

Filtrat wird kochend in einem Volumen von 150 *ccm* mit 10—15 *ccm* einer 10 $\frac{0}{0}$ igen Natriumammoniumphosphatlösung, hierauf tropfenweise mit Ammoniak versetzt und $\frac{1}{4}$ des Volumens an Ammoniak zugefügt. Durch Reiben mit einem Glasstabe wird die Bildung des Niederschlages beschleunigt. Nach einer halben Stunde wird filtriert, mit kaltem Wasser, vorteilhafter aber mit verd. Alkohol gewaschen und in gleicher Weise wie der Zinkniederschlag titriert. Zur Bestimmung des Kupfers verwende man eine besondere Einwage von 2 *g*, die in Salpetersäure und einigen Tropfen Flussäure gelöst und zur Entfernung der nitrosen Gase gekocht wird. In dieser Lösung wird jodometrisch die Summe von Eisen und Kupfer bestimmt und durch Abzug des bereits bekannten Eisengehaltes das Kupfer errechnet. Nur bei geringen Kupfergehalten werden diese in dem ursprünglichen Rückstand durch Schwefelwasserstoff-fällung getrennt und kolorimetrisch bestimmt. Auch die Ermittlung des Aluminiums geschieht in einer besonderen Einwage, 1 *g* wird im Kohlensäurestrom in 100 *ccm* einer Lösung von 300 *g* Kupferammoniumchlorür gelöst, filtriert, der Rückstand durch Behandlung mit Flussäure vom Silizium befreit und durch eine Alkalikarbonatschmelze die Trennung des Kupfers vom Aluminium vorgenommen. Brzeziner.

IV. Spezielle analytische Methoden.

1. Auf Lebensmittel und Gesundheitspflege bezügliche.

Milchuntersuchung¹⁾. In neuerer Zeit hat neben der chemischen und physikalischen Milchuntersuchung die hygienische Prüfung besondere Bedeutung erlangt. Unter den neueren Untersuchungsverfahren stehen an erster Stelle die, welche auf dem Nachweis von Enzymen beruhen, da sie gestatten, in einfacher Weise zu ziemlich weitgehenden Schlüssen über den Gesundheitszustand der Kühe und die Vorbehandlung der Milch zu gelangen. Bezüglich der Natur der betreffenden Fermente verweise ich auf frühere Ausführungen²⁾ und beschränke mich hier auf die Angabe einiger neueren Verfahren und Untersuchungen. Eine eingehende Zusammenstellung der zu diesem Gegenstand vorliegenden Arbeiten bis zum Jahre 1912 bringt A. Splittgerber³⁾.

Die hier in Betracht kommenden Enzyme sind: die Katalasen, welche Wasserstoffsperoxyd unter Sauerstoffentwicklung spalten, die Reduktasen, durch welche Reduktion (Entfärbung eines Farbstoffes) entweder direkt oder bei Gegenwart von Formaldehyd (Schardingersche Reaktion) bewirkt wird, die Peroxydasen, die den Sauerstoff von Suroxyden aktivieren, ferner Diastasen, Laktoproteolase und Laktase.

¹⁾ Fortsetzung des Berichtes von S. 392. — ²⁾ Diese Ztschrft. 44, 1 (1905). — ³⁾ Pharm. Zentralhalle 53, 1289 (1912).

O. Jensen¹⁾ hat den Ursprung dieser Fermente studiert und kommt zu dem Ergebnis, dass die Peroxydasen lediglich vom Tierkörper, nicht von den Milchkakterien gebildet werden. Dagegen wird Katalase von zahlreichen Bakterienarten und zwar vorwiegend als Endoenzym erzeugt; zu einem geringen Teil ist die Milchkatalase auch auf die Leukozyten zurückzuführen. Milchsäurebakterien jedoch bilden keine Katalase, ihre starke Entwicklung bei fortschreitender Säuerung und die Säure selbst wirken hemmend auf das Ferment. Reduktasen enthält vollkommen frische Milch nicht, sie entstehen erst mit der Bakterienentwicklung, jedoch ist die Reduktion formalinhaltigen Methylenblaus (Schardinger-Reaktion) unabhängig von Bakterien und an die Fettkügelchen geknüpft. Die Hydrogenase, die Schwefel zu Schwefelwasserstoff reduziert, stammt lediglich von den Milkbakterien.

Zur Bestimmung der Katalasen sind zahlreiche Apparate angegeben worden. Der Apparat von G. Köstler²⁾ besteht aus einer in $\frac{1}{10}$ ccm geteilten Messröhre, die einen verschiebbaren Agarpfropfen enthält und entweder mittels Kautschukstopfens auf ein entsprechendes Gefäß aufgesteckt wird oder an ein solches angeschmolzen ist. Die mit Wasserstoffsperoxyd versetzte Milch wird in das Gefäß gefüllt, und der entwickelte Sauerstoff nach dem Stehen im Brutschrank oder Wasserbad an dem Stand des durch ihn vorgetriebenen Agarpfropfens abgelesen. Die Agarpfropfen können in schwach alkalischem, mit wenig Formalin versetztem Wasser vorrätig gehalten werden. Den gleichen Apparat empfehlen unabhängig von Köstler auch R. Burri und W. Staub³⁾. Der Milchraum ist bei ihrer Anordnung mit einem eingeschliffenen Glasstöpsel abgeschlossen, er fasst bis zur Nullmarke genau 13 ccm und wird mit 10 ccm Milch und 3 ccm 1⁰/₁₀iger Wasserstoffsperoxydlösung beschickt, nachdem der Agarpfropfen auf den Nullpunkt eingestellt ist. Es ist ratsam, den Apparat nicht gleich nach der Beschickung in den Thermostaten zu stellen, sondern zuerst im Wasserbade auf die betreffende Temperatur vorzuwärmen. Bei der Ablesung können das Gewicht des Agarpfropfens und die Wasserdampf-tension, Fehlerquellen, die in entgegengesetztem Sinne wirken, ihres geringen Einflusses wegen für gewöhnlich vernachlässigt werden. Die Herstellung des Agarpfropfens geschieht in der Weise, dass man 3—4 ccm geschmolzenes 3⁰/₁₀iges Agar in das mit Kautschukstopfen verschlossene angewärmte Messrohr durch einen angewärmten Trichter einfließen lässt.

N. Gerber und A. Ottiker⁴⁾ haben eine Vorrichtung nach Gerber-Lobeck beschrieben, welche aus einem Gärgläschen und einem mittels Gummistopfens aufgesetzten, nach Art einer Waschflasche konstruierten, »Volumeter« genannten Aufsatz besteht. Der letztere wird mit Wasser als Abschlussflüssigkeit für das gebildete Gas gefüllt, die Menge des

¹⁾ Zentrbl. Bakteriöl. II, 18, 211 (1907). — ²⁾ Milchw. Zentrbl. 4, 532 (1908). — ³⁾ Ztschrft. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 17, 88 (1909). — ⁴⁾ Milchw. Zentrbl. 6, 316 (1910), ferner N. Gerber, Chem. Ztg. 36, 796 (1912).

Gases wird an einer Teilung abgelesen. Diese Einrichtung bietet den Vorteil, dass nach der Messung und Wegnahme des Gärgläschens das Wasser im Messgefäß sich von selbst wieder auf den Nullpunkt einstellt, so dass sofort eine neue Bestimmung gemacht werden kann. Durch Vergrößerung des Volumeters wurde ein Apparat geschaffen, der das von Schaffer benutzte Eudiometer zur Ausführung der Walterschen Milchgärprobe mit 100 *ccm* Milch bei 35—38° ersetzen kann. Die Gärgläschen werden mit 9 *ccm* Milch und 3 *ccm* 1% iger Wasserstoff-superoxydlösung beschickt und in ein Wasserbad von 20—25° gestellt. Vor der Ablesung muss kräftig geschüttelt werden, damit die in der Milchmischung befindlichen Gasbläschen frei werden. Die Gärgläschen sind vor der Füllung zu sterilisieren. Aus ihren Bestimmungen ziehen die Verf. den Schluss, dass der Katalasegehalt weder zum Fett noch zum normalen Säuregehalt in bestimmtem Verhältnis steht. Die Katalase findet sich hauptsächlich im Rahm, nur zum geringen Teil in der Magermilch. Frische Milch gesunder Tiere gibt nach 2 Stdn. stets weniger als 3 *ccm* Sauerstoff, auch später nicht über 4 *ccm*, nur bei altmilchenden Tieren ist die Menge häufig höher. Ungereinigte oder durch Bakterien nachträglich verunreinigte Milch gibt meist wesentlich höheren Katalasegehalt, und mit einem Zusatz von 5% Milch kranker Tiere erhält man schon einen Ausschlag. Ebenso verhält sich blutige Milch (nach 1 Stde. über 4 *ccm*) und Kolostrum. Als Grenze für die Verdächtigkeit der Mischmilch sehen die Verf. 4 *ccm* Gas im Sommer und 3,5 *ccm* im Winter an. Der Katalasegehalt ist nach der Rasse der Tiere sehr verschieden, auch sonstige Unterschiede in der Haltung der Kühe sind von Einfluss. Pasteurisierte Milch soll höchstens 0,5 *ccm*, sterilisierte gar keinen Sauerstoff entwickeln. Der durchschnittliche Katalasegehalt mehrerer Tausend Proben entsprach 2,5—3 *ccm* Sauerstoff. Milch verschiedener Melkzeiten zeigte selten Unterschiede. Beim Stehen nicht gekühlter Milch vermehrt sich der Katalasegehalt schnell (nach 12—24 Stdn. über 4 *ccm*). Die Verf. sind danach der Überzeugung, dass die Katalasemethode ganz besonders geeignet ist, Milch anormaler oder kranker Tiere und falsch behandelte Milch aufzufindig zu machen.

O. Laxa¹⁾ fand bei der Prüfung verschiedener Apparate, dass derjenige von Köstler, bezw. Burri und Staub, (s. oben) durch die Verwendung des Agarstopfens unhandlich wird, er gebraucht daher ein graduiertes Glasrohr, welches unten in eine offene Spitze endigt, oben mit Hahn verschliessbar ist und 20 *ccm* fasst. Man mischt in einem Glase etwas mehr als 15 *ccm* Milch und 5 *ccm* 1% iger Wasserstoff-superoxydlösung und saugt die Mischung in das Glasrohr bis etwas über den Hahn, schliesst den Hahn und lässt den Apparat so in senkrechter Stellung in einem Becherglase auf einem Ständer stehen. Den mit dieser Anordnung verbundenen Übelstand, dass zu niedrige Werte bei hohem

¹⁾ Ztschrft. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genussm. 21, 417 (1911).

Katalasegehalt gefunden werden, weil ein Teil der Milch ausfliesst und nicht mehr zur Wirkung kommt, (ähnlich wie bei dem Apparat von Koning) erwähnt Laxa selbst. Die Beobachtungen werden bei Zimmertemperatur gemacht. Vergleiche mit den Apparaten von Funke, sowie Burri und Staub und dem Koningschen Verfahren (Titration des überschüssigen Wasserstoffsperoxyds mit Thiosulfatlösung nach 2 Stdn.) ergaben, dass Laxas Apparat die mit dem chemischen Verfahren am besten übereinstimmenden und bei Doppelbestimmungen die gleichmäßigsten Werte liefert.

W. D. Kooper¹⁾ führte vergleichende Untersuchungen mit mehreren Apparaten (Koning, Funke, Henkel, Gerber) aus und ermittelte zwischen diesen das Verhältnis 1:1,37:1,44:1,66 der Katalasezahlen in frischer Vollmilch. Für Rahm, Buttermilch, saure Milch usw. ist das Verhältnis ein anderes. Auch er fand einen Einfluss der Rasse, Breitenburger Kühe gaben höhere Werte als Ostfriesen. Möglichst steril gewonnene, mit Chloroform versetzte Milch zeigt sehr niedrigen Katalasegehalt, 0,66 *ccm* in 2 Stdn., der grösste Teil der Katalase ist daher bakteriellen Ursprungs. Verschmutzung der Milch ist von grossem Einfluss. Die Katalase folgt zwar dem Rahm; beim Buttern geht sie aber in die Buttermilch über, sie ist also kein integrierender Bestandteil des Fettes. Die von Kooper aufgestellten Verhältniszahlen kann aber Grimmer²⁾ nicht als zu Recht bestehend ansehen, sie haben weder wissenschaftlichen noch praktischen Wert, zumal da der Apparat von Koning als Grundlage gewählt ist, der gerade die grössten Fehlerquellen aufweist.

Als Ersatz für die wenig haltbare Wasserstoffsperoxydlösung bringt N. Gerber³⁾ (Firma N. Gerber u. Co. in Leipzig-Zürich) eine durch geringen Zusatz einer Säure haltbar gemachte patentierte Carbamid-Wasserstoffsperoxyd-Verbindung in Tablettenform in den Handel. Eine Tablette, in 5 *ccm* Wasser gelöst, gibt eine 1%ige Wasserstoffsperoxydlösung, eine Tablette kann auch direkt in 10 *ccm* Milch gelöst werden.

Auch J. Pritzker⁴⁾ ist der Ansicht, dass die Katalaseprobe von Bedeutung ist, wo es auf möglichst einfache Erkennung gesunder Milch ankommt, sowohl im Käsereibetrieb wie bei der praktischen Milchkontrolle, und dass sie als Ergänzung und Kontrolle der Leukozytenprobe dienen kann. Das Schweizerische Lebensmittelbuch fordert als oberste Grenze die Katalasezahl 4,0, Thöni hat aber bei 246 Proben als höchsten Wert 3,0 festgestellt, selbst von 116 bluthaltigen Proben gaben nur 42 Zahlen über 2,0, er hält daher die Katalaseprüfung bei Marktmilch für wenig empfindlich und bereits eine Katalasezahl von 2,0 für verdächtig. Verf. hat in 2209 Proben folgende Werte gefunden: unter

1) *Milchw. Zentrbl.* 7, 264 (1911). — 2) *Milchw. Zentrbl.* 7, 314 (1911). — 3) *Chem. Ztg.* 36, 796 (1912). — 4) *Ztschrft. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm.* 30, 49 (1915).

