

## Neuere Milchuntersuchungsmethoden und ihre Bedeutungen für die Milchwirtschaft.

Von Dr. L. EBERLEIN, Leipzig.

(Eingeg. 5. März 1929.)

Die Untersuchung der Milch kann man von zwei Gesichtspunkten betrachten. — In dem einen Fall wird es sich darum handeln, absichtliche, in betrügerischer Absicht vorgenommene Verfälschungen aufzudecken; hier kommen wesentlich Wässerung, Entrahmung und Zusatz von Konservierungsmitteln in Betracht. Die hierbei benutzten Methoden chemischer und physikalischer Art haben mancherlei Ergänzungen und Verfeinerungen in den letzten Jahren erfahren, vielfach sind sie auch vereinfacht worden, um auch dem Nicht-Chemiker bestimmte Prüfungen möglich zu machen. — Andererseits wird jetzt in immer gesteigertem Maße Sorgfalt darauf verwandt, Milch, die durch unsachgemäße Gewinnung minderwertig geworden oder verdorben ist, als solche zu erkennen. Im Interesse der gesamten Milchwirtschaft, aber auch im allgemeinen volkswirtschaftlichen Interesse ist dies von größter Bedeutung. Ganz abgesehen von den Gefahren, die uns durch schlechte Trinkmilch entstehen, kann uns auf diese Weise der Weg geebnet werden, um die nicht seltenen Klagen über minderwertige inländische Milchprodukte verstummen zu lassen, da man nur aus einwandfreier Milch tadellose Molkereierzeugnisse herstellen kann. Nur so wird es gelingen, die gewaltige Einfuhr ausländischer Milcherzeugnisse (Butter, Weichkäse, Sahne) einzudämmen. Hier kommen meist biologische Methoden (neben einigen chemisch-physikalischen) in Betracht: Feststellung des Schmutzgehaltes, Zählung oder Schätzung der Keime, Erkennung pathogener Organismen (jetzt besonders auch der virulenten Streptokokken!), Feststellung der vom Reichsviehseuchengesetz vorgeschriebenen Erhitzung von Seuchmilch.

## 1. Chemisch-physikalische Methoden zum Nachweis von Fälschungen.

Die einfachste und häufigst angewandte Methode, um die Wässerung der Milch nachzuweisen, ist die Spindelung mit dem Lactodensimeter (Milchwaage), die auch gelegentlich zur Feststellung der Entrahmung gute Dienste leisten kann. So einfach dem Chemiker die Spindelung einer Flüssigkeit zwecks Feststellung des spezifischen Gewichts mit einem Aräometer erscheint, so gehen doch die Anschauungen namhafter Milchwirtschaftler, wie das Lactodensimeter abzulesen sei, auseinander. Während bekannte Milchwirtschaftler, wie Barthel, Fleischhauer u. a. den Schnittpunkt des Flüssigkeitsspiegels mit dem Spindelschaft als Ablesungspunkt bezeichnen, weist Kooper, Leipzig<sup>1)</sup>, darauf hin, daß bei der Spindelung an dem oberen Wulst abzulesen sei, der sich infolge der Viscosität durch Oberflächenspannung der Milch bildet, da dieser Punkt der hydrostatischen Waage entspricht. — Die Grenzen, innerhalb welcher die Milch als unverwässert bzw. nicht entrahmt angesehen wird, sind von den Untersuchungsämtern der verschiedenen Städte zuweilen verschieden angegeben; während in Leipzig beispielsweise als unterste Grenze für unverfälschte

Milch 1,028, als obere 1,034 gilt, soll in Dresden als unterstes spez. Gewicht 1,029 gelten, während nach oben keine Grenze festgelegt ist, die Feststellung einer Entrahmung mit Hilfe des Lactodensimeters also abgelehnt wird. — Von den verschiedenen angebotenen Milchspindeln erscheinen mir die mit überstehendem (also während der Spindelung nicht in der Milch befindlichen) Thermometer am brauchbarsten, wie sie beispielsweise von den bekannten Firmen Dr. N. Gerber's Co. m. b. H., Leipzig, und Paul Funke & Co., Berlin, (neben anderen Spindeln) geliefert werden. Man benutze möglichst die sog. großen Modelle, die eine bequeme Schätzung der vierten Dezimale gestatten. Die Korrektur auf Normaltemperatur, falls nicht bei 15° abgelesen wurde, erfolgt mit Hilfe einer dem Lactodensimeter beigegebenen Tabelle.

Als eines der wichtigsten Kennzeichen für die Wässerung gilt noch immer die Bestimmung der fettfreien Trockenmasse. Abgesehen von einigen besonders krassen Fällen, kann eine Milch mit weniger als 8,0% fettfreier Trockenmasse fast sicher als gewässert angesehen werden. Nach Teichert<sup>2)</sup> betrug bei 7294 Stallprobenmilchen, die sich auf einen Zeitraum von 28 Jahren erstrecken, der Mindestwert für die fettfreie Trockenmasse 7,85%, der Meistwert 10,15%, der Mittelwert schwankte in 30 Jahren zwischen 8,83 und 9,12%. In zweifelhaften Fällen wird stets die Stallprobe herangezogen werden müssen; die Berechnung ergibt sich dann aus der bekannten Formel von Herz.

