1. Probenahme
Sachgemäße Entnahme von Proben zur chemisch-physikalischen bzw mikrobiologischen Untersuchung. Ziel ist der Erhalt einer repräsentativen Durchschnittsprobe.
Die Probenahme ist ein ausschlaggebender Analysenpunkt.

1.1. Allgemein
Probenahme von: autorisierter, neutralen, in Probenahmetechnik ausgebildeter Person. Proben sind doppelt zu nehmen > kühlen > rascher Transport ins Labor.
Schriftlicher Bericht: Art, Ort, Datum, Zeit der Probenahme, Art und Menge Konservierung.
Geräte trocken und sauber (ch-ph) für mibi auch keimfrei (abflammen).
Proben darf Konservierungsmittel zugesetzt werden darf nachfolgende Analyse nur nicht stören.

1.2 flüssige Milchprodukte
200mL Probenmaterial verhindern von Schäumen, Aufrahmen, Ausbuttern,

1.3. Butter
Mit Butterbohrer 200g Probe entnehmen, luftdicht und geschützt vor Lichteinwirkung einpacken.

1.4. Käse
Mit Käsebohrer mind. 50g Probe entnehmen, Probe je nach Art und Gewicht des Käses Ausschneiden.

1.5. getrocknete Milchprodukte
300-500g Probe luftdicht verschließen, vor Lichteinfluss schützen.

2. Probenkonservierung
Für chem. Untersuchungszwecke, außer Verfälschungsnachweise (Verswässerung, Neutralisation) dürfen mit Konservierungsmitteln versehen werden.
Mikrobiologische Proben nicht, außer Bactoscan-KZBestimmung mittels Azidiol.
Kaliumbichromat, Bronopol
H2O2, Formalin
Natriumazid / NaN3, Sublimat (Quecksilber)
Azidiol (Ethanol, Chloramphenicol, Wasser, Natriumazid, Natriumcitratdihydrat
Jede konservierte Probe ist für den menschl. Genuss ungeeignet!

# 3. Chemisch-Physikalische Untersuchungsmethoden

Milch: TM, Fett, ffTM, Eiweiß, Lactose, Dichte, Gefrierpunkt, pH, Suregrad, Erhitzung

Sauermilchprodukte: Fett, pH, Konsistenz

Rahm: Fett, pH, Säuregrad, Erhitzung

Butter: Wasser, pH, Refraktion, Wasserfeinverteilung, Konsistenz

Kondensmilch: TM, Fett, Lactose, Saccharose,

TMProdukte: Wasser, Fett, Eiweiß, Asche, pH, Säuregrad, Löslichkeit, Reinheitsgrad, Hitzeklassifizierung

Käse: TM, Fett, Eiweiß, Kochsalz

3.1 TM und Wassergehalt
TM ist das was nach dem Verdunsten des Wassers übrig bleibt. Zieht man davon den Fettgehalt ab, so erhält man die fettfreie TM. Wichtig für: Ausbeuteberechnung Käseherstellung / Milchpulvererzeugung.

## Referenzmethode:

* Wägeschalenmethoden (Referenzmethode)
Produktmenge in Wägeschale, konstante Temp. In Trockenschrank 102°C bis zur Gewichstkonstanz getrocknet. Bei festen, pastösen Produkten mit Seesand homogen vermischen.

## Andere Methoden:

* Folienmethode
Probe zw. 2 Aluminiumfolien (dünn + große Oberfl.) bei 102°C bzw 130°C getrocknet
* Infrarot-Trocknung
Schnellmethode: mit IR-Heizung ausgestattete Laborwaage wird unter definierten Bedingungen getrocknet
* Infrarotspektroskopie
	+ Durchstrahlungsmessung im MIR (MILCO-SCAN; IRMA)

Im mittleren IR-Bereich (2,5 – 16 µm) werden die Aborptionsmaxima der Milchinhaltsstoffe gemessen. 🡪 benötigt IMV-Standardmethoden zur Kalibration

