Routineverfahren zur Untersuchung der Anlieferungsmilch auf Fett und Eiweiß sowie bakteriologische und zytologische Beschaffenheit

(§2 (5) der Milch-Güteverordnung vom 9. Juli 1980)

Zusammengestellt durch

- Arbeitskreis der Referent(inn)en für Milchwirtschaft der Länder
- Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
- Institute für Chemie und Technologie der Milch sowie
  Hygiene und Produktsicherheit der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel

Kiel, Juni 2003

Inhaltsverzeichnis **Seite**

1.	**Fett- und Eiweißgehalt**	3
1.1	*Routineverfahren zur Bestimmung des Fett- und Eiweißgehaltes in Rohmilch mittels Infrarotabsorption*	3
2.	**Gefrierpunkt**	7
2.1	*Automatisiertes Thermistor-Kryoskop-Verfahren (DIN EN ISO 5764; Anhang B)*	7
2.2	*Indirekte Methode mittels Messung der Infrarotabsorption und Leitfähigkeit*	7
3.	**Bakteriologische Beschaffenheit**	11
3.1	*Automatisierte fluoreszenzoptische Zählung von Mikroorganismen (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach* § 35 LMBG L01.01-7)	11
4.	**Anzahl somatischer Zellen**	11
4.1	*Automatisierte fluoreszenzoptische Zählung von somatischen Zellen (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG L01.01-1)*	11

1. Fett- und Eiweißgehalt

1.1 Routineverfahren zur Bestimmung des Fett- und Eiweißgehaltes in Rohmilch mittels Infrarotabsorption

1.1.1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zur Bestimmung des Fett- und Eiweißgehaltes in Kuhmilch, auch chemisch konserviert. Die Methode kann auch bei entsprechender Kalibrierung oder Umrechnung – zur Untersuchung von Milch anderer Tierarten (insbesondere von Ziegen und Schafen) – herangezogen werden.

1.1.2 Begriff

Unter dem Fettgehalt der Milch wird der nach der Röse-Gottlieb-Methode (§35 LMBG L01.00-9) festgestellte Gehalt an Fett und fettähnlichen Substanzen in g/100g der Probe verstanden.

Unter dem Eiweißgehalt der Milch wird der nach der Kjeldahl-Methode (§35 LMBG L01.00-10) bestimmbare Stickstoffgehalt der Milch multipliziert mit dem Faktor 6,38 verstanden.

Die mittels der hier beschriebenen Methoden gemessenen Infrarotabsorptionen werden in die o.g. Angaben automatisch transformiert und angezeigt.

1.1.3 Kurzbeschreibung

Die zu untersuchende Probe wird vor der Überführung in das Analysegerät erwärmt und gründlich durchmischt. Die über dispersive IR-Spektroskopie oder über Fourier-Transformation IR-Spektroskopie gemessenen Absorptionswerte werden durch mathematische (chemometrische) Verfahren, z.B. MLR (multiple lineare Regression) oder PLS (Partial Least Square), in Fett- und Eiweißgehalt umgerechnet und in Prozentwerten angegeben. Die Kalibrierungen der Geräte erfolgt durch Vergleichsuntersuchungen mit den für Fett- und Eiweißgehalt o.g. Referenzmethoden.

1.1.4 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine und für diese Untersuchung geeignete Chemikalien zu verwenden. Zur Herstellung der benötigten Lösungen ist nach Herstellerangaben zu verfahren.

1.1.5 Geräte und Hilfsmittel

1.1.5.1 Infrarotspektralphotometer

Es sind nur Geräte, die auf Grund der Herstellerspezifikation und/oder eigenen Untersuchungen für o.g. Zweck geeignet sind, zu verwenden. Darüber hinaus müssen sie der DIN ISO 9622 in der jeweils gültigen Fassung entsprechen.

1.1.5.2 Wasserbad, thermostatisch auf 40°C ± 2°C regelbar oder ein anderes zur Probenerwärmung geeignetes Gerät.

1.1.6 Probenahme

1.1.6.1 Probenahme-Technik

Die Probenahme-Technik ist bei automatisierten Routineverfahren integrierter Bestandteil der Gerätetechnik.