## Prozente der zuges. Wässerung:

$$= 100 \times \frac{\text{fettfr. Trockenmasse d. Stallprobe} - \text{fettfr. Trockenmasse d. Verdachtsprobe}}{\text{fettfreie Trockenmasse der Stallprobe}}$$

Soll die Trockenmasse direkt bestimmt werden, so werden 2 bis 3 g Milch in flacher, mit einem Deckel geschlossener Schale im Soxhletschen Trockenofen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Fleischmann<sup>3)</sup> geschieht die Bestimmung der Trockensubstanz besser indirekt durch Berechnung aus dem spez. Gewicht und dem Fettgehalt der Milch nach der von ihm aufgestellten Formel, da bei der Trocknung trotz aller Sorgfalt leicht durch die Eiweißkörper Wasserteilchen zurückgehalten werden, anderteils der Milchzucker das in ihm enthaltene Kristallwasser teilweise oder ganz verliert. — Auch vom Nichtchemiker kann die Ermittlung der fettfreien Trockenmasse als verschärfte Methode zur Erkennung einer Wässerung benützt werden, wenn er in der Lage ist, spez. Gewicht und Fettgehalt der Milch zu bestimmen. Beim Bezug eines Lactodensimeters wird meist eine Tabelle beigegeben, aus der man aus dem spez. Gewicht und den Fettprozenten ohne weiteres den Gehalt an Trockenmasse ablesen kann; durch Abzug der Fettprozente erhält man dann die fettfreie Trockenmasse.

Von den rein physikalischen Methoden zur Erkennung der Wässerung scheint neuerdings der Be-

<sup>1)</sup> Milchwirtschaftl. Ztrbl. 1926, Heft 11.<sup>2)</sup> Methoden z. Unters. v. Milch u. Molkereierzeugnissen. 2. Auflage. S. 212. Verlag Ferd. Enke, Stuttgart 1927.<sup>3)</sup> Lehrbuch d. Milchwirtschaft. 6. Aufl. Verlag Paul Parey, Berlin 1920.

stimmung des Gefrierpunktes der Milch wieder der Vorzug gegeben zu werden. Schon Beckmann hatte 1894<sup>4)</sup> darauf hingewiesen, daß der Gefrierpunkt der Milch konstant ist; J. Winter hat ihn genau bei  $-0,555$ , mit sehr geringen Schwankungen, festgestellt. Nach dem von J. Winter und Parmenier ausgearbeiteten Verfahren kann man schon einen Wasserzusatz von etwa 4% erkennen<sup>5)</sup>.

Demnach bringt man die verschiedenen Milchproben in verkorkten Glaszylindern in Eiswasser auf nahezu  $0^{\circ}$  und stellt dann einzelne, die untersucht werden sollen, in eine Kältemischung von 1 Teil Kochsalz und 4 Teilen zerstoßenem Eis. In die in ein Stativ eingeklemmte Probe wird ein Beckmannsches Thermometer (Gradteilung 0,01) gebracht und mittels des ringförmigen Rührers gerührt. Zunächst sinkt die Temperatur 1 bis  $2^{\circ}$  unter den Gefrierpunkt, steigt aber wieder mit der Eisabscheidung und bleibt beim Gefrierpunkt lange unverändert. Bei Milch, wie bei Lösungen überhaupt, ist hier aber eine Korrektur erforderlich. Man nimmt den Milchzylinder in die linke Hand, während man mit der rechten den Rührer bewegt; hierbei schmilzt der größere Teil des entstandenen Eises. Ist die Temperatur um 5 bis 6 Hundertteile eines Grades gestiegen, so bringt man den Zylinder wieder in die Kältemischung. Man beobachtet nun, unter zweimaligem Heben und Senken des Rührers in der Sekunde, wann die Quecksilbersäule feststeht, und liest ab. Nach zwei Minuten wiederholt man die Ablesung zur Erhaltung eines einwandfreien Resultates.

Hier wie sonst bei genauen kryoskopischen Bestimmungen empfiehlt sich von Zeit zu Zeit eine Nachprüfung des Thermometers, indem man den Gefrierpunkt des destillierten Wassers bestimmt.

Winter berechnet eine Wässerung von Milch aus folgender Formel

$$E = V \frac{a - \Delta}{a}$$

wobei E das zugesetzte Volumen Wasser, V Gesamtvolumen von Wasser und Milch, a die normale Herabsetzung des Gefrierpunktes ( $0,55^{\circ}$ ),  $\Delta$  die beobachtete Herabsetzung des Gefrierpunktes ist. In einer von Winter aufgestellten Tabelle<sup>6)</sup> kann man aus der ermittelten Ablesung den Prozentgehalt des zugesetzten Wassers ohne weiteres feststellen. Nach Bonnema macht sich eine Korrektur der Winterschen Formel aus folgenden Gesichtspunkten erforderlich. Wenn eine natürliche Milch 1 W% Wasser enthält, dann sind die Kristalloide, welche die Erniedrigung des Gefrierpunktes in 100 g Milch verursachen, in W g Wasser gelöst. Werden jetzt w g Wasser zu 100 g Milch zugesetzt, so sind die Kristalloide in (W + w) g Wasser gelöst. Wurde D als Gefrierpunkt der gewässerten Milch beobachtet, so ist die Wässerung

$$w = \frac{0,555 \cdot W}{D} - w;$$

wobei W noch aus der Trockensubstanz (ermittelt aus spez. Gewicht und Fettgehalt) zu bestimmen ist.

Indessen scheint man sich in den meisten Fällen mit der Winterschen Formel zu begnügen. Nach Barthel hat sich die Zuverlässigkeit der Methode ausgezeichnet bewährt, nach seinen Feststellungen hat reine

unverfälschte Kuhmilch niemals einen höheren Gefrierpunkt als  $0,54$ , und zwar unabhängig von Rasse, Individualität, Fütterung, Lactationsperiode, Fettgehalt<sup>7)</sup>. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß Säuerung der Milch sowie Zusatz von Konservierungsmitteln den Gefrierpunkt beeinflussen werden. Da der Zusatz der letzteren verboten ist (es kommt in der Hauptsache jetzt kaum etwas anderes als Natriumcarbonat bzw. Bicarbonat in Betracht), wäre bei Nachweis derselben die Milch im vornherein zu beanstanden. — Wird eine Milch mit Säuregraden zwischen 7 bis 10 nach Soxhlet verkauft (eine Milch mit höheren Säuregraden kommt für den Handel überhaupt nicht in Frage), so ist für jeden Säuregrad über 7 eine Korrektur von  $0,008^{\circ}$  anzubringen<sup>8)</sup>.

