Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 44 (1953)

Heft: 3

Artikel: Die Bestimmung der Milchsäure in biologischem Material

Autor: Kleinert, J.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982847

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 22.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Literatur

[1]) *J. Grossfeld*, Z.U.L. **63**, 555 (1932).
[2]) *J. König*, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genussmittel 3. I. 468.
[3]) *J. Pritzker* und *R. Jungkunz*, diese Mitt. **30**, 256 (1939).
[4]) *J. Pritzker* und *R. Jungkunz*, Pharm. Acta Helv. **11/12**, 225 (1939).
[5]) *J. Pritzker* und *R. Jungkunz*, Pharm. Acta Helv. **11/12**, 153 (1941); **4/5**, 109 (1942); **11**, 259 (1942); **18**, 651 (1943); **19**, 47 (1944); **19**, 76 (1944); **19**, 106 (1944); **19**, **19**, 152 (1944); **19**, 225 (1944); **19**, 436 (1944).
[6]) *J. Pritzker* und *R. Jungkunz*, diese Mitt. **34**, 185 (1943).
[7]) *J. Pritzker* und *R. Jungkunz*, diese Mitt. **34**, 192 (1943).
[8]) *H. Hadorn*, diese Mitt. **42**, 226 (1951).
[9]) *H. Hadorn* und *R. Jungkunz*, diese Mitt. **41**, 155 (1952).

Die Bestimmung der Milchsäure in biologischem Material

Von *J. Kleinert*
(aus Dissertationsarbeit ETH, Zürich)

Allgemeines

Die meistgebräuchlichen Methoden zur Bestimmung der Milchsäure in biologischem Material basierten während vieler Jahre auf dem Prinzip der Oxydation zu Acetaldehyd und Destillation desselben in Bisulfitlösung. Das freie Bisulfit wurde dann jodometrisch bestimmt. Für Milch wurde diese Methode von *Troy* und *Sharp* [1]) erfolgreich angewandt, sie ist jedoch lang und umständlich. *Hostettler* [2]) hat sie für Käse eingeführt und damit gute Resultate erhalten. Später entwickelte *Hilling* [3]) eine Methode, bei welcher die Milchsäure mit Äther aus dem proteinfreien Filtrat extrahiert wird. Gleichzeitig erreichte er damit die Elimination anderer störender Substanzen. Durch Zusetzen von Ferrichloridlösung entwickelte sich eine Farbe, die mit einer Standardfarbe verglichen wird. Die Association of Official Agricultural Chemists [4]) hat diese Methode für die USA als offiziell erklärt. Eine für Milchsäurebestimmungen in Blut entwickelte Methode von *Mendel* und *Goldschneider* [5]) wurde durch *Heinemann* und *Meanwhile* [6]) modifiziert, um sie auch für Milch und Milchprodukte anwenden zu können. Mittelst Schwefelsäure wird die Milchsäure in einem eiweiss- und lactosefreien Filtrat zu Acetaldehyd oxydiert, welcher mit Veratrol eine Farbreaktion bildet. Durch Vergleich mit einer Standardfarblösung lässt sich der Milchsäuregehalt daraus bestimmen. Sie geben auf Milch bezogen eine Sicherheit von $\pm$ 4 mg% an, weisen aber zugleich auf die grossen Schwierigkeiten hin, welche sich einer reproduzierbaren Farbentwicklung entgegenstellen. Diesen

Nachteil beseitigten *Barker* und *Summerson* [7]) bei ihrer Methode für Blut und Gewebe durch Anwendung der p-Oxydiphenyl-Reaktion nach *Eegrive* [8]). Zur Entfernung der Glucose aus dem eiweissfreien Filtrat wandten sie die Kupferhydroxyd-Calciumhydroxydmethode von *van Slyke* [9]) an. Sodann wird die Milchsäure in konzentrierter Schwefelsäure zu Acetaldehyd oxydiert und p-Oxydiphenyl als Farbreagens zugesetzt, welches viel empfindlicher sein soll als Veratrol. Zwischen dem Acetaldehyd und dem para-Oxydiphenyl bildet sich eine Purpurfarbe, deren Intensität colorimetrisch oder photometrisch gemessen wird. Die Messergebnisse vergleicht man mit Farbintensitäten, welche durch künstlich angesetzte Standardlactatlösungen von genau bekanntem Lactatgehalt entwickelt wurden. Daraus lässt sich der Milchsäuregehalt leicht und rasch berechnen. Zudem hat diese schnelle und bequeme Methode den Vorteil, dass sie von einer Grosszahl organischer Verbindungen, welche der Milchsäure sehr nahe stehen, nicht beeinflusst wird. *Davidson* [10]) hat dieses Vorgehen etwas modifiziert, indem er die Entfernung von Eiweiss und Lactose durch Befolgung der Methode von *Troy* und *Sharp* [1]) vereinfachte. Diese beiden Komponenten werden dabei durch Anwendung von Kupfersulfat und Calciumhydroxyd ausgefällt. Die übrigen Ausführungen sind im wesentlichen gleich denen von *Barker* und *Summerson* [7]). Für Milch und Milchpulver wurde ihre Methode mit grossem Erfolg angewendet. Wie aus einer Anzahl quantitativer Versuche hervorgeht, ist die Sicherheit der Methode recht gut. Die Wiederauffindung der in Form von Lithiumlactat zu Milch zugegebenen Milchsäure variierte von 96 bis 103 %, wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist.

Tabelle 1

Zugesetzte Milchsäure	Aufgefundene Milchsäure	
mg / 100 ml	mg / 100 ml	%
20	19,7	99,0
40	41,1	103,0
60	57,4	96,0
100	97,7	98,0
140	141,2	101,0
160	162,0	102,0
200	200,7	100,0
400	400,8	100,0

Die Unterschiede ergeben sich bei der Bestimmung der Lactate in den präparierten Filtraten einerseits aus der Methode selbst, anderseits aus der generellen Anwendung des Korrekturfaktors 100/92 für die Absorption im Niederschlag, der für die in Tabelle 1 zusammengestellten Proben zwischen 100/90 bis 100/94 variieren würde. Versuche mit Zugabemengen unter 10 mg pro 100 ml Milch erfordern keine Verdünnung des Primärfiltrates. Die Wiederauffindungswerte

lagen aber bei Anwendung des vorerwähnten Korrekturfaktors von 100/92 10 bis 15 % zu tief. Wo grössere Sicherheit gewünscht wird, ist unter dem 10-mg-Gehalt pro 100 ml ein Korrekturfaktor von 1,25 statt 1,06 anzuwenden. In Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Werte betrug die mittlere Differenz zwischen Doppelproben jeder gegebenen Konzentration 2 %. Ferner wurde ein Vergleich mit der Destillationsmethode von *Troy* und *Sharp* [1]) angestellt. Als Ausgangsmaterial diente eine frische mit Sc. cremoris beimpfte Rohmilch. Diese wurde bei 30° C bebrütet und die Säuerung durch Titration laufend verfolgt, bis der gewünschte Säuregrad erreicht war. Dann erfolgte die Zubereitung der Filtrate nach der Kupfersulfat-Calciumhydroxydmethode, worauf die Milchsäure nach der Destillations- und p-Oxydiphenylmethode bestimmt wurde. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse beider Methoden einander gegenübergestellt.