1.1.6.2 Lagertemperatur

Unkonservierte Proben sind bis zum Beginn der Untersuchung bei einer Temperatur im Bereich von +2°C bis +8°C zu lagern.

1.1.6.3 Konservierung

Die nachfolgenden Konservierungsverfahren haben sich bewährt, andere Verfahren können eingesetzt werden, sofern sie das Untersuchungsergebnis nicht beeinflussen. Bei der Überprüfung der Justierung der Geräte ist die Art der Probenkonservierung zu berücksichtigen.

1.1.6.3.1 Eine chemische Konservierung der Rohmilchproben ist durch Zusatz eines Konservierungsmittel auf der Basis von Natriumazid und Chloramphenicol (Azidiol) möglich. Die Endkonzentration des Natriumazids muss ρ = 12 mg/100ml und des Chloramphenicol (Azidiol) ρ = 0,5 mg/100ml betragen. Derart konservierte Romilchproben können maximal vier Tage bei +6°C ± 2°C oder einen Tag bei +8°C ± 2°C und anschließend zwei Tage bei +6°C ± 2°C gelagert werden.

1.1.6.3.2 Eine chemische Konservierung der Rohmilchprobe ist durch Zusatz von standardisierten Tabletten (z.B. Natriumazid-Tabletten[1] oder Bronotabs[2]) entsprechend der Herstellerangaben möglich. Analog hierzu sind auch flüssige Aufbereitungen verwendbar.

1.1.7 Durchführung

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgt grundsätzlich nach den Herstellerangaben zur Bedienung von Infrarot-Messgeräten.

Die folgenden Angaben sind beispielhaft aufgeführt. Es handelt sich hierbei um Mindestanforderungen, die entsprechend dem Anwendungsbereich erweitert werden können:

1.1.7.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung hat nach den Regeln der guten Laborpraxis sowie den Angaben der Gerätehersteller zu erfolgen.

1.1.7.2 Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Geräte

Die Funktionsprüfung der Geräte ist entsprechend folgender Verfahren durchzuführen: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG L 01.00-78 (Bestimmung des Milchfett-, Protein- und Lactosegehaltes in Rohmilch und verarbeiteter Milch – Leitfaden für den Betrieb von Mittel-Infrarot-Geräten – Stand Mai 2002) in Verbindung mit der Ergänzung nach DIN 10478

---

[1] z. B. vom Hersteller Merck KGaA, Darmstadt

[2] z. B. vom Hersteller D&F Control Systems, Inc. USA

(Infrarotspektrophotometrische Inhaltsstoffbestimmung in Rohmilch – Funktionsprüfung der Geräte).

1.1.7.3 Bestimmung

Nach entsprechender Probenvorbereitung und Überprüfung der Geräte kann die Untersuchung von Routineproben erfolgen.

1.1.8 Auswertung

1.1.8.1 Ergebnisangabe

Die Angabe der Messergebnisse erfolgt in Fett- und Eiweißprozenten (g/100g) mit zwei Nachkommastellen; zur Errechnung von Mittelwerten kann die geräteintern ermittelte dritte Nachkommastelle herangezogen werden.

1.1.8.2 Zuverlässigkeit der Methode

Wiederholbarkeit (r)

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die von einem Bearbeiter nach demselben Verfahren an identischem Untersuchungsmaterial mit demselben Gerät in kurzem Zeitabstand erhalten werden, darf in nicht mehr als 5% der Fälle größer als 0,04 g/100 g sein.

Vergleichbarkeit (R)

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die von verschiedenen Bearbeitern nach demselben Verfahren in verschiedenen Laboren mit verschiedenen Geräten an identischem Untersuchungsmaterial erhalten werden, darf in nicht mehr als 5% der Fälle größer als 0,07 g /100 g sein.