* + Reflexionsmessung im NIR (INFRA-ANALYZER)
	Diffuse Reflexionsmessung im nahen IR-Bereich (0,8 – 2,5 µm)
	🡪Eichvorgänge anhand von Std.Methoden sind notwendig
* Karl-Fischer-Titration
= genaueste Methode für wasserarme Proben
J2 + SO2 + 2H2O 🡪2 HJ + H2SO4
(Umsetzung von Jod und Schwefeldioxid mit Wasser in Gegenwart von Pyridin)
Jodverbrauch wird gemessen du. Rücktitration, amperometrisch od. du. Dead-Stop-Methode.
* Butterwasser-Schnellmethode

Du. Erhitzen der Probe entstandene Masseverlust = Wasser / duch Wägen ermittelt.

### 3.2. Fettgehalt

## Gravitmetrische Methoden (3 Referenzmethoden)

* Röse-Gottlieb
Alkalischer Aufschluss 🡪 mit organischem Lösungsmittel extrahiert 🡪 du. Zentrifugation Abtrennung der wässrigen Phase 🡪 Lsgsmittel abdestilliert und der Fettrückstand @ 105°C getrocknet und ausgewogen
* Weibull-Soldt
Saure Hydrolyse 🡪 abfiltrieren des Fettes, trocknen 🡪 Extraktion mit Ether 🡪 verdampft Ether, trocknet @ 105°C und wägt Fett
* Schmid-Bondynski-Ratzlaff

1.Saure Hydrolyse

## Sonstige Methoden

* Butyrometrische Methode (Volumetr. Messung)
Im Butyrometer + konz. Schwefelsre + Amylalkohol (=Phasentrennung) 🡪 Zentrifugation 🡪Fettgehalt an Skala direkt in Gewichtsprozent ablesen
* Infrarotspektroskopie
	+ Durchstrahlungsmessung im MIR (MILCO-SCAN; IRMA)

Im mittleren IR-Bereich (2,5 – 16 µm) werden die Aborptionsmaxima der Milchinhaltsstoffe gemessen. 🡪 benötigt IMV-Standardmethoden zur Kalibration

* + Reflexionsmessung im NIR (INFRA-ANALYZER)
	Diffuse Reflexionsmessung im nahen IR-Bereich (0,8 – 2,5 µm)
	🡪Eichvorgänge anhand von Std.Methoden sind notwendig
* Photometrische Trübungsmessung (Milkotester)

Milchprobe + Tensidlösung 🡪 farblose Probe wo Milchfett Trübung verursacht = je mehr Fettkügelchen deste mehr Streulicht, desto höher der Fettgehalt der Probe

### 3.3. Eiweißgehalt

## 2 Referenzmethoden:

* Kjedahl

Indirekte Bestimmung über Stickstoffkonzentration in Probe (Milcheiweiß Faktor 6,38 = Milchprotein + NPN)
Probe mit Schwefelsäure und Katalysator aufgeschlossen 🡪der gebildete Ammoniak du. Wasserdampfdestillation in Vorlage / Borsäure getrieben und mit Salzsäure rücktitriert.
Der ermittelte Stickstoffgehalt dinet als Grundlage zur Berechnung des Gesamteiweißgeh.

* Dumas
Pyrolyse (Hitze) 🡪 Reduktion v. NOx -> NO2 🡪 du Wärmeleitfähigkeitsdetektor

## Sonstige Methoden:

* Amidoschwarz-Farbstoffbindung
Amidoschwarz 10B-Std.Lsg. bindet an Milcheiweiß, nach Zentrifugation und Filtration = geklärte Lösung 🡪 Photometrische Messung, Entsprechend dem Eiweißgehalt hat sich die Farbstoffkonzentration verringert
* Infrarotspektroskopie
	+ Durchstrahlungsmessung im MIR (MILCO-SCAN; IRMA)