Tabelle 2

Anzahl Bestimmungen	Destillationsmethode von *Troy* und *Sharp*	p-Oxydiphenylmethode von *Davidson*
	mg / 100 ml	mg / 100 ml
1	24,6	26,3
2	35,7	34,0
3	42,5	41,4
4	43,5	41,3
5	48,3	49,1
6	67,3	69,5

Diese Zusammenstellung zeigt eine recht gute Übereinstimmung der beiden Methoden.

Eine Grosszahl weiterer Versuche erfolgte mit frischer Milch, die immer eine kleine Menge nativer Milchsäure enthält. *Troy* und *Sharp* [1]) fanden mit ihrer Destillationsmethode einen Mittelwert von 2 mg%, *Gould* [11]) nach der Ätherextraktionsmethode von *Hilling* [3]) 1—3 mg% und *Davidson* [10]) mit der p-Oxydiphenylmethode 1,5—2,0 mg% pro 100 ml Milch. Die mit der p-Oxydiphenylmethode ermittelten Werte stimmen somit gut mit den anderen Resultaten überein. Als grösster Vorteil der von *Davidson*[10]) entwickelten Methode ist zu nennen, dass sie sich für serienmässige Milchsäurebestimmungen in Milch und Milchprodukten eignet. Bei Milchpulver üben Neutralisation und Trocknung keinen nachteiligen Einfluss auf die Genauigkeit der Bestimmung aus. Dagegen werden mit der Destillationsmethode in neutralisierten Pulvern zu tiefe und mit der Ätherextraktionsmethode zu hohe Resultate erzielt.

Die Milchsäurebestimmung nach *Davidson* [10])

1. Reagenzien

Sämtliche zur Verwendung gelangenden Reagenzien müssen von analytischer Reinheit sein.

Kupfersulfatlösungen. Diese werden hergestellt durch genaues Abwägen des erforderlichen Kupfersulfates ($CuSO_4 + 5H_2O$), das mit destilliertem Wasser quantitativ in einen NP-Messkolben übergeführt und bei 20° C zur Marke aufgefüllt wird.

Lösung I	5 % (w/v)	$CuSO_4 + 5H_2O$
Lösung II	25 % (w/v)	$CuSO_4 + 5H_2O$

Calciumhydroxydsuspension. In einem Mörser sind 300 g reinstes CaO fein zu zerreiben und mit destilliertem Wasser zu einer Suspension anzurühren. Die $Ca(OH)_2$-Suspension wird quantitativ in eine Flasche übergeführt. Total dürfen zur Herstellung nicht mehr als 1400 ml destilliertes Wasser verwendet werden.

Konzentrierte Schwefelsäure. Zur Analyse wird eine reinste, speziell Fe-freie Schwefelsäure mit einer Dichte von 1,84 benötigt.

Para-Oxydiphenyl-Reagenslösung. Diese muss in 0,5%iger NaOH-Lösung 1,5 % (w/v) p-Oxydiphenyl enthalten. Hergestellt wird das Reagens durch Auflösen von 1,5 g p-Oxydiphenyl in 10 ml 5 % (w/v) NaOH-Lösung. Unter ständigem Rühren wird über kleiner Flamme vorsichtig erhitzt, bis der Zusatz vollständig in Lösung gegangen ist. Dann führt man die Lösung quantitativ mit heissem destilliertem Wasser in einen 100-ml-NP-Messkolben über, lässt abkühlen und ergänzt zur Marke. Das fertige Reagens ist nur beschränkt haltbar und muss in einer braunen Flasche aufbewahrt werden.

Grundstandardlösung mit Lithiumlactat. Davidson [10]) stellte diese her durch Auflösen von 0,1067 g Lithiumlactat in einem 1000-ml-NP-Messkolben. Um den Einfluss von Wägefehlern auf ein Minimum zu beschränken, verwendeten wir die 10fache Menge, welche anschliessend entsprechend verdünnt wurde. Diese Grundstandardlösung ist unmittelbar vor Gebrauch aus reinstem Lithiumlactat, welches zuvor im Vakuumtrockenschrank während 2 Stunden bei 70° C getrocknet wurde, herzustellen.

Arbeitsstandardlösung. Von der Grundstandardlösung (10 ml Lithiumlactatlösung in 100-ml-NP-Messkolben) gibt man genau 3, 6, 9 und 12 ml von 20° C in vier 100-ml-NP-Messkolben und füllt mit destilliertem Wasser von derselben Temperatur zur Marke auf. Diese Lösungen enthalten pro ml Mengen von 3, 6, 9 und 12 γ Milchsäure.