Anmerkung: Die Werte zur Wiederholbarkeit (r) und Vergleichbarkeit (R) entsprechen den Angaben im IDF-Standard 141C:2000: Whole milk – Determination of milk fat, protein and lactose content – Guidance on the operation of mid-infrared instruments.

1.1.9 Untersuchungsbericht

Im Untersuchungsbericht ist unter Hinweis auf diese Methode mindestens anzugeben:

- Art, Herkunft und Bezeichnung der Probe
- Art und Datum der Probeentnahme
- Datum der Untersuchung
- ggf. Angabe über eine erfolgte Konservierung
- Untersuchungsbefund als Angabe in Fett- bzw. Eiweißgehalt in Prozent.

Diese Angaben können auch - insbesondere bei elektronischer Berichterstellung- generalisiert hinterlegt werden.

2. Gefrierpunkt

2.1 Automatisiertes Thermistor-Kryoskop-Verfahren

DIN EN ISO 5764 (Milch – Bestimmung des Gefrierpunktes – Thermistor-Kryoskop-Verfahren (Referenzverfahren) – Stand September 2002); Anhang B: Leitfaden zur Anwendung von Routineverfahren mit Thermistor-Kryoskopen.

Anmerkung: Eine Übernahme in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG ist geplant.

2.2 Ermittlung des Gefrierpunktes in Milch durch Messung der Infrarotabsorption und der Leitfähigkeit

2.2.1 Anwendungsbereich

Die Methode beschreibt ein Routineverfahren zur Ermittlung des Gefrierpunktes in Rohmilch.

2.2.2 Begriff

Unter dem Gefrierpunkt der Milch wird die entsprechend dem Thermistor-Kryoskop-Verfahren (siehe Kap. 2.1) gemessene Temperatur, in ° C angegeben, verstanden.

2.2.3 Kurzbeschreibung

Die Ermittlung des Gefrierpunktes durch die Messung der Infrarotabsorption und der Leitfähigkeit ist eine Schnellmethode (Routineverfahren), die mit automatisierten Geräten durchgeführt wird.

Die Infrarotabsorption durch die Milchprobe wird bei verschiedenen Wellenlängen gemessen und die Leitfähigkeit der Milch an der Durchflußküvette bestimmt. Die vom Gerät gemessenen Absorptionswerte werden über eine spezielle Regressionsberechnung (Partielle Least Squares, PLS) in Kombination mit der Leitfähigkeitsmessung in Gefrierpunktwerte transformiert und angezeigt. Die Justierung der Geräte erfolgt mit Milchproben, deren Gefrierpunkt nach dem Thermistor-Kryoskop-Verfahren (Referenzverfahren nach DIN EN ISO 5764) bestimmt wird.

2.2.4 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine und für diese Untersuchung geeignete Chemikalien zu verwenden. Zur Herstellung der benötigten Lösungen ist nach Herstellerangaben zu verfahren.

2.2.5 Geräte

2.2.5.1 Infrarotspektralphotometer mit Leitfähigkeitsmessung (z.B. MSC 4000 und MSC FT 6000)

2.2.5.2 Wasserbad, thermostatisch auf 40°C ± 2°C regelbar oder ein anderes zur Probenerwärmung geeignetes Gerät.

2.2.6 Probenahme

Die Probenahme erfolgt ohne Zusatz eines Konservierungsmittels. Die Probe soll schnellstmöglich der Untersuchung zugeführt werden und ist bis zur Untersuchung bei einer Temperatur von +2 bis +8°C aufzubewahren.

2.2.7 Justierung der Infrarotabsorptions-Geräte

Vor Inbetriebnahme hat eine Basiskalibrierung durch den Gerätehersteller oder nach den Angaben des Geräteherstellers zu erfolgen.

Monatlich sowie nach jedem Küvetten-/Homogenisatorwechsel ist eine Slope/Intercept-Kalibrierung mit mindestens 20 unkonservierten Rohmilchproben im Bereich von ca. –0,480 bis –0,530°C (auch durch Wasserzusatz einzustellen) durchzuführen, deren Messwerte referenzmethodisch nach DIN EN ISO 5764 ermittelt werden.

