

Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
in Kooperation mit der
Technischen Hochschule Ostwestfalen-Lippe

**Softwarebasierte Knochenpartikelanalyse
in Geflügel-Verarbeitungsfleisch zur
Herstellung von Fleischerzeugnissen
der Kategorie Spitzenqualität**

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

vorgelegt von
Tim Julian Fechner
Tierarzt aus Bielefeld

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4279

Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
in Kooperation mit der
Technischen Hochschule Ostwestfalen-Lippe

Softwarebasierte Knochenpartikelanalyse
in Geflügel-Verarbeitungsfleisch zur Herstellung von
Fleischerzeugnissen der Kategorie Spitzenqualität

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

vorgelegt von

Tim Julian Fechner
Tierarzt
aus Bielefeld

Berlin 2021

Journal-Nr: 4279

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Matthias Upmann
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Tassilo Seidler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

food production, poultry meat, bones, calcium, food quality, food composition,
food hygiene, food safety, histology

Tag der Promotion: 25.06.2021

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-96729-124-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2021

Dissertation, Freie Universität Berlin

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 | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2021 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Literatur	9
2.1	Verarbeitungsfleisch vom Geflügel	9
2.1.1	Definition	9
2.1.2	Anforderungen und Qualitätskriterien	9
2.1.3	Herstellung	12
2.1.4	Abgrenzung zu Separatorenfleisch.....	16
2.2	Knochenpartikel und Kalziumgehalt in Fleisch	19
2.2.1	Knochenpartikel und Kalzium in Separatorenfleisch	19
2.2.2	Gehalte in Fleisch und Fleischprodukten.....	20
2.2.3	Detektionsmethoden	20
3	Material und Methode	23
3.1	Versuchsaufbau	23
3.2	Untersuchungsgut	23
3.2.1	Einmischversuche in Hackfleisch	23
3.2.2	Fleischprodukte aus dem Lebensmittelhandel.....	24
3.2.3	Geflügelverarbeitungsfleisch	26
3.3	Analytische Verfahren	31
3.3.1	Histologische Aufarbeitung.....	31
3.3.2	Kalziumbestimmung	37
3.3.3	Vollanalyse.....	39
3.4	Aussagekraft der histologischen Methode	40
3.4.1	Eigenschaften der Färbungen nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Calleja im Vergleich	40
3.4.2	Präzision	41
3.4.3	Richtigkeit der Methodik des Knochenpartikelnachweises durch Silbernitratimprägnierung	42
3.4.4	Spezifität	47
3.5	Analytische Zusammensetzung von Geflügelverarbeitungsfleisch	49
3.5.1	Vergleich des Verarbeitungsfleisches und des Separatorenfleisch aus zwei Betrieben	49
3.5.2	Homogenität des Verarbeitungsfleisches innerhalb einer Arbeitswoche.....	49
3.5.3	Schwankungen aufgrund des verarbeiteten Teilstücks.....	49

3.5.4	Schwankungen aufgrund des Anpressdruckes im Kolbenseparator	50
3.5.5	Schwankungen aufgrund des Geschlechts in Putenverarbeitungsfleisch	50
4	Ergebnisse.....	51
4.1	Aussagekraft der histologischen Methode.....	51
4.1.1	Eigenschaften der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Calleja im Vergleich	51
4.1.2	Präzision	60
4.1.3	Richtigkeit und Sensitivität	68
4.1.4	Spezifität	78
4.2	Analytische Zusammensetzung von Geflügelverarbeitungsfleisch	84
4.2.1	Vollanalyse.....	84
4.2.2	Histologie und Kalziumwerte	86
5	Diskussion.....	104
5.1	Aussagekraft der histologischen Methode.....	104
5.1.1	Eigenschaften der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Calleja im Vergleich	105
5.1.2	Präzision	109
5.1.3	Richtigkeit der Methodik des Knochenpartikelnachweises durch Silbernitratimprägnierung	110
5.1.4	Spezifität	114
5.2	Analytische Zusammensetzung von Geflügelverarbeitungsfleisch	116
5.2.1	Anforderungen an Verarbeitungsfleisch	116
5.2.2	Anforderungen an Spitzenqualität	118
5.2.3	Knochenpartikeleintrag und Kalziumgehalt der Betriebsproben.....	120
5.3	Beurteilung von Partikelzählung, Planimetrie und Kalziumbestimmung	130
6	Schlussfolgerung.....	132
7	Zusammenfassung.....	133
8	Summary.....	135
9	Literaturverzeichnis	137
10	Anhang.....	148
10.1	Spezifikationen.....	148

10.2	Untersuchungsergebnisse	154
10.2.1	Aussagekraft der histologischen Methodenentwicklung.....	154
10.2.2	Analytische Zusammensetzung von Geflügelverarbeitungsfleisch	169
11	Tabellenverzeichnis	184
12	Abbildungsverzeichnis	187
13	Formelverzeichnis.....	192
14	Publikationsverzeichnis.....	195
15	Danksagung.....	196
16	Selbständigkeitserklärung.....	197

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
Abs.	Absatz
Abschn.	Abschnitt
Anh.	Anhang
ALTS	Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der Lebensmittel tierischer Herkunft tätigen Sachverständigen
Art.	Artikel
BEFFE	Bindegewebeseiweißfreies Fleischeiweiß
BITV	Barrierefreie-Informationstechnik-Verordnung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
dgl.	dergleichen
EG	Europäische Gemeinschaft
EU	Europäische Union
EuGH	Europäischer Gerichtshof
F-AAS	Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie
FE	Fleischeiweiß
gem.	gemäß
GfK	Growth from Knowledge
i.d.R.	in der Regel
Kap.	Kapitel
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LMIV	Lebensmittelinformationsverordnung
mm	Millimeter
Nr.	Nummer
o. ä.	oder ähnlich
o. g..	oben genannt
ppm	parts per million
RGB	Rot-Grün-Blau
s.	siehe
u. Ä..	und Ähnliche
VO	Verordnung
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Beliebtheit von Geflügelfleisch ist groß: In den letzten drei Jahrzehnten (1990 bis 2020) ist das weltweite Produktionsvolumen von Geflügelfleisch um 87,7 Millionen Tonnen gestiegen (Windhorst, 2020). Auch in Deutschland steigt seit 2012 der pro Kopf Verbrauch kontinuierlich an (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, 2020a) und zwar hauptsächlich durch Hähnchenfleisch (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, 2020b). Einen wesentlichen Anteil an dieser Entwicklung hat der Handel mit Geflügelverarbeitungsprodukten, wie Geflügelbrühwürsten, Geflügelsalami oder anderen Geflügelerzeugnissen. So wurden im Jahr 2016 rund 1.200 Tonnen Geflügelwurst gekauft und dies allein im Bio-Sektor (AMI-Auswertung des GfK-Haushaltspanels aus Schlussbericht "Analyse des Bio-Geflügelmarktes", Schaack et al., 2018).

Die Herstellung dieser Produkte beginnt mit der Schlachtung von Geflügel, bei der im Zuge der Zerlegung Teilstücke aus Muskulatur, Fett- und Bindegewebe sowie Knochen entstehen. Die zunehmende Automatisierung der Schlacht- und Verarbeitungsprozesse für Nutzgeflügel führte zur Entwicklung von maschinellen Zerlegungs- und Entbeinungstechnologien (Stiebing, 1998; Barbut, 2002, 2015; Horn und Langen, 2017). Interessant ist ein Einsatz dieser Technologien insbesondere zur Entbeinung von Teilstücken, für die eine manuelle Bearbeitung nicht wirtschaftlich erscheint (Barbut, 2002, 2015). Hierbei werden die Gewebe zumeist unter Druck vom Knochen getrennt: Bei den gebräuchlichsten Trenntechnologien werden Weichgewebe wie Muskulatur und Fett in sogenannten Separatoren durch perforierte Metalloberflächen gepresst, während harte bzw. zähe Gewebe wie Knochen und Bindegewebe zurückbleiben (Barbut, 2015). Je nach Art der Teilstücke, Bauart und Prozesseinstellung der Maschinen entstehen Erzeugnisse unterschiedlicher Qualität.

Werden als Ausgangsmaterial nicht-entbeinte Teilstücke verwendet, entsteht sogenanntes Geflügelverarbeitungsfleisch. Eine Qualitätsklassifizierung dieses Produktes kann anhand mehrerer Kriterien vorgenommen werden. Dazu gehören Strukturveränderungen, Gehalt an Fremdgeweben (Knochen, Haut, Organe), BEFFE- und Kalziumgehalte. Im Wesentlichen sollten die Produktqualitäten denen von Hackfleisch entsprechen. Der Bundesverband der Deutschen Geflügelschlachtereien e. V. (2017) hat in einer Leitlinie Anforderungen zusammengestellt, die für Produkte mit hervorhebenden Hinweisen über die geltenden Regelungen der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse (2015) hinaus weitere Qualitätsaspekte für Geflügelverarbeitungsfleisch aufführt. Hierzu gehört der Gehalt an Knochenpartikeln.

Durch unterschiedliches Ausgangsmaterial und unterschiedliche maschinelle Prozesse können die Knochenpartikel- und Kalziumgehalte von Verarbeitungsfleisch nicht unerheblich schwanken. Die vorliegende Arbeit untersucht daher, ob anhand des Knochenpartikel- und

Kalziumgehaltes eine Qualitätsklassifizierung von Verarbeitungsfleisch möglich ist und ob Empfehlungen für eine Minimierung gegeben werden können. Gleichzeitig wird untersucht, welche Nachweismethodik und welche Prüfparameter sich für eine effiziente Laboranalytik und valide Qualitätsvergleiche eignen.

Dementsprechend wurden in Geflügelverarbeitungsfleischproben aus 5 Betrieben chemisch-analytisch Knochenpartikel- und histologisch Kalziumgehalte bestimmt. Ebenso wurde die Methodik des histologischen Knochenpartikelnachweises für qualitative, quantitative und planimetrische Auswertungen teilautomatisiert und auf ihre Aussagekraft überprüft.

2 Literatur

2.1 Verarbeitungsfleisch vom Geflügel

2.1.1 Definition

Verarbeitungsfleisch ist Fleisch, welches für die „Verarbeitung“ zu Fleischerzeugnissen vorgesehen ist. Eine gesonderte rechtliche Definition liegt nicht vor, so dass die allgemeine Fleischdefinition gemäß Anh. I Nr. 1.1 der VO (EG) Nr. 853/2004 Gültigkeit besitzt. Diese umfasst alle genießbaren Teile von Geflügel und anderen genannten Tieren, einschließlich Blut. Für die Herstellung von Fleischerzeugnissen gelten ferner die Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse (2015), welche nach Abschn. 1 Nr. 1.1 „bei der gewerbsmäßigen Herstellung von Fleischerzeugnissen“ (...) „unter „Fleisch“ nur Skelettmuskulatur mit anhaftendem oder eingelagertem Fett- und Bindegewebe sowie eingelagerten Lymphknoten, Nerven, Gefäßen und Schweinespeicheldrüsen“ verstehen. Darüber hinaus wird der Fleischbegriff für die Lebensmitteletikettierung auf „Skelettmuskeln von Tieren der Arten „Säugetiere“ und „Vögel“, die als für den menschlichen Verzehr geeignet gelten, mitsamt dem wesensgemäß darin eingebetteten oder damit verbundenen Gewebe“ eingeschränkt, wobei für Fett- und Bindegewebsgehalte Obergrenzen definiert werden. Ferner existieren weitere Definitionen für Fleisch, die beispielsweise auch den Ablauf der postmortalen Veränderungen einschließen (Honikel & Schwägele, 1998).

Obwohl Verarbeitungsfleisch prinzipiell unterschiedliche Zerkleinerungsgrade aufweisen kann, werden die Begriffe „3-Millimeter-Fleisch“ oder „Baader-Fleisch“ oft synonym verwendet (Hildebrandt & Köpernik, 2007).

2.1.2 Anforderungen und Qualitätskriterien

2.1.2.1 Grundlegende Anforderungen

Grundvoraussetzung für das Inverkehrbringen und Verwenden von Verarbeitungsfleisch ist dessen Genusstauglichkeit: Ohne Genusstauglichkeits- und entsprechende Identitätskennzeichnung darf ein Lebensmittelunternehmer seine Waren gemäß Art. 5 Abs. 1 VO (EG) Nr. 853/2004 nicht in Verkehr bringen. Die Verwendung einer solchen Kennzeichnung ist lediglich Betrieben gestattet, die gemäß Art. 4 Abs. 2 der VO (EG) Nr. 853/2004 ordnungsgemäß zugelassen wurden.

Weiterhin muss Geflügelfleisch und somit auch Geflügelverarbeitungsfleisch bei der Herstellung grundsätzlich auf 4 Grad Celsius oder tiefer abgekühlt und bei dieser Temperatur gelagert werden. Alternativ kann es zur Lagerung unmittelbar nach der Herstellung bei einer Kerntemperatur von höchstens -18 Grad tiefgefroren werden (Kap. III Nr. 1 und 2 der VO (EG) Nr. 853/2004; Barbut, 2015).

Für die Verwendung von Verarbeitungsfleisch in Fleischzubereitungen hat das Verarbeitungsfleisch gem. Anh. I Nr. 1.15 der VO (EG) Nr. 853/2004 zusätzlich die Anforderungen für frisches Fleisch zu erfüllen. Folglich darf es laut Anh. I Nr. 1.10 der VO (EG) Nr. 853/2004 lediglich gekühlt, gefroren oder schnellgefroren vorliegen. Tiefgefrorenes Fleisch ist dabei im Voraus zu entbeinen (Anh. III Abschn. V Kap. III Nr. 2 a) der VO (EG) Nr. 853/2004). Den Entbeinungsprozess beschreibt Davies (2004) als das Herauslösen des Knochens aus einem Fleischteilstück.

Verarbeitungsfleisch darf für den Einsatz in Fleischzubereitungen auch aus Fleischabschnitten, die beim Zerlegen angefallen sind, hergestellt werden (Anh. III Abschn. V Kap. III Nr. 2 c) i) der VO (EG) Nr. 853/2004), allerdings nur, sofern diese zur Durcherhitzung bestimmt sind. Fleischzubereitungen dürfen zudem nur so zerkleinert werden, dass die innere Muskelfaserstruktur des Fleisches und die Merkmale von frischem Fleisch erhalten bleiben (Anh. I Nr. 1.15 der VO (EG) Nr. 853/2004).

Bestimmte Materialien, die als Nebenprodukte der Schlachtung anfallen, dürfen explizit nicht verwendet werden. Dazu zählen beim Geflügel Kopf, Speiseröhre, Kropf, Eingeweide und Geschlechtsorgane. Die zusätzlichen Anforderungen, die für Hackfleisch gelten, muss Verarbeitungsfleisch jedoch auch bei entsprechender Zerkleinerung nicht erfüllen. Anschließend muss das Fleischprodukt unmittelbar nach der Herstellung verpackt werden.

Die LMIV sowie die Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse (2015) formulieren darüber hinaus Qualitätskriterien in Bezug auf Fleisch für die Deklaration des Endprodukts. So hat Geflügelfleisch grundsätzlich einen maximalen Fettanteil von 15% und einen maximalen Kollagengehalt im Fleischeiweiß (errechnet aus dem Hydroxyprolinegehalt) von 10% nicht zu überschreiten. Andernfalls ist die Deklaration mit der Zutat Fett oder Bindegewebe entsprechend anzupassen, sofern alle anderen Anforderungen für Fleisch erfüllt werden (Anh. VII Teil B Nr. 17 der VO (EG) 1169/2011). Spezifischere Analysewertanforderungen sind in den Leitsätzen je nach Produkt gesondert aufgeführt.

Während des Herstellungsprozesses sind zudem mikrobiologische Kriterien einzuhalten. Bei Geflügel hat der Lebensmittelunternehmer durch Eigenkontrollen zu gewährleisten, dass in Schlachtkörpern und Fleischerzeugnissen in 25 g keine Salmonellen oder Listerien nachweisbar sind (Anh. I der VO (EG) Nr. 2073/2005). Sofern das Verarbeitungsfleisch in einer Fleischzubereitung verwendet wird, darf entsprechend auch *Escherichia coli* als Indikatorkeim für fäkale Kontamination nur in geringen, definierten Maßen nachgewiesen werden ($n=5$, $c=2$, $m=500$ KbE/g oder cm^2 , $M=5000$ KbE/g oder cm^2).

2.1.2.2 Spitzenqualität

Für Fleischerzeugnisse existieren nach den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse (2015) drei Qualitätsstufen. Dazu zählen die einfache Qualität, die Standard-Qualität und die

Spitzenqualität (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2015; Horn & Langen, 2017). Der Bestimmungszweck der Leitsätze ist dabei die Niederschrift der Verkehrsauffassung, auf die sich alle an der Lebensmittelwirtschaft Beteiligten geeinigt haben. Rechtlich haben sie den Stellenwert eines Expertengutachten inne.

Der Verbraucher verbindet mit einer entsprechenden Aufmachung und Kennzeichnung bestimmte wertgebende Eigenschaften. Bei Produkten der Spitzenqualität werden besonders ausgewählte Rohstoffe und ein hoher Anteil hochwertiger Zutaten (z.B. hoher Anteil Skelettmuskulatur, geringer Anteil Bindegewebe) erwartet. Dieses ist entsprechend in den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse (2015) niedergelegt. Darin heißt es in Abschnitt Nr. 2.12: „Fleischerzeugnisse mit hervorhebenden Hinweisen wie Spitzenqualität, Delikatess-, Feinkost-, Gold-, prima, extra, spezial, 1a, ff oder dgl. oder in besonders hervorhebender Aufmachung (z. B. goldfarbene Hülle) unterscheiden sich von den unter der betreffenden Bezeichnung des Lebensmittels sonst üblichen Fleischerzeugnissen, abgesehen von hohem Genusswert, durch besondere Auswahl des Ausgangsmaterials, keine Verarbeitung von Separatorenfleisch oder manuell oder auf andere Art vom Knochen gewonnenem Restfleisch sowie insbesondere durch höhere Anteile an Skelettmuskulatur“. Ferner hat der Anteil an bindegewebeisweißfreiem Fleischeiweiß in der chemischen Untersuchung bei solchen Produkten um ein Zehntel höher zu sein, als in herkömmlichen Produkten. Ebenfalls darf das bindegewebeisweißfreie Fleischeiweiß im Fleischeiweiß in Geflügelprodukten nicht geringer als 90% sein. Diese Voraussetzung findet sich ebenfalls im Leitfaden für die „Anforderungen an die Qualität von maschinell unter Druckanwendung gewonnenem Fleisch zur Herstellung von Geflügelfleischprodukten mit hervorhebenden Hinweisen“ des Bundesverbands der Geflügelschlachtereien e. V. (2017) wieder. Dort wurde zusätzlich festgelegt, dass ein Kalziumgehalt von mehr als 200 mg/kg zum Ausschluss des Rohstoffes für die Herstellung von Fleischerzeugnissen der Kategorie Spitzenqualität führt. Als histologische Parameter wurden ein feststellbarer Muskelabrieb von maximal 35%, im Mittel von 20%, festgelegt sowie Knochenpartikel, die nur vereinzelt vorkommen dürfen. Bei Geflügelhaut wird zwischen den Ausgangsmaterialien Putenunterkeulenfleisch und Gabelbeinflisch unterschieden: Letzteres darf keine Geflügelhaut aufweisen, ersteres nur vereinzelt. Schließlich wird die Bewertung durch eine sensorische Komponente ergänzt, die besagt, dass der Zerkleinerungsgrad nicht über denjenigen von Hackfleisch hinausgehen soll. Eine Auslobung von Produkten mit dem Prädikat Spitzenqualität ist ein freiwilliges Kennzeichnungselement des Lebensmittelunternehmers. Sobald dieser entsprechend auslobt, muss das Verbot der Irreführung gemäß Art. 36 der VO (EG) Nr. 1169/2011 beachtet werden.

2.1.3 Herstellung

2.1.3.1 Ausgangsmaterial

Nach der Schlachtung eines Masthähnchens und der Herrichtung des Schlachtkörpers wird dieser in Teilstücke zerlegt. Aufgrund der technologischen Entwicklung erfolgt die Zerlegung von Geflügelschlachtkörpern in modernen Anlagen mit Hilfe automatisierter Zerlegelinien, die pro Linie mehr als 6.000 Tiere pro Stunde verarbeiten können (Barbut, 2002). Es gibt unterschiedliche Zerteilungsmöglichkeiten, die zu unterschiedlichen Teilstücken führen. Bei der Vermarktung von Geflügelteilstücken an Endverbraucher ist der Lebensmittelunternehmer entsprechend Art. 1 Abs. 2 der VO (EG) Nr. 543/2008 an definierte Schnittführungen gebunden. Eine mögliche Zerteilung des Schlachtkörpers ist in Abbildung 1 exemplarisch beschrieben. Dagegen ist der Hersteller von Verarbeitungsfleisch für weiterverarbeitende Fleischbetriebe beim Zuschnitt der Teilstücke nicht an die Regelungen der o.g. Verordnung gebunden, da diese nicht an den Endverbraucher vermarktet werden. Insbesondere Zuschnitte, die wenig Fleisch liefern und deren Fleischertrag die Personalkosten für ein Entbeinen von Hand nicht rechtfertigen, werden zu Verarbeitungsfleisch verarbeitet (Barbut, 2002, 2015). Dabei werden die Teilstücke häufig maschinell entfleischt (Sams, 2001; Barbut, 2002). Als Ausgangsmaterial kommt jedes noch nicht entbeinte Teilstück wie Hals, Flügel, Rücken, Gabelbeine, Schulter mit Rückenanteilen o.ä. in Betracht. Zudem können auch knochenlose Teile wie Filetabschnitte („Trimmings“) und überzählige Filetzuschnitte verwendet werden.

Der Zuschnitt von Puten ist dagegen weniger automatisiert und so kommt es zu deutlich mehr manuellen Zerteilungsschritten. Als primäres Teilstück zur Herstellung von mechanisch getrenntem Fleisch fallen hier Unterschenkel sowohl von männlichen als auch von weiblichen Tieren an. Diese werden zunächst abgesetzt, maschinell entbeint und daraufhin in einem Bandseparator passiert, um verknöcherte Sehnen und Haut zu entfernen (Horn & Langen, 2017).

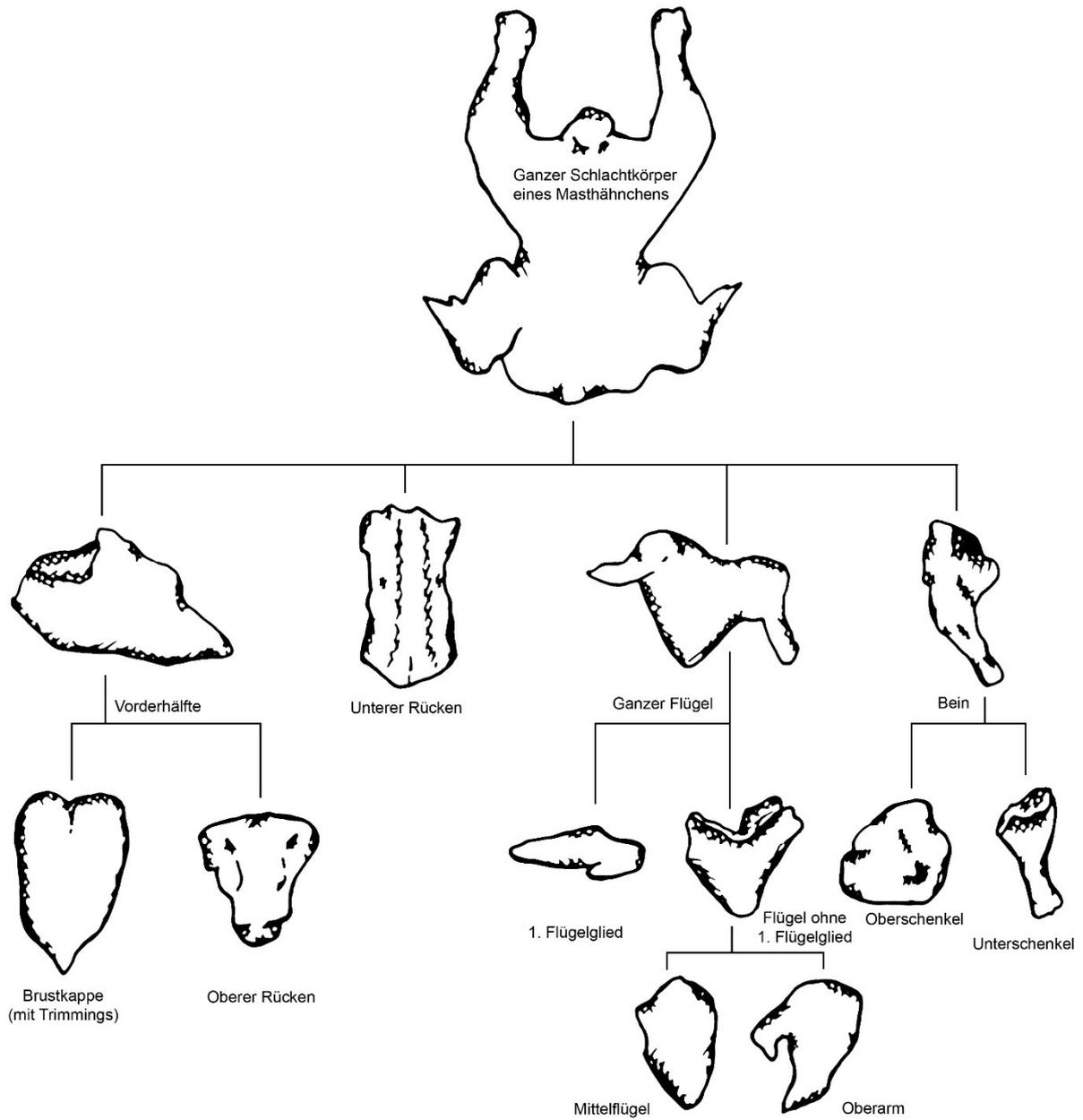


Abbildung 1 - Zerteilung eines Masthähnchens innerhalb der Schlachtlinie (Beispiel), eigene Illustration

2.1.3.2 Maschinelles Entfleischen

Das maschinelle Trennen von Fleisch und Hartgeweben (Knochen, Knorpel, Sehnen) erfolgt mit Hilfe von Separatoren. Die ersten Separatoren für Geflügelfleisch, welche als Entbeiner („Deboner“) bezeichnet wurden, tauchten in den späten 1950er Jahren auf (Field, 2004). In dieser Zeit stieg die Beliebtheit von verarbeiteten Geflügelprodukten rasch an (Froning, 1981). Das Prinzip dieser Entbeiner bestand darin, dass Teilstücke bestehend aus Knochen und Muskelfleisch mit Drücken von bis zu 200 bar gegen eine perforierte Oberfläche gepresst wurden, so dass das Muskelfleisch die Löcher passierte und damit vom Knochen getrennt wurde (Bauer, 2013a). Bei diesem Vorgang können auch Teile der Knochen, sofern sie die Lochgröße unterschreiten, mit in das Endprodukt gelangen. Der entsprechende Anteil an Knochenpartikeln ist umso höher, je stärker die Teilstücke beim Trennprozess zerkleinert werden (BfR, 2006). Knochenmark kann aufgrund seiner weichen Struktur die Löcher ebenfalls passieren (Serum et al., 1986; Field, 1999).

Die Entbeiner wurden in zwei Kategorien eingeteilt und zwar in solche, die das Muskelfleisch von innen nach außen pressen, und solche, die es von außen nach innen pressen (Froning, 1981).

Heutzutage existieren auf dem Markt primär Schnecken-, Kolben- und Bandseparatoren (Barbut, 2002, 2015).

Endless Screw

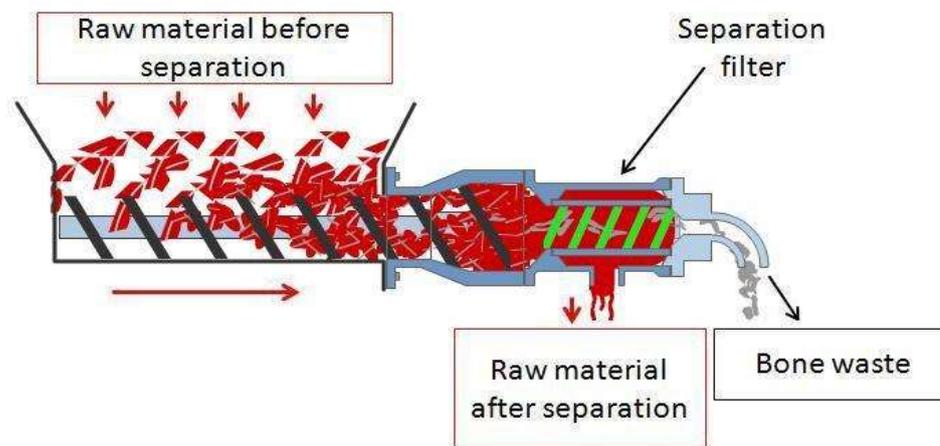


Abbildung 2 – Schema eines Schneckenseparators, Ausgangsmaterial definierter Größe wird in einer rotierenden Schnecke verdichtet, so dass sich kontinuierlich Druck aufbaut. Dieser sorgt dafür, dass das Material gegen einen Separationsfilter gepresst und weiche Bestandteile diesen passieren können. Das übriggebliebene stark knochenhaltige Material wird durch eine separate Öffnung abgeleitet. Abbildung übernommen aus EFSA Bericht (European Food Safety Authority (EFSA), 2013)

Bei Schneckenseparatoren (s. Abbildung 2) wird das Ausgangsmaterial zuerst durch einen Knochenschneider auf eine bestimmte Maximallänge gebracht. Daraufhin gelangt es in eine rotierende Schnecke, welche das Material transportiert, verdichtet und den erforderlichen Abpressdruck aufbaut. Dieser steigt mit dem Förderweg kontinuierlich an, bis er am Ende der Strecke den gewünschten Wert erreicht hat. Am Ende der Schnecke wird diese von einem mit Löchern versehenen Zylinder umgeben, welcher durch die Größe seiner Löcher Fleisch- und Fettgewebe, aber kaum Hartgewebe wie Knochen, Knorpel- oder Bindegewebe passieren lässt (Barbut, 2002; Bauer, 2013a; Barbut, 2015). Knochenrückstände werden über Schieber- oder Ringklappenöffnungen ausgeworfen (Stiebing, 1998).

Linear Separator

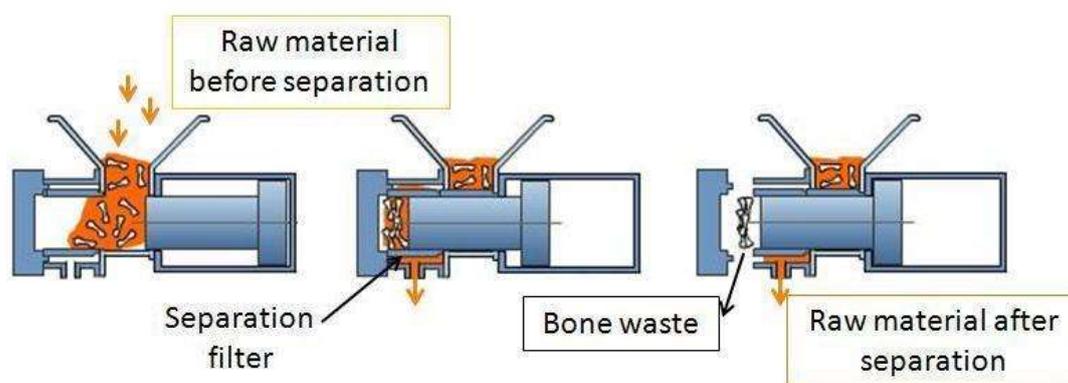


Abbildung 3 – Schema eines Kolbenseparators, Ausgangsmaterial definierter Größe wird durch einen Fülltrichter in den Hohlraum eines Zylinders verbracht. In diesen Hohlraum fährt ein passender Kolben, welcher einen definierten Druck innerhalb des Hohlraums aufbaut. Dem Druckgefälle folgend bewegt sich das weichere Material durch einen Separationsfilter aus einer Öffnung. Nach Abschluss des Vorgangs wird das knochenreiche Restmaterial ausgestoßen. Abbildung übernommen aus EFSA Bericht (European Food Safety Authority (EFSA), 2013)

Kolbenseparatoren (s. Abbildung 3) funktionieren auf ähnliche Weise. Häufig findet auch hier eine Begrenzung der Knochengröße dadurch statt, dass ein Knochenschneider das Ausgangsmaterial auf einen bestimmten Maximalwert zerteilt. Das so zerkleinerte Material gelangt daraufhin in einen Hohlzylinder und wird von einem hydraulisch betriebenen Kolben gegen eine löchrige Oberfläche gepresst, durch welche wiederum das fleisch- und fetthaltige Material nach außen geleitet wird. Das im Innern des Zylinders verbliebene Material kann danach ausgestoßen werden (Stiebing, 1998; Field, 2004; Barbut, 2015). Laut Koolmees (1986) und Josefowitz (2008) produzieren solche pressenden Separatoren tendenziell niedrigere Knochenpartikelgehalte als Schneckenseparatoren.

Belt Technology

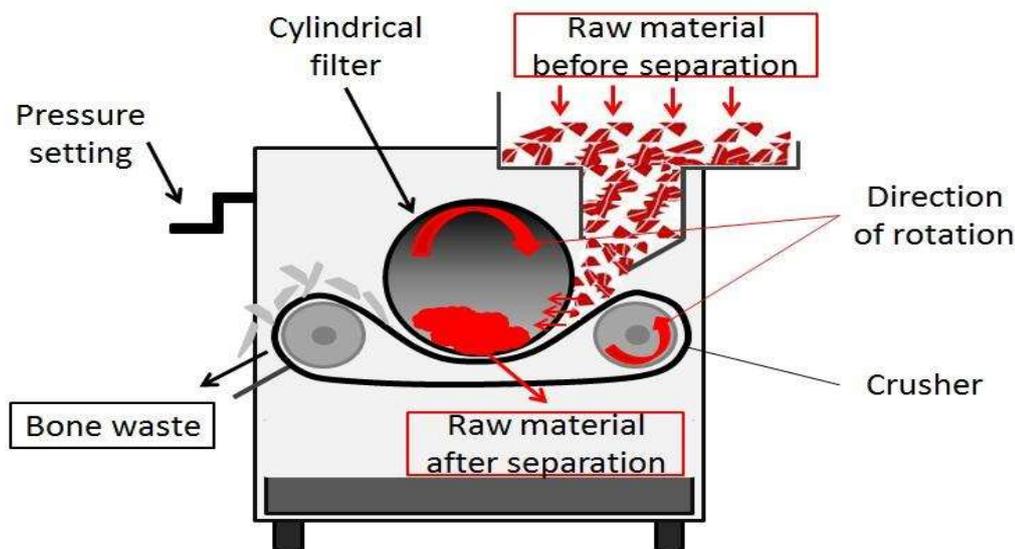


Abbildung 4 – Schema eines Bandseparators, Ausgangsmaterial wird durch einen Fülltrichter in den Bandseparator verbracht und gelangt auf ein breites Förderband aus Gummi. Dieses presst das Material mit dem gewünschten Druck gegen eine perforierte Trommel, so dass die weichen Komponenten in das Innere der Trommel gelangen. Die weichen Komponenten größtenteils bestehend aus Fleisch und Fett werden über die Trommel ausgeschleust. Das übrige Material wird mit seinen harten Komponenten über das Förderband schließlich auch ausgeschleust. Abbildung übernommen aus EFSA Bericht (European Food Safety Authority (EFSA), 2013)

Das Arbeitsprinzip des Bandseparators (s. Abbildung 4) unterscheidet sich von dem der anderen Separatoren: Es wird ein breites Band aus Gummi verwendet, welches je nach Elastizität und eingestellter Bandspannung das zu verarbeitende Material mit unterschiedlichem Druck gegen eine löchrige Trommel presst. Das Fleisch- und Fettgewebe kann diese Löcher passieren und gelangt ins Innere der Trommel. Von dort wird es sukzessive nach außen geleitet. Restgewebe verbleiben außerhalb und werden nach außen abgeführt (Stiebing, 1998; Barbut, 2002; Bauer, 2013a; Barbut, 2015; Schigulski et al., 2015). Um den Verschleiß des Bandes zu verringern, verwenden bestimmte Hersteller zusätzlich Druckrollen mit Stützketten, die den Druck auf das Band auf einer größeren Fläche verteilen (Barbut, 2015). Zusammen mit weiteren Einstellungen kann mit dieser Methode ein besonders schonend gewonnenes Erzeugnis hergestellt werden, welches eine geringe Muskelzerstörung aufweist und wenig Knochenpartikel enthält (Field, 2004; Barbut, 2015).

2.1.4 Abgrenzung zu Separatorenfleisch

Separatorenfleisch wird von der EG im Anhang I Nr. 1.14 der VO (EG) Nr. 853/2004 definiert 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“. Diese Definition formuliert demnach drei Anforderungen, welche laut dem Urteil des EuGH (2014) als kumulativ zu bewerten sind. Nur die Erfüllung aller drei Anforderungen sorgt also dafür, dass ein Erzeugnis als Separatorenfleisch eingeordnet werden kann (Upmann, 2021).

Die erste Anforderung besteht darin, dass das Erzeugnis aus Fleisch gewonnen werden muss, welches fleischtragenden Knochen nach dem Entbeinen bzw. Geflügelschlachtkörpern anhaftet. Besteht kein vorheriger Entbeinungsschritt, kann - mit Ausnahme des ganzen Geflügelschlachtkörpers - kein Separatorenfleisch entstehen. Ferner muss es sich um Knochen handeln: Wird Fleisch von Sehnen und Bindegewebe abgetrennt, kann ebenfalls kein Separatorenfleisch entstehen; in diesem Fall könnte es sich um Verarbeitungsfleisch handeln, welches auf bestimmte Bindegewebsgehalte eingestellt wird. Ähnliches gilt für Geflügelschlachtkörper, welche in Anhang I Nr. 1.9 VO (EG) Nr. 853/2004 als „Körper eines Tieres nach dem Schlachten und Zurichten („dressing“)" definiert werden. Für Teilstücke eines Geflügelschlachtkörpers ist ein vorausgehender Entbeinungsschritt ebenfalls Voraussetzung dafür, dass Separatorenfleisch entsteht. Unterbleibt diese Primärentbeinung, entsteht ebenfalls Verarbeitungsfleisch (Upmann, 2021).

Zweite Voraussetzung für die Entstehung von Separatorenfleisch ist eine maschinelle Art der Gewinnung. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass ein händisches Gewinnen von sogenanntem Knochenputz nicht als Separatorenfleisch zu kennzeichnen ist, obwohl die Qualität des Produktes nicht besser ist als diejenige von Separatorenfleisch. Die Relevanz von Knochenputz hat allerdings in den letzten Jahren stark abgenommen und ist in der Geflügelschlachtung nahezu bedeutungslos geworden. Die hoch technisierten Schlachtungsprozesse erlauben aus ökonomischer Sicht keine händische Entbeinung mehr (Barbut, 2002). Darüber hinaus hat Knochenputz in vielen Fällen eine hohe Anzahl an Knochenpartikeln (Linke & Thumser, 1964) und weist entsprechend einen deutlich höheren Kalziumgehalt auf. Ein Kriterium auf Basis einer händischen Restfleischgewinnung ist im Kontext moderner Fleischgewinnung nicht mehr allgemein anwendbar und kann daher schwerlich als Bewertungsgrundlage dienen.

Schließlich besteht die dritte Anforderung an Separatorenfleisch darin, dass eine Veränderung oder Auflösung der Struktur der Muskelfasern vorliegen muss. Dies ist laut Hildebrandt (2007) sowie Hildebrandt und Köpernik (2007) bei Verarbeitungsfleisch nicht der Fall. Zusätzlich hängen die Auflösungserscheinungen der Muskelfasern maßgeblich davon ab, wie stabil letztere sind. So zeigt sich bei Geflügelfleisch *post mortem* schon sehr früh eine Veränderung der Muskelfasern, da das ummantelnde Endomysium weniger stark ausgeprägt ist (Liu et al., 1994) als dies bei anderen Tierarten der Fall ist. Gleiches gilt auch für das Perimysium. Zusätzlich tritt im Zuge der Fleischreifung ein blättriger Zerfall des Endomysiums und später auch des Perimysiums ein. Dies ist beim Rind erst nach 14 Tagen *post mortem* der Fall

(Nishimura et al., 1995), beim Schwein schon nach 8 Tagen (Nishimura et al., 2008) und beim Hähnchen bereits nach einem halben Tag (Liu et al., 1994). Ferner gibt es viele weitere Einflussfaktoren auf die Stabilität der Muskelfasern. Dazu gehören unter anderem die zunehmende Stabilisierung des Kollagens durch Vernetzung im intramuskulären Bindegewebe mit fortschreitendem Alter sowie eine Destabilisierung durch intramuskuläres Fettgewebe (Nishimura, 2010). Diese Faktoren schränken die Eignung der Muskelzerstörung als Qualitätsparameter bei Geflügelfleisch ein.

Zusammenfassend ist bei maschinell entbeintem Fleisch, welches nicht ausnahmslos alle drei Kriterien für Separatorenfleisch erfüllt, eine Bezeichnung als Verarbeitungsfleisch zulässig (EuGH, 2014).

Darüber hinaus empfiehlt die European Safety Food Agency zur Unterscheidung von Separatorenfleisch und frischem Fleisch einen umfangreichen Untersuchungskatalog. Dieser umfasst zum einen chemische Parameter (Kalzium, Phosphat, Asche, Eisen, Fett, Cholesterin, Fettsäuren, Wassergehalt und Protein mit Kollagenbestimmung), zum anderen histologische Untersuchungen von Muskel-, Binde- und Fettgewebe, Knochenpartikeln, Knorpel, Knochenmark und Gewebe aus dem Zentralnervensystem sowie deren strukturelle Veränderungen (European Food Safety Authority (EFSA), 2013).

2.2 Knochenpartikel und Kalziumgehalt in Fleisch

2.2.1 Knochenpartikel und Kalzium in Separatorenfleisch

Bei der Verwendung von Separatoren zur Entbeinung kann die Integrität der Knochen verletzt werden, so dass es zu Splitterprozessen kommt. Je nach Separatortyp wird der Rohstoff unterschiedlich stark verdichtet und so Druck aufgebaut. Die Rohstoffmasse, bestehend aus Fleisch, Fett, Bindegewebe und Knochen, weist ihrerseits sehr unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf Festigkeit, Elastizität und Brüchigkeit auf. Das Ziel des Druckaufbaus besteht darin, dass das Rohstoffgemisch den Druckgradienten dadurch ausgleicht, dass die weicheren und formbareren Bestandteile eine löchrige Barriere passieren und so der Druck in der Rohstoffkammer abfällt. In Folge des Druckaufbaus geben allerdings auch Knochen, deren Fragilität zu hoch ist, dem Druck nach. Dabei zerbrechen diese unter Entstehung vieler kleiner Knochenpartikel. Dies ist der Natur des Knochens geschuldet, welcher die Eigenschaft besitzt, hart und spröde zu sein (Field, 2000).

Knochenpartikel und Knochen im Allgemeinen bestehen sowohl aus organischer als auch anorganischer Matrix. Der organische Teil des Knochens wird hauptsächlich aus Kollagen Typ I-Fasern und zu einem geringen Teil aus anderen Proteinen gebildet. Die anorganischen Komponenten werden vornehmlich durch Hydroxylapatitkristalle gebildet, welche im Wesentlichen aus den Elementen Kalzium und Phosphor bestehen (Field, 2000). Darüber hinaus finden sich noch Magnesium, Kalium, Chlor, Eisen und Karbonat in der anorganischen Knochenmatrix (Gorski, 1998).

Durch den hohen Anteil an Kalzium im Knochen kommt es in Abhängigkeit von der Menge an Knochenmaterial im Produkt zu einem Anstieg seines Kalziumgehaltes (Branscheid et al., 2009; Bauer, 2013b), wodurch sich Kalzium als Indikatorelement eignet (Field, 2000). In Separatorenfleisch wurden daher auch erhöhte Kalziumgehalte gegenüber frischem Fleisch nachgewiesen (Field & Riley, 1974; Ang & Hamm, 1982; Demos & Mandigo, 1995; Calhoun et al., 1999; Mayer et al., 2007). Dementsprechend wurden in Art. 11 Abs. 2 der VO (EG) Nr. 853/2004 in Verbindung mit Erwägungsgrund 13 und 14, Art. 4 und Anh. IV der VO (EG) Nr. 2074/2005 Kalziumgrenzwerte für Separatorenfleisch festgelegt. „Separatorenfleisch, bei dessen Gewinnung die Knochenstruktur verändert wird“ ist anders zu bewerten als solches, „das nach Verfahren gewonnen wird, die die Struktur der verwendeten Knochen nicht verändern“. Während der letztgenannte Rohstoff, dessen Kalziumgehalt 0,1% (=100 mg/100 g oder 1000 ppm) des frischen Erzeugnisses nicht überschreitet und als „nicht wesentlich höher als der Kalziumgehalt von Hackfleisch/Faschiertem gilt“ (Art. 11 Abs. 2 der VO (EG) Nr. 853/2004), in Produkten zum Einsatz kommen kann, die roh abgegeben werden aber eindeutig zum Verzehr nach erfolgten Erhitzungsschritt bestimmt sind (Anh. III, Abschn. V Kap. I Nr. 2

c) der VO (EG) Nr. 853/2004), dürfen die erstgenannten Rohstoffe, die über diesem Wert liegen, nur in erhitzter Form an den Konsumenten abgegeben werden.

2.2.2 Gehalte in Fleisch und Fleischprodukten

Ein Knochenpartikeleintrag bei der Entbeinung von Fleisch ist technologisch unvermeidbar (Linke & Thumser, 1964; Upmann & Lade, 2015). Daher wird das Vorkommen von Knochenpartikeln in Fleisch bis zu einem vereinzelt Vorkommen geduldet. Als „vereinzelt“ gilt gemäß 8.2.1 der L 6.00-13 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB ein Vorkommen, bei dem „nicht regelmäßig“ in jedem Schnitt Knochenpartikel detektiert werden. Daraus resultiert bei 10 Schnitten mit einer Fläche von ungefähr 4 cm² ein durchschnittlicher maximaler Wert von 0,2 Knochenpartikeln/cm² (Schulte-Sutrum & Horn, 2003). Gleichzeitig sind jedoch auch andere Berechnungen denkbar, da die Kapitel 6 und 7 der L 6.00-13 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB lediglich 6 Schnitte verlangen und in der Praxis neben 4 cm² auch Großschnitte mit mehr Quadratzentimetern zum Einsatz kommen.

Der Kalziumgehalt in Fleisch wird durch den Anh. IV der VO (EG) 2074/2005 in Bezug auf Separatorenfleisch ohne Veränderung der Knochenstruktur auf 0,1%, also 1000 mg/kg beschränkt. Dieser Wert soll den typischen Kalziumgehalt von Hackfleisch nicht signifikant übersteigen. Allerdings ist in dieser Verordnung auch beschrieben, dass dieser Wert anzupassen sei, „sobald ausführliche Informationen über Abweichungen infolge der Verwendung unterschiedlicher Arten von Rohmaterial vorliegen“. Infolgedessen haben weitere Bestandsaufnahmen diese Vorgaben deutlich unterboten. Untersuchungen im Rahmen einer Erhebung für den ALTS zeigen, dass Werte von 150 mg/kg typisch für Geflügelfleisch aus Brust, Schenkel und anderen Fleischstücke sind (Stenzel & Hildebrandt, 2006). Dieser Wert wurde auf 200 mg/kg angehoben und stellt somit auch tierartenübergreifend bei Hackfleisch einen sinnvollen Wert dar (Hildebrandt & Josefowitz, 2007). Die 200 mg/kg finden sich ebenso in den Leitlinien des Zentralverbands der Deutschen Geflügelschlachtereien e. V. (2017) wieder. Dort wird dieser Höchstwert für Verarbeitungsfleisch festgelegt, das zur Herstellung von Produkten der Kategorie Spitzenqualität verwendet wird.

2.2.3 Detektionsmethoden

2.2.3.1 Histologie

Die Histologie eignet sich zur Ermittlung der geweblichen Zusammensetzung von Lebensmitteln. Dies trifft in erster Linie auf Fleisch, Fleischerzeugnisse und Wurstwaren zu (Schulte-Sutrum & Horn, 2003). Wie bei anderen Analyseverfahren auch, ist eine fortlaufende Validierung notwendig, um Fehlerquellen (Färbeartefakte, Farbvarianz u. Ä.) bei diesem Verfahren unter Kontrolle zu halten (Schering, 2015).

Für den Nachweis von Knochenpartikeln in Fleischerzeugnissen sind mehrere Verfahren etabliert. Die wichtigsten Färbungen sind die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, die Silbernitratimprägnierung und die Färbung nach Calleja (Puchtler et al., 1969; Schultesutrum & Horn, 2003). Erstere und letztere wurden auch in Ringversuchen validiert (Schultesutrum & Horn, 2003)

Bei der **Silbernitratimprägnierung** wird das in den Knochen befindliche Kalzium gegen Silberionen aus dem Silbernitrat der Färbelösung ausgetauscht (Mulisch & Welsch, 2015). Dabei lagern sich die Silberionen an den Oberflächen der Hydroxylapatitkristalle des Knochens an. Dies geschieht mit Hilfe sogenannter „knochensuchender Ionen“ (Rungby et al., 1993). Die Silberionen ersetzen dort phosphatgebundenes Kalzium an den äußeren Schichten dieser Kristalle. Danach werden die Proben einer reduzierenden Substanz ausgesetzt. Die nun stattfindende Versilberung wird durch katalytische Stellen beschleunigt. Solche Stellen können im Fall des von Kossa-Verfahrens entweder metallische Silberatome oder Silbersulfidmoleküle sein. Da Disulfidbrücken reichlich in den Kollagenfasern vorhanden sind, welche immer in der Nähe von kalzifiziertem Gewebe auftreten (Kassem et al., 1992), werden daraus Thiolgruppen abgegeben. Somit entstehen in Gegenwart von Silber Silbersulfide.

Für eine erfolgreiche Silbernitratimprägnierung sind dementsprechend Silberionen von der Oberfläche von Hydroxylapatiten, eine reduzierende Substanz und katalytische Stellen notwendig (Rungby et al., 1993).

Die **Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra** (Pfeiffer et al., 1975) beruht hauptsächlich auf der Färbung mittels Alizarin- oder Alizarin S-Verbindungen (Mulisch & Welsch, 2015). Die genaue Funktionsweise der Färbung ist nicht eindeutig geklärt. Nach Puchtler et al. (1969) bilden die Farbstoffe selektiv mit Kalzium oder anderen Metallionen Salze beziehungsweise Lacke; ein Lack ist ein schwerlösliches oder unlösliches Salz eines wasserlöslichen Farbstoffs. Die Salzbildung erfolgt zwischen den Sulfonsäuregruppen des Farbstoffes und Kalzium beziehungsweise anderen Metallkationen.

Im Gegensatz dazu kommt es nach Lang (2012) sowie Mulisch und Welsch (2015) mit zweiwertigen Kationen wie Ca^{++} zu einer Chelatbildung. Diese Chelatbildung wurde von Puchtler et al. (1969) allerdings bezweifelt, da auch lackbildende Acid-Farbstoffe, die keine Chelatgruppen enthalten, Kalzium selektiv färben.

In sauren Lösungen wird Kalzium aus dem Farbkomplex wieder freigesetzt, so dass der pH-Wert bei dieser Färbung eine starke Rolle spielt (Mulisch & Welsch, 2015).

Die **Färbung nach Calleja** weist Knochengewebe mit Hilfe des Farbstoffes Indigokarmin nach und färbt dieses blau ein. Darüber hinaus werden auch Knorpelgewebe und kollagene Fasern blau eingefärbt, so dass es sich nicht um eine selektive Knochenfärbung handelt (Steven et al., 2000; Mulisch & Welsch, 2015).

2.2.3.2 Kalziumnachweis

Eine standardisierte, international anerkannte Methode zur Bestimmung des Kalziumwertes stellt unter anderem die Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie dar (Wnuk, 2002). Sie wird zur Kalziumbestimmung in Fleisch und Fleischerzeugnissen (Chekri et al., 2012; Bauer, 2013b) aber auch in anderen Lebensmitteln (Madejczyk, 2008) eingesetzt.

2.2.3.3 Weitere Detektionsmethoden

Aufgrund ihrer hohen Dichte ist auch der röntgenologische Knochenpartikelnachweis möglich. Dieser lieferte aber in der Vergangenheit unsichere Ergebnisse bei mikroskopisch kleinen Partikeln (Tao & Ibarra, 2000). Neueste Forschungen haben aber inzwischen die Nachweisgrenze im Hinblick auf die Partikelgröße weiter nach unten verschoben (Pospiech et al., 2019).

Nicht zuletzt ist auch die Verdauungsmethode nach Negatu (2005) sowie Upmann und Lade (2015) eine effektive Detektionsmethode. Sie basiert auf der enzymatischen Zersetzung aller proteinbasierten Gewebe und lässt fast ausschließlich das Knochengewebe übrig. Dieses kann dann getrocknet und unter einem Mikroskop direkt nachgewiesen werden.

3 Material und Methode

3.1 Versuchsaufbau

Die Untersuchungen wurden in den Laboren der Technischen Hochschule Ostwestfalen-Lippe durchgeführt. Sie bestehen einerseits aus Untersuchungen zur Aussagekraft der histologischen Knochenpartikelanalyse, andererseits aus einer Erhebung zur Ermittlung des Knochenpartikelgehaltes von Geflügelverarbeitungsfleisch. Aus dem Probenmaterial (Fleisch, Fleischzubereitungen, Fleischerzeugnisse) wurden histologische Schnitte hergestellt, gefärbt und untersucht. Die genauen Spezifikationen der verwendeten Materialien sind in Tabelle 19 in Kapitel 10 - Anhang aufgelistet.

3.2 Untersuchungsgut

3.2.1 Einmischversuche in Hackfleisch

Für die Untersuchungen zur methodischen Aussagekraft wurde Geflügelhackfleisch aus knochenfreien Hähncheninnenfilets selbst hergestellt, in welches unterschiedliche Mengen an Knochengranulat aus dem Futtermittelhandel eingemischt wurde.

Hähncheninnenfilets aus dem Lebensmitteleinzelhandel wurden manuell von anhaftendem Bindegewebe, Sehnen, Gefäßen und Knorpel-/Knochenresten befreit. Das schiere Muskelfleisch wurde mit einem haushaltsüblichen Küchenfleischwolf auf eine Größe von 3 mm gewolft.

Das so hergestellte Hackfleisch wurde gemäß Tabelle 1 mit unterschiedlichen Mengen Geflügelknochengranulat aus dem Tierfutterergänzungsmittelhandel, mit Gewürzen oder mit Mineralstoffen vermischt. Das Mischen wurde manuell für mindestens 5 Minuten vorgenommen und bei einer augenscheinlich gleichmäßigen Verteilung beendet.

Tabelle 1 – Einmischversuche von unterschiedlichen Substraten zur Entwicklung eines softwaregestützten Nachweis- und Bestimmungsverfahrens zur histologischen Knochenpartikelanalyse

Hackfleisch [g]	Knochengranulat [g]	Majoran [g]	Schwarzer Pfeffer [g]	CaCO ₃ [g]	Na ₂ HPO ₄ [g]
100	0	-	-	-	-
99,9	0,1	-	-	-	-
99,7	0,3	-	-	-	-
99,5	0,5	-	-	-	-
99,0	-	1,0	-	-	-
99,0	-	-	1,0	-	-
95,0	-	-	-	5,0	-
95,0	-	-	-	-	5,0

3.2.2 Fleischprodukte aus dem Lebensmittelhandel

Ferner wurden Fleischprodukte aus dem Lebensmittelhandel erworben (s. Tabelle 2). Zum einen wurden für die Untersuchungen der methodischen Aussagekraft zwei



Abbildung 5 – Geflügelbrühwurst mit deklariertem Anteil an mechanisch getrenntem Putenfleisch



Abbildung 6 – Geflügelbratrollen mit deklariertem Anteil an Hähnchenseparatorenfleisch

Geflügelfleischprodukte mit einem deklarierten Anteil an „Geflügelseparatorenfleisch“ bzw. „mechanisch getrenntem Fleisch“ ausgewählt. Es handelte sich um Geflügelbrühwürste (Abbildung 5) sowie Geflügelbratrollen (Abbildung 6). Die Geflügelbrühwurst enthielt einen deklarierten Anteil von 34% mechanisch getrennten Hühnerfleisch sowie 3% mechanisch getrenntem Putenfleisch.

Die Geflügelbratrollen enthielten einen deklarierten Anteil von 70% Hähnchenseparatorenfleisch.

Zum anderen wurden Geflügelhackfleischzubereitungen aus Hähnchen- und Putenhackfleisch als SB-Ware im Lebensmitteleinzelhandel erworben (s. Abbildung 7 und Abbildung 8).



Abbildung 7 – Hackfleischzubereitung aus Hähnchenhackfleisch und Speisesalz



Abbildung 8 – Hackfleischzubereitung aus Putenhackfleisch und Gewürzen

Tabelle 2 - Produkte aus dem Lebensmitteleinzelhandel mit Verdacht auf Knochenpartikelgehalt zur Entwicklung eines softwaregestützten Nachweis- und Bestimmungsverfahrens zur histologischen Knochenpartikelanalyse

Produkt- bezeichnung	Hersteller (EG Nr.)	Angaben aus Zutatenverzeichnis (Auszug)
Geflügelbrühwurst	A (NL 77 EG)	47% Hühnerfleisch, wovon 34% mechanisch getrennt, Hühnerfett, Hühnerbindegewebe, Weizenmehl, 3% mechanisch getrenntes Putenfleisch, Putenfett
Geflügelbratrolle	B (DE NW 40108 EG)	Hähnchenseparatorenfleisch 70%, Rindfleisch 2%, Rinderfett
Hähnchen- hackfleisch- zubereitung	C (DE BW 07001 EG)	99,1% Hähnchenhackfleisch
Putenhackfleisch- zubereitung	D (DE NI 10321 EG)	94% Putenhackfleisch

3.2.3 Geflügelverarbeitungsfleisch

3.2.3.1 Materialursprung

Insgesamt wurden 29 Chargen Geflügelverarbeitungsfleisch (27-mal Hähnchen, 2-mal Pute) in 5 verschiedenen Herstellerbetrieben entnommen. Die Probenentnahme erfolgte in 14 Fällen durch wissenschaftliches Personal, in 15 Fällen durch das Personal des Qualitätsmanagements des jeweiligen Herstellerbetriebes nach Unterweisung durch das wissenschaftliche Personal.

Als Ausgangsmaterial wurden verschiedene Teilstücke verwendet:

Hähnchen

- Gabelbeine nach dem Ausstanzen
- Brustbeine
- Oberes Rückenstück
- Schulter
- Flügelglieder (1. Flügelglied, Mittelflügel)
- Unterkeulen
- Filet-Abschnitte, sogenannte Trimmings, mit teilweise anhaftendem Knochen

Pute

- Unterkeulen von weiblichen Tieren
- Unterkeulen von männlichen Tieren

Zur Herstellung des Verarbeitungsfleisches wurden Separatoren der Firma Baader® und der Firma Sepamatic® verwendet. Das Produkt der Separation wurde entweder als solches oder in Mischungen mit anderen Teilstücken vermarktet. Tabelle 3 und Tabelle 4 geben einen Überblick über die untersuchten Verarbeitungsfleischprodukte.