2. *Methodik*

Zubereitung des eiweiss- und lactosefreien Filtrates

In ein 50-ml-NP-Messkölbchen pipetiert man 5 ml Milch und 35 ml destilliertes Wasser von genau 20° C. Unter ständigem Schütteln lässt man 0,5 ml 5%ige Kupfersulfatlösung zutropfen. Dann verbringt man das Messkölbchen in ein Wasserbad von 90° C, um den Inhalt unter ständigem Schwenken möglichst rasch auf 45—47° C aufzuwärmen. Nach Erreichen dieser Temperatur werden 5 ml der 25%igen Kupfersulfatlösung zugesetzt. Dann wird die Probe für weitere 10 Minuten in einem Wasserbad bei 45—47° C gehalten. Anschliessend setzt man 5 ml der $Ca(OH)_2$-Suspension zu, füllt mit destilliertem Wasser zur Marke auf und gibt weitere 0,2 ml Wasser zu als Ausgleich für das Abkühlen des Inhaltes auf 20° C. Das Kölbchen wird kräftig durchgeschüttelt und für weitere 10 Minuten im Wasserbad bei 45—47° C belassen. Dann wird in Eiswasser unter 20° C abgekühlt und der Inhalt durch ein gewöhnliches Faltenfilter filtriert. Bei längerem Stehen tendiert das Filtrat zur Ausfällung von $CaSO_4$, doch wird das weitere Vorgehen dadurch nicht gestört. Filtrate von Milch, welche bereits eine Proteolysis durchgemacht haben, zeigen eine Purpurfarbe, welche durch die «Biuret»-Reaktion entsteht. Bei der Zugabe der konzentrierten Schwefelsäure verschwindet diese Farbe wieder und übt auf die weitere Bestimmung keinen störenden Einfluss aus.

Die Milchsäurebestimmung

Zur Bestimmung wird ein Filtrat benötigt, welches zwischen 1—10 γ Milchsäure enthält. Filtrate mit grösseren Mengen sind entsprechend zu verdünnen. Primärfiltrate, welche beträchtliche Verdünnungen erfordern, lassen sich einige Stunden bei Zimmertemperatur oder über Nacht im Kühlschrank aufbewahren, ohne dass Milchsäureverluste auftreten. Verdünnte Filtrate, die weniger als 10 γ Milchsäure pro ml enthalten, sind möglichst schnell aufzuarbeiten, ansonst Milchsäureverluste entstehen.

Von einem Filtrat, welches zwischen 1—10 γ Milchsäure pro ml enthält, gibt man 1 ml in ein Pyrex-Gärprobeglas von ca. 50 ml Fassungsvermögen und setzt einige Tropfen der 5%igen $CuSO_4$-Lösung zu. Diese bewirkt, wie *Barker* und *Summerson* [7]) gezeigt haben, ein Maximum an Farbentwicklung und leistet ein Minimum an Störungen durch Kationen. Weiter lässt man aus einer Bürette 6 ml konzentrierte Schwefelsäure zufliessen, verbringt dann das Gärprobeglas für 5 Minuten in ein kochendes Wasserbad und kühlt darnach den Inhalt in Eiswasser unter 20° C ab. Der gekühlten Probe werden 3 Tropfen des p-Oxydiphenylreagenses zugesetzt und kräftig durchgeschüttelt zur Sicherstellung einer feinen Dispersion des Reagenses, welches in Säure unlöslich ist. Das Gärprobeglas kommt dann für 15 Minuten in ein Wasserbad von 30° ± 2° C. Darnach setzt man erneut einen Tropfen der Reagenslösung zu, schüttelt wiederum kräftig durch

und verbringt die Probe für weitere 15 Minuten in dasselbe Wasserbad. Unmittelbar nach dieser zweiten Wärmeperiode bringt man das Gärprobeglas für 90 Sekunden in ein siedendes Wasserbad, um das überschüssige suspendierte Reagens vollständig aufzulösen. Nach dieser Hitzebehandlung wird die Probe sofort in Eiswasser unter 20° C gekühlt und die entwickelte Farbe in einem Elektrophotometer unter Verwendung der 10-mm-Küvette colorimetrisch gemessen. Der entsprechende Milchsäuregehalt lässt sich an Hand der Standardkurve unter Berücksichtigung des Verdünnungsgrades einfach berechnen.

Die Farbmessung

Barker und *Summerson* [7]) benutzten die spektrophotometrischen Daten von *Block* und *Bolling* [12]), deren graphische Absorptionsaufzeichnungen bei 560 mμ ein Absorptionsmaximum zeigen. Im Bestreben, diese noch enger zu begrenzen, wurden Messungen mit einem Elektro-Spektrophotometer ausgeführt, wobei es sich zeigte, dass die Absorption zwischen 540—590 mμ liegt und, wie aus der Kurve ersichtlich ist, ein Maximum bei 570 mμ aufweist.

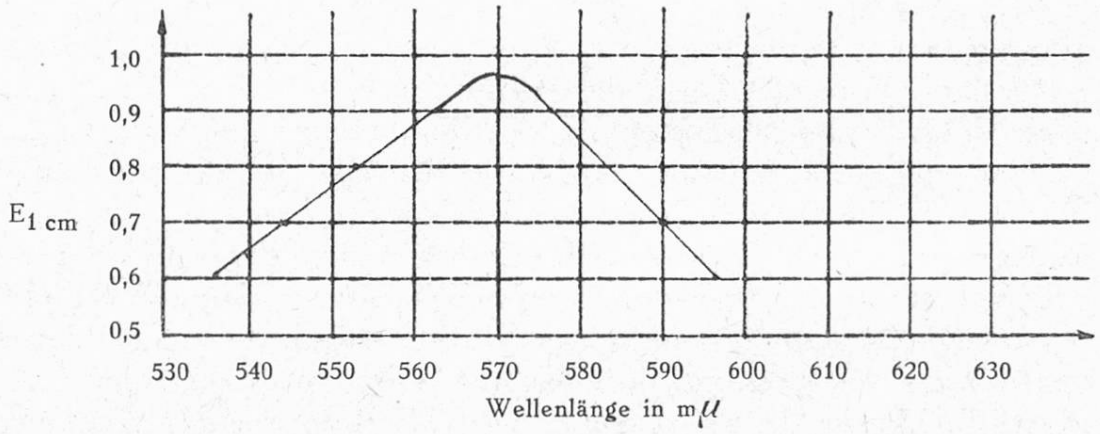

Abbildung 1
Graphische Darstellung der Absorption nach *Davidson* [10])

Wird der Farbstandard im Spektrophotometer unter Verwendung einer 10-mm-Küvette und einer Wellenlänge von 570 ± 5 mμ gemessen, so erhält man eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Milchsäurekonzentration, wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist.

Die Grosszahl der Messungen hat *Davidson* [10]) mit dem «Miller-Absorptiometer» ausgeführt, basierend auf den Aufzeichnungen von *Morris* [13]), unter Verwendung des Illford-Spectrumfilters Nr. 605, gelb-grün, mit einem Durchlässigkeitsmaximum bei ca. 555 mμ. Mit diesem Instrument betragen die Extinktionswerte der 10-mm-Schicht für 3, 6, 9 und 12 γ Milchsäure 0,226, 0,442, 0,652 und 0,838, woraus sich eine lineare Beziehung ergibt.

