Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Histologische, mikrobiologische und chemische Qualitätsmerkmale von Putenseparatorenfleisch

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Josefowitz
Tierarzt
aus Gdingen/Gdynia (Polen)

Berlin 2008

Journal-Nr. 3180

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Goetz Hildebrandt
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Mohamed Hafez Ahmed Hafez
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Turkeys, turkey meat, mechanically recovered meat (FSTA), histology, bone tissue, quantitative analysis, qualitative analysis, hygiene, *Salmonella*

Tag der Promotion: 11. Februar 2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN-10: 3-86664-380-2
ISBN-13: 978-3-86664-380-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008
D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.
No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten
© **mbv** 2008

nordendstr. 75 - 13156 berlin – 030-45494866
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 9

2 Literatur 11

2.1 Begriffsbestimmung....11
2.2 Gewinnung....13
2.3 Verwendungsmöglichkeiten....18
2.4 Recht und öffentliche Diskussion....20
2.4.1 Hygiene und Gesundheitsgefährdung....20
2.4.2 Deklaration....25
2.4.3 Öffentliche Diskussion....26
2.5 Qualität....28
2.5.1 Gewebliche Zusammensetzung....28
2.5.2 Kalziumgehalt....35
2.5.3 Mikrobieller Status....43
2.6 Nachweis....50
2.6.1 Indirekter Nachweis....51
2.6.1.1 Kalziumbestimmung....51
2.6.1.2 Immunologie....53
2.6.1.3 Gelelektrophorese....54
2.6.1.4 Isoelektrische Fokussierung....54
2.6.2 Direkter Nachweis....55
2.6.2.1 Sedimentation....55
2.6.2.2 Enzymatische Verdauung....57
2.6.2.3 Laugenbehandlung....57
2.6.2.4 Histomorphologische Gravimetrie....61
2.6.2.5 Radioskopie....61
2.6.2.6 Histologie....62
2.6.2.7 Histometrie....65
a. Point Count Verfahren....65
b. Partikelzählung....67
c. Planimetrische Verfahren – automatisierte Histometrie....72

3 Grundlagen der Farbanalyse 77

3.1 Theorie des Farbsehens.....77
3.1.1 Farbe – physikalisch: die Strahlung.....78
3.1.2 Farbe – physiologisch: der Gesichtssinn.....80
3.1.3 Farbe – psychophysisch: die Wahrnehmung.....81
3.2 Theorie der Farbanalyse.....83
3.2.1 Farbsysteme.....83
3.2.1.1 Lineare zweidimensionale Farbmodelle.....83
3.2.1.2 Kreisförmige Farbmodelle.....83
3.2.1.3 Einfache dreidimensionale Farbmodelle.....84
3.2.1.4 Wahrnehmungsorientierte und farbmetrische Modelle.....84
3.2.1.5 Additives Farbsystem: RGB.....86
3.2.1.6 Substraktives Farbsystem: CMYK.....87
3.2.2 HSV/HSI-Farbsystem.....88
3.2.3 Software.....90
3.2.4 Phasenanalyse.....91
3.2.5 Partikelanalyse.....93

4 Eigene Untersuchungen 98

4.1 Material.....98
4.1.1 Probenart und -herkunft 98
4.1.2 Probennahme und -transport.....99
4.1.3 Probenübersicht.....99
4.1.4 Referenzmaterial zur qualitativen histologischen Untersuchung 101
4.2 Methodik.....102
4.2.1 Histologische Untersuchung.....102
4.2.1.1 Materialien.....102
a. Reagenzien 102
b. Geräte.....104
c. Hardware.....104
d. Software.....105

4.2.1.2 Probenaufbereitung....105
4.2.1.3 Schneiden der Proben....105
4.2.1.4 Färben der Proben....105
a. Alizarin-S....105
b. Kossa....107
c. Calleja....108
4.2.1.5 Eindecken der Proben....109
4.2.1.6 Überprüfung der Richtigkeit und der Wiederholbarkeit des phasenanalytischen Verfahrens....110
4.2.1.7 Quantitative histologische Untersuchung....112
a. Konventionelle Partikelzählung....112
b. Phasenanalytische Untersuchung....112
c. Digitale Partikelanalyse....117
4.2.1.8 Qualitative und semiquantitative histologische Untersuchung. 121
4.2.2 Physikalisch-chemische Untersuchung....121
4.2.2.1 Labormaterialien....121
a. Reagenzien....121
b. Geräte....121
4.2.2.2 Trockenveraschung des Probenmaterials....121
4.2.2.3 Atomemissionsspektrometrische Bestimmung von Kalzium....122
4.2.3 Mikrobiologische Untersuchung....122
4.2.3.1 Labormaterialien....122
a. Nährböden und -lösungen, Bebrütungsbedingungen....122
b. Geräte....123
c. Reagenzien....124
4.2.3.2 Vorbereitung des Probenmaterials....124
4.2.3.3 Tropfplatten- und Gussverfahren....124
4.2.3.4 Koloniezählung und Keimzahlberechnung....125
4.2.3.5 Pseudomonaden....126
4.2.3.6 Salmonellen....126
4.2.3.7 Listeria monocytogenes....127
4.2.3.8 Campylobacter....127

5 Ergebnisse und Diskussion 128

5.1 Histologische Untersuchung....128

5.1.1 Überprüfung der Richtigkeit und der Wiederholbarkeit des Verfahrens....128

5.1.2 Quantitative histologische Untersuchung....132

5.1.2.1 Konventionelle Partikelzählung....132

5.1.2.2 Phasenanalytische Bestimmung des Knochenanteils....134

5.1.2.3 Färbung nach Kossa....136

5.1.2.4 Vergleich beider histometrischen Methoden unter der Berücksichtigung der Gewinnungstechnologie und des Ausgangsmaterials....137

5.1.2.5 Streuung der Ergebnisse innerhalb der Proben....140

5.1.2.6 Digitale Partikelzählung....144

5.1.2.7 Digitale Bestimmung der Partikelfläche, des Equivalent Circle Diameter und der nächsten Abstände zum Nachbarpartikel....148

5.1.3 Qualitative und semiquantitative histologische Untersuchung....157

5.2 Physikalisch-chemische Untersuchung....162

5.2.1 Ergebnisse der Kalziumbestimmung....162

5.2.2 Vergleich der Kalziumbestimmung mit der phasenanalytischen Histometrie....165

5.3 Schlussfolgerungen zum phasenanalytischen Verfahren....168

5.4 Mikrobiologische Untersuchung....170

5.4.1 Mikrobiologisches Profil....170

5.4.2 Pathogene Keime....181

5.5 Schlussfolgerungen zur Statuserhebung von Putenseparatorenfleisch....183

6 Zusammenfassung 185

7 Summary 188

8 Verzeichnis der Vorveröffentlichungen 191

8.1 Wissenschaftliche Beiträge.....191
8.2 Vorträge.....191
8.3 Poster.....192

9 Literaturverzeichnis 193

10 Tabellenverzeichnis 206

11 Abbildungsverzeichnis 210

12 Danksagung 215

13 Selbständigkeitserklärung 216

Abkürzungsverzeichnis

AAS	*Atomabsorptionsspektrometrie*
AMRS	*Advanced Meat Recovery System*
a_w	*activity of water*
BEFFE im FE	*Bindegewebseiweißfreies Fleischeiweiß im Fleischeiweiß*
BSE	*Bovine Spongiforme Enzephalopathie*
CIE	*Commision International de L'Éclairage*
CMYK	*Cyan Magenta Yellow Key (Farbsystem)*
CT	*Computertomographie*
CV	*Variationskoeffizient*
DGHM	*Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie*
DIN	*Deutsches Institut für Normung*
DLMB	*Deutsches Lebensmittelbuch*
ECD	*Equivalent Circle Diameter*
EDTA	*Ethylene diamine tetracetic acid*
EG	*Europäische Gemeinschaft*
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
EN	*Europäische Norm*
EWG	*Europäische Wirtschaftsgemeinschaft*
FFH	*Flüssiges Fleisch Homogenat*
HE	*Hämatoxylin Eosin*
HSI	*Hue Saturation Intensity (Farbsystem)*
HSV	*Hue Saturation Value (Farbsystem)*
ICP-OES	*Iductively Coupled Plasma Opical Emission Spectrometry*
ID	*Identity*
ISO	*International Organization for Standardization*
KbE	*koloniebildende Einheiten*
KOH	*Kaliumhydroxid*
KS	*Kolbenseparat/Kolbensepartorenfleisch*
L*a*b	*Luminance (a)Red/Green (b)Yellow/Blue (Farbsystem)*
LFGB	*Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch*
LMKV	*Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung*
MDM	*Mechanically Deboned Meat*
MDP	*Mechanically Deboned Pork*
MDT	*Mechanically Deboned Tissue*
MEF	*Mechanisch entbeintes Fleisch*
MO	*Mikroorganismen*
MRM	*Mechanically Recovered Meat*
MSM	*Mechanically Separated Meat*
MST	*Mechanically Separated Tissue*
OT	*Objektträger*
ppm	*parts per million*
QUID	*Quantitative Ingredient Declaration*
RGB	*Red Green Blue (Farbsystem)*
RL	*Richtlinie*
RS	*Rotationsseparat/Rotationsseparatorenfleisch*
SD	*Standardabweichung*
SDS	*sodium dodecyl sulphate*
SDS-PAGE	*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*
Skt	*Skalenteil*
TSE	*Transmissible Spongiforme Enzephalopathie*
USDA	*United States Department of Agriculture*
VO	*Verordnung*

1 Einleitung

Die Diskussion um die Herstellung, Verarbeitung und Kennzeichnung von Separatorenfleisch oder Mechanically Separated Meat (MSM) als maschinell vom Knochen abgelöstem Fleisch sowie die Suche nach Möglichkeiten, diesen Rohstoff in Lebensmitteln nachzuweisen, verliert in dem Spannungsfeld von wirtschaftlicher Relevanz, nachhaltiger Produktion und mangelnder Verbraucherakzeptanz nach wie vor nicht an Aktualität.

Laut Anhang III Abschnitt V Kapitel III Nummer 3 und 4 der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs in Verbindung mit Anhang I Kapitel 1 Nummer 1.7 und Kapitel 2 Nummer 2.1.7 der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel und Anhang IV Nummer 1 der Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 der Kommission vom 5. Dezember 2005 zur Festlegung von Durchführungsvorschriften für bestimmte unter die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates fallende Erzeugnisse und für die in den Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vorgesehenen amtlichen Kontrollen, zur Abweichung von der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 853/2004 und (EG) Nr. 854/2004 gibt es neben dem üblichen zerkleinerten Fleisch das Separatorenfleisch in zwei Qualitätsstufen in Abhängigkeit von der Zerstörung der Knochenstruktur beim Separieren bzw. dem Kalziumgehalt sowie dem mikrobiologischen Status mit unterschiedlichen Verwendungsmöglichkeiten. Zugleich sind die Regelungen verbunden mit differierenden Vorgaben zur Berücksichtigung in der Zutatenliste oder bei der Berechnung des BEFFE-Wertes eines daraus hergestellten Fleischerzeugnisses. Die Einstufung mit ihren Konsequenzen für die Verwendbarkeit ergibt sich aus den entsprechenden Bestimmungen. Um beurteilen zu können, inwieweit die aufgeführten Qualitätsmerkmale bezüglich des Hygienestatus und des Knochengehalts überhaupt eine sachgerechte Eingruppierung dieses Rohstoffs ermöglichen, wurde in der vorliegenden Arbeit die substantielle und mikrobiologische Beschaffenheit von

Putenseparatorenfleisch, das mit zwei unterschiedlichen Technologien gewonnen wurde, näher überprüft.

Aus der Definition von Separatorenfleisch als maschinell vom Knochen abgelöstem Fleisch, dessen Muskelfaserstruktur zerstört, aufgelöst oder verändert ist, resultieren keine diagnostisch verwertbaren Produktparameter für den Nachweis derartigen Materials (HILDEBRANDT und JOSEFOWITZ 2007). Erst wenn Gewinnungstechnologie und Ausgangsmaterial einen deutlich höheren Knochengehalt als bei zerkleinertem Geflügelfleisch bedingen, lässt sich MSM identifizieren und zwar mit Hilfe der chemischen Kalzium-Bestimmung oder einer mikroskopischen Analyse selektiv gefärbter histologischer Schnitte.

Im Gegensatz zum chemischen Verfahren erlaubt die histologische Methodik [einschließlich verschiedener Formen der stereometrischen Analyse] einen direkten Nachweis der Knochensubstanz. Den Goldstandard für die wichtigste Anwendung, das heißt die mikroskopische Mengenbestimmung, gibt das Prinzip der Planimetrie vor. Damit ist jedes Verfahren gemeint, bei dem die Flächeninhalte von Schnittebenen eines unregelmäßig begrenzten Körpers direkt ermittelt werden.

Statt repräsentative Strecken oder Punkte - wie bei den üblichen histometrischen Techniken - zu erfassen, muss bei der Planimetrie die Gesamtheit der Randpunkte eines jeden Elements umrissgetreu registriert werden. Eine solcher Forderung lässt sich bei der vorgegebenen Fragestellung nur mit Hilfe automatisierter Gerätekombinationen in die Praxis umsetzen. Entsprechende Hard- und Software zur mikroskopischen Planimetrie stehen nunmehr zur Verfügung um über differenzierte Farbphasen einzelne Komponenten zu diskriminieren und zu vermessen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung der computerisierten planimetrischen Phasenanalyse zur Ermittlung von Knochengewebe anhand von 35 Putenseparaten überprüft und dem Partikelzählverfahren sowie der Calcium-Bestimmung gegenübergestellt.

Ferner bot die softwaregestützte Phasenanalytik die Möglichkeit, eine digitale Detektion und Zählung der Knochenpartikel vorzunehmen und die Resultate mit den Ergebnissen der anderen analytischen Verfahren zu vergleichen. Darüber hinaus wurden stereometrische Parameter wie Partikelflächen, -ECD und nächste Abstände zwischen benachbarten Partikeln ermittelt und statistisch ausgewertet.

2 Literatur

2.1 Begriffsbestimmung

Die in der Legislative verankerte Definition des Separatorenfleisches ist weitaus jünger als die Gewinnungsverfahren an sich.

Die erste gesetzlich verankerte Definition des Separtorenfleisches fand sich im Artikel 2 Buchstabe c der Richtlinie „Frischfleisch“ von 1991 (Richtlinie 91/497/EWG des Rates vom 29. Juli 1991 zur Änderung und Kodifizierung der Richtlinie 64/433/EWG zur Regelung gesundheitlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit frischem Fleisch zwecks Ausdehnung ihrer Bestimmungen auf die Gewinnung und das Inverkehrbringen von frischem Fleisch). Dort wird Separatorenfleisch als „mechanisch von fleischtragenden Knochen, ausgenommen Kopfknochen, Röhrenknochen, Gliedmaßenenden unterhalb der Karpal- oder Tarsalgelenke sowie Schweineschwänze, gewonnenes und für zugelassene Betriebe bestimmtes Fleisch“ bezeichnet. Diese Begriffsbestimmung wurde in zwei Hygieneverordnungen übernommen, nämlich die deutsche Fleischhygieneverordnung („... ein Erzeugnis, das nach dem Entbeinen durch maschinelles Abtrennen von frischem Fleisch (Restfleisch) von Knochen, ausgenommen Kopfknochen und Röhrenknochen sowie Gliedmaßenenden unterhalb der Karpal- oder Tarsalgelenke und Schweineschwänzen, gewonnen worden ist;“ (§ 2 Nr. 7a der Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch in der Fassung der Bekanntmachung vom 29. Juni 2001 (BGBl. I S. 1366), zuletzt geändert durch Artikel 2 § 3 Abs. 33 des Gesetzes vom 1. September 2005 (BGBl. I S. 2618)) sowie Geflügelfleischhygieneveordnung („... ein Erzeugnis, das nach der Zerlegung durch maschinelles Abtrennen von frischem Geflügelfleisch von Knochen gewonnen wird;“ (§ 1 Nummer 7 der GeflügelfleischhygieneVO 2001 in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. Dezember 2001 (BGBl. I S. 4098; 2003 I S. 456), zuletzt geändert durch Artikel 3 der Verordnung vom 8. Dezember 2004 (BGBl. I S. 3353)).

Das Deutsche Lebensmittelbuch bezeichnete das maschinell separierte Fleisch als „maschinell von grob ausgelösten Knochen abgetrenntes Fleisch“ und stellte es dem fettgewebsreichen Schweine- bzw. dem sehnenreichen Geflügelfleisch gleich (Abschnitt I Ziffer 1.123 und 1.133 der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuchs).

Im Bericht des Veterinärausschusses der Europäischen Union wurden mehrere Begriffe wie mechanically deboned meat (MDM), mechanically deboned tissue (MDT), mechanically separated meat/tissue (MSM/MST) und mechanically recovered meat (MRM) zum mechanisch vom Knochen entfernten Fleisch zusammengefasst. Die weichen Separate, bei denen überwiegend Bindegewebe entfernt wird, sind ausdrücklich aus dieser Definition herausgenommen (European Commission 1997).

Die Richtlinie 2001/101/EG bekräftigte, dass das Separatorenfleisch vom Anwendungsbereich der Definition „Fleisch“ auszunehmen ist (Erwägungsgrund (7) der Richtlinie 2001/101/EG der Kommission vom 26. November 2001 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür).

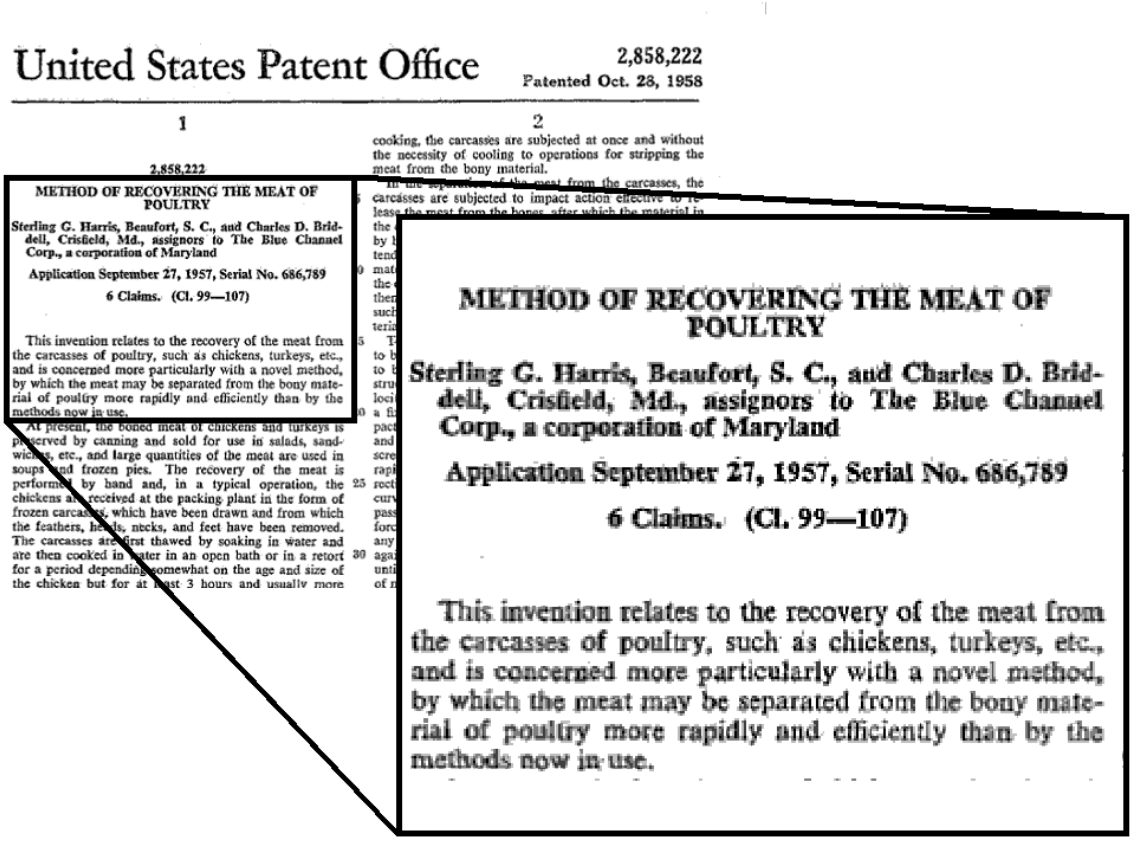
Seit dem Inkrafttreten der neuen Lebensmittelhygienegesetzgebung auf europäischer Ebene wurde das Separatorenfleisch in der VO (EG) 853/2004 als „ein Erzeugnis, das durch Ablösung des an fleischtragenden Knochen nach dem Entbeinen bzw. an den Geflügelschlachtkörpern haftenden Fleisches auf maschinelle Weise so gewonnen wird, dass die Struktur der Muskelfasern sich auflöst oder verändert wird“ definiert (Anhang 1 Nummer 1.14 der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs). Eine Ergänzung erfuhr diese Begriffsbestimmung durch den in dieser Verordnung vorgeschalteten Erwägungsgrund Nummer 20, in dem angeführt wird, dass die neue Definition alle Verfahren des mechanischen Ablösens abdecken soll.

Die Auflösung oder Veränderung der Struktur der Muskelfaser wurde um den Ausdruck “Zerstörung” durch den Artikel 1 (11b) der Verordnung (EG) Nr. 1923/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien ergänzt.

2.2 Gewinnung

Die ältesten bekannten Separationsgeräte, die damaligen Trommelseparatoren, wurden Anfang der 40er Jahre in der japanischen Fischverarbeitungsindustrie eingesetzt. Ende de 50er Jahre wurden die ersten, vornehmlich in der geflügelfleischverarbeitenden Industrie in den USA verwendeten Geräte zur maschinellen Entbeinung von fleischttragenden Knochen entwickelt (FRONING 1976, TRINDADE et al. 2004).

Die Abbildungen 1 und 2 spiegeln beispielhaft den damaligen Fortschritt in der Entwicklung der Technologie der maschinellen Restfleischgewinnung wieder.



United States Patent Office 2,858,222 Patented Oct. 28, 1958

1 2

2,858,222

METHOD OF RECOVERING THE MEAT OF POULTRY

Sterling G. Harris, Beaufort, S. C., and Charles D. Briddell, Crisfield, Md., assignors to The Blue Channel Corp., a corporation of Maryland

Application September 27, 1957, Serial No. 686,789

6 Claims. (Cl. 99—107)

This invention relates to the recovery of the meat from the carcasses of poultry, such as chickens, turkeys, etc., and is concerned more particularly with a novel method, by which the meat may be separated from the bony material of poultry more rapidly and efficiently than by the methods now in use.

cooking, the carcasses are subjected at once and without the necessity of cooling to operations for stripping the meat from the bony material.

METHOD OF RECOVERING THE MEAT OF POULTRY

Sterling G. Harris, Beaufort, S. C., and Charles D. Briddell, Crisfield, Md., assignors to The Blue Channel Corp., a corporation of Maryland

Application September 27, 1957, Serial No. 686,789

6 Claims. (Cl. 99—107)

This invention relates to the recovery of the meat from the carcasses of poultry, such as chickens, turkeys, etc., and is concerned more particularly with a novel method, by which the meat may be separated from the bony material of poultry more rapidly and efficiently than by the methods now in use.

Abbildung 1: ***Auszug aus dem Register des Patentbüros der USA vom 28.10.1958***
(Quelle: United States Patent Office; www.google.com/patents?id=AtNQAAAAEBAJ&pg=PA1954#PPA1954,M1)

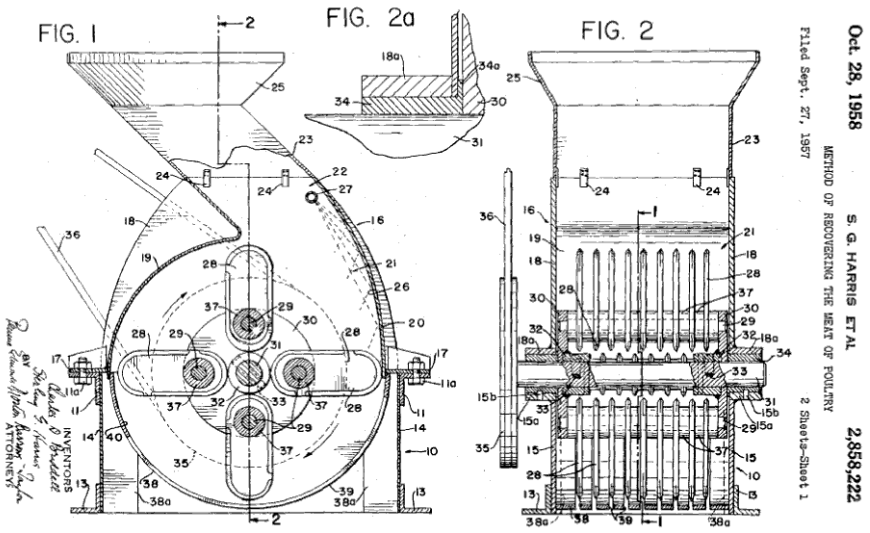


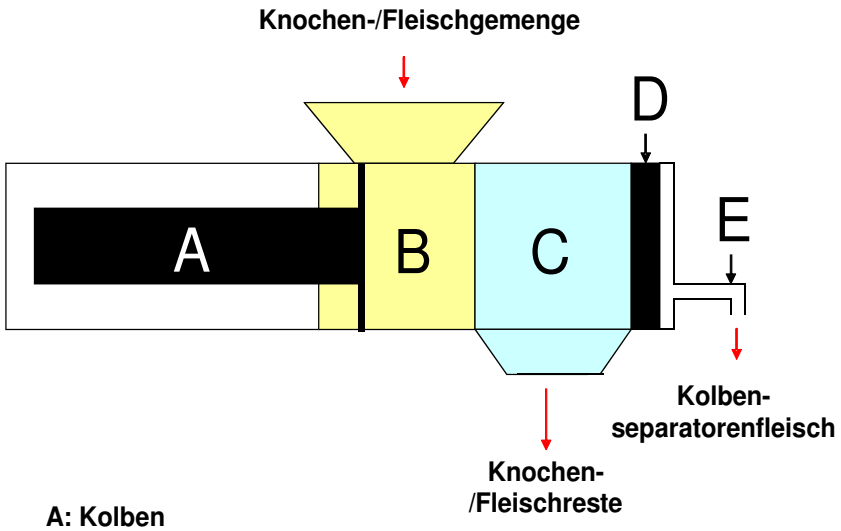
Abbildung 2: ***Patentskizze über eine „Methode zur Wiedergewinnung von Geflügelfleisch“***
(Quelle: United States Patent Office;
www.google.com/patents?id=AtNQAAAAEBAJ&pg=PA1954#PPA1954,M1)

Im wesentlichen gibt es zwei Grundsysteme der Separatorenfleischgewinnung, die seit den Anfängen, sukzessive modernisiert, die Produktqualität des mechanisch gewonnen Fleisches stetig verbessert haben (NITSCH 2004).

- **Kolbenseparation**

  Die Kolbenseparation gehört zur diskontinuierlichen Herstellungsweise des Separatorenfleisches. Dabei wird ein Kolbenseparator mit einem Druckzylinder betrieben, der manuell oder über eine dosierbare Fördereinrichtung mit unzerkleinerten oder vorgebrochenen Knochen beschickt wird. Mittels eines Kolbens wird im geschlossenen Zylinder soviel Druck erzeugt, dass die Muskulatur von den Knochen gelöst und durch z.B. Filterplatten in Form einer Paste nach außen gedrückt wird. Der abgeleitete Fleischbrei ist weitgehend frei von Knochen- oder Knorpelpartikeln und kann sofort verwendet oder eingefroren werden. Die Temperaturerhöhung schwankt zwischen 3 und 9°C. Pressdruck und Pressdauer sind einstellbar (WITTMANN 1977).

Die Abbildung 3 zeigt vereinfachend schematisch dargestellt die Funktionsweise eines Kolbenseparators:



A: Kolben
B: Füllkammer
C: Druckkammer
D: Sieb
E: Fleischabführrohr

Abbildung 3: ***Funktionsweise eines Kolbenseparators*** *(eigene Zeichnung; Quelle: DMP-45 „Technische Merkmale - Funktionsprinzip“ Stork Protecon Langen)*

- **Rotationsseparation**

  Bei den kontinuierlich arbeitenden Rotationsseparatoren können durch Verstärkung des Drucks sowohl der Knochenanteil als auch die Temperatur gesteuert werden. Je nach Arbeitsweise unterscheidet man:

  Separatoren mit einer Entknochungstrommel als rotierendes Element

  „Das über einen Einfülltrichter kontinuierlich zugeführte, vorzerkleinerte Material wird mittels einer Druckplatte gegen die rotierende Trommel gedrückt. Die weichen Bestandteile des zerkleinerten Materials werden in das Innere der Trommel gepresst und mittels einer Schneckenwalze entfernt. Das Hartseparat bleibt außerhalb der Trommel ...“ Es kommt zu einer Temperaturerhöhung von maximal 3°C (WITTMANN 1977).

Separatoren mit einer Schnecken- oder Messerwelle als rotierendes Element

„Der Separator wird über eine Pumpe oder über einen Schwerkraftförderer mit zerkleinertem Fleisch-Knochenmaterial versorgt. Eine Schnecke transportiert das Material zum Entknochungskopf, wobei durch den entstehenden Staudruck sowie einer verdichtenden Schnecke oder einer Messerwelle das weiche Material durch die Entknochungszylinder nach außen gepresst wird.“ Die Temperaturerhöhung schwankt zwischen 2 – 5°C (WITTMANN 1977).

In der Abbildung 4 wird vereinfachend schematisch die Funktionsweise eines Rotationsseparators dargestellt:

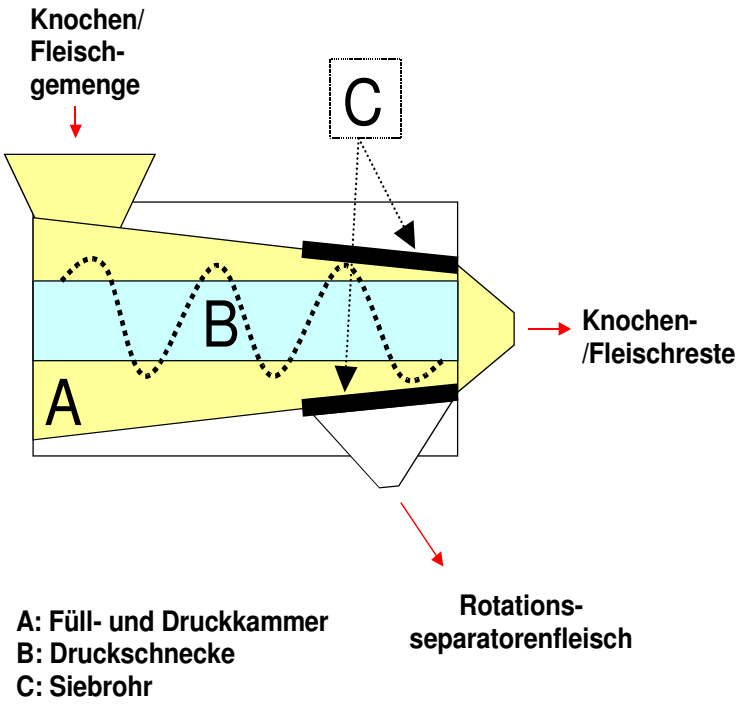


Abbildung 4: ***Funktionsweise eines Rotationsseparators*** *(eigene Zeichnung; Quelle: www.lima-france.com/complete-lines.php)*

STIEBING (1998) beschrieb beide Gewinnungstechnologien, wie in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: ***Gegenüberstellung beider Separationstechnologien (STIEBING 1998)***

Kolbenseparatoren	***Druckschneckenseparatoren***
Bei diskontinuierlich arbeitenden Kolbenseparatoren wird das Knochen- bzw. Fleischgemenge teilweise unzerkleinert über eine Beschickungsöffnung in den Presszylinder gefüllt und mit einem hydraulisch betriebenen Kolben unter hohem Druck gegen ein Filtersystem gepresst, wodurch die weichen Bestandteile des Gemenges abgeführt werden. Nach dem Pressen öffnet sich der Zylinder und die zusammengedrückten Knochen werden ausgestossen.	Bei kontinuierlich arbeitenden Druckschneckenseparatoren wird das zerkleinerte Knochen/Fleischgemenge mit Förderschnecken unter ansteigendem Druck komprimiert. Am Auslauf werden die weichen Bestandteile durch Siebe nach aussen gepresst. Der Knochenrückstand wird ausgestossen.

Die Zusammensetzung des gewonnenen Rohstoffs wird durch verschiedene Parameter wie Pressdruck, Maschinentyp und die Art des verwendeten Ausgangsmaterials beeinflusst (STIEBING 1998).

BAUM et al. (1980) untersuchten die Beeinflussung der Größe und Anteile der Knochenpartikel in Abhängigkeit von der Trommelperforation des Separators. Hierzu färbten sie über verschiedene Perforationsdurchmesser hergestelltes Separatorenfleisch mit Sibernitrat an und bestimmten die entstandenen Knochen- und Fleischpartikelgrößen. Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen zeigt die Abbildung 5.

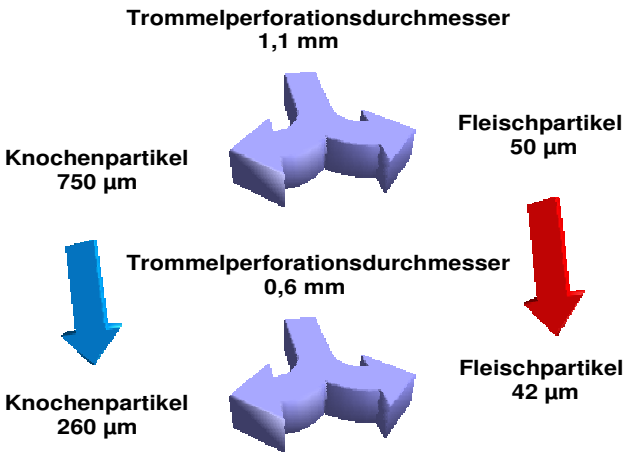


Abbildung 5: ***Abhängigkeit der Größe und Anteile der Knochenpartikel von der Trommelperforation (BAUM et. al. 1980)***

- **Physikalisch-chemische Separationsverfahren**

  Bei den physikalisch-chemischen Kombiverfahren (Herta-KS-Verfahren, FFH-Verfahren) wird das Fleisch-Knochen-Gemisch vorzerkleinert, in Kochsalz oder Nitritpökelsalz suspendiert und anschließend in einer Kolloidmühle homogenisiert. Die entstandene flüssige Phase enthält die gelösten und dispergierten Eiweiße und einen Großteil des Fettes. In der festen Phase befindet sich vor allem das Knochen- und Bindegewebe (WITTMANN 1977). Diese Technologie ist heutzutage jedoch weitestgehend überholt (STIEBING 1998).

- **„3 mm - Fleisch“**

  Das unter schonenden Prozessbedingungen maschinell vom Knochen gewonnene und ggf. zusätzlich gebaaderte Separatorenfleisch, welches sich aufgrund der noch gut erhaltenen Muskelfaserstruktur schwer von gewolftem Fleisch unterscheiden läßt, wurde in der Praxis oftmals als „3 mm – Fleisch“ gehandelt, obwohl es sich hierbei aufgrund der geltenden lebensmittelrechtlichen Bestimmungen eindeutig um Separatorenfleisch handelte (STIEBING 1998). Die umgangssprachlich eingebürgerte Bezeichnung steht im Zusammenhang mit der Sieblochgröße der Separatoren (ANONYM 2006a).

2.3 Verwendungsmöglichkeiten

Zwei Jahrzehnte lang nach dem Beginn der maschinellen Separation war in der damaligen Bundesrepublik Deutschland der Einsatz des Separatorenfleisches in der fleischverarbeitenden Industrie kaum reglementiert. Die Verwendung für rohe Fleischerzeugnisse stieß zwar aufgrund erhöhter bakterieller Kontamination infolge der bei der Gewinnung herrschenden erhöhten Temperaturen auf Ablehnung (WIESE 1976), jedoch stand der Verarbeitung des maschinell gewonnenen Fleisches zu Brüh- und Kochwürsten von der rechtlichen Seite aus nichts im Wege. Die einzigen immer wieder diskutierten Einwände waren sensorische Abweichungen aufgrund des erhöhten Knochenanteils sowie die daraus resultierende etwaige Minderung des Nähr- und Genusswertes, die allerdings größtenteils wissenschaftlich nicht bestätigt werden konnte (LINKE et al. 1974; WIESE 1976). Dass es sich beim Separatorenfleisch um ein labiles Produkt handelte, zeigt aber die damalige Ablehnung seiner Aufnahme in die Hackfleischverordnung und die Forderung nach einer spezifischen Hygieneverordnung für den maschinell gewonnen Rohstoff (WIESE 1976).

In den USA und den Niederlanden gab es in den 80er Jahren eine mengenmäßige Beschränkung für den Einsatz von MDM in Fleischprodukten von höchstens 20 % Gewichtsanteil. Eine Verwendung des Separatorenfleisches war bei Produkten wie Schinken oder Vorderschinken sogar untersagt (FIELD 1983; BIJKER et al. 1985).

Die erste relevante Einschränkung der Verwendungsmöglichkeiten von Separatorenfleischeinsatz boten und bieten bis heute die Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches. So darf das Separatorenfleisch nur zur Herstellung von Brüh- und Kochwürsten verwendet werden („Maschinell von grob ausgelösten Knochen abgetrenntes Fleisch wird nur für Brüh- und Kochwürste verwendet." (Deutsches Lebensmittelbuch, Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse , Abschnitt I, Nr. 1.123 und 1.133). Ferner darf es nicht bei Brüh- und Kochwurst der „Spitzenqualität" zum Einsatz kommen („Fleischerzeugnisse mit hervorhebenden Hinweisen, ..., unterscheiden sich von den unter der betreffenden Bezeichnung sonst üblichen Fleischerzeugnissen, abgesehen von hohem Genußwert, durch besondere Auswahl des Ausgangsmaterials,..." (Deutsches Lebensmittelbuch, Leitsätze für Fleisch- und Fleischerzeugnisse, Abschnitt I, Nummer 2.12).

Ein Verbot der Verwendung des Separatorenfleisches in Hackfleischerzeugnissen brachte die Verordnung über Hackfleisch, Schabefleisch und anderes zerkleinertes rohes Fleisch. Nach § 6 Absatz 3 darf „mittels Separatoren von Knochen abgetrenntes Fleisch" zur Herstellung der durch diese Verordnung abgedeckten Erzeugnisse nicht verwendet werden.

In den 90er Jahren wurde durch die EU-Gesetzgebung bekräftigt, dass maschinell gewonnenes Fleisch nur dann in den Verkehr gebracht werden dürfe, wenn es gemäß der Frischfleisch-Richtlinie in einem zugelassen Betrieb einer Hitzebehandlung unterzogen wird (SCHÖTZ 2002).

Bedingt durch die BSE-Krise Ende der 90er Jahre wurde die frühere Verwendung der Wiederkäuerseparate aufgrund des vom Nervensystem ausgehenden Gesundheitsrisikos verboten. Nach der TSE-Verordnung dürfen Knochen von Rindern, Schafen und Ziegen nicht für die Herstellung von Separatorenfleisch verwendet werden (Verordnung (EG) Nr. 1923/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien, Anhang XI a).

Durch die neue europäische Gesetzgebung im Bereich der Lebensmittelhygiene, das Hygienepaket, sind zwei je nach erfüllten Kriterien unterschiedliche Verwendungsmöglichkeiten vorgesehen. Zum einen darf Separatorenfleisch nur für hitzebehandelte Fleischerzeugnisse verwendet werden, zum anderen kann es unter bestimmten Voraussetzungen zusätzlich bei zum Erhitzen bestimmten Fleischzubereitungen und rohen Fleischerzeugnissen Anwendung finden (siehe auch 2.4.1, Tabelle 2).

2.4 Recht und öffentliche Diskussion

2.4.1 Hygiene und Gesundheitsgefährdung

Die erste große öffentliche Diskussion um die hygienischen Kriterien des mechanisch gewonnen Fleisches entbrannte Mitte der 70er Jahre, als die USDA-Spezifikationen für das Separatorenfleisch veröffentlicht wurden (TÄNDLER 1975). Die Auseinandersetzung führte dazu, dass sich der deutsche Gesetzgeber gezwungen sah, diesbezüglich nationale Vorschriften zu erlassen, was in § 6 Absatz 3 der Verordnung über Hackfleisch, Schabefleisch und anderes zerkleinertes rohes Fleisch im Verbot der Verwendung von Separatorenfleisch in Hackfleisch, Geschnetzeltem und Hackfleischerzeugnissen seinen Ausdruck fand.

Den nächsten Vorstoß zur Verringerung des hygienischen Risikos brachte 1991 die Frischfleisch-Richtlinie der Europäischen Union (Richtlinie 91/497/EWG des Rates vom 29. Juli 1991 zur Änderung und Kodifizierung der Richtlinie 64/433/EWG zur Regelung gesundheitlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit frischem Fleisch zwecks Ausdehnung ihrer Bestimmungen auf die Gewinnung und das Inverkehrbringen von frischem Fleisch, Artikel 6 Absatz 1 Buchstabe c) nach der Separatorenfleisch einer Hitzebehandlung gemäß der Fleischerzeugnis-Richtlinie (Richtlinie 92/5/EWG des Rates vom 10. Februar 1992 zur Änderung und Aktualisierung der Richtlinie 77/99/EWG zur Regelung gesundheitlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Fleischerzeugnissen sowie zur Änderung der Richtlinie 64/433/EWG , Artikel 6) im Herkunftsbetrieb oder in einem vom amtlichen Tierarzt bestimmten sonstigen Betrieb unterzogen werden sollte. Laut Geflügelfleisch-Richtlinie (Richtlinie 92/116/EWG des Rates vom 17. Dezember 1992 zur Änderung und Aktualisierung der Richtlinie 71/118/EWG zur Regelung gesundheitlicher Fragen beim Handelsverkehr mit frischem Geflügelfleisch , Artikel 5) und Zuchtwild-Richtlinie (Richtlinie 91/495/EWG des Rates vom 27. November 1990 zur Regelung der gesund-

heitlichen und tierseuchenrechtlichen Fragen bei der Herstellung und Vermarktung von Kaninchenfleisch und Fleisch von Zuchtwild, Artikel 6) durfte auch das von den genannten Tiergruppen mechanisch gewonnene Fleisch nur in den Verkehr gebracht werden, wenn im Herkunftsbetrieb oder in einem anderen von der Behörde zugelassenem Betrieb eine Hitzebehandlung erfolgte. In der Hackfleisch-RL (Richtlinie 94/65/EG des Rates vom 14. Dezember 1994 zur Festlegung von Vorschriften für die Herstellung und das Inverkehrbringen von Hackfleisch/Faschiertem und Fleischzubereitungen , Artikel 1 Absatz 3) wurde zudem klargestellt, dass diese Richtlinie nicht für Separatorenfleisch, das in nach der Richtlinie 77/99/EWG zugelassenen Verarbeitungsbetrieben einer Wärmebehandlung unterzogen wurde, gilt (SCHÖTZ 2002).

Während der BSE-Krise war aufgrund der möglichen Kontamination des Separatorenfleisches mit Ganglien des vegetativen Nervensystems oder Resten von Gehirn und Rückenmark eine Gesundheitsgefährdung durch das mechanisch gewonnene Fleisch nicht mehr auszuschließen, so dass 2001 das Herstellen von Wiederkäuerseparatorenfleisches EU-weit verboten wurde (Verordnung (EG) Nr. 1923/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien, Anhang XI a).

Nach der neuen europäischen Lebensmittelhygienegesetzgebung gibt es für das Separatorenfleisch zwei differenzierte, an den Verwendungsmöglichkeiten orientierte Kategorien, wobei verschiedene Kriterien zur Anwendung kommen. Dies wird im Erwägungsgrund Nummer 13 der Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 der Kommission vom 5. Dezember 2005 zur Festlegung von Durchführungsvorschriften für bestimmte unter die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates fallende Erzeugnisse und für die in den Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vorgesehenen amtlichen Kontrollen, zur Abweichung von der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 853/2004 und (EG) Nr. 854/2004 folgendermaßen verdeutlicht: „Separatorenfleisch, das nach Verfahren gewonnen wird, die die Struktur der verwendeten Knochen nicht verändern, sollte anders bewertet werden als Separatorenfleisch, bei dessen Gewinnung die Knochenstruktur verändert wird“. Die beiden Kategorien aus der neuen Lebensmittelhygienegesetzgebung mit den entsprechenden Kriterien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: ***Kriterien für die zwei Kategorien von Separatorenfleisch***

Kriterium	***VO (EU) 853/2004*** ***Anhang III Abschnitt V Kapitel III***	
	Nummer 3	***Nummer 4***
Herstellungs-technik	a) Struktur der Knochen, die bei der Herstellung von Separatorenfleisch verwendet werden, wird nicht verändert b) Kalziumgehalt übersteigt nicht signifikant den Kalziumgehalt von Hackfleisch/Faschiertem	andere als die in Nummer 3 genannten Techniken
Gewinnung	a) Nicht entbeinte Rohstoffe aus einem angegliederten Schlachtbetrieb dürfen nicht ... Geflügelschlachtkörper dürfen jedoch nicht älter als drei Tage sein. b) Die maschinelle Gewinnung von Separatorenfleisch muss unmittelbar nach dem Entbeinen stattfinden. c) Wird das Separatorenfleisch nicht unmittelbar nach der Gewinnung verwendet, so muss es umhüllt oder verpackt und dann auf eine Temperatur von nicht mehr als 2 °C abgekühlt oder auf eine Kerntemperatur von -18 °C oder darunter eingefroren werden. Bei der Beförderung und Lagerung müssen diese Temperaturanforderungen eingehalten werden.	a) Nicht entbeinte Rohstoffe aus einem angegliederten Schlachtbetrieb dürfen nicht ... Gefügelschlachtkörper dürfen jedoch nicht älter als drei Tage sein. b) Findet die maschinelle Gewinnung von Separatorenfleisch nicht unmittelbar nach dem Entbeinen statt, so müssen die fleischtragenden Knochen bei nicht mehr als 2 °C bzw. bei gefrorenen Erzeugnissen bei -18 °C oder darunter gelagert und befördert werden. c) Fleischtragende Knochen von gefrorenen Schlachtkörpern dürfen nicht wieder eingefroren werden. d) Wird das Separatorenfleisch nicht binnen einer Stunde nach seiner Gewinnung verwendet, so ist es sofort auf eine Temperatur von nicht mehr als 2 °C abzukühlen. e) Wird das Separatorenfleisch nach dem Kühlen binnen 24 Stunden nicht verarbeitet, so muss es innerhalb von zwölf Stunden nach seiner Gewinnung eingefroren werden und innerhalb von sechs Stunden eine Kerntemperatur von -18 °C oder darunter erreichen. f) Gefrorenes Separatorenfleisch muss vor der Lagerung oder Beförderung umhüllt oder verpackt werden, darf nicht länger als drei Monate gelagert werden und bei der Beförderung und Lagerung muss eine Temperatur von -18 °C oder darunter gewährleistet sein.

Verwendung	d) Wird durch vom Lebensmittelunternehmer durchgeführte Untersuchungen der Nachweis erbracht, dass Separatorenfleisch den mikrobiologischen Kriterien für Hackfleisch/Faschiertes gemäß der Verordnung (EG) Nr. 852/ 2004 entspricht, so kann es in Fleischzubereitungen, die eindeutig nicht dazu bestimmt sind, ohne vorherige Hitzebehandlung verzehrt zu werden, sowie in Fleischerzeugnissen verwendet werden. e) Separatorenfleisch, das die Kriterien des Buchstaben d) nachweislich nicht erfüllt, kann nur zur Herstellung hitze-behandelter Fleischerzeugnisse in Betrieben verwendet werden, die gemäß der vorliegenden Verordnung zugelassen sind.	g) Separatorenfleisch darf nur zur Herstellung wärmebehandelter Fleischerzeugnisse in Betrieben verwendet werden, die gemäß dieser Verordnung zugelassen sind.

Mikrobiologische Kriterien	***VO (EU) 2073/2004***	
	Anhang I	
	Kapitel 1, Nummer 1.7	
	Salmonella	
	n = 5	
	c = 0	
	in 10 g nicht nachweisbar	
	Kapitel 2, Nummer 2.1.7	
	Aerobe mesophile Keimzahl	
	n = 5	
	c = 2	
	m = 5 x10^5 KbE/g	
	M = 5 x10^6 KbE/g	

	E. coli	
	n = 5	
	c = 2	
	m = 50 KbE/g	
	M = 500 KbE/g	

Kalziumgehalt	***VO (EU) 2074/2004***	
	Anhang IV, Nummer 1	
	darf 0,1 % (= 100 mg/100 g oder 1000 ppm) des frischen Erzeugnisses nicht überschreiten;	

n = Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe; c = Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte zwischen m und M liegen; E. coli wird als Indikator für fäkale Kontamination verwendet.

Quellen: Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs ; Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel; Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 der Kommission vom 5. Dezember 2005 zur Festlegung von Durchführungsvorschriften für bestimmte unter die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates fallende Erzeugnisse und für die in den Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vorgesehenen amtlichen Kontrollen, zur Abweichung von der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 853/2004 und (EG) Nr. 854/2004

2.4.2 Deklaration

In den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts verlangten zwar Verbraucherverbände in der damaligen Bundesrepublik Deutschland die Deklaration des Separtorenfleisches, jedoch bestand allgemein eher die Tendenz, den Knochengehalt möglichst niedrig zu halten, wodurch sich eine Deklaration des Zusatzes vom MEF erübrigte. Bei Einhaltung strenger Qualitätsnormen sah man sich in der Lage, einen nicht übermäßigen, jedoch deklarationsfreien Zusatz von Separatorenfleisch bei bestimmten Fleischerzeugnissen zu tolerieren (WITTMANN 1977).

ZWINGMANN (1980) verlangte Deklarationspflicht für einen Separatorenfleischzusatz von > 6 %.

In den USA sollte erhöhter Kalziumgehalt (über 20 mg Kalzium pro Einzelportion eines Produktes) kenntlich gemacht werden, was einer indirekten Kennzeichnung des verwendeten Separatorenfleisches gleich käme (FIELD 1983).

Die Diskussion um die Kennzeichnung der Verwendung des Separatorenfleisches in Lebensmitteln flammte in Europa erneut in den 90er Jahren auf, als von diversen Kreisen Anfragen an die Europäische Kommission gestellt wurden, ob das Separatorenfleisch als gleichwertig dem eigentlichen Fleisch zu betrachten sei (Europäische Gemeinschaft 1996a). Die Antwort der Kommission zu dem damaligen Diskussionsthema „Knochen statt Fleisch“ lautete: „Die Erörterungen mit den Mitgliedsstaaten ... führten zu dem Ergebnis, dass Separatorenfleisch im Einklang mit Artikel 6 Absatz 5 Punkt b) der Richtlinie 79/112/EWG über die Etikettierung von Lebensmitteln in der Zutatenliste als solches anzugeben ist.“ (Europäische Gemeinschaft 1996b).

Eine bis heute gültige Regelung zur Deklarationspflicht für das mechanisch gewonnene Fleisch fand sich in der Richtlinie 2001/101/EG der Kommission vom 26. November 2001 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür. In dieser Richtlinie wird EU-einheitlich der Begriff „Fleisch“ für Kennzeichnungszwecke definiert und die Erwägungsgründe erläutern, dass sich das Separatorenfleisch nach der Vorstellung des Verbrauchers wesentlich vom Fleisch unterscheidet und damit vom Anwendunsbereich dieser Definition auszunehmen ist (Erwägungsgrund Nummer 7). Es muss mit seinem spezifischen Namen „Separatorenfleisch“ und Angabe der Tierart kenntlich gemacht werden (Erwägungsgrund Nummer 8). Die „Fleisch“-Begriffsbestimmung dieser Richtlinie im Anhang, die eine entsprechende Änderung des Anhangs I der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates

vom 20. März 2000 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür nach sich zog, schließt das mechanisch entbeinte Fleisch von ihrer Definition aus.

Wie bereits unter 2.1 dargestellt, übernahmen die Leitsätze für Fleisch- und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuchs die Deklarationspflicht des Separatorenfleisches mit der Konsequenz, dass Schweine- und Geflügelseparatorenfleischverwendung in Brüh- und Kocherzeugnissen zu kennzeichnen ist (Deutsches Lebensmittelbuch, Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, Abschnitt I, Nr. 1.123 und 1.133).

Die deutsche Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln (LMKV) bekräftigt in ihrer Anlage 1 in Verbindung mit § 6 Absatz 4 Nummer 1 den Ausschluß des Separatorenfleisches aus der Definition „Fleisch“. Somit unterliegt das maschinell entbeinte Fleisch der QUID-Regelung und darf nicht zum Fleischanteil angerechnet werden. Der frühere Bezug der Anlage 1 der LMKV zur Definition des Separatorenfleisches auf den § 2 Nummer 7 a der Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch in der Fassung der Bekanntmachung vom 29. Juni 2001 (BGBl. I S. 1366), zuletzt geändert durch Artikel 2 § 3 Abs. 33 des Gesetzes vom 1. September 2005 (BGBl. I S. 2618) wurde durch den Artikel 3 der Verordnung zur Änderung der Fruchtsaftverordnung und anderer lebensmittelrechtlicher Vorschriften vom 9. Oktober 2006 aktualisiert. Hierbei wird auf die Definition des Anhangs I Nummer 1.14 der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs verwiesen.

2.4.3 Öffentliche Diskussion

Die BSE-Krise, Deklarationspflicht, Entwicklung schonender Gewinnungsmethoden, unterschiedliche Bezeichnungen und nicht zuletzt die damit verbundene Problematik der Definition des mechanisch gewonnenen Fleisches infolge der neuen europäischen Lebensmittelhygienegesetzgebung brachten in den letzten Jahren eine bewegte Diskussion der beteiligten Kreise von Wirtschaft, Wissenschaft und Lebensmittelüberwachung über diesen eigentlich altbekannten Rohstoff in Gang. Bis zum Inkrafttreten des Lebensmittelhygienepaktes 2006 bestand in Deutschland und der EU keine gesetzlich festgelegte Verkehrsauffassung über die Gewinnung und Zusammensetzung des Separatorenfleisches. Das mehrmals geforderte, über das der Wiederkäuerseparate hinausgehende generelle Verbot des mechanisch vom Knochen

gewonnenen Fleisches konnte zwar in der Vergangenheit abgewendet werden, jedoch führten die intensiven Auseinandersetzungen dazu, dass Öffentlichkeit und Verbrauchertum dem vom Knochen separierten Fleisch mit immer mehr Skepsis und Ablehnung begegneten. Im Jahr 2001 verpflichtete sich die deutsche Fleischwarenindustrie angesichts der BSE-Krise, den in Verruf geratenen Rohstoff bei ihren Erzeugnissen nicht mehr einzusetzen (ANONYM 2006b). Auch die Deutsche Landwirtschaftliche Gesellschaft verabschiedete 2000 einen Ehrenkodex, der Separatorenfleisch für prämierte Erzeugnisse verbietet (Stiebing 2002). Danach entwickelte sich ein regelrechter Streit um die Definition und Begrifflichkeit von mechanisch entbeintem Fleisch zwischen den Herstellern und Verarbeitern auf der einen und der Lebensmittelüberwachung auf der anderen Seite. Bis zur Einführung der europäischen Lebensmittelhygieneverordnungen reichte die Bezeichnung des mit modernen Gewinnungsmethoden hergestellten Rohstoffs vom Mechanically Recovered Meat (eng. Mechanisch wiedergewonnenes Fleisch) über Mechanisch Deboned Meat (eng. Mechanisch entbeintes Fleisch) bis zum so genannten „3-mm-Fleisch“, welche seitens der Industrie als Verarbeitungs- und nicht als Separatorenfleisch eingestuft wurden. Diese Auffassung wurde jedoch von den Überwachungsbehörden nicht geteilt. Seit dem 01.01.2006 gilt jedes maschinell vom Knochen gewonnene Fleisch von Schwein und Geflügel als Separatorenfleisch und muss dementsprechend als solches deklariert werden. Alle Versuche seitens der Industrie, das mit modernen Methoden gewonnene Fleisch anders zu bezeichnen und somit aus der Definition „Separatorenfleisch“ herauszunehmen, sind bisher gescheitert. Den aktuellen Stand in der Diskussion um die Begriffsbestimmung von Separatorenfleisch zeigt die Abbildung 6 mit dem Entscheidungsbaum von HILDEBRANDT et al. (2006).

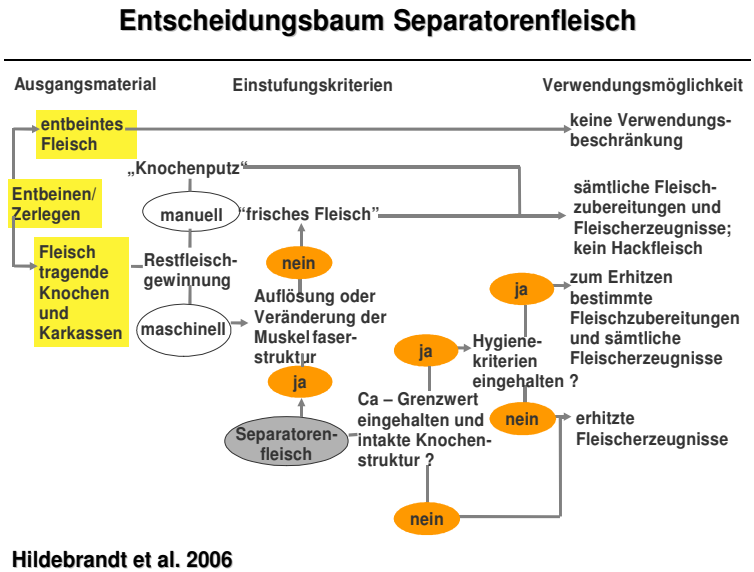


Abbildung 6: ***Entscheidungsbaum Separatorenfleisch (HILDEBRANDT et al. 2006)***

Die aus der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs (Anhang III Abschnitt IV Kapitel III Nummer 3) abgeleiteten und im Entscheidungsbaum von HILDEBRANDT et al. (2006) aufgeführten Merkmale Calciumgehalt und Knochenstruktur sowie bakteriologischer Status dienen nicht der Beschreibung von Separatorenfleisch, sondern sie erlauben seine Einteilung in zwei Sorten mit unterschiedlichen Verwendungsmöglichkeiten (HILDEBRANDT und KÖPERNIK 2007).

Somit kann die im Kapitel 2.6 dargestellte Analytik zum Nachweis des Separatorenfleisches zwar keine Lösung der juristischen Auseinandersetzung um die Definition und Deklaration des mechanisch entbeinten Rohstoffes bieten (HILDEBRANDT und JOSEFOWITZ 2007), jedoch stellen geeignete Nachweismethoden die Voraussetzung für die Überwachung der Rechtsvorschriften dar.

2.5 Qualität

2.5.1 Gewebliche Zusammensetzung

Histologisch kennzeichnend für das mechanisch vom Knochen abgelöste Fleisch ist neben dem Vorkommen von Skelettmuskulatur, kollagenem und elastischem Bindegewebe sowie den physiologischen Begleitgeweben (Nerven, Gefäße, lymphatisches Gewebe) das Auftreten von Knochen- und Knorpelgewebe. Deren Anteil kann bedingt durch die Gewinnungsart, den verwendeten Maschinentyp, den ausgeübten Druck, die Porenweite und nicht zuletzt das Ausgangsmaterial erheblich variieren (Kapitel 2.2).

ERNST (1974) fand einen Knochengehalt von 13,4 % in histologischen Schnitten von maschinell entbeintem Fleisch, wobei der Knochen durch Imprägnierung mit Silbernitrat dargestellt wurde.

Von LINKE et al. (1974) wurden in unter Zusatz von Nitritpökellake mechanisch entbeintem Rotfleisch (flüssige Phase) Knochenpartikeldurchmesser von 0,019 – 0,582 mm ($\bar{x}$ = 0,087) vorgefunden, während der Knochenrückstand (feste Phase) Durchmesser von 0,039 - 2,173 mm ($\bar{x}$ = 0,556 mm) aufwies. Im manuell gewonnenen Fleisch lagen die entsprechenden Werte zwischen 0,039 und 2,037 mm ($\bar{x}$ = 0,401 mm).

Von HILDEBRANDT et al. (1975) wurde bei 1710 Fleischerzeugnissen eine qualitativ-histologische Auswertung durchgeführt und unter anderen Parametern das Vorhandensein des Knochengewebes erfasst. Die Tabelle 3 und Abbildung 7 zeigen die Häufigkeiten des Vorkommens von Knochengewebe bei den untersuchten Proben.