Tabelle 3 – Proben, welche aus Betrieben entnommen und untersucht wurden

Betriebsstätte	Produktionsdatum	Versuch in Kapitel	Verarbeitungsfleisch	Separatorfleisch	Gabelbein [%]	Brustbein [%]	Rücken [%]	Schulter [%]	Schabefleisch [%]	1. Flügelglied [%]	Mittelflügel [%]	Unterkeule [%]	Filetabschnitte [%]	Separatortyp	Hähnchen	Weibliche Pute	Männliche Pute	Entnommen durch QM	Entnommen durch TH OWL
1	23.10.17	3.5.1	x											Baader 603	X				X
1	23.10.17	3.5.1		x										Lima RM 1000S	X				X
2	27.10.17	3.5.1	x											Baader 605	X				X
2	27.10.17	3.5.1		x										Lima RM 600S	X				X
3	12.02.18	3.5.4, (40 bar))	x							100				Marel DMP 45	X				X
3	12.02.18	3.5.4, (60 bar))	x							100				Marel DMP 45	X				X
3	12.02.18	3.5.4, (40 bar)	x								100			Marel DMP 45	X				X
3	12.02.18	3.5.4, (60 bar)	x								100			Marel DMP 45	X				X
2	12.02.18	3.5.2, morgens	x		50								50	Baader 605	X			X	
2	12.02.18	3.5.2, mittags	x		20				60				20	Baader 605	X			X	
2	12.02.18	3.5.2, abends	x		50								50	Baader 605	X			X	
2	13.02.18	3.5.2, morgens	x		80								20	Baader 605	X			X	
2	13.02.18	3.5.2, mittags	x		30								70	Baader 605	X			X	
2	13.02.18	3.5.2, abends	x		50								50	Baader 605	X			X	
2	15.02.18	3.5.2, morgens	x		50								50	Baader 605	X			X	
2	15.02.18	3.5.2, mittags	x				50						50	Baader 605	X			X	
2	15.02.18	3.5.2, abends	x		50								50	Baader 605	X			X	

Tabelle 4 – Proben, welche aus Betrieben entnommen und untersucht wurden (Fortsetzung)

Betriebsstätte	Produktionsdatum	Versuch	Verarbeitungsfleisch	Separatorenfleisch	Gabelbein [%]	Brustbein [%]	Rücken [%]	Schulter [%]	Schabeifisch [%]	1. Flügelglied [%]	Mittelflügel [%]	Unterkeule [%]	Filetabscnitte [%]	Separatortyp	Hähnchen	Weibliche Pute	Männliche Pute	Entnommen durch QM	Entnommen durch TH OWL
2	16.02.18	3.5.2, morgens	x		50								50	Baader 605	X			X	
2	16.02.18	3.5.2, mittags	x			100								Baader 605	X			X	
2	16.02.18	3.5.2, abends	x		40								60	Baader 605	X			X	
2	19.02.18	3.5.2, morgens	x		50								50	Baader 605	X			X	
2	19.02.18	3.5.2, mittags,	x		100									Baader 605	X			X	
2	19.02.18	3.5.2, abends	x		50								50	Baader 605	X			X	
4	05.06.18	3.5.5	x									100		Sepamatic 4000		X			X
4	05.06.18	3.5.5	x									100		Sepamatic 2000			X		X
5	19.06.18	3.5.3	x			100								Sepamatic 3000 CT	X				X
5	19.06.18	3.5.3	x		100									Sepamatic 3000 CT	X				X
5	19.06.18	3.5.3	x					100						Sepamatic 3000 CT	X				X
5	19.06.18	3.5.3	x									100		Sepamatic 3000 CT	x				X

3.2.3.2 Betriebe

Betrieb 1 und 2 waren integrierte Schlacht- und Zerlegebetriebe für Hähnchen. Innerhalb des Zerlegeprozesses wurden Teilstücke, welche nicht für den Verkauf geeignet waren, zu Verarbeitungsfleisch verarbeitet. Nicht entbeinte Gabelbeine, Rückenstücke und Häse wurden verarbeitet, aber auch Hähnchenbrustfilets mit Zuschnittfehlern oder deren Zuschnittreste. Die Teilstücke wurden in Transportwagen gesammelt und zum jeweiligen Bandseparator (s. Tabelle 3 und Tabelle 4) gebracht. Die Qualitätseigenschaften des Endproduktes (wie zum Beispiel Fett- und Eiweißgehalt) wurden durch die Bestückung des Separators mit unterschiedlichen Ausgangsmaterialien gelenkt.

Beide Betriebe stellten ebenfalls Separatorenfleisch her. Die Vorgehensweise war dabei ähnlich, jedoch bestanden die Rohstoffe aus Knochen nach dem Entbeinen. Zur Herstellung wurde ein Kolbenseparator verwendet. Das Produkt wurde nach der Herstellung durch ein Schlauchsystem in Formen gefüllt und sofort in sogenannten Plattenfroster tiefgefroren.

Bei Betrieb 3 handelte es sich um einen Hersteller von Separatoren, welcher den Separator in einer Probeproduktion mit dem jeweiligen Ausgangsmaterial bestückte.

Betrieb 4 war ebenfalls ein integrierter Schlacht- und Zerlegebetrieb, welcher ausschließlich Puten verarbeitete. Der Ablauf der Verarbeitungsfleischgewinnung fand analog zu demjenigen der Betriebe 1 und 2 statt.

Betrieb 5 war ein reiner Verarbeitungsbetrieb, der die Ausgangsmaterialien von anderen Betrieben und Standorten bezog. Das Vorgehen der Verarbeitungsfleischgewinnung entsprach demjenigen der übrigen Betriebe.

Die Probenentnahmen erfolgten sowohl für Verarbeitungs- als auch für Separatorenfleisch aus dem Auffangbehälter an der Stelle, an welcher das Produkt aus dem jeweiligen Separator austrat. Jede Produktionscharge wurde an drei unterschiedlichen Stellen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt. Das Material wurde direkt mit einem umgestülpten Kunststoffbeutel entnommen, beschriftet und verschlossen. Alle Proben wurden innerhalb des Betriebes bei unter 4 Grad Celsius gekühlt.

3.2.3.3 Transport und Lagerung

Der Transport zur Hochschule erfolgte unmittelbar nach der jeweiligen Probenentnahme in Kühlboxen und dauerte maximal 6 Stunden.

Die 15 Proben, welche durch das Qualitätsmanagement des Herstellerbetriebes entnommen wurden, lagerten maximal 3 Tage im Betrieb. Der Transport erfolgte mit Kühlelementen durch eine Transportfirma. Bei Ankunft an der Hochschule wurde das Material unmittelbar der Verpackung entnommen und zu Portionen à ca. 500 Gramm in Kunststoffbeutel gefüllt. Beim Umfüllen wurde das Material zusätzlich durchmischt. Die weitere Behandlung erfolgte gemäß Abschnitt 3.3.1.1.

3.3 Analytische Verfahren

3.3.1 Histologische Aufarbeitung

3.3.1.1 Anfertigen histologischer Schnitte

Das Probenmaterial wurde, mit Ausnahme der Geflügelbrühwurst und der Geflügelbratrolle, in Kunststoffbeutel gefüllt. Durch die Anwendung eines Nudelholzes wurde das Probenmaterial im Folgenden gleichmäßig auf eine Höhe von 3 cm flach gewalzt, welche durch ein Lineal überprüft wurde.

Die Beutel wurden in der Gefriertruhe für 10 Minuten bei -18 Grad bis zur Verfestigung des Materials gelagert. Die Geflügelbratrolle wurde lediglich der auf -18 Grad temperierten Gefriertruhe, die Geflügelbrühwurst dem auf 6 Grad gekühlten Kühlschrank entnommen.

Zum Anfertigen histologischer Schnitte wurde die Gefrierschnitt-Technik angewendet.

Aus den so präparierten Proben wurden mittels einer quadratischen Edelstahlstanze manuell kleine flache Würfel ausgestanzt (s. Abbildung 9). Die Kantenlänge der Stanze betrug 2,2 cm, so dass Würfel mit einer Oberfläche von 4,84 cm² auf der Oberseite hergestellt wurden. Die Kantenlänge wurde mit einem Lineal kontrolliert und Würfelkanten mit ausgerissenem Binde- und Fettgewebematerial rekonstruiert.

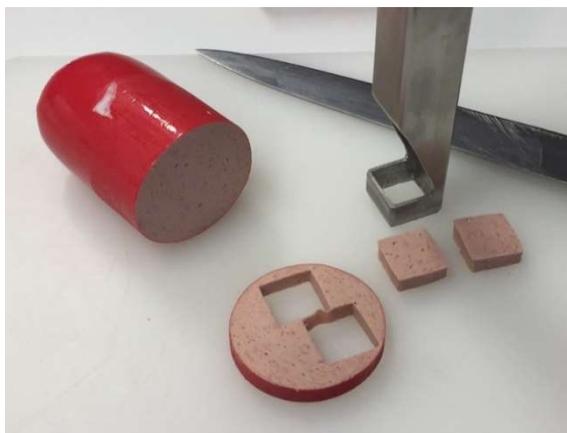


Abbildung 9 – Preparation der Probenwürfel mit einem Edelstahlstanzer zur Vorbereitung Vorbereitung für Gefriermikrotomschnitte.

Das Schneiden und Färben der Proben erfolgte in Anlehnung an die Routineverfahren zur qualitativen und quantitativen histologischen Untersuchung (L 06.00-13 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB).

Die Würfel wurden dann unter Verwendung des Einbettungsmittels auf Objektischen des Gefriermikrotoms befestigt und in das Gefriermikrotom verbracht.

Die im Mikrotom eingestellte Temperatur wurde in Abhängigkeit vom Fettgehalt der Probe gewählt: Das Verarbeitungsfleisch (s. Tabelle 3 und Tabelle 4) sowie die Hackfleischzubereitungen aus Hähnchen- und Putenfleisch (s. Tabelle 1) wurden in einem Temperaturbereich zwischen minus 18 Grad und minus 20 Grad eingefroren.

Die übrigen Proben wurden bei tieferen Temperaturen von minus 22 bis minus 25 Grad eingefroren. Sobald die Proben die gewünschte Temperatur erreicht hatten, wurden 10 Mikrometer dicke Schnitte angefertigt (s. Abbildung 10). Durch langsame Schnittführung, gleichmäßige Geschwindigkeit, akkurate Positionierung des Schnittstreckers und Manipulation mittels Pinsel wurde die Stauchung und Faltenbildung minimiert. Schnitte, welche makroskopisch Abweichungen von der Form eines Quadrates aufwiesen, wurden verworfen. Der auf diese Weise entstandene Schnitt wurde daraufhin auf einen Objektträger verbracht.



Die Objektträger wurden dann in die Speicherkassetten des Färbeautomaten eingesetzt. Nach Befüllung wurde die Kassette im

Abbildung 10 – Anfertigen eines Schnittes

Trockenschrank bei 55 +/- 5 Grad Celsius für mindestens 60 Minuten getrocknet.

3.3.1.2 Färbungen

Im Folgenden wurde die Kassette dann in den Färbeautomaten eingesetzt, welcher die Färbungen gemäß eingespeichertem Protokoll vornahm. Die Schnitte wurden nach der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, nach Calleja sowie mittels Silbernitratimprägnierung gefärbt.

Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra sowie Färbung nach Calleja

Die Trichromfärbung mit Pikrinsäure-Alizarin-S und Indigocarmin (Pfeiffer et al., 1975) und die Färbung nach Calleja erfolgten in Anlehnung an das in der amtlichen Methode empfohlenem Schema (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Färbeschema Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra und Färbeschema nach Calleja

Färbeschema nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra		Färbeschema nach Calleja	
Zeit in Minuten	Färbeschritt	Zeit in Minuten	Färbeschritt
1:00	Ethanol 100%	1:00	Isopropanol
0:30	Essigsäure 1%	1:00	Ethanol 96%
0:30	Destilliertes Wasser	1:00	Ethanol 90%
1:30	Pikrinsäure-Alizarin S-Lösung	1:00	Ethanol 70%
1:00	Destilliertes Wasser	1:00	Destilliertes Wasser
2:30	Indigokarmin-Lösung	12:00	Kernechtrot-Lösung
1:30	Destilliertes Wasser	1:00	Destilliertes Wasser
		20:00	Pikro-Indigo-Lösung
1:30	Destilliertes Wasser	1:00	Destilliertes Wasser
0:30	Ethanol 70%	0:30	Ethanol 70%
0:30	Ethanol 90%	0:30	Ethanol 90%
0:30	Ethanol 96%	0:30	Ethanol 96%
0:30	Isopropanol	0:30	Isopropanol
1:30 + X	Xylol	1:30 + X	Xylol

Silbernitratimprägnierung

Die Silbernitratimprägnierung wurde in der in Tabelle 6 beschriebenen Art und Weise durchgeführt. Sie ähnelt der Silbernitratimprägnierung nach Kossa, modifiziert nach Königsmann, wurde allerdings durch die Verwendung eines alternativen Reduktions- und Oxidationsmittels gem. Mulisch und Welsch (2015) modifiziert.

Die Silbernitrat-Lösung wurde nach Verwendung in einem Kühlschrank bei 6°C gelagert. Vor der erneuten Nutzung wurde diese auf Raumtemperatur erwärmt und unter Lichtausschluss in einer Kunststoffbox (s. Abbildung 58) mittels eines Faltenfilters gefiltert.

Tabelle 6: Silbernitratimprägnierung in der verwendeten Modifikation

Silbernitratimprägnierung (Teil 1)		Silbernitratimprägnierung (Teil 2)	
Zeit in Minuten	Färbeschritt	Zeit in Minuten	Färbeschritt
1:00	Isopropanol	0:30	Farmerscher Abschwächer
1:00	Ethanol 96%	1:00	Natriumthiosulfat (Fixierer)
1:00	Ethanol 90%	10:00	Spülen in Leitungswasser
1:00	Ethanol 70%	1:00	[Optional] Orange-G
1:00	Destilliertes Wasser	0:30	Ethanol 70%
40:00	Silbernitrat-Lösung	0:30	Ethanol 90%
1:00	Destilliertes Wasser	0:30	Ethanol 96%
1:00	Destilliertes Wasser	0:30	Isopropanol
2:00	Natriumcarbonat-Lösung	1:30+X	Xylol
10:00	Spülen in Leitungswasser		

Das Eindecken der Präparate erfolgte manuell mit einem synthetischen Einschlussmittel. Dafür wurden die Objektträger samt Schnitten einzeln dem Xylolbad entnommen und es wurden je zwei Tropfen Einschlussmittel auf das Präparat gegeben. Direkt im Anschluss wurde ein Deckgläschen unter Vermeidung von Lufteinschlüssen aufgelegt. Die Trocknung erfolgte unter dem Abzug bei Zimmertemperatur für mindestens 24 Stunden.

3.3.1.3 Auswertung

Die Schnitte wurden mittels Slidescanner und der dazugehörigen Software digitalisiert. Folgende Einstellungen wurden verwendet (s. Tabelle 7):

Tabelle 7 – Verwendete Einstellungen des Slide Scanners zur Digitalisierung der Präparate auf den Objektträgern

Image Encoding	JPEG
JPEG Quality Factor (1-100)	70
Interpolated Focus Distance	5
Brightfield Compensation	Compensation Image

Die entstandenen DAT-Dateien wurden mit Hilfe des Programms Panoramic Viewer geöffnet und als Bilddatei im JPEG-Format exportiert. Beim Export der Bilder wurden folgende Einstellungen verwendet (s. Tabelle 8):

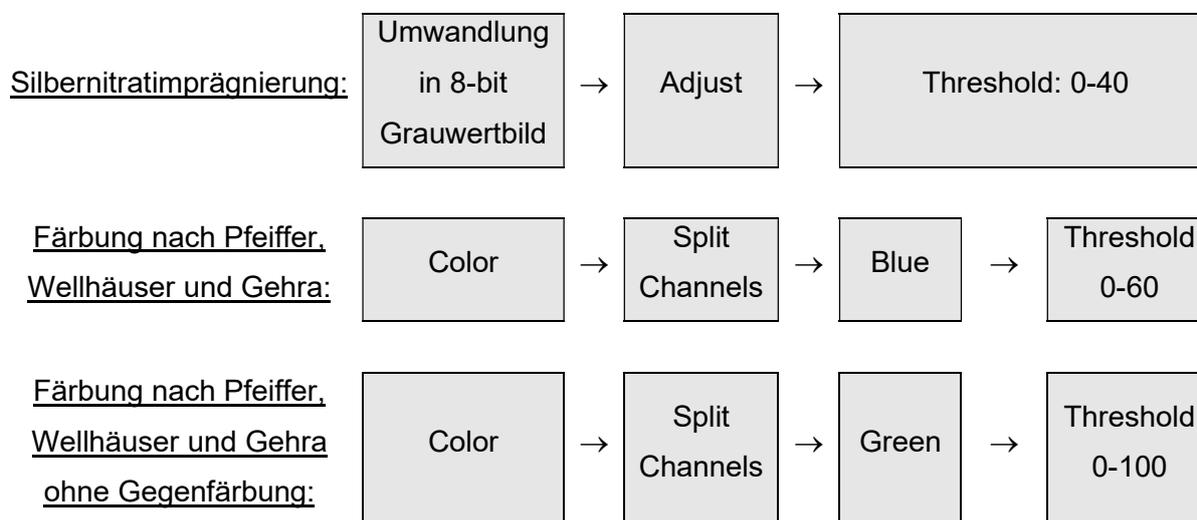
Tabelle 8 – Verwendete Einstellungen des Bildexports zur Konvertierung und anschließendem Export

File Format	MetaXML
Magnification	1:4
Tile Size	2048 x 2048
Image Codec	JPEG
Quality (1-100)	100
Region	Whole Slide

Die Bilder wurden abhängig von ihrer Größe in unterschiedlich viele Einzelbilder geteilt und abgespeichert. Jedes Einzelbild verfügte über eine Auflösung von 2048 x 2048 Pixel. Im Regelfall wurden 30 Einzelbilder abgespeichert. Daraus ergab sich eine Gesamtauflösung des Schnittes von 61.440 x 61.440 Pixeln.

Die Einzelbilder wurden daraufhin in das Programm ImageJ® geladen und in eine Bilderfolge, einen sogenannten „Stack“ überführt. Nach Erstellung des Stacks konnten je nach Färbung folgende Farbschwellenwerte angewendet werden, um die Knochenpartikelfläche von anderen Geweben zu diskriminieren und zu detektieren (s. Tabelle 9).

Tabelle 9 - Einstellung der Schwellenwerte zur Diskriminierung von Knochenpartikelflächen zu anderen Geweben



Bilder der Silbernitrat-gefärbten Schnitte erfuhren zunächst eine Umwandlung in ein 8-bit Grauwertbild, so dass lediglich Grautöne von weiß bis schwarz auftraten. Da die gesuchten Knochenpartikel von schwarzer Farbe waren, konnte dementsprechend ein sehr enger Schwellenwertbereich ausgewählt werden, welcher nur äußerst dunkle Bereiche detektierte (gem. Tabelle 9).

Die übrigen Färbungen wurden durch sogenanntes Channel Splitting ebenfalls in 8-bit Grauwertbilder überführt und der spezifische Schwellenwert aus Tabelle 9 angewendet.

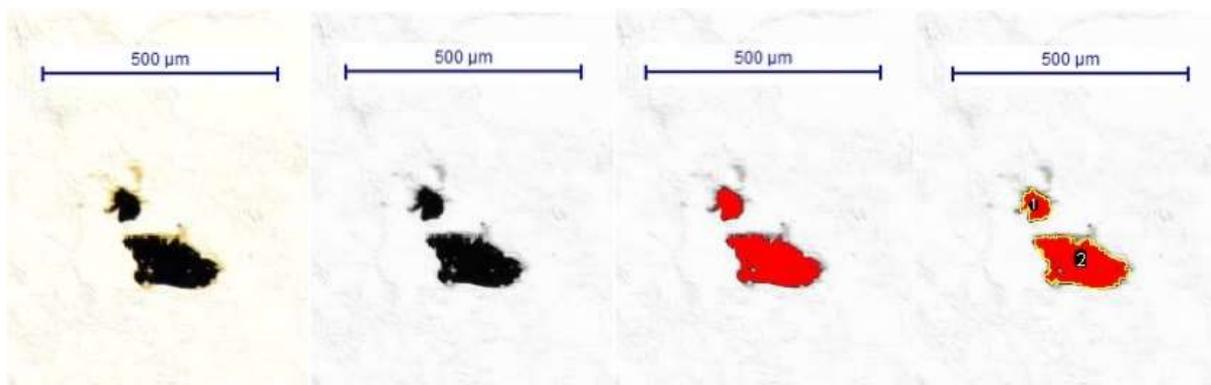


Abbildung 11: Einzelne Schritte der Flächendetektion im Programm ImageJ® bei der Silbernitratimprägnierung. Von links nach rechts: Originalbild, Umwandlung in ein 8-bit-Grauwertbild, Anwendung des Schwellenwertes, Partikelzählung und Flächenmessung.

Anschließend wurde eine Partikelzählung mit gleichzeitiger Flächenbestimmung im Programm durchgeführt. Dabei wurden Knochenpartikel als solche gezählt, wenn sie mindestens eine Fläche von $100 \mu\text{m}^2$ aufwiesen. Der Vorgang ist in Abbildung 11 dargestellt. Jedes Einzelbild wurde nach Abschluss des Vorgangs visuell auf falsch detektierte Flächen überprüft und gegebenenfalls korrigiert. War die Analyse abgeschlossen, wurde ein Export der Ergebnisse in das Excel-Format vorgenommen (s. Abbildung 12).

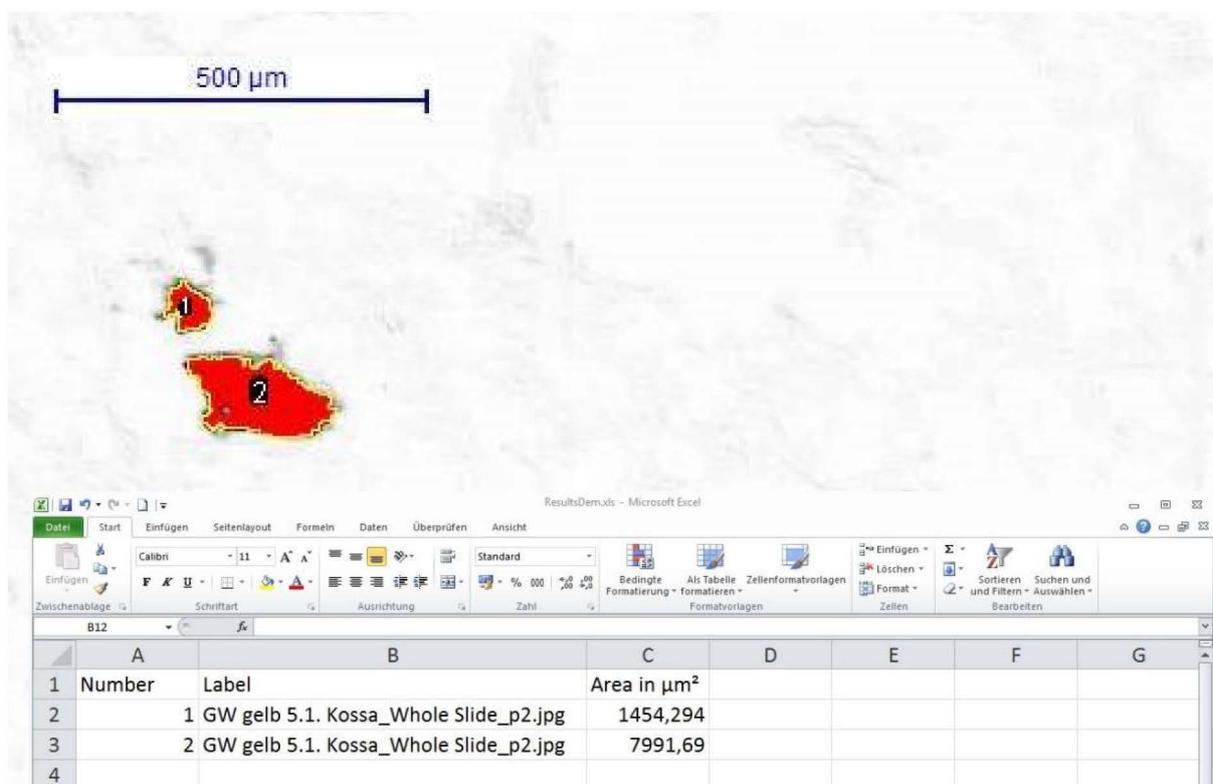


Abbildung 12 - Excel-Export der in ImageJ erstellten Daten

Die Ergebnisse in der Excel-Datei wurden verwendet, um einerseits die Anzahl der Knochenpartikel und andererseits die Flächenanteile innerhalb eines Schnittes zu berechnen. Dazu wurde die Anzahl der detektierten Knochenpartikel und deren Flächen jeweils addiert und die Summe durch die ursprüngliche Gesamtfläche von $4,48 \text{ cm}^2$ der gestanzten Proben dividiert. Das Ergebnis wurde sowohl als Anzahl Knochenpartikel pro cm^2 als auch als Knochenpartikelfläche in $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ angegeben. Bei der angewendeten Methode wurde somit jeder Knochenpartikel als solcher gezählt, der eine Zusammenhangstrennung zu anderen Knochenpartikeln aufwies.

3.3.2 Kalziumbestimmung

Bei allen Verarbeitungsfleischproben aus Tabelle 3 und 4 erfolgte eine Kalziumbestimmung. Dazu wurde zunächst das Probenmaterial in einer Moulinette homogenisiert. Dann wurden je 10 Gramm Probenmaterial so exakt wie möglich mit einer Feinwaage abgewogen und in einen 100 ml Messkolben gegeben. Zum Aufschluss der Probe wurden dem Messkolben circa 50 ml Salpetersäure zugesetzt. Als Probenblindwert wurde ein Becherglas mit Salpetersäure ohne Probenmaterial einer gleichen Behandlung unterzogen. Die Gemische aus Probenmaterial und Säure wurden auf circa 100 Grad Celsius erhitzt und zur Entstehung einer homogenen Lösung ohne Probenmaterialklumpen für 120 Minuten gekocht. Der Verdunstungsverlust im Becherglas wurde mit Salpetersäure mehrfach nach Bedarf wieder aufgefüllt. Nach Abschluss des Kochvorganges wurde das Volumen mit destilliertem Wasser wieder exakt auf 100 ml

aufgefüllt und das Gefäß für 60 Minuten stehen gelassen, damit größere Partikel sedimentieren konnten. Nach Abschluss der Sedimentation wurde ein Großteil des entstandenen, klaren Überstands abpipettiert und in Reagenzgläser überführt.

Zusätzlich wurden Reagenzgläser mit Kalzium-Bezugslösungen steigender Konzentration aus einer zertifizierten Kalzium-Stammlösung und destilliertem Wasser hergestellt und ebenfalls in Reagenzgläser überführt. Die Bezugslösungen umfassten einen Blindwert ohne gelöstes Kalzium sowie vier weitere Standard-Lösungen mit 1, 2, 3 und 5 mg/L, welche allerdings je nach zu erwartenden Werten anzupassen sind. Mit dem Blindwert und den Kalziumsbezugslösungen wurde dann die Kalibration eines Flammen-Atomabsorptionsspektrometers (F-AAS, s. Abbildung 13) durchgeführt. Für die Durchführung wurden die Lösungen durch eine Kapillare eingesaugt und auf diese Weise nach der Kalibration alle Proben einschließlich des Probenblindwertes untersucht. Im Anschluss an die Untersuchung wurde der Kalziumgehalt der Probe in mg/kg durch die Berechnung gem. Formel 1 ermittelt.

Formel 1 - Umrechnung des Messwertes für Kalzium

$$\frac{100x}{m} = y$$

x: Messwert (mg/l)

m: Einwaage (g)

y: Messwert (mg/kg)



Abbildung 13 – F - AAS

3.3.3 Vollanalyse

Zur Ermittlung der Hauptbestandteile wurden Verarbeitungsfleisch- und Separatorenfleisch-Proben (s. Kapitel 3.5.1) aus den Betrieben 1 und 2 bei einem akkreditierten Labor untersucht (s. Tabelle 3). Dabei wurden die Parameter Gesamteiweiß, BEFFE, Fett und Kalzium bestimmt.

Gleichzeitig wurden alle Proben mit einem Nahinfrarot-Schnellanalysegerät analysiert. Dazu wurden 250 Gramm des Probenmaterials aus Tabelle 3 zunächst in einer Moulinette mindestens 180 Sekunden homogenisiert. Das Probenmaterial wurde in Glasschalen verbracht, so dass diese gleichmäßig mit einer mindestens 1,5 cm dicken Schicht des Materials bedeckt waren. Es folgte eine Vakuumierung in dafür vorgesehenen Plastikbeuteln. Die Proben wurden gemäß eingespeichertem Protokoll und eingespeicherter Kalibration untersucht und mit den Ergebnissen aus dem externen Labor verglichen.

3.4 Aussagekraft der histologischen Methode

3.4.1 Eigenschaften der Färbungen nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Calleja im Vergleich

Mit den Untersuchungen sollte geklärt werden, welche Färbung am besten für eine softwarebasierte Partikelzählung sowie eine Flächenbestimmung geeignet ist. Dazu wurden die Knochenpartikelfärbungen nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, die Silbernitratimprägnierung sowie die Färbung nach Calleja miteinander verglichen. Als Proben wurden die Produkte Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikeln (s. Tabelle 1), Geflügelbrühwurst und Geflügelbratrollen (s. Tabelle 2) verwendet. Es wurden jeweils Serien von 3 aufeinanderfolgenden Schnitten von 10 µm Stärke angefertigt. Jeder dieser drei Schnitte wurde je einer Färbung zugeteilt und gemäß 3.3.1.2 gefärbt.

Für jeden Schnitt erfolgte eine automatisierte Detektion der Knochenpartikel und eine Bestimmung ihrer Flächen durch die Software ImageJ®, in der in Abschnitt 3.3.1.3 beschriebenen Art und Weise.

Ferner wurde für jede Probe eine Kontrastmessung vorgenommen. Dazu wurden innerhalb eines Bildes je 10 RGB-Farbcodes aus gefärbten Knochenpartikeln und aus der Hintergrundfärbung ermittelt. Hieraus wurde jeweils der Mittelwert berechnet und daraus der Kontrastwert ermittelt. Letzteres wurde mit der Michelson-Gleichung (Harmening, 2017) zur Berechnung des Kontrastes sowie mit der Luminanz-Gleichung (Lai et al., 2015) und einer Überführung der RGB-Werte in sRGB-Werte (BITV) durchgeführt (Formel 2, Formel 3, Formel 4).

Formel 2 - Michelson-Kontrast

$$K_m = \frac{L_{max} - L_{min}}{L_{max} + L_{min}}$$

K_m = Michelson Kontrast

L_{max} = Maximale Luminanz

L_{min} = Minimale Luminanz

Formel 3 - Luminanzberechnung

$$L = 0,2126 * R + 0,7152 * G + 0,0722 * B$$

Formel 4 - Rechnerische Überführung der RGB Werte in RGB-Farbdarstellung mit normierten Farbkanälen

$$R_{sRGB} = \frac{R_{8bit}}{255}$$

$$G_{sRGB} = \frac{G_{8bit}}{255}$$

$$B_{sRGB} = \frac{B_{8bit}}{255}$$

3.4.2 Präzision

Die statistischen Berechnungen und Boxplots wurden mit dem Programm SPSS 16.0.1 (15. November 2007) für Windows erstellt. In den Boxplots wurden milde Ausreißer, die einen Abstand von 1,5 bis 3,0 Interquartilabständen zum 1. oder 3. Quartil hatten, als Kreis dargestellt. Extreme Ausreißer von mehr als 3 Interquartilabständen wurden als Sternchen dargestellt.

Es wurde untersucht, wie viele Schnitte für eine valide Bestimmung des Knochenpartikelgehaltes ausgewertet werden müssen. Hierfür wurden 108 Schnitte aus Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz aus Tabelle 1 hergestellt und mit der Silbernitratimprägnierung gemäß 3.3.1.2 gefärbt. Dieses Probenmaterial wurde als repräsentativ für Untersuchungsmaterial mit geringer Knochenpartikelbelastung angesehen. Die Auswertung erfolgte gemäß 3.3.1.3 und die Ergebnisse wurden in vollem Umfang für die Ermittlung der statistischen Berechnungen verwendet.

Dazu erfolgte eine Berechnung mittels allgemeiner deskriptiver Statistik (Mittelwert, Median, Varianz, Standardabweichung, Minimum, Maximum, Spannweite, Interquartilbereich, Schiefe und Kurtosis) für die Knochenpartikelanzahl/cm² und die Knochenpartikelfläche in µm²/cm².

Darauf basierend wurden Ausreißer charakterisiert, deren Häufigkeit berechnet und rechnerisch ermittelt, wie hoch die statistische Chance auf einen Ausreißer bei einer Schnitzzahl von 6 und bei einer Anzahl von 30 Schnitten ist. Dies geschah unter Zuhilfenahme der Formel 5.

Formel 5 – Berechnung der Ausreißerwahrscheinlichkeit

$$P = 1 - \left(\frac{108 - n_A}{108} \right)^n$$

P= Wahrscheinlichkeit auf mindestens einen Ausreißer

n= Anzahl der Schnitte

n_A=Anzahl der Ausreißer

Danach wurden aus den 108 Schnitten durch das Programm SPSS zufällig 6 beziehungsweise 30 Stichproben ausgewählt und deren Mittelwert berechnet.

Die Werte aus den 108 Schnitten wurden mit Hilfe des Kolgomorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung überprüft.

3.4.3 Richtigkeit der Methodik des Knochenpartikelnachweises durch Silbernitratimprägnierung

3.4.3.1 Berechnung der Dichte und Korrelation mit histologischen Ergebnissen

Im Rahmen der Untersuchung sollte ermittelt werden, ob aus den histologischen Knochenpartikelergebnissen ein Rückschluss auf die tatsächlich im Produkt vorhandene Knochenmasse möglich ist. Zu diesem Zweck wurden Radius und Ulna eines Masthähnchens durch 5-stündiges Abkochen so präpariert, dass weder Fleisch- noch Sehnenreste mehr erkennbar waren (s. Abbildung 14). Daraufhin wurden die Knochen mit einer Geflügelschere an den knöchernen Epiphysen in 4 Fragmente so gekürzt, dass sie annähernd eine Masse von 0,6 Gramm aufwiesen. Die Gewichte wurden mit einer Feinwaage ermittelt. Danach wurde ein Pyknometer mit 21,8 °C warmem Wasser gefüllt. Die Masse des gefüllten Pyknometers wurde sogleich ermittelt. Schließlich wurden die annähernd gleichschweren 4 Knochenfragmente nacheinander in das Pyknometer verbracht und das Pyknometer (s. Abbildung 15) mit Knochen und Wasser gewogen. Mit diesen drei Wägungen pro Fragment wurde gemäß Formel 6 die Dichte der Knochen bestimmt.

Formel 6 – Dichteberechnung

$$\rho (\text{Probe}) = \frac{m_1 * p (H_2O)}{m_1 + m_2 - m_3}$$

ρ = Dichte

m_1 = Masse der Probe

m_2 = Masse Pyknometer + Wasser

m_3 = Masse Pyknometer + Probe + Wasser

Daraufhin wurde die theoretische Knochenpartikelfläche berechnet, welche sich rechnerisch aus einer Zugabe von 0,5 Prozent des Knochengranulats ergibt (Formel 7).

Formel 7 - Formel zur Berechnung der rechnerisch zu erwartenden Knochenpartikelfläche

$$A_{hyp} = \frac{A * k}{\rho}$$

A_{hyp} = theoretische Knochenpartikelfläche

A = Fläche von 1 cm² des Schnittes in μm^2

k = Eingesetzte Masse [g] an Knochenpartikeln in Prozent

ρ = Dichte

Im Folgenden wurde aus dem Knochen zunächst durch einen Hammer im Plastikbeutel und dann mit einem Mörser ein feines Knochengranulat hergestellt. Hähnchenhackfleisch wurde im Anschluss daran mit 0,5 Gewichtsprozent dieses Knochengranulats versetzt (s. Abbildung 16).

Die hergestellten Proben wurden gemäß Abschnitt 3.3.1.2 mit der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra und der Silbernitratimprägnierung gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte der automatisierten Analyse durch ImageJ® unterzogen (Abschnitt 3.3.1.3).

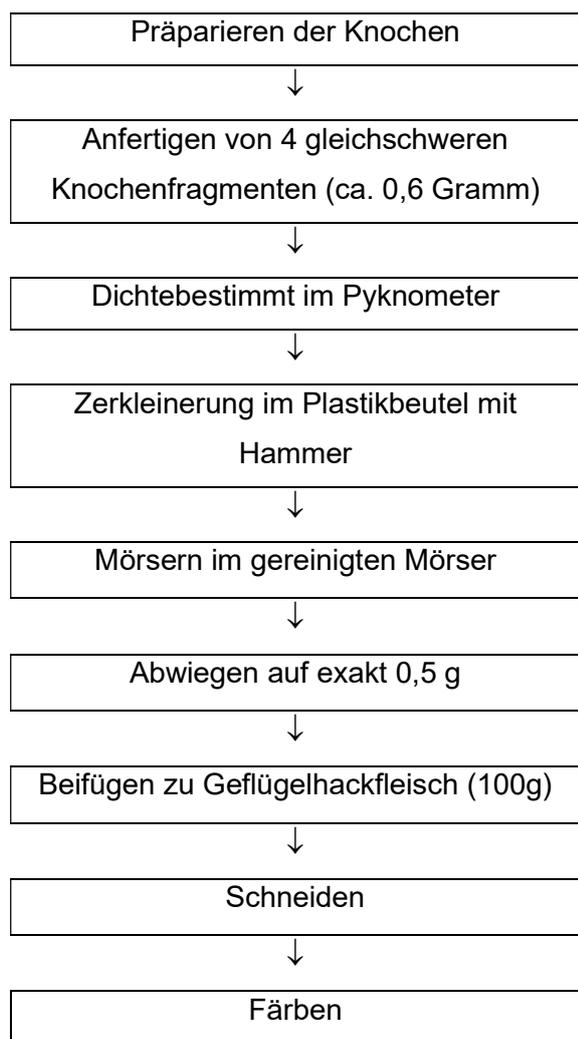


Abbildung 14 – Fertig präparierte Hühnerknochen



Abbildung 15 - Pyknometer

Abbildung 16 - Ablauf der Dichtebestimmung von Geflügelknochen

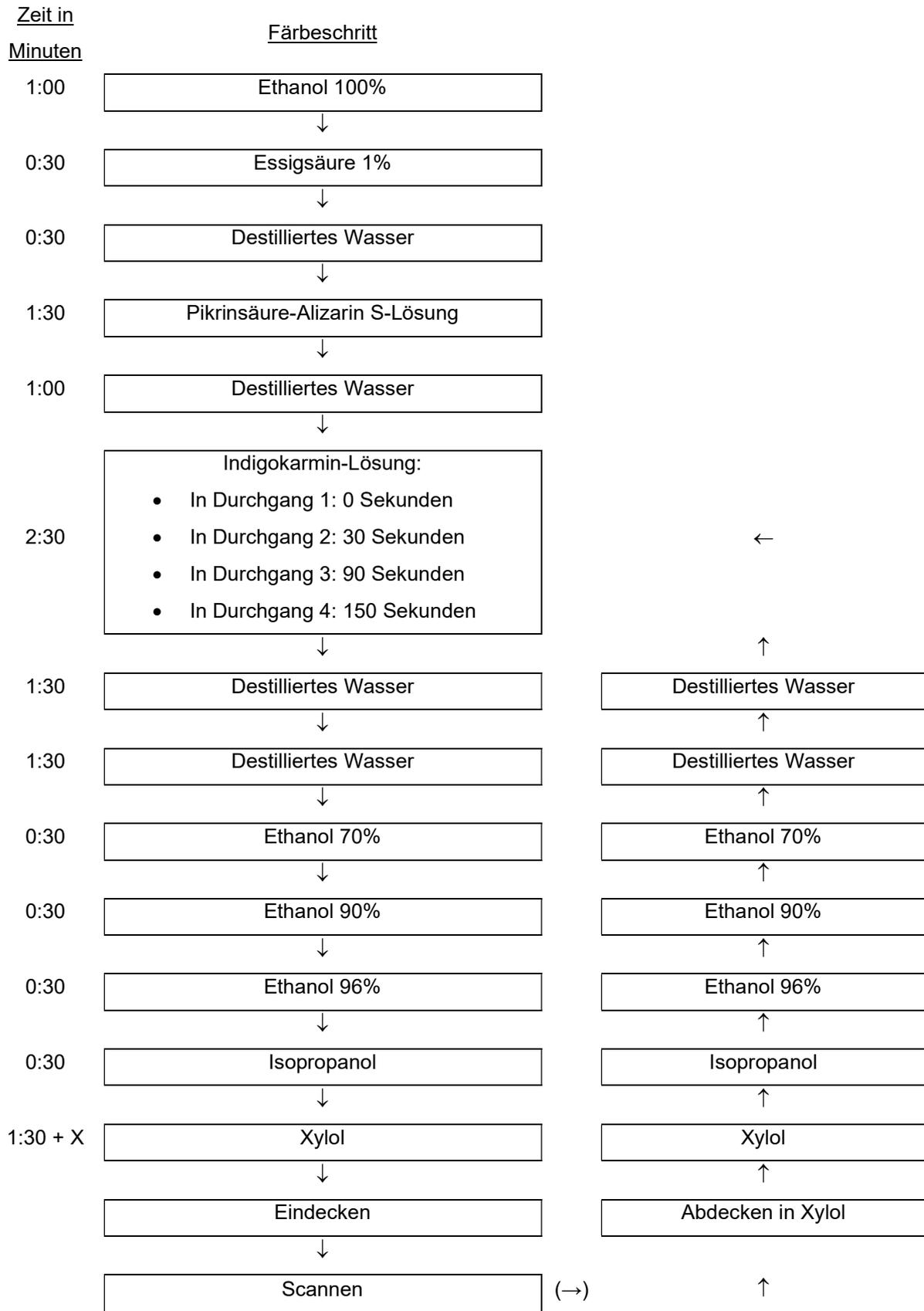
3.4.3.2 Sensitivität der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra

Die Auswirkungen unterschiedlicher Färbezeiten der Gegenfärbung mit Indigokarmin bei der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra (gem. 3.3.1.2) wurde unter Verwendung von Hähnchenhackfleisch mit 0,3% Knochenpartikelzusatz (s. Tabelle 1) untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Färbeprotokolle dieser Färbung angewendet, bei denen derselbe histologische Schnitt schrittweise mit sich addierenden Verweilzeiten im Indigokarmin gefärbt

wurde. Dabei wurde im ersten Schritt auf die Gegenfärbung mit Indigokarmin verzichtet und eine Auswertung nach 3.3.1.3 durchgeführt.

Daraufhin wurde das Präparat durch das Einwirken von Xylol wieder von seinem Deckgläschen befreit und durch eine absteigende Alkoholreihe erneut in wässriges Milieu überführt (s. Abbildung 17). Im Anschluss daran wurde beim Schritt zur Gegenfärbung mit Indigokarmin fortgefahren und das Protokoll normal fortgeführt, so dass sich die Einwirkzeiten des Indigokarmins zu einer Gesamteinwirkzeit von 30, 90 und 150 Sekunden addierten.

Abbildung 17 - Färbeprotokoll des schrittweisen Färbens mit Indigokarmin



3.4.3.3 Stauchungs- und Auffaltungstendenzen

Zur Untersuchung von Stauchungs- und Auffaltungstendenzen beim Schneiden der Proben, die Einfluss auf die Richtigkeit der Methode haben können, wurden Knochenpartikel in einem Filterpapier platziert und das Filterpapier mit einem Faden so umwickelt und verschlossen, dass keine Knochenpartikel herausfallen konnten. Das Filterpapier samt Inhalt wurde dann 5 Minuten in eine Alizarin S-Lösung gemäß der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra aus 3.3.1.2 gegeben, so dass die Färbelösung die Knochenpartikel im Inneren des Filterpapiers umspülen konnte. Nach Abschluss des Färbevorgangs wurden die Knochenpartikel mit destilliertem Wasser gespült, bis keine Trübung des Wassers mehr feststellbar war. Danach wurden die Knochenpartikel für 60 Minuten im Trockenschrank bei 55 +/- 5 °C getrocknet.

Aus 5 Gramm weißer, haushaltsüblicher, pulverförmiger Gelatine und 0,5 Gramm Indigokarmin wurde in 50 Milliliter destilliertem Wasser eine blaue Gelatinelösung hergestellt, die zum Lösen aller Bestandteile auf 75 Grad Celsius erhitzt wurde, bis eine homogene Flüssigkeit entstanden war. Die Hälfte der fertigen Gelatinelösung wurde dann in eine Silikonform mit würfelförmigen Aussparungen gegossen, so dass die Aussparungen zur Hälfte gefüllt waren. Nach 2 Minuten wurden die gefärbten Knochenpartikel auf die Oberfläche der Gelatinewürfel gestreut, so dass die Partikel etwas einsanken, sich aber noch an der Oberfläche befanden. Danach wurde die restliche Gelatinelösung in die Silikonform gegeben und die Aussparungen vollständig ausgefüllt. Nach circa 60 Minuten wurden die entstandenen Gelatineblöcke aus der Silikonform entnommen. Der auf diese Art und Weise entstandene Gelatineblock wurde sodann im Gefriermikrotom bei minus 20 Grad Celsius für 60 Minuten eingefroren (s. Kapitel 3.3.1). Danach wurden 10 Mikrometer dicke Schnitte angefertigt, die sofort mit Einschussmittel eingedeckt wurden. Nach dem Scan dieser Präparate wurden durch eine softwarebasierte Flächenmessung per Hand einerseits die Fläche des Knochenpartikels und andererseits die der Gelatinekehle ermittelt, in der sich der jeweilige Knochenpartikel befand (s. Kapitel 3.3.1.3). Schließlich wurde die Differenz zwischen dem Flächenmaß des Knochenpartikels und der Gelatinekehle bestimmt.

3.4.3.4 Flächenvergleich der manuellen Messung zur automatisierten Messung

Um die Präzision der softwarebasierten Flächenbestimmung von Knochenpartikeln auf Basis der Silbernitratimprägnierung zu überprüfen, wurde zunächst ein vereinfachtes Bild angefertigt, bei dem sich ein 2.272,96 µm² großes Quadrat auf einer 6.642,25 µm² großen Fläche befand. Jenes Bild wurde in das Programm ImageJ[®] geladen und das Quadrat per Hand mit dem Mauszeiger umfahren. Die umfahrene Fläche wurde durch das Programm

ermittelt. Daraufhin wurde die geometrische Figur erneut verwendet, um die Fläche mit der automatisierten Erkennung nach 3.3.1.3 zu berechnen. Beide Ergebnisse wurden miteinander verglichen.

Als realitätsnahes Beispiel wurde ein Bild von einem Knochenpartikel, welcher mit der Silbernitratimprägnierung gefärbt wurde, in das Programm geladen und wiederum per Hand umfahren und dessen Flächeninhalt berechnet. Im Vergleich dazu wurde erneut die automatisierte Flächenerkennung nach 3.3.1.3 durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

3.4.3.5 Anzahl detektierter Knochenpartikel bei konventioneller und automatisierter Zählweise

Eine konventionelle Partikelzählung am Mikroskop wurde durchgeführt, um die Ergebnisse mit denen der softwarebasierten Auswertung zu vergleichen. Dazu wurden die Proben Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikel aus Tabelle 1 ausgewählt und nach 3.3.1.1 und 3.3.1.2 hergestellt und gefärbt. Eine Auswertung erfolgte dann durch eine Analyse am Mikroskop, bei der jeder Schnitt bei 25-facher Vergrößerung mäanderförmig durchgemustert wurde. Die Knochenpartikeltreffer wurden handschriftlich notiert und gemäß der Formel 8 in Treffer pro cm^2 umgerechnet. Die Ergebnisse wurden dann mit denen der automatisierten Analyse aus 3.3.1.3 verglichen.

Formel 8 - Berechnung der Knochenpartikeltreffer/ cm^2

$$\frac{\text{Summe } y (y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n)}{4,84} = \text{Detektierte Knochenpartikelfläche pro } \text{cm}^2$$

3.4.4 Spezifität

Um zu überprüfen, ob die Methode falsch positive Befunde verursachen kann, wurden Proben aus gewolften Hähncheninnenfilets gemäß 3.2.1 ohne Knochenpartikelzugabe hergestellt (s. Tabelle 1). Ebenfalls wurden Hackfleischzubereitungen aus Hähnchen und Putenfleisch aus Tabelle 2 verwendet. Die Proben wurden danach mit der Silbernitratimprägnierung gefärbt und gemäß den Abschnitten 3.3.1.1, 3.3.1.2 und 3.3.1.3 bearbeitet und ausgewertet. Schließlich sollte überprüft werden, inwieweit Gewürze falsch positive Befunde verursachen können. Gleichmaßen wurden Mineralstoffe aus dem Knochen auf ihre Anfärbbarkeit untersucht. Um dies zu erreichen wurde aus dem Lebensmitteleinzelhandel Majoran als Vertreter der Gewürze mit hohem Kalziumgehalt und Pfeffer als Vertreter der Gewürze mit schwarzen Pigmenten in einer Menge von 1 Gramm in 99 Gramm Geflügelhackfleisch eingemischt (s. Tabelle 1). Ferner wurden Kalziumkarbonat und Dinatriumhydrogenphosphat als Vertreter von Kalzium- und

Phosphatverbindungen und somit als Knochenminerale in einer Konzentration von 5% eingemischt (s. Tabelle 1). Im Folgenden wurden die Proben dann mit der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra sowie der Silbernitratimprägnierung gemäß 3.3.1.2 und 3.3.1.3 gefärbt und ausgewertet.

3.5 Analytische Zusammensetzung von Geflügelverarbeitungsfleisch

3.5.1 Vergleich des Verarbeitungsfleisches und des Separatorenfleisches aus zwei Betrieben

Aus Betrieb 1 und 2 wurden gemäß Tabelle 3 am 23.01.2017 und am 27.01.2017 sowohl Verarbeitungsfleischproben als auch Separatorenfleischproben entnommen. Diese wurden nach 3.3.1.1, 3.3.1.2 und 3.3.1.3 bearbeitet, mit der Silbernitratimprägnierung gefärbt und ausgewertet.

3.5.2 Homogenität des Verarbeitungsfleisches innerhalb einer Arbeitswoche

Es sollte festgestellt werden, ob Schwankungen zwischen unterschiedlichen Verarbeitungsfleischchargen desselben Betriebs auftreten. Dazu wurde das Verarbeitungsfleisch aus Betrieb 2 jeweils an aufeinanderfolgenden Tagen beprobt. 5 Tage lang wurden täglich morgens, mittags und abends Proben aus der laufenden Produktion entnommen. Diese Proben wurden durch das betriebseigene Qualitätsmanagement gemäß einer Probennahme-Anleitung entnommen. Der Transport erfolgte in diesem Fall durch ein Logistikunternehmen (s. 3.2.3.3).

3.5.3 Schwankungen aufgrund des verarbeiteten Teilstücks

Das Probennahme-Protokoll verzeichnet die Mischung der verschiedenen Rohstoffkategorien, aus denen die betreffende Produktcharge hergestellt worden war (s. Tabelle 3, 4). Aus diesen Daten erfolgte zusätzlich eine mathematische Berechnung der Messwerte für die einzelnen Rohstoffkategorien. Dazu wurden die Ergebnisse zunächst als überbestimmtes Gleichungssystem betrachtet. Diese unterliegen allerdings Messungenauigkeiten und Schwankungen, so dass der exakte Wert für den Messwert pro Bestandteil nicht sicher ermittelt werden kann. Die Methode der kleinsten Quadrate bietet jedoch eine Möglichkeit der besseren Annäherung zu den exakten Messwerten pro Bestandteil. Zur Minimierung des quadratischen Fehlers wurde folgende Formel verwendet:

Formel 9 - Minimierung des quadratischen Fehlers im überbestimmten Gleichungssystem

$$\min_x \| Ax - b \|$$

$$x = (A^T A)^{-1} A^T b$$

A: Mischverhältnisse

x: Messwert pro Bestandteil

b: Messwert pro Mischung

A^T: Transponierte Matrix

Als Vergleichsproben wurden zusätzlich noch Proben in Verarbeitungsbetrieb 5 entnommen, welcher selbst Verarbeitungsfleisch aus angelieferten Hähnchenteilstücken aus Geflügelschlachtbetrieben herstellte (s. Tabelle 4, Betriebsstätte 5). Die Beprobung erfolgte direkt aus dem verwendeten Bandseparator. Abschließend wurden die Proben erneut gemäß 3.2.3.3 zum Labor verbracht und nach 3.3.1.1, 3.3.1.2 (Silbernitratimprägnierung), 3.3.1.3 bearbeitet, gefärbt und ausgewertet.

3.5.4 Schwankungen aufgrund des Anpressdruckes im Kolbenseparator

Die Untersuchungen zur Feststellung der Auswirkungen eines erhöhten Anpressdruckes auf die Knochenpartikelzahl wurden mit einem Kolbenseparator in Betriebsstätte 3 (s. Tabelle 3) durchgeführt. Es wurde ein Kolbenseparator der Firma Marel® verwendet, bei dem zwei verschiedene Druckstufen (40 und 60 bar) eingestellt wurden. Als Ausgangsmaterial wurden Teile vom Hähnchenflügel verwendet (s. Tabelle 3). Die so hergestellten 4 Proben wurden gemäß 3.2.3.3 zum Labor verbracht und nach 3.3.1.1, 3.3.1.2 (Silbernitratimprägnierung) und 3.3.1.3 bearbeitet, gefärbt und ausgewertet.

3.5.5 Schwankungen aufgrund des Geschlechts in Putenverarbeitungsfleisch

Ebenso wurde Putenverarbeitungsfleisch aus einem Putenschlachtbetrieb (Betriebsstätte 4, s. Tabelle 4) untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denjenigen aus den Hähnchenschlachtbetrieben verglichen. Als Ausgangsmaterial wurden die Unterkeulen von weiblichen und männlichen Puten verwendet. Diese wurden separat voneinander in je einen Bandseparator derselben Baureihe mit denselben Einstellungen gegeben. Auch diese Proben wurden gemäß 3.2.3.3 zum Labor verbracht und nach 3.3.1.1, 3.3.1.2 (Silbernitratimprägnierung), 3.3.1.3 bearbeitet, gefärbt und ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Aussagekraft der histologischen Methode

4.1.1 Eigenschaften der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Calleja im Vergleich

Die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, die Silbernitratimprägnierung und die Färbung nach Calleja zeigten deutliche Unterschiede in der Darstellung von Knochenpartikeln und Hintergrund. Die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra stellte die Knochenpartikel rot auf einem blauen Hintergrund dar. Die modifizierte Silbernitratimprägnierung ließ Knochenpartikel als schwarze Flächen vor einem nahezu farblosen Hintergrund erkennen, während die Färbung nach Calleja Knochengewebe blau vor einem grünen Hintergrund anfärbte (s. Abbildung 18).

Die Farbkontraste wurden gemäß 3.4.1 berechnet. Es traten starke Kontrastunterschiede zwischen Knochensubstanz und Matrixhintergrund bei den einzelnen Färbungen auf. Nach



Abbildung 18 – 3 Folgeschnitte gefärbt nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra (1), mit der Silbernitratimprägnierung (2) und nach Calleja (3)

Tabelle 10 erreichte die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra den geringsten Kontrast, gefolgt von der Färbung nach Calleja. Den stärksten Kontrast erzielte die Silbernitratimprägnierung, welche mit schwarzen Knochenpartikeln auf nahezu farblosem Hintergrund einen Maximalwert erreichte.

Tabelle 10 – Mittelwerte nach dem sRGB-Schema aus 10 Messungen von digitalen Bildern, die Proben zeigen, die mit der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Calleja gefärbt wurden und daraus berechnet Kontrastwerte.

Färbung	Farbwerte Knochen (\bar{x})	Farbwerte Hintergrund (\bar{x})	Kontrastverhältnis (Bereich von 0 – 1))
Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra	102/29,5/30	47/62,5/117,8	0,17
Silbernitrat	7,7/4,5/6,7	250,9/247,7/235,1	0,96
Calleja	33,4/65,5/129,7	117,3/184,7/105,8	0,44

Der von der Silbernitratimprägnierung erreichte Kontrastwert von 0,96 ist vom Maximalwert 1 nicht weit entfernt. Im Gegensatz dazu wiesen die Calleja-Färbung mit 0,44 und die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra mit 0,17 einen deutlich geringeren Kontrast auf.

Bei Betrachtung der nachgewiesenen Knochenpartikelanzahl von Silbernitratimprägnierung im Vergleich zur Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra wurden ebenfalls Unterschiede zwischen den verschiedenen Färbeverfahren deutlich (Tabelle 24 und Abbildung 19).

In Geflügelhackfleisch mit 0,1%igem Knochenpartikelzusatz wurde mit Hilfe der Silbernitratimprägnierung (Mittelwert: 4,4 Knochenpartikel/cm²) ungefähr die 10fache Menge an Knochenpartikeln nachgewiesen, wie mit der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra (0,4 Knochenpartikel/cm²). Zudem zeigte die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra bei einigen Schnitten gar keine Knochenpartikeltreffer (s. Tabelle 24 und Tabelle 25) an. Die Streuung der Werte fiel in diesem Versuchsmaterial gering aus. Bei der Silbernitratimprägnierung wurde nur ein Messwert von 9,3 Knochenpartikel/cm² statistisch als extremer Ausreißer nachgewiesen. Ferner liegen Median und arithmetisches Mittel auf einem annähernd gleichen Niveau.

Die Geflügelbrühwurst zeigte im Vergleich zum Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikeln mehr Knochenpartikeltreffer. Allerdings war auch hier ein deutlicher Unterschied zwischen der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra und der Silbernitratimprägnierung zu sehen: Mit einem arithmetischen Mittel von 15,9 Knochenpartikeln/cm² (Silbernitratimprägnierung) wurden im Vergleich zu 1,9 Knochenpartikeln/cm² (Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra) im Schnitt gut 8-mal so viele Knochenpartikel durch die Silbernitratimprägnierung nachgewiesen (Tabelle 26; Abbildung 19). Allerdings wurden auch mit der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra in jedem Schnitt regelmäßig mehrere Knochenpartikel nachgewiesen. Hier zeigte sich auf

Seiten der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra mit 4,1 Knochenpartikeln/cm² ein milder Ausreißer. Festgestellt wurde ebenfalls eine erhöhte Streuung bei der Silbernitratimprägnierung und dort auch eine deutlichere Differenz zwischen arithmetischen Mittel und dem Median.

Die höchste Anzahl nachgewiesener Knochenpartikel trat bei der Geflügelbratrolle auf. Ebenfalls waren hier erneut Unterschiede innerhalb der Knochenpartikelzählung zu verzeichnen: Der Mittelwert nachgewiesener Knochenpartikel lag mit 69,1 Knochenpartikeln/cm² (Silbernitratimprägnierung) und 3,4 Knochenpartikeln/cm² (Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra) bei dem gut 20-fachen zu Gunsten der Silbernitratimprägnierung. Auffällig war hier besonders die große Spannweite zwischen oberem und unterem Quartil, die eine große Streuung der Werte anzeigt.