Im mittleren IR-Bereich (2,5 – 16 µm) werden die Aborptionsmaxima der Milchinhaltsstoffe gemessen. 🡪 benötigt IMV-Standardmethoden zur Kalibration

* + Reflexionsmessung im NIR (INFRA-ANALYZER)
	Diffuse Reflexionsmessung im nahen IR-Bereich (0,8 – 2,5 µm)
	🡪Eichvorgänge anhand von Std.Methoden sind notwendig
* Eiweißtiter / Formoltitration

Schnellmethode: Du Formalin (Formaldehyd) Aminogruppen/Guanidylgruppen zu Methylolgruppen. Säurezunahme ein Maß für Eiweißgehalt 🡪Säure mit n/7 NaOH titriert. Der Laugenverbrauch gibt direkt den Eiweißgehalt in %.

### 3.4. Lactosegehalt

## Referenzmethode:

* Titrationsmethode
Mit Kaliumjodid wird Jodid zu Jod reduziert 🡪 Rücktitration: Jodmenge entspricht Lactosegehalt. (Probe geringerer Titrationverbrauch als Blindwert, da hier alles an Lactose gebunden ist)

## Sonstige Methoden:

* Gravimetrische Methoden
Lactose reduziert in Fehling’scher Lsg. Cu2+ zu Cu1+ 🡪 Kupferoxid fällt aus 🡪 trocknen und auswägen
* Enzymatische Bestimmung

Lactose + H2O – β-Galactosidase 🡪 Glu + β-Gal
β-Gal + NAD+ - Galactose-DH 🡪 Galactonsäure + NADH + H+ (Reduktion von NAD+)

Messung bei 340 nm des gebildeten NADH = Lactosekonzentrationsäquivalent

* Infrarotspektroskopie
	+ Durchstrahlungsmessung im MIR (MILCO-SCAN; IRMA)

Im mittleren IR-Bereich (2,5 – 16 µm) werden die Aborptionsmaxima der Milchinhaltsstoffe gemessen. 🡪 benötigt IMV-Standardmethoden zur Kalibration

* + Reflexionsmessung im NIR (INFRA-ANALYZER)
	Diffuse Reflexionsmessung im nahen IR-Bereich (0,8 – 2,5 µm)
	🡪Eichvorgänge anhand von Std.Methoden sind notwendig
* Kolorimetrische Bestimmung
+ Pikrinsre = Farbkomplex 🡪 Messung bei 520 nm
* Polarimetrische Methode
Der Drehwinkel von linear-polarisiertem Licht ist von der Laktosekonzentration abhängig
* Refraktometer
* Sacharimeter (Spindel)
* HPLC

### 3.5. Mineralstoffgehalt

* Asche = anorganische Bestandteile der Probe
vortrocknen 🡪 500 – 550°C Muffelofen bis zur Gewichtskonstanz
Milchasche entspricht nicht Salzzusammensetzung der Milch (Zerstörung von org. Salzen)
* Einzelne Mineralstoffe und Spurenelemente

Ionensensitive Elektroden, Flammenphotometrie, AAS (Atomabsorptionsspektroskopie), AES (Atomemissionssp.) zur qualitativen und quantitativen Bestimmung

### 3.5. Frischezustand

Abgesehen von der sensorischen Analyse ist der Frischezustand auch mit ch-ph Methoden feststellbar:

* Potentielle Azidität / Säuregrad
Du Titration und Erfassung des Umschlagpunktes

Milch hat hohe Pufferwirkung = 6-7 mL 0,25 M NaOH ist normal = Grenzwert = 7°SH,
9° Soxhlet-Henkel = ansaurer Geruch, 11-13°SH = Spontangerinnung beim Kochen,
27°SH = Spontangerinnung bei Zimmertemperatur;

* Aktuelle Azidität
pH-Wert Messung, normal bei Milch = 6,6 – 6,7, bei Joghurt = 4,2 pH

### 3.6. Verfälschungskontrolle

Zusatz von Wasser (Verwässerung)
Entzug von Fett (Entrahmung)
Beimischung von anderen Milchsorten

## Verwässerung und Entrahmung

* Dichte und spezifisches Gewicht:
	+ Pyknometer = Gravimetrische Ermittlung der Dichte
	+ Aräometer (Milchspindel, Lactodensimeter) = Auftriebsmethode
	+ Schwingdichtebestimmung = Schwingung in U-Rohr

Fettfreie TM und Wassergehalt (Wägeschalenmethode, Folienmethode, Infrarot-Trocknung, Infrarot-Spektroskopie, Karl Fischer-Titration, Butterwasser-Schnellmethode)

* Gefrierpunkt = Bestimmung mittels Kryoskop
Arbeitet nach Unterkühlunsprinzip, Rasch unter Gefrierpunkt abgekühlt 🡪 Vibration beschleunigt Bildung von Eiskristallen -> Schmelzwärme bewirkt Anstieg der Probentemperatur auf konstantes Niveau
* Refraktion = Bestimmung der Lichtbrechung im Refratkometer

Salz/Lactosegehalt in Milch konstant -> Refraktion zw. 38 und 41 Skalenteilen
Du Wasserzusatz wird Wert erniedrigt, du Konservierungsmittel und Neutralisationsmittel erhöht. Auch Ansäuerung und der Zusatz von Mastitis Milch ändert Wert.

## Neutralisations und Konservierungsmittelzusatz

* Neutralisation wird überprüft mittels:
	+ Bestimmung der Pufferkapazität mit Salzsäure
	+ Aschegehalt
	+ Bestimmung v. Erdalkaliionen
	+ Lactatgehalt
* Konservierungsmittelzusatz 🡪 mit Farbreaktionen

Rückstände von Waschmitteln (photometr. Messung) und Chlorhaltigen Desinfektionsmitteln (Farbreaktion)

Vermischung von Milch verschiedener Tierarten**:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Immunelektrophorese)

## Nachweis ordnungsgemäßer Erhitzung

* Kurzzeiterhitzung
Phosphatase inaktiviert oder noch aktiviert 🡪Farbreaktion mit Nitrophenylphosphat wenn noch aktiviert
* Hocherhitzung
Lactoperoxidase 🡪Farbreaktion mit Guajakonsäure wenn noch aktiviert

## Nachweis von Fettschädigung

* Freies Fett
Durch Dichteunterschied (Zentrifugation) Trennung von freiem und membranumhüllten Fett, und späteres anfärben des freien Fettes mit Sudan-III
* Freie Fettsäuren
Titration mit ethanolischer Kalilauge gegen Phenolphtalein als Indikaor
(FS = Buttersäure, Capronsre, Caprylsre, Laurinsre 🡪 ranzig, seifig)

# 4. Mikrobiologische Untersuchungsmethoden

Sonder Klasse < 50 000 KBE / mL
1. Klasse < 100 000 KBE / mL
2. Klasse < 400 000 KBE / mL

### 4.1. Direkte Methoden ( Auszählung unter dem Mikroskop oder mit freiem Auge)

* Breed Methode
Definiertes Milchvolumen auf Objektträger auf einer Fläche mit bekannter Größe ausgestrichen 🡪 auzählen von mehreren Gesichtsfeldern 🡪 Einfügen der Zahlen (ausgezählte Keime, Gesichtsfelddurchmesser, augezählte Gesichtsfelder) in Formel 🡪 Ergebnis: Keimgehalt / mL
* Direkte Epifloureszenz Filter Technik

Aufkonzentrierung mittels Filter + Floureszensfarbstoff unter Epifloureszenzmikroskop Kolonien auszählen

* BACTOSCAN-VERFAHREN (automatisierte floureszenzoptische Keimzahlbestimmung)

2 getrennte Einheiten: 1. Probenaufbereitung mit Dichtegradientenzentrifugation & 2. Zählgerät erfasst die gefärbten Bakterienzellen (Arcidinoorange) mittels Floureszenzmikroskop über Photodetektion
Referenzmethode = Koch’sches Plattengussverfahren
Nachteil = Proben mit geringer Keimzahl geringere Präzision (< 100 000 KBE/mL)

* Elektronische Mikrokoloniezählung
Partikelzählung mittels elektronischer Wiederstandsmessung in Kapillare
Messimpulse = Zellzahl
* Koch’sches Plattenverfahren
arbeitsintensiv, fehleranfällig, schlecht reproduzierbar = ist aber Referenzmethode
Verdünnung in/auf festen/flüssigen Agar verteilt 🡪Auszählen KBE/mL oder g
* Platten-Öse-Methode

Kalibrierte Platinöse (CORNWALL-SPRITZE) nimmt ein Probenvolumen von 0,001 mL (1 µL) auf= Verdünnungsstufe 3 von Koch = 1000 🡪 diese Menge wird mit 1mL Verdünnungslösung auf Petrischale gespült und wie bei Koch weiter vorgegangen.
Ermöglicht weglassen von Verdünnungsstufen, aber nur gscheit wenn Keimzahl < 300 000 KBE/mL.

* Eintauchobjektträger / Bacto-Strip-Methoden

Objektträger mit festem Medium in Suspension eingetaucht, bebrütet und ausgewertet.

### 4.2. Indirekte Methoden = Bildung von charakteristischen Stoffwechselproduktkonzentrationen bzw. Enzymaktivitäten wird auf Keimgehalt in Milch geschlossen

* Pyruvat-Methode
Misst enzymatisch im AUTO-ANALYZER gebildetes Pyruvat, ist auch einsetzbar für Pasteurisierte Milch da du Erhitzung Pyruvatgehalt nicht verändert wird.
* Biolumineszenz (ATP) Messung
ATP mit Luciferin Reaktion 🡪 Biolumineszenz = photometrische Quantifizierung
* Impedanzmessung
Messung der Änderung des Leitfähigkeitssignales (steigt mit steigender Bakterienzahl)
* Limulus-Test
Blut (Pfeilschwanz-Krebs) gerinnt wenn es in Kontakt mit LPS kommt ( auch bei pasteurisierter und UHT- Milch anwendbar).
Früher auf Microtiterplatten, gleichzeitig mehrere Verdünnungsstufen möglich, Auswertung: wenn nach eingeführter Wasserstrahlpumpe Loch in Gel = Positiv, wenn alles weggesaugt = negativ.
* Farbstoffreduktionsmethoden
Reduktion mittels bakteriellen Dehydrogenasen 🡪Farbumschlag, Zeitdauer bis Farbumschlag ist zu beachten ist nämlich abhängig von Aktivität

4.3. Titer-Methoden (MPN)
MPN-Coliforme-Keimzahl in Milch, in dekadischer Abstufung Verdünnungsstufen, wenn mikrobielle Reaktion (Gasbildung) gerade nicht mehr auftritt. Statistische Auswertung anhand der 3 Parallelansätze.

### 4.4 Differenzierung und Quantifizierung relevanter Keimgruppen

* Gesamtkeimzahl

Alle aeroben/fakultativ anaeroben, mespophilen Keime auf Plate Count Agar

* Coliforme Keime = Hygieneindikator
gram neg. , aeroben/fakultativ anaeroben nichtsporenbildenden Stäbchen, die Lactose innerhalb von 48 h zu Säure und Gas abbauen können (E.coli, Citrobacter, Klebsellia)
Agar = Violettrot-Galle-Agar
Auswertung = alle dunkelroten KBE mit eine Durchmesser > 0,5 mm
* Psychotrophe Keime
Temperaturoptimum im mesophilen Bereich ( = 20 – 45°C) aber auch ein Wachstum bei Kühltempteraturen haben. Bilden proteolytische und lipolytische Enzyme ( Pseudomonaden, Flavobacterium)
Nährmedium: Plate Count Agar bei 6,5°C für 10 Tage
* Proteolytische Keime

=eiweißspaltend, 🡪 zusatz von Magermilchpulver in Nährmedium
Auswertung: nach überschichten der Platten mit 1%iger HCl alle KBE mit Proteolysehof auszählen

* Lipolytische Keime
Nachweis mittels Farbreaktion der Bildung von Fettsreestern aus Fettsren (Victoriablau-Base) auf Plate-Count Agar,

Auswertung: alle blau gefärbten Kolonien

* Thermoresistente Keime
meist Sporenbildner, die Pasteurisierungstemperaturen ohne Aktivitätsverlust überstehen. (wachsen lieber bei niedrigen Temperaturen)
Probe auf 85°C für 10min erhitzen rasch rückkühlen auf 10°C 🡪 bei 30°C bebrüten = alle erkennbaren KBE auszählen
* Thermophile Keime

Sporenbildende Keime die bei Temperaturen über 45° C optimal wachsen und sich vermehren können ( Clostridien, Bacillus), Bebrütung der Platte bei 55°C.

* Anaerobe Sporenbildner

NIZO-Methode, Paraffinpropfen wird du. Gasbildung v. Clostridien hinaufgedrückt.

* Hefen und Schimmelpilze

Kommen in Fruchtjoghurt vor, niedriger pH und Antibiotikazusatz hemmen Bacterien, Rest = Hefen und Schimmelpilze

* Mastitiserreger
Ausstrich auf Blutagarplatten – Hämolysehof (Nachweistest = CAMP-Test)
Staph. aureus

### 4.5. Gehalt an somatischen Zellen

## Direkte Methoden

* Breed-Methode
10µL Probe auf Breed-Schablone, Lufttrocknen, Methylenblaufäbrung, auszählen der Leucozyten-Zellen (blau, groß, rund-oval)
* Automatisierte fluoreszezoptische Zellzahlbestimmung

DNA der Leucozyten-Zellen Farbstoffmarkiert – Floureszenzmessung elektronisch detektiert.

* Elektronische Zellgehaltsbestimmung
Prinzip: Messung des elektronischen Widerstandes

Indirekte Methoden: hierbei wird aufgrund von chemisch-physikalischen Parametern auf den Zellgehalt de Milch getestet 🡪ambulante Schnelltests

* Whiteside-Laugen-Test

Leucozyten von anormaler Milch werden von Natronlauge nicht aufgelöst und flocken daher aus.

* Schalm-Test
Milch mit einem erhöhten Zellgehalt geliert (Mastitis erhöht Zellzahl)
* Somaticell-Zellzahltest
Reagenz + Milch 🡪 läuft viel Milch aus = geringe Zellzahl, geliert Milch, bleibt viel Milch in Eprouvette = hohe Zellzahl

### 4.5. Nachweis von Hemmstoffen

## Säuerungs bzw. Wachstumsaktivitäts- Tests

* Hemmstofftest nach Frank
Streptococcus thermophilus sehr empfindlich gegenüber Penicillin, bei ungehindertem Wachsen kann er Methylenblau reduzieren, bei Anwesenheit von Antibiotika kann er Methylenblau nicht reduzieren.

HEMMSTOFF neg. = entfärbte Probe
HEMMSTOFF pos. = blaue Probe

* Brilliantschwarz Reduktionstest / DELVO-Test

Bacillus stearothermophilus kein Wachstum bei: Antibiotica, Sulfonamiden, Desinfektions und Konservierungsmitteln.
HEMMSTOFF NEG. = entfärbte Probe

HEMMSTOFF pos. = blaue Probe

## Spezielle Hemmstofftests

* Charm-Test

Vgl. kompetitiver ELISA, Bacillus stearothermophilus Affiität zu Penicillin

* Penzym-Test

Β-Lactam AB hemmen Carboxypeptidase, du Zusatz von Oxidase entsteht H2O2 bei nicht vorhanden sein von AB 🡪 + Chromogenreaktion = Rosa
bei Anwesenheit von AB bleibt Reaktion aus = farblos