Tabelle 3: ***Ergebnisse der Analyse des Knochengewebes (HILDEBRANDT et al. 1975*)**

Erzeugnis	***Anzahl der Proben***	***Nachweis von Knochen***	
		absolut	***relativ [%]***
Schabefleisch	264	10	4
Rinder-Gehacktes	312	27	9
Hackepeter	96	4	4
Cerealienhaltige Hackfleischerzeugnisse	268	23	9
Rohwurst I	112	2	2
Rohwurst II	170	12	7
Rohwurst einfach	9	0	0
Brühwurst I	17	3	18
Brühwurst II	450	55	12
Brühwurst einfach	12	0	0

I:Spitzenqualität II:mittlere Qualität

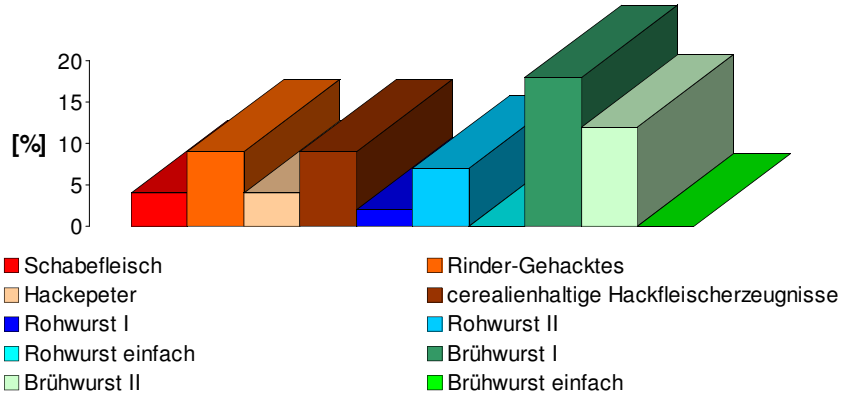


Abbildung 7: ***Häufigkeit des Vorkommens von Knochengewebe in Abhängigkeit von der Art des Fleischerzeugnisses (HILDEBRANDT et al. 1975)***

TERBIJHE (1976) ermittelte bei 24 Geflügelseparaten mittels KOH-Verfahren in 88 % der Fälle Knochengehalte über 1 % .

1976 gab die Bundesanstalt für Forschung eine Stellungnahme zum Separatorenfleisch ab, in der sie einen Knochengehalt von höchstens 0,1% für die mit Zusatz von Separatorenfleisch hergestellten Lebensmittel vorschlug (ANONYM 1976).

NEUHÄUSER (1977) untersuchte Separate von grobentbeinten Rindervorderviertel und Schweineknochen, die mit einem Pressdruck von 240 bis 260 bar hergestellt worden waren. Der Rückstand wurde nochmals mit erhöhtem Druck von 320 bis 350 bar durch die Maschine gepresst. Die Ergebnisse sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: ***Ergebnisse der Untersuchung von Schweine- und Rinderseparaten (NEUHÄUSER 1977)***

	Ausgangsmaterial	***Knochen (%)***
1. Separation	Rindervorderviertel	0,64
	Schweineknochen	0,51
2. Separation	Rindervorderviertel	1,74
	Schweineknochen	1,24

FIELD et al. (1977) charakterisierten mechanisch entbeintes Rindfleisch unter anderem mit Hilfe der Partikelgröße. Den größten Partikeldurchmesser gaben sie mit 460 µm an. Der mittlere Partikeldurchmesser reichte von 76,6 bis 111,7 µm.

KÖNIGSMANN (1978) sowie KÖNIGSMANN et al. (1980a) untersuchten 10 Rinder- und 4 Schweineseparatorenfleischproben mit Hilfe der Fernsehbildanalyse und ermittelten Volumenanteile von 0,2125 bis 4,980 % (Tabelle 5). Die Abbildung 8 illustriert die erheblichen Schwankungen des Knochenanteils.

Tabelle 5: ***Ermittlung der Knochenvolumenanteile mittels Fernsehbildanalyse (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980)***

	Tierart	***Knochenanteil [Vol %]***
1	Rind	3,997
2		2,489
3		0,887
4		1,732
5		0,9855
6		1,482
7		1,183
8		0,8715
9		4,980
10		0,4855
11	Schwein	4,4135
12		2,4365
13		4,4335
14		0,2125

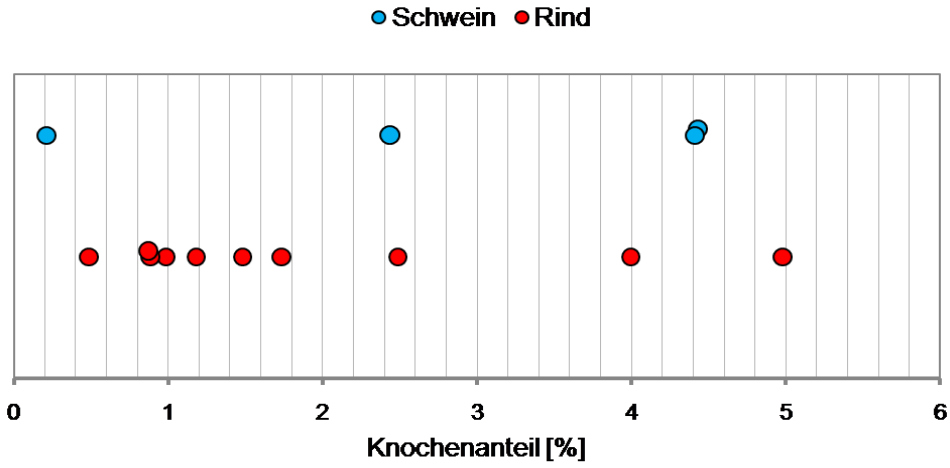


Abbildung 8: ***Knochenanteil in 14 Separatorenfleischproben (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980a)***

Nach Überprüfung des Knochengehalts von Schweineseparatorenfleich mittels des KOH-Auskochverfahrens verlangten BIJKER et al. (1979), dass die damaligen niederländischen Grenzwerte für das mechanisch entbeinte Schweinefleisch verändert werden sollten. Der ermittelte Hartknochenrückstand sollte nicht 0,4% (~ 1% reiner Knochengehalt) überschreiten und 90% der Knochenpartikel sollten einen Durchmesser unter 1,0 mm aufweisen.

WINTER (1978) verglich das manuell durchgeführte Entbeinen von Schweine- und Rinderknochen mit der maschinellen Separation. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Sie zeigen, dass manuelles Entbeinen zwar größere Knochenpartikel liefert, jedoch unterscheiden sich die Mengenanteile gegenüber der maschinellen Separation nicht systematisch.

Tabelle 6: ***Vergleich der manuellen Entbeinung und der maschinellen Separation (WINTER 1978)***

Ausgangsmaterial	***Knochenrückstands-prozentsätze***		***mittlere Abmessungen der Knochenpartikel [µm]***	
	Manuelle Entbeinung	***maschinelle Separation***	***Manuelle Entbeinung***	***maschinelle Separation***
Schweineschulterknochen	0,07	0,08	250	176
Schweinerücken und -lendenwirbel (mit Teilen der Rippen)	0,27	0,34	364	260
		0,24		187
Rindernackenwirbel	0,73	0,43	286	262
Rindernackenwirbel ohne Fleisch, Bindegewebe und Fett	./.	0,18	./.	163

Das von BIJKER et al. (1980) mittels KOH-Auskochverfahren und Mikroskopie untersuchte Schweineseparatorenfleisch wies Knochenrückstände von 0,12 – 0,62 % auf, die Partikelgröße variierte von 100 - 1000 µm. Nur 0,6 % der Knochenpartikel waren größer als 3 mm.

ZWINGMANN (1980) gab als mittleren Knochengehalt 1,14 % bei der Gewinnung von mit ambulanten Separtorenanlagen gewonnenem Restfleisch an.

Bei der chemischen Analyse von „Mechanically Deboned Pork“ stellten BIJKER und KOOLMEES (1981) einen Gehalt von 0,05 bis 0,62 % an Knochenrückstandssubstanz fest.

SLOWINSKI und MROCZEK (1982) warnten vor dem Auftreten von Knochensplittern beim Zusatz von mechanisch entbeintem Geflügelfleisch. Das Geflügelseparatorenfleisch wurde mit Hilfe einer BEEHIVE®-Maschine mit einem Porendurchmesser von 0,66 mm gewonnen, während mechanisch entbeintes Schweine- und Rindfleisch mit Hilfe einer Seffelaar-Looyen-Anlage produziert wurde. Die Splitter wurden aus dem Separatorenfleisch separiert und mikroskopisch ausgemessen; sie konnten im Modellversuch in einer dem Magensaft ähnlichen Salzsäurelösung nur geringfügig aufgelöst werden. Die Resultate der Statuserhebung sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: ***Knochengehalte von Geflügel-, Schweine- und Rinderseparaten (SLOWINSKI und MROCZEK 1982)***

Ausgangsmaterial	***Knochengehalt des vom Knochen separierten Fleisches [%]***
Hähnchenkarkassen	0,66
vorzerkleinerte Hähnchenkarkassen	0,91
vorzerkleinerte Hennenkarkassen	0,57
vorzerkleinerte Putenkarkassen	0,66
Schweineknochen	0,61
Rinderknochen	0,69

Zur Herstellung von Geflügelseparatorenfleisch, welches STRELECKA et al. (1984) untersuchte, wurden Selo Bibun® und Protecon® Entbeinungsmaschinen benutzt. Knochenpartikel bis höchstens 2 mm und 90 % der Partikel unter 1 mm wurden für das mechanisch gewonnene Geflügelfleisch empfohlen.

Die Erhebungen von BUSLAEVA et al. (1986) zur Größe von Knochenpartikeln im mechanisch separierten Rindfleisch lieferten die in Tabelle 8 aufgelisteten Ergebnisse:

Tabelle 8: ***Knochenpartikelanalyse von Rinderseparatorenfleisch (BUSLAEVA et al. 1986)***

Separatorentyp	***mittlerer Durchmesser [µm]***	***50 % der Partikel [µm]***	***maximaler Durchmesser[µm]***
K 25-046	18,09	< 5,19	260,74
FDMM-1	7,63	< 4,81	166,99

Sowohl histometrische Knochen- als auch chemische Kalziumanalysen bei mechanisch entbeintem Fleisch von Schwein, Geflügel und Rind, die von KOOLMEES et al. (1986) durchgeführt wurden, erbrachten einen höheren Knorpelanteil, einen geringeren Knochenrückstand und größere Knochenpartikel sowie geringere Kalziumgehalte bei diskontinuierlich hergestelltem MDM im Vergleich zu kontinuierlich gewonnenem Separatorenfleisch.

Bei ihrer Untersuchung von 18 Hartseparatorenfleischchargen ermittelten WENTHE et al. (2001) die Zahl der Knochen bzw. Knorpelpartikel in histologischen Präparaten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 augeführt.

Tabelle 9: ***Knochen- bzw. Knorpelanteile von Hartseparatorenfleischchargen (WENTHE et al. 2001)***

Anzahl der Knochen- bzw. Knorpelpartikel / Schnitt		
keine	***0-1***	***>1***
5x	9x	4x

TREMLOVA et al. (2006) verglichen u.a kontinuierlich und diskontinuierlich gewonnene Geflügelseparatorenfleischproben, die mittels histologischer und chemischer Methoden untersucht worden waren. Die Autoren fanden bei den Kolbenseparaten insgesamt eher kleine Knochenteilchen vor, während die Rotationsseparate sowohl kleinere als auch größere Knochenfragmente aufwiesen.

2.5.2 Kalziumgehalt

Die chemische Zusammensetzung des Separatorenfleisches im Vergleich zu manuell gewonnenem Fleisch wie z.B. Hackfleisch manifestiert sich hauptsächlich in erhöhten Kalziumwerten, was mit den in Kapitel 2.5.1 beschriebenen erhöhten Knochenanteilen in ursprünglichem Zusammenhang steht.

Im Gegensatz zu höchstens 150 ppm in üblichem Fleisch gaben LINKE et al. (1974) für mechanisch gewonnenes Restfleisch 610 bis 2200 ppm Kalzium an.

Die in Tabelle 10 aufgelisteten Kalziumwerte wurden von FIELD et al. (1974) sowie FIELD (1976) bei maschinell gewonnenem Fleisch ermittelt.

Tabelle 10: ***bei maschinell gewonnenem Fleisch ermittelte Kalziumwerte (FIELD et al. 1974; FIELD 1976)***

Ausgangsmaterial		***Kalzium [%]***
FIELD et al. (1974)		
Hammel	*Karkassen*	0,09
Lamm	*Nacken*	0,20
	Schulter	0,27
	Brust	0,21
	Gliedmaßen	0,37
		0,18
		0,26
		0,11
		0,13
		0,21
		0,28
FIELD (1976)		
Schwein	*Schinken*	1,39
	Lende	0,41
Kalb	*Schulter*	1,76
	Rippenstücke	0,71
	Rücken	0,54
Rind	*Rippen*	1,55
	Rumpf	1,55
	Lende	1,50
	Nacken	1,06

Die Abbildung 9 zeigt Schwankungen der in den beiden Erhebungen ermittelten Kalziumgehalte in Abhängigkeit von der untersuchten Tierart und dem Tieralter.

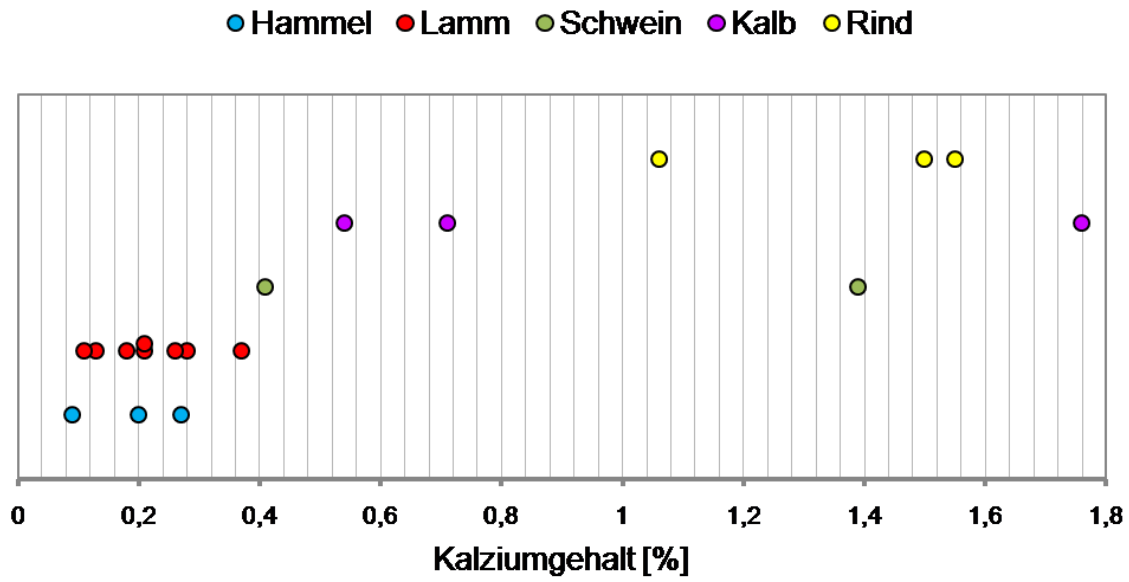


Abbildung 9: ***Schwankungen der von FIELD et al. (1974) und FIELD (1976) ermittelten Kalziumgehalte in Abhängigkeit von der untersuchten Tierart und dem Tieralter***

KÖNIGSMANN (1978) sowie KÖNIGSMANN et al. (1980b) berechnete bei 10 Rinder- und 4 Schweineseparatorenfleischproben Knochenanteile aus den mittels Atomabsorptionspektrophotometrie bestimmten Kalziumgehalten. Die Berechnung erfolgte nach der von BAKER (1974) entwickelten Formel (siehe Kapitel 2.6.1, Seite 52). Die Knochenanteile der einzelnen Separate sind in der Tabelle 11 sowie der Abbildung 10 dargestellt.

Tabelle 11: ***Knochenanteile gemäß Kalziumbestimmungen (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980)***

	Tierart	***Knochenanteil [%]***
1	Rind	1,796
2		1,162
3		0,5485

	Tierart	***Knochenanteil [%]***
4	Rind	1,010
5		0,554
6		0,732
7		0,797
8		0,5985
9		2,1945
10		0,157
11	Schwein	2,2495
12		1,4055
13		2,0515
14		0,253

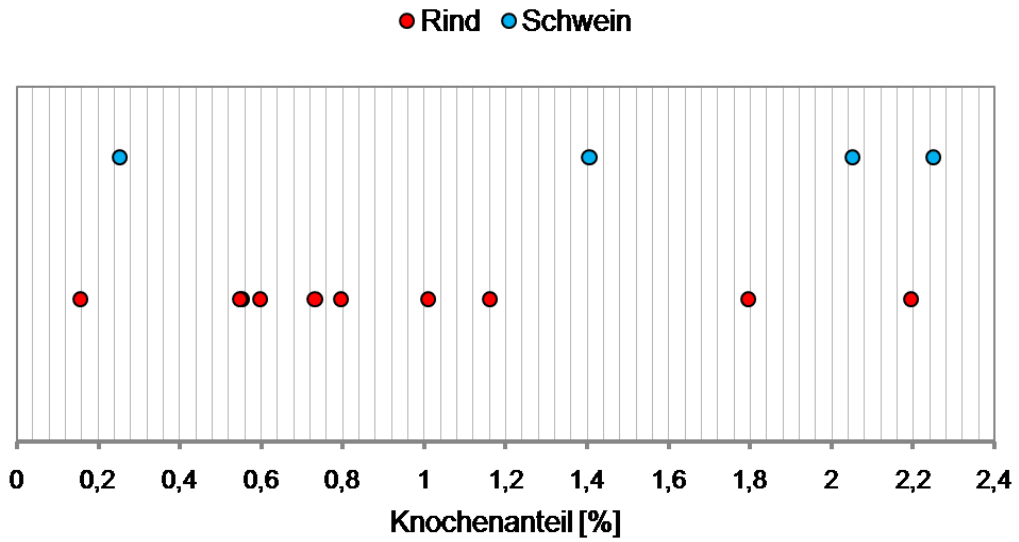


Abbildung 10: ***aus dem Kalziumgehalt errechnete Knochengehalte von Separatorenfleischproben zweier Tierarten (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980b)***

BIJKER et al. (1983) untersuchten Proben von mechanisch diskontinuierlich hergestelltem Schweinefleisch und fanden Kalziumgehalte zwischen 0,04 und 0,28 %.

Nach CROSSLAND et al. (1995) enthielt das durch kontinuierliche Rotationsseparation (Yieldmaster®, „continuos tapered auger feed“) hergestellte Geflügelseparatorenfleisch mehr Asche und Kalzium als das MEF, welches einer diskontinuerlichen Kolbenseparation (Protecon®, „hydraulically powered piston“) unterzogen wurde. Insgesamt wirkten sich Art der Entbeinung, Maschinentyp, Einstellungsbedingungen und Ausgangsmaterial nicht so gravierend auf die chemische Zusammensetzung des Endprodukts aus, dass man diesbezüglich das separierte Fleisch von dem in der Untersuchungsreihe aus gleichen Ausgangsmaterialien manuell gewonnenem Knochenputz unterscheiden oder gar in Fleischprodukten nachweisen konnte. Die Tabellen 12 und 13 verdeutlichen die Ergebnisse dieser Erhebungen.

Tabelle 12.: ***Vergleich des Asche- und Kalziumgehalts zwischen dem maschinell und manuell gewonnenem Geflügelfleisch (CROSSLAND et al. 1995)***

	Aschegehalt [mg/100g] (Mittelwert)	***Kalziumgehalt [mg/100g] (Mittelwert)***
MRM[1)] aus Hähnchenrücken	1,0 ± 0,04	87,1 ± 15,5
HDM[2)] aus Hähnchenrücken	0,8	53,8
MRM[1)] aus Putenkarkassen	0,9 ± 0,05	43,6 ± 7,7
HDM[2)] aus Putenkarkassen	0,8	19,6

[1)] Mechanically Recovered Meat (über Protecon®) [2)] Hand Deboned Meat

Tabelle 13.: ***Schätzintervalle von Asche- und Kalziumgehaltsmittelwerten aus mit Hilfe von zwei verschiedenen Separatorentypen unter unterschiedlichen Einstellungsparametern gewonnenen Hähnchen- und Puten-MRM[1)] (CROSSLAND et al. 1995)***

		Aschegehalt [mg/100g]	***Kalziumgehalt [mg/100g]***
Hähchen-MRM[1)]	*Protecon®*	0,8 ± 0,05 - 0,8 ± 0,07	62,9 ± 16,6 - 65,4 ± 12,32
	Yieldmaster®	1,3 ± 0,07 - 1,3 ± 0,10	191,5 ± 33,6 - 239,8 ± 45,9

Puten-MRM[1)]	*Protecon®*	0,78 ± 0,03 - 0,89 ± 0,05	34,2 ± 7,0 - 43,6 ± 7,7
	Yieldmaster®	1,26 ± 0,05 - 1,39 ± 0,16	225,0 ± 20,0 - 516,2 ± 84,2

[1)] Mechanically Recovered Meat

Der Veterinärausschuss der Europäischen Union postulierte einen Grenzwert von 1,5 % Kalzium in der Trockenmasse (European Commission 1997).

NURMI und RING (1999) forderten bei der Gewinnung von hygienisch vertretbarem Separatorenfleisch Kalziumgehalte unter 1,5 % in der Trockenmasse und unter 0,25 % in der Frischmasse.

WNUK (2002) analysierte 79 Separatorenfleischproben mittels ICP-OES. Es wurde festgestellt, dass ca. 20% aller untersuchten Proben unter dem damals in der Bundesrepublik Deutschland empfohlenen Grenzwert von 600 mg/kg lagen.

Bei der Überprüfung der Verarbeitungseignung von Schweineseparatorenfleisch wurden von TROEGER (2002) unterschiedliche Mengen an Kolbenseparat in Brühwürsten mitverarbeitet. Wie sich aus der Abbildung 11 entnehmen läßt, korrelierte der Kalziumgehalt der Modellbrühwürste mit dem Anteil des eingesetzten maschinell entbeinten Fleisches.

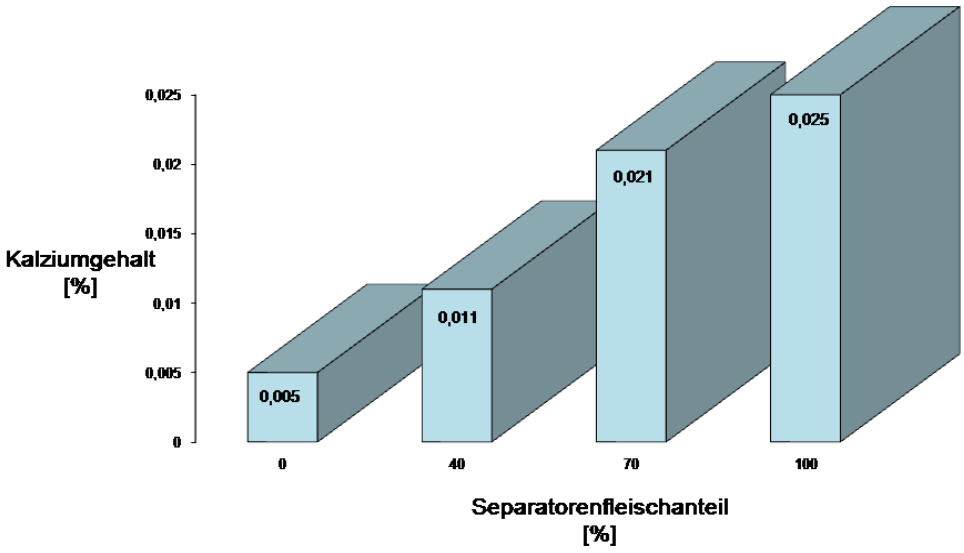


Abbildung 11: ***Zusammenhang zwischen bei Brühwürsten eingesetzter Menge an Kolbenseparatorenfleisch und Kalziumgehalt (TROEGER 2002)***

Bei einem Projekt von CANDOGAN et al. (2001), in dem chemische, physikalische und mikrobiologische Merkmale von maschinell separiertem Hühnerfleisch aus Brust-, Nacken- und Rückenstücken bestimmt wurden, konnten die Autoren bei den untersuchten Proben höhere Gehalte an Mineralstoffen und Asche und insbesondere deutlich höhere Kalziumgehalte feststellen.

STENZEL und HILDEBRANDT (2006) werteten in einer bundesweiten Erhebung Untersuchungsergebnisse von Fleisch-, Hackfleisch- und Separatorenfleischproben aus. Bei einem nur geringen Anteil der Fleisch- und Hackfleischproben lag der Kalziumgehalt über 150 ppm. Dagegen überstiegen mit einer Ausnahme alle Separatorenfleischproben den Wert von 200 ppm.

Die Darstellung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 14 .

Tabelle 14: ***Untersuchungsergebnisse von Fleisch-, Hackfleisch- und Separatorenfleischproben (STENZEL und HILDEBRANDT 2006)***

		Kalziumgehalt		
		≤ 150 ppm	***≥ 150 ≤ 200 ppm***	***≥ 200 ppm***
Fleisch	*Rind (n=83)*	58	18	7
	Schwein(n=230)	220	8	2
	Huhn (n=16)	16	0	0
	Pute (n=3)	3	0	0
Hackfleisch	*Rind/Schwein (n=101)*	89	8	4
Separatoren-fleisch	*Schwein (n=6)*	1	0	5
	Pute (n=1)	0	0	1
	keine Angabe der Tierart (n=4)	0	0	4

Die Abbildung 12 stellt die prozentualen Anteile bezogen auf die Probengesamtheit in den einzelnen von STENZEL und HILDEBRANDT (2006) aufgestellten Kalziumgehaltskategorien abhängig von der Art des Probenmaterials dar.

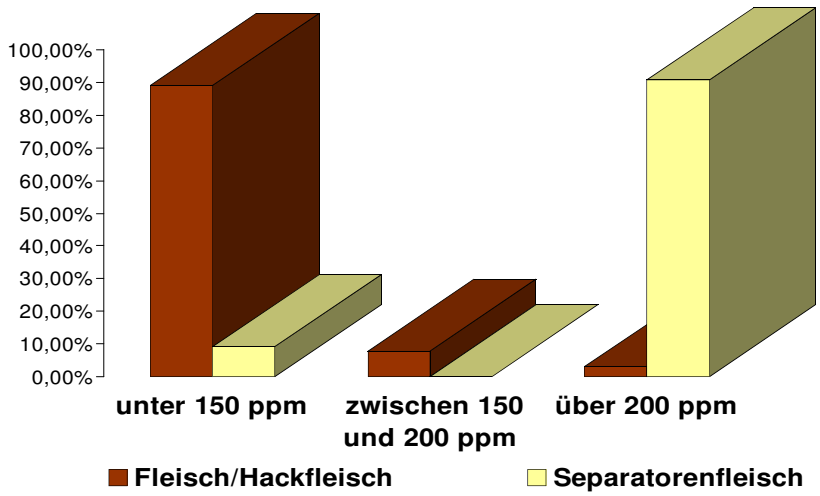


Abbildung 12: ***Prozentuale Verteilung des Kalziumgehalts nach der Probenart (STENZEL und HILDEBRANDT 2006)***

Von TREMLOVA et al. (2006) wurden u.a kontinuierlich und diskontinuierlich gewonnene Geflügelseparatorenfleischproben mittels histologischer und chemischer Methoden untersucht. Die Ergebnisse der Kalziumanalyse enthält Tabelle 15.

Tabelle 15: ***Kalziumgehalte von kontinuierlich und diskontinuierlich gewonnenen Geflügelseparaten (TREMLOVA et al. 2006)***

Gewinnungstechnologie	***Kalziumgehalt [mg/kg]***
Kontinuierlich hergestelltes Geflügelseparatorenfleisch (Beehive®)	254,5
Diskontinuierlich hergestelltes Geflügelseparatorenfleisch (Protecon®)	197,5

2.5.3 Mikrobieller Status

Hartseparatorenfleisch wir oft eine hohe Keimbelastung unterstellt. Für die mikrobielle Anfälligkeit des maschinell entbeinten Fleisches sind vor allem drei Faktoren von Bedeutung:

- Vergrößerung der Oberfläche und „Einmischen“ der Keime vergleichbar dem Hackfleisch
- Erhöhung der Temperatur beim Separierungsvorgang
- Gewinnungshygiene.

OSTOVAR et al. (1971) schätzten die Anfälligkeit des Separtorenfleisches nicht höher als die des Hackfleisches ein. Sie ermittelten bei Geflügelseparaten die in Tabelle 16 aufgeführten Gesamtkeimzahlen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gewinnung.

Tabelle 16: ***Gesamtkeimzahlen beim Geflügelseparatorenfleisch in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gewinnung (OSTOVAR et al. 1971)***

Geflügelseparatorenfleisch	***Gesamtkeimzahl (KbE/g)***
Separierung sofort nach Schlachtung	3,25 x 10^5
Separierung nach 5 d, Lagerung bei 3°-5°C	7,10 x 10^5

Den Untersuchungen von MAXCY et al. (1973) zufolge enthielt das mechanisch entbeinte Geflügelfleisch Gesamtkeimzahlen von 10^5 – 10^6 KbE/g sowie eine Kontaminationsrate mit Coliformen von 10 – 10^3 KbE/g.

BEM und LEISTNER (1974) untersuchten Separate, die aus Hühnerhälsen, -brust und -karkassen sowie Putenrücken gewonnen wurden. Sie fanden dort Gesamtkeimzahlen von 2 x 10^6 KbE/g.

Bei Versuchen mit einem Walzenseparator wurde von KNORR et al. (1974) das „Weichmaterial“ aus Schweinerippen und Rinderköpfen aufgrund der besseren mikrobiologischen Ergebnisse für den menschlichen Verzehr als geeignet angesehen, während der aus Schweineköpfen und Schweineschwänzen mit Haut gewonnene Rohstoff eher der Tiernahrungsindustrie zugeleitet werden sollte, wie Tabelle 17 ausweist.

Tabelle 17: ***Mikrobieller Status des Endprodukts nach Walzenseparation (KNORR et al. 1974)***

Ausgangsmaterial	***Zusammensetzung***		***Gesamt-keimzahl [x/g]***	***Sporen-bildner***	***Kalzium-gehalt [g/kg]***
	Knochen-schrott [%]	***Weich-material [%]***			
Schweinerippen (sauber entbeint)	70,7	29,3	$1,2 \times 10^5$	nicht nach-gewiesen	0,3
Schweineschwänze mit Haut (schlecht geputzt)	53,5	46,5	$1,5 \times 10^7$	nach-gewiesen	0,4
Schweineköpfe ohne Gebiss mit Fettbacke (sauber entbeint)	69,0	31,0	$3,0 \times 10^7$	nicht nach-gewiesen	-
Rinderköpfe ohne Gebiss (sauber entbeint)	87,5	12,5	$2,4 \times 10^6$	nicht nach-gewiesen	0,3

Die hygienischen Aspekte der Gewinnung von Separatorenfleisch mittels Zentrifuge unter Zugabe von gekühlter Nitritpökelsalzlake überprüften LINKE et al. (1974). Die Autoren hielten zwar das erzeugte Restfleisch für ein hygienisch labiles Produkt, dennoch sahen sie in dem mechanisierten Separieren mit Zusatz von Pökelstoffen einen Weg zu einem risikoärmeren Erzeugnis. Die Reduktion der gramnegativen Flora war dabei auf den Einfluss von Nitritpökelsalz und die damit verbundene Senkung des aw-Wertes zurückzuführen. Ein Vergleich der Keimzahlen zwischen dem manuell und mechanisch gewonnenen Restfleisch ist der Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: ***Vergleich der Keimzahlen (geometrische Mittelwerte/g) zwischen manuell und mittels Zentrifuge unter Zugabe von Nitritpökelsalzlake gewonnenem Restfleisch (LINKE et al. 1974)***

Gewinnung	***manuell***		***mechanisch***	
	Rind	***Schwein***	***flüssige Phase (nach Frostung)***	***feste Phase (nach Frostung)***
Probenumfang (n)	9	6	10	8
Aerobe Gesamtkeimzahl	$3{,}2 \times 10^6$	$1{,}7 \times 10^7$	$7{,}4 \times 10^5$	$5{,}4 \times 10^5$
Gramnegative glukosepositive Keime	$5{,}0 \times 10^5$	$3{,}4 \times 10^6$	$5{,}4 \times 10^3$	$4{,}0 \times 10^4$
Enterokokken	$1{,}5 \times 10^3$	$1{,}1 \times 10^3$	$9{,}1 \times 10^3$	$3{,}5 \times 10^2$
Staphylokkoken	$3{,}8 \times 10^2$	$1{,}9 \times 10^2$	$3{,}6 \times 10^2$	$1{,}5 \times 10^2$
Sporen sulfitreduzierender Clostridien	< 10	< 10	<10	<10
Sporen von Bazillen	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$

flüssige Phase: überwiegend Restfleisch feste Phase: überwiegend Knochen

Einen Vergleich der bakteriellen Kontamination des Separatorenfleisches mit der des Hackfleisches führte WIESE (1976) durch. Da die Keimvermehrung im wesentlichen von der Temperatur des Ausgangsmaterials abhängt, sollten die fleischtragenden Knochen nach dem Zerlegen sofort maschinell entbeint oder gefrostet werden.

Den mikrobiolgischen Status des von verschieden Rotationsseparatoren gewonnenen Separatorenfleisches untersuchte WITTMANN (1977) und stellte fest, dass eine hygienische Gewinnung dieses Rohstoffes in erster Linie von der Auswahl des Ausgangsmaterials abhängt. Das MDM sollte ansonsten unverzüglich verarbeitet und die Separationsanlagen sorgfältig gereinigt werden. Die Tabellen 19 und 20 zeigen die Gesamtkeimzahlen des Rohmaterials sowie die mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse von Geflügelseparatorenfleisch.

Tabelle 19: ***Aerobe Gesamtkeimzahlen des Rohmaterials für die Separatorenfleisch-gewinnung (WITTMANN 1977)***

Tierart	***Anzahl der Proben***	***Aerobe Gesamtkeimzahl/Gramm***		***Probenanteil über dem Grenzwert***
		Durchschnitt	***Spannweite***	
Schwein	8	2×10^7	4×10^5 - 5×10^7	87 %
Rind	7	9×10^6	1×10^6 - 2×10^7	57 %
Geflügel	39	2×10^6	8×10^4 - 9×10^6	21 %

Grenzwert: 5×10^6/g

Tabelle 20: ***Mikrobiologische Untersuchungsergebnisse von Geflügelseparatorenfleisch (WITTMANN 1977)***

Knochenart (jeweils n = 3)	***Mikroorganismen/g***			
	Gesamt-keimzahl	***Entero-bacteriaceae***	***Fäkal-Streptokokken***	***Hefen und Schimmelpilze***
PAOLI - Separator				
Rücken	$9{,}7 \times 10^6$	$1{,}1 \times 10^4$	$6{,}7 \times 10^3$	$1{,}0 \times 10^5$
Hälse mit Haut	$2{,}7 \times 10^6$	$3{,}4 \times 10^4$	$4{,}9 \times 10^4$	$3{,}9 \times 10^4$
Hälse ohne Haut	$8{,}2 \times 10^6$	$8{,}6 \times 10^2$	$3{,}3 \times 10^4$	$7{,}4 \times 10^4$
Flügel	$1{,}0 \times 10^7$	$1{,}0 \times 10^4$	$2{,}2 \times 10^4$	$9{,}8 \times 10^4$
BEEHIVE -Separator				
Rücken	$6{,}8 \times 10^6$	$4{,}1 \times 10^5$	$4{,}9 \times 10^5$	$5{,}9 \times 10^4$
Hälse mit Haut	$2{,}6 \times 10^6$	$9{,}5 \times 10^2$	$2{,}6 \times 10^4$	$2{,}8 \times 10^4$
Hälse ohne Haut	$2{,}7 \times 10^6$	$1{,}1 \times 10^4$	$3{,}2 \times 10^4$	$3{,}7 \times 10^4$
Flügel	$4{,}5 \times 10^6$	$3{,}3 \times 10^3$	$4{,}6 \times 10^4$	$9{,}1 \times 10^4$

Knochenart	***Mikroorganismen/g***	***positives Ergebnis***	
(jeweils n = 3)	***Staphylococcus aureus***	***Clostridium perfringens***	***Salmonellen***
PAOLI - Separator			
Rücken	1,0 x 10^2	1x	2x
Hälse mit Haut	5,5 x 10^2	0	0
Hälse ohne Haut	3,3 x 10^2	1x	0
Flügel	1,8 x 10^2	0	0
BEEHIVE -Separator			
Rücken	2,3 x 10^2	1x	1x
Hälse mit Haut	1,9 x 10^2	0	1x
Hälse ohne Haut	9,5 x 10^2	2x	0
Flügel	2,3 x 10^2	0	3x

Die Abbildung 13 verdeutlicht die unterschiedlichen Ergebnisse der aeroben Gesamtkeimzahlbestimmung in Abhängigkeit von Ausgangsmaterial und Separatorentyp.

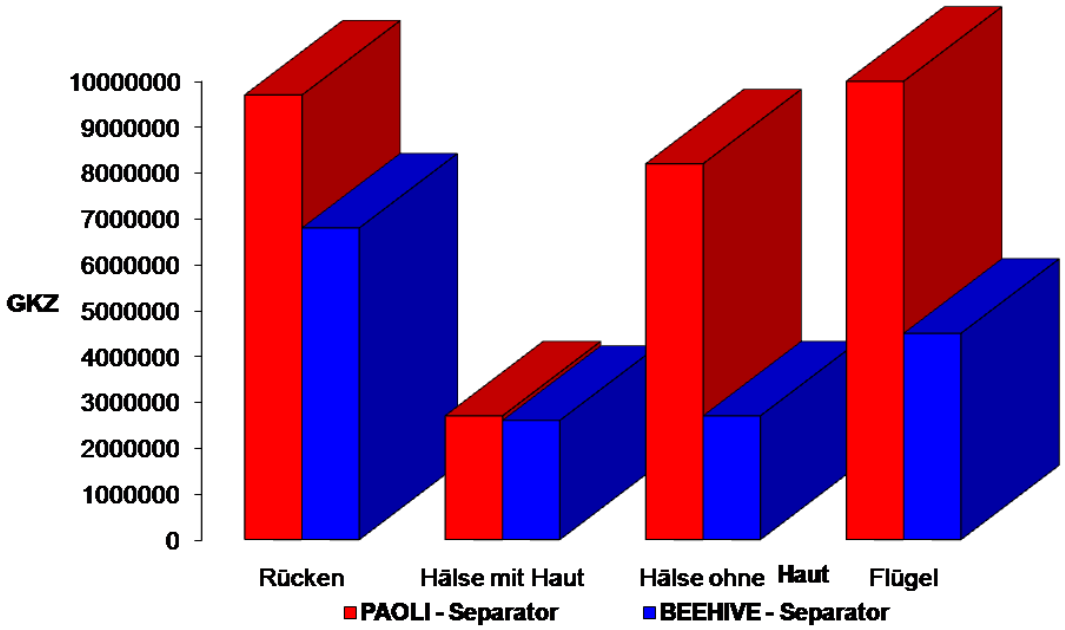


Abbildung 13: ***Gesamtkeimzahlen in Abhängigkeit von Ausgangsmaterial und Separatorentyp (WITTMANN 1977)***

Bei den von BIJKER et al. (1980) untersuchten jeweils 10 Schweineseparatorenproben von acht Herstellern fanden sich ca. 10^4 Staphylococcus aureus – Keime / g in Produkten von zwei Unternehmen. Enterobacteriaceaenkontaminationen zwischen 10^4 und 10^5/g lagen in Erzeugnissen von sieben Herstellern vor.

ZWINGMANN (1980) unterstellte dem mit ambulant eingesetzten Separatoren gewonnenen Restfleisch Keimzahlen im Normbereich von rohem Fleisch unter der Voraussetzung, dass nur frische oder nach der Entbeinung gleich tiefgefrorene Knochen, möglichst vom gleichen Betrieb, weiterverarbeitet werden.

Gemäß des Berichtes des Wissenschaftlichen Veterinärauschusses der Europäischen Union zu den Produktions- und Verwendungsregeln von „Mechanically Recovered Meat“ soll das potenzielle Gesundheitsrisiko in Betracht gezogen werden, welches vom Rohmaterial Fleisch grundsätzlich ausgeht. Einerseits sind es die pathogenen Keime, andererseits die Verderbniserreger, die berücksichtigt werden müssen. Bei Keimzahlen von 1 x 10^8 KbE/g eignet sich das Fleisch nicht mehr zum menschlichen Verzehr und Keimzahlen von 1 x 10^7 KbE/g deuten auf eine schlechte Qualität hin. Nicht jedes Ausgangsmaterial eignet sich zur Separation. Das Separatorenfleisch sollte unter den

gleichen hygienischen Bedingungen wie das Fleisch gewonnen werden (European Commission 1997). Die Tabelle 21 enthält die in dem Bericht angegebenen bakteriologischen Kriterien für das Separatorenfleisch.

Tabelle 21: ***bakteriologische Kriterien für Separatorenfleisch [KbE/g] (European Commission 1997)***

MRM	***Gesamtkeimzahl***		***Enterokokken***		***Enterobacteriaceae***	
	m	***M***	***m***	***M***	***m***	***M***
Separatoren-fleisch aus Rotfleisch	5×10^5	5×10^6	5×10^3	5×10^4	5×10^3	5×10^4
Separatoren-fleisch aus Geflügelfleisch	5×10^5	5×10^6	5×10^3	5×10^4	5×10^4	5×10^5

M: darüber liegende Ergebnisse sind nicht mehr akzeptabel

m: darunter liegenden Ergebnisse sind zufriedenstellend

NURMI und RING (1999) aus einer Arbeitsgruppe der EU-Kommission beschrieben einige Bedingungen, unter denen sich die in der Tabelle 21 aufgeführten bakteriologischen Richtwerte für das Separatorenfleisch einhalten lassen. Sollte der Rohstoff nicht tiefgefroren werden können, müßte er bei maximal 4°C Lagerungstemperatur innerhalb von 48 Stunden weiterverarbeitet werden. Mindestens einmal pro Tag sollte das maschinell entbeinte Fleisch mikrobiologisch untersucht werden. Die Befolgung strengster Hygienkriterien während des gesamten Produktionsprozesses ist unerlässlich, und Ausgangsmaterial mit Keimzahlen ab 1×10^7 KbE/g eignet sich nicht für die Gewinnung von Separatorenfleisch.

CANDOGAN et al. (2001) bestimmten u. a. mikrobiologische Merkmale von mechanisch separiertem Hähnchenfleisch. Die signifikant hohen Werte für Coliforme und aerobe mesophile Keime führten die Autoren auf das jeweils verwendete Rohmaterial, die hygienischen Bedingungen bei der Gewinnung sowie die Lagerung des mechanisch entbeinten Fleisches zurück.

CARVALHO und CORTEZ (2005) ermittelten unter anderem bei Hähnchenkarkassen und Hähnchen-MDM die Prävalenz von Salmonella spp. Die von ihnen publizierten Daten sind in der Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: ***Prävalenz von Salmonella spp. bei Hähnchenkarkassen und -MDM (CARVAHLO und CORTEZ 2005)***

Probenmaterial	***Häufigkeit***	
	absolut	***relativ***
Hähnchenkarkassen (n = 45)	6	13,3 %
Hähnchen-MDM (n = 60)	15	25 %

Die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel enthält die verbindlichen mikrobiologischen Kriterien für Separatorenfleisch (Anhang I Kapitel 1 Nummer 1.7 und Kapitel 2 Nummer 2.1.7 (Tabelle 2)). Reglementiert werden Salmonellen als pathogene Keime (n = 5, c = 0, in 10g nicht nachweisbar) sowie die Gesamtkeimzahl (n = 5, c = 2, m = 5 x 10^5 KbE/g, M = 5 x 10^6 KbE/g) und E.coli als Parameter der Prozeßhygiene (n = 5, c = 2, m = 50 KbE/g, M = 500 KbE/g).

2.6 Nachweis

Wegen des Zusatzes von manuellem Knochenputz beschäftigte die Bestimmung von Knochengewebe in Fleischerzeugnissen die chemische Analytik schon vor dem ersten Einsatz von Entbeinungsmaschinen. Der Nachweis von Knochen und damit der Verarbeitung von Separatorenfleisch gewann an Bedeutung, als die ersten rechtlichen Regelungen bezüglich der Verwendung, Deklaration oder gar des Verbots der Herstellung des Wiederkäuerseparatorenfleisches erlassen wurden. Im folgenden Kapitel wird nicht nur die Bestimmung von Knochengewebe, sondern auch die Ermittlung anderer Parameter in Hinblick auf die Qualitätsbeurteilung und den Nachweis von Separatorenfleisch geschildert.

Die Methoden zur Bestimmung der Knochenpartikel im Separatorenfleisch werden in indirekte und direkte Verfahren eingeteilt. Den indirekten analytischen Ansatz verkörpert in erster Linie die Kalziumbestimmung. Die direkten Methoden umfassen Sedimentation, enzymatische Verdauung, Laugenbehandlung, Radioskopie sowie qualitative und quantitative Histologie (KIJOWSKI 1981; HILDEBRANDT und JOSEFOWITZ 2007).

2.6.1 Indirekter Nachweis

2.6.1.1 Kalziumbestimmung

GRUNDEN und MCNEIL (1973) verglichen den Gehalt an fester Knochensubstanz mittels Atomabsorptionsspektometrie und EDTA-Titration in mechanisch entbeintem Geflügelfleisch und ermittelten eine Korrelation von r = 0,99 zwischen beiden Methoden. Je nach Alter der Tiere schwankten die Werte zwischen 0,33 und 1,44 %.

Die Kalziumbestimmung als Nachweismethode der Verarbeitung von mechanisch entbeintem Fleisch stellten ARNETH et al. (1975) wegen der Schwankungen des nicht zum Knochen gehörenden Kalziumgehalts im Ausgangsmaterial und geringer Probenrepräsentanz in Frage.

SOMMER und MÜLDER (1975) beschrieben eine Methode zur Bestimmung von Knochenteilchen in Wursterzeugnissen aus Separatorenfleisch, wobei der Kalziumgehalt des vorgereinigten Rückstandes ermittelt wurde. Die Proben wurden durch Erhitzen mit konzentrierter Harnstoff-Guanidin-Lösung unter gleichzeitiger oxidativer Spaltung mit Wasserstoffsuperoxid verflüssigt. Das zentrifugierte Sediment wurde gewaschen und auf Vorhandensein von Knochenteilchen im polarisierten Licht mikroskopisch untersucht. Bei positivem Ergebnis wurde der Rückstand mit 10 ml 10%er Perchlorsäure in das Zentrifugenglas zurückgespült, im Wasserbad auf 80 °C erhitzt, in einem 100 ml – Meßkolben unter Zugabe von 5 ml $SrCl_2$-Lösung bis zur Marke aufgefüllt und durch einen Ca-freien Filter filtriert. Anschließend erfolgte die atomabsorptionsspektrometrische Bestimmung des Kalziumgehalts. Unter der Annahme, dass knochenfreie Wurstproben bei dieser Vorreinigung nicht mehr als 25 ppm Kalzium enthalten, wurde der Knochengehalt nach der Formel 2.1 berechnet:

$$Knochengehalt = (Kalziumgehalt - 25) \cdot \frac{6{,}25}{10000} \qquad (2.1)$$

$6{,}25$ = Umrechnungsfaktor nach BAKER (1974)

HUJANKOVA (1976) plädierte für die Kalziumbestimmung mit Hilfe der Atomabsorptionsspektometrie als Nachweismethode für Separatorenfleisch, weil sich die direkten Methoden wie Sedimentation und Laugenbehandlung als weniger geeignet erwiesen.

Unter der Verwendung eines Atomabsorptionspektrometers ermittelten KÖNIGSMANN (1978) sowie KÖNIGSMANN et al. (1980b) Kalziumgehalte von Schweine- und Rinderseparaten, indem die Proben homogenisiert, entfettet, lyophilisiert und nach den Vorschriften für die „Analyse von Nahrungsmitteln“ von PERKIN ELMER aufbereitet wurden. Der Knochenanteil wurde nach der von BAKER (1974) entwickelten Formel 2.2 bestimmt.

$$Knochenanteil = (eff.\ Kalziumgehalt[\%] - 0{,}015\ x\ F) \qquad (2.2)$$

$0{,}015$ = Abzug für Muskelfleisch-Kalzium

F : Umrechnungsfaktor (Rind/Schwein = 4)

Die Tabelle 11 gibt die in der zitierten Studie ermittelten Knochenanteile anhand der Kalziumbestimmung mittels AAS wieder.

Wegen der in den Produkten enthaltenen, möglicherweise fleischfremden Kalziumquellen wie Casein oder Vegetabilien ist es nach BIJKER et al. (1983) nicht korrekt, vom erhöhten Kalziumgehalt eines Fleischerzeugnisses direkt auf den Zusatz von Separatorenfleisch zu schließen. Weiterhin schwankt die Mineralisation des Knochengewebes in Abhängigkeit vom Knochentyp, der Rasse und dem Alter des geschlachteten Tieres (FIELD 1981).

Einen Nachweis von Separatorenfleisch in Brühwürsten über die Kalziumbestimmung mit gleichzeitiger Anwendung einer histologischen Technik beschrieb PSOTA (1984). Er hielt bei Ca-Werten über 16,0 mg % die Mitverarbeitung von MDM für wahrscheinlich, bei über 22,0 mg % für bewiesen. Eine Kalziumkonzentration von über 28,0 mg % würde auf einen Knochenanteil > 1 % und einen Separatorenfleischanteil an der Brühwurst von > 5 % hindeuten.

Von FIELD (2000) wurden Umrechnungsfaktoren von 4,5 (Kühe, Mastrinder, Lämmer, Schweine und Hennen) und 5,0 (Kälber und Broiler) für die Berechnung des Gehaltes an frischem Knochen aus dem Asche- respektive Kalziumgehalt (37% der Asche) empfohlen. Es wurde nochmals darauf hingewiesen, dass die beiden Parameter je nach Alter der Tiere, Vorhandensein von Knorpel und Hydratation der Knochen schwanken können.

Da der physiologische Kalziumgehalt in knochenfreien tierischen Geweben im Bereich von 50 – 100 ppm liegt und beim Separatorenfleisch bis zu 15 000 ppm betragen kann, sollte laut STENZEL (2001) neben dem histologischen Verfahren der Kalziumgehalt als Indikator zum Nachweis von Separatorenfleisch zur Anwendung kommen.

Auch STENZEL und HILDEBRANDT (2006) wiesen darauf hin, dass sich die Festlegung eines eindeutigen Kalzium-Grenzwertes zum Nachweis der Verwendung von Separatorenfleisch schwierig gestaltet, da eine Vielzahl von exogenen Kalziumquellen die Ergebnisse erheblich beeinträchtigen können. Der in der Literatur diskutierte und mittlerweile über die Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 der Kommission vom 5. Dezember 2005 zur Festlegung von Durchführungsvorschriften für bestimmte unter die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates fallende Erzeugnisse und für die in den Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vorgesehenen amtlichen Kontrollen, zur Abweichung von der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 853/2004 und (EG) Nr. 854/2004 (Anhang IV Nummer 1) umgesetzte Grenzwert von 1000 ppm im frischen Erzeugnis wäre jedoch deutlich zu hoch. Aufgrund der über einen Zeitraum von drei Jahren durchgeführten Erhebungen zu Kalziumgehalten in 443 Proben von Rind-, Schwein- und Geflügelfleisch sowie Separatorenfleisch schlugen die Autoren einen Grenzwert für Kalzium von 200 ppm im Frischgewicht vor.

2.6.1.2 Immunologie

Da bei der maschinellen Entbeinung unter hohem Druck eine Freisetzung von Knochenmarksubstanzen erfolgen kann, versuchte man, einen immunologischen Marker zum Nachweis von Separatorenfleisch zu entwickeln. PICERING et al. (1995b) überprüften die Spezifität eines polyklonalen Antiserums für die niedermolekulare Proteinfraktion aus Knochenmarksproteinen vom Huhn. Das Antiserum zeigte bei dem nicht-kompetitiven Festphasen-ELISA ein hohes Reaktionspotential gegen Extrakte aus rohem Geflügelseparatorenfleisch und eine geringe Aktivität gegen manuell entbeintes Geflügelfleisch. Als Störfaktoren bei diesem Verfahren wurden jedoch Sojaproteine und Kreuzreaktionen mit Blut und Haut identifiziert. Bei Mischungen aus MEF und Fleisch von Huhn gestaltete die Methode keine hinreichend genauen Rückschlüsse auf den Anteil des Separatorenfleisches. Für erhitzte Produkte zeigte sich der ELISA ungeeignet.

TROEGER und WACHSMANN (2007) prüften die Eignung eines Enzymimmunassays zum Nachweis des sauren Gliaproteins als Indikatoren für die Mitverarbeitung von schonend aus Schweinewirbelknochen hergestelltem Separatorenfleisch in Brühwürsten. Es wurden Referenz-Brühwürste mit unterschiedlichem Anteil an Rückenmarkssubstanz und Separatorenfleisch produziert sowie Handelsbrühwurstproben in die Untersuchung miteinbezogen. Die Ergebnisse zeigten, dass die immunologische Methode prinzipiell zum Nachweis des schonend gewonnenem Separatorenfleisches in Brühwurst geeignet ist, die Nachweisgrenze jedoch vom Rückenmarksgehalt des Ausgangsmaterials abhängt.

2.6.1.3 Gelelektrophorese

Mittels SDS-PAGE der SDS- und wasserlöslichen Proteine wurde von SAVAGE et al. (1995) der Versuch unternommen, zwischen maschinell und nicht maschinell resp. schonend maschinell entbeintem Fleisch von Rind, Schwein, Lamm und Geflügel zu unterscheiden. Das maschinell gewonnene rote Fleisch unterschied sich von dem nicht maschinell entbeintem Fleisch durch die hohe relative Intensität der Hämoglobinbande und die weniger ausgeprägte Myoglobinbande sowie durch Intensitätsveränderungen der Banden bei Proteinen mit höherem Molekulargewicht. Bei weißem Fleisch prägten sich zwar die erstgenannten Differenzen weniger aus, dafür aber war die Unterscheidung durch Veränderungen der Intensität bei den höher molekulargewichtigen Eiweißen möglich. Eine Beeinträchtigung erfuhr das Verfahren durch verschiedenes Ausgangsmaterial einer Tierart, unterschiedliche Maschinentypen und Einstellungsbedingungen sowie die Art der Vorzerkleinerung. In Gemischen von Fleisch verschiedener Gewinnungsarten konnten bei Rind, Schwein und Lamm ≥ 5 % und beim Geflügel ≥ 25 % Separatorenfleischanteil sicher nachgewiesen werden. Während sich beim auf 75°-100°C für 5 Minuten erhitztem Rindfleisch die Bandenmuster nicht wesentlich veränderten, ließen sich Proben konventioneller Fleischkonserven mit diesem Verfahren schlecht auswerten.

2.6.1.4 Isoelektrische Fokussierung

SKARPEID et al. (2001) versuchten, maschinell entbeintes Rindfleisch, das von Knochen von Extremitäten und Rippen sowie von Rückenknochen mit Gewebe des zentralen Nervensystems gewonnen worden war, über die Isoelektrische Fokussierung nachzuweisen. Vorzekleinerte Fleischmischungen mit den zwei MRM-Sorten sowie handentbeintem Fleisch und Kopffleisch wurden in einem Gel mit immobilisierten pH-Gradienten untersucht. Die Gele wurden photographiert und digitalisiert, so dass die

Untergrundfarbe eliminiert und somit die Signalstärke erheblich vergrößert werden konnte. Über Modelle, die durch eine multifaktorielle Analyse der Proteinprofile ermittelt wurden, versuchten die Autoren die Zusammensetzung der Proben zu erklären. Die beiden MRM-Sorten konnten nicht so gut wie manuell entbeintes Fleisch wiedergegeben werden, höchstens unter der Zusammenfassung zu einer Kategorie.

2.6.2 Direkter Nachweis

2.6.2.1 Sedimentation

Bei der Untersuchung von Dosenleberwurst verglich SINELL (1956) das KOH-Auskochverfahren (Kapitel 2.6.2.3) mit dem Suspensionsverfahren. Bei dieser Technik wurde das Probenmaterial zunächst entfettet und getrocknet. Anschließend erfolgte die Aufschwemmung der zum Pulver zerkleinerten Probe in Tetrachlorkohlenstoff. Nach der Zentrifugation wurde die Schwimmschicht vorsichtig mit einem Löffel entfernt, der Rest der Flüssigkeit abgegossen, der Bodensatz getrocknet und gewogen. Den Vergleich der Flotationsmethode mit dem KOH-Auskochverfahren gibt die Tabelle 23 wieder.

Tabelle 23: ***Vergleich des Suspensionsverfahrens mit der KOH-Auskochmethode (SINELL 1956)***

Knochengehalt [%]	
CCl_4 - Methode	***KOH-Verfahren***
1,80	1,84
2,16	2,13
1,60	1,80
1,70	1,66
1,70	1,66

KRESSMANN (1968) kochte zunächst die Knochenschrot enthaltenden Lebensmittelproben, ließ dann die Bestandteile sich absetzen, dekantierte die flüssige Phase und löste den zuvor filtrierten Rückstand in gesättigter Magnesiumsulfatlösung auf. Anschließend wurde das Sediment ausgewaschen, getrocknet und gewogen.

Zum Nachweis von Knochenpartikeln in Wursterzeugnissen suspendierten SCHAAL und ANHALT (1974) eine durch zweimaliges Wolfen homogenisierte Probe in gesättigter Magnesiumsulfatlösung. Während der Fleischanteil flotierte, setzte sich der Knochen auf dem Boden ab. Nach dem Ablassen des Rückstands, Auffangen auf Filterpapier und Trocknen des Sediments konnte abschließend der Rückstand ausgewogen werden .

Eine hohe Korrelation von r = 0,94 fanden WENZEL et al. (1974) zwischen dem Verfahren der Sedimentation nach SCHAAL und ANHALT (1974) und der Kalziumbestimmung mittels AAS.

Aus zerkleinertem Schweinefleisch und verschiedenen Mengen an Knochenpulver stellte SCHULZE (1977) Modellchargen her. Unter der Berücksichtigung des Gewichtsverlustes im unbehandelten Knochenpulver berechnete er die für die einzelnen Zusatzmengen adäquaten Knochengehalte und verglich sie mit den durch das Sedimentierverfahren aus den Modellchargen analytisch ermittelten Daten (Tabelle 24). Es zeigte sich, dass sich dieses Verfahren zur Knochengehaltsbestimmung eignet, sofern die methodisch bedingten Verluste an Knochensubstanz bekannt sind und die Knochenart gleichbleibt. Durch die Abhängigkeit der Resultate von Tierart, Alter und anatomischer Herkunft der Knochen wäre jedoch die Bestimmung eines dem Untersucher unbekannten Separatorenfleischzusatzes anhand einer generellen Umrechnungsformel unmöglich.

Tabelle 24: ***Vergleich der berechneten mit den analytisch nach dem Sedimentierverfahren bestimmten Knochengehaltswerten im Zumischversuch (SCHULZE 1977)***

Charge mit Knochenpulverzusatz von	***Mittel der berechneten Werte [%]***	***Mittel der Analysewerte [%]***
0 %	0,08	0,18
1 %	0,75	0,76
2 %	1,42	1,28
4 %	2,75	2,71
7 %	4,76	4,82

2.6.2.2 Enzymatische Verdauung

VAN GEND (1971) entwickelte eine enzymatische Methode, wobei die Probe mit Papain vorverdaut wurde, bis ein Gemisch von Bindegewebe, Stärkemehl und Knochen übrig blieb. Anschließend wurde der Knochen durch Sedimentation mit einem Tetrachlorkohlenstoff-Acetongemisch isoliert, getrocknet und gewogen. Daran schloss sich die mikroskopische Verifizierung an. Bei der Beurteilung sollte der Grenzwert für den bei der Abtrennung technologisch unvermeidebaren Grobknochengehalt 0,05% betragen.

NEGATU et al. (2006) stellten eine Modifikation der enzymatischen Methode vor. Nach der Inkubation des Kaninchenseparatorenfleisches in einem Gemisch von Verdauungsenzymen aus Papain (Papaya), Bromelain (Ananas) und Ficin (Feige) sowie dem Autoklavieren der Proben ließen sich die weichgeweblichen Reste leicht von den Knochenpartikeln durch Auswaschen mit Wasser abtrennen. Das modifizierte Verfahren arbeitet schneller, genauer sowie umweltschonender und kann auf Separatorenfleisch aller Tierarten angewendet werden.

2.6.2.3 Laugenbehandlung

Bereits 1941 versuchte DILLER „die kleinsten Knochenteilchen in Wurst“ über eine Behandlung mit Lauge nachzuweisen. Im ersten Schritt wurden die Proben entfettet und die Proteine mit Natronlauge ausgefällt. Nach Zugabe von Chloroform schwemmten die leichten Bestandteile auf, wodurch das schwerere Sediment quantifiziert werden konnte. Der Gewichtsverlust an Knochensubstanz bei der Laugenbehandlung musste in Kauf genommen werden.