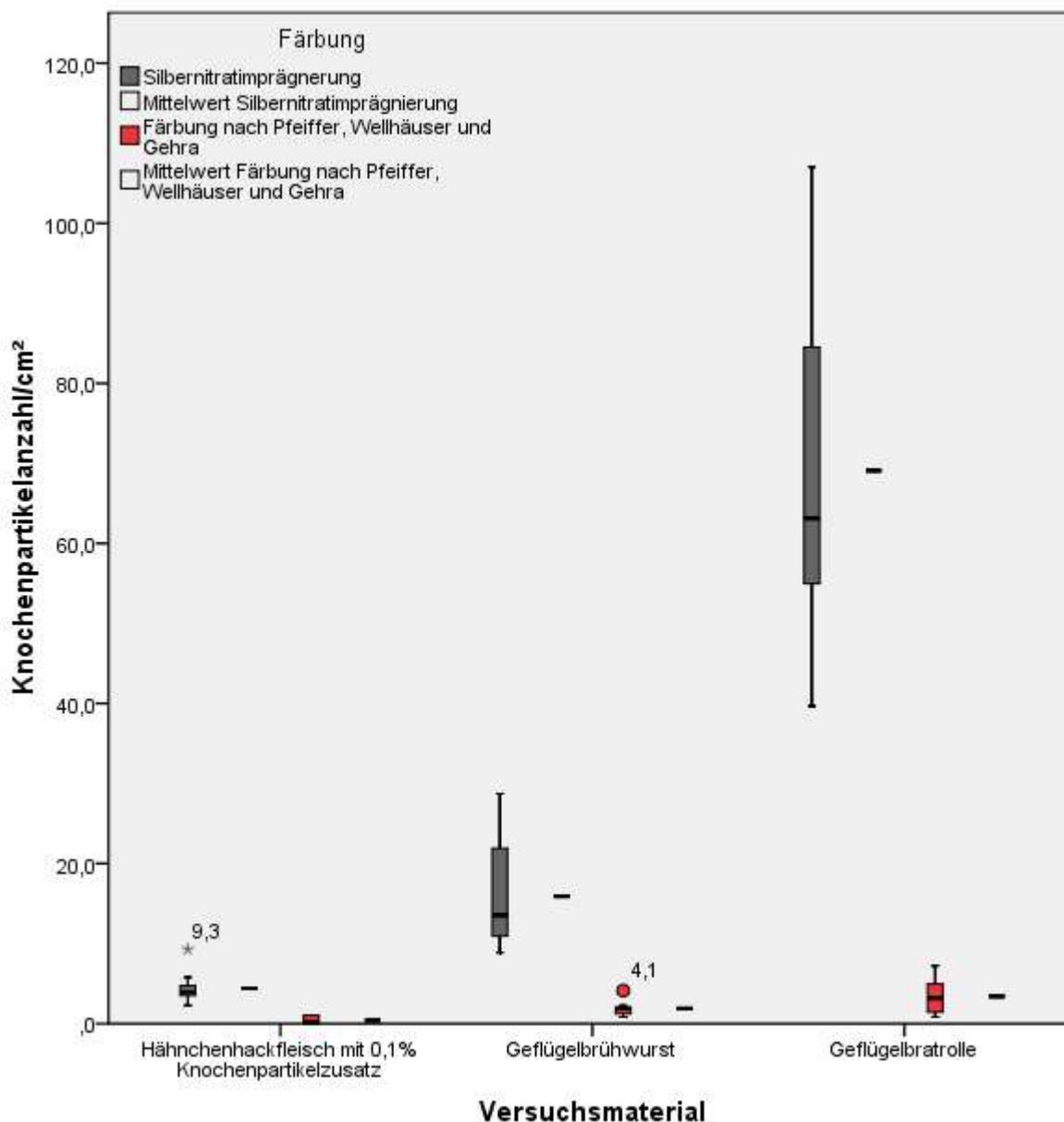


Abbildung 19 – Knochenpartikelanzahl ermittelt mit der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra in den Probenmaterialien Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz, Geflügelbrühwurst und Geflügelbratrolle. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

Ein ähnliches Bild zeigte sich beim Vergleich der detektierten Knochenpartikelflächen (s. Tabelle 25 und Abbildung 20). Auch hier wurde im Versuchsmaterial Geflügelhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz deutlich mehr Fläche durch die Silbernitratimprägnierung nachgewiesen. Ein arithmetisches Mittel von $3.489 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ im Gegensatz zu $613 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ zeigt, dass hier im Schnitt knapp 6-mal so viel Fläche durch die Silbernitratimprägnierung nachgewiesen wurde.

Die Knochenpartikel, welche durch die Silbernitratimprägnierung nachgewiesen wurden, besaßen eine durchschnittliche Größe von $785,5 \mu\text{m}^2$. Das kleinste Exemplar wurde mit einer Größe von $103,6 \mu\text{m}^2$ und das Größte mit $10.065,3 \mu\text{m}^2$ gemessen. Im Gegensatz dazu wurden Knochenpartikel durch die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Schnitt mit $1.648,2 \mu\text{m}^2$ gemessen, wobei der kleinste Wert $111,1 \mu\text{m}^2$ und der größte $7.017,9 \mu\text{m}^2$ betrug. Die Streuung der Werte fiel bei beiden Färbungen gering aus und zeigte keine Ausreißer, wie auch keine großen Unterschiede zwischen arithmetischem Mittel und Median.

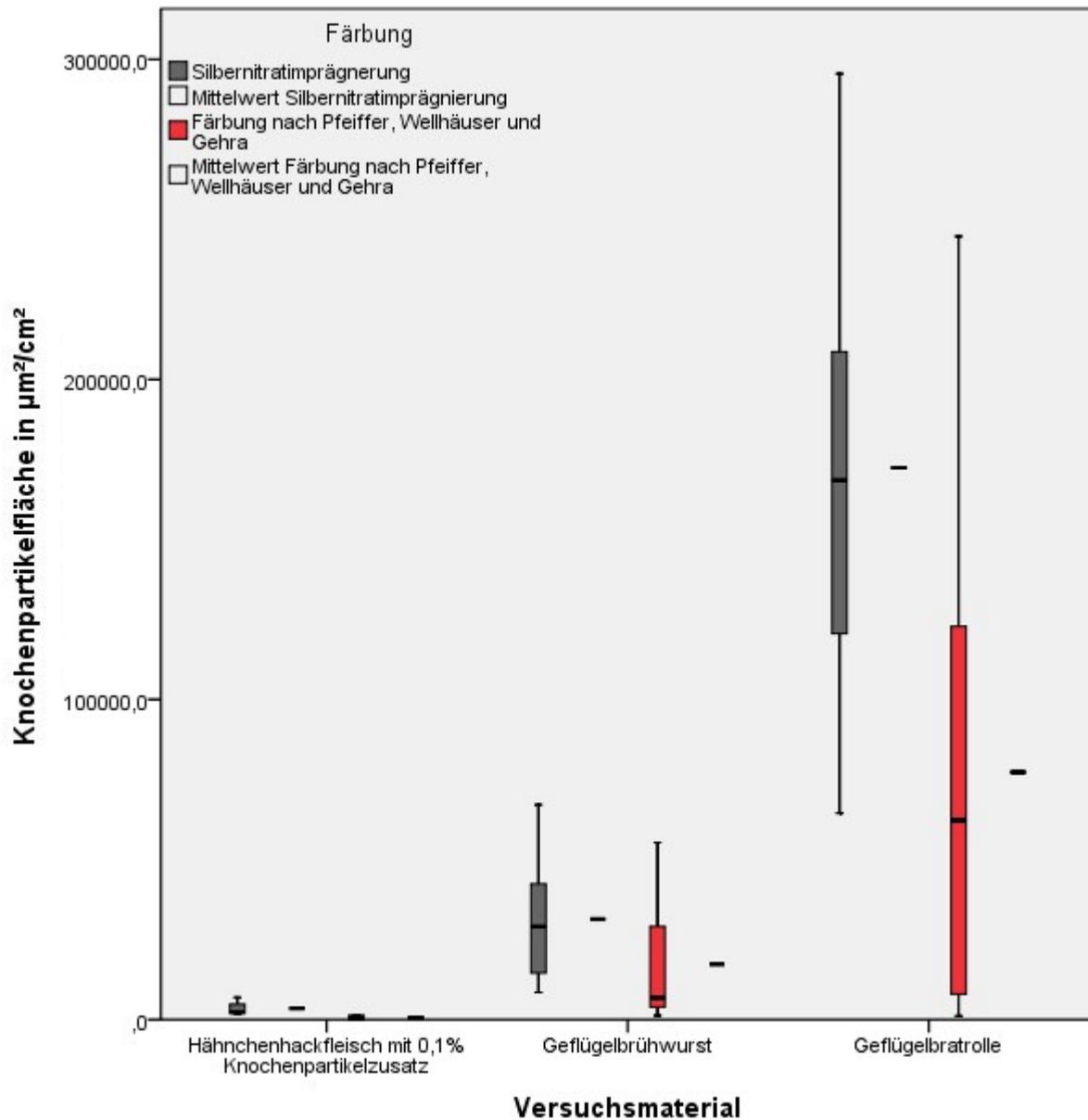


Abbildung 20 – Knochenpartikelflächen ermittelt mit der Silbernitratimpregnierung und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra in den Probenmaterialien Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz, Geflügelbrühwurst und Geflügelbratrolle. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

Der Unterschied zwischen beiden Färbungen war im Material Geflügelbrühwurst bei der detektierten Fläche weniger stark ausgeprägt. Hier wurden mit durchschnittlich $31.354,37 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ und $17.270,56 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ circa die doppelte Menge durch die Silbernitratimpregnierung detektiert (s. Abbildung 20). Ebenfalls war erstmalig zu sehen, dass ein Wert bei der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra höher ist (s. Tabelle 27).

Die durch Silbernitratimprägnierung gefärbten Partikel besaßen hier eine durchschnittliche Größe von $1.978,6 \mu\text{m}^2$. Der kleinste Partikel wurde mit einer Größe von $103,8 \mu\text{m}^2$ und der größte mit $212.822,3 \mu\text{m}^2$ gemessen. Im Gegensatz dazu wurden Knochenpartikel durch die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Schnitt mit $9.185,7 \mu\text{m}^2$ gemessen, wobei der kleinste Wert $103,8 \mu\text{m}^2$ und der größte $241.233,2 \mu\text{m}^2$ betrug. Die Streuung der Werte ist wiederum deutlicher zu sehen, wie auch erste deutlichere Unterschiede zwischen arithmetischen Mittel und Median, während Ausreißer nicht auftraten.

Im Versuchsmaterial Geflügelbratrolle zeigte die detektierten Knochenpartikelfläche mit $172.443 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ zu $77.293 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ ein arithmetisches Mittel, welches bei dem gut zweifachen zu Gunsten der Silbernitratimprägnierung lag. Diese wies Knochenpartikel mit einer Durchschnittsgröße von $2.494,4 \mu\text{m}^2$ nach. Die geringste Fläche fand sich bei einem Partikel, der eine Fläche von $103,6 \mu\text{m}^2$ besaß und die größte bei einem, der eine Fläche von $212.822,3 \mu\text{m}^2$ aufwies. Die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra detektierte Knochenpartikel von durchschnittlich $22.950,7 \mu\text{m}^2$, wobei hier der kleinste Wert $166,2 \mu\text{m}^2$ und der größte $785.934,9$ betrug. Die Streuung fiel hier besonders hoch aus, erkennbar an der großen Spannweite zwischen oberem und unterem Whisker. Die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra zeigt sogar einen unteren Whisker, welcher die Nulllinie tangiert.

Wurden die Knochenpartikel ihrer Größe nach klassifiziert, so zeigte sich im Versuchsmaterial Geflügelhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz, dass bei der Silbernitratimprägnierung 46% der nachgewiesenen Knochenpartikel eine Größe von $100\text{-}250 \mu\text{m}^2$ zeigten, während sich bei der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra in diesem Größenbereich nur 28% der nachgewiesenen Knochenpartikel einordnen ließen. Umgekehrt waren bei Knochenpartikeln, welche größer waren als $3.000 \mu\text{m}^2$ nur 6% der Knochenpartikel zu finden, die durch Silbernitratimprägnierung nachgewiesen wurden. Demgegenüber stand ein Anteil von 22% der durch Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra nachgewiesenen Partikel, die eine Größe von mindestens $3.000 \mu\text{m}^2$ aufwiesen (s. Abbildung 21).

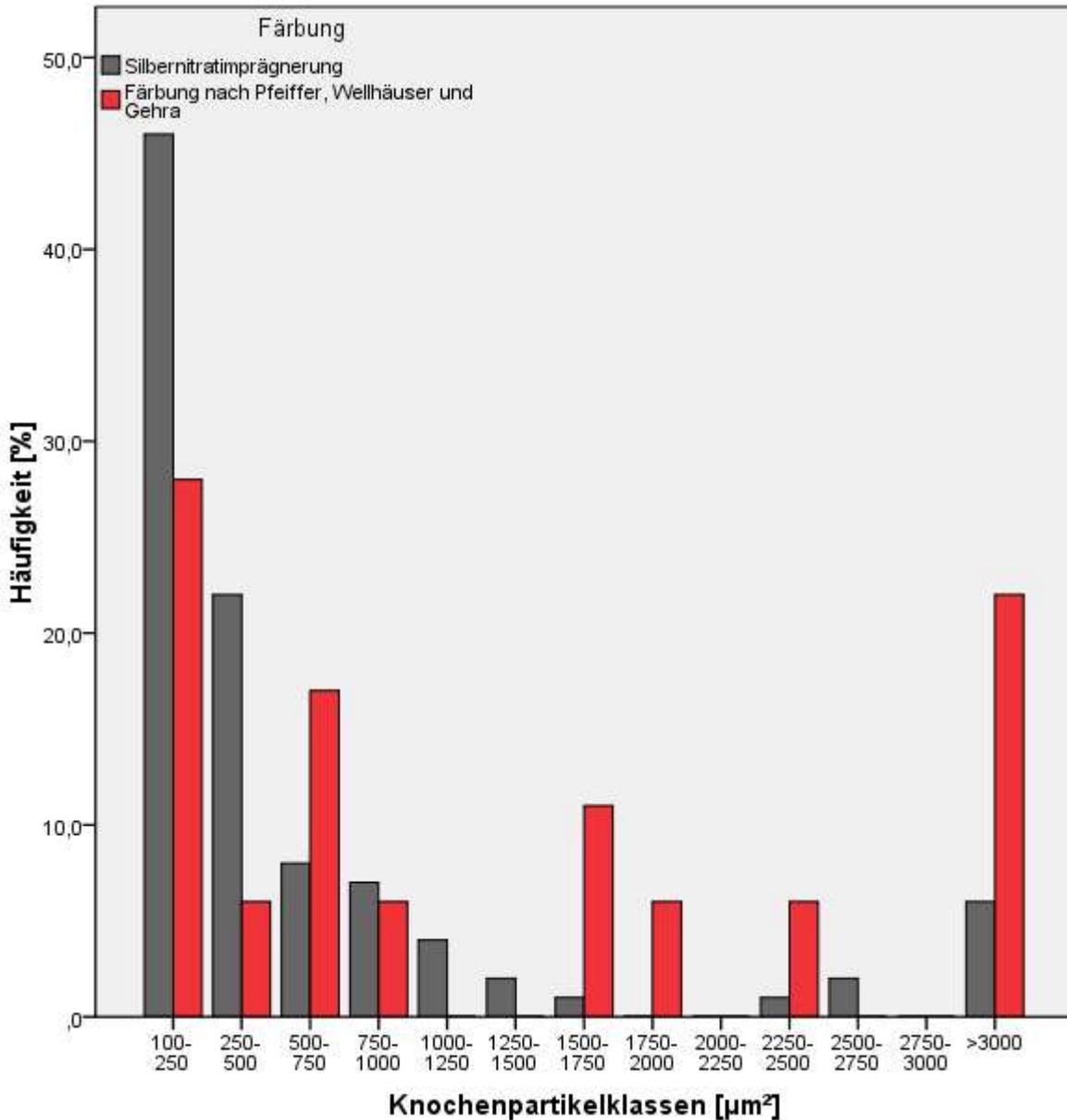


Abbildung 21 - Prozentuale Häufigkeit der Knochenpartikel klassifiziert nach deren Flächen bei der Silbernitratimpregnierung und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Probenmaterial Geflügelhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz.

Deutlicher fiel das Ergebnis im Versuchsmaterial Geflügelbrühwurst aus. 37% der durch Silbernitratimpregnierung nachgewiesenen Partikel besaßen eine Größe von 100 – 250 μm^2 , während dies für die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra nur in 12% der Fälle zutraf. Dem gegenüber standen 11% der über 3000 μm^2 großen Partikel der Silbernitratimpregnierung und 43% Anteil bei der Färbung nach Pfeiffer Wellhäuser und Gehra (Abbildung 22).

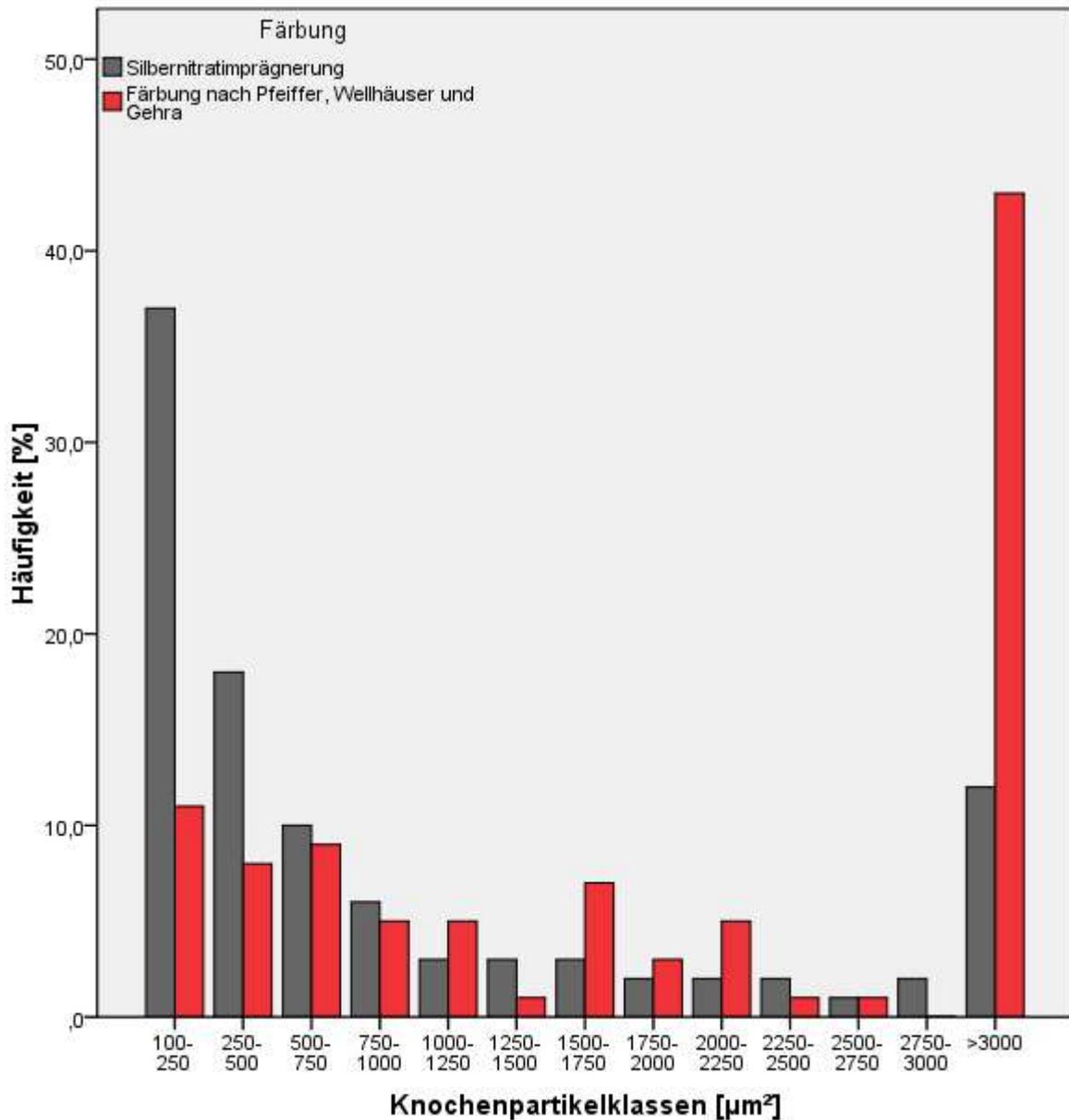


Abbildung 22 - Prozentuale Häufigkeit der Knochenpartikel klassifiziert nach deren Flächen bei der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Probenmaterial Geflügelbrühwurst.

Diese Erscheinung traf ebenfalls für die Geflügelbratrolle zu. Die Größenspanne von 100 – 250 μm^2 wurde von der Silbernitratimprägnierung in 34,5% der Fälle erreicht, während dies bei der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra nur in 1,2% der Fälle zutraf. Hingegen erreichte letztere in der Kategorie größer als 3000 μm^2 knapp 70%, während die Silbernitratimprägnierung hier nur auf einen Wert von 15% kam (Abbildung 23).

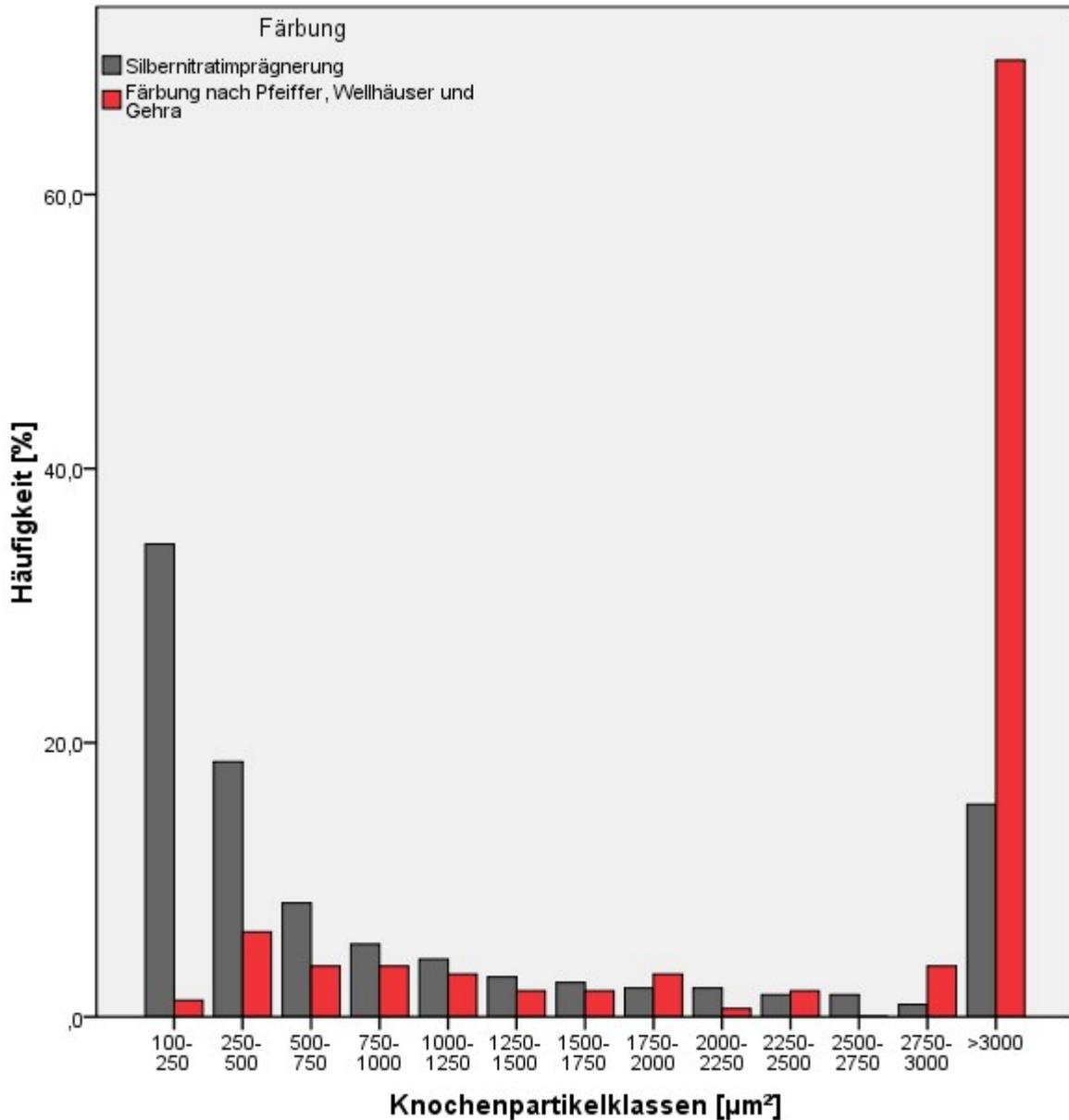


Abbildung 23 - Prozentuale Häufigkeit der Knochenpartikel klassifiziert nach deren Flächen bei der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Probenmaterial Geflügelbratrolle.

4.1.2 Präzision

Die Untersuchung von 108 Proben aus Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzugabe (s. Tabelle 1) zeigte, dass trotz gleichen Knochenpartikelgehaltes der Proben sehr unterschiedliche Ergebnisse möglich waren. Die hier angewendete Silbernitratimprägnierung zeigte eine große Streuung (s. Tabelle 33). Es wurden im Mittel $11,8 \pm 8,99$ Knochenpartikel/cm² Schnittfläche und $15.784,99 \mu\text{m}^2 \pm 32.738,32 \mu\text{m}^2$

Knochenfläche/cm² Schnittfläche festgestellt. Bei einem Standardfehler von 0,05 ergab sich ein Vertrauensbereich von 0,95. Darauf aufbauend konnte die Varianz mit 80,89 Knochenpartikeln/cm² und 1.071,8 mm²/cm² eingegrenzt werden (s. Tabelle 11).

Tabelle 11 - Statistische Werte aus 108 Schnitten mit Probenmaterial aus Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelgehalt

		Statistik	Standardfehler	
Knochenpartikelanzahl/cm ²	Mittelwert	11,786	0,8654	
	Median	8,985		
	Varianz	80,890		
	Standardabweichung	8,9939		
	Minimum	2,3		
	Maximum	43,8		
	Spannweite	41,5		
	Interquartilbereich	8,9		
	Schiefe	1,655		0,233
	Kurtosis	2,568		0,461
Knochenpartikelfläche in µm ² /cm ²	Mittelwert	15784,989	3150,2466	
	Median	7344,440		
	Varianz	1,072E9		
	Standardabweichung	32738,3229		
	Minimum	1127,6		
	Maximum	204438,9		
	Spannweite	203311,3		
	Interquartilbereich	8407,2		
	Schiefe	4,813		0,233
	Kurtosis	23,891		0,461

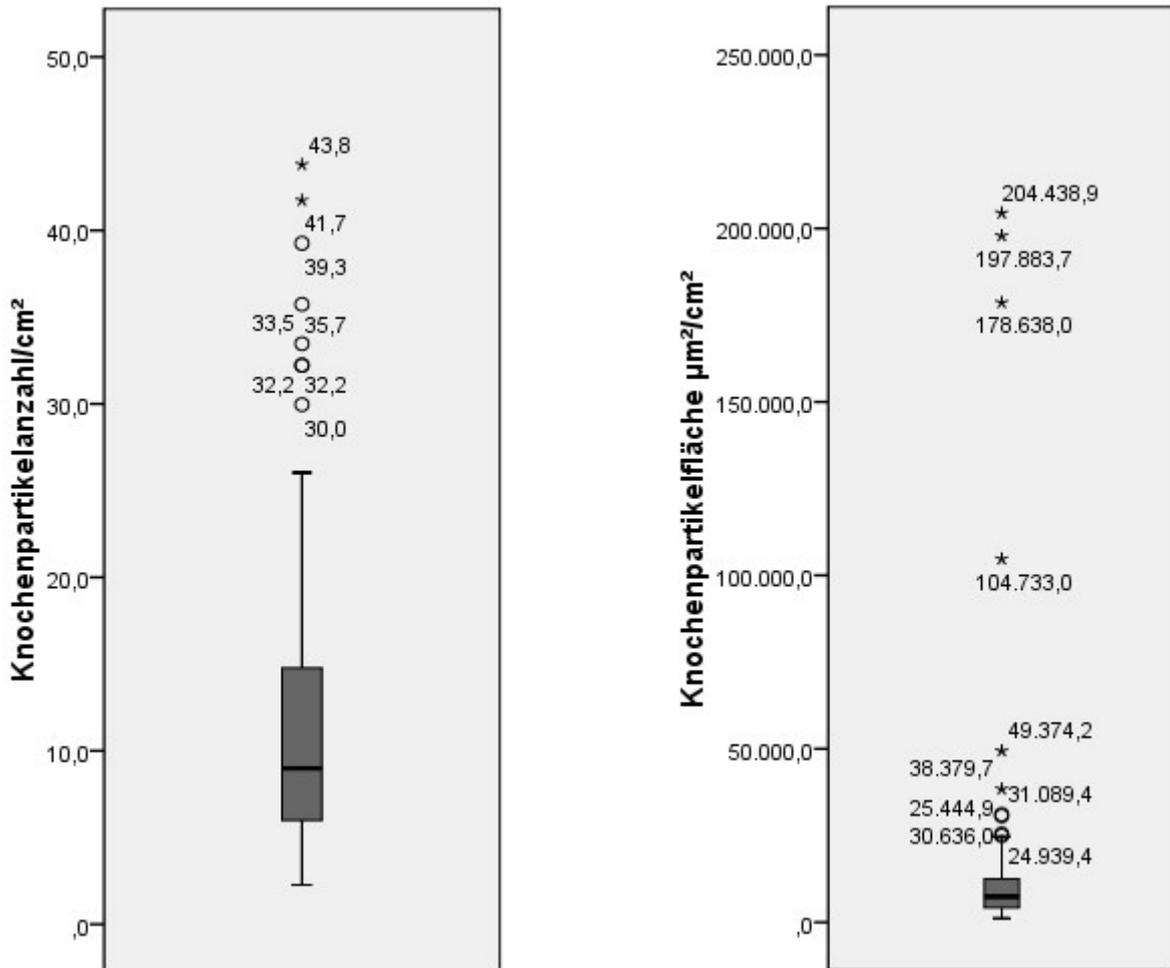


Abbildung 24 - Knochenpartikelanzahlen und Knochenpartikelflächen aus Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelgehalt

Bei der Bestimmung der Knochenpartikelanzahl sind 8 Ausreißer (größer 1,5-facher Interquartilsabstand) aufgetreten, davon sind 2 extreme Ausreißer (größer 3-facher Interquartilsabstand). Folglich sind 8 von 108 Werten Ausreißer, dies entspricht 7,41%, jeder 14. Schnitt ist also durchschnittlich ein Ausreißer. Werden nur die extremen Ausreißer betrachtet so ergibt sich ein Wert von 2 von 108, also 1,85% und somit ist jeder 54. Schnitt ein extremer Ausreißer. Im Falle von 6 Schnitten wäre die Wahrscheinlichkeit einen Ausreißer bei der Knochenpartikelanzahl dabei zu haben bei 37%, auf einen extremen Ausreißer bei 11%. Anders verhält es sich, wenn 30 Schnitte angefertigt werden. Dann wäre die Wahrscheinlichkeit einen Ausreißer dabei zu haben bei 90%, auf einen extremen Ausreißer bei 43%.

Bei Betrachtung der Knochenpartikelfläche werden 10 Ausreißer festgestellt, wovon 8 mehr als den 3fachen Interquartilsabstand überschreiten. Es sind also 10 von 108 beziehungsweise 9,26% Ausreißer und 8 von 108, also wiederum 7,41% extreme Ausreißer. Damit ist jeder 11.

Schnitt ein Ausreißer, jeder 14. ein extremer Ausreißer. Bei der Betrachtung der extremen Ausreißer innerhalb der Knochenpartikelfläche fällt weiterhin auf, dass hier sehr große Spannweiten auftreten (geringster extremer Ausreißer: 24.939,4; Maximum: 204.438,9). Werte ab 100.000 werden somit in 4 Schnitten von 108 festgestellt. Dies entspricht 3,70% und tritt folglich durchschnittlich in jedem 28. Schnitt auf.

Bei der Knochenpartikelfläche beträgt die Chance auf einen Ausreißer 44% und wiederum 37% auf einen extremen. Werden allerdings 30 Schnitte angefertigt, ist es hingegen eine Chance von 95% auf einen Ausreißer und wiederum 82% auf einen extremen.

So zeigt sich auch bei der zufälligen Auswahl von 10 Stichproben bei einer Ziehungszahl von einmal 6 und einmal 30 Schnitten aus 108 im Vergleich, dass die durchschnittliche Differenz zum Mittelwert bei 6 Schnitten im Vergleich zum Referenzwert aus 108 Schnitten bei 3,05 liegt und bei 30 Schnitten nur bei 0,71 Knochenpartikeln/cm². Bei der Knochenpartikelfläche ist der Unterschied 8.993,1 µm² bei 6 Schnitten beziehungsweise bei 5.441,1 µm² bei 30. Dies veranschaulicht Abbildung 25 und Tabelle 34.

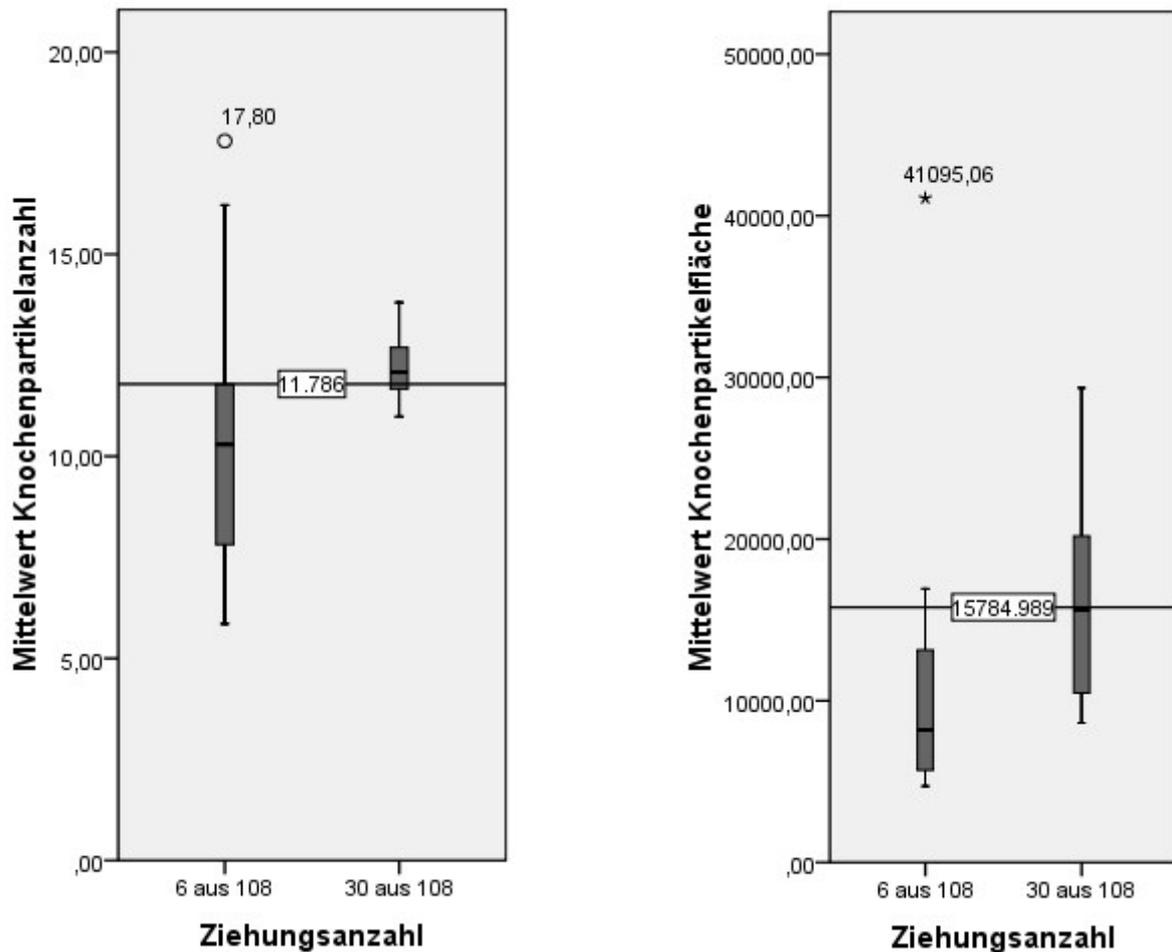


Abbildung 25 - Auswahl von 10 Stichproben von einmal 6 aus 108 und einmal 30 aus 108 unter Betrachtung der Knochenpartikelanzahl und der Knochenpartikelfläche mit zusätzlicher Kenntlichmachung des Mittelwerts aller 108 Proben als Linie. Zu beachten ist, dass der jeweilige Mittelwert von 6 aus 108 bzw. 30 aus 108 nicht dargestellt ist.

Um weitere statistische Tests durchzuführen, müssen die Werte auf Normalverteilung hin überprüft werden. Diese Überprüfung ergab, dass keine Normalverteilung vorliegt.

Für $n = 108$ Schnitte gelangt der Kolmogorov-Smirnov-Test (s. Tabelle 12) zu dem Ergebnis, dass die Nullhypothese zu verwerfen ist und eine Normalverteilung nicht angenommen werden kann. Die Signifikanz liegt unter 0,05. Gleiches zeigen auch die entsprechenden Histogramme (Abbildung 26, Abbildung 27). Ein Logarithmieren der Daten führt hingegen dazu, dass eine Normalverteilung entsteht (Abbildung 26, Abbildung 27, Tabelle 12).

Eine Rückrechnung der log-Werte durch Potenzieren ergibt bei 6 Schnitten ein 95% Konfidenzintervall von 3,19 bis 27,61 Knochenpartikeln/cm² und 2.333,46 bis 18.663,80 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ Knochenpartikelfläche. Bei 30 Schnitten 8,32 bis 14,76 Knochenpartikeln/cm² und 6.011,74 und 12.105,98 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ Knochenpartikelfläche und bei

108 Schnitten 8,05 bis 10,52 Knochenpartikeln/cm² und 6.471,43 bis 9.527,96 µm²/cm² (s. Tabelle 13).

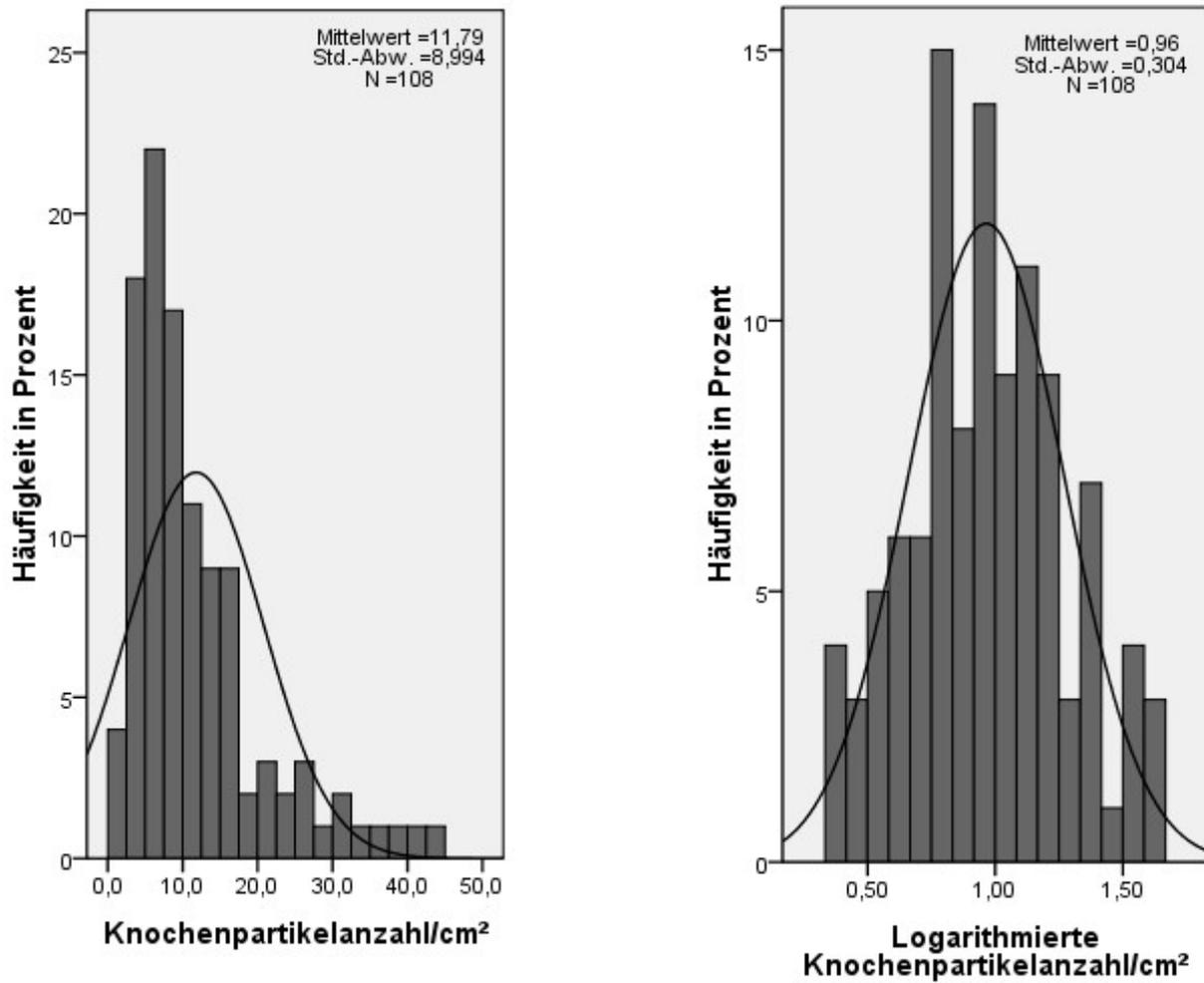


Abbildung 26 - Histogramm der Knochenpartikelanzahlen und der logarithmierten Knochenpartikelanzahlen aus 108 Schnitten von Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelgehalt.

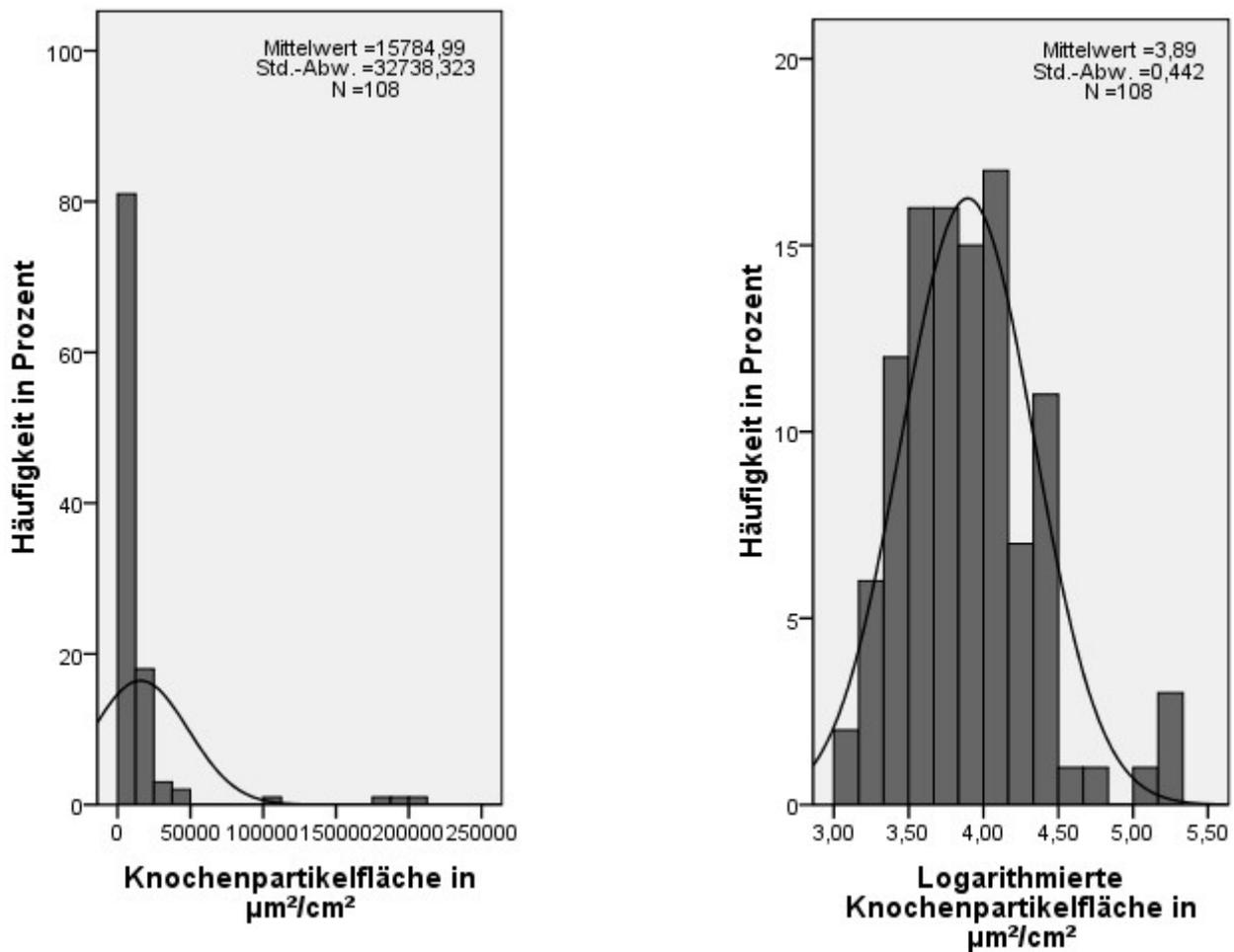


Abbildung 27 - Histogramm Knochenpartikelflächen und der logarithmierten Knochenpartikelfläche aus 108 Schnitten von Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelgehalt.

Tabelle 12 - Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		Knochenpartikelanzahl		Knochenpartikelfläche	
		Anzahl/cm ²	log Anzahl/cm ²	$\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$	log $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$
N		108	108	108	108
Parameter	der Mittelwert	11,786	,9644	15784,989	3,8949
Normalverteilung ^a	Standard- abweichung	8,9939	,30443	32738,3229	,44161
Extremste Differenzen	Absolut	,158	,058	,327	,084
	Positiv	,158	,058	,310	,084
	Negativ	-,145	-,047	-,327	-,055
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,646	,606	3,400	,869
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,009	,856	,000	,437

Tabelle 13 - Statistische Werte einer zufälligen Stichprobe von 6 aus 108 und 30 aus allen 108 Schnitten (die potenzierten Werte der Unter- bzw. Obergrenzen sind in Klammern aufgeführt)

			6 aus 108		30 aus 108		108	
			Statis- tik	Standard -fehler	Statis- tik	Standard -fehler	Statis- tik	Standard -fehler
Logarithmierte Knochenpartikelanzahl /cm ²	Mittelwert		,973	,1822	1,045	,0609	,964	,0293
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	,504 (3,19)		,920 (7,98)		,906 (8,05)	
		Obergrenze	1,441 (27,61)		1,169 (14,76)		1,022 (10,52)	
	5% getrimmtes Mittel		,968		1,053		,962	
	Median		,928		1,075		,953	
	Varianz		,199		,111		,093	
	Standardabweichung		,4463		,3338		,3044	
	Minimum		,4		,4		,4	
	Maximum		1,6		1,6		1,6	
	Spannweite		1,2		1,2		1,3	
	Interquartilbereich		,9		,4		,4	
	Schiefe		,276	,845	-,382	,427	,158	,233
	Kurtosis		-1,321	1,741	-,508	,833	-,493	,461
Logarithmierte Knochenpartikelfläche in µm ² /cm ²	Mittelwert		3,820	,1756	3,931	,0742	3,895	,0425
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	3,368 (2334)		3,779 (6012)		3,811 (6471)	
		Obergrenze	4,271 (18664)		4,083 (12106)		3,979 (9528)	
	5% getrimmtes Mittel		3,819		3,930		3,868	
	Median		3,798		3,901		3,866	
	Varianz		,185		,165		,195	
	Standardabweichung		,4301		,4062		,4416	
	Minimum		3,3		3,3		3,1	
	Maximum		4,3		4,7		5,3	
	Spannweite		1,0		1,4		2,3	
	Interquartilbereich		,9		,7		,5	
	Schiefe		,085	,845	-,039	,427	,869	,233
	Kurtosis		-2,282	1,741	-1,092	,833	1,344	,461

4.1.3 Richtigkeit und Sensitivität

4.1.3.1 Berechnung der Dichte und Korrelation mit histologischen Ergebnissen

Wie bei den vorausgegangenen Ergebnissen wies die Silbernitratimprägung gegenüber der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra auch in diesem Fall eine höhere Anzahl an Knochenpartikeln/cm² nach: Mit 52,23 gegenüber 6,03 Knochenpartikeln/cm² (s. Tabelle 36, Abbildung 28) detektierte die Silbernitratimprägung knapp die 9-fache Menge an Knochenpartikeln. Die Streuung lag bei der Silbernitratimprägung im Bereich von 32 bis 78 Knochenpartikeln/cm², während die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra eine Spannweite von 3 bis 9 Knochenpartikeln/cm² aufwies mit zwei Ausreißern bei 9,9 Partikeln/cm².

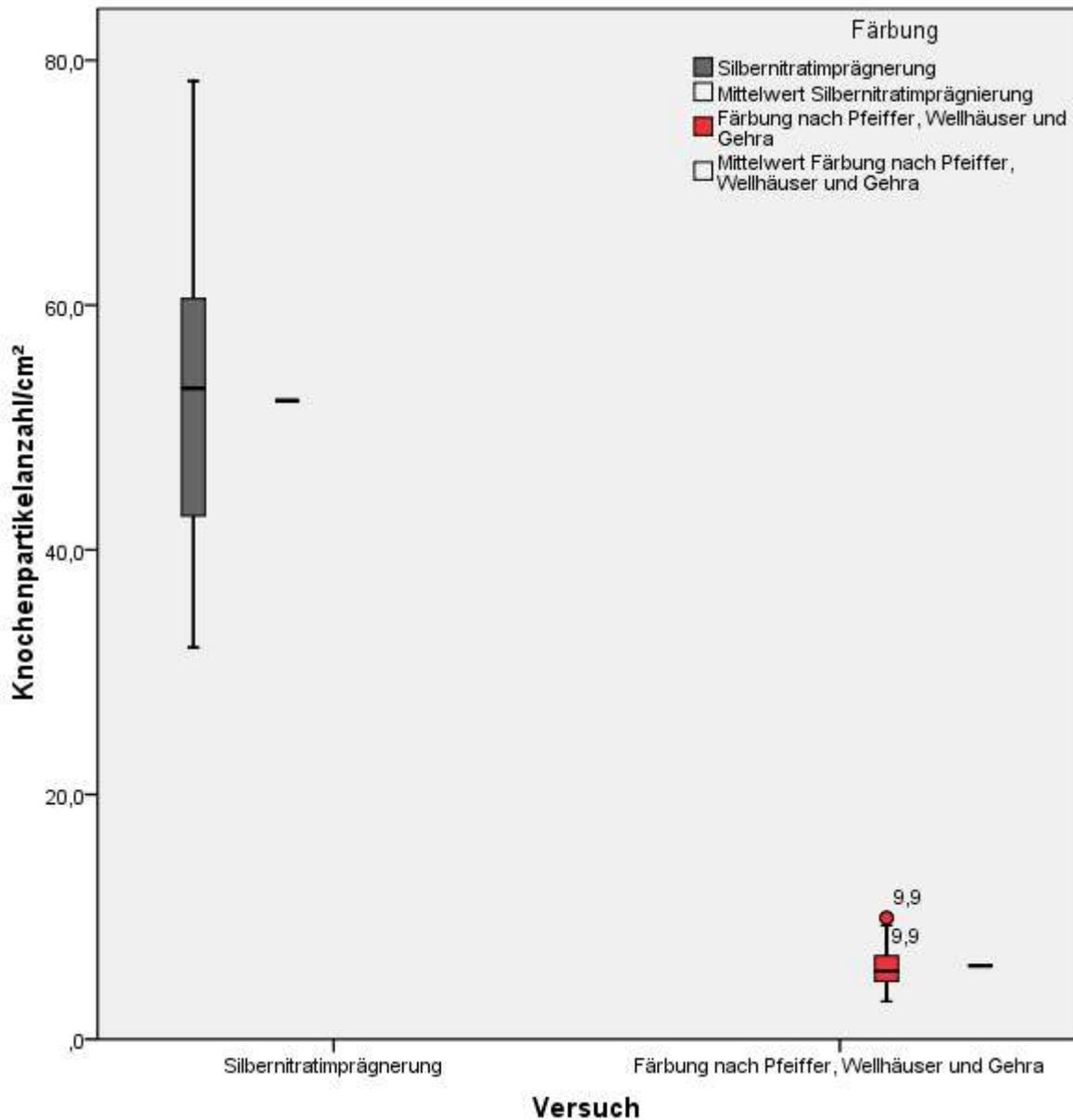


Abbildung 28 - Knochenpartikelanzahl ermittelt durch Silbernitratimpregnierung und Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Material Hähnchenhackfleisch mit 0,5% Knochenpartikelzusatz. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

Die Dichtemessung ergab Werte von 1,31 bis 1,86 Gramm pro Kubikzentimeter. Für den Versuch wurde ein Radius aus Tabelle 35 verwendet. Dieser wies einen Dichtewert von 1,3094 g/cm³ auf (s. Tabelle 35). Mit Hilfe des Dichtewertes wurde die Knochenpartikelfläche errechnet, welche sich rechnerisch aus einer Zugabe von 0,5% Knochenpartikeln ergeben würde. Rechnerisch betrug die zu erwartende Knochenpartikelfläche 381.841,00 µm²/cm². Der zu erwartende Flächenanteil betrug damit 0,38%.

Die Silbernitratimprägnierung wies 0,11% und die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra 0,07% nach (Tabelle 37 und Abbildung 29), so dass mit der Silbernitratimprägnierung ungefähr 50% mehr Knochenpartikelfläche nachgewiesen wurde, die ca. ein Drittel des hinzugefügten Knochenmaterials ausmachte.

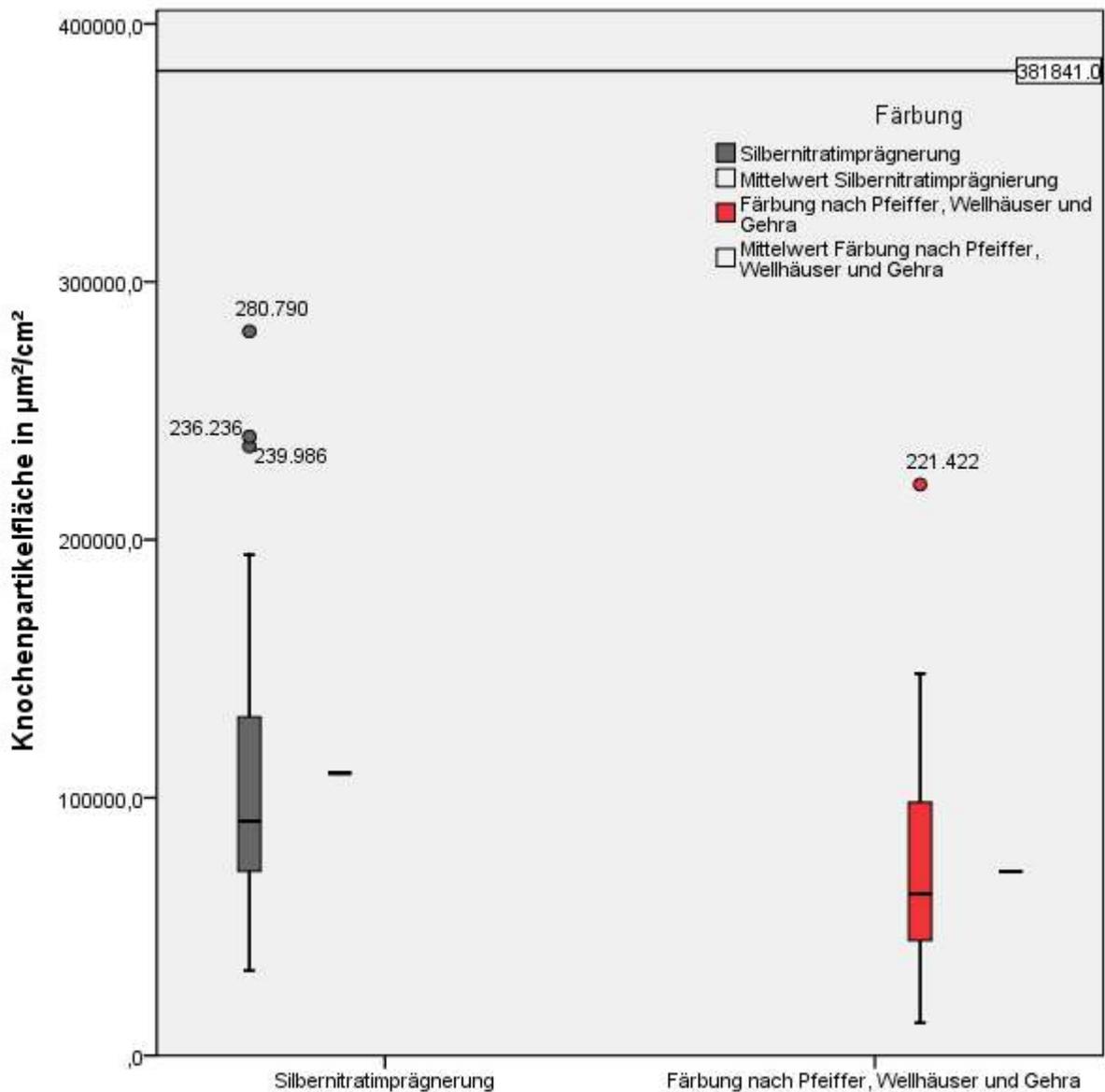


Abbildung 29 – Knochenpartikelflächen ermittelt durch Silbernitratimprägnierung und Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Material Hähnchenhackfleisch mit 0,5% Knochenpartikelzusatz in Bezug zum rechnerisch ermittelten Wert. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

4.1.3.2 Sensitivität der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra

Bei der schrittweisen Erhöhung der Indigokarmin-Einwirkzeit trat mit zunehmender Expositionszeit eine Verringerung der Knochenpartikelzahlen auf (s. Abbildung 30). Die Anzahl nahm pro Stufe durchschnittlich um den Faktor 3,9 ab. Die stufenweise Verringerung der Anzahl führte bei manchen Proben dazu, dass bei der letzten Stufe keine Knochenpartikel mehr detektiert wurden (s. Tabelle 38, Abbildung 31).

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der detektierten Knochenpartikelfläche. Die nachgewiesene Fläche nahm um etwa den Faktor 4,4 ab (s. Tabelle 39, Abbildung 32).