1,1 34,3⁰/₀ der Proben, 1,1—2,0 41,7⁰/₀, 2,1—3,0 14,5⁰/₀, 3,1—4,0 4,6⁰/₀, über 4,1 5,0⁰/₀ (höchster Wert über 10,0). Verf. ist der Ansicht, dass die Katalasezahl eine Verdachtszahl ist und dass sie als solche auch bei Marktmilch zur Erkennung kranker oder unrichtig behandelter Milch gute Dienste leistet; er hält bei einem Wert = 3,0 Verdacht für begründet, andererseits berechtigt ein niedriger Ausfall der Probe noch nicht zu günstiger hygienischer Beurteilung der Milch. Die bekannten Katalaser sind meist kompliziert und umständlich zu handhaben. Verf. hat daher einen einfachen Apparat konstruiert, welcher aus einem an einem Ende zugeschmolzenen Glasrohr von etwas über 15 *ccm* Inhalt besteht, das in $\frac{1}{10}$ *ccm* eingeteilt ist; am unteren offenen Ende ist seitlich ein gebogenes Abflussröhrchen angeschmolzen: In das Rohr werden 10 *ccm* Milch und 5 *ccm* 1⁰/₀ige H₂O₂-Lösung gegeben, dann wird bis zur Marke 15 ein Gummistopfen hineingedrückt, wobei keine Luftblase zurückbleiben darf. Nach dem Umschütteln wird der Apparat mit dem Gummistopfen nach unten in einem Bechergläse oder einem passenden Gestell an einem warmen Ort bei 22—25° 2 Stdn. stehen gelassen; die in dieser Zeit gebildete Gasmenge gibt mit 10 multipliziert die Katalasezahl. Die mit dem Apparat erhaltenen Werte wurden mit den im Koestlerschen Apparat gefundenen verglichen; bei Katalasezahlen bis 1,0 erhält man mit dem letzteren etwas höhere Werte, bei Zahlen von 1,0—5,0 sind die Werte gleich oder bei dem neuen Apparat höher. Um den Fehler, welcher durch das teilweise Ausfließen der Milch infolge der Sauerstoffentwicklung verursacht wird, auszugleichen, berechnet Verf. eine Korrekturformel, wonach die wahre Katalasezahl ist = $10 \left(V + \frac{V^2}{30} \right)$, worin V das abgelesene Gasvolumen bedeutet.

Diese Korrekturformel wurde experimentell nachgeprüft durch die Sauerstoffentwicklung aus Kaliumpermanganat und H₂O₂.

v. Heygendorff und Meurer¹⁾ treten dafür ein, dass als Katalasegehalt einer Milch nur ihr Gehalt an Enzym angegeben werden sollte, welcher sofort nach sterilem Melken gemessen wird, da jede spätere Messung durch Stoffwechselprodukte gewisser Bakterien oder der Leukozyten beeinflusst ist. Diese Zahl sollte aber zum Unterschied von der Katalasezahl als Oxydierfähigkeit der Milch bezeichnet werden. Ihre Bestimmung erfolgt am besten mit dem Katalaser nach Lobeck, sie sollte namentlich bei Vorzugsmilch stets ausgeführt werden.

A. Faitelowitz²⁾ weist darauf hin, dass Wasserstoffsuperoxyd zerstörend auf Katalase einwirkt, dass daher die freiwerdende Sauerstoffmenge kein unzweideutiger Maßstab für den Katalasegehalt ist, dass diese Menge vielmehr je nach der Stärke des Wasserstoffsuperoxydzusatzes veränderlich ist. Die Bestimmung der Katalase erfolgt daher

¹⁾ Milchw. Zentrbl. 6, 529 (1910). — ²⁾ Milchw. Zentrbl. 6, 299, 361 u. 420 (1910).

am sichersten und schnellsten nach der Formel $K = \frac{1}{t} \cdot l \left(\frac{a}{a-x} \right)$.

wobei t die Zeit, a die Anzahl *ccm* Sauerstoff des angewendeten und x diejenige des zerlegten Wasserstoffsperoxyds bedeutet. Dieser Ausdruck schwankt für frische Milch von 0,0025—0,0055. Die Katalasezunahme richtet sich nach der Aufbewahrungstemperatur (bei Zimmertemperatur 24—30 Stdn., im Brutschrank 6—8 Stdn., bei 0° 3—4 Tage). Chloroformzusatz verhindert die Katalasevermehrung, ohne die bereits vorhandene zu schwächen. Formalin dagegen wirkt lähmend, die Hemmung ist aber nicht der zugesetzten Menge proportional, dagegen hängt sie von der Aktivität oder der Menge der Milch und von der Reihenfolge der Zugabe ab; sie wird bedeutend verstärkt, wenn man das Formalin zuerst mit dem Wasserstoffsperoxyd mischt. Analog verhalten sich Rhodan- und Cyankalium, auch Milchsäure und Essigsäure rufen Lähmung des Fermentes hervor, wobei diese der Konzentration direkt proportional ist und durch Neutralisation rückgängig gemacht werden kann. Diese zeitliche Lähmung umfasst bei frischer Milch in der Regel die Hälfte der Katalase, so dass durch Neutralisation eine Verdoppelung der Aktivität erreicht wird; in älterer Milch dagegen ist nur ein Teil der Katalase zeitlich gelähmt. Dieselben Verhältnisse gelten für geronnene Milch, in welcher im übrigen die Katalase sich lange beständig hält. Alkalische Reaktion lähmt die Katalase ebenfalls. Das Maximum des Katalasegehaltes wird gefunden, wenn man die Milch nach dem Gerinnen neutralisiert, doch ist die Art der Gerinnung von Einfluss. Erhitzen frischer Milch auf 100° während 30 Minuten verursacht in der Regel höheres Katalasemaximum. Beim Gerinnen der Milch geht der grösste Teil des Fermentes in das Koagulum über, in diesem vermehrt es sich langsamer als in Milch, wächst aber allmählich zu einem sehr hohen Werte an. Die Vermehrung kann beschleunigt werden durch zeitweiliges Neutralisieren der im Serum entstandenen Säure. Im gekochten Serum steigt die Katalase zu einem viel höheren Werte an als im rohen, und aus dem Serum lässt sich eine sehr katalasereiche Trockenmasse gewinnen.

Die Enzymnatur der Peroxydasen- und Katalasenreaktionen ungekochter Milch wird von Bordas und Touplain¹⁾ bestritten und ihr Ursprung dem kolloidalen Charakter der Milch zugesprochen. Als Beweis wird angeführt, dass auch Eisensalze, z. B. Eisenoxalat und Eisenlaktat, dieselben Reaktionen geben und dass Zugabe von sehr fein pulverisiertem Kasein zu einer auf 85° erhitzten, also enzymfrei gemachten Milch alle Farbenreaktionen bei Gegenwart von Wasserstoffsperoxyd hervorruft. Die Annahme besonderer Fermente sei daher unnötig. Diese Ansicht weist J. Mayer²⁾ als unrichtig zurück, indem er betont, dass der feste Bodensatz, welcher sich beim Zentrifugieren abscheidet und

¹⁾ Compt. rend. 150, 341 (1910). — ²⁾ Arb. a. d. Kais. Gesundh. Amt 34, 115 (1910).

grösstenteils aus Kasein besteht, sich als inaktiv erweist, wenn man von den katalytisch wirkenden Schmutzteilchen absieht. Auch ist Kasein aus erhitzter Milch nicht mehr imstande, die Reaktionen hervorzurufen. Dass die Katalase von dem Kasein bisher nicht getrennt werden konnte, liegt an ihrem kolloidalen Zustande. Bordas und Touplain begehen auch den Fehler, Peroxydase und Katalase nicht auseinander zu halten. Erstere ist gegen chemische und physikalische Einflüsse bedeutend empfindlicher als letztere und wird bei der Darstellung des Kaseins aus roher Milch anscheinend sehr geschwächt oder gänzlich vernichtet. Sie haftet weder dem Rohkasein an, noch findet sie sich im Serum, noch im Zentrifugenbodensatz, das Kasein selbst darf also nicht als Träger des Peroxydaseprinzips oder als oxydierendes Prinzip betrachtet werden. Somit muss an der Enzymnatur von Peroxydase und Katalase festgehalten werden.

Zu demselben Ergebnis kommt auch J. Sarthou¹⁾. Er nimmt neben der physiologischen Katalase eine bakterielle an. Er beweist das Vorhandensein der ersteren durch Prüfung ganz frischer Milch und das der letzteren dadurch, dass er sterilisierte Milch mit Milchsäurebakterien impft, wobei nach dem Gerinnen die Wasserstoffsperoxydzersetzung eintritt. Er erklärt die von Bordas und Touplain behauptete katalytische Wirkung gekochter Milch dadurch, dass die Milch aus der Luft von neuem Milchsäurebakterien aufgenommen hatte, die eine bakterielle Katalasereaktion hervorriefen. In einer weiteren Arbeit fasst J. Sarthou²⁾ seine Ansicht dahin zusammen, dass die Milch enthält 1. ein im Milchserum unlösliches katalytisches Prinzip, welches sich in der Buttermilch findet und aus Wasserstoffsperoxyd inaktiven Sauerstoff abspaltet, 2. eine im Milchserum und Wasser lösliche Anaeroxydase, welche die Peroxydase-reaktionen hervorruft, und 3. unlösliches Kasein, welches unter gewissen Bedingungen in Gegenwart von Wasserstoffsperoxyd mit p-Phenyldiamin, nicht aber mit Guajakol reagiert. Bordas und Touplain³⁾ suchen zwar ihre Ansicht zu verteidigen, werden aber von J. Sarthou⁴⁾ nochmals widerlegt, wobei dieser betont, dass ausgewaschenes Kalkkaseinat p-Phenyldiamin bei Gegenwart von Wasserstoffsperoxyd nur langsam und nur dann färbt, wenn es sich in einem ganz besonderen physikalischen, sehr lockeren Zustande befindet. Auch wird Guajakol nicht von Kalkkaseinat, wohl aber von Milch, Magermilch und dem Waschwasser des Kalkkaseinates gefärbt.

F. Spindler⁵⁾ verwendete bei seinen Untersuchungen über die Katalase den Gerber-Lobeck'schen Katalaser. In gewöhnlicher Mischmilch fand er fast immer höhere Katalasezahlen als 2,5, ebenso auch bei saurer Milch, Yoghurt und Kefir, wobei für letzteren die Enzymmenge dem Alter proportional war. Ein höherer Katalasegehalt kann

¹⁾ Compt. rend. **150**, 119 (1910). — ²⁾ Journ. Pharm. Chim. [7] **102**, 20 (1910). — ³⁾ Journ. Pharm. Chim. [7] **102**, 118 (1910). — ⁴⁾ Journ. Pharm. Chim. [7] **102**, 165 (1910). — ⁵⁾ Biochem. Ztschrft. **30**, 384 (1911).

auch durch Zugabe von Natriumbikarbonat vorgetäuscht werden. Eine aus dem Trockenmilchprodukt »Galak« hergestellte Milch hatte bereits nach 1—2 Tagen Katalasezahlen wie normale Milch. Bei Ziegenmilch schwankten die Zahlen. Kolostrum gab sowohl bei Rindern, wie bei Schweinen und Ziegen hohe Werte, die höchsten wurden 8 Tage nach der Geburt festgestellt. Bei Kühen traten auch am Ende der Laktation beim Trockenstehen sehr hohe Zahlen auf. Erkrankungen, wie Mastitis, Euterabszesse, Nekrose, Eutertuberkulose, ferner Peritonitis und allgemeine Tuberkulose erhöhen die Katalasemenge, bei Peritonitis tritt sie nur während der Krankheitsdauer auf und sinkt bei eintretender Besserung, sie gibt also ein Bild der Entwicklung des Krankheitsprozesses.

Über die Natur der Reduktasen sind sehr verschiedene Ansichten geäußert worden. E. Seligmann¹⁾ schreibt ihnen bakteriellen Ursprung zu, wobei er betont, dass diese Frage nur theoretische Bedeutung habe; denn nachdem nachgewiesen sei, dass auch gekochte Milch sowohl die Methylenblau- wie auch die Formalinmethylenblaureaktion zeigen kann, wenn sie wieder infiziert ist, hat die Methode keine Bedeutung mehr für den praktischen Nachweis einer Erhitzung der Milch. Die Reaktionsgeschwindigkeit zeigt eine deutliche Abhängigkeit von den Witterungsverhältnissen, indem sie an sehr heißen Tagen die niedrigsten Werte erreicht. Ferner wird das Reduktionsvermögen frischer Milch durch 2 stündige Aufbewahrung bei 37° gesteigert. Auch das Verhalten der Reaktion gegenüber Desinfektionsmitteln spricht für den bakteriellen Ursprung der Reduktasen. Eine Auflösung von Jodoform in Azeton, welche nach Vandervelde die Bakterien stark schädigt, dagegen die Enzyme nicht beeinflusst, unterdrückt die Milchreduktasen und zwar sowohl die Methylenblaureduktase (M-Reduktase), wie auch die Formalinmethylenblaureduktase (FM-Reduktase) völlig bei 50 und 70°. Mineralische wie organische Säuren haben keinen wesentlichen Einfluss auf den Reduktionsvorgang. Auch die Versuche über die Wirksamkeit der für Fermente stark giftigen Blausäure ergaben, dass diese viel geringer ist als bisher angenommen wurde.

R. Trommsdorff²⁾ stellt fest, dass die reduzierenden Eigenschaften der Milch sich in zweierlei Form äussern. Methylenblau und andere (Farb-) Stoffe (Indigo, Lackmus, Neutralrot, Schwefel) werden reduziert durch bakterielle Reduktasen, andererseits wird das Schardingersche Methylenblauformalin bei 70° auch von keimarmer Milch entfärbt, während erhitzte Milch die Reaktion nicht gibt. Selbst absolut keimfreie Milch wirkt in wenigen Minuten entfärbend, nur einmal wurde bei solcher Milch das Ausbleiben der Reaktion beobachtet.

Chr. Barthel³⁾ weist darauf hin, dass für die Ausführung der Reduktaseprobe nur das Zinkchloriddoppelsalz des Tetramethyltionins,

¹⁾ Ztschrift. f. Hygiene 58, 1 (1908). — ²⁾ Zentrbl. Bakteriöl. I. Abt. 49, 291 (1909). — ³⁾ Milch-Ztg. 39, 25 (1910).

nicht das salzsaure Salz verwendet werden dürfe. Zur Herstellung der Farblösung werden 5 *ccm* einer gesättigten Lösung des Farbstoffes in 96%igem Alkohol mit 195 *ccm* Wasser verdünnt. Zur Reaktion werden 20 *ccm* Milch mit 1 *ccm* der verdünnten Lösung gemischt und im Wasserbade bei 45—50° gehalten. Nach den Entfärbungszeiten werden 3 Klassen von Milch unterschieden: sehr gute mit mehr als 3 Stdn., mittelmäßige mit 1—3 Stdn. und schlechte mit weniger als 1 Stde. Entfärbungszeit.