SINELL (1956) modifizierte die Analytik, indem die in der 10%igen Kalilauge aufgelöste, entfettete und getrocknete Substanz zwei Stunden lang unter Wasserzufuhr zum Sieden gebracht wurde. Nach dem Erhitzen wurde der abzentrifugierte Rückstand getrocknet, 20 Minuten lang im Porzellantiegel geglüht und anschließend gewogen. Nach dem Glühen fanden sich noch ¾ des ursprünglichen Knochengewichts wieder. Demgemäß erfolgte die Berechnung des Knochengehalts nach der Formel 2.3:

$$K = R - c \cdot \frac{4}{3} \qquad (2.3)$$

K : Knochengehalt [g]

R : Ascherückstand [g]

c : 0,35 % der Ausgangstrockenmasse („Gewürzasche“).

Das KOH-Verfahren zum quantitativen Nachweis von Geflügelseparatorenfleisch wurde von GERATS und TERBIJHE (1975) erneut empfohlen und folgendermaßen beschrieben: zunächst wurden Fett und Rohprotein durch alkoholische KOH-Lösung bei 95°-100°C separiert. Nach Filtration, Waschen, Trocknen und Wiegen konnte dann mit Hilfe der Formel 2.4 der Knochengehalt bestimmt werden:

$$G[\%] = \frac{D-C}{B-A} \cdot 100\,\% \cdot t \qquad t = r \cdot s \tag{2.4}$$

G : Knochengehalt

A : Gewicht des leeren Kolbens

B : Gewicht des Kolbens mit der Probe

C : Gewicht des Glasfilters

D : Gewicht des Glasfilters mit Knochenteilchen

t : Umrechnungsfaktor zur Ermittlung des tatsächlichen Knochenanteils am Ausgangsmaterial (t = 0,44 bei ca. 6 Wochen alten Hühnern)

r : Trockensubstanz des Knochens

s : Gewichtsverlust durch KOH-Behandlung

BOLDER und HOSPERS (1977) propagierten aufgrund ihrer Untersuchungen von mechanisch entbeintem Geflügelfleisch eine parallele Ermittlung des Knochengehalts mit der KOH-Methode einerseits und dem Kalziumnachweis andererseits.

SCHULZE (1977) bestimmte Umrechnungsfaktoren sowohl für das Sedimentierverfahren (Kapitel 2.6.2.1, Seite 56) als auch die Laugenbehandlung. Für das Separatorenfleisch aus Schweineknochen lagen sie niedriger als bei Geflügelfleisch. Sofern die methodisch bedingten Verluste an Knochensubstanz bekannt wären und die Art der Knochen gleichbliebe, würde sich die KOH-Methode neben dem Sedimentationsverfahren zur Knochengehaltsbestimmung eignen. Die Gegenüberstellung der von

SCHULZE anhand der auf die jeweiligen Chargen unter der Berücksichtigung des Gewichtsverlustes im unbehandelten Knochenpulver berechneten und durch die KOH-Methode ermittelten Werte beinhaltet die Tabelle 25.

Tabelle 25: ***Vergleich der berechneten und mittels KOH-Methode ermittelten Knochengehaltswerte von Chargen mit Knochenpulverzusatz (SCHULZE 1977)***

Charge mit Knochenpulverzusatz von	***Mittel der berechneten Werte [%]***	***Mittel der Analysewerte [%]***
0 %	0,003	0,02
1 %	0,62	0,62
2 %	1,23	1,26
4 %	2,46	2,37
7 %	4,31	4,35

Mittels des KOH-Auskochverfahrens ermitellte Knochengehalte von Schweineseparatorenfleischproben wurden von BIJKER et al. (1978) mit Proben bekannter Gehalte an Knochensubstanz verglichen. Es bestand eine signifikante Korrelation.

Die von KÖNIGSMANN (1978) und KÖNIGSMANN et al. (1980b) durchgeführte Bestimmung des Knochenanteils mittels KOH-Auskochverfahrens bei 14 Separatorenfleischproben erfolgte in Anlehnung an die Anweisung von SINELL (1956; Kapitel 2.6.2). Nach der Formel 2.3 (Seite 57) wurde dann für die Separatorenfleischproben der jeweilige Knochengehaltswert ausgerechnet, wobei für Separatorenfleisch $c = 0$ ist. Die ermitellten Knochengehaltswerte in der Feuchtsubstanz von Separatorenfleischproben zeigen die Tabelle 26 und Abbildung 14.

Tabelle 26: ***mittels KOH-Auskochverfahren bestimmte Knochengehaltswerte von Separatorenfleischproben (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980)***

	Tierart	***Knochengehalt [%]***
1	Rind	1,2685
2		1,1875
3		0,284

	Tierart	*Knochengehalt [%]*
4	Rind	0,6195
5		0,5765
6		0,4545
7		0,7985
8		0,4495
9		2,694
10		0,2915
11	Schwein	2,414
12		1,276
13		1,8575
14		0,314

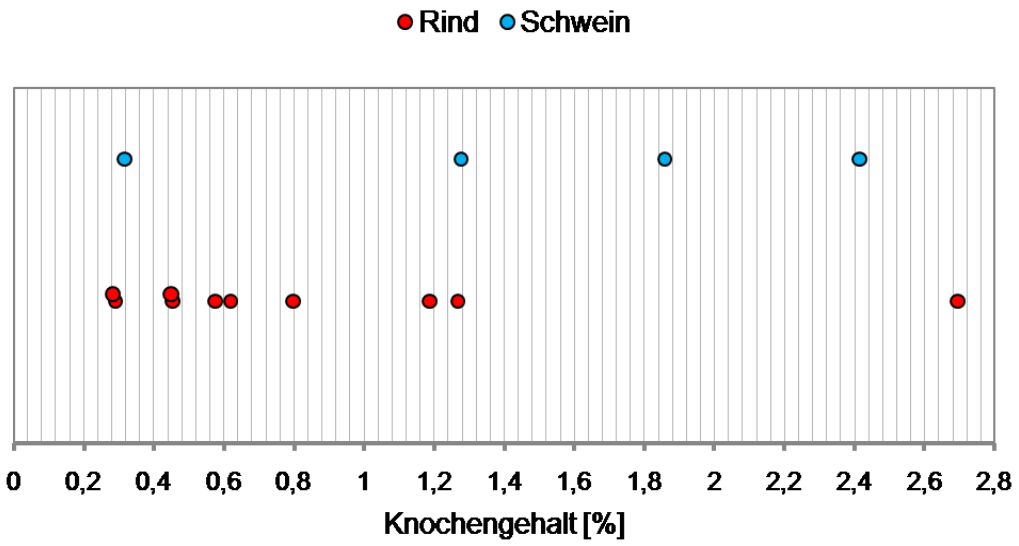


Abbildung 14: ***mittels KOH-Auskochverfahren bestimmte Knochengehalte von Separatorenfleischproben (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980b)***

BIJKER et al. (1979) untersuchten die Qualität von „mechanically deboned pork“ und bestimmten mit Hilfe des KOH-Auskochverfahrens den Knochenanteil, indem eine Abtrennung von Fetten und Proteinen in Kalilauge bei 95°-100°C stattfand und kalzifizierte Knochenpartikel übrig blieben, deren Größen anschließend lichtmikroskopisch bestimmt werden konnten. Sie bekräftigten, dass die KOH-Auskochmethode eine effektive Möglichkeit zur Überwachung der Qualität von Schweinesepartorenfleisch darstellt.

KIJOWSKI (1981) empfahl zur Bestimmung der Knochenpartikel in mechanisch entbeintem Geflügelfleisch eine Kombination aus Laugenbehandlung und Mikroskopie.

2.6.2.4 Histomorphologische Gravimetrie

BRANSCHEID et al. (2007) stellten eine morphologische Methode der simultanen Darstellung von Knochen- und Knorpelpartikeln vor. Von Separatorenfleischproben und Modellproben mit Zusatz an Knorpel- bzw. Knochengewebe wurden repräsentative Aliquots gezogen, gemischt und hiervon 2,0 g abgewogen. Das Material wurde im Reagenzglas einer Stückfärbung mit Alizarinrot-Alcianblau-Gemisch unterworfen und anschließend auf Filterpapier ausgebreitet. Die rot erscheinenden Knochen- und blau dargestellten Knorpelpartikel wurden mit Pinzette und Präpariernadel selektiv isoliert und gewogen. Beim Separatorenfleisch wurde eine relativ breite Streuung der Gehalte einer Probe bei mehreren Wiederholungen festgestellt. Die mittleren Gewichtsanteile verschiedener Proben lagen für Knochen zwischen 0,4 und 0,8 %, während sie für Knorpel zwischen 0,6 und 6,4 % streuten. Die Modellproben mit definiertem Zusatz an Knorpel- bzw. Knochengewebe zeigten repräsentative Ergebnisse.

2.6.2.5 Radioskopie

Bei vergleichenden Untersuchungen zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Knochengewebe in Fleisch- und Wursterzeugnissen stellten WENZEL et al. (1974) fest, dass Röntgenologie nur eine semiquantitative Aussage treffen kann.

NITSCH et al. (2002) untersuchten geflügelfleischfreie Brüh- und Kochwurstproben röntgenologisch. Die Proben wurden einerseits aus dem Handel gezogen, andererseits wurden sie als Modellfleischwaren aus definierten Zusatzmengen an manuell und mechanisch mittels AMRS gewonnenem Fleisch hergestellt. Die Quantifizierung erfolgte über das als Partikelindex bezeichnete Verhältnis der Anzahl der gefundenen Partikel zum Probengewicht in Gramm. Durch die Untersuchungen konnten Grenz-

werte für verdächtiges Material von 0,02/g bei Brüh- und 0,025/g bei Kochwürsten abgeleitet werden, die sich jedoch nur auf Produkte ohne Weißfleischanteil beziehen. Generell wurde eine Absicherung der Befunde mittels histologischer Untersuchung angeraten .

DIEPOLDER und SCHULZE (2005) untersuchten 29 zuvor histologisch überprüfte Proben mittels Radioskopie auf das Vorhandensein von Knochenpartikeln. In 23 Fällen stimmten Ergebnisse beider Verfahren überein, in 5 Fällen war der radioskopische im Gegensatz zum histologischen Befund positiv, bei einer Probe ergab nur die Histologie ein postives Ergebnis. Die radioskopische Untersuchung wurde als eine schnelle und zuverlässige Screening-Methode empfohlen, die jedoch einer histologischen Untermauerung des Befundes bedarf.

BRANSCHEID et al. (2007) untersuchten Separatorenfleisch und Modellproben mit Zusatz an Knorpel- bzw. Knochengewebe mit Hilfe eines Röntgen-Computertomographen und verglichen die Ergebnisse mit den Resultaten eines histomorphologisch-gravimetrischen Verfahrens. Bei der radiologischen Auswertung der Separatorenfleischproben wurden die Partikelanteile um eine 10er Potenz unterschätzt, was sich mit der in der morphologischen Darstellung erkennbaren geringen Partikelgröße begründen ließ. Bei der Wahl eines geeigneten Grenzwertes für die CT-Analyse läßt sich jedoch das den Modellproben zugesetzte Knochengranulat sehr genau messen.

2.6.2.6 Histologie

Der histologische Nachweis wurde oft als parallel anzuwendende Methode für den sicheren Nachweis zur Absicherung der qualitativen und quantitativen physikalisch-chemischen Befunde empfohlen (BIJKER et al. 1979; KIJOWSKI 1981; PSOTA 1984). Das histologische Verfahren erfaßt die Knochenanteile direkt und liefert störungsfreie und optimal dokumentierbare Befunde (HILDEBRANDT 2001). Es bietet die Möglichkeit, der fortgeschrittenen Entwicklung zur Qualitätsverbesserung des Rohstoffs Separatorenfleisch auch analytisch zu folgen (TREMLOVA et al. 2006) und bildet mittlerweile die einzige gerichtsverwertbare Technik zum Nachweis von Separatorenfleisch (SCHULTE-SUTRUM und HORN 2003).

Bei vergleichenden Untersuchungen zum Nachweis von Knochengewebe in Fleisch- und Wursterzeugnissen bemängelten WENZEL et al. (1974) allerdings das Herauslösen von nach KOSSA gefärbten Knochenpartikeln in der aufsteigenden Alkoholreihe.

Bei der Trichromfärbung nach CALLEJA mit Pikrinsäure - Alizarin S – Indigokarmin, welche mineralisiertes Knochengewebe im Gegensatz zum gelb bis blau-grünem Restgewebe brilliant rot darstellt (Abbildung 15), fallen laut PFEIFFER et al. (1975) Knochenpartikel unter 0,4 mm nicht heraus. Die Schneidetechnik übt keinen Einfluss auf die Selektivität der Darstellung des Knochengewebes aus. Weitere Versuche mit Zugabe von Natrium- und Kalziumkarbonat zeigten, dass der Farbstoff Alizarin S mit Kalzium einen sehr stabilen Lack bildet. Einer Tinktion anderer Gewebe konnte erfolgreich durch eine vorherige pH-Wert-Senkung mit 1%iger Essigsäure begegnet werden. Als wichtigste Bedingung, um den Verlust der selektiven Anfärbung zu verhindern, empfahlen die Autoren, die Präparate nicht unnötig lang in der Pikrinsäure-Alizarin S-Lösung zu belassen. Unter dieser Prämisse eignet sich die um Alizarin S erweiterte Calleja-Rezeptur zum kontrastreichen Nachweis mineralisierter Knochenpartikel mit einem hohen Maß an Spezifität.

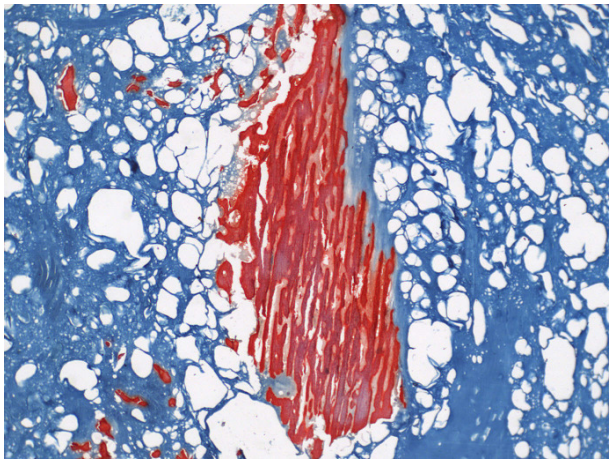


Abbildung 15: ***Alizarin S - Färbung***

KÖNIGSMANN (1978) und KÖNIGSMANN et al. (1980a) modifizierten die Silbernitratimprägnierung nach KOSSA (1901) und ERNST (1974), indem sie Orange G zur Gegenfärbung des nicht kalzifizierten Gewebes einsetzten (Abbildung 16). Darüber hinaus übernahmen sie die zur Verhinderung des Herausfallens der Knochenpartikel von BENTLER (1968) angeregte Kollodium-Beschichtung, wobei sie eine Konzentration von 0,25 % Kollodium festlegten.

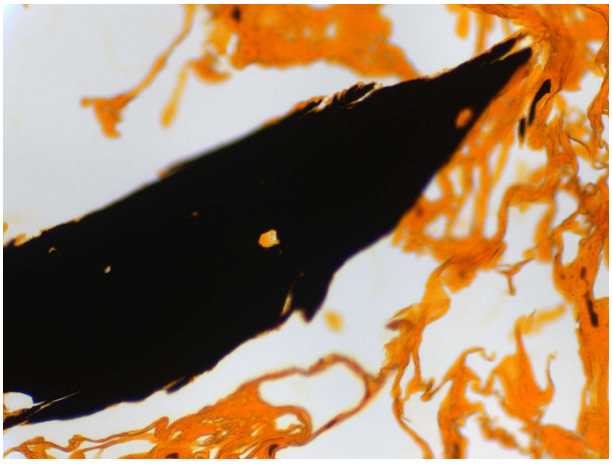


Abbildung 16: ***Kossa - Färbung***

PICKERING et al. (1995a) untersuchten mit Toluidinblau gefärbte Gefrierschnitte von Rinder-, Schweine-, Lamm- und Geflügelseparatorenfleisch. Bei fast allen maschinell entbeinten Fleischproben konnte im Gegensatz zum handentbeinten Fleisch hyaliner Knorpel nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden kaum vom verwendeten Separatorentyp, den Einstellungsbedingungen sowie der Zerkleinerungsart vor dem maschinellen Gewinnen beeinflusst. Eine Quantifizierung der Anteile an Separatorenfleisch in Gemischen aus MEF und Nicht-MEF fiel jedoch unbefriedigend aus, weshalb das histologische Verfahren in erster Linie als brauchbare Screening-Methode zur Beurteilung der Verarbeitung von Separatorenfleisch eingestuft wurde.

TREMLOVA (2000) empfahl die modifizierte VAN GIESSON – Färbung für den qualitativen Nachweis von Knochensplittern in Fleischerzeugnissen, wie sie WICHMANN-SCHAUER und HILDEBRANDT (1997) zur Darstellung von Gräten entwickelt hatten.

Da erfahrungsgemäß Knorpel und Knochen in separatorenfleischfreien Erzeugnissen ein seltenes Ereignis (< 0,05 Vol% - <0,1 Vol%) bilden, schlug HILDEBRANDT (2001) den simultanen Nachweis beider Komponenten für die Diagnostik der Separatorenfleischverarbeitung vor. Er empfahl die Silbernitrat-Imprägnierung in Verbindung mit der Alciangrünfärbung zur Darstellung des Knochen- und Knorpelgewebes, bei der der Knochen schwarz und hyaliner Knorpel blau erscheinen.

Für einen polarisationsoptischen Nachweis von Separatorenfleisch als Routinemethode plädierte BRANSCHEID (2002). Zuvor entkalkte Proben behandelte er mit Alcian Blau und einer Mischung aus Siriusrot und Orange G, um das mit Alcian Blau gefärbte Knorpelgewebe im normalen Durchlicht sowie die durch Siriusrot und Orange G dargestellten Knochen- und Bindegewebe unter gekreuzten Polarisatoren eines Polarisationsmikroskops zu erfassen. Die polarisationsoptische Methode stützte sich

auf eine Verstärkung der Doppelbrechung der Kollagenfasern durch den Farbstoff Siriusrot. Je nach angelagerter Farbstoffmenge wurden Polarisationsfarben zwischen Grün und Karminrot erzeugt. Die besonders straffe und einheitliche Ausrichtung der Kollagenfasern im Knochengewebe bewirkte die kräftigsten Rottöne, die sich von den Polarisationsfarben des straffen Bindegewebes unterscheiden ließen. Mit dem Entkalken des Materials wollte der Autor Verluste von Knochenpartikeln beim Schneiden und der weiteren Behandlung der Schnitte vermeiden.

Zellkernreiche Strukturen ohne intaktes Plasmalemm konnten RAUSCHER und HILDEBRANDT (2004) vermehrt beim Separatorenfleisch nachweisen. Die vermutete Zuordnung dieser chromatindichten Zellkernanhäufungen zum hämopoetischen Gewebe ließ sich jedoch in den meisten Fällen nicht bestätigen.

2.6.2.7 Histometrie

Das Knochengewebe in Fleisch und Fleischerzeugnissen kann über drei histologisch-analytische Ansätze quantitativ erfasst werden. Neben der Bestimmung der Mengenanteile durch das Punktzählverfahren sowie die direkte Knochengewebsflächenmessung gehört auch die Partikelzählung zu den quantitativen Techniken.

a. Point Count Verfahren

Die Möglichkeit, das Knochengewebe histometrisch zu erfassen, bot das Pointcount-Verfahren nach PRÄNDL (1961). Nach der Reduktion des dreidimensionalen Probenkörpers in verschiedene Schnittebenen werden innerhalb dieser Flächen Gewebstrefferpunkte in festgelegten Abständen unter dem Mikroskop ausgezählt. Als Stichprobenverfahren („jeder Treffer bildet eine unabhängige Stichprobe“) bietet die Point Count Technik zwar kein identisches, aber ein angenähertes Abbild der Wirklichkeit. Je höher die ausgewertete Trefferzahl, um so genauer wird der wahre Volumenanteil der Zielgröße eingegrenzt. Schätzung von Mittelwert und Streuung des Merkmals basieren auf der Annahme einer Binominalverteilung mit folgenden drei Voraussetzungen: die Möglichkeit von nur zwei Ergebnissen bei jedem einzelnen Versuch (z.B. Knochen; Nicht-Knochen), die Unabhängigkeit zweier aufeinander folgender Ergebnisse und die konstante Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses für jeden Versuch. Diese Prämissen wurden von WEIß und HILDEBRANDT (1974) in Bezug auf histometrische Analysen als realistisch angesehen, so dass dieses statistische Modell als charakteristische Strukturierung für die Verteilung der Gewebspartikel im histologischen Präparat bei ausreichender Homogenisierung Gültigkeit besitzt.

In Hinblick auf den Knochenanteil setzten LINKE und THUMSER (1964) das Punktzählverfahren ein. Sie ermittelten Knochengehalte von 0,52 % – 0,81 % bei nach Calleja gefärbten Präparaten von manuell entbeintem Knochenputz.

HILDEBRANDT et al. (1975) bestimmten geringwertige Gewebe in Fleischerzeugnissen mit dem Ziel, hieraus eine histometrische Qualitätsbeurteilung abzuleiten. Bei 332 nach Calleja gefärbten Hackfleisch- und Wurstpräparaten fanden sie mittels Punktzählverfahren Knochenanteile von 0,011 bis 0,020 Vol.% bezogen auf die Gesamttrefferzahl. Die höheren Knochengehalte in den erhitzten Proben müssen nicht produktspezifisch sein, sie können auch aus der Tatsache resultieren, dass sich Knochenpartikel optisch besser gegen verleimtes Bindegewebe als gegen natives Material abheben. Die Tabelle 27 und Abbildung 17 veranschaulichen die Ergebnisse der Untersuchungen.

Tabelle 27: ***mittels des Punktzählverfahrens bestimmte Knochenanteile bei Hackfleisch- und Wurstpräparaten (HILDEBRANDT et al. 1975)***

Erzeugnis	***Probenzahl***	***mittlere Gesamttrefferzahl/Probe***	***mittlerer Knochenanteil [Vol.%]***	***Standardabweichung***
Schabefleisch	40	1092	0	
Rinder-Gehacktes	93	1163	0,018	± 0,12
Hackepeter	12	1035	0	
Schnittfeste Rohwurst I	9	1033		
Schnittfeste Rohwurst II	23	1332		
Rohwurst I	9	1086		
Rohwurst II	2	1212		
Türkische Rohwurst	65	1383	0,019	± 0,11
Brühwurst I	14	1089	0,020	± 0,48

Erzeugnis	*Probenzahl*	*mittlere Gesamttreffer-zahl/Probe*	*mittlerer Knochenanteil [Vol.%]*	*Standard-abweichung*
Brühwurst II	62	1141	0,011	± 0,38
Brühwurst III	3	1212	0	

I:Spitzenqualität II:mittlere Qualität III:einfache Qualität

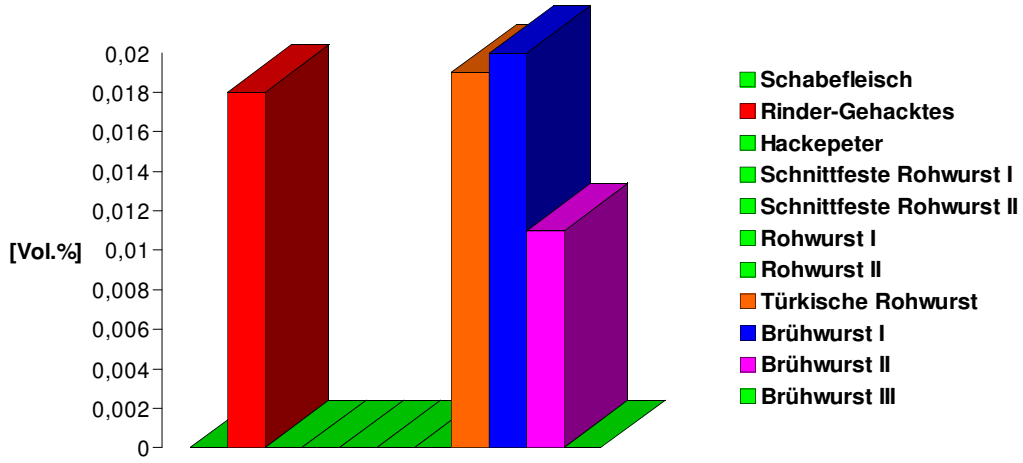


Abbildung 17: ***mittels Punktzählverfahren bestimmter mittlerer Knochenanteil (HILDEBRANDT et al. 1975)***

b. Partikelzählung

Da die Durchführung des Point Count Verfahrens sehr zeit- und personalaufwendig ist, zumal das „seltene Ereignis“ Knochen das Auswerten vieler Treffer erfordert, wurde nach einer weniger arbeitsintensiven Alternative gesucht. Diese bot sich in Form des Auszählens der in einem Schnitt identifizierbaren Knochenpartikel an.

PSOTA (1984) setzte sowohl die Histologie als auch die Kalziumbestimmung mittels AAS zum Nachweis von Separatorenmaterial ein. Ein Auftreten von Knorpel- und/oder Knochenpartikeln in mehr als drei von neun Brühwurstschnitten sprach für die Mitverarbeitung von Separatorenfleisch.

Von BIJKER et al. (1985) wurden Vorderschinken und Luncheon Meat – Proben untersucht, die für die Versuchsreihe mit Zusätzen an Schweine- (0 - 35 %) und Geflügelseparatorenfleisch (0 – 20 %) hergestellt worden waren. Die Proben wurden aufbereitet, gefriergeschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin und Alizarin-S gefärbt. Die mit HE behandelten Präparate wurden qualitativ auf das Vorhandensein von Knochen- und Knorpelstrukturen überprüft. Bei den Alizarin-S-Schnitten wurden unter der 25fachen Vergrößerung alle über 50 µm große Knochenpartikel registriert. In dem Modellversuch differierte der Knochenrückstand von 0,22 % bei mitverwendetem Schweineseparat bis 0,59 % beim zugesetztem Geflügel-MDM, während sich die Partikelgrößenverteilung nicht wesentlich unterschied (Tabelle 28).

Tabelle 28: ***Partikelgrößenverteilung bei Schweine- und Geflügel-MDM (BIJKER et al. 1985)***

Größe der Knochenpartikel [µm]	***relativer Anteil beim Zusatz von Schweine-MDM (Protecon®)[%]***	***relativer Anteil beim Zusatz von Geflügel-MDM (Paoli®) [%]***
100-1000	96,0	97,0
1000-2000	3,6	3,0
2000-3000	0,4	0
> 3000	0	0

Schon der Zusatz von 1 % Schweine-MEF verursachte eine deutliche Zunahme der Knochenpartikelzahl. Beim mitverwendeten Geflügelseparat varrierten die Zahlen der Knochenpartikel zwischen 0 und 1 % Zusatz unwesentlich, ab 10 % Zusatz konnten jedoch Partikelzahlen von weit über 60 ermittelt werden.

Die Tabelle 29 zeigt die interessanten Ergebnisse von BIJKER et al. (1985) in Bezug auf die Korrelation des Zusatzes an Schweineseparatorenfleisch und die dazugehörigen Partikelzahlen beim Luncheon Meat (Abbildung 18).

Tabelle 29: ***Beziehung zwischen dem Zusatz an Schweineseparatorenfleisch und der mittleren Knochenpartikelzahlen in histologischen Schnitten von Vorderschinken und Luncheon Meat (BIJKER et al. 1985)***

% des Zusatzes an Schweineseparatorenfleisch	*mittlere Knochenpartikelzahlen*
0	11,9
1	23,4
2	24,0
3	28,9
4	31,4
5	32,2
10	69,3
15	90,1
20	193,4
25	234,1
30	245,1
35	340,3

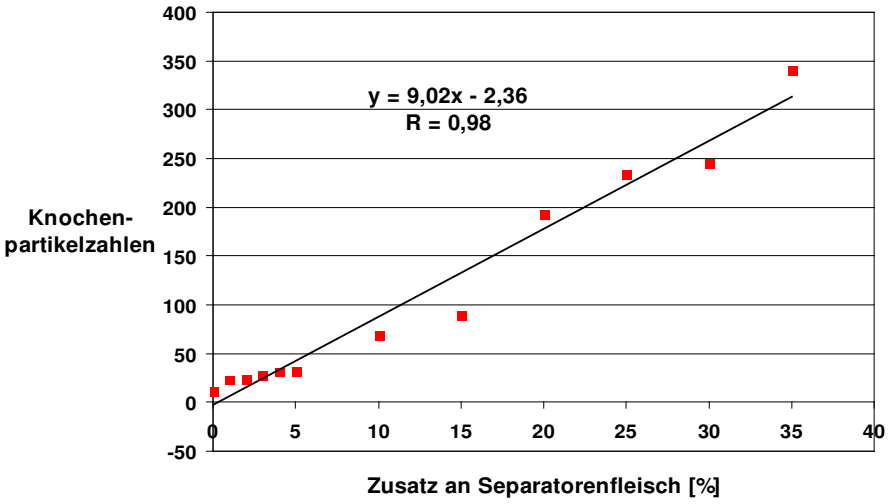


Abbildung 18: ***Korrelation zwischen dem Zusatz an Separatorenfleisch und der mittleren Knochenpartikelzahl in histologischen Schnitten von Vorderschinken und Luncheon Meat (BIJKER et al. 1985)***

Sowohl beim Vorderschinken mit Schweine-MEF-Zusatz und Luncheon Meat mit mitverarbeitetem Geflügelseparatorenfleisch als auch bei verschiedenen Auszählern und Auszählungsmengen variierten die Relationen zwischen der Menge des eingesetzten MEF und den ausgezählten Knochenpartikeln pro Schnitt von Stufe zu Stufe so sehr, dass BIJKER et al. (1985) es ablehnten, die Zahl der Knochenpartikel als quantitatives Kriterium zu verwenden. Sie empfahlen die beschriebene Technik als einfachen und orientierenden Nachweis des Zusatzes von Separatorenfleisch, bei dem Knochenpartikel in acht Schnitten (= 40 cm²) ausgezählt werden sollten. Für die Beurteilung würde sich dann folgendes Schema anbieten:

- 0-30 Knochenpartikel weisen auf keine oder nur sehr geringe Mitverarbeitung hin;
- bei 30-60 Knochenpartikel kann Separatorenfleisch mitverarbeitet worden sein;
- bei über 60 Knochenpartikeln ist eine Mitverarbeitung bewiesen.

HORN (1997) stellte fest, dass nur der quantitative histologische Knochennachweis eine Diagnose von Separatorenfleisch gestattet. Der chemische Knochen- bzw. Kalziumnachweis könnte zwar der Bestätigung von Überschreitungen des maximalen Knochengehaltes dienen, jedoch nicht zum Nachweis von mechanisch entbeintem Fleisch herangezogen werden. Die von ihm vorgeschlagene Vorgehensweise ist in der Tabelle 30 dargestellt, wobei der Grenzwert von 1,5 Knochenpartikeln/cm² bei 8 Schnitten insgesamt 48 Partikeln/32 cm² entspricht.

Tabelle 30: ***Beurteilungsschema zum Nachweis von Separatorenfleisch (HORN 1997)***

Erzeugnis	***maximal tolerierbarer Knochenanteil***	***Nachweisverfahren***
Fleischerzeugnisse allgemein	1,5 Knochenpartikel / cm² (8 Schnitte)	Histologie
Fleischerzeugnisse (Separatorenfleisch kenntlich gemacht)	0,1 % Knochenanteil (= 0,05 % Knochenasche) im Fertigerzeugnis	Histologie bei Verdacht → Bestätigung durch chemische Analyse (Kalzium, Knochenasche)

SCHULTE-SUTRUM und HORN (2002, 2003) berichteten über die Ergebnisse einer Eignungsprüfung, an der sich 20 deutsche Untersuchungseinrichtungen mit 46 Sachverständigen beteiligt hatten. Als Versuchsauftrag sollte die Komponente Knochengewebe histologisch bestimmt werden. Um den Zusatz von Separatorenfleisch nachzuweisen, wurden Brühwurstproben mit Anteilen von 0%, 20% und 60%

mechanisch entbeintem Fleisch hergestellt. Zusätzlich wurde eine Probe aus dem Handel einbezogen, bei der zwar der Zusatz, jedoch nicht die zugesetzte Menge bekannt waren. Das Probenmaterial wurde in Paraffin eingebettet, geschnitten und jeweils zwei Schnitte nach Calleja und vier Schnitte mit Alizarin-S gefärbt. Die Aufgabe der Sachverständigen bestand im Auszählen aller Knochenpartikel ab einer Größe von 30 – 50 µm pro Schnitt und Ausmessen der Gesamtflächen der 6 erhaltenen Präparate. Die Knochennester sollten zusammen als ein Partikel, jedoch im Zweifelsfall getrennt registriert werden. Die Ergebnisse des Ringversuchs sowie die Standardabweichung zur Einschätzung der zufälligen Fehler, wie Bestimmung der Schnittfläche, Einschätzung der Größe des Partikels (>30-50µm), Beurteilung der Knochennester und Zählverfahren sind in der Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: ***Ergebnisse eines Ringversuchs zur Eignung des Partikelzählverfahrens (n = 46; SCHULTE-SUTRUM und HORN 2003)***

	Calleja - Färbung		***Alizarin S - Färbung***	
Zusatz an Separatoren-fleisch [%]	***Mittelwert [Knochen-partikel/cm²]***	***Standard-abweichung***	***Mittelwert [Knochen-partikel/cm²]***	***Standard-abweichung***
0	0,3	0,1	0,2	0,2
20	2,2	0,8	2,3	0,9
60	6,3	2,1	6,3	1,9
unbekannt	2,4	0,9	2,7	1,0

Die relativ hohe Standardabweichung bei der Alzarin S – gefärbten Probe ohne Separatorenfleischzusatz läßt sich darauf zurückführen, dass auch bei üblich zerlegtem Fleisch Knochenpartikel vorkommen können, wie sie bei einigen Proben gefunden wurden. Derartig technologisch unvermeidbare Spuren können aber toleriert werden, da sie in einem Bereich liegen, aus dem keine rechtlichen Verstöße abzuleiten sind. SCHULTE-SUTRUM und HORN (2003) stellten fest, dass die histologischen Verfahren auch unter der Berücksichtigung ihrer systemimmanenten Fehler den Nachweis von Separatorenfleisch leisten können.

Eine Übersicht der Beurteilungskriterien nach der Eignungsprüfung ist in der Tabelle 32 zusammengestellt.

Tabelle 32: ***Zusammenstellung der Beurteilungskriterien aufgrund einer Eignungsprüfung (SCHULTE-SUTRUM und HORN 2003)***

„Vereinzeltes Vorkommen von Knochenpartikeln wird als technologisch unvermeidbar angesehen und ist nicht zu beanstanden (Nach L-6.00-13 heißt „vereinzelt“: nicht in jedem Schnitt wird ein Knochenpartikel gefunden; bei 10 Schnitten mit einer Fläche je 4 cm^2 ergeben sich daraus maximal 0,2 Knochenpartikel pro cm^2).“
„Bei geringen Mengen bis zu 1,5 Knochenpartikel pro cm^2 soll ein Hinweis zur Überprüfung der Herstellungspraxis unter der Berücksichtigung der Rezeptur in die Beurteilung aufgenommen werden (Nach L-6.00-13 heißt „in geringer Menge“: Knochenpartikel kommen mit mindestens einem Partikel pro Schnitt vor; bei 10 Schnitten mit einer Fläche von je 4 cm^2 ergeben sich daraus 0,3 bis 1,5 Knochenpartikel pro cm^2).“
„Liegt der ermittelte Wert über 1,5 Knochenpartikel pro cm^2, so folgt daraus, dass Separatorenfleisch verarbeitet wurde. Fehlt eine entsprechende Kennzeichnung oder wurde das Separatorenfleisch mengenmäßig dem Fleisch zugeschlagen, liegt eine Irreführung entsprechend § 17 Absatz 1 Nummer 5 Buchstabe b) Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) vor.“

c. Planimetrische Verfahren – automatisierte Histometrie

In der zweiten Hälfte der 70er Jahre beschrieben zum ersten Mal HILDEBRANDT und KRETSCHMER (1977) sowie HILDEBRANDT et al. (1978) die Eignung der programmierbaren, elektronischen Fernsehbildanalyse für die histometrische Bestimmung wertmindernder Gewebe in Fleischerzeugnissen, wodurch eine Automatisierung und Beschleunigung des umständlichen Punktzählverfahrens möglich wurde. Zur Rationalisierung der quantitativen mikroskopischen Auswertung bot sich eine Fernseh-Computer-Kombination - der Micro-Videomat der Firma Zeiss – an. Unter der Voraussetzung, dass die zu diskriminierenden und messenden Strukturen genügend kontrastreich und in ihrem Grauwert differenzierbar dargestellt wurden, erlaubte das Gerät präzise und richtige Flächenbestimmungen. Messtechnisch bestand die Vorgehensweise in der Abtastung eines von einem Lichtmikroskop erzeugten Farbbildes mit einer Schwarz-Weiß-Kamera und dessen Umsetzung in Bildpunkte unterschiedlicher Grauwerte. Die sich anschließende stereometrische Erfassung geschah durch Registrierung der Objekte, die unterhalb des vom Diskriminator vorgegebenen Helligkeitsschwellenwertes (d.h. oberhalb des Grenz-Grauwertes) erkannt wurden. Die wichtigste Voraussetzung bildeten somit histologische Schnitte mit ausreichendem Kontrast der Grautöne der gesuchten Gewebsarten. Die Kontraste ließen sich ggf. durch Einsatz geeigneter Farbfilter verstärken.

Das Prinzip der fernsehbildanalytischen Flächenmessung am Beispiel des Knochengewebes zeigt schematisch die Abbildung 19, in der ein nach KOSSA modifiziert nach KÖNIGSMANN gefärbtes Präparat **(a)** dargestellt ist. Zunächst wurden bei dem erstellten Grauwertbild **(b)** die zwei Filtereinstellungen ermittelt, bei denen ein maximaler Helligkeitskontrast zwischen dem gesuchten Knochengewebe und dem restlichen Gewebe samt leerer Objektträgerfläche **(c)** einerseits und zwischen Gesamtgewebe und der leeren Objektträgerfläche **(d)** andererseits besteht.

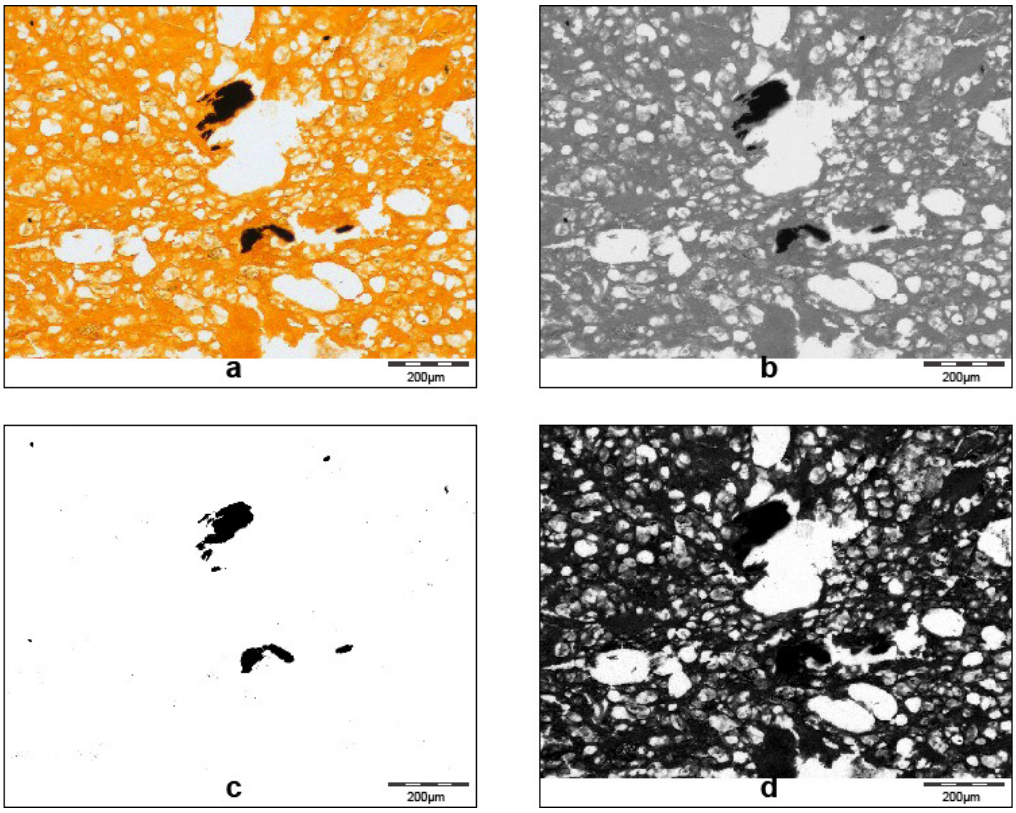


Abbildung 19: ***Prinzip der automatisierten Fernsehbildanalyse***

Anschließend konnten über die jeweilige Einstellung des Graubereichsdiskriminatoren und somit die bis zum optimalen Schwellenwert erzeugte Helligkeitsdämpfung die entsprechenden Flächenanteile bestimmt werden. Vor allem bei der Kollagenbestimmung traten jedoch Überfärbung oder Farbblässe von Gewebspartien auf, was die Forderung nach einer standardisierten, diskriminierungsrelevanten und korrekten Färbetechnik bestätigte. Anderenfalls waren die Voraussetzungen für das fernsehtechnische Verfahren nicht gegeben. In streng kontrollierten Modellversuchen konnten für die Kollagenbestimmung hohe Korrelationen zwischen Fernsehbildanalyse und entsprechenden Referenzverfahren erzielt werden. Somit erlaubte die automatisierte mikroskopische Planimetrie eine exakte, reproduzierbare und automatisierte Flächenbestimmung (HILDEBRANDT und KRETSCHMER 1977; HILDEBRANDT et al. 1978).

KÖNIGSMANN (1978) und KÖNIGSMANN et al. (1980a und 1980b) untersuchten histologische Präparate von homogenisierten Separatorenfleischproben sowie mit dessen Zusatz hergestellten Brühwürsten mit Hilfe der Fernsehbildanalyse und stellten die so gewonnenen Ergebnisse dem KOH-Auskochverfahren und der Kalziumanalyse mittels AAS gegenüber. Als Voraussetzung für die histologische computergestützte Meßtechnik galt bei diesen Untersuchungen der Probenaufbereitung und dem Färbevorgang die größte Aufmerksamkeit. Da die Apparatur anhand der verschiedenen Grauabstufungen die Messungen vornahm, waren farbintensive und in ihren Grauwerten ausreichend kontrastierte Objekte notwendig. Nicht alle hierzu nötigen Voraussetzungen bot der Kalknachweis nach KOSSA v. (1901) mit der vereinfachten Modifikation von ERNST (1974). Durch den Gebrauch von Silbernitrat und Pyragollol stellte sich zwar das Knochengewebe ausreichend kontrastiert schwarz-braun dar, jedoch mussten die Fehlimprägnierungen des restlichen Gewebes in Form braunschwarzer statt gelber Partien bei der Gegenfärbung mit Orange-G durch eine Differenzierung mit Kaliumpermanganat beseitigt werden. Um das Herauslösen der Knochenpartikel während der Aufarbeitung und Färbung zu verhindern, wurden die Präparate mit einer Kollodiumlösung vor dem Färbevorgang überschichtet. Die gefärbten und eingedeckten Proben wurden vom Micro-Videomat der Firma Zeiss, bestehend aus einem Lichtmikroskop mit Scanningtisch und Verlaufsfiltermonochromator, einer montierten Schwarz-Weiß-Kamera sowie einem Bildschirm mit Bedienungspult, unter einer Vergrößerung von 1 : 7,875 meanderförmig durchfahren und 100 – 342 Messbilder pro Schnitt aufgenommen. Es erfolgten zwei Untersuchungsvorgänge mit den jeweiligen Filter- und Diskriminatoreinstellungen, wobei einerseits die Gesamtgewebsfläche und andererseits die Knochegewebsfläche sowie die Knochenpartikelzahl erfasst wurden. Die Messvorgänge wurden mit Ausnahme der Filterregulierung durch Eingabe programmspezifischer Parameter computergesteuert durchgeführt. Die unter dem Punkt 2.5.1 bereits aufgeführte Tabelle 5 sowie die Abbildung 8 zeigen die von KÖNIGSMANN (1978) und KÖNIGSMANN et al. (1980a und 1980b) ermittelten Knochenanteile der Separatorenfleischproben.

Trotz der differierenden Bezugsgrößen und unterschiedlichen Analysemethoden korrelierten, wie die Abbildungen 20 und 21 zeigen, die Ergebnisse der histometrischen Fernsehbildanalyse mit den beiden chemisch-physikalischen Methoden des KOH-Auskochverfahrens und der Kalziumbestimmung mittels AAS sehr eng. Deshalb konnten alle drei Methoden prinzipiell für die Überwachungspraxis empfohlen werden. Die Vorteile der histometrischen Technik lagen in der direkten Erfassung des Knochengewebes, in der Gewinnung zusätzlicher Informationen wie zum Beispiel über die Partikelzahl und -größe, in der Überprüfung der Genauigkeit des Verfahrens durch

visuelle Kontrolle und nicht zuletzt in der Möglichkeit der Aufbewahrung der Präparate als Beweismaterial einschließlich jederzeit möglicher Kontrolluntersuchungen zur Richtigkeit des Befundes. Der einzige Nachteil bestand allerdings in den damals noch recht hohen Investitionskosten, die letztendlich dem Einsatz der Technik in der Routinearbeit im Wege standen (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980a und 1980b).

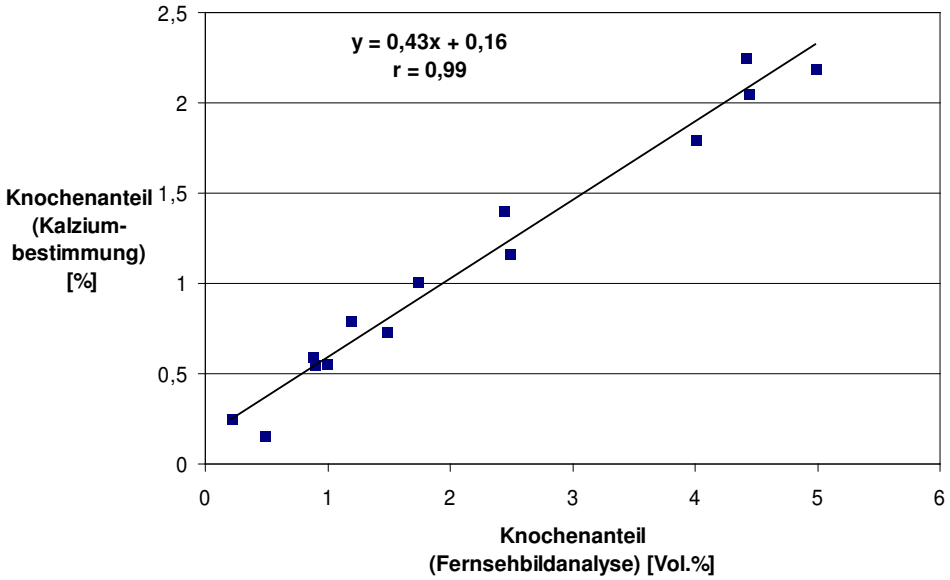


Abbildung 20: ***Korrelation zwischen dem automatisierten fernsehbildanalytischen Knochennachweis und der Kalziumbestimmung (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980a und 1980b)***

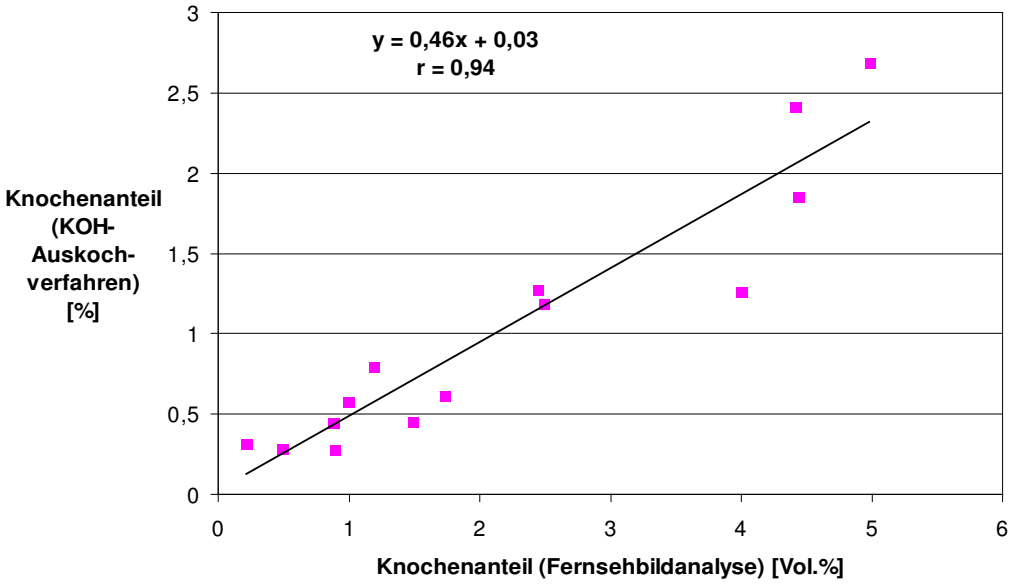


Abbildung 21: ***Korrelation zwischen dem automatisierten fernsehbildanalytischen Knochennachweis und der KOH-Auskochmethode (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980a und 1980b)***

Die den drei angewendeten Verfahren jeweils zugeordneten Untersuchungsergebnisse sind den Tabellen 5, 11 und 26 zu entnehmen.

HILDEBRANDT und HIRST (1985) fassten die Ergebnisse der fernsehtechnischen Planimetrie zusammen und berichteten über weitere Versuche. So wurde die Eignung der Fernsehbildanalyse zur Bestimmung von Bindegewebseiweißfreiem Fleischeiweiß im Fleischeiweiß überprüft. Mit Hilfe des Mikro-Videomaten wurden unter anderem BEFFE im FE - Werte für denaturiertes und rohes kollagenes Bindegewebe bestimmt und dem Punktezählverfahren gegenüber gestellt. Die Korrelationskoeffizienten von 0,98 und 0,99 wiesen auf eine hoch signifikante Korrelation zwischen der computergestützten und manuellen Methode hin. Auch Elastin ließ sich fernsehtechnisch in histologischen Präparaten quantitativ erfassen. Insgesamt wurde noch einmal bekräftigt, dass die histometrische Fernsehbildanalyse eine adäquate Alternative zur chemischen Analytik darstellt und eine objektive Erkennung und Klassifizierung der gesuchten Partikel oder Formen gemäß charakteristischer Parameter ermöglicht. Darüber hinaus trägt sie der Forderung nach technischer Rationalisierung und Automatisierung der analytischen Disziplin Rechnung.

TREMLOVA und STRAHA (2002) untersuchten 26 Geflügelfleischprodukte mit Hilfe eines „Image Structure and Object Analyser“ (Fa. SOFO). Von den mit Alizarin-S gefärbten Paraffinschnitten wurden 854 Aufnahmen angefertigt und Knochenpartikel anhand eines sich an der Farbe eines Knochenfragments orientierenden Overlays determiniert und analysiert. Die Proben enthielten zwischen 135 und 2167 Knochenpartikel, deren Längen sich zwischen 5 und 2088 µm erstreckten. Die Bilderanalyse setzte eine standardisierte Aufbereitung und Färbung der Proben voraus. Unter der Voraussetzung, Übersichtsaufnahmen ganzer Schnitte untersuchen zu können, konnte die digitale Objektanalyse als objektiv und zeitsparend für die histometrische Untersuchung von Fleischprodukten empfohlen werden.

3 Grundlagen der Farbanalyse

3.1 Theorie des Farbsehens

„Farbe ist eine durch Licht bestimmter Wellenlänge hervorgerufene Sehempfindung“ definiert der Schüler-Duden Physik (1989).

So einfach scheint es nicht zu sein, denn WELSCH und LIEBMANN (2006) geben zu bedenken: „Keine noch so eingehende Beschäftigung mit der Physik des Lichts kann die Empfindung beim Sehen einer Farbe oder die Verwendung der Farben in der Kunst wirklich erklären. Dies zu fordern wäre so, als ob man sich beim Autofahren ständig der Positionen und Interaktionen aller Atome des Autos bewusst sein wollte. Für die tägliche Fahrt zur Arbeit ist es offensichtlich nützlicher, nur gröbere Zusammenhänge zu beachten. Gleichwohl ist es für das Gesamtverständnis eines Phänomens wichtig und nützlich, sich exemplarisch mit den zugrunde liegenden Prinzipien bis hinunter zur Physik zu beschäftigen.“

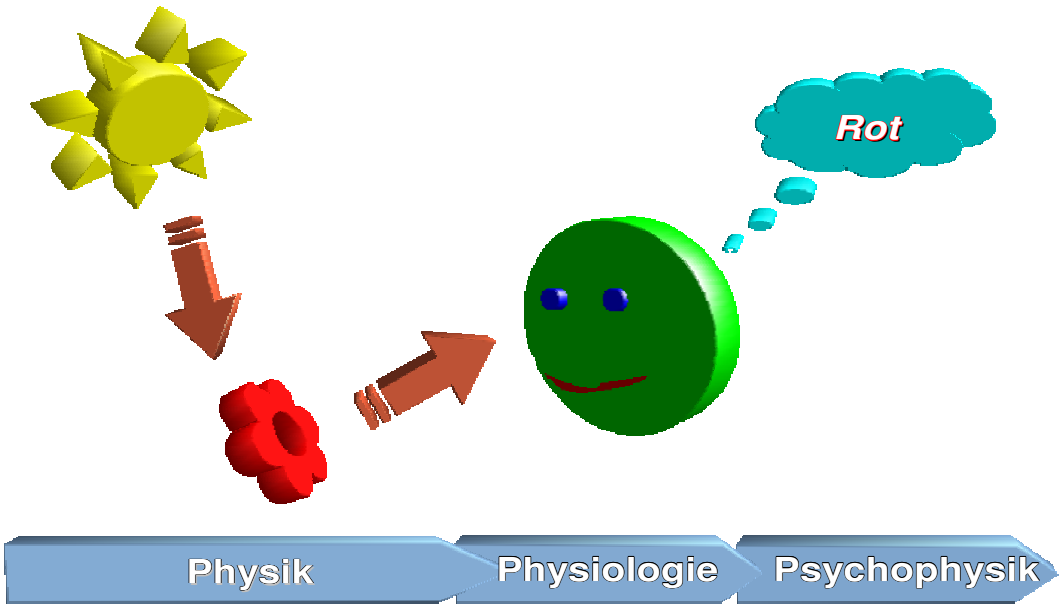


Abbildung 22: ***Phänomen des Farbsehens***

Abbildung 22 soll verdeutlichen, dass sich das Farbsehen nicht ausschließlich physikalisch erklären lässt. Vielmehr besteht ein komplexes Zusammenspiel zwischen physikalischen, physiologischen und psychophysischen Vorgängen, die erst zusammen einen bestimmten Farbeindruck ermöglichen. In den nächsten Kapiteln wird versucht, dieses Phänomen unter den drei genannten Gesichtspunkten zu erörtern.

3.1.1 Farbe – physikalisch: die Strahlung

Die Strahlung wird klassisch in Wellen- und Teilchenstrahlung eingeteilt. Zu ersterer gehören die elektromagnetische Strahlung, die Wärmestrahlung, das sichtbare Licht aber auch die Röntgen- und Gammastrahlung. Alpha- und Betastrahlen repräsentieren die zweite Art von Strahlung, die Teilchenstrahlung. Der Welle-Teilchen-Dualismus bedingt, dass beide Arten ineinander überführbar sind (Formel 3.1), was durchaus sinnvoll und gar notwendig sein kann, um alle Aspekte des Phänomens Farbsehen zu erklären (WIKIPEDIA "WELLE-TEILCHEN-DUALISMUS"; WELSCH und LIEBMANN 2006).

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v} \tag{3.1}$$

λ : Wellenlänge h : Planckscher Wirkungsquantum m : Masse v : Geschwindigkeit

Das Licht verhält sich bei der Ausbreitung ähnlich wie eine Wasserwelle und bildet bei Überlagerung zweier Wellen die so genannten Interferenzmuster. Beim photoelektrischen Effekt können andererseits eindeutig einzelne Lichtteilchen nachgewiesen werden. Um alle Aspekte dieses Phänomens zu erfassen, bedient man sich beider Erklärungstheorien, die sich gegenseitig ergänzen. Bei diesem Komplementaritätsprinzip ist es möglich, sowohl von langwelligem roten Licht als auch von roten Lichtteilchen zu sprechen (WELT DER PHYSIK "DAS DOPPELLEBEN DES LICHTS"; WELSCH und LIEBMANN (2006))

Der Entstehungsprozess farbigen Lichts verbindet sich unmittelbar mit der Atomtheorie. Bei der Emission von Photonen im für Farbe interessanten Energiebereich des sichtbaren Lichts kommt es fast immer zum Rücksprung eines Elektrons von einem höheren in einen niedrigeren Energiezustand (WELT DER PHYSIK "DAS DOPPELLEBEN DES LICHTS").

Die Grundlage für das physikalische Verständnis farbigen Lichts entwickelte im 18. Jahrhundert Sir Isaak Newton (1643-1727). Er zerlegte das weiße Tageslicht mit Hilfe eines Prismas in seine Bestandteile, die „bunten Streifen des Regenbogens“ (Erster Newtonscher Versuch, Abbildung 23). Beim Nachschalten eines zweiten Prismas konnten diese einzelnen „Prismenfarben“ nicht weiter zerlegt werden (Zweiter Newtonscher Versuch). Eine Sammellinse vereinte jedoch alle Bestandteile wieder zu weißem Licht (Dritter Newtonscher Versuch). Newton betonte, dass jeder einzelne Lichtstrahl selbst farblos sei. Die Farben entstünden somit durch unterschiedliche Ablenkung der farbigen, sich schnell bewegenden Kleinstpartikel des Lichts. Die größeren, roten Teilchen würden beim Durchgang durch ein Prisma am wenigsten, die kleinen, blauen am stärksten abgelenkt. Die Prismafarben seien keine Mischfarben, sondern nicht weiter zerlegbare Grund-Primärfarben, aus denen sich aber wohl Sekundärfarben mischen ließen. Abweichend von den bis dato propagierten linearen Farbvorstellungen ordnete er die Farben einem Farbkreis an, nannte sie Spektralfarben und wählte in Anlehnung an die harmonische Ausbreitung des Schalls und der Oktave mit ihren sieben Tonintervallen sieben Hauptfarben: Rot, Orange, Gelb, Grün, Cyanblau, Ultramarinblau und Violettblau (Abbildung 24). Durch diese kreisförmige Anordnung der Farben erfasste Newton als Erster das Prinzip der Komplementärfarben. Diese liegen sich im Kreis gegenüber und ergeben bei ihrer Mischung einen grauen Farbton. Das Weiß liegt im Zentrum seines Farbkreises und ergibt somit die Summe aller Spektralfarben. Auf der Newtonschen Spektral- und Komplämenterfarbentheorie beruhen wichtige Theorien des menschlichen Farbsehens (u.a die trichromatische Theorie von Young, Helmholtz und Maxwell) bis hin zu den modernen Farbwiedergabe- und Drucksystemen sowie Computermonitoren (KÜPPERS 2005; WELSCH und LIEBMANN 2006).

Abbildung 23: ***Farbspektrum*** *(Quelle: www.wikipedia.de)*

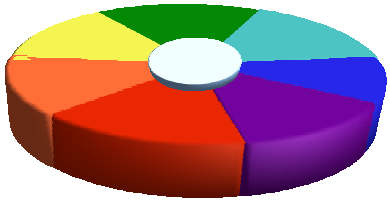


Abbildung 24: ***Farbkreis nach Isaac Newton***

3.1.2 Farbe – physiologisch: der Gesichtssinn

Elektromagnetische Strahlung mit Wellenlängen von 400 – 750 nm wird vom menschlichen Auge als Licht empfunden. Die Lichtstrahlen werden im Auge gebrochen und auf der Retina abgebildet. Mikroskopisch lassen sich in der Netzhaut Photorezeptoren und vier nachgeschaltete Nervenzellklassen sowie Stützzellen und Pigmentepithel identifizieren. Die Photorezeptoren der Retina werden in etwa 110 Millionen Stäbchen, die dem Schwarz-Weiß-Sehen zuzuordnen sind, sowie die für das Farbsehen zuständigen ca. 6 Millionen Zapfen eingeteilt. Beide konvergieren jeweils auf ca. 1 Million Ganglienzellen und Fasern des Nervus opticus. Jeder Zapfen besteht aus einem Außenglied, welches über ein dünnes Zilium mit dem Innenglied des Fotorezeptors verbunden ist. Die größte Rezeptordichte erreichen die Zapfen foveal, dort beträgt ihr Durchmesser etwa 3 µm. In den Außengliedern der für das Farbsehen zuständigen Photorezeptoren befinden sich Membraneinfaltungen. Die Membranen beinhalten die drei verschiedenen Zapfensehfarbstoffe, die sich durch unterschiedliche Glykoproteinzusammensetzung unterscheiden. Die Absorptionsmaxima der einzelnen Photopigmente, die eine Unterscheidung des Lichts verschiedener Wellenlänge ermöglichen, liegen im kurz- (420 nm), mittel- (535 nm) und langwelligem (565 nm) Bereich. Diese peripheren Mechanismen des Farbsehens folgen damit der trichromatischen Farbentheorie von Young, Helmholtz und Maxwell. Danach läßt sich jede beliebige Farbe durch die Addition der drei monochromatischen Farben erzeugen.