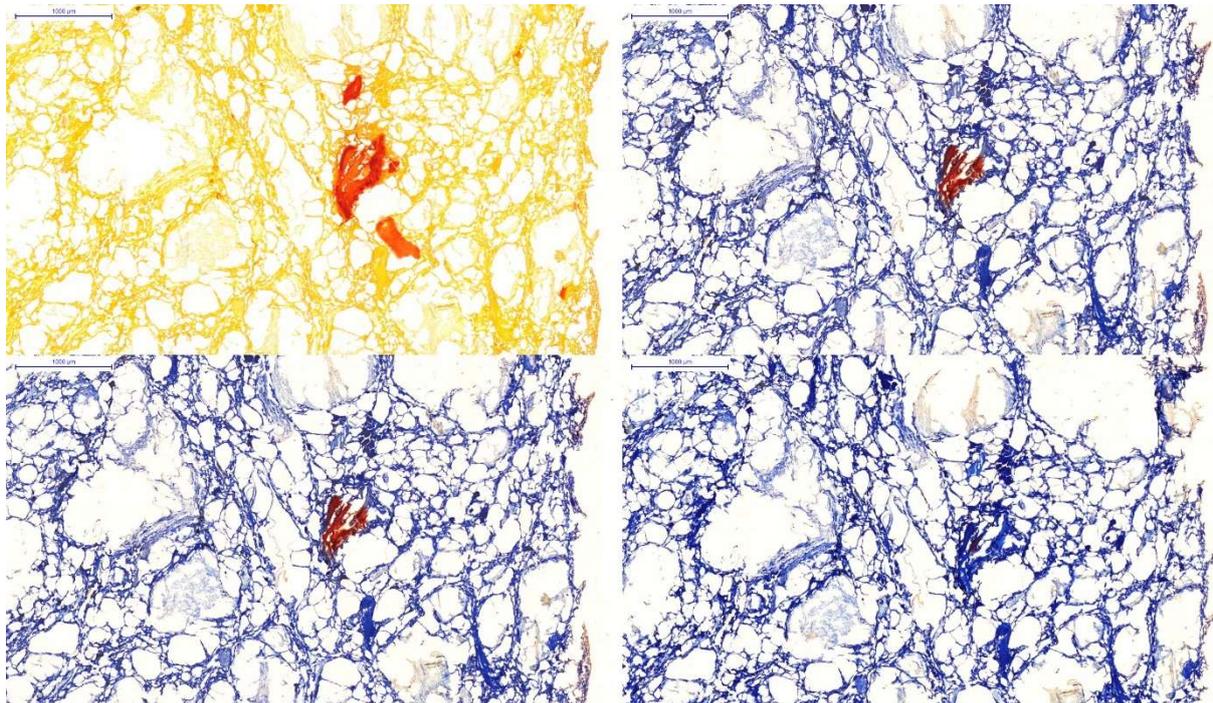


Abbildung 30 – Von oben links nach oben rechts nach unten links nach unten rechts: Schrittweise Entfärbung eines Knochenpartikels durch zunehmende Einwirkzeit von Indigokarmin. Einwirkzeit des Farbstoffs Indigokarmin: 0, 30, 90 und 150 Sekunden

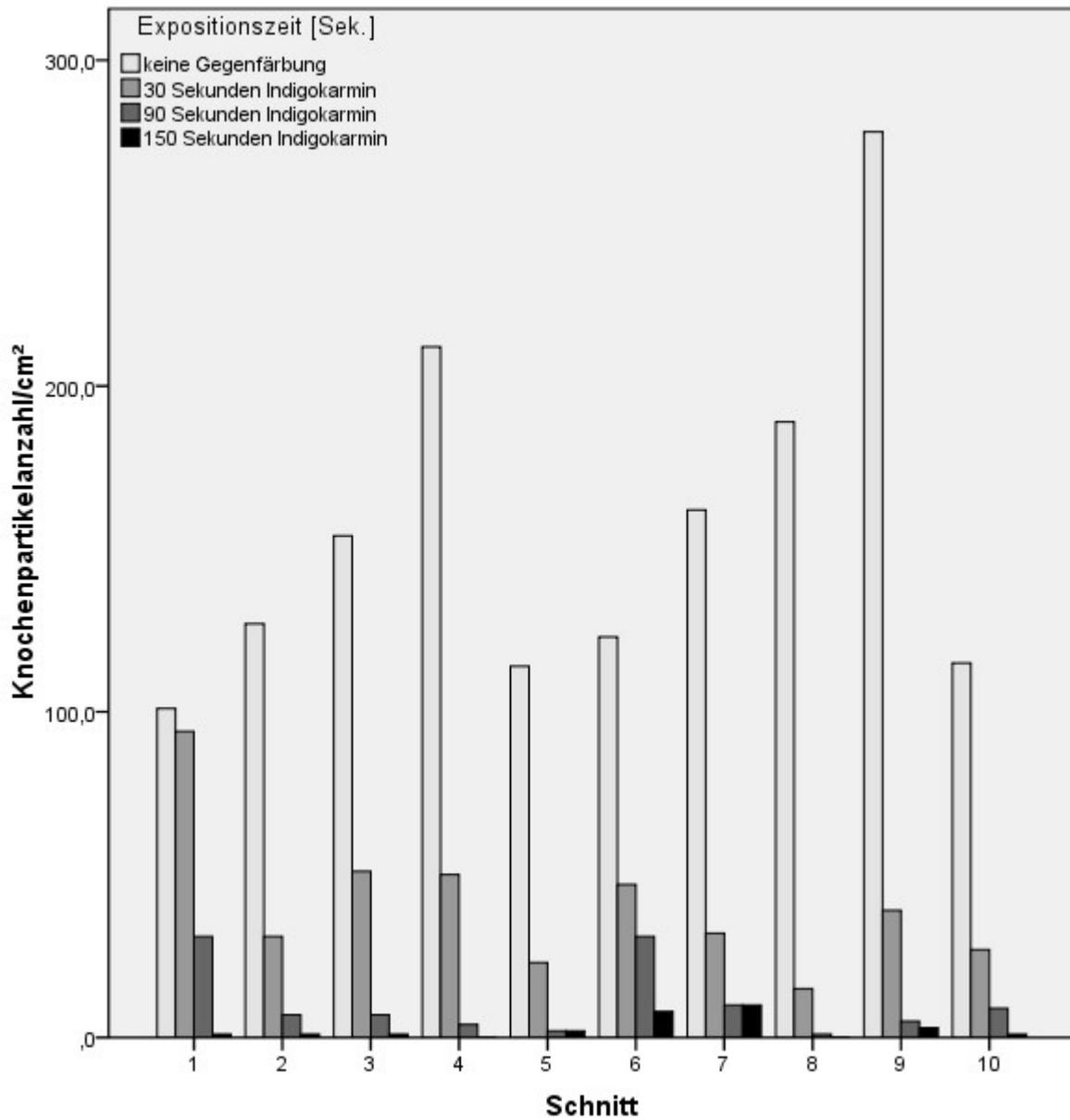


Abbildung 31 - Detektierte Knochenpartikelanzahl bei schrittweiser Erhöhung der Einwirkzeit bei der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra

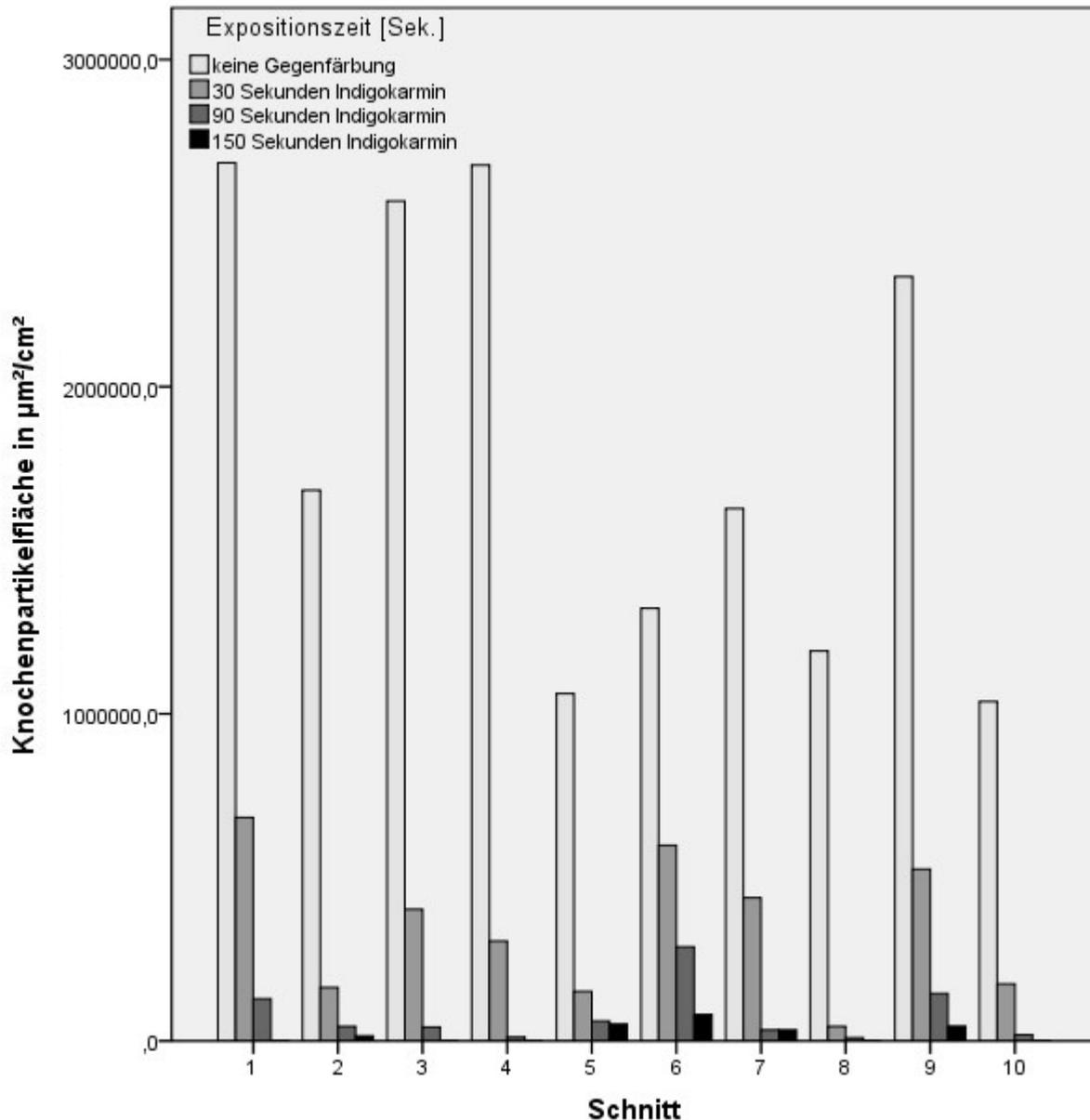


Abbildung 32 - Detektierte Knochenpartikelfläche bei schrittweiser Erhöhung der Einwirkzeit bei der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra

4.1.3.3 Stauchungs- und Auffaltungstendenzen

Stauchungs- und Auffaltungstendenzen wurden durch Vergleich der Knochenpartikelfläche und der Kavitätenfläche nach dem Anfertigen von Schnitten untersucht. Durchschnittlich wurde eine Differenz zwischen Knochenpartikelfläche und der zugehörigen Kavität von fast 30% gemessen. 50% der Werte bewegte sich zwischen knapp 20% und 40% (s. Tabelle 14, Abbildung 33).

Tabelle 14 - Knochenpartikelfläche und Flächen ihrer Kavitäten

	Fläche der Kavität [μm^2]	Fläche der Knochen [μm^2]	Differenz Kavität - Knochen
1	25.948,7	-	100,0%
2	34.585,0	13.887,7	59,8%
3	95.102,50	41.331,8	56,5%
4	23.244,4	11.325,3	51,3%
5	49.709,1	29.162,7	41,3%
6	6.265,5	3.886,9	38,0%
7	52.602,6	34.440,4	34,5%
8	41.215,2	28.362,8	31,2%
9	108.786,2	75.313,3	30,8%
10	69.228,7	49.031,5	29,2%
11	12.187,3	8.802,0	27,8%
12	89.270,1	65.387,9	26,8%
13	39.255,7	30.992,9	21,1%
14	71.439,7	57.577,2	19,4%
15	6.452,7	5.245,6	18,7%
16	59.539,5	50.546,0	15,1%
17	16.873,4	14.382,9	14,8%
18	89.863,9	79.504,0	11,5%
19	10.802,1	9.678,7	10,4%
20	63.471,8	60.085,8	5,3%

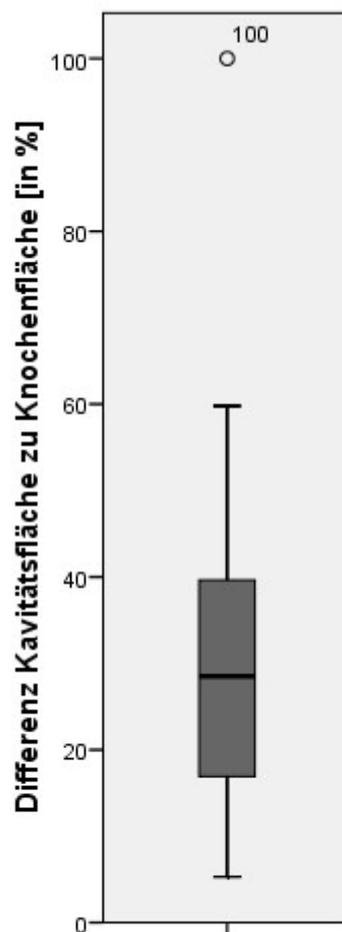


Abbildung 33 - Differenz Knochenpartikelfläche zur Kavität in Prozent

4.1.3.4 Flächenvergleich zwischen manueller und automatisierter Messung

Die Überprüfung der Richtigkeit der Messung ergab ein hohes Maß an Übereinstimmung zwischen manueller und automatisierter Auswertung (s. Abbildung 34 und Tabelle 15). Die geometrische Figur eines Quadrates wurde mit einer Übereinstimmung von 100% detektiert. Eine Abweichung zwischen den beiden Messmethoden ist nicht feststellbar.

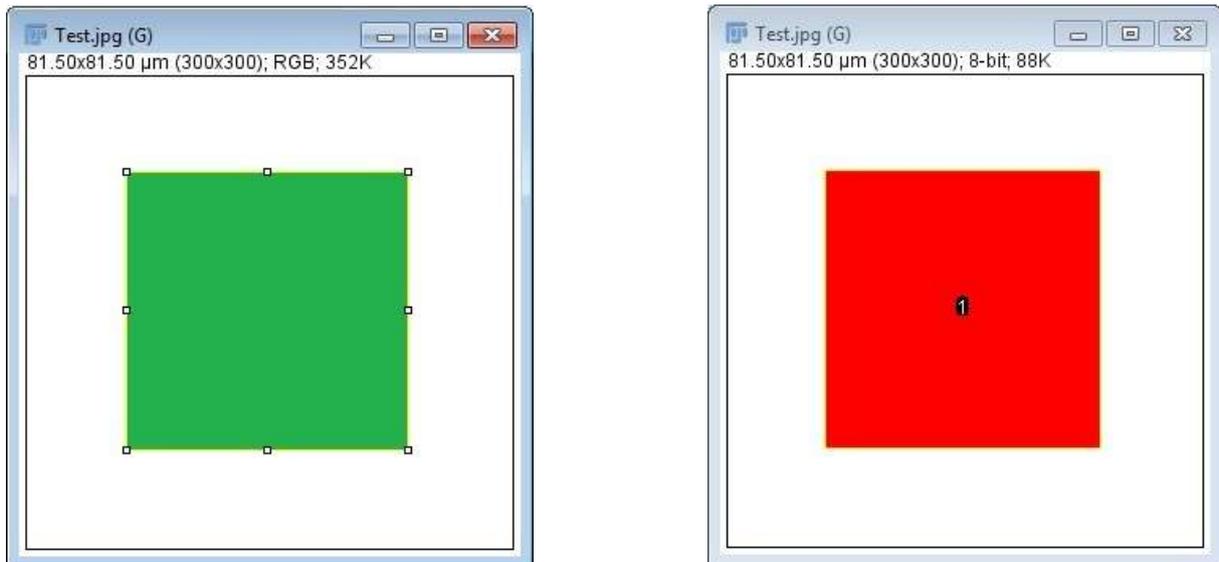


Abbildung 34 – Geometrische Figur eines Quadrates. Links manuell mit der Maus umfahren, rechts mit der automatischen Flächenerkennung nach 3.3.1.3 erfasst

Tabelle 15 - Vergleich der Flächenmessung zwischen dem manuellen Umfahren und der automatischen Flächenerkennung

	Quadrat	Knochenpartikel
Gesamtfläche:	6.642,25 μm^2 (81,50 x 81,50)	44.211,47 μm^2 (226,03 x 195,60)
Manuelle Messung:	2.272,96 μm^2 ; 0,34210% Anteil	479,42 μm^2 ; 0,01084% Anteil
Phasenanalyse	2.272,96 μm^2 ; 0,34210% Anteil	477,43 μm^2 ; 0,01080% Anteil
Übereinstimmung:	100%	99,58%

Beim Ausmessen eines Knochenpartikels als Vergleichsobjekt wurde eine Übereinstimmung von 99,58% ermittelt (s. Abbildung 35, 36, Tabelle 15).

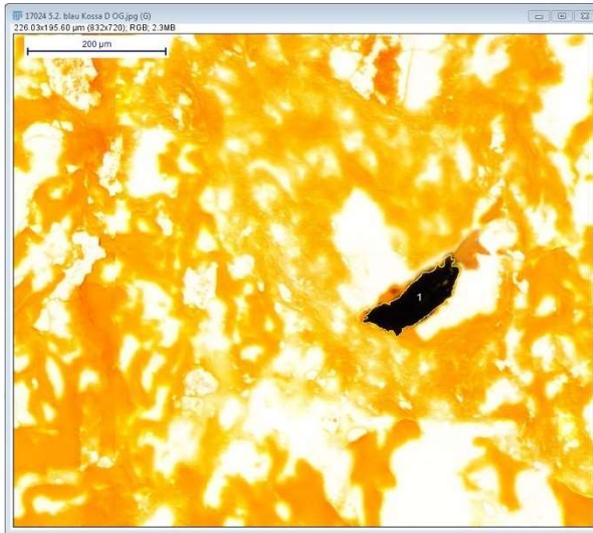


Abbildung 35 – Knochenpartikel manuell mit der Maus umfahren

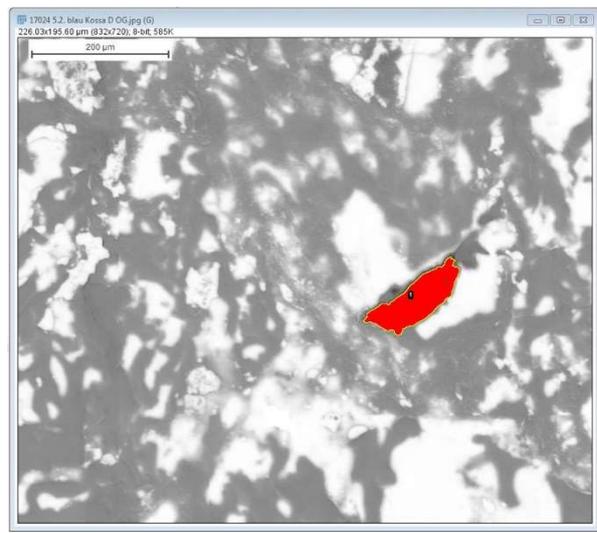


Abbildung 36 – mit der automatischen Flächen-erkennung nach 3.3.1.3 erfasst

4.1.3.5 Knochenpartikelanzahl bei konventioneller und automatisierter Zählweise

Wurden die Ergebnisse einer konventionellen Partikelzählung mit denen der Phasenanalyse im Hinblick auf die Knochenpartikelanzahl verglichen, so lag eine Übereinstimmung von 95% vor. Von 10 Schnitten lieferten 6 eine Übereinstimmung von 100%, die übrigen 4 Schnitte zeigten eine maximale Abweichung von bis zu 18%. Die Abweichungen wurden durch höhere Knochenpartikelzahlen bei der automatischen Zählweise hervorgerufen (s. Tabelle 16).

Tabelle 16 – Vergleich der konventionellen Partikelzählung mit der Zählung durch Phasenanalyse

Schnitt	Anzahl konventionelle Zählung [Knochenpartikel/cm ²]	Anzahl Phasenanalyse [Knochenpartikel/cm ²]	Übereinstimmung $\left[\frac{n_{\text{konventionell}}}{n_{\text{Phasenanalyse}}} * 100 \right]$
1	8,7	9,3	93%
2	5,8	5,8	100%
3	4,8	4,8	100%
4	1,9	2,3	82%
5	3,3	3,5	94%
6	3,5	3,5	100%
7	3,9	3,9	100%
8	3,3	3,9	84%
9	3,9	3,9	100%
10	3,5	3,5	100%
\bar{x}	4,3	4,4	95%

4.1.4 Spezifität

4.1.4.1 Proben ohne zugefügtes Knochenmaterial

Die Proben ohne Beifügung von Knochenpartikeln zeigten sehr geringe Knochenpartikelzahlen. Mit einem durchschnittlichen Wert von 0,2 Knochenpartikeln/cm² und einer mittleren Fläche von 153,62 µm²/cm² lagen diese deutlich unter den Werten der Proben mit Knochenpartikelzusatz (s. Tabelle 17)

Tabelle 17 – Detektierte Knochenpartikelanzahlen und Knochenpartikelflächen bei den Nullproben ohne Knochenpartikelzusatz aus Tabelle 1

Schnitt (4,84 cm ²)	Knochenpartikel / Schnitt	Knochenpartikel /cm ²	Knochenpartikel fläche/Schnitt	Knochenpartikel fläche/cm ²
1	0	0	0	0
2	3	0,62	2.215,41	457,73
3	3	0,62	4.996,77	1.032,39
4	1	0,21	1.649,472	340,80
5	1	0,21	552,15	114,08
6	2	0,41	545,23	112,65
7	1	0,21	248,44	51,33
8	2	0,41	372,68	77,00
9	0	0	0	0
10	2	0,41	6.687,62	1.381,74
11	1	0,21	392,09	81,01
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	4	0,83	1.960,35	405,03
18	1	0,21	185,71	38,37
19	0	0	0	0
20	1	0,21	288,90	59,69
21	3	0,62	1471,99	304,13
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0

Ergebnisse

25	2	0,41	248,53	51,35
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	2	0,41	490,20	101,28
30	0	0	0	0
\bar{x}	0,97	0,2	743,52	153,62

Ähnlich verhielt es sich auch bei den Geflügelhackfleischproben aus SB-Packungen des Lebensmittelhandels. Hier wurden ähnliche Zahlen- und Flächenwerte erreicht (s. Tabelle 18). Das arithmetische Mittel der Knochenpartikelanzahl in der Hähnchenhackfleischzubereitung (0,34 Knochenpartikel/cm²) lag etwas höher als dasjenige der Putenhackfleischzubereitung (0,18 Knochenpartikel/cm²). Es traten sowohl milde als auch extreme Ausreißer bis zu 3,3 Knochenpartikel/cm² in insgesamt 3 Schnitten auf.

Bei der Auswertung der Knochenpartikelfläche fällt auf, dass bei der Putenhackfleischzubereitung aufgrund der wenigen Knochenpartikeltreffer nur Ausreißer abgebildet werden, während bei der Hähnchenhackfleischzubereitung ein Boxplot mit vergleichsweise hoher Spannweite entstand (s. Abbildung 37, 38).

Tabelle 18 - Detektierte Knochenpartikelanzahlen und Knochenpartikelflächen bei Hähnchen- und Putenhackfleisch aus Tabelle 2

Schnitt (4,84 cm ²)	Knochenpartikel/Schnitt in Hähnchenhackfleisch	Knochenpartikel/cm ² in Hähnchenhackfleisch	Knochenpartikelfläche/Schnitt in Hähnchenhackfleisch	Knochenpartikelfläche/cm ² in Hähnchenhackfleisch	Knochenpartikel/Schnitt in Putenhackfleisch	Knochenpartikel/cm ² in Putenhackfleisch	Knochenpartikelfläche/Schnitt in Putenhackfleisch	Knochenpartikelfläche/cm ² in Putenhackfleisch
1	0	0	0,00	0	1	0,21	434,4	89,8
2	2	0,41	1398,0	288,9	0	0	0	0
3	3	0,62	1218,8	251,7	1	0,21	2316,7	478,7
4	2	0,41	692,07	143,0	0	0	0	0
5	2	0,41	1598,8	330,3	0	0	0	0
6	2	0,41	1121,2	231,7	0	0	0	0
7	1	0,21	110,7	22,9	0	0	0	0

Ergebnisse

8	10	2,07	21960, 0	4.537,2	1	0,21	6432,9	1.329,1
9	0	0	0	0	1	0,21	903,2	186,6
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1	0,21	1910,2	394,7	0	0	0	0
13	0	0	0	0	1	0,21	8129,0	1.679,6
14	0	0	0	0	2	0,41	448,2	92,6
15	0	0	0	0	16	3,31	10.032	2.072,7
16	2	0,41	1003,5	207,3	0	0	0	0
17	0	0	0,00	0	1	0,21	372,3	76,9
18	1	0,21	256,1	52,9	0	0	0	0
19	1	0,21	117,7	24,3	0	0	0	0
20	4	0,83	2311,6	477,6	0	0	0	0
21	1	0,21	1854,8	383,2	1	0,21	137,9	28,5
22	0	0	0	0	0	0	0	0
23	2	0,41	1086,6	224,5	0	0	0	0
24	1	0,21	768,2	158,7	0	0	0	0
25	3	0,62	643,6	133,0	0	0	0	0
26	1	0,21	124,6	25,7	0	0	0	0
27	7	1,45	48501,6	10.021,0	0	0	0	0
28	1	0,21	456,8	94,4	0	0	0	0
29	1	0,21	712,8	147,3	0	0	0	0
30	2	0,41	477,5	98,7	1,0	0,21	530,5	109,6
\bar{x}		0,34		608,3		0,18		204,8

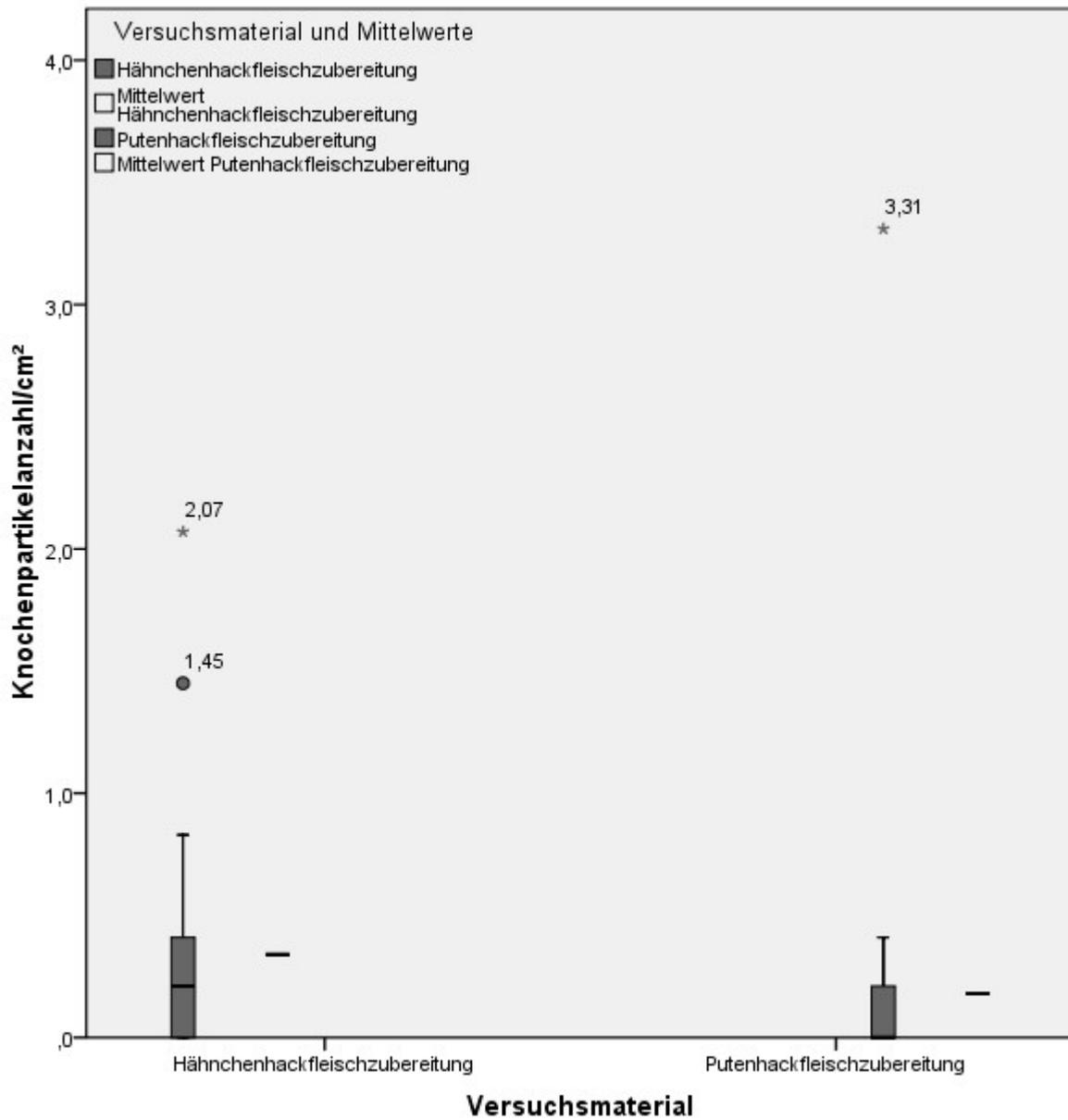


Abbildung 37 – Vergleich von Hähnchenhackfleischzubereitung und Putenhackfleischzubereitung aus Tabelle 2 hinsichtlich der Knochenpartikelanzahl. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

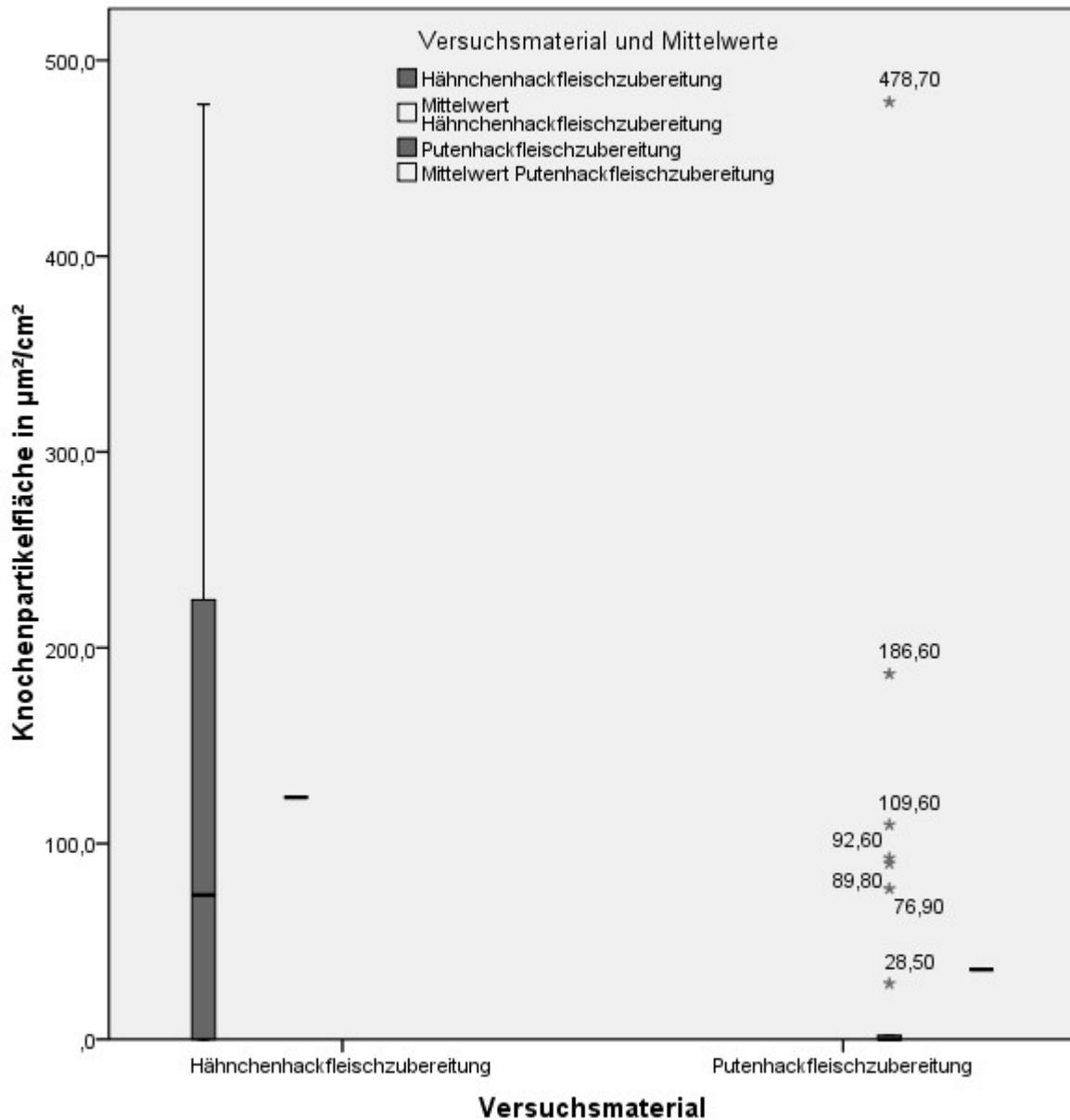


Abbildung 38 – Vergleich von Hähnchenhackfleischzubereitung und Putenhackfleischzubereitung aus Tabelle 2 hinsichtlich der Knochenpartikelfläche. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

4.1.4.2 Gewürze, Kalziumkarbonat, Dinatriumhydrogenphosphat

Majoran und Pfeffer zeigten als Vertreter der Gewürze keinerlei Anfärbbarkeit, weder bei der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra noch bei der Silbernitratimprägnierung. Ebenso wenig wurden Dinatriumhydrogenphosphat-Zusätze angefärbt. Einzig Kalziumkarbonat zeigte eine Anfärbbarkeit. Die Farbflächen der Silbernitratimprägnierung waren homogen mit klaren Grenzen (s. Abbildung 39). Die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra ließ inhomogene Farbflächen sowie verschwommene Grenzen mit Farbschleiern erkennen. Ebenso waren

Bereiche zu erkennen (s. Abbildung 40), welche sowohl die rote Färbung des Alizarins, als auch die blaue Färbung des Indigokarmins aufwiesen.



Abbildung 39 - Probe mit Kalziumkarbonat in der Silbernitratimprägnierung

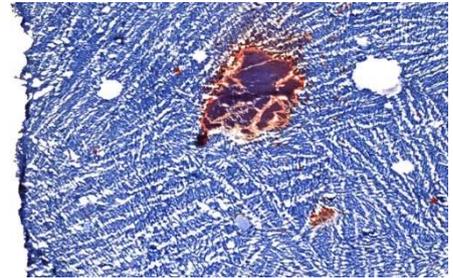


Abbildung 40 - Probe mit Kalziumkarbonat in der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra

4.2 Analytische Zusammensetzung von Geflügelverarbeitungsfleisch

4.2.1 Vollanalyse

Die Proben aus Betriebsstätte 1 und 2 wurden auf ihre Hauptinhaltsstoffe untersucht.

Die Ergebnisse aller Verarbeitungsfleischproben sind in Abbildung 41 zusammengefasst, die einzelnen Werte befinden sich im Anhang in Tabelle 40 bis Tabelle 44.

Im Vergleich der Analyse-Methoden der chemischen und der Nahinfrarotspektroskopischen Untersuchung wurde mit Ausnahme des Bindegewebeiseiweißwertes durchweg eine hohe Übereinstimmung von durchschnittlich 96% (ohne Bindegewebeiseiweiß) erreicht.

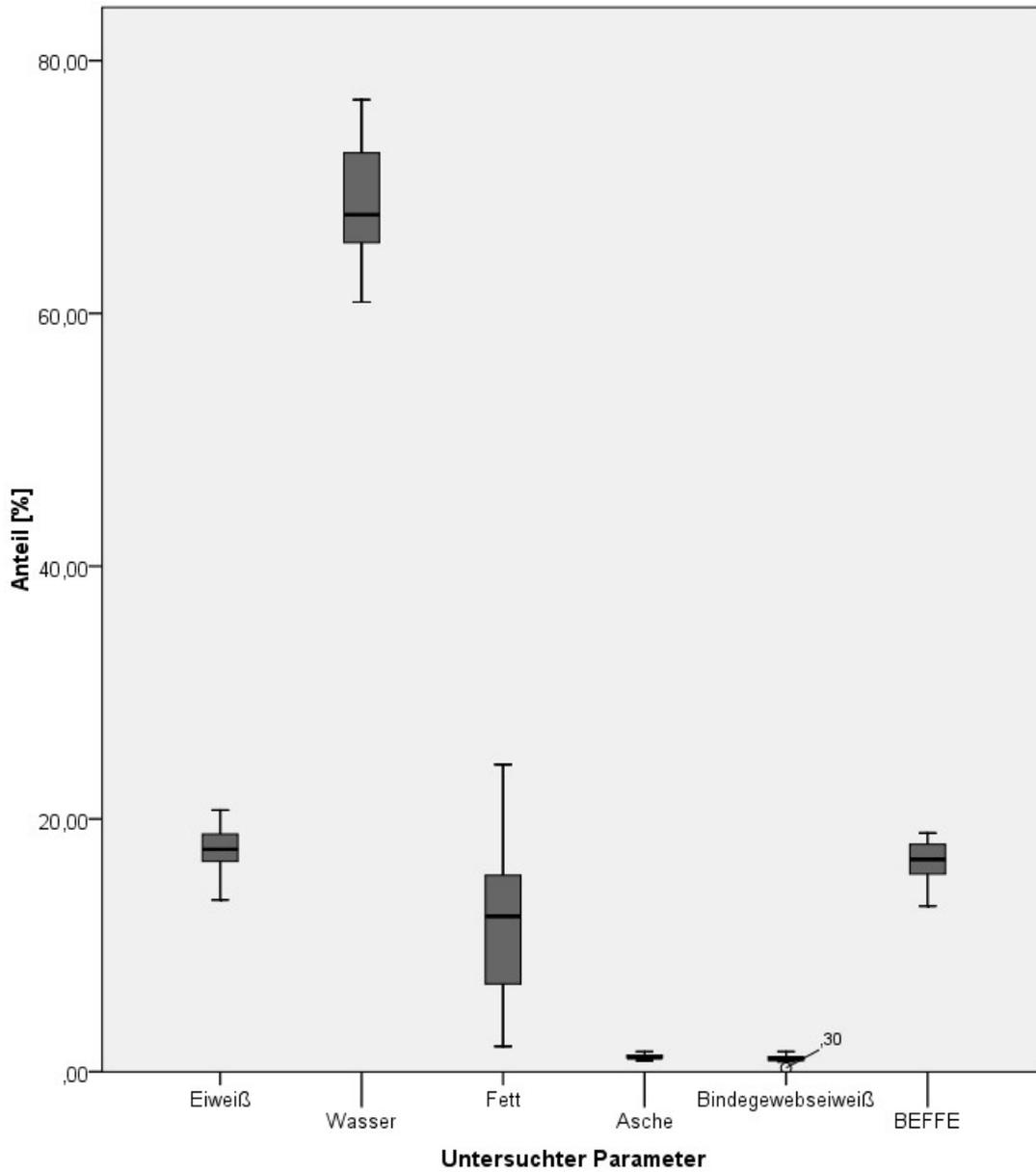


Abbildung 41 – Vollanalyseergebnisse aller Verarbeitungsfleischproben in Prozent

4.2.2 Histologie und Kalziumwerte

Alle untersuchten Verarbeitungsfleischproben sind in der Abbildung 42 zusammengefasst. Werden alle Verarbeitungsfleischproben nach Teilstücken aufgeschlüsselt so ergeben sich unterschiedliche Knochenpartikelgehalte je nach verarbeitetem Rohstoff (s. Abbildung 43, Abbildung 44 und Abbildung 45).

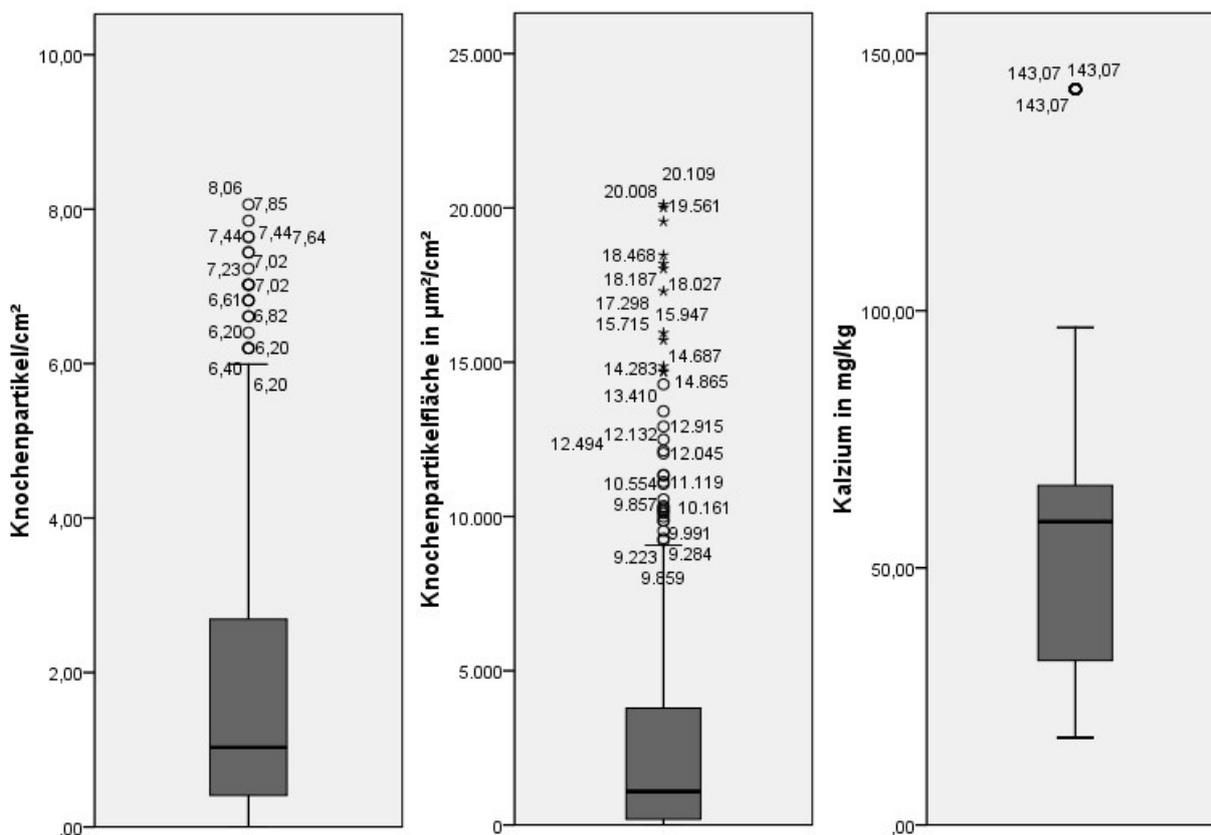


Abbildung 42 – Übersicht aller Verarbeitungsfleischproben im Hinblick auf die Untersuchungsparameter Knochenpartikelanzahl, Knochenpartikelfläche und Kalzium. Bei den Knochenpartikelanzahlen sind 51 Ausreißer mit Werten ab 9,3 Knochenpartikeln/cm² nicht dargestellt und bei der Knochenpartikelfläche sind 75 Ausreißer mit Werten ab 21.000 µm²/cm² nicht dargestellt.

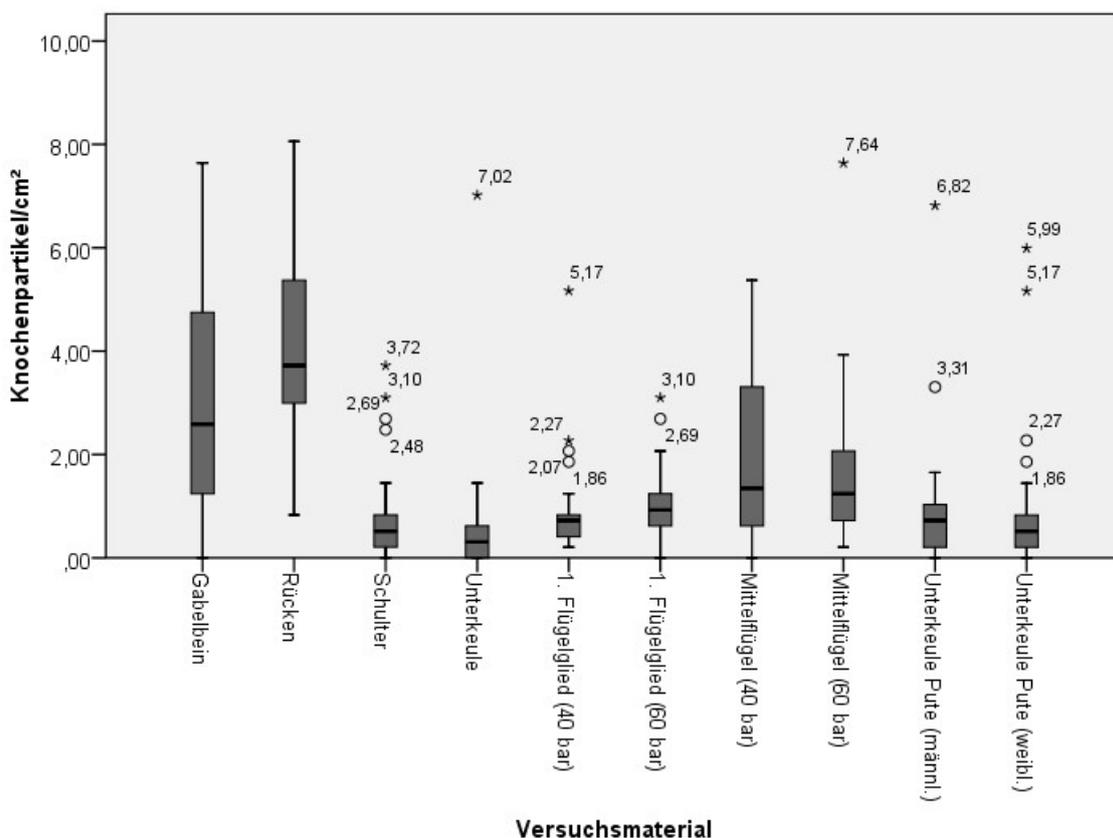


Abbildung 43 – Knochenpartikelanzahl/cm² in verschiedenen Teilstücken. 51 Ausreißer mit Werten ab 9,3 Knochenpartikeln/cm² sind nicht dargestellt

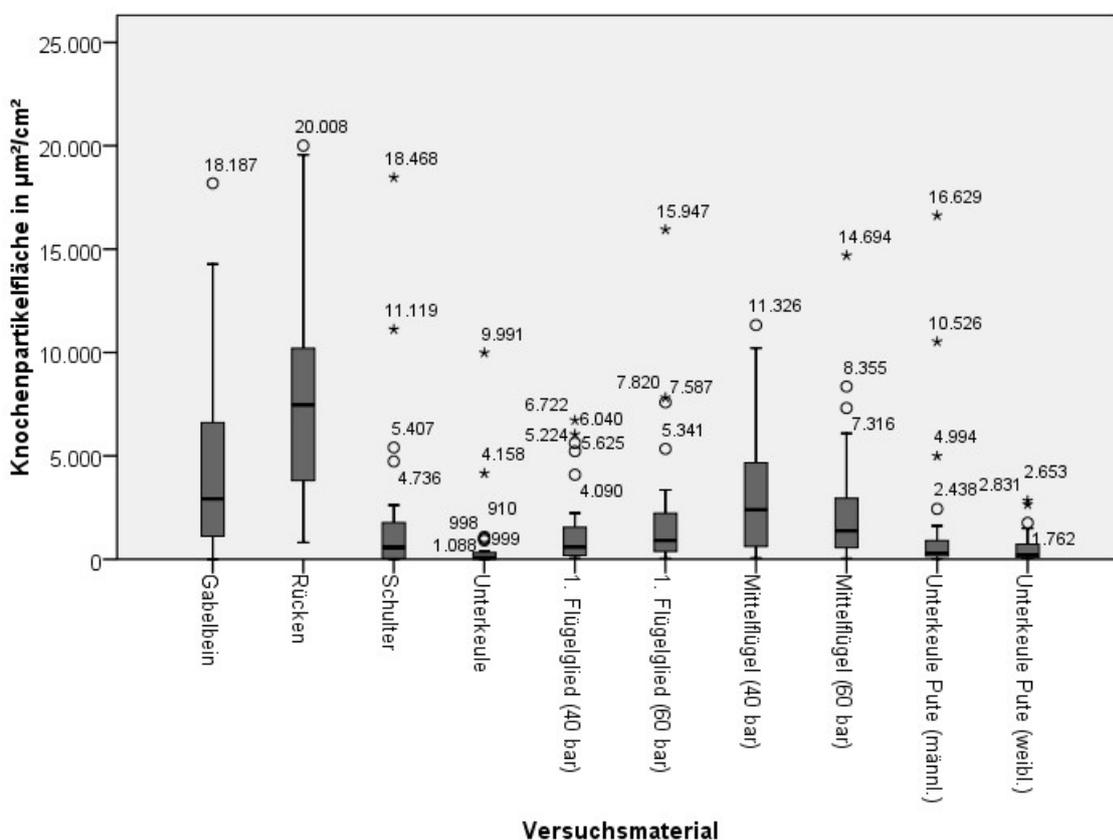


Abbildung 44 – Knochenpartikelfläche in µm²/cm² in verschiedenen Teilstücken. 75 Ausreißer mit Werten ab 21.000 µm²/cm² sind nicht dargestellt

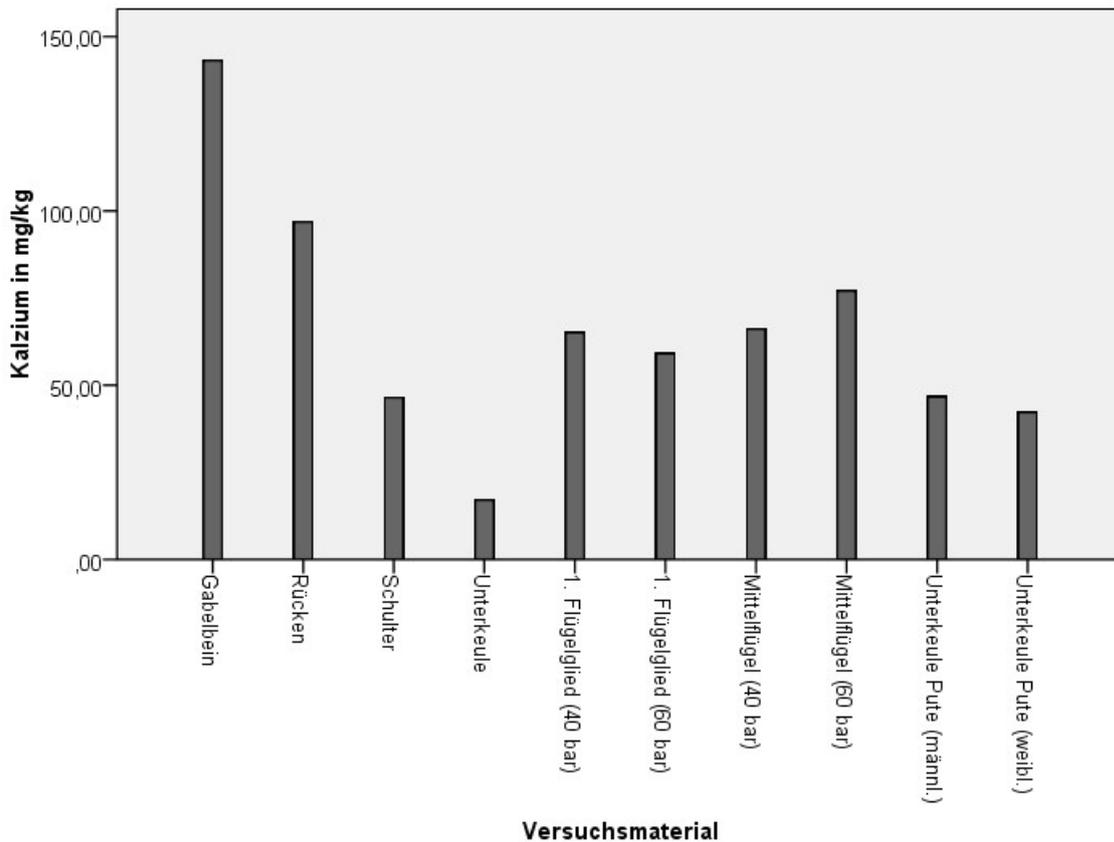


Abbildung 45 - Kalziumgehalt in mg/kg in verschiedenen Teilstücken

4.2.2.1 Vergleich Verarbeitungsfleisch und Separatorenfleisch

Bei den Proben des Betriebs 1 zeigte sich im Verarbeitungsfleisch eine mittlere Knochenpartikelanzahl von 5,83 Knochenpartikeln/cm². Dieser Wert entsprach näherungsweise demjenigen von Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzugabe (4,44 Knochenpartikel/cm²; s. Tabelle 1, Tabelle 25). 3 Schnitte wiesen keine Knochenpartikel auf. Das Verarbeitungsfleisch aus Betrieb 2 zeigte eine durchschnittliche Knochenpartikelanzahl von 3,33 Knochenpartikeln/cm²; die Spannweite der Knochenpartikelzahl war bei Betrieb 2 ebenfalls geringer.

Die Ergebnisse der Separatorenfleischproben aus Tabelle 3 zeigten im Vergleich zu den Verarbeitungsfleischproben deutlich höhere Werte. Das Produkt aus Betrieb 1 enthielt im Mittel 77,26 Knochenpartikel/cm², dasjenige aus Betrieb 2 durchschnittlich 34,79 Knochenpartikel/cm² (s. Abbildung 46).

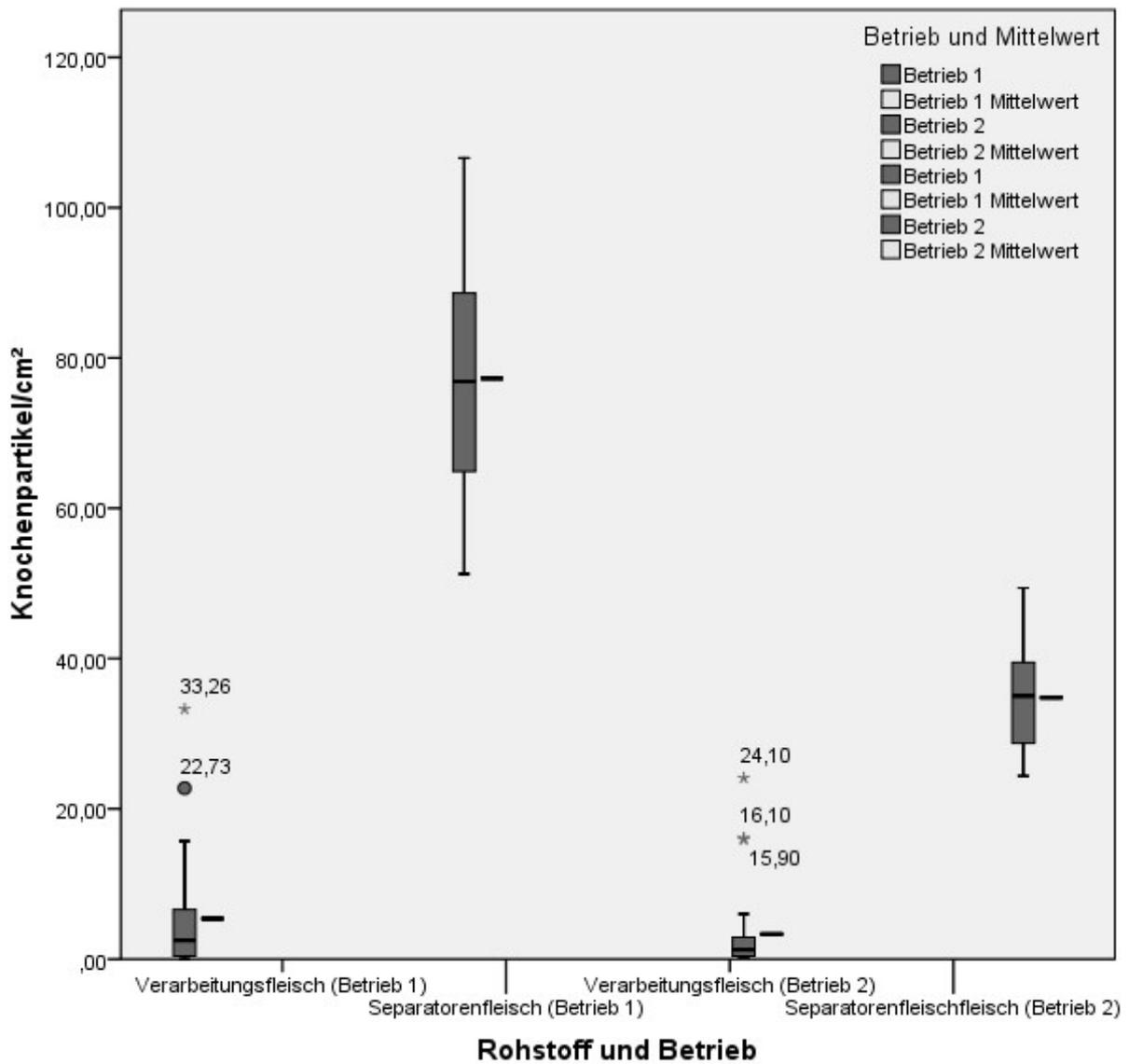


Abbildung 46 - Ermittelte Knochenpartikelzahlen im Vergleich zwischen Betrieb 1 und Betrieb 2 in den Materialien Verarbeitungsfleisch und Separatorenfleisch. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

Die Knochenpartikelfläche beschreibt ähnliche Tendenzen: Das durchschnittliche Ergebnis in Betrieb 1 zeigte mit $24.933,79 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ einen Wert, welcher sich zwischen den Ergebnissen mit 0,1% Knochenpartikelzugabe ($3.489,12 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$) und den Werten mit 0,5% Knochenpartikelzugabe ($109.503,85 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$) aus Tabelle 1 bewegte (Tabelle 25, Tabelle 37). Werden die Ergebnisse aus Betrieb 2 betrachtet, so wird mit $7.157,51 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ ein mittlerer Wert erreicht, der knapp ein Drittel der aus Betrieb 1 festgestellten Menge betrug. Zudem ist auch beim Messparameter Knochenpartikelfläche zu erkennen, dass die Spannweite des Großteils der Werte in Betrieb 1 deutlich größer ausfällt als in Betrieb 2.

Ein ähnliches Bild zeichnete sich auch beim Material Separatorenfleisch ab. Hier zeigte sich in Betrieb 1 ein mittlerer Wert von $154.082,21 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$, bei Betrieb 2 von $75.531,98 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$. In gleicher Weise war die Spannweite der Werte bei Betrieb 1 größer (s. Abbildung 47).

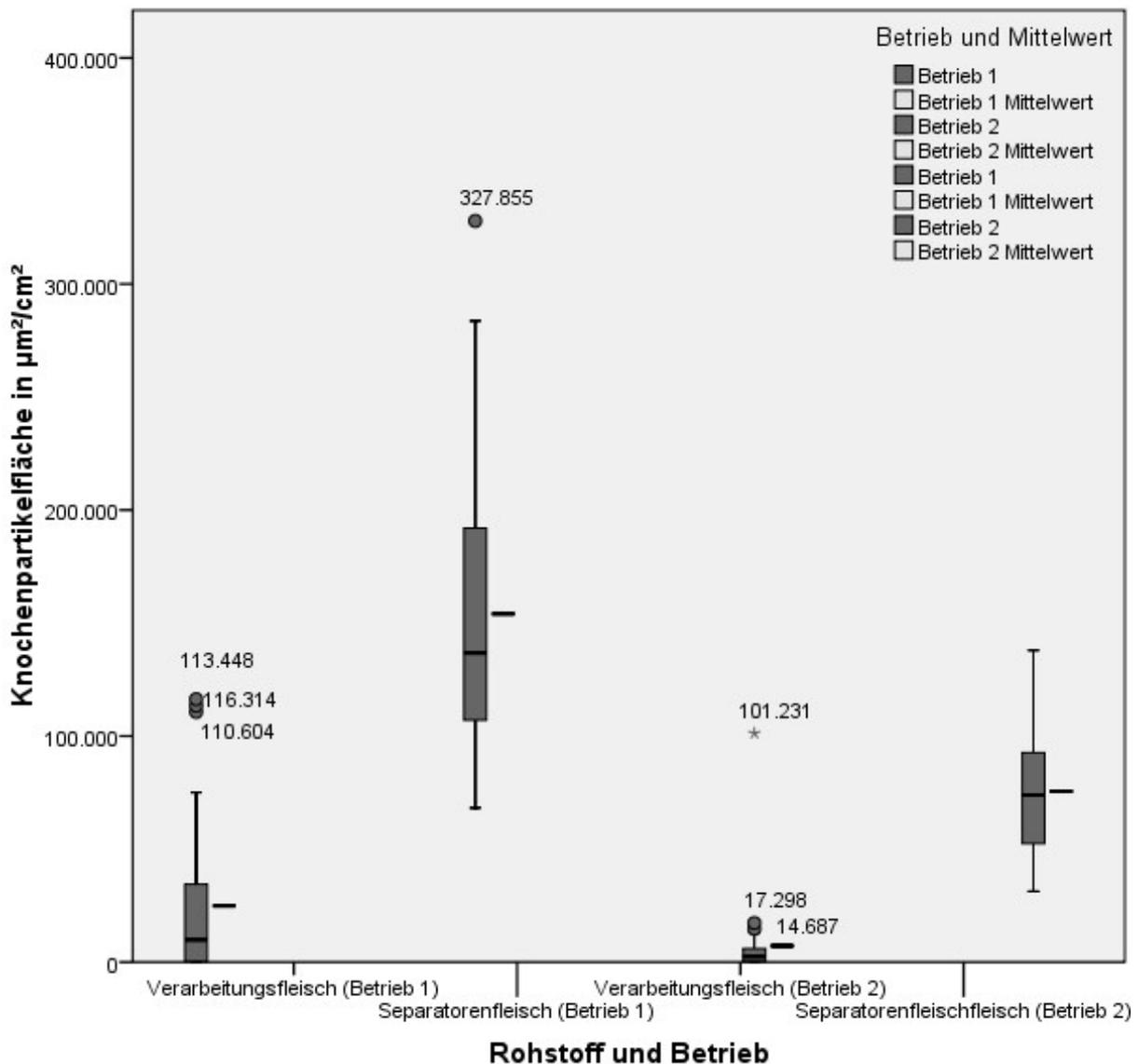


Abbildung 47 - Ermittelte Knochenpartikelflächen im Vergleich zwischen Betrieb 1 und Betrieb 2 im Material Verarbeitungsfleisch und Separatorenfleisch. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

Der Kalziumwert lag in Betrieb 1 bei 62 mg/kg, in Betrieb 2 bei 32 mg/kg im Material Verarbeitungsfleisch. Das Separatorenfleisch aus Betrieb 1 erreichte einen Kalziumwert von 560 mg/kg, dasjenige aus Betrieb 2 von 237 mg/kg.