Die Temperatur während der Aufbewahrung hat aber, wie O. Jensen¹⁾ zeigt, einen starken Einfluss auf die Reduktionszeit. Diese ist am kürzesten, wenn die Temperatur 38° beträgt und wenn nur die Hälfte der von Barthel angegebenen Methylenblaulösung verwendet wird, weil diese Lösung etwas hemmend auf die Entwicklung der Milchsäurebakterien wirkt. Die übliche Gärprobe (Aufbewahrung der Milch während 24 Stdn. bei 38—40°) gibt nur das Verhältnis zwischen guten und schlechten Bakterien an, aber nichts über deren absolute Menge. Ein besseres Bild über die Beschaffenheit der Milch erlangt man durch die Kombination der Gärprobe mit der Reduktaseprobe, die sogenannte Gärreduktaseprobe. Diese wird ausgeführt, indem man 40 *ccm* Milch in sterilisierten Röhren mit 1 *ccm* Methylenblaulösung versetzt und im Wasserbade bei 38° aufbewahrt. Man stellt zunächst die Entfärbungszeit fest und überlässt die Milch weiter 24 Stdn. der Gärung. Chr. Barthel²⁾ teilt zwar die Ansicht, dass die Anwendung einer niedrigeren Reduktionstemperatur den Eintritt der Entfärbung beschleunigt, er kann diese Abänderung aber trotzdem nicht gutheissen, weil die Ursache jener Erscheinung darin liegt, dass bei 38° die Bakteriëntwicklung ihr Optimum hat, so dass bei dieser Ausführungsart der Reaktion nicht nur die reduzierende Kraft der Milch, wie sie beim Beginn der Reaktion vorlag, sondern gleichzeitig die Reduktionskraft der nachträglich gebildeten Bakterien gemessen wird, während bei 45—50° die Bakterienwirkung ausgeschlossen ist. In der Verbindung der Gär- und der Reduktaseprobe sieht aber auch Barthel den Vorteil, dass man nicht nur über den gesamten Bakteriengehalt, sondern auch darüber Aufschluss erlangt, welche Bakteriengruppen die Oberhand haben, was besonders für die Beurteilung der Milch bezüglich ihrer Tauglichkeit für Meiereizwecke von Bedeutung ist, da z. B. eine Milch, welche viele Milchsäurebakterien enthält, also ein sehr schlechtes Ergebnis der Reduktaseprobe liefert, doch ein sehr günstiges Gärbild zeigt, und umgekehrt eine keimarme Milch ein gutes Ergebnis der Reduktaseprobe, aber ein sehr schlechtes Gärbild aufweisen kann, wenn die Art der Keime ungünstig ist. Weiterhin hat Barthel an einer grösseren Anzahl von Proben die Gärreduktaseprobe mit der gewöhnlichen Gärprobe, der Alkoholprobe, der Katalaseprobe und der Schardingerschen

1) Milch-Ztg. 39, 37 (1910). — 2) Ztschrift. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 21, 513 (1911).

Probe, sowie der Bakterienzählung verglichen. Bei der Reduktaseprobe verwirft er die Aufschichtung von flüssigem Paraffin, welche zwecks Luftabschlusses vielfach angewendet wird. Es gibt auch Apparate für die Reduktaseprobe, bei welchen der Luftabschluss mechanisch bewirkt wird (z. B. die Reduktaser von Lobeck-Gerber oder Funke). Für die Bakterienzählung benutzt Verf. einen Gelatinepeptonnährboden mit Zusatz von Milchzucker und Glykose. Letztere bietet den Vorteil, dass die verflüssigenden Bakterien stärker gehemmt werden als durch Milchzucker allein, so dass die Platten längere Zeit aufbewahrt werden können. Molkengelatine lässt zwar mehr Kolonien zur Entwicklung gelangen als die Glykoselaktosegelatine, sie ist aber der Verflüssigung mehr ausgesetzt als diese. Aus seinen Ergebnissen zieht Verf. folgende Schlüsse. Die Alkoholprobe zeigt zwar sehr scharf die beginnende Säuerung an, hierauf beschränkt sich aber auch ihre Bedeutung bei der Untersuchung von Mischmilch, über die allgemeine hygienische Beschaffenheit der Milch sagt sie nichts. Bei der Katalaseprobe kann man nicht ohne weiteres 2,5 *ccm* Gas als höchstzulässige Grenze ansehen, denn die Katalasezahl geht in bakterienarmer Milch häufig bis zu 4,5 hinauf und erst über dieser Grenze ist die Milch sicher mangelhaft. Der Zusammenhang zwischen der Katalasezahl und der hygienischen Beschaffenheit der Milch ist aber bei weitem nicht so konstant wie der zwischen der Reduktaseprobe und der Beschaffenheit. Bei der Reduktaseprobe entspricht im allgemeinen einer Entfärbungszeit von weniger als 1 Stde. einem Bakteriengehalt von etwa 10 Millionen und darüber in 1 *ccm*, bei weniger als 4 Millionen Keimen beträgt die Zeit meist über 3 Stdn., bei mehr als 20 Millionen fast immer weniger als 15 Min. Für die Reduktaseprobe ist demnach eine Beobachtungszeit von 3 Stdn. angemessen. Die Scharfingersche Reaktion bietet keine brauchbare Grundlage für die Beurteilung der hygienischen Beschaffenheit der Milch, da die Entfärbungszeit nicht in direktem Verhältnis zum Bakteriengehalt steht; die Ursache der Entfärbung bei dieser Reaktion ist ja ein besonderes Enzym, die Aldehydreduktase.

Die Gärreduktaseprobe hat auch R. Dons¹⁾ an einem grösseren Material auf seine Brauchbarkeit geprüft. Er findet aber, dass das Verfahren für die Keimzählung sehr ungenau und auch sein hygienischer Wert nur gering ist. Bei dieser Reaktionsausführung sind nur die bei 38° gut wachsenden Bakterien tätig, während andere nur bei überaus grosser Menge reduzieren. Das Reduktionsvermögen der bei 38° gut wachsenden Arten ist aber sehr verschieden, wobei auch von Einfluss ist, ob die Milch roh oder pasteurisiert ist. Wahrscheinlich sind die milchsäurebildenden Mikrokokken und Streptokokken ausschlaggebend. Die Bakterien der Koli- und Aerogenesgruppe reduzieren in roher Milch ebenso schnell wie die echten Milchsäurebakterien, jedoch ist die Geschwindigkeit der Reduktion kein Ausdruck für die Anzahl der Bakterien.

1) Zentrbl. Bakteriolog. I. Abt. 40, 132 (1914).

Zusatz von erheblichen Mengen Pferde- und Menschenfäzes beeinflusste die Reduktion nicht, wenn die Milch nach der Schmutzzugabe 2 Stdn. bei Zimmertemperatur gestanden hatte. Weiter hat sich ergeben, dass Milch, die längere Zeit bis auf 100° oder kürzere Zeit bis auf 135° erwärmt war, Methylenblau reduziert, und dass rohe Milch, die 10 Minuten bis auf 68—70° erwärmt ist, den Charakter der Rohmilch behält. Die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien in der Milch wird durch Methylenblau sogar in sehr schwachen Konzentrationen erheblich gehemmt, so dass die Gärreduktaseprobe keine hygienische Bedeutung hat.

Über den Zusammenhang der Methylenblaureduktion mit den Milchbakterien hat auch E. B. Fred¹⁾ Untersuchungen angestellt. Von 22 gewöhnlich in der Milch vorhandenen Arten wirkten 21 farbstoffreduzierend. In Milch geht die Entfärbung schneller vorstatten als in Bouillon. Die Reduktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Temperatur, bis 37° verhält sie sich der letzteren umgekehrt proportional. In einer frisch angelegten Kultur ist sie auch dem Wachstum der Bakterien proportional und hört mit der Erschöpfung des Nährbodens auf. In quantitativer Beziehung verhalten sich bei der Reduktion verschiedene Bakterienarten abweichend, jede Art scheint aber ihren bestimmten Reduktionskoeffizienten zu besitzen, wobei jedoch die Form der Wachstums- und Reduktionskurven gleich bleibt. Die Peroxydase ist in der Milch als solche ursprünglich vorhanden, wird also nicht erst durch Bakterienwachstum gebildet, während die Katalase vorwiegend der Bakterienentwicklung ihre Entstehung verdankt. Die Reduktion der formalinfreien Methylenblaulösung ist sehr verwickelt. Sie wird anscheinend durch die Veränderung der Materie während der Assimilation gefördert, wobei wahrscheinlich intra- und extrazelluläre Produkte mitwirken. Die Reduktionsprobe eignet sich, um ein annäherndes Bild über den Bakteriengehalt der Milch zu gewinnen.

Chr. Barthel²⁾ untersuchte den Einfluss, den der in der Milch gelöste Sauerstoff als Hemmungsfaktor bei der Methylenblauentfärbung ausübt. Sterilisierte Milch wirkt entfärbend, wenn der Sauerstoff (z. B. durch Erwärmen oder Durchleiten eines indifferenten Gases wie Kohlenensäure, Stickstoff) entfernt wird, die Entfärbung ist also nicht ausschließlich durch Bakterientätigkeit bedingt. Letztere besteht darin, dass die Bakterien durch ihre Sauerstoffzehrung die Milch sauerstofffrei machen, daher findet ein Parallelismus statt zwischen der Entfärbungszeit und dem Bakteriengehalt. Die Bakterien können aber auch direkt reduzieren, man hat also eine 3fache Ursache für die Entfärbung anzunehmen: die Sauerstoffzehrung der Bakterien, die Eigenreduktion der Milch und die direkte Bakterienreduktion. Der Prozess verläuft in 2 Phasen, zuerst wird der in der Milch gelöste Sauerstoff durch die Bakterien

¹⁾ Zentrbl. Bakteriöl. II. Abt. 35, 391 (1912). — ²⁾ Ztschrift. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 34, 137 (1917).

verbraucht, sodann tritt die Entfärbung durch die in der Milch selbst befindlichen reduzierenden Stoffe ein; welcher Art diese Stoffe sind, ist einstweilen noch nicht festgestellt. Wegen der geschilderten Rolle der Bakterien bleibt die Tatsache bestehen, dass die Entfärbungszeit der Milch unter normalen Verhältnissen ausschliesslich von der Bakterienentwicklung in der Milch abhängig ist. Wegen der Bedeutung des in der Milch gelösten Sauerstoffs bei der Entfärbung ist es in der Praxis ratsam, bei Anstellung der Reduktaseprobe die Milchproben erst gründlich umzuschütteln. In eingehenden Darlegungen tritt Verf. verschiedenen gegen die Reduktaseprobe erhobenen Einwendungen entgegen. Wenn zur Kontrolle der Probe eine Zählung der Bakterien erfolgen soll, so kann diese entweder durch Plattenkultur oder durch direkte Zählung erfolgen, letztere nach den Verfahren von S. Breed oder O. Skar. Diese eignen sich aber nur für nicht erhitzte Milch, bei der alle vorhandenen Bakterien als lebenskräftig angesehen werden können, während für pasteurisierte Milch nur die Plattenkultur in Frage kommt. Alle Verfahren leiden aber an erheblichen Fehlerquellen, sie sind sehr zeitraubend und können daher in der Praxis die Reduktaseprobe nicht ersetzen. Auch die Bestimmung des Ammoniakgehaltes bringt den grösseren oder geringeren Bakteriengehalt nicht zum Ausdruck. Die Alizarolprobe ¹⁾ hat mit der Haltbarkeit der Milch nichts zu tun, sie zeigt nur eine bereits eingetretene, recht beträchtliche Veränderung der Beschaffenheit der Milch an. Als Endergebnis seiner Untersuchungen über die neueren Methoden für die Schätzung des Bakteriengehaltes und dadurch ihres Frischheitsgrades betont Verf., dass für eine orientierende Klasseneinteilung der gewöhnlichen Handelsmilch nach ihrem Bakteriengehalt keine Methode sich besser eignet als die Reduktaseprobe. Als praktische Kontrollmethode ist in zweiter Linie die direkte Bakterienzählung anzusehen, die aber nur für unerhitzte Milch in Frage kommt. Eine von allen Gesichtspunkten aus befriedigende Methode zur Feststellung der hygienischen Beschaffenheit der Milch gibt es bis jetzt nicht, augenblicklich ist die Reduktaseprobe, vereinigt mit der Gärreduktaseprobe nach Orla-Jensen, die beste kombinierte Methode für eine orientierende Beurteilung der bakteriellen Beschaffenheit der Milch sowohl in quantitativer wie in qualitativer Hinsicht.

Über die Rolle der Leukozyten der Milch bei der Reduktaseprobe wird im allgemeinen angenommen, dass sie keinen wesentlichen Einfluss ausüben. Da aber auch normale Milch sehr reich an Leukozyten sein kann, so hat O. Skar ²⁾ geprüft, wie sich dieselben dem Methylengrün gegenüber verhalten, wenn das Sedimentieren und die Aufrahmung verhindert wird. Von einzelnen Kühen wurden aus einer einzelnen Zitze nacheinander 4 Proben von je 60 ccm in regelmäßigen Abständen vom Beginn des Melkens bis zur Entleerung des Euterviertels steril

¹⁾ Vergl. diese Ztschrft. 59, 390 (1920). — ²⁾ Ztschrft. f. Fleisch- u. Milchhyg. 23, 442 (1913).

entnommen. Nach Zusatz der Methylenblaulösung wurden die Proben bei 38° gehalten, wobei die Röhren teilweise ab und zu umgekehrt wurden. Die beiden ersten Proben, welche reich an Bakterien und Leukozyten (etwa 600 000 in 1 *ccm*) waren, brauchten 17—19 Stdn. zur Entfärbung, während diese bei den beiden letzten Proben bereits nach 8—12 Stdn. eingetreten war, obwohl dieselben nur sehr wenig Bakterien, dagegen 3—7 Millionen Leukozyten in 1 *ccm* enthielten. In den ruhig stehengebliebenen Gläsern entfärbte sich die Milch im allgemeinen mehrere Stunden später als in den umgekehrten Gläsern. Wurde die gefärbte Milch, bevor sie in den Thermostaten kam, zentrifugiert, so dauerte die Entfärbung erheblich länger. Die Methylenblaufärbung wird nach diesen Versuchen nicht nur durch Bakterien, sondern in erheblichem Maße auch durch die Leukozyten bewirkt.

Auch zur Beurteilung des Rahms hält A. E. Sandelin¹⁾ die Reduktaseprobe für brauchbar. Die Reduktionszeit ist bei Magermilch zuweilen etwas länger als die der Vollmilch, was darauf zurückzuführen ist, dass die Magermilch nicht durch eine Rahmschicht vor Luftzutritt geschützt ist. Die Ansicht, dass bei Zentrifugentrainment die Hauptmengen der Bakterien in den Rahm wandern, die Magermilch also bakterienärmer sei, trifft nicht zu.