Beim Phototransduktionsprozeß werden Lichtquanten von der chromophoren Gruppe des zuständigen Glykoproteins (11-cis-Retinal) absobiert und bewirken deren Stereoisomerisation zur All-Transform. Auf eine Konformationsänderung dieses „Zapfenopsins“ über mehrere Zwischenprodukte folgt eine Verminderung der Permeabilität der äußeren Zapfenmembran für Natrium- und Kalziumionen. Die Erregung durch einen adäquaten Reiz führt somit zu einer Hyperpolarisation und verminderter Abgabe des Transmitters an den Synapsen, worauf das Signal zur sich anschließenden Bipolarzelle invertiert wird. All-trans-Retinal und Opsin liegen nach dem Phototransduktionsprozeß getrennt und inaktiv vor uns müssen wieder resynthetisiert werden. Aus der unterschiedlichen, relativen Empfindlichkeit der Zapfenpigmente resultiert ihre unterschiedliche Gewichtung. Während die mit ihren Absorptionsmaxima im mittel- und langwelligen Bereich angesiedelten Rezeptoren im Vergleich zum kurzwelligen Rezeptorentyp um etwa 1,5 Zehnerpotenzen empfindlicher sind, fehlt letztgenannter im zentralen Bereich der Fovea fast vollständig (KLINKE und SILBERNAGL 1994; SILBERNAGEL und DESPOPOULOS 1991).

3.1.3 Farbe – psychophysisch: die Wahrnehmung

„Unser Farbsinn ist kein physikalisches Meßsystem für Wellenlängen. Erst die neuronale Verarbeitung von Licht verschiedener Wellenlängen führt zum Farbsehen“ (KLINKE und SILBERNAGL 1994)

Die auf der Netzhaut auftreffenden Signale werden zwar bereits in der Retina vorverarbeitet, die wirkliche farbspezifische Differenzierung erfolgt jedoch erst in den spezialisierten Strukturen der primären Sehrinde und in den nachgeschalteten höheren Hirnregionen. Während die trichromatische Theorie von Young, Helmholtz und Maxwell für die Rezeptormechanismen des Sehsystems ihre Gültigkeit besitzt, findet bei der weiteren Verarbeitung des Farbreizes die Gegenfarbentheorie von Hering ihre Anwendung. Diese postuliert, dass drei Gegenfarbenpaare (Rot/Grün, Blau/Gelb und Schwarz/Weiß) sich wechselseitig hemmen. Die Gegenfarbenneurone für Rot und Grün sowie Gelb und Blau, die bereits in der Retina vorzufinden sind, spielen eine wichtige Rolle bei der psychophysischen Farbkodierung. Die eigentlichen farbspezifischen Doppelgegenfarbenneurone, die auf Farbkontrast reagieren, befinden sich jedoch erst in den zylindrischen Unterstrukturen der primären Sehrinde. Die wahrgenommene Farbe eines Gegenstands wird im zentralen Sehsystem errechnet, indem das Signal der von diesem Gegenstand ausgehenden Wellenlänge in Relation zur Umgebung im Gesichtsfeld gesetzt wird. Die Wahrnehmung dieser Farbe bleibt trotz Beleuchtung mit Licht unterschiedlicher spektraler Zusammensetzung (z.B. Morgen-, Mittags- oder Abendsonne) relativ konstant. Im Gegensatz dazu zeigt ein Farbphoto unter gleichen Bedingungen jeweils einen entsprechenden Farbstich (KLINKE und SILBERNAGL 1994).

Ein weiterer Aspekt der Farbwahrnehmung ergibt sich aus den verschiedenen spektralen Empfindlichkeitskurven der Photorezeptoren der Netzhaut (Kapitel 3.1.2), wo sie ungleichmäßig gereizt werden (Abbildung 25).

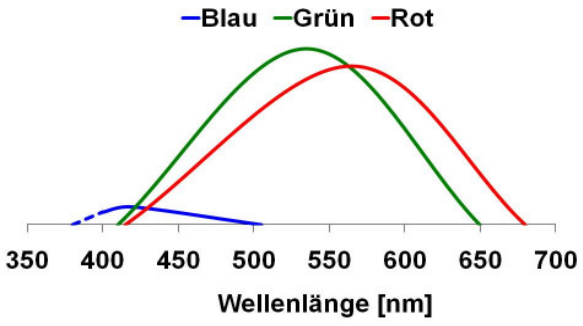


Abbildung 25: ***relative Empfindlichkeitsverläufe der Farbrezeptoren des menschlichen Auges (GRAßL 2001)***

Fällt eine bestimmte spektrale Intensitätsverteilung ins Auge, so erzeugt sie drei verschieden starke Reize in den betreffenden Photorezeptoren. Diese Empfindlichkeitskurven sind von Mensch zu Mensch individuell unterschiedlich, so dass die drei Reize, die im Auge bei einer bestimmten Farbe mit dem Intensitätspektrum erzeugt werden, in verschiedenen Augen unterschiedliches Größenverhältnis zueinander haben können, also nicht ganz objektiv definierbar sind. Besonders deutlich wird dieses Phänomen bei der Farbblindheit (GRAßL 2001).

Die Wahrnehumg von Farben wird von den Komponenten Farbton, Sättigung und Helligkeit bestimmt, wobei der Farbton den stärksten Einfluß ausübt. Die Sättigung gibt die „Verdünnung“ des Farbtons durch Beimischung von Graustufen an. Diese beiden Parameter bilden gemeinsam die Farbart, die noch durch den dritten Parameter - die Helligkeit - beeinflusst wird. Das Farbsehen nutzt diese drei Qualitäten multiplikativ und erhält damit bis zu 1 Million Unterscheidungsmöglichkeiten (Tabelle 33; KLINKE und SILBERNAGL 1994).

Tabelle 33: ***Komponenten zur Wahrnehmung von Farben***

Farbtöne	ca. 200
Sättigungsstufen	26
Helligkeitsschritte	500

Die Abbildung 26 stellt schematisch den Mechanismus des Farbsehens dar.

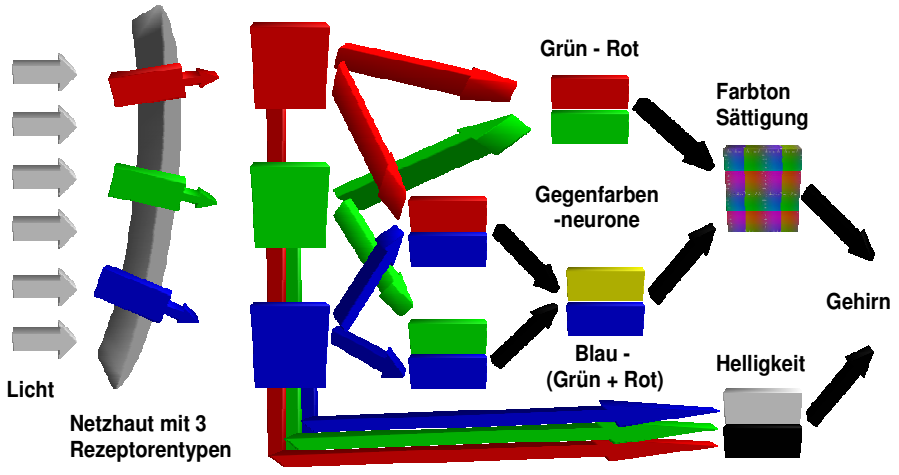


Abbildung 26: ***Mechanismus des Farbsehens***

3.2 Theorie der Farbanalyse

3.2.1 Farbsysteme

Seit über 2 600 Jahren befassen sich Menschen mit der Einordnung der Farben in bestimmte Farbsysteme und -modelle. Von einfachen, linearen Farbreihen bis zu komplizierten, graphischen Modellen in Form geometrischer Körper gibt es über 60 verschiedene Farbordnungen, die zu Farbsystemen zusammengefasst werden (WELSCH und LIEBMANN 2006).

3.2.1.1 Lineare zweidimensionale Farbmodelle

Die älteste Darstellung der Farben geht auf Aristoteles (384 – 322 v. Chr.) zurück. Seine Reihe der mittelgesättigten Farben beinhaltete Weiß, Gelb, Rot, Violett, Grün, Blau und Schwarz, geordnet nach ihrer Eigenhelligkeit. Nach Aristoteles würden alle Farben aus einer Mischung von Schwarz und Weiß entstehen. Alle auf dieser „Regenbogen-Theorie“ bis ins 17. Jahrhundert beruhenden Versuche stellten jedoch noch keine echten Farbtheorien dar, sondern bemühten sich vorrangig um eine Benennung von Grund- und Mischfarben (COLORSYSTEM "PYTHAGORAS; ARISTOTELES; PLATON"; WELSCH und LIEBMANN 2006).

3.2.1.2 Kreisförmige Farbmodelle

Bei einer Farbordnung geht es vornehmlich darum, die Farbbeschreibungen so zu präzisieren, dass alle Farbtöne ohne Abweichungen zuverlässig reproduziert werden könnten. Dazu legte Sir Isaac Newton 1704 einen völlig neuartigen Ansatz einer Farbtheorie vor, indem er den physikalisch-mathematischen Beweis für die Entstehung der Farben bestimmter Wellenlänge durch die Brechung des Sonnenlichts erbrachte (Kapitel 3.1.1). Von ihm wurden die bis heute gültigen Regeln der additiven Farbmischung begründet und die Ordnung der Farben entsprechend ihrer Eigenhelligkeit verlassen. Seine kreisförmige Anordnung beinhaltet die Spektralfarben: Violettblau, Ultramarinblau, Cyanblau, Grün, Gelb, Orange, Rot ohne Schwarz und Weiß. Damit werden die Darstellung der Übergänge zwischen benachbarten Farbtönen erleichtert und die Erfassung sowie der Vergleich der gegenüberliegenden Farbpaare entspre-

chend ihrer Wahrnehmung ermöglicht. Die auf der Farbtheorie von Newton basierenden Farbordnungsentwürfe ebneten schließlich den Weg für physikalisch begründete Farbmodelle (SILVESTRINI und FISCHER 2002; WELSCH und LIEBMANN 2006).

3.2.1.3 Einfache dreidimensionale Farbmodelle

Der physikalisch-mathematische Ansatz Newtons und der Fortschritt bei der Erforschung der Physiologie des Farbsehens (trichromatische Theorie von Young, Helmholtz und Maxwel, vgl. Kapitel 3.1.3) führten zur Entwicklung von dreidimensionalen Farbmodellen (Farbkugel von Runge, Zylinder von Rood), welche die Vorläufer der heute üblichen Zylinder- und Doppelkegelmodelle darstellen. Diese Farbkörper krankten jedoch daran, dass sich kein einigermaßen gleicher Abstand der Buntfarben zu den beiden Unbuntfarben Schwarz und Weiß ergab (SILVESTRINI und FISCHER 2002; WELSCH und LIEBMANN 2006).

3.2.1.4 Wahrnehmungsorientierte und farbmetrische Modelle

Ende des 19. und im 20. Jahrhundert kam es zu neuen physiologischen Erkenntnissen, die ihren Ausdruck in der Gegenfarbentheorie von Hering (Kapitel 3.1.3) fanden. Eine wichtige Neuerung für die zukünftigen Modelle war die Gruppierung der sechs Grundfarben in drei „physiologischen Gegenfarbpaare“, die dem CIE-L*a*b-Modell zugrunde liegen. Es wurden unverwechselbare und weltweit verständliche Benennungen von Farben eingeführt sowie ihre Zuweisung zu einem genau definierten Farbort vollzogen. Als mathematische Orientierungspunkte dienten hierzu die drei Farbeigenschaften: Farbton (hue), Sättigung (saturation/chroma) und Helligkeit (value/lightness), deren nähere Bedeutung Tabelle 34 vermittelt.

Tabelle 34: ***Farbeigenschaften nach Munsell***

Farbeigenschaft	***Bedeutung***	***Beispiel***
Farbton	einzelne von einem normal farbsichtigen Betrachter unterscheidbaren Farben	Rot - Blau
Sättigung	Empfindung einer Farbe unter verschiedenen Beleuchtungsverhältnissen	blass – leuchtend, grell
Helligkeit	Aufhellung einer Farbe durch Beimischung von Weiß und Abdunklung durch Beimischung von Schwarz	hell - dunkel

Mit diesem von Munsell entwickelten Farbmodell wurde zum ersten Mal die visuelle Gleichabständigkeit der Farben angestrebt. Darauf gestützt veröffentlichte die „Commision Internationale de L'Eclairage“ (CIE) im Jahr 1931 das erste bedeutende, farbmetrische Modell (Abbildung 27). Der veränderten Fassung dieses Systems von 1964 liegen Werte der Spektralkurven der drei primären Spektralfarben Rot, Grün und Blau für ein 10°-Gesichtsfeld und die Normlichtart D65 (Farbtemperatur von 6 500° K) zugrunde. Aus der Berechnung dieser Werte ergibt sich die charakteristische, nach unten offene „CIE-Sohle“. Mit diesem CIE-Modell wurde erstmals ein mathematisch begründetes, wahrnehmungsorientiertes Farbmodell geschaffen, bei dem ein normal farbsichtiger Betrachter die Basiswerte für die primären Spektralvalenzen liefert (SILVESTRINI und FISCHER 2002; WELSCH und LIEBMANN 2006).

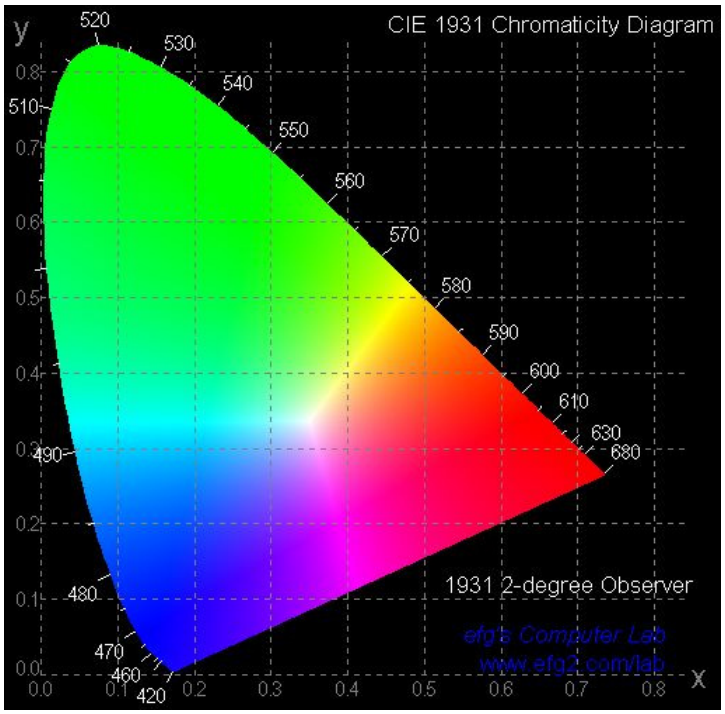


Abbildung 27: ***CIE-Modell*** *(Quelle: theo-phys.uni-essen.de)*

3.2.1.5 Additives Farbsystem: RGB

Das additive Mischungssystem charakterisiert die Wirkung unterschiedlicher Strahler. Dabei werden verschiedene bunte Lichtquellen so überlagert, dass Mischfarben entstehen. Bei Überlagerung aller drei Grundfarben in voller Sättigung entsteht die unbunte Farbe Weiß (Abbildung 28 links). Erlöschen aller Lichtquellen führt zur achromatischen Farbe Schwarz.

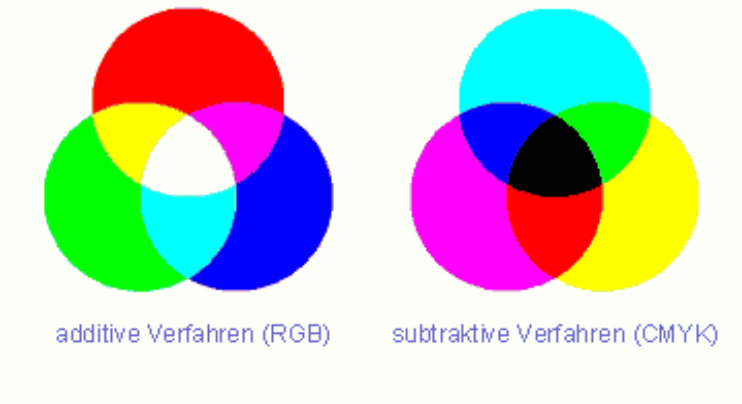


Abbildung 28: ***additive und substraktive Verfahren*** *(Quelle: www.at-mix.de)*

In dem RGB (Red/Green/Blue) – System liegen alle Farben auf einem kartesischen Koordinatensystem und können mit den digitalisierten Zahlenwerten 1 und O benannt werden (Abbildung 29).

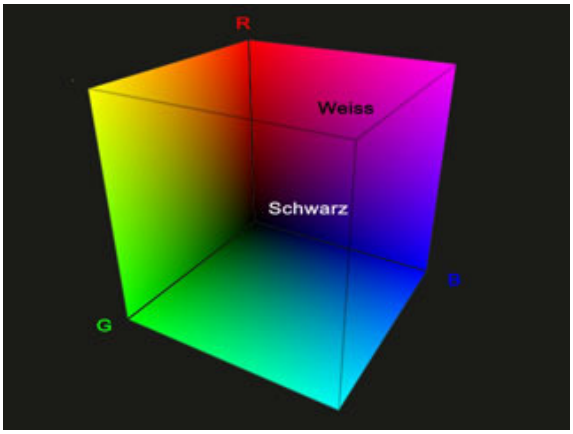


Abbildung 29: ***RGB-Farbsystem*** *(Quelle: www.dma.ufg.ac.at)*

Mit einem Zahlentripel (x-, y- und z-Achse) kann folglich jeder einzelne Farbton beschrieben werden. Dieses Modell kann durch weitere Unterteilung der Hauptachsen mittels einer 256-teiligen Skala theoretisch 16,7 Millionen Farbtöne darstellen. Die TV- und Computermonitore enthalten mehrere Hunderttausend ca. 0,2 mm große Punkte mit phosphoreszierenden Molekülen, die bei einer durch Elektronenstrahlen ausgelösten Reizung entweder rotes, grünes oder blaues Licht aussenden. Durch die unterschiedliche Stärke des Elektronenstrahls kann die Helligkeit der Farbe geregelt werden. Da das menschliche Auge die winzigen Farbpunkte einzeln nicht erkennt, werden die RGB–Triaden vom Sehapparat zu allen möglichen Farbtönen partitiv gemischt. Der Nachteil des RGB-Systems ist seine Abhängigkeit von dem ausgebenden Gerät, so dass die Farben von Apparat zu Apparat unterschiedlich ausfallen können (KÜPPERS 2005; WELSCH und LIEBMANN 2006).

3.2.1.6 Substraktives Farbsystem: CMYK

Beim substraktiven Mischungssystem entstehen aus den primären Pigmentfarben (Cyan, Magenta und Gelb/yellow) alle möglichen reflektierten Farbtöne, die so genannten Körperfarben. Vom belichteten Gegenstand werden einige Farbanteile absorbiert und nur die restlichen Farbtöne reflektiert. Verringern oder Ausblenden der Anteile einer Grundfarbe lässt die anderen Farben deutlicher hervortreten, Verstärken schwächt ihre Wirkung ab (Abbildung 28 rechts). Die unbunte Farbe Weiß entsteht durch Auslassen aller drei Pigmentfarben, was einer vollständigen Absorption des auftreffenden Lichts gleichkommt. Da reines Schwarz durch Mischung aller drei Hauptfarben aufgrund von Unreinheiten des Cyans nicht zu erreichen ist, muss es beim Drucken als vierte Farbe zugegeben werden (K = „key“).

Beim CMYK – Farbwürfel können alle möglichen Farbtöne ebenfalls mit Zahlentripeln beschrieben werden (Abbildung 30). Die Umrechnung vom RGB zu CMYK, die vor dem Druck computergestützt durchgeführt wird, ist in der Formel 3.2 dargestellt (KÜPPERS 2005; WELSCH und LIEBMANN 2006).

$$\begin{aligned} C &= 1 - R \\ M &= 1 - G \\ Y &= 1 - B \end{aligned} \tag{3.2}$$

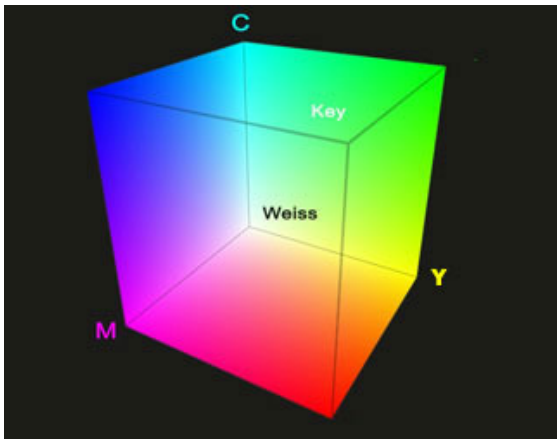


Abbildung 30: ***CMYK-Farbsystem*** *(Quelle: www.dma.ufg.ac.at)*

3.2.2 HSV/HSI-Farbsystem

In Zusammenhang mit der Entwicklung der Fernsehtechnologie wurden auf der Grundlage der Farbordnung von Munsell (Kapiel 3.2.1.4) weitere Farbsysteme entwickelt, die einen Kompromiss zwischen der rein numerischen und der perzeptuellen Farbskala bieten. Bei dem dreidimensionalen, 1978 von Alvy Ray Smith eingeführten, HSV–Farbraum werden Farben an der menschlichen Wahrnehmung orientiert mit den drei Parametern Hue (Farbton), Saturation (Sättigung) und Value (Grauwert) beschrieben. Wie Abbildung 31 entnommen werden kann, ist in dem visuell-zylindrisch dargestellten Farbmodell der Parameter Farbton auf einem Kreis angeordnet, während die Parameter Sättigung und Grauwert in den beiden anderen Ebenen zu finden sind. Die Tabelle 35 fasst die Eigenschaften der drei Parameter des HSV – Farbraums zusammen (WIKIPEDIA "HSV-Farbraum"; COLORSYSTEM "HLS-System").

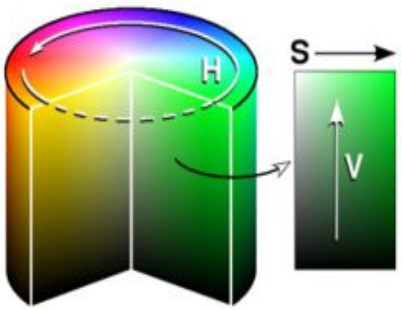
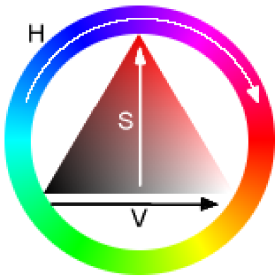


Abbildung 31: ***HSV-Farbsystem*** *(Quelle: www.wikipedia.de)*

Tabelle 35: **Eigenschaften der drei Parameter des HSV-Farbsystems**

Farbton (Hue)	***Sättigung (Saturation)***	***Grauwert (Value)***
Farbwinkel **H** spezifiziert die dominante Wellenlänge der Farbe  (Quelle: www.wikipedia.de)	Sättigung **S** entspricht der Zumischung von purem Weiß zu einer monochromatischen Spektralfarbe = Verteilung der Frequenzen um die dominante Wellenlänge herum	Grauwert **V** entspricht dem Gesamtenergiegehalt = der maximalen Amplitude des Lichts
0°/360° = Rot 120° = Grün 240° = Blau	0 % = keine Farbe 50 % = ungesättigte Farbe 100 % = gesättigte Farbe	0 % = keine Helligkeit 100 % = volle Helligkeit

Die Werte des wahrnehmungsorientierten HSV–Farbsystems können in die farbmetrischen RGB–Werte über Umrechnungsformeln (nach Travis / Foley und Van Dam) transformiert werden (Tabelle 36, Abbildung 32, WIKIPEDIA "HSV-Farbraum").

Tabelle 36: ***Gegenüberstellung des HSV- und RGB-Farbsystems***

Farbe	***H***	***S***	***V***	***R***	***G***	***B***
Schwarz	-	-	0 %	0	0	0
Weiß	-	0 %	100 %	1	1	1
Rot	0° = 360°	100 %	100 %	1	0	0
Grün	120°	100 %	100 %	0	1	0
Blau	240°	100 %	100 %	0	0	1

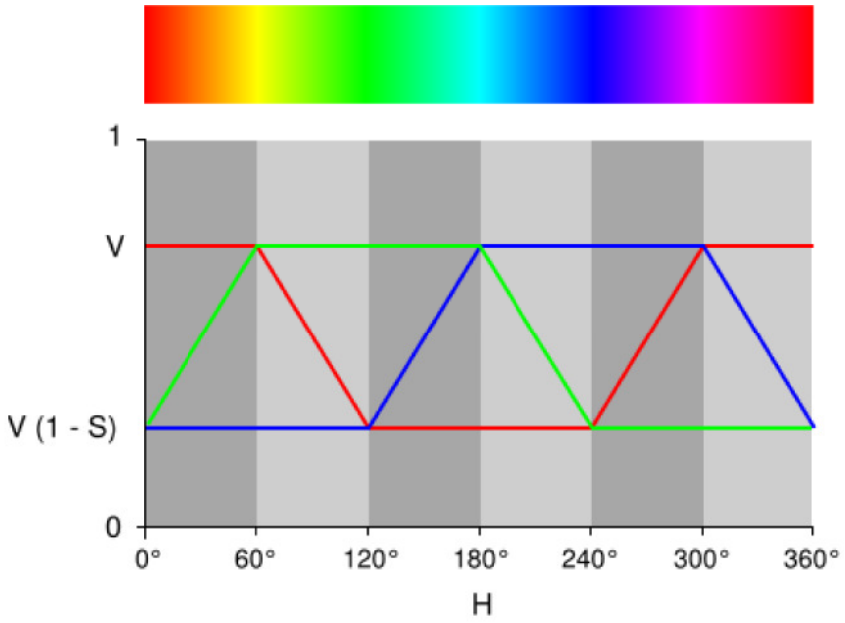


Abbildung 32: ***Gegenüberstellung des HSV- und RGB- Farbsystems***
(Quelle: www.wikipedia.de)

Eine Weiterentwicklung des HSV–Farbmodells bildet der HSI–Farbraum. Während beim HSV der Parameter Grauwert/Value vom Schwarz bis zu dem jeweiligen Farbton reicht, deckt der Parameter Intensität des HSI – Farbsystems das ganze Spektrum der Intensität vom Schwarz über den jeweiligen Farbton bis zum Weiß ab. Dieser Vorteil einer Symmetrie „zwischen der Helligkeit und der Dunkelheit“, der Farbpräzisierung des HSI–Systems, wird vom World Wide Web Consortium bestätigt. Farbwerte aus dem HSI-Farbraum können ebenfalls über Umrechnungsformeln (nach Gonzalez und Woods) in RGB–Werte transformiert werden (WIKIPEDIA "HSV-Farbraum"; WIKIPEDIA "HSI color space").

3.2.3 Software

Die, bei den in den nachfolgenden Kapiteln vorgestellten Analyseverfahren, angewendete Software analySIS® FIVE auto stammt aus dem Haus Olympus Soft Imaging Solutions (ehemals Soft Imaging System GmbH). Das Software-Paket ermöglicht u.a. die digitale Bildaufnahme, Bildbearbeitung, Analyse, Datenbank-Archivierung und Ergebnis-Dokumentation (HANDBUCH "Schritt für Schritt analySIS®" 2004).

3.2.4 Phasenanalyse

Phasenanalyse bezeichnet die quantitative Flächenauswertung von verschiedenen Farbwertbereichen. Die Definition der Objekte (als Beispiel rotes Quadrat, Abbildung 33), deren Flächen summiert werden sollen, erfolgt durch die Präzisierung der Phasen, welche die Farbwertbereiche eben dieser Objekte umfassen (HANDBUCH "Messen" 2001).

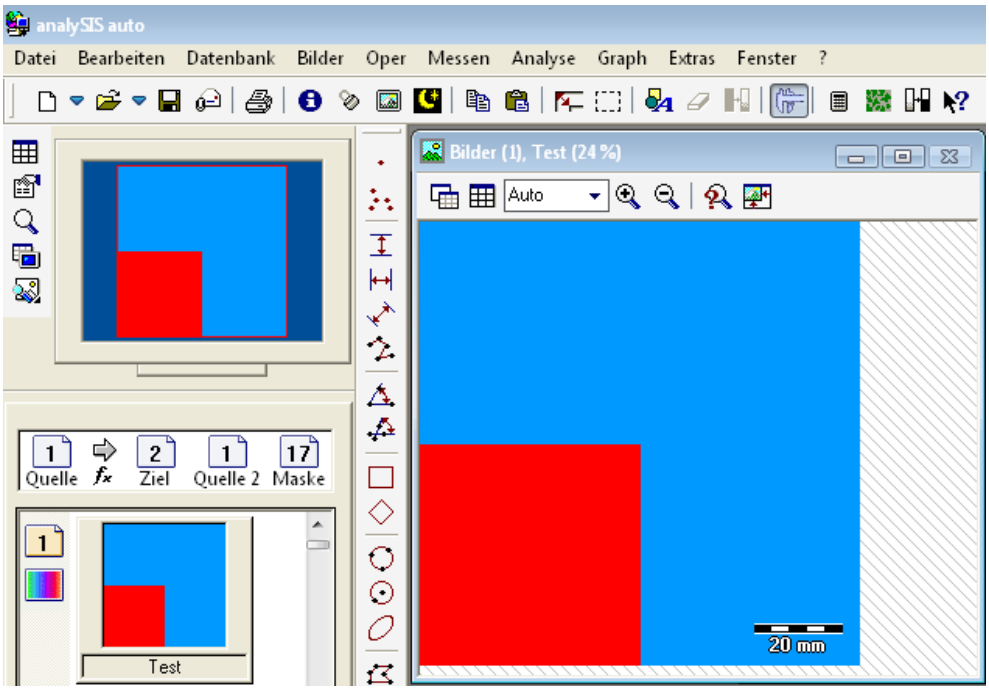


Abbildung 33: ***Skizze „rotes Quadrat“*** *(analySIS®)*

Bei Echtfarbbildern werden die unteren und oberen Farbschwellwerte für die drei Parameter des jeweiligen Farbsystems (HSI oder RGB) festgelegt (als Beispiel HSI mit Farbe, Sättigung und Intensität, Abbildung 34) und somit einer Farbphase zugewiesen (Phase „Rot“, schwarz markiert, Abbildung 35). Als Alternative können Farbphasen interaktiv im Bild definiert werden, indem der Pixelbereich des zu messenden Areals visuell bestimmt und manuell markiert wird. Der Flächeninhalt von Farbbereichen, die keiner Phase zugeordnet sind, wird nicht berechnet (HANDBUCH "Messen" 2001).

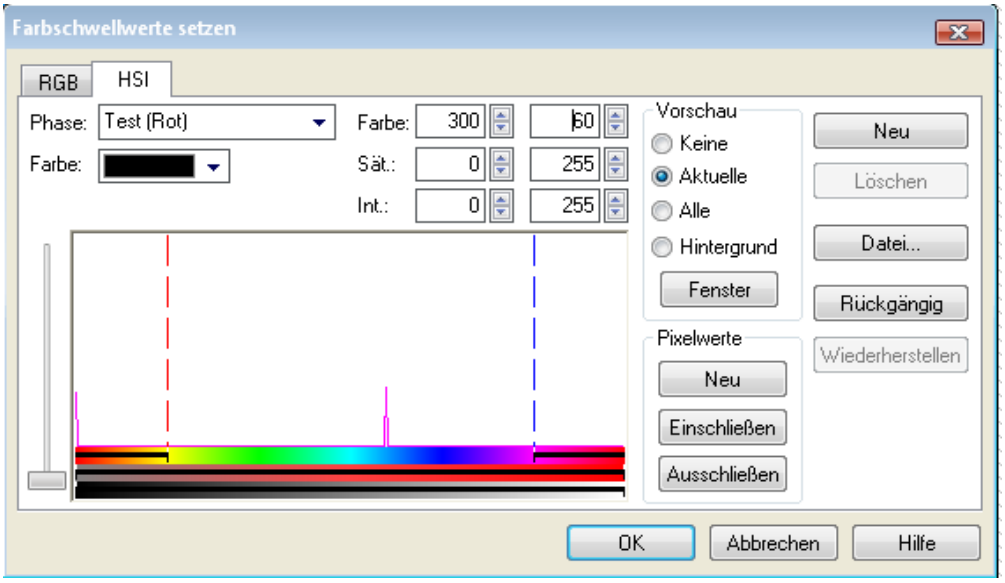


Abbildung 34: ***Festlegung der Farbschwellwerte*** *(analySIS®)*

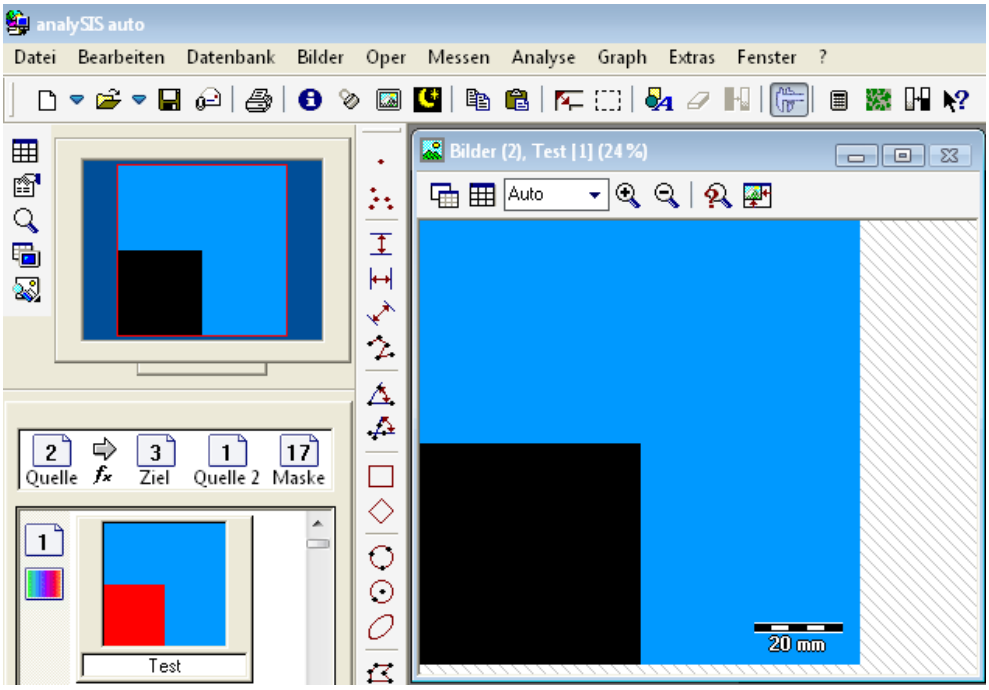


Abbildung 35: ***Diskriminierung der roten Fläche*** *(analySIS®)*

Nach der Messung der zugehörigen Flächen wird eine Messtabelle mit den absoluten Flächen und dem prozentualen Flächenanteil jeder Phase am Gesamtbild, bzw. am Bildausschnitt erzeugt (Abbildung 36; HANDBUCH "Messen" 2001).

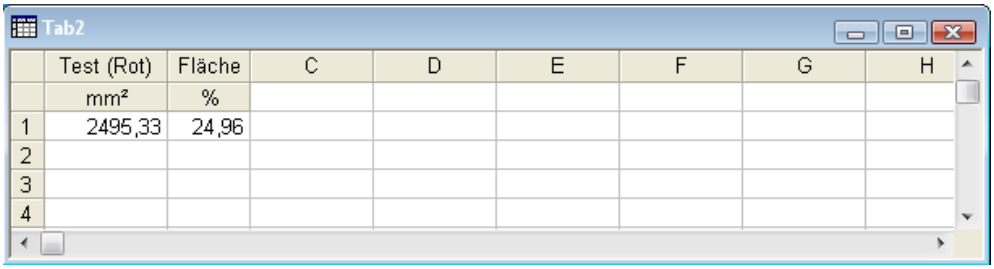


Abbildung 36: ***Messergebnis der roten Fläche*** *(analySIS®)*

3.2.5 Partikelanalyse

Bei der Partikelanalyse werden die sich auf einem Bild oder Bildausschnitt befindenden Partikel von der Software nach dem Kriterium Farbwert automatisch erkannt und vermessen. Für eine erfolgreiche Partikelanalyse müssen sich die Teilchen deutlich vom Untergrund abheben (Abbildung 37; HANDBUCH "Schritt für Schritt analySIS®" 2004).

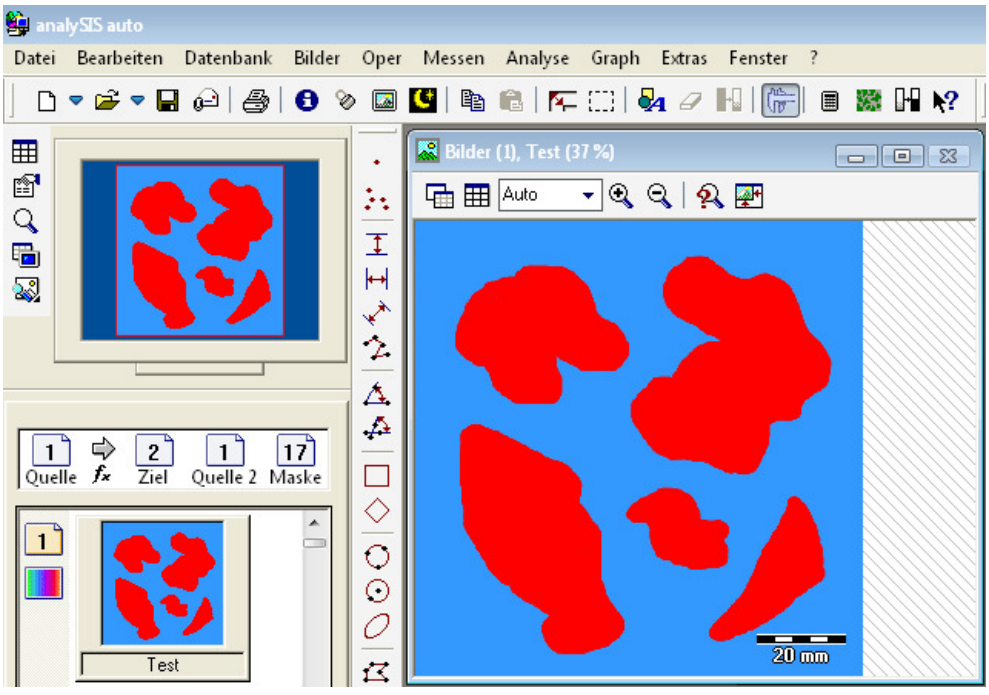


Abbildung 37: ***Partikelskizze*** *(analySIS®)*

Zunächst werden analog zur Phasenanalyse (Kapitel 3.2.4) Farbschwellwerte gesetzt, innerhalb derer die Partikel detektiert werden sollen (Abbildung 38). Vor der Detektion werden Detektionsparameter, wie z.B. minimale Pixelgröße und Einbeziehung oder Abschneiden von Randpartikeln, definiert (Abbildung 39).

Gegebenenfalls kann auch eine Klassifikation der Partikel vorgegeben werden (HANDBUCH "Schritt für Schritt analySIS®" 2004).

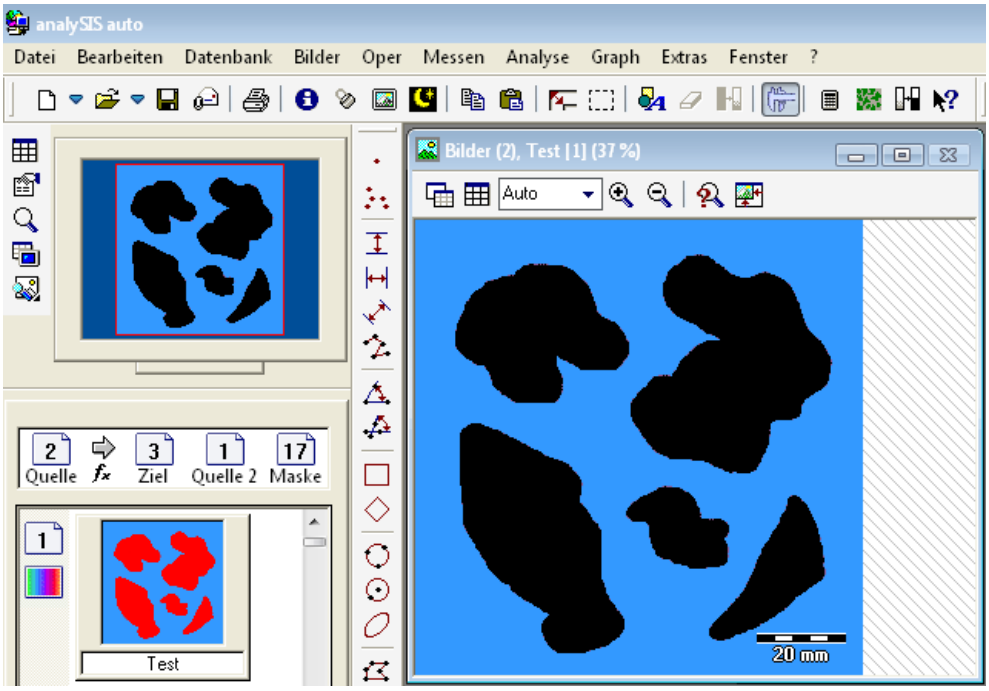


Abbildung 38: ***Diskriminierung der Partikel*** *(analySIS®)*

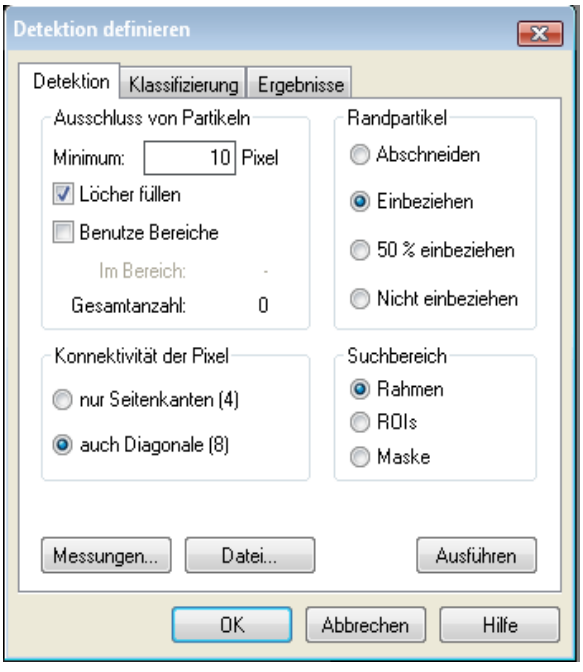


Abbildung 39: ***Detektionseinstellungen*** *(analySIS®)*

Im letzten Schritt sind Messparameter wie z.B. Partikelflächen oder Equivalent Circle Diameter auszuwählen, über welche die detektierten Objekte vermessen werden sollen (Abbildung 40; HANDBUCH "Schritt für Schritt analySIS®" 2004).

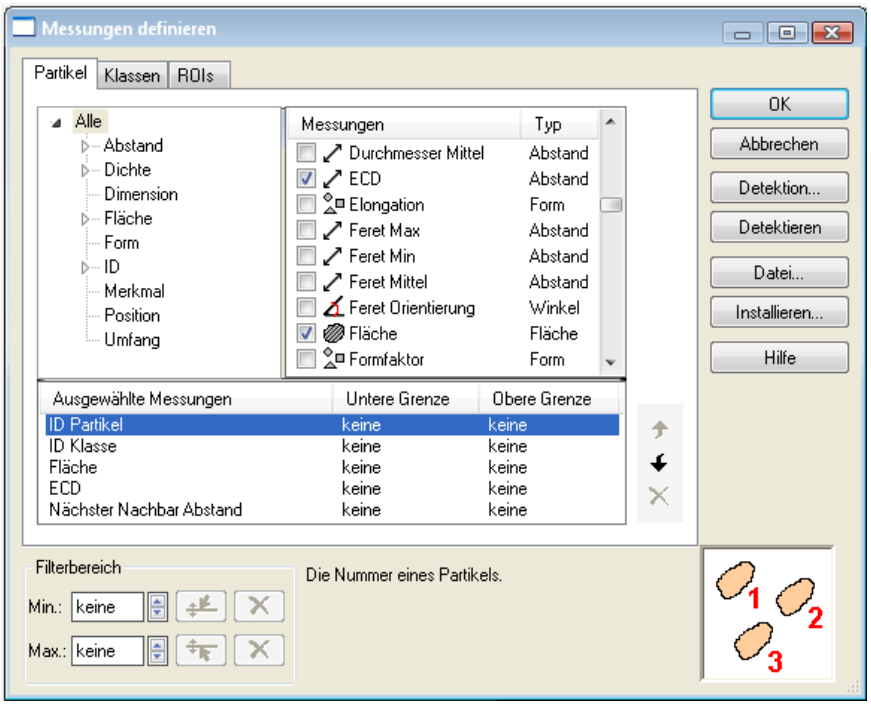


Abbildung 40: ***Messparameter*** *(analySIS®)*

Nach der Partikeldetektion (Abbildungen 41 - 44) wird eine Messtabelle mit der Anzahl der Partikel, den vorgegebenen Messparametern und ggf. den definierten Klassen erzeugt (Abbildung 45; HANDBUCH "Schritt für Schritt analySIS®" 2004).

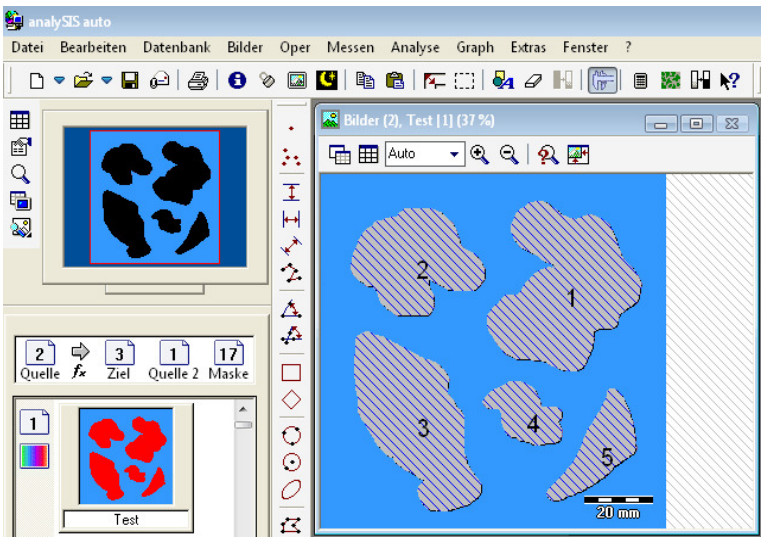


Abbildung 41: ***digitale Partikelzählung*** *(analySIS®)*

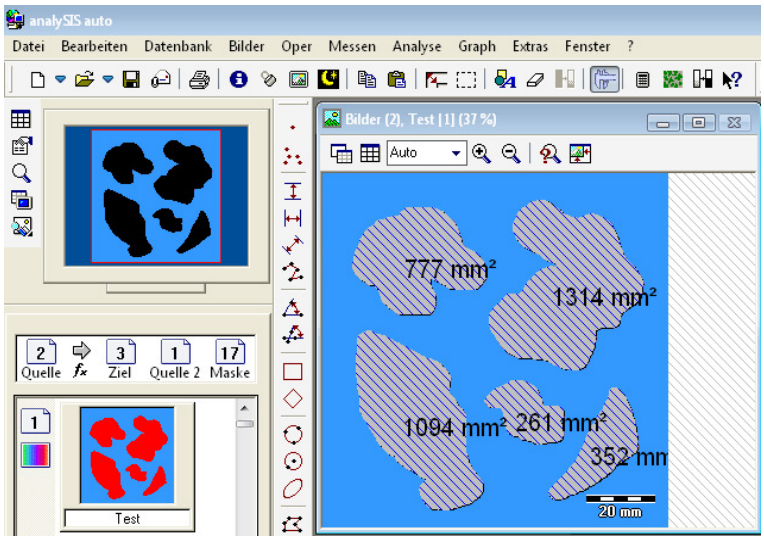


Abbildung 42: ***Messung der Partikelflächen*** *(analySIS®)*

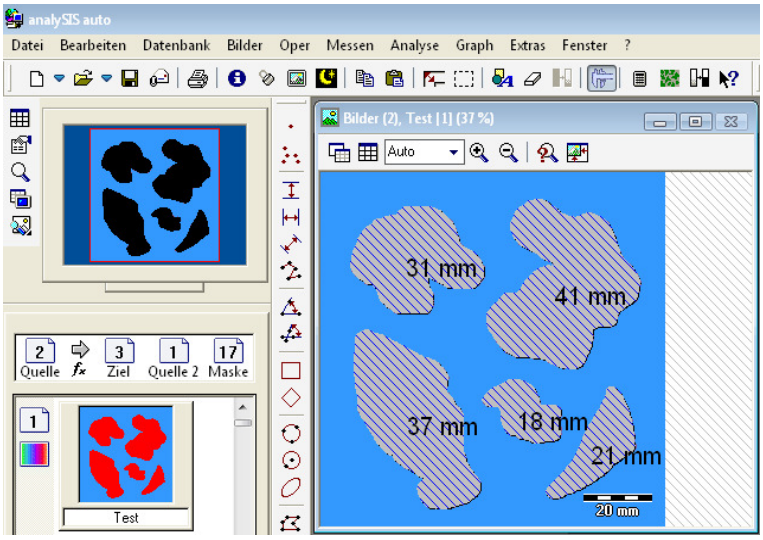


Abbildung 43: ***Messung der Partikel-Equivalent Circle Diameter*** *(analySIS®)*

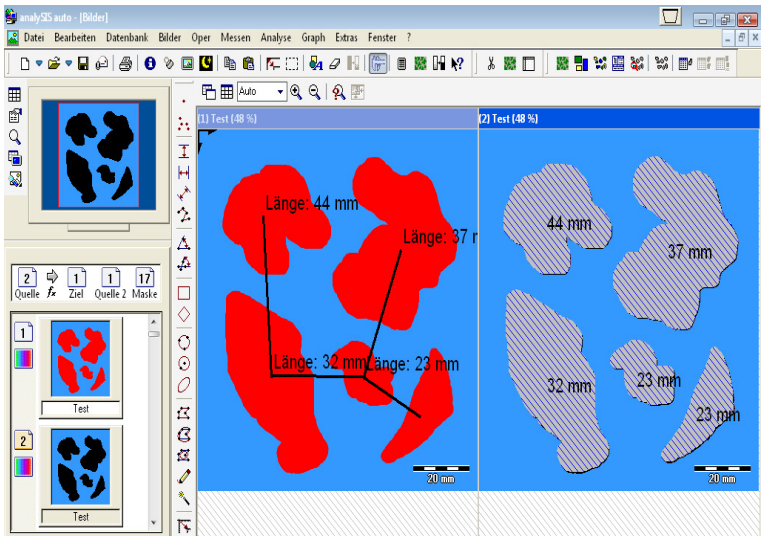
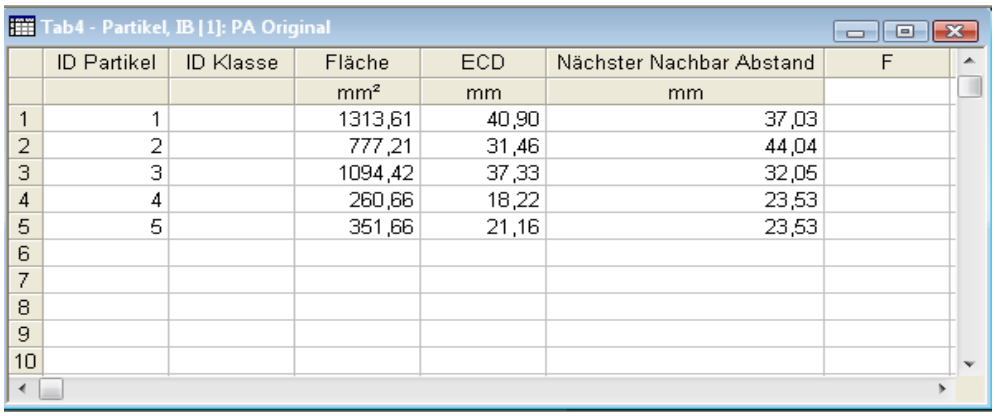


Abbildung 44: ***Messung der nächsten Abstände zum Nachbarpartikel*** *(analySIS®)*



Tab4 - Partikel, IB [1]: PA Original

	ID Partikel	ID Klasse	Fläche	ECD	Nächster Nachbar Abstand	F
			mm²	mm	mm	
1	1		1313,61	40,90	37,03	
2	2		777,21	31,46	44,04	
3	3		1094,42	37,33	32,05	
4	4		260,66	18,22	23,53	
5	5		351,66	21,16	23,53	
6						
7						
8						
9						
10						

Abbildung 45: ***Ergebnistabelle*** *(analySIS®)*

4 Eigene Untersuchungen

4.1 Material

4.1.1 Probenart und -herkunft

Das Probenmaterial bestand aus insgesamt 35 Putenseparatorenfleischproben, davon 15 Kolbenseparaten (Abbildung 46) und 20 Rotationsseparaten (Abbildung 47). Die Proben wurden in vier Putenschlachtbetrieben jeweils 5 mal aus der laufenden Tagesproduktion entnommen.

Abbildung 46: ***Kolbenseparat***

Abbildung 47: ***Rotationsseparat***

4.1.2 Probennahme und -transport

Die Probennahme erfolgte in 30 Fällen durch den Autor. In einem Fall (5 Proben) wurde die Beprobung durch das für das Qualitätsmanagement des Schlachthofs zuständige Personal durchgeführt. Der Transport des Probenmaterials zum Institut erfolgte unmittelbar nach der jeweiligen Probennahme in Kühlboxen und dauerte nicht länger als 6 Stunden. Die fünf nicht selbst entnommenen Proben wurden durch eine Transportfirma am darauf folgenden Tag styroporverpackt im Institut angeliefert. Die Eingangstemperatur der Proben lag zwischen 2° und 7° C. Alle Proben wurden nach dem Eintreffen im Institut in einem Kühlschrank mit der Grenztemperatur von 2°C gelagert, bis am darauf folgenden Tag mit der mikrobiologischen Untersuchung sowie der histologischen und chemischen Aufbereitung begonnen wurde.

4.1.3 Probenübersicht

Als Ausgangsmaterialien wurden zur Herstellung von Putenseparatorenfleisch hauptsächlich Putenkarkassen, in 5 Fällen ausschließlich Putenhälse verwendet. Die 15 Kolbenseparate wurden mittels der Geräte der Firma Stork Protecon® produziert. Die restlichen 20 Proben waren Rotationsseparate und wurden mit Lima®-Separatoren sowie in 5 Fällen mit dem Simo®-System gewonnen. Die Tabelle 37 gibt eine Übersicht der Aufteilung des Probenmaterials nach Probenart, Ausgangsmaterial und Separatorentyp.

Tabelle 37: ***Probenübersicht***

Lfd. Nummer	***Probenart und -nummer***	***Ausgangsmaterial***	***Separatorentyp***
1	Kolbenseparat (Pute) 1	Putenhälse	Stork Protecon®
2	Kolbenseparat (Pute) 2	Putenhälse	Stork Protecon®
3	Kolbenseparat (Pute) 3	Putenhälse	Stork Protecon®
4	Kolbenseparat (Pute) 4	Putenhälse	Stork Protecon®
5	Kolbenseparat (Pute) 5	Putenhälse	Stork Protecon®

Lfd. Nummer	*Probenart und -nummer*	*Ausgangsmaterial*	*Separatorentyp*
6	Kolbenseparat (Pute) 6	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®
7	Kolbenseparat (Pute) 7	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®
8	Kolbenseparat (Pute) 8	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®
9	Kolbenseparat (Pute) 9	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®
10	Kolbenseparat (Pute) 10	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®
11	Kolbenseparat (Pute) 11	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®
12	Kolbenseparat (Pute) 12	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®
13	Kolbenseparat (Pute) 13	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®
14	Kolbenseparat (Pute) 14	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®
15	Kolbenseparat (Pute) 15	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®
16	Rotationseparat (Pute) 1	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®
17	Rotationseparat (Pute) 2	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®
18	Rotationseparat (Pute) 3	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®
19	Rotationseparat (Pute) 4	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®
20	Rotationseparat (Pute) 5	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®
21	Rotationseparat (Pute) 6	Putenkarkassen	Lima®

Lfd. Nummer	*Probenart und -nummer*	*Ausgangsmaterial*	*Separatorentyp*
22	Rotationseparat (Pute) 7	Putenkarkassen	Lima®
23	Rotationseparat (Pute) 8	Putenkarkassen	Lima®
24	Rotationseparat (Pute) 9	Putenkarkassen	Lima®
25	Rotationseparat (Pute) 10	Putenkarkassen	Lima®
26	Rotationseparat (Pute) 11	Putenkarkassen	Lima®
27	Rotationseparat (Pute) 12	Putenkarkassen	Lima®
28	Rotationseparat (Pute) 13	Putenkarkassen	Lima®
29	Rotationseparat (Pute) 14	Putenkarkassen	Lima®
30	Rotationseparat (Pute) 15	Putenkarkassen	Lima®
31	Rotationseparat (Pute) 16	Putenkarkassen	Simo®
32	Rotationseparat (Pute) 17	Putenkarkassen	Simo®
33	Rotationseparat (Pute) 18	Putenkarkassen	Simo®
34	Rotationseparat (Pute) 19	Putenkarkassen	Simo®
35	Rotationseparat (Pute) 20	Putenkarkassen	Simo®

4.1.4 Referenzmaterial zur qualitativen histologischen Untersuchung

Um die bei der qualitativen histologischen Untersuchung in den Separaten auftretenden Gewebsarten und Organsysteme einordnen zu können, wurden als Referenzmaterial eine männliche und eine weibliche Putenkarkasse aus dem laufenden Schlachtbetrieb entnommen und zur Untersuchung herangezogen.

4.2 Methodik

4.2.1 Histologische Untersuchung

Die histologische Aufbereitung, Schneiden und Färbung der Proben erfolgten in Anlehnung an die Routineverfahren zur qualitativen und quantitativen histologischen Untersuchung der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs (L13 06.00; AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB).

4.2.1.1 Materialien

a. Reagenzien

- Formaldehyd-Lösung 10%
- Alkoholreihe: Ethanol 70%, 80%, 90%, 96%, 98%
- Intermedium: Xylol
- Einschlußmittel: Cytoseal™XYL, Microm International GmbH
  Consul-Mount®, Thermo Electron Corporation
- Eiweißglycerin

  1g Eialbumin

  5ml Aqua dest

  10ml Glycerin

- Pikrinsäure-Alizarin-S-Lösung:

  3g Pikrinsäure in 250 ml Aqua dest.

  2,5g Alzarin-S-Lösung in 250 ml Aqua dest.

  Beide Lösungen wurden vermischt, mit NaOH auf pH 4,3 bis 4,5 eingestellt und nach zweistündigem Stehenlassen filtriert.

- Indigocarmin-Lösung

  1,25g Indigokarmin

  500ml Aqua dest.

- 100ml Essigsäure 1%

- Silbernitrat-Lösung

  5g Silbernitrat

  100ml Aqua dest.

- Pyrogallol-Lösung

  1g Pyrogallol kristallisiert

  100ml Ethanol 96%

- Kaliumpermanganat-Lösung

  0,25g Kaliumpermanganat

  100ml Aqua dest.

  Das Kaliumpermanganat wurde in Wasser vollständig gelöst und anschließend filtriert.

- Fixiermittel

  Tetenal Eukospeed Superfix 2000®, Tetenal Photowerk GmbH & Co. KG

- Orange G-Lösung

  2g Orange G

  100ml Aqua dest.

  8ml Essigsäure 96%

  Das Orange G wurde mit Wasser zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen filtriert. Anschließend wurden 8 ml Essigsäure zugefügt.