2.2.8 Durchführung

Die Durchführung der Untersuchung erfolgt grundsätzlich nach den Anweisungen des Herstellers.

2.2.8.1 Vorbereitung der Proben

Die Probe ist nach Möglichkeit sofort zu untersuchen. Sofern erforderlich, kann die Untersuchung der Probe auch noch innerhalb von 2 Tagen vom Zeitpunkt der Probenahme an erfolgen, wenn die Probe bei einer Temperatur von +2 bis +8°C aufbewahrt worden ist.

Unmittelbar vor der Untersuchung sind die Milchproben durch Einstellen in ein Wasserbad oder Gerät vergleichbarer Wirksamkeit auf 40 + 2°C zu erwärmen und zu durchmischen, so dass eine gleichmäßige Verteilung des Fettes gewährleistet ist.

2.2.8.2 Überprüfung der Justierung

Der Nullpunkt ist vor Beginn der Messung und im Messbetrieb in regelmäßigen Abständen lt. Herstellerhinweis zu kontrollieren. Die maximal zulässige Nullpunktabweichung beträgt + 0,002°C.

Die tägliche Einstellung des Gerätes erfolgt mit einer Kontrollmilch (Pilotprobe, Standardmilch), deren Sollwert referenzanalytisch abzusichern ist. Die zulässige Toleranz beträgt + 0,002°C.

Nach jeder Probenserie, maximal nach 200 Proben, wird die Geräteeinstellung mit einer Kontrollmilch kontrolliert. Die Eingriffsgrenze für die Abweichung der am Infrarotabsorptionsgerät ermittelten Werte zum Sollwert der Kontrollmilch liegt bei +0,003°C.

Bei Überschreitung dieser Grenze erfolgt zunächst die manuelle Nachmessung einer weiteren Kontrollmilch. Wird die Abweichung bestätigt, hat eine Nachkalibrierung des Gerätes zu erfolgen.

2.2.8.3 Messung der Proben

Nach erfolgter Einstellung und Überprüfung des Infrarotabsorptionsgerätes wird die Messung der Milchproben durchgeführt.

2.2.9 Auswertung

2.2.9.1 Ergebnisangabe

Das Ergebnis ist auf drei Stellen nach dem Komma anzugeben.

2.2.9.2 Zuverlässigkeit der Methode

Wiederholbarkeit (r)

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die von einem Bearbeiter nach demselben Verfahren an identischem Untersuchungsmaterial mit demselben Gerät in kurzem Zeitabstand erhalten werden, darf in nicht mehr als 5% der Fälle größer als 0,004°C sein.

Vergleichbarkeit (R)

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die von verschiedenen Bearbeitern nach demselben Verfahren in verschiedenen Laboren mit verschiedenen Geräten an identischem Untersuchungsmaterial erhalten werden, darf in nicht mehr als 5% der Fälle größer als 0,006°C sein.

2.2.10 Untersuchungsbericht

Im Untersuchungsbericht ist unter Hinweis auf diese Methode mindestens anzugeben:

- Art, Herkunft und Bezeichnung der Probe
- Art und Datum der Probeentnahme
- Ergebnis in °C

Diese Angaben können bei elektronischer Berichterstellung auch generalisiert hinterlegt werden.

3. Bakteriologische Beschaffenheit

3.1 Automatisierte fluoreszenzoptische Zählung von Mikroorganismen

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, L01.01-7 (Bestimmung der Keimzahl in Rohmilch – Durchflußzytometrische Zählung von Mikroorganismen (Routineverfahren), Stand Mai 2002) mit Verweis auf Umrechnungsverfahren (Kap. 8.1 Ergebnisangabe)).

4. Anzahl somatischer Zellen

4.1 Automatisierte fluoreszenzoptische Zählung von somatischen Zellen

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, L01.01-1 (Zählung somatischer Zellen in Rohmilch (fluoreszenzoptische Zählung), Stand September 1998)