksamkeit auf die flexible und variable Gestaltung sowohl in der elektrischen Generatorschaltung als auch im mechanischen Konzept gelegt. Hiermit sollte dem besonderen Status als Labor- und Versuchsgerät entsprechend Rechnung getragen werden. Die Einhaltung von Sicherheitsbestimmungen, die Integration von Schutzmaßnahmen und die Berücksichtigung der Bedienerfreundlichkeit stellten dabei wesentliche Schwerpunkte dar.

Der Generatorschrank besitzt frontseitig eine verschließbare Glastür, durch die jederzeit eine Kontrolle der Konfiguration und der Betriebsweise des Generators gegeben und durch die eine Abänderung des Aufbaus problemlos möglich ist. Die Einbindung über Endschalter in das Sicherheitskonzept des Gerätes gewährleistet dabei die gebotenen Schutzmaßnahmen.

Die eigentliche Versuchs- und Messanordnung befindet sich in komfortabler Arbeitshöhe innerhalb der Sicherheits-Prüfhaube auf der Oberseite des Impulsgenerators. Der Versuchsplatz

wurde dabei so gestaltet, dass die Elektroporation sowohl an kleinen Proben unter Nutzung von zylinderförmigen Probenröhrchen als auch an größeren flächenartig ausgedehnten Proben durch Verwendung von speziellen Tellerelektroden durchgeführt werden kann.

Direkt in diesem Versuchsbereich sind auch die erforderlichen Messmittel (Spannungsteiler, Stromsensor) zum Nachweis und zur Kontrolle der durchgeführten Impulsbelastung angeordnet. Die elektrischen Ausgangssignale dieser Messmittel können an jedem herkömmlichen Speicheroszilloskop mit geeigneter zeitlicher Auflösung zur Anzeige gebracht werden. Ein derartiges Messgerät ist vielfach im Laborbereich bereits vorhanden und somit nicht Bestandteil des Impulsgenerators.

6 Versuchsreihen zur Elektroporation

In umfangreichen Versuchsreihen wurden die Auswirkungen der Elektroporation bei variierenden EP-Parametern auf die Qualität von Rindfleisch durch Bewertung sensorischer und physikalischer Merkmale untersucht:

- Grillverlust
- pH-Wert
- a_w -Wert
- elektrische Leitfähigkeit
- Aufschlussgrad
- Scherkraft
- Farbe
- Textur
- Zartheit
- Saftigkeit
- Aroma und Geschmack
- Gesamteindruck

Erste Versuche ließen keine eindeutigen Aussagen über die Wirksamkeit der Elektroporation im Bezug auf die Fleischzartheit zu. Hinsichtlich der sensorische Eigenschaften waren die mit einer höheren Anzahl an Impulsen behandelten Fleischproben geringfügig besser zu beurteilen. Die Versuche deuteten darauf hin, dass der Erfolg der Elektroporation und die Erreichung guter sensorischer Eigenschaften speziell bei Rindfleisch stark vom Reifegrad des Fleisches abhängig sind. Aus diesem Grund wurden weitere umfangreiche Versuche unternommen, verschieden gereiftes Rindfleisch zu behandeln. Auch in diesen Versuchsreihen konnten nur in begrenztem Umfang Hinweise auf die Verbesserung der Zartheit des rohen Rindfleisch ermittelt werden. Exemplarisch sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 die Ergebnisse einer Versuchsreihe zur EP-Behandlung von Rindfleisch zusammen gefasst.

Tabelle 1: Aufstellung der Parameter und Messergebnisse für Rindfleisch (Roastbeef, roh)

