

# Zeitschrift

für

## Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, sowie der Gebrauchsgegenstände.

---

Heft 1.

1. Januar 1912.

Band 23.

---

### Sind Alkalität und „Peroxydase“ der Milch identische Begriffe?

Von

W. D. Kooper.

Mitteilung aus dem chemischen Laboratorium der Milchwirtschaftlichen  
Zentralstelle zu Güstrow.

[Eingegangen am 21. November 1911.]

Die vor kurzem von van Eck in dieser Zeitschrift<sup>1)</sup> ausgesprochene Vermutung, „daß wir es bei der Peroxydase nicht mit einem Ferment zu tun haben, sondern daß es lediglich die alkalisch reagierenden Stoffe in der Milch sind, die mit dem Rothenfußerschen Reagens die bekannte Farbenerscheinung hervorrufen“, wurde vor kurzem von Grimmer<sup>2)</sup> einer Kritik unterzogen. Grimmer kommt auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schlusse, „daß die oxydierende Wirkung der rohen Milch weder durch anorganische Katalysatoren irgend welcher Art, noch durch alkalische Reaktion bedingt werden kann, da es nicht möglich war, das Ferment (das oxydierende Prinzip) frei von anderen Bestandteilen organischer Natur zu erhalten.

In seiner Arbeit bemerkt Grimmer u. a.: „Durch die Untersuchungen anderer Autoren kann es aber als fest bewiesen gelten, daß erhitzte Milch eine geringere Acidität besitzt als rohe Milch, daß also schon aus diesem Grunde das Versagen der Peroxydasereaktion nicht auf eine Abnahme der Alkalinität zurückzuführen ist“. Dazu möchte ich bemerken, daß die Versuche jener Forscher (Höft, Kirsten, Hesse, Siegfeld u. a.) zu gleicher Zeit bewiesen, daß diese beim Erhitzen in offenen Gefäßen zustande kommende, geringe Abnahme nur auf Kohlensäureverlust zurückzuführen sei, während andererseits die Untersuchungen anderer Autoren zeigten, daß bei höherem Erhitzen der Säuregrad durch Abspaltung von phosphorhaltigen Säuren aus dem Casein bzw. Lecithin eine Zunahme zeigt. Weiter sagt Grimmer: „es sei noch daran erinnert, daß die alkalisch reagierenden Milcharten, Frauen-, Esel- und Stutenmilch, eine viel schwächere Peroxydasereaktion zeigen als die amphoter oder sauer reagierenden Milcharten der Wiederkäuer“. Ich glaube dieses in Verbindung setzen zu müssen mit dem verschiedenen Gesamtaschengehalt der einzelnen Milcharten. Der steigende Aschengehalt der Milch ergibt nämlich folgende Reihe: Frau, Eselin, Stute, Kuh, Ziege, Schaf, Hündin. Meine Untersuchungen ergaben nun, worauf ich weiter zurückkommen werde, daß die aschenreichere Ziegenmilch, ebenso auch Colostrummilch (obwohl der Säuregrad bedeutend höher lag als der von normaler Milch), einen höheren Alkalitätsgrad besitzt als die aschenärmere Kuhmilch. Versuche in dieser Richtung mit anderen Milcharten behalte ich mir vor.

Ferner sagt Grimmer<sup>3)</sup>: „Schließlich ist aber das, was Hesse und Kooper

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift 1911, 22, 393.

<sup>2)</sup> Milchwirtsch. Zentralbl. 1911, 7, 395.

<sup>3)</sup> Daselbst 1911, 7, 397.

als eine Peroxydasereaktion ansprechen, alles andere als dies, da schon Alkalien allein befähigt sind, Rothenfußer's Reagens zu oxydieren, während Milch diese Eigenschaft erst nach Zusatz von Wasserstoffsperoxyd erlangt“. Hätte Grimmer aber versucht, das Verhalten des Reagens dem Formalin gegenüber kennen zu lernen, dann würde er gesehen haben, daß das, was er speziell als Peroxydasereaktion betrachtet (nämlich die Eigenschaft der rohen Milch nur in Gegenwart von Wasserstoffsperoxyd das Rothenfußer'sche Reagens zu oxydieren) auch für Formalin zutrifft.

Das Formalin oxydiert nämlich, wie die Milch, nur in Gegenwart von Wasserstoffsperoxydlösung, wie folgender Versuch zeigt:

		Mit dem Rothenfußer'schen Reagens entsteht:
I	10 ccm Milch + 10 Tropfen Wasserstoffsperoxydlösung	Sofort intensive Färbung
II	10 „ „ ohne Zusatz	Keine Färbung
Ia	10 „ „ + 10 ccm destill. Wasser	Anfangs keine, nach 1/2 Stunde Violett färbung
Ib	10 „ „ ohne Zusatz	Anfangs keine Färbung und auch noch nicht nach längerer Zeit
IIa	10 „ Formalin + 10 Tropfen Wasserstoffsperoxydlösung	Sofort intensive Färbung
IIb	10 „ „ ohne Zusatz	Keine Färbung

Dieser Versuch beweist außerdem, wie auch die folgenden, daß Wasserzusatz das Auftreten der Violett färbung beschleunigt und befördert.