Von anderen physikalischen Methoden, um Wässerung in schwierigen Fällen nachzuweisen, sei die Bestimmung der Brechungszahl des Milchserums erwähnt, darauf beruhend, daß der Brechungsindex normaler Milch zwischen  $1,3430$  und  $1,3445$  bei  $15^{\circ}$  liegt. Nach Henseval und Mullie<sup>9)</sup> ist Milch als gewässert zu betrachten, die einen niedrigeren Brechungsindex als  $1,3425$  aufweist; Milch zwischen  $1,3425$  und  $1,3429$  ist der Wässerung verdächtig. — Zur Herstellung des Serums werden je 30 ccm Milch mit 0,25 ccm Chlorcalciumlösung vom spezifischen Gewicht  $1,1375$  in ein Glasröhrchen gebracht, die mit Rückflußrohr versehenen Röhren im stark siedenden Wasserbad 15 Minuten gehalten und das Serum abgekühlt und unfiltriert im Eintauchrefraktometer von Zeiß bei  $17,5^{\circ}$  untersucht. Aus einer Tabelle kann aus der Refraktometerzahl die zugesetzte Wassermenge abgelesen werden. Näheres siehe Barthel, „Methoden zur Untersuchung von Milch und Molkereiprodukten“, 1925, S. 29; Mai und Rothenfußer, Le Lait 5, 1925, S. 777; Röttger, „Nahrungsmittelchemie“, 6. Aufl., 1926, S. 341. Über Messung der elektrischen Leitfähigkeit vgl.: „Erfahrungen mit physikalischen Methoden bei der Untersuchung von Milch“ von J. Krenn<sup>10)</sup>.

Gewissermaßen als Vorprobe wäre die schon längere Zeit angewandte Nitratprobe zu erwähnen, die auf dem Grundsatz basiert, daß unverfälschte Milch keine Salpetersäure enthält. Sie gibt natürlich nur dann ein Resultat, wenn das zugesetzte Wasser Nitrate enthielt (Wässerung der Milch auf dem Land!); der Nachweis derselben erfolgt durch Zusatz von Diphenylamin in konzentrierter Schwefelsäure. Vgl. hierüber — neben den bereits genannten Lehrbüchern — „Praktische Methoden zur Untersuchung von Milch und Molkereiprodukten“, bearbeitet von Dr. W. Riedel, Oldenburg, herausgegeben von Dr. W. Gerbers Co., Leipzig; S. 86.

Als beste praktische Methode der Fettbestimmung in der Milch gilt noch immer das Gerbersche Schwefelsäureverfahren, daß sich in entsprechenden Modifikationen für alle Milchprodukte (Butter, Käse, Buttermilch, Magermilch, Rahm usw.) anwenden läßt und das darauf beruht, die Eiweißstoffe usw. durch konzentrierte Schwefelsäure vom spezifischen Gewicht  $1,825$  zu verbrennen und die Fettsäuren als solche in dem gleichen Gefäß („Butyrometer“) abzuschcheiden, wobei ein Zusatz von Amylalkohol (spez.

<sup>4)</sup> Milchztg. 1894, S. 703.

<sup>5)</sup> Vgl. Methoden z. Unters. v. Milch u. Molkereiprodukten. Von Ch. Barthel. 4. Aufl. S. 24. Verlag Paul Parey, Berlin 1928.

<sup>6)</sup> Vgl. Dr. Barthel, Methoden z. Unters. v. Milch u. Molkereiprodukten.

<sup>7)</sup> Vgl. hier indessen auch: Teichert, Methoden z. Unters. v. Milch u. Milcherzeugnissen. S. 43. 2. Aufl. Verlag F. Enke, Stuttgart 1927.

<sup>8)</sup> Röttger, Nahrungsmittelchemie. S. 347. 5. Aufl. 1926.

<sup>9)</sup> Revue Générale du Lait 4, 529 [1905].

<sup>10)</sup> Ztschr. angew. Chem. 1929, Nr. 8.

Gew. 0,815 bei 15°, Sdp. 128–130°) die Klärung des abgeschiedenen Fettes bzw. der Fettsäuren bewirkt. Die Butyrometer gestatten dann eine direkte Ablesung der Fettprocente. Die Ausführung ist bekannt: 10 ccm Schwefelsäure werden im Flachbutyrometer mit 11 ccm gut gemischter Milch überschichtet, 1 ccm Amylalkohol zugegeben, das mit Gummistopfen geschlossene Butyrometer geschüttelt, in der G er b e r s c h e n Zentrifuge bei 1000 Touren Umdrehungszahl/Minute drei Minuten zentrifugiert, die Stöpsel hochgedreht und die Butyrometer in ein Wasserbad von 65–70° während vier Minuten gebracht, alsdann die abgeschiedene Fettsäule sofort abgelesen. — Bei dem Neusalverfahren wird anstatt der Schwefelsäure „Neusal“ (eine Lösung salicylsaurer und citronensäurer Salze) benutzt; zur Klärung des Fettes dient Butylalkohol, der der Neusalösung gleich beigelegt ist. Zur Ausführung der Bestimmung werden besondere, sogenannte „Neusalbutyrometer“ verwandt<sup>11)</sup>.

Im allgemeinen liegt für den Chemiker kein Grund vor, seinerseits von der bewährten G er b e r s c h e n Methode, die sehr genaue Resultate gibt, abzugehen. Indessen kommt er, besonders in seiner Eigenschaft als Nahrungsmittelchemiker, häufig in die Lage, Polizeiorgane, Milchhändler und andere für die Milchversorgung Interessierte in einer einfachen Milch-Fett-Bestimmung zu unterweisen, wobei mit weniger kostspieligen Apparaten gearbeitet und auch die Anwendung der gefährdenden Schwefelsäure vermieden werden soll. Hierbei hat sich die Einführung der Morsin-Methode<sup>12)</sup> bewährt (Methode von Morres und Schützler), die von der Firma Paul Funke & Co., G. m. b. H., Berlin, eingeführt ist. Das zur Lösung der Eiweißstoffe und zur Ausscheidung des Fettes dienende Morsin besteht nach Mitteilung der genannten Firma aus einer alkalischen Lösung von salicylsäurem und citronensäurem Natron in verdünntem Methylalkohol unter Zusatz von Isobutylalkohol.