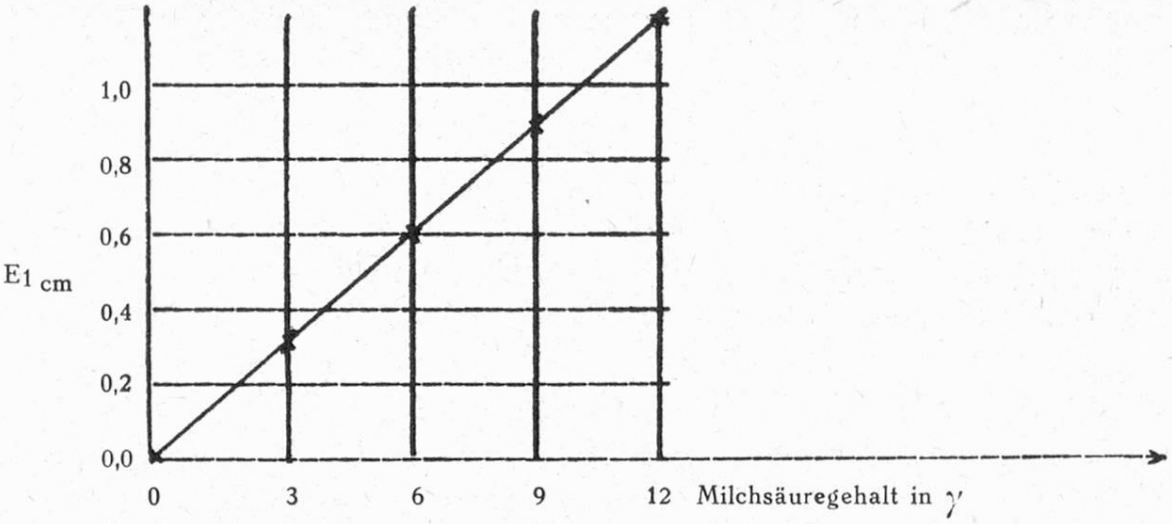

Abbildung 2
Graphische Darstellung der Extinktion nach *Davidson* [10])

Berechnung der Resultate

Bei jeder Bestimmung ist von Anfang an eine Blindprobe mitzuführen. Dabei ist das Verdünnen und Enteiweissen so vorzunehmen, wie wenn es sich um eine wirkliche Probe handeln würde. Diese darf keine Farbreaktion mit dem p-Oxydiphenyl zeigen und dient zur Einstellung des Photometers auf 100 % Durchlässigkeit, was einem Extinktionswert von Null entspricht. Aus der prozentualen Durchlässigkeit lässt sich die unbekannte Lactatkonzentration an Hand einer Eichkurve berechnen, welche gestützt auf bekannte Lactatkonzentrationen ermittelt wurde. Bei der Aufnahme einer solchen Eichkurve sind die Standardlactatlösungen ebenfalls dem Cu- und Ca-Verfahren zu unterwerfen. Statt der direkten Potentiometerablesung und dem Aufsuchen des entsprechenden Lactatgehaltes auf der Eichkurve lässt sich dieser bei Verwendung eines Photometers mit 0—100 Linearskala noch genauer aus der Extinktion, die den Wert von 2-log G darstellt, berechnen, wobei G die prozentuale Durchlässigkeit bedeutet, welche durch das Photometer angezeigt wird. Die Lactatkonzentration der unbekannten Lösung berechnet sich durch Multiplikation des 2-log G-Wertes mit dem Proportionalitätsfaktor, welcher durch sorgfältige Analysen von Lactatlösungen bekannter Konzentration zu bestimmen ist. Diese Art der Berechnung hat den grossen Vorteil, dass Störungen des Messgerätes sofort erkennbar sind.

Eigene Versuche und Modifikationen

1. Aufnahme einer Standardkurve

Bei Verwendung bestehender Kurven aus der Literatur läuft man Gefahr, Fehlergebnisse zu erhalten, weil sie den individuellen Verhältnissen zu wenig Rechnung tragen. Deshalb ist es unbedingt notwendig, vorgängig eigener Be-

Tabelle 3

Zusammenstellung der prozentualen Durchlässigkeit und der daraus resultierenden Extinktionswerte

Standardkurven	Prozentuale Durchlässigkeit in %	Extinktionswerte 2—log G	Vorgelegte Milchsäure in γ
I.	100,0	0	0
	64,85	0,18809	3
	41,8	0,37882	6
	26,0	0,58503	9
	17,8	0,74958	12
II.	100,0	0	0
	64,0	0,19382	3
	42,0	0,37675	6
	+	+	9
	+	+	12
III.	100,0	0	0
	62,3	0,20551	3
	39,0	0,40894	6
	25,35	0,59602	9
	17,15	0,76574	12
IV.	100,0	0	0
	63,45	0,19757	3
	40,3	0,39469	6
	25,6	0,59176	9
	17,9	0,74715	12

Daraus ergeben sich folgende Mittelwerte:

$$63{,}65\ \% \quad 0{,}19775 = 3\ \gamma, \quad 1\ \gamma = \frac{0{,}19775}{3} = \mathit{0{,}065915}$$

$$40{,}74\ \% \quad 0{,}38980 = 6\ \gamma, \quad 1\ \gamma = \frac{0{,}38980}{6} = \mathit{0{,}064966}$$

$$25{,}65\ \% \quad 0{,}59093 = 9\ \gamma, \quad 1\ \gamma = \frac{0{,}59093}{9} = \mathit{0{,}065657}$$

$$17{,}61\ \% \quad 0{,}75415 = 12\ \gamma, \quad 1\ \gamma = \frac{0{,}75415}{12} = \mathit{0{,}062845}$$

stimmungen eine genaue Standardkurve aufzunehmen. Die Milchsäuremenge der zu bestimmenden Proben darf dabei nach *Barker* und *Summerson* [7]) nicht mehr als 1—10 γ betragen, denn auch die Methode von *Davidson* [10]) stimmt für höhere Werte nicht mehr genau.

