Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, sowie der Gebrauchsgegenstände.

Heft 1.

1. Juli 1910.

20. Band.

Beiträge zur Schardinger'schen Reaktion der Kuhmilch.

Von

Professor Dr. med. Paul H. Römer und Dr. phil. Th. Sames.

Mitteilung aus der experimentellen Abteilung des Instituts für Hygiene und
experimentelle Therapie zu Marburg.

[Eingegangen am 7. Mai 1910.]

Seit längerer Zeit mit Studien über die reduzierende Wirkung der Kuhmilch gegenüber Methylenblau beschäftigt, haben wir einige Beobachtungen machen können, die uns zur Beurteilung der Schardinger'schen Reaktion von Bedeutung erscheinen.

Wie bekannt, hat frisch gewonnene Milch die Fähigkeit, das Schardinger'sche Reagens, d. h. eine Mischung von Formalin und Methylenblau, zu entfärben, eine Eigenschaft, die gekochter Milch nicht mehr innewohnt. Diese reduzierende Fähigkeit der Milch ist nach der Ansicht einiger Forscher (Smidt¹⁾, Brand²⁾, Oppenheimer³⁾, Trommsdorff⁴⁾ streng zu trennen von der reduzierenden Wirkung, die die Milch gelegentlich gegenüber einfacher Methylenblaulösung aufweist. Beide Reaktionen werden allerdings von den genannten Autoren auf reduzierende Fermente bezogen, von denen aber das Methylenblau reduzierende Ferment, das wir künftighin „M.-Reduktase“ nennen wollen, ein Produkt von Bakterientätigkeit in der Milch sein soll, während die „F. M.-Reduktase“, d. h. der Formalin-Methylenblau entfärbende Stoff, ein originäres Milchferment sei, das schon in frisch und steril ermolkenen Milch vorhanden ist. Andere Autoren (Seligmann⁵⁾) glauben, daß sowohl die M.-Reduktase als die F. M.-Reduktase im wesentlichen bakteriellen Charakters sind.

Wir wollen hier auf diesen Streit und auf die Gründe und Gegengründe, die für und gegen die eine oder andere Meinung sprechen, nicht eingehen. Unsere nachfolgenden Ausführungen beziehen sich lediglich auf die reduzierende Wirkung, die ganz frisch ermolkenen Milch gegenüber Formalin-Methylenblau besitzt. Wir lassen es dahingestellt, ob es sich hier in der Tat um eine Enzymwirkung handelt und bezeichnen nur der Einfachheit halber den das Schardinger'sche Reagens entfärbenden Stoff in frisch ermolkenen Milch als F. M.-Reduktase, ohne dadurch über die Natur dieser Reaktion etwas präjudizieren zu wollen. Nur eine Bemerkung sei uns vielleicht erlaubt. Es besteht neuerdings vielfach die Neigung, Reaktionen, die chemisch

¹⁾ Archiv f. Hygiene 1906, 58, 313; Hyg. Rundschau 1904, 14, 23.

²⁾ Münch. med. Wochenschr. 1907, 17.

³⁾ Arbeiten aus dem Inst. f. experim. Therapie Frankfurt, Heft 4.

⁴⁾ Zentralblatt Bakteriologie. I. Abt. 1909, Orig 49, 291.

⁵⁾ Zeitschr. f. Hygiene 1906, 52, 161 u. 1908, 58, 1. — Sommerfeld's Handbuch der Milchkunde. Wiesbaden 1909, Verlag von J. F. Bergmann.

nicht aufgeklärt werden können, und deren weitere Eigentümlichkeit darin besteht, durch höhere Temperaturen gehemmt oder beseitigt zu werden, ohne weiteres auf Fermente zu beziehen. Gerade bei einem so kompliziert zusammengesetzten Stoff wie der Milch, erscheint uns eine solche Beurteilung, wenn sie zum Prinzip wird, etwas gewagt. Wir können und wollen zwar im folgenden nicht bestreiten, daß die F. M.-Reduktase als Ferment aufzufassen ist; wir möchten aber doch darauf hinweisen, daß sich ähnliche Phänomene wie die Schardinger'sche Reaktion auf einfachem Wege künstlich herstellen lassen.