Am besten wird die Methode nach den letzten Vorschriften mit „Morsin 28“ (1928) ausgeführt; sie gibt für Vollmilch und, in entsprechender Modifikation, auch für Rahm gute Resultate, die dem G er b e r s c h e n Schwefelsäureverfahren ziemlich nahe kommen. Hiernach werden 6 ccm Morsin mit 9,7 ccm der zu untersuchenden Milch im „Morsinbutyrometer“ gemischt, letzteres geschlossen und sehr gut geschüttelt. Als dann wird in ein Wasserbad von 50–60° (am besten genau 55°) gesetzt (Stöpsel nach unten), 5 Minuten dort belassen und dann von neuem geschüttelt. Hierauf folgt weiteres Einstellen in das Wasserbad von 55° während der Dauer von 5 Minuten. Als dann werden die Butyrometer herausgenommen, vier- bis fünfmal zum völligen Auslaufen umgedreht und nun in dem Wasserbad nach Eindrehen der Stöpsel diesmal 15 Minuten belassen, worauf Ablesung der Butyrometer erfolgt.

Die Methode hat, bei allerdings größerem Zeitaufwand, den Vorteil der billigen Anschaffungskosten der Apparate, da hierzu nur einige Morsinbutyrometer, zwei Pipetten und die Morsinlösung erforderlich sind.

Refraktometrisch läßt sich der Fettgehalt der Milch mit dem Wollnyschen Milchfett-Refraktometer gut bestimmen. Es basiert auf der Tatsache, daß das Milchfett einen nahezu beständigen Brechungs-exponenten besitzt. Allerdings ist zu berücksichtigen,

daß die Methode bei Kolostrum (Biestmilch) nicht gut anzuwenden geht (infolge der Zusammenballung der Fetteilchen in diesem Fall); auch bei Milch von besonders hohem Fettgehalt scheinen kleine Fehler sich einzustellen. Über die Ausführung sei hier auf das einschlägige Schrifttum verwiesen<sup>13)</sup>.

Von nachzuweisenden Konservierungsmitteln kommen Wasserstoffsuperoxyd und Formalin neben Soda und Bicarbonat in Betracht. Zum Nachweis von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird im Reagensglas Milch mit zwei Tropfen 40%igem Formalin und mit reiner konzentrierter HCl (spezifisches Gewicht 1,19) versetzt. Beim Mischen tritt bei Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blauviolette Färbung ein. — Formalin wird mit der Fritzmanschen Reaktion nachgewiesen: Man gibt im Reagensglas zu der zu prüfenden Milch Wasserstoffsuperoxyd und unterschichtet sie mit reiner konzentrierter Schwefelsäure. Ein blauvioletter Ring an der Berührungsstelle zwischen Milch und Schwefelsäure zeigt die Anwesenheit von Formalin an.

Der Nachweis von Soda geschieht mit den üblichen Mitteln. Als sehr geeigneten Nachweis neutralisierter Milch empfiehlt Prof. Morres, Friedland in Böhmen, die Alizarolprobe in Verbindung mit der Reduktaseprobe<sup>14)</sup> (s. unten); diese Methode ist indessen nur bei unerhitzter Milch zur Anwendung zu bringen. Läßt demnach die Alizarolprobe auf einen geringen Säuregrad schließen, während die Reduktaseprobe auf hohe Bakterienzahl hinweist, so kann die Milch als neutralisiert gelten. — Die Anschauung von Morres, daß gegen richtig neutralisierte und dann erhitzte Milch vom chemischen und hygienischen Standpunkt nicht viel einzuwenden sei, wird von deutschen Milchwirtschaftlern allerdings keineswegs allgemein geteilt werden.

## 2. Biologische Methoden.

Im nachfolgenden sollen, ohne Anspruch auf Vollständigkeit, einige der wichtigsten neueren Methoden angeführt werden, die zur Erkennung dienen, ob Milch in einwandfreier Weise aus gesundem Viehstand genommen wurde, soweit dieselben auch vom bakteriologisch geschulten Chemiker ausgeführt werden können.

Schmutzprobe. Nur unverschmutzte Milch sollte überhaupt zum Handel zugelassen werden. Am häufigsten und fraglos am gefährlichsten ist die Verschmutzung durch Kuhkot. Leider versagen, in bezug auf Angabe von richtigen Methoden, hier in mancher Hinsicht die Milchregulative unserer Städte, die teilweise aus einer Zeit stammen, in der man die Bedeutung der Milchverschmutzung noch nicht in vollem Maße erkannt hatte. Wenn demnach z. B. nur solche Milch als verschmutzt gelten soll, die nach ½stündigem Stehen in einem durchsichtigen Gefäße (Glasflasche!) einen deutlichen Bodensatz zeigt, so muß diese Verordnung als unzureichend bezeichnet werden, denn feinverteilter Schmutz sedimentiert keineswegs immer in kurzer Zeit; außerdem hat diese, meist von Wohlfahrtsbeamten und Milchhändlern ausgeführte Bestimmung gegenüber dem Produzenten (dem Milchlieferanten, Landwirt) keine Beweiskraft, da die Milch doch meist nach dem Anstellen der Probe fortgegossen wird, der Produzent also nicht der unsauberen Milchgewinnung überführt wer-

<sup>11)</sup> Ausführung vgl. u. a.: Prakt. Methoden z. Unters. v. Milch usw. Von Dr. W. Riedel, Oldenburg, S. 72.

<sup>12)</sup> Vgl. Die Fettbestimmung in der Milch ohne Zentrifuge, Milchwirtschaftl. Ztrbl. 1926, 2. Heft.