4.2.2.2 Homogenität des Verarbeitungsfleisches innerhalb einer Arbeitswoche

Die Verarbeitungsfleischproben einer Arbeitswoche aus Betrieb 2 (s. Tabelle 3) zeigten unterschiedliche Knochenpartikelgehalte. Die Tagesmittelwerte aus 30 Schnitten pro Probe lagen zwischen 0,62 und 9,46 Knochenpartikeln/cm², der Mittelwert über alle Proben der Woche bei 3,73 Knochenpartikeln/cm².

Es ist erkennbar, dass je nach Charge sehr unterschiedliche Werte zustande kommen. So zeigt die erste Probe vom 12.02.2018 um 08:30 Uhr sehr geringe Werte mit geringer Streuung. Dagegen weist die Probe vom 16.02.2018 um 12:00 Uhr vergleichsweise hohe Werte mit einer großen Spannweite auf. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse vom 12.02.2018 um 12:30 Uhr, dass auch bei generell niedrigen Werten extreme Ausreißer auftreten können (s. Abbildung 48).

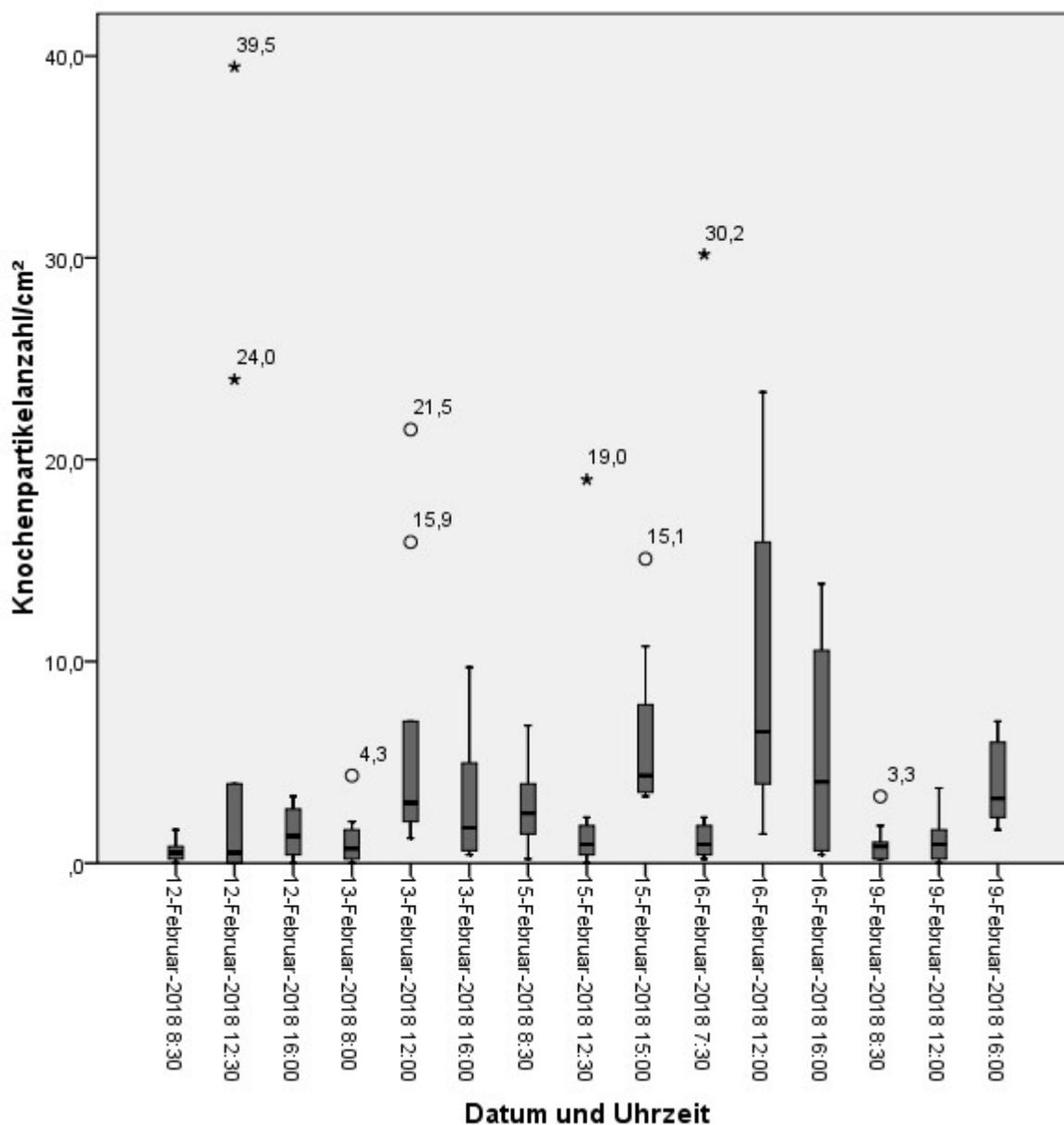


Abbildung 48 - Ermittelte Knochenpartikelanzahlen aus einer Arbeitswoche unter Verwendung verschiedener Mischungen aus Verarbeitungsfleisch. Auf die Illustration der arithmetischen Mittel wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Die Knochenpartikelfläche zeigt ähnliche Ergebnisse wie die Knochenpartikelanzahl. Im Chargenmittel wurden zwischen 394,12 und 18.261,57 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ nachgewiesen; der Gesamtdurchschnittswert lag bei 8.595,54 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ (s. Abbildung 49). Erneut zeigt die erste Probe vom 12.02.2018 um 08:30 Uhr die niedrigsten Werte, während die Probe vom 16.02.2018 um 12:00 Uhr die höchsten Werte aufwies. Der höchste Wert wurde in der Probe vom 12.02.2018 um 16:00 mit 70.971 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ gemessen.

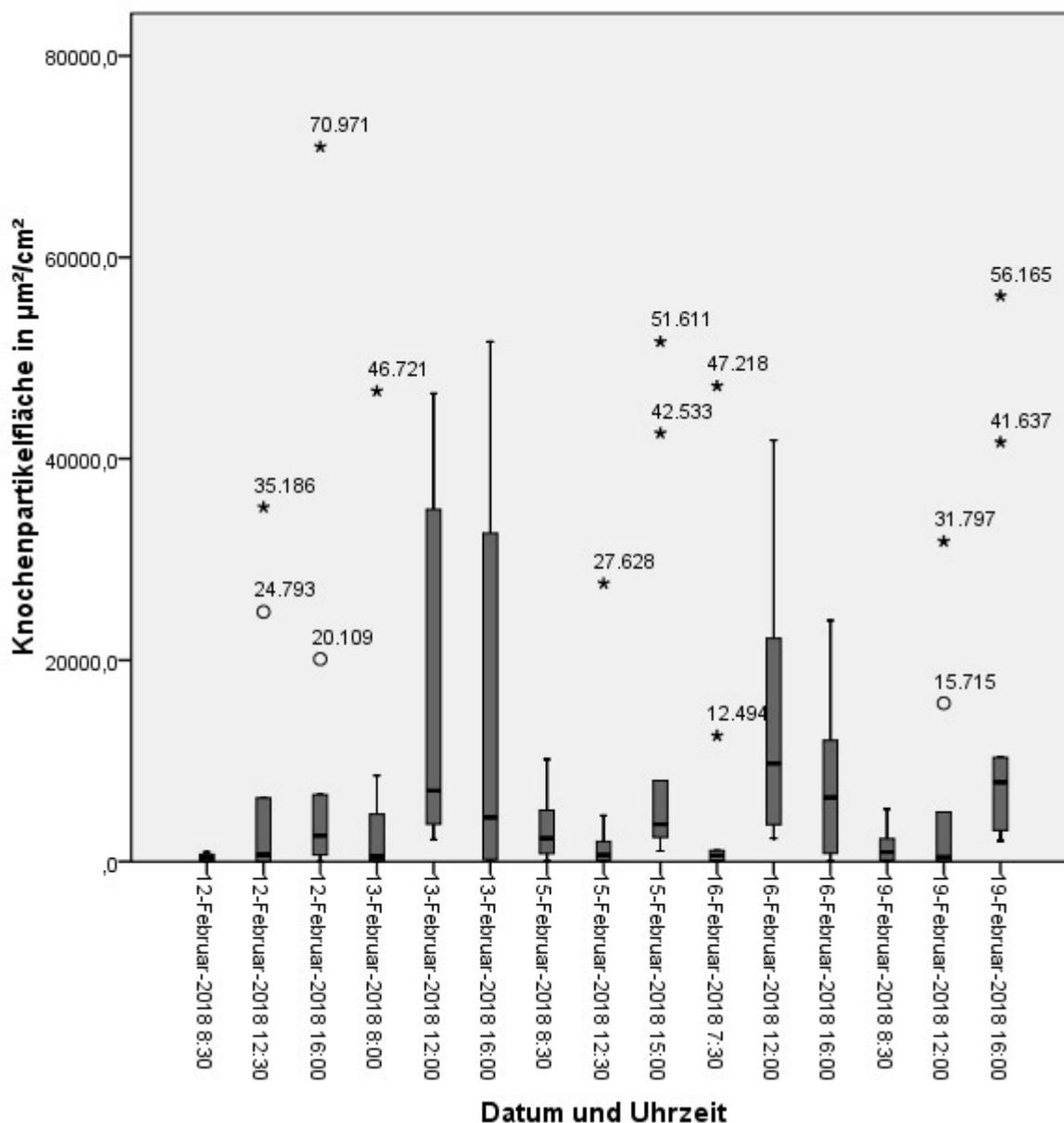


Abbildung 49 - Ermittelte Knochenpartikelflächen aus einer Arbeitswoche unter Verwendung verschiedener Mischungen aus Verarbeitungsfleisch. Auf die Illustration der arithmetischen Mittel wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Die Kalziumwerte lagen relativ einheitlich zwischen 25 und 35 mg/kg. Am 16. und 19.02.2018 waren jedoch auch Werte zwischen 55 und 85 mg/kg nachweisbar, so dass der Mittelwert aller Chargen bei 38,65 mg/kg lag (s. Abbildung 50).

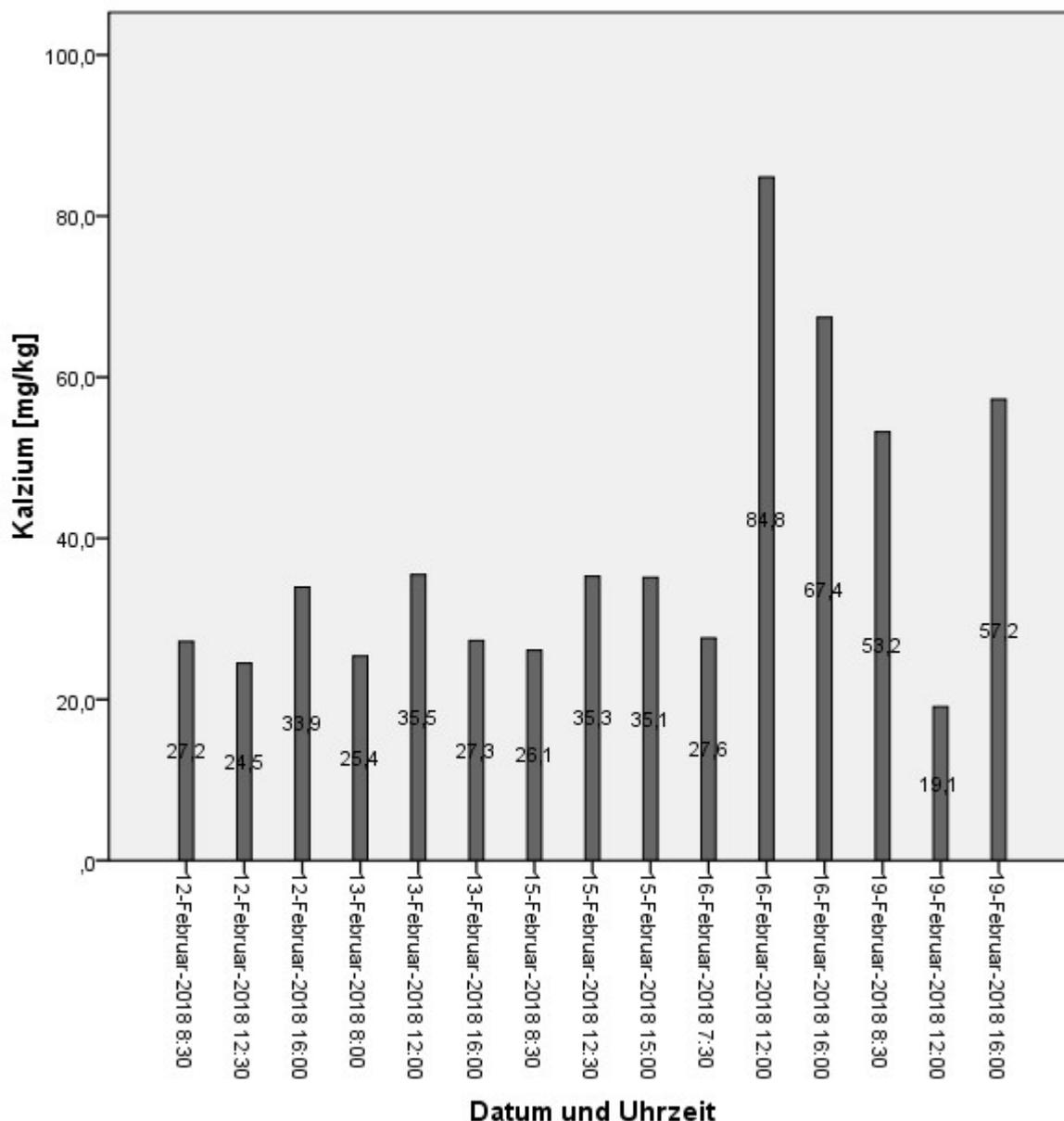


Abbildung 50 - Ermittelte Kalziumwerte aus einer Arbeitswoche unter Verwendung verschiedener Mischungen aus Verarbeitungsfleisch.

4.2.2.3 Schwankungen aufgrund des verarbeiteten Teilstückes

Bei der Berechnung der Ergebnisse der einzelnen Komponenten aus 4.2.2.2 ergaben sich für die Materialien Gabelbein, Filetabschnitte und Brustbeine verwertbare Werte, für die Materialien Schaberfleisch und Rücken lagen zu wenige Daten vor. Die Ergebnisse aus Tabelle 50 zeigten Knochenpartikelanzahlen von 1,06 Knochenpartikeln/cm² beim Gabelbeinmaterial. Bei den Filetabschnitten wurden bereits 5,41 Knochenpartikel/cm² und beim *Sternum* sogar 9,46 Knochenpartikel/cm² erreicht. Bei der Knochenpartikelfläche zeigte sich ein anderes Bild. Hier wurden beim Gabelbein 12.660,72 µm²/cm² erreicht, obwohl bei

den Filetab schnitten lediglich $4.695,81 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ an Knochenmaterial enthalten war. Die Brustbeine erreichten mit $12.290,71 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ einen ähnlich hohen Wert wie die Gabelbeine, allerdings bei höherer Knochenpartikelanzahl.

Die Kalziumwerte des Gabelbeinmaterials betragen 33, der Filetab schnitte 46 und des Brustbeins 35 mg/kg (Tabelle 50, Abbildung 51).

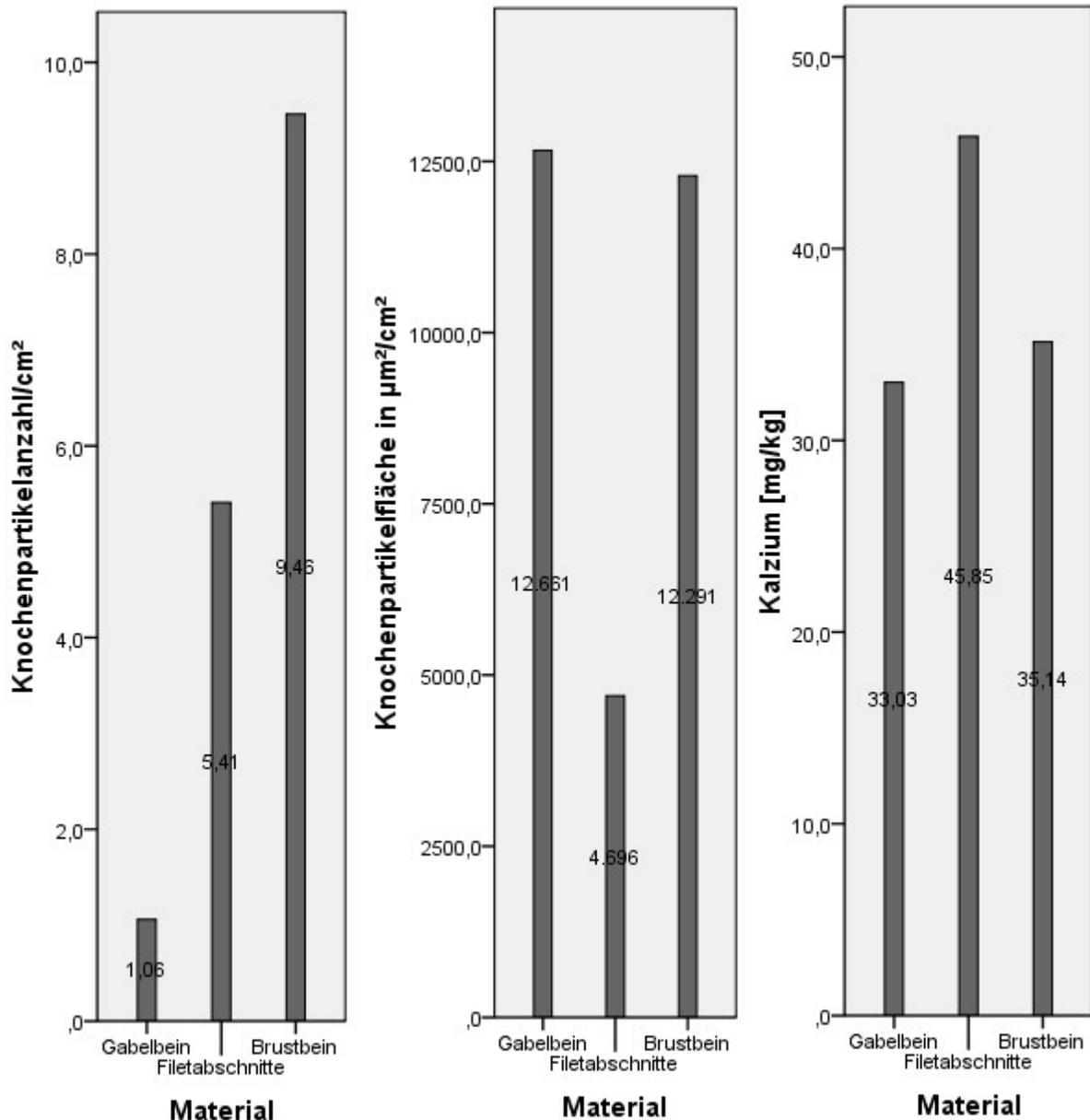


Abbildung 51 – Berechnungen der Einzelkomponenten der Verarbeitungsfleischmischungen. Ermittelte Knochenpartikelanzahlen (1), ermittelte Knochenpartikelflächen (2) und ermittelte Kalziumwerte (3).

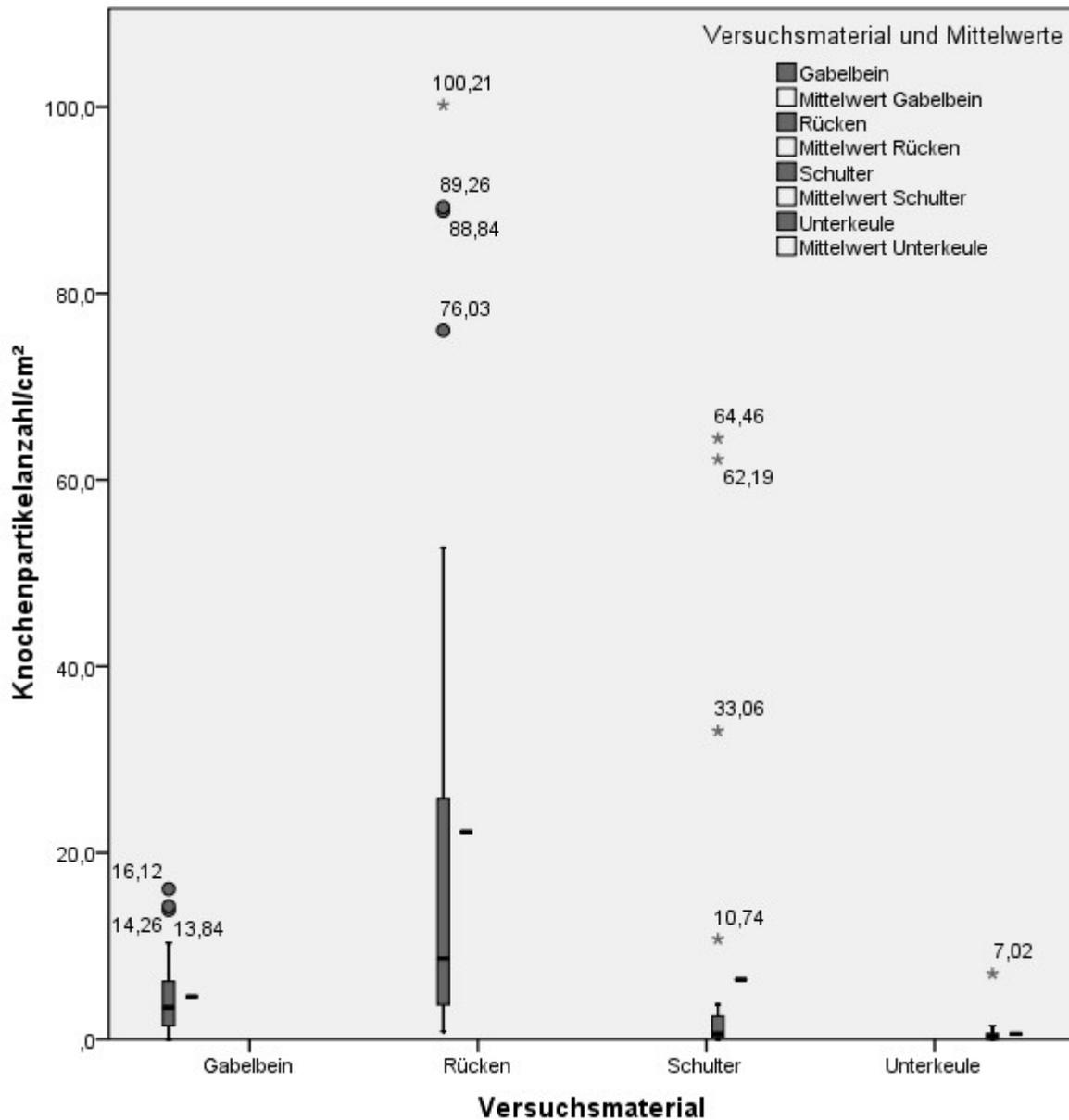


Abbildung 52 - Vergleich verschiedener Versuchsmaterialien aus einem Verarbeitungsbetrieb hinsichtlich der Knochenpartikelanzahl. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

Die Ergebnisse aus dem Verarbeitungsbetrieb zeigten hinsichtlich der Knochenpartikelanzahl beim Rohstoff Gabelbein einen Wert von 4,58 Knochenpartikeln/cm². Beim Rohstoff Rücken zeigte sich hingegen mit 22,25 Knochenpartikel/cm² ein deutlich höherer Wert.

Bei den Rohstoffen Schulter und Unterkeule wurden allgemein sehr niedrige Werte erzielt. Bei den Hähnchenschultern wurden 6,40 Knochenpartikel/cm² erreicht. Mit 0,59 Knochenpartikeln/cm² wurden aus allen Betriebsproben aus dem Material Hähnchenkeule die besten Ergebnisse erzielt (s. Abbildung 52).

Bei Betrachtung der Knochenpartikelfläche zeigte sich im Material Gabelbein gemessen an der Knochenpartikelanzahl ein hoher Wert, welcher bei $50.754,58 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ lag. Es sind zudem einige milde Ausreißer erkennbar und folglich eine Differenz zwischen arithmetischem Mittel und Median.

Die Rückenproben zeigen wiederum die höchsten Werte. Hier wurden $56.289,25 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ erreicht. Ebenfalls sind erneut viele Ausreißer zu verzeichnen und somit auch eine große Differenz zwischen arithmetischem Mittel und dem Median. Die Versuchsmaterialien Schulter und Unterkeule blieben entsprechend der Werte der Knochenpartikelanzahlergebnisse niedrig mit $13.135,26 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ und $669,03 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ (s. Abbildung 53).

Die Kalziumwerte betragen bei Gabelbein und Rücken $143,07 \text{ mg/kg}$ beziehungsweise $96,74 \text{ mg/kg}$. Die Werte von Schulter und Unterkeule blieben mit $46,35 \text{ mg/kg}$ und $16,97 \text{ mg/kg}$ auf einem niedrigen Niveau.

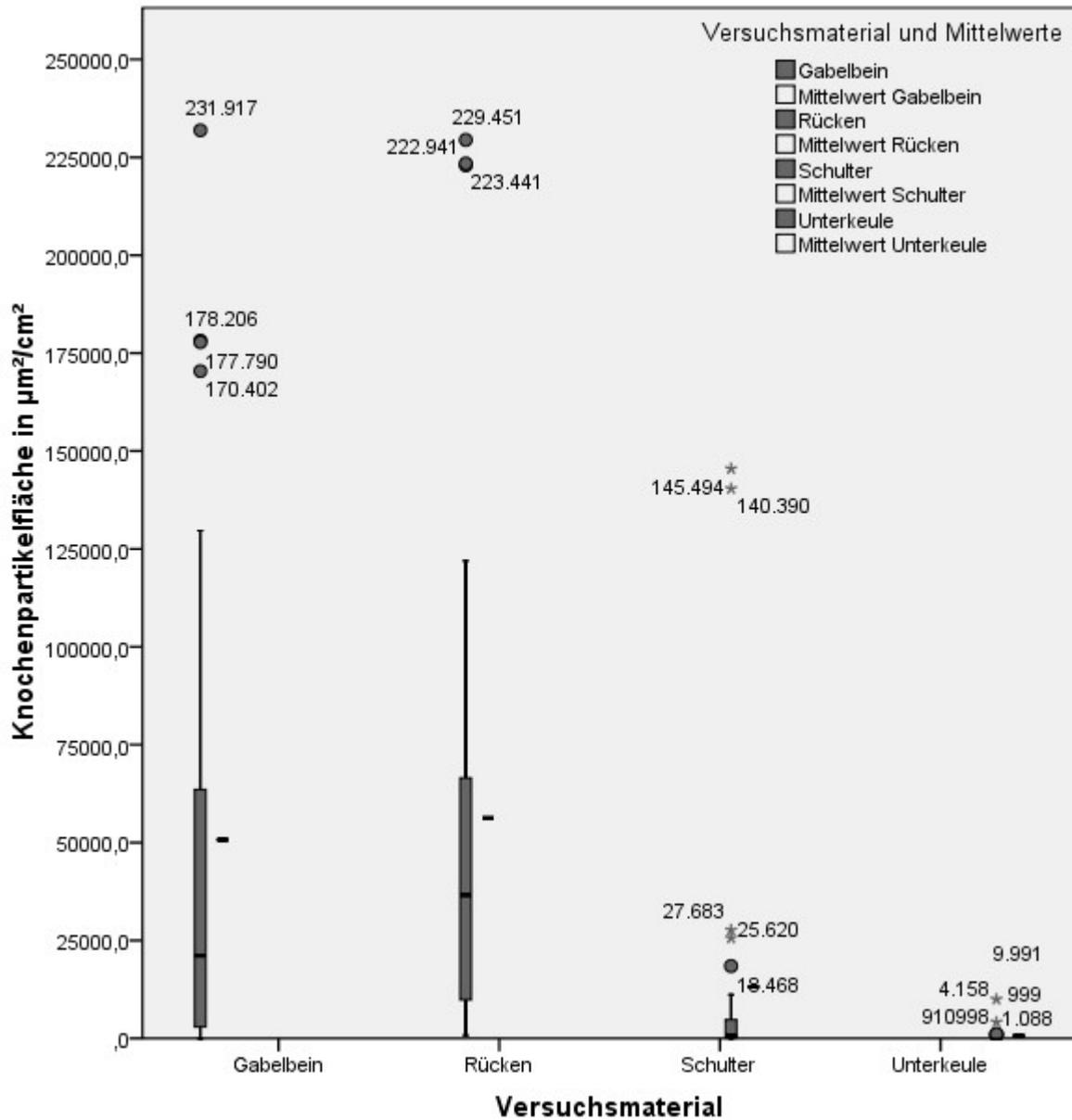


Abbildung 53 – Vergleich verschiedener Versuchsmaterialien aus einem Verarbeitungsbetrieb hinsichtlich der Knochenpartikelfläche. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

4.2.2.4 Schwankungen aufgrund des Anpressdruckes im Kolbenseparator

Dieser Versuch zeigte, dass es mit einer Erhöhung des Drucks beim Rohstoff 1. Flügelglied zu einer Erhöhung der Knochenpartikelanzahl pro Quadratzentimeter von 0,94 auf 5,74 kommt. Ähnliches war bei der Knochenpartikelmenge des Rohstoffes Mittelflügel zu sehen. Hier bewirkte eine Erhöhung des Druckes ebenfalls einen Anstieg der Knochenpartikelzahl

von 1,94 auf 4,79 Knochenpartikel/cm² (s. Abbildung 55). Damit liegt der Rohstoff 1. Flügelglied unter Anwendung von 40 bar im Bereich von Gabelbeinen aus dem vorausgegan-



Abbildung 54 - Knochenpartikelnest im Rohstoff Verarbeitungsfleisch aus dem Mittelflügel bei 40 bar Druck

genen Versuch, bei Erhöhung des Drucks auf 60 bar im Bereich von Filetabschnitten. Der Wert des Rohstoffes Mittelflügel bei 40 bar Druck war deutlich höher als der des Rohstoffes 1. Flügelglied. Bei diesen Proben traten zudem sehr viele Ausreißer auf, sowohl milde als auch extreme, die dazu führten, dass sich das arithmetische Mittel mitunter stark vom Median unterschied. Dies zeigte sich insbesondere bei den Proben, die unter 60 bar Druck gewonnen wurden.

Lediglich die Berücksichtigung des arithmetischen Mittels zeigte einen Anstieg der Knochenpartikelanzahl mit steigendem Druck. Die Verwendung des Medians lässt dies nicht zu.

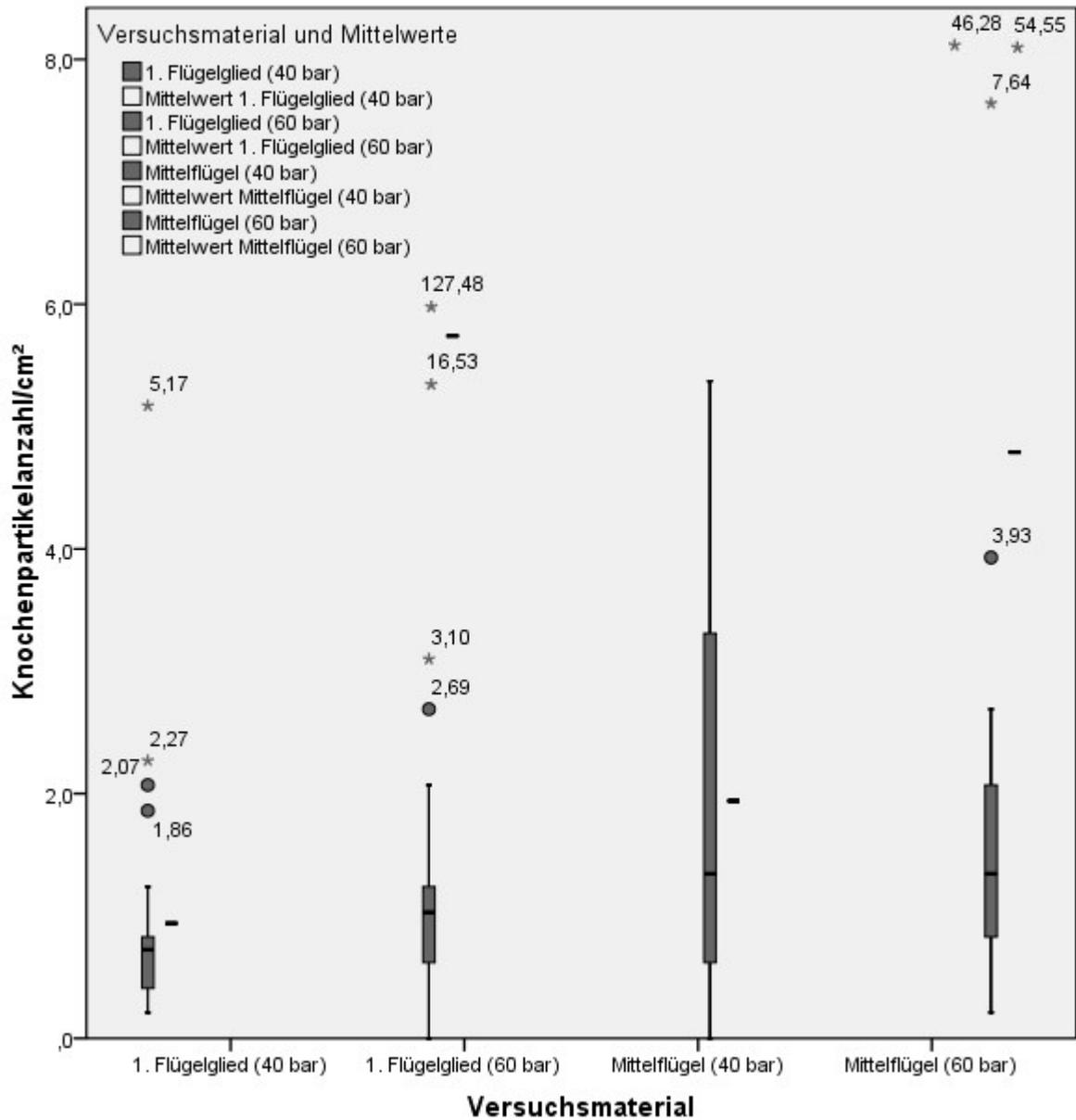


Abbildung 55 - Vergleich der Knochenpartikelanzahlen in den unterschiedlichen Materialien (nicht maßstabsgetreue Ausreißer zugunsten der Übersichtlichkeit: 1. Flügelglied (60 bar): 127,48 & Mittelflügel (60 bar): 46,28 und 54,55). Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

Die Ergebnisse der Knochenpartikelfläche entsprachen denjenigen für die Anzahl. Wurde der Rohstoff 1. Flügelglied verwendet, stellte sich bei einer Druckerhöhung analog eine Erhöhung der Knochenpartikelfläche von 1.454,45 auf 9.530,55 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ ein. Beim Rohstoff Mittelflügel stieg die Fläche von 3.036,73 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ bei 40 bar auf 6.245,53 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ bei 60 bar an (s. Abbildung 56).

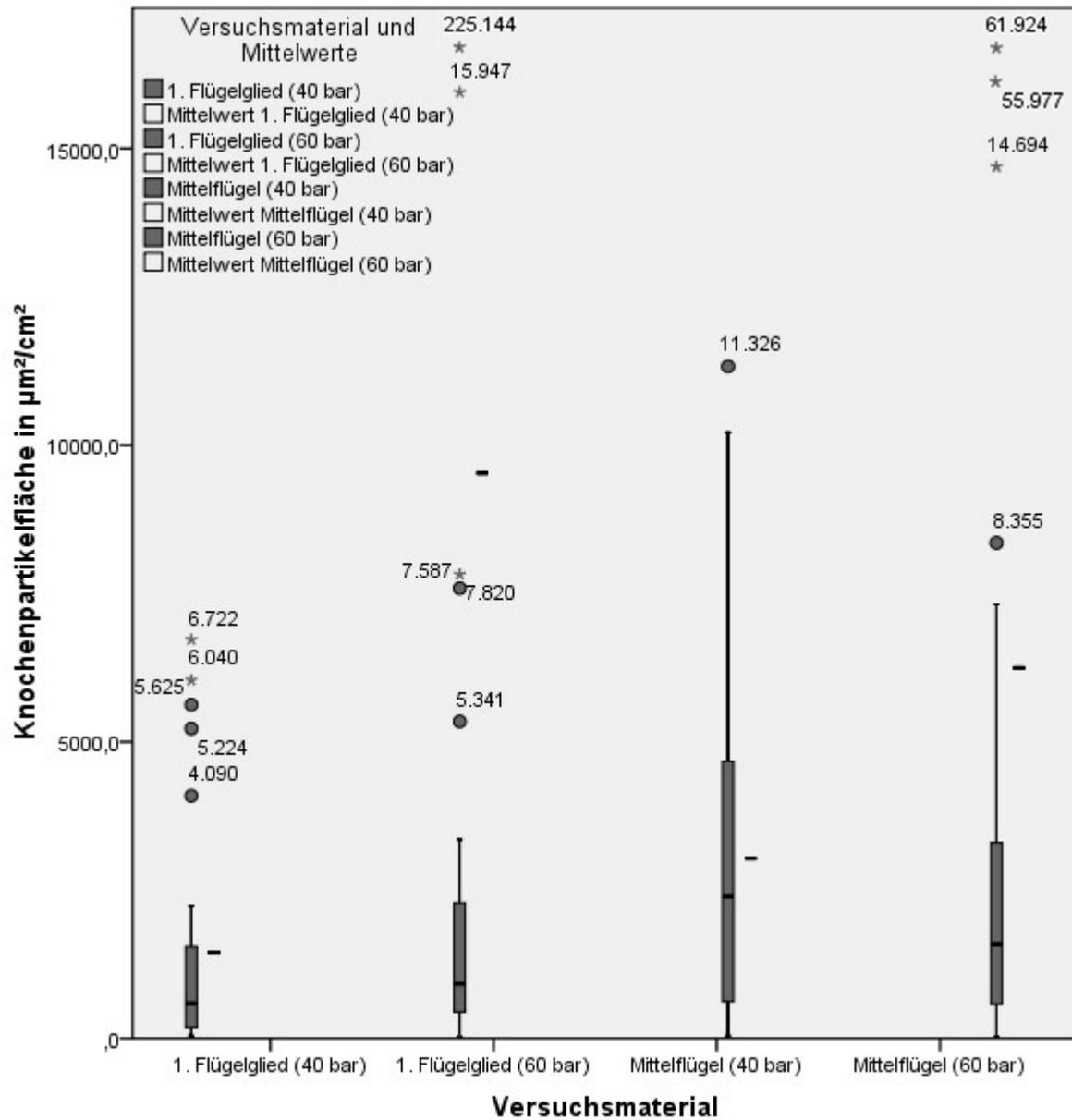


Abbildung 56 - Vergleich der Knochenpartikelfläche in den unterschiedlichen Materialien (nicht maßstabsgetreue Ausreißer zugunsten der Übersichtlichkeit: 1. Flügelglied (60 bar): 225.144 & Mittelflügel (60 bar): 55.977 und 61.924 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$). Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

Die Kalziumwerte zeigten ein einheitliches Bild im Bereich von 59 bis 77 mg/kg. Das Material 1. Flügelglied zeigte bei 40 bar Druckerhöhung einen Wert von 65 mg/kg und bei 60 bar einen Wert von 59 mg/kg. Im Material Mittelflügel war mit steigendem Druck von 40 auf 60 bar ein leichter Anstieg von 66 mg/kg auf 77 mg/kg zu verzeichnen.

4.2.2.5 Schwankungen aufgrund des Geschlechts bei Putenverarbeitungsfleisch

Die Verarbeitungsfleischproben von weiblicher und männlicher Pute zeigten bei der Knochenpartikelanzahl mit 0,98 und 0,93 Knochenpartikeln/cm² annähernd gleiche Werte (s. Abbildung 57). Auch die Schwankungsbreite war ähnlich.

Bei der Knochenpartikelfläche war hingegen ein Anstieg von 2.783,49 µm²/cm² bei der weiblichen Pute auf 4.241,21 µm²/cm² bei der männlichen Pute zu erkennen. Dieser Unterschied war beim Median nicht mehr vorhanden (s. Abbildung 57).

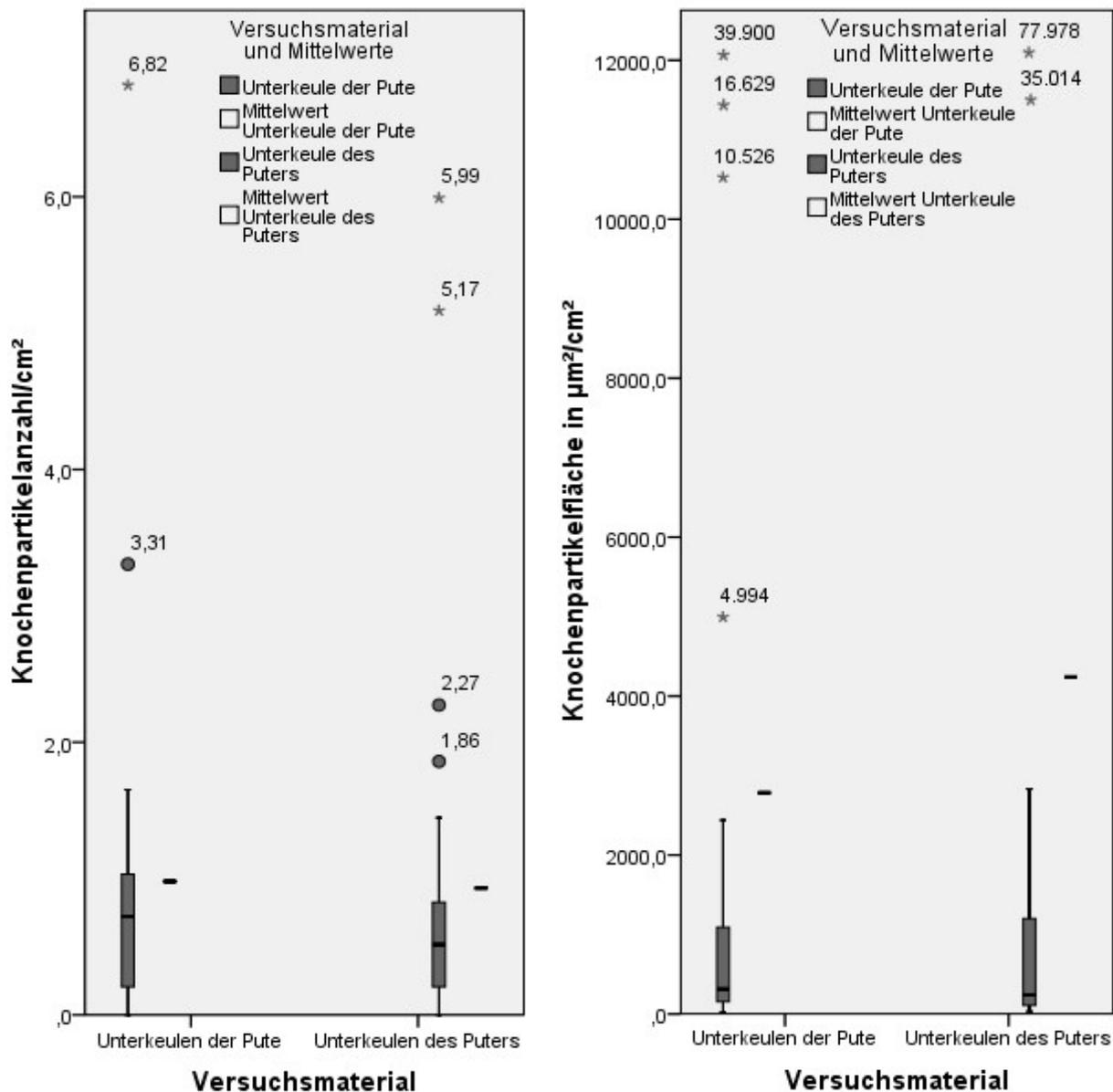


Abbildung 57 - Vergleich der Knochenpartikelanzahlen und der Knochenpartikelflächen in Putenverarbeitungsfleisch von weiblichen und männlichen Puten (nicht maßstabsgetreue Ausreißer bei der Knochenpartikelfläche: Unterkeulen der weiblichen Pute: 16.629 µm²/cm² und 39.900 µm²/cm² sowie bei den Unterkeulen der männlichen Pute: 35.014 µm²/cm² und 77.978 µm²/cm²). Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.

Die Auswertung der Kalziumergebnisse zeichnete ein ähnliches Bild. Hier wurden bei der weiblichen Pute mit 46,51 mg/kg etwas höhere Kalziumwerte nachgewiesen als bei der männlichen Pute (42,13 mg/kg).

5 Diskussion

5.1 Aussagekraft der histologischen Methode

Branscheid et al. (2007) und Branscheid et al. (2009) halten die histologische Methode für die Identifizierung von Knochengewebe für unverzichtbar, da sie ähnlich wie die Verdauungsmethode (Negatu, 2005; Upmann & Lade, 2015) einen direkten Nachweis von Knochengewebspartikeln ermöglicht (Hildebrandt et al., 2006). Auf der anderen Seite kann das Ergebnis durch das analytische Vorgehen beeinflusst werden. Färbungen weisen beispielsweise unterschiedliche Eigenschaften auf, die sich auf die Ergebnisse auswirken und teilweise zu starken Diskrepanzen führen (Puchtler et al., 1969).

Eine unterschiedliche Sensitivität des Kalziumnachweises führt zur Verschiebung der gefärbten Grenzgebiete zwischen Knochen und Sehnen. Da diese Übergangszonen von Sehnenansätzen nach Benjamin et al. (1986) oft kalzifiziert sind, kann die Grenze je nach Färbung entweder mehr zum Knochen oder mehr zur Sehne hin verschoben sein (Fechner et al., 2017). Dementsprechend sind fortlaufend Maßnahmen erforderlich, um eine hohe Qualität der histologischen Untersuchungsmethode zu gewährleisten (Schering, 2015).

Für den histologischen Knochenpartikelnachweis spielt die Zählweise der Partikel eine zentrale Rolle. Bis heute wird darüber diskutiert, wann von einem oder mehreren Knochenpartikeln gesprochen werden kann, wenn diese im histologischen Bild eng benachbart auftreten (Langen & Horn, 2020).

Ferner wird die Mindestgröße eines Knochenpartikels für die Zählung unterschiedlich bewertet. Häufig wird eine Mindestgröße von 50 μm einer Seite des Knochenpartikels verwendet und anhand von Bruchkanten subjektiv verschiedene Knochenpartikel zu einem einzigen zusammengefasst und gezählt (Bijker et al., 1985; Schulte-Sutrum & Horn, 2003). Neuere Vorschläge befürworten eine Mindestgröße von 10 μm und zählen alle Knochenpartikel innerhalb eines Kreises von 250 μm Durchmesser als einen Knochenpartikel ungeachtet etwaiger Bruchkanten (Lohneis, 2014). Nach Hildebrandt et al. (2006) wirkt eine solche Mindestgröße, insbesondere im Hinblick auf ihre Eindimensionalität, allerdings sehr willkürlich.

In den vorliegenden Versuchen wurde zur Zählung der Knochenpartikel eine Mindestgröße von 100 μm^2 verlangt. Darüber hinaus wurden alle Knochenpartikel, welche eine Zusammenhangstrennung aufwiesen, auch als einzelne Knochenpartikel gezählt und die Anzahl der ermittelten Knochenpartikel in Relation zur Fläche des Schnittes gebracht. Ferner wurde wie in 3.3.1.3 beschrieben die gemessene Knochenpartikelfläche in Bezug zu 4,84 cm^2 , also der ursprünglich ausgestanzten Fläche, gesetzt und der Knochenpartikelgehalt planimetrisch ermittelt. Diese Bezugsgröße hat den Vorteil, dass viele volumenrelevante

Einflüsse, die auf die Weichgewebe der Probe im Verlauf der Probenbearbeitung einwirken, bedeutungslos werden. Solche Einflüsse entstehen durch Stauchung während des Schneidens, Schrumpfungen durch Entwässerung während der Färbung oder durch das Herauslösen von Probenbestandteilen oder Fettauswaschungen. Proben, die viel Fett beinhalten oder im Verlauf der Bearbeitung stark schrumpfen, können so irrtümlicherweise als knochenpartikelreicher erscheinen, als dies tatsächlich der Fall ist. Somit wurden die Parameter Knochenpartikel/cm² und Knochenpartikelgehalt in µm²/cm² beziehungsweise in Prozent zur Auswertung herangezogen.

Von Upmann und Lade (2015) wurde diskutiert, ob das Zählen der Partikel letztendlich durch die beschriebene Planimetrie abgelöst werden sollte.

5.1.1 Eigenschaften der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Calleja im Vergleich

Die Untersuchungen der Kontrastwerte der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Calleja zeigen, dass die Silbernitratimprägnierung den größten Kontrast erreicht. Die Ergebnisse wurden mit der Michelson-Gleichung ermittelt, so dass „0“ für den geringsten und „1“ für den höchsten Kontrast steht (Peli, 1990). Die Silbernitratimprägnierung in der angewandten Modifikation färbt Knochen annähernd schwarz, während der Hintergrund annähernd ungefärbt verbleibt (Mulisch & Welsch, 2015). Somit ist der berechnete Kontrastwert von 0,96 eng am maximalen Kontrast von schwarz zu weiß verortet. Eine Detektion des Zielgewebes, also in diesem Fall des Knochengewebes, ist daher mit einem einzigen Parameter möglich und ausreichend. So kann eine verlässliche Differenzierung zwischen Zielgewebe und Hintergrund gewährleistet werden. Diese Färbung besitzt nach Hildebrandt et al. (2006) zudem eine geringere Neigung zur Artefaktbildung, ist jedoch zeitaufwändiger als die beiden anderen Färbungen. Die Silbernitratimprägnierung eignet sich folglich ideal für eine automatische Bildanalyse, was auch durch andere Autoren festgestellt wurde (Hildebrandt & Hirst, 1985; Hildebrandt et al., 2006).

Die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra erreicht lediglich einen Kontrast von 0,17. Sie eignet sich somit aufgrund ihrer Lage nahe am Kontrastwert 0 wenig für eine softwarebasierte Auswertung auf Basis des Kontrastes. Dennoch wird diese Färbung von vielen Autoren verwendet (Tremlová et al., 2006; Nagy et al., 2007), teilweise auch zur softwarebasierten Auswertung (Tremlová & Starha, 2003; Josefowitz et al., 2006). Aufgrund ihrer sehr guten selektiven Färbung von Knochenpartikeln ist sie wie die Silbernitratimprägnierung in der amtlichen Untersuchungsvorschrift nach L 6.00-13, § 64 LFGB enthalten (LFGB; Mulisch & Welsch, 2015). Eine softwarebasierte Auswertung ist mit dieser Färbung möglich, aber aufwändiger und fehleranfälliger, da mehrere Parameter eingestellt

werden müssen und auch mehrere Schwellenwerte zur Anwendung kommen. Diese Methodik wird zwar von Grünewald und Kießling (2017) mit eigenen Schnitten erfolgreich angewendet, birgt aber durch die Anwendung mehrerer Schwellenwerte die Gefahr, dass diese individuell auf die eigenen Schnitte adaptiert sind. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Farbabweichungen oder andernorts gefärbte Schnitte zu anderen Ergebnissen führen. Zudem führt das Auftreten von Farbschleiern bei dieser Vorgehensweise zur Überschätzung des Knochenpartikelgehaltes, da diese als Knochenpartikelfläche fehlinterpretiert werden können. Um diese Einflüsse näher zu untersuchen und um die Aussagekraft dieser Ergebnisse bewerten zu können, ist die Durchführung eines Ringversuchs notwendig.

Im Gegensatz dazu lässt sich bei der Färbung nach Calleja zwar ein moderater Kontrastwert von 0,44 feststellen, allerdings färben sich sowohl Knochen als auch Knorpel und Bindegewebe blau, so dass diese Färbung keine Unterscheidung zwischen diesen Geweben anhand der Farbe zulässt (Calleja, 1897; Lerche et al., 1957; Hildebrandt et al., 2006; Mulisch & Welsch, 2015). Eine Differenzierung ist zwar anhand der Gewebestruktur möglich, diese kann jedoch für eine softwaregestützte, automatisierte Auswertung nur unter erheblichem Aufwand, teilweise auch gar nicht, umgesetzt werden. Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Färbungen ist die Färbung nach Calleja folglich als ungeeignet für den softwarebasierten Knochennachweis einzustufen.

In der Anwendung zeigen die Silbernitratimprägnierung und die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra bei der Vergleichsuntersuchung zwischen Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz, Geflügelbrühwurst und Geflügelbratrolle je nach Material sehr unterschiedliche Knochenpartikelanzahlen. Mit der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra wurden in der Hähnchenhackfleischprobe mit 0,1% Knochenpartikelzusatz sehr geringe Werte von 0,4 Knochenpartikeln/cm² festgestellt. Zudem sind in 3 Schnitten gar keine Knochenpartikel nachweisbar, womit nach L 06.00-13 der amtlichen Methodensammlung nach § 64 LFGB von einem vereinzelt Auftreten gesprochen werden kann (Schulte-Sutrum & Horn, 2003). Die Silbernitratimprägnierung weist dagegen deutlich höhere Anzahlen von 4,4 Knochenpartikeln/cm² nach.

Bei Betrachtung der Knochenpartikelfläche und dem daraus resultierenden Knochenpartikelgehalt ergibt sich ein ähnliches Verhältnis. Hier werden mit der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra umgerechnet ein mittlerer Wert von 0,0006% und mit der Silbernitratimprägnierung ein mittlerer Wert von 0,0035% ermittelt. Mit der Calleja-Färbung fanden andere Autoren in Hackfleisch vom Rind 0,018% und in Hackepeter sowie Schabefleisch gar keine Knochenpartikel (Hildebrandt et al., 1974; Josefowitz, 2008). Dabei wurde allerdings die Point-Count-Zählung verwendet. Bei diesem Vorgehen wird ein virtuelles Punkteraster auf den Schnitt übertragen. Die gleichmäßig angeordneten Punkte markieren das darunterliegende Gewebe, welches daraufhin einer Bewertung unterzogen wird (Beneke,

2018). Folglich können mit dieser Methode nur Knochenpartikel nachgewiesen werden, welche sich zufällig direkt unterhalb eines solchen Punktes befinden. Daher überrascht es nicht, dass entweder höhere Werte oder gar keine Knochenpartikel bei der Untersuchung festgestellt wurden: Die Wahrscheinlichkeit einen Knochenpartikel zu verpassen ist bei dieser Vorgehensweise relativ hoch, auf der anderen Seite sorgt ein zufälliger Treffer bei nicht hinreichend vielen untersuchten Rasterpunkten für eine Überschätzung der Werte. Ein Gehalt von 0,001% und darunter wäre mit dieser Zählweise mit einem immensen Zeitaufwand verbunden, da aufgrund des geringen Gehaltes ein sehr engmaschiges Punktegitter ausgezählt werden müsste. Dennoch bewegen sich diese Werte grundsätzlich in dem Spektrum, welches auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde.

Die Probe Geflügelbrühwurst zeigte in der eigenen Untersuchung durch die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra ein arithmetisches Mittel von 3,4 Knochenpartikeln/cm², während die Silbernitratimprägnierung mit mittleren 69,1 Knochenpartikeln/cm² deutlich höher lag. Otto-Kuhn und Stürmer (2017) stellten bei ihren Geflügelbrühwurstproben mit und ohne deklariertem Separatorenfleischanteile Werte von 0,15 bis 4,71 Knochenpartikeln/cm² fest. Sie verwendeten hierfür Calleja-gefärbte Schnitte und zählten mit Hilfe des Lohneis'schen Zählsystems (Lohneis, 2014). Da bei diesem System alle Knochenpartikel innerhalb eines Radius von 250 µm als ein einziger Knochenpartikel gezählt werden, ergibt sich daraus zwangsläufig eine geringere Anzahl als bei direkter Partikelzählung. Jedoch wurde hier ebenfalls ab einer Mindestgröße von 10 µm gezählt. Andere Autoren fanden mit Hilfe der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra in Geflügelerzeugnissen 0,25 bis 2,25 Knochenpartikel/cm² (Tremlová, 2000) und in verschiedenen Brühwürsten 0,00 bis 14,85 Knochenpartikel/cm² (Pospiech et al., 2013).

Die Ergebnisse hinsichtlich der Knochenpartikelfläche bzw. der Knochenpartikelgehalte aus 4.1.1 fielen ähnlich aus wie die der Knochenpartikelanzahl. Ein Wert von 0,017% wurde durch die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra erreicht und 0,031% durch die Silbernitratimprägnierung. Otto-Kuhn und Stürmer (2016) stellten mittels Point-Count-Verfahren 0,0 bis 1,25% in Brühwurstproben fest. Wiederum tritt hier die Problematik der Point-Count-Methode zu Tage, da zwar in jeder Probe durch Planimetrie Knochenpartikel gefunden wurden, jedoch mit der Point-Count-Methode in zwei Proben gar keine Knochenpartikel nachgewiesen werden konnten. Tremlová und Starha (2003) stellten in Geflügelbrühwurst, Geflügelsalami und Geflügelhackfleisch Knochenpartikelgehalte von 0,28 bis 5,32% fest. Allerdings beschreiben die Autoren diese Ergebnisse als außergewöhnlich hoch.

Eine ägyptische Arbeitsgruppe fand in Brühwürsten vom Rind mit der Hämalaun-Eosin-Färbung, welche sich nach Symonds (1990) für den Knochennachweis nicht besonders gut eignet, sowie mit der Trichrom-Blau-Färbung einen Knochenpartikelgehalt von 0,15% (Mohamed et al., 2016).

Ältere Literatur beschreibt Schweinebauch mit 0,03% (Linke & Thumser, 1964) und Geflügelwürste sogar mit 0,44% Knochenpartikelgehalt (Kratz, 1971).

Von solch hohen Gehalten war von den eigenen Untersuchungen selbst die Geflügelbratrolle mit einem deklarierten Separatorenfleischanteil von 70% weit entfernt. Diese Probe erreichte eine Knochenpartikelanzahl mit der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra von mittleren 3,4 und mit der Silbernitratimprägning ein arithmetisches Mittel von 69,1 Knochenpartikel/cm² und Knochenpartikelgehalte von 0,077% bzw. 0,172%.

Generell fiel auf, dass durch die Silbernitratimprägning deutlich mehr Knochenpartikel nachgewiesen werden. Als Ursache sind folgende Szenarien vorstellbar: Einerseits könnte die Silbernitratimprägning eine deutlich höhere Sensitivität aufweisen und so deutlich mehr Knochenpartikel nachweisen. Andererseits könnte sie zu falsch positiven Ergebnissen führen und demnach eine niedrige Spezifität aufweisen; eine Kombination beider Faktoren ist ebenfalls vorstellbar. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse weisen vor allem auf eine höhere Sensitivität hin (Horn & Langen, 2020). Diese wurde bereits im Zusammenhang mit Sehnenansätzen am Knochen beschrieben, welche in der sogenannten Übergangszone oft kalzifiziert sind (Benjamin et al., 1986). Nach Fechner et al. (2017) ist hier die Knorpel-Knochen Grenze bei der Silbernitratimprägning deutlich stärker in Richtung des Knorpels verschoben (Fechner et al., 2017).

Bei der Betrachtung der einzelnen Größen der Knochenpartikel zeigte sich, dass die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra primär größere Partikel nachweist, während die Silbernitratimprägning auch hohe Anteile an kleinsten Partikeln detektiert.