Bei einem so komplizierten System wie der Milch muss der Verlauf einer Reaktion, wie sie die Methylenblauréduktion darstellt, von mancherlei Faktoren abhängig sein. Auf einen solchen Faktor macht E. Eichwald²⁾ aufmerksam, nämlich auf den kolloidalen Zustand der Milchbestandteile. Methylenblau wird wie andere Farbstoffe in hohem Maße von Kolloiden adsorbiert, wobei der Verteilungsgrad der Kolloide die Adsorptionsgrösse bestimmt. In der Milch sind die Kolloide Fett und Eiweisskörper hinsichtlich des Verteilungsgrades starken Schwankungen unterworfen, so dass die in Lösung bleibende Farbstoffmenge sehr verschieden sein muss. Nun ist anzunehmen, dass der reduzierende Stoff der Milch zunächst nur auf den in Lösung befindlichen Farbstoff wirkt und dass erst, nachdem dieser reduziert ist, der adsorbierte Farbstoff an die Lösung abgegeben und reduziert wird. Die Reduktion muss also um so langsamer verlaufen, je grösser die adsorbierte Farbstoffmenge, d. h. je grösser der Verteilungsgrad der Kolloide ist. Einige Versuche, welche der Verf. in der Richtung, dass er die Reduktion einmal bei ruhigem Stehen, andererseits unter Umschütteln (also Zerteilen des Fettes) der Proben und zwar in Luft- wie auch Kohlensäureatmosphäre vornahm, scheinen eine Bestätigung der Ansicht zu geben.

Zum Nachweise der Leukozyten verwendete H. Kufferath³⁾ an Stelle der Trommsdorffschen Röhrrchen solche, die er durch Anschmelzen von Thermometerröhren an Röhren von 20 *ccm* Fassungsraum

1) Molkerei-Ztg. 27, 281, 290 u. 298 (1918). — 2) Ztschrft. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 38, 359 (1919). — 3) Ann. Inst. Pasteur 33, 420 (1919).

herstellt und deren Kapillare mit Teilstrichen für 1, bzw. 2⁰/₁₀₀ Leukozytengehalt versehen ist.

Schardingersche Reaktion. Während die gewöhnliche Reduktaseprobe auf der direkten Entfärbung von Methylenblau beruht, tritt bei der Schardingerschen Probe eine Aldehydkatalase in Wirksamkeit, welche in Gegenwart von Formaldehyd reduzierend wirkt. Die Reaktion wird in der Weise angestellt, dass man 10 *ccm* Milch mit 1 *ccm* der Schardingerschen Lösung (5 *ccm* gesättigte alkoholische Methylenblaulösung, 5 *ccm* Formalin, 190 *ccm* Wasser) vermischt und unter Luftabschluss bei 70° oder bei 45—50° im Wasserbade stehen lässt. Auch diese Reaktion ist vielfacher Nachprüfung unterzogen worden.

Bei Versuchen von K. Schern¹⁾ entfärbte frische Milch altmilchender Kühe in der Mehrzahl der Fälle die Formalin-Methylenblaulösung (FM-Lösung), während frische Milch frischmilchender Kühe sich negativ verhielt. Letzteres war namentlich dann zu beobachten, wenn ein Kalb längere Zeit am Euter der betr. Kuh saugte oder gesaugt hatte. Die Menge des entfärbenden Enzyms steigt nach der Geburt des Kalbes allmählich an bis zur normalen Höhe.

S. Oppenheimer²⁾ fand bei der Prüfung von 18 frisch ermolkenen Proben, welche von 16 Kühen stammten, dass sämtliche Proben die Schardinger-Reaktion bei 50° innerhalb 15 Minuten, davon 5 innerhalb 10 Minuten gaben. Zwischen der Keimzahl und der Reaktionsgeschwindigkeit besteht aber kein Parallelismus, die überwiegende Mehrzahl der Proben war sehr keimarm, einzelne waren fast steril. Bei 70° trat Entfärbung bei Untersuchung der Milch von 6 Kühen 5mal innerhalb 7¹/₄ Minuten ein, sie war bei einer Kuh, die erst 2 Monate vorher gekalbt hatte, sogar nach 32 Minuten noch nicht vollständig. Auch bei 70° bestand kein Zusammenhang zwischen Keimzahl und Reaktionsverlauf. In 2 Fällen, in denen die ersten, keimreichen Strahlen untersucht wurden, wiesen diese erheblich langsamere Reaktion auf als die mittleren Gemelkteile; vermutlich spielt hier der Fettgehalt eine Rolle. Nach diesen Ergebnissen rührt die Schardinger-Reaktion von einem Stoffe her, der mit den Milchbakterien nichts zu tun hat; diese originäre Aldehydkatalase ist also von den direkten oder indirekten bakteriellen Reduktasen streng zu unterscheiden.

P. H. Römer und Th. Sames³⁾ warnen davor, die Reduktionswirkungen ohne weiteres Fermenten zuzuschreiben, indem sie darauf hinweisen, dass auch in gekochter Milch, welche also nicht mehr reduzierend wirkt, die Reaktion wieder hervorgerufen werden kann durch Zusatz von Ferrosulfatlösung. Hält man aber die mit Ferrosulfat versetzte Milch ¹/₂ Stde. unter häufigem Umschütteln in kochendem

1) Biochem. Ztschrft. 18, 261 (1909). — 2) Arb. a. d. Kgl. Inst. f. exper. Therapie Frankfurt a. M. 4, 75 (1908). — 3) Ztschrft. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 20, 1 (1910).

Wasserbade und prüft nachher die abgekühlte Milch mit FM-Lösung, so ist die Reaktion verschwunden. Ferrosulfat allein wirkt aber nicht reduzierend. Die FM-Reduktase zeigt gegenüber ultravioletten Strahlen ein anderes Verhalten als die Oxydase; bei einstündiger Belichtung in dünner Schicht wird die erstere nicht geschädigt, die letztere dagegen vernichtet. Auch bei der Dialyse ergab sich zwischen der Oxydase und der FM-Reduktase ein wesentlicher Unterschied. Die eigentümlichen Abweichungen, welche die Scharfing-*Schardinger*-Reaktion häufig bei frischen Proben ergibt, glauben die Verf. auf einfache Weise daraus erklären zu können, dass die Reaktion nicht in den ersten Teilen des Gemelkes auftritt, während bei der Endmilch des Gemelkes die Entfärbung prompt stattfindet. Bei der Mischmilch finden sich dementsprechend alle Übergänge von sehr rascher bis zu langsamer und unvollständiger Entfärbung. Auffällig ist, dass sehr häufig Handelsmilchproben gefunden wurden, welche nicht erhitzt waren, aber trotzdem die *Schardinger*-Reaktion nicht gaben. Zwischen dem Fettgehalt und der Reaktionsstärke besteht ein weitgehender, aber nicht vollständiger Parallelismus. Es ist daher zu folgern, dass unter den gleichen Bedingungen, unter denen die Milchdrüse reichlich Fett ausscheidet, es in der Regel auch zu reichlicher Ausscheidung der FM-Reduktase kommt. Ferner ist zu beachten, dass die zuletzt ermolkene Milch erst während des Melkens durch Zerfall von Drüsenzellen entsteht; da nun erfahrungsgemäß Reduktionswirkungen Eigenschaften fast aller lebenden Zellen sind, so würde das Auftreten der FM-Reduktase gerade in den letzten Anteilen des Gemelkes hierdurch zu erklären sein. Der Ansicht von *König*, dass die Reduktase in zwei Formen, nämlich in freiem und in gebundenem Zustande in der Milch vorkomme und dass die gebundene Form bei Zusatz von Alkali in Erscheinung trete, können die Verf. nicht zustimmen, denn auch reine Milchzuckerlösung wirkt nach Zusatz von Alkali auf FM-Lösung reduzierend, und in gekochter Milch kann man durch Alkalizusatz die Reaktion wieder hervorrufen.

Diese Untersuchungen haben *W. Rullmann*¹⁾ zu einer Nachprüfung veranlasst, die teilweise zu anderen Ergebnissen führte. Unerhitzte Milch, sowohl keimfreie wie keimhaltige, sowie thermostabile Körper entfärben sowohl in Gemeinschaft, wie für sich allein die FM-Lösung bei 45—50° in wenigen Minuten. Der Formaldehyd lässt sich auch durch die äquivalente Menge Ameisensäure ersetzen; diese Lösung (AM-Lösung) braucht zur Entfärbung aber fast stets wesentlich längere Zeit. Die Entfärbung der Lösungen in sterilisierter Milch beruht auf der Einwirkung thermostabiler Körper, hierbei scheint das Alter, bezw. der Frischezustand der Milch ohne Einfluss zu sein, sofern sie keimfrei bleibt. Der Zusatz von Natronlauge, Ammoniak oder Phosphaten zu sterilisierter Milch beschleunigt die Reaktion wesentlich, namentlich

1) *Biochem. Ztschrift.* **32**, 446 (1911).

wenn gleichzeitig Milchzucker zugefügt wurde. Milchzucker ohne Alkalizusatz hat dagegen keine oder nur geringe fördernde Wirkung. Dagegen wirkt erhöhte Temperatur stets beschleunigend. Das verschiedene Verhalten von roher unerhitzter, pasteurisierter, sterilisierter und aufgekochter Milch dürfte zunächst durch die bei 50° beginnende Entmineralisierung der Milch, dann durch die bei 65—69° beginnende Enzymschädigung und schliesslich durch die bei noch höheren Temperaturen eintretende Zersetzung der Eiweissstoffe bedingt sein. Die Einwirkung anorganischer Fermente auf erhitzte Milch, wie sie Römer und Sames (s. oben) beschrieben haben, konnte bestätigt werden. Dagegen ergaben sich widersprechende Resultate bezüglich der Reaktion bei unerhitzter Milch. Der Einwand, dass durch Zusatz von Basen zu gekochter Milch ein Rohzustand vorgetäuscht werden könne, ist zwar theoretisch begründet, dürfte aber praktisch ohne Bedeutung sein. Verf. hält die Rothenfusser'sche Peroxydasereaktion für sehr genau und scharf, er spricht auch der Schar'dinger'schen Reaktion für die gewöhnlichen Zwecke der Milchbakteriologie zur Unterscheidung von roher und gekochter Milch einen erheblichen Wert zu. Eine Regeneration der Enzyme konnte er nicht beobachten.

P. H. Römer¹⁾ ist der Ansicht, dass der positive Ausfall der Schar'dinger-Reaktion nicht unbedingt beweisend für Rohmilch ist, da sowohl gekochte und mit genügenden Mengen Alkali versetzte, wie auch gekochte und mit Ferrosulfatlösung vermischte Milch eine positive Reaktion gibt. Andererseits schliesst ein negativer Ausfall der Reaktion nicht aus, dass Rohmilch vorliegt, aus den von Römer und Sames dargelegten Gründen (s. oben). Insgesamt ergibt sich somit, dass der Ausfall der Schar'dinger-Reaktion allein niemals mit Sicherheit einen Schluss auf Erhitzung oder Nichterhitzung der Milch zulässt. Gegenüber den von Römer gegen die Arbeit von W. Rullmann (s. oben) erhobenen Einwendungen weist letzterer²⁾ darauf hin, dass er bei seinen Untersuchungen nie völlig negative Milch gefunden habe.

R. E. Lee und M. G. Mellon³⁾ stellten bei ihren Untersuchungen fest, dass die FM-Lösung nicht entfärbt wird 1. von normaler frischer Milch in weniger als 20 Minuten; bei bereits nach 10 Minuten oder noch früher eintretender Entfärbung enthält die Milch 1 Million und mehr Keime in 1 ccm; 2. von 10 Minuten bei 70° erhitzter Milch, wenn seit dem Pasteurisieren nicht wieder 48 Stdn. verstrichen sind; 3. von alter durch Formaldehyd konservierter Milch. Dagegen tritt Entfärbung ein mit normaler Milch, die bei gewöhnlicher Temperatur bereits 24—48 Stdn. gestanden hat. Eine Abhängigkeit der zur Entfärbung erforderlichen Zeit von der Zahl der Bakterien ist im allgemeinen nicht vorhanden, jedoch wurde eine Proportionalität bei Einzelproben bis zu einem gewissen Säuregrade beobachtet. Hieraus ist zu schliessen, dass die

¹⁾ Biochem. Ztschrft. 40, 5 (1 12). — ²⁾ Biochem. Ztschrft. 48, 155 (1913). — ³⁾ Journ. Ind. Eng. Chem. 9, 360, (1917).

Reduktase bakteriellen Ursprungs ist, dass aber nicht alle in der Milch vorkommenden Bakterien an ihrer Bildung beteiligt sind.

R. Burri und H. Schmid⁴⁾ fanden, dass bei frischer bakterienarmer Milch die Intensität der Schardinger-Reaktion im wesentlichen abhängig ist von der Temperatur, bei der die Milch vorher aufbewahrt wurde. Kühlung der Milch verkürzt die Reduktionszeit, erhöht also anscheinend die Menge des Enzyms, wobei die Tiefe der Abkühlung keinen wesentlichen Unterschied ausmacht. Unmittelbar nach der Kühlung ist der erreichte Zustand der Milch hinsichtlich ihres Verhaltens bei der FM-Reaktion labil, d. h. er lässt sich unter dem Einfluss der bei der Prüfung benutzten Reaktionstemperatur von 45° wieder mehr oder weniger rückgängig machen. Ein relatives Unempfindlichwerden gegenüber höheren Temperaturen vollzieht sich aber im weiteren Zeitverlauf, indem nach ungefähr 2 Stdn., vom Beginn der Kühlung an gerechnet, ein Grenzwert erreicht wird, wobei es gleichgültig ist, ob in der zweiten Stunde die Kühlung angedauert hat, oder die Milch nach der einstündigen Kühlung während der folgenden Stunde bei 20° aufbewahrt wurde. Dieses Verhalten lässt einen Schluss auf den Verlauf der Fetterstarrung zu, es legt die Vermutung nahe, dass bei der Kühlung der Milch das Milchfett in einer ersten Phase vom flüssigen in den festen Zustand übergeht und in einer zweiten Phase Änderungen in der Struktur des festen Fettes, bzw. innere Umlagerungen infolge von Kristallisationsvorgängen, stattfinden.

Das Verhalten der Schardinger-Reaktion gegenüber Kolostrum haben R. Reinhardt u. E. Seibold¹⁾ untersucht und gefunden, dass unmittelbar nach der Geburt und nicht selten auch noch in den nächstfolgenden Tagen die Reaktion eintritt aber zuweilen verzögert ist. Dann aber bleibt die Reaktion in der Milch frischmilchender Kühe in der Regel aus und zeigt sich erst nach Verlauf von 3—8 Wochen wieder, wobei das Saugen des Kalbes ohne Einfluss auf die Zeit des Wiedereintritts der Reaktion ist. Jedoch fehlt das Enzym auch in der Milch frischmilchender Tiere nie vollständig, was daraus hervorgeht, dass sich im Rahm, bzw. in der Restmilch, stets mindestens Spuren des Enzyms nachweisen lassen. Ein Antiferment ist aber in der Milch frischmilchender Kühe nicht enthalten. Zwischen der Milch alt- und frischmilchender Kühe bestehen nur quantitative Unterschiede. Allgemeinerkrankungen und Enterentzündungen beeinflussen die Reaktion. Vom Fettgehalt ist der Enzymgehalt nicht abhängig. Zur Entfärbung einer gewissen Menge der FM-Lösung ist eine entsprechende Menge des Fermentes erforderlich; 10 *ccm* Milch altmilchender Kühe entfärben 1 *ccm* Reagens innerhalb 4—12 Minuten. Bezüglich des Einflusses der Zeit, die zwischen dem letzten Melken und der Milchentnahme verfließen ist, und des gebrochenen Melkens kommen die Verf. zu denselben Ergebnissen wie Römer u. Sames (s. oben): Die Anfangsmilch

¹⁾ Biochem. Ztschrift. **36**, 376 (1911). — ²⁾ Biochem. Ztschrift. **31**, 294 (1911).

enthält wenig, die Mittelmilch wenig, die Endmilch am meisten Ferment. Die einzelnen Euterviertel können verschieden fermentreiche Milch liefern. Steril entnommene Milch entfärbt ebenso wie die durch das übliche Melken gewonnene. Der die Entfärbung bewirkende Körper ist ein in der Milch präformiertes Enzym, das beim Erhitzen auf 65° unwirksam wird. Die optimale Reaktionstemperatur liegt für Milch altmilchender Kühe bei 65° , für die von frischmilchenden Tieren bei 45° . In bakterienhaltiger Milch tritt nach Ablauf der bakteriziden Phase eine Zunahme der Reduktionskraft ein, in steriler Milch nicht. Die Zunahme ist auf fermentbildende Bakterien zurückzuführen.

Dieselben Verfasser haben in einer weiteren Arbeit¹⁾ auch den Einfluss von Eutererkrankungen auf die Schardinger-Reaktion eingehend erforscht. Sie fanden, dass das Auftreten einer Euterentzündung allgemein die Reaktion beeinflusst, dass aber der Enzymgehalt in erster Linie von dem Grade der Veränderung des Sekrets sowie von der Ausdehnung, dem Grade und dem Stadium der Entzündung abhängig ist. So lange das Mastitissekret normale Farbe und Beschaffenheit zeigt, pflegt die Reaktionszeit normal oder schwach verkürzt zu sein, bei sehr starker Veränderung aber, besonders bei serös-wässriger Beschaffenheit des Sekrets tritt starke Verzögerung oder Ausbleiben der Reaktion ein. Mastitismilch zeigt also grosse Schwankungen im Enzymgehalt, und es ergibt sich daraus, dass die Schardinger-Reaktion sich nicht zur Ermittlung euterkranker Kühe eignet.

Die vergleichende Prüfung der vorstehend besprochenen Untersuchungsverfahren, und zwar der Keimzahlbestimmung, der Leukozytenmenge, der Katalase-, Reduktase- und Gärreduktasezahl, des Schmutzgehaltes in Verbindung mit der mikroskopischen Prüfung des Leukozytenbodensatzes führten E. Philippe²⁾ zu folgenden Ergebnissen. Die Leukozytenprobe ist nicht immer zuverlässig, das Sediment besteht nicht stets aus wirklichen Eiterelementen, wodurch Mastitis vorgetäuscht werden kann. Notwendig ist daher mikroskopische und nötigenfalls bakteriologische Prüfung. Die Probe lässt sich dadurch verbessern, dass man die Milch zuvor durch ein Wattefilter gibt. Von den untersuchten Proben bildeten nur 3% über $1 \text{ Vol.}\frac{0}{100}$ und nur 1 Probe mehr als $2 \text{ Vol.}\frac{0}{100}$ Sediment. Bei $3,5\%$ der Proben wurden im Sediment Streptokokken, bei $11,5\%$ Leukozyten, bei 26% Erythrozyten nachgewiesen. Der Koestlersche Apparat zur Katalasebestimmung ist nicht fehlerfrei. Die Filtration der Milch hat auf die Katalasezahl keinen Einfluss. Hohe Katalasezahlen zeigen abnorme Milch an, es ist dabei ohne praktische Bedeutung, ob die Milch erst nach 6 oder gar 12 Stdn. zur Untersuchung gelangt. Die Milchsäurebakterien beeinflussen die Zahl nicht. Zur Aufstellung von Grenzzahlen reichen die Erfahrungen noch nicht aus. Bei den Reduktasen sind 2 Arten zu unterscheiden, die Milchreduktase und die Bakterienreduktase.

¹⁾ Biochem. Ztschrift. 31, 385 (1911). — ²⁾ Mitt. Lebensmittelunters. u. Hyg. 2, 1 (1911).

Die Reduktaseprobe mit formalinfreier Methylenblaulösung ist ein sicheres Mittel zur Erkennung der Frische der Milch; eine solche, welche innerhalb 3 Stdn. noch nicht entfärbt ist, kann als normal gelten. Bei der Schardingerschen Probe soll normale Milch in längstens 10 Minuten entfärbt werden. Für die Schmutzbestimmung wurde das Bernsteinsche Wattefilter verwendet.

A. Giffhorn¹⁾ erhielt bei frischer normaler Mischmilch stets Peroxydasereaktion, die FM-Lösung wurde in 5—12 Minuten reduziert, 0,01—0,025 g lösliche Stärke wurde zersetzt und bei der Katalaseprobe eine Sauerstoffmenge von 5—30 mm erhalten. Mischmilch mit hohem Katalase- und FM-Enzymgehalt, aber normalem Diastasegehalt ist stark verunreinigt, solche mit niedrigem Diastasegehalt, aber hohem Gehalt an sonstigen Enzymen besitzt ein hohes Alter und ist als Nahrungsmittel nicht mehr verwendbar. Milch euterkranker Tiere kennzeichnet sich durch hohen Diastase-, Katalase- und FM-Reduktase-, aber niedrigen M-Reduktasegehalt. Bei Erhitzung einer stark bakterienhaltigen und längere Zeit aufbewahrten Milch über 72° werden die Peroxydase, die Diastase und beide Reduktasen zerstört, während die Katalase unverändert bleibt. Mischmilch, die die Peroxydasereaktion gibt, aber Stärke nicht zersetzt, war 30 Minuten lang auf 65—72° erhitzt.

Auch H. Lenzen²⁾ hat die hygienischen Prüfungsmethoden miteinander verglichen. Er stellte fest, dass erhöhter Katalasegehalt einer frisch ermolkenen rohen Milch ein Zeichen von Eutererkrankung ist, wenn die Kolostralperiode vorüber ist. Bei Marktmilch zeigt aber die Katalaseprobe die Beimischung von pathogener Milch nicht sicher an, da die Katalase auch durch Bakterien erzeugt wird, welche in der Milch normal vorkommen. Der von König aufgestellte Grenzwert 2,5 ccm ist zu niedrig, ein solcher von 4 ccm ist zweckmäßiger. Die Bestimmung der FM-Reduktase ist kein sicheres Erkennungszeichen für Euterentzündung, da sie in diesem Falle nicht selten versagt, ohne dass dafür eine ausreichende Erklärung vorliegt. Die bakterielle Zersetzung der Milch beschleunigt die M-Reduktion erheblich, nicht dagegen die FM-Reaktion; jedoch wirkt auch bei letzterer Mastitismilch oft beschleunigend. Die Diastasereaktion nach König (s. weiter unten) zeigt Mastitis nicht zuverlässig an, ihre Ergebnisse weichen oft erheblich von denen der übrigen Enzymreaktionen ab. Die bei der Peroxydasereaktion mit dem Storchschen Reagens (vgl. weiter unten) in Rohmilch auftretende Blaufärbung geht mit zunehmendem Säuregrad mehr oder weniger schnell in Rosa über, während bei Milch, welche sich im Inkubationsstadium befindet, die Blaufärbung bestehen bleibt oder erst nach einigen Stunden umschlägt. Die quantitative Bestimmung der Leukozytenzahl ist für sich allein nicht beweisend für das Vorhandensein einer Mastitis, da die Milch erhebliche Mengen von Leukozyten enthalten kann, ohne

¹⁾ Dissertation, Bern 1909. — ²⁾ Arb. a. d. Bakter. Lab. d. städt. Schlachthofes Berlin, Heft 3 (1911).

dass eine solche Erkrankung vorliegt. Noch weniger kann die Aufstellung von Grenzwerten für die Leukozytenzahl in zentrifugierten Milchproben als Anhalt für den Nachweis von Mastitis als berechtigt anerkannt werden. Nicht die Menge, sondern die Beschaffenheit des Bodensatzes einer zentrifugierten Milchprobe ist maßgebend für die Diagnose, es muss also der mikroskopische oder kulturelle Nachweis von Streptokokken erfolgen. Die Katalase- oder Reduktaseprobe gibt keinen Anhalt für die Diagnose von Eutertuberkulose. Mastitismilch wirkt hämolytisch, doch hat dieses Verfahren nur wissenschaftliches Interesse. Bei der Kolostralmilch steht einem hohen Säuregrad und hohem Diastase- und Katalasegehalt eine Verlangsamung der FM- und der Peroxydasereaktion gegenüber, bei letzterer tritt auch der sonst mit hohem Säuregehalt verbundene Farbenumschlag in Rosa nicht ein, anscheinend deshalb, weil die Azidität nicht durch Milchsäure, sondern durch saure Phosphate bedingt ist. Pasteurisierte Milch ist gekennzeichnet durch erhebliche Abschwächung der Katalase- und Reduktasereaktion, die aber augenscheinlich im wesentlichen nur auf die Ausschaltung der Milchsäurebakterien zurückzuführen ist, während sie sich mit dem sonstigen Keimgehalt nicht in Übereinstimmung befindet. Die Schlachthofmilch ist nach Ansicht des Verf. zur menschlichen Ernährung ungeeignet, da sie fast stets Stauungs- und Mastitischarakter besitzt, oder von alternden und tuberkulösen Kühen stammt.

A. Stetter¹⁾ fand bei seinen Prüfungen keinen Zusammenhang zwischen dem Katalase- und Reduktasegehalt der Milch einerseits und dem spezifischen Gewicht und Fettgehalt andererseits, wengleich der letztere bei krankhaften Störungen in erster Linie Abweichungen unterliegt. Dagegen geht ein hoher Säuregrad meist mit hohem Reduktasegehalt Hand in Hand, eine gewisse Proportionalität beim Steigen ist zwischen beiden zu bemerken, während die Katalasezahl vom Säuregrad unabhängig ist. Der Reduktase- und Katalasegehalt ist in der Abendmilch meist höher als in der Morgenmilch, zuweilen sind sie gleich, niemals aber in der Morgenmilch höher. Beide Werte können auch an aufeinanderfolgenden Tagen sehr verschieden sein. Hohe Zahlen deuten zwar auf eine pathologische Beschaffenheit der Milch hin, lassen aber noch keinen sicheren Schluss auf Krankheiten (Euterentzündungen oder dgl.) bei den Tieren zu. Zur Beurteilung ist die Azidität neben der Katalase- und Reduktaseprobe heranzuziehen. Ist die Azidität normal bei hohem Katalase- und Reduktasegehalt, so kann altmelke, blutige, unsaubere, pathologische oder Kolostrummilch vorliegen.

Peroxydase. Über die Natur dieses Fermentes, welches als Sauerstoffüberträger wirkt und — im Gegensatz zur Katalase — Wasserstoffsuperoxyd unter Bildung von aktivem Sauerstoff spaltet, gehen die Ansichten der Forscher ebenfalls noch erheblich auseinander. Hesse

¹⁾ Milchw. Zentrbl. 43, 369 (1914).

und W. D. Kooper¹⁾ glauben aus ihren Untersuchungen schliessen zu können, dass man es bei der Peroxydase nicht mit einem Ferment zu tun habe, sondern dass es lediglich die alkalisch reagierenden Stoffe in der Milch sind, die z. B. auf das Rothenfussersche Reagens einwirken. Letzteres wird bereitet durch Lösen von 2 g Guajakol und 1 g p-Phenylendiaminchlorhydrat in 15 ccm Wasser und 135 ccm Alkohol; es liefert in frischer roher Milch mit Wasserstoffsuroxyd Violettfärbung. Dieselbe Reaktion wie mit Milch lässt sich nun auch erzielen, wenn man zu destilliertem Wasser etwas Reagens und Wasserstoffsuroxyd und darauf $\frac{1}{10}$ -Natronlauge oder eine andere Base zusetzt. Die entstandene Färbung verschwindet wieder auf Zusatz von Säure, bezw. es entsteht eine grüne Färbung, und bei Säureüberschuss scheidet sich ein Salz aus. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in der Rothenfusserschen Lösung durch Oxydation ein Stoff entsteht, welcher in alkalischer Lösung dissoziiert und violett gefärbt ist, durch Säure aber in den undissoziierten Zustand übergeführt wird. Somit stellt das Reagens einen Indikator mit ausgeprägten sauren Eigenschaften dar. Den Einwand, dass gekochte Milch die Reaktion nicht mehr gibt, glauben die Verf. dadurch entkräften zu können, dass der Alkalitätsgrad der Milch beim Kochen erniedrigt wird. Auch durch Zusatz von Quecksilberchlorid wird die Reaktion unterdrückt, es zeigte sich aber, dass auch in diesem Falle eine starke Erhöhung des Säuregrades, bezw. Abnahme des Alkalitätsgrades, eingetreten war. Welche Stoffe es sind, die der Milch die alkalische Reaktion erteilen, welche bei der Färbung der Rothenfusserschen Lösung in die Erscheinung tritt, ob es die Kaseinkalkverbindung oder die neutralen Phosphate oder andere Stoffe sind, lässt sich noch nicht sagen, wahrscheinlich sind mehrere derselben an der alkalischen Reaktion beteiligt.

In einer früheren Arbeit über die Oxydasen und Reduktasen der Milch gelangte W. D. Kooper²⁾ zu folgenden Hauptergebnissen: 1. Katalase: Sie geht beim Aufrahmen hauptsächlich in den Rahm über. Beim Älterwerden der Milch steigt der Katalasegehalt, um bei einem Säuregrad von 45—50° wieder abzunehmen. Sie wird durch Konservierungsmittel vernichtet oder geschwächt oder in der Vermehrung gehemmt. Gekochter Milch kann durch Impfen mit sehr wenig roher Milch katalytische Eigenschaft mitgeteilt werden. Die Katalase kann sich in gekochter Milch nach Impfung stark vermehren, sie rührt deshalb wahrscheinlich von Mikroorganismen her. 2. Reduktase: Sie geht beim Entrahmen ebenfalls in den Rahm über, zum Teil bleibt sie in der Magermilch, worin sie sich stärker vermehrt als im Rahm; das Substrat, auf welches sie wirkt, ist deshalb wohl grösstenteils in der Magermilch zu suchen. Ihre Wirksamkeit steigt bei der Säuerung der Milch anfangs an, nimmt bei einem Säuregrade von 35—40° ab, um später wieder

¹⁾ Ztschrift. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 21, 385 (1911). — ²⁾ Ztschrift. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 20, 564 (1910).

etwas zu steigen. Gegen Desinfektionsmittel verhält sie sich ähnlich wie Katalase. Sie vermehrt sich stark in mit roher Milch geimpfter gekochter Milch und ist daher wahrscheinlich bakteriellen Ursprungs. 3. Peroxydase (indirekte Oxydase). Sie geht beim Entrahmen ausschliesslich in die Magermilch über. Beim Älterwerden der Milch nimmt ihre Wirksamkeit nicht zu. Von einem Säuregrade von 40—50° an nimmt die Intensität der Färbung einer p-Phenylendiaminlösung fortwährend ab, um schliesslich ganz zu verschwinden. Die Oxydase wird durch Sublimatlösung in einer für Fermente tödlichen Verdünnung nicht vernichtet, scheinbar sogar nicht geschwächt. Sie vermehrt sich in gekochter Milch nach dem Impfen mit roher Milch nicht. Sie rührt daher nicht von Mikroorganismen, sondern wahrscheinlich vom Muttertier her, obwohl auch einfache chemische Vorgänge zur Erklärung der Oxydationsvorgänge ausreichen.

Grimmer¹⁾ ist im Gegensatz zu Hesse und Kooper der Ansicht, dass die oxydierende Wirkung roher Milch weder durch anorganische Katalysatoren irgendwelcher Art, noch durch alkalische Reaktion bedingt sein kann, er vermutet vielmehr, dass die Peroxydase, wenn auch nicht eine Funktion des Milchalbumins, so doch eines diesem sehr nahestehenden anderen, bisher unbekanntes Stoffes ist. Über die Herkunft des Enzyms lässt sich mit Sicherheit nichts sagen, aus dem Blut kann es nicht stammen. Denkbar ist nur, dass das in der Zelle erzeugte und bei ihrer Zerstörung aus ihr austretende Ferment entweder selbst ein dem Milchalbumin in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften ähnlicher Eiweisskörper ist, oder aber dass das Ferment sehr grosse Neigung hat, vom Milchalbumin adsorbiert zu werden. Sicher erscheint es dem Verf. jedenfalls, dass es nicht anorganischer Natur ist.

Wenn man 5 ccm gekochte Milch mit 5 Tropfen frisch bereiteter 2%iger p-Phenylendiaminlösung versetzt, so tritt auf Zusatz von Wasserstoffsperoxyd eine indogoblaue Färbung ein und zwar um so langsamer, je weniger Wasserstoffsperoxyd zugesetzt wurde. Ersetzt man die Milch durch Kasein, das aus der gekochten Milch ausgefällt worden ist, so treten dieselben Färbungen auf. E. Nicolas²⁾ erklärt diese Erscheinung dadurch, dass das p-Phenylendiamin durch Wasserstoffsperoxyd zu einem kristallinischen, granatroten Körper oxydiert wird, der sich mit dem Kasein der Milch unter Blaufärbung verbindet. Er glaubt daher, dass in der rohen Milch eine Peroxydase vorhanden ist und dass die Blaufärbung des Kaseins nicht auf einer Zersetzung des Wasserstoffsperoxyds durch das Kasein beruht.

Über die höchste Temperatur, welche die Peroxydase beim Erhitzen ertragen kann, bestehen grosse Widersprüche. Die Ursache dieser Erscheinung schreibt J. J. van Eck³⁾ zum Teil den gänzlich ver-

¹⁾ Milchw. Zentrbl. 7, 395 (1911). — ²⁾ Bull. Soc. Chim. France 9, 266 (1911). — ³⁾ Ztschrift. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 22, 393 (1911).

schiedenen Arbeitsmethoden der verschiedenen Forscher zu. Auch fehlen fast immer Angaben über die Anwärmungszeit und die Dauer der Erhitzung, sowie über den Säuregrad. Van Eck benutzte bei seinen Untersuchungen die Storchsche Reaktion (10 *ccm* Milch, 5 Tropfen frisch hergestellter 2%iger Lösung von Paraphenyldiaminchlorhydrat und 5 Tropfen 1%iger Wasserstoffsperoxydlösung). Mit Milchproben, welche auf verschiedene Temperaturen erhitzt worden sind, kann man alle Färbungen erhalten, welche zwischen denen von reiner, roher Milch und von $\frac{1}{2}$ Stde. auf 100° erhitzter Milch liegen. Die gleichen Färbungen lassen sich aber auch erzielen durch Mischung von roher mit sterilisierter Milch in wechselnden Verhältnissen. Auf diese Weise konnte eine Skala für die wechselnden Peroxydase-mengen hergestellt werden. Die Untersuchungen ergaben nun, dass die Abnahme des Peroxydasegehaltes beim Erhitzen in gleicher Weise wie bei anderen Enzymen beim Erhitzen ihrer wässrigen Lösung stattfindet und durch die Formel dargestellt werden kann: Aktive Peroxydase \pm H₂O = inaktive Peroxydase. Hiernach ist es verständlich, dass auch bei stärkerer Erhitzung der Milch noch Spuren von Peroxydase übrigbleiben, welche mit empfindlichen Reagenzien noch schwache Färbungen geben; auch erklären sich hierdurch leicht die verschiedenartigen Angaben der einzelnen Forscher. Bezüglich der Beständigkeit der Peroxydase gegen Erhitzen wird man also nur feststellen können, wie lange man die Milch auf einer bestimmten Temperatur halten muss, um mit einer Reaktion von bestimmter Empfindlichkeit kein wirksames Ferment mehr nachweisen zu können. Kurze Erhitzung auf höhere Temperatur kann ebenso wirken, wie längere Erhitzung auf niedrigere Temperatur.

Über die Verwendung der Peroxydasereaktionen zur Unterscheidung von roher und gekochter Milch liegen aus den letzten Jahren eine grössere Anzahl von Arbeiten vor, von welchen ich die folgenden anführe.

J. H. Kastle und M. B. Porch¹⁾ halten die Peroxydasereaktion nicht für ein sicheres Mittel zum Nachweise gekochter Milch, weil bei roher Milch die Reaktion in verschiedener Intensität auftritt. Das Nichteintreten der Färbung ist daher noch kein Beweis dafür, dass die Milch sterilisiert ist. Ein Zusatz von Phenol, Kresol und β -Naphthol erhöht die färbende Kraft der Milch beträchtlich. Beim Gebrauch dieser Peroxydasebeschleuniger können Phenolphthalein, Guajak und p-Phenyldiamin mit Vorteil als Peroxydasereagenzien benutzt werden, es ist so möglich, den Nachweis der Milcherhitzung sicher zu erbringen. Milch, die 1 Stde. auf 70° oder 20 Minuten auf 75° erhitzt worden ist, gibt keine Peroxydasereaktion mehr. Die Milch verschiedener Kühe einer Herde zeigt verschiedenes Verhalten bei der Reaktion. Frauenmilch gibt die Reaktion in viel geringerem Grade als Kuhmilch.

¹⁾Journ. of Biol. Chem. 4, 301 (1908).

B. Herholz¹⁾ hat bei seinen Untersuchungen zum Vergleiche die Guajakringprobe, das Storchsche Verfahren, auch in der Abänderung nach Schaffer, die Ursolprobe nach Utz in verschiedenen Ausführungsformen, die Reaktion mit Dimethyl-p-Phenylendiamin, die Reaktion nach Dupouy mit p-Phenylendiamin und Guajakol, die Jodkaliumstärkereaktion und das Scharding'sche Verfahren herangezogen. Das Guajakverfahren ist sehr brauchbar, doch muss die Tinktur vorher geprüft sein. Die Guajakholztinkturen geben gleichmäßige und sichere Befunde, bei den Harztinkturen treten hinsichtlich der Schärfe und Dauer der Reaktionsfähigkeit starke Unterschiede auf. Für die Holztinktur ist 70%iger Alkohol anzuwenden, sie ist nach 30—40 Tagen gebrauchsfähig. Auf 10 *ccm* Milch sind 10—12 Tropfen der Tinktur zu nehmen, die Beobachtungszeit ist auf $\frac{1}{2}$ Stde. auszudehnen. Die Prüfung wird am besten als Ring- oder Zonenreaktion angestellt, diese tritt nicht mehr ein, wenn die Milch 5 Minuten oder länger auf 75° oder höher erhitzt worden ist. Wurde die Milch bis nahe zur Grenze ihres Reaktionsvermögens pasteurisiert, so erscheint die Blaufärbung in längstens 3—5 Minuten. Selbst starke Säuerung verhindert die Reaktion nicht. Mischmilch mit 50% Rohmilchgehalt verhält sich wie Rohmilch, 40—30% roher in genügend erhitzter Milch sind in 3 Minuten, 25—20% Rohmilch in der Mischung in 5 Minuten nachzuweisen. Unter Umständen sind noch geringere Zusätze nachweisbar, indessen ist eine Verschärfung der Reaktion durch Zusatz von H₂O₂ nicht zu erzielen. Entsteht bei der Guajakringprobe, die sich wegen ihrer Einfachheit zur Vorprüfung besonders empfiehlt, in 5 Minuten keine Blaufärbung, so sind andere zuverlässige Verfahren, nämlich die Reaktionen mit p-Phenylendiamin, Ursol und Guajakol heranzuziehen. Mit der Guajakolreaktion sind noch 5%, mit p-Phenylendiamin und Ursol noch 2% roher in gekochter Milch in 5 Minuten sicher zu erkennen. Die Guajakringprobe ist besonders dort wertvoll, wo beim Ausbruch von Seuchen ungeschultes Personal die Überwachung auszuführen hat. Die Begrenzung ihrer Leistungsfähigkeit liegt auch in der Tatsache, dass erst das Erhitzen auf 85° zur Abtötung aller Keime genügt, während bereits die Erhitzung auf 75° die Reaktion aufhebt.

An Stelle der wenig haltbaren Lösung von p-Phenylendiamin empfiehlt W. C. de Graaff²⁾ zur Ausföhrung der Peroxydasereaktion eine 10%ige alkoholische Lösung von Brenzkatechin. Die Reaktion wird in derselben Weise angestellt wie die Storch'sche, sie besitzt auch dieselbe Empfindlichkeit wie diese, jedoch ist die Färbung nicht blau, sondern violettbraun.

Th. Sames³⁾ ist der Ansicht, dass zur Unterscheidung von roher und erhitzter Milch stets mehrere Reaktionen herangezogen werden sollten. Die Guajakreaktionen ohne und mit Zusatz von H₂O₂ sind die brauchbarsten. Die Benzidinreaktion ist scharf, sie wird aber durch

¹⁾ Dissertation, Königsberg 1908, und *Milchw. Zentrbl.* 4, 445 (1908).

²⁾ *Pharm. Weekbl.* 47, 35 (1910). — ³⁾ *Milchw. Zentrbl.* 6, 462 (1910).

Formaldehyd beeinflusst. Die Formalin-Methylenblaureaktion ist allein nicht brauchbar, da ihr negativer Ausfall nicht auf Erhitzung schliessen lässt und der positive Ausfall nicht stets Rohmilch anzeigt.

Gegenüber einer Angabe von Hesse und Kooper¹⁾ weist S. Rothenfusser²⁾ darauf hin, dass sein p-Phenylendiamin-Guajakolreagens nicht aus der freien Base, sondern aus dem Chlorhydrat herzustellen ist. Das Reagens ist jahrelang unverändert haltbar. Zur Steigerung der Empfindlichkeit der Reaktion ist das Bleiserum der Milch zu verwenden.

K. Schern und W. Schellhase³⁾ bestätigen, dass der Zusatz von Guajak die Guajaktinktur empfindlicher macht, und dass sowohl eine Beschleunigung wie auch eine Verstärkung der Reaktion eintritt. Ferner fanden sie, dass die Guajaktinktureaktion sehr erheblich durch den Zusatz von Wasserstoffsperoxyd zur Milch, besonders nach längerer Einwirkung desselben, beeinträchtigt wird, während dies bei der Guajakreaktion nicht der Fall ist. Dagegen wird durch den Zusatz von 0,5—5 *cem* einer 3%igen Wasserstoffsperoxydlösung zur Guajak-Guajakollösung die Reaktion sehr deutlich hervorgerufen. Das Reagens erwies sich bei 8 Wochen langer Aufbewahrung als unverändert haltbar.

Für den Ausfall der Guajak- und p-Phenylendiaminreaktion ist nicht nur die bei der Erhitzung der Milch erreichte Höchsttemperatur, sondern namentlich auch die Zeit der Erwärmung maßgebend. Zur Prüfung dieser Einflüsse erhitze J. Drost⁴⁾ die Milch im Reagensglase unter Umrühren mit dem Thermometer im Wasserbade und kühlte nachher sofort stark ab. Milch, welche innerhalb 1 Minute von Zimmerwärme auf 85° erhitzt war, oder deren Temperatur in 15—26 Sekunden von 70 auf 85°, ja sogar in 28—30 Sekunden von gewöhnlicher Temperatur auf 81° gebracht war, gab beide Reaktionen nicht mehr. Dagegen trat Bläuung noch ein bei Proben, welche in 23—28 Sekunden auf 78,5° erhitzt waren, teilweise noch bei Erhitzung während derselben Zeit auf 79°. Verf. nimmt an, dass die Erhitzung in Pasteurisierapparaten mindestens ebenso stark, wenn nicht noch kräftiger wirkt, als bei den Laboratoriumsversuchen.

S. S. Silva⁵⁾ bestimmte den Inaktivierungskoeffizienten der Milchperoxydase durch Hitze und fand denselben für 1° C = 2,23, also von derselben Grösßenordnung wie die Temperaturkoeffizienten der Hitzeinaktivierung von Tetanolydin oder Vibriolydin oder der Eialbumin-koagulierung. Unterhalb 70° ist der Grad der Hitzeinaktivierung der Peroxydase so gering, dass er sich zum Nachweis der Pasteurisierung mit Hilfe der Storchschen Reaktion nicht eignet. Jedoch kann die Reaktion benutzt werden zur Feststellung einer Überhitzung pasteurisi-

¹⁾ Milchw. Zentrbl. 6, 412 (1910). — ²⁾ Milchw. Zentrbl. 6, 468 (1910). — ³⁾ Berl. tierärztl. Wochenschr. 28, 221 (1912). — ⁴⁾ Ztschrft. f. Fleisch- u. Milchhyg. 23, 250 (1913). — ⁵⁾ Biochem. Journ. 8, 656 (1914).

sierter Milch. Kleine Mengen Säure wirken verzögernd, kleine Mengen Alkalien beschleunigend auf die Hitzeinaktivierung der Milchperoxydase. Salze wirken ausgesprochen verzögernd, aber unabhängig von der Ionenvalenz.

An Stelle der Wasserstoffsuperoxydlösung benutzt W. Grimmer¹⁾: Äthylhydroperoxyd (herzustellen nach A. v. Baeyer und Villiger²⁾ oder zu beziehen von Paul Funke, Berlin). Einige *ccm* Milch werden mit 2 Tropfen Guajakollösung (1 g Guajakol in 10 *ccm* Alkohol gelöst, auf 100 *ccm* mit Wasser verdünnt) und 1—2 Tropfen einer 0,1%igen Lösung von Äthylhydroperoxyd versetzt. Gekochte Milch bleibt farblos, rohe wird stark ziegelrot.

A. Hildebrandt³⁾ prüfte folgende Reagenzien: Guajaktinkturen verschiedener Herkunft, Guajakharzlösungen in Azeton und Alkohol, Guajakharz-Guajakollösungen nach Schern und Schellhase (vergl. oben), p-Phenylendiamin in Lösung und Substanz, das Rothenfussersche Reagens, Benzidin. Bei der Prüfung 5 verschiedener Guajakharzsorten auf ihre Brauchbarkeit wurde als zweckmäßigstes Verfahren folgendes gefunden: ein etwa hanfsamengrosses Häufchen des Harzpulvers wird in 20 Tropfen einer 10%igen Guajakol-Azetonlösung durch gelindes Sieden gelöst, etwa 10 *ccm* frische Rohmilch zugesetzt und durchgeschüttelt. Tritt nicht sofort Blaufärbung ein, so setzt man nach 15—30 Sekunden 1 Tropfen einer höchstens 0,3%igen H_2O_2 -Lösung zu und mischt; jetzt muss sofort Blaufärbung eintreten, sonst ist das Harz zu verwerfen. Beim Versagen der Reaktion ohne H_2O_2 -Zusatz spielt der Luftsauerstoff eine Rolle. Die Guajakharzlösung in Azeton gibt bei positiver Reaktion reinere und leuchtendere Farbtöne als die in Alkohol, sie ist daher vorzuziehen. Das bei der Storchschen Reaktion verwendete p-Phenylendiamin erwies sich noch in einem 12 Jahre alten Präparat als brauchbar. Zur Bereitung und Aufbewahrung der gegen Sauerstoff empfindlichen Lösungen dient ein besonderer kleiner Apparat, der die Entnahme unter völliger Vermeidung des Luftzutrittes gestattet. Er besteht aus einem aus braunem Glase hergestellten oder mit Rotlack »Bayer« überzogenen Schütteltrichter mit ausgezogenem Abflussrohr und Zweiweghahn, welcher das Reagens aufnimmt und mit einer mit Pyrogallussäurelösung beschickten Waschflasche verbunden ist; nach der Beschickung wird die zurückgebliebene Luft durch Kohlensäure verdrängt. Die Rothenfussersche Reaktion hat Verf. abgeändert, wie folgt: In ein Reagensglas gibt man einige Kriställchen p-Phenylendiaminchlorhydrat und 20 Tropfen 10%iger Guajakolazetonlösung, erwärmt zum gelinden Sieden, lässt 10 *ccm* Milch zufließen und schüttelt um. Nach Zugabe von 2 Tropfen 0,3%iger H_2O_2 -Lösung tritt bei Anwesenheit von Peroxydase sofort Violett färbung ein. Die Guajakolazetonlösung ist im Gegensatz zum fertigen Rothenfusser-Reagens unbegrenzt haltbar. Auch die Guajakharzreaktion kann in der gleichen Weise ausgeführt werden, wie oben bei der Prüfung

¹⁾ Milchw. Zentrbl. 44, 246 (1915). — ²⁾ Ber. Deutsch. Chem. Ges. 34, 738 (1901). — ³⁾ Landw. Jahrb. 50, 177 (1916); Milchw. Zentrbl. 46, 33 (1917).

des Harzes angegeben. Diese Reaktion zeigt noch 5% Rohmilch an, wenn sie als Ringprobe ausgeführt wird. Das kombinierte Guajakharz-Guajakolreagens nach Schern und Schellhase hält Verf. für das beste, namentlich in der Hand des Nichtchemikers. Bei Besprechung der Eigenschaften und Prüfung der H_2O_2 -Lösungen empfiehlt Verf. bei Ausführung der Peroxydasereaktionen Milch und Reagens zu mischen, dann zunächst einen und nach einigen Sekunden, wenn es nötig ist, den zweiten Tropfen H_2O_2 zuzusetzen. Bei Ausführung einer Ringprobe lässt man das H_2O_2 vorsichtig auf die Oberfläche der Milch-Reagensmischung laufen. Bei der Herstellung von Bleiserum werden 100 *ccm* Milch mit 6 *ccm* Bleiessig versetzt und die Mischung auf 40° erwärmt. Verf. empfiehlt weiter, bei der Prüfung eine Vergleichsprobe anzustellen mit etwa 10 *ccm* der zu untersuchenden Milch, welche auf 85° erhitzt und dann abgekühlt wurde. In Tabellen sind dann die Ergebnisse von Prüfungen verschiedener Reagenzien mit derselben Milchprobe oder dem Serum einer solchen wiedergegeben, wobei berücksichtigt sind: 10%ige und 5%ige Guajakharz-Azetonlösung, Phenylendiamin in 2%iger Lösung und in Substanz, Rothenfussers Reagens, 4%ige Benzidinlösung, ein 12 Jahre altes p-Phenylendiamin und das Reagens nach Schern und Schellhase. Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, dass vor allem das Rothenfussersche und das Schern-Schellhasesche Reagens zu empfehlen sind. Der Wirkungswert von Guajak-tinkturen kann durch geringen Guajakolzusatz erheblich gesteigert werden. Die Empfindlichkeit des Rothenfusserschen Reagens lässt sich durch Abstumpfung des Säuregrades der Milch mit $\frac{1}{4}$ N.-Natronlauge bis auf etwa 0,6° Soxhlet-Henkel erhöhen, so dass noch 1% Rohmilch nachgewiesen werden kann; zu berücksichtigen ist hierbei die Lichtempfindlichkeit des Reagens bei nur schwach und langsam eintretenden Reaktionen. Die Bleisera von auf 85° erhitzten Milchproben gaben mit Guajakharz-Azetonlösungen Blaufärbungen, es ist daher bei Anwendung dieser Reagenzien von der Verwendung der Bleisera abzusehen. Eine positive Reaktion mit dem Rothenfusserschen und dem Schern-Schellhaseschen Reagens ruft auch Schrotmehl in 0,5%iger Aufschlemmung hervor, nicht dagegen Tapiokamehl und Talkum. Ferner wurden verschiedene Konservierungsmittel geprüft. H_2O_2 kann je nach der zugegebenen Menge und Einwirkungszeit unrichtige Reaktionen veranlassen, auch Formaldehyd und Soda können zu Täuschungen Anlass geben. Natriumbikarbonat beeinflusst die Reaktion ebenfalls, jedoch weniger als Soda. Kaliumbichromat macht die Milch für die Prüfung gänzlich unbrauchbar, nur das Bleiserum ist mit Vorsicht verwendbar. Salizylsäure, Benzoesäure, Borsäure und Borax sind unschädlich. Geprüft wurde auch das Verhalten der mit Metallen (Kupfer, Zink, Eisen, Zinn in Gestalt von Weissblech und Aluminium) in Blechform in Berührung gewesenen Milch. Gegen Metalleinflüsse erwies sich Rothenfussers Reagens am empfindlichsten, Kupfer übte den stärksten Einfluss aus, aber auch Eisen und schadhaftes Weissblech wirkten

störend, namentlich bei höherem Säuregrad der Milch. Aluminium und Zink wirkten nicht ein. Kupferlaktat erzeugte mit Rothenfusserschem Reagens in gekochter Milch noch bei einem Gehalt von 0,005% ohne und bei 0,0025% mit H_2O_2 eine positive Reaktion, während das Reagens nach Schern und Scheilhase bedeutend weniger empfindlich war. Diese Tatsachen verleihen der Peroxydasereaktion eine erhebliche Unsicherheit. Andererseits wurde ihre Brauchbarkeit an Milchprodukten: Magermilch, Rahm, Molkereibutter, Haushaltsbutter, Buttermilch, süsse und saure Molken festgestellt. Bei Proben von Einzelmilch fielen die Prüfungen der Rohmilch mehrfach zweifelhaft aus.

Veranlasst durch die in einem Strafverfahren erhobene Frage, ob vorschriftsmäßig abgekochte, mit Kaliumbichromat konservierte Milch bei der Prüfung mit Guajaktinktur (allein ohne Anwendung eines Sauerstoffüberträgers, wie Wasserstoffsuperoxyd) einen nicht abgekochten Zustand vortäuschen könne, stellte B. Kühn¹⁾ Versuche über den Einfluss von Konservierungsmitteln auf die Guajakreaktion roher und gekochter Milch an. Er stellte fest, dass abgekochte Milch, die gegen reaktionsfähige Guajaktinktur sich negativ verhält, mit der Tinktur wieder Blaufärbung hervorruft, wenn 0,1% Bichromat zugesetzt wird. Die Erklärung hierfür liegt darin, dass Kaliumbichromat in seinem Molekül sehr viel disponiblen Sauerstoff aufgespeichert enthält, der in naszierender Form leicht abgegeben werden kann, und dass er deshalb imstande ist, die katalytische Sauerstoffübertragung der Enzyme der rohen Milch, welche die Guajakreaktion verursacht, zu übernehmen. Man erhält die Reaktion demnach auch, wenn man Bichromatlösung zu mit Wasser versetzter Guajaktinktur zufügt. Die Untersuchung wurde weiter ausgedehnt auf die sonst zur Konservierung von Milch benutzten Stoffe, ferner wurde geprüft, ob ein Konservierungsmittel umgekehrt der rohen Milch bei der Prüfung mit Guajaktinktur den Anschein einer abgekochten verleihen könne. Es ergab sich in der Tat, dass Wasserstoffsuperoxyd bei Zusatz von 1—3% einer 3%igen Lösung zur Milch die Reaktion zu unterdrücken, also abgekochte Milch vorzutäuschen vermag, besonders dann, wenn die Milch einige Zeit (12—24 Stdn.) mit Wasserstoffsuperoxyd gestanden hat. Bei grösseren Mengen Wasserstoffsuperoxyd (5 ccm und mehr der 3%igen Lösung auf 100 ccm Milch) wird die Reaktion in der Regel sofort unterdrückt. Die weitere Prüfung erstreckte sich auf: Natriumbikarbonat, Borax, Borsäure, Salizylsäure, Formalin, Kaliumbichromat. Im einzelnen ergab sich, dass die 4 ersten Konservierungsmittel weder die Reaktion der rohen Milch stören, noch sie in abgekochter Milch hervorgerufen können. Formalin kann die Reaktion in roher Milch erst bei Zusatz erheblicher Mengen (20 ccm 40%iges Formalin auf 1 l Milch) abschwächen und zwar meist nur dann, wenn die Milch längere Zeit der Einwirkung des Formalins ausgesetzt gewesen ist. Kleinere Mengen sind ohne Einfluss. Abgekochte Milch wird durch Formalin nicht

¹⁾ Ztschrft. f. Fleisch- u. Milchhyg. 22, 115 (1912).

wieder reaktionsfähig gemacht. Rohe Milch, welche durch Formalin inaktiviert ist, wird durch geringe Mengen H_2O_2 ($1/10$ Tropfen 3%iger Lösung auf 5 cm Milch) reaktiviert, dagegen wird durch H_2O_2 inaktivierte Milch nicht durch Formalin reaktiviert. Kaliumbichromat täuscht in abgekochter Milch rohe Milch vor; auf die Reaktion roher Milch wirkt es verstärkend. H_2O_2 kann in roher Milch abgekochte, aber nicht in abgekochter Milch rohe vortäuschen. Die Guajakreaktion ist, abgesehen von den bei Konservierung mit Bichromat und H_2O_2 zu machenden Einschränkungen, bei Anwendung aktiver, vorher geprüfter Tinktur für die Unterscheidung roher und gekochter Milch als zuverlässig zu bezeichnen, ihr Ersatz durch andere Reaktionen (mit p-Phenylendiamin und H_2O_2 ; p-Phenylendiamin und Guajakol, Reaktion nach Schar dinger) ist nicht zu empfehlen. Zu der Arbeit von Schern und Schellhase (vergl. oben), welche zur Verstärkung der Reaktion einen Zusatz geringer Mengen H_2O_2 zur Guajaktinktur, sowie die Anwendung eines Gemisches von Guajaktinktur und Guajakol empfehlen, bemerkt Verf., dass vor allgemeiner Einführung des Reagenses zunächst durch ausgedehnte Untersuchungen nachgewiesen werden müsste, dass das Reagens nicht wie die von Storch und Rothenfusser imstande ist, gekochte Milch nach mehrtägiger Aufbewahrung wieder als ungekocht erscheinen zu lassen. Auch dürfte das H_2O_2 sich in der Tinktur nicht lange unzersetzt halten.

Auch B. Grewing¹⁾ nimmt zu der Frage nach dem Einfluss von Konservierungsmitteln auf die Peroxydasereaktionen Stellung. Bekanntlich bildet Formaldehyd mit Benzidin und mit Guajaktinktur einen blauen Farbstoff, er kann also in gekochter Milch rohe vortäuschen. Die Frage, ob die sonstigen gebräuchlichen Konservierungsmittel einen Einfluss auf den Peroxydasenachweis mittels der meistangewandten Reagenzien ausüben, hat daher praktische Bedeutung. Geprüft wurden: die Guajakprobe, die Storchsche p-Phenylendiaminlösung, die Reaktion nach Wilkinson und Peters mit alkoholischer Benzidinlösung, die Reaktion nach Weber mit Kreosot, die Dupouy-Utzsche Reaktion (Guajakol-lösung) und die Rothenfusserschen Serumreaktionen mit p-Phenylendiamin und Benzidin. Die Reaktionszeit wurde auf 20 Minuten beschränkt. Die angewandten Konservierungsmittel waren: 1% Borsäure, 1% Borax, 0,2% Salizylsäure, 0,2% Benzoesäure, 1% doppeltkohlensaures Natrium, 0,01% Sublimat, 0,01% Formalin, 0,1% Kaliumbichromat, 2% Wasserstoffsuperoxyd, 2% alkoholische Phenollösung nach Denigès. Bei ungekochter Milch ergab sich ein vollständiges Versagen der Guajakreaktion bei Gegenwart von H_2O_2 , eine Beeinträchtigung bei Borax, Formalin und Bichromat. Die Storchsche Reaktion fiel durchweg positiv aus, das Webersche Reagens reagierte abgeschwächt bei Salizylsäure-, Benzoesäure-, Sublimat-, Formalin-, H_2O_2 -Zusatz, ähnlich verhielt sich das Dupouy-Utzsche Reagens. Positiv reagierten das Wilkinson-

¹⁾ Ztschrft. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 28, 380 (1914).

Peterssche Reagens und die Rothenfusserschen Proben. Bei gekochter Milch war bei Bichromatzusatz nur die Rothenfussersche Reaktion unbeeinflusst, weil hier das Bichromat durch den Bleiessig ausgefällt wird; Formalin gab mit den Reagenzien nach Storch, Wilkinson-Peters und Rothenfusser Färbungen; Salizyl- und Benzoesäure, sowie Sublimat reagierten nur mit Rothenfussers p-Phenylendiaminreagens. Aus den Versuchen ergibt sich, dass bei der Untersuchung konservierter Milch eine einzelne Reaktion nicht genügt, sondern durch Anwendung der verschiedenen Reagenzien kontrolliert werden muss. Besondere Beachtung verdienen die Guajakreaktion, das Dupouy-Utzsche Reagens und die Rothenfusserschen Reaktionen. Die Farbentöne und die Tiefe der Färbungen sind zu beachten, als Beobachtungszeit genügen 15—20 Minuten. Zur Konservierung von Milchproben empfiehlt sich vor allem die alkoholische Phenollösung nach Denigès, da sie keine Störung verursacht. Bei der Prüfung soll der Milch zuerst das H_2O_2 , dann das Reagens zugesetzt werden.

H. Violle¹⁾ kann den Peroxydasereaktionen keine entscheidende Bedeutung für die Beurteilung der Beschaffenheit der Milch zuerkennen. Gesunde Milch kann sehr geringen Gehalt an Peroxydase zeigen, solche aus kranken Brustdrüsen sehr reichlichen. Richtig ist, dass bei natürlicher Milch das Auftreten der Reaktion beweist, dass die Milch nicht erhitzt wurde. Aber man kann nach dem Erhitzen durch Zusatz von frischen Geweben oder Flüssigkeiten pflanzlichen oder tierischen Ursprungs die Reaktion wieder hervorrufen.

Von sonstigen Verfahren zur Unterscheidung von roher und gekochter Milch, welche nicht auf Enzymreaktionen beruhen, haben F. Reiss und G. Diesselhorst²⁾ die Methode von M. Rubner (Aussalzen mit Kochsalz bei 30—40° und Kochen des Filtrats) geprüft, sie gelangen aber zu dem Ergebnis, dass das Verfahren unbrauchbar ist, da auch gekochte Milch hierbei einen Niederschlag abscheidet. Durch Zusatz von Chlorkalzium oder Chlormagnesium zum Kochsalz kann die Bildung des Niederschlages nicht verhindert werden, auch die Kochsalzmenge ist, wenn ein Überschuss vorhanden ist, ohne Einfluss. Die Untersuchung des Niederschlages ergab, dass derselbe bei gekochter Milch neben Kalziumphosphat aus Laktoproteinen besteht. Die Bildung des Niederschlages lässt sich vermeiden, wenn das Serum vor dem Kochen mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt wird. Das Erhitzen des Serums wird zweckmäßig im Wasserbade vorgenommen, weil über freier Flamme die Flüssigkeit leicht schäumt, wobei die Ausscheidungen in den Schaum gehen und dadurch, wenn sie gering sind, leicht der Beobachtung entzogen werden. In dieser Ausführungsform ist das Rubnersche Verfahren geeignet, noch geringe Zusätze von Rohmilch (in einem Fall noch 1—3 %) nachzuweisen.

¹⁾ Compt. rend. **169**, 248 (1919). — ²⁾ Ztschrft. f. Fleisch- u. Milchhyg. **25**, 177 u. 197 (1915).

L. Gaucher¹⁾ verwendet zu dem angegebenen Zweck Hämateinlösung. 20 *ccm* Milch werden mit 20 Tropfen einer Lösung von 0,2 g Hämatein in 20 *ccm* Wasser versetzt; gekochte Milch entfärbt sich in einigen Sekunden, rohe Milch bleibt rosa gefärbt. Die Stärke der Färbung hängt ab von der Stärke der Erhitzung. Bei in geschlossenen Gefässen auf 100° oder 110° erhitzter Milch bleibt jedoch die Färbung in geringer Abschwächung $\frac{1}{2}$ Stde. bestehen, um dann eine Milchkaffee ähnliche Farbe anzunehmen. Es muss stets eine frisch bereitete Lösung verwendet werden. Die Ursache der Hämateinwirkung ist nicht bekannt.

W. Morres²⁾ führt den Nachweis gekochter Milch mit Hilfe des Mikroskops. Die Grundlage für diesen Nachweis bildet die Tatsache, dass sich beim Erstarren geschmolzener Fette aus feinen Nadelchen bestehende Kristalldrüsen bilden. Beim Kochen der Milch laufen die Fettkügelchen zu grösseren Tröpfchen zusammen, deren Durchmesser das 2—5 fache desjenigen der gewöhnlichen Fettkügelchen beträgt. Beim Abkühlen der gekochten Milch scheiden sich dann die Kristallstrahlen oder -drüsen in den Fetttropfen aus und können bei 300 facher Vergrösserung nachgewiesen werden. Die Kristallformen sind nicht in allen grösseren Fetttropfen nachzuweisen, aber schon das Auftreten der letzteren lässt auf Kochen der Milch schliessen. Geschieht die Abkühlung der Milch nach dem Kochen rasch und auf tiefe Temperatur (12°), so entsteht ein Gewirr von verzweigten Kristallen. Bei noch stärkerer Abkühlung auf etwa 8—10° entstehen aus den runden Fettkugeln eckige Körner. Will man feststellen, ob die Milch rasch oder langsam abgekühlt wurde, so empfiehlt es sich, einen Tropfen von der Oberfläche der Probe mit 1 oder 2 Tropfen Wasser oder Glycerin zu verdünnen und auf dem Objektträger auszubreiten und antrocknen zu lassen. Man sieht dann besser, ob die Fettgebilde rund oder eckig sind.

Diastase, Laktase und Laktoproteolase. Ausser den oben besprochenen Enzymen sind von einigen Forschern noch mehrere andere in den Kreis der Betrachtung gezogen worden, welche aber nur geringe Bedeutung besitzen. Von ihnen nenne ich zunächst die Diastase. Zu ihrer Bestimmung verwendet C. J. Koning 1% ige Stärkelösung und verfährt dabei in ähnlicher Weise, wie sie z. B. bei der Honigprüfung gebräuchlich ist, indem er die Menge der von 10 *ccm* Milch in $\frac{1}{2}$ Stde. verzuckerten Stärkelösung mittels der Jodreaktion ermittelt. Dieses Verfahren bezeichnet aber J. van Haarst³⁾ als unbrauchbar, da destilliertes Wasser sich genau so wie Milch verhalte. C. J. Koning⁴⁾ verteidigt demgegenüber das Verfahren und führt zum Beweise seiner Brauchbarkeit an, dass man in 10 *ccm* pasteurisierter Milch einen halben Tropfen der Stärkelösung nach 30 Minuten ohne Schwierigkeit nachweisen könne.

1) Ann. Chim. anal. appl. 13, 146 (1908). — 2) Milchw. Zentrbl. 5, 416 u. 502 (1909). — 3) Chem. Weekbl. 7, 354 (1910). — 4) Chem. Weekbl. 7, 377 (1910).

Eine Laktase hat A. J. J. Vandevelde¹⁾ nachgewiesen. Die Laktose erleidet in der rohen Milch nicht nur durch Bakterien, sondern auch anderweitig Veränderungen, wobei weder Gase, noch Alkohol, noch Säuren entstehen. Ebensowenig treten dabei die gewöhnlichen Inversionsprodukte der Laktose, d-Glykose und d-Galaktose auf, dagegen bilden sich Zuckerarten, deren Reduktionsvermögen von dem der Laktose nicht sehr abweicht. In gekochter Milch treten diese Umsetzungen nicht ein, es handelt sich hier demnach um ein Ferment. Die Wirkung dieses Enzyms beschränkt sich also nicht auf blosse Inversion der Laktose, sondern es entstehen bei seiner Tätigkeit andere Zuckerarten, deren Natur bisher nicht festzustellen war.

Auch ein die Eiweisstoffe der Milch angreifendes Enzym, eine Laktoproteolase glaubt A. J. J. Vandevelde²⁾ nachgewiesen zu haben, wobei er beobachtete, dass weder das Alter der Kuh, noch die Laktationsperiode oder die Menge der täglich ermolkenen Milch von Einfluss auf die Proteolyse der Milch sind. Nur die gleich nach dem Kalben gewonnene Milch ist arm an Proteolase. Die Gesamtmenge der durch Essigsäure, Erhitzen und Alkoholzusatz fällbaren Eiweisstoffe geht in 20 Tagen um etwa 30–50 % zurück, auch bei sehr langer Einwirkungszeit wurden nicht mehr als 70 % der Eiweisstoffe verdaut. Blutfibrin wird von der Proteolase in ähnlicher Weise gelöst wie die Laktoproteide. Pankreatin greift die Eiweisstoffe der gekochten Milch stärker an als die der rohen, Pepsin verhält sich umgekehrt. Von sonstigen Fermenten konnte Verf. Lipase nicht nachweisen, dagegen scheint in geringer Menge ein Enzym vorhanden zu sein, das Salol in Phenol und Salizylsäure spaltet und durch Kochen vernichtet wird. Auch ein koagulierendes Enzym oder Chymosin ist vorhanden. Zum Studium der enzymatischen Reaktionen ist die Abtötung der Bakterien erforderlich. Hierfür hält der Verf. die bisher gebräuchlichen Antiseptika, wie Toluol, Xylol, Chloroform etc., nicht für geeignet. Er empfiehlt für diesen Zweck Wasserstoffsperoxyd oder eine 3%ige Lösung von Jodoform in Azeton, wovon 3,3 ccm auf 25 ccm Milch verwendet werden.

H. Kufferath³⁾ hat sich eingehend mit der gesamten bakteriologischen und hygienischen Kontrolle der Milch beschäftigt und ein genaues System für die Bewertung der Marktmilch ausgearbeitet. Neben den wichtigsten Enzymreaktionen (Katalase, Reduktase) zieht er die Keimzählung auf Agar und Gelatine, die Leukozytenzahl, die Gärung, die Untersuchung auf schädliche Keime (Tuberkelbazillen, B. coli, Streptokokken) direkt und im Zentrifugenabsatz heran. Den Ausfall aller dieser Prüfungen bringt er in Punktzahlen zum Ausdruck und trägt die Ergebnisse in ein besonderes Formular ein.

¹⁾ Rev. Gén. du Lait 7, 80 u. 102 (1908); ferner Bull. Acad. Roy. Belg., Classe des Sciences 1908, 563. — ²⁾ Mémoires publiés par la classe des sciences de l'Acad. Roy. de Belg. 1907 [2], 85 S. — ³⁾ Ann. Inst. Pasteur 33, 462 (1919).

Da es von Wichtigkeit ist, auch diejenigen Stoffe, welche zu einer Quelle äusserlicher Verunreinigung der Milch werden können, wie Futtermittel, Kot usw., hinsichtlich ihrer bakteriologischen Beschaffenheit näher kennen zu lernen, hat A. Rosam¹⁾ ein einfaches Verfahren zur Beurteilung des Gärungsvermögens solcher Stoffe angegeben. Die Bestimmung erfolgt in Probegläsern, welche mit Kautschukstopfen und Steigrohr verschlossen sind; letzteres soll 5 cm in das Probeglas hineinreichen und 30—50 cm über den Stopfen hervorragen. Eine bestimmte Menge des Futters oder dgl. wird in das Glas gebracht, mit Wasser übergossen und der Stopfen aufgesetzt, so dass keine Luftblase eingeschlossen bleibt. Das Glas bleibt bei 35—40° im Thermostaten oder im Wasserbade (bedeckt mit Tuch- oder Filzlappen) stehen, nach 20—30 Minuten wird der Stand der Flüssigkeit im Rohr gekennzeichnet, nach einigen Stunden die durch Gärung bewirkte Zunahme festgestellt. Mit 100 % wird eine Gärung bezeichnet, bei welcher die Flüssigkeit in 3 Stdn. um 30 cm ansteigt. Von Futtermitteln, Milch oder Fäkalien verwendet man auf 50 ccm Inhalt des Glases 1—5 g. Um die Gärwirkung von anderen Stoffen auf Milch zu bestimmen, wird beim Auffüllen das Wasser durch sterilisierte Milch ersetzt, um sie in Milch selbst festzustellen, wird das Glas nur mit der Milch gefüllt. Für das Gärvermögen wurden folgende Werte gefunden: Futterrüben 43—60 %, frische Futterschnitzel 30—50 %, gesäuerte Futterschnitzel 10—18 %, getrocknete Schnitzel 25—40 %, frisches, unreines Krautblatt 40—60 %, Kleie 50—70 %, Heu 30—45 %, frische Treber 0,5—5 %, unreines Streustroh 65 %, Fäkalien 50—70 %, Milch 4—20 %. Fäkalien sind besonders gärkräftig bei Durchfall der Tiere, im übrigen wird ihr Gärungsvermögen durch die Beschaffenheit und Menge der Futtermittel, den Gesundheitszustand der Tiere und die Jahreszeit beeinflusst. Die Gärfähigkeit der Milch sinkt bei peinlicher Sauberkeit des Euters und steigt bei Unreinheit der Streu. Bei der Steigerung der Temperatur auf 55—60° liess das Gärvermögen bedeutend nach. Die Versuchsanordnung kann auch zur Katalasebestimmung dienen, indem zu 150 ccm Milch 50 ccm 1 % iges Wasserstoffsperoxyd zugesetzt werden und bei 25° beobachtet wird.

A. Scholl.

4. Auf Pharmazie bezügliche Methoden.

Zur Prüfung von Kresolseifenlösung (Liquor Cresoli saponatus)²⁾.

Seit dem Erscheinen des Deutschen Arzneibuches V. ist die Kresolseifenlösung häufig Gegenstand von Untersuchungen gewesen, die zu einer Bemängelung der gegenwärtigen Fassung dieses Artikels führten. Nach F. Raschig³⁾ ist die Prüfung des D. A. B. V. auf höher siedende Kohlenwasserstoffe und Harzseife, nach welcher 6 ccm Natriumchloridlösung (1:100) durch 3 Tropfen Kresolseifenlösung höchstens leicht opaleszierend getrübt werden dürfen, unerfüllbar; denn durch diese

¹⁾ Milchw. Zentrbl. 42, 193 (1913). — ²⁾ Siehe diese Ztschrft. 50, 586 (1911); 53, 320 (1914); 55, 367 (1916). — ³⁾ Pharm. Ztg. 56, 180 (1911).