<sup>13)</sup> Vgl. hier besonders: Teichert, Methoden z. Unters. v. Milch u. Milcherzeugnissen. 2. Aufl. Verlag Ferd. Enke, Stuttgart 1927.

<sup>14)</sup> Molkerei-Ztg. 1928, Nr. 137.

den kann. Dagegen gestatten die auf dem Filtrierprinzip beruhenden Milchschnitzprober (von den Firmen Dr. N. Gerbers Co., Leipzig, Paul Funke & Co., Berlin N 4 u. a.) noch nach Monaten oder Jahren den Nachweis einer zu einer bestimmten Zeit erfolgten unsauberen Milchbelieferung. Sie bestehen aus einem Glasgefäß in Form einer gewöhnlichen Milchflasche, die indessen keinen Boden hat; der untere, verjüngte Teil wird beim Gebrauch mittels Bajonettverschlusses durch eine Siebplatte abgeschlossen, auf die ein kleines Watte- oder besser Leinenfilter zu liegen kommt; beim Gebrauch des Schnitzprobers wird durch die Bodenöffnung  $\frac{1}{2}$  Liter Milch eingegossen; beim Durchfließen der Milch werden sämtliche Schmutzteilchen auf den Filtern zurückgehalten, die, auf Papierbogen gelegt und mit Datum und Namen des Lieferanten versehen, ein beweiskräftiges Material für die Sauberkeit der Milchlieferung ergeben. — Ich habe in den von mir in Rheinland-Westfalen und in Sachsen veranstalteten Fachkursen für Milchhändler mich überzeugen können, wie erzieherisch die Einführung dieser Schnitzprober auf die Milchlieferanten sich auswirkt.

Die neueren biologischen Methoden beginnen sich jetzt auch in den chemischen Untersuchungsämtern einzubürgern, nachdem dieselben bis vor kurzer Zeit nur von milchwirtschaftlichen Kontrollstationen oder bakteriologischen Instituten in der Hauptsache ausgeübt wurden. Sie bezwecken hauptsächlich die Feststellung des Frischzustandes der Milch (wobei als Vorprobe die Alizarol- oder Titrierprobe dienen kann), ferner die Ermittlung kranker Sekrete, und somit kranker Tiere.

In erster Linie dient zur Erkennung des Frischzustandes die Reduktaseprobe. Von der früher ebenfalls häufig benutzten Katalaseprobe sagt Prof. Behre, Altona, mit Recht, daß diese keine besondere Bedeutung neben der Reduktaseprobe mehr besitzt, da sie uns ebenfalls nur einen Aufschluß über die Höhe der Keimzahl gibt. Die Lab- und Gärproben werden meist nur Bedeutung für die Käserei besitzen; in besonderen Fällen kann die Gärprobe allerdings ein Kriterium für die Sauberkeit des Stalles abgeben.

Die Reduktaseprobe besteht bekanntlich darin, daß man die Milch mit einem Farbstoff (früher ausschließlich Methylenblau, jetzt besser Janusgrün) versetzt und aus der Entfärbungszeit Schlüsse auf den Frischzustand und damit den Bakteriengehalt der Milch ziehen kann. Die praktische Bedeutung liegt auf der Hand. Man kann, ohne bakteriologische Keimzählungsmethode, beispielsweise dem Viehbesitzer auf Grund zu raschen Entfärbens mitteilen, daß seine Milch nicht genügend gekühlt war<sup>15)</sup>. Über Ausführung der Reduktaseprobe mit Methylenblau und Janusgrün (Safraninazodimethylanilin) vgl. u. a. Praktische Methoden zur Prüfung von Milch und Molkereiprodukten. Von Dr. W. Riedel, Oldenburg, Seite 103.

Der Vorzug des Janusgrüns gegenüber dem Methylenblau besteht darin, daß dessen erste Reduktionsstufe (rot) im Gegensatz zu Methylenblau luftbeständig ist<sup>16)</sup>. Zu 10 ccm Milch wird 1 ccm Janusgrünlösung,  $\frac{1}{100}$ % Janusgrün enthaltend, zugegeben. Die grüne oder blaugrüne Lösung wird zunächst (im ersten Reduktionsstadium) leuchtend rot, weiter reduziert entfärbt es sich. Während aber die Methylenblaulösung sich beim Um-

schütteln wieder färbt, die weiß gewordene Milch wieder blau wird, läßt sich beim Janusgrün die erste Reduktionsstufe nicht wieder in die Ausgangsfarbe zurückverwandeln. Die zweite Reduktionsstufe des Janusgrün ist dagegen nicht luftbeständig, sie „reoxidiert“ wieder in die erste.

Handelt es sich darum, Bakterien als solche zu erkennen und zu zählen, so ist das dem biologisch geschulten Chemiker bekannte Plattenverfahren unvermeidlich, wobei als Nährboden Milchzuckeragar benutzt wird. Vielfach wird indessen, zwecks rascher Ausführung — das Plattenverfahren nimmt mindestens 48–72 Stunden in Anspruch — jetzt die direkte Keimzählung in milchwirtschaftlichen Laboratorien in Anwendung gebracht. Hier verdient in erster Linie die von Breed angegebene, später von Newman wesentlich vereinfachte Schnelluntersuchungsmethode<sup>17)</sup> Erwähnung, wobei nach Breed das Entfetten, Fixieren und Färben der Präparate in einem einzigen Arbeitsgang vorgenommen werden kann. Demnach werden 0,01 ccm Milch mit einer Capillarpipette auf einen Objektträger gebracht, dort mit einer umgebogenen Nadel genau auf die Fläche von 1 qcm ausgebreitet, in einem kleinen Trockenapparat getrocknet und mit der Breed-Newmanschen Lösung behandelt; alsdann nochmals getrocknet, die Farbstoffe mit Wasser abgewaschen und letzteres durch Abtupfen mit Filtrierpapier entfernt, wonach durch Auszählen bei bekannter Vergrößerung festgestellt wird, wieviel Keime pro Gesichtsfeld vorliegen. Eine einfache Umrechnung ergibt die Feststellung des Keimgehaltes pro Kubikzentimeter. Zur Ersparung der Umrechnung kann eine im Verlage der Molkerei-Zeitung, Hildesheim, erschienene, von G. Röder entworfene Tabelle dienen, die für die gangbaren Vergrößerungen und die im Gesichtsfeld beobachteten Keimzahlen die Ablesung der Keimzahlen im Kubikzentimeter gestattet.