Versuch/ Fleisch	Elektroporationsparameter					Masse	pH-Wert	a _w -Wert	LF	Farbe		
Nr.	Feld-stärke	Impulse	Impulsfrequenz	Kondensatorkapazität	spezif. Energieeintrag					L*	a*	b*
	kV/cm		Hz	µF	kJ/kg	g			mS/cm			
1 / 1 A	1	50	5	2	0,355	83,9	5,83	0,942	15,9	32,74	+16,73	+5,36
1 / 1 B	-	-	-	-	-	88,9	5,62	0,951	20,4	35,35	+15,89	+5,89
1 / 5 A	1	50	5	2	0,355	82,9	5,87	-	16,8	32,27	+15,85	+4,57
1 / 5 B	-	-	-	-	-	66,0	5,69	-	15,2	33,81	+15,24	+4,23
1 / 8 A	1	50	5	2	0,355	64,5	5,85	0,940	15,4	34,36	+15,53	+5,06
1 / 8 B	-	-	-	-	-	66,3	5,78	0,952	18,8	32,39	+14,64	+4,56
2 / 11 A	2	50	5	2	1,42	84,2	5,80	0,956	16,9	31,12	+14,74	+3,44
2 / 11 B	-	-	-	-	-	79,6	5,81	0,954	17,4	30,95	+15,73	+2,47
2 / 15 A	2	50	5	2	1,42	83,2	5,68	-	16,6	33,22	+14,39	+4,16
2 / 15 B	-	-	-	-	-	91,3	5,72	-	14,3	35,55	+12,05	+3,59
2 / 18 A	2	50	5	2	1,42	79,7	5,88	0,957	15,7	31,76	+15,04	+4,00
2 / 18 B	-	-	-	-	-	84,1	5,86	0,940	14,9	30,51	+15,61	+2,31
3 / 21 A	3	50	5	2	3,20	111,0	5,91	0,949	16,1	33,94	+14,42	+4,28
3 / 21 B	-	-	-	-	-	83,4	5,93	0,953	16,2	29,77	+16,63	+3,88
3 / 25 A	3	50	5	2	3,20	62,6	5,74	-	15,1	31,31	+14,14	+3,31
3 / 25 B	-	-	-	-	-	71,1	5,74	-	17,1	33,68	+12,74	+3,59
3 / 28 A	3	50	5	2	3,20	94,2	5,79	0,951	16,3	32,21	+17,59	+3,53
3 / 28 B	-	-	-	-	-	85,1	5,82	0,952	15,7	34,27	+13,98	+2,56
4 / 31 A	1	200	5	2	1,42	73,9	5,66	0,955	15,3	40,85	+17,33	+8,29
4 / 31 B	-	-	-	-	-	78,2	5,63	0,955	18,8	38,48	+14,27	+5,60
4 / 35 A	1	200	5	2	1,42	91,1	5,66	-	17,2	41,92	+15,22	+7,03

4 / 35 B	-	-	-	-	-	119,2	5,77	-	17,7	39,28	+14,69	+6,67
4 / 38 A	1	200	5	2	1,42	37,6	5,64	0,959	12,7	43,42	+12,74	+5,74
4 / 38 B	-	-	-	-	-	56,2	5,59	0,965	15,0	41,43	+11,47	+4,03
5 / 41 A	2	200	5	2	5,69	83,2	5,68	0,978	18,6	39,86	+13,07	+5,11
5 / 41 B	-	-	-	-	-	104,8	5,80	0,973	19,8	39,80	+15,21	+6,69
5 / 45 A	2	200	5	2	5,69	109,1	5,82	-	18,9	39,99	+13,96	+5,71
5 / 45 B	-	-	-	-	-	81,1	5,77	-	17,7	39,63	+13,59	+6,29
5 / 48 A	2	200	5	2	5,69	81,5	5,70	0,984	18,8	41,43	+11,52	+3,67
5 / 48 B	-	-	-	-	-	116,6	5,74	0,971	19,0	39,01	+14,38	+5,33
6 / 51 A	3	200	5	2	12,8	83,2	5,78	0,970	18,3	40,35	+14,45	+5,25
6 / 51 B	-	-	-	-	-	109,2	5,72	0,942	17,9	40,49	+15,98	+7,14
6 / 55 A	3	200	5	2	12,8	82,4	5,77	-	18,3	40,07	+14,72	+2,86
6 / 55 B	-	-	-	-	-	84,5	5,82	-	18,9	39,66	+14,32	+4,98
6 / 58 A	3	200	5	2	12,8	80,4	5,74	0,968	17,1	42,00	+13,88	+6,19
6 / 58 A	-	-	-	-	-	84,8	5,81	0,960	18,6	41,18	+14,85	+6,24