Weiter bemerkt Grimmer: „Durch Alkalien und alkalisch reagierende Salze wird Guajactinktur nicht blau, sondern intensiv gelb gefärbt. Die Salze aber, welche Guajactinktur bläuen, haben keine alkalische Reaktion“. — Wir bemerkten in unserer früheren Veröffentlichung<sup>1)</sup> schon, daß das Rothenfußer'sche Reagens als solches wahrscheinlich einen Indikator der ersten Gruppe darstellt, d. h. einen Indikator mit ausgeprägt sauren Eigenschaften, welcher schon mit schwächeren Basen Salze zu bilden vermag, welche nur durch relativ starke Säuren zerlegt werden können. Wir haben zwar speziell mit der Guajactinktur keine Versuche angestellt, glauben aber, daß, nach Grimmer's Versuchen zu urteilen, dieses Reagens nicht der ersten, sondern der zweiten Gruppe angehört, welche Indikatoren umfaßt, die zwar mit Basen leicht Salze bilden, die aber, dem schwachen Säurecharakter der Indikatoren entsprechend, nicht sehr beständig sind und schon durch relativ schwächere Säuren oder saure Salzen zerlegt werden. Diese Indikatoren sind gegen Säuren empfindlicher als die Indikatoren der ersten Gruppe, gegen Basen dagegen wenig empfindlich. Mit schwach alkalisch reagierenden Salzen, wie Dikaliumphosphat, Dinatriumphosphat, Natriumdicarbonat oder stärker alkalischen wie Natriumcarbonat entsteht, wie Grimmer's Versuche zeigen, ein gelb gefärbter Körper (Guajacgelb?), während die Gelbfärbung durch salpetrigsaures Kalium auf Reduktion zurückzuführen ist. Viele Körper, wie Chlor, Brom, Jod, Ozon, Salpetersäure, Chromsäure u. a., befördern die Oxydation (die übrigens auch schon an der Luft ohne Zusatz stattfindet) sehr stark, sodaß zum Beispiel ein mit verdünnter alkoholischer Guajac lösung (1:100) getränktes Papier ein empfindliches Reagens besonders auf Chromsäure abgibt. So lassen sich die durch Grimmer beobachteten Blaufärbungen der Guajactinktur nach Zusatz von Jod-, Brom- und

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift 1911, 22, 385.

Chlorkalium, bezw. -natrium, erklären. Man sieht, auch für die mit der Guajac-harztinktur zustande kommende Blaufärbung braucht nicht notwendig ein ferment-artiger Körper als Ursache herangezogen zu werden, wenn schon mit diesen eben erwähnten Salzen die Färbung sich erzielen läßt.

Auf Seite 397 von Grimmer's Arbeit heißt es: „In erhitzt gewesener Milch kann allerdings gegen Storch'sches und auch gegen Rothenfußer's Reagens eine Peroxydasereaktion ausgelöst werden, sobald sie mit Formalin oder mit Alkalien versetzt wird. Hierbei spielt der Erhitzungsgrad eine nicht unerhebliche Rolle.“ Grimmer glaubt das verschiedene Verhalten der ungleich hoch und ungleich lang erhitzten Milch dem Reagens gegenüber dadurch deuten zu können, daß „durch länger dauerndes Erhitzen der Milch in dieser Stoffe gebildet werden, die die Reaktion des Formalins hemmen“. Nun verstehe ich aber nicht, weshalb hier dieser Umstand gegen unsere Annahme sprechen soll, daß die Reaktion gegen Rothenfußer's Reagens auf die Alkalität der Milch zurückzuführen sei. Im Gegenteil! Je höher Milch erhitzt wird, um so hochgradigere Veränderungen auch der Milchsätze gehen vor sich, und diese Veränderungen werden sicher nicht ohne Einfluß auf die alkalische Reaktion der Milch bleiben. Daß sich dabei Körper organischer oder anorganischer Natur bilden, die hemmend auf die Reaktion des Formalins wirken, ist mehr als wahrscheinlich.

In neuester Zeit erschien in dieser Zeitschrift<sup>1)</sup> die oben erwähnte Veröffentlichung von van Eck, worin dieser Autor das Verhalten der Peroxydase beim Erhitzen bespricht. Nachdem van Eck einige Angaben aus der Litteratur über dieses Thema angeführt hat, hebt er hervor, „daß eine befriedigende Übereinstimmung über die höchste Temperatur, welche die Peroxydase ertragen kann, nicht besteht“. Am Ende seiner Ausführungen kommt er auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schlusse: „daß eine kurze Erhitzung auf höhere Temperatur, gleich wie eine längere Erwärmung bei niedrigerer Temperatur eine praktisch vollständige Vernichtung herbeiführen kann“. — Vergleicht man diese Angaben mit den von Diffloth<sup>2)</sup> erhaltenen Ergebnissen, daß eine Milch, die 60 Minuten auf 60° C erhitzt worden war, ungefähr dieselbe Zunahme an unlöslichen Phosphaten zeigte wie eine solche, die nur halb so lange auf 95° C erhitzt wurde, dann bemerkt man, daß auch diese Thatsachen nicht in Widerspruch stehen mit unserer Annahme, daß die mit dem Rothenfußer'schen bezw. Storch'schen Reagens auftretenden Farbenscheinungen verursacht werden durch die alkalisch reagierenden Stoffe in der Milch.

Schließlich seien die Versuche von Sartory<sup>3)</sup> erwähnt, der das Verhalten verschiedener Salze gegenüber Guajactinktur studierte. Seine im Milchwirtschaftlichen Zentralblatt von Grimmer<sup>4)</sup> besprochenen Untersuchungen können meines Erachtens ebenfalls nicht als für die Fermentnatur der sog. Peroxydase sprechend bezeichnet werden. Wie leicht übrigens z. B. das Rothenfußer'sche Reagens oxydiert wird, lehrt die Tatsache, daß eine Lösung von Kaliumbichromat in der Verdünnung 1:100 000 das Reagens sofort intensiv violett färbt, während eine Lösung 1:200 000 dieses noch nach einiger Zeit tut.

Die jetzt neu angestellten Versuche bezweckten u. a. neues Material herbeizuschaffen zur Stützung unserer Annahme, daß die mit dem Rothenfußer'schen

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift 1911, 21, 385.

<sup>2)</sup> Bull. Scienc. Pharmacol. 1904, 6, 273.

<sup>3)</sup> Compt. rend. Soc. biol. 70, 522, 700 u. 395.

<sup>4)</sup> Milchwirtsbh. Zentralbl. 1911, 7, 347.

Reagens in frischer Milch auftretende Violettfärbung der alkalischen Reaktion der Milch zuzuschreiben ist.

Bei der Thörner'schen Titrimethode zur Bestimmung des Säuregrades der Milch werden 10 ccm Milch mit 20 ccm Wasser verdünnt. Es ist bekannt, daß durch diese Verdünnung mit Wasser der wirkliche Säuregehalt etwas herabgesetzt wird, weshalb man in vielen Fällen einfach diesen Wasserzusatz wegläßt und die Milch direkt titriert. Die Ursache der Herabsetzung des Säuregehaltes durch die Verdünnung ist die, daß etwas alkalisches Calciumphosphat in Lösung geht. Wie sehr Wasserzusätze zu Milch von Einfluß auf deren Säure- und Alkalitätsgrad sein können, lehrten Versuche, die diesbezüglich hier angestellt wurden.