Schon seit längerer Zeit, neuerdings aber in sehr verstärktem Maße, wendet man große Sorgfalt der Erkennung euterkranker Milch zu, sowohl im Interesse der Volksgesundheit, als auch deshalb, um den Landwirt durch rechtzeitiges Erkennen einer im Entstehen begriffenen Eutererkrankung vor Verlusten zu schützen. Bekannt ist die Trommsdorffsche Leucocytenprobe, wobei durch Ausschleudern von verdächtiger Milch in 10 ccm fassenden Zentrifugengläschen mit langem, graduiertem Stiel (einer fein eingeteilten Capillare) die in euterkranker Milch stets in reichem Maße vorhandenen Leucocyten, neben Bakterien und Eiweißteilchen ausgeschleudert werden; aus Menge und mikroskopischer Beschaffenheit des Sediments kann man auf eine vorhandene, mehr oder weniger fortgeschrittene Eutererkrankung schließen. Olav Skar, Oslo, empfiehlt Leucocytengläschen mit verkürztem Stiel, aus dem der ausgeschleuderte Bodensatz besser entfernt werden kann, und welche den Vorteil der leichteren Reinigung besitzen. Als die bakteriellen Indikatoren der Eutererkrankungen gelten die Mastitis-Streptokokken, die sich morphologisch von den harmlosen Milchsäure-Streptokokken unterscheiden. Zur Erkennung derselben hat sich ausgezeichnet die von Jensen und Skar<sup>18)</sup> mitgeteilte Methode erwiesen, die eine Modifikation der Gramschen Färbung darstellt

<sup>15)</sup> G. Röder, Zur praktischen Ausführung der Keimzahlbestimmung in Milch, Molkerei-Ztg. 1928, Nr. 128.

<sup>16)</sup> O. Skar, Nachweis und Bekämpfung der Euterentzündung beim Rinde, Ztschr. f. Infektionskrankheiten, parasitäre Krankheiten u. Hygiene d. Haustiere 1928, Bd. 34, Heft 1.

<sup>15)</sup> Christiansen, Vgl. Milchwirtschaftl. Ztrbl. 55, Heft 10 [1926].

<sup>16)</sup> Milchwirtschaftl. Ztg. 1926, Nr. 42.

und die, nach den persönlichen Erfahrungen des Verfassers, sich auch sonst gut bei der mikroskopischen Erfassung von Mikroorganismen in der Milch bewährt hat. Sie sei daher im folgenden kurz mitgeteilt.

1. Das lufttrockne Präparat wird etwa  $\frac{1}{4}$  Minute mit 0,15–0,18%iger, wässriger Lösung von Methylviolet 6 B gefärbt.

2. Abspülen mit Jod-Jodkalium-Lösung (1–2–97). Nach erneutem Auftropfen bleibt das Präparat  $\frac{1}{4}$  Minute stehen.

3. Abspülen mit 96%igem Alkohol; weiteres Betropfen und Schütteln bis zur Entfärbung des Präparates.

4. Abspülen mit Wasser.

5. Färben mit 1‰iger wässriger Lösung von Neutralrot (destilliertes Wasser 500, Neutralrot 0,5, 1‰ige Essigsäurelösung) in etwa 3–5 Sekunden.

6. Abstreichen zwischen Filtrierpapier in mehreren Lagen. Trocknen an der Luft.

Mikroskopieren, wobei das Immersionsöl direkt (ohne Deckgläschen) auf das Präparat zu geben ist. — Man erhält bei diesem Färbeverfahren selten Überfärbung der Streptokokken mit Deckung ihres Querstreifens wie bei der gewöhnlichen Gram-Färbung. Die Präparate werden auch brauchbar, wenn man bei Massenuntersuchungen die Färbezeit nicht genau einhalten kann. Die charakteristischen Involutionsformen der pathogenen Streptokokken sind deutlich zu erkennen. Degenerierte oder tote Ketten oder Teile davon sind nur schwach Gram-gefärbt oder gelegentlich Gram-negativ, was die Unterscheidung von den nicht pathogenen, mehr Gram-festen Streptokokken erleichtert.

Die Entfärbung der Präparate gelingt nach der Methode sehr leicht; die Lösungen sind haltbar.

Bei der großen Bedeutung der Eutererkrankungen ist es begreiflich, daß man deren Feststellung jetzt auch auf Grund bestimmter Schnellmethoden, ohne mikroskopische Kontrolle, versucht hat. Auch wenn man diesen Verfahren nur den Wert von Vorprüfungen zubilligen wollte, so können einige von ihnen doch mit großem Vorteil bei sinngemäßer, verständiger Anwendung zur Erkennung von Mastitis herangezogen werden. Die „Chlorofunkmethode“ der Firma Paul Funke & Co. m. b. H., Berlin N4, basiert auf der Tatsache, daß chronische Mastitis immer mit einer Vermehrung des Chlorgehaltes verbunden ist, die mit Hilfe eines bestimmten Titrierverfahrens nachgewiesen wird; sie ist schon anderen Orts in dieser Zeitschrift beschrieben<sup>19)</sup>. Neuerdings wird die Messung der Wasserstoffionenkonzentration von Milchproben zwecks Bekämpfung von Sekretionsstörungen häufig mit gutem Erfolg durch die „Thybromolprobe“ der Firma Dr. N. Gerbers Co., Leipzig, vorgenommen. Der Schöpfer dieser Methode, Dr. Georg Roeder, Chefchemiker des Laboratoriums von Dr. N. Gerbers Co., Leipzig, hat festgestellt, daß die Wasserstoffionenkonzentration zu Beginn der Störungen bis zu einem gewissen Grade erniedrigt, bei weiterem Fortschritt der Erkrankung plötzlich stark erhöht wird, so daß bei akuten Entzündungen häufig eine stark saure Reaktion beobachtet werden