Die Herstellung der Grundstandard- und Arbeitsstandardlösung erfolgte wie auf Seite 235 ff. beschrieben. Zur Aufnahme der Standardkurve verwendeten wir von jeder Arbeitsstandardlösung 3 ml, um für die 10-mm-Küvette unseres Photometers genügend Farblösung zu erhalten. Dies bedingte auch eine Verdreifachung der für eine Bestimmung erforderlichen Reagentien. Da keine Pyrex-Reagiergläser zur Verfügung standen, verwendeten wir gewöhnliche 50-ml-Gärprobegläser. Um die Proben während der H_2SO_4-Zugabe und speziell nach dem Zusetzen des p-Oxydiphenylreagenses innig durchmischen zu können, stellten wir in jedes Reagierglas einen Glasstab. Im übrigen führten wir die Farbreaktion wie in der Methode von *Davidson* [10]) beschrieben aus. Das Messen der gefärbten Lösungen erfolgte in der 10-mm-Küvette im *«Lumetron Electro Photometer»* Mod. 402 EF unter Verwendung des grünen G.A.B. Interferenzfilters mit einem Absorptionsmaximum bei 575 mμ und den Blenden Nr. 6 unten und Nr. 5 oben im Strahlengang. Aus den abgelesenen Durchlässigkeitswerten haben wir die Extinktion wie beschrieben berechnet. Die in Abbildung 3 S. 241 dargestellte Standardkurve bildet das Mittel aus vier zu verschiedenen Zeitpunkten ausgeführten Bestimmungen. Die Proben einer Bestimmungsserie wurden immer doppelt ausgeführt. In Tabelle 3 sind die Extinktionswerte zusammengestellt. Der Verlauf der Extinktionsgeraden ist aus Abbildung 3 ersichtlich.

2. *Enteiweissungsversuche*

Zur colorimetrischen Milchsäurebestimmung können nur protein- und lactosefreie Filtrate verwendet werden. Durch Versuche soll nun festgestellt werden, ob durch die Enteiweissung und Entzuckerung nicht auch Milchsäure mit verloren geht. Deshalb versetzten wir verschiedene Proben frischer Vollmilch, die praktisch noch keine Milchsäure enthält, mit bekannten Mengen Milchsäure in Form von Lithiumlactat, wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist.

Bei den so angesetzten Proben wurde die Enteiweissung und Entzuckerung nach der durch uns modifizierten Methode von *Davidson* [10]) vorgenommen.

Tabelle 4

Nr.	Zugegebenes Lithiumlactat in mg	Zu ml Milch von D 1,032	Entspricht mg Milchsäure	Davon zur Analyse verwendet
1	213,4	1000 ml	200,0	5,0 ml
2	533,5	100 ml	500,0	5,0 ml
3	1600,5	100 ml	1500,0	5,0 ml
4	3201,0	100 ml	3000,0	5,0 ml
5	—	100 ml	—	5,0 ml

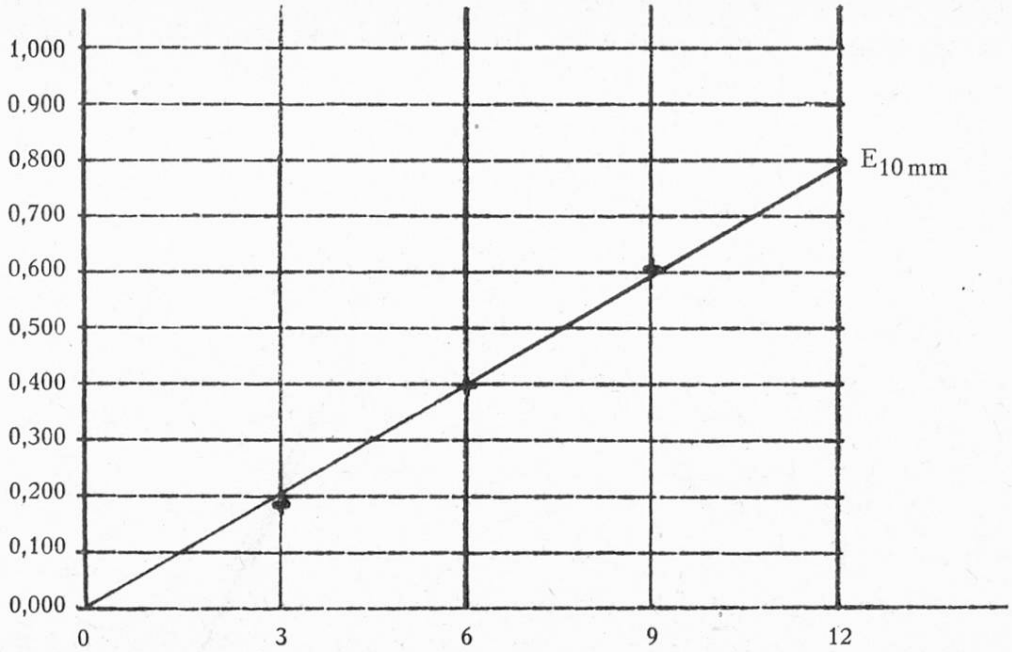

Abbildung 3
Graphische Darstellung der Extinktionswerte

Mittelwerte für:	1 γ	=		=	0,06464
	3 γ	=	63,65 %	=	0,19775
	6 γ	=	40,74 %	=	0,38980
	9 γ	=	25,65 %	=	0,59693
	12 γ	=	17,61 %	=	0,75415

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, traten keine Milchsäureverluste ein.

Tabelle 5

Nr.	Zugegebene Milchsäure in %	Wieder aufgefundene Milchsäure in %	± Abweichung der aufgefundenen Werte	Prozentuale Abweichung der aufgefundenen Werte
1	0,02	0,02166	+ 0,00126	+ 6,3 mg%
2	0,5	0,4977	— 0,0229	— 4,58 mg%
3	1,5	1,4197	— 0,083	— 5,35 mg%
4	3,0	3,145	+ 0,145	+ 3,86 mg%

Wie aus der Tabelle 5 hervorgeht, schwanken die wieder aufgefundenen Werte zischen 95—105 %. Das Mittel liegt noch knapp im Bereich des Zulässigen. Wie schon an früherer Stelle erwähnt, liegt die Ursache der Abweichungen einerseits in der Methode selbst, anderseits resultieren sie aus der generellen Anwendung des Korrekturfaktors. Des weitern ist zu berücksichtigen, dass schon beim Einwägen solch geringer Mengen Lithiumlactat eine gewisse Streuung nicht zu vermeiden ist. Da zur Farbreaktion nur äusserst kleine Milchsäuremengen

benötigt werden, erfordern die zu analysierenden Proben je nach Milchsäuregehalt oft beträchtliche Verdünnungen. Um von dieser Seite grössere Fehler auszuschliessen, ist es unbedingt notwendig, dass mit genau ausgewogenen Glaswaren gearbeitet wird, denn die Präzisionsbezeichnung «NP» bietet keine Gewähr für genaue Eichung, wovon sich jedes Laboratorium selbst überzeugen kann. Auch ist darauf zu achten, dass beim Pipettieren sowie beim Einstellen von Messlösungen zur Marke stets bei 20° C gearbeitet wird. Bei den zu verwendenden Pipetten ist darauf zu achten, dass sie fein ausgezogene und unverletzte Spitzen aufweisen. Die Nachlaufzeiten sind zu standardisieren, und für die Dauer einer Versuchsperiode ist an der einmal gewählten Pipettiermethode festzuhalten.