In der oben erwähnten Veröffentlichung<sup>1)</sup> bezeichneten wir als Alkalitätsgrad der Milch die Menge N.-Schwefelsäure, welche nötig ist, um die mit dem Rothenfußer'schen Reagens (ein Gemisch von p-Phenylendiaminchlorhydrat und Guajacol in Wasser und Alkohol, zu welchem bei der Anwendung einige Tropfen einer 0,3 0/0-igen Wasserstoffsperoxydlösung kommen) entstandene Violettfärbung in 100 ccm Milch zum Verschwinden zu bringen. — Weitere Versuche haben nun ergeben, daß statt der Titration mit N.-Schwefelsäure der mit  $\frac{1}{4}$  N.-Schwefelsäure der Vorrang zu geben ist. Eine  $\frac{1}{10}$  N.-Schwefelsäure würde eine zu verdünnte Lösung darstellen, um bei dieser Titration richtige Resultate geben zu können. Aus verschiedenen Gründen aber ist der Alkalitätsgrad dennoch in ccm  $\frac{1}{10}$  N.-Schwefelsäure auszudrücken.

Die Titrimethode zur Feststellung des Alkalitätsgrades der Milch gestaltet sich also folgendermaßen:

Zu 10 ccm Milch fügt man 10 Tropfen des Rothenfußer'schen Reagens und 10 Tropfen einer 0,3 0/0-igen Wasserstoffsperoxydlösung. Bei der Titration mit  $\frac{1}{4}$  N.-Schwefelsäure schlägt die violette Färbung zunächst in eine dunkelgrüne, bei weiterem Säurezusatz in eine immer heller werdende Färbung um. Die Titration ist beendet, sobald ein Tropfen der hereinfallenden Säure in der jetzt graugrünlichen Flüssigkeit keine hellere Stelle mehr erzeugt. — Die Anzahl der ccm  $\frac{1}{4}$  N.-Schwefelsäure, welche erforderlich sind, werden mit 25 multipliziert: die erhaltene Zahl drückt dann den Alkalitätsgrad für 100 ccm Milch und bezogen auf  $\frac{1}{10}$  N.-Schwefelsäure aus. Waren z. B. zur Neutralisation erforderlich 4,40 ccm  $\frac{1}{4}$  N.-Schwefelsäure, dann betrug der Alkalitätsgrad  $10 \times 10 \times \frac{4,40}{4}$  oder  $25 \times 4,40 = 110,0$ .

Es ist nun nicht gleichgültig, bei welcher Temperatur die Neutralisation vorgenommen wird. Die günstigste ist eine solche von etwa 15—20° C. Im allgemeinen verläuft der Farbenumschlag bei einer höheren Temperatur schneller. Bei älterer Milch verläuft er anders als bei frischer, in dem bei ersterer statt eines grünen ein grauer Farbenton auftritt. Außerdem übt bei solcher alten Milch das Casein, das bei der Titration ausgefällt wird, einen störenden Einfluß aus. Genau wie bei der Bestimmung des Säuregrades nach kurzer Zeit die entstandene Rotfärbung verschwindet und die ursprünglich weiße Färbung zurückkehrt, nehmen auch die mit  $\frac{1}{4}$  N.-Schwefelsäure neutralisierten, grünen Flüssigkeiten nach kurzer Zeit meistens wieder ihre ursprüngliche violette Färbung an. Diese letztere läßt sich in allen Fällen auch durch einen größeren Wasserzusatz wieder herstellen, was sich vielleicht dadurch erklären läßt, daß alkalisches Calciumphosphat in Lösung geht. Nach Zusatz des Rothenfußer's-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift 1911, 21, 385—393.

schen Reagens zu Milch tritt die Violettfärbung bei allen Milchproben nicht gleich schnell und gleich intensiv auf, nach einiger Zeit jedoch zeigen sie meistens alle die gleiche tiefviolette Färbung.

Der Alkalitätsgrad ist keine konstante Größe. Er ist sogar wie der Säuregrad ziemlichen Schwankungen unterworfen. Als Durchschnitt von 30 einzelnen Proben Mischmilch wurden hier 110,0 Alkalitätsgrade ermittelt. Dabei wurde als unterste Grenze 106,0 als oberste 112,1 festgestellt. Der Säuregrad dieser von 40 Kühen stammenden Milchproben bewegte sich zwischen 16,5 und 20,0 nach Thörner (titriert ohne Wasserzusatz).

Die einzelnen Schwankungen sind aus Tabelle I ersichtlich:

Tabelle I.  
Säure- und Alkalitätsgrade von frischer Vollmilch.

No.	Tag	Säuregrade	Alkalitätsgrade	No.	Tag	Säuregrad	Alkalitätsgrade
1	15. Februar	16,5	112	17	21. März	18,0	111
2	4. „	17,0	112	18	21. „	17,0	108
3	27. „	16,8	112	19	21. „	17,0	111
4	21. März	20,0	109	20	22. „	18,25	108,6
5	21. „	20,0	111	21	22. „	18,2	109,8
6	21. „	17,0	106	22	22. „	18,2	110,6
7	21. „	17,0	109	23	22. „	18,2	109,5
8	21. „	19,0	111	24	23. „	17,5	111,7
9	21. „	19,2	111	25	23. „	18,0	110,5
10	21. „	18,8	110	26	23. „	18,0	110
11	21. „	18,7	109,5	27	23. „	18,5	112,2
12	21. „	19,0	108	28	23. „	18,5	107,2
13	21. „	19,0	106	29	23. „	18,0	112,2
14	21. „	17,0	111,5	30	23. „	17,7	111,8
15	21. „	16,8	112	Im Durchschnitt		17,4	110,1
16	21. „	18,0	110				

Im Laufe des Sommers aber wurden bei mehreren Proben höhere Alkalitätsgrade beobachtet, einmal sogar ein solcher von 125,0 bei normalem Säuregehalt. Da das Alter der Milch aber nicht mehr einwandfrei festzustellen war, außerdem auch andere verwirrende Umstände dazu kamen, wurde die betreffende Probe nicht weiter untersucht. Wahrscheinlich handelte es sich jedoch um die Einzelmilch einer frisch-milchenden Kuh, da, wie spätere Beobachtungen zeigten, Colostralmilch einen bedeutend höheren Alkalitätsgrad besitzt, der bis zur normalen Größe beständig abnimmt. Dieses Herabsinken geht nicht regelmäßig und ohne Unterbrechung vor sich, wenigstens bei der hier in Betracht kommenden Probe war dieses nicht der Fall.