kann<sup>20)</sup>. Bei veralteten, chronischen oder latenten Störungen pflegt indessen die Wasserstoffionenkonzentration gegenüber dem Normalfall regelmäßig erniedrigt zu sein. — Da — nach Roeder — auch bei den geringen Schwankungen in der Wasserstoffionenkonzentration normaler Milch immerhin auch hier schon Änderungen in der Farbenreaktion bei Anwendung einer Titriermethode festzustellen sind, so soll bei der Thybromolprobe weniger Wert auf den absoluten Farbton gelegt werden, vielmehr soll hier eine Vergleichsprobe für die Gemelke der einzelnen Euterviertel in Anwendung kommen. Praktisch kommt es nämlich nur ganz ausnahmsweise vor, daß alle vier Euterviertel einer Kuh gleichzeitig und gleich stark erkranken; es läßt sich daher aus der Verschiedenheit gleichzeitig aus dem Euter entnommener Proben viel sicherer und zuverlässiger auf eine vorliegende Störung schließen als aus absoluten Zahlenwerten, die stets natürlichen Schwankungsmöglichkeiten unterworfen sind.

Die Ausführung der „Thybromolprobe“ — Thybromol = Dibromthymol-sulphophthalein — geschieht in der Weise, daß man zu Beginn des Melkens 5 cm Milch in ein Gläschen bringt, mit je 1 cm der Thybromollösung versetzt und nach dem Durchschütteln beobachtet, ob die Farben der vier Proben gleich oder verschieden sind. — Bei normaler Milch zeigen alle vier Proben eine gleichmäßige (höchstens etwas hellere oder dunklere) hellgelblich-grüne Färbung. Leichte Störungen verschieben die Tönung je nach der Intensität nach blaugrün; eine ebensolche Verfärbung bewirken in der Regel auch chronische Erkrankungen. Bei sehr starken, akuten Fällen tritt eine rein gelbe, mit der Färbung normaler Proben keineswegs zu verwechselnde Farbe auf. — Bei der Lieferung der handlichen Apparatur ist eine Farbentafel beigegeben, die an einigen charakteristischen Beispielen die Beurteilung der Proben veranschaulicht.

Diese Schnellmethode gibt — nach Befund eines großen Analysenmaterials — in 80–90% der untersuchten Fälle die richtigen Ergebnisse, was für die Praxis, in Anbetracht ihrer einfachen Ausführung, entschieden von großem Wert ist. In Zweifelsfällen müßte natürlich der mikroskopische Befund nach dem Ausschleudern herangezogen werden.

Bei der großen Bedeutung, der zurzeit der Erhitzung der Milch zukommt, ist der Nachweis der Erhitzung von Wichtigkeit. Bekanntlich bedient man sich dazu meist der Peroxydasereaktion nach Rothenfußer, darauf beruhend, daß man der zu prüfenden Milch ein Peroxyd in fester Form („Pergenol“) sowie eine geringe Menge Paraphenyldiamin zugesetzt; bei Rohmilch entsteht nach kurzer Zeit intensive Blauviolett-färbung, die bei gekochter Milch ausbleibt. — Bei der Wichtigkeit der richtigen Durchführung der einschlägigen Bestimmungen des Reichsviehseuchengesetzes einerseits und der Durchführung der Dauerpasteurisierung andererseits erscheint es indessen auch von Bedeutung, durch einfache Reaktion den Grad der Erhitzung zu erkennen. In diesem Zusammenhang sei auf die Arbeiten von Dr. P. Weinstein hingewiesen: „Nachweis des Erhitzungsgrades der Milch“<sup>21)</sup>.

<sup>19)</sup> E. Fischer, Chem.-technische Neuerungen auf der Ausstellung „Die Ernährung“ in Berlin, Ztschr. angew. Chem. 41, Nr. 29, 784 [1928]. Vgl. auch betr. Bekämpfung der Euterkrankheiten, M. Seelmann, Fortschritte auf dem Gebiete der Milchhygiene, ebenda S. 796.

<sup>20)</sup> S. auch: G. Roeder, Untersuchungen über die Empfindlichkeit der Thybromolprobe im Vergleich mit anderen Methoden zum Nachweis krankhafter Veränderung der Milch, Milchwirtschaftl. Forsch. Bd. 7, Heft 3 u. 4. Jul. Springer, Berlin 1929.

<sup>21)</sup> Ztschr. Unters. Lebensmittel 56, Heft 5/6, 457 [1928].

Weinstein fand, daß Milch, behandelt nach den Bestimmungen des Reichsviehseuchengesetzes:

a) auf 85° eine Minute erhitzt negative Rothenfußersche Reaktion ergibt;

b) 30 Minuten auf 70° erhitzt die Rothenfußersche Reaktion zeigt, jedoch ist hier die Scharingersche Reaktion auf Aldehydreduktase negativ, d. h. innerhalb 22 Minuten tritt keine Entfärbung ein (s. unten).

Zum Nachweis dauererhitzter Milch:

a) ordnungsgemäß dauererhitzte Milch (63°, eine halbe Stunde) gibt positive Rothenfußersche Reaktion, entfärbt Scharingers Reagens innerhalb 10—11 Minuten und zeigt einen niederen Katalasewert (ausgeführt mit dem Fukomakatalaser der Firma Paul Funke & Co., Berlin N 4) von nicht mehr als 8—10 ccm O<sub>2</sub> für 100 ccm Milch (meist nach Weinstein

hier nur 2—6 ccm O<sub>2</sub> für 100 ccm Milch). Ferner besitzt richtig dauererhitzte Milch Aufrahmfähigkeit;

b) ungenügend dauererhitzte Milch zeigt einen Katalasewert über 10.