Im Vergleich zu den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren ist darauf hinzuweisen, dass trotz der insgesamt hohen Knochenpartikelanzahlen in den eigenen Versuchen deutlich geringere Knochenpartikelgehalte als in anderen Studien nachgewiesen wurden. Dies liegt zum einen an der hier angewandten Mindestgröße der Knochenpartikel von 100 µm² (10 µm x 10 µm), wie sie auch andere Autoren vorschlagen (Lohneis, 2014; Otto-Kuhn & Stürmer, 2016), zum anderen auch an der Zählweise. Während die eigenen Untersuchungen die ausgestanzte Fläche des histologischen Schnittes als Bezugsgröße berücksichtigen, wird in anderen Studien das Point-Count-Verfahren verwendet. Hierbei wird die Anzahl an Brät- oder Muskelgewebetreffern ermittelt und histologische Leerstellen herausgerechnet. Dies führt dazu, dass die Bezugsgröße für die Berechnung des Knochenpartikelgehaltes sinkt und somit ein relativ höherer Knochenpartikelgehalt entsteht. Aus der Verwendung der ausgestanzten Fläche als Bezugsgröße in den eigenen Untersuchungen resultiert im Vergleich dazu ein geringerer Knochenpartikelgehalt.

5.1.2 Präzision

Die Untersuchung von 108 Proben Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzugabe (s. Tabelle 1) zeigt die große Breite an verschiedenen Ergebnissen, die trotz des Einsatzes von Proben mit dem gleichen Anteil an zugesetzten Knochenpartikeln zustande kommen. Die große Streuung der Ergebnisse mit der angewendeten Silbernitratimprägnierung ist folgendermaßen zu bewerten: Es liegen einige wenige sehr extreme Ausreißer vor. Diese sind allerdings nicht als Ausreißer im Sinne von Messfehlern zu verstehen, da die Existenz der gemessenen Knochenpartikel durch den direkten histologischen Nachweis erfolgt (Hildebrandt et al., 2006). Sie stellen vielmehr ein Knochenpartikelnest dar, welches zur Ermittlung des korrekten Knochenpartikelgehaltes sehr wichtig ist, da es die Werte enorm beeinflusst. Der Ausschluss dieser Knochenpartikelnester führt zu einer starken Unterschätzung des realen Knochenpartikelgehaltes, da diese einen großen Anteil am Knochenpartikelgehalt ausmachen können. Deshalb ist es umso wichtiger solche Knochenpartikelnester zu identifizieren.

Die vorgenommenen Messungen zeigen, dass eine Schnittanzahl von 6 Schnitten, wie sie von der amtlichen Methode empfohlen wird (L 6.00-13, § 64, LFGB), zum Auffinden und Identifizieren solcher Nester nicht ausreicht. 6 Schnitte identifizieren einen Ausreißer anhand der eigenen Versuchsergebnisse (s. 4.1.2) in deutlich weniger als 50% der Fälle. Eine Anzahl von 30 Schnitten vermag dies mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90% erheblich besser.

Zudem sorgt dieser Schnittumfang dafür, dass geringere Schwankungen um den wahren Wert auftreten und so die Messung präziser wird. Der Test auf Normalverteilung fällt negativ aus, so dass statistische Prognosen zur Ermittlung des idealen Stichprobenumfangs sehr schwierig sind. Erst ein Logarithmieren der Werte lässt normalverteilte Werte entstehen. Auf dieser Grundlage lässt sich ein Konfidenzintervall auf der Basis von 6 und von 30 Schnitten ermitteln, welches erneut zeigt, dass die Schwankung bei 6 Schnitten sehr hoch ist, während sich die Schwankungen bei 30 Schnitten auf ein akzeptables Maß verringert und sich die Abweichung vom wahren Wert deutlich minimiert (s. Tabelle 13).

5.1.3 Richtigkeit der Methodik des Knochenpartikelnachweises durch Silbernitratimprägnierung

5.1.3.1 Größenverteilung nachgewiesener Knochenpartikel

Die Verteilung der einzelnen Knochenpartikel nach Größe zeigt, dass die Silbernitratimprägnierung prozentual mehr kleinere, die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra mehr von den größeren Knochenpartikeln nachweist. Gleichzeitig detektiert die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra in ihrer Gesamtzahl deutlich weniger Partikel als die Silbernitratimprägnierung.

Dieser Effekt tritt in Abhängigkeit vom untersuchten Produkt unterschiedlich stark in Erscheinung: Bei Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz ist er bereits ausgeprägt, verstärkt sich in der Geflügelbrühwurst und ist bei der Geflügelbratrolle um ein Vielfaches stärker. Somit kann geschlossen werden, dass durch die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra umso mehr kleine Knochenpartikel undetektiert bleiben je größer die Anzahl an Knochenpartikeln in einem Schnitt ist. Dies wird zudem dadurch untermauert, dass sich zwischen den beiden Färbungen die Differenz im Knochenpartikelgehalt mit steigendem Knochenpartikelgehalt verringert (s. Abbildung 20). Das ist dadurch zu erklären, dass bei zunehmender Anzahl von Knochenpartikeln der Anteil größerer Partikel zunimmt, welcher problemlos von der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra detektiert wird.

Die Größenverteilung von Knochenpartikeln wurde auch von anderen Autoren untersucht. Deren Ergebnisse lassen sich am besten mit denen aus dem Material Geflügelbratrolle vergleichen, da dieses einen hohen Anteil an deklarierbarem Separatorenfleisch aufweist. Die festgestellten Spannweiten von 103,6 bis 503.952,7 μm^2 (Silbernitratimprägnierung) beziehungsweise 166,2 bis 785.934,9 μm^2 (Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra) fallen jedoch teilweise deutlich höher aus als die Ergebnisse von Königsmann et al. (1980), welche 42 bis 3.632 μm^2 Knochenpartikelgehalt feststellten. Bei grober Umrechnung in einen Durchmesser durch Ziehen der Wurzel, also 10,2 bis 709,9 μm (Silbernitratimprägnierung) beziehungsweise 12,9 bis 886,5 μm (Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra) lassen sich die Werte auch mit den Ergebnissen weiterer Autoren vergleichen: In Separatorenfleisch stellten Linke et al. (1974) Durchmesser von 19 und 2.173 μm , Winter (1978) zwischen 163 bis 262 μm und Field et al. (1977) aus einem Beehive-Separator mit 0,46 mm Lochdurchmesser zwischen 10 und 450 μm Knochenpartikeldurchmesser fest.

Zu beachten ist, dass die Größe der Knochenpartikel nach Field et al. (1977) und Sams (2001) maßgeblich durch die Lochgröße der Trommel bestimmt wird. Die Reduktion der Porengröße eines dem Separator nachgeschalteten Filters von 1,1 mm auf 0,6 mm führte bei Untersuchungen von Baum et al. (1980) zu einer durchschnittlichen Reduktion der Knochenpartikelgrößen von 750 auf 260 μm in ihrer größten Dimension, beziehungsweise von

50 auf 42 μm im Durchmesser. Viele Separatoren arbeiten jedoch mit größeren Lochdurchmessern von zumeist 3 mm, so dass sich bei Untersuchungen von Bijker et al. (1983) in Separatorenfleisch 90,6% der Knochenpartikel in die Größekategorie 100 bis 1000 μm , bezogen auf die größte Dimension des Knochenpartikels, einordnen lassen. Auch Koolmees (1986) stellte in seinen Untersuchungen fest, dass 84,8 bis 97,5% der Knochenpartikel kleiner als 1000 μm waren. Dies entspricht weitgehend den eigenen Ergebnissen. Die Vergleichbarkeit ist allerdings eingeschränkt, da bei Bijker et al. (1983) die Methode nach Hill und Hites (1968), also eine Digestionsmethode mit Papain und Tetrachlorkohlenstoff zur Auftrennung verwendet wurde. Froning (1981) fand in Hühnerrücken und Halsfleisch Werte von 80 bis 1500 μm , wobei auch hier ein Großteil der Partikel kleiner als 0,5 mm waren. Nach Nitsch (2005) beeinflusst auch der angewendete Druck die Größe der Partikel. Er stellte in seinen Versuchen fest, dass niedrigere Drücke tendenziell eher zu größeren Partikeln führen und umgekehrt. In den USA wird seitens der Legislative direkt auf die Größe der Knochenpartikel eingegangen und festgelegt, dass mindestens 98% der Knochenpartikel in Separatorenfleisch in ihrer größten Dimension kleiner als 500 μm sein sollen. Gleichzeitig darf kein Partikel größer sein als 850 μm (FDA, 2013).

5.1.3.2 Berechnung der Dichte und Korrelation mit histologischen Ergebnissen

Die Ergebnisse der Dichtemessung von 1,31 bis 1,86 Gramm pro Kubikzentimeter ordnen sich in die typischen Knochendichteergebnisse von Geflügel ein (Zhang & Coon, 1997; Rath et al., 1999; Shahnazari et al., 2006). Zunächst zeigen die Ergebnisse der Knochenpartikelanzahlmessung wiederum, dass ein Unterschied zwischen Silbernitratimprägnierung und Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra besteht und von einer höheren Sensitivität der Silbernitratimprägnierung bezüglich der Knochenpartikelanzahl ausgegangen werden kann (s. Abschnitt 5.1.1). In Bezug auf die Knochenpartikelfläche wurde ein Knochengehalt von 0,38% in das Produkt eingebracht, von dem mittels Silbernitratimprägnierung etwa 29% (0,11% Knochensubstanz) und mittels Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra circa 18% (0,07% Knochensubstanz) nachgewiesen wurden. Dies zeigt deutlich, dass eine klare Differenz zwischen dem real vorhandenen Knochenpartikelgehalt und den histologisch gemessenen Werten besteht. Gleichzeitig zeigt es, dass die Silbernitratimprägnierung - obwohl sie nur knapp ein Drittel des realen Knochenpartikelgehaltes erkennt - den realen Wert besser widerspiegelt als die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra. Ferner ist auf Basis dieser Ergebnisse davon auszugehen, dass der tatsächliche Knochenpartikelgehalt der vermarkteten Produkte unterschätzt wird. Branscheid et al. (2009) beschrieben in einem ähnlichen Versuch, dass im Schnitt 75% der zugegebenen Knochenpartikel im Nachhinein nachgewiesen werden konnten, wobei jedoch eine andere Methodik verwendet wurde.

5.1.3.3 Sensitivität der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra

Sowohl Alizarin-S als auch Indigokarmin werden in Färbungen zum Knochenpartikelnachweis verwendet. Daher überrascht es nicht, dass diese Farbstoffe um die Bindung an Knochenmaterial konkurrieren. Was jedoch überrascht, ist die Eigenschaft des Indigokarmins die zuvor mit Alizarin-S gefärbten Knochenpartikel zu überfärben, beziehungsweise das Alizarin zu verdrängen.

Der Versuch zeigte, dass bei einem Verzicht auf eine Gegenfärbung mit Indigokarmin die Knochenpartikel vollständig von Alizarin-S rot gefärbt werden. Um die Knochen herum bildet sich dabei ein großzügiger Farbschleier. Dieser Farbschleier sorgt dafür, dass die Größe des Knochenpartikels überschätzt wird, da die Randbereiche rot gefärbt werden, obwohl sie kein Knochenmaterial enthalten. Die Knochenpartikel können so nahezu vollständig identifiziert werden, es kommt jedoch zu einer starken Überschätzung ihrer Fläche (Fechner et al., 2018). Sobald mit einem Zyklus der Gegenfärbung mit Indigokarmin begonnen wird, werden diese Randbereiche zuerst entfärbt, da das Alizarin hier keine starke Bindung zum Gewebe aufbauen kann. Mit steigender Einwirkzeit verschiebt sich die Farbgränze zwischen Alizarin und Indigokarmin immer weiter in Richtung Knochenpartikelzentrum. Infolgedessen verschwinden kleinere Knochenpartikel, größere büßen an Fläche ein. Durch lange Einwirkzeit ist es daher möglich, dass Alizarin S vollständig aus einem Schnitt verdrängt wird und es so zu vermeintlich negativen Knochenpartikelbefunden kommt. Bei der Einwirkzeit von 180 Sekunden, die von L 06.00-13 der Methodensammlung nach § 64 LFGB für eine Gegenfärbung mit Indigokarmin festgesetzt wird, waren nach der vorliegenden Untersuchung viele Knochenpartikel bereits entfärbt. Es kommt hinzu, dass die Färbepotenz des Indigokarmins maßgeblich vom Hersteller und vor allem von der Frische der Lösung abhängt, da Indigokarmin mit der Zeit an Färbepotenz verliert. Auf kommerziell erhältlichen, fertig angemischten Farblösungen ist daher ein Mindesthaltbarkeitsdaten angebracht. Ursachen können unter anderem bakterieller Abbau (Mark & Ho, 1995; Fischer-Colbrie et al., 2005; Li et al., 2015) oder die Anwesenheit von Kalziumverbindungen sein (Ramesh et al., 2017). So kommt es zwangsläufig dazu, dass mit älteren Farblösungen mehr Knochenpartikel nachgewiesen werden als mit frischen, sofern die Vorgaben der § 64-Methode verwendet werden. Auch dies stellt einen Grund dar, warum durch die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra weitaus weniger Knochenpartikelzahlen und Knochenpartikelgehalte nachgewiesen werden, als tatsächlich vorhanden sind. Die Sensitivität wird aus diesem Grund eingeschränkt (Fechner et al., 2018).

5.1.3.4 Stauchungs- und Auffaltungstendenzen

Eine Verminderung des Knochenpartikelgehaltes kann ebenfalls beim Anfertigen der Schnitte auftreten. Hier besteht permanent die Gefahr, dass Knochenpartikel bei Kontakt mit der Klinge herausgerissen werden und für die Knochenpartikelanalyse nicht mehr zur Verfügung stehen (Hildebrandt et al., 2006). Diesem Problem lässt sich nur durch die Entkalkung des Gewebes begegnen, welche allerdings das Knochengewebe für die standardmäßig verwendeten Knochenpartikelfärbungen undetektierbar macht (Branscheid, 2002); das trifft sowohl für das Silbernitrat, als auch für das Alizarin zu (Hoyte, 1960).

Ferner zeigen Knochenpartikel bei Kontakt mit der Klinge im Mikrotom Stauchungs- und Auffaltungstendenzen (Fechner et al., 2018). Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass sich Knochengewebe im sich vom Präparat ablösenden Schnitt ziehharmonikaartig faltet. Dies kommt regelmäßig vor und führt bei der planimetrischen Messung zur Unterschätzung des Knochenpartikelgehaltes. Der vorliegende Versuch dazu zeigt anhand einzelner Knochenpartikel mitunter starke Differenzen zwischen der ursprünglichen Ausdehnung des Knochenpartikels und seiner endgültigen Form nach dem Schneiden, die im Mittel knapp 30% betragen. Da diese Differenzen sehr unterschiedlich ausfallen, was möglicherweise mit der individuellen Knochenstruktur zusammenhängt, kann dieser Flächenverlust nicht pauschal mit einem Korrekturfaktor ausgeglichen werden. Weitere Studien zu diesem Thema wären anzuraten. Dennoch handelt es sich hier um eine Fehlerquelle für die Unterschätzung von Knochenpartikelgehalten (Fechner et al., 2018) und eine mögliche Erklärung für die auftretende Differenz aus Abschnitt 5.1.3.1.

5.1.3.5 Flächenvergleich zwischen manueller und automatisierter Messung

Analog zu Josefowitz (2008) wurde eine Überprüfung der automatisierten Flächenbestimmung durchgeführt. Diese ergab anhand der Beispielform eines Quadrates eine 100%ige Übereinstimmung. Dies verwundert nicht, da jegliche Abweichung auf eine Unachtsamkeit der manuellen Auswertung zurückzuführen wäre, da die Software solche klaren Farbunterschiede präzise detektiert. Die gleiche Überprüfung wurde auch anhand eines Knochenpartikels vorgenommen, um entsprechend ein realitätsnäheres Szenario abzubilden. Auch hier wird eine sehr hohe Übereinstimmung erreicht. Allerdings kann nicht geklärt werden, ob die Differenz durch Fehler seitens der Software oder seitens des Untersuchers zu Stande kommt, da kein wahrer Bezugswert existiert. Ungeachtet dessen ergibt die automatische Auswertung jedoch auf dieser Basis belastbare Ergebnisse.

5.1.3.6 Vergleich der detektierten Knochenpartikelanzahl von konventioneller und automatisierter Methode

Ebenfalls wurde die automatisierte Knochenpartikelzählung mit einer untersucherbasierten Auswertung am Mikroskop verglichen. Die ermittelten Unterschiede aus Kapitel 4.1.3.5 sind ausschließlich darauf zurückzuführen, dass die Software mehr Knochenpartikel erkannt hat. Dabei handelte es sich in keinem Fall um falsch positive Befunde. Demzufolge bestehen bei der softwarebasierten Knochenpartikelzählung Vorteile gegenüber der visuellen Auszählung am Mikroskop, da sie offenbar genauer, unbestreitbar schneller und objektiver ist. Zu berücksichtigen ist, dass die konventionelle mikroskopische Zählung bei hohen Partikelzahlen an ihre Grenzen stößt. Die untersuchten Geflügelbratrollenschnitte enthielten bis zu 518 Knochenpartikel pro Schnitt. Diese Zahl lässt sich nur noch schwerlich visuell am Mikroskop bestimmen und erhöht die Fehlerwahrscheinlichkeit, sofern jeder Knochenpartikel gezählt werden und keine semiquantitative Auszählung vorgenommen wird. Zu beachten ist hier wiederum, dass jeder Knochenpartikel, der eine Zusammenhangstrennung zu anderen Knochenpartikeln aufwies, einzeln als solcher gezählt wurde. Knochenpartikelnester wurden somit immer als mehrere Knochenpartikel und nicht als lediglich ein Knochenpartikel gezählt (s. 5.1). Indes bewegt sich das Verarbeitungsfleisch im Gegensatz zu der erwähnten Geflügelbratrolle bei deutlich geringeren Knochenpartikelzahlen.

5.1.4 Spezifität

Die Ergebnisse in Kapitel 4.1.4.1 zeigen, dass sich vereinzelt Knochenpartikel in den Proben befinden, auch wenn die Rohstoffauswahl sehr gewissenhaft betrieben wird. Es scheint auch nicht unüblich zu sein, dass grundsätzlich Knochenpartikel vorhanden sind (Zhao & Sebranek, 1997). „Vereinzelt“ ist dabei definiert als „nicht in jedem Schnitt (4 cm²) vorkommend“ (L 6.00-13, Methodensammlung nach § 64, LFGB). Unter der Bedingung, dass die vorgeschriebenen 6 Schnitte (L 6.00-13, Methodensammlung nach § 64, LFGB) untersucht werden und von diesen 6 lediglich einer ohne Knochenpartikel verbleibt und die übrigen nur einen Knochenpartikel pro Schnitt aufweisen, ergibt sich daraus ein Richtwert von 0,2 Knochenpartikeln/cm² (Schulte-Sutrum & Horn, 2003). Dies stellt den sogenannten technologisch unvermeidbaren Knochenpartikelgehalt dar, der auch in allen Nullproben, seien es selbst hergestellte oder aber kommerziell erworbene, vorhanden sein kann (Stenzel & Hildebrandt, 2006; Hildebrandt & Josefowitz, 2007; Upmann & Lade, 2015).

Dieser Umstand schränkt die Spezifität des Detektionsverfahrens geringfügig ein.

Allerdings zeigt sich, dass der Unterscheid zwischen Proben mit Knochenpartikelzusatz ab 0,1% und ohne Knochenpartikelzusatz sehr groß ist. Es lässt sich somit zwischen 0,2 Knochenpartikeln/cm² und 153,62 µm²/cm² der Nullprobe und 4,4 Knochenpartikeln/cm² und 3.489 µm²/cm² eine ausreichend große Unterscheidbarkeit feststellen. Die Ergebnisse der

Hähnchen- und Putenhackfleischzubereitungen reihen sich mit 0,34 Knochenpartikel/cm² und 608,3 µm²/cm² sowie 0,18 Knochenpartikel/cm² und 204,8 µm²/cm² annähernd in diesen Bereich ein. Es stellt sich jedoch die Frage, ob ein Grenzwert von 0,2 Knochenpartikeln/cm² sinnvoll gewählt ist, wenn Hähnchenhackfleisch aus der Oberkeule diesen Wert bereits überschreitet. Die Formulierung von Schulte-Sutrum und Horn (2003) lässt hier deutlich Interpretationsspielraum. Die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.4.1 lassen aufgrund der Schnitte ohne Knochenpartikel eine semiquantitative Einordnung als „vereinzelt“ zu.

Bei der Auswertung der Versuche mit Gewürzen wurden keine Interferenzen festgestellt, obwohl dies nach Schulte-Sutrum und Horn (2003) vorkommen kann. Selbst sehr kalziumreiche Gewürze wie Majoran mit einem Kalziumgehalt von 0,66 bis 1,59% gemäß Zawiślak und Dzida (2010) zeigten in den Versuchen keine Anfärbbarkeit. Ebenso wenig störte schwarzer Pfeffer die Auswertung: Er war stets von Knochenpartikeln zu unterscheiden, da er vom Farbton her deutlich brauner und somit heller war.

Bei den Stoffen Kalziumcarbonat und Dinatriumhydrogenphosphat wurde eine Anfärbbarkeit erwartet. Kalziumkarbonat ist ein elementarer Bestandteil des Knochens. Phosphat soll sich nach Gallyas und Wolff (1985), Rungby et al. (1993) sowie Mulisch und Welsch (2015) ebenfalls mit der Silbernitratimprägnierung darstellen lassen. Dies traf auf Dinatriumhydrogenphosphat jedoch nicht zu. Somit erscheint die Silbernitratimprägnierung in diesem Versuchsaufbau beim Knochenpartikelnachweis spezifischer als in der Literatur beschrieben. Kalziumcarbonat färbte sich mit der Silbernitratimprägnierung erwartungsgemäß sehr detailliert mit starken Kontrasten im den Randbereichen an, während die nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra gefärbte Folgeschnitte ein weniger klares Bild lieferten. Die unvollständige Färbung und die verschwommenen Bereiche untermauern den Eindruck aus Kapitel 5.1.3.3, dass letztere Färbung weniger sensitiv ist und von der Gegenfärbung verdrängt wird (Fechner et al., 2018). Zum gleichen Ergebnis kamen Puchtler et al. (1969). Die Autoren beschrieben, dass im methodisch empfohlenen sauren pH-Bereich von 4,3 bis 4,5 (Methodensammlung nach § 64, LFGB) Kalzium entfernt und dadurch Diffusionsartefakte produziert werden. Diese Artefakte gleichen in ihrer Beschreibung den hier beobachteten Farbschleiern. Zudem wird beschrieben, dass jede Charge Alizarin S ein eigenes individuelles pH-Optimum besitzt (Puchtler et al., 1969). Da die Silbernitratimprägnierung kein saures Milieu benötigt, können solche Artefakte bei dieser Färbung nicht entstehen.

5.2 Analytische Zusammensetzung von Geflügelverarbeitungsfleisch

5.2.1 Anforderungen an Verarbeitungsfleisch

Das für die Versuche eingesetzte Verarbeitungsfleisch, wie auch jedes für dessen Herstellung verwendete Teilstück, entsprach ausnahmslos den Anforderungen an Verarbeitungsfleisch gem. 2.1.2: Es wurde aus genusstauglichen Teilen von Geflügel hergestellt und enthielt weder Kopf noch Speiseröhre, Kropf, Eingeweide oder Geschlechtsorgane (Anh. III Abschn. VI Nr. 1 g) der VO (EG) Nr. 853/2004).

Die Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse (2015) definieren Fleisch und somit auch Verarbeitungsfleisch als „alle Teile von geschlachteten oder erlegten warmblütigen Tieren, die zum Genuss für Menschen bestimmt sind.“ Zu Lebensmitteletikettierungszwecken sind für Hähnchen- und Putenfleisch, welche als Zutat für andere Lebensmittel verwendet oder gewerbsmäßig hergestellt werden, die Skelettmuskeln der entsprechenden Tierarten „mitsamt dem wesensgemäß darin eingebetteten oder damit verbundenen Gewebe“ zu verwenden. Dazu zählen Fett- und Bindegewebe sowie eingelagerte Lymphknoten, Nerven und Gefäße. Dabei darf der Rohstoff allerdings maximal 15% Fett aufweisen und das Verhältnis von Kollagen zu Fleischeiweiß maximal 10% betragen, andernfalls sind Fett oder Bindegewebe separat zu deklarieren. Darüber hinaus gilt Separatorenfleisch im Sinne des Anhanges 1 Nr. 1.14 der VO (EG) Nr. 853/2004 nicht als Fleisch und darf dementsprechend nicht als Verarbeitungsfleisch vermarktet werden (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2015). Die in den Versuchen verwendeten Geflügelteilstücke sind grundsätzlich zum menschlichen Verzehr bestimmt und stammten aus der laufenden Produktion eines Lebensmittelunternehmens. Die maschinelle Entbeinung der verwendeten Teilstücke verfolgte das Ziel, Skelettmuskulatur möglichst vollständig vom Knochen zu trennen, wobei zähere bzw. festere Bestandteile wie Bindegewebe und Knochenpartikel möglichst nicht in das Verarbeitungsfleisch gelangen sollten.

Die Einhaltung der Vorgaben hinsichtlich Fett und Kollagen zu Fleischeiweißverhältnis wurde in den Versuchen durch eine Vollanalyse überprüft. Diese wurde aufgrund der hohen Übereinstimmung mit der chemischen Vollanalyse mit der effizienteren Methode der Nahinfrarotspektroskopie durchgeführt. Auch diese besitzt die Fähigkeit die chemischen Hauptkomponenten zuverlässig zu bestimmen (Prieto et al., 2009). Ferner wird diese Technik zum Großteil routinemäßig in der laufenden Produktion eingesetzt. Sie sorgt also auch in der Praxis für die Einhaltung der Anforderungen für Geflügelfleisch (Windham et al., 2003). Einzig der Mineralstoffgehalt ist mit dieser Methodik nicht immer zuverlässig feststellbar. Jedoch reduziert das Homogenisieren der Probe zusätzlich die Streuung der Werte, wie es auch in den vorliegenden Versuchen praktiziert wurde. Andere Autoren stellten ebenso die Zuverlässigkeit dieser Methode in der Analyse der chemischen Hauptkomponenten mit

Ausnahme des Mineralstoffgehaltes bei Geflügelfleisch fest (Cozzolino & Murray, 2002; Berzaghi et al., 2005; McDevitt et al., 2005).

Den Ergebnissen zur Folge waren einige Proben oberhalb der Grenze von 15% Fett. Dies traf vor allem auf die Rohstoffmischungen aus Betrieb 2 zu, die in 6 von 15 Fällen diesen Wert überschritten. Als allgemein fettreich kann das Gabelbeinfleisch betrachtet werden, welches mit 24,3% auch den Spitzenwert der Auswertung lieferte. Auch bei Verwendung eines Teilstücks als einzigen Rohstoff konnte das Gabelbeinfleisch und das Schulterfleisch den Grenzwert nicht einhalten. Das Fleisch von Sternum, Rücken und Unterschenkeln von Hähnchen und Pute waren dagegen magerer; ebenfalls kann vermutet werden, dass Filetabschnitte weniger Fett beinhalten, da Mischungen mit Gabelbeinfleisch in der Regel zu einer guten Kontrolle des Fettgehalts führen. Die Fettgehaltsüberschreitungen stellen allerdings grundsätzlich kein Problem dar. Für diesen Fall sehen die LMIV (Anhang VII Teil B Nr. 17 der VO (EG) 1169/2011), wie auch I. 1. der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse (2015) vor, dass der Fleischanteil entsprechend nach unten angepasst und die Angabe „Fett“ hinzugefügt werden muss. Dies ist allerdings nur zulässig, wenn ansonsten alle Kriterien der Definition von „...fleisch“ erfüllt wurden. Darüber hinaus handelt es sich in den Fällen, bei denen Fettanteilsüberschreitungen festgestellt wurden, um Kundenvorgaben hinsichtlich des Fettgehalts. Das Verarbeitungsfleisch kann durch Mischungen entsprechend angepasst und gemäß Kundenvorgaben produziert werden. Somit stellt dies keine Problematik dar, die durch Rohstoffauswahl nicht kontrolliert werden kann.

Anders stellte sich das Bild beim Kollagen zu Fleischeiweißverhältnis dar. Die 10%-Grenze wurde von keinem Material erreicht und der durchschnittliche Wert lag bei circa 5%. Allgemein bewegten sich die Bindegewebeiseiweißwerte zwischen 1 und 2%. Dies war rohstoffübergreifend zu beobachten, wobei auch hier die besten Werte vom Teilstück Unterschenkel und die schlechtesten vom Teilstück Rücken erreicht wurden. Interessanterweise wurde der geringste Wert von 0,9% beim Unterschenkel der weiblichen Pute ermittelt. Dies veranschaulicht, dass der Vorgang des mechanischen Trennens trotz des hohen Sehnenanteils im Unterschenkel der Pute das Bindegewebe sehr effektiv vom Fleisch trennt und somit den Bindegewebeeintrag in das Verarbeitungsfleisch stark minimiert.

Der Ausschluss der Verwendung von Separatorenfleisch impliziert ferner, dass vor der mechanischen Gewinnung des Verarbeitungsfleisches keine Primärentbeinung stattgefunden haben darf. Dies ist bei allen Proben aus den aufgeführten Betrieben der Fall, womit diese grundsätzlich kein Separatorenfleisch darstellen. Ferner gelten nach Schulte-Sutrum und Horn (2003) 1,5 Knochenpartikel/cm² als Hinweis auf die Verarbeitung von Separatorenfleisch. Dass die Ausgangsmaterialien einen starken Einfluss auf das Auftreten von Knochenpartikeln ausüben, wurde auch von Nitsch (2005) und Josefowitz (2008) festgestellt. Die beschriebene Vorgehensweise in den Versuchen lässt zwar einen direkten Bezug zu diesem Grenzwert nicht

zu, dennoch kann festgehalten werden, dass auch hier die Teilstücke Rücken und Schulter die höchsten zahlenmäßigen Knochenpartikelbelastungen aufweisen. Dies macht dieses Material zwar nicht zum Separatorenfleisch, zeigt aber an, dass dieses Material ein gewisses Risiko besitzt in Nachweismethoden als Separatorenfleisch fehlinterpretiert zu werden.

Die BEFFE-Werte schließen sich diesem Eindruck an. Werden niedrige Fett- und Bindegewebsgehalte ermittelt, so ist entsprechend auch von einem hohen BEFFE-Wert auszugehen. Wiederum weisen die Teilstücke Sternum, Flügel und Unterschenkel hohe BEFFE-Werte um die 18% auf. Niedrigere Werte um die 15% werden von Gabelbein und Schulter erreicht. Diese Eigenschaften der Teilstücke sollten bei der Verwendung zur Herstellung von Fleischerzeugnissen berücksichtigt werden, da die Leitsätze Mindest-BEFFE-Werte für viele Fleischerzeugnisse vorgeben.

5.2.2 Anforderungen an Spitzenqualität

Fleischerzeugnisse der Kategorie Spitzenqualität, die als solche bezeichnet oder mit bedeutungsgleichen Beschreibungen in Verkehr gebracht werden, sind einer bestimmten Auswahl des Ausgangsmaterials unterworfen. Diese wird in erster Linie durch die Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse definiert.

Abschnitt I Nr. 2.12 der Leitsätze definiert Fleischerzeugnisse der Kategorie Spitzenqualität folgendermaßen: „Fleischerzeugnisse mit hervorhebenden Hinweisen wie Spitzenqualität, Delikatess-, Feinkost-, Gold-, prima, extra, 1a, ff oder dergleichen oder in besonders hervorgehobener Aufmachung (z.B. goldfarbene Hülle) unterscheiden sich von den unter der betreffenden Bezeichnung des Lebensmittels sonst üblichen Fleischerzeugnissen, abgesehen vom Genusswert, durch besondere Auswahl des Ausgangsmaterials, keine Verwendung von Separatorenfleisch oder manuell oder auf andere Art vom Knochen gewonnenes Restfleisch sowie durch höhere Anteile an Skelettmuskulatur“ (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2015).

Diese Formulierung schließt also die Verwendung von Separatorenfleisch, aber auch diejenige von manuell oder auf andere Art von Knochen gewonnenem Restfleisch aus. Manuell vom Knochen gewonnenes Restfleisch bezeichnet den in 2.1.4 erwähnten Knochenputz, welcher erwiesenermaßen von schlechter Qualität ist (Linke & Thumser, 1964). Dieser ist in Abschnitt I Nr. 1.113 der Leitsätze für Rindfleisch definiert und lautet: „Fleisch, das von grob ausgelösten Knochen abgetrennt wird („Knochenputz“)" (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2015). Es ist also auch hier ein vorausgegangener Entbeinungsschritt erforderlich. Allerdings wird das „Knochenputzen“ aus Kostengründen in der Regel nicht mehr durchgeführt (Stiebing, 1998).

Folglich kann maschinell primärentbeintetes Verarbeitungsfleisch, gewonnen aus Gabelbeinen, Rücken, Unterkeulen, Filetabschnitten, 1. Flügelglied und Mittelflügel auch hier zur Verwendung von Fleischerzeugnissen der Kategorie Spitzenqualität eingesetzt werden.

Um den speziellen Eigenschaften des Geflügelfleisches in diesem Kontext Rechnung zu tragen, hat der Bundesverband der Geflügelschlachtereien e. V. einen Leitfaden für die Bewertung von Gabelbein- und Putenunterkeulenfleisch erarbeitet. Dieser stellt in mehreren Kategorien Anforderungen an die Herstellung, so dass dieses Verarbeitungsfleisch stets den hohen Ansprüchen an den Rohstoff für Spitzenqualitäten gerecht wird (Bundesverband der Geflügelschlachtereien e. V., 2017). In der Kategorie Ausgangsmaterial heißt es darin, dass der Fleischanteil der Teilstücke überwiegen soll. Mehr noch wird dieser mit einem Wert von mindestens 85% „Skelettmuskulatur mit wesensgemäß darin eingebetteten Strukturen oder damit verbundenem Gewebe“ angegeben. Dies kann unter Umständen jedoch problematisch werden, da laut Schigulski et al. (2015) das Gabelbein nach Ausstanzung im Schnitt über einen Knochenanteil von 16% verfügt. Demzufolge wäre ein Großteil der Gabelbeine nicht zulässig, obwohl sich diese nicht wesentlich von den Übrigen unterscheiden. Ferner verhindert eine solche Regelung, dass das Ausstanzen des Gabelbeins weiter optimiert wird, da dies zu einem Knochenanteilanstieg führen würde. Auch werden Rasse und Schlachtgewicht nicht berücksichtigt, die ebenfalls einen Einfluss auf den Knochenanteil im Gabelbein ausüben (Schigulski et al., 2015).

Eine weitere Anforderung setzt voraus, dass der verwendete Rohstoff Kontroll- und Sortierungsprozessen unterworfen wird. Diese sind für Putenunterkeulenfleisch und Gabelbeine näher beschrieben. Bezüglich des Gewinnungsprozesses gibt es eine Obergrenze für die Ausbeute. Diese wird bei Gabelbeinen so festgelegt, dass 20% Restgewebe am Knochen zu verbleiben haben. Darüber hinaus darf im Endprodukt nur ein bestimmter Zerkleinerungsgrad vorliegen, der nicht über den von Hackfleisch hinausgeht. Dies wurde deshalb so bestimmt, da die Muskelfaserzerstörung ein Indikator für Separatorenfleisch ist (Hildebrandt, 2007; Branscheid & Troeger, 2011). Demzufolge sind die vorliegenden Verarbeitungsfleischprodukte in Bezug auf die Rohstoffauswahl zur Herstellung von Produkten der Kategorie Spitzenqualität geeignet.

Ferner wird chemisch auf BEFFE im Fleischeiweiß und den Kalziumgehalt geachtet, deren Grenzwerte nicht unterschritten bzw. überschritten werden sollen. Erwartungsgemäß wird dies von den untersuchten Proben erfüllt (s. Abbildung 41).

Histologisch wird auf den Anteil an Muskelabrieb untersucht, welcher im Mittel nicht höher als 20 und maximal 35% pro Schnitt betragen darf. Darüber hinaus wird die Anwesenheit von Fremdgewebe, wie zum Beispiel Geflügelhaut, geprüft (Horn & Langen, 2017). Unter solchem Fremdgewebe können auch Drüsengewebe und Knochenpartikel subsummiert werden (ALTS, 2012, 2013).

Auch die ermittelten Analysewerte aus der Vollanalyse in Verarbeitungsfleisch erfüllen die Bedingungen vom Bundesverband der Geflügelschlachtereien e. V. (2017) für Produkte der Kategorie Spitzenqualität. Dies gilt für die Anforderungen an den Kalziumgehalt von unter 200 mg/kg, den alle Verarbeitungsfleischproben stark unterschreiten. Der maximal gemessene Wert in diesen Proben beträgt 143,07 mg/kg. Die Separatorenfleischproben hingegen überschreiten den Grenzwert deutlich mit 237 bis 560 mg/kg.

Die Mindestanforderung an den BEFFE-Gehalt im Fleischeiweiß wird ebenso ausnahmslos erfüllt. Alle Verarbeitungsfleischproben weisen Werte von über 90% auf und entsprechen somit diesem Kriterium. Dies gilt allerdings auch für die untersuchten Separatorenfleischproben, wodurch dieses Kriterium allein als nicht hinreichend für die Unterscheidung einzustufen ist.

Am Beispiel des in den Leitsätzen erwähnten Geflügelbierschinkens (Absch. II Nr. 2.224.1 der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2015) lässt sich die Anforderung an Produkte der Kategorie Spitzenqualität verdeutlichen. In diesem Produkt ist die Verwendung von „sehnen- und fettgewebsarmes Geflügelfleisch: Skelettmuskulatur (Geflügelfleisch ohne Haut) von Geflügel, die von Natur aus nur wenig Bindegewebe oder Fettgewebe enthält (z. B. Brustfilet) oder deren Gehalt an diesen Geweben entsprechend verringert worden ist“ und „grob entsehntes Geflügelfleisch: Geflügelfleisch mit Bindegewebegehalten, wie sie bei der Verarbeitung von ganzem Geflügel ohne Brust nach Entfernung von groben Sehnen und der Flügel zu erwarten sind“ zugelassen (Absch. I Nr. 1.131 und Nr. 1.132 der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2015). Die vorgeschriebenen Analysenwerte sind ein Anteil von bindegewebeiseiweißfreien Fleischeiweiß von nicht unter 13% und bindegewebeiseiweißfreies Fleischeiweiß im Fleischeiweiß chemisch ermittelt von nicht unter 88%. Diese Voraussetzungen werden von den oben genannten Verarbeitungsfleischproben erfüllt und somit sind sie für die Verwendung zur Herstellung eines Geflügel-Bierschinkens der Kategorie Spitzenqualität einsetzbar.

Einschränkend ist zu erwähnen, dass sich der Leitfaden des Bundesverbands der Geflügelschlachtereien e. V. (2017) primär auf die Teilstücke Gabelbein und Unterkeule bezieht. Eine Übertragbarkeit auf andere Teilstücke kann zwar i.d.R. angenommen werden, allerdings werden nicht alle Teilstücke auch sämtliche genannten Kriterien (z.B. Knochengehalte) erfüllen, so dass eine konkrete Erweiterung dieses Leitfadens notwendig erscheint.

5.2.3 Knochenpartikeleintrag und Kalziumgehalt der Betriebsproben

5.2.3.1 Vergleichswerte für Kalzium

Neben dem Knochenpartikelnachweis ist die Kalziumbestimmung ein wichtiger Parameter für die Abgrenzung zwischen Verarbeitungsfleisch und Separatorenfleisch (Stenzel & Hildebrandt, 2006)

Untersuchungen von Stenzel und Hildebrandt (2006) zeigten im Rahmen von Erhebungen für den ALTS, dass die Kalziumwerte von 19 Geflügelproben stets unter 150 ppm lagen. Folglich wurde unter Addition einer Toleranz von 50 ppm ein möglicher Grenzwert von 200 ppm vorgeschlagen. Ein Maximalwert von 150 ppm ist in Anbetracht der eigenen Ergebnisse (s. Abbildung 4) als realistisch zu bewerten, da kein Wert oberhalb dieser Grenze liegt. Dennoch kann bei einer strengeren Betrachtungsweise geschlussfolgert werden, dass dieser Wert tendenziell zu hoch bemessen ist. Dies begründet sich darin, dass die eigenen Untersuchungen einen Mittelwert von gut 57 ppm ausweisen und auch die Ergebnisse des Probenmaterials Rücken einschließen.

5.2.3.2 Einflüsse auf das Ergebnis

5.2.3.2.1 Knochenmaterial

Da gesplitterte Knochen eine Ursache für erhöhte Kalziumwerte darstellen können (Branscheid et al., 2009), ist die Beschaffenheit des Knochens ein wichtiger Faktor für den späteren Kalziumgehalt in Verarbeitungsfleisch. Dabei spielt sowohl der Kalzifizierungsgrad als auch der Knochentyp eine Rolle. So besitzt die *Substantia compacta* oder *Substantia corticalis* durch eine höhere Dichte entsprechend mehr Kalziumverbindungen. Die *Substantia spongiosa* enthält folglich deutlich weniger Kalzium, da die dichte Knochenmasse durch dünne Trabekel ersetzt wird (Cottin, 2004). Zudem sorgen Perioden schnellen Wachstums oder starke Umgestaltungsvorgänge im Knochen für eine Hypomineralisation, während gestopptes Wachstum und geringe Umgestaltungsvorgänge für Hypermineralisation sorgen (Grynepas, 1993). Letztere treten insbesondere in Folge eines hohen Alters durch das Absterben alter Osteozyten auf und sorgen dafür, dass der Knochen spröder wird (Schnitzler, 1993). Die Spröde identifizieren Crosland et al. (1995) als einen Faktor für ein erhöhtes Auftreten von Knochenpartikeln. Bedingt durch die kurze Lebensdauer ist dies in Falle der Masthähnchen allerdings ein zu vernachlässigender Faktor.

Auch die Tierart, Rasse, Fütterung und der physiologische Zustand der Tiere spielt eine Rolle (Bijker et al., 1985; Hildebrandt & Josefowitz, 2007; Branscheid et al., 2008a; Fleming, 2008; Branscheid et al., 2009; Bauer, 2013b). Allerdings gilt es bei der Kalzium-Bestimmung zu bedenken, dass die Ergebnisse nicht als absolute Bezugsgröße fungieren können. Der Kalziumwert, welcher mit der F-AAS-Technik und damit einer validierten Methode bestimmt wurde (Wnuk, 2002), die auch viele andere Autoren zur Kalziumbestimmung in Fleisch und Fleischerzeugnissen (Chekri et al., 2012; Bauer, 2013b) oder anderen Lebensmitteln (Madejczyk, 2008) verwenden, unterliegt rohstofftypisch gewissen Schwankungen. Darüber hinaus sollte beachtet werden, dass auch bei einer Homogenisierung von 100 g eine gleichmäßige Verteilung der Knochenpartikel nur bedingt stattfindet und somit Teilproben mit unterschiedlichem Knochenpartikelgehalt aus dem Homogenat entnommen werden können.

Dies führt dazu, dass verschiedene Kalziumwerte aus demselben Probenmaterial gemessen werden können. Dieses Phänomen zeigt sich in gleicherweise im Wurstbrät, welches ebenfalls keine homogene Knochenpartikelverteilung aufweist (Upmann & Lade, 2015).

5.2.3.2.2 Rohstoff

Der Rohstoffauswahl kommt hinsichtlich der Unterschiede im Kalzium- und Knochenpartikelgehalt zwischen den Produkten große Bedeutung zu. Das untersuchte Verarbeitungsfleisch ist das Produkt einer mechanischen Primärentbeinung bzw. einer „Entfleischung“ der verwendeten Teilstücke. Somit haben die Ausgangsmaterialien einen starken Einfluss auf das Auftreten von Knochenpartikeln (Nitsch, 2005; Josefowitz, 2008). Die Ergebnisse aus Abbildung 43, Abbildung 44 und Abbildung 45 zeigen, dass je nach Teilstück große Unterschiede bei der Knochenpartikelanzahl sowie dem Knochenpartikel- und Kalziumgehalt auftreten. Dies zeigt, dass bestimmte Rohstoffe ein höheres Risiko für Knochenpartikeleintrag innehaben als andere.

Ebenso sind die in der Praxis auftretenden **betriebsspezifischen Unterschiede** primär durch die Rohstoffauswahl zu erklären. Im Vergleich zwischen zwei Betrieben offenbarten sich deutliche Unterschiede in den untersuchten Parametern. Die Proben aus Betrieb 1 sind durchweg im Hinblick auf Knochenpartikelanzahl, Knochenpartikelfläche und Kalziumwert gegenüber den Proben aus Betrieb 2 erhöht. Dies konnte probenübergreifend beobachtet werden. In Betrieb 1 wurden in Verarbeitungsfleisch 5,83 Knochenpartikel/cm² sowie 0,025% Knochenpartikelgehalt detektiert. Betrieb 2 hingegen unterschritt diese Werte mit 3,33 Knochenpartikeln/cm² und 0,0072% Knochenpartikelgehalt.

Unterschiede zwischen Betrieben wurden auch durch Branscheid et al. (2008b) bei Verarbeitungsfleisch festgestellt. Schlachtort A unterschied sich mit einem Knochenpartikelgehalt von 0,11% deutlich von Schlachtort B mit lediglich 0,03%.

Innerhalb dieser Spanne wurden auch von Nagy et al. (2007) Werte von 0,04% bis 0,08% in Geflügelverarbeitungsfleisch hergestellt durch Entbeinung mittels Bandseparator festgestellt. Allerdings stellten die Autoren einen deutlich höheren Kalziumgehalt von 610 mg/kg respektive 0,061% fest.

Die Kalziumwerte von 0,0062% in Betrieb 1 wurden ebenso von Betrieb 2 durch Kalziumgehalte von 0,0032% halbiert. Eine solche Variabilität wurde - allerdings mit deutlich höheren Werten - auch von anderen Autoren berichtet. So beispielsweise durch Tremlová und Starha (2003) in Geflügelfleischprodukten wie Brühwürsten, Salami und Hackfleisch, die Werte zwischen 0,025% und 0,108% zeigten.

Die Ursachen sind dabei neben der Rohstoffauswahl in der technischen Ausstattung, den angewendeten Einstellungen, der Wartung sowie der individuellen Handhabung zu suchen (Sams, 2001). Durch die Vielfalt der unterschiedlichen Einflussfaktoren gestaltet sich eine Diversifizierung und konsekutiver Rückschluss auf die einzelnen Einflussgrößen schwierig. Da

diese allesamt bei der Herstellung von Verarbeitungsfleisch zum Tragen kommen, müssen die objektiv mess- und beherrschbaren Faktoren priorisiert und soweit möglich objektiviert und isoliert voneinander betrachtet werden.

Die herausragende Rolle der Rohstoffauswahl wurde durch die Untersuchungen zwischen den **einzelnen verarbeiteten Teilstücken** Rechnung getragen. Ein wichtiges und oft diskutiertes Teilstück stellt das Gabelbein oder die Furcula dar (Branscheid et al., 2008b; Branscheid & Troeger, 2011; Schigulski et al., 2015). Das Gabelbein ist ein V-förmiger Knochen, welcher beide Schlüsselbeine vereint. Innerhalb der vollautomatischen Zerlegelinien wird das Gabelbein, welches sich kranial der Brustmuskulatur befindet und somit ein Hindernis beim Lösen des Brustfilets darstellt, in der Regel durch Ausstanzen abgetragen. Der Fleischanteil dieses Teilstückes macht ungefähr 2% (10-20 g) des Schlachtgewichts aus, der Gewichtsanteil des Knochens in diesem Teilstück beträgt ungefähr 16% (Branscheid et al., 2008b; Schigulski et al., 2015). Da das abgelöste Gabelbein weder Schlachtkörper noch Knochen nach dem Entbeinen, sondern ein nicht entbeintes Teilstück darstellt, handelt es sich bei Gabelbeinflisch nicht um Separatorenfleisch im Sinne von Anhang I Nr. 1.14 der VO (EG) 853/2004 (Branscheid et al., 2008b; Schigulski et al., 2015; Upmann, 2021).

Allerdings ist die rechtliche Einordnung nach wie vor Gegenstand gerichtlicher Auseinandersetzungen (Beschluss des Oberverwaltungsgerichts Lüneburg - 13 ME 115/15 Anhang 1 Nr 114 EGV 853/2004, 2015). Auch andere Teilstücke wie Unterkeulen, Filetabschnitte, Schulter, 1. Flügelglied, Rücken und Mittelflügel unterliegen dieser Diskussion. Im Gegensatz zum Gabelbein ist das Material Rücken aus histologischer und chemischer Sicht weitaus schlechter einzustufen. Es enthält neben vielen kleinen Knochen und Sehnen oftmals auch Reste von Nieren- und anderen Geweben, die bei Einsatz als Ausgangsmaterial zu qualitativ weniger hochwertigen Endprodukten führen (Branscheid & Troeger, 2011). Die allgemein schlechte Qualität des Materials Rücken konnte in Bezug auf die Knochenpartikelanzahl und den Knochenpartikelgehalt auch in den eigenen Versuchen reproduziert werden (s. Abbildung 43 und Abbildung 44).

Anders verhält es sich dagegen mit dem Ausgangsmaterial Brustbein. Dieses ist bereits entbeint worden und kann somit rein rechtlich zum Separatorenfleisch gezählt werden, obwohl auch hier die Versuche zeigen, dass das Endprodukt von vergleichsweise guter Qualität ist. Die Ergebnisse der untersuchten Proben bestätigen den großen Einfluss des verarbeiteten Teilstücks auf die Höhe der Knochenpartikelanzahl, des Knochenpartikel- und des Kalziumgehalts. Dies geht auch aus den ermittelten Ergebnissen in Betrieb 5 hervor. Dort wurde festgestellt, dass das Material Gabelbein grundsätzlich wenige Knochenpartikel (4,58 Knochenpartikel/cm²) enthält, diese aber in der Regel größere Flächen besitzen. Dies führt dazu, dass höhere Knochenpartikelgehalte beim Gabelbein zustande kommen (0,051%), was zudem durch die Kalziummessung (0,014%) bestätigt wird.

Im Gegensatz dazu werden im Material oberer Rücken sehr viele Partikel (22,25 Knochenpartikel/cm²) nachgewiesen und es bestehen auch viele Ausreißer, dies spricht für ein hohes Knochenpartikelrisiko in diesem Material. Auch ohne vorherige Entbeinung birgt dieses Ausgangsmaterial ein höheres Risiko des Knochenpartikeleintrags. Dies liegt darin begründet, dass die Knochen des Rückens mit ihren vielen Wirbeln, Gelenken und fragilen Knochenvorsprüngen eine höhere Neigung aufweisen, auch bei geringeren Drücken zu brechen. Ebenso ist das Verhältnis von Knochen zu Fleisch in diesem Rohstoff deutlich schlechter zu bewerten. Die Knochenpartikelfläche ist in diesem Material mit 0,056% ähnlich hoch, wie die des Gabelbeins und bewegt sich folgerichtig auch beim Kalziumwert mit 0,01% in einem ähnlichen Bereich.

Andere Autoren stellten in ganzen Teilstücken vom Hähnchenrücken 0,01% Knochenpartikelgehalt etwas weniger, allerdings mit 0,046% deutlich mehr Kalzium fest (Branscheid & Troeger, 2011). Weitere Autoren fanden in den Proben aus Teilstücken vom Hähnchenrücken sogar 0,195% Kalzium (Botka-Petrak, 2011). Diese Teilstücke wurden allerdings vorher entbeint, wodurch dieses Material zur Kategorie Separatorenfleisch zu zählen ist.

Das Material Schulter zeigt einen geringeren Knochenpartikelgehalt (0,013%) als Rücken und Gabelbein, jedoch mehr einzelne Knochenpartikel (6,4 Knochenpartikel/cm²) als das Gabelbein sowie einen Kalziumgehalt von 0,0046%.

Die besten Werte erzielt das Material Unterkeule. Hier werden von allen Rohstoffen die niedrigsten Werte erreicht, sowohl hinsichtlich Knochenpartikelanzahl (0,59 Knochenpartikel/cm²) als auch hinsichtlich Knochenpartikelgehalt (0,0067%) und Kalziumwert (0,0017%).

Die Rückrechnung auf die **Einzelkomponenten** aus Betrieb 2 bestätigt, dass das Material Gabelbein wenige (1,06 Knochenpartikel/cm²), aber dafür große Knochenpartikel zu beinhalten scheint (Knochenpartikelgehalt: 0,013%). Auch Branscheid et al. (2008b) fand in seinen Untersuchungen zu Gabelbeinen Knochenpartikelgehalte von 0,03% bis 0,11%.

Der Kalziumgehalt schließt sich mit einem Wert von 0,0033% dieser Tendenz an, während Branscheid et al. (2008b) Werte zwischen 0,005% und 0,025% feststellt.

Umgekehrt verhält es sich bei den Filetabschnitten, die tendenziell mehr Knochenpartikel (5,41 Knochenpartikel/cm²) kleineren Ausmaßes (Knochenpartikelgehalt: 0,0047%) beinhalten. Allerdings weisen diese trotz geringeren Knochenpartikelgehaltes einen etwas höheren Kalziumgehalt von 0,0046% auf. Das Brustbein weist sowohl eine sehr hohe Knochenpartikelanzahl (9,46 Knochenpartikel/cm²) als auch einen ähnlich hohen Knochenpartikelgehalt (0,012%) wie das Material Gabelbein auf und stellt somit das am höchsten kontaminierte Einzelmaterial in Betrieb 2 dar. Auch der Kalziumwert unterstreicht den gleichen Knochenpartikelgehalt von Gabelbeinen und Brustbein (0,0035%).

Im Vergleich mit anderen Autoren wie Botka-Petrak et al. (2011), welche in Hühnerschlachtfleisch 0,06% Kalziumgehalt feststellte, sind diese Schwankungen im Kalziumgehalt jedoch unbedeutend.

Die Auswertung der Teilstücke 1. Flügelglied und Mittelflügel zeigt keinen relevanten Unterschied in der Knochenpartikelanzahl. Mit 1,94 zu 0,94 Knochenpartikeln/cm² lagen sogar Werte vor, die im Rohstoff Mittelflügel höher ausfielen als im 1. Flügelglied. Die gleiche Tendenz zeigte sich ebenfalls im Knochenpartikelgehalt (0,0015% zu 0,0037%). Dies überrascht zunächst, da der Mittelflügel aus weniger Knochen, die zudem auch noch größer und stabiler sind, besteht. Allerdings sind diese Werte sehr gering und mit den Ergebnissen des Gabelbeins vergleichbar. Ferner wurden im Material Mittelflügel Werte mit einer großen Varianz vorgefunden. Die Kombination aus sehr geringen Knochenpartikelzahlen und einer hohen Varianz im Material macht die Ergebnisse beeinflussbar, beispielsweise durch das Auftreten von Knochenpartikelnestern (s. Abbildung 54). Daher lässt sich durch die durchgeführten Versuche schwerlich eine Qualitätsunterscheidung zwischen den Teilstücken 1. Flügelglied und Mittelflügel treffen. Dennoch kann festgestellt werden, dass Hähnchenflügel eher zu geringen Knochenpartikeleinträgen in das Verarbeitungsfleisch führen.

Die Kalziumwerte der Flügel bewegen sich um einen Wert von 0,006%. Andere Autoren konnten in diesem Material deutlich höhere Werte feststellen. Botka-Petrak et al. (2011) fanden 0,29% Kalziumgehalt in entbeinten Hühnerflügeln und damit Werte, die um das 40fache höher lagen als in der hiesigen Untersuchung.

Der **Vergleich des Hähnchenverarbeitungsfleisches mit dem der Pute** bestätigte die Erkenntnis, dass die Verwendung des Teilstücks Unterkeule zu niedrigen Knochenpartikelwerten im Endprodukt führt. Ähnlich wie das Resultat der Hähnchenunterkeule aus Betrieb 5 werden Knochenpartikelzahlen unter einem Knochenpartikel pro Quadratzentimeter erreicht. Somit lässt sich daraus schließen, dass das Material Unterkeule grundsätzlich eine besonders geringe Knochenpartikelbelastung aufweist. Dies wird ebenfalls durch den geringen Knochenpartikelgehalt von 0,003% bis 0,004% unterstrichen.

Auch der ermittelte Kalziumwert spricht für die gute Qualität. Mit 42,13 bis 46,51 mg/kg wurden Werte ermittelt, die sich nahe an denen von manuell entbeintem Putenfleisch bewegen. So ermittelte Serdaroğlu et al. (2005) 17,2 +/- 0,68 mg/kg Kalzium in manuell entbeintem und 202,9 +/- 1,07 mg/kg Kalzium in mechanisch entbeintem Putenfleisch.

Der **Vergleich zwischen weiblicher und männlicher Pute** ergibt keinen relevanten Unterschied. Alle Ergebnisse befinden sich auf einem ähnlichen Niveau und die geringen Unterschiede sind mit natürlichen Schwankungen innerhalb des Rohstoffes erklärbar. Die Ausnahme bildet der Knochenpartikelflächenwert der männlichen Pute, welcher, allerdings aufgrund eines sehr großen Knochenpartikels von 209.570,82 µm² Größe, diesen Wert stark

nach oben beeinflusst. Dies kommt stellenweise vor und beeinflusst den Wert immens (Branscheid et al., 2008b). Wird dieser Knochenpartikel aus der Berechnung herausgenommen, so stellt sich ein Wert ein, welcher sich auf dem gleichen Niveau bewegt, wie die Werte von der weiblichen Pute. Weder die zunehmende Kalzifizierung der Sehnen, welche bei Puten im Laufe des Wachstums eintritt (Engel, 1967), noch das höhere Endgewicht der männlichen Pute scheinen für die Fleischqualität in den vorliegenden Versuchen eine entscheidende Rolle zu spielen. Ein relevanter Unterschied zwischen beiden Geschlechtern ist entsprechend nicht feststellbar.

Der Einfluss der Rohstoffe zeigte sich auch in den Ergebnissen der verschiedenen Mischungen von Verarbeitungsfleisch über eine Arbeitswoche. Aufgrund des unterschiedlichen Rohmaterials zur Herstellung des Verarbeitungsfleisches kam es auch innerhalb eines Betriebes im Laufe einer Arbeitswoche zu starken Schwankungen. Gleichzeitig fällt auf, dass nur ein geringer Zusammenhang zwischen detektierter Knochenpartikelfläche und gemessenem Kalziumwert besteht. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen Knochenpartikelfläche und Kalziumwert betrug 0,12 und war damit schwach und nicht signifikant. In den Proben aus Betrieb 5 war die Korrelation dagegen immerhin als moderat einzustufen, da ein Wert von 0,4 erreicht wird, welcher auf dem Niveau von 0,01 signifikant ist (Cohen, 2013).

Die Unzuverlässigkeit des Kalziumwertes in Bezug zur Knochenpartikelfläche wurde auch von Branscheid et al. (2008a) festgestellt. Andere Autoren hingegen fanden mit der Methode der linearen Regressionsanalyse basierend auf den kleinsten Quadraten sehr gute Korrelationen von 0,98 zwischen Knochenpartikel- und Kalziumgehalt (Hildebrandt & Hirst, 1985).

Der Kalziumgehalt ist zudem ein wichtiger Parameter bei der Qualitätsbeurteilung von **Separatorenfleisch** (Crosland et al., 1995; Field, 2000; Hildebrandt et al., 2006). Bei Separatorenfleisch mit erhöhtem Kalziumgehalt von 0,1% (=100 mg/100 g oder 1000 ppm) des frischen Erzeugnisses oder darüber (Anh. IV der VO (EG) Nr. 2074/2005), darf ein Einsatz gem. Anh. III Abschn. V Kap. III Nr. 3 d) und e) und Nr. 4 g) der VO (EG) Nr. 853/2004 nur in wärmebehandelten Fleischerzeugnissen erfolgen. Dies rührt daher, dass ab diesem Wert von einer Veränderung der Knochenstruktur während des Gewinnungsprozesses ausgegangen werden kann. Es werden somit zwei Kategorien geschaffen. Die eine Kategorie schließt die Veränderung der Knochenstruktur ein und besitzt Kalziumgehalte von mindestens 0,1%. Die andere erhält die Knochenstruktur weitgehend und weist einen Kalziumgehalt auf, der sich unterhalb von 0,1% bewegt.

Zwischen den untersuchten Produkten „**Verarbeitungsfleisch**“ und „**Separatorenfleisch**“ treten hinsichtlich des Gehaltes an Kalzium und Knochenpartikeln große Unterschiede auf.

Das Separatorenfleisch aus Betrieb 1 zeigte Werte von 77,26 Knochenpartikeln/cm² und einen Knochenpartikelgehalt von 0,15%, während in Betrieb 2 lediglich 34,79 Knochenpartikel/cm² und 0,08% Knochenpartikelgehalt ermittelt werden konnten.

Hingegen lag das Verarbeitungsfleisch aus Betrieb 1 bei 5,83 Knochenpartikeln/cm² und einem Knochenpartikelgehalt von 0,025% beziehungsweise 3,33 Knochenpartikeln/cm² und einem Knochenpartikelgehalt von 0,007% in Betrieb 2.

Diese Werte zeigen ähnliche Tendenzen wie in den Untersuchungen von Nagy et al. (2007), die bei Geflügel-Separatorenfleisch Knochenpartikelgehalte von 0,22% bis 0,32% und beim Verarbeitungsfleisch Werte von 0,04% bis 0,08% vorfanden. Andere Autoren stellten in Separatorenfleisch mehr als 3 Knochenpartikel in 10 Schnitten und bei Verarbeitungsfleisch entsprechend weniger als 3 Knochenpartikel in 10 Schnitten fest (Tremlová et al., 2006). Noch geringere Werte stellten Branscheid und Troeger (2011) in Geflügelfleisch fest. Dort wurde handentbeintes Fleisch mit Verarbeitungsfleisch und Separatorenfleisch verglichen. Es traten Knochenpartikelmengen von 0,0 bis 0,01% in Verarbeitungsfleisch und 0,0 bis 0,13% in Separatorenfleisch auf. Auch diese Werte decken sich mit den vorliegenden Untersuchungen. Handentbeintes Material zeigte Knochenpartikelgehalte von 0,01 bis 0,19%. Diese erhöhten Werte in handentbeintem Fleisch sind nicht untypisch, da eine starke Abhängigkeit von der individuellen Schnitfführung besteht. Solche stark erhöhten Werte von 0,8% in handentbeintem Knochenputz vom Schwein wurden auch von Linke und Thumser (1964) festgestellt.

Ältere Quellen beschreiben ebenfalls deutlich höhere Werte. Bijker et al. (1983) ermittelten in Schweineseparatorenfleisch 0,4 bis 1,9% unter Verwendung der KOH-Methode mit anschließender histologischer Färbung durch Silbernitrat und Point-Count-Auswertung. Dieser Methodik bedient sich auch Koolmees (1986) und wies 1 bis 2% Knochen in Schweineseparatorenfleisch und 2 bis 4% in Geflügelseparatorenfleisch nach. Dies zeigt, dass durch die verbesserten Möglichkeiten der Fleischgewinnung durch Separatoren im Laufe der Jahre und Jahrzehnte der Knochenpartikeleintrag verringert werden konnte (Barbut, 2002).

Die **Kalziumwerte** von 0,056% in Betrieb 1 im Material Separatorenfleisch wurden ebenso von Betrieb 2 durch Kalziumgehalte von 0,024% unterschritten. Dagegen konnten im Verarbeitungsfleisch lediglich 0,0062% in Betrieb 1 und 0,0032% in Betrieb 2 nachgewiesen werden. Damit erreicht das Verarbeitungsfleisch lediglich ein Neuntel des Separatorenfleisch-Kalziumwertes aus Betrieb 1.

Auch andere Autoren stellten mitunter deutliche Unterschiede fest, so beispielsweise in Geflügelfleischprodukten, wie Brühwürsten, Salami und Hackfleisch, die Werte zwischen 0,025% und 0,108% zeigten (Tremlová & Starha, 2003).

In Geflügelseparatorenfleisch wurden Kalziumgehalte von 0,07% bis 0,025% gefunden (Koolmees, 1986), 0,067% (Karagöz & Şireli, 2014) oder auch 0,012% bis 0,037% (Tremlová

et al., 2006). Nagy et al. (2007) stellten hingegen deutlich höhere Werte von 0,19% in Separatorenfleisch und 0,1% in Verarbeitungsfleisch fest, während die Kontrollwerte aus Brustmuskel und Schenkelmuskel bereits auch schon 0,06% und 0,05% betragen. Dies konnte auch Henckel et al. (2004) in seinen Versuchen feststellen. Während Ang und Hamm (1982) Werte von 0,053% bis 0,091% in Separatorenfleisch aus Hühnerhälsen feststellten und in händisch gewonnenen Material lediglich 0,017% bis 0,034%, trat auch bei Abdullah und Al-Najdawi (2005) mit 0,163% und 0,230% von ganzen und enthäuteten Hühnern im Vergleich zu manuell entbeinten Hühnern (0,017% und 0,014%) ein ähnlicher Unterschied auf. Hier war also ein deutlicher Unterschied zwischen maschineller und händischer Entbeinung gegeben. Branscheid et al. (2008b) fanden in Separatorenfleisch vom Oberschenkel des Masthähnchens einen Gehalt an Knochenpartikeln von 0,79% mit einem Kalziumgehalt von 0,31%.

Ältere Ergebnisse zeigen in Separatorenfleisch Spannen von 0,02% bis 0,41% (Winter, 1978) oder in Rinderteilen sogar Werte von 1,72% (Chant, 1977).

Dies macht deutlich, dass sich die Kategorien Verarbeitungsfleisch und Separatorenfleisch in den Ergebnissen von Knochenpartikelanzahl, Knochenpartikelfläche und Kalziumwert so stark unterscheiden, dass ohne Einschränkung von zwei verschiedenen Produktkategorien gesprochen werden kann. Überschneidungen oder Fehlinterpretationen bei dem reinen Rohstoff können auf dieser Basis kaum vorkommen. Die starken Qualitätsunterschiede wurden auch von anderen Autoren festgestellt (Tremlová et al., 2006; Nagy et al., 2007). Branscheid et al. (2008b) fanden in ihren Versuchen einen Kalziumgehalt, der sich von Verarbeitungsfleisch zum Separatorenfleisch sogar um das 20-fache erhöhte. Eine Verwechslungsgefahr anhand der Untersuchungsergebnisse ist somit praktisch ausgeschlossen.

Interessanterweise korreliert im Material Separatorenfleisch der Knochenpartikelgehalt deutlich besser mit dem Kalziumgehalt. Es besteht dabei eine hohe Korrelation von 0,62 nach Cohen (2013). Dies legt nahe, dass die Korrelation zwischen Knochenpartikelgehalt und Kalziumgehalt zunimmt, je mehr Knochenpartikel und Kalzium im Material vorhanden sind.

5.2.3.2.3 Technologie

Auch die verwendete Technologie der Verarbeitungsfleischgewinnung beeinflusst die spätere Qualität des Verarbeitungsfleisches. Die vielen auftretenden Einflussfaktoren sind allerdings in der Praxis schwerlich losgelöst voneinander zu betrachten. Dies beginnt allein schon damit, dass in der Praxis unterschiedliche Separationstechniken verwendet werden, wie in 2.1.3.2 erläutert. Auch im direkten Vergleich von Bandseparatoren treten Unterschiede auf. Verschiedene Hersteller und auch unterschiedliche Modelle eines Herstellers wirken individuell auf das Ausgangsmaterial ein (Sams, 2001). Hinzu kommt, dass viele Einstellungen am Separator verändert werden können wie beispielsweise die Bandspannung. Allerdings sind

die Einstellungen lediglich als Sollwert zu betrachten. In der Praxis variiert der auf das Material wirkende Druck ununterbrochen. Je nach zugeführter Rohstoffmenge treten wellenartig höhere Druckspitzen auf. Eine kontinuierliche Einspeisung ist aufgrund des inhomogenen Rohstoffs und der diskontinuierlichen Beladung der zuführenden Transportbänder nicht möglich.

Nichtsdestotrotz stellt sicherlich der Anpressdruck eine nicht unbedeutende, wenn auch variable Einflussgröße dar. Dies zeigen auch die vorliegenden Ergebnisse, welche unter Verwendung eines Kolbenseparators in Betrieb 3 ermittelt wurden. Die Erhöhung des Anpressdruckes um 20 bar führt zu einem Anstieg der Knochenpartikelanzahl von 0,94 auf 5,74 Knochenpartikel/cm² im Material 1. Flügelglied beziehungsweise 1,94 auf 4,79 im Material 1. Mittelflügel. Der Knochenpartikelgehalt stieg analog von 0,004 auf 0,01% im Material 1. Flügelglied bzw. von 0,003 auf 0,006% im Mittelflügel.

Dies zeigt, dass zwar eine Erhöhung des Anpressdruckes grundsätzlich auch zu einer Erhöhung der Knochenpartikelanzahl führt, dieser Zusammenhang aber nicht sehr streng ist und aus oben erwähnten Gründen deutlichen Schwankungen unterliegt.

Die Kalziumwerte lassen darüber hinaus ebenfalls keine eindeutige Aussage zu. Es ist daher als wahrscheinlich anzusehen, dass die Druckunterschiede bedeutend größer (>100 bar zu 400 bar (Bauer, 2013a)) sein müssen, bevor sich eine enge Relation zum Knochenpartikelgehalt sowie zum Kalziumgehalt einstellt. Dies zeigten auch die Ergebnisse von Barbut et al. (1989), welche ganze Hähnchenbrüste mit Haut und Knochen in einem Schneckenseparator entbeinten und in den ersten drei Druckeinstellungen keine Veränderung des Kalziumgehalts feststellten. Erst ein höherer Druck sorgte für einen sprunghaften Anstieg von Kalzium und Fleischausbeute. Andere Autoren stellten starke Zusammenhänge fest, die sich allerdings auch auf Separatorenfleisch mit deutlich schlechteren Rohstoffen und entsprechend höheren Drücken bezogen (Beraquet, 2000; Nitsch, 2005; Nagy et al., 2007; Tasić et al., 2017); im Gegensatz zu den Untersuchungen von Botka-Petrak (2011) mit Kalziumwerten von 0,0059% bis 0,0077% kamen beispielsweise Kalziumwerte von 0,2936%, vor. Aber es gibt auch Versuche in denen abhängig vom verwendeten Separatortyp keine großen Unterschiede durch Druckerhöhung auftreten (Komrska et al., 2010). Michalski (2009) stellt abhängig vom verwendeten Separatortyp Unterschiede im Kalziumgehalt fest. Er ermittelte in Separatorenfleisch aus Kolbenseparatoren mehr als dreimal mehr Kalzium als in Material aus dem Bandseparator. Die Vorteile des Bandseparators traten auch im Vergleich zu Schneckenseparatoren bei den Versuchen von Josefowitz (2008) zu Tage, welcher Putenseparatorenfleisch untersuchte.

5.3 Beurteilung von Partikelzählung, Planimetrie und Kalziumbestimmung

Zur Beurteilung, welche die am besten geeignete Methode zur Ermittlung eines Knochenpartikeleintrags darstellt, gilt es folgende Punkte zu berücksichtigen:

Die Partikelzählung als gegenwärtiges Referenzverfahren mit Verankerung in der amtlichen Methode birgt zahlreiche Probleme (L 06.00-13 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des LFGB). In der Summe kristallisiert sich als größtes Manko heraus, dass sie keinen wirklichen Anspruch auf Quantifizierbarkeit des Knochenpartikeleintrags erheben kann. So zeigt sich als grundlegendes Problem, dass die Verarbeitung eines Rohstoffs mit einem sich darin befindlichen Knochenpartikel zu einer Zerkleinerung desselben führen kann. Zusammen mit einer anschließenden Vermischung geht die Zuordenbarkeit dieser Bruchstücke zueinander vollständig verloren, so dass ein identischer Sachverhalt deutlich negativer interpretiert wird. Ferner ist die veranschlagte Mindestgröße eines Knochenpartikels willkürlich und wird in der Praxis nicht einheitlich angewendet (s. 5.1). Dies führt im oben beschriebenen Beispiel dazu, dass eine hinreichend hohe Zerkleinerung eines Knochenpartikels histologisch praktisch zur Knochenpartikelfreiheit führt.

Ferner sind für eine Anwendung einer Mindestgröße bereits planimetrische Messungen notwendig. Die aktuell praktizierten Grenzwerte von mindestens 1,5 Knochenpartikeln/cm² nach Schulte-Sutrum und Horn (2003) müssen ebenfalls als problematisch betrachtet werden. Die Untersuchungen zeigen, dass je nach Sensitivität der verwendeten Färbung und je nach individueller Anwendung der Mindestgröße unterschiedliche Knochenpartikelanzahlen resultieren. Dabei zeigte sich, dass grundsätzlich deutlich mehr Knochenpartikel nachgewiesen werden können, wenn eine höhere Sensitivität erreicht wird. Somit müssten neue Grenzwerte definiert werden, sofern an der Knochenpartikelzählung festgehalten wird. Ein weiteres viel diskutiertes Problem ist die korrekte und einheitlich angewandte Zählweise von Knochenpartikeln. Der gegenwärtig praktizierte Lösungsansatz von Lohneis (2014) kann die realen Gegebenheiten nicht adäquat widerspiegeln, da ähnlich wie bei der Mindestgröße hier ein willkürlicher gewählter Radius verwendet wird.

Eine adäquate Quantifizierung des Knochenpartikelgehalts lässt sich nach Einschätzung des Autors lediglich durch die Planimetrie verwirklichen, wie dies auch Upmann und Lade (2015) vermuten. Leider muss aus technischen Gründen auch hier eine Mindestgröße definiert werden, um eine Praxistauglichkeit zu gewährleisten. Ergänzend zur Planimetrie sollte ebenso die Kalziumbestimmung Verwendung finden. Die Kombination aus beiden Messmethoden stellt durch zwei unabhängige Parameter eine größtmögliche Sicherheit dar und führt so zu belastbaren Ergebnissen. Dies ist unter anderem auch deshalb notwendig, da natürlicherweise starke Schwankungen im Untersuchungsmaterial auftreten. Diesem Problem lässt sich nur

durch eine hohe Anzahl von Stichproben begegnen. Die in den Versuchen ermittelte Anzahl von 30 Schnitten wäre dafür grundsätzlich geeignet, würde aber in der Praxis einen erheblichen Mehraufwand bedeuten. Obgleich zu beachten ist, dass eine Anzahl von 30 Schnitten bereits bei der Point-Count-Methode in Teilen zum Einsatz kommt (Beneke, 2018).

Die praktizierten Kalziumgrenzwerte von 200 mg/kg können laut den ermittelten Ergebnissen dieser Arbeit beibehalten werden. Sie zeigen in den Versuchen stets eine korrekte Zuordnung von Verarbeitungs- und Separatorenfleisch an. Allerdings sollte der Kalziumwert nur als Nachweis von Separatorenfleisch gelten, sofern auch der histologische Nachweis einen kritischen Wert erreicht.

6 Schlussfolgerung

Schlussendlich kann festgehalten werden, dass die entwickelte Methode zum softwarebasierten Nachweis von Knochenpartikeln hinreichend geeignet ist. Vielmehr zeigt sie in vielen Bereichen Vorteile gegenüber den herkömmlich verwendeten Techniken.

Die Silbernitratimprägnierung, auf der die Methode fußt, ist sensitiver und gleichzeitig nur wenig aufwendiger als die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra. Ihr vermeintlicher Mangel an Spezifität konnte in den Versuchen nicht reproduziert werden. Darüber hinaus eignet sie sich sehr gut zur softwarebasierten Auswertung. Die automatisierte Zählung von Knochenpartikeln sorgt damit für eine praktikable und komfortable Auswertung bei hohen Knochenpartikelanzahlen. Ferner ist die softwarebasierte Auswertung die Basis für planimetrische Berechnungen zur Ermittlung eines Knochenpartikelgehaltes. Die Planimetrie kann gegenüber der herkömmlichen Partikelzählung auch hohen Ansprüchen an Objektivität und Reproduzierbarkeit gerecht werden, insbesondere, wenn sie mit der Kalziumbestimmung kombiniert wird. Letztere erweist sich somit als nützliches ergänzendes Werkzeug zur Histologie.

Die Untersuchungen des Geflügel-Verarbeitungsfleisches zeigen, dass es sich hierbei grundsätzlich um einen Rohstoff handelt, welcher in Produkten der Kategorie Spitzenqualität bedenkenlos eingesetzt werden kann. Dies gilt auch bei typischerweise auftretenden starken Schwankungen der Ergebnisse. Nichtsdestotrotz müssen diese Schwankungen mit einer hohen Anzahl an Schnitten ausgeglichen werden, um valide Aussagen generieren zu können. Die gegenwärtig angewendete Anzahl von 6 Schnitten ist dafür nicht ausreichend.

7 Zusammenfassung

Softwarebasierte Knochenpartikelanalyse in Geflügel-Verarbeitungsfleisch zur Herstellung von Fleischerzeugnissen der Kategorie Spitzenqualität

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine softwarebasierte Methode zur Knochenpartikelanalyse zu entwickeln. Diese sollte hinsichtlich Sensitivität und Spezifität den hohen Anforderungen gerecht werden, die nötig sind, um eine valide Aussage über die Einsetzbarkeit von Geflügel-Verarbeitungsfleisch in Produkten der Kategorie Spitzenqualität zu machen.

Dazu wurden die drei gängigsten und in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsmethoden erwähnten histologischen Knochenfärbungen miteinander verglichen. Die Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra sowie die Silbernitratimprägnierung stellten sich dabei schnell als die erfolgversprechendsten heraus, während die Färbung nach Calleja aufgrund ihrer mangelnden Spezifität ausschied. So wurden erstere in verschiedensten Versuchen auf ihre Eigenschaften und ihre Eignung zur softwarebasierten Knochenpartikelanalyse überprüft. Die Ergebnisse zeigten deutliche Vorteile der Silbernitratimprägnierung gegenüber der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra.

Die Silbernitratimprägnierung wurde entsprechend für die Versuche zur Beurteilung des Rohstoffs Geflügel-Verarbeitungsfleisch herangezogen. Ergänzend wurde eine Kalziumbestimmung und eine Vollanalyse mittels Nahinfrarotspektroskopie durchgeführt.

Im Folgenden wurden unterschiedliche Einflussfaktoren auf die Qualität des Verarbeitungsfleisches geprüft. Dazu zählten die Ermittlung der Variabilität zwischen verschiedenen Betrieben, zwischen den Wochentagen einer Arbeitswoche sowie zwischen den verschiedenen Rohstoffen in Form verschiedener Teilstücke. Diese umfassten Gabelbeine, Rücken, Schultern, Unterkeulen, Filetabschnitte, Brustbein sowie das 1. Flügelglied und den Mittelflügel. Zusätzlich wurde der Einfluss unterschiedlicher Anpressdrücke beleuchtet und das Verarbeitungsfleisch von Masthähnchen mit dem von weiblichen und männlichen Puten verglichen.

Die Ergebnisse zeigten teilweise große Unterschiede hinsichtlich Knochenpartikelanzahl sowie Knochenpartikel- und Kalziumgehalt. Selbst zwischen den Wochentagen einer Arbeitswoche in einem Betrieb traten starke Schwankungen auf. Zusammen mit den übrigen Ergebnissen führte dies zu der Annahme, dass der größte Einflussfaktor von dem verwendeten Rohstoff ausgeht. So konnten im Folgenden die verschiedenen Rohstoffkategorien gezielt beleuchtet und deren Qualität anhand der untersuchten Parameter

bewertet werden. Die Ergebnisse wurden dann den Anforderungen an Rohstoffe für Spitzenqualität gegenübergestellt.

Es konnte dabei festgestellt werden, dass sämtliche Ergebnisse, ermittelt durch Knochenpartikelzählung, Knochenpartikelflächen- und Kalziumbestimmung, wie auch die Werte der Vollanalyse für eine Rohstoffqualität sprachen, welche eine Einsetzbarkeit in Produkten der Kategorie Spitzenqualität bedenkenlos möglich machen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein bedeutender Unterscheid zwischen Verarbeitungs- und Separatorenfleisch besteht.

8 Summary

Software-based bone particle analysis in processed poultry meat for the production of meat products of the category “top quality”

The aim of the current paper was to develop a software-based bone particle analysis that can fulfill the high requirements in terms of sensitivity and specificity that are necessary in order to evaluate the suitability of raw poultry processing meat in the production of „top quality“ products.

For this purpose, the three most common histological bone staining methods described in the official collection of examination methods according to § 64 LFGB were compared. The Pfeiffer, Wellhäuser and Gehra staining and the silver nitrate impregnation quickly turned out to be the most promising, while the Calleja staining was eliminated due to its lack of specificity. The properties and suitability of the two first stains were checked against each other in various tests. This also included the suitability for software-based bone particle analysis. The results showed clear advantages of silver nitrate impregnation compared to the Pfeiffer, Wellhäuser and Gehra staining. Thus, silver nitrate impregnation was used for assessing the raw poultry processing meat. In addition, the silver nitrate impregnation was supplemented by a calcium determination and a full analysis was routinely carried out by means of near-infrared spectroscopy.

Various factors influencing the quality of mechanically processed meat were examined below. This included the determination of the variability between different companies within a working week as well as the influence of different raw materials in the form of different carcass parts. Included were furculae, backs, shoulders, drumsticks, trimmings, sterni as well as the first wing segment and the middle wing. In addition, the influence of different contact pressures was examined and the processed meat of broilers was compared with that of female and male turkeys. Results partially showed large differences in terms of the number and content of bone particles as well as calcium content. Even during a working week in one company, there were strong fluctuations between single days. Together with the other results, this led to the assumption that the raw material used poses the greatest influencing factor. In the following, the various raw material categories were specifically examined and their quality was assessed based on the examined parameters. The results were then compared to the “top quality” category, for the definition of which the guidelines for meat and meat products and the guidelines of the Federal Association of Poultry Slaughterhouses were used.

All results determined by bone particle counting, bone particle area and calcium determination, as well as the values of the full analysis are a strong indication for a raw material quality, which makes it possible to use it in products of the category „top quality“. In addition, it could be

shown that there is a significant difference between mechanically processed and mechanically separated meat.

9 Literaturverzeichnis

Abdullah, B., & Al-Najdawi, R. (2005). Functional and sensory properties of chicken meat from spent-hen carcasses deboned manually or mechanically in Jordan. *International journal of food science & technology*, 40(5), 537-543.

ALTS. (2012). TOP 15 Beurteilung von Knochenpartikeln im histologischen Präparat bei Würsten der Spitzenqualität. 70. Arbeitstagung 2012.

ALTS. (2013). TOP 32 Bewertung von erhöhten Drüsenpartikelzahlen in Brühwürsten bei Spitzenqualität. 71. Arbeitstagung 2013.

Ang, C. Y. W., & Hamm, D. (1982). Proximate analyses, selected vitamins and minerals and cholesterol content of mechanically deboned and hand-deboned broiler parts. *Journal of Food Science*, 47(3), 885-888.

Barbut, S. (2002). *Poultry Products Processing - An Industry Guide*: CRC Press.

Barbut, S. (2015). *The science of poultry and meat processing*.

Barbut, S., Draper, H., & Cole, P. (1989). Effect of mechanical deboner head pressure on lipid oxidation in poultry meat. *Journal of Food Protection*, 52(1), 21-25.

Bauer, A. (2013a). Aktuelles aus der internationalen Fleischforschung : Bewertung von Separatorenfleisch (Teil 1) - Rechtliche Rahmenbedingungen, eingesetzte Techniken und Einschätzung der Gesundheitsrisiken ; ein Review. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)*, 8/2013, 84-86.

Bauer, A. (2013b). Aktuelles aus der internationalen Fleischforschung : Bewertung von Separatorenfleisch (Teil 2) - Identifikation und Bewertung von Parametern und Nachweismethoden - ein Review. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)*, 9/2013, 97-99.

Baum, W., Ernst, H., & Zohrer, P. (1980). Untersuchungen zur Beeinflussung der Größe und Anteile der Knochenpartikel bei der maschinellen Entfleischung von Rinder- und Schweinefleischknochen. *Fleisch*.

Beneke, B. (2018). Technologie verändert die Muskelstruktur. *Fleischwirtschaft*, 02/2018, 62-68.

Benjamin, M., Evans, E. J., & Copp, L. (1986). The histology of tendon attachments to bone in man. *Journal of anatomy*, 149, 89.

Beraquet, N. J. (2000). Carne mecanicamente separada de aves. SEMINÁRIO E CURSO TEÓRICO-PRÁTICO "AGREGANDO VALOR À CARNE DE AVES". Campinas.

Berzaghi, P., Dalle Zotte, A., Jansson, L., & Andrighetto, I. (2005). Near-infrared reflectance spectroscopy as a method to predict chemical composition of breast meat and discriminate between different n-3 feeding sources. *Poultry Science*, 84(1), 128-136.

- Bijker, P. G. H., Koolmees, P. A., & Tuinstra-Melgers, J. (1985). Histological detection of mechanically deboned meat in meat products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 36(3), 71-74.
- Bijker, P. G. H., Koolmees, P. A., & van Logtestijn, J. G. (1983). Tissue Composition of Mechanically Deboned Pork (MDP). *Meat science*, 9(4), 257-269.
- BITV. Barrierefreie-Informationstechnik-Verordnung vom 12. September 2011 (BGBl. I S. 1843), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 21. Mai 2019 (BGBl. I S. 738) geändert worden ist. Frankfurt am Main: Antiphon Verlag.
- Botka-Petrak, K., Hraste, A., Lucic, H., Gottstein, Z., Duras Gomerivic, M., Jaksic, S., & Petrak, T. (2011). Histological and Chemical Characteristics of Mechanically Deboned Meat of Broiler Chickens. *Veterinarski Arhiv*. 81(2), 273-283.
- Branscheid, W. (2002). Polarisationsoptischer Nachweis von Knochenpartikeln in Separatorenfleisch. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)*, 82(7), 92-95.
- Branscheid, W., Judas, M., & Horeth, R. (2009). The morphological detection of bone and cartilage particles in mechanically separated meat. *Meat Sci*, 81(1), 46-50. doi:10.1016/j.meatsci.2008.06.018
- Branscheid, W., Judas, M., & Höreth, R. (2007). Morphologischer und radiologischer Nachweis von Knochen- und Knorpelpartikeln in Separatorenfleisch. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach*, 45.
- Branscheid, W., Judas, M., Wagner, H., & Troeger, K. (2008a). Investigations on the characterisation of mechanically deboned broiler meat. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)*, 88(11), 106-111.
- Branscheid, W., & Troeger, K. (2011a). Mechanische Gewinnung von Fleisch und Restfleisch bei Geflügel. *Mitteilungsblatt Fleischforschung Kulmbach* 50, Nr. 193, 123-140.
- Branscheid, W., Wagner, H., Troeger, K., & Judas, M. (2008b). Furcula-Fleisch - Eigenschaften und Bewertung. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)*, 88(11), 106-111.
- Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, B. (2020a). Pro-Kopf-Konsum von Geflügelfleisch in Deutschland in den Jahren 1991 bis 2019. Statista.
- Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, B. (2020b). Konsum von Geflügelfleisch nach Arten in Deutschland in den Jahren 2010 bis 2019. Statista.
- Bundesministerium für Risikobewertung (2006). Separatorenfleisch: Der Grad der Veränderung der Muskelfaserstruktur ist für die Einstufung unerheblich.
- Bundesverband der Geflügelschlachtereien e. V. (2017). Leitfaden - Anforderungen an die Qualität von maschinell unter Druckanwendung gewonnenem Fleisch zur Herstellung von Geflügelfleischprodukten mit hervorhebenden Hinweisen.

Calhoun, C., Schnell, T., & Mandigo, R. (1999). Properties and utilization of pork from an advanced meat recovery system. *Journal of Food Science*, 64(1), 76-81.

Calleja, C. (1897). Método de triple coloración con el carmín de litinado y el micro-carmín de indigo. *Revista Trimestral Micrografía*, 2.

Chant, J. L. D., L.; Field, R. A.; Kruggel, W. G.; Chang, Y. (1977). Composition of Palatability of Mechanically Deboned Meat and Mechanically Separated Meat. *Journal of Food Science*, 42(2), 306-309.

Chekri, R., Noël, L., Millour, S., Vastel, C., Kadar, A., Sirot, V., . . . Guérin, T. (2012). Calcium, magnesium, sodium and potassium levels in foodstuffs from the second French Total Diet Study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2), 97-107.

Cohen, J. (2013). *Statistical power analysis for the behavioral sciences*: Routledge.

Cottin, E. (2004). Einfluss von angereicherter Haltungsumwelt und Herkunft auf Leistung, Verhalten, Gefiederzustand, Beinstellung, Lauffähigkeit bei männlichen Mastputen, Tibiale Dyschondroplasia. Leipzig. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover. Hannover

Cozzolino, D., & Murray, I. (2002). Effect of sample presentation and animal muscle species on the analysis of meat by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 10(1), 37-44.

Crosland, A. R., Patterson, R. L., Higman, R. C., Stewart, C. A., & Hargin, K. D. (1995). Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - I: Chemical composition. *Meat Sci*, 40(3), 289-302.

Davies, R. J. (2004). Cutting and Boning. Traditional." (2004): 375-381.

Demos, B., & Mandigo, R. (1995). Composition and chemistry of mechanically recovered beef neck-bone lean. *Journal of Food Science*, 60(3), 576-579.

Engel, M. B. Z., E. (1967). Changes in Cells, Matrix and Water of Calcifying Turkey Leg Tendons. *American Journal of Anatomy*, 120(3), 489-525.

Europäischer Gerichtshof (2014). Rechtssache C-453/13 entschieden vom Europäischen Gerichtshof.

European Food Safety Authority (EFSA), P., Italy. (2013). Scientific Opinion on the public health risks related to mechanically separated meat (MSM) derived from poultry and swine. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).

FDA. (2013). US Code of Federal Regulations - Title 9: Animals and Animal Products. Part 319 - Definitions and standards of identity or composition. Subpart A - General. § 319.5. 9CFR319.

Fechner, T., Röser, A., & Upmann, M. (2017). Histologische Knochenpartikelfärbungen im Vergleich – Genauigkeit von Alizarin, Kossa und Co. Poster präsentiert auf der 58. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Garmisch-Partenkirchen.

Fechner, T., Röser, A., & Upmann, M. (2018). Stolpersteine beim histologischen Knochenpartikelnachweis. Poster präsentiert auf der 59. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Garmisch-Partenkirchen.

Field, R. (2004). Mechanically recovered meat in: Encyclopedia of Meat Sciences: C Devine, D Dikeman.

Field, R., & Riley, M. (1974). Characteristics of meat from mechanically deboned lamb breasts. *Journal of Food Science*, 39(4), 851-852.

Field, R. A. (1999). Bone Marrow Measurements for Mechanically Recovered Products From Machines that Press Bones. *Meat science*, 51(3), 205-214.

Field, R. A. (2000). Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. *Meat science*, 55(3), 255-264.

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

Fischer-Colbrie, G., Maier, J., Robra, K.-H., & Guebitz, G. (2005). Degradation of the indigo carmine dye by an anaerobic mixed population. In *Environmental Chemistry* (pp. 289-294): Springer.

Fleischerzeugnisse. (2015). Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, Neufassung vom 25.11.2015 (BAnz AT 23.12.2015 B4, GMBL 2015 S. 1357).

Fleming, R. H. (2008). Nutritional factors affecting poultry bone health: Symposium on 'Diet and bone health'. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(2), 177-183.

Froning, G. (1981). Mechanical deboning of poultry and fish. In *Advances in food research* (Vol. 27, pp. 109-147): Elsevier.

Gallyas, F., & Wolff, J. (1985). Oxalate pretreatment and use of a physical developer render the Kossa method selective and sensitive for calcium. *Histochemistry*, 83(5), 423-430.

Gorski, J. P. (1998). Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 9(2), 201-223.

Grünewald, T., & Kießling, E. (2017). Vorläufige Ergebnisse zur Qualitätsbeurteilung feiner Brühwurst anhand vergleichender histologischer Untersuchungen mittels Knochenzählung und digitaler planimetrischer Phasenanalyse - Vorschlag eines planimetrischen Grenzwertes-. Paper presented at the 58. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Garmisch-Partenkirchen.

- Grynblas, M. (1993). Age and disease-related changes in the mineral of bone. *Calcified tissue international*, 53(1), 57-64.
- Harmening, W. (2017). Kontrastempfindlichkeit und Sehschärfe bei Tieren. *Der Ophthalmologe*, 114(11), 986-996.
- Henckel, P., Vyberg, M., Thode, S., & Hermansen, S. (2004). Assessing the quality of mechanically and manually recovered chicken meat. *LWT - Food Science and Technology*, 37(6), 593-601. doi:10.1016/j.lwt.2004.01.006
- Hildebrandt, G. (2007). Anmerkungen zum Separatorenfleisch. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2(4), 463.
- Hildebrandt, G., & Hirst, L. (1985). Determination of the collagen, elastin and bone content in meat products using television image analysis. *Journal of Food Science*, 50(3), 568-572.
- Hildebrandt, G., & Josefowitz, P. (2007). Analytik benötigt klare Vorgaben. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)*, 87(1), 21-23.
- Hildebrandt, G., & Köpernik, K. (2007). Deklaration von Separatorenfleisch. *Fleischwirtschaft* 06/2007, 21-25
- Hildebrandt, G., Rauscher, K., & Stenzel, W.-R. (2006). Analysenmerkmale zum Nachweis von Separatorenfleisch 2. Mikroskopische Untersuchung. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)*, 86(6), 111-114.
- Hildebrandt, G., Weiß, H., & Berner, H. (1974). Bedeutung nicht zu Skelettmuskulatur und Bindegewebssubstanz zahlender Gewebe des Fleisches für die histometrische Qualitätsbeurteilung von Hackfleisch sowie Roh- und Bruhwurst. *Fleischwirtschaft*.
- Hill, R. M., & Hites, B. D. (1968). Meat and meat products. Determination of small bone particles in meat. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 51, 1175-1177.
- Honikel, K., & Schwägele, F. (1998). Biochemische Prozesse der Fleischbildung. *Qualität von Fleisch und Fleischwaren*, Deutscher Fachverlag, 2, 593-615.
- Horn, D., & Langen, M. (2017). Rohstoffqualität - Alles Spitze?! *Fleischwirtschaft* 04/2017, 12-17
- Horn, D., & Langen, M. (2020). *Bildatlas Histologie Fleisch und Fleischerzeugnisse: Befunde beurteilen - Ergebnisse sicher bewerten*: Behr's Verlag.
- Hoyte, D. (1960). Alizarin as an indicator of bone growth. *Journal of anatomy*, 94(Pt 3), 432.
- Josefowitz, P. (2008). *Histologische, mikrobiologische und chemische Qualitätsmerkmale von Putenseparatorenfleisch*. (Dissertation). Freie Universität Berlin, Berlin.
- Josefowitz, P., Hildebrandt, G., Islam, R., & Klare, H. J. (2006). Phasenanalytische Planimetrie zur quantitativen Bestimmung des Knochenanteils, des bindegewebseiweißfreien Fleischeiweißes im

Fleischeiweiß und anderer Gewebekomponenten in histologischen Schnitten. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 1(S2), 214-214. doi:10.1007/s00003-006-0160-9

Karagöz, A., & Şireli, U. T. (2014). Mekanik olarak ayrılmış broiler etlerinin (MABE) bazı mikrobiyolojik ve kimyasal niteliklerinin belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 61(3), 185-191.

Kassem, M., Rungby, J., Mosekilde, L., & Eriksen, E. F. (1992). Ultrastructure of human osteoblasts and associated matrix in culture. *Apmis*, 100(1-6), 490-497.

Komrska, P., Tremlová, B., Štarha, P., Simeonovová, J., & Randulová, Z. (2010). A Comparison of Histological and Chemical Analysis in Mechanically Separated Meat. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 59(1), 145-152.

Königsmann, R., Hildebrandt, G., & Sinell, H. (1980). Quantitativer Knochennachweis in Fleischerzeugnissen mittels Fernsehbildanalyse. *Arch. Lebensmittelhyg*, 31(6).

Koolmees, P. A. B., P. G.; van Logtestijn J. G.; Tuinstra-Melgers, J. (1986). Histometrical and Chemical Analysis of Mechanically Deboned Pork, Poultry and Veal. *Journal of Animal Science*, 63(6), 1830-1837.

Kratz, K.-D. (1971). *Histometrische und histologische Untersuchungen an Geflügelwürsten*. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover

Lai, S., Barbaro, M., & Bonfiglio, A. (2015). Organic fet-based DNA hybridization sensor with sub-picomolar sensitivity. Paper presented at the 2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC).

Lang, G. (2012). *Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*: Springer-Verlag.

Langen, M., & Horn, D. (2020). *Bildatlas Histologie Fleisch und Fleischerzeugnisse*. Behr's Verlag, Hamburg.

Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse (2015). *Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches in der Neufassung vom 25.11.2015 (BAnz AT 23.12.2015 B4, GMBL 2015 S. 1357)*.

Lerche, M., Rievel, M., & Goertler, V. (1957). *Lehrbuch der Tierärztlichen Lebensmittelüberwachung*. Hannover.

LFGB. *Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. Juni 2013 (BGBl. I S. 1426)*, das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 24. April 2019 (BGBl. I S. 498) geändert worden ist.

Li, H.-X., Xu, B., Tang, L., Zhang, J.-H., & Mao, Z.-G. (2015). Reductive decolorization of indigo carmine dye with *Bacillus* sp. MZS10. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 30-37.

Linke, H., Arneth, W., & Bem, Z. (1974). Ein neues Verfahren zur mechanisierten Restfleischgewinnung unter hygienischen, analytischen und lebensmittelrechtlichen Gesichtspunkten. *Fleischwirtschaft*.

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

Liu, A., Nishimura, T., & Takahashi, K. (1994). Structural changes in endomysium and perimysium during post-mortem aging of chicken Semitendinosus muscle—Contribution of structural weakening of intramuscular connective tissue to meat tenderization. *Meat Science*, 38(2), 315-328.

Lohneis, M. (2014). Beurteilungsstrategien Fleischerzeugnisse mit Knochenpartikeln. DVG Tagung Garmisch-Partenkirchen.

Madejczyk, M. B., D. (2008). Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. *Analytica Chimica ACTA*, 617, 11 - 17.

Mark, K.-K., & Ho, W. (1995). Microbial degradation of indigo and indigo carmine with bacteria strain. *U.S. Patent No. 5,418,161*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Mayer, A., Smith, J., Kropf, D., Marsden, J., & Milliken, G. (2007). A comparison in the composition of recovered meat produced from beef neckbones processed using hand boning, a traditional Advanced Meat Recovery (AMR) system, and a Desinewated Minced Meat system. *Meat Science*, 77(4), 602-607.

McDevitt, R., Gavin, A., Andrés, S., & Murray, I. (2005). The ability of visible and near infrared reflectance spectroscopy to predict the chemical composition of ground chicken carcasses and to discriminate between carcasses from different genotypes. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 13(3), 109-117.

Michalski, M. (2009). Contents of calcium in mechanically separated meat produced by traditional method (pressure) and using techniques that do not alter the structure of the bones. *Roczniki Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego*, 47(1), 77-82.

Mohamed, M. A., Zahran, D. A., Kassem, G. M., Emara, M., & Mansour, N. (2016). Detection of mechanically recovered poultry meat (MRPM) in traditional Egyptian luncheon (emulsion type sausage). *Polish journal of food and nutrition sciences*, 66(1), 17-24.

Mulisch, M., & Welsch, U. (2015). *Romeis-Mikroskopische Technik*: Springer-Verlag.

Nagy, J., Lenhardt, L., Korimova, L., Dicakova, Z., Popelka, P., Pipova, M., & Tomkova, I. (2007). Comparison of the Quality of Mechanically Deboned Poultry Meat after Different Methods of Separation. *Meso*, 9(2), 92-95.

Negatu, Z. M., J.I.; McMillan, K.W. (2005). Determination of small Bone Fragments in mechanically separated Rabbit Meat. *Journal of muscle foods*, 17(2), 185-197.

Nishimura, T. (2010). The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Animal science journal*, 81(1), 21-27.

Nishimura, T., Fang, S., Ito, T., Wakamatsu, J., & Takahashi, K. (2008). Structural weakening of intramuscular connective tissue during postmortem aging of pork. *Animal science journal*, 79(6), 716-721.

Nishimura, T., Hattori, A., & Takahashi, K. (1995). Structural weakening of intramuscular connective tissue during conditioning of beef. *Meat Science*, 39(1), 127-133.

NITSCH, P. (2005). Die sensorische Qualität von MEF: Anzahl, Größenverteilung und Prozessabhängigkeit von Knochenpartikeln in mechanisch entbeintem Restfleisch (MEF) des Advanced-Meat-Recovery-System (AMRS). *Fleischwirtschaft (Frankfurt)*, 85(2), 90-92.

Oberverwaltungsgericht Lüneburg (2015). Beschluss des Oberverwaltungsgerichts Lüneburg vom 27.10.2015 - 13 ME 115/15 Anhang 1 Nr 114 EGV 853/2004.

Otto-Kuhn, D., & Stürmer, J.-A. (2016). Histologische Untersuchung von Brühwurstzeugnissen auf Knochenpartikel: Vergleich Histometrie - Planimetrie. Posterbeitrag auf der 57. DVG-Arbeitstagung Lebensmittelhygiene in Garmisch-Partenkirchen vom 27.09. bis 30.09.2016.

Otto-Kuhn, D., & Stürmer, J.-A. (2017). Nachweis von Knochenpartikeln - Viele Volltreffer bei preisgünstigen Brühwurstzeugnissen aus oder mit Geflügelfleisch. *Fleischwirtschaft*(3), 64.

Peli, E. (1990). Contrast in Complex Images. *JOSA A*, 7(10), 2032-2040.

Pfeiffer, G., Wellhauser, R., & Gehra, H. (1975). Eine Trichromfärbung zur Darstellung von Muskeleiweiss, Bindegewebsweiss und mineralisch behaftetem Knochengewebe. *Archiv für Lebensmittel-Hygiene*.

Pospiech, M., Tremlová, B., Eliášová, M., & Talandová, M. (2013). The optimisation of the bone fragment content determination in histological sections. *Maso International–Journal of Food Science and Technology*, ISSN, 155-170.

Pospiech, M., Zikmund, T., Javůrková, Z., Kaiser, J., & Tremlová, B. (2019). An Innovative Detection of Mechanically Separated Meat in Meat Products. *Food Analytical Methods*, 12(3), 652-657.

Prieto, N., Roehe, R., Lavín, P., Batten, G., & Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, 83(2), 175-186.

Puchtler, H., Meloan, S. N., & Terry, M. S. (1969). On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 17(2), 110-124.

Ramesh, T. N., Kirana, D. V., Ashwini, A., & Manasa, T. (2017). Calcium hydroxide as low cost adsorbent for the effective removal of indigo carmine dye in water. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21(2), 165-171.

Rath, N., Balog, J., Huff, W., Huff, G., Kulkarni, G., & Tierce, J. (1999). Comparative differences in the composition and biomechanical properties of tibiae of seven-and seventy-two-week-old male and female broiler breeder chickens. *Poultry Science*, 78(8), 1232-1239.

- Rungby, J., Kassem, M., Eriksen, E. F., & Danscher, G. (1993). The von Kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background. *The Histochemical Journal*, 25(6), 446-451.
- Sams, A. R., Alvarado, C., & Owens, C. M. (Eds.). (2001). *Poultry meat processing (Vol. 7)*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Schaack, D., Quaing, H., Nusch, T., Rampold, C., & Beck, M. (2018). Schlussbericht Analyse des Bio-Geflügelmarktes. Agrarmarkt Informations-Gesellschaft
- Schering, B. (2015). Zur aktuellen Bedeutung der Lebensmittel-Histologie: Entwicklung der Fragestellungen, §64 Methoden und Validierung - Teil 3: Validierung in der Lebensmittel-Histologie, Hinweise für die Qualitätssicherung in der Praxis. *Fleischwirtschaft*(7), 94.
- Schigulski, S., Upmann, M., Klein, G., & Langen, M. (2015). Furculafleisch ist kein Separatorenfleisch. *Fleischwirtschaft*(12), 61-63.
- Schnitzler, C. M. (1993). Bone quality: a determinant for certain risk factors for bone fragility. *Calcified tissue international*, 53(1), 27-31.
- Schulte-Sutrum, M., & Horn, D. (2003). Separatorenfleisch - Eignungsprüfung. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)* 83(1) (2003): 78-81.
- Serdaroğlu, M., Yildiz, G. T., & Bağdatlıoğlu, N. (2005). Effects of deboning methods on chemical composition and some properties of beef and turkey meat. *Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences*, 29(3), 797-802.
- Serum, D. K., Field, R. A., & Miller, G. J. (1986). Contribution of bone marrow to the vitamin content of mechanically separated meat. *Meat Sci*, 17(1), 73-77. doi:10.1016/0309-1740(86)90084-7
- Shahnazari, M., Sharkey, N. A., Fosmire, G. J., & Leach, R. M. (2006). Effects of strontium on bone strength, density, volume, and microarchitecture in laying hens. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(11), 1696-1703.
- Stenzel, W.-R., & Hildebrandt, G. (2006). Analysenmerkmale von Separatorenfleisch 1. Ergebnisse einer Datenerhebung zum Calcium-Gehalt von Hackfleisch. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)*, 86(5), 96-98.
- Steven, P., Paulsen, F., & Tillmann, B. (2000). Orcein-picroindigocarmine-a new multiple stain. *Archives of histology and cytology*, 63(4), 397-400.
- Stiebing, A. (1998). Zur Begriffsbestimmung Separatorenfleisch. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)*, 78(4), 321-322.
- Symonds, D. A. (1990). Use of the von Kossa stain in identifying occult calcifications in breast biopsies. *American journal of clinical pathology*, 94(1), 44-48.

Tao, Y., & Ibarra, J. (2000). Thickness-compensated X-ray imaging detection of bone fragments in deboned poultry—model analysis. *Transactions of the ASAE*, 43(2), 453.

Tasić, A., Kureljušić, J., Nešić, K., Rokvić, N., Vićentijević, M., Radović, M., & Pisinov, B. (2017). Determination of calcium content in mechanically separated meat. Paper presented at the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.

Tremlová, B. (2000). Histolgischer Nachweis von Knochenpartikeln in Fleischprodukten. *Fleischwirtschaft (Frankfurt)* 80(7) (2000): 73-74.

Tremlová, B., Sarha, P., Pospiech, M., Buchtova, H., & Randulova, Z. (2006). Histological analysis of different kinds of mechanically recovered meat. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* 57(3) (2006): 85.

Tremlová, B., & Starha, P. (2003). Histometric Evaluation of Meat Products – Determination of Area and Comparison of Results Obtained by Histology and Chemistry. *Czech journal of food sciences* 21(3) (2003): 101-106.

Upmann, M. (2021). Separatorenfleisch oder nicht? - Konzept zur Einordnung von Geflügelrohstoffen. *Rundschau für Lebensmittel und Fleischhygiene*, 1/2021, 5-6.

Upmann, M., & Lade, P. (2015). Knochenpartikel im Verarbeitungsfleisch für die Wurstproduktion. *Fleischwirtschaft*(9), 109.

Verordnung (EG) Nr. 543/2008 der Kommission vom 16. Juni 2008 mit Durchführungsvorschriften zur Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 des Rates hinsichtlich der Vermarktungsnormen für Geflügelfleisch.

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs.

Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission.

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission von 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien von Lebensmitteln.

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.

Windham, W., Lawrence, K., & Feldner, P. (2003). Prediction of fat content in poultry meat by near-infrared transmission analysis. *Journal of applied poultry research*, 12(1), 69-73.

Windhorst, H. W. (2020). Geflügelfleisch auf Wachstumskurs - Eine Prognose der Entwicklung der Fleischerzeugung bis 2028. *Fleischwirtschaft*, 4/2020, 32 - 35.

Winter, F. (1978). Gewinnung und Verarbeitung von Separatorenfleisch. *Die Fleischerei*, 29 (7), 9-11.

Wnuk, I. (2002). Bestimmung von Mineralstoffen und Spurenelementen in Lebensmitteln mit besonderer Berücksichtigung von Calcium im Separatorenfleisch mittels ICP-OES ; Determination of mineral and trace elements in food with special consideration of calcium in mechanically deboned meat by ICP-OES. *MITTEILUNGSBLATT-BUNDESANSTALT FÜR FLEISCHFORSCHUNG KULMBACH* 1.157 (2002): 209-212.

Zawiślak, G., & Dzida, K. (2010). Yield and quality of sweet marjoram herb depending on harvest time. *Acta Sci. Pol. Hort. Cult*, 9(1), 65-72.

Zhang, B., & Coon, C. N. (1997). The relationship of various tibia bone measurements in hens. *Poultry Science*, 76(12), 1698-1701.

Zhao, Y., & Sebranek, J. (1997). Technology for meat-grinding systems to improve removal of hard particles from ground meat. *Meat Science*, 45(3), 389-403.

10 Anhang

10.1 Spezifikationen

Tabelle 19 - Spezifikationen der Materialien

Stoff	Art.-Nr.	Hersteller	Firmensitz	Land
2-Propanol ≥99,5%	9866.5	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Alizarinrot S (C.I. 58005)	0348.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Einbettungsmittel zur Gefrierschnittvorbereitung , Cryo Glue	30001100	Slee medical GmbH	Mainz	Deutschland
Essigsäure 99-100%	7332.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Ethanol vergällt ≥99,8%	K928.3	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Faltenfilter ROTILABO® Typ 113P, Ø: 70 mm	CA08.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Formaldehyd-Lösung 37% für die Histologie	LOT 8U00724 9	AppliChem GmbH	Darmstadt	Deutschland
Gelatine Weiß Gemahlen		Dr. Oetker	Bielefeld	Deutschland
Indigocarmin (C.I. 73015)	2700.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Kernechtrot- Aluminiumsulfatlösung	N069.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Knochengranulat – Geflügel Analytische Bestandteile: Rohprotein 0,2%, Fettgehalt 0,3%, Rohfaser 0,3%, Rohasche 81,4%, Kalziumgehalt ca. 30- 40%,	KNM5	Hund & Sport Hungenberg GmbH	Grevenbroich	Deutschland

Anhang

Phosporgehalt ca. 6-12%				
Kunststoffbeutel	-	Cofresco Frischhalteprodu kte GmbH & Co. KG	Minden	Deutschland
Menzel™ Mikroskop- Deckelgläschen	15747592	Thermo Fisher Scientific	Schwerte	Deutschland
Natriumcarbonat Decahydrat	K303.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Natriumhexacyanoferrat (III)	P746.3	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Natriumthiosulfat Pentahydrat	P034.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Natronlauge (0,25 N)	P711.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Objektträger, HistoBond®	0810000	Paul Marienfeld GmbH und Co. KG	Lauda- Königshofen	Deutschland
Orange G (C.I. 16230)	0318.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Pikrinsäure-Lösung 1,2%	A2520	AppliChem GmbH	Darmstadt	Deutschland
Pyknometer nach Gay- Lussac mit einem Volumen von 50 ml	unbekann t	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Salpetersäure 65%	X898.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Silbernitratlösung 5%	N053.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Synthetisches Einschlussmittel, Roti®- Histokitt II	160.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Xylol (Isomere) >98%, rein	9719.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland

Tabelle 20 – Spezifikationen der Geräte und Software

Gerät	Art.-Nr.	Hersteller	Firmensitz	Land
Computer Intel Pentium 4 CPU, 2,533 GHz Taktrate, 512 MB DDR- RAM, 128 MB ATI AGP-Grafikkarte, 80 GB Festplatte	-	Dell	Round Rock, Texas	USA
F-AAS Solaar M5 dual AA FS95 Autosampler GF95 Grafite Furnace Solaar M Series GFTV	-	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts	USA
Farbdigitalkamera	SIS CIC-12	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH	Münster	Deutschland
Färbeautomat	HMS 740	MICROM International GmbH	Walldorf	Deutschland
Fleischwolf	g-4398	Gravidus GmbH	Bremen	Deutschland
Gefriermikrotom/Cryostat	MEV	SLEE medical GmbH	Mainz	Deutschland
ImageJ	1.51f	National Institutes of Health	Bethesda	USA
Kühltruhe Öko Arctis	2643- GT	AEG	Frankfurt am Main	Deutschland
Kühlschrank Öko_Santo Super	-	AEG	Frankfurt am Main	Deutschland
Microsoft-Excel® 2017	-	Microsoft	Redmond, Washington	USA
Mikroskop Axiostar plus	-	Carl Zeiss Werke	Göttingen	Deutschland
Zerkleinerer Moulinette DP 800,	-	SEB Gruppe	Lourdes	Frankreich

Anhang

Nahinfrarotspektrometer	Flex N-500 FT	BÜCHI Labortechnik GmbH	Essen	Deutschland
Objekträgerscanner Panoramic Desk	-	3D Histech Ltd.	Budapest	Ungarn
Panoramic Desk	2.0 SP 1 RTM	3D Histech Ltd.	Budapest	Ungarn
Panoramic Viewer	1.15.2. SP 1 RTM	3D Histech Ltd.	Budapest	Ungarn
Trockenschrank	Modell 400	Memmert	Schwabach	Deutschland

Spezifikationen der Lösungen

Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra

Pikrinsäure-Alizarin-S-Lösung

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

250 ml Pikrinsäurelösung 1,2%

NaOH zur Einstellung des pH-Wertes auf 4,3 bis 4,5

Indigocarmin-Lösung

0,625 g Indigokarmin

250 ml Aqua dest.

250 ml Essigsäure 1%

Färbung nach Calleja

Kernechtrot-Lösung (als Fertiglösung)

25 g Aluminiumsulfat

0,5 g Kernechtrot

Wasser zum Auffüllen auf 500ml

Pikro-Indigocarmin-Lösung

1,65g Indigokarmin

500 ml Pikrinsäurelösung 1,2%

Silbernitratlösung

Silbernitratlösung

500 ml Silbernitratlösung 5%

Natriumcarbonatlösung (Reduktionsmittel)

25 g Natriumcarbonat

125 ml Formaldehyd 37%

375 ml Aqua dest.

Farmerscher Abschwächer (Oxidationsmittel)

5g Natriumhexacyanoferrat (III)

50 ml Aqua dest.

45g Natriumthiosulfat

450 ml Aqua dest.

Natriumthiosulfat-Lösung (Fixierer)

25 g Natriumthiosulfat

500 ml Aqua dest.

Orange G-Lösung

9,2 g Orange G

463 ml Aqua dest.

37 ml Essigsäure 96%

(Das Orange G wurde mit Wasser zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen filtriert. Anschließend wurden 37 ml Essigsäure zugefügt.)



Abbildung 58 – Kunststoffbox mit Eingriffen und Sichtfenster zum Reinigen und Umfüllen der Silbernitratlösung unter weitgehendem Ausschluss von UV-Strahlung

10.2 Untersuchungsergebnisse

10.2.1 Aussagekraft der histologischen Methodenentwicklung

10.2.1.1 Eigenschaften der Färbungen nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Calleja im Vergleich

Tabelle 21 - Kontrastwerte Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra

Farbwerte Knochen	Farbwerte Hintergrund	Kontrastverhältnis (1 - 21: 1)
58/22/32	29/23/49	1,1 : 1
142/42/42	34/46/88	1,6 : 1
91/21/31	88/112/156	2,7 : 1
54/21/30	49/42/83	1,2 : 1
47/11/15	29/22/73	1,1 : 1
242/64/36	51/65/140	2,4 : 1
71/19/23	45/95/192	2,6 : 1
98/35/26	58/92/155	1,8 : 1
145/42/33	49/76/129	1,0 : 1
72/18/32	38/52/113	1,3 : 1
\bar{x} :	\bar{x} :	\bar{x} :
102/29,5/30	47/62,5/117,8	1,74 : 1

Tabelle 22 - Kontrastwerte Silbernitratimprägnierung

Farbwerte Knochen	Farbwerte Hintergrund	Kontrastverhältnis (21: 1 max.)
2/3/7	252/248/239	19,4 : 1
0/2/1	255/244/221	19,1 : 1
6/11/7	245/241/232	17,6 : 1
11/6/12	255/254/250	19,9 : 1
12/6/8	255/248/230	19,0 : 1
11/7/4	243/246/243	18,4 : 1
0/2/14	255/246/210	19,1 : 1
5/3/8	245/246/232	18,8 : 1
17/3/0	253/254/248	20,0 : 1
13/2/6	251/250/246	19,6 : 1
\bar{x} :	\bar{x} :	\bar{x} :
7,7/4,5/6,7	250,9/247,7/235,1	19,09 : 1

Tabelle 23 - Kontrastwerte Calleja- Färbung

Farbwerte Knochen	Farbwerte Hintergrund	Kontrastverhältnis (1 - 21: 1)
31/74/153	184/193/112	4,4 : 1
23/30/82	173/175/68	6,7 : 1
28/71/122	158/177/122	4,0 : 1
28/49/112	199/204/86	7,1 : 1
40/89/155	185/198/129	3,8 : 1
36/83/153	120/148/97	2,2 : 1
38/50/102	187/200/128	3,7 : 1
34/72/154	169/176/96	3,7 : 1
37/71/145	202/207/107	5,3 : 1
39/66/119	156/169/113	3,9 : 1
\bar{x} :	\bar{x} :	\bar{x} :
33,4/65,5/129,7	117,3/184,7/105,8	4,79 : 1

Tabelle 24 - Knochenpartikelanzahl in Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz

Schnitt	Silbernitratimprägnierung [Knochenpartikel/cm ²]	Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra [Knochenpartikel/cm ²]
1	9,30	0,62
2	5,79	1,03
3	4,75	1,03
4	2,27	0,00
5	3,51	0,21
6	3,51	0,00
7	3,93	0,21
8	3,93	1,03
9	3,93	0,00
10	3,51	0,21
\bar{x}	4,44	0,43

Tabelle 25 – Knochenpartikelfläche in Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz

Schnitt	Silbernitratimprägnierung [$\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$]	Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra [$\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$]
1	6.700,95	1.539,00
2	6.864,98	1.473,73
3	4.775,39	1.317,32
4	1.717,31	-
5	4.183,46	700,27
6	2.056,78	-
7	1.998,30	110,49
8	1.991,17	54,53
9	1.978,34	-
10	2.624,47	934,18
\bar{x}	3.489,12	612,95

Tabelle 26 Knochenpartikelanzahl in Geflügelbrühwurst

Schnitt	Silbernitratimprägnierung [Knochenpartikel/ cm^2]	Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra [Knochenpartikel/ cm^2]
1	12,60	1,03
2	10,95	2,07
3	22,73	4,13
4	28,72	2,07
5	12,19	1,45
6	21,90	2,27
7	16,53	1,65
8	9,50	2,07
9	14,46	1,24
10	8,88	0,83
\bar{x}	15,85	1,88

Tabelle 27 – Knochenpartikelfläche in Geflügelbrühwurst

Schnitt	Silbernitratimprägung [$\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$]	PWG-Färbung [$\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$]
1	13.355,12	3.952,45
2	15.328,94	7.040,20
3	67.118,61	34.876,88
4	36.775,17	6.593,25
5	14.549,99	6.239,50
6	39.556,53	29.066,97
7	42.376,49	24.630,91
8	54.606,77	55.311,12
9	21.377,62	3.737,51
10	8.498,45	1.256,81
\bar{x}	31.354,37	17.270,56

Tabelle 28 - Knochenpartikelanzahl in Geflügelbratrolle

Schnitt	Silbernitratimprägung	PWG-Färbung
1	62,60	4,75
2	81,61	5,17
3	89,67	1,86
4	107,02	7,23
5	54,96	3,51
6	63,64	4,96
7	58,68	1,03
8	84,50	2,89
9	48,97	0,83
10	39,67	1,45
\bar{x}	69,13	3,37

Tabelle 29 - Knochenpartikelfläche in Geflügelbratrolle

Schnitt	Silbernitratimprägnierung [$\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$]	PWG-Färbung [$\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$]
1	208.619,50	108.439,45
2	207.010,89	123.948,34
3	182.347,29	37.645,09
4	280.406,81	122.846,60
5	154.712,29	74.109,74
6	142.080,20	50.405,21
7	120.578,21	7.953,97
8	295.542,72	244.675,89
9	64.504,56	1.808,57
10	68.631,37	1.094,58
\bar{x}	172.443,38	77.292,74

Tabelle 30 - Knochenpartikelgrößen der Silbernitratimprägnierung

Probenmaterial	Silbernitratimprägnierung		
	Durchschnittsgröße Knochenpartikel [μm^2]	Kleinster Knochenpartikel [μm^2]	Größter Knochenpartikel [μm^2]
	Hähnchenhackfleisch	785,5	103,6
Geflügelbrühwurst	1.978,6	103,8	212.822,3
Geflügelbratrolle	2.494,4	103,6	503.952,7

Tabelle 31 - Knochenpartikelgrößen der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra

Probenmaterial	Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra		
	Durchschnittsgröße Knochenpartikel [μm^2]	Kleinster Knochenpartikel [μm^2]	Größter Knochenpartikel [μm^2]
	Hähnchenhackfleisch	1.648,2	111,1
Geflügelbrühwurst	9.185,7	103,8	241.233,15
Geflügelbratrolle	22.950,7	166,2	785.934,9

Tabelle 32 Nachgewiesene Knochenpartikelgrößen in Hähnchenhackfleisch mit 0,1%igen Knochenpartikelzusatz, in Geflügelbrühwurst und in Geflügelbratrolle gefärbt durch Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra [μm^2]

Statistiken						
	Hähnchenhackfleisch mit 0,1%igen Knochenpartikelzusatz		Geflügelbrühwurst		Geflügelbratrolle	
	Silbernitratimprägnierung	Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra	Silbernitratimprägnierung	Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra	Silbernitratimprägnierung	Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra
N	215	18	767	91	3346	163
Mittelwert	785,5	1.648,2	1.978,6	9.185,7	2.494,4	22.950,7
Standard- fehler des Mittelwertes	95,9	443,1	319,7	2.887,0	195,7	5.317,7
Median	296,9	809,1	415,1	2.023,0	441,8	7.520,8
Standard- abweichung	1.405,8	1.879,7	8.855,3	27.540,6	11.322,1	67.891,3
Varianz	2,0E6	3,5E6	7,8E7	7,6E8	1,3E8	4,6E9
Spannweite	9.961,7	6.906,8	212.718,6	241.129,4	503.849,2	785.768,7
Minimum	103,6	111,1	103,8	103,8	103,6	166,2
Perzentile						
10	117,4	142,4	124,5	177,4	124,6	674,5
20	138,0700	191,7680	152,1890	565,5064	166,1000	1.544,3200
30	165,6800	326,4600	200,6130	775,9600	221,4700	2.952,5420
40	207,1100	572,2960	285,0084	1.508,6224	304,5200	4.438,7800
50	296,8500	809,1300	415,0610	2.023,0400	441,8200	7.520,7800
60	372,7900	1.627,9820	615,6730	3.443,7274	706,9560	9.907,2000
70	589,5600	1.927,3280	980,9268	6.108,3716	1.183,4800	15.301,9400
80	868,4600	3.390,7100	1.831,8010	7.712,1840	2.198,6340	23.389,2000
90	2.367,8980	4.771,0630	3.579,2058	17.807,3722	5.298,9880	50.191,1340
Maximum	10.065,3	7.017,9	212.822,3	241.233,2	503.952,7	785.934,9

10.2.1.2 Präzision

Tabelle 33 – Ergebnisse der Statistikproben

Schnitte	Anzahl	Fläche (μm^2)
1	2,48	1.314,60
2	3,31	2.156,75
3	2,48	1.127,62
4	9,09	23.603,13
5	5,99	15.620,43
6	4,96	5.974,50
7	3,31	3.649,97
8	5,37	6.352,38
9	2,69	4.241,12
10	6,20	1.882,24
11	6,20	2.724,32
12	6,82	2.552,98
13	4,75	4.165,01
14	7,02	4.496,27
15	4,34	1.799,08
16	5,17	4.472,00
17	4,34	4.233,55
18	2,27	3.241,88
19	2,48	2.316,86
20	3,93	2.121,51
21	25,21	22.824,43
22	32,23	31.089,38
23	32,23	23.299,16
24	16,12	24.314,40
25	14,46	10.248,26
26	15,70	10.897,44
27	2,89	8.020,44
28	8,26	4.235,43
29	7,64	11.568,07
30	3,10	2.879,87
31	4,34	6.027,27
32	4,96	2.312,24

Schnitte	Anzahl	Fläche (μm^2)
55	35,74	178.638,03
56	41,74	197.883,69
57	43,80	204.438,91
58	25,00	104.733,03
59	7,02	4.601,41
60	12,19	24.939,37
61	6,40	2.355,18
62	6,20	5.144,70
63	10,12	4.802,10
64	5,99	3.959,22
65	26,03	24.669,88
66	29,96	49.374,16
67	14,05	19.735,90
68	10,12	9.102,48
69	11,98	18.325,38
70	17,36	30.635,95
71	22,11	12.807,84
72	39,26	18.366,51
73	11,57	5.456,94
74	33,47	22.171,61
75	15,91	14.605,81
76	13,02	11.363,74
77	13,02	4.743,49
78	19,01	11.974,05
79	22,93	9.297,86
80	17,36	8.502,75
81	5,99	10.335,62
82	9,50	4.718,84
83	6,20	2.007,93
84	13,64	12.722,08
85	18,39	38.379,69
86	21,90	24.207,52

Anhang

33	5,99	9.842,40
34	3,93	1.863,24
35	3,31	3.286,04
36	4,34	6.063,02
37	8,68	6.433,38
38	3,51	1.890,40
39	13,84	8.661,26
40	8,68	5.372,35
41	4,96	2.285,07
42	5,99	5.904,30
43	6,20	10.245,65
44	6,61	7.947,71
45	8,88	11.085,03
46	11,16	4.923,35
47	17,15	7.444,36
48	7,64	3.038,66
49	10,33	9.975,39
50	13,02	10.112,66
51	6,82	3.255,39
52	8,26	4.247,35
53	9,92	8.960,57
54	6,82	3.276,89

87	24,38	21.019,89
88	20,87	18.902,39
89	12,60	7.441,13
90	15,70	10.877,80
91	12,40	7.247,75
92	9,09	4.502,80
93	6,20	2.401,11
94	12,60	11.373,77
95	6,20	2.866,72
96	11,98	6.657,50
97	10,54	21.117,19
98	9,92	6.982,71
99	17,15	25.444,86
100	15,08	12.191,29
101	9,50	11.730,55
102	3,72	2.524,15
103	6,61	4.280,39
104	7,85	10.160,60
105	10,74	7.963,52
106	8,47	6.565,64
107	9,50	9.672,83
108	8,47	5.975,48

Deskriptive Statistik

		Statistik	Standardfehler
Knochenpartikelanzahl/cm ²	Mittelwert	11,786	,8654
	90% Konfidenzintervall des Mittelwerts	10,350	
	Untergrenze		
	Obergrenze	13,222	
	5% getrimmtes Mittel	10,828	
	Median	8,985	
	Varianz	80,890	
	Standardabweichung	8,9939	
	Minimum	2,3	
	Maximum	43,8	
	Spannweite	41,5	
	Interquartilbereich	8,9	
	Schiefe	1,655	,233
	Kurtosis	2,568	,461

Tabelle 34 - Vergleich aus je 10 Mittelwerten aus 6 aus 108 und aus 30 aus 108 und deren Differenz zum Mittelwert aus 108 Schnitten in den Kategorien Knochenpartikelanzahl und -fläche

Ziehung	Mittelwert Anzahl	Ausreißer ≥ 30	Mittelwert Fläche	Ausreißer ≥ 24.929	Differenz zum Mittelwert aus 108 (Anzahl)	Differenz zum Mittelwert aus 108 (Fläche)
Ziehung (6 aus 108)						
1	7,3	nein	6641,99	nein	4,5	9143,00
2	11,3	nein	10703,16	nein	0,5	5081,83
3	11,6	nein	8528,09	nein	0,2	7256,90
4	17,8	ja	16926,43	ja	6,0	1141,44
5	9,3	nein	7859,03	nein	2,5	7925,96
6	9,3	nein	5707,72	nein	2,5	10077,27
7	7,8	nein	4710,85	nein	4,0	11074,14
8	11,8	ja	13139,27	ja	0,0	2645,72
9	16,2	ja	41095,06	ja	4,4	25310,07
10	5,9	nein	5510,41	nein	5,9	10274,58
\bar{X}	10,8		12082,20		3,0	8993,09
Ziehung (30 aus 108)						
1	13,8	ja	22385,00	ja	2,0	6600,01
2	12,5	ja	18891,98	ja	0,7	3106,99
3	12,7	ja	29345,96	ja	0,9	13560,97
4	11,7	ja	9037,97	nein	0,1	6747,02
5	12,9	ja	17712,02	ja	1,1	1927,03
6	12,0	ja	13597,75	ja	0,3	2187,24
7	11,0	ja	10484,72	ja	0,8	5300,27
8	11,1	ja	20191,98	ja	0,7	4406,99
9	12,1	ja	12370,00	ja	0,3	3414,99
10	11,9	ja	8625,49	nein	0,1	7159,50
\bar{X}	12,2		16264,29		0,7	5441,10

10.2.1.3 Berechnung der Dichte und Korrelation mit histologischen Ergebnissen*Tabelle 35 – Ergebnisse der Dichtebestimmung von 4 Geflügelknochen*

Knochen	Masse der Probe (g)	Masse Pyknometer+H ₂ O	Masse Pyknometer+H ₂ O+Probe	Dichte der Proben
Radius 1	0,5971	88,6830	88,8251	1,3094
Radius 2	0,6058	88,6830	88,8725	1,4520
Ulna 3	0,5814	88,6830	88,9141	1,6561
Ulna 4	0,6188	88,6830	88,9695	1,8581

Temperatur: 21,8°C

Dichte H₂O bei 21,8°C: 0,997819

Tabelle 36 – Knochenpartikelanzahl in Hähnchenhackfleisch mit 0,5% Knochenpartikelzusatz beim Versuch mit Dichteermittlung

Schnitt	Silbernitratimprägnierung	PWG-Färbung
1	37,81	3,10
2	47,31	9,30
3	54,34	8,47
4	54,13	6,40
5	53,51	5,58
6	41,53	4,96
7	32,23	6,40
8	43,18	4,75
9	52,89	7,44
10	43,80	6,20
11	72,73	9,92
12	57,64	5,58
13	75,00	6,82
14	66,53	9,92
15	63,22	4,34
16	78,31	8,68
17	76,65	6,40
18	60,54	4,96
19	59,71	4,96
20	62,40	5,99
21	34,09	3,10
22	32,02	4,96
23	35,54	4,55
24	42,77	5,37
25	56,40	4,55
26	37,81	4,55
27	47,52	4,34
28	49,79	5,58
29	43,39	7,64
30	54,13	5,99
\bar{x}	52,23	6,027

Tabelle 37 – Knochenpartikelfläche in Hähnchenhackfleisch mit 0,5% Knochenpartikelzusatz beim Versuch mit Dichteermittlung

Schnitt	Silbernitratimprägnierung	PWG-Färbung
1	32.951,39 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	12.734,07 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
2	131.318,64 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	100.999,50 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
3	95.905,33 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	105.768,11 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
4	60.685,06 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	26.442,03 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
5	105.062,98 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	45.395,46 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
6	148.680,28 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	130.698,88 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
7	168.021,25 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	87.974,42 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
8	59.607,52 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	25.857,12 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
9	78.156,19 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	50.723,05 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
10	71.464,78 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	64.972,70 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
11	236.236,12 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	148.103,59 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
12	86.628,12 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	44.662,16 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
13	87.848,28 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	46.063,93 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
14	72.644,64 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	37.945,77 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
15	64.731,63 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	30.766,91 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
16	146.221,31 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	101.394,24 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
17	99.305,12 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	69.881,06 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
18	85.057,96 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	64.341,69 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
19	53.660,92 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	38.843,30 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
20	111.450,47 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	83.967,92 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
21	280.789,78 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	221.422,09 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
22	97.258,02 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	54.465,91 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
23	239.985,90 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	64.943,89 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
24	69.881,60 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	51.434,74 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
25	194.199,12 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	98.213,25 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
26	73.664,52 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	75.272,04 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
27	59.938,85 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	43.283,44 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
28	83.069,94 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	61.085,78 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
29	96.696,20 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	101.839,41 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
30	93.993,71 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	51.921,69 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
\bar{x}	109.503,85 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	71.380,60 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
%	0,11%	0,07%

10.2.1.4 Sensitivität der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra

Tabelle 38 – Stufenweise Verringerung der Knochenpartikelanzahl durch Anwendung von Indigokarmin

	keine Gegenfärbung	30 Sekunden Indigokarmin	90 Sekunden Indigokarmin	150 Sekunden Indigokarmin (gemäß amtlicher Methode)
1	20,87	19,42	6,40	0,21
2	26,24	6,40	1,45	0,21
3	31,82	10,54	1,45	0,21
4	43,80	10,33	0,83	-
5	23,55	4,75	0,41	0,41
6	25,41	9,71	6,40	1,65
7	33,47	6,61	2,07	2,07
8	39,05	3,10	0,21	-
9	57,44	8,06	1,03	0,62
10	23,76	5,58	1,86	0,21
\bar{x}	32,54	8,45	2,21	0,56

Tabelle 39 – Stufenweise Verringerung der Knochenpartikelfläche durch Färbung mit Indigokarmin

	keine Gegenfärbung	30 Sekunden Indigokarmin	90 Sekunden Indigokarmin	150 Sekunden Indigokarmin
1	554.727,95 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	141.094,09 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	26.576,52 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	436,17 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
2	347.809,96 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	33.827,00 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	9.109,58 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	3.217,67 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
3	530.532,03 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	83.085,94 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	8.797,82 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	276,00 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
4	553.152,19 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	63.123,84 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	2.492,50 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	-
5	219.395,10 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	31.289,35 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	12.602,73 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	10.578,11 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
6	273.272,23 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	123.600,65 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	59.349,32 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	16.568,99 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
7	336.187,99 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	90.488,43 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	6.964,84 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	6.929,50 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
8	246.372,27 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	9.177,33 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	1.937,34 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	-
9	482.745,00 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	108.461,53 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	30.000,17 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	9.324,71 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$
10	214.355,41 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	35.952,42 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	3.954,81 $\mu\text{m}^2 / \text{cm}^2$	57,23 μ m^2 / cm^2
\bar{x}	375.855,01	72.010,06	16.178,56	4.738,84

10.2.1.5 Stauchungs- und Auffaltungstendenzen

Alle Daten sind vollständig im Kapitel 4.1.3.3 aufgeführt.

10.2.1.6 Flächenvergleich der manuellen Messung zur automatisierten Messung

Alle Daten sind vollständig im Kapitel 4.1.3.4 aufgeführt.

10.2.1.7 Vergleich der Anzahl der detektierten Knochenpartikel zwischen der konventionellen und der automatisierten Methode

Alle Daten sind vollständig im Kapitel 4.1.3.5 aufgeführt.

10.2.2 Analytische Zusammensetzung von Geflügelverarbeitungsfleisch

10.2.2.1 Vollanalyse

Tabelle 40 - Analyseergebnisse Betrieb 1 und 2

Bestandteil	Messeinheit	Chemische Untersuchung	Nahinfrarotspektroskopische Untersuchung	Übereinstimmung $\frac{n_{chem}}{n_{infrarot}} \cdot 100$
	Betrieb 1			
Verarbeitungsfleisch				
pH-Wert		6,00		
Gesamteiweiß	g/100 g	18,30	18,80	97%
Bindegewebeseiweiß	g/100 g	0,76	1,10	69%
Fleischeiweiß	g/100 g	18,30	18,80	97%
BEFFEE	g/100 g	17,50	17,40	99%
BEFFEE im FE	%	95,80	96,30	99%
Kalzium	mg/kg	62,00		
Separatorenfleisch				
pH-Wert		6,60		
Gesamteiweiß	g/100 g	15,40	14,70	95%
Bindegewebeseiweiß	g/100 g	1,52	1,50	99%
Fleischeiweiß	g/100 g	15,40	14,70	95%
BEFFEE	g/100 g	13,90	13,30	96%
BEFFEE im FE	%	90,10	92,20	98%
Kalzium	mg/kg	560,00		
Verarbeitungsfleisch	Betrieb 2			
pH-Wert		6,10		
Gesamteiweiß	g/100 g	18,00	16,90	94%
Bindegewebeseiweiß	g/100 g	0,42	1,20	35%
Fleischeiweiß	g/100 g	18,00	16,90	94%
BEFFEE	g/100 g	17,60	15,90	90%
BEFFEE im FE	%	97,70	95,20	97%
Kalzium	mg/kg	32,00		

Separatorenfleisch				
pH-Wert		6,30		
Gesamteiweiß	g/100 g	16,10	15,10	94%
Bindegewebsprotein	g/100 g	1,28	1,40	91%
Fleischiweiß	g/100 g	16,10	15,10	94%
BEFFEE	g/100 g	14,80	14,40	97%
BEFFEE im FE	%	92,00	93,00	99%
Kalzium	mg/kg	237,00		

Tabelle 41 - Analysenergebnisse Wochenversuch

Material	Datum	Uhrzeit	Eiweiß [%]	Wasser [%]	Fett [%]	Asche [%]	Bindegewebsinweiß [%]	BEFFE [%]
50% Gabelbeine 50% Filetabschnitte	12.02.2018	08:30	19,4	67,8	11,1	1,3	1,1	18,1
20% Gabelbeine 20% Filetabschnitte 60% Schaberfleisch	12.02.2018	12:30	16,5	62,9	19,0	1,1	1,2	15,4
50% Gabelbeine 50% Filetabschnitte	12.02.2018	16:00	17,3	66,7	14,4	1,1	0,9	16,5
80% Gabelbeine 20% Filetabschnitte	13.02.2018	08:00	15,2	68,8	13,5	1,1	0,8	14,7
30% Gabelbeine 70% Filetabschnitte	13.02.2018	12:00	17,6	65,4	15,4	1,2	0,9	16,8
50% Gabelbeine 50% Filetabschnitte	13.02.2018	16:00	15,2	61,5	22,5	1,1	0,9	14,4
50% Gabelbeine 50% Filetabschnitte	15.02.2018	08:30	16,0	65,0	16,8	1,3	0,8	15,0
50% Filetabschnitte 50% Rückenfleisch	15.02.2018	12:30	18,8	67,9	11,4	1,1	1,0	17,5
50% Gabelbeine 50% Filetabschnitte	15.02.2018	15:00	17,6	66,2	14,8	1,1	0,8	16,5
50% Gabelbeine 50% Filetabschnitte	16.02.2018	07:30	15,5	73,1	7,7	1,4	0,8	14,2
100% Sternum	16.02.2018	12:00	19,2	75,7	3,1	1,4	0,3	18,9
40% Gabelbeine 60% Filetabschnitte	16.02.2018	16:00	17,6	66,7	13,4	1,1	1,0	16,4
50% Gabelbeine 50% Filetabschnitte	19.02.2018	08:30	16,8	65,8	15,1	1,0	1,1	16,0
100% Gabelbein	19.02.2018	12:00	13,6	60,9	24,3	0,9	0,9	13,1
50% Gabelbeine 50% Filetabschnitte	19.02.2018	16:00	17,6	68,8	11,3	1,1	0,9	16,8

Tabelle 42 - Analyseergebnisse aus den Materialien 1. Flügelglied und Mittelflügel bei unterschiedlichen Anpressdrücken

Material	Eiweiß	Wasser	Fett	BEFFE
1. Flügelglied 40 bar	18,6	74,8	5,0	18,0
1. Flügelglied 60 bar	17,7	72,6	7,5	17,0
Mittelflügel 40 bar	19,0	76,9	2,0	18,4
Mittelflügel 60 bar	18,6	75,4	4,6	18,0

Tabelle 43 – Analyseergebnisse aus den Materialien Rücken, Gabelbein, Schulter und Unterschenkel

Material		Eiweiß [%]	Wasser [%]	Fett [%]	Asche [%]	Bindegewebs einweiß [%]	BEFFE [%]
Rücken	3	20,7	71,2	6,6	1,1	1,6	18,8
Gabelbein	4	17,3	61,4	19,5	1,3	1,4	15,9
Schulter	5	16,2	64,4	19,3	1,1	1,4	14,8
Unterschenkel	6	19,3	74,9	3,6	1,6	1,2	18,2

Tabelle 44 - Analyseergebnisse aus den Unterkeule der weiblichen und männlichen Pute

Material		Eiweiß [%]	Wasser [%]	Fett [%]	Asche [%]	Bindegewebs einweiß [%]	BEFFE [%]
Weibliche Pute	1	19,2	72,8	6,1	1,5	0,9	18,4
Männliche Pute	2	17,3	72,4	7,3	1,4	1,5	16,8

10.2.2.2 Histologische Ergebnisse und Kalziumwerte**10.2.2.2.1 Vergleich Verarbeitungsfleisch und Separatorenfleisch***Tabelle 45 – Histologische Analyseergebnisse aus Betrieb 1*

Schnitt	Knochenpartikelanzahl	Knochenpartikelfläche	Kalziumwert mg / kg
1	1,03	3.774,02	62,00
2	10,74	110.604,41	62,00
3	5,99	113.448,83	62,00
4	7,44	40.249,60	62,00
5	4,13	28.082,04	62,00
6	3,72	10.281,26	62,00
7	0,21	28,52	62,00
8	3,51	23.660,72	62,00
9	0,21	218,14	62,00
10	0,00	-	62,00
11	1,65	9.531,30	62,00
12	1,24	4.087,69	62,00
13	1,86	1.581,18	62,00
14	3,10	10.104,46	62,00
15	0,21	122,62	62,00
16	0,41	118,34	62,00
17	0,62	551,77	62,00
18	0,83	282,30	62,00
19	0,00	-	62,00
20	0,41	102,66	62,00
21	4,75	25.581,23	62,00
22	33,26	116.314,63	62,00
23	22,73	75.025,65	62,00
24	15,50	36.475,57	62,00
25	7,44	14.865,12	62,00
26	6,61	34.382,54	62,00
27	15,70	34.087,40	62,00
28	6,20	52.069,26	62,00
29	1,86	2.382,47	62,00
30	0,00	-	62,00
\bar{x}	5,38	24.933,79	62,00

Tabelle 46 - Histologische Analyseergebnisse aus Betrieb 2

Schnitt	Knochenpartikelanzahl	Knochenpartikelfläche	Kalziumwert mg / kg
1	1,24	12.915,00	32,00
2	0,41	117,45	32,00
3	1,24	1.660,03	32,00
4	0,21	84,51	32,00
5	0,21	63,02	32,00
6	1,45	6.952,36	32,00
7	0,21	105,99	32,00
8	0,41	2.161,33	32,00
9	1,03	5.863,82	32,00
10	2,27	3.556,39	32,00
11	0,21	70,18	32,00
12	0,41	1.531,12	32,00
13	1,86	14.686,75	32,00
14	5,99	4.367,07	32,00
15	0,62	124,61	32,00
16	0,83	234,90	32,00
17	0,21	27,21	32,00
18	1,03	206,25	32,00
19	2,27	3.534,90	32,00
20	15,91	11.051,59	32,00
21	1,24	1.349,22	32,00
22	1,03	4.288,29	32,00
23	3,93	2.854,56	32,00
24	2,89	101.231,75	32,00
25	1,45	6.549,89	32,00
26	24,17	17.297,83	32,00
27	5,58	2.672,66	32,00
28	16,12	5.918,24	32,00
29	2,07	2.101,18	32,00
30	3,51	1.147,27	32,00
\bar{x}	3,33	7.157,51	32,00

Tabelle 47 - Ergebnisse der Separatorenfleischproben aus Betrieb 1

Schnitt	Knochenpartikelanzahl	Knochenpartikelfläche	Kalziumwert mg / kg
1	87,81	168.681,88	560,00
2	68,60	125.664,86	560,00
3	88,64	204.253,51	560,00
4	79,34	151.127,75	560,00
5	59,50	223.484,35	560,00
6	71,28	107.022,87	560,00
7	60,12	84.934,77	560,00
8	94,21	116.271,86	560,00
9	104,34	251.535,03	560,00
10	66,94	113.250,65	560,00
11	92,56	198.374,29	560,00
12	71,28	191.974,80	560,00
13	91,74	283.620,20	560,00
14	76,03	124.391,96	560,00
15	90,70	179.932,07	560,00
16	90,50	160.957,02	560,00
17	80,17	143.800,99	560,00
18	86,16	136.010,74	560,00
19	60,74	111.027,22	560,00
20	84,09	327.855,20	560,00
21	61,78	99.169,24	560,00
22	56,82	138.461,39	560,00
23	71,28	93.639,15	560,00
24	64,88	100.517,03	560,00
25	106,61	137.586,26	560,00
26	77,69	254.601,90	560,00
27	87,60	125.178,29	560,00
28	51,24	68.167,22	560,00
29	73,55	106.468,22	560,00
30	61,57	94.505,69	560,00
\bar{x}	77,26	154.082,21	560,00

Tabelle 48 - Ergebnisse der Separatorenfleischproben aus Betrieb 2

Schnitt	Knochenpartikelanzahl	Knochenpartikelfläche	Kalziumwert
1	28,10	92.583,55	237,00
2	24,79	35.235,89	237,00
3	24,38	41.187,08	237,00
4	35,54	57.523,83	237,00
5	38,02	80.036,65	237,00
6	30,99	78.294,98	237,00
7	43,60	51.575,51	237,00
8	29,75	65.725,15	237,00
9	28,51	60.117,72	237,00
10	28,72	31.332,89	237,00
11	25,62	92.593,58	237,00
12	28,51	58.212,77	237,00
13	39,46	137.938,61	237,00
14	43,60	75.103,82	237,00
15	33,88	49.071,86	237,00
16	40,70	78.509,82	237,00
17	33,06	72.750,56	237,00
18	36,98	107.869,00	237,00
19	41,94	102.447,77	237,00
20	36,98	72.196,26	237,00
21	49,38	100.025,75	237,00
22	30,79	52.489,32	237,00
23	34,71	76.864,11	237,00
24	47,93	120.970,21	237,00
25	35,74	123.075,68	237,00
26	41,94	71.859,67	237,00
27	36,57	93.742,28	237,00
28	32,02	48.967,30	237,00
29	26,24	45.461,04	237,00
30	35,33	92.196,83	237,00
\bar{x}	34,79	75.531,98	237,00

10.2.2.2 Homogenität des Verarbeitungsfleisches innerhalb einer Arbeitswoche*Tabelle 49 - Analyseergebnisse einer Arbeitswoche*

Datum	Knochenpartikelanzahl	Knochenpartikelfläche	Kalzium
12.02.2018 morgens	0,62	394,12	27,19
12.02.2018 mittags	7,13	7.085,04	24,50
12.02.2018 abends	1,49	10.824,54	33,94
13.02.2018 morgens	1,14	6.587,30	25,39
13.02.2018 mittags	6,16	18.261,57	35,49
13.02.2018 abends	3,04	15.467,44	27,29
15.02.2018 morgens	2,71	3.551,06	26,09
15.02.2018 mittags	2,71	3.741,07	35,29
15.02.2018 abends	6,18	12.290,71	35,14
16.02.2018 morgens	3,88	6.328,35	27,61
16.02.2018 mittags	9,46	15.114,28	84,82
16.02.2018 abends	5,31	7.516,31	67,42
19.02.2018 morgens	1,01	1.435,77	53,22
19.02.2018 mittags	1,26	5.521,59	19,09
19.02.2018 abends	3,84	14.814,00	57,24
\bar{x}	3,73	8.595,54	38,65

Tabelle 50 - Berechnung der Ergebnisse aus einer Arbeitswoche für die einzelnen Komponenten

Material	Gabelbeine	Filetabschnitte	Brustbein
Knochenpartikelanzahl [Knochenpartikel/cm ²]	1,06	5,41	9,46
Knochenpartikelfläche [μm ² /cm ²]	12.660,72	4.695,81	12.290,71
Kalzium [mg/kg]	33,03	45,85	35,14

10.2.2.2.3 Schwankungen aufgrund des verarbeiteten Teilstücks

Tabelle 51 - Histologische Ergebnisse aus einem Verarbeitungsbetrieb

Material	Gabelbein		Rücken		Schulter		Unterkeule	
	Anzahl	Fläche	Anzahl	Fläche	Anzahl	Fläche	Anzahl	Fläche
1	3,72	44.917,61	4,34	5.299,92	0,83	881,19	0,21	96,80
2	2,69	86.051,39	16,94	65.465,28	3,10	5.406,69	0,41	55,52
3	7,23	63.547,74	25,83	70.947,41	0,00	-	0,21	25,62
4	1,45	1.197,21	88,84	229.450,92	0,62	2.448,53	0,83	997,92
5	10,33	231.916,52	52,69	121.935,08	0,41	160,86	1,24	391,48
6	2,27	2.923,99	2,89	53.607,02	0,62	610,71	0,41	66,91
7	2,48	62.813,19	89,26	121.315,83	0,21	37,01	0,21	32,74
8	0,41	7.213,18	76,03	222.940,97	0,21	519,60	0,83	999,34
9	1,45	1.034,93	100,21	223.440,64	3,72	4.736,19	1,45	909,66
10	0,41	5.328,39	18,39	36.522,87	0,00	-	0,00	-
11	1,24	1.454,88	3,10	21.000,37	0,83	142,36	0,83	4.158,23
12	16,12	118.780,47	2,07	2.323,25	0,62	1.607,20	0,00	-
13	5,99	54.495,32	20,45	66.514,44	1,45	1.215,72	0,41	121,00
14	4,75	178.205,58	20,45	60.475,70	0,41	95,38	0,41	216,38
15	1,86	2.797,30	3,72	7.468,00	2,48	11.119,45	0,41	71,18
16	6,61	24.049,63	3,31	36.655,26	0,83	2.622,20	0,00	-

Anhang

17	4,75	39.288, 85	4,13	10.554, 28	0,41	525,29	0,21	102,50
18	4,75	29.904, 74	3,51	9.856,7 3	0,41	600,74	0,21	101,07
19	13,84	170.40 1,62	26,03	47.712, 06	0,21	22,78	0,62	130,97
20	14,26	129.68 0,67	8,06	53.182, 80	0,00	-	0,00	-
21	1,45	748,79	20,04	19.561, 15	0,00	-	0,00	-
22	-	-	31,61	67.848, 32	0,00	-	0,00	-
23	4,55	14.282, 58	1,24	811,43	62,19	145.49 3,76	0,00	-
24	4,96	18.187, 41	4,13	5.980,3 8	33,06	27.682, 59	0,00	-
25	7,64	177.78 9,90	9,30	51.814, 76	64,46	140.39 0,29	0,62	129,54
26	1,24	9.223,2 5	9,71	23.325, 04	0,83	1.329,6 1	0,62	1.087,6 0
27	0,62	380,09	6,82	23.073, 07	2,69	25.619, 85	0,21	62,64
28	1,03	3.084,8 6	7,02	7.759,8 3	10,74	18.467, 87	0,00	-
29	3,1	36.927, 16	6,40	20.008, 14	0,21	548,07	0,41	323,15
30	6,2	6.010,2 7	0,83	1.826,4 3	0,62	1.773,7 6	7,02	9.990,5 6

10.2.2.2.4 Schwankungen aufgrund des Anpressdruckes im Kolbenseparator

Tabelle 52 – Knochenpartikelanzahl bei unterschiedlichen Drücken

Schnitt	1. Flügelglied (40 bar)	1. Flügelglied (60 bar)	Mittelflügel (40 bar)	Mittelflügel (60 bar)
1	1,86	0,62	2,27	0,83
2	1,03	0,21	0,41	1,24
3	0,83	1,65	1,24	2,69
4	2,27	1,03	1,03	1,45
5	0,62	0,83	1,45	0,21
6	0,41	1,03	0,62	0,83
7	0,83	1,24	0,62	0,83
8	0,41	0,41	1,03	0,83
9	0,83	0,62	3,31	1,45
10	2,07	0,83	3,31	1,24
11	0,41	1,03	0,00	0,62
12	0,83	0,00	0,62	2,07
13	0,83	1,03	0,83	1,45
14	0,83	0,21	3,72	2,48
15	0,21	1,03	5,37	1,45
16	0,62	1,24	3,72	2,07
17	1,24	0,62	2,89	2,07
18	0,62	2,07	4,55	1,45
19	0,21	0,62	5,37	0,41
20	5,17	2,69	0,21	0,41
21	0,41	1,03	3,10	7,64
22	0,41	0,41	3,31	54,55
23	0,41	0,62	0,62	46,28
24	0,62	16,53	0,00	3,93
25	0,62	127,48	0,41	1,03
26	0,21	0,83	2,89	0,62
27	0,83	1,24	0,21	2,27
28	0,83	0,21	1,45	0,21
29	1,24	1,65	3,51	0,21
30	0,62	3,10	0,21	0,83
\bar{x}	0,94	5,74	1,94	4,79

Tabelle 53 - Knochenpartikelflächen bei verschiedenen Drücken

Schnitt	1. Flügelglied (40 bar)	1. Flügelglied (60 bar)	Mittelflügel (40 bar)	Mittelflügel (60 bar)
1	5.223,60	882,28	2.549,60	549,10
2	210,20	37,18	157,29	225,93
3	317,45	1.178,28	224,50	3.041,50
4	5.625,41	724,98	2.119,18	2.196,40
5	122,98	2.162,08	3.153,03	805,06
6	185,89	596,29	622,03	619,17
7	2.163,51	1.347,01	417,54	536,23
8	1.086,76	280,27	706,39	1.907,55
9	1.545,77	670,65	2.460,94	2.406,60
10	6.040,10	303,15	3.646,37	2.855,60
11	2.235,01	311,73	-	945,20
12	524,79	-	622,03	2.317,94
13	1.049,58	7.820,38	2.337,96	7.315,61
14	261,68	446,14	8.011,22	6.084,43
15	45,76	7.587,30	1.693,06	4.208,33
16	163,01	2.285,06	8.598,00	3.298,89
17	428,98	170,16	2.528,88	1.567,22
18	128,70	835,09	9.068,69	579,13
19	55,77	1.069,60	6.522,39	163,01
20	6.722,18	1.870,37	45,76	1.612,98
21	656,35	922,32	10.211,49	8.355,18
22	230,22	100,10	11.326,28	55.976,71
23	657,78	2.306,50	813,64	61.923,86
24	107,25	15.946,77	-	985,23
25	200,19	225.143,75	873,70	1.178,28
26	51,48	903,73	3.110,14	606,30
27	1.224,03	3.356,09	205,91	14.694,14
28	1.402,78	117,26	5.694,05	115,83
29	4.089,65	1.201,16	3.178,77	38,61
30	876,56	5.340,85	203,05	255,96
\bar{x}	1.454,45	9.530,55	3.036,73	6.245,53

10.2.2.2.5 Schwankungen aufgrund des Geschlechts bei Putenverarbeitungsfleisch

Tabelle 54 - Knochenpartikelanzahl und Knochenpartikelfläche in Putenverarbeitungsfleisch

Knochenpartikelanzahl/cm ² Unterkeule der Pute	Knochenpartikelfläche Unterkeule der Pute [µm ² /cm ²]	Knochenpartikelanzahl/cm ² Unterkeule des Puters	Knochenpartikelfläche Unterkeule des Puters [µm ² /cm ²]
0,41	139,70	0,83	2.831,15
1,65	2.437,71	0,62	811,14
1,03	173,92	2,27	1.761,98
0,83	169,64	0,21	108,34
1,24	300,79	0,62	185,32
1,65	39.899,99	0,62	79,83
0,21	47,04	0,41	182,47
1,24	1.047,79	0,21	65,58
0,21	129,73	1,86	1.200,32
0,21	68,43	0,62	191,02
1,03	434,79	0,00	-
1,03	16.629,08	0,00	-
1,03	1.610,88	0,62	246,62
3,31	10.526,29	0,41	471,86
0,21	128,30	1,45	1.491,13
0,21	751,27	5,17	77.977,76
0,41	262,30	5,99	35.014,44
0,41	222,39	0,41	635,80
0,00	-	1,03	265,15
0,62	250,90	0,41	173,92
0,62	128,30	0,62	253,75
6,82	4.993,71	0,41	162,51
1,03	551,69	0,41	42,77
0,00	-	0,83	230,94
0,83	1.134,74	1,24	2.652,95
0,41	325,03	0,00	-
0,21	22,81	0,21	35,64
0,41	543,14	0,21	68,43
0,83	216,68	0,21	95,51
1,45	357,81	0,00	-

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Einmischversuche von unterschiedlichen Substraten zur Entwicklung eines softwaregestützten Nachweis- und Bestimmungsverfahrens zur histologischen Knochenpartikelanalyse	24
Tabelle 2 - Produkte aus dem Lebensmitteleinzelhandel mit Verdacht auf Knochenpartikelgehalt zur Entwicklung eines softwaregestützten Nachweis- und Bestimmungsverfahrens zur histologischen Knochenpartikelanalyse	26
Tabelle 3 – Proben, welche aus Betrieben entnommen und untersucht wurden.....	28
Tabelle 4 – Proben, welche aus Betrieben entnommen und untersucht wurden (Fortsetzung)	29
Tabelle 5: Färbeschema Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra und Färbeschema nach Calleja....	33
Tabelle 6: Silbernitratimprägnierung in der verwendeten Modifikation	34
Tabelle 7 – Verwendete Einstellungen des Slide Scanners zur Digitalisierung der Präparate auf den Objektträgern	34
Tabelle 8 – Verwendete Einstellungen des Bildexports zur Konvertierung und anschließendem Export.....	35
Tabelle 9 - Einstellung der Schwellenwerte zur Diskriminierung von Knochenpartikelflächen zu anderen Geweben.....	35
Tabelle 10 – Mittelwerte nach dem sRGB-Schema aus 10 Messungen von digitalen Bildern, die Proben zeigen, die mit der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra, der Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Calleja gefärbt wurden und daraus berechnet Kontrastwerte.	52
Tabelle 11 - Statistische Werte aus 108 Schnitten mit Probenmaterial aus Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelgehalt.....	61
Tabelle 12 - Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest.....	66
Tabelle 13 - Statistische Werte einer zufälligen Stichprobe von 6 aus 108 und 30 aus allen 108 Schnitten (die potenzierten Werte der Unter- bzw. Obergrenzen sind in Klammern aufgeführt).....	67
Tabelle 14 - Knochenpartikelfläche und Flächen ihrer Kavitäten	74
Tabelle 15 – Vergleich der Flächenmessung zwischen dem manuellen Umfahren und der automatischen Flächenerkennung.....	75
Tabelle 16 – Vergleich der konventionellen Partikelzählung mit der Zählung durch Phasenanalyse.....	77
Tabelle 17 – Detektierte Knochenpartikelanzahlen und Knochenpartikelflächen bei den Nullproben ohne Knochenpartikelzusatz aus Tabelle 1	78

Tabelle 18 - Detektierte Knochenpartikelanzahlen und Knochenpartikelflächen bei Hähnchen- und Putenhackfleisch aus Tabelle 2	79
Tabelle 19 - Spezifikationen der Materialien	148
Tabelle 20 – Spezifikationen der Geräte und Software	150
Tabelle 21 - Kontrastwerte Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra	154
Tabelle 22 - Kontrastwerte Silbernitratimprägnierung	154
Tabelle 23 - Kontrastwerte Calleja- Färbung	155
Tabelle 24 - Knochenpartikelanzahl in Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz	155
Tabelle 25 – Knochenpartikelfläche in Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz	156
Tabelle 26 Knochenpartikelanzahl in Geflügelbrühwurst	156
Tabelle 27 – Knochenpartikelfläche in Geflügelbrühwurst	157
Tabelle 28 - Knochenpartikelanzahl in Geflügelbratrolle	157
Tabelle 29 - Knochenpartikelfläche in Geflügelbratrolle	158
Tabelle 30 - Knochenpartikelgrößen der Silbernitratimprägnierung	158
Tabelle 31 - Knochenpartikelgrößen der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra.....	158
Tabelle 32 Nachgewiesene Knochenpartikelgrößen in Hähnchenhackfleisch mit 0,1%igen Knochenpartikelzusatz, in Geflügelbrühwurst und in Geflügelbratrolle gefärbt durch Silbernitratimprägnierung und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra [μm^2]	159
Tabelle 33 – Ergebnisse der Statistikproben	160
Tabelle 34 - Vergleich aus je 10 Mittelwerten aus 6 aus 108 und aus 30 aus 108 und deren Differenz zum Mittelwert aus 108 Schnitten in den Kategorien Knochenpartikelanzahl und -fläche	163
Tabelle 35 – Ergebnisse der Dichtebestimmung von 4 Geflügelknochen	164
Tabelle 36 – Knochenpartikelanzahl in Hähnchenhackfleisch mit 0,5% Knochenpartikelzusatz beim Versuch mit Dichtermittlung	165
Tabelle 37 – Knochenpartikelfläche in Hähnchenhackfleisch mit 0,5% Knochenpartikelzusatz beim Versuch mit Dichtermittlung	166
Tabelle 38 – Stufenweise Verringerung der Knochenpartikelanzahl durch Anwendung von Indigokarmin.....	167
Tabelle 39 – Stufenweise Verringerung der Knochenpartikelfläche durch Färbung mit Indigokarmin.....	168
Tabelle 40 - Analyseergebnisse Betrieb 1 und 2.....	169
Tabelle 41 - Analysenergebnisse Wochenversuch	171

Tabelle 42 - Analyseergebnisse aus den Materialien 1. Flügelglied und Mittelflügel bei unterschiedlichen Anpressdrücken.....	172
Tabelle 43 – Analyseergebnisse aus den Materialien Rücken, Gabelbein, Schulter und Unterschenkel	172
Tabelle 44 - Analyseergebnisse aus den Unterkeule der weiblichen und männlichen Pute	172
Tabelle 45 – Histologische Analyseergebnisse aus Betrieb 1	173
Tabelle 46 - Histologische Analyseergebnisse aus Betrieb 2.....	174
Tabelle 47 - Ergebnisse der Separatorenfleischproben aus Betrieb 1	175
Tabelle 48 - Ergebnisse der Separatorenfleischproben aus Betrieb 2	176
Tabelle 49 - Analyseergebnisse einer Arbeitswoche	177
Tabelle 50 - Berechnung der Ergebnisse aus einer Arbeitswoche für die einzelnen Komponenten.....	178
Tabelle 51 - Histologische Ergebnisse aus einem Verarbeitungsbetrieb.....	179
Tabelle 52 – Knochenpartikelanzahl mit unterschiedlichen Drücken.....	181
Tabelle 53 - Knochenpartikelflächen bei verschiedenen Drücken.....	182
Tabelle 54 - Knochenpartikelanzahl und Knochenpartikelfläche in Putenverarbeitungsfleisch	183

12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Zerteilung eines Masthähnchens innerhalb der Schlachtlinie (Beispiel), eigene Illustration.....	13
Abbildung 2 – Schema eines Schneckenseparators, Ausgangsmaterial definierter Größe wird in einer rotierenden Schnecke verdichtet, so dass sich kontinuierlich Druck aufbaut. Dieser sorgt dafür, dass das Material gegen einen Separationsfilter gepresst und weiche Bestandteile diesen passieren können. Das übriggebliebene stark knochenhaltige Material gelangt durch eine separate Öffnung abgeleitet. Abbildung übernommen aus EFSA Bericht (European Food Safety Authority (EFSA), 2013).....	14
Abbildung 3 – Schema eines Kolbenseparators, Ausgangsmaterial definierter Größe wird durch einen Fülltrichter in den Hohlraum eines Zylinders verbracht. In diesen Hohlraum fährt ein passender Kolben, welcher einen definierten Druck innerhalb des Hohlraums aufbaut. Dem Druckgefälle folgend bewegt sich das weichere Material durch einen Separationsfilter aus einer Öffnung. Nach Abschluss des Vorgangs wird das knochenreiche Restmaterial ausgestoßen. Abbildung übernommen aus EFSA Bericht (European Food Safety Authority (EFSA), 2013).....	15
Abbildung 4 – Schema eines Bandseparators, Ausgangsmaterial wird durch einen Fülltrichter in den Bandseparator verbracht und gelangt auf ein breites Förderband aus Gummi. Dieses presst das Material mit dem gewünschten Druck gegen eine perforierte Trommel, so dass die weichen Komponenten in das Innere der Trommel gelangen. Die weichen Komponenten größtenteils bestehend aus Fleisch und Fett werden über die Trommel ausgeschleust. Das übrige Material wird mit seinen harten Komponenten über das Förderband schließlich auch ausgeschleust. Abbildung übernommen aus EFSA Bericht (European Food Safety Authority (EFSA), 2013).....	16
Abbildung 5 – Geflügelbrühwurst mit deklarierten Anteilen an mechanisch getrenntem Putenfleisch.....	24
Abbildung 6 – Geflügelbratrollen mit deklariertem Anteil an Hähnchenseparatorenfleisch.....	24
Abbildung 7 – Hackfleischzubereitung aus Hähnchenhackfleisch und Speisesalz.....	25
Abbildung 8 – Hackfleischzubereitung aus Putenhackfleisch und Gewürzen.....	25
Abbildung 9 – Preparation der Probenwürfel mit einem Edelstahlstanzer zur Vorbereitung für Gefreiermikrotomschnitte.	31
Abbildung 10 – Anfertigen eines Schnittes	32
Abbildung 11 – Einzelne Schritte der Flächendetektion im Programm ImageJ® bei der Silbernitratimprägnierung. Von links nach rechts: Originalbild, Umwandlung in ein 8-bit-Grauwertbild, Anwendung des Schwellenwertes, Partikelzählung und Flächenmessung.	36

Abbildung 12 - Excel-Export der in ImageJ erstellten Daten	37
Abbildung 13 – F - AAS	39
Abbildung 14 – Fertig präparierte Hühnerknochen	43
Abbildung 15 – Pyknometer	43
Abbildung 16 - Ablauf der Dichtebestimmung von Geflügelknochen.....	43
Abbildung 17 – Färbeprotokoll des schrittweisen Färbens mit Indigokarmin	45
Abbildung 18 – 3 Folgeschnitte gefärbt nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra (1), mit der Silbernitratimprägning (2) und nach Calleja (3)	51
Abbildung 19 – Knochenpartikelanzahl ermittelt mit der Silbernitratimprägning und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra in den Probenmaterialien Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz, Geflügelbrühwurst und Geflügelbratrolle. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.....	54
Abbildung 20 – Knochenpartikelflächen ermittelt mit der Silbernitratimprägning und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra in den Probenmaterialien Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz, Geflügelbrühwurst und Geflügelbratrolle. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.....	56
Abbildung 21 – Prozentuale Häufigkeit der Knochenpartikel klassifiziert nach deren Flächen bei der Silbernitratimprägning und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Probenmaterial Geflügelhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelzusatz.	58
Abbildung 22 – Prozentuale Häufigkeit der Knochenpartikel klassifiziert nach deren Flächen bei der Silbernitratimprägning und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Probenmaterial Geflügelbrühwurst.....	59
Abbildung 23 – Prozentuale Häufigkeit der Knochenpartikel klassifiziert nach deren Flächen bei der Silbernitratimprägning und der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Probenmaterial Geflügelbratrolle.	60
Abbildung 24 – Knochenpartikelanzahlen und Knochenpartikelflächen aus Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelgehalt.....	62
Abbildung 25 - Auswahl von 10 Stichproben von einmal 6 aus 108 und einmal 30 aus 108 unter Betrachtung der Knochenpartikelanzahl und der Knochenpartikelfläche mit zusätzlicher Kenntlichmachung des Mittelwerts aller 108 Proben als Linie. Zu beachten ist, dass der jeweilige Mittelwert von 6 aus 108 bzw. 30 aus 108 nicht dargestellt ist. ...	64
Abbildung 26 - Histogramm der Knochenpartikelanzahlen und der logarithmierten Knochenpartikelanzahlen aus 108 Schnitten von Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelgehalt.....	65

Abbildung 27 - Histogramm Knochenpartikelflächen und der logarithmierten Knochenpartikelfläche aus 108 Schnitten von Hähnchenhackfleisch mit 0,1% Knochenpartikelgehalt.....	66
Abbildung 28 - Knochenpartikelanzahl ermittelt durch Silbernitratimprägnierung und Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Material Hähnchenhackfleisch mit 0,5% Knochenpartikelzusatz. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.	69
Abbildung 29 – Knochenpartikelflächen ermittelt durch Silbernitratimprägnierung und Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra im Material Hähnchenhackfleisch mit 0,5% Knochenpartikelzusatz in Bezug zum rechnerisch ermittelten Wert. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.	70
Abbildung 30 – Von oben links nach oben rechts nach unten links nach unten rechts: Schrittweise Entfärbung eines Knochenpartikels durch zunehmende Einwirkzeit von Indigokarmin. Einwirkzeit des Farbstoffs Indigokarmin: 0, 30, 90 und 150 Sekunden	71
Abbildung 31 - Detektierte Knochenpartikelanzahl bei schrittweiser Erhöhung der Einwirkzeit bei der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra.....	72
Abbildung 32 - Detektierte Knochenpartikelfläche bei schrittweiser Erhöhung der Einwirkzeit von bei der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra	73
Abbildung 33 - Differenz Knochenpartikelfläche zur Kavität in Prozent.....	74
Abbildung 34 – Geometrische Figur eines Quadrates. Links manuell mit der Maus umfahren, rechts mit der automatischen Flächenerkennung nach 3.3.1.3 erfasst	75
Abbildung 35 - Knochenpartikel manuell mit der Maus umfahren	76
Abbildung 36 - Knochenpartikel mit der automatischen umfahren Flächenerkennung nach 3.3.1.3 erfasst	76
Abbildung 37 – Vergleich von Hähnchenhackfleischzubereitung und Putenhackfleischzubereitung aus Tabelle 2 hinsichtlich der Knochenpartikelanzahl. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.....	81
Abbildung 38 - Vergleich von Hähnchenhackfleischzubereitung und Putenhackfleischzubereitung aus Tabelle 2 hinsichtlich der Knochenpartikelfläche. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.....	82
Abbildung 39 – Probe mit Kalziumkarbonat in der Silbernitratimprägnierung.....	83
Abbildung 40 - Probe mit Kalziumkarbonat in der Färbung nach Pfeiffer, Wellhäuser und Gehra	83
Abbildung 41 – Vollanalyseergebnisse aller Verarbeitungsfleischproben in Prozent.....	85
Abbildung 42 – Übersicht aller Verarbeitungsfleischproben im Hinblick auf die Untersuchungsparameter Knochenpartikelanzahl, Knochenpartikelfläche und Kalzium. Bei den Knochenpartikelanzahlen sind 51 Ausreißer mit Werten ab 9,3	

Knochenpartikeln/cm ² nicht dargestellt und bei der Knochenpartikelfläche sind 75 Ausreißer mit Werten ab 21.000 µm ² /cm ² nicht dargestellt.	86
Abbildung 43 – Knochenpartikelanzahl/cm ² in verschiedenen Teilstücken. 51 Ausreißer mit Werten ab 9,3 Knochenpartikeln/cm ² sind nicht dargestellt	87
Abbildung 44 – Knochenpartikelfläche in µm ² /cm ² in verschiedenen Teilstücken. 75 Ausreißer mit Werten ab 21.000 µm ² /cm ² sind nicht dargestellt.....	87
Abbildung 45 - Kalziumgehalt in mg/kg in verschiedenen Teilstücken	88
Abbildung 46 - Ermittelte Knochenpartikelzahlen im Vergleich zwischen Betrieb 1 und Betrieb 2 in den Materialien Verarbeitungsfleisch und Separatorenfleisch. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.	89
Abbildung 47 - Ermittelte Knochenpartikelflächen im Vergleich zwischen Betrieb 1 und Betrieb 2 im Material Verarbeitungsfleisch und Separatorenfleisch. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.	90
Abbildung 48 – Ermittelte Knochenpartikelanzahlen aus einer Arbeitswoche unter Verwendung verschiedener Mischungen aus Verarbeitungsfleisch.	92
Abbildung 49 - Ermittelte Knochenpartikelflächen aus einer Arbeitswoche unter Verwendung verschiedener Mischungen aus Verarbeitungsfleisch. Auf die Illustration der arithmetischen mittel wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.....	93
Abbildung 50 - Ermittelte Kalziumwerte aus einer Arbeitswoche unter Verwendung verschiedener Mischungen aus Verarbeitungsfleisch.	94
Abbildung 51 – Berechnungen der Einzelkomponenten der Verarbeitungsfleischmischungen. Ermittelte Knochenpartikelanzahlen (1), ermittelte Knochenpartikelflächen (2) und ermittelte Kalziumwerte (3).....	95
Abbildung 52 - Vergleich verschiednener Versuchmaterialien aus einem Verarbeitungsbetrieb hinsichtlich der Knochenpartikelanzahl. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.....	96
Abbildung 53 – Vergleich verschiedener Versuchmaterialien aus einem Verarbeitungsbetrieb hinsichtlich der Knochenpartikelfläche. Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.....	98
Abbildung 54 - Knochenpartikelnest im Rohstoff Verarbeitungsfleisch aus dem Mittelflügel bei 40 bar Druck.....	99
Abbildung 55 - Vergleich der Knochenpartikelanzahlen in den unterschiedlichen Materialien (nicht maßstabsgetreue Ausreißer: 1. Flügelglied (60 bar): 127,48 & Mittelflügel (60 bar): 46,28 und 54,55). Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.....	100
Abbildung 56 - Vergleich der Knochenfläche in den unterschiedlichen Materialien (nicht maßstabsgetreue Ausreißer zugunsten der Übersichtlichkeit: 1. Flügelglied (60 bar):	

225.144 & Mittelflügel (60 bar): 55.977 und 61.924). Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.....101

Abbildung 57 - Vergleich der Knochenpartikelanzahlen und der Knochenpartikelflächen in Putenverarbeitungsfleisch von weiblichen und männlichen Puten (nicht maßstabsgetreue Ausreißer bei der Knochenpartikelfläche: Unterkeulen der Pute: 16.629 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ und 39.900 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ sowie bei den Unterkeulen des Puters: 35.014 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ und 77.978 $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$). Die jeweiligen Mittelwerte sind grafisch als Strich neben den Boxplots aufgetragen.....102

Abbildung 58 – Kunststoffbox mit Eingriffen und Sichtfenster zum Reinigen und Umfüllen der Silbernitratlösung unter weitgehendem Ausschluss von UV-Strahlung 153

13 Formelverzeichnis

Formel 1 - Umrechnung des Messwertes für Kalzium

$$\frac{100x}{m} = y$$

x: Messwert (mg/l)

m: Einwaage (g)

y: Messwert (mg/kg)

Formel 2 - Michelson-Kontrast

$$K_m = \frac{L_{max} - L_{min}}{L_{max} + L_{min}}$$

K_m = Michelson Kontrast

L_{max} = Maximale Luminanz

L_{min} = Minimale Luminanz

Formel 3 - Luminanzberechnung

$$L = 0,2126 * R + 0,7152 * G + 0,0722 * B$$

Formel 4 - Rechnerische Überführung der RGB Werte in RGB-Farbdarstellung mit normierten Farbkanälen

$$R_{sRGB} = \frac{R_{8bit}}{255}$$

$$G_{sRGB} = \frac{G_{8bit}}{255}$$

$$B_{sRGB} = \frac{B_{8bit}}{255}$$

Formel 5 – Berechnung der Ausreißerwahrscheinlichkeit

$$P = 1 - \left(\frac{108 - n_A}{108} \right)^n$$

P= Wahrscheinlichkeit auf mindestens einen Ausreißer

n= Anzahl der Schnitte

n_A=Anzahl der Ausreißer

Formel 6 – Dichteberechnung

$$\rho (\text{Probe}) = \frac{m_1 * \rho (H_2O)}{m_1 + m_2 - m_3}$$

ρ = Dichte

m_1 = Masse der Probe

m_2 = Masse Pyknometer + Wasser

m_3 = Masse Pyknometer + Probe + Wasser

Formel 7 - Formel zur Berechnung der rechnerisch zu erwartenden Knochenpartikelfläche

$$A_{hyp} = \frac{A * k}{\rho}$$

A_{hyp} = theoretische Knochenpartikelfläche

A = Fläche von 1 cm² des Schnittes in μm^2

k = Eingesetzte Masse [g] an Knochenpartikeln in Prozent

ρ = Dichte

Formel 8 - Berechnung der Knochenpartikeltreffer/cm²

$$\frac{\text{Summe } y (y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n)}{4,84} = \text{Detektierte Knochenpartikelfläche pro cm}^2$$

Formel 9 - Minimierung des quadratischen Fehlers im überbestimmten Gleichungssystem

$$\min_x \| Ax - b \|$$

$$x = (A^T A)^{-1} A^T b$$

A : Mischverhältnisse

x : Messwert pro Bestandteil

b : Messwert pro Mischung

A^T : Transponierte Matrix

Formel 10 - Theoretisch berechneter Wert der Knochenpartikelfläche

$$\frac{A * k}{p}$$

A = Fläche von 1 cm² des Schnittes in μm²

k = Eingesetzte Menge an Knochenpartikeln in Prozent

p = Dichte

$$\frac{100.000.000 * 0,005}{1,3094} = 381.841,00$$

Zusätzliche Formeln aus Kapitel 3.4.2

Berechnung des arithmetischen Mittels

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Berechnung der Standardabweichung

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Standardfehler α

Wurde mit 0,05 definiert, demzufolge ist der Vertrauensbereich β 0,95

Varianz

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Konfidenzintervall

$$\left[x - t_{\left(1-\frac{\alpha}{2}; n-1\right)} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} ; x + t_{\left(1-\frac{\alpha}{2}; n-1\right)} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right]$$

14 Publikationsverzeichnis

Fechner, Röser, Upmann (2017): Histologische Knochenpartikelfärbungen im Vergleich – Genauigkeit von Alizarin, Kossa und Co., Poster bei der jährlichen DVG Tagung in Garmisch-Partenkirchen 2017

Fechner, Röser, Upmann (2017): Die digitale Knochenpartikelanalyse – eine Machbarkeitsstudie, Vortrag bei der jährlichen DVG Tagung in Garmisch-Partenkirchen 2017

Fechner, Röser, Upmann (2018): Stolpersteine beim histologischen Knochenpartikelnachweis, Poster bei der jährlichen DVG Tagung in Garmisch-Partenkirchen 2018, gewählt als bestes Poster der Tagung

Fechner, Kneißler, Upmann (2020): Kapitel „Knochen“ in Horn & Langen: Bildatlas Histologie Fleisch und Fleischerzeugnisse: Befunde beurteilen - Ergebnisse sicher bewerten, Seiten: 17, 118-123

15 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen herzlich bedanken, die mich bei der Durchführung und Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Thomas Alter danke ich, dass ich meine Promotion an seinem Institut durchführen durfte und für seine offene und angenehme Kommunikation, ob im direkten Miteinander oder über die Distanz hinweg.

Herrn Prof. Dr. Matthias Upmann möchte ich einen besonderen Dank aussprechen, dass er mir diese Promotion ermöglicht und mir eine Stelle in Lemgo gegeben hat. Er begeisterte mich für das Themenfeld der Lebensmittel und hat so meinen Lebensweg entscheidend beeinflusst. Ich danke ihm dafür, dass er mein selbstständiges Arbeiten gefördert und unterstützt hat, stets die notwendige Geduld aufbrachte, mich oft für wichtige Themen sensibilisierte und mir die Möglichkeit gab meine Ideen umzusetzen.

Frau Anja Röser danke ich für die umfassende Einarbeitung im histologischen Labor und die fortwährende Unterstützung bei allen großen und kleinen Problemen sowie für die interessanten Gespräche, die ich vermissen werde.

Herrn Achim Kothe und Herrn Michael Beck danke ich für die Unterstützung im lebensmittelchemischen Labor.

Des Weiteren danke ich allen beteiligten Firmen und deren Personal für Zeit, Proben und Logistik.

Ein besonderer Dank gebührt auch meinen Eltern, mit deren Unterstützung ich immer meinen Weg gehen konnte, meinem Bruder Florian, der mir bei auftauchenden Computerproblemen half sowie meiner restlichen Familie und meinen Freunden für deren Zuspruch.

16 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Ferner besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

Tim Julian Fechner

Bielefeld, den 25.06.2021



mbvberlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-124-7