Die Schardinger'sche Reaktion wird bekanntlich in der Weise angestellt¹⁾, daß man zu 10 ccm Milch 1 ccm des Schardinger'schen Reagens (5 ccm gesättigte alkoholische Methylenblaulösung, 5 ccm Formalin, destilliertes Wasser zu 200 ccm) zusetzt, mit flüssigem Paraffin überschichtet und nach einigen Autoren am besten bei 70°, nach anderen bei 45—50° das Röhrchen im Wasserbade auf eintretende Entfärbung beobachtet. Während frische Rohmilch in der Regel in einigen Minuten völlige Entfärbung zeigt, vermag sie nach dem Kochen nicht mehr zu entfärben. Diese Erscheinung kann man in folgendem Versuch sehr einfach nachahmen: Zu 10 ccm gekochter (oder schon in rohem Zustand die Schardinger'sche Reaktion nicht gebender) Milch setzt man 0,2—0,3 ccm einer 1 0/0-igen frisch bereiteten Ferrosulfatlösung. Die vorher nicht mehr die Schardinger'sche Reaktion gebende Milch gibt sie nun wieder sehr prompt. Hält man die mit Ferrosulfat versetzte Milch 1/2 Stunde lang unter häufigem Umschütteln im kochenden Wasserbad und setzt man nachher in der gewohnten Weise das Schardinger'sche Reagens zur abgekühlten Milch zu, so ist die Reaktion verschwunden, die Milch bleibt blau. Ein Beispiel aus zahlreichen von uns in dieser Richtung angestellten Versuchen ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Tabelle I.

Röhr- chen No.	Inhalt (Alle 6 Röhrchen enthielten die gleiche Milch)	Ergebnis
1	10 ccm Milch + 1 ccm F. M. (Schardinger'sches Reagens)	Nach 3 1/2 Minuten weiß
2	10 ccm Milch 1/2 Stunde gekocht + 1 ccm F. M.	Bleibt blau
3	10 ccm Milch + 0,3 ccm 1 0/0-ige Ferrosulfatlösung + 1 ccm F. M.	Sofort entfärbt
4	10 ccm Milch 1/2 Stunde gekocht + 0,3 ccm 1 0/0-ige Ferrosulfatlösung + 1 ccm F. M.	„ „
5	10 ccm Milch + 0,3 ccm 1 0/0-ige Ferrosulfatlösung 1/2 Stunde gekocht + 1 ccm F. M.	Bleibt blau
6	10 ccm Milch 1/2 Stunde gekocht + 0,3 ccm 1 0/0-ige Ferrosulfatlösung, 1/2 Stunde gekocht + 1 ccm F. M.	Bleibt blau

Der Versuch wurde angestellt mit einer frisch ermolkenen Milch, die prompt die Schardinger'sche Reaktion gab (Röhrchen No. 1). Nach dem Erhitzen gibt die Milch die Reaktion nicht mehr (Röhrchen No. 2), Zusatz von Ferrosulfat zur ungekochten Milch beschleunigt die Entfärbung des Schardinger'schen Reagens (Röhrchen No. 3) und vermag gekochter Milch eine reduzierende Fähigkeit gegenüber F. M. wieder zu verleihen (Röhrchen No. 4). Die reduzierende Wirkung der eisenhaltigen Milch verschwindet durch genügend langes Erhitzen verbunden mit Schütteln (Röhrchen No. 5 und 6).

¹⁾ Vergl. Tjaden in Sommerfeld's Handbuch der Milchkunde. S. 728.

Die reduzierende Wirkung, welche Ferrosulfat nichtreduzierender Milch verleiht, kann übrigens nicht auf eine reduzierende Wirkung des Ferrosulfats allein bezogen werden, denn entsprechend stark eisenhaltige wässrige Lösungen des Ferrosulfats entfärben Formalin-Methylenblau nicht. Schon wenn wir das Ferrosulfat einer 10-fach verdünnten Milch zusetzen, tritt keine Entfärbung von Formalin-Methylenblau auf. Zusatz von Ferrosulfat in den oben angegebenen Konzentrationen wirkt also nur dann entfärbend auf das Formalin-Methylenblau, wenn wir es zu Vollmilch (oder auch zu Rinderserum) zusetzen. Die nachfolgende Tabelle enthält einige dahingehörige Versuche:

Tabelle II.

Röhr- chen No.	Inhalt	Ergebnis
1	10 ccm dest. Wasser + 0,3 ccm 1 %ige Ferrosulfatlösung + 1 ccm F. M.	Bleibt blau
2	10 ccm dest. Wasser + 0,15 ccm 10 %ige Ferrosulfatlösung + 1 ccm F. M.	" "
3	8,5 ccm dest. Wasser + 1,15 ccm 10 %ige Ferrosulfatlösung + 1 ccm F. M.	Hellblau
4	7 ccm dest. Wasser + 3,0 ccm 10 %ige Ferrosulfatlösung + 1 ccm F. M.	Sofort grünblau, aber keine Entfärbung
5	10 ccm $\frac{1}{10}$ Rinderserum + 0,5 ccm 1 %ige Ferrosulfatlösung	Entfärbung nach 1 Minute
6	10 " " " + 0,3 " " "	" " 2 Minuten
7	10 ccm erhitzte Vollmilch + 0,3 ccm 1 %ige Ferrosulfatlösung + 1 ccm F. M.	" " 1 Minute
8	10 ccm $\frac{1}{10}$ Milch + 0,5 ccm 10 %ige Ferrosulfatlösung + 1 ccm F. M.	Nicht entfärbt

Mit vorstehenden Versuchen wollen wir nun nicht etwa behaupten, daß die Schardinger'sche Reaktion der Rohmilch die Wirkung eines Eisensalzes oder überhaupt eines reduzierenden Salzes sei, sondern wollen nur darauf hinweisen, wie vorsichtig man bei der Beurteilung sogenannter Enzymreaktionen sein muß, wenn es möglich ist, mit Hilfe einfacher chemischer Reagenzien eine Art Modell für den angeblich enzymatischen Vorgang zu schaffen.

An dieser Stelle möchten wir gleich auf das verschiedene Verhalten der F. M.-Reduktase einerseits und der sogenannten Oxydase andererseits gegenüber Belichtung mit ultraviolettem Licht hinweisen. Während die Oxydasen-Reaktion der Milch bei einstündiger Belichtung der Milch in dünner Schicht mit den Strahlen der Heraeus'schen Quecksilberquarzlampe vernichtet wurde, wurde die F. M.-Reduktasenreaktion nicht geschädigt. Man könnte nun allerdings daran denken, daß die Oxydase in geringerer Menge in der Milch vorhanden ist als die F. M.-Reduktase und daher auch bei gleicher Schädigung durch die Belichtung die Oxydasenreaktion früher verschwindet. Hiergegen sprechen aber Dialyseversuche, die wir sowohl mit Vollmilch als mit Molke in Pergamenthülsen anstellten und 2—4 Tage gegen strömendes Leitungswasser fortsetzten. Das Dialysat verlor auch bei viertägiger Dialyse nicht die Oxydasenreaktion, während die F. M.-Reduktase bereits nach zweitägiger Dialyse nicht mehr nachweisbar war.

Wenn wir also die F.M.-Reduktase ebenso wie die Oxydase als ein Ferment betrachten wollen, so ergibt sich aus dem verschiedenen Verhalten gegenüber ultravioletttem Licht und gegenüber der Dialyse eine bemerkenswerte Differenz zwischen beiden. Smidt weist darauf hin, daß die F.M.-Reduktase beim Zentrifugieren in den Rahm übergeht, die Oxydase nicht. Doch das nur nebenbei.

Wie eingangs erwähnt, gibt frisch ermolkene Rohmilch in der Regel die F.M.-Reaktion, sodaß man sie neben den anderen bekannten Fermentreaktionen der Milch zur Unterscheidung von Rohmilch und erhitzter Milch empfohlen hat. Immerhin mahnen einige Versuchsergebnisse bereits zur Vorsicht. So konnte Brand bei Untersuchung einer größeren Zahl von Kühen schon solche finden, deren Milch die Reaktion nicht gab. Schern¹⁾ ist diesen Ausnahmefällen nachgegangen und glaubt die Ursache für die Nichtentfärbung des Schardinger'schen Reagens bei manchen Milchsorten darauf beziehen zu dürfen, daß es sich um frischmilchende Kühe handelte. Bei altmilchenden Kühen fand er nahezu konstant die Schardinger'sche Reaktion, vermißte sie allerdings bei den von ihm untersuchten 50 Kühen in 1—2 Fällen. Bei frischmilchenden Kühen vermißte er sie dagegen häufiger, zumal dann, wenn es sich um Tiere handelte, an denen das Kalb dauernd saugte.

Wir selbst hatten bereits vor Kenntnis der Schern'schen Arbeit unsere Aufmerksamkeit auf diesen Punkt gerichtet, indem wir bei jeder Milch, die wir untersuchten, genau den Zeitpunkt der Lactation vermerkten, in dem sich die milchliefende Kuh befand. Wir teilen im folgenden in tabellarischer Form unsere diesbezüglichen Ergebnisse mit. Über unsere Methodik bemerken wir, daß wir genau in der oben beschriebenen Weise die Reaktionen anstellten; wir bevorzugten für das Anstellen der Reaktion ein Wasserbad von 50—52°.

Tabelle III.

Kuh No.	Gekalbt vor	Ergebnis	Kuh No.	Gekalbt vor	Ergebnis
94	1 Tag	Entfärbt nach 4 Stunden	129	150 Tagen	Entfärbt nicht
	2 Tagen	Teilweise entfärbt nach 15 Minuten	153	„	Entfärbt nach 3—4 Minuten
	3 „	Entfärbt nach 11 Min.	160	„	Entfärbt nicht
	4 „	„ „ 8 „	172	„	„ „
			173	„	„ „
8944	7 „	„ „ 30 „	133	180 „	Entfärbt nach 10 Minuten
	8 „	„ „ 20 „	182	„	„ „ 6 „
	16 „	Nicht entfärbt	187	„	„ „ 5 „
	29 „	„ „	202	„	Nicht entfärbt
	30 „	„ „	245	181 „	Entfärbt nach 6 Minuten
			189	185 „	„ „ 8 „
81	28 „	Entfärbt nach 6 Minuten	200	„	Nicht entfärbt
109	28 „	„ „ 10 „	201	„	Entfärbt nach 12 Minuten
	43 „	Nicht entfärbt	187	220 „	„ „ 11 „
134	44 „	Entfärbt nach 18 Minuten	225	„	Nicht entfärbt
	45 „	„ „ 3 1/2 „	227	„	Entfärbt nach 7 Minuten
	58 „	Nicht entfärbt	185	222 „	„ „ 3 3/4 „
	61 „	„ „	239	240 „	„ „ 8 „
116	61 „	Entfärbt nach 5 Minuten	258	„	„ „ 15 „
			259	„	Nicht völlig entfärbt
72	120 „	„ „ 4 „	122	270 „	Entfärbt nach 3 Minuten
			278	„	Nicht völlig entfärbt
227	135 „	„ „ 5 „	232	360 „	Entfärbt nach 5 Minuten
			380	„	„ „ 8 „

¹⁾ Biochemische Zeitschr. 1909, 18, 261.

Aus vorstehender Tabelle geht hervor, daß bei den beiden Kühen No. 94 und 8944, die ganz frischmilchend waren, in der Tat die Milch entsprechend den Angaben Schern's oft nicht entfärbte; dagegen konnten wir häufiger als er auch bei altnilchenden Kühen völliges Ausbleiben der Schardinger'schen Reaktion finden. Wir verweisen z. B. auf die Kühe No. 187, 189 u. a. Was uns nun ganz besonders bemerkenswert erscheint, ist, daß wir bei ein und derselben Kuh häufig an direkt aufeinanderfolgenden Tagen das eine Mal prompt entfärbende, das andere Mal nicht entfärbende Milch fanden. Diese Erscheinung machte uns bezüglich der Richtigkeit der schon gemachten Erklärungsversuche für das Ausbleiben der Schardinger'schen Reaktion (wie besondere Fütterung der Tiere, Kranksein der Tiere etc.) sehr stutzig.

Wir wollen nun gleich vorweg nehmen, daß wir die Ursache für das gelegentliche Ausbleiben der Schardinger'schen Reaktion gefunden zu haben glauben, da wir willkürlich in der Lage sind, mit großer Sicherheit von ein und derselben Kuh einmal Milch zu ermelken, die keine Schardinger'sche Reaktion gibt, und das andere Mal eine Milch, die prompt die Reaktion gibt. Wir sind zu dieser Erfahrung erst auf einem Umwege gekommen. Durch Zufall blieben nämlich in unserem Versuchsstall die Kühe, die wir zur Entnahme von Milch für die Schardinger'sche Reaktion bestimmt hatten, über die Melkzeit hinaus stehen, weil wir ganz frisch die Milch untersuchen wollten. Dabei zeigte sich nun, daß solche „Staumilch“, d. h. über die gewöhnliche Zeit im Euter gestandene Milch, in der Regel keine Schardinger'sche Reaktion gab. Wir weisen darauf hin, daß die nicht entfärbenden Milchproben, die wir bei den Kühen No. 129, 8944, 187, 109, 133, 239 (Tabelle III) gewonnen haben, solche „Staumilch“ waren. Wir glaubten bereits, daß diese Stauung der Milch im Euter die Ursache für die Nichtentfärbung der Schardinger'schen Reagens wäre, können aber nunmehr die Sache einfacher aufklären.