Die Scharingersche Reaktion (Aldehydkatalase oder Aldehydreduktase nach Scharinger wird folgendermaßen vorgenommen: 10 ccm Milch werden mit 1 ccm Formalin-Methylenblaulösung (hergestellt aus 5 ccm gesättigter alkoholischer Lösung von salzsaurem Methylenblau, 5 ccm einer 40%igen Formaldehydlösung und 190 ccm Wasser) versetzt, durch Umrühren mit einem dicken Glasstab in einem möglichst engen Reagensröhrchen rasch durchgemischt, in ein Wasserbad von 45—50° gestellt und die Zeit der Entfärbung beobachtet. — Rohmilch pflegt sich innerhalb 5, sicher aber innerhalb 10 Minuten zu entfärben, und zwar unbedingt, wenn es sich um Mischmilch mehrerer Kühe handelt (wie es in der Praxis immer der Fall sein wird. [A. 36.]

## Analytisch-technische Untersuchungen.

### Beiträge zur Kenntnis der Kakaobutter. I.: Quantitative Bestimmung der ungesättigten Fettsäuren der Kakao-Preßbutter.

(Studien auf dem Fettgebiet, 14. Mitteilung.)

Von Prof. Dr. H. P. KAUFMANN.

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Jena.

(Eingeg. 4. März 1929.)

Beurteilen wir analytisch-chemische Maßnahmen nicht nach dem Grad des wissenschaftlichen Interesses, das die zu analysierenden Stoffe bieten, sondern von praktischen Gesichtspunkten aus, so darf die Analyse der Fette Anspruch auf ganz besondere Beachtung erheben. Dies zeigt mit aller Klarheit die imponierende Zahl, die den Wert der deutschen Einfuhr an Fetten und Fettrohstoffen wiedergibt: Für über eine Milliarde Mark dieser Naturstoffe führen wir im Jahre — zur Verwendung als Nahrungsmittel und zu technischen Zwecken — ein. Dazu kommt die Erzeugung an pflanzlichen und tierischen Fetten im eigenen Lande. So muß der Nahrungsmittelchemiker der Fettanalyse die gleiche Beachtung schenken wie der industrielle Chemiker, dem die Verarbeitung der Fette obliegt, oder der Apotheker, der sie bei der Bereitung der Heilmittel braucht. Unter den übrigen wissenschaftlichen Interessenten steht der Biologe obenan, denn die Fette sind die mächtigsten Energiespender im Organismus von Pflanze und Tier.

Die Fettanalyse ist dementsprechend ein in Wissenschaft und Praxis viel bearbeitetes Gebiet. Aber leider gibt es noch Aufgaben, die sie nicht oder nur unvollkommen zu lösen vermag. Neben mangelnder Methodik ist daran insbesondere die nicht ausreichende Kenntnis der Bestandteile natürlicher Fette schuld, deren Erforschung durch die Unmöglichkeit der Anwendung der üblichen Methoden (z. B. Kristallisation und Destillation) ebenso häufig erschwert wird, wie durch leichte Veränderlichkeit infolge Oxydation, Polymerisation oder sterischer Umlagerung. So bieten z. B. die mehrfach ungesättigten Säuren und ihre Isomerieverhältnisse, gemischte Glyceride derselben, die Vorgänge des Trocknens der Öle, das Ranzigwerden, die Hydrierung, ganz zu schweigen von noch im Stadium der Hypothese befindlichen Fragen des Fettstoffwechsels, eine Fülle schwieriger Probleme. Hat man doch die altbekannte

Ölsäure erst in den letzten Jahren in tatsächlich reinem Zustande gewinnen können<sup>1)</sup>!

Die Fettanalyse bedient sich in ausgesprochener Weise des Systems der Kennzahlen. Diese gründen sich meist nicht auf einen Bestandteil (Ausnahme: die auf  $\alpha$ -Linolensäure fußende Hexabromidzahl), sondern auf Eigenschaften einer Summe von Bestandteilen. Bewährte Methoden, teils konventioneller Ausführungsform — hier leistet die Wissenschaftliche Zentralstelle für Öl- und Fettforschung, die „Wizoeff“, wertvolle Arbeit — ziehen altbekannte Eigenschaften der Fettsäureglyceride und ihrer Bestandteile heran. Es sind dies neben physikalischen Eigenschaften (vor allem Spez. Gewicht, Schmelzpunkt, Erstarrungspunkt, Viscosität, Refraktion) hauptsächlich der Gehalt und die Art freier und gebundener Säure (Säurezahl, Verseifungszahl, Esterzahl, Reichert-Meißl- und Polenske-Zahl, Acetyl- bzw. Hydroxylzahl) und ihr Sättigungsgrad (Jodzahl, Hydrierzahl). Diese Kennzahlen genügen meist zur Identifizierung und Reinheitsprüfung in der technischen Analyse. Es mehren sich aber die Fälle, in denen sie zum Nachweis raffinierterer Fälschungen nicht mehr ausreichen. Insbesondere unterliegen wertvolle Fette in wachsendem Maß der Gefahr der Verfälschung, zumal seit die Fetthärtung Produkte bestimmter Konstanten (z. B. in bezug auf Schmp., Refraktion, Jodzahl) zur Verfügung stellen kann.

Einen deutlichen Ausdruck finden diese Verhältnisse in den von interessierten Kreisen der Produzenten und der verarbeitenden Industrie in jüngster Zeit ausgeschrieben Wettbewerben zur Auffindung von Methoden der Reinheitsprüfung von Fetten. Die Asociacion Nacional de Olivareros in Madrid veranstaltete einen mit 25 000 Peseten ausgestatteten

<sup>1)</sup> Holde u. Gorgas, Ztschr. angew. Chem. 39, 1443 [1926]. Bertram, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 46, 397 [1927].