Tabelle 2: Aufstellung der Parameter, Messergebnisse und sensorischen Bewertung für Rindfleisch (Roastbeef, zubereitet)

Versuch/ Fleisch	Elektroporationsparameter					Masse roh	Masse gegrillt	Diff. Gewicht	Grill- verlust	pH- Wert	a _w - Wert	Sensorik			
Nr.	Feld- stärke	Im- pulse	Impuls- frequenz	Kondensat orkapazität	spezif. Energie- eintrag							Zart- heit	Saftig- keit	Aroma/ Ge- schmack	Ges.- ein- druck
	kV/cm		Hz	µF	kJ/kg	g	g	g	%						
1 / 2 A	1	50	5	2	0,355	96,1	66,5	29,6	30,8	6,09	0,943	4,8	4,2	4,4	4,4
1 / 2 B	-	-	-	-	-	86,0	61,9	24,1	28,0	6,09	0,944	4,8	4,2	4,4	4,6
2 / 12 A	2	50	5	2	1,42	81,4	55,1	26,3	32,3	6,22	0,941	5,0	4,2	4,4	4,6
2 / 12 B	-	-	-	-	-	65,4	40,2	25,2	38,5	6,16	0,946	5,0	3,6	4,0	4,2
3 / 22 A	3	50	5	2	3,20	80,4	57,0	23,4	29,1	6,18	0,950	5,0	4,6	4,4	4,4
3 / 22 B	-	-	-	-	-	89,7	67,0	22,7	25,3	6,03	0,949	5,0	4,8	4,4	4,4
4 / 32 A	1	200	5	2	1,42	87,5	54,8	32,7	37,4	6,23	0,949	4,4	4,2	4,8	4,3
4 / 32 B	-	-	-	-	-	81,1	51,4	29,7	36,6	6,18	0,948	5,2	4,8	4,8	4,6
5 / 43 A	2	200	5	2	5,69	93,6	65,2	28,4	30,3	6,25	0,950	5,4	5,2	4,8	4,8
5 / 43 B	-	-	-	-	-	97,5	72,9	24,6	25,2	6,17	0,951	4,6	4,2	4,2	4,1
6 / 53 A	3	200	5	2	12,8	114,6	72,7	41,9	36,6	6,14	0,952	5,0	4,2	4,8	4,7
6 / 53 B	-	-	-	-	-	98,7	63,0	35,7	36,2	6,17	0,950	4,6	4,0	4,2	4,0

Diese Ergebnisse standen im Gegensatz zu den vorliegenden Erfahrungen aus der Behandlung anderer Fleischsorten oder aus der Behandlung von Pflanzenbestandteilen als auch im Gegensatz zu Veröffentlichungen, in welchen die Verbesserung der Zartheit von Rindfleisch durch Elektroporation beschrieben wird [21]. Entsprechend kritisch wurden diese Ergebnisse überprüft. In zusätzlichen Versuchsreihen mit anderen Fleischsorten und Pflanzenbestandteilen wurden das experimentelle Setup und die verwendeten Analysemethoden überprüft. Hier konnte die zu erwartende Wirkung der Elektroporation eindeutig nachgewiesen und die Eignung des experimentellen Setups und der verwendeten Analysemethoden bestätigt werden.

Die Wirkung der Elektroporation ist stark von dem zu behandelnden Rohstoff abhängig. Dies verdeutlicht eine Versuchsreihe, in welcher Rindfleisch, Schweinefleisch, Äpfel und Kartoffeln bei gleichem Energieeintrag behandelt und der erzielte Aufschlussgrad analysiert wurde. In Tabelle 3 sind die in dieser Versuchsreihe verwendeten EP-Parameter und in Tabelle 4 der resultierende Aufschlussgrad zusammen gefasst.

Tabelle 3: Parametereinstellungen bei der vergleichenden EP-Behandlung von Rindfleisch, Schweinefleisch, Äpfel und Kartoffeln

Versuch	elektrische Feldstärke kV/cm	Impulse	Impulsfrequenz Hz	Kondensatorkapazität nF	Energie je Impuls J	spezif. Energieeintrag kJ/kg
Rindfleisch, 2 Jahre alte Mutterkuhfärsen, Fleisch vom Hals, 48 Stunden alt						
mittlere EP	4	24	1	19,1	0,1528	6
starke EP	8	30	1	19,1	0,6	15
Schweinefleisch, handelsüblicher Schweinerücken						
mittlere EP	4	17	1	19,1	0,44	6
starke EP	6,7	15	1	19,1	1,2	15
Äpfel, Sorte Gala						
mittlere EP	4	24	1	19,1	0,1528	6
starke EP	8	15	1	19,1	0,6	15
Kartoffel, Sorte Krone						
mittlere EP	4	22	1	19,1	0,34	6
starke EP	8	16	1	19,1	1,14	15

Tabelle 4: Aufschlussgrad der mittleren Elektroporation (Rindfleisch) in %

Rohstoff	Messung	Aufschlussgrad der Proben Mittelwert und Spannweite (*) dreier Wiederholungen	
		mittlere EP	starke EP
Rindfleisch	1	15,1 (14,5-15,6*)	11,7 (10,5-14,0*)
Rindfleisch	2	15,2 (14,7-16,1*)	4,3 (1,0-9,3*)
Rindfleisch	3	11,3 (10,9-12,0*)	kein Effekt messbar
Schweinefleisch	1	8,5 (1,7-14,1*)	16,3 (14,5-21,4*)
Schweinefleisch	2	17,8 (10,1-27,2*)	7,6 (1,1-10,9*)
Schweinefleisch	3	19,2 (8,6-28,1*)	32,2 (26,6-32,7*)
Apfel	1	63,9 (63,5-64,3*)	62,1 (61,9-62,2*)
Apfel	2	55,7 (55,3-56,2*)	69,6 (69,5-69,8*)
Apfel	3	61,9 (61,8-62,0*)	74,4 (74,1-74,8*)
Kartoffel	1	75,5 (75,0-76,0*)	62,5 (62,4-63,3*)
Kartoffel	2	79,7 (79,4-80,1*)	71,9 (71,1-72,4*)
Kartoffel	3	67,0 (66,4-67,8*)	65,0 (64,9-65,6*)

7 Zusammenfassung

In dem hier auszugsweise vorgestellten Vorhaben wurden sowohl technische als auch anwendungsbezogene Aspekte der Elektroporation untersucht.

In Simulationsrechnungen wurden die Eignung verschiedener Elektrodenanordnungen und Ausführungsformen sowie die Auswirkungen von Einflussgrößen wie Leitfähigkeit oder Dielektrizitätskonstante aber auch von Störgrößen wie Luftblasen oder Isolationsschichten auf die Feldausbreitung untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass eine berührungslose Auslegung der Elektrodenanordnung bzw. die Elektroporation in der Verpackung technisch nicht realisierbar ist. Schon minimale Lufteinschlüsse führen zu starken lokalen Feldüberhöhungen, was die angestrebte Wirkung der Perfussion im zu behandelnden Fleisch reduziert und lokal zu unerwünschten thermischen Effekten führen kann.

Das entwickelte EP-Gerät ist ausgeführt als kompakter Hochspannungs-Impulsgenerator und geeignet zur Durchführung von biomedizinischen Laborexperimenten. Der Generator erzeugt aus kapazitiver Energiespeicherung repetierende Hochspannungsimpulse, die einen doppelt-exponentiellen Verlauf aufweisen und die in Impulsbreite, Spannungsmaximalwert und Folgefrequenz variabel bzw. einstellbar sind. Die maximale Impulsspannung beträgt 35 kV, die maximale Pulsenergie 35 J. Bei Entwurf und Aufbau des Gerätes wurde erhöhte Aufmerksamkeit auf die flexible und variable Gestaltung sowohl in der elektrischen Generatorschaltung als auch im mechanischen Konzept gelegt. Hiermit sollte dem besonderen Status als Labor- und Versuchsgerät entsprechend Rechnung getragen werden.

Die Untersuchungen richteten sich auf verschiedene Parameter im Gesamtkontext einer Ver-

besserung der Fleischqualität durch die Anwendung von pulsierenden elektrischen Feldern. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Anwendung der Elektroporation zur Verbesserung der Fleischqualität, hier insbesondere der Zartheit, von Rindfleisch. Hierzu wurden in zahlreichen praktischen Untersuchungen die Wirkungen der Elektroporation auf unterschiedliche Fleischsorten und Fleischteilstücke durchgeführt. Die sensorischen Veränderungen der jeweiligen Fleischstücke standen dabei ebenso im Zentrum der Betrachtungen, wie auch die physikalischen und biotechnologischen Besonderheiten der Materialien. Die durchgeführten Untersuchungen ließen keine eindeutigen Aussagen über die Wirksamkeit der Elektroporation im Bezug auf die Fleischzartheit bei Rindfleisch zu. In zusätzlichen Versuchsreihen mit anderen Fleischsorten und Pflanzenbestandteilen wurden das experimentelle Setup und die verwendeten Analysemethoden überprüft. Hier konnte die zu erwartende Wirkung der Elektroporation eindeutig nachgewiesen und die Eignung des experimentellen Setups und der verwendeten Analysemethoden bestätigt werden. Erste Ansätze für eine Erklärung der stark abweichenden Wirkung der Elektroporation in Abhängigkeit von der Zellart wurden im Vorhaben in Form einer Analyse der Unterschiede zwischen pflanzlichen und tierischen Zellen erarbeitet. Hinsichtlich der wissenschaftlichen Bearbeitung der hier dargestellten Erkenntnisse besteht über das Vorhaben hinaus erheblicher Forschungsbedarf.

Über die Anwendung bei Rindfleisch hinaus ist das Verfahren sehr wohl als Technologie im Lebensmittelsektor aber auch als Aufschlussverfahren in der Analytik einsetzbar. Eine Überführung der Technologie in den Produktionsprozess setzt weiterführende Applikationsentwicklungen voraus. Insbesondere die Anwendung der Elektroporation bei der Probenvorbereitung in der Analytik ist ein Ansatz, dessen Potential und Einsatzmöglichkeiten am fzmb weiter untersucht werden.

Danksagung

Die Arbeiten in diesem Vorhaben wurden unterstützt durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie im Rahmen der Fördermaßnahme Innovative Wachstumsträger (INNO-WATT) unter der Registriernummer IW060261.

Literatur

- [1] Töpfel, S., V. Heinz: „Anwendung gepulster elektrischer Felder zur Steigerung der Wirtschaftlichkeit in der Lebensmittelindustrie“, Symposium Bioelectrics, SYBE 1 AMOP, Düsseldorf, 19-23.03.2007
- [2] Sack, M., R. Stängele, G. Müller: „Technische Elektroporation von Pflanzenzellen bei großen Masseströmen, Symposium Bioelectrics, SYBE 1, AMOP, Düsseldorf, 19-23.03.2007
- [3] Gusbeth, C., W. Fray, H. Volkmann, S. Gupta, H.-J. Blum: “Keimabtötung mit hohen gepulsten elektrischen Feldern”, Symposium Bioelectrics, SYBE 1, AMOP, Düsseldorf,

19-23.03.2007

- [4] Töpfel, S.: „Konservierung ohne Konservierungsmittel“, Food Technologie Magazin, S. 24-27, 05/2006
- [5] Bluhm, HJ., Grey, W., Gusbeth, C., Sack, M., und Schultheiss, C.: „Aufschluss und Abtötung biologischer Zellen mit Hilfe starker gepulster elektrischer Felder“, NACHRICHTEN – Forschungszentrum Karlsruhe, Jahrg. 35, 3/2003
- [6] Schultheiss, C., Bluhm, HJ., Mayer, HG. und Kern, M.: „Industrial-scale electroporation of plant material using high repetition rate Marx generators“, Pulsed Power Plasma Science, 200 1, IEEE Conference Record
- [7] Schultheiss, C.: “Weißes Gold energieschonend gewinnen”, Journal der Ernährungsindustrie Innovation, http://www.cleaner-production.de/fileadmin/assets/pdfs/Weisses_Gold_energieschonend_gewinnen.pdf
- [8] TU-Berlin, FG Lebensmittelbiotechnologie und Prozesstechnik: „Inaktivierung von Mikroorganismen durch Elektroporation“, Forschungsbericht ZUTECH, AiF-FV 179 ZN
- [9] Töpfel, S.: „Beschleunigung der Trocknung von Rohprodukten durch gepulste elektrische Felder“, Deutsches Institut für Lebensmitteltechnologie DIL e.V., Quakenbrück, 2007,- Projektinfo
- [10] Bolton, D.J., Caterame, T., et al: “The ineffectness of organic acids, freezing and pulsed electric fields to control Escherichia coli O157:H7 in beef burger”, The Letters in Applied Microbiology, Nr. 34, S. 139-143 The Society for Applied Microbiology, 2002
- [11] Töpfel, S.: “Pulsed Electric Fields (PEF) for Permeabilization of Cell Membranes in Food- and Bioprocessing – Applications, Process and Equipment Design and Cost Analysis”, Technische Universität Berlin , Fakultät III – Prozesswissenschaften, Berlin, 2006,- Dissertation
- [12] Doevenspeck, H.: „Verfahren und Vorrichtung zur Gewinnung der einzelnen Phasen aus dispersen Systemen“, German Patent, DE 1237541, 1960
- [13] Taiwo, K.A., Angersbach A., Knorr D.: Influence of high intensity electric field pulses and osmotic dehydration on the rehydration characteristics of apple slices at different temperatures, Journal of Food Engineering 52, S. 185–192, Elsevier Science Ltd. 2002
- [14] IHM - Institut für Hochleistungsimpuls- und Mikrowellentechnik: „Elektroporation biologischer Zellen“, http://hikwww1.fzk.de/ihm/pulsepower/elektroporation_d.htm
- [15] Pliquett, U., Joshi, R.P. , Sridhara, V., Schoenbach, K.H.: „High electrical field effects on cell membranes“, Bioelectrochemistry, Nr. 70, S. 275–282, 2007
- [16] Barnes, F. S., Ben Greenebaum: “Biological and Medical Aspects of Electromagnetic Fields - HANDBOOK OF BIOLOGICAL EFFECTS OF ELECTROMAGNETIC FIELDS”, THIRD EDITION, CRC Press, 2007, ISBN 0-8493-9538-0

- [17] Angersbach, A., Heinz, V., Knorr, D.: "Electrophysiological Model of Intact and Processed Plant Tissues: Cell Disintegration Criteria", Biotechnol. Nr. 15. S. 753-762. 1999
- [18] Bluhm, H., Frey, W., Gusbeth, C., Sack, M., Schultheiss, C.: „Aufschluss und Abtötung biologischer Zellen mit Hilfe starker gepulster elektrischer Felder“, NACHRICHTEN - Forschungszentrum Karlsruhe, Jahrg. 35, S. 105-110, 3/2003
- [19] IFT/FDA Contract No. 223-98-2333 Task Order No. 4: "Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods", A Report of the Institute of Food Technologists for the Food and Drug Administration of the United States Department of Health and Human Services, S. 44, December 31, 2001
- [20] Angersbach, A., Heinz, V., Knorr, D.: Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems, Innovative Food Science & Emerging Technologies 1, S.135 – 149, 2000
- [21] Lopp, A., Weber, H.: "Untersuchungen zur Optimierung der Zartheit von Rindfleisch", FLEISCHWIRTSCHAFT, 3/2005
- [22] SIELAFF, H.: „Fleischtechnologie“, Beehr`s Verlag GmbH & Co KG, Hamburg, 1996
- [23] Eberle, U., „Zart Aber mit Karacho“, Bild der Wissenschaft 03/2004
- [24] Frankenförder Forschungsgesellschaft mbH: Sachbericht zum Forschungsprojekt: "Entwicklung eines innovativen Verfahrens zur Präparation von Rohfleisch und Fett für die Herstellung von Rohwürsten", Förderkennzeichen KP 0148201 US 5 B, März 2007