3. Milchsäurebestimmungen in Käse

Da in der Literatur keine Angaben zu finden sind, ob sich die Methode von *Davidson* [10]) auch für Milchsäurebestimmungen in Käse eignet, stellten wir in dieser Richtung weitere Versuche an. Um Lactatverluste zu vermeiden, legten wir die Käseproben bis zu ihrer Aufarbeitung in n/4NaOH-Lösung ein. Da aber deren Einfluss auf die Enteiweissung und Entzuckerung nicht bekannt war, führten wir in dieser Richtung zuerst einige Probebestimmungen durch. Zu diesem Zweck stellten wir durch Weglassen der Milchsäurebakterienkultur ein weitgehend milchsäurefreies Modellkäschen her. Von der gut abgepressten Käsemasse wurden in mehrere Reagiergläser genau 5 g eingewogen und mit 30 ml n/4 NaOH-Lösung überschichtet. Des weitern setzten wir den Proben 0,2; 0,5; 1,5 und 3,0 % Milchsäure in Form von Lithiumlactat zu. Um den nativen Milchsäuregehalt der Käsemasse zu bestimmen, führten wir eine Blindprobe ohne Lithiumlactatzusatz mit. Die Käse-Laugeemulsion brachten wir quantitativ in ein 100-ml-NP-Messkölbchen, setzten die Zucker und Eiweiss ausfällenden Reagentien zu und füllten mit dest.Wasser zur Marke auf. Beim Filtrieren stellte sich heraus, dass eine direkte Präparation ungeeignet ist, indem praktisch kein Filtrat erhalten wurde. Für die weiteren Versuche nahmen wir nur einen aliquoten Teil der Käseemulsion, welcher, wie in der Methode von *Davidson* [10]) angegeben, im Trockenmassegehalt annähernd demjenigen von 5 ml Vollmilch entsprach. Die Verdünnung wurde wie folgt vorgenommen:

5,0 g Käse + 30 ml n/4NaOH
+ 2 ml Lithiumlactat (0,01 g M.S.) in ein 100-ml-Messkölbchen.

Davon zur	Enteiweissung	20 ml			
	in ein K_{50}		darin sind	0,002	g M.S. enthalten
	vom Filtrat	10 ml			
	in ein K_{100}		darin sind	0,000 4	g M.S. enthalten
davon zur	Analyse	1 ml	darin sind	0,000 004	g M.S. enthalten
			=	*4 γ Milchsäure*	

Legende: K = NP-Messkölbchen
50 = Index, gibt jeweils den Inhalt des Messkölbchens an.

Dieses Verdünnungsschema legten wir sämtlichen Testversuchen zugrunde, wobei die letzte Verdünnung jeweils je nach Säuregrad und pH-Wert der zu verarbeitenden Probe variierte. So konnte bei frischer Milch oder frischer Käsemasse, die nur sehr wenig Milchsäure enthielten, direkt 1 ml aus der K_{50}-Verdünnung zur Farbreaktion verwendet werden. Die Ergebnisse des ersten Enteiweissungsversuches sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6

Probe	Galvanometer-Ablesung in % I	Galvanometer-Ablesung in % II	Extinktion 2—log G Mittelwert	γ Milchsäure	Milchsäure korrigiert in %	Vorgelegte Milchsäure in %	± Abweichung in %
Testls.	100,0	100,0	0	0	0	0	0
1	53,6	55,0	0,26520	4,1009	0,2050	0,200	+ 2,52
2	51,0	50,3	0,29564	4,5699	0,4569	0,500	— 8,11
3	33,5	32,8	0,47952	7,4248	1,8562	1,500	+ 23,70
4	33,5	33,5	0,47496	7,2599	3,6299	3,000	+ 20,33
5 Bld.	98,7	98,7	0,00546	0,0844	0,0844	—	—

Die Ergebnisse dieses Versuches sind recht unbefriedigend ausgefallen. Der Fehler liegt aber nicht an der Methode selbst, sondern, wie sich herausstellte, in der Zubereitung der Käseemulsion. Wie aus weiteren Versuchen hervorging, ergaben ganz frisch konservierte Proben unterschiedliche Resultate, weil die Käsemasse in der kurzen Zeit von der Lauge nicht vollständig aufgelöst wurde. Es lag somit keine homogene Emulsion vor, was beim Entnehmen aliquoter Teile zwangsläufig zu Fehlbestimmungen führen musste. Um diese Fehlerquelle fortan auszuschalten, verbrachten wir sämtliche Proben vorgängig für eine Stunde in ein Wasserbad von 70° C und schüttelten sie periodisch kräftig durch. Nach dieser Vorbehandlung waren alle Käseteilchen vollständig gelöst, und die Emulsion konnte quantitativ in ein 100-ml-NP-Messkölbchen übergeführt werden. Die Käseemulsion kühlten wir auf 20° C ab, ergänzten mit dest. Wasser zur Marke und schüttelten das Ganze erneut kräftig durch. Von dieser homogenen Lösung wurden jeweils die zur Enteiweissung erforderlichen 20 ml entnommen.

Der Versuch wurde in etwas abgeänderter Form unter Berücksichtigung des vorstehend Gesagten wiederholt. Als Ausgangsmaterial dienten zwei während 5 Monaten in n/4 NaOH-Lösung konservierte Käseproben. Die erste Probe wurde 3 Stunden und die zweite 15 Stunden nach beendeter Fabrikation dem Modellkäschen entnommen. Der Lactosegehalt der zweiten Probe betrug noch 0,09 %, war also praktisch abgebaut.