Die Verhältnisse werden am besten dargestellt durch die Wiedergabe nachfolgender Versuche, in denen wir von denselben Kühen vergleichend die Anfangsmilch, Endmilch und Mischmilch untersuchten. Unter Anfangsmilch verstehen wir die nach dem Wegmelken des allerersten Strichs aus den 4 Zitzen bei der üblichen Melkzeit gewonnenen ersten 50—100 ccm Milch, die Endmilch sind die zuletzt ermolkenen 100 ccm Milch. Mischmilch ist die in der üblichen Weise durch Vereinigung des Gesamtgemelkes einer Kuh gewonnene Milch.

Tabelle IV.

Kuh No.	Tag des Versuches	Anfangsmilch	Mischmilch	Endmilch
109	22. I. 10	Nicht entfärbt	{ Unvollständig entfärbt nach 26 Minuten }	Entfärbt nach 8½ Minuten
	24. I. 10	„ „	{ Unvollständig entfärbt nach 15 Minuten }	„ „ 7 „
	25. I. 10	Entfärbt nach 25 Minuten	Entfärbt nach 25 Minuten	„ „ 4 „
129	19. IV. 10	Nicht entfärbt	„ „ 15 „	„ „ 5½ „
	27. IV. 10	„ „	—	„ „ 3½ „
204	25. IV. 10	„ „	—	—
	26. IV. 10	„ „	—	—
187	25. IV. 10	„ „	—	—
	26. IV. 10	„ „	—	—

Kuh No.	Tag des Versuches	Anfangsmilch	Mischmilch	Endmilch
227	25. IV. 10	{ Unvollständig entfärbt nach 10 Minuten }	—	—
	26. IV. 10	Entfärbt nach 8 $\frac{1}{2}$ Minuten	—	—
109	25. IV. 10	—	{ Unvollständig entfärbt nach 15 Minuten }	—
	26. IV. 10	—	Entfärbt nach 7 Minuten	—
8944	25. IV. 10	—	" " 6 "	—
	26. IV. 10	—	{ Unvollständig entfärbt nach 10 $\frac{1}{2}$ Minuten }	—
116	25. IV. 10	—	Entfärbt nach 5 $\frac{1}{2}$ Minuten	—
	26. IV. 10	—	" " 4 $\frac{1}{2}$ "	—
81	25. IV. 10	—	" " 6 "	—
	26. IV. 10	—	" " 4 $\frac{1}{2}$ "	—
129	25. IV. 10	—	—	Entfärbt nach 5 Minuten
	26. IV. 10	—	—	" " 4 "
185	25. IV. 10	—	—	" " 2 $\frac{1}{2}$ "
	26. IV. 10	—	—	" " 8 "
134	4. V. 10	Nicht entfärbt	—	" " 4 "
8944	4. V. 10	" "	—	" " 2 $\frac{1}{2}$ "
109	4. V. 10	" "	—	" " 2 "
227	4. V. 10	" "	—	" " 2 "

(Die Milchproben vom 4. V. 10 sind Abendmilch, die anderen sämtlich morgens früh ermolken.)

Wir finden also, daß die Anfangsmilch der untersuchten Kühe entweder überhaupt nicht, oder — mit einer Ausnahme — nur ganz unvollständig entfärbt. Bei der Mischmilch finden wir alle Übergänge von der sehr raschen Entfärbung bis zur langsamen unvollständigen Entfärbung, während die Endmilch stets prompt entfärbte. Wir glauben auf Grund dieser Versuchsergebnisse die sich auch später immer wiederholt haben, daß die nicht entfärbenden Milchproben, welche wir in Tabelle III aufgeführt haben, in der Regel Anfangsmilch gewesen sind und glauben weiter, daß, wenn in der Literatur angegeben ist, die Rohmilch entfärbe in der Regel das Schardinger'sche Reagens, es sich, wie es bei in Großstädten ausgeführten Untersuchungen sehr wahrscheinlich ist, um Handelsmilch aus Milchläden gehandelt hat, die natürlich eine Mischmilch darstellt. Auch bei den anderen Untersuchungen hat man vermutlich meist Mischmilch untersucht. Wir selbst waren in der glücklichen Lage, selbstermolkene Milch untersuchen zu können, und lernten so bald die Differenzen zwischen Anfangsmilch und Endmilch beachten.

In Marburg haben wir auffälligerweise sehr häufig Handelsmilchproben gefunden, welche die Schardinger'sche Reaktion nicht gaben, sich jedoch durch positiven Ausfall der Oxydasen-Reaktion als Rohmilch erwiesen. Wir fanden bei von Anfang Dezember 1909 bis Mai 1910 fast täglich ausgeführten Untersuchungen von je einer Handelsmilchprobe nahezu die Hälfte der Proben frei von nachweisbarer F.M.-Reduktase.

Die von uns nachgewiesene Möglichkeit, von ein und derselben Kuh einmal

Milch mit F.M.-Reduktase, ein andermal Milch ohne F.M.-Reduktase zu ermelken, legte den Wunsch nahe, durch genaue Analyse von derartig verschieden sich verhaltenden Milchproben ein und derselben Kuh dem Wesen des reduzierenden Stoffes näher zu kommen. Wir wollen aus unseren zahlreichen Analysen eine besonders charakteristische hier anführen. Die am 19. April früh morgens ermolkene Anfangs-, End- und Mischmilch der Kuh No. 129 untersuchten wir neben der Prüfung auf die Schardinger'sche Reaktion auf den Gehalt an Fett (nach Gerber), an Milchzucker, an Casein (Essigsäurefällung), Molkenprotein (Hitzefällung des essigsäuren Filtrates nach der Caseinentfernung). Wir bestimmten weiter den Glührückstand, den Gehalt an Calciumoxyd und untersuchten endlich noch die Oxydasen-Reaktion. Die nachfolgende Tabelle enthält die Ergebnisse:

Tabelle V.

	Anfangsmilch	Mischmilch	Endmilch
F.M.-Reduktase-Reaktion	negativ	positiv nach 15 Min.	positiv nach 5½ Min.
Oxydase-Reaktion . .	positiv	positiv	positiv
Fett	0,7 %	3,2 %	8,8 %

Auf fettfreie Milch berechnet:

Milchzucker	4,02 %	4,40 %	4,32 %
Casein	2,26 %	2,34 %	2,15 %
Molkenprotein . . .	0,49 %	0,41 %	0,39 %
Casein + Molkenprotein	2,75 %	2,75 %	2,54 %
Glührückstand . . .	0,683 %	0,612 %	0,583 %
Calciumoxyd	0,208 %	0,222 %	0,202 %

Wir fanden also in diesem wie in ähnlichen Versuchen keine wesentlichen Unterschiede im Gehalt an Milchzucker, Casein, Protein und Salzen zwischen Anfangsmilch, Mischmilch und Endmilch. Höchst auffällig waren dagegen die gewaltigen Differenzen im Fettgehalt, die in dem oben geschilderten Versuch dem Ausfall der Schardinger'schen Reaktion insofern entsprechen, als der Zunahme des Fettgehaltes Auftreten bzw. zunehmende Intensität der Entfärbungskraft entsprach.

Wir haben uns deshalb die Frage vorgelegt, ob die Entfärbung des Schardinger'schen Reagens vielleicht ausschließlich eine Frage des Fettgehaltes sei, zumal, wie bekannt, die F.M.-Reduktase beim Zentrifugieren der Milch mit aufräumt. Im nachfolgenden berichten wir über eine ganze Anzahl von Milchproben, die zu gleicher Zeit am (25. IV. 10) ermolken und dann zu gleicher Zeit auf den Gehalt an Fett einerseits (nach Gerber) und F.M.-Reduktase andererseits nach den oben bezeichneten Methoden untersucht wurden.

Tabelle VI.

Kuh No.	Art der Milch	Fettgehalt der Milch o/o	Schardinger'sche Reaktion
204	Anfangsmilch	1,2	Negativ.
109	Mischmilch	1,3	Unvollständige Entfärbung nach 15 Minuten
187	Anfangsmilch	1,4	Negativ
227	"	2,3	Unvollständige Entfärbung nach 10 Minuten
8944	Mischmilch	3,1	Positiv nach 6 Minuten
116	"	3,2	" " 5 1/2 "
81	"	3,2	" " 6 "
129	Endmilch	4,4	" " 5 "
185	"	5,2	" " 2 1/2 "
97	"	5,6	" " 18 "

Wir haben an denselben Kühen den Versuch am nächsten Tage (26. IV. 10) noch einmal wiederholt mit dem in der nachfolgenden Tabelle verzeichneten Ergebnissen:

Tabelle VII.

Kuh No.	Art der Milch	Fettgehalt der Milch o/o	Schardinger'sche Reaktion
204	Anfangsmilch	1,1	Negativ.
187	"	1,3	"
227	"	1,7	Positiv nach 8 1/2 Minuten
8944	Mischmilch	2,4	Unvollständig entfärbt nach 10 1/2 Minuten
116	"	2,4	Entfärbt nach 4 1/2 Minuten
109	"	2,5	" " 7 "
81	"	2,7	" " 4 1/2 "
185	Endmilch	3,1	Positiv nach 8 Minuten
97	"	3,2	" " 11 "
129	"	3,7	" " 4 "

Wir haben in vorstehenden beiden Tabellen die untersuchten Milchproben nach dem Fettgehalt geordnet. Es bestätigt sich im allgemeinen zunächst die bekannte Beobachtung, daß die Endmilch bedeutend fettreicher ist, wie die Anfangsmilch. Weiter finden wir wiederum eine Bestätigung unserer obigen Angaben, daß wir mit der Endmilchprobe prompt die Schardinger'sche Reaktion bekommen, mit den Mischmilchproben in der Regel, mit den Anfangsmilchproben in der Regel nicht. Ferner finden wir einen weitgehenden Parallelismus zwischen Fettgehalt einerseits und Stärke der Schardinger'schen Reaktion andererseits. Aber dieser Parallelismus ist kein vollständiger. Wir verweisen besonders auf die Untersuchung der Milch der Kuh No. 97, die bei sehr hohem Fettgehalt eine recht verzögerte Schardinger'sche Reaktion gab. Wir dürfen also in Übereinstimmung mit anderen Autoren nicht etwa annehmen, daß das Fett selbst der Träger der reduzierenden Wirkung ist.

Durch einen weiteren Versuch können wir diese Anschauung noch glaubhafter machen. Die am 27. April 1910 ermolzene Frühmilch der Kuh No. 129 unter-

suchten wir wiederum auf Fettgehalt und F.M.-Reduktase, und zwar einmal die Anfangsmilch, ferner die Endmilch, weiterhin den durch mehrmaliges Zentrifugieren gewonnenen Rahm aus der Endmilch und endlich die nach diesem Zentrifugieren aus der Endmilch gewonnene Magermilch. Das Ergebnis enthält die nachfolgende Tabelle:

Tabelle VIII.

Art der Milch	Fettgehalt der Milch	Schardinger'sche Reaktion
Anfangsmilch	1,25 ‰	Negativ
Endmilch	5,7 "	Positiv nach 3½ Minuten
Rahm	14,0 "	Entfärbt nach 2½ Minuten
Magermilch	0,1 "	Nach ½ Stunde etwas entfärbt, dann wieder dunkelblau werdend.

Trotz des minimalen Fettgehaltes vermochte also die Magermilch noch in Spuren zu entfärben.

Was aus unseren Untersuchungen mit Sicherheit hervorgeht, ist, daß die Endmilch die Schardinger'sche Reaktion stets viel schneller gibt als die Anfangsmilch, sowie daß in der Regel der stärkeren Entfärbung des Schardinger'schen Reagens ein stärkerer Fettgehalt entspricht. Wir dürfen also folgern, daß unter den gleichen Bedingungen, unter denen die Milchdrüse reichlich Fett ausscheidet, es auch zu reichlicher Ausscheidung der F.M.-Reduktase in der Regel kommt. Nun ist zu berücksichtigen¹⁾, daß das zur Melkzeit gewonnene Gesamtgemelke einer Kuh sich zusammensetzt einmal aus der Milch, die sich in der Zwischenzeit von der letzten Melkung her während der Melkpause im Milchbaum angesammelt hat und der während des Melkens erst neu gebildeten Milch. Wie Heidenhain angibt, findet nun gerade während des Melkens ein beschleunigter Zerfall von Milchdrüsenzellen statt. Hierauf ist vermutlich wohl auch das Auftreten von F.M.-Reduktase gerade in der Endmilch zu beziehen, denn erfahrungsgemäß sind ja Reduktionswirkungen Eigenschaften fast aller lebenden Zellen und wir können es daher verständlich finden, wenn beim gesteigerten Zerfall vitaler Körperelemente reichlicher reduzierende Substanzen vom Charakter der F.M.-Reduktase in gelöster Form auftreten.

Anhangsweise weisen wir noch auf eine Beobachtung hin, die für die Technik des Nachweises der sogenannten F.M.-Reduktase von Bedeutung ist. Koning²⁾ nimmt an, daß die Reduktase der Rohmilch in zwei Formen in der Milch vorkommt, nämlich in freiem und in gebundenem Zustande. Die gebundene Reduktase soll dadurch leichter erkenntlich gemacht werden, daß man ein schwaches Alkali der Milch zusetzt. Es erscheint uns mit Smidt sehr zweifelhaft, ob die beschleunigte Reduktionswirkung der Milch nach Zusatz von Alkali auf eine der F.M.-Reduktase ähnliche Wirkung zurückzuführen ist. Neben der reduzierenden Wirkung der F.M.-Reduktase müssen wir ja als reduzierend wirkend vor allem noch den Milchzucker beachten. 4 ‰-ige Milchzucker-Lösung z. B. entfärbt zwar Formalin-Methylenblau nicht, wohl aber ganz

¹⁾ Wir folgen hier den Ausführungen Pfaundler's. Vergl. Sommerfeld's Handbuch der Milchkunde. Wiesbaden 1909. Verlag von J. F. Bergmann.

²⁾ Milchwirtschaftl. Zentralblatt 1907, 3, 41.

prompt nach Zusatz von Alkali (2 Tropfen N.-Natronlauge zu 10 ccm 4⁰/₀-iger Milchzuckerlösung). Da der Milchzucker nun in der Regel in einer Konzentration von etwa 4⁰/₀ in der Milch vorhanden ist, kann nach Zusatz von Alkali die darnach auftretende Schardinger'sche Reaktion sehr leicht auf den Milchzucker zurückgeführt werden und fälschlicherweise eine „gebundene Reduktase“, d. h. ein Ferment als Ursache der Entfärbung vortäuschen. In der Tat kann man, wie auch Smidt angibt, mit gekochter Milch, in der doch Reduktasen, d. h. auf Fermentwirkung zu beziehende Reduktionskräfte, vernichtet sein müssen, durch Zusatz von Alkali wieder positive Schardinger'sche Reaktion erhalten. Der nachfolgende Versuch bildet hierfür ein Beispiel:

Inhalt	Ergebnis
10 ccm gekochte Milch + F. M.	Keine Entfärbung.
10 " " " + 2 Tropfen N.-Natronlauge + F. M.	Nicht entfärbt.
10 " " " + 4 " " + "	Entfärbt nach 1 Stunde.
10 " " " + 6 " " + "	Entfärbt nach 12 Minuten.
10 " " " + 8 " " + "	Entfärbt nach 5 Minuten.

Ebenso entfärbte eine Milch, der wir 5 Tropfen N.-Natronlauge zu 10 ccm zugesetzt und die wir dann gekocht hatten, prompt. In der gleichen Weise wirkt auch Kalkwasser, in geeigneter Menge zugesetzt. Wenn wir Milch durch Essigsäure-Zusatz und nachfolgende Filtration zuerst vom Casein und dann durch Kochen vom Molkenprotein befreit hatten, so gab das klare Filtrat natürlich nicht mehr die Schardinger'sche Reaktion. Nach Zusatz von 2 Tropfen N.-Natronlauge zu 10 ccm des Filtrates wurde dagegen Formalin-Methylenblau wieder prompt entfärbt. Diese Versuche sprechen in Übereinstimmung mit Smidt nicht für die Anschauung, welche in dem Nachweis von Reduktionswirkung nach Zusatz von Alkali ein Mittel zum Nachweis gebundener reduzierender Fermente erblickt. Es kommt hier in erster Linie die Reduktionskraft des Milchzuckers in Betracht.

Beitrag zur Bestimmung der schwefligen Säure im Hackfleisch.

Über die vermeintliche Bildung von schwefliger Säure bei der Destillation von Hackfleisch.

Von

B. Kühn und J. Rühle.

Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Königlichen Auslandsfleischbeschau in Stettin.

Eingegangen am 11. Mai 1910.

Die Frage, ob sich im Fleisch durch Zersetzung schweflige Säure oder schwefelhaltige flüchtige Verbindungen bilden können, die bei der durch das Gesetz, betr. die Schlachtvieh- und Fleischschau vom 3. VI. 1900 (Ausführungsbestimmungen vom 30. V. 1902), vorgeschriebenen Bestimmung der schwefligen Säure mittels Destillation