- Kernechtrot-Lösung

  97,4g Aluminiumsulfat

  1,0g Kernechtrot

  Wasser zum Auffüllen auf 1000ml

- Pikro-Indigo-Lösung

  3,3g Indigokarmin

  12,0g angefeuchtete Pikrinsäure

  1000ml Aqua dest.

b. Geräte

- Pathcentre®, Thermo Shandon GmbH
- Ausgießstation, Sakura Bayer Diagnostics
- Schlittenmikrotom, Reichert-Jung GmbH
- Färbeautomat, Varistain Gemini, Thermo Shandon GmbH
- Eindeckautomat, Consul, Thermo Shandon GmbH

c. Hardware

- Mikroskop, BH-2, Olympus Deutschland GmbH
- Scanningtisch, Scan 100x100 mit Fokusantrieb M F D, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG
- Tischsteuerung, Corvus-3, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG
- Farbdigitalkamera, SIS CIC-12, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH
- Computer Intel Pentium 4 CPU, 2,533 GHz Taktrate, 512 MB DDR-RAM, 128 MB ATI AGP-Grafikkarte, 80 GB Festplatte

d. Software

- analySIS® FIVE auto, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH
- Microsoft-Excel®

4.2.1.2 Probenaufbereitung

Die Proben wurden ohne Entfettungsschritt 24 Stunden im 10% Formaldehyd fixiert, zugeschnitten, in Tissue-Tec®-Einbettkasetten verbracht und verschlossen. Die Entwässerung der Proben über die aufsteigende Alkoholreihe und Paraffinierung des Gewebes erfolgten 14 Stunden lang im Pathcentre®. Danach wurden die Proben in flüssigem Paraffin ausgegossen und auf einer Kühlplatte in Form von Blöcken zum Erstarren gebracht.

4.2.1.3 Schneiden der Proben

Von den hergestellten Blöcken wurden auf einem Schlittenmikrotom der Firma Reichert -Jung mit eingestellter Schichtdicke von 10 - 12 µm Präparate geschnitten, auf mit Eiweißglycerin beschichtete Objektträger aufgezogen und auf einer Heizplatte gestreckt. Anschließend wurden die Objektträger mit jeweils zwei Präparaten 24 Stunden im Brutschrank bei 60°C getrocknet.

4.2.1.4 Färben der Proben

Vor dem Färbevorgang wurden die Präparate 10 Minuten lang mit Xylol behandelt und über die absteigende Alkoholreihe entparaffiniert.

a. Alizarin-S

Die Trichromfärbung mit Pikrinsäure-Alizarin-S und Indigocarmin (PFEIFFER et al. 1975) erfolgte manuell nach dem in der Tabelle 38 dargestellten Färbeschema.

Tabelle 38: ***Färbeschema Alizarin S***

Zeit	***Färbeschritt***
	Essigsäure 1%
	Aqua dest.
5 Minuten	Pikrinsäure-Alizarin S-Lösung
	Aqua dest.
2,5 Minuten	Indigokarmin-Lösung
	Aqua dest.
	aufsteigende Alkoholreihe
10 Minuten	Xylol

Für das Rotationsseparat zeigt Abbildung 48 einen beispielhaften histologischen Schnitt.

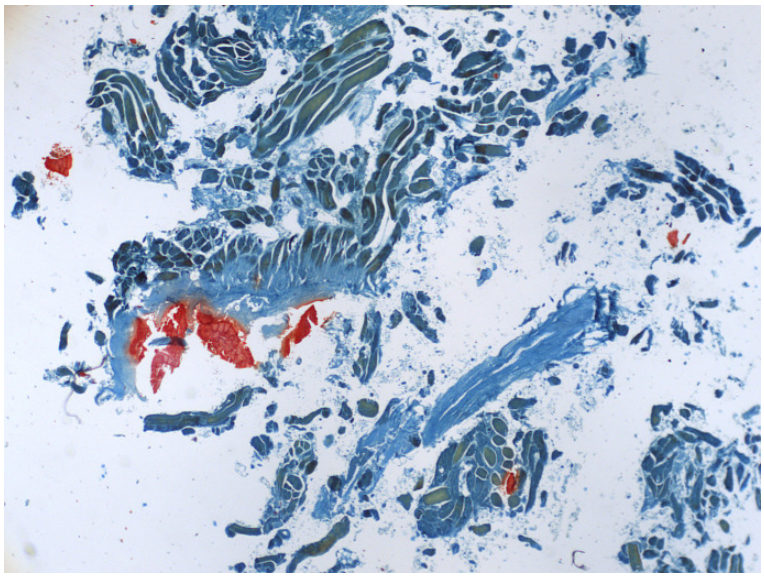


Abbildung 48: ***mit Alizarin S gefärbtes Rotationseparat, 2x (Objektivvergrößerung)***

b. Kossa

Die Tabelle 39 fasst die manuell durchgeführten Färbeschritte der Silbernitratimprägnierung nach KOSSA in der Modifikation nach KÖNIGSMANN (1978) ohne Kollodiumbeschichtung (Abbildung 49), die zur Überprüfung der Eignung dieser Tinktur zur phasenanalytischen Bestimmung bei fünf Rotationseparaten durchgeführt wurde, zusammen.

Tabelle 39: ***Färbeschema Kossa***

Zeit	***Färbeschritt***
10 Minuten	Silbernitrat-Lösung unter Beleuchtung mit 60 Watt Glühbirne
	Aqua dest.
4 Minuten	Pyrogallol-Lösung
	Aqua dest.
6 Minuten	Kaliumpermanganat-Lösung
	Aqua dest. bis zur Klarheit des ablaufenden aqua dest.
15 Minuten	Fixiermittel
10 Minuten	fließendes Leitungswasser
5 Minuten	Orange G-Lösung
2 Minuten	Ethanol 96%
2 Minuten	Ethanol 98%
10 Minuten	Xylol

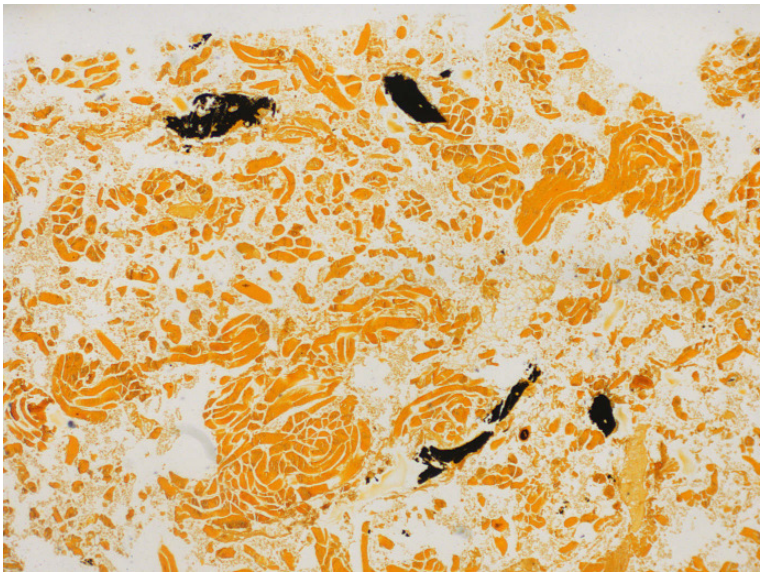


Abbildung 49: ***nach Kossa gefärbtes Rotationsseparat, 2x (Objektivvergrößerung)***

c. Calleja

Die Färbung nach CALLEJA (1897) wurde nach der in der in der Tabelle 40 dargestellten Reihenfolge automatisch im Färbeautomaten der Firma Thermo Shandon GmbH durchgeführt (Abbildung 50).

Tabelle 40: ***Färbeschema Calleja***

Zeit	***Färbeschritt***
55 Minuten	Kernechtrot-Lösung
	Aqua dest.
1 Stunde	Pikro-Indigo-Lösung
	Aqua dest.
	aufsteigende Alkoholreihe
10 Minuten	Xylol

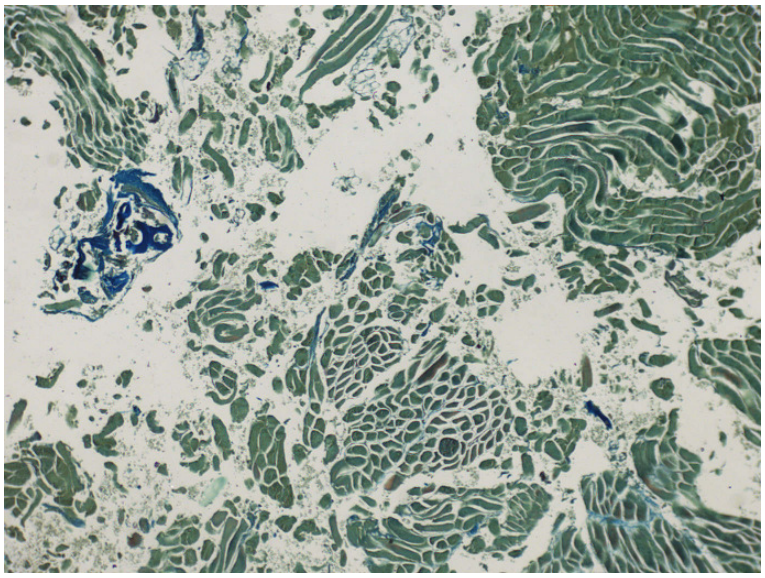


Abbildung 50: ***nach Calleja gefärbtes Rotationsseparat, 2x (Objektivvergrößerung)***

4.2.1.5 Eindecken der Proben

Die gefärbten Präparate wurden zum Teil im Eindeckautomaten Consul der Firma Thermo Shandon GmbH automatisch mit Consul-Mount®, zum Teil manuell mit Cytoseal™XYL eingedeckt.

4.2.1.6 Überprüfung der Richtigkeit und der Wiederholbarkeit des phasenanalytischen Verfahrens

In einem Vorversuch zur Überprüfung der Eignung des Verfahrens wurde in Anlehnung an das Erscheinungsbild der Alizarin S – Färbung eine einfache Zeichnung angefertigt, bei der ein rotes Quadrat in einer blauen Fläche liegt. Die geometrische Figur wurde per Hand digital umrissen, mit Hilfe der Software die innerhalb des Umrisses vorhandene Fläche ermittelt und zur Ausschnittsgesamtfläche in Relation gesetzt. Parallel dazu wurde die Fläche des Quadrates im automatisierten Messprozess phasenanalytisch erfasst (Abbildung 51).

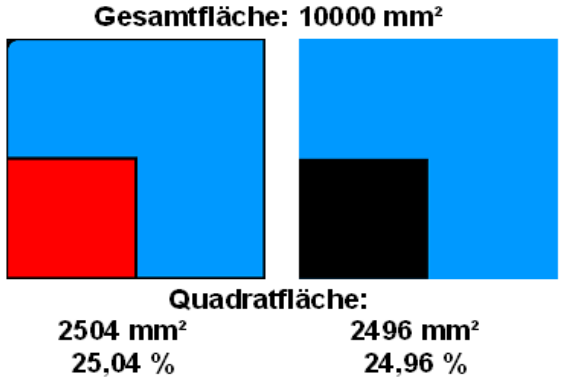


Abbildung 51: ***Vorversuch 1: links Fläche mit Hand umrissen, rechts automatisierte Phasenanalyse*** *(analySIS®)*

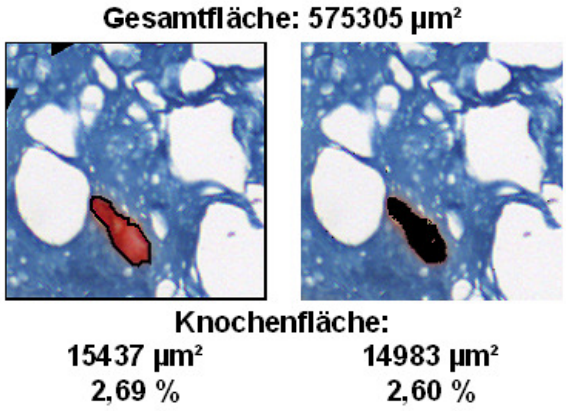


Abbildung 52: ***Vorversuch 2: links Fläche mit Hand umrissen, rechts automatisierte Phasenanalyse*** *(analySIS®)*

Um die Untersuchungstechnik über die idealen Bedingungen einer gleichmäßigen Farbe und einfachen Form hinaus auf ihre Brauchbarkeit zu testen, wurde ein weiterer,

analoger Vorversuch auf der Basis eines exemplarisch ausgewählten, mit Alizarin S – gefärbten „echten“ Knochenpartikel durchgeführt (Abbildung 52).

In einem dritten Vorversuch wurde die Wiederholbarkeit des Verfahrens überprüft, indem 10 Mehrfachbestimmungen der phasenanalytischen Flächenmessung sowohl bei der roten, geometrischen Figur als auch beim „echten“, Alizarin S -gefärbten Knochenpartikel durchgeführt wurden.

Ein vierter Vorversuch galt dem Vergleich der phasenanalytischen Diskriminierung der gesuchten Fläche mit voreingestellten Parametern (Kapitel 4.2.1.7) einerseits, mit der digitalen Erkennung der Flächen im interaktiven, visuellen Dialog (Markieren der gesuchten Fläche per „Anklicken“, Kapitel 3.2.4) andererseits. Sowohl die Fläche des Quadrats als auch die des Knochenpartkels wurden vergleichend diskriminiert und vermessen (Abbildungen 53 und 54).

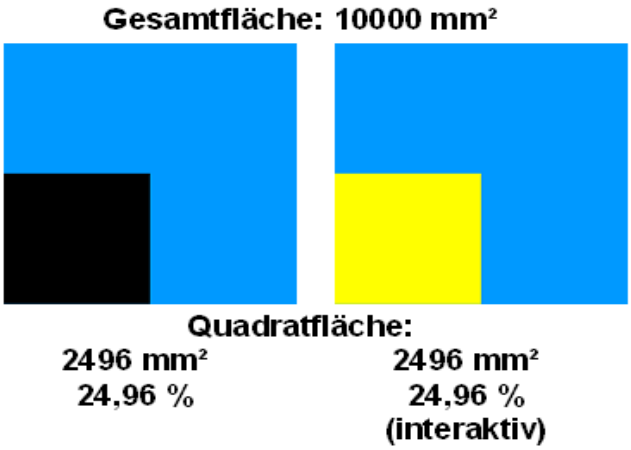


Abbildung 53: ***Vorversuch 4a*** *(analySIS®)*

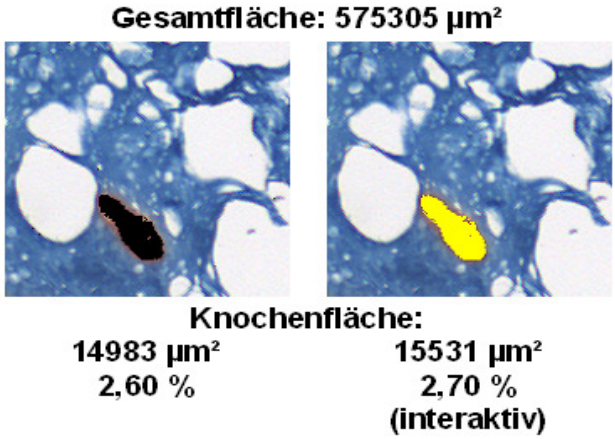


Abbildung 54: ***Vorversuch 4b*** *(analySIS®)*

4.2.1.7 Quantitative histologische Untersuchung

a. Konventionelle Partikelzählung

Die Partikelzählung erfolgte nach dem in einem Ringversuch im Jahr 2003 bestätigten Zählverfahren (SCHULTE-SUTRUM und HORN 2003) sowohl bei allen mit Alizarin-S als auch bei fünf durch die Silbernitrat-Imprägnierung gefärbten Proben. Dabei wurden bei 12 Präparaten einer Probe alle identifizierbaren Knochenpartikel ausgezählt und die so ermittelte Anzahl ins Verhältnis zur Gesamtfläche der 12 Präparate gesetzt. Die Gesamtfläche wurde bei jedem Präparat durch Ausmessen der Kantenlängen mit einem Lineal bestimmt. Um die zufälligen Fehler bei der Beurteilung der Zusammengehörigkeit von Knochenpartikeln zu reduzieren, wurde abweichend vom Ringversuch jeder sichtbare und sich nicht in sichtbarer Verbindung zum benachbarten Knochenstück befindende Partikel mitgezählt. Die Berechnung der Ergebnisse des Knochenpartikelzählverfahrens wird in der Formel 4.1 dargestellt.

$$a = \frac{\sum b}{\sum c} \tag{4.1}$$

a Anzahl der Knochenpartikel pro cm²

$\sum b$ Summe aller gezählten Knochenpartikel einer Probe

$\sum c$ Summe aller ausgemessenen Präparatsflächen einer Probe (cm²)

b. Phasenanalytische Untersuchung

- Einscannen der Präparate

  Das Einscannen von jeweils zwei Präparaten eines Objektträgers erfolgte über die Aufnahme eines Übersichtsbildes. Dabei wurden zunächst über das Modul Tischmanager der Software analySIS® Tischpositionen definiert, die eine vollständige Aufnahme der gesamten Präparate ermöglichten. Das System rechnete bei der verwendeten Objektivvergrößerung von 2x mit den dazugehörigen Kalibrierdaten automatisch die Anzahl von 64 Einzelbildern aus, die dann sukzessive aufgenommen und zu einem Gesamtbild Stoß an Stoß zusammengefügt wurden. Da sich der Einsatz des Autofokus aufgrund der unterschiedlich zusammengesetzten Matrix des zu untersuchenden Probenmaterials und der damit verbundenen Vielzahl von Ebenen als ungünstig erwies, erfolgte eine pro

Probendurchgang (6 Objektträger mit jeweils 2 Präparaten) einmalige Fokussierung, joystick-gesteuert, manuell. Die erforderliche Belichtung sowie der Weißabgleich - die Angleichung aller Farben an die Farbe Weiß - wurden von der Software automatisch ausgeführt. Um eine gleich bleibende Auflösung der Aufnahmen zu erreichen, wurde die Speicherkapazität pro aufgenommenes Übersichtsbild auf 13 MB festgelegt. Die Tabelle 41 fasst die Einstellungsparameter zusammen, wie sie verwendet wurden, um Übersichtsaufnahmen unter standardisierten Bedingungen zu erhalten.

Tabelle 41: ***Einstellungsparameter Übersichtsaufnahmen***

Parameter	***Einstellung***
Belichtung	automatisch, softwaregestützt
Weißabgleich	automatisch, softwaregestützt
Objektivvergrößerung	2x, kalibriert
Einzelbilderanzahl	64
Speicherkapazität pro Gesamtbild	13 MB

Die Präparate sollten ohne angrenzender leerer Außenflächen auf den Objektträgern und sich dort eventuell befindender Artefakte registriert werden. Dazu wurden die Übersichtsaufnahmen so nah wie möglich außen an den Präparatsgrenzen in einer rechteckigen Form digital zugeschnitten.

- Meßvorgang

Die Messung der gesuchten Flächen: Knochengewebsfläche und Gesamtgewebsfläche erfolgte softwaregestützt über das HSI-Farbsystem. Die zur Planimetrie der beiden Flächenanteile benötigten Farbschwellwerte wurden für die Knochengewebsfärbung mit Alizarin S (Abbildung 55) gemäß Tabelle 42 festgelegt.

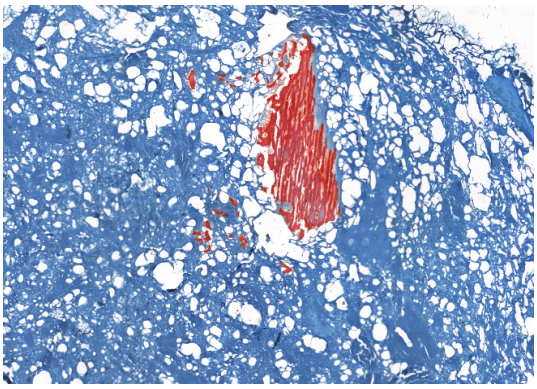


Abbildung 55: ***mit Alizarin S gefärbtes Präparat***

Tabelle 42: ***Farbschwellwerte Alizarin S***

Farbparameter	***Farbphase: Rot (Knochengewebsfläche)***	***Farbphase: alle Farben außer Weiß (Gesamtgewebsfläche)***
Farbton	300° - 60°	0° - 360°
Sättigung	50 – 255 Skt	0 – 255 Skt
Intensität	0 – 200 Skt	0 – 200 Skt
	Abbildung 56	Abbildung 57

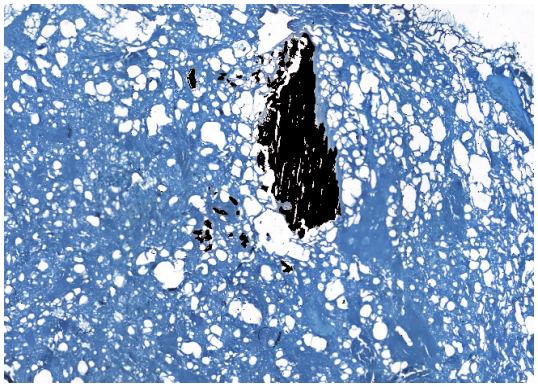


Abbildung 56: ***Diskriminierung der Knochengewebsfläche*** *(analySIS®)*

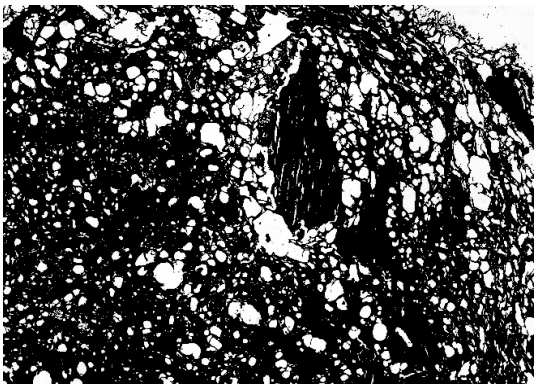


Abbildung 57: ***Diskriminierung der Gesamtgewebsfläche*** *(analySIS®)*

Bei der Definition von Schwellenwerten für die Phasen im HSI-System zeigte sich für die Alizarin S–Färbung, dass der Farbton das wesentliche Unterscheidungsmerkmal bildete (Knochengewebe 300° - 60°, Gesamtgewebe 0° - 360°). Für die Parameter Sättigung wurden beim Knochengewebe (50 – 255 Skt) 0 – 50 Skt zur Elimination von Fehldiskriminierung von Färberesten ausgeblendet, während die Fläche des Gesamtgewebes (0 – 255 Skt) über den gesamten Bereich gemessen werden konnte. Der Parameter Intensität (0 – 200 Skt), bei dem 201 – 255 Skt wegen der möglichen Fehldiskriminierung in weißen Bereichen zur Messung nicht herangezogen wurden, blieb unabhängig von der zu erfassenden Komponente.

Bei der Färbung nach Kossa stellte sich heraus, dass der für die Farbe Schwarz (Knochengewebe 0 – 50 Skt) nach visueller Überprüfung eingestellte Parameter Intensität das wesentliche Unterscheidungskriterium darstellte. Die beiden anderen Parameter konnten in dem jeweiligen Schwellwertbereich ganz offen bleiben (Farbton 0° – 360°, Sättigung 0 – 255 Skt). Die Messung der Gesamtgewebsfläche wurde bei der Kossa-Färbung analog den HSI-Parametern bei der Alizarin S-Färbung durchgeführt (Tabelle 43).

Tabelle 43: ***Farbschwellwerte Kossa***

Farbparameter	***Farbphase: Schwarz (Knochengewebsfläche)***	***Farbphase: alle Farben außer Weiß (Gesamtgewebsfläche)***
Farbton	0° - 360°	0° - 360°
Sättigung	0 – 255 Skt	0 – 255 Skt
Intensität	0 – 50 Skt	0 – 200 Skt

- Berechnung der Ergebnisse

  Nach der softwaregestützten Messung der beiden Flächenanteile wurden die Ergebnisse einer Probe in µm² tabellarisch aufgeführt und in eine vorgefertigte Microsoft-Excel®-Tabelle (Tabelle 44) übertragen, in der die ausgemessenen Flächen der einzelnen Präparate jeweils addiert und die Summe der Knochengewebsflächen $\sum a$ in die Relation zur Summe der Gesamtgewebsflächen $\sum b$ gesetzt wurde.

  Durch Multiplikation mit dem Faktor 100 wurde der relative Knochenanteil am Gesamtgewebe in % berechnet (Formel 4.2).

Tabelle 44: ***Auswertung des relativen Knochengewebsanteils am Gesamtgewebe***

Probennummer	***Knochengewebsfläche (µm²)***	***Gesamtgewebsfläche (µm²)***
Objektträger Nr. 1	a_1	b_1
Objektträger Nr. 2	a_2	b_2
Objektträger Nr. 3	a_3	b_3
Objektträger Nr. 4	a_4	b_4
Objektträger Nr. 5	a_5	b_5
Objektträger Nr. 6	a_6	b_6
Gesamtsumme (µm²)	$\sum a$	$\sum b$

relativer Knochengewebsanteil am Gesamtgewebe (%)	
$\frac{\sum a}{\sum b} \cdot 100$	(4.2)

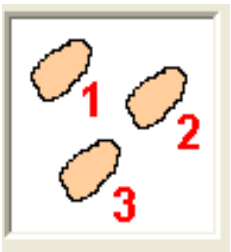
Zur Beurteilung der Homogenität des untersuchten Knochengewebes innerhalb der einzelnen Proben wurden von jedem einzelnen Objektträger phasenanalytische Flächenmessungen durchgeführt und statistisch ausgewertet.

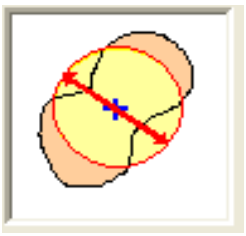
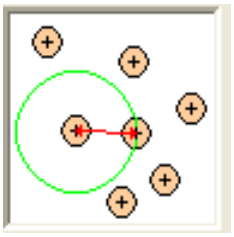
c. Digitale Partikelanalyse

Nach dem im Kapitel 3.2.5 dargestellten Prinzip wurde eine softwaregestützte Zählung der Knochenpartikel durchgeführt sowie Einzelflächen, Equivalent Circle Diameter und Abstände zum nächsten Partikelnachbarn der Knochenteilchen (Tabelle 45) ermittelt und statistisch ausgewertet.

Um zu vermeiden, dass Färbereste als Partikel detektiert werden, wurden 10 zusammenhängende Pixel als unterste Erkennungsgrenze voreingestellt.

Tabelle 45: ***Parameter der digitalen Partikelanalyse***
(HANDBUCH "Schritt für Schritt analySIS" 2004)

Partikelzahl	ID-Nummer zur eindeutigen Identifizierung und Zählung der Partikel	

Einzelfläche	Partikelfläche in der Einheit der Bildkalibrierung. Die Fläche berechnet sich aus der Anzahl der Pixel x Kalibrierungsfaktoren in X- und Y-Richtung	
Equivalent Circle Diameter	Durchmesser eines Kreises, der eine Fläche besitzt, die gleich der Fläche des Partikels ist, in der Einheit der Bildkalibrierung	
Nächster Abstand Nachbar	Abstand zum nächsten Partikel-nachbarn, in der Einheit der Bildkalibrierung	

Nach der Detektion und Zählung der Partikel pro Objektträger wurde der Mittelwert der Partikelzahlen aller Objektträger einer Probe gebildet und durch den Durchschnittswert der Präparatsflächen eines Objektträgers von 8 cm² dividiert.

Das Prinzip der digitalen Partikelzählung und -analyse ist in den Abbildungen 58 - 62 dargestellt.

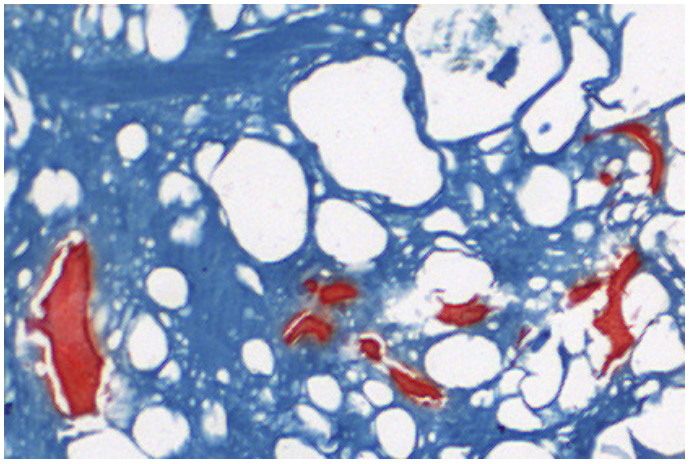


Abbildung 58: ***mit Alizarin S gefärbtes Präparat***

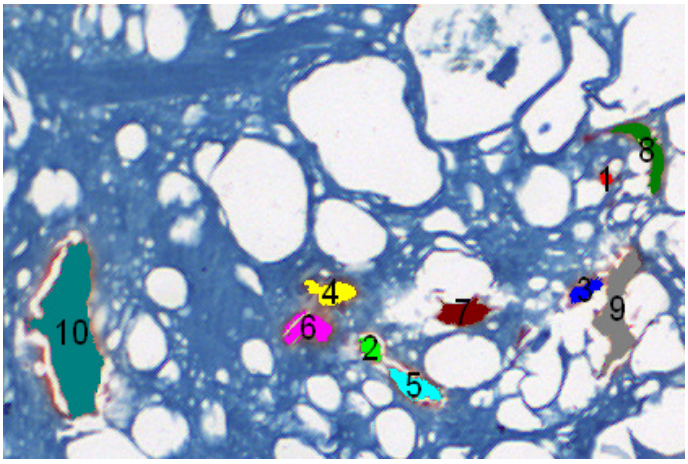


Abbildung 59: ***digitale Partikelzählung*** *(analySIS®)*

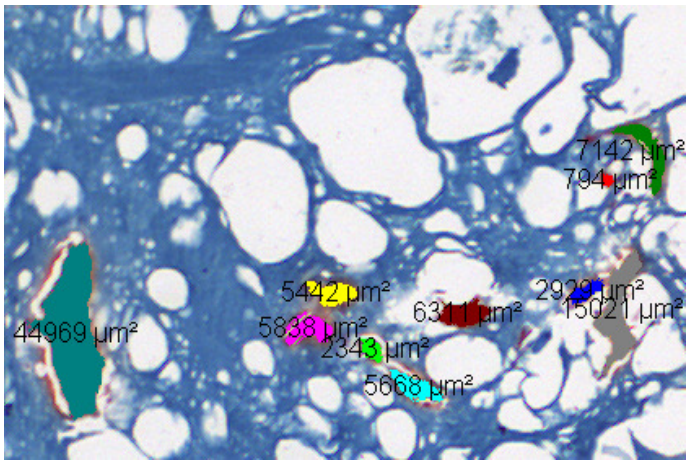


Abbildung 60: ***Messung der Partikelflächen*** *(analySIS®)*

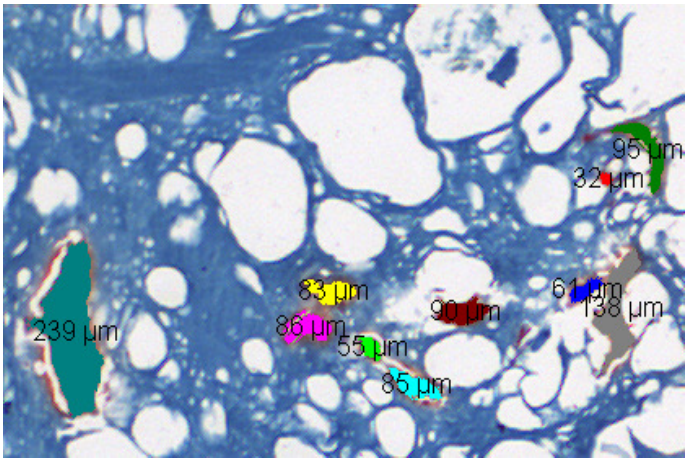


Abbildung 61: ***Messung der Partikel-Equivalent Circle Diameter*** *(analySIS®)*

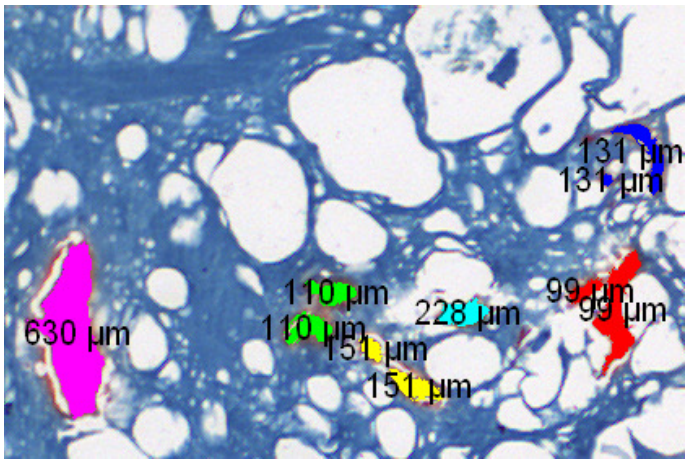


Abbildung 62: ***Messung der nächsten Abstände zum Nachbarpartikel*** *(analySIS®)*

4.2.1.8 Qualitative und semiquantitative histologische Untersuchung

Die aus jeweils einer weiblichen und einer männlichen Putenkarkasse entnommenen Gewebe und Organsysteme sowie das Probenmaterial aus allen 35 Separatorenfleischproben wurden fixiert, aufbereitet (4.2.1.2 , 4.2.1.5), geschnitten (4.2.1.3) und nach Calleja gefärbt (4.2.1.4). Die in den Karkassen vorgefundenen Organstrukturen wurden als Referenzmaterial zur Überprüfung der geweblich-substantiellen Zusammensetzung der Separatorenfleischproben herangezogen.

Die nach Calleja gefärbten Präparate aller Separatorenfleischproben wurden qualitativ und semiquantitativ nach der amtlichen Methode für die histologische Untersuchung des § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs ausgewertet (AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB).

4.2.2 Physikalisch-chemische Untersuchung

Die Bestimmung von Kalzium erfolgte in Anlehnung an die DIN EN ISO 11885 mittels Optischer Emissionsspektrometrie mit Induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES).

4.2.2.1 Labormaterialien

a. Reagenzien

- Salpetersäure 67% Suprapur
- zertifizierte Kalzium-Stammlösung 1000 mg/l, Merck KGaA
- Bezugslösungen aus der Kalzium-Stammlösung, 10 – 200 mg/l

b. Geräte

- Atomemissionsspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma, Poems II, Thermo Jarell Ash Corp.

4.2.2.2 Trockenveraschung des Probenmaterials

Nach Homogenisierung wurde das Probenmaterial eingewogen (Tabelle 65) und einer Trockenveraschung unterzogen. Danach erfolgte die Auflösung der veraschten Matrix in 1 ml Salpetersäure.

4.2.2.3 Atomemissionsspektrometrische Bestimmung von Kalzium

Zunächst wurde die Probenlösung in einer Sprühkammer (Meinhard) zerstäubt. Das gebildete Aerosol wurde mit Hilfe eines Trägergases (Argon) in ein induktiv gekoppeltes Plasma transportiert, in dem die Anregung der Kalzium-Atome erfolgte. Die charakteristischen emittierten Elementlinien wurden durch ein Prisma zerlegt und die Linienintensitäten mit einem photosensitiven Detektor qualitativ und quantitativ erfasst. Die Messung der Probenlösung erfolgte gegen eine Kalibrierung mit der Bezugslösung. Die Matrix der Blind- und der Bezugslösung wurde in Hinblick auf die Messung der Matrix der Aufschlusslösung angepasst. Rechnergestützt wurden die Detektionssignale ausgewertet. Die erhaltenen Werte in mg/l wurden über die Formel 4.3 in mg/100g umgerechnet.

$$\frac{x}{E} * 10 = y \qquad (4.3)$$

x : Messwert (mg/l) E : Einwaage (g/ml) y : Messwert (mg/100g)

4.2.3 Mikrobiologische Untersuchung

Die mikrobiologische Untersuchung wurde mit Hilfe der im Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen Berlin akkreditierten Prüfverfahren durchgeführt. Bei den Prüfverfahren werden die entsprechenden Methoden nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs bzw. die einschlägigen DIN/ISO-Normen umgesetzt.

4.2.3.1 Labormaterialien

a. Nährböden und -lösungen, Bebrütungsbedingungen

- Peptonwasser, SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH
- Plate Count – Agar, Merck KGaA
- Blut – Agar, Oxoid GmbH
- Mossel – Agar, Oxoid GmbH

- de Man Rogosa Sharpe (MRS) – Agar, Oxoid GmbH
- Violet red bile glucose (VRBG) – Agar, Oxoid GmbH
- Glutamat Stärke Phenolrot (GSP) – Agar, Oxoid GmbH
- Citrate azide tween carbonate (CATC) – Agar, Merck KGaA
- Tryptose Sulfit Cycloserin (TSC) – Agar, Difco™
- Brilliant green phenolred lactose (BPLS) – Agar, Oxoid GmbH
- Rambach – Agar, Merck KGaA
- Chromogen *Listeria* Medium (OCLA) – Agar, Oxoid GmbH
- Rapid *Listeria monocytogenes* – Agar, Bio-Rad Laboratories GmbH
- *Campylobacter* blood-free selective (CCDA) – Agar, Oxoid GmbH
- Karmali – Agar, Oxoid GmbH
- Petrifilm STX, Transia GmbH
- Petrifilm *E. coli*, Transia GmbH
- modifiziertes Rappaport-Vassidiliadis-Medium, im Haus hergestellt
- modifiziertes Selenit-Cystin-Medium, im Haus hergestellt
- ½ Fraser-Boullion / Fraser-Boullion, SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH
- Bolton-Boullion, Oxoid GmbH

b. Geräte

- Stomacher 400®, Stomacher® Laboratory Systems
- Bac Trac 4000®, sylab GmbH
- Topfset zur anaeroben Bebrütung, Oxoid GmbH
- Topfset zur mikroaerophilen Bebrütung, Oxoid GmbH

c. Reagenzien

- omnivalentes Salmonellen-Antiserum, SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH
- Oxidase-Teststreifen, Mast Diagnostica GmbH
- Lösungen zur Gram-Färbung:

  Karbolgentianaviolettslösung, Merck KGaA

  Lugolsche Lösung, Merck KGaA

  Alkohol 96%

  verdünnte Fuchsin Lösung, Merck KGaA

4.2.3.2 Vorbereitung des Probenmaterials

Für das Tropfplatten- und Gussverfahren wurden jeweils 10g des Probenmaterials in einen Stomacherbeutel mit Filtrierschlauch abgewogen und mit 90 ml Pepton-NaCl-Lösung aufgefüllt. Anschließend wurde das Probenmaterial in einem Stomacher 400® 0,5 Minuten homogenisiert und eine dezimale Verdünnungsreihe angelegt.

4.2.3.3 Tropfplatten- und Gussverfahren

Beim Tropfplatten-Verfahren wurden 0,05 ml der relevanten Verdünnungsstufen auf ein abgegrenztes Sechstel des entsprechenden Nährbodens aufgetragen. Zur Keimzahlermittlung bei E. coli und Staphylokkoken wurden bei den vorgesehenen Verdünnungen jeweils 1 ml des Materials auf die jeweiligen Petrifilme aufgetropft. Bei E. coli wurden bei den ersten 10 Proben Verdünnungen von 10^{-1} -10^{-3} angesetzt. Aufgrund des Auftretens von relativ hohen Keimzahlen wurden zur besseren Auswertbarkeit bei den restlichen 25 Proben Verdünnungen von 10^{-2}-10^{-4} vorgenommen. Zur Ermittlung der Keimzahlen bei Clostridien wurde das Gussverfahren mit jeweils 1 ml pro Verdünnungsstufe durchgeführt. Ein Untersuchungsschema einschließlich der Bebrütungsbedingungen enthält Tabelle 46.

Tabelle 46: ***Mikrobiologie - Untersuchungsschema***

Keimgruppe	***Nährmedium***	***Verdünnung***	***Kultivierungs-verfahren***	***Bebrütung Temperatur (°C) / Zeit (h)***
aerobe mesophile Koloniezahl	Plate Count- Agar	10^{-2}-10^{-7}	Dropplating Doppel-bestimmung	30/48±4
aerobe mesophile Koloniezahl	Blut-Agar	10^{-2}-10^{-7}	Dropplating	37/48±4
Entero-bakteriazeen	VRBG-Agar	10^{-2}-10^{-7}	Dropplating	30/48±4 (anaerob)
Pseudomonaden	GSP-Agar	10^{-2}-10^{-7}	Dropplating	25/48±4
E.coli	Petrifilm *E.coli*	10^{-1}-10^{-3}(10x) 10^{-2}-10^{-4}(25x)	Petrifilm einfach	44/18-24
Staphylokokken	Petrifilm STX	10^{-2}-10^{-3}	Petrifilm einfach	37/24-48
Clostridien	TSC-Agar	10^{-1}-10^{-2}	Gussverfahren	37/18-24 (anaerob)
Milchsäure-bakterien	MRS-Agar	10^{-2}-10^{-7}	Dropplating	25/48±4
Bacillus cereus	Mossel-Agar	10^{-2}-10^{-7}	Dropplating	30/18-24
Enterokokken	CATC-Agar	10^{-2}-10^{-7}	Dropplating	37/48±4

4.2.3.4 Koloniezählung und Keimzahlberechnung

Nach der vorgesehenen, in der Tabelle 46 aufgeführten Bebrütungszeit wurden alle (aerobe mesophile Keimzahlen) bzw. die charakteristischen Kolonien (restliche Keimgruppen) identifiziert und ausgezählt. Zur Auswertung wurden Verdünnungsstufen herangezogen, bei denen 1-150 von allen (aerobe mesophile Keimzahlen) bzw. den typischen Kolonien (restliche Keimgruppen) gewachsen waren. Aus den Koloniezahlen der niedrigsten und den nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufen wurde der gewogene arithmetische Mittelwert $\overline{c}$ nach der Formel 4.4 berechnet.

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0{,}1} \tag{4.4}$$

$\bar{c}$ Gewogenes arithmetisches Mittel der Koloniezahlen

$\sum c$ Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächsthöhere auszählbare Verdünnungsstufe)

n_1 Anzahl der Platten der niedrigsten auszählbaren Verdünnungsstufe

n_2 Anzahl der Platten der nächsthöheren Verdünnungsstufe

Die Berechnung der Keimzahl je g der Probe erfolgte durch Multiplikation des $\bar{c}$-Wertes mit dem Faktor 10 und dem Verdünnungsfaktor. Das Ergebnis wurde als Zahl zwischen 1,0 und 9,9 multipliziert mit der entsprechenden Zehnerpotenz, angegeben und auf eine Dezimale gerundet.

Während über die dargestellte Berechnungsgrundlage die Keimzahlen vom Gussverfahren (Clostridien) sowie von der Kultivierung über die Petrifilme direkt errechnet werden konnten, musste beim übrigen Tropfplattenverfahren eine Multiplikation mit dem Faktor 2 erfolgen, da dort die Ausgangsmenge bei jeder Verdünnung 0,05 ml betrug.

4.2.3.5 Pseudomonaden

Nach der Bebrütung auf dem GSP-Agar wurde bei der Bestimmung der Keimzahlen von Pseudomonaden abweichend zur bisher dargestellten quantitativen Auswertung lediglich die höchste Verdünnungsstufe ermittelt, bei der Kolonien dieser Bakterienspezies noch gewachsen waren und über die Bestätigungsreaktion mit dem Oxidasetest nachgewiesen werden konnten.

4.2.3.6 Salmonellen

Für den Nachweis von Salmonellen wurde eine Voranreicherung von jeweils 10 g Probenmaterial in 90 ml gepufferten Peptonwassers angesetzt und 18-24 Stunden bei 37°C bebrütet. Am drauf folgenden Tag wurde das vorangereicherte Probenmaterial in einer Menge von 0,1 ml in Messzellen mit 10 ml flüssigem modifiziertem Rappaport-Vassidiliadis-Medium und 1 ml in 9 ml flüssigem modifiziertem Selenit-Cystin-Medium

18 Stunden bei 40° respektive 36°C selektiv angereichert. Simultan wurde die Impedanzmessung über BacTrac 4000® durchgeführt. Die bei der Screening-Methode positiv bestätigten oder verdächtigen Proben wurden jeweils auf BPLS- und Rambach-Agar ausgestrichen und 18-20 Stunden bei 37°C subkultiviert. Die positiven Kolonien wurden anschließend mit einem omnivalenten Salmonellen-Antiserum serologisch bestätigt.

4.2.3.7 Listeria monocytogenes

Bei der Primäranreicherung wurden 10 g des Probenmaterials in 90 ml ½ Fraser-Bouillon homogenisiert und anschließend 24±2 Stunden bei 30°C bebrütet. Danach erfolgte die Sekundäranreicherung von 0,1 ml in 10 ml Fraser-Bouillon und anschließende Bebrütung für 44-48 Stunden bei 37°C. Bei einer Schwarzfärbung wurde das Probenmaterial auf OCLA-Agar und Rapid-Agar ausgestrichen und bei 37°C 44-48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am Ende erfolgte die Identifizierung der für *Listeria* spp. typischen Kolonien.

4.2.3.8 Campylobacter

Jeweils 25 g des Separtorenfleisches wurden in 225 ml Bolton-Bouillon eingemischt und unter mikroaerophilen Bedingungen zunächst 4 Stunden bei 37°C und anschließend bei 41,5°C 42-44 Stunden bebrütet. Danach erfolgte ein Ausstrich des angereicherten Probenmaterials auf CCDA- und Karmali-Agar sowie dessen mikroaerophile Bebrütung für einen Zeitraum von 40-48 Stunden bei 41,5°C. Anschließend wurden verdächtige Kolonien abgenommen, gram-gefärbt und mikroskopisch bestätigt.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Histologische Untersuchung

5.1.1 Überprüfung der Richtigkeit und der Wiederholbarkeit des Verfahrens

Die Ergebnisse des manuell per Umriss einerseits und phasenanalytisch andererseits ermittelten Anteils der „roten Fläche“ und des „echten“, Alizarin S – gefärbten Knochenpartikels lagen in beiden Fällen nur um ca. 0,1 % auseinander (Tabellen 47 und 48). Die nahezu kongruenten Resultate bestätigen zunächst die Richtigkeit des analytischen Ansatzes. Die Differenz von 0,1 % resultiert aus der Tatsache, dass ein manueller Umriss zu grob ausfällt und die Grenzpixelwerte der gesuchten Fläche nicht exakt erfasst. Diese Schlußfolgerung konnte durch mehrfache Versuche des Umreißens per Hand und anschließende Flächenmessung verifiziert werden, weil die ermittelten Flächen stets geringfügig variierten.

Tabelle 47: ***Ergebnisse Vorversuch 1***

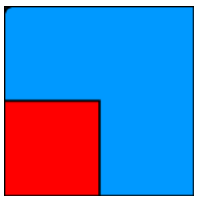
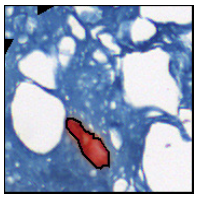
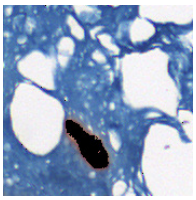
Messmethode	 ***per Umriss ermittelt***	***phasenanalytisch ermittelt***
Gesamtausschnittsfläche	10000 mm²	
„rote“ Fläche	2504 mm²	2496 mm²
relativer Anteil	25,04 %	24,96 %

Tabelle 48: ***Ergebnisse Vorversuch 2***

Messmethode	 ***per Umriss ermittelt***	 ***phasenanalytisch ermittelt***
Gesamtausschnittsfläche	575305 µm²	
Knochengewebsfläche	15437 µm²	14983 µm²
relativer Anteil	2,69 %	2,6 %

Anhand von 10 bespielhaften Mehrfachbestimmungen konnte die Wiederholbarkeit des automatisierten Verfahrens abgeschätzt werden (Tabelle 49). Bei einer relativen Standardabweichung von 0 % erwiesen sich die Messungen als höchst präzise und sprachen für eine optimale Wiederholbarkeit.

Tabelle 49: ***Ergebnisse Vorversuch 3***

Messung Nr.	***1***	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***SD***
„rote“ Fläche [%]	24,96	24,96	24,96	24,96	24,96	24,96	24,96	24,96	24,96	24,96	0 %
Knochen-gewebs - fläche [%]	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	0 %

Die Ergebnisse des Vorversuchs 4a, bei dem die phasenanalytische Messung im automatisierten Messvorgang mit der durch den visuellen, interaktiven Dialog („Anklicken“ der gesuchten Flächenanteile) durchgeführten Flächenanalyse verglichen wurde, fielen gleich aus (Tabelle 50). Die von der Software nach der visuellen Festlegung ermittelten Farbschwellenwerte für die einheitliche Farbnuance des

Quadrats liegen innerhalb des Bereichs der voreingestellten Parameter und sind für diese bestimmte Nuance der Farbe Rot repräsentativ (Tabelle 51).

Tabelle 50: ***Ergebnisse Vorversuch 4a zur Ermittlung der Farbschwellenwerte***

Messmethode	***phasenanalytisch ermittelt***	***per visuellen, interaktiven Dialog ermittelt***
Gesamtausschnittsfläche	10000 mm²	
„rote Fläche“	2496 mm²	2496 mm²
relativer Anteil	24,96 %	24,96 %

Tabelle 51: ***Farbschwellenwerte Vorversuch 4a***

rotes Quadrat	***Einstellungen im automatisierten Messvorgang***	***per visuellen, interaktiven Dialog ermittelte Einstellungen***
Farbton	300° - 60°	0°
Sättigung	50 Skt – 255 Skt	255 Skt
Intensität	0 Skt – 200 Skt	85 Skt

Beim analogen Versuch mit dem „echten“ Knochenpartikel statt eines Modellquadrats (Vorversuch 4b) liegen die Resultate um 0,1 % auseinander (Tabelle 52). Die Differenz resultiert aus der Tatsache, dass bei der visuellen Festlegung der Farbschwellwerte („Anklicken“ der gesuchten Flächenanteile“) in den Grenzbereichen auch Pixel von Färberesten markiert worden sind, weshalb bei dem Parameter Sättigung der im

automatisierten Messvorgang festgesetzte Schwellenwert von 50 Skt knapp unterschritten wurde. Diese fehlerhafte Diskriminierung führte zu dem geringfügig höheren Messergebnis. Die anderen beiden Farbschwellwertbereiche liegen in den für den automatisierten Messprozess festgelegten Intervallen.

Tabelle 52: ***Ergebnisse Vorversuch 4b zur Ermittlung der Farbschwellenwerte***

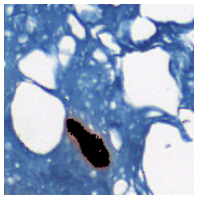
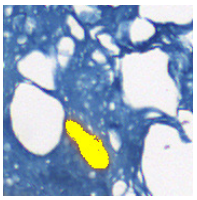
Messmethode	 ***phasenanalytisch ermittelt***	 ***per visuellen, interaktiven Dialog ermittelt***
Gesamtausschnittsfläche	575305 µm²	
Knochengewebsfläche	14983 µm²	15531 µm²
relativer Anteil	2,6 %	2,7 %

Tabelle 53: ***Farbschwellenwerte Vorversuch 4b***

Knochengewebsfläche	***Einstellungen im automatisierten Messvorgang***	***durch visuellen, interaktiven Dialog ermittelte Einstellungen***
Farbton	300° - 60°	335° - 20°
Sättigung	50 Skt – 255 Skt	46 Skt – 179 Skt
Intensität	0 Skt – 200 Skt	62 Skt – 139 Skt

5.1.2 Quantitative histologische Untersuchung

5.1.2.1 Konventionelle Partikelzählung

Die über das Partikelzählverfahren ermittelten Knochenpartikelzahlen pro cm² reichen beim Kolbenseparatorenfleisch von 0 bis 2,44 Partikel/cm², während sie beim Rotationseparatorenfleisch insgesamt zwischen 1,73 und 45,5 und damit wesentlich höher liegen. Die Ergebnisse der manuellen Partikelzählung an den mit Alizarin-S gefärbten Schnitten sind in der Tabelle 54 zusammengefasst.

Tabelle 54: ***Ergebnisse konventionelles Partikelzählverfahren (Alizarin-S-Färbung)***

Probenmaterial und Probennummer	***Ausgangsmaterial***	***Separatorentyp***	***Knochenpartikel/cm²***
Kolbenseparat 1	Putenhälse	Stork Protecon®	0,3
Kolbenseparat 2	Putenhälse	Stork Protecon®	0
Kolbenseparat 3	Putenhälse	Stork Protecon®	0,1
Kolbenseparat 4	Putenhälse	Stork Protecon®	0
Kolbenseparat 5	Putenhälse	Stork Protecon®	0
Kolbenseparat 6	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	2,44
Kolbenseparat 7	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,07
Kolbenseparat 8	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,52
Kolbenseparat 9	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	1,55
Kolbenseparat 10	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,37
Kolbenseparat 11	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,04
Kolbenseparat 12	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,52

Probenmaterial und Probennummer	***Ausgangsmaterial***	***Separatorentyp***	***Knochenpartikel/cm²***
Kolbenseparat 13	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,04
Kolbenseparat 14	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0
Kolbenseparat 15	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0
Rotationsseparat 1	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®	35,27
Rotationsseparat 2	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®	31,44
Rotationsseparat 3	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®	17,88
Rotationsseparat 4	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®	45,5
Rotationsseparat 5	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®	26,33
Rotationsseparat 6	Putenkarkassen	Lima®	10,16
Rotationsseparat 7	Putenkarkassen	Lima®	11,09
Rotationseparat 8	Putenkarkassen	Lima®	6,73
Rotationsseparat 9	Putenkarkassen	Lima®	10,3
Rotationsseparat 10	Putenkarkassen	Lima®	27,66
Rotationsseparat 11	Putenkarkassen	Lima®	11,64
Rotationsseparat 12	Putenkarkassen	Lima®	11,96
Rotationsseparat 13	Putenkarkassen	Lima®	4,84
Rotationsseparat 14	Putenkarkassen	Lima®	4,96
Rotationsseparat 15	Putenkarkassen	Lima®	4,7
Rotationsseparat 16	Putenkarkassen	Simo®	5,78

Probenmaterial und Probennummer	*Ausgangsmaterial*	*Separatorentyp*	*Knochenpartikel/cm²*
Rotationsseparat 17	Putenkarkassen	Simo®	2,7
Rotationsseparat 18	Putenkarkassen	Simo®	7,01
Rotationsseparat 19	Putenkarkassen	Simo®	2,03
Rotationsseparat 20	Putenkarkassen	Simo®	1,73

5.1.2.2 Phasenanalytische Bestimmung des Knochenanteils

Die relativen Knochenanteile schwanken beim Kolbenseparatorenfleisch zwischen 0,01 % und 0,32 %. Die Werte liegen beim Rotationseparatorenfleisch insgesamt wesentlich höher mit einer Spannweite von 0,19 % bis 2,22 %. Die einzelnen Messwerte der mit Alizarin-S gefärbten Präparate sind in der Tabelle 55 aufgeführt.

Tabelle 55: ***Ergebnisse phasenanalytische Planimetrie (Alizarin-S-Färbung)***

Probenmaterial und Probennummer	*Ausgangsmaterial*	*Separatorentyp*	*relativer Knochenanteil in %*
Kolbenseparat 1	Putenhälse	Stork Protecon®	0,29
Kolbenseparat 2	Putenhälse	Stork Protecon®	0,05
Kolbenseparat 3	Putenhälse	Stork Protecon®	0,08
Kolbenseparat 4	Putenhälse	Stork Protecon®	0,02
Kolbenseparat 5	Putenhälse	Stork Protecon®	0,01
Kolbenseparat 6	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,16
Kolbenseparat 7	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,02
Kolbenseparat 8	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,1
Kolbenseparat 9	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,32

Probenmaterial und Probennummer	***Ausgangsmaterial***	***Separatorentyp***	***relativer Knochenanteil in %***
Kolbenseparat 10	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,04
Kolbenseparat 11	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,03
Kolbenseparat 12	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,05
Kolbenseparat 13	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,02
Kolbenseparat 14	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,03
Kolbenseparat 15	Putenkarkassen, Putenhälse	Stork Protecon®	0,01
Rotationsseparat 1	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®	1,72
Rotationsseparat 2	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®	1,61
Rotationsseparat 3	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®	1,06
Rotationsseparat 4	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®	2,22
Rotationsseparat 5	Putenkarkassen, Putenflügel	Lima®	1,53
Rotationsseparat 6	Putenkarkassen	Lima®	0,47
Rotationsseparat 7	Putenkarkassen	Lima®	0,42
Rotationsseparat 8	Putenkarkassen	Lima®	0,34
Rotationsseparat 9	Putenkarkassen	Lima®	0,45
Rotationsseparat 10	Putenkarkassen	Lima®	1,27
Rotationsseparat 11	Putenkarkassen	Lima®	0,82
Rotationsseparat 12	Putenkarkassen	Lima®	0,72

Probenmaterial und Probennummer	*Ausgangsmaterial*	*Separatorentyp*	*relativer Knochenanteil in %*
Rotationsseparat 13	Putenkarkassen	Lima®	0,24
Rotationsseparat 14	Putenkarkassen	Lima®	0,99
Rotationsseparat 15	Putenkarkassen	Lima®	0,46
Rotationsseparat 16	Putenkarkassen	Simo®	0,43
Rotationsseparat 17	Putenkarkassen	Simo®	0,32
Rotationsseparat 18	Putenkarkassen	Simo®	0,42
Rotationsseparat 19	Putenkarkassen	Simo®	0,3
Rotationsseparat 20	Putenkarkassen	Simo®	0,19

5.1.2.3 Färbung nach Kossa

Zur Überprüfung der Eignung der Farbtinktur nach Kossa modifiziert nach KÖNIGSMANN (1978) zur phasenanalytischen Flächenmessung wurden bei fünf untersuchten Proben folgende Ergebnisse erzielt (Tabelle 56):

Tabelle 56: ***Ergebnisse konventionelle Partikelzählung und phasenanalytische Planimetrie (Kossa-Färbung)***

Probenmaterial und Probennummer	*Koventionelle Partikelzählung Knochenpartikel/cm²*	*Phasenanalytische Planimetrie relativer Knochenanteil in %*
Rotationsseparat 1	41,22	0,53
Rotationsseparat 2	37,16	0,56
Rotationsseparat 3	19,05	0,19
Rotationsseparat 4	46,38	0,59
Rotationsseparat 5	30,83	0,44

Beim Vergleich der beiden Farbrezepturen Alizarin (Knochen = Rot) und Kossa (Knochen = Schwarz) besteht für die Silberimprägnierung das Problem der Diskriminierung der unbunten Farbe Schwarz, so dass hierbei vermehrt manuelle Eingriffe und individuelle Korrekturen notwendig sind. Darüber hinaus kommt es bei der Erkennung und Markierung der schwarzen Fläche zur Fehldiskriminierung von dunklen Artefakten wie Staubkörnchen etc.. Bedingt durch die Elimination dieser störenden Faktoren werden im Vergleich zu den Resultaten bei der Alizarin S-Färbung phasenanalytisch geringere Flächeninhalte ermittelt.

Insoweit lassen sich die Erfahrungen mit der auf Grauwerten basierenden Fernsehbildanalyse (HILDEBRANDT et al. 1978) nicht auf die HSI-Phasenanalyse übertragen.

5.1.2.4 Vergleich beider histometrischen Methoden unter der Berücksichtigung der Gewinnungstechnologie und des Ausgangsmaterials

Die Resultate der Bestimmung des Knochenanteils mit Hilfe der manuellen Partikelzählung und der phasenanalytisch-mikroskopischen Technik sind jeweils getrennt nach den beiden Separationstechniken in den Abbildungen 63 und 64 dargestellt.