Nachdem die Proben wie oben beschrieben emulgiert waren, pipettierten wir von jeder zweimal 20 ml in 50-ml-NP-Messkölbchen und bezeichneten diese mit I, Ia, II, IIa. Um noch einmal festzustellen, ob durch die Klärung wirklich keine Milchsäureverluste eintreten, setzten wir den Proben Ia und IIa je 0,5 % Milchsäure in Form von Lithiumlactat zu. In der Bestimmung hielten wir uns

an die Methode von *Davidson* [10]), mit dem Unterschied, dass wir auch vom 5%igen $CuSO_4$ sowie dem p-Oxydiphenyl genau abgemessene Mengen zusetzten und nicht einfach einige Tropfen. Die Resultate sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7

Milchsäurebestimmungen in Käse mit und ohne Lithiumlactatzusätze

Probe	I. Best. %	II. Best. %	Mittelwert %	Extinktion 2—log G	γ Milchsäure	% Milchsäure	Milchsäure vorgelegt	Abweichung in %
Testls.	100,0	100,0	100,0	0	0	0	—	—
I	93,0	91,8	92,4	0,03446	0,5328	0,053	—	—
Ia	44,4	43,2	43,9	0,35778	5,5349	0,553	0,5	+ 0,0002
II	38,9	36,8	37,8	0,42193	6,5274	1,632	—	—
IIa	28,5	28,7	28,6	0,54325	8,4042	2,101	0,5	— 0,0307

Die jeweils zusammengehörenden Doppelproben stimmen nach Abzug der zugesetzten Milchsäuremenge sehr gut überein. Somit darf diese Art der Emulsionsvorbereitung als richtig betrachtet werden, weshalb wir sie für die folgenden Bestimmungen beibehalten haben. Im weitern stimmten die ermittelten Milchsäuremengen auch gut mit den titrierten Gesamtsäuregraden nach *Soxhlet-Henkel* überein. Aus den bisherigen Tastversuchen geht hervor, dass es möglich ist, in Form von Lithiumlactat zugesetzte Milchsäuremenge genau zu ermitteln. Da es uns interessierte, ob mit dieser Methode auch biologisch gebildete Milchsäure, welche mit dem Produkt viel inniger verbunden ist, voll erfasst werden kann, stellten wir unter Verwendung einer Mischkultur von Lb. helveticus und Sc. thermophilus als Reifungserreger ein ca. 250—300 g schweres Modellkäschen her. Das in die Form abgefüllte Käschen liessen wir während einer Stunde bei 18—20° C abtropfen, indem wir es alle 15 Minuten wendeten. Dann wurde der Gärungsprozess durch Einlegen in die Tiefgefrierzelle künstlich unterbunden. Mittelst einer elektrischen Thermosonde verfolgten wir den Temperaturrückgang im Innern. Nachdem die Temperatur auf 5° C abgesunken war, durfte angenommen werden, dass keine störende Bakterientätigkeit mehr stattfand. Um den quantitativen Abbau der Lactose und ihre Umsetzung in Milchsäure genau erfassen zu können, durfte während des Gärungsverlaufes keine Molke verloren gehen. Deshalb verbrachten wir die kalte Käsemasse nach aseptischer Entfernung der äusseren Schicht (um Infektionen mit unerwünschten Organismen zu vermeiden) in spezielle sterile Gärröhren. Diese füllten wir ca. zu 3/4 mit Käsemasse, stampften sie etwas zusammen und verschlossen die Gläser anaerob, damit die Mikroorganismen bei der weiteren Bebrütung (40° C) ähnliche Verhältnisse vorfanden wie im Käschen. Der Gärungsverlauf wurde, wie aus Tabelle 8 ersichtlich ist, in zunehmenden Zeitabständen kontrolliert, wobei wir die Ausgangsdaten für Säuregrad, pH, Lactose und Milchsäure unmittelbar nach dem Abfüllen in die

Gärröhren bestimmten. Bei den späteren Kontrollen konnten der Säuregrad und das pH jeweils sofort ermittelt werden, dagegen war dies bei der Lactose und Milchsäure aus Zeitgründen nicht möglich, weshalb wir die entnommenen Proben konservierten. Für sämtliche Analysen sind 5 g Käse verwendet worden. Damit für die durchzuführenden Analysen ein einheitliches Material vorlag, wurde jeweils der gesamte Inhalt einer Gärröhre in einen Mörser übergeführt und gründlich emulgiert. Die zur Lactosebestimmung erforderliche Menge von 5 g rieben wir in einem Mörser mit heissem destilliertem Wasser an, führten sie quantitativ in einen 100-ml-NP-Messkolben über und enteiweissten wie in der Mikromethode von *Stiles* und Mitarbeitern [14]) beschrieben. Das Filtrat stellten wir bis zur endgültigen Bestimmung in den Eisschrank. Für die Milchsäurebestimmung gaben wir stets zwei Proben à 5 g in kleine braune Fläschchen zu 30 ml n/4 NaOH-Lösung und bewahrten sie bis zur weiteren Aufarbeitung bei Zimmertemperatur auf. Die erste Milchsäurebestimmung führten wir nach 18, die zweite nach 42 Tagen aus. Die Versuchsdaten sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8

Zeit in Stunden	pH	SH	Lactose in %	Rückgang der Lactose in %	Milchsäure nach 18 Tagen bestimmt %	Milchsäure nach 42 Tagen bestimmt %	Mittelwert in %
0	6,92	14,37	3,040	—	0,1529	0,1417	0,1498
4	6,02	31,16	2,720	0,320	0,3367	0,3115	0,3248
8	5,56	47,93	2,450	0,590	0,5093	0,5419	0,5256
12	5,27	63,11	2,174	0,866	0,7539	0,8089	0,7814
27	4,98	100,65	1,174	1,866	1,1472	1,1066	1,1269

Bis auf die letzte Probe nach 27 Stunden stimmt die Zunahme der Milchsäure mit der Abnahme des Lactosegehaltes gut überein. Da die verwendete Ausgangsmilch nicht steril war, muss angenommen werden, dass dieses Lactatmanko auf die Tätigkeit lactatabbauender Mikroorganismen zurückzuführen ist. Im übrigen geht auch aus diesem Versuch hervor, dass die Methode brauchbare Werte liefert. Es empfiehlt sich deshalb, diese colorimetrische Methode zu Vergleichsuntersuchungen für Milchsäurebestimmungen an Käse mit einer der bekannten Destillationsmethoden (Dr. *Hostettler*) heranzuziehen. Der Vorteil gegenüber den Destillationsmethoden liegt darin, dass die Methode von *Davidson* [10]) rasch geht und ein serienweises Arbeiten erlaubt.