Die untersuchte Colostralmilch entstammte einer 5-jährigen Kuh, die schon 3-mal gekalbt hatte und vor dem letzten Kalben nur eine Woche trocken stand. Sie gab nur spärlich Milch und die Mengen der letzteren waren dabei sehr unregelmäßig. Wie die Untersuchung zeigte, hatte die Milch einen für Colostrummilch auffallend niedrigen Fettgehalt. Ebenso war das spezifische Gewicht weit unter normal, zwei Umstände, welche wahrscheinlich dem kurzen Trockenstehen zuzuschreiben waren. Der Alkalitätsgrad der Milch war am höchsten kurz vor dem Kalben, während er 22 Stunden nach der Geburt schon um 25,0 bis auf 155,0 Grad herabgesunken war. Mit Unter-

brechungen am 7. und am 11. Tage nach der ersten Probenahme, an welchen Tagen ein vorübergehendes Steigen konstatiert wurde, nahm der Alkalitäts- und auch der Säuregrad sonst fortwährend ab. (Siehe Tabelle II.)

Tabelle II.  
Colostrummilch.

	28. VII. 1911 2 Stdn. vor dem Kalben	29 VII.	30. VII.	31. VII.	1. VIII.	2. VIII.	3. VIII.	4. VIII.	5. VIII.	7. VIII.	8. VIII.
		22 Stdn.	46 Stdn.	70 Stdn.	94 Stdn.	118 Stdn.	142 Stdn.	166 Stdn.	190 Stdn.	238 Stdn.	262 Stdn.
	nach dem Kalben										
Fett (o/o)	2,25	2,35	3,80	3,70	3,25	3,45	3,20	2,55	3,40	3,10	2,85
Spez.Gew.	1,0392	1,0333	1,0334	1,0317	1,0309	1,0314	1,0312	1,0312	1,0303	1,0296	1,0297
Säure- grade (n. Thörner)	28,0	27,0	27,0	25,0	22,5	23,0	21,0	21,0	19,0	19,0	18,8
Alkali- täts- grade	180,0	155,0	133,5	132,0	130,0	132,0	135,0	130,0	122,0	111,0	115,0

Es wurden weiter mehrere Proben Ziegenmilch auf Alkalitäts- und Säuregrad, spezifisches Gewicht und Fett untersucht. Diese Untersuchungen (Tabelle III) ergaben für Ziegenmilch einen bedeutend höheren Alkalitätsgrad als für Kuhmilch. Auch die Schwankungen zwischen den einzelnen Proben waren bedeutend größere, obwohl es sich hier allerdings um Einzelmilch handelte, während die Kuhmilchproben sämtlich Durchschnittsproben der Milch von mehreren Kühen darstellen.

Tabelle III.  
Ziegenmilch.

No.	Die Ziege war milchend seit	Alter der Ziege	Zahl der Lämmer	Fett o/o	Spezifi- sches Gewicht	Säure- grade [n. Thörner]	Alkali- tätsgrade	Gemolken und unter- sucht am
1	6. V. 1911	7 Jahre	6	2,50	1,0262	13,0	110,0	19. VII. 1911 7 und 10 Uhr vormittags
2	30. IV. 1911	1 Jahr	1	2,35	1,0311	13,0	121,0	
3	2. VI. 1911	5 Jahre	4	2,80	1,0285	13,5	126,0	
4	15. V. 1910	6 "	5	3,00	1,0261	12,5	125,0	
5	14. IV. 1911	5 "	4	3,15	1,0298	13,0	127,0	26. VII. 1911 7 und 10 Uhr vormittags
6	14. V. 1911	3 "	3	3,10	1,0318	14,0	130,0	
7	15. IV. 1911	2 "	2	3,80	1,0305	15,0	125,0	
8	19. IV. 1911	6 "	6	2,50	1,0285	14,0	125,0	
9	16. IV. 1911	6 "	5	2,70	1,0273	12,0	115,0	31. VII. 1911 7 und 10 Uhr vormittags
10	19. IV. 1911	2 "	2	3,10	1,0304	15,0	127,5	
11	14. IV. 1911	7 "	2	3,10	1,0300	14,5	125,0	
12	3. VI. 1911	7 "	6	4,10	1,0272	15,5	112,5	
13	9. IV. 1911	2 "	2	2,35	1,0272	15,0	109,0	7. VIII. 1911 7 und 10 Uhr vormittags
14	15. X. 1910	4 "	3	3,15	1,0252	13,0	107,5	
15	14. III. 1911	4 "	3	2,90	1,0262	13,0	110,0	
16	15. III. 1911	7 "	6	4,10	1,0301	14,5	129,0	
17	20. III. 1911	5 "	4	4,50	1,0284	14,0	125,0	7. VIII. 1911 7 und 10 Uhr vormittags
18	30. IV. 1911	1 Jahr	1	2,40	1,0292	12,5	124,0	
19	6. V. 1911	7 Jahre	6	2,90	1,0280	13,0	120,0	
20	22. IV. 1911	4 "	3	3,00	1,0253	14,0	102,5	
21	25. IV. 1911	2 "	2	3,50	1,0298	17,0	127,5	

Der höchste beobachtete Alkalitätsgrad für Ziegenmilch war, wie aus obiger Tabelle ersichtlich ist, 130,0, der niedrigste betrug dagegen nur 102,5. Von den 21 Proben hatten 14 einen über 120,0 liegenden Alkalitätsgrad, nur 3 zeigten einen solchen unter 110,0, woraus mit großer Wahrscheinlichkeit zu entnehmen ist, daß der Alkalitätsgrad für Ziegenmilch annähernd um 10,0 Grade höher liegt als der für Kuhmilch. Hiermit stimmt die Tatsache überein, daß auch der Aschengehalt von Ziegenmilch ein höherer ist als der von Kuhmilch.

Merkwürdigerweise scheint ein Zusammenhang zu bestehen zwischen spezifischem Gewicht und Alkalitätsgrad. Ordnet man nämlich die spezifischen Gewichte nach der Größe, dann ergibt sich, daß bei steigendem spezifischen Gewichte auch der Alkalitätsgrad steigt. (Siehe Tabelle IV.)

Tabelle IV.

Spezifisches Gewicht und Alkalitätsgrad der Ziegenmilch.

Spez. Gewicht	Alkalitätsgrad	Spez. Gewicht	Alkalitätsgrad	Spez. Gewicht	Alkalitätsgrad
1,0252	107,5	1,0273	115,0	1,0298	127,0
1,0253	102,5	1,0280	120,0	1,0300	125,0
1,0262	110,0	1,0284	125,0	1,0301	129,0
1,0262	110,0	1,0285	125,0	1,0304	127,5
1,0272	109,0	1,0285	126,0	1,0318	130,0
1,0272	121,5	1,0298	127,5		

Wenn sich diese Übereinstimmung auch schwer erklären läßt, ist sie doch zu auffallend, um sie vollständig unbeachtet lassen zu können.

Die weiteren Versuche bezweckten u. a., den Einfluß kennen zu lernen, welcher durch Wasserzusätze zu Milch auf ihren Alkalitäts- und Säuregrad ausgeübt wird.

Zu diesem Zwecke wurde Kuhmilch mit bestimmten, aber ungleichen Mengen Wasser verdünnt und diese Verdünnungen sofort auf Alkalitätsgrad und Säuregrad untersucht. Selbstverständlich wurde dazu nur eine Milch verwendet. Diese Untersuchungen wurden bei steigendem Säuregrad einige Male wiederholt, der Alkalitätsgrad jedoch ließ sich leider nur bis zu einem gewissen Säuregrade mit Sicherheit bestimmen, da bei weiter fortschreitender Säuerung die Violettfärbung mit dem Rothensfußer'schen Reagens ausbleibt. Dieses war jedoch nicht bei Ziegenmilch der Fall. Es wurde die interessante Beobachtung gemacht, daß bei einem Säuregrade, bei welchem Kuhmilch absolut keine Färbung mehr zeigt, mit Ziegenmilch noch eine sehr intensive Violettfärbung zu erzielen ist. Bei 82,0 Säuregraden kam diese Färbung sogar noch zustande. — In den folgenden Tabellen V und VI sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen niedergelegt. Tabelle V zeigt die Säuregrade der einzelnen Verdünnungen an verschiedenen Tagen und daneben die auf Grund des Säuregrades der unverdünnten Milch berechneten Säuregrade der Verdünnungen. Zweimal, am 2. August 9 Uhr vormittags und 6 Uhr nachmittags, sind auch die Alkalitätsgrade bestimmt und berechnet worden. In Tabelle VI sind zu besserer Übersicht die Unterschiede zwischen dem gefundenen und berechneten Säuregrade bzw. Alkalitätsgrade bei den Verdünnungen nebeneinander gestellt.

Tabelle V.

Einfluß des Wassers auf den Säuregrad und Alkalitätsgrad von Kuhmilch.  
I. 2. August 1911, 9 Uhr vormittags.

No.	Wasser- zusatz 0/0	Säuregrade			Alkalitätsgrade		
		gefunden	berechnet	Differenz	gefunden	berechnet	Differenz
1	0	16,0	16,0	—	110,0	110,0	—
2	10	14,3	14,4	— 0,1	105,0	99,0	+ 6,0
3	20	12,4	12,8	— 0,4	104,0	88,0	+ 16,0
4	30	10,7	11,2	— 0,5	96,0	77,0	+ 19,0
5	40	9,0	9,6	— 0,6	84,0	66,0	+ 18,0
6	50	7,0	8,0	— 1,0	70,0	55,0	+ 15,0

II. 2. August 1911, 6 Uhr nachmittags.

1	0	31,0	31,0	—	107,0	107,0	—
2	10	26,0	27,9	— 1,9	103,0	96,3	+ 6,7
3	20	22,0	24,8	— 2,8	97,0	85,6	+ 11,4
4	30	20,0	21,7	— 1,7	93,0	74,9	+ 18,1
5	40	17,0	18,6	— 1,6	81,0	64,2	+ 16,8
6	50	14,0	15,5	— 1,5	69,0	53,5	+ 15,5

III. und IV. Säuregrade am 3. August 1911.

		10 Uhr vormittags			6 Uhr nachmittags		
		gefunden	berechnet	Differenz	gefunden	berechnet	Differenz
1	0	86,0	86,0	—	88,5	88,5	—
2	10	80,0	77,4	+ 2,6	82,0	79,7	+ 2,3
3	20	71,0	68,8	+ 2,2	74,0	70,8	+ 3,2
4	30	67,5	60,2	+ 7,5	68,5	62,0	+ 6,5
5	40	58,0	51,6	+ 6,4	59,5	53,1	+ 6,4
6	50	48,5	43,0	+ 5,5	50,5	44,2	+ 6,2

V. und VI. Säuregrade am 4. August 1911.

		10 Uhr vormittags			6 Uhr nachmittags		
		gefunden	berechnet	Differenz	gefunden	berechnet	Differenz
1	0	98,0	98,0	—	103,0	103,0	—
2	10	92,0	88,2	+ 3,8	97,2	92,7	+ 4,5
3	20	82,0	78,4	+ 3,6	87,8	82,4	+ 5,4
4	30	77,0	68,6	+ 8,4	81,8	72,1	+ 9,7
5	40	68,5	58,8	+ 9,7	72,1	61,8	+ 10,3
6	50	59,0	49,0	+ 10,0	63,0	51,5	+ 11,5

Tabelle VI.

Tag	Wirklicher Säure- grad der unver- dünnten Milch	Differenzen zwischen gefun- denen und berechneten Säure- graden bei einem Wasser- zusatz von					Wirklicher alkali- tät-grad der unver- dünnten Milch	Differenzen zwischen gefunde- nen und berechneten Alkali- tät-graden bei einem Wasserzusatz von					
		10 %	20 %	30 %	40 %	50 %		10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	
		1911											
2.	9 Uhr vorm	16,0	-0,1	-0,4	-0,5	-0,6	-1,0	110,0	+6,0	+16,0	+19,9	+18,0	+15,0
VIII.	6 „ nachm	31,0	-1,9	-2,8	-1,7	-1,6	-1,5	107,0	+6,7	+11,4	+18,1	+16,8	+15,5
3.	10 Uhr vorm	86,0	+2,6	+2,2	+7,5	+6,4	+5,5	—	—	—	—	—	—
VIII.	6 „ nachm.	88,5	+2,3	+3,2	+6,5	+6,4	+6,1	—	—	—	—	—	—
4.	10 Uhr vorm.	98,0	+3,8	+3,6	+8,4	+9,7	+10,0	—	—	—	—	—	—
VIII.	6 „ nachm.	103,0	+5,5	+5,4	+9,7	+10,3	+11,5	—	—	—	—	—	—

Aus den Tabellen V und VI geht folgendes hervor:

1. Durch Wasserzusatz zu frischer Milch sinkt der Säuregrad und steigt der Alkalitätsgrad.

2. Bei fortschreitender Säuerung der Verdünnungen wird anfangs die Differenz zwischen gefundenem und berechnetem Säuregrad etwas größer (am 2. August 6 Uhr nachmittags), bald aber zeigt sich der durch Titration gefundene Säuregrad größer als der berechnete (3. August 1910 Uhr vormittags). Der Alkalitätsgrad dagegen nimmt erstens bei Zunahme des Säuregrades ab, zweitens werden auch die Unterschiede zwischen den gefundenen und berechneten Alkalitätsgraden kleiner.

3. Je höher der Säuregrad steigt, um so mehr steigen auch die Unterschiede zwischen gefundenen und berechneten Säuregraden.

Verdünnt man schon saure Milch mit Wasser, dann zeigt sich ähnliches, nur mit dem Unterschiede, daß jetzt durch die Wasserzusätze der Säuregrad anfangs viel tiefer sinkt als wenn man frische Milch verdünnt. (Siehe Tabelle VII.)

Tabelle VII.

Einfluß des Wasserzusatzes auf den Säuregrad und Alkalitätsgrad von Kuhmilch.

a) 25. März 1911.

No.	Wasser- zusatz	Säuregrade			Alkalitätsgrade		
		gefunden	b-rechnet	Differenz	gefunden	berechnet	Differenz
1	0 %	47,0	47,0	—	87,0	87,0	—
2	5 „	35,0	44,7	— 9,7	84,2	82,7	+ 1,5
3	10 „	29,0	42,3	— 13,3	81,7	78,3	+ 3,4
4	15 „	25,0	40,0	— 15,0	79,7	73,9	+ 5,8
5	20 „	21,5	37,7	— 16,2	77,7	69,6	+ 8,1
6	25 „	19,5	35,4	— 15,9	75,5	65,2	+ 10,3
7	30 „	18,5	32,9	— 14,4	72,0	60,9	+ 11,1

Säuregrade

b) 27. März 1911.

c) 28. März 1911.

1	0 %	78,0	78,0	—	79,0	79,0	—
2	5 „	67,0	74,1	— 7,1	73,5	75,0	— 1,5
3	10 „	62,0	70,2	— 8,2	70,0	71,0	— 1,0
4	15 „	60,0	66,3	— 6,3	67,5	67,2	+ 0,3
5	20 „	57,0	62,4	— 5,4	65,5	63,2	+ 2,3
6	25 „	55,0	58,5	— 3,5	63,5	59,2	+ 4,3
7	30 „	54,0	54,6	— 0,6	61,0	55,3	+ 5,7

Ziegenmilch, die, wie schon vorhin hervorgehoben wurde, sogar bei hohem Säuregrade noch reagiert und Violettfärbung zeigt, eignete sich zu diesen Versuchen besonders gut, da die Bestimmung ihres Alkalitätsgrades nicht allein, wie bei Kuhmilch, bei fortschreitendem Alter eine Abnahme des Alkalitätsgrades zeigt, sondern diese Abnahme auch für die Verdünnungen viel größer ist als die für die unverdünnte Milch. (Siehe Tabelle VIII und IX.)

Tabelle VIII.  
Einfluß des Wasserzusatzes auf den Säuregrad und Alkalitätsgrad von  
Ziegenmilch.

Nr.	Wasser- zusatz	Säuregrade			Alkalitätsgrade		
		gefunden	berechnet	Differenz	gefunden	berechnet	Differenz
a) 7. August 1911.							
1	0	13,5	13,5	—	121,0	121,0	—
2	15 %	11,0	11,5	— 0,5	110,0	103,0	+ 7,0
3	25 „	9,5	10,1	— 0,6	96,0	91,0	+ 5,0
4	50 „	6,0	6,8	— 0,8	64,0	60,5	+ 3,5
b) 8. August 1911.							
1	0	72,0	72,0	—	95,0	95,0	—
2	15 %	62,0	61,2	+ 0,8	73,5	80,7	— 7,2
3	25 „	57,0	54,0	+ 3,0	63,0	71,3	— 8,3
4	50 „	41,0	36,0	+ 5,0	44,0	47,5	— 3,5
c) 9. August 1911.							
1	0	82,0	82,0	—	91,0	91,0	—
2	15 %	74,0	69,7	+ 4,3	67,5	77,3	— 9,8
3	25 „	67,0	61,5	+ 4,5	55,0	68,2	— 13,2
4	50 „	50,0	41,0	+ 9,0	27,5	45,5	— 18,0

Tabelle IX.

Tag	Wirklicher Säuregrad der unverdünnnten Milch	Differenzen zwischen gefundenen und be- rechneten Säure- graden bei einem Wasserzusatz von			Wirklicher Alkalitäts- grad der unver- dünnnten Milch	Differenzen zwischen gefundenen und be- rechneten Alkali- tätsgraden bei einem Wasserzusatz von		
		15 %	25 %	50 %		15 %	25 %	50 %
1911								
7. VIII.	13,5	— 0,5	— 0,6	— 0,8	121,0	+ 7,0	+ 5,0	+ 3,5
8. VIII.	72,0	+ 0,8	+ 3,0	+ 5,0	95,0	— 7,2	— 8,2	— 3,5
9. VIII.	82,0	+ 4,3	+ 4,5	+ 9,0	91,0	— 9,8	— 13,2	— 18,0

Die Tatsache, daß durch Wasserzusatz zu frischer Milch der Säuregrad anfangs verringert wird, erklärt man durch die Annahme, daß durch die Verdünnung etwas des wenig löslichen, alkalisch reagierenden, sekundären Calciumphosphates ( $\text{CaHPO}_4$ ) in Lösung geht. Bei fortschreitender Säuerung verwandelt die durch die Lebenstätigkeit der Milchsäurebakterien entstandene Milchsäure nun zunächst das vorhandene alkalisch reagierende sekundäre Salz ( $\text{CaHPO}_4$ ) in saures primäres Salz ( $\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_8$ ), das suspendierte Tricalciumphosphat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) wird gelöst und alles alkalische Dikaliumphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) in saures Monophosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) übergeführt. Das entstandene saure Calciumphosphat jedoch ist wenig beständig. Von wenig Wasser wird es schon zersetzt in Phosphorsäure und sich abscheidendes  $\text{CaH}_5\text{PO}_6$ , welches sich allmählich in der Flüssigkeit löst. Mit 100 Teilen Wasser entsteht aber sofortige Lösung, was

vielleicht die Ursache sein mag, daß in den Verdünnungen der Säuregrad schneller ansteigt als in der unverdünnten Milch.

In dem Maße, wie primäres Phosphorsäuresalz entsteht, wird Alkali gebunden, bis schließlich die Abscheidung des Caseins beginnen kann. Die Milchsäure verbindet sich jetzt mit dem Kalk des Caseins zu milchsaurem Calcium. Bei den hier ausgeführten Versuchen wurde weiter die Beobachtung gemacht, daß, trotz des relativ höheren Säuregehaltes, bei den Verdünnungen die Gerinnung später eintrat als bei der unverdünnten Milch. — Durch die Untersuchungen anderer Forscher wissen wir, daß die Gerinnung von einer Änderung in der Bindungsweise der mineralischen Bestandteile abhängt. Diese Änderung kann nun auf verschiedenen Wegen herbeigeführt werden. Im allgemeinen sind z. B. die Kalksalze in der frischen Milch nicht in einer zur Fällung des Caseins oder Paracaseins geeigneten Form enthalten. Durch Zusatz bestimmter Salze jedoch kann eine solche Umsetzung zustande kommen, was die Gerinnung der Milch zur Folge hat. Die Untersuchungen von Loevenhart<sup>1)</sup> haben gezeigt, daß z. B. die Salze von Lithium, Beryllium, Magnesium, Calcium, Strontium, Barium, Manganoxydul, Eisenoxydul das Paracasein schon bei Zimmertemperatur in kurzer Zeit fällen, das Casein nach längerem Stehen bei 40° C. Alle anderen Schwermetalle koagulieren Casein und Paracasein bereits bei Zimmertemperatur. Die Salze von Kalium, Natrium und Ammonium fällen dagegen weder Casein noch Paracasein.

Das Erwärmen übt einen ähnlichen Einfluß aus, wie der Zusatz von Salzen der zwei ersten Reihen. Durch Erhitzen nimmt nämlich der Gehalt an unlöslichen Phosphaten zu, was Gerinnung bei genügendem Säuregrade zur Folge haben kann. Dieses Mehr an unlöslichen Phosphorsalzen entstammt zum Teil den löslichen Mineralsalzen, zum anderen Teil dem organischen Phosphorgehalt (Lecithin). Dauer und Höhe der Erhitzung spielt selbstverständlich dabei eine wichtige Rolle. So fand z. B. Diffloth<sup>2)</sup>, daß eine Milch, die 60 Minuten auf 60° C erhitzt worden war, ungefähr dieselbe Zunahme an unlöslichen Phosphaten zeigte, wie eine, die nur halb so lang auf 95° C erhitzt wurde. Jensen und Plattner<sup>3)</sup> fanden, daß, je höher die Milch erhitzt wird, desto weniger Säuregrade zum Koagulieren notwendig sind. Milch, welche eine Stunde auf 140° C erhitzt wurde, gerann selbst bei Kreidezusatz. Der Säuregrad nimmt beim Erwärmen durch Kohlensäureverlust ab, bei stärkerem Erhitzen dagegen erfährt er durch Abspaltung von phosphorhaltigen Säuren aus dem Casein eine Zunahme.

Umgekehrt haben Untersuchungen von Hammarsten gezeigt, daß durch Wasserzusatz die Gerinnung von Milch oder Caseinlösungen durch Lab verhindert oder verzögert werden kann. Durch Zusatz von Chlorcalcium jedoch wird dieser hemmende Einfluß aufgehoben. — Auch durch Alkalizusatz wird der Gehalt der Milch an löslichen Calciumsalzen vermindert, der an Alkaliphosphaten dagegen vermehrt, was gleichfalls eine Verminderung der Gerinnungsfähigkeit zur Folge hat. Säurezusatz bzw. Erhöhung der Acidität, z. B. durch Einleiten von Kohlensäure, steigert den Gehalt an gelösten Calciumsalzen, was wieder eine vermehrte Gerinnungsfähigkeit zur Folge hat. Man muß deshalb annehmen, daß die Rolle der Calciumphosphate darin besteht, die Ausscheidung des durch Alkaliphosphate in Lösung gehaltenen, durch die fermentative Labwirkung gebildeten Paracaseins zu ermöglichen.

<sup>1)</sup> Zeitschr. physiol. Chem. 1904, 41, 177—205.

<sup>2)</sup> Bull. Scienc. Pharmacol. 1904, 6, 273.

<sup>3)</sup> Landw. Jahrbuch der Schweiz 1905.

Wenn nun auch zwischen der Fällung des Caseins durch Säurewirkung und der durch fermentative Wirkung erfolgten Gerinnung ein wesentlicher Unterschied besteht, so scheint zur Erklärung der hier gemachten Beobachtung, die Annahme nicht unberechtigt, daß die Ausscheidung des Caseins durch die Milchsäure durch einen geringeren Gehalt an für die Gerinnung notwendigen löslichen Kalksalzen verzögert wurde.

### Zusammenfassung der Ergebnisse.

Die angestellten Versuche lieferten folgende Ergebnisse:

1. Der Alkalitätsgrad von frischer Kuhmilch betrug im Durchschnitt von 30 Einzeluntersuchungen 110,1.
2. Der Alkalitätsgrad ist keine konstante Größe, sondern wie der Säuregrad Schwankungen unterworfen.
3. Der Alkalitätsgrad von Colostrummilch ist höher als der von normaler Milch. Bei fortschreitender Lactation sinkt der Alkalitätsgrad bis zur normalen Höhe.
4. Der Alkalitätsgrad von frischer Ziegenmilch ist höher als der von Kuhmilch. Bei 14 von den 21 untersuchten Proben wurde ein über 120,0 liegender Alkalitätsgrad beobachtet.
5. Durch Wasserzusatz zu frischer Milch steigt der Alkalitätsgrad, während der Säuregrad durch die Verdünnung abnimmt.
6. Durch Wasserzusatz zu älterer Milch sinkt der Säuregrad tiefer als wenn man frische Milch verdünnt. Die Zunahme des Alkalitätsgrades durch die Verdünnung ist bei älterer Milch dagegen eine geringere.
7. Beim Älterwerden der Milch und auch ihrer Verdünnungen sinkt der Alkalitätsgrad in den letzteren schneller als in der unverdünnten Milch, während umgekehrt der Säuregrad in der verdünnten Milch schneller steigt.
8. Je weiter die Säuerung fortschreitet, um so höher werden die Unterschiede zwischen den berechneten und gefundenen Alkalitäts- bzw. Säuregraden der Verdünnungen.
9. Die Gerinnung tritt bei den Verdünnungen später ein als bei der unverdünnten Milch. Je größer die Verdünnung, um so später erfolgt die Ausscheidung des Caseins.
10. Die intensive Violett-färbung der rohen Milch mit dem Rothenfußer'schen Reagens kam in Ziegenmilch noch zustande bei einem Säuregrade, bei welchem die Kuhmilch schon längst keine Reaktion mehr zeigte.
11. Violett-färbung tritt nach längerer Zeit in Milch auch ohne Zusatz von Wasserstoffsperoxyd ein. Durch Wasserzusatz läßt sich die Farbstoffbildung sehr beschleunigen.

Wenn wir die aus den Versuchen hervorgehenden Ergebnisse überblicken und mit denen anderer Forscher vergleichen, müssen wir zu demselben Schlusse wie in unserer früheren Veröffentlichung gelangen. Am einfachsten läßt sich die farbstoffbildende Eigenschaft der rohen Milch durch die Wirkung anorganischer Körper erklären und zwar scheinen es speziell die alkalisch reagierenden Stoffe in der Milch zu sein, die in erster Linie diesen Erscheinungen zugrunde liegen.

Dafür sprechen folgende Umstände:

1. daß die Eigenschaft der rohen Milch, das Rothenfußer'sche Reagens in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd zu färben, nicht allein dieser, sondern auch vielen anorganischen und organischen Körpern zukommt, von welchen mehrere in der Milch vorhanden sind;

2. daß die Farbstoffbildung durch rohe Milch ohne die Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd durch Zusatz von destilliertem Wasser merklich beschleunigt wird;

3. daß Dauer und Höhe der Erhitzung der Milch von Einfluß sind auf das Zustandekommen der Reaktion, indem kurze Erhitzung auf höhere Temperatur dieselbe Wirkung ausübt als eine längere Erhitzung bei niedrigerer Temperatur, was man vergleichen kann mit dem Einfluß, welcher durch das Erwärmen auf den Gehalt an Phosphaten ausgeübt wird. Milch, die nämlich 60 Minuten auf 60° C erhitzt wird, zeigt ungefähr dieselbe Zunahme an unlöslichen Phosphaten wie eine Milch, die nur halb so lang auf 95° erhitzt wurde;

4. daß durch länger dauerndes Erhitzen die Milch Eigenschaften bekommt, welche auch die Reaktion des Formalins mit dem Reagens hemmen;

5. daß durch Verdünnung der Milch größere Mengen  $\frac{1}{4}$  N.-Schwefelsäure nötig werden, um die Violettfärbung zum Verschwinden zu bringen;

6. daß dieses Steigen des „Alkalitätsgrades“ einem Sinken des Säuregrades gegenüber steht;

7. daß beim Älterwerden der Verdünnungen der Säuregrad in denselben schneller steigt als in der unverdünnten Milch, während umgekehrt der Alkalitätsgrad in gleichem Maße abnimmt;

8. daß der Alkalitätsgrad nicht konstant ist, sondern Schwankungen unterliegt und außerdem bei verschiedenen Milcharten (Kuh-, Ziegen-, Colostrummilch) ungleich groß ist;

9. daß die an anorganischen Bestandteilen reichere Ziegenmilch einen höheren Alkalitätsgrad besitzt als die aschenärmere Kuhmilch und die noch aschenärmeren Frauen-, Esel- und Stutenmilch sämtlich eine schwächere Reaktion zeigen als die Kuhmilch;

10. daß die Reaktion bei Ziegenmilch noch bei einem sehr hohen Säuregrade auftritt (bei welchem jedoch die Ziegenmilch noch nicht gerann), während Kuhmilch bei einem viel niedrigerem Säuregrade keine Reaktion mehr zeigt.

Das Zustandekommen der Reaktion scheint darnach abhängig zu sein von einer bestimmten Bindung der Phosphorsäure an die Alkali- bzw. Erdalkalimetalle.

Auf Grund dieser Tatsachen kommen wir zu dem Schlusse, daß die als Titel über unsere Veröffentlichung gestellte Frage bejahend zu beantworten ist.