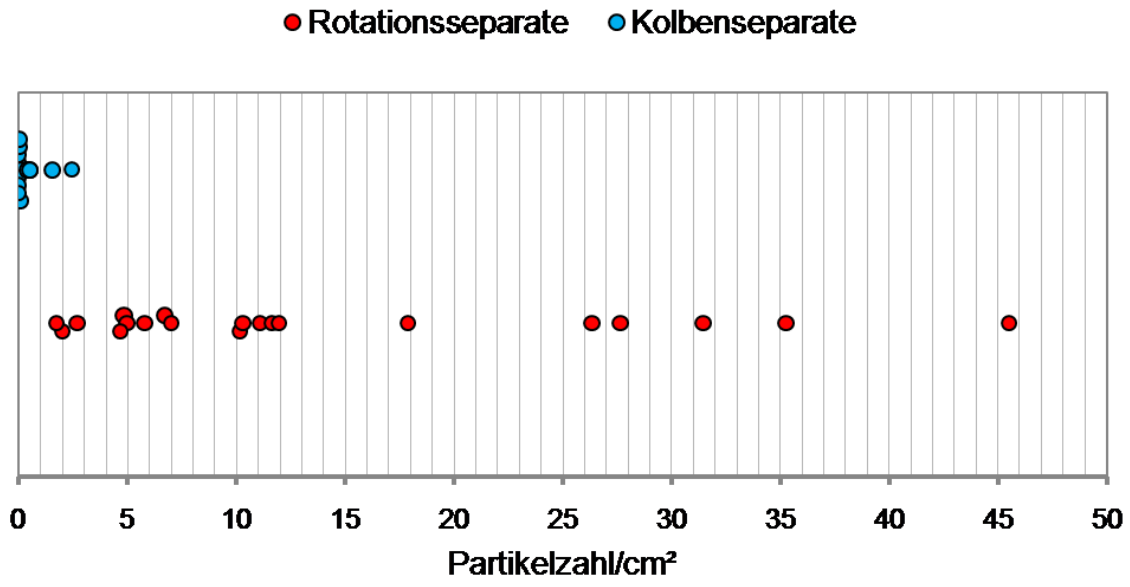


Abbildung 63: ***Häufigkeitsverteilung der manuell ermittelten Knochenpartikelzahl/cm² in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie***

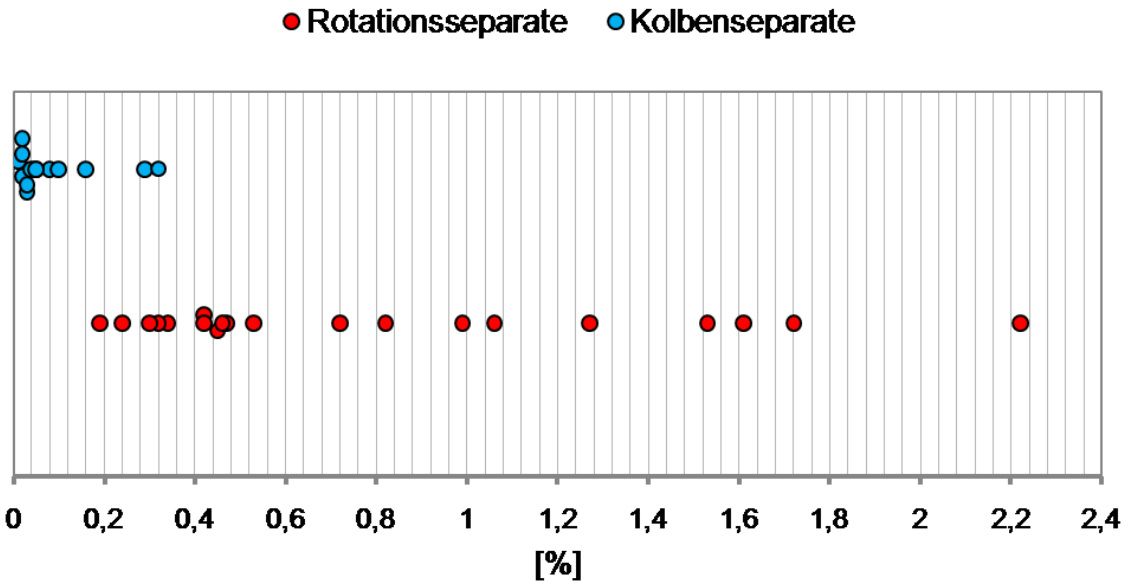


Abbildung 64: ***Häufigkeitsverteilung der phasenanalytisch bestimmten Knochenfläche in % in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie***

Sowohl die Ergebnisse der konventionellen als auch die der digitalen Messung zeigen einen erheblichen Unterschied in der Häufigkeit des Vorkommens von Knochengewebe bei den mit zwei verschiedenen Separationstechnologien gewonnenen Proben. Das Kolbenseparatorenfleisch weist im Vergleich zum Rotationsseparatorenfleisch geringere Teilchenzahlen pro cm² sowie geringere Flächenanteile und somit einen geringeren Gehalt an Knochengewebe auf. Dieser Effekt ist auf die technologiebedingte, schonendere Bearbeitung des Ausgangsmaterials zurückzuführen.

Unabhängig von den Differenzen zwischen den beiden Gewinnungstechnologien gibt es auch innerhalb der zwei Gruppen Unterschiede in Abhängigkeit vom Maschinenfabrikat. So führt beim Rotationsseparat der Einsatz der Simo®-Anlage zu geringeren Knochenanteilen im Vergleich zu dem durch die Lima®-Separatoren gewonnenen Restfleisch. Weiterhin ist die Art des Ausgangsmaterials von Bedeutung. Bei der Verarbeitung von Flügeln treten die höchsten Knochenanteile auf, während die Verwendung von Hälsen eine Reduktion des ossifizierten Gewebes im gewonnen Rohstoff bedingt (Abbildungen 65 und 66).

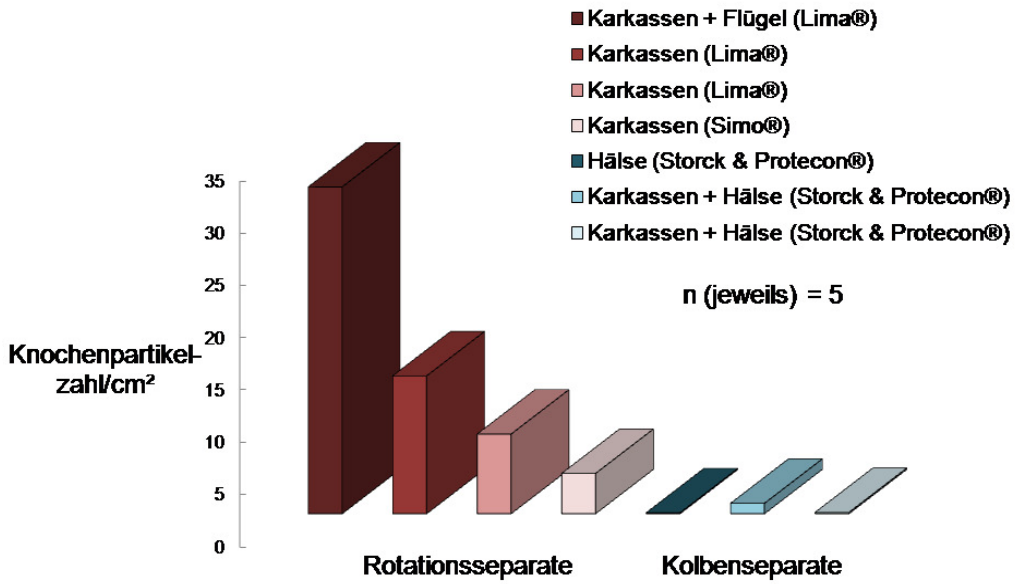


Abbildung 65: ***Knochenanteil (konventionelles Partikelzählverfahren) in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial und Separatorentyp***

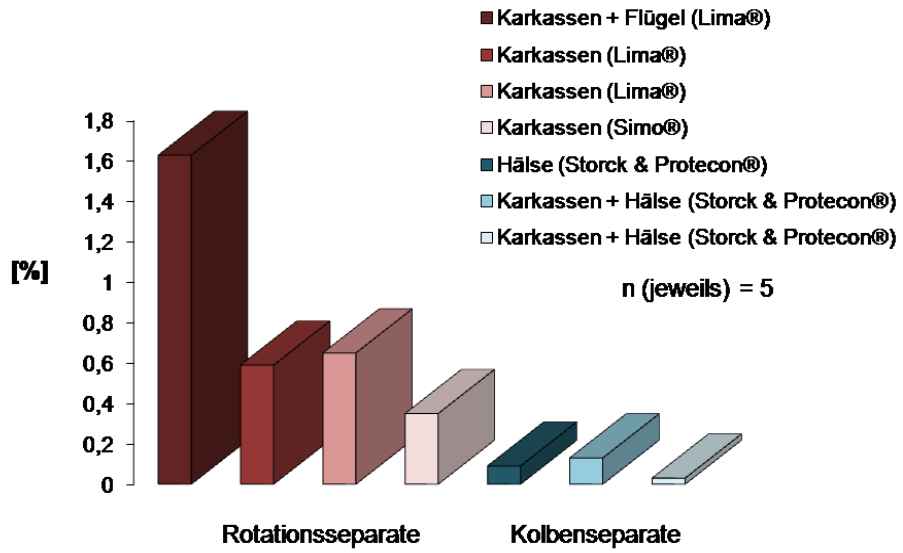


Abbildung 66: ***Knochenanteil (phasenanalytische Planimetrie) in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial und Separatorentyp***

Beim Vergleich beider histometrischer Methoden, d.h. der manuellen Partikelzählung und der phasenanalytischen Flächenbestimmung, korrelieren die Verfahren trotz der differierenden Bezugsgrößen und unterschiedlicher analytischer Ansätze sehr eng miteinander (Abbildung 67). Die Regressionsanalyse, bei der eine lineare Beziehung unterstellt wurde, zeigt einen hoch signifikanten Zusammenhang (Signifikanzniveau < .001) zwischen den beiden histometrischen Verfahren (r = .96). Die geringen, aber offensichtlichen Differenzen zwischen den parallelen mikroskopischen Daten dürften in erster Linie der Tatsache geschuldet sein, dass die Knochenpartikel zwischen und innerhalb der Proben in ihrer Größe variieren. So stellt sich bei dem deutlichsten Ausreißer heraus, dass hier relativ wenige, dafür aber flächenmäßig große Knochensplitter vorliegen.

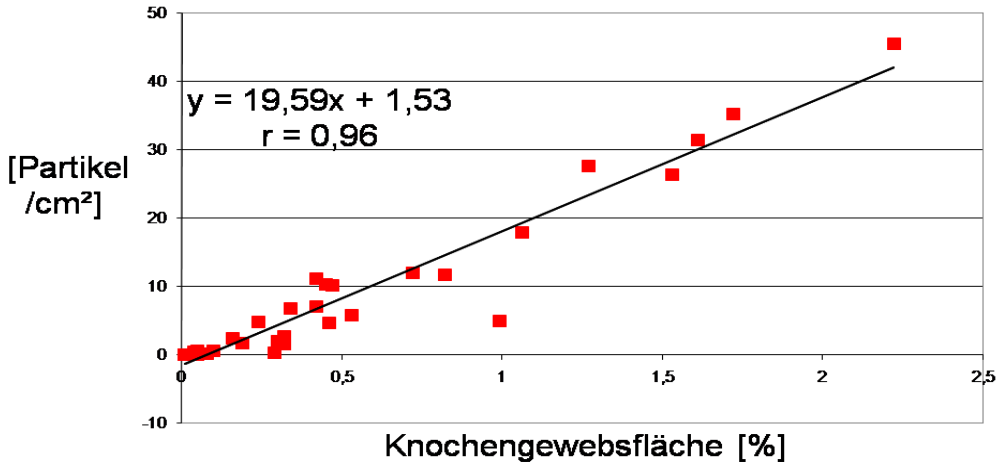


Abbildung 67: ***Korrelation zwischen manueller Partikelzählung und phasenanalytischer Flächenbestimmung***

5.1.2.5 Streuung der Ergebnisse innerhalb der Proben

Zur Beurteilung der Homogenität des Knochenanteils innerhalb jeder einzelnen Probenaufbereitung wurden jeweils phasenanalytische Einzelmessungen der Knochengewebsfläche eines jeden Objektträgers, auf dem sich stets zwei Präparate befanden, durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der Tabelle 57 zusammengefasst.

Tabelle 57: ***Ergebnisse Einzelflächenmessung pro Objektträger (OT a - f)***

Probe	*OT a*	*OT b*	*OT c*	*OT d*	*OT e*	*OT f*	*Mittel-wert*	*SD*	*CV [%]*
	[%]								
KS 1	0,51	0,85	0,19	0,03	0,11	0,03	0,29	0,30	103,45
KS 2	0,05	0,05	0,04	0,04	0,07	0,04	0,05	0,01	20,00
KS 3	0,1	0,07	0,17	0,03	0,02	0,11	0,08	0,05	62,50
KS 4	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,03	0,02	0,00	0,00
KS 5	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
KS 6	0,14	0,11	0,12	0,28	0,21	0,10	0,16	0,06	37,50
KS 7	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	50,00
KS 8	0,11	0,1	0,09	0,09	0,11	0,08	0,10	0,01	10,00
KS 9	0,29	0,34	0,39	0,30	0,33	0,27	0,32	0,04	12,50
KS 10	0,03	0,07	0,02	0,04	0,06	0,02	0,04	0,02	50,00
KS 11	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,00	0,00
KS 12	0,05	0,03	0,04	0,03	0,04	0,09	0,05	0,01	20,00
KS 13	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,00	0,00
KS 14	0,01	0,03	0,05	0,02	0,03	0,02	0,03	0,01	33,33
KS 15	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00
RS 1	1,60	1,72	1,61	1,51	1,85	2,05	1,72	0,12	6,98
RS 2	1,89	1,35	1,97	1,87	1,44	1,16	1,61	0,26	16,15
RS 3	0,90	0,57	1,26	0,66	0,93	2,05	1,06	0,24	22,64
RS 4	2,60	2,78	1,88	2,5	1,88	1,66	2,22	0,38	17,12
RS 5	1,49	1,73	1,01	1,70	1,70	1,56	1,53	0,27	17,65

Probe	*OT a*	*OT b*	*OT c*	*OT d*	*OT e*	*OT f*	*Mittel-wert*	*SD*	*CV [%]*
	[%]								
RS 6	0,35	0,48	0,34	0,28	0,52	0,83	0,47	0,09	19,15
RS 7	0,43	0,47	0,48	0,46	0,33	0,33	0,42	0,05	11,90
RS 8	0,32	0,40	0,25	0,54	0,19	0,36	0,34	0,12	35,29
RS 9	0,44	0,19	0,66	0,65	0,29	0,45	0,45	0,19	42,22
RS 10	2,19	1,07	0,97	1,33	1,15	0,89	1,27	0,44	34,64
RS 11	0,84	0,98	0,90	0,87	0,63	0,70	0,82	0,12	14,63
RS 12	0,59	0,60	0,73	0,72	0,93	0,73	0,72	0,12	16,66
RS 13	0,28	0,35	0,16	0,22	0,16	0,28	0,24	0,07	29,16
RS 14	1,24	1,05	0,80	0,77	0,81	1,27	0,99	0,18	18,18
RS 15	0,17	0,15	0,35	0,58	0,76	0,73	0,46	0,24	52,17
RS 16	0,52	0,59	0,45	0,51	0,61	0,51	0,53	0,06	11,32
RS 17	0,36	0,28	0,41	0,36	0,30	0,23	0,32	0,05	15,62
RS 18	0,41	0,37	0,43	0,44	0,39	0,48	0,42	0,03	7,14
RS 19	0,35	0,33	0,29	0,33	0,27	0,23	0,30	0,03	10,00
RS 20	0,17	0,22	0,12	0,26	0,11	0,22	0,19	0,05	26,32

Der Variationskoeffizient (Standardabweichung/Mittelwert [%]) der Einzelmessungen der Knochengewebsfläche streut beim Kolbenseparat zwischen 0 % und 103,45 %, während das Rotationseparat Schwankungen zwischen 6,98 % und 52,17 % aufweist (Abbildungen 68 und 69).

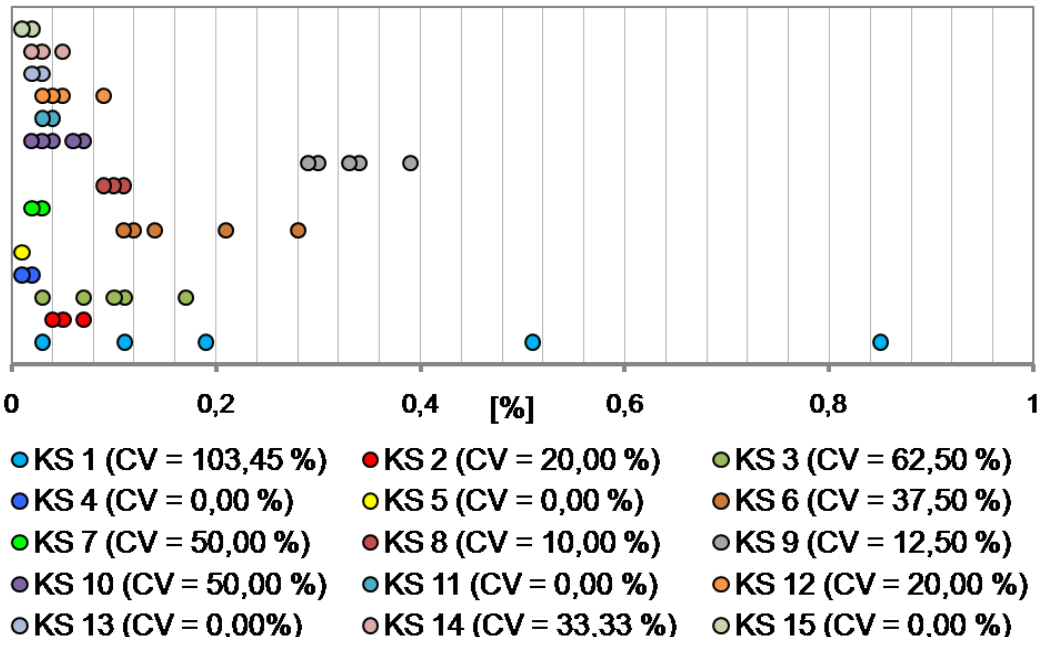


Abbildung 68: ***Streuung der Einzelergebnisse (6 Objektträger/Probe) des phasenanalytisch ermittelten Knochenanteils (Kolbenseparate)***

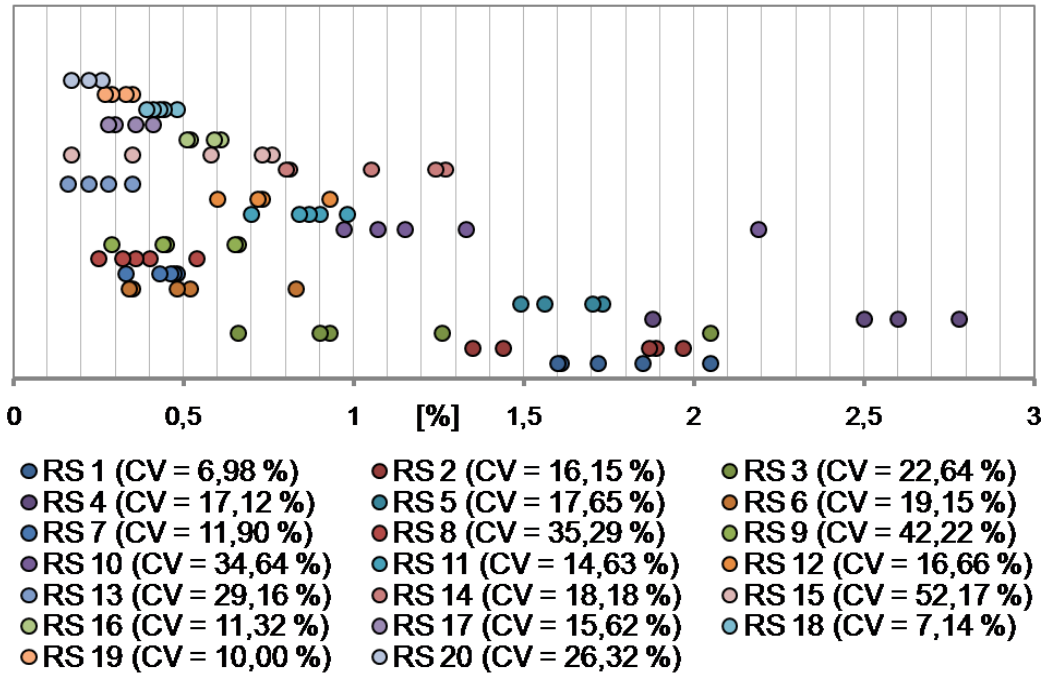


Abbildung 69: ***Streuung der Einzelergebnisse (6 Objektträger/Probe) des phasenanalytisch ermittelten Knochenanteils (Rotationsseparate)***

Unter der Berücksichtigung, dass die Probenmatrix vor der histologischen Aufbereitung nicht homogenisiert worden ist, liegen die Mittelwerte der Standardabweichungen von 21,25 % (Rotationsseparat) und 25,12 % (Kolbenseparat) im akzeptablen Bereich und erlauben eine recht genaue Schätzung des wirklichen Anteils.

5.1.2.6 Digitale Partikelzählung

Die digitale Partikelzählung wurde für die sechs Objektträger jeder Probe getrennt durchgeführt. Die Ergebnisse einschließlich des Mittelwerts enthält Tabelle 58.

Tabelle 58: ***Ergebnisse digitale Partikelzählung pro Objektträger (OT a – f)***

Probe	***Partikelzahlen***						***Mittelwert der Partikelzahlen***	***Partikelzahl /cm²***	***SD***	***CV [%]***
	OT a	***OT b***	***OT c***	***OT d***	***OT e***	***OT f***				
KS 1	12	18	5	0	2	1	6,33	0,79	7,17	113,27
KS 2	1	2	0	0	3	1	1,17	0,15	1,17	100,20
KS 3	1	0	9	0	0	2	2,00	0,25	3,52	176,07
KS 4	0	0	0	3	0	4	1,17	0,15	1,83	157,27
KS 5	1	1	0	0	2	1	0,83	0,10	0,75	90,33
KS 6	14	15	15	17	11	18	15,00	1,88	2,45	16,33
KS 7	1	8	7	0	3	1	3,33	0,42	3,39	101,59
KS 8	6	6	9	4	5	5	5,83	0,73	1,72	29,53
KS 9	11	10	23	14	10	13	13,50	1,69	4,93	36,51
KS 10	3	11	6	3	2	5	5,00	0,63	3,29	65,73
KS 11	1	1	1	1	2	0	1,00	0,13	0,63	63,25
KS 12	2	6	2	3	5	3	3,50	0,44	1,64	46,95
KS 13	9	2	0	2	1	6	3,33	0,42	3,44	103,34
KS 14	0	1	1	0	6	4	2,00	0,25	2,45	122,47
KS 15	2	0	1	0	3	3	1,50	0,19	1,38	91,89

Probe	*Partikelzahlen*						*Mittelwert der Partikelzahlen*	*Partikelzahl /cm²*	*SD*	*CV [%]*
	OT a	*OT b*	*OT c*	*OT d*	*OT e*	*OT f*				
RS 1	190	155	103	137	325	378	214,97	26,83	110,92	51,67
RS 2	147	191	112	150	208	153	160,17	20,02	34,31	21,42
RS 3	62	78	76	73	131	182	100,33	12,54	46,73	46,57
RS 4	212	197	176	191	330	321	237,83	29,73	68,94	28,99
RS 5	123	116	127	138	157	175	139,33	17,42	22,58	16,21
RS 6	40	23	35	35	20	40	32,17	4,02	8,61	26,77
RS 7	61	57	40	29	31	25	40,50	5,06	15,20	37,54
RS 8	39	25	13	25	14	17	22,17	2,77	9,77	44,06
RS 9	42	60	37	35	55	38	44,50	5,56	10,45	23,47
RS 10	154	157	132	83	102	110	123,00	15,38	29,69	24,14
RS 11	86	128	124	135	117	158	124,67	15,58	23,59	18,93
RS 12	87	101	144	112	115	124	113,83	14,23	19,51	17,14
RS 13	48	46	29	38	41	38	40,00	5,00	6,78	19,96
RS 14	76	61	91	112	64	87	81,83	10,23	19,01	23,23
RS 15	47	31	51	41	35	65	45,00	5,63	12,26	27,25
RS 16	47	59	51	53	44	73	54,50	6,81	10,43	19,13
RS 17	28	31	35	28	38	29	31,50	3,94	4,14	13,13
RS 18	65	78	66	77	56	54	66,00	8,25	10,10	15,30
RS 19	24	23	27	25	24	22	24,17	3,02	1,72	7,13
RS 20	15	17	18	15	11	21	16,17	2,02	3,37	20,85

Ähnlich wie die Ergebnisse des konventionellen Partikelzählverfahrens und der phasenanalytischen Planimetrie zeigen die Resultate der digitalen Partikelzählung eine erhebliche Differenz im Auftreten von Knochengewebe bei den mit unterschiedlichen Separationstechnologien gewonnenen Proben (Abbildung 70). Die mittlere Knochenteilchenzahl schwankt beim Rotationsseparatorenfleisch im Mittel zwischen 2,02 und 29,73 Partikel/cm², während sie bei den Kolbenseparaten zwischen 0,13 und 1,88 Partikel/cm² streut.

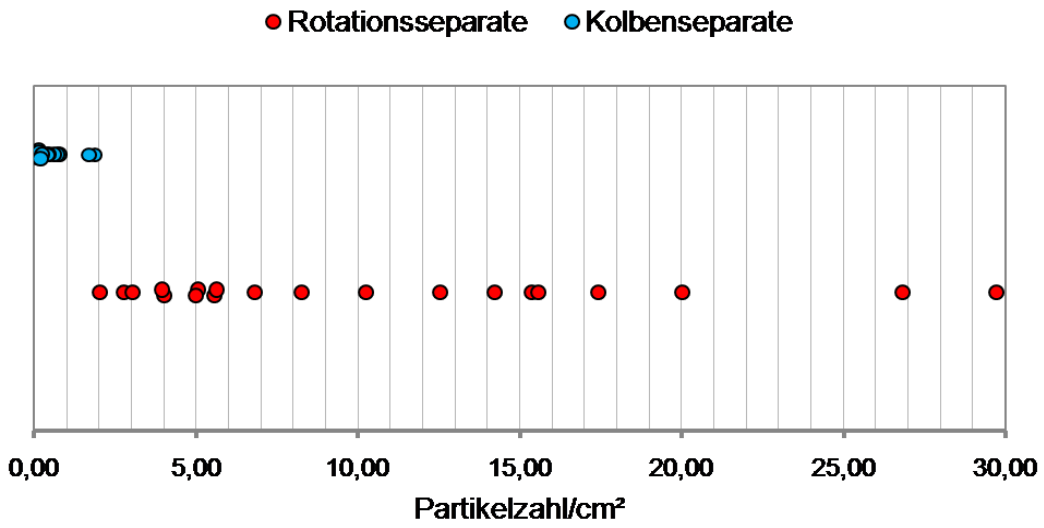


Abbildung 70: ***Vergleich der digital ermittelten Partikelzahlen/Probe in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie***

Ein Vergleich der konventionellen mit der phasenanalytischen Partikelzählung erbringt ebenfalls eine signifikante Korrelation (r = .95; Abbildung 71). Die drei am weitesten von der Regressionsgeraden entfernten Proben weisen eine sehr hohe Zersplitterungsrate des Knochengewebes auf, wobei die digitale Partikelzahlzählung im Gegensatz zur visuell-manuellen Auswertung die einzelnen Fragmente getrennt erfasst.

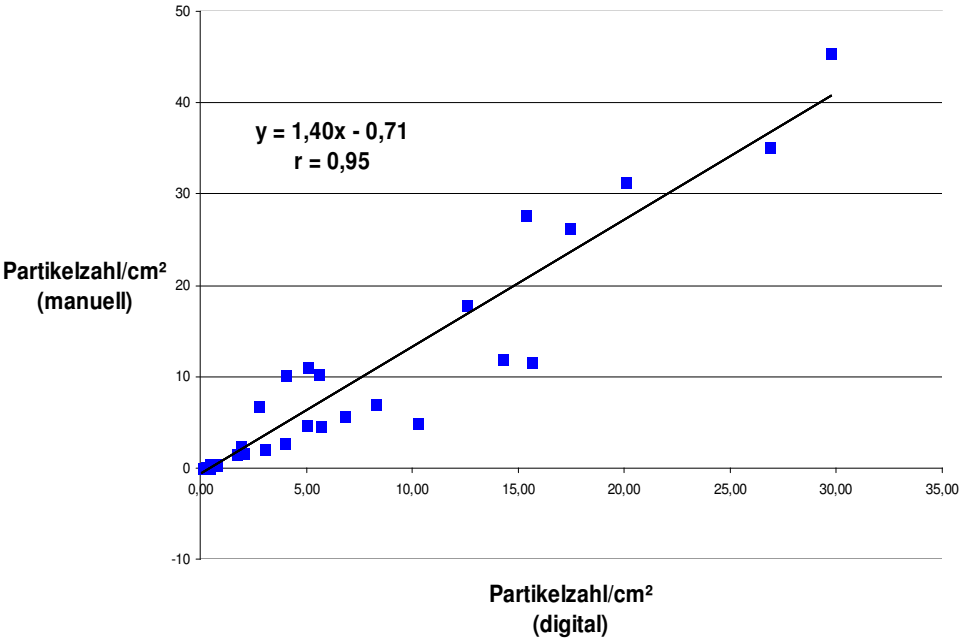


Abbildung 71: ***Korrelation zwischen dem digitalen und dem konventionellen Partikelzählverfahren***

Auch bei Gegenüberstellung der digitaler Partikelzählung mit der phasenanalytischen Flächenbestimmung kommt eine hoch signifikante Korrelation zustande (Abbildung 72).

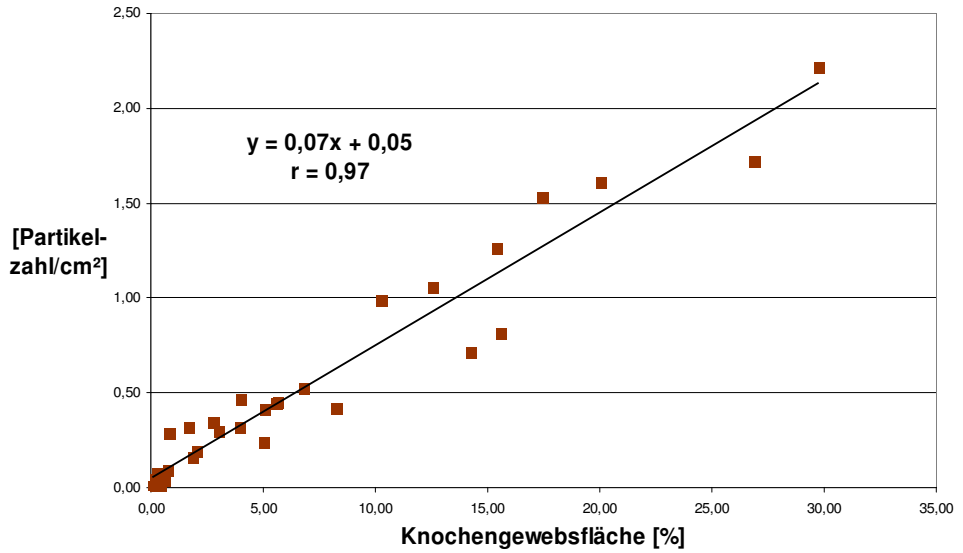


Abbildung 72: ***Korrelation zwischen den beiden digitalen Verfahren***

5.1.2.7 Digitale Bestimmung der Partikelfläche, des Equivalent Circle Diameter und der nächsten Abstände zum Nachbarpartikel

Die verwendete Software analySIS® gestattet es, für jeden Einzelpartikel die Flächen, den Equivalent Circle Diameter und den nächsten Abstand zum Nachbarpartikel zu bestimmen. Um die Homogenität abzuschätzen, sind neben den Ergebnissen für die sechs Objektträger jeder Probe auch die Mittelwerte je Probe aufgeführt (Tabelle 59). Die mittleren Partikelflächen (Mittelwert/Probe) zeigen gleichfalls einen deutlichen Einfluss der Technologie. Sie variieren bei Kolbenseparaten zwischen 5282,49 µm² und 85210,03 µm². Dagegen weisen die Rotationsseparate eine Differenz zwischen 21722,43 µm² und 54653,11 µm² auf. Bei der digitalen Messung von Partikeleinzelflächen fällt beim Rotationseparat die geringere Streuung der mittleren Partikelflächen zwischen den Proben auf (Tabelle 60, Abbildung 73). Dieser Befund deutet auf eine größere, durch die Herstellungstechnologie hervorgerufene morphologische Homogenität der Knochenpartikel bei dem kontinuierlich hergestellten Separatorenfleisch hin.

Tabelle 59: ***phasenanalytisch bestimmte mittlere Knochenpartikelflächen pro Objektträger (OT a – f)***

Probe	***mittlere Partikelflächen / OT [µm²]***						
	OT a	***OT b***	***OT c***	***OT d***	***OT e***	***OT f***	***Mittelwert***
KS 1	74861,69	12182,55	9311,32	-	189626,99	3732,81 5	57943,08
KS 2	25009,86	9244,36	-	-	6470,21	5972,50	17127,11
KS 3	8958,76	-	139020,69	-	-	8772,11	73989,72
KS 4	-	-	-	5397,87	-	5599,22	5498,55
KS 5	7287,12	23885,57	-	-	8255,16	8052,15	11870,00
KS 6	21303,71	23837,83	34365,23	43705,72	60098,32	25175,05	34747,64
KS 7	8126,53	5599,22	6559,09	-	4354,95	8900,49	6708,06
KS 8	49148,73	58175,66	36415,68	62787,14	59362,39	48899,87	52464,91
KS 9	66172,63	95203,55	51042,19	90967,41	100711,34	107163,07	85210,03
KS 10	64367,30	12182,55	28182,75	15428,97	34247,53	24070,02	29746,52
KS 11	11222,35	4479,38	10825,16	11609,33	5039,30	-	8635,11
KS 12	6905,71	7417,07	12383,29	27498,40	14395,57	10327,45	13154,58

Probe	*mittlere Partikelflächen / OT [µm²]*						
	OT a	***OT b***	***OT c***	***OT d***	***OT e***	***OT f***	***Mittelwert***
KS 13	5350,46	6772,11	-	5972,50	5804,67	4417,16	5663,38
KS 14	-	13157,24	6332,79	-	4966,21	5899,15	7588,85
KS 15	5203,27	-	6345,79	-	4230,52	5350,37	5282,49
RS 1	29278,07	34814,36	47696,20	46214,96	26398,47	24343,29	34790,89
RS 2	40853,02	33032,37	27510,97	30177,41	33401,75	31280,10	32709,27
RS 3	23735,90	27176,43	33322,37	51855,21	18929,08	20468,95	31003,80
RS 4	34953,86	39498,51	35797,93	29439,13	23938,65	20079,29	30617,89
RS 5	29439,13	34425,78	39540,62	29297,78	30787,40	19231,46	30453,70
RS 6	24369,92	31715,35	68815,70	26961,59	7913,57	23302,10	30513,04
RS 7	26149,55	23239,03	27968,82	17492,74	22637,72	14483,32	21995,20
RS 8	21452,46	28651,83	26225,18	24696,30	38767,95	40358,32	30025,34
RS 9	22942,25	39110,55	38708,23	14835,27	29910,03	27141,49	28774,64
RS 10	36742,78	28133,53	21627,70	36622,06	20073,03	31415,56	29102,44
RS 11	38108,31	16637,27	27419,25	14383,78	18836,22	20062,70	22574,59
RS 12	28400,61	32820,31	27018,57	33645,33	29774,88	31762,04	30570,29
RS 13	21370,36	26045,29	25220,27	20049,14	24338,86	13310,67	21722,43
RS 14	55761,38	59608,77	55139,01	47812,48	55144,33	54452,66	54653,11
RS 15	34127,46	17051,99	34071,08	49939,01	26961,59	65309,94	37910,18
RS 16	25573,75	32742,25	19264,25	32250,58	26553,89	28583,34	27494,68
RS 17	47233,44	38173,48	40026,44	50141,26	29430,30	37817,07	40470,33
RS 18	26147,79	23100,38	25845,42	18930,70	31041,14	27788,73	25475,70
RS 19	58820,62	62273,09	47856,25	40028,98	40563,25	54499,10	50673,55
RS 20	40712,57	37127,10	32703,61	37227,26	42791,63	28599,50	36526,94

Tabelle 60: ***Mittelwert und Streuung der mittleren Partikelflächen in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie***

mittlere Partikelflächen			
	Mittelwert [µm²]	***mittlere SD***	***mittlerer CV [%]***
Kolbenseparat	27708,67	27118,18	97,87
Rotationsseparat	32402,90	8534,00	26,34

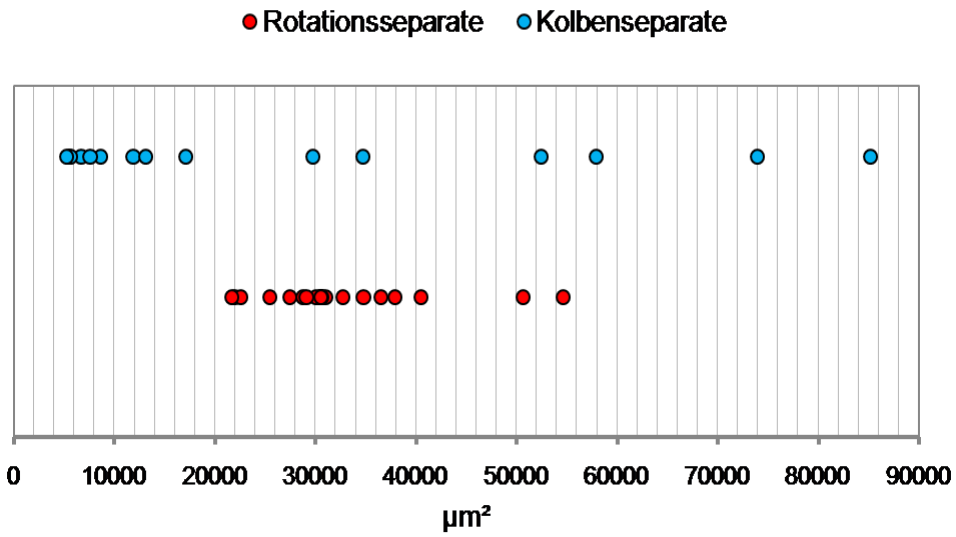


Abbildung 73: ***Vergleich der mittleren Partikelflächen/Probe in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie***

Auch hinsichtlich der mittleren Partikel-ECD (Mittelwert/Probe) findet sich bei den Kolbenseparaten eine größere Heterogenität. Sie variieren zwischen 83,02 µm und 260,51 µm, während sie sich bei Rotationsseparaten zwischen 142,63 µm und 201,65 µm erstrecken (Tabelle 61). Offensichtlich führt das Prinzip der Rotationsseparation zu gleichmäßigerer Zersplitterung des Knochengewebes (Tabelle 62, Abbildung 74).

Tabelle 61: ***phasenanalytisch bestimmte mittlere Partikel-ECD pro Objektträger (OT a – f)***

Probe	***mittlere Partikel-ECD [µm]***						
	OT a	***OT b***	***OT c***	***OT d***	***OT e***	***OT f***	***Mittelwert***
KS 1	185,84	112,50	105,16	-	405,90	68,94	175,67
KS 2	178,45	97,21	-	-	90,34	87,20	122,00
KS 3	106,80	-	266,92	-	-	104,29	159,34
KS 4	-	-	-	82,02	-	84,06	83,04
KS 5	96,32	174,39	-	-	112,35	94,69	119,44
KS 6	150,57	161,41	177,14	187,33	218,05	148,82	173,89
KS 7	101,72	83,04	88,19	-	74,35	106,45	90,75
KS 8	203,60	234,85	180,31	240,86	223,66	198,62	213,65
KS 9	224,00	281,73	187,19	268,70	297,18	304,24	260,51
KS 10	246,06	106,96	156,05	123,43	202,95	152,60	164,68
KS 11	119,54	75,52	117,40	121,58	79,75	-	102,76
KS 12	91,73	94,25	123,25	170,70	119,19	110,36	118,25
KS 13	81,60	92,07	-	85,60	85,97	74,72	83,99
KS 14	-	129,43	89,61	-	79,20	84,13	95,59
KS 15	86,44	-	89,89	-	73,28	82,46	83,02
RS 1	164,16	173,36	198,99	193,76	152,58	142,61	170,91
RS 2	178,49	163,99	155,50	168,47	176,23	153,00	165,95
RS 3	151,36	160,18	172,21	219,78	134,58	132,60	161,78
RS 4	172,18	187,65	171,83	160,67	153,00	139,56	164,15
RS 5	160,67	171,54	178,99	159,67	160,12	136,67	161,28
RS 6	155,12	166,51	214,07	155,47	97,37	126,77	152,55
RS 7	145,96	148,04	153,83	134,78	150,49	122,66	142,63
RS 8	142,05	164,33	159,75	145,21	195,70	191,90	166,49

Probe	*mittlere Partikel-ECD [µm]*						
	OT a	*OT b*	*OT c*	*OT d*	*OT e*	*OT f*	*Mittelwert*
RS 9	139,08	172,51	176,64	128,06	157,47	154,28	154,67
RS 10	177,36	159,05	140,28	180,60	140,98	167,59	160,98
RS 11	187,42	125,63	160,54	122,86	134,22	141,15	145,30
RS 12	164,46	171,80	157,43	172,13	168,43	162,87	166,19
RS 13	139,68	152,88	156,59	140,62	155,25	119,97	144,16
RS 14	211,92	221,94	203,05	184,18	193,11	195,68	201,65
RS 15	179,87	129,43	169,87	189,87	155,47	198,66	170,53
RS 16	154,45	175,71	141,93	158,80	159,66	160,01	158,43
RS 17	204,11	198,86	187,62	218,82	166,68	195,32	195,24
RS 18	156,40	141,53	154,15	134,50	164,62	162,34	152,26
RS 19	190,23	215,99	187,53	177,35	181,91	208,47	193,58
RS 20	198,56	189,68	179,14	193,41	192,75	165,67	186,54

Tabelle 62: ***Mittelwert und Streuung der mittleren Partikel-ECD in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie***

mittlere Partikel-ECD			
	Mittelwert [µm]	*mittlere SD*	*mittlerer CV [%]*
Kolbenseparat	53,31	136,44	39,08
Rotationsseparat	16,90	165,76	10,20

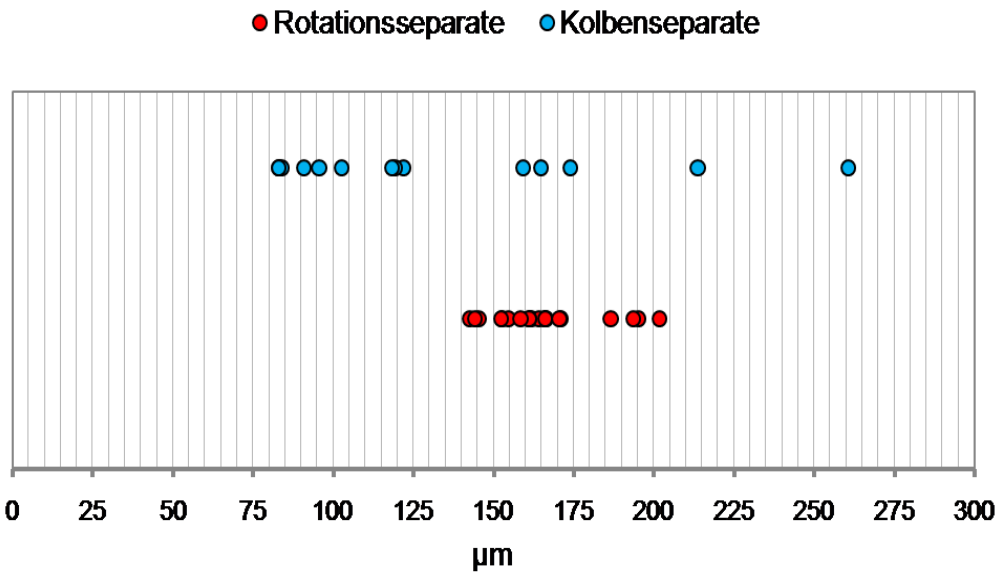


Abbildung 74: ***Vergleich der mittleren Partikel-ECD/Probe in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie***

Einen Hinweis auf die Häufigkeit der Knochennesterbildung ergibt die Messung der einzelnen nächsten Abstände zum Nachbarpartikel. Die mittleren nächsten Abstände zum Nachbarpartikel (Mittelwert/Probe) liegen beim Kolbenseparatorenfleisch zwischen 2215,32 µm und 18693,10 µm. Beim Rotationsseparatorenfleisch reichen die Werte von 766,17 µm bis 3551,02 µm und können darauf hindeuten, dass bei dieser Technologie häufiger die so genannten Knochennester entstehen, da die detektierten Partikel geringere mittlere nächste Abstände zu ihren Nachbarpartikeln aufweisen (Tabelle 53, Abbildung 75). Allerdings lässt sich dieses Phänomen zumindest teilweise mit der höheren Partikelzahl/Flächeneinheit bei diesem Verfahren erklären.

Tabelle 63: ***phasenanalytisch bestimmte mittlere nächste Abstände zum Nachbarpartikel pro Objektträger (OT a – f)***

Probe	***mittlere nächste Abstände zum Nachbarpartikel [µm]***							
	OT a	***OT b***	***OT c***	***OT d***	***OT e***	***OT f***	***Mittel-wert/ Probe***	***Mittelwert/ Gewinnungs-technologie***
KS 1	3778,50	638,67	3667,48	-	23623,89	-	7927,14	
KS 2	-	12448,22	-	-	9252,33	-	10850,27	
KS 3	-	-	5376,65	-	-	11868,98	8622,81	
KS 4	-	-	-	12485,53	-	6585,88	9535,71	
KS 5	-	-	-	-	11751,97	-	11751,97	
KS 6	2228,87	1722,98	4287,93	2260,55	3443,51	2212,72	2692,76	
KS 7	-	4991,40	8734,39	-	10978,56	-	8234,78	
KS 8	6406,43	9701,32	3340,16	12025,18	4092,04	12164,85	7971,66	9480,40
KS 9	1931,00	2044,56	2399,27	1894,37	2807,40	3101,78	2215,32	
KS 10	14566,87	4502,30	6339,44	12331,34	44672,18	8044,29	15076,07	
KS 11	-	-	-	-	18693,10	-	18693,10	
KS 12	18459,99	1893,17	20937,66	8134,34	2996,82	6815,42	9872,90	
KS 13	2271,04	5455,23	-	16362,79	-	4598,11	7171,79	
KS 14	-	-	-	-	6972,35	6789,23	6880,79	
KS 15	16520,34	-	-	-	5861,79	21744,78	14708,97	

Probe	*mittlere nächste Abstände zum Nachbarpartikel [µm]*							
	OT a	*OT b*	*OT c*	*OT d*	*OT e*	*OT f*	*Mittel-wert/ Probe*	*Mittelwert/ Gewinnungs-technologie*
RS 1	1015,39	1125,33	1449,28	1231,54	695,68	673,71	1031,82	1680,62
RS 2	1089,44	823,92	1309,68	987,11	1281,59	1276,83	1128,09	
RS 3	1612,20	1221,11	1511,97	1547,58	1092,62	810,00	1299,25	
RS 4	745,43	801,98	931,18	877,63	612,27	628,51	766,17	
RS 5	877,63	1276,39	974,46	1038,43	988,86	871,69	1004,57	
RS 6	2238,53	2272,11	1936,57	1736,60	3379,41	1740,84	2217,34	
RS 7	1824,34	2219,56	2264,69	2198,95	1151,46	1843,79	1917,13	
RS 8	2195,14	2218,27	1809,23	2592,86	2381,20	3292,43	2414,85	
RS 9	2270,05	1447,03	2829,69	2427,22	2089,39	2863,60	2321,16	
RS 10	785,46	953,75	810,49	1174,79	1031,48	1209,44	994,24	
RS 11	1240,46	530,78	965,73	629,60	712,24	799,59	813,07	
RS 12	1025,98	793,45	622,72	1056,03	1234,44	930,02	943,77	
RS 13	1540,83	1804,97	2144,43	2245,43	1835,19	1244,40	1802,54	
RS 14	1376,77	1627,46	1396,15	1170,36	1606,37	1398,22	1429,22	
RS 15	2202,44	1916,52	1923,77	2302,43	1736,60	1963,18	2007,49	
RS 16	1782,80	1252,37	1579,69	1601,92	2229,92	1043,91	1581,77	
RS 17	2365,99	2770,45	2587,18	2578,96	1877,35	2421,61	2433,59	
RS 18	1597,24	1511,89	1151,65	1184,02	1439,69	1299,89	1364,06	
RS 19	2061,51	1565,28	3177,31	3494,35	2666,96	2582,27	2591,28	
RS 20	5374,47	2500,92	3437,92	2162,77	5204,52	2625,55	3551,02	

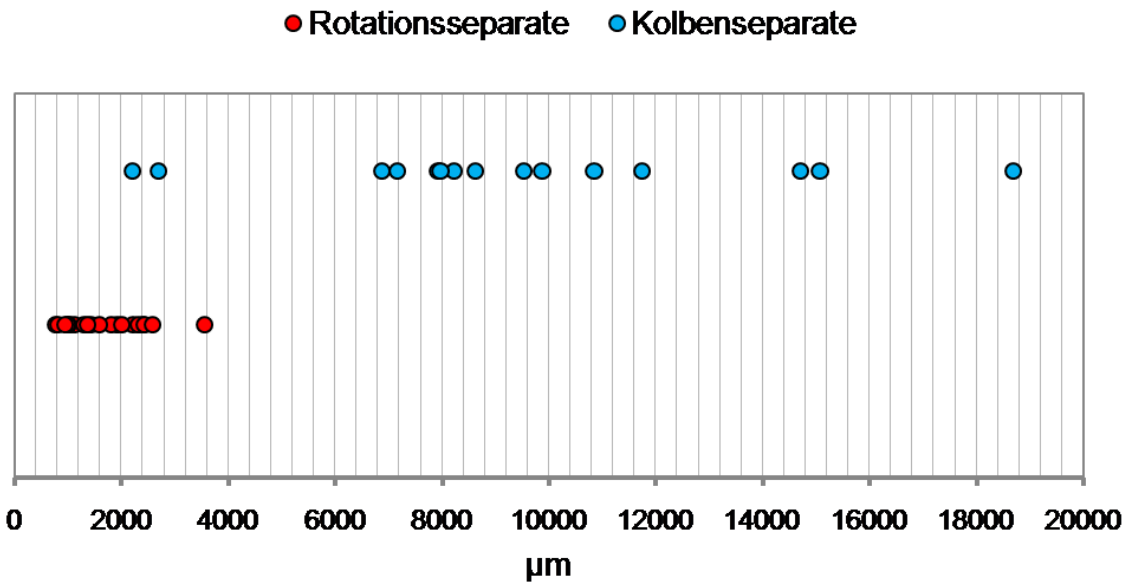


Abbildung 75: ***Vergleich der mittleren nächsten Abstände zum Nachbarpartikel in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie***

Aufgrund der phasenanalytisch ermittelten stereometrischen Parameter der Knochenpartikel besteht grundsätzlich die Möglichkeit, mit den beiden unterschiedlichen Technologien hergestellte Separate zu differenzieren und sie in ihrer Qualität zu charakterisieren. Eine Schwierigkeit liegt in der Abgrenzung des Kolbenseparatorenfleisches zu manuell gewonnenem Knochenputz, bei dem durchaus ähnliche Knochenanteile vorkommen können. Darüber hinaus führt eine zwangsläufige Verdünnung des maschinell separierten Fleisches bei der Verarbeitung in Fleischerzeugnissen zu verminderten Anteilen an Knochengewebe im Endprodukt und somit zur Unterschreitung des vorgegebenen Grenzwerts von 0,1 Vol.%. Gerade bei dem schonend gewonnenen Kolbenseparat dürfte dies fast die Regel sein.

5.1.3 Qualitative und semiquantitative histologische Untersuchung

Bei der Sektion des Referenzmaterials, d.h. der industriell ausgenommenen Putenkarkassen, wurden folgende im Tierkörper verbliebene Organstrukturen makroskopisch identifiziert und an den nach Calleja gefärbten Präparaten mikroskopisch bestätigt: Lunge mit Luftröhre, Thymus, Schilddrüse, Niere, Nebenniere, Eierstock und Samenleiter. Die Ergebnisse der qualitativen und semiquantitativ-taximetrischen Untersuchung der Separatorenfleischproben sind der Tabelle 64 zu entnehmen. Das in den vorhergehenden Kapiteln ausführlich behandelte Knochengewebe wurde hier nicht berücksichtigt.

Tabelle 64: ***Ergebnisse der semiquantitativen Untersuchung***

Probe	***Ausgangs-material***	***Vereinzelt***	***In geringer Menge***	***In mäßiger Menge***	***In mittlerer Menge***	***Überwiegend***
KS 1	Putenhälse	-	Bindegewebe	-	-	Skelett-muskulatur
KS 2	Putenhälse	-	Bindegewebe	-	-	Skelett-muskulatur
KS 3	Putenhälse	-	Bindegewebe	-	-	Skelett-muskulatur
KS 4	Putenhälse	-	Bindegewebe	-	-	Skelett-muskulatur
KS 5	Putenhälse	-	Bindegewebe	-	-	Skelett-muskulatur
KS 6	Puten-karkassen, Putenhälse	-	Knorpel	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
KS 7	Puten-karkassen, Putenhälse	-	-	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
KS 8	Puten-karkassen, Putenhälse	-	Knorpel	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
KS 9	Puten-karkassen, Putenhälse	Lunge	Bindegewebe, Knorpel	-	-	Skelett-muskulatur

Probe	*Ausgangs-material*	*Vereinzelt*	*In geringer Menge*	*In mäßiger Menge*	*In mittlerer Menge*	*Überwiegend*
KS 10	Puten-karkassen, Putenhälse	Knorpel	-	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
KS 11	Puten-karkassen, Putenhälse	-	Bindegewebe	-	-	Skelett-muskulatur
KS 12	Puten-karkassen, Putenhälse	-	-	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
KS 13	Puten-karkassen, Putenhälse	kutane Schleimhaut	Knorpel	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
KS 14	Puten-karkassen, Putenhälse	-	Bindegewebe, Knorpel	-	-	Skelett-muskulatur
KS 15	Puten-karkassen, Putenhälse	Knorpel	Bindegewebe	-	-	Skelett-muskulatur
RS 1	Puten-karkassen, Putenflügel	Knorpel	-	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 2	Puten-karkassen, Putenflügel	Knorpel	-	Bindegewebe		Skelett-muskulatur
RS 3	Puten-karkassen, Putenflügel	-	-	Bindgewebe		Skelett-muskulatur
RS 4	Puten-karkassen, Putenflügel	-	-	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 5	Puten-karkassen, Putenflügel	Knorpel	-	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 6	Puten-karkassen	Knorpel, Niere	-	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur

Probe	***Ausgangs-material***	***Vereinzelt***	***In geringer Menge***	***In mäßiger Menge***	***In mittlerer Menge***	***Überwiegend***
RS 7	Puten-karkassen	Thymus	Knorpel, Niere	Bindegewebe		Skelett-muskulatur
RS 8	Puten-karkassen	Knorpel, Niere	-	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 9	Puten-karkassen	Niere	Knorpel	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 10	Puten-karkassen	Thymus	Knorpel	Bindegewebe		Skelett-muskulatur
RS 11	Puten-karkassen	Knorpel, Thymus	Niere	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 12	Puten-karkassen	Niere	Knorpel, Thymus	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 13	Puten-karkassen	Lunge	Knorpel, Niere	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 14	Puten-karkassen	Knorpel, Thymus, Niere	-	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 15	Puten-karkassen	Knorpel	Niere, Thymus	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 16	Puten-karkassen	Knorpel, Thymus	Niere	Bindegewebe		Skelett-muskulatur
RS 17	Puten-karkassen	Knorpel	Niere	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 18	Puten-karkassen	Knorpel, Ovar	Niere	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 19	Puten-karkassen	Knorpel, Thymus	Niere	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur
RS 20	Puten-karkassen	Knorpel, Thymus	Niere	Bindegewebe	-	Skelett-muskulatur

Während das Knorpelgewebe bei 90 % aller histologischen Präparate von Rotationsseparaten vorkommt, konnte es bei Kolbenseparaten nur bei ca. 47 % der Proben nachgewiesen werden (Abbildung 76). Damit besteht eine deutliche Korrelation zwischen dem Auftreten von Knorpelgewebe und den höheren Anteilen an Knochengewebe. Andererseits korrelierte mehr als vereinzeltes Vorkommen an Knorpelsubstanz nicht mit der Herstellungstechnologie, denn in beiden Gruppen finden sich jeweils fünf Proben mit höheren Gehalten. Eine interessante Beobachtung stellt sich beim Vergleich des Vorkommens von Nierenstrukturen bei beiden Separatorenfleischarten ein (Abbildung 77). Bei gleichem Rohstoff (Putenkarkasse) können beim Rotationseparatorenfleisch teilweise höhere Gehalte am Nierengewebe beobachtet werden, während dieses Parenchym bei Kolbenseparaten nicht auftritt (Abbildung 76). Bei Putenhälsen als Ausgangsmaterial lassen sich kein Knorpelgewebe und verständlicherweise auch keine Nierenstrukturen nachweisen. Bei den Proben, die aus Putenkarkassen und Putenflügeln hergestellt wurden, findet sich ebenfalls kein Nierengewebe, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf den durch die Mitverwendung von Flügeln bedingten Verdünnungseffekt zurückzuführen ist.

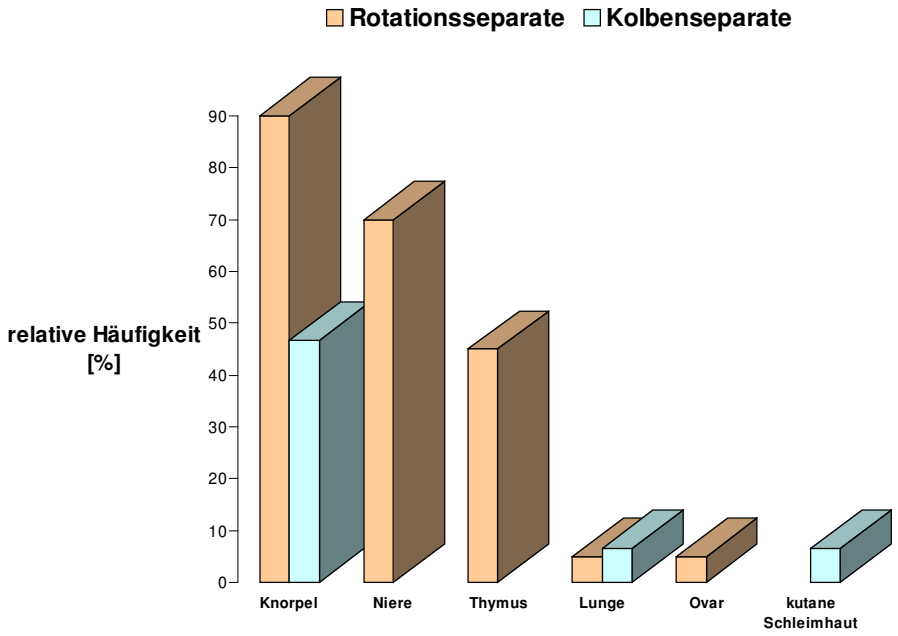


Abbildung 76: ***relative Häufigkeiten des Auftretens von „Innereien“ in den Separatorenfleischproben***

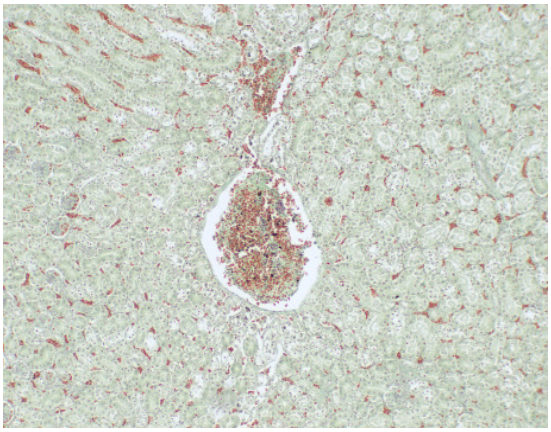


Abbildung 77: ***Nierenpanrenchym in einer Rotationsseparatorenfleischprobe (Calleja 10x (Objektivvergrößerung))***

Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der Bindegewebsmengen deuten darauf hin, dass bei den Kolbenseparaten Endprodukte mit niedrigeren Gehalten an diesem geringwertigen Gewebe entstehen, woran jedoch die ausschließliche oder teilweise Verwendung von Putenhälsen als Ausgangsmaterial beteiligt zu sein scheint (Abbildung 78).

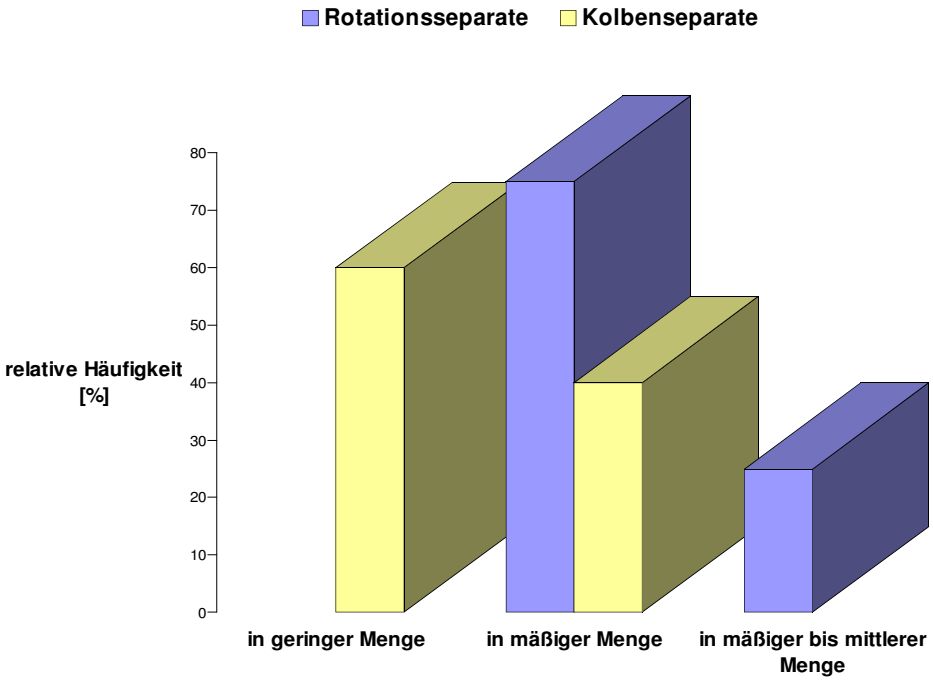


Abbildung 78: ***relative Häufigkeiten des Auftretens verschiedener Bindegewebsmengen in Abhängigkeit vom Separationsverfahren***

Eine Überprüfung der geweblichen Zusammensetzung des Rohstoffs unter Berücksichtigung der außer Skelettmuskel- und Knochengewebe autretenden histomorphologischen Strukturen führt zu durchaus bemerkenswerten Ergebnissen. Dennoch dürfte sich wohl mit Ausnahme des Knorpels der Nachweis von „Innereien“ für die Verifizierung des Separatorenfleisches wenig eignen, weil der Verdünnungseffekt solche Funde zu seltenen Ereignissen macht. Persönliche Erfahrungen aus der Routineuntersuchung zeigen bislang keinen Zusammenhang zwischen der Mitverwendung von Separatorenfleisch und dem Vorkommen von Nierengewebe in Fleischprodukten.

5.2 Physikalisch-chemische Untersuchung

5.2.1 Ergebnisse der Kalziumbestimmung

Die Tabelle 65 enthält die mittels ICP-OES bestimmten Kalziumgehalte der Proben.

Tabelle 65: ***Ergebnisse Kalziumbestimmung***

Probenmaterial/ Probennummer	***Kalziumgehalt in mg/l***	***Einwaage in g***	***Kalziumgehalt in mg/100g***
Kolbenseparat 1	11,1	3,98	28
Kolbenseparat 2	11,4	3,49	33
Kolbenseparat 3	10,8	3,89	28
Kolbenseparat 4	9,26	3,71	25
Kolbenseparat 5	19,3	3,69	52
Kolbenseparat 6	32,5	5,24	62
Kolbenseparat 7	20,2	4,62	44
Kolbenseparat 8	24,2	4,77	51
Kolbenseparat 9	23,5	4,76	49
Kolbenseparat 10	21,8	5,01	43

Probenmaterial/ Probennummer	*Kalziumgehalt in mg/l*	*Einwaage in g*	*Kalziumgehalt in mg/100g*
Kolbenseparat 11	8,46	4,80	18
Kolbenseparat 12	11,9	4,88	24
Kolbenseparat 13	7,52	3,77	20
Kolbenseparat 14	9,28	4,97	19
Kolbenseparat 15	9,63	5,25	18
Rotationsseparat 1	88,4	3,17	279
Rotationsseparat 2	99,5	3,54	281
Rotationsseparat 3	88,1	3,87	228
Rotationsseparat 4	108,8	3,32	327
Rotationsseparat 5	91,5	3,77	243
Rotationsseparat 6	28,9	3,36	86
Rotationsseparat 7	34,6	2,89	120
Rotationsseparat 8	24,9	3,17	78
Rotationsseparat 9	18,6	2,65	70
Rotationsseparat 10	30,7	3,15	97
Rotationsseparat 11	41,6	3,35	124
Rotationsseparat 12	40,7	3,76	108
Rotationsseparat 13	50,8	5,09	100
Rotationsseparat 14	32,8	4,21	78
Rotationsseparat 15	34,4	4,28	80
Rotationsseparat 16	35,7	3,86	92

Probenmaterial/ Probennummer	*Kalziumgehalt in mg/l*	*Einwaage in g*	*Kalziumgehalt in mg/100g*
Rotationsseparat 17	41,2	4,24	97
Rotationsseparat 18	38,3	4,18	92
Rotationsseparat 19	34,2	3,74	91
Rotationsseparat 20	40,5	4,03	100

Während beim Kolbenseparat Kalziumgehalte von 18 mg/100g bis 62 mg/100g gemessen werden, liegen die Ergebnisse der Kalziumbestimmung beim Rotationsseparatorenfleisch zwischen 70 mg/100g und 327 mg/100g.

Die Resultate bestätigen die Untersuchungsauswertung von STENZEL und HILDEBRANDT (2006) bei der fast alle Separatorenfleischproben 200 ppm (20mg/100g) überschritten (Tabelle 14).

Die Differenzen der Kalziumgehalte im Separationsendprodukt in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie korrelieren mit den Ergebnissen von CROSSLAND et al. (1995), bei denen wesentlich höhere Kalziumgehalte im Putenrotationsseparatorenfleisch (225,0 bis 516,2 mg/100g) im Vergleich zu Putenkolbenseparaten (34,2 bis 43,6 mg/100g) festgestellt worden sind (Tabelle 13).

Der durch die VO (EU) 2074/2005 vorgegebene Grenzwert für den höchstzulässigen Kalziumgehalt im Separatorenfleisch von 100mg/100g, bei dessen Einhaltung das Material zu Fleischzubereitungen und sämtlichen Fleischerzeugnissen verarbeitet werden darf, wird bei allen Kolbenseparaten unterschritten. Bei den Rotationseparaten sind die Werte zwar insgesamt höher, ein Erreichen oder ein Überschreiten des Grenzwerts findet jedoch nur bei der Hälfte der untersuchten Proben statt.

5.2.2 Vergleich der Kalziumbestimmung mit der phasenanalytischen Histometrie

Die Korrelationen der Ergebnisse der Kalziumbestimmung mit den Resultaten der phasenanalytischen Planimetrie sowie des konventionellen und digitalen Partikelzählverfahrens zeigen jeweils signifikante Zusammenhänge (r = .92, r = .92, r = .91, Abbildungen 79 - 81). Die Abweichungen von der Regressionsgeraden spiegeln überwiegend die Problematik der durch verschiedene Faktoren (Knochentyp, Rasse, Geschlecht und Alter der geschlachteten Tiere) bedingten Schwankungen des Kalziumgehalts im Ausgangsmaterial wieder.

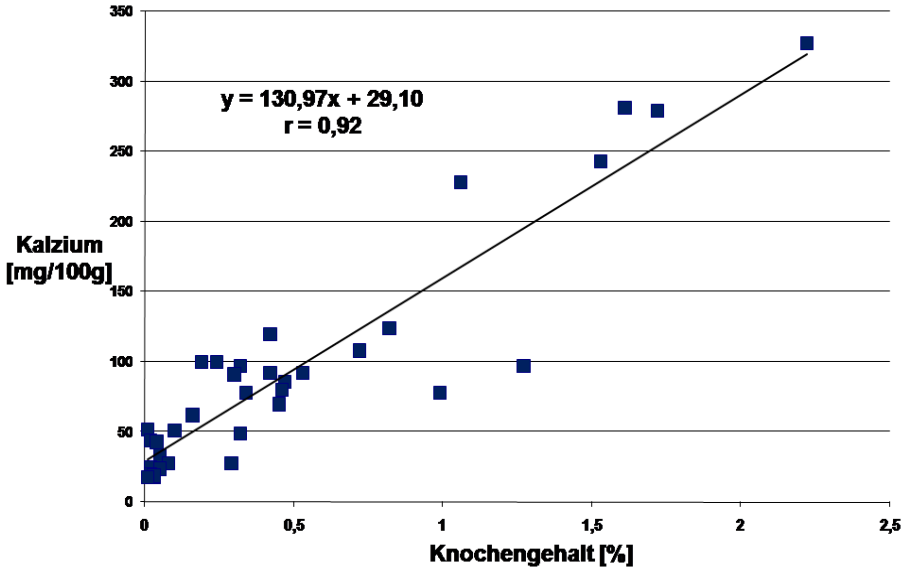


Abbildung 79: ***Korrelation zwischen der phasenanalytischen Planimetrie und der Kalziumbestimmung***

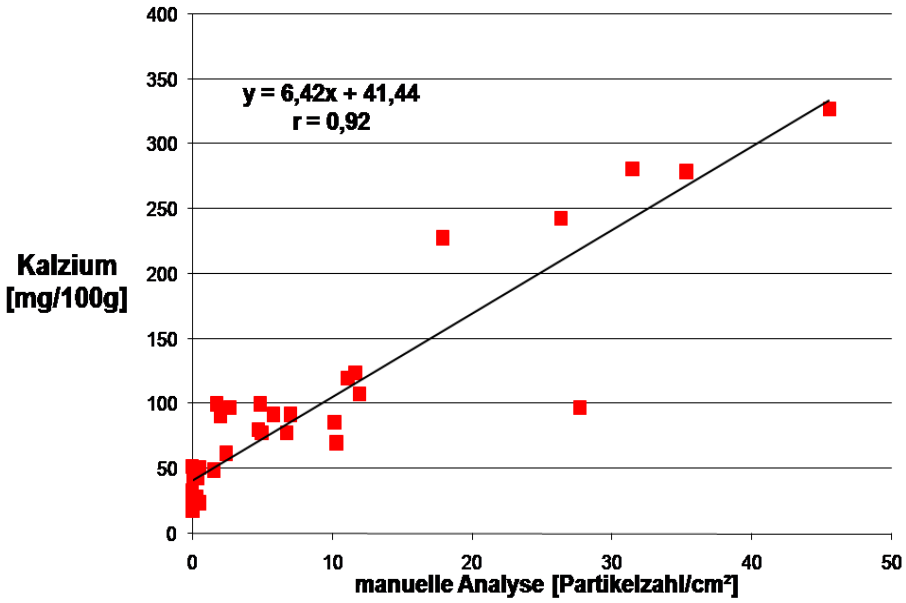


Abbildung 80: ***Korrelation zwischen dem konventionellen Partikelzählverfahren und der Kalziumbestimmung***

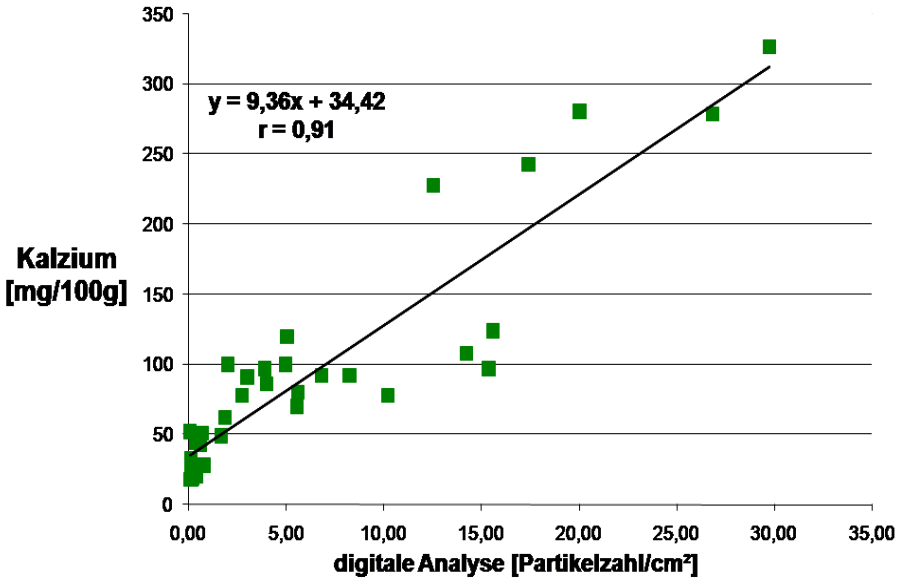


Abbildung 81: ***Korrelation zwischen dem digitalen Partikelzählverfahren und der Kalziumbestimmung***

Ein Vergleich des Knochenanteils der beiden durch die unterschiedlichen Technologien hergestellten Separatarten erbringt ähnliche Ergebnisse, wie sie bereits bei den Resultaten der histometrischen Verfahren gefunden und dargestellt wurden, nämlich das Rotationseparat weist im Vergleich zum Kolbenseparat höhere Kalziumgehalte auf (Abbildung 82).

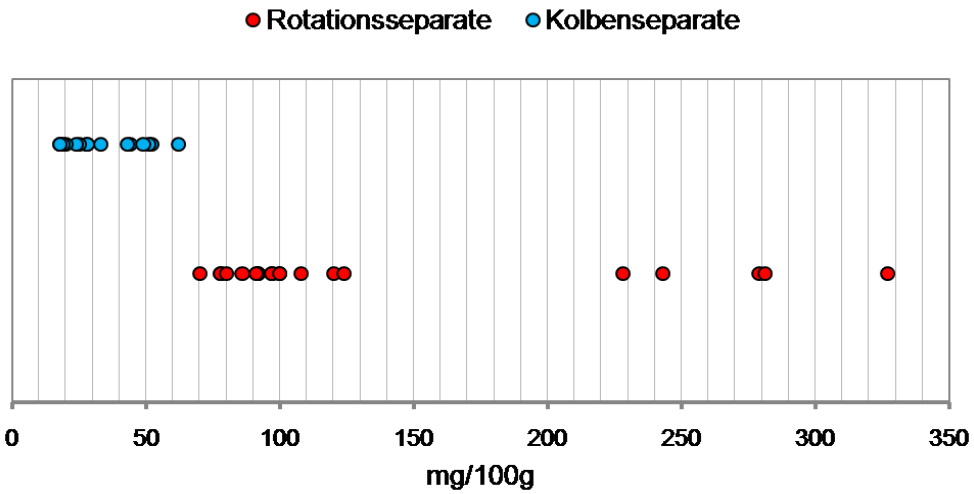


Abbildung 82: ***Vergleich des Knochenanteils in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie***

Das aus Karkassen und Flügeln hergestellte Rotationsseparat enthält den höchsten mittleren Kalziumgehalt, während bei den anderen drei kontinuierlich gewonnenen Separaten annähend ähnliche Resultate zeigen, die immer noch über den Werten der Kolbenseparate liegen (Abbildung 83).

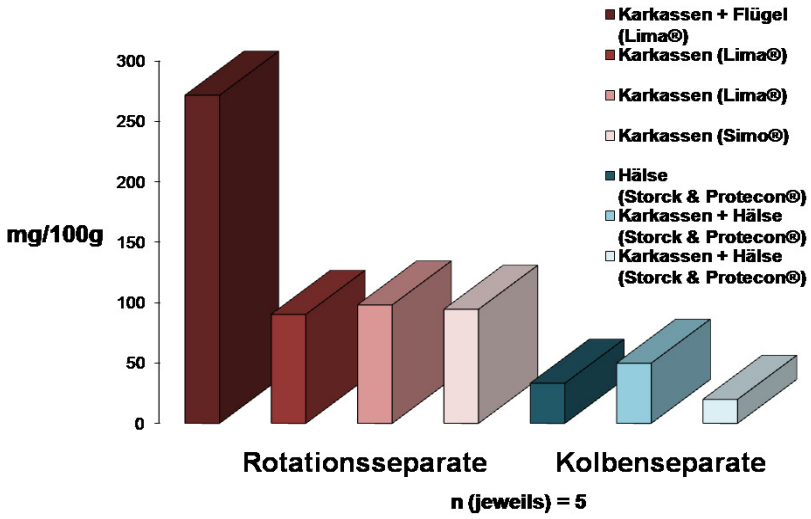


Abbildung 83: ***Knochenanteil (Kalziumbestimmung) in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial und Separatorentyp***

5.3 Schlussfolgerungen zum phasenanalytischen Verfahren

Im Gegensatz zu den chemischen Verfahren erlaubt die histologische Methodik einen direkten Nachweis der Knochensubstanz, wobei verschiedene Formen der stereometrischen Analyse durchgeführt werden können, wie z.B. die Bestimmung von Flächenanteilen, Partikelanzahl oder -durchmesser. Für die optimale mikroskopische Flächenbestimmung sollte das Prinzip der Planimetrie zur Anwendung kommen (HILDEBRANDT et al. 2006) kommen, bei dem die Flächeninhalte von Schnittebenen eines unregelmäßig begrenzten Körpers formgetreu ermittelt werden. Um die zu einer Komponente gehörenden Plana vermessen zu können, muss die Gesamtheit der Randpunkte eines jeden Elements unverzehrt registriert werden. Bei der vorgegebenen Fragestellung kann eine solche Forderung mit Hilfe automatisierter Gerätekombinationen in die Praxis umgesetzt werden, sofern sich Analyten über differenzierte Farbphasen diskriminieren und ermitteln lassen.

Während die Präzision des phasenanalytischen Verfahrens anhand der statistischen Auswertung von Mehrfachbestimmungen in Form der Wiederholbarkeit abgeschätzt wird, muss die Richtigkeit der digitalen Analytik aus dem Vergleich der erzielten Ergebnisse mit den Resultaten anderer Methoden abgeleitet werden. Präzision und Richtigkeit der Phasenanalytischen Planimetrie genügen hohen Ansprüchen.

Die softwaregestützte Phasenanalytik bietet zusätzlich die Möglichkeit, eine digitale Zählung der Knochenpartikel durchzuführen sowie Parameter wie Flächen, Equivalent Circle Diameter oder nächste Abstände zum Nachbarpartikel der einzelnen Knochenteilchen zu ermitteln und statistisch auszuwerten.

Die Grundvoraussetzung für die phasenanalytischen Verfahren der Flächenmessung, der Partikeldetektion und Partikelzählung bildet eine standardisierte Färbetechnik, die ossifiziertes Gewebe selektiv erfassen kann. Während sich die Rezeptur nach Calleja für die qualitative Lebensmitteluntersuchung am besten eignet, reicht bei dieser Tinktion der Kontrast zwischen dem hell- bis mittelblau gefärbten Kollagen und dem dunkelblau dargestellten Knochengewebe für die softwaregestützte Diskriminierung der einzelnen Komponenten nicht aus. Hier müsste zusätzlich eine – allerdings sehr aufwendige und bisher nicht versuchte – Strukturanalyse durchgeführt werden. Für die Phasenanalytik grundsätzlich prädestiniert sind die beiden amtlichen Färbungen zur selektiven darstellung von Knochen. Es handelt sich um die Trichromfärbung mit Pikrinsäure – Alizarin S – Indigocarmin (PFEIFFER et al. 1975) und die Silbernitratimprägnierung nach KOSSA modifiziert nach KÖNIGSMANN (KÖNIGSMANN 1978).

Aufgrund der systemimmanenten Probleme bei der Diskriminierung der achromatischen Farbe Schwarz kann jedoch die Färbung nach KOSSA für die digitalen Messverfahren nicht uneingeschränkt empfohlen werden. Die Vorteile der Alizarin S – Färbung liegen in der für das angewendete HSI-Farbsystem in allen Nuancen gut abgrenzbaren Farbe Rot (Knochengewebe). Darüber hinaus ist diese Tinktur in der Praxis relativ einfach und schnell durchführbar. Während eventuell auftretende Färbereste bis zu einem gewissen Grad über den Parameter Sättigung eliminiert werden können, muss das Knochengewebe zwecks einwandfreier Diskriminierung der gesuchten Fläche korrekt angefärbt sein, was die wichtigste Voraussetzung für die Erkennung dieser Komponente im gefärbten Präparat darstellt.

Beim Ausmessen der Gesamtgewebsfläche macht es sich störend bemerkbar, wenn durch Austrocknung der Präparate Lufträume auftreten. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, frische Präparate sofort einzuscannen, während die computergestützte Flächenuntersuchung gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen kann. Unter den beschriebenen Voraussetzungen ist es möglich, die Untersuchung unter pro Probendurchgang (6 Objektträger mit jeweils 2 Präparaten) einmaliger, visueller Kontrolle der Schärfe voll automatisch durchführen zu lassen, so dass die zufälligen Fehler durch das manuelle Eingreifen des Untersuchenden reduziert werden können. Die Dauer der Untersuchung beträgt bei geübtem Untersuchungspersonal pro Probe (6 Objektträger mit jeweils 2 Präparaten) ca. 15-20 Minuten, wobei das Einscannen der Schnitte die meiste Zeit beansprucht.

Als Nachteil der Histologie wird der mögliche Verlust von Knochenpartikeln durch mechanische Einflüsse bei der Herstellung der Präparate genannt (WENZEL et al. 1974; BRANSCHEID 2002). PFEIFFER et al. (1975) fanden jedoch, dass sich Teilchen unter 0,4 mm Durchmesser nicht herauslösen. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen ergab die visuelle Kontrolle der Schnitte wie auch der Färbeküvetten keinen Anhaltspunkt für einen solchen Verdacht.

5.4 Mikrobiologische Untersuchung

5.4.1 Mikrobiologisches Profil

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Profilanalyse der Proben sind in der Tabelle 66 zusammengestellt.

Tabelle 66: ***Ergebnisse der mikrobiologischen Profilanalyse (Kolbenseparate; n = 15)***

	KbE/g							
Keimgruppe	***< 10^1***	***< 10^2***	***< 10^3***	***< 10^4***	***< 10^5***	***< 10^6***	***< 10^7***	***< 10^8***
aerobe mesophile Koloniezahl (PC-Agar)	-	-	-	-	6	5	3	1
aerobe mesophile Koloniezahl (Blutagar)	-	-	-	-	4	7	3	1
Entero-bakteriazeen (VRBG-Agar)[1)]	-	-	-	6	5	1	2	-
Pseudomonaden (GSP-Agar)	-	2	8	4	1	-	-	-
***E.coli* (Petrifilm)**	-	-	9	1	-	5	-	-
Staphylokokken (Petrifilm)	-	-	6	8	1	-	-	-
Clostridien (TSC-Agar)	7	-	4	2	2	-	-	-
Milchsäure-bakterien (MRS-Agar)	-	-	-	4	11	-	-	-
***Bacillus cereus* (Mossel-Agar)**	15	-	-	-	-	-	-	-
Enterokokken (CATC-Agar)	-	-	-	12	3	-	-	-

[1)] 1x nicht auswertbar

Tabelle 67: ***Ergebnisse der mikrobiologischen Profilanalyse (Rotationsseparate; n = 20)***

	KbE/g							
Keimgruppe	***< 10^1***	***< 10^2***	***< 10^3***	***< 10^4***	***< 10^5***	***< 10^6***	***< 10^7***	***< 10^8***
aerobe mesophile Koloniezahl (PC-Agar)	-	-	-	-	14	6	-	-
aerobe mesophile Koloniezahl (Blutagar)	-	-	-	3	15	2	-	-
Entero-bakteriazeen (VRBG-Agar)[1)]	-	-	-	7	10	-	-	-
Pseudomonaden (GSP-Agar)	9	-	1	3	6	1	-	-
***E.coli* (Petrifilm)**	-	-	1	12	7	-	-	-
Staphylokokken (Petrifilm)	3	-	7	5	5	-	-	-
Clostridien (TSC-Agar)	7	-	7	6	-	-	-	-
Milchsäure-bakterien (MRS-Agar)	2	-	3	6	9	-	-	-
***Bacillus cereus* (Mossel-Agar)**	20	-	-	-	-	-	-	-
Enterokokken (CATC-Agar)	2	-	8	7	3	-	-	-

[1)] 3x nicht auswertbar

Bei der Besprechung der Ergebnisse werden zunächst diejenigen Keimgruppen abgehandelt, für die amtliche oder zumindest publizierte Grenzwerte vorliegen.

Die ermittelten Gesamtkeimzahlen, bei denen ähnliche Resultate zwischen dem Wachstum auf dem Plate Count - Agar und Blutagar vorliegen, streuen insgesamt von 1,2 x 10^4 - 1,1 x 10^7 KbE/g (PC-Agar; Abbildung 84) und von 7,7 x 10^3 – 1,1 x 10^7 KbE/g (Blutagar; Abbildung 85). Während die meisten Proben Keimdichten im Bereich bis zu 5 x 10^5 KbE/g aufweisen, sind die Gesamtkeimzahlen bei fünf Kolbenseparaten deutlich erhöht (6,2 x 10^5 – 1,1 x 10^7 KbE/g). Die Ursache hierfür liegt mit großer Wahrscheinlichkeit im verwendetem Ausgangsmaterial, das sich aus Putenhälsen zusammensetzt und bei dem die hohe Kontaminationsrate mit der Wasserbad-Betäubung und dem abfließenden Brühwasser bei den „kopfüber“ gehängten Tierkörpern während des Schlachtprozesses im Zusammenhang stehen dürfte (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG 2003).

Um zur Herstellung von Fleischzubereitungen und sämtlichen Fleischerzeugnissen verwendet werden zu dürfen, müssen bei dem maschinell hergestellten Rohstoff, unabhängig von der Gewinnungstechnologie, mikrobiologische Hygienekriterien nach der VO (EU) 2073/2005 (Tabelle 2) erfüllt sein. Der dort vorgegebene Grenzwertbereich für das erste Kriterium, die aerobe mesophile Keimzahl (5 x 10^5 - 5 x 10^6 KbE/g), wird bei den Proben bis auf die aus Putenhälsen hergestellten Kolbenseparate eingehalten.

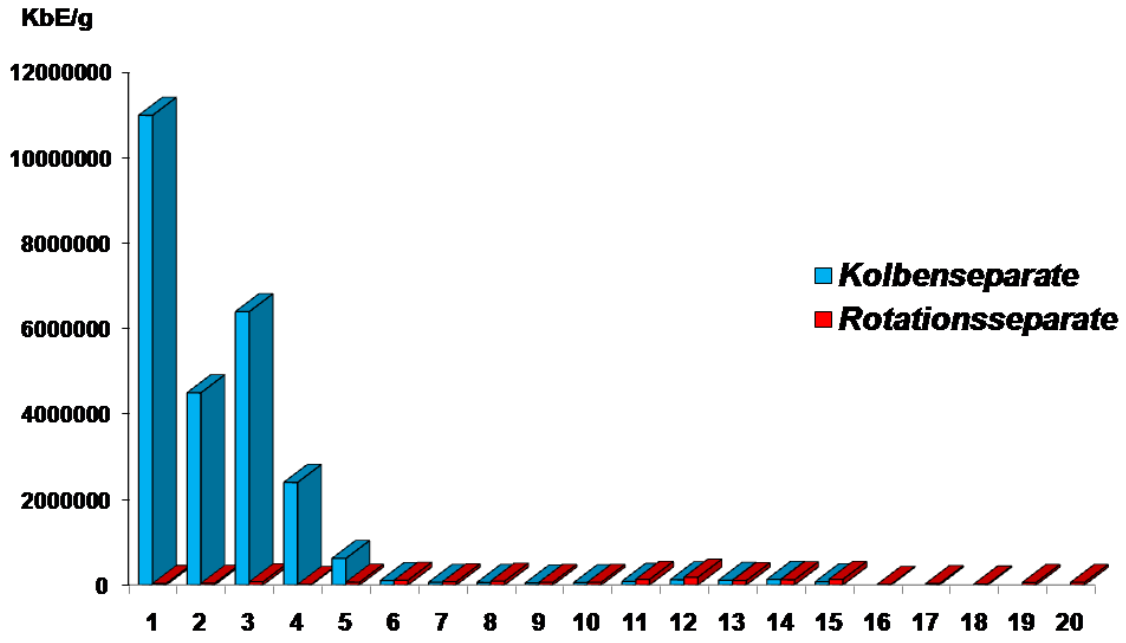


Abbildung 84: ***Häufigkeit der aeroben mesophilen Keimzahlen (Plate Count – Agar)***

Die von WITTMANN (1977) für die Gesamtkeimzahl beim Geflügelseparatorenfleisch gefundenen Werte von 2,6 x 10^6 - 1,0 x 10^7 KbE/g erreichen nur drei aus Putenhälsen gewonnene Kolbenseparate. Bis auf vier (KS 1 – 4) bzw. fünf Ausnahmen (KS 1 – 5) liegen bei allen anderen Proben die Gesamtkeimzahlen unter den von BEM und LEISTNER (1974; 2,0 x 10^6 KbE/g) bzw. OSTOVAR et al. (1971; 3,25 x 10^5 KbE/g) ermittelten Werten (Kapitel 2.5.3).

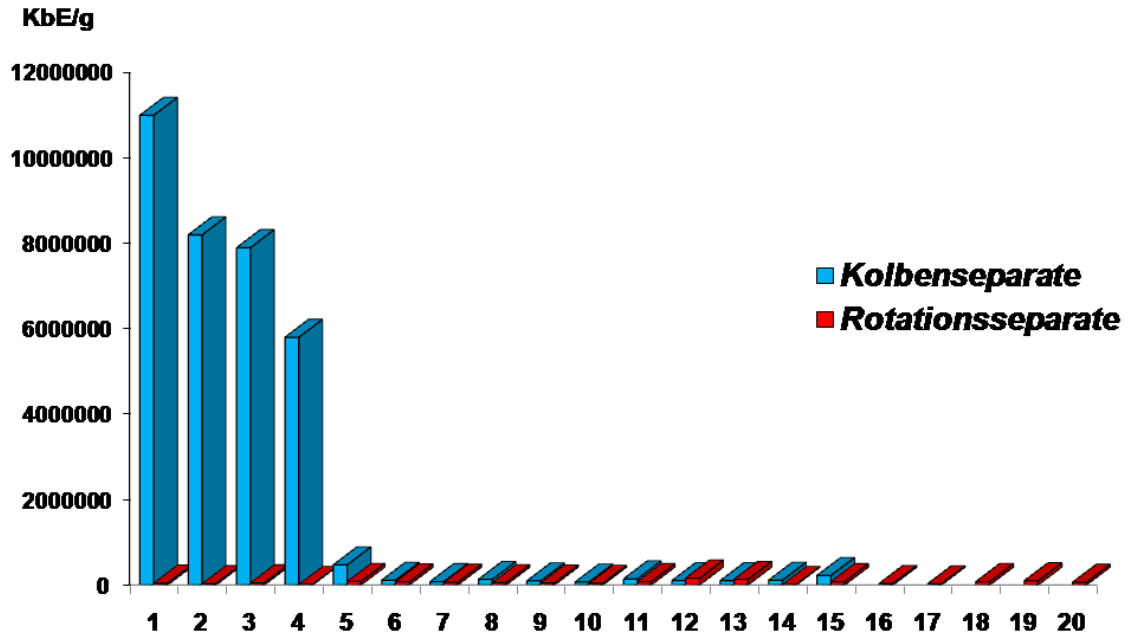


Abbildung 85: ***Häufigkeit der aeroben mesophilen Keimzahlen (Blutagar)***

Das zweite Hygienekriterium der VO (EU) 2073/2005 bezieht sich auf die als Indikator für eine fäkale Verunreinigung fungierende Kontamination mit *Escherichia coli* (m = 50 KbE/g, M = 500 KbE/g). Die Kontaminationsraten mit *Escherichia coli* erstrecken sich zwischen 2,0 x 10^2 und 1,8 x 10^5 KbE/g (Abbildung 86), wobei auch hier die höchsten Wachstumszahlen bei den aus Putenhälsen hergestellten Kolbenseparaten (> 10^5 KbE/g) verzeichnet werden. Der Wert für die Gute Hygienepraxis m wird von allen Proben überschritten, 91 % der Proben liegen sogar höher als M (Abbildung 87). Letztere dürften bereits auf Grund dieses Einzelergebnisses nur für erhitzte Fleischerzeugnisse verwendet werden.

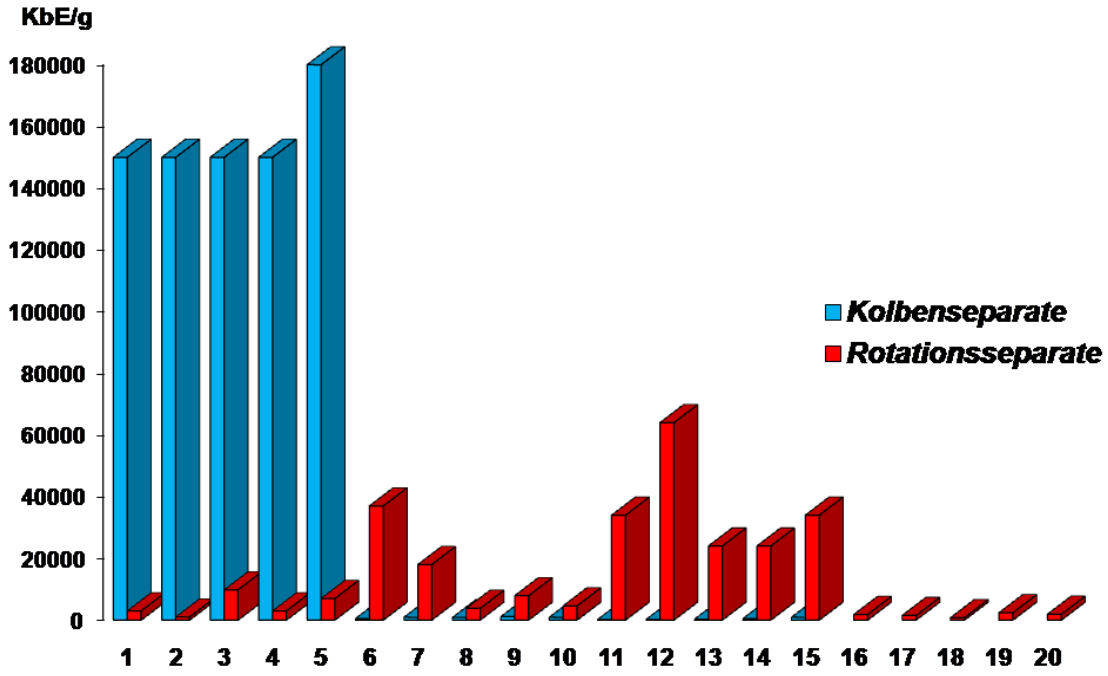


Abbildung 86: ***Häufigkeit der E. coli – Keimzahlen (Petrifilm)***

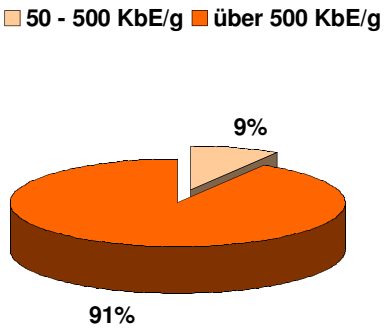


Abbildung 87: ***prozentuale Verteilung der Kontaminationsrate mit E. coli in Bezug auf die durch die VO (EU) 2073/2005 vorgeschriebenen m/M – Werte***

Weitere Kriterien zur Beurteilung des mikrobiologischen Status lassen sich aus den Richt- und Warnwerten zur Beurteilung von ungewürztem Hackfleisch auf Handelsebene der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie als vergleichbar zerkleinertem Produkt ableiten (Tabelle 68, EISGRUBER und BÜLTE 2006).

Tabelle 68: ***Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von ungewürztem Hackfleisch auf Handelsebene (DGHM)***

	Richtwert (KbE/g)	***Warnwert (KbE/g)***
Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl	$5x10^6$	-
Pseudomonaden	$1x10^6$	-
Enterobacteriaceae	$1x10^4$	$1x10^5$
Escherichia coli	$1x10^2$	$1x10^3$
Koagulase-positive Staphylokokken	$5x10^2$	$5x10^3$
Salmonellen	-	nicht nachweisbar in 25 g
Listeria monocytogenes	-	$1x10^2$

Bei den Pseudomonaden erreichte keine der Proben den von der DGHM vorgeschlagenen Richtwert (Abbildung 88). Die Resultate bewegen sich in einer Größenordnung von < 10 bis 10^5 KbE/g, am häufigsten in den Bereichen unter 10 KbE/g sowie von 10^2 bis 10^4 KbE/g.

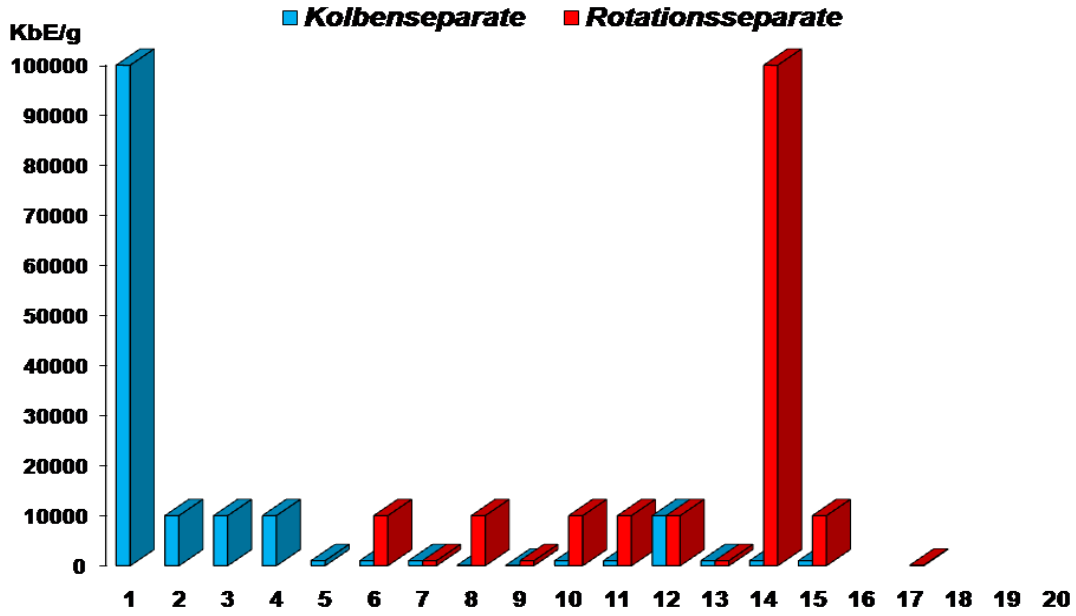


Abbildung 88: ***Häufigkeit der Pseudomonaden - Keimzahlen (GSP - Agar)***

Dagegen wird in 48 % der Separate der Richtwert für *Enterobacteriaceae* überschritten, während sich bei weiteren 10 % der Proben - und zwar bei drei aus Putenhälsen gewonnenen Kolbenseparaten - auch noch eine Überschreitung des Warnwertes ergibt (Abbildung 89).

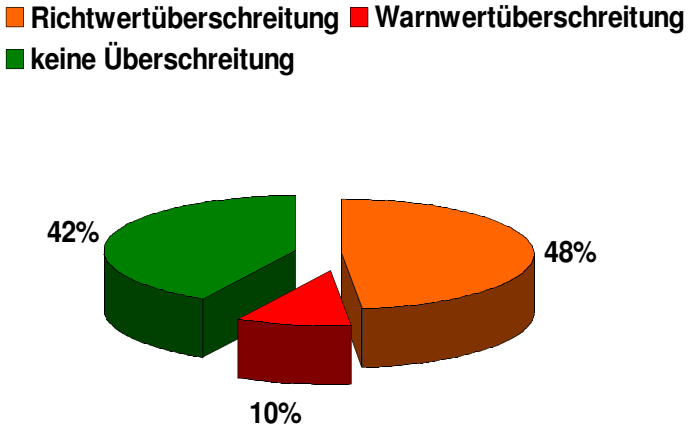


Abbildung 89.: ***prozentuale Verteilung der Kontaminationsrate mit Enterobacteriaceae in Bezug auf den DGHM - Richt- und Warnwert (4 Proben blieben wegen unmöglicher Auswertbarkeit unberücksichtigt)***

Die Abbildung 90 zeigt die ermittelten Enterobacteriaceae-Keimzahlen, die sich zwischen 1,6 x 10^3 und 4,9 x 10^6 KbE/g erstrecken.

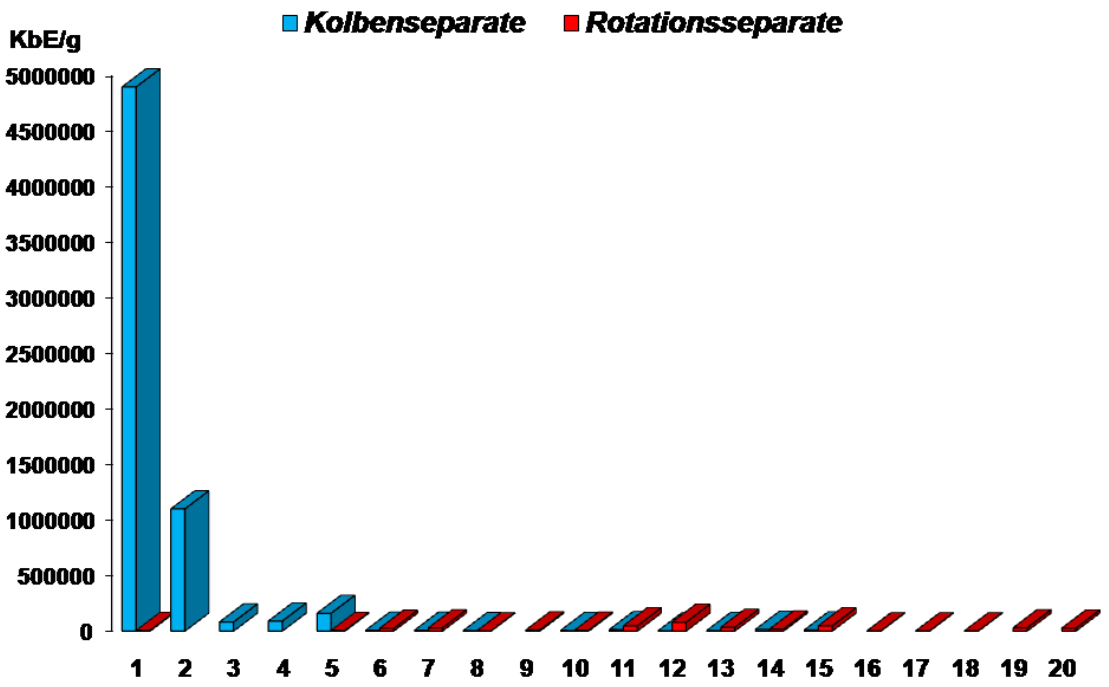


Abbildung 90: ***Häufigkeit der Enterobacteriaceae - Keimzahlen (VRBG - Agar)***

Im Hinblick auf die im Bericht des Wissenschaftlichen Veterinärausschusses der Europäischen Union veröffentlichten Grenzwerte für *Enterobacteriaceae* von m = 5 x 10^4 KbE/ g und M = 5 x 10^5 KbE/g (EUROPEAN COMMISSION 1997, Tabelle 21) sind bei zwei Proben die Ergebnisse nicht mehr akzeptabel. Während vier Separate im Grenzwertbereich liegen, erbringen bis auf die vier nicht auswertbaren Proben alle Übrigen zufriedenstellende Ergebnisse.

Bis auf zwei deutlich erhöhte Resultate liegen die *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen der untersuchten Proben in dem von WITTMANN (1977, Tabelle 20) beim Geflügelseparatorenfleisch ermittelten Bereich von 8,6 x 10^2 – 4,1 x 10^5 MO/g.

Die Häufigkeitsverteilung der Keimzahlen der koagulase-positiven Staphylokokken von < 10 bis 2,0 x 10^4 KbE/g verdeutlicht Abbildung 91.

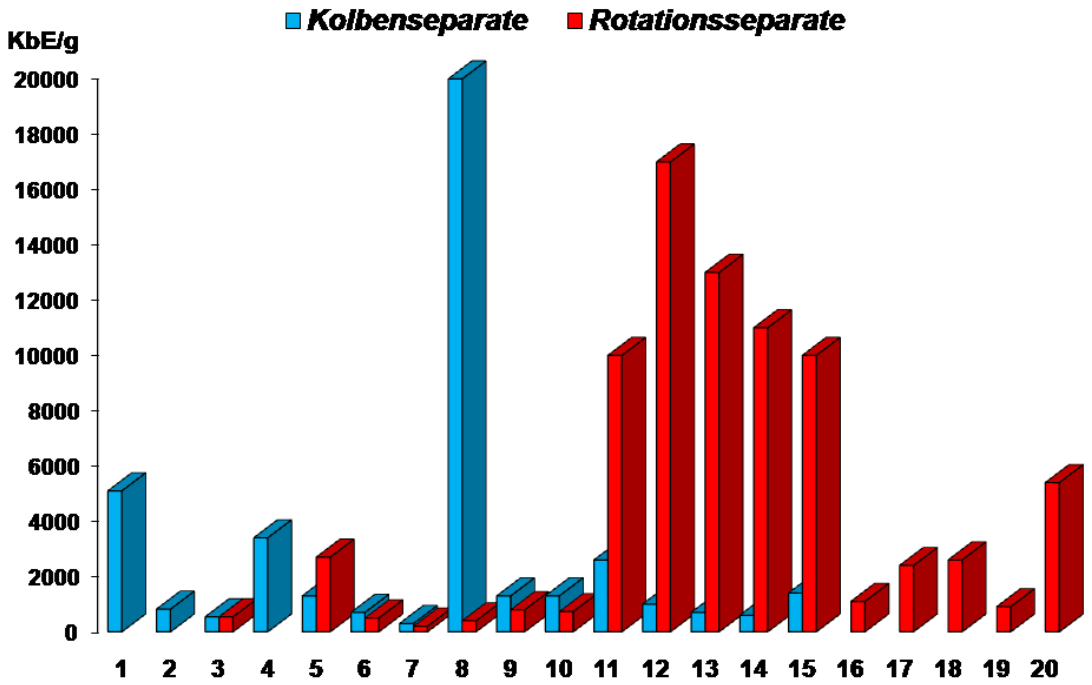


Abbildung 91: ***Häufigkeit der koagulase-positiven Staphylokokken - Keimzahlen (Petrifilm)***

Der Richtwert der DGHM für koagulase-positive Staphylokokken beträgt 5 x 10^2 KbE/g. Eine Überschreitung kann bei 63 % der Proben nachgewiesen werden. 20 % der Separate überschreiten sogar den Warnwert von 5 x 10^3 (Abbildung 92).

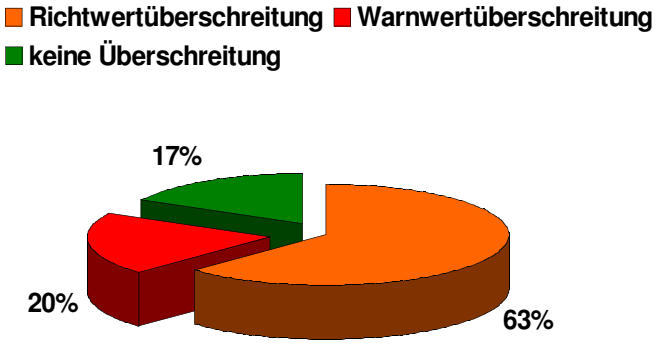


Abbildung 92: ***prozentuale Verteilung der Kontaminationsrate mit koagulase-positiven Staphylokokken in Bezug auf den DGHM – Richt- und Warnwert.***

Im Vergleich zu den von WITTMANN (1977, Tabelle 20) ermittelten Staphylokokkenkeimzahlen beim Geflügelseparatorenfleisch fallen bei den untersuchten Proben 19 Ergebnisse zum Teil wesentlich höher aus, während 13 Bestimmungen bis auf die 3 Proben, bei denen kein Wachstum festgestellt werden konnte, ähnliche Resultate liefern.

Die Keimbelastung mit Clostridien von < 10 bis 1,3 x 10^4 ist schematisch in den Abbildungen 93 und 94 dargestellt. Unter der Berücksichtigung, dass sich *Clostridium perfringens* bei ungenügender Kühlung in zubereiteten Speisen wie z.B. Geflügelsalaten innerhalb weniger Stunden auf zur Auslösung von Intoxikationserscheinungen ausreichende Konzentrationen von > 10^6 KbE/g Lebensmittel vermehren können (KRÄMER 2002), verdienen die z.T. hohen Keimzahlen dieses Erregers in den Separatorenfleischproben Aufmerksamkeit.

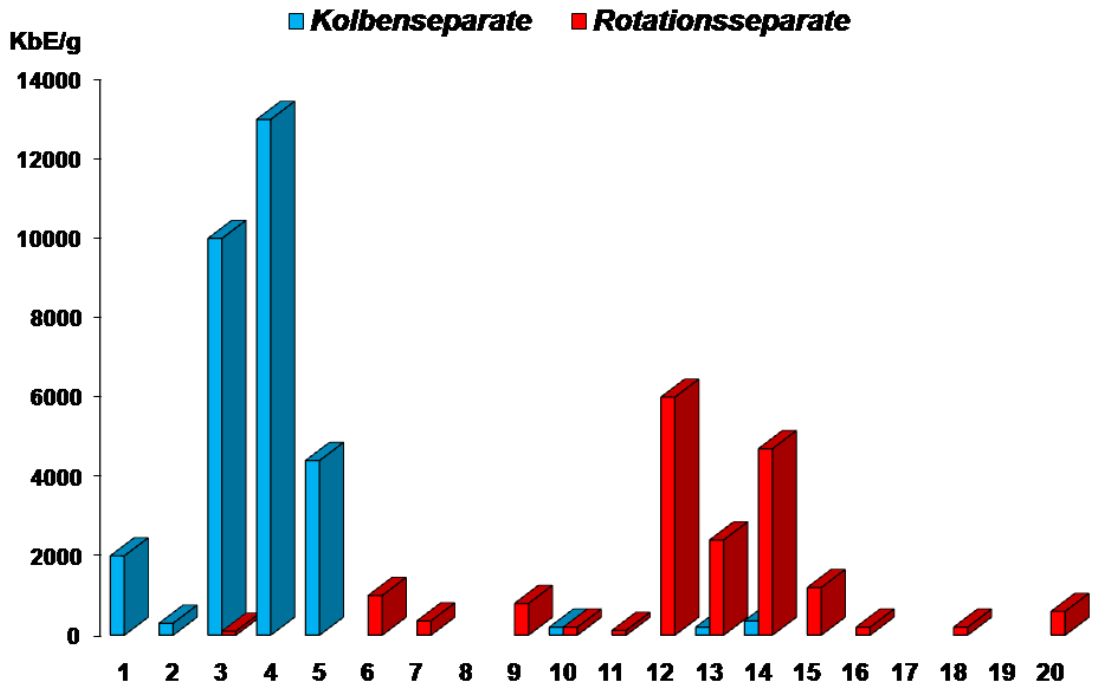


Abbildung 93: ***Häufigkeit der Clostridien - Keimzahlen (TSC - Agar)***

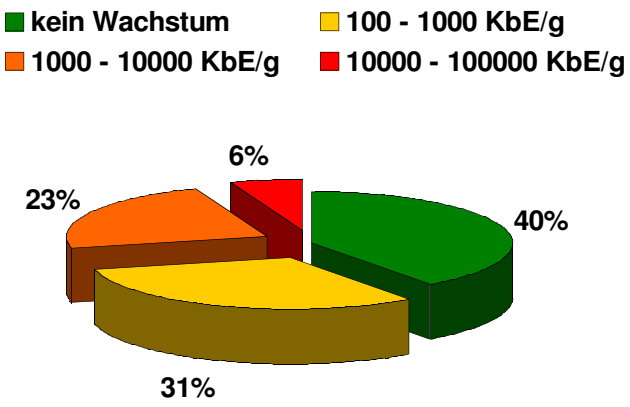


Abbildung 94: ***prozentuale Verteilung der Kontamination mit Clostridien***

Ein Wachstum von *Bacillus cereus* kann bei keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Dagegen wird eine Belastung des Separatorenfleisches mit Enterokokken in 94 % der Proben festgestellt. Diese Tatsache lässt auf mangelnde hygienische Bedingungen bei der Gewinnung des Rohstoffs schließen (Abbildungen 95 und 96).

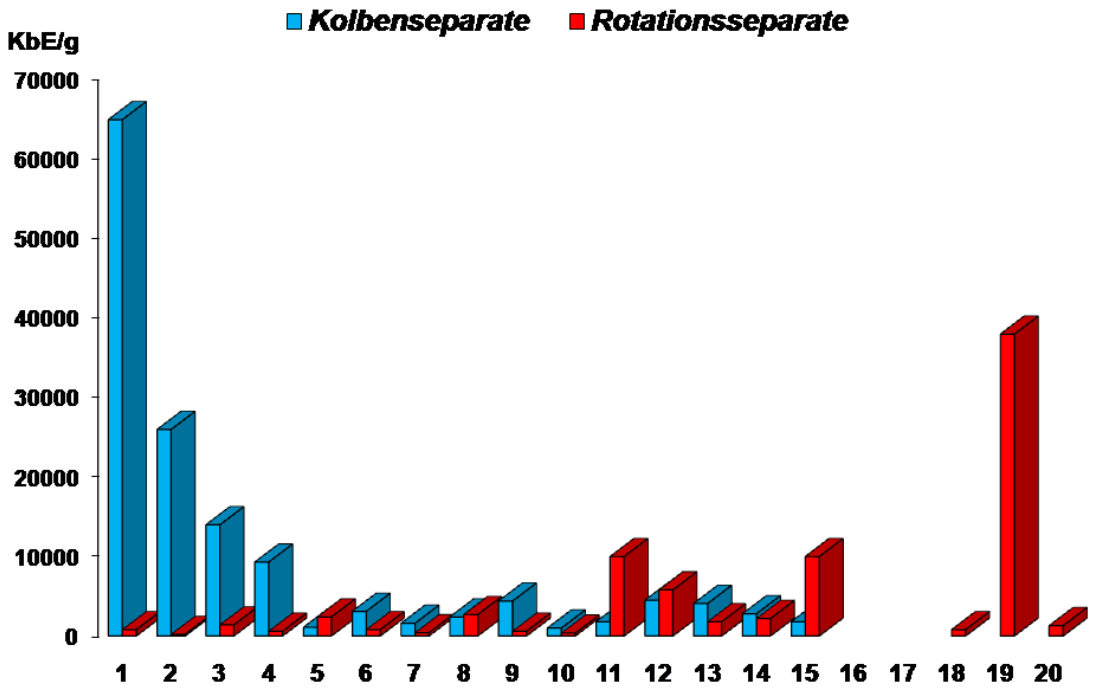


Abbildung 95: ***Häufigkeit der Enterokokken – Keimzahlen (CATC - Agar)***

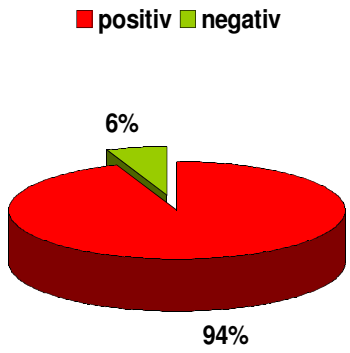


Abbildung 96: ***prozentuale Verteilung der Kontamination mit Enterokokken***

Die im Bericht des Wissenschaftlichen Veterinärausschusses der Europäischen Union veröffentlichten Grenzwerte für Enterokokken von 5 x 10^3 – 5 x 10 10^4 KbE/g (EUROPEAN COMMISSION 1997, Tabelle 21) führen bei einer der untersuchten Proben zu einem inakzeptablen Ergebnis. Während sich 25 Untersuchungsergebnisse im Grenzwertbereich befinden, sind nur 7 Bestimmungen zufriedenstellend.

Einen anderen Eindruck vermittelt der Vergleich mit den von WITTMANN (1977, Tabelle 20) für Fäkal-Steptokokken gefundenen Werten. Hier ergeben sich nur bei 7 Proben ähnliche Resultate im Bereich von 9,3 x 10^3 – 6,5 x 10^4 KbE/g, 26 Untersuchungsergebnisse liegen niedriger.

Die Ergebnisse der Keimstatuserhebung zeigen, dass die hygienischen Bedingungen bei der Gewinnung des Separatorenfleisches unabhängig von der Gewinnungsart und dem Verwendungszweck verbessert werden müssen. Darüber hinaus besteht ein Restrisiko für eine Lebensmittelintoxikation durch koagulase-positive Staphylokokken und *Clostridium perfringens*, sofern enterotoxinogene Stämme vorliegen und sich die Keime im Laufe der Verarbeitung des Rohstoffs und der Lagerung der daraus hergestellten Erzeugnisse weiter vermehren.

5.4.2 Pathogene Keime

Die Ergebnisse der Untersuchungen auf S*almonella* und *Campylobacter* spp. sowie *Listeria monocytogenes* sind in Tabellen 69 und 70 zusammengefasst.

Tabelle 69: ***Häufigkeit pathogener Keime (Kolbenseparate; n = 15)***

Keim	***nachgewiesen***	***nicht nachgewiesen***
Salmonella spp.	7	8
Listeria monocytogenes	0	15
Campylobacter spp. (3 Poolproben jeweils aus 5 Proben)[1)]	0	2 Poolproben (n=5)

[1)] 1 Poolprobe (n = 5) nicht auswertbar (Überwucherung durch *Proteus* spp.)

Tabelle 70: ***Häufigkeit pathogener Keime (Rotationsseparate; n = 20)***

Keim	***nachgewiesen***	***nicht nachgewiesen***
Salmonella spp.	2	18
Listeria monocytogenes	0	20
Campylobacter spp. (3 Poolproben jeweils aus 5 Proben)	1 Poolprobe (n = 5)	3 Poolproben (n = 5)

Eine Belastung des maschinell gewonnenen Fleisches mit Salmonellen kann bei 26 % der untersuchten Proben nachgewiesen werden (Abbildung 97).

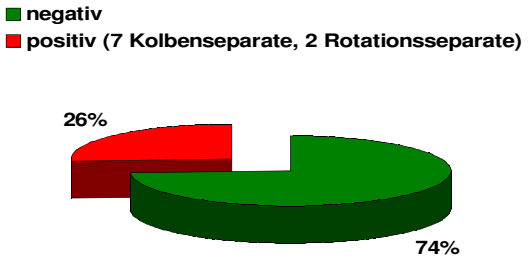


Abbildung 97: ***Nachweisquote von Salmonella spp. bei den untersuchten Proben***

Dieser relativ hohe Anteil an *Salmonella*-kontaminiertem Rohstoff stimmt mit den Untersuchungen an Hähnchenseparatorenfleisch von CARVALHO und CORTEZ (2005,Tabelle 22). Die Untersuchung auf das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* verläuft stets negativ. Lediglich bei einer Poolprobe von fünf Rotationsseparaten (14 %; n = 30) wird *Campylobacter* spp. identifiziert (Abbildung 98).

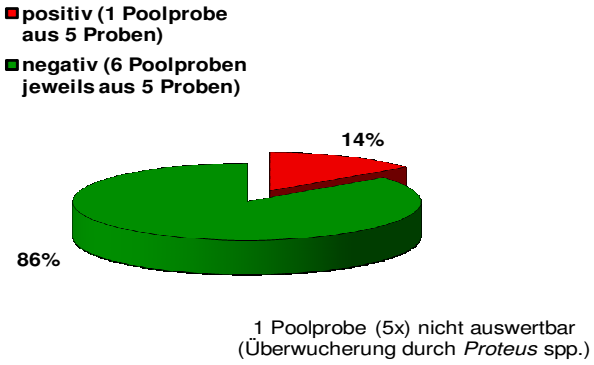


Abbildung 98: ***Nachweisquote von Campylobacter spp. bei den untersuchten Proben***

Der Nachweis von Salmonellen und *Campylobacter* stellt jedoch kein Spezifikum für Separatorenfleisch dar, weil diese Keime stets im Geflügelfleisch vorkommen können, wie die Ergebnisse der Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen bei deutschem Nutzgeflügel und Geflügelfleisch durch ELLERBROEK et al. (2001) bestätigen. Die niedrige Isolierungsquote für *Campylobacter* spp. steht sogar im Widerspruch zu der meist höheren Belastung von Geflügelfleisch, wie sie beispielsweise bei 356 untersuchten rohen Geflügelfleischproben mit 32 % von ADAM et al. (2006) angegeben wurde.

5.5 Schlussfolgerungen zur Statuserhebung von Putenseparatorenfleisch

Bezüglich des Einflusses der Herstellungstechnologie auf die substantielle Zusammensetzung zeigt die Statuserhebung des Putenseparatorenfleisches erhebliche Unterschiede sowohl in Bezug auf den Kalziumgehalt als auch hinsichtlich des Auftretens von Knochengewebe im gewonnenen Rohstoff auf. Zusätzlich werden diese Differenzen durch die Veränderung der technischen Einstellungsparameter in den Separationsanlagen sowie die Art der verwendeten Ausgangsmaterialien modifiziert. Unter kontrollierten Bedingungen ist es allerdings heutzutage möglich, Geflügelseparatorenfleisch herzustellen, welches niedrige Kalziumgehalte und kaum Knochenpartikel aufweist. Die untersuchten Kolbenseparate erfüllten in den meisten Fällen diese beiden Qualitätskriterien.

Unabhängig von der Gewinnungstechnologie zeigen jedoch alle untersuchten Proben immense hygienische Mängel auf, die vordergründig auf die Herstellungspraxis zurückzuführen sind. Hohe Kontaminationsraten mit *Escherichia coli* bei allen Separaten sowie in unterschiedlicher Ausprägung festgestellte Belastung des Rohstoffs mit Gesamtkeimzahlen, *Enterobacteriaceae*, koagulase-positiven Staphylokokken, Clostridien und Enterokokken erfordern dringend eine Verbesserung der Gute Hygiene – Praxis auf diesem Sektor. Eine Investitionshemmnis auf dieser Stufe des Schlachtprozesses bildet allerdings die Problematik der Marktfähigkeit des maschinell gewonnenen Rohstoffs, die wiederum unmittelbar einen Zusammenhang zu der Deklarationsfrage aufweist. Unabhängig davon sind umgehend Veränderungen bei der Hygiene der Separatorenfleischgewinnung notwendig, falls das maschinell gewonnene Restfleisch in Fleischzubereitungen und rohen Fleischerzeugnissen zur Verwendung kommen soll (VO (EG) 853/2004, VO (EG) 2073/2005 und VO (EG) 2074/2005).

Die Untersuchungen der Proben in Bezug auf das Vorkommen pathogener Keime wie *Salmonella* und *Campylobacter* spp. erbrachten lediglich ausgangsmaterialimmanente Resultate. Hier gelten langfristig die analogen Ansätze zur Verminderung der Kontaminationsrate mit diesen Keimen, wie sie im Allgemeinen beim Geflügelfleisch angestrebt wird.

Inwieweit die in dieser Arbeit erhobenen Qualitätsmerkmale des Putenseparatorenfleisches vor allem in mikrobiologischer Hinsicht künftig verbessert werden, hängt im Wesentlichen von der Auseinandersetzung um das Image und die Bewertung dieses Rohstoffes unter der Berücksichtigung der zahlreichen technologischen, mikrobiologischen, analysetechnischen, juristischen, ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkte ab (HILDEBRANDT und KÖPERNIK 2007).

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Qualitätsmerkmale von Separatorenfleisch am Beispiel eines von Puten gewonnen Produkts auf ihre Aussagekraft überprüft werden. Die Statuserhebung an 35 Putenseparaten, die mit der Kolben- oder der Rotationstechnologie gewonnen wurden, erfolgte in Hinblick auf das Kriterium Knochen/histometrisch (digitale Flächenermittlung und Partikelanalyse, konventionelle Partikelzählung im histologischen Schnitt) und Knochen/chemisch (Kalziumbestimmung). Darüber hinaus wurde bei den Proben die gewebliche Zusammensetzung mikroskopisch erfasst und ihr mikrobieller Status ermittelt.

Verbunden mit dieser Statuserhebung lag der zweite Schwerpunkt der Arbeit in der Erprobung der Phasenanalytik in Form einer softwaregestützten Flächenmessung und Partikelanalyse. Dazu wurden die digital ermittelten Ergebnisse mit den Resultaten der beiden Referenzmethoden, dem konventionellen Partikelzählverfahren sowie der Kalziumbestimmung verglichen.

Als wesentliche Ergebnisse sind herauszustellen:

1. Bei allen angewandten Methoden zeigte sich, dass die Kolbenseparation geringere Gehalte an Knochegewebe im Vergleich zur Rotationstechnologie liefert. Weiterhin scheint es innerhalb der beiden Separatgruppen einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der Knochenpartikel und dem verwendeten Ausgangsmaterial zu geben, wobei sich Putenflügel als besonders ungünstig erwiesen. Die Verarbeitung des durch Rotation separierten Fleisches durfte bei dem üblichen Rezepturanteil auch zu erhöhten Anteilen im fertigen Erzeugnis führen, während der durch Kolbenseparatoren gewonnene Rohstoff aufgrund der teilweise recht geringen Knochenanteile im Endprodukt kaum nachzuweisen ist.

2. Der Kalziumgehalt von über zwei Dritteln der untersuchten Proben lag unter dem von der VO (EU) 2074/2005 vorgegebenen Grenzwert von 100 mg / 100 g. Überschreitungen dieser großzügigen Norm kamen lediglich bei Rotationseparaten vor.

3. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung dokumentieren nachdrücklich, dass die hygienischen Bedingungen bei der Gewinnung der Separate verbessert werden müssen. *Escherichia coli* als Hygieneparameter gemäß VO (EU) 2073/2005 wurde in sämtlichen Proben in Konzentrationen über dem Grenzwert von 50 KbE/g nachgewiesen. In Hinblick auf eine Gesundheitsgefährdung sind die teilweise hohen Keimzahlen von koagulase-positiven Staphylokokken und Clostridien zu beachten.

4. Salmonellen konnten aus 9 / 35 Proben isoliert werden, *Campylobacter* spp. dagegen nur aus einer Poolprobe und *Listeria monocytogenes* ließ sich überhaupt nicht nachweisen.

5. Die qualitative und semiquantitative histologische Untersuchung ergab zwar Differenzen im Vorkommen von Knorpelgewebe, Nierenstrukturen und Kollagenanteilen bei den einzelnen Proben, die eine Abhängigkeit von der Separationsstechnologie und den verwendeten Ausgangsmaterialien erkennen ließen, doch genügen diese Hinweise nicht zur Separatorenfleischdiagnose und erst recht nicht für seine Zuordnung zu bestimmten Verfahren und Knochensorten.

6. Für die automatisierte Knochenflächenbestimmung wurden die Paraffinschnitte gemäß Amtlicher Methodensammlung nach § 64 LFGB mit Alizarin-S gefärbt (PFEIFFER et al. 1975). Während sich Knochengewebe bei dieser Farbrezeptur orange-rot darstellt, erscheint das restliche Gewebe blau. Auf die Verwendung der Kossa-Färbung (KÖNIGSMANN 1978) als Alternative wurde verzichtet, da sich nach den Ergebnissen der Vorversuche beim verwendeten additiven HSI-System Probleme mit der „unbunten“ Farbe Schwarz bei der automatisierten Phasenanalyse ergaben. Bei der praktischen Durchführung wurden die 60 Einzelbilder eines histologischen Präparates automatisch mit der Digitalkamera sukzessiv eingescannt und zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Danach erfolgte die Zuordnung, Markierung und Flächenmessung der zwei gesuchten Gewebskomponenten über die HSI-Parameter mit paralleler visueller Kontrolle.

7. Die Partikelanalyse erwies sich als hilfreich zur Beurteilung der Partikelhomogenität in Bezug auf die Parameter Einzelfläche und Equivalent Circle Diameter sowie die Neigung der Partikel, so genannte Knochennester zu formen. Die bei kontinuierlich hergestellten Separaten geringeren Streuungen der einzelnen Merkmale deuten auf eine größere morphologische Homogenität und Tendenz zur Knochennesterbildung hin.

8. Die Resultate der digitalen mikroskopischen Phasenanalyse und der Referenzmethoden korrelieren bei der Bestimmung des Knochenanteils trotz der differierenden Bezugsgrößen und unterschiedlicher analytischer Ansätze sehr eng miteinander. Die Regressionsanalyse zeigt einen hoch signifikanten Zusammenhang (Signifikanzniveau stets < .001) sowohl zwischen der phasenanalytischen Flächenbestimmung und der manuellen Partikelzählung ($r = .96$) als auch zur chemischen Methode ($r = .92$). Ein Vergleich des konventionellen mit dem phasenanalytischen Partikelzählverfahren erbrachte ebenfalls eine gesicherte Korrelation ($r = .95$).

   Insgesamt lassen sich aus den Untersuchungsergebnissen sehr enge Beziehungen zwischen den unterschiedlichen Analysetechniken ableiten. Eine standardisierte, kontrastreiche Färbung stellt dabei die wichtigste Voraussetzung dar, um der Software eine fehlerfreie Diskriminierung der gesuchten Flächen zu ermöglichen. Diese Prämisse erfüllt die Alizarin-S-Färbung weitgehend. Für die wenigen fehlgefärbten Partien wäre zwar eine Korrektur für jeden Schnitt bzw. jede Probe grundsätzlich möglich, allerdings würde dadurch die Automatisierung des Verfahrens beeinträchtigt und Manipulationen durch das Personal notwendig werden. Gerade dieses individuelle Eingreifen sollte sich jedoch durch einen vollständig standardisierten Aufbereitungs- und Untersuchungsgang erübrigen, damit die aus der Point count Technik bekannten personengebundenen Fehler vermieden werden. Welcher Grad an Perfektion sich bei weiterer Erprobung erreichen lässt, ist noch nicht abzuschätzen, doch genügt das Verfahren bereits jetzt den Anforderungen an eine zuverlässige Methode und kann daher für die Routineanalytik empfohlen werden.

7 Summary

Histological, microbiological and chemical characteristics of the quality of mechanically separated turkey meat

The aim of the thesis was to evaluate the characteristics of mechanically separated meat produced from turkey as example. The status survey of 35 separates of turkey produced by pressure roller or rotation auger technology was done in view of the criterion bone/histometrical (digital area determination and particle analysis, conventional particle counting in the histological section) and bone/chemical (Calcium determination). Additionally the tissue composition and the microbiological status of the samples were determinated.

Apart from doing the status survey the second focus was to prove the analysis of phases in terms of the software supported area determination and particle analysis. The proof compared two reference methods, the conventional particle counting and the Calcium determination, with the digital investigated results.

1. With all used methods it was shown, that the pressure roller technology provided lower bone tissue contents than the rotation auger technology. Furthermore it seems to be an interrelation between the occurrence of the bone particles and the anatomical origin of the deboned material within both separated groups. The MSM produced by rotation auger yields higher bone quotas in the finished product whereas it is hardly to prove the raw material produced by pressure roller because of its infinitesimal bone contents.

2. The Calcium content of more than 2/3 of the examined samples was lower than the limit of 100 mg / 100 g from the EU Regulation 2074/2005. There were only some overruns by the rotation auger produced samples.

3. The results of the microbiological examination showed insistently, that it is necessary to improve the hygienic conditions for the production of the separates. All samples showed higher counts than the limit of 50 cfu *Escherichia coli / g* as a hygienic parameter according to the EU Regulation 2073/2005. In terms of the health risk the high numbers of colony forming units of coagulase-positive *Staphylococcus* and *Clostridia* should be taken into account.

4. *Salmonella spp.* was isolated 9 x from 35 samples and *Campylobacter spp*. from only one pooled sample. *Listeria monocytogenes* was not found at all.

5. The qualitative and semi-quantitative histological examination resulted in differences of the occurrence of cartilage, renal structures and collagen parts by the particular samples showing an interdependence between the separation technology and the anatomical origin of the deboned material but these informations are not sufficient for the diagnosis of mechanically separated meat or more than ever for an assignment to certain procedures or kind of bone.

6. The experiment involved paraffin slides stained by Alizarin-S according to German official collection of food examination methods for the automatic determination of the bone area (PFEIFFER et al. 1975). The bone tissue appears orange-red using this staining formula and the residual tissue blue. The problems involving the achromatic color black for the analysis by the additive HSI system prohibited the Kossa staining (KÖNIGSMANN 1978) as an alternative. The 60 particular pictures were scanned automatically and gradually by a digital camera and conglomerated to a general overview picture. The discrimination, marking and determination of the two areas of concern were yielded subsequently upon a visual controlling according to the HSI parameters.

7. The particle analysis turned out to be helpful for the judgment of its homogeneity in relation to parameters as single area and equivalent circle diameter as well as affinity of particles to build so called bone nests. The continuous produced separates show a lower dispersal of the particular characteristics and indicate a higher morphological homogeneity and tendency for the bone nests.

8. The results of the digital microscopic analysis of phases and the reference methods correlate for the determination of the bone quotas in spite of different analytical basics very tight. The analysis of the regression shows a high significant correlation (< .001) between the phase analytical area determination and manual particle counting (r = .96) and also to the chemical method (r = .92). The phase analytical particle counting correlates with the conventional particle counting in a similar way (r = .95).

Altogether the different analytical techniques show very close correlations. A standard and full contrast staining is the most important precondition for a software supported discrimination of the areas of concern. This condition is fulfilled by the Alizarin-S staining. Principally it is possible to correct the misstained areas by visual controlling, but it interferes also the automation of the procedure and makes necessary personal manipulations. And this individual intervention should be eliminated and substituted by a full automatic standard examination for avoiding the personal error from the point count technique. It cannot be assessed, which grade of perfection could be reached by further tests, but meanwhile this procedure satisfies the requirements for a valid method and can be recommended for the routine analysis.

8 Verzeichnis der Vorveröffentlichungen

8.1 Wissenschaftliche Beiträge

Hildebrandt G. und P. Josefowitz (2007) Analytik benötigt klare Vorgaben. Beurteilungskriterien und Nachweisverfahren für Separatorenfleisch, Fleischwirtschaft 87 (1), S. 21-23

Josefowitz P., G. Hildebrandt, R. Islam und H.J. Klare (2006) Phasenanalytische Planimetrie zur quantitativen Bestimmung des Knochenanteils, des bindegewebseiweißfreien Fleischeiweißes im Fleischeiweiß und anderer Gewebskomponenten in histologischen Schnitten, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 1 (2), S. 214

Josefowitz P., G. Hildebrandt, R. Islam und H.J. Klare (2007) Phasenanalytische Bestimmung des bindegewebseiweißfreien Fleischeiweißes im Fleischeiweiß, Archiv für Lebensmittelhygiene 58, S. 36-38

Josefowitz P. und R. Islam (2007) Einsatzmöglichkeiten der modernen, computergestützten Mikroskopie in der Lebensmittel-, Futtermittel- und Arzneimitteluntersuchung sowie in der Infektionsdiagnostik, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2 (4), S. 500 – 501

Josefowitz P., G. Hildebrandt, R. Islam und H.J. Klare (2007) Qualitätsmerkmale von Putenseparatorenfleisch. 1. Phasenanalytische Bestimmung der Knochengewebsfläche, Fleischwirtschaft, 87 (11), S. 122-126

8.2 Vorträge

Hildebrandt G. und P. Josefowitz (2006) Nachweisverfahren von Separatorenfleisch in Lebensmitteln, 11. Forum der Fleischwirtschaft, Münster/Westfalen, 20.11.2006 Separatorenfleisch und Kochpökelwaren. Produkte im Spannungsfeld zwischen Industrie, Überwachung, Handel und Verbrauchererwartung, S. 20-25

Hildebrandt G. und P. Josefowitz (2007) Phase analytical determination of tissue components in histological slides of meat products, First International Conference on Food Safety, Al-Baath University/Hama/Syrien, 23.-25. 04.2007

Hildebrandt G. und P. Josefowitz (2007) Rechtliche und hygienische Aspekte zur Verarbeitung von mechanisch gewonnenem Fleisch - Anmerkungen zur Zusammensetzung, 31. Informationstag "Fleischtechnologie", Berlin, 27.04.2007

Josefowitz P., G. Hildebrandt, R. Islam und H.J. Klare (2006) Phasenanalytische Planimetrie zur quantitativen Bestimmung des Knochenanteils, des bindegewebseiweißfreien Fleischeiweißes im Fleischeiweiß und anderer Gewebskomponenten in histologischen Schnitten, 59. Arbeitstagung des ALTS, Berlin, 12.-14.06.2006, Ergebnisprotokoll, S. 114

Josefowitz P., G. Hildebrandt, R. Islam und H.J. Klare (2006) Phasenanalytisch bestimmte Knochenfläche als Qualitätsmerkmal von Separatorenfleisch, 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, 26.-29.09.2006, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe, Programm- und Referate-Band, S. 156

Josefowitz P. und R. Islam (2007) Einsatzmöglichkeiten der modernen, computergestützten Mikroskopie in der Lebensmittel-, Futtermittel- und Arzneimitteluntersuchung sowie in der Infektionsdiagnostik, 60. Arbeitstagung des ALTS, Berlin, 11.-13.06.2007, Ergebnisprotokoll, S. 94 - 95

8.3 Poster

Josefowitz P., G. Hildebrandt, R. Islam und H.J. Klare (2006) Phasenanalytische Bestimmung des bindegewebseiweißfreien Fleischeiweißes im Fleischeiweiß, 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, 26.-29.09.2006, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe, Programm- und Abstract-Band, S. 230

9 Literaturverzeichnis

Adam M., M. Contzen, S. Horlacher und J. Rau (2006) Untersuchungen zur Prävalenz von *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch und Rohmilch mittels PCR, konventioneller kultureller Methode und Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie, Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 119 (5/6), S. 209-215

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Absatz 1 LFGB, Band I (Lebensmittel), Hrg. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Beuth Verlag GmbH Berlin

Anonym (1976) Stellungnahme der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, zum Separatorenfleisch, Fleischwirtschaft 56 (7), S. 912

Anonym (2006a) Neue Rechtslage ändert nichts an Beurteilung von Separatorenfleisch, allgemeine fleischer zeitung 33, S. 6

Anonym (2006b) „Die komplizierte Fachdiskussion kann kein Verbraucher nachvollziehen“ BVDF-Geschäftsführer Dr. Joachim Wiegener zur Einstufung von 3-mm-Fleisch, Fleischwirtschaft 86 (12), S. 10-11

Arneth W., H. Linke, H. Hecht und K. Honikel (1975) Technologisch unvermeidbarer Knochenanteil im Fleisch aus harten Separatoren, Mitteilungsblatt BAF Kulmbach 50, S. 2593-2595

Baker R.C. (1974) Zitat aus „Zur Versachlichung der Diskussion über manuellen Knochenputz sowie maschinell entbeintes Fleisch von Geflügel und Großtieren“ Wiese von W. (1976), Fleischwirtschaft 56 (5), S. 606-610

Baum W., H. Ernst und P. Zöhrer (1980) Untersuchungen zur Beeinflussung der Größe und Anteile der Knochenpartikel bei der maschinellen Entfleischung von Rinder- und Schweineknochen, Fleisch 34 (4), S. 71-73

Bem Z. und L. Leistner (1974) Fleischseparatoren aus mikrobiologischer Sicht, Mitteilungsblatt BAF Kulmbach 46, S. 2244-2249

Bentler W. (1968) Ein Beitrag zur Technik der histologischen Untersuchung von Rohwürsten, Archiv für Lebensmittelhygiene 19, S. 33-34

Bijker P.G.H., G.E. Gerats und T. Fransen (1978) Bone content in mechanically deboned pork, Tijdschrift voor Diergeneeskunde 103 (11), S. 583-588

Bijker P.G.H., G.E. Gerats, J.G. van Logtestijn, P.A. Koolmees und T. Fransen (1979) Methods to determine the bone content and the size of bone particles in mechanically deboned pork (M.D.P.), Proceedings of the European Meeting of Meat Research Workers No. 25, S. 843-849

Bijker P.G.H., J.I.M. Scholten, T. Fransen und P.A. Koolmees (1980) Microbiological quality and chemical composition of mechanically deboned meat, Tijdschrift voor Diergeneeskunde 105 (11), S. 440-447

Bijker P.G.H. und P.A. Koolmees (1981) Tissue composition of mechanically deboned pork, Voeding 42 (10), S. 343-347

Bijker P.G.H., P.A. Koolmees und J.G. van Logtestijn (1983) Tissue composition of mechanically deboned pork (MDP), Meat Science 9 (4), S. 257-269

Bijker P.G.H., P.A. Koolmees und J. Tuinstra-Melgers (1985) Histological detection of mechanically deboned meat in meat products, Archiv für Lebensmittelhygiene 36, S. 71-74

Bolder N.M. und H. Hospers (1977) Problems with determination of bone in meat deboned by means of a mechanical separator, Voedingsmiddelentechnologie 10 (19), S. 11-15

Brandscheid W. (2002) Polarisationsoptischer Nachweis von Knochenpartikeln in Separatorenfleisch, Fleischwirtschaft 82 (7), S. 92-95

Branscheid W., M. Judas und R. Höreth (2007) Morphologischer und radiologischer Nachweis von Knochen- und Knorpelpartikeln, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle 14 (2), S. 92

Bundesinstitut für Risikobewertung (2003) Empfehlungen zur hygienischen Gewinnung von Geflügelfleisch, http://www.bfr.bund.de/cm/208/empfehlungen_zur_hygienischen_gewinnung_von_gefluegelfleisch.pdf, Abruf: Juli 2007

Busalaeva T.P., N.N. Lipatov, G.A. Mamonova, G.A. Vinokurov und A.T. Ivanov (1986) Histological structure and disperse composition of the components of mechanically separated beef, Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii, Pishchevaya Tekhnologiya No. 4, S. 17-19

Calleja C. (1897) Metodo de tripla coloracion con el cermin litinado y el picrocarmin, Zitat aus „Mikroskopische Technik“ Romeis B. (1968), 16. Auflage, R. Oldenbourg Verlag München

Candogan K., N. Kolsarici, I. Akoglu, Ü. Üzümcüoglu und A. Tekin (2001) Some chemical, physical and microbiological characteristics of mechanically deboned chicken meats produced from breast frame, neck or back, Proceedings of XV European Symposium on the Quality of Poultry Meat, Kusadasi, Turkey, S. 362-372

Carvalho A.C.F.B. und A.L.L. Cortez (2005) Salmonella spp. in carcasses, mechanically deboned meat, sausages and chicken meat, Ciencia Rural 35 (6), S. 1465-1468

Colorsystem HLS-System, http://www.colorsystem.com/projekte/dt/!56HLSD.HTM, Abruf: April 2007

Colorsystem Pythagoras, Aristoteles, Platon, http://www.colorsystem.com/projekte/dt/!01PYTD.HTM, Abruf: Juli 2007

Crossland A.R., R.L.S. Patterson, R.C. Higman, C.A. Stewart und K.D. Hargin (1995) Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - I: Chemical Composition, Meat Science 40, S. 289-302

Deutsches Lebensmittelbuch. Leitsätze 2003, Hrg. Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Bundesanzeiger Verlagsgesellschaft mbH Köln

Diepolder H. und G. Schulze (2005) Detektion von Knochensplittern in Fleischerzeugnissen mittels Röntgentechnik, Protokoll der 58. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), S. 173-174

Diller H. (1941) Der Nachweis von kleinsten Knochenteilen in Wurst, Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A 82 (1), S. 17-19

Eisgruber H. und M. Bülte (2006) Mikrobiologische Kriterien und Mykotoxin-Höchstgehalte in Lebensmitteln, 1. Auflage Behr's Verlag Hamburg

Ellerbroek L., H. Wichmann-Schauer und M. Haarmann (2001) Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen bei deutschem Nutzgeflügel und Geflügelfleisch, http://www.bfr.bund.de/cm/220/fober_salmonelgeflugel.pdf, Abruf: Juli 2007

Ernst H. (1974) Zum histologischen Nachweis von Knochengewebe in fein zerleinertem Fleisch, Fleisch 28, S. 135

Europäische Gemeinschaft (1996a) Schriftliche Anfrage Nr. 751/96 von Ian White an die Kommission vom 26.03.1996, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, C217/1996, S. 105

Europäische Gemeinschaft (1996b) Antwort von Herrn Bangemann im Namen der Kommission vom 25.09.1996, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, C11/1997, S. 92

European Commission (1997) Report on mechanically recovered meat health rules to the production and use of mechanically recovered meat - report of the Scientific Veterinary Committee - 16. September 1997, http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm4/out16_en.html, Abruf: November 2005

Field R.A., M.L. Riley und M.H. Corbridge (1974) Influence of yield on calcium content of mechanically deboned lamb and mutton, Journal of Food Science 39 (2), S. 285-287

Field R.A. (1976) Mechanically deboned red meat, Food Technology 30 (9), S. 38-48

Field R.A., S.L. Olson-Womack und W.G. Kruggel (1977) Characterisation of bone particles from mechanically deboned meat, Journal of Food Science 42 (5), S. 1406-1407

Field R.A. (1981) Mechanically deboned red meat, Advances in Food Research 27, S. 23

Field R.A. (1983) An update on mechanically separated meat, Reciprocal Meat Conference Proceedings 36, S. 38-40

Field R.A. (2000) Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures, Meat Science 55, S. 255-264

Froning G.W. (1976) Mechanically-deboned poultry meat, Food Technology 30 (9), S. 50-63

Geflügelfleischhygiene-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. Dezember 2001 (BGBl. I S. 4098; 2003 I S. 456), zuletzt geändert durch Artikel 3 der Verordnung vom 8. Dezember 2004 (BGBl. I S. 3353)

Gend van H.W. (1971) Über die Bestimmung und den Gehalt von Knochensplittern in Fleischwaren, Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A 146 (2), S. 97-99

Gerats G.E. und R.J. Terbijhe (1975) Der quantitative Nachweis von Knochenpartikeln in mechanisch entbeintem Geflügelfleisch durch ein KOH-Verfahren, Archiv für Lebensmittelhygiene 6, S. 230-231

Graßl H.P. (2001) Farbwahrnehmung und Farbdarstellung, Vorlesung Medientechnik für Wirtschaftsingenieure, Fachhochschule Landshut, Literatur kann beim Autor angefordert werden

Grunden L.P. und J.H. Macneil (1973) Examination of bone content in mechanically deboned poultry meat by EDTA and atomic absorption spectrophotometric methods, Journal of Food Science 38 (4), S. 712-713

Handbuch (2001) Messen, Soft Imaging System GmbH (jetzt: Olympus Soft Imaging Solutions GmbH), Münster

Handbuch (2004) Schitt für Schritt analySIS®, Soft Imaging System GmbH (jetzt: Olympus Soft Imaging Solutions GmbH), Münster

Hildebrandt G., H. Weiß und H. Berner (1975) Die Bedeutung nicht zu Skelettmuskulatur und Bindegewebssubstanz zählender Gewebe des Fleisches für die histometrische Qualitätsbeurteilung von Hackfleisch sowie Roh- und Brühwurst, Fleischwirtschaft 55, S. 107-111

Hildebrandt G. und F.-J. Kretschmer (1977) Die Eignung der Fernsehbild-Computer-Analyse zur histometrischen Kollagenbestimmung, Fleischwirtschaft 57, S. 689-697

Hildebrandt G., R. Königsmann und H. Berner (1978) Quantitative Fernsehbildanalyse wertmindernder Gewebe in Fleischerzeugnissen, Fleischwirtschaft 58, S. 1985-1989

Hildebrandt G. und L. Hirst (1985) Determination of the collagen, elastin und bone content in meat products using television image analsis, Journal of Food Science 50, S. 568-572 & 576

Hildebrandt G. (2001) Hartseparatorenfleisch: Histologischer Nachweis mittels Knorpel-Knochen-Färbung, Protokoll der 54. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), S. 111

Hildebrandt G., K. Rauscher und W.-R. Stenzel (2006) Analysemerkmale zum Nachweis von Separatorenfleisch 2. Mikroskopische Untersuchung, Fleischwirtschaft 86 (6), S. 111-114

Hildebrandt G. und P. Josefowitz (2007) Analytik benötigt klare Vorgaben Beurteilungskriterien und Nachweisverfahren für Separatorenfleisch, Fleischwirtschaft 87 (1), S. 21-23

Hildebrandt G. und K. Köpernik (2007) Deklaration von Separatorenfleisch. Ein Beitrag zur Klärung der aus derzeit geltendem Recht resultierenden offenen Fragestellungen, Fleischwirtschaft 87 (6), S. 21-24

Hujankova M. (1976) Methods and means of evaluation of the content of bone particles in mechanically deboned meat, Zpravodaj Masneho Prumyslu No. 3/4, S. 46-57

Horn D. (1997) Kennzeichnung von Separatorenfleisch in der Zutatenliste, Protokoll der 50. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständigen (ALTS), S. 41-42

Kijowski J. (1981) Determination of bone particles in mechanically deboned poultry meat, Gospodarka Miesna 33 (5/6), S. 32-35

Klinke R. und S. Silbernagl (1994) Lehrbuch der Physiologie, 1. Auflage 1994, Georg Thieme Verlag Stuttgart

Knorr F., H. Kersken, K. Potthast und H. Reuter (1974) Nachputzen von Schlachttierknochen, Versuche mit einem Walzenseparator, Fleischwirtschaft 54, S. 899-900

Königsmann R. (1978) Vergleichende Untersuchungen über die Eignung der Fernsehbildanalyse zum quantitativen Knochennachweis in Fleischerzeugnissen, Veterinärmedizinische Dissertation, Freie Universität Berlin

Königsmann R., G. Hildebrandt und H.-J. Sinell (1980a) Quantitativer Knochennachweis in Fleischerzeugnissen mittels Fernsehbildanalyse, 1. Mitteilung, Archiv für Lebensmittelhygiene 31, S. 6-12

Königsmann R., G. Hildebrandt und H.J. Sinell (1980b) Quantitativer Knochennachweis mit der Atomabsorptionsspektralphotometrie (AAS) und einem KOH-Verfahren, 2. Mitteilung, Archiv für Lebensmittelhygiene 31, S. 66-71

Koolmees P.A., P.G. Bijker, J.G. van Logtestijn und J. Tuinstra-Melgers (1986) Histometrical and chemical analysis of mechanically deboned pork, poultry and veal, Journal of Animal Science 63, S. 1830-1837

Kossa von (1901) Nachweis von Kalk, Zitat aus „Mikroskopische Technik“ Romeis B. (1968), 16. Auflage, R. Oldenbourg Verlag München

Krämer J. (2002) Lebensmittel-Mikrobiologie, 4. Auflage, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart

Kressmann H. (1968) Vergleichende Untersuchungen an Knochenschrot und Futterfleischkonserven, Archiv für Lebensmittelhygiene 19, S. 199-202

Küppers H. (2005) Schnellkurs Farbenlehre, DuMont Literatur und Kunst Verlag, Köln

Linke H. und W. Thumser (1964) Zur Beurteilung von Knochen und Knorpelgewebe bei Roh- und Brühwürsten, Archiv für Lebensmittelhygiene 15, S. 201-203

Linke H., Arneth W. und Z. Bem (1974) Ein neues Verfahren zur mechanisierten Restfleischgewinnung unter hygienischen, analytischen und lebensmittelrechtlichen Gesichtspunkten, Fleischwirtschaft 54, S. 1653-1660

Maxcy R.M., G.W. Froning und T.E. Hartung (1973) Microbial quality of ground poultry meat, Poultry Science 52, S. 486

Negatu Z., J.I. McNitt und K.W. McMillin (2006) Determination of small bone fragments in mechanically separated rabbit meat, Journal of Muscle Foods 17 (2), S. 185-197

Neuhäuser S. (1977) Technologische Verbesserungen der maschinellen Fleischgewinnung, Fleischwirtschaft 57, S.1233

Nitsch P., S. Höpfl und G. Wachsmann (2002) Röntgenologischer Nachweis von Knochenpartikeln in Fleischwaren, Mitteilungsblatt BAFF 41 Nr. 157, S. 213-218

Nitsch P. (2004) Mechanisch entbeintes Fleisch, Fleischwirtschaft 84 (10), S. 86-87

Nurmi E. und Ch. Ring (1999) Gewinnung von hygienisch vertretbarem Separatorenfleisch, Fleischwirtschaft 79 (4), S. 28-31

Ostovar K., J.H. Macneil und K. O'Donell (1971) Poultry product quality 5. Microbiological evaluation of mechanically deboned meat, Journal of Food Science 36, S. 1005

Pfeiffer G., R. Wellhäuser und H. Gehra (1975) Eine Trichromfärbung zur Darstellung von Muskeleiweiß, Bindegewebseiweiß und mineralisch behaftetem Knochengewebe, Archiv für Lebensmittelhygiene 26, S. 191-192

Pickering K., C.L. Evans, K.D. Hargin und C.A. Stewart (1995a) Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - III: Microscopy, Meat Science 40, S. 319-326

Pickering K., M. Griffin, P. Smethurst, K.D. Hargin und C.A. Stewart (1995b) Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - IV: Immunology, Meat Science 40 , S. 327-336

Prändl O. (1961) Die histologische Analyse von Wurstwaren. Grundlagen für die quantitative Auswertung histologischer Präparate, Veterinärmedizinische Habilitation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Gerhard Röttger Verlag München

Psota A. (1984) Detection of mechanically deboned meat in Bratwurst sausages, Ernährung 8 (6), S. 353-356

Rauscher K. und G. Hildebrandt (2004) Zellkernreiche Gewebe in Fleischerzeugnissen - ein Hinweis auf Separatorenfleisch ?, Tagungsband der 45. Tagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft/Garmisch-Partenkirchen, S. 339-342

Richtlinie 91/495/EWG des Rates vom 27. November 1990 zur Regelung der gesundheitlichen und tierseuchenrechtlichen Fragen bei der Herstellung und Vermarktung von Kaninchenfleisch und Fleisch von Zuchtwild, Amtsblatt der Europäischen Union, L 495/1991

Richtlinie 91/497/EWG des Rates vom 29. Juli 1991 zur Änderung und Kodifizierung der Richtlinie 64/433/EWG zur Regelung gesundheitlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit frischem Fleisch zwecks Ausdehnung ihrer Bestimmungen auf die Gewinnung und das Inverkehrbringen von frischem Fleisch, Amtsblatt der Europäischen Union, L268/1991

Richtlinie 92/5/EWG des Rates vom 10. Februar 1992 zur Änderung und Aktualisierung der Richtlinie 77/99/EWG zur Regelung gesundheitlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Fleischerzeugnissen sowie zur Änderung der Richtlinie 64/433/EWG, Amtsblatt der Europäischen Union, L005/1992

Richtlinie 92/116/EWG des Rates vom 17. Dezember 1992 zur Änderung und Aktualisierung der Richtlinie 71/118/EWG zur Regelung gesundheitlicher Fragen beim Handelsverkehr mit frischem Geflügelfleisch, Amtsblatt der Europäischen Union, L116/1991

Richtlinie 94/65/EG des Rates vom 14. Dezember 1994 zur Festlegung von Vorschriften für die Herstellung und das Inverkehrbringen von Hackfleisch/Faschiertem und Fleischzubereitungen, Amtsblatt der Europäischen Union, L065/1994

Richtlinie 2001/101/EG der Kommission vom 26. November 2001 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür, Amtsblatt der Europäischen Union, L310/2001

Savage A.W.J., R.I. Richardson, P.D. Jolley, K.D. Hargin und C.A. Stewart (1995) Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - II: Gel Electrophoresis, Meat Science 40 , S. 303-317

Schaal M. und G. Anhalt (1974) Nachweis von Knochenpartikeln in Wursterzeugnissen, Archiv für Lebensmittelhygiene 7 , S. 164-166

Schötz H. (2002) Separatorenfleisch: Rechtliche Aspekte - Deklaration, Mitteilungsblatt BAFF 41 Nr. 158, S. 247-248

Schüler Duden (1989) Physik, 2. Auflage 1989, Duden-Verlag Mannheim

Schulte-Sutrum M. und D. Horn (2002) Eignungsprüfung Lebensmittelhistologie/ Nachweis von Separatorenfleisch, Protokoll der 55. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständigen (ALTS), S.113-125

Schulte-Sutrum M. und D. Horn (2003) Separatorenfleisch - Eignungsprüfung, Fleischwirtschaft 83 (1), S. 78-81

Schulze K. (1977) Bestimmung des Knochengehalts in Separatorenfleisch aus Schweineknochen, Archiv für Lebensmittelhygiene 28, S. 166-169

Silbernagel S. und A. Despopoulos (1991) Taschenatlas der Physiologie, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart

Silvestrini N. und E.P. Fischer (2002) Farbsysteme in Kunst und Wissenschaft, 3. Auflage, DuMont Literatur und Kunst Verlag Köln

Sinell H.-J. (1956) Zum quantitativen Nachweis geringer Knochenmengen in Dosenleberwurst, Archiv für Lebensmittelhygiene 7, S. 61-63

Skarpeid H.-J., R.E. Moe und U.G. Indahl (2001) Detection of mechanically recovered meat and head meat from cattle in grund beef mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing protein profiles, Meat Science 57, S. 227-234

Slowinski M. und J. Mroczek (1982) Bone splinters in mechanically deboned meat, Medycyna Weterynaryjna 38 (10) , S. 506-509

Sommer H. und U. Mülder (1975) Eine Methode zur Bestimmung von Knochenteilchen in Wursterzeugnissen aus Separatorfleisch, Fleischwirtschaft 55, 1730-1732

Stenzel W.-R. (2001) Calciumgehalt: Ein möglicher Parameter zum Nachweis der Verwendung von Separatorenfleisch in Fleischerzeugnissen, Protokoll der 54. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), S. 113

Stenzel W.-R. und G. Hildebrandt (2006) Analysemerkmale zum Nachweis von Separatorenfleisch, 1. Ergebnisse einer Datenerhebung zum Calcium-Gehalt von Hackfleisch, Fleischwirtschaft 86 (5), S. 96-98

Stiebing A. (1998) Zur Begriffsbestimmung von Separatorenfleisch, Fleischwirtschaft 78 (4), 321-322

Stiebing A. (2002) Separatorenfleisch im Kreuzfeuer der Kritik, Fleischwirtschaft 82 (2), S. 8

Strelecka D., J. Lukacka, I. Mravcova und B. Rybarova (1984) Chemical composition and methods of quality evaluation of mechanically deboned poultry meat, Hydinarsky Priemysel 26 (5/6), S. 207-240

Tändler K. (1975) USDA-Spezifikationen für "Separatorenfleisch" von Rinder- und Schweineknochen, Fleischwirtschaft 55 (12), S. 1688-1690

Terbijhe, R.J. (1976) Orientierende Untersuchungen über die bakteriologische Beschaffenheit und den Knochengehalt von "Geflügelmeat", Archiv für Lebensmittelhygiene 27, 5

Tremlova B. (2000) Histologischer Nachweis von Knochenpartikeln in Fleischprodukten, Fleischwirtschaft 80 (7), S. 73-74

Tremlova B. und P. Straha (2002) Histometric evaluation of meat products - determination of size and number of objects, Czech Journal Food Science 20, S. 175-180

Tremlova B., P. Sarha, M. Pospiech, H. Buchtova und Z. Randulova (2006) Histological analysis of different kinds of mechanically recovered meat, Archiv für Lebensmittelhygiene 57, S. 85-91

Trindade M.A., P.E. de Felicio, C.J. Contreras Castillo (2004) Mechanically separated meat of broiler and white layer spent hens, Scientia Agricola 61 (2), S. 234-239

Troeger K. (2002) Mechanisch entbeintes Restfleisch: Verarbeitungseignung, Mitteilungsblatt BAFF 41, Nr. 157, S. 199-208

Troeger K. und G. Wachsmann (2007) Nachweis von schonend gewonnenem Separatorenfleisch ("3 mm-Fleisch") in Brühwurst, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle 14 (2), S. 91

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs, Amtsblatt der Europäischen Union, L 226/2004

Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien, Amtsblatt der Europäischen Union, L 147/2001

Verordnung (EG) Nr. 1923/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien, Amtsblatt der Europäischen Union, L 404/2006

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, Amtsblatt der Europäischen Union, L 338/2005

Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 der Kommission vom 5. Dezember 2005 zur Festlegung von Durchführungsvorschriften für bestimmte unter die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates fallende Erzeugnisse und für die in den Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vorgesehenen amtlichen Kontrollen, zur Abweichung von der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 853/2004 und (EG) Nr. 854/2004, Amtsblatt der Europäischen Union, L 338/2005

Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch in der Fassung der Bekanntmachung vom 29. Juni 2001 (BGBl. I S. 1366), zuletzt geändert durch Artikel 2 § 3 Abs. 33 des Gesetzes vom 1. September 2005 (BGBl. I S. 2618)

Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln in der Fassung der Bekanntmachung vom 15. Dezember 1999 (BGBl. I S. 2464), zuletzt geändert durch Artikel 11 der Verordnung vom 8. August 2007 (BGBl. I S. 1816)

Verordnung über Hackfleisch, Schabefleisch und anderes zerkleinertes rohes Fleisch in der Fassung der Bekanntmachung vom 10.5.1976 (BGBl. I S. 1186), zuletzt geändert am 18.5.2005 (BGBl. I S. 1401)

Verordnung zur Änderung der Fruchtsaftverordnung und anderer lebensmittelrechtlicher Vorschriften vom 9. Oktober 2006 (BGBl. Nr. 47 vom 20.10.2006 S. 2260)

Weiß H. und G. Hildebrandt (1974) Die histometrische Bindegewebsbestimmung als Beispiel der Auswertung un Beurteilung von Stichprobenergebnissen im Rahmen der Qualitätskontrolle, Deutsche Lebensmittel-Rundschau 70 (7), S. 237-243

Welsch N. und C.Chr. Liebmann (2006) "Farben Natur Technik Kunst", 2. Auflage 2006, Elsvier Spektrum Akademischer Verlag München

Welt der Physik Das Doppelleben des Lichtes, Deutsche Physikalische Gesellschaft & Bundesministerium für Bildung und Forschung, www.weltderphysik.de/de/1487.php, Abruf: Juli 2007

Wenthe S., W. Zens, S. Horlacher, A. Abdulmajwood und M. Bülte (2001) Problematik der Verarbeitung von Hartseparatorenfleisch, Fleischwirtschaft 81 (6), S. 93-95

Wenzel S., G. Anhalt, M. Schaal und H, Froehner (1974) Vergleichende Untersuchungen zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Knochengewebe in Fleisch- und Wursterzegnissen durch direkte und indirekte Verfahren, Archiv für Lebensmittelhygiene 25, S. 173-177

Wichmann-Schauer H. und G. Hildebrandt (1997) Differenzierung von erhitztem und nativem Kollagen in Rohwürsten mit Hilfe von histologischen Färbetechniken, Fleischwirtschaft 77 (5), S. 477-478

Wiese von W. (1976) Zur Versachlichung der Diskussion über manuellen Knochenputz sowie maschinell entbeintes Fleisch von Geflügel und Großtieren, Fleischwirtschaft 56 (5), S. 606-610

Wikipedia HSI color space, http://en.wikipedia.org/wiki/HSI_color_space, Abruf: April 2007

Wikipedia Farbraum, http://de.wikipedia.org/wiki/HSV-Farbraum, Abruf: April 2007

Wikipedia Welle-Teilchen-Dualismus, http://de.wikipedia.org/wiki/Welle-Teilchen-Dualismus, Abruf: August 2007

Winter F.F. (1978) Gewinnung und Verarbeitung von Separatorenfleisch, Fleischwirtschaft 58 (7), S. 9

Wittmann M. (1977) Zur maschinellen Trennung von Fleisch und Knochen, Fleischwirtschaft 57 (6), S. 1135-1143

Wittmann M. (1977) Zur maschinellen Trennung von Fleisch und Knochen, Fleischwirtschaft 57 (7), S. 1261-1274

Wnuk I. (2002) Bestimmung von Mineralstoffen und Spurenelementen in Lebensmitteln mit besonderer Berücksichtigung von Calcium im Separatorenfleisch mittels ICP-OES, Mitteilungsblatt BAFF 41, Nr. 157, S. 209-212

Zwingmann W. (1980) Lebensmittelhygienische und -rechtliche sowie chemisch-analytische Beurteilung von mit ambulant eingesetzten Separatorenanlagen gewonnenem Restfleisch , Fleischwirtschaft 60 (1) 1980, S. 63-71

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung beider Separationstechnologien (STIEBING 1998).....17

Tabelle 2: Kriterien für die zwei Kategorien von Separatorenfleisch.....22

Tabelle 3: Ergebnisse der Analyse des Knochengewebes (HILDEBRANDT et al. 1975).....29

Tabelle 4: Ergebnisse der Untersuchung von Schweine- und Rinderseparaten (NEUHÄUSER 1977).....30

Tabelle 5: Ermittlung der Knochenvolumenanteile mittels Fernsehbildanalyse (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980a).....31

Tabelle 6: Vergleich der manuellen Entbeinung und der maschinellen Separation (WINTER 1978).....33

Tabelle 7: Knochengehalte von Geflügel-, Schweine- und Rinderseparaten (SLOWINSKI und MROCZEK 1982).....34

Tabelle 8: Knochenpartikelanalyse von Rinderseparatorenfleisch (BUSLAEVA et al. 1986).....34

Tabelle 9: Knochen- bzw. Knorpelanteile von Hartseparatorenfleischchargen (WENTHE et al. 2001).....35

Tabelle 10: bei maschinell gewonnenem Fleisch ermittelte Kalziumwerte (FIELD et al. 1974; FIELD 1976) 36

Tabelle 11: Knochenanteile gemäß Kalziumbestimmungen (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980b).....37

Tabelle 12.: Vergleich des Asche- und Kalziumgehalts zwischen dem maschinell und manuell gewonnenem Geflügelfleisch (CROSSLAND et al. 1995).....39

Tabelle 13.: Schätzintervalle von Asche- und Kalziumgehaltsmittelwerten aus mit Hilfe von zwei verschiedenen Separatorentypen unter unterschiedlichen Einstellungsparametern gewonnenen Hähnchen- und Puten-MRM (CROSSLAND et al. 1995).....39

Tabelle 14: Untersuchungsergebnisse von Fleisch-, Hackfleisch- und Separatorenfleischproben (STENZEL und HILDEBRANDT 2006).....41

Tabelle 15: Kalziumgehalte von kontinuierlich und diskontinuierlich gewonnenen Geflügelseparaten (TREMLOVA et al. 2006).....42

Tabelle 16: Gesamtkeimzahlen beim Geflügelseparatorenfleisch in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gewinnung (OSTOVAR et al. 1971).....43

Tabelle 17: Mikrobieller Status des Endprodukts nach Walzenseparation (KNORR et al. 1974).....44

Tabelle 18: Vergleich der Keimzahlen (geometrische Mittelwerte/g) zwischen manuell und mittels Zentrifuge unter Zugabe von Nitritpökelsalzlake gewonnenem Restfleisch (LINKE et al. 1974)....45

Tabelle 19: Aerobe Gesamtkeimzahlen des Rohmaterials für die Separatorenfleisch -gewinnung (WITTMANN 1977)....46

Tabelle 20: Mikrobiologische Untersuchungsergebnisse von Geflügelseparatorenfleisch (WITTMANN 1977)....46

Tabelle 21: bakteriologische Kriterien für Separatorenfleisch [KbE/g] (European Commission 1997)....49

Tabelle 22: Prävalenz von Salmonella spp. bei Hähnchenkarkassen und -MDM (CARVAHLO und CORTEZ 2005)....50

Tabelle 23: Vergleich des Suspensionsverfahrens mit der KOH-Auskochmethode (SINELL 1956)....55

Tabelle 24: Vergleich der berechneten mit den analytisch nach dem Sedimentierverfahren bestimmten Knochengehaltswerten im Zumischversuch (SCHULZE 1977)....56

Tabelle 25: Vergleich der berechneten und mittels KOH-Methode ermittelten Knochengehaltswerte von Chargen mit Knochenpulverzusatz (SCHULZE 1977)....59

Tabelle 26: mittels KOH-Auskochverfahren bestimmte Knochengehaltswerte von Separatorenfleischproben (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980b)....59

Tabelle 27: mittels des Punktzählverfahrens bestimmte Knochenanteile bei Hackfleisch- und Wurstpräparaten (HILDEBRANDT et al. 1975)....66

Tabelle 28: Partikelgrößenverteilung bei Schweine- und Geflügel-MDM (BIJKER et al. 1985)....68

Tabelle 29: Beziehung zwischen dem Zusatz an Schweineseparatorenfleisch und der mittleren Knochenpartikelzahlen in histologischen Schnitten von Vorderschinken und Luncheon Meat (BIJKER et al. 1985)....69

Tabelle 30: Beurteilungsschema zum Nachweis von Separatorenfleisch (HORN 1997)....70

Tabelle 31: Ergebnisse eines Ringversuchs zur Eignung des Partikelzählverfahrens (SCHULTE-SUTRUM und HORN 2003)....71

Tabelle 32: Zusammenstellung der Beurteilungskriterien aufgrund einer Eignungsprüfung (SCHULTE-SUTRUM und HORN 2003)....72

Tabelle 33: Komponenten zur Wahrnehmung von Farben....82

Tabelle 34: Farbeigenschaften nach Munsell....84

Tabelle 35: Eigenschaften der drei Parameter des HSV-Farbsystems....89

Tabelle 36: Gegenüberstellung des HSV- und RGB-Farbsystems....89

Tabelle 37: Probenübersicht....99

Tabelle 38: Färbeschema Alizarin S....106

Tabelle 39: Färbeschema Kossa....107

Tabelle 40: Färbeschema Calleja....108

Tabelle 41: Einstellungsparameter Übersichtsaufnahmen....113

Tabelle 42: Farbschwellwerte Alizarin S....114

Tabelle 43: Farbschwellwerte Kossa....116

Tabelle 44: Auswertung des relativen Knochengewebsanteils am Gesamtgewebe....116

Tabelle 45: Parameter der digitalen Partikelanalyse....117

Tabelle 46: Mikrobiologie - Untersuchungsschema....125

Tabelle 47: Ergebnisse Vorversuch 1....128

Tabelle 48: Ergebnisse Vorversuch 2....129

Tabelle 49: Ergebnisse Vorversuch 3....129

Tabelle 50: Ergebnisse Vorversuch 4a zur Ermittlung der Farbschwellenwerte....130

Tabelle 51: Farbschwellenwerte Vorversuch 4a....130

Tabelle 52: Ergebnisse Vorversuch 4b zur Ermittlung der Farbschwellenwerte....131

Tabelle 53: Farbschwellenwerte Vorversuch 4b....131

Tabelle 54: Ergebnisse konventionelles Partikelzählverfahren (Alizarin-S-Färbung)....132

Tabelle 55: Ergebnisse phasenanalytische Planimetrie (Alizarin-S-Färbung)....134

Tabelle 56: Ergebnisse konventionelle Partikelzählung und phasenanalytische Planimetrie (Kossa-Färbung)....136

Tabelle 57: Ergebnisse Einzelflächenmessung pro Objektträger....141

Tabelle 58: Ergebnisse digitale Partikelzählung pro Objektträger....144

Tabelle 59: phasenanalytisch bestimmte mittlere Knochenpartikelflächen pro Objektträger….148

Tabelle 60: Mittelwert und Streuung der mittleren Partikelflächen in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie....150

Tabelle 61: phasenanalytisch bestimmte mittlere Partikel-ECD pro Objektträger....151

Tabelle 62: Mittelwert und Streuung der mittleren Partikel-ECD in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie....152

Tabelle 63: phasenanalytisch bestimmte mittlere nächste Abstände zum Nachbarpartikel pro Objektträger....154

Tabelle 64: Ergebnisse der semiquantitativen Untersuchung 157

Tabelle 65: Ergebnisse Kalziumbestimmung....162

Tabelle 66: Ergebnisse der mikrobiologischen Profilanalyse (Kolbenseparate)....170

Tabelle 67: Ergebnisse der mikrobiologischen Profilanalyse (Rotationsseparate).....171

Tabelle 68: Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von ungewürztem Hackfleisch auf Handelsebene (DGHM).....175

Tabelle 69: Häufigkeit pathogener Keime (Kolbenseparate).....181

Tabelle 70: Häufigkeit pathogener Keime (Rotationsseparate).....182

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auszug aus dem Register des Patentbüros der USA vom 28.10.1958 13

Abbildung 2: Patentskizze über eine „Methode zur Wiedergewinnung von Geflügelfleisch“ 14

Abbildung 3: Funktionsweise eines Kolbenseparators 15

Abbildung 4: Funktionsweise eines Rotationseparators 16

Abbildung 5: Abhängigkeit der Größe und Anteile der Knochenpartikel von der Trommelperforation (BAUM et. al. 1980).....17

Abbildung 6: Entscheidungsbaum Separatorenfleisch (HILDEBRANDT et al. 2006).....27

Abbildung 7: Häufigkeit des Vorkommens von Knochengewebe in Abhängigkeit von der Art des Fleischerzeugnisses (HILDEBRANDT et al. 1975).....30

Abbildung 8: Knochenanteil in 14 Separatorenfleischproben (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980a).....32

Abbildung 9: Schwankungen der von FIELD et al. (1974) und FIELD (1976) ermittelten Kalziumgehalte in Abhängigkeit von der untersuchten Tierart und dem Tieralter.....37

Abbildung 10: aus dem Kalziumgehalt errechnete Knochengehalte von Separatoren-fleischproben zweier Tierarten (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980b).....38

Abbildung 11: Zusammenhang zwischen bei Brühwürsten eingesetzter Menge an Kolbenseparatorenfleisch und Kalziumgehalt (TROEGER 2002).....40

Abbildung 12: Prozentuale Verteilung des Kalziumgehalts nach der Probenart (STENZEL und HILDEBRANDT 2006).....42

Abbildung 13: Gesamtkeimzahlen in Abhängigkeit von Ausgangsmaterial und Separatorentyp (WITTMANN 1977).....48

Abbildung 14: mittels KOH-Auskochverfahren bestimmte Knochengehalte von Separatorenfleischproben (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980b).....60

Abbildung 15: Alizarin S - Färbung.....63

Abbildung 16: Kossa - Färbung.....64

Abbildung 17: mittels Punktzählverfahren bestimmter mittlerer Knochenanteil (HILDEBRANDT et al. 1975).....67

Abbildung 18: Korrelation zwischen dem Zusatz an Separatorenfleisch und der mittleren Knochenpartikelzahl in histologischen Schnitten von Vorderschinken und Luncheon Meat (BIJKER et al. 1985) 69

Abbildung 19: Prinzip der automatisierten Fernsehbildanalyse 73

Abbildung 20: Korrelation zwischen dem automatisierten fernsehbildanalytischen Knochennachweis und der Kalziumbestimmung (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980a und 1980b)....75

Abbildung 21: Korrelation zwischen dem automatisierten fernsehbildanalytischen Knochennachweis und der KOH-Auskochmethode (KÖNIGSMANN 1978; KÖNIGSMANN et al. 1980a und 1980b)....75

Abbildung 22: Phänomen des Farbsehens....77

Abbildung 23: Farbspektrum 79

Abbildung 24: Farbkreis nach Isaac Newton 79

Abbildung 25: relative Empfindlichkeitsverläufe der Farbrezeptoren des menschlichen Auges (GRAßL 2001)....81

Abbildung 26: Mechanismus des Farbsehens 82

Abbildung 27: CIE-Modell 85

Abbildung 28: additive und substraktive Verfahren 86

Abbildung 29: RGB-Farbsystem 86

Abbildung 30: CMYK-Farbsystem 88

Abbildung 31: HSV-Farbsystem 88

Abbildung 32: Gegenüberstellung des HSV- und RGB- Farbsystems 90

Abbildung 33: Skizze „rotes Quadrat“ 91

Abbildung 34: Festlegung der Farbschwellwerte 92

Abbildung 35: Diskriminierung der roten Fläche 92

Abbildung 36: Messergebnis der roten Fläche 93

Abbildung 37: Partikelskizze 93

Abbildung 38: Diskriminierung der Partikel 94

Abbildung 39: Detektionseinstellungen 94

Abbildung 40: Messparameter 95

Abbildung 41: digitale Partikelzählung 95

Abbildung 42: Messung der Partikelflächen 96

Abbildung 43: Messung der Partikel-Equivalent Circle Diameter 96

Abbildung 44: Messung der nächsten Abstände zum Nachbarpartikel 96

Abbildung 45: Ergebnistabelle 97

Abbildung 46: Kolbenseparat....98

Abbildung 47: Rotationsseparat....98

Abbildung 48: mit Alizarin S gefärbtes Rotationseparat....106

Abbildung 49: nach Kossa gefärbtes Rotationsseparat....108

Abbildung 50: nach Calleja gefärbtes Rotationsseparat....109

Abbildung 51: Vorversuch 1....110

Abbildung 52: Vorversuch 2....110

Abbildung 53: Vorversuch 4a....111

Abbildung 54: Vorversuch 4b....111

Abbildung 55: mit Alizarin S gefärbtes Präparat....114

Abbildung 56: Diskriminierung der Knochengewebsfläche....114

Abbildung 57: Diskriminierung der Gesamtgewebsfläche....115

Abbildung 58: mit Alizarin S gefärbtes Präparat....119

Abbildung 59: digitale Partikelzählung....119

Abbildung 60: Messung der Partikelflächen....120

Abbildung 61: Messung der Partikel-Equivalent Circle Diameter....120

Abbildung 62: Messung der nächsten Abstände zum Nachbarpartikel....120

Abbildung 63: Häufigkeitsverteilung der manuell ermittelten Knochenpartikelzahl/cm² in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie....137

Abbildung 64: Häufigkeitsverteilung der phasenanalytisch bestimmten Knochenfläche in % in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie....138

Abbildung 65: Knochenanteil (konventionelles Partikelzählverfahren) in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial und Separatorentyp....139

Abbildung 66: Knochenanteil (phasenanalytische Planimetrie) in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial und Separatorentyp....139

Abbildung 67: Korrelation zwischen manueller Partikelzählung und phasenanalytischer Flächenbestimmung....140

Abbildung 68: Streuung der Einzelergebnisse des phasenanalytisch ermittelten Knochenanteils (Kolbenseparate)....143

Abbildung 69: Streuung der Einzelergebnisse des phasenanalytisch ermittelten Knochenanteils (Rotationsseparate)....143

Abbildung 70: Vergleich der digital ermittelten Partikelzahlen/Probe in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie....146

Abbildung 71: Korrelation zwischen dem digitalen und dem konventionellen Partikelzählverfahren 147

Abbildung 72: Korrelation zwischen den beiden digitalen Verfahren.....147

Abbildung 73: Vergleich der mittleren Partikelflächen/Probe in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie.....150

Abbildung 74: Vergleich der mittleren Partikel-ECD/Probe in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie.....153

Abbildung 75: Vergleich der mittleren nächsten Abstände zum Nachbarpartikel in Abhängigkeit von der Herstellungstechnologie.....156

Abbildung 76: relative Häufigkeiten des Auftretens von „Innereien“ in den Separatorenfleischproben.....160

Abbildung 77: Nierenpanrenchym in einer Rotationsseparatorenfleischprobe.....161

Abbildung 78: relative Häufigkeiten des Auftretens verschiedener Bindegewebsmengen in Abhängigkeit vom Separationsverfahren.....161

Abbildung 79: Korrelation zwischen der phasenanalytischen Planimetrie und der Kalziumbestimmung 165

Abbildung 80: Korrelation zwischen dem konventionellen Partikelzählverfahren und der Kalziumbestimmung.....166

Abbildung 81: Korrelation zwischen dem digitalen Partikelzählverfahren und der Kalziumbestimmung.....166

Abbildung 82: Vergleich des Knochenanteils in Abhängigkeit von der Herstellungs-technologie.....167

Abbildung 83: Knochenanteil (Kalziumbestimmung) in Abhängigkeit vom Ausgangs-material und Separatorentyp 167

Abbildung 84: Häufigkeit der aeroben mesophilen Keimzahlen (Plate Count – Agar), nach der Größe geordnet.....173

Abbildung 85: Häufigkeit der aeroben mesophilen Keimzahlen (Blutagar), nach der Größe geordnet.....173

Abbildung 86: Häufigkeit der E. coli – Keimzahlen (Petrifilm) 174

Abbildung 87: prozentuale Verteilung der Kontaminationsrate mit E. coli in Bezug auf die durch die VO (EU) 2073/2005 vorgeschriebenen m/M – Werte.....174

Abbildung 88: Häufigkeit der Pseudomonaden - Keimzahlen (GSP - Agar).....176

Abbildung 89.: prozentuale Verteilung der Kontaminationsrate mit Enterobacteriaceae in Bezug auf den DGHM - Richt- und Warnwert (4 Proben blieben wegen unmöglicher Auswertbarkeit unberücksichtigt).....176

Abbildung 90: Häufigkeit der Enterobacteriaceae - Keimzahlen (VRBG - Agar).....177

Abbildung 91: Häufigkeit der koagulase-positiven Staphylokokken - Keimzahlen (Petrifilm)....178

Abbildung 92: prozentuale Verteilung der Kontaminationsrate mit koagulase-positiven Staphylokokken in Bezug auf den DGHM – Richt- und Warnwert.....178

Abbildung 93: Häufigkeit der Clostridien - Keimzahlen (TSC - Agar).....179

Abbildung 94: prozentuale Verteilung der Kontamination mit Clostridien 179

Abbildung 95: Häufigkeit der Enterokokken – Keimzahlen (CATC - Agar).....180

Abbildung 96: prozentuale Verteilung der Kontamination mit Enterokokken 180

Abbildung 97: Nachweisquote von Salmonella spp. bei den untersuchten Proben.....182

Abbildung 98: Nachweisquote von Campylobacter spp. bei den untersuchten Proben.....182

12 Danksagung

Herrn Professor Dr. Goetz Hildebrandt, Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin möchte ich für die Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte Betreuung, Beratung und Begeisterung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, besonders herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Joachim Klare und Herrn Dr. Rafiqul Islam, Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen, Berlin, mit deren tatkräftigen Unterstützung der praktische Teil meiner Forschungsarbeit erst möglich wurde.

Der Leitung des Instituts für Lebensmittel, Arzneimittel und Tiersuchen, Berlin und den Mitarbeitern der Fachbereiche 24, 27, 31 und 41 danke ich für die Möglichkeit der Durchführung des praktischen Teils meiner Arbeit in ihrem Haus und für die dort jederzeit erhaltene Hilfe.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Mohamed Hafez Ahmed Hafez, Institut für Geflügelkrankheiten, Freie Universität Berlin und Herrn Dr. Carsten in der Wiesche, Olympus Imaging Solutions für die gewährte Unterstützung.

Ferner danke ich den beteiligten Schlachtbetrieben, die mir die Entnahme des Probenmaterials ermöglichten.

Nicht zuletzt gebührt ein besonderer Dank meinen Nächsten, die mir während der Anfertigung der Dissertation zur Seite standen.

13 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Peter Josefowitz

Berlin, 31. Oktober 2007