Zusammenfassung

1. In grossen Zügen wird die Entwicklung der Milchsäurebestimmungsmethoden für biologisches Material (Blut, Gewebe und Milch) skizziert.
2. Die Klärung sowie die Entzuckerung und Enteiweissung der Testlösungen erfolgte mittelst Kupfersulfat und Calciumhydroxyd.
3. Milchsäurebestimmungen an ein und demselben Material nach der Destillationsmethode von *Troy* und *Sharp* [1]) und der colorimetrischen Methode von *Davidson* [10]) zeigten in Bezug auf Genauigkeit praktisch keine Unterschiede.
4. Die colorimetrische Milchsäurebestimmung nach *Davidson* [10]) erfordert einen relativ geringen Arbeitsaufwand und ist, da sie Serienuntersuchungen erlaubt, äusserst speditiv.
5. Ausführliche Beschreibung der Methodik.
6. Eigene Versuche bestätigten, dass die Methode von *Davidson* [10]) geeignet ist, sowohl zugesetzte Milchsäure in Form von Lithiumlactat als auch durch Bakterien gebildete Gärungsmilchsäure in Milch befriedigend zu bestimmen.
7. Es wurde geprüft, ob mit dieser Methode auch die Gärungsmilchsäure im Käse bestimmt werden kann.

Résumé

1. On esquisse en grandes lignes le développement des méthodes de dosage de l'acide lactique dans des matériaux biologiques (sang, tissus, lait).
2. La défécation ainsi que l'élimination des sucres et des protéines dans les solutions ont été faites avec du sulfate de cuivre et de l'hydroxide de calcium.
3. Des dosages d'acide lactique, effectués sur une seule et même substance, ont révélé qu'il n'y a pratiquement aucune différence, quant à l'exactitude, entre la méthode par distillation de *Troy* et *Sharp* [1]) et celle par colorimétrie de *Davidson* [10]).
4. Le dosage colorimétrique de l'acide lactique selon *Davidson* [10]) ne prend relativement que peu de temps et est très expéditif, puisqu'il permet l'analyse en série.
5. Description détaillée du mode opératoire.
6. Des essais de l'auteur confirment que la méthode de *Davidson* [10]) convient pour doser d'une manière satisfaisante aussi bien de l'acide lactique ajouté sous forme de lactate de lithium que l'acide lactique formé par fermentation bactérienne dans le lait.
7. On a contrôlé la possibilité de doser par cette méthode l'acide lactique de fermentation dans le fromage.

Summary

1. The history of the development of the methods for the determination of lactic acid in biological materials (blood, tissues, milk) is briefly reviewed.
2. The solutions have been freed from their sugars and proteins by precipitation with copper sulphate and calcium hydroxide.
3. No difference was found, with regard to the accuracy, between *Troy* and *Sharp's* method (distillation) and *Davidson's* method (colorimetry).
4. *Davidson's* colorimetric method is described in detail. This method requires relatively little time and allows series of determinations to be made.
5. *Davidson's* method gives satisfactory results for the determination of lactic acid of fermentative origin in milk and in cheese, as well as of lactic acid added to milk as lithium lactate.

Literatur

[1]) *H. C. Troy* and *P. F. Sharp,* Mem. Cornell agric. Exp. Sta. Nr. 179 (1935).
[2]) *H. Hostettler,* Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, Bern (1934).
[3]) *F. Hilling,* Journ. Ass. agric. Chem. Wash. **20**, 130 (1937); **25**, 253 (1942).
[4]) Association of official agricultural chemists, Official and tentative methode of analysis 6th. ed. Wash., D.C., U.S.A. (1945).
[5]) *G. Mendel* und *J. Goldschneider,* Biochem. Ztg. **164**, 163 (1925).
[6]) *B. Heinemann* und *Meanwhile,* Joun. of Dairy Sci. **23**, 969 (1940).
[7]) *B. Barker* und *W. H. Summerson,* Journ. biol. Chem. **138**, 535 (1941).
[8]) *E. Eegrive,* Ztschr. anal. Chem. **95**, 323 (1933).
[9]) *D. D. van Slyke,* Journ. biol. Chem. **32**, 455 (1917).
[10]) *J. Davidson,* Journ. of Dairy Res. Vol. **16**, Nr. 2 (1949).
[11]) *J. A. Gould,* Journ. Dairy Sci. **27**, 743 (1944).
[12]) *R. J. Block* und *D. Bolling,* Journ. biol. Chem. **130**, 365 (1939).
[13]) *C. J. O. R. Morris,* Brit. med. Journ. ii, **81** (1944).
[14]) *H. R. Stiles, W. H. Peterson* und *E. B. Fred,* Journ. of Bact., Vol. **12**, 427—439, (1926).

Un dispositif nouveau, simple et pratique d'infection continue

Par *E. Novel* et *A. Münzhuber*

(Laboratoire cantonal d'analyses bactériologiques et biologiques, Institut d'Hygiène, Genève)

Il n'est aucun laboratoire cantonal de chimie ou de bactériologie qui n'ait été amené à procéder à une expertise bactériologique concernant l'efficacité d'un filtre, d'un système de filtration ou relative à la valeur germicide d'un procédé de stérilisation utilisant soit l'ozone, soit les rayons U.V., soit encore les infrarouges, etc.

Lorsqu'il s'agit simplement de contrôler l'efficacité de tels appareils en des temps très brefs, quelques minutes, voire une heure, l'infection continue expérimentale peut employer des moyens de fortune (réservoirs d'eau, par ex., pollués artificiellement, goutte à goutte de suspension microbienne tombant dans l'appareil à examiner, etc.) qui suffisent à permettre les prélèvements des échantillons pour les soumettre à l'examen bactériologique quantitatif.

Mais dès que ce contrôle doit comporter un grand nombre d'analyses, s'étendant sur plusieurs heures ou même sur plusieurs jours de suite, ou s'il s'agit de contaminer artificiellement un liquide quelconque (l'eau par ex.) et de travailler sous pression et à des débits variables, les moyens de fortune ne suffisent plus: