

Tabelle 7. Leberpasteten, industrielle Herstellung

Herkunft	H <sub>2</sub> O %	TR-M %	Fett %	Asche %	N % (Rohprotein)	FR H <sub>2</sub> O %	H <sub>2</sub> O : N etwa Feder-Z.	K-Nitrat mg %	Binde- gewebe %	Fett : N (Roh- protein)
Frankreich .....	48.2	51.8	39.9	1.9	9.0	12	5.4	48	14	4.4
Frankreich .....	46.6	53.4	42.8	1.7	7.7	16	6.1	2	35	5.6
Frankreich .....	50.4	49.6	37.8	2.4	8.7	16	6.5	2	18	4.3
Frankreich .....	41.1	58.9	45.8	1.8	10.0	1	4.1	90	27	4.6
Frankreich .....	44.4	55.6	46.7	1.2	7.0	16	6.3	10	19	6.7
Deutschland .....	52.1	47.9	36.6	1.6	7.7	21	6.7	44	12	4.8
Deutschland .....	53.7	46.3	33.6	2.7	7.5	23	7.1	67	13	4.5

gleichbarkeit. Das beruht darauf, daß im Falle der Verwendung von Schwarten und Sehnen diese nicht direkt verarbeitet werden, sondern lediglich ein Schwartenaufluß und die Schwarten abgeseiht werden. In solchen Fällen ist histometrisch kein Schwartengewebe nachzuweisen<sup>3)</sup>. Zwar soll dabei der Wasser-Eiweiß-Quotient steigen<sup>3)</sup>. Es ist aber unwahrscheinlich, daß er die Toleranzgrenze überschreitet, da erst z. B. bei einer 60 % Wasserschüttung zum Warmbrät ca. 3 % Fremdwasser analytisch festgestellt werden konnten<sup>7)</sup>. In diesen Fällen ist die Hydroxyprolinmethode z. Zt. die einzig objektive.

Bei dem überwiegenden Teil unserer Untersuchungen wurde auch der Nitrit- und Nitratgehalt nach der Cd-Reduktions-Methode mit Sulfanilsäure durch Kupplung mit  $\alpha$ -Naphthylamin bestimmt<sup>11)</sup>. Dabei wurden als Nitrit — berechnet als NaNO<sub>2</sub> — bis 6 mg/100 g Erzeugnis gefunden. Der Salpetergehalt — berechnet als KNO<sub>3</sub>, hatte einen Höchstwert von 14 mg/100 g und wies einen Mittelwert von 7,5 mg/100 g auf. Die gefundenen Werte lagen also ganz erheblich unter der in der Fleisch-VO angegebenen Menge von 50 mg Salpeter in 100 g Fleischmaterial. Im Vergleich dazu wurden bei industriell hergestellten Pasteten bis 175 mg Salpeter in 100 g der Pastete — also nicht des Fleischmaterials, das eigentlich zugrunde zu legen ist — gefunden!

Da Leberpastete ein Erzeugnis eigener Art und keine Leberwurst ist, ist auch der Zusatz von aufgeschlossenem Milcheiweiß nach der Fleisch-VO für Leberpasteten nicht zulässig. Gegen den Zusatz hat sich auch der Arbeitskreis lebensmittelchemischer Sachverständiger der Länder und des Bundesgesundheitsamtes (ALS) ausgesprochen<sup>1)</sup>. Dagegen bestehen gegen die Zugabe von frischen Eiern und Sahne in begrenzter Menge, soweit sie zur Qualitätsverbesserung dienen, keine Bedenken.

An die industrielle Herstellung von Leberpastete — im allgemeinen eingedoster Ware — sind selbstverständlich die gleichen Anforderungen zu stellen wie an die handwerkliche Produktion. Schließlich ist der Ausgangspunkt und das handelsübliche Vorbild für die industrielle Erzeugung die handwerkliche Produktion.

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, erreichen die industriellen Produkte jedoch oft nicht die beim Handwerk angetroffenen Qualitäten.

Nach eingehenden Untersuchungen von *Bentler*<sup>4)</sup> sind diese von der Norm stark abweichenden Erzeugnisse keine Leberpasteten im eigentlichen Sinne. Da die verarbeiteten Rohstoffe häufig nicht den Richtlinien für Fleischerzeugnisse vom 5. 11. 1965 entsprechen, weil nach *Bentler* z. T. auch pflanzliches Ausgangsmaterial mit verarbeitet wird, müßte das in ihrer Deklaration deutlich zum Ausdruck kommen. Sie sollten daher zweckmäßigerweise als „Leberpasten“ oder „Lebercrem“ bezeichnet werden.

Fräulein C. Kretsch sei an dieser Stelle für die Durchführung der zahlreichen technischen Analysen gedankt.

## LITERATUR

- 1) Arbeitskreis lebensmittelchemischer Sachverständiger (ALS) — unveröffentlicht
- 2) Aus der Wirtschaft: DLR 62, 414 (1966)
- 3) Bartels, H. u. K. Gerigk: Fleischwirtschaft 46, 885—886 (1966)
- 4) Bentler, W.: Fleischwirtschaft 46, 1114—1116 (1966)
- 5) Coretti, D.: Obergutachten (1961) unveröffentlicht, auch zitiert bei 7)
- 6) DLG-Qualitätsprüfung, Bestimmungen für Fleisch und Fleischerzeugnisse (1966/67)
- 7) Fleischmann, O.: DLR 62, 305—308 (1966)
- 8) Grau, R.: Fleischwirtschaft 12, 802 (1960)
- 9) Grau, R., H. Gspahn, H. Günther, K. Möhler, F. Petuely u. O. Wyler: Arch. f. Lebensmittelhyg. 18, 25—27 (1967)
- 10) Grüttner/Lienhop: Taschenbuch der Fleischwarenherstellung, (Braunschweig 1957) S. 470
- 11) Möhler, K.: Z. Lebensmitteluntersuch. u. -Forsch. 125, 337—340 (1965)
- 12) Rank, B.: „Unsere Lebensmittel von A—Z“ (Stuttgart 1952)
- 13) Rauschnig, R.: Lebensmittel-ABC (Leipzig 1957)

Aus der Bundesforschungsanstalt für Getreideverarbeitung in Berlin und Detmold

## Vergleichende Milchsäurebestimmung in Backwaren

Von Dr. J.-M. Brümmer und U. Klempin

Bei der Herstellung voll befriedigender Roggen- und Roggenmischbrote spielt die biologische Säuerung die vorherrschende Rolle<sup>1-3)</sup>. Für die Forschung, noch mehr für die laufende Betriebskontrolle ist daher eine spezielle Bestimmung der Milchsäure, die die wichtigste nicht flüchtige, organische Säure des fertigen Sauersteiges ist, von Interesse<sup>4-8)</sup>.

Die Milchsäure wurde 1750 von *Scheele* als Säure der sauren Milch gefunden. Als einfachste Hydroxysäure ( $\alpha$ -Hydroxypropionsäure) besitzt sie ein asymmetrisches C-Atom und kann daher in drei Formen vorkommen:

D (—) — Milchsäure  
L (+) — Milchsäure  
DL — Milchsäure

Da das Problem einer zufriedenstellenden Untersuchungsmethodik nicht nur auf den Gebäcksektor beschränkt ist, sind in der Literatur viele Anhaltspunkte hierfür vorhanden.

\*) Veröffentlichungs-Nr. 36 10 — der B. f. G.

den. Neben den schon lange bekannten Methoden, die extraktiv, titrimetrisch, destillativ oder ähnlich arbeiten, kommen neuerdings verstärkt photometrische, chromatographische und enzymatische Bestimmungen zur Anwendung\*\*).

Durch die Verfeinerung der Analysengänge und der apparativen Möglichkeiten sind stets neue Bestimmungen im Entstehen, die einer Überprüfung bedürfen. Zusammenfassende Arbeiten erleichtern den Überblick und sind bisher von *Lauersen* und *Wahländer*<sup>9)</sup> sowie von *Kubowitz*<sup>10)</sup> geliefert worden.

Die meisten Veröffentlichungen enthalten Destillationsmethoden in irgendeiner Weise. Diese Art der Bestimmungen, die auf *v. Fürth* und *Charnass*<sup>11)</sup> zurückgehen, beruhen auf einer möglichst schonenden Oxydation der Milchsäure. Der gebildete Acetaldehyd kann titrimetrisch über sein Anlagerungsprodukt mit Bisulfit<sup>12–23)</sup> oder durch anderweitige Umsetzungen bestimmt werden<sup>24, 25)</sup>. Dabei spielen Farbbildungen die wichtigste Rolle<sup>26, 27)</sup>. Besonders die Methode von *Barker* und *Summerson*<sup>28)</sup>, die die Färbung des Acetaldehyds mit p-Hydroxydiphenyl kolorimetrisch bei 540 nm auswerten, fand starke Beachtung. Dieser Weg ist wiederholt besprochen und abgewandelt worden<sup>29–37)</sup>.

Der eigentlichen Destillation muß eine Aufarbeitung der freien oder gebundenen Milchsäure vorausgehen. Anfängliche Extraktionsversuche mit Äther waren nicht erfolgreich oder bereiteten anderweitig Schwierigkeiten und konnten daher nicht als Routineuntersuchung Anwendung finden<sup>38, 39)</sup>. Bessere Ergebnisse lieferten wäßrige Auszüge<sup>15, 40–43)</sup> oder Extraktionen mit verdünnten Säuren<sup>44)</sup>, die anschließend mit Natriumwolframat einer Eiweiß- (nach *Clausen*)<sup>12)</sup> und mit Kupfersulfat/Calciumhydroxyd, einer Kohlenhydratfällung (nach *Salkowski*<sup>45)</sup>) unterzogen werden. Der Analysengang wurde oft überarbeitet, dabei wurden Fehlermöglichkeiten erkannt<sup>46)</sup> und Abänderungen und Zusammensetzungen veröffentlicht<sup>47)</sup>. In den letzten Jahren ist auch wiederholt mit Erfolg eine Abtrennung der Milchsäure durch Ionenaustausch- und Chromatographieverfahren versucht und erreicht worden<sup>34, 48–57)</sup>.

Eine andere Art der Destillation schlug *Flieg*<sup>58)</sup> vor, der durch schonenden Abbau der Milchsäure mit Chromschwefelsäure Essigsäure erhielt und deren Flüchtigkeit zur weiteren Bestimmung ausnutzte. Bei einer Untersuchung von Sauerteigen kann diese Destillation, wie *Drews*<sup>15)</sup> zeigte, von Vorteil sein.

Daneben sind noch acidimetrische<sup>40–43, 59–62)</sup>, photometrische<sup>28, 32, 63–66)</sup> und manometrische<sup>10)</sup> Bestimmungsmethoden angewandt worden.

Die nächstwichtigste Untersuchungsart wurde auf kolorimetrischen Verfahren aufgebaut. Soweit eine Destillation angewandt wurde, sind diese Arbeiten bereits angeführt worden. Es gibt darüber hinaus aber die Möglichkeit, die Milchsäure direkt in gefärbte Verbindungen überzuführen. Zu erwähnen sind hier die Untersuchungen von *Fuchs*<sup>67)</sup>, *Mc. Allister*<sup>68)</sup>, *Ling*<sup>69)</sup>, *Peterson*<sup>49)</sup>, *Taylor* und *Clegg*<sup>70)</sup> und *Kubowitz*<sup>10)</sup>, wie sie z. B. auch von *Pijanowski* und Mitarbeitern<sup>42)</sup>, *Paulsen*<sup>71)</sup> und *Steinholt* und *Calbert*<sup>72)</sup> übernommen wurden. Auch hierbei wird zum Teil Acetaldehyd erfaßt, der jedoch nicht erst nach der Oxydation abgetrennt, sondern mit dem direkt in der Untersuchungslösung eine Farbreaktion angestellt wird.

Verhältnismäßig neu ist die Anwendung von spezifisch abbauenden Enzymen zur Ermittlung der Milchsäure. In mehreren Veröffentlichungen ist, seitdem *Dewan* und *Green*<sup>73)</sup> eine derartige Möglichkeit aufzeichneten, über die Bestimmungsmethodik mit Lactat-Dehydrogenase (LDH) berichtet worden<sup>74–82)</sup>. Der Abbau von L(+)-Milchsäure ist z. B. durch Oxydation in Gegenwart von NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid; DPN = Diphosphopyridin-Nukleotid) und LDH möglich. Dabei entsteht Brenztraubensäure und die reduzierte Form NADH. Durch einen Überschuß an NAD und OH-Ionen und durch Hydratonbildung der Ketosäure kann das Reaktionsgleichgewicht so verschoben werden, daß der Abbau solange fortläuft, wie L(+)-Lactat vorhanden ist. In äquivalenter Menge entsteht NADH, dessen Absorption bei 340 nm bzw. 366 nm gemessen wird. Die Messung kann in bestimmten Zeitabständen

oder nach Stillstand der Reaktion vollzogen werden. Diese Methode ist spezifisch und erlaubt eine schnelle Bearbeitung von Untersuchungsreihen.

Die vorliegende Arbeit unternimmt den Versuch einer vergleichenden Untersuchung zur Bestimmung der Milchsäure in Backwaren. Ähnliches haben schon *Lindholm* und Mitarbeiter<sup>83)</sup> und *Schweiger* und *Günther*<sup>84, 85)</sup> für Fleisch und *Langner*<sup>86)</sup> für Bakteriennährböden durchgeführt.

Wir prüften eine kolorimetrische, eine destillative und eine enzymatische Bestimmung am gleichen Untersuchungsmaterial. Im folgenden werden die Methoden dieser drei Bestimmungen eingehend erläutert.

#### Kolorimetrische Milchsäurebestimmung

Sie wurde nach der von *Ling*<sup>69)</sup> angegebenen Form der Methode von *Hillig*<sup>29)</sup> in der Modifikation von *Taylor* und *Clegg*<sup>70, 47)</sup> durchgeführt.

10 g vorgetrocknetes Brot werden zerkleinert, mit Wasser durchfeuchtet und auf 200 ml verdünnt und 1 Stunde lang geschüttelt. Zu je 25 ml des klaren Zentrifugates sind folgende Zusätze zuzugeben: 10 ml Bariumchloridlösung (98,75 g BaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O/l), 10 ml Natronlauge (0,66 n) und 5 ml Zinksulfatlösung (225 g ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O/l). Anschließend wird intensiv geschüttelt und filtriert. Je 10 ml des Filtrats erhalten 1 ml fünfmal verdünnte Eisenchloridlösung (Anfangskonzentration 5 g FeCl<sub>3</sub> + 12,5 ml 1 n HCl auf 100 ml Wasser). Die entstandene Färbung wird in 1-cm-Küvetten bei 415 nm gegen einen Blindwert gemessen.

Die Extraktionswerte können durch eine Eichkurve oder durch direkte Berechnung ausgewertet werden. Die Eichkurve kann mit Hilfe von Lithiumlactat oder mit bekannten Milchsäurelösungen aufgestellt werden. Eine weitere Verdünnung der Eisenlösung wie sie *Steinholt* und *Calbert*<sup>72)</sup> vorschreiben, brachte keine Verbesserung der Ergebnisse.

#### Destillative Milchsäurebestimmung

Hier wurden die Aufbereitungsweise nach *Drews*<sup>15)</sup> und der Analysengang nach *Rohrlich*<sup>19)</sup> angewandt.

10 g vorgetrocknetes Brot — wird frisches Untersuchungsmaterial benutzt, so sollte die Einwaage 40 g betragen — werden in einen 200-ml-Meßkolben gebracht und mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Die Brotaufschlemmung wird in eine Weithalsflasche übergeführt, 30 Min. lang geschüttelt und anschließend zentrifugiert. 75 ml der überstehenden Flüssigkeit werden im Erlenmeyer-Kolben mit 40 ml 1 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 40 ml 10 %iger Natriumwolframatlösung zur Fällung der Eiweißstoffe versetzt. Die Flüssigkeit bleibt eine halbe Stunde lang stehen und wird in dieser Zeit mehrfach umgeschüttelt. Abschließend wird zentrifugiert.

10 ml der vom Eiweiß befreiten Lösung werden mit 150 ml einer Aufschlammung von Calciumhydroxid (100 g Ca(OH)<sub>2</sub> + 900 ml H<sub>2</sub>O, vor Gebrauch gut schütteln) und mit 90 ml 25 %iger Kupfersulfatlösung versetzt, um die Zucker zu entfernen. Nach wiederum einer halben Stunde Abstehtzeit wird zentrifugiert und filtriert.

Die Bestimmung der Milchsäure erfolgt in einer Apparatur, die von *Lieb* und *Zacher*<sup>187)</sup> entwickelt und von *Rohrlich*<sup>19)</sup> und uns weitergeführt wurde. In den Destillationskolben werden 50 ml der geklärten Lösung mit 33 ml 10 %iger Schwefelsäure und 10 ml 10 %iger Mangansulfatlösung (als Katalysator) zugegeben und durch Zusatz von Wasser auf ein Volumen von 150 ml gebracht.

Die Oxydation mit Kaliumpermanganat in Gegenwart von Schwefelsäure und Mangansulfat erlaubt nach *Friedemann* und Mitarbeitern<sup>88)</sup> eine höhere Oxydationsgeschwindigkeit bei gleichzeitig schonender Oxy-

\*\* Für die freundliche Unterstützung durch die Fa. C. F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim/Tutzing, die die notwendigen Testkombinationen TC-B-Nr. 15 972 zur Verfügung stellte, danken wir auch an dieser Stelle.

ation. In Abbildung 1 wird der Aufbau der Apparatur gezeigt. Aus Sicherheitsgründen sind dem Kochkolben eine Waschflasche mit 10 ml 0,02 n Natriumhydrogensulfidlösung und 20 ml 1 n Natronlauge vorgeschaltet. Die dritte Waschflasche, ebenso wie die erste nach dem Kochkolben dienen als Sicherheitsflaschen. Die letzten beiden Vorlagen sind ebenfalls mit 10 ml 0,02 n Natriumhydrogensulfidlösung zum Auffangen des gebildeten Acetaldehyds gefüllt.

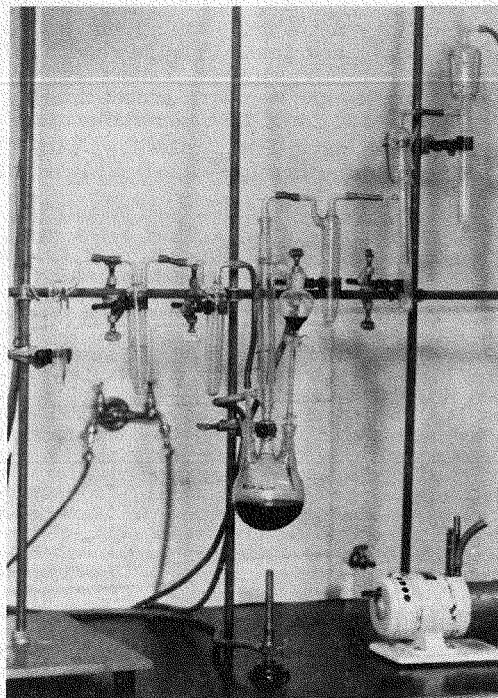


Abb. 1

Der Kolbeninhalt wird zum Sieden gebracht und ein mäßiger Luftstrom durch die Apparatur gesaugt. Nach *Kottmeyer*<sup>20)</sup> sind dabei durch Überoxydation Verluste zu erwarten. Es wird daher vorgeschlagen, über Pyrogallol gereinigten Stickstoff als Trägergas für den Acetaldehyd zu benutzen, was zweifellos Vorteile bringt. Vielleicht erklären sich so die Verluste, die wir beim Destillationsvorgang erhielten.

Nachdem sich das Kondensationsgleichgewicht eingestellt hat, wird tropfenweise 0,005 m Kaliumpermanganatlösung zugegeben. Das Zutropfrohr für die Permanganatlösung darf nicht an der gleichen Stelle in den Kochraum ragen, an der aus dem Kühler Kondensat zurücktropft, da sonst merkliche Verluste durch Oxydation des Acetaldehyds entstehen. Ein Überschuß an Oxydationsmittel macht sich durch Färbung der Kochlösung bemerkbar. Man läßt anschließend noch 5 Minuten kochen und leitet weiter einen geringen Luftstrom durch die Apparatur, um allen Acetaldehyd in die Vorlagen zu bringen. Dann wird die Destillation abgebrochen und der Inhalt der Vorlagen quantitativ in ein Kölbchen gespült und verschlossen. Nach etwa 30 Minuten titriert man das überschüssige Natriumhydrogensulfid mit ca. 0,01 n Jodlösung gegen Stärkelösung als Indikator zurück. Einen Überschuß an Jod beseitigt man durch 0,01 n Natriumthiosulfatlösung. *Kottmeyer*<sup>20, 46)</sup> schlägt vor, die Untersuchungslösung in die Jodvorlage zu geben, weil nur dann die Umsetzung quantitativ verläuft.

Die Acetaldehydhydrogensulfid-Anlagerungsverbindung wird durch Zugabe von 5 g Natriumhydrogencarbonat zerstört. Dabei ist der Kolben nur sehr vorsichtig zu schwenken, da jedes stärkere Schütteln bereits merkliche Verluste bringt. Das nun in Freiheit gesetzte Natriumhydrogensulfid, das der Menge des vorhandenen Acetaldehyds entspricht,

wird mit 0,01 n Jodlösung titriert, wobei diese im Überschuß zugesetzt und anschließend mit 0,01 n Arsenitlösung zurücktitriert wird.

Da Natriumhydrogensulfidlösung nicht beständig ist, wird sie aus einer 0,01 n Natriumpyrosulfidlösung hergestellt. Zur Reinigung der Kochkolben empfiehlt sich konzentrierte Natronlauge.

Bei der Einwaage von 40 g Brot und Arbeiten mit der vorgeschriebenen Verdünnung errechnet sich der Milchsäuregehalt, bezogen auf 100 g luftgetrocknetes Brot, wie folgt:

$$\frac{100 \times 200 \times 155 \times 340 \times 0,45}{40 \times 75 \times 100 \times 50 \times 1000} \times \text{ml verbr. 0,01 n Jodlösung} = 0,03161 \times \text{ml verbr. 0,01 n Jodlösung} = \% \text{ Milchsäure}$$

#### Enzymatische Milchsäurebestimmung

Unsere Untersuchungen wurden nach der den Testkombinationen der Fa. Boehringer beiliegenden Vorschrift ausgeführt. Danach ergab sich folgende Arbeitsweise:

1 bis 5 g Brot werden mit bidestilliertem Wasser (50 bis 60° C) zerrieben, auf 50 ml verdünnt und 1 Stunde lang intensiv geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren werden 0,1 ml des Überstandes 1:1 mit 70 %iger Perchlorsäure enteiweißt und mit 2,0 ml Glycinpuffer- und Hydrazinlösung, 0,03 ml Lactat-Dehydrogenase-Lösung und 0,2 ml der NAD-Lösung direkt in die Meßküvette gegeben und nach dem Mischen 1 Stunde lang bei 25° C temperiert. Zum Leerwert wurden außer der Probe alle Lösungen in gleicher Weise angesetzt. Zum Konzentrationsausgleich wurde die Probenmenge durch bidestilliertes Wasser oder durch Perchlorsäure ersetzt. Die Messung wird wahlweise bei 340 oder 366 nm durchgeführt.

Aus den Extinktionsunterschieden von Probe und Blindprobe ergibt sich 1 E, das direkt oder über eine Eichkurve in Milchsäure umgerechnet werden kann. Obwohl die Arbeitsanleitungen sehr genau sind, scheint es ratsam, doch auf einige Fehlermöglichkeiten hinzuweisen: Glasgeräte, die mit Chromschwefelsäure gereinigt wurden, sollten erst mit Alkalien und dann mit bidest. Wasser eingehend gespült werden. Bei der Präparation der Substrate ist daran zu denken, daß sich auf der Oberfläche der menschlichen Haut beträchtliche Milchsäuremengen befinden können. Es ist angebracht, beim Messen gegen eine Blindprobe die benutzten Küvetten auf gleiche Durchlässigkeit zu prüfen.

#### Ergebnisse:

In unserer Versuchsbäckerei wurden durch Einsatz unterschiedlicher Sauerteiganteile Roggenmischbrote (70 % Type 1150, 30 % Type 1050) in Kurzsaureführung mit verschiedenen Milchsäurekonzentrationen erbacken. Als Sauerteigkonzentration (S) wurden die Zusätze 0 %, 10 % und 40 % gewählt. Im ersten Falle handelt es sich um den sog. Hefebackversuch.

Aus den Versuchsbrotten wurden aus dem Laibinnern gleiche Krumenpartien herausgelöst, getrocknet, gemahlen und eingehend gemischt. Die Substrate wiesen nach der Vortrocknung noch folgende Restwassergehalte (%) auf:

Hefebrot	3,2
Brot, 10 % S	2,9
Brot, 40 % S	3,3

Die im folgenden wiedergegebenen Ergebnisse für die Milchsäurekonzentrationen beziehen sich auf Brot-trockensubstanz.

An diesem Untersuchungsmaterial ergaben sich nach der kolorimetrischen Analyse mit dem rechnerischen Ansatz nach *Pijanowski*<sup>47)</sup> folgende Ergebnisse:

Hefebrot	0,04 % Milchsäure
Brot, 10 % S	0,14 % Milchsäure
Brot, 40 % S	0,26 % Milchsäure

Von einer zum Brot zugesetzten, bekannten Milchsäuremenge wurden im günstigsten Falle 74 % wiedergefunden.

Die Destillationsmethode wurde ebenfalls durch Zugabe bekannter Milchsäuremengen geprüft. Es ergab sich, daß durch die beschriebene Aufarbeitung etwa 2 % und durch die Destillation einschließlich der nachfolgenden Arbeiten etwa 6 % Verluste auftreten. Da die Ergebnisse sehr gut reproduzierbar waren, wurde nach zahlreichen Versuchen eine Konstante  $F = \frac{100}{91,9} = 1,09$  eingeführt. Für die Brotproben ergaben sich nun folgende Werte:

Hefebrot	0,06 % Milchsäure
Brot, 10 % S	0,25 % Milchsäure
Brot, 40 % S	0,75 % Milchsäure

Der Einsatz von spezifisch Milchsäure abbauenden Enzymen brachte folgendes Ergebnis:

Hefebrot	0,05 % Milchsäure
Brot, 10 % S	0,22 % Milchsäure
Brot, 40 % S	0,41 % Milchsäure.

Eine Untersuchung der gleichen Substrate an anderer Stelle brachte zufriedenstellende Übereinstimmungen.

Die von uns eingesetzten Untersuchungsmethoden zur vergleichenden Bestimmung der Milchsäurekonzentration in Backwaren zeigen also sehr unterschiedliche Ergebnisse.

Aus praktischen Gründen muß jedoch an der arbeitsaufwendigeren Destillationsmethode noch festgehalten werden, da sonst der Vergleich mit den bisher in der Literatur veröffentlichten Daten schwierig wird. Die kolorimetrische Bestimmung über die direkte Anfärbung der Milchsäure mit Eisenchloridlösung scheint für die Bestimmung der Milchsäure in Backwaren nicht geeignet zu sein. Ebenso bringt die kolorimetrische Bestimmung nach einer Destillation keine Vorteile.

Für die enzymatische Methode ist eine Entscheidung schwerer zu fällen. Die Werte liegen zwischen den Ergebnissen der kolorimetrischen und der destillativen Bestimmung. Bei Anwendung der spezifischen L-Lactat-Dehydrogenase ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß nicht — wie bei der destillativen Bestimmung — die Gesamtmilchsäurekonzentration erfaßt wird. Die genaue Zusammensetzung der Sauerteigflora ist noch nicht bekannt. Literaturhinweise<sup>8, 40-42, 89-91</sup>) lassen aber erkennen, daß unter der Vielfalt der Säuerungsorganismen nicht nur L(+)-Milchsäurebildner sein müssen. Außerdem könnte während des Backprozesses Racemisierung erfolgen. In diesen Fällen würde mit der enzymatischen Methode nur ein Teil der gesamten Milchsäuremenge erfaßt.

Abschließend ist zu bemerken, daß die destillative Milchsäurebestimmung in der von uns angegebenen Form die für Backwaren brauchbarste Methode ist. Sie ist solange anderen, besonders enzymatischen Methoden, vorzuziehen, als noch über die Konfiguration der während der Säuerung gebildeten Milchsäure und ihren Veränderungen während des Backprozesses keine Klarheit besteht. Diese Arbeiten laufen ebenso wie die Be-

mühungen um eine methodische Verbesserung der Milchsäurebestimmung in Brot und Backwaren weiter.

### Zusammenfassung

Milchsäurebestimmungen sind zur Erkennung der Säuerungsort von Roggen- oder Roggenmischbrot und zur Kontrolle der Sauerteigführung für Untersuchungslabore und für die Brotindustrie unersetzlich. Für Backwaren wurden bisher vergleichende Betrachtungen über verschiedene Milchsäurebestimmungsarten nicht bearbeitet.

An unterschiedlich stark gesäuerten Broten werden die Milchsäuregehalte durch eine kolorimetrische, eine destillative und eine enzymatische Bestimmungsmethode überprüft. Es erscheint ratsam am destillativen Analysengang festzuhalten, da die kolorimetrischen Methoden entweder nicht geeignet sind oder keinerlei Zeitersparnis bringen. Die enzymatische Bestimmung wirft erneut die Frage nach der Milchsäurebildung durch die Sauerteigflora auf.

Anhand einer chronologischen Aufstellung wird die Literatur der Milchsäurebestimmung eingehend beleuchtet.

### LITERATUR:

- 1) *Pelshenke, P. F.*, Über den Geschmack des Brotes. *Mehl u. Brot* **22**, 1—3 (1935)
- 2) *Drews, E.*, und *H. Stephan*, Der Geschmack des Brotes. Der Einfluß der Sauerteigführung auf die Säuren und den Geschmack. *Bäcker-Ztg.* **10**, 26, 9—10 (1956), *Brot u. Gebäck* **10**, 1, 1—4 (1956)
- 3) *Drews, E.*, Analytische Untersuchungen an unterschiedlich gesäuerten Broten. *Brot u. Gebäck* **15**, 2, 33—35 (1961), **15**, 3, 41—44 (1961)
- 4) *Rotsch, A.*, Analytische Möglichkeiten zur Aufklärung von Qualitätsmängeln an Bäckereirohstoffen und fertigen Backwaren. *Brot u. Gebäck*, **21**, 5, 81—84 (1967)
- 5) *Drews, E.*, Über das Schicksal einiger mehligener Säuren bei der Sauerteiggärung und den Einfluß der Mitverarbeitung von Citronen-, Wein- und Apfelsäure auf den Milch- und Essigsäuregehalt des Brotes. *Brot u. Gebäck* **15**, 6, 105—113 (1960)
- 6) *Täufel, K.*, u. *N. Behnke*, Zitronensäurebilanz bei der Teiglockerung durch Sauerteig und Hefe. *Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forschung* **105**, 274—283 (1957)
- 7) *Rohrlich, M.*, und *W. Essner*, Das Milchsäure-Essigsäure-Verhältnis in Brot. *Brot u. Gebäck* **6**, 1, 1—3 (1952)
- 8) *Rohrlich, M.*, und *J. Stegemann*, Über die Vermehrung der Sauerteigorganismen und die Säurebildung im Verlauf der Teiggärung bei diskontinuierlicher Führung. *Brot u. Gebäck* **12**, 41—56 (1958)
- 9) *Lauersen, F.*, und *H. Wahlländer*, Über die Bestimmung von Milchsäure in kleinen Blutmengen. *Biochem. Z.* **298**, 273—292 (1938)
- 10) *Kubowitz, F.*, Über quantitative Milchsäurebestimmung im Blutserum und eine neue photoelektrische (kolorimetrische) Bestimmungsmethode. *Z. Ges. inn. Med. Grenzgebiete* **7**, 19, 865—882 (1952)
- 11) *V. Fürth, O.*, und *D. Charnass*, Über die Bestimmung (quantitative Bestimmung) der Milchsäure durch Ermittlung der daraus abzuspaltenden Aldehydmenge. *Biochem. Z.* **26**, 199—220 (1910)
- 12) *Clausen, S. W.*, Eine Methode zur Bestimmung kleiner Mengen von Milchsäure. *Biol. Chem.* **52**, 263—280 (1922)
- 13) *Hirsch-Kaufmann, H.*, Zur Methodik der Milchsäurebestimmung in tierischen Organen. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **140**, 25—46 (1924)
- 14) *Linhardt, K.*, und *E. Reichold*, Über den Einfluß der angewandten Braunsteinsorte auf die Mikrobestimmung der Milchsäure. *Biochem. Z.* **320**, 241—246 (1949/50)
- 15) *Drews, E.*, Bestimmung von Milch-, Essig- und Propionsäure im Sauerteig und Brot. *Getreide, Mehl u. Brot* **4**, 21/22, 245—248 (1950)
- 16) *Drews, E.*, Bestimmung der Milchsäure in Sauerteig und Brot. *Getreide, Mehl u. Brot* **5**, 3, 36—37 (1951)
- 17) *Koch, J.*, und *G. Bretthauer*, Über eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der Milchsäure in Süßmost und Wein. *Z. analyt. Chem.* **132**, 346—356 (1951)
- 18) *Lang, K.*, und *K. Pfleger*, Zur Mikrobestimmung der Milchsäure. *Mikrochem.* **36/37**, 1174—1176 (1951)
- 19) *Rohrlich, M.*, und *W. Essner*, Untersuchung über die Bestimmung, Aktivisierung und Hemmung der Milch- und Essigsäure bei der Sauerteiggärung. *Brot u. Gebäck* **6**, 85—91 (1951)
- 20) *Kottmeyer, G.*, Ein Beitrag zur Bestimmung kleinster Milchsäuremengen. *Biochem. Z.* **322**, 304—309 (1952)
- 21) *Barnett, A. J. G.*, Determination of lactic acid in cultures of lactobacilli Nature (London) **174**, 649—654 (1954)
- 22) *Dimotaki-Kourakon, V.*, Die Bestimmung von Milchsäure im Wein. *Z. analyt. Chem.* **188**, 4, 374 (1962)
- 23) *Guyman, J. F.*, und *E. A. Crowell*, Die Bestimmung von Aldehyden in Weinen und Spirituosen durch die direkte Bisulfid-Methode. *J. Assoc. off. agric. Chemists* **46**, 276—284 (1963), **50**, 305—307 (1967)

- 24) *Boissin, R.*, Dosage de l'acide lactique et de l'acide Pyruvique au moyen de l'acide periodique. *J. Pharmacie de Belgique* IX, 1, 240—255 (1940)
- 25) *Dierschelt, W.*, und *H. U. Bergmeyer*, Bestimmung kleinster Milchsäuremengen mit Hilfe der Polarographie und ihre Anwendung bei der Messung besonders der aeroben Glykolyse. *Biochem. Z.* 320, 46—56 (1949)
- 26) *Mendel, B.*, und *J. Goldscheider*, Eine kolorimetrische Mikromethode zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure im Brot. *Biochem. Z.* 164, 163—174 (1925)
- 27) *Hillig, F.*, The colorimetric determination of lactic acid. *J. Assoc. off. agric. Chemists* 20, 303—307 u. 605—610 (1937)
- 28) *Barker, S. B.*, und *W. H. Summerson*, The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. biol. Chemistry* 138, 535—554 (1941)
- 29) *Davidson, J.*, The colorimetric determination of lactic acid in milk and milk products. *J. Dairy Res.* 16, 209—216 (1949)
- 30) *Capobianco, A.*, A modification of the methods for the determination of lactic and pyruvic acids in organic liquids. *Boll. Soc. ital. Biol. sperim.* 27, 1/2, 60—61 (1951)
- 31) *Neidlinger, J. S.*, *C. A. Kempf* und *A. P. Stewart*, Adaptation of the Barker-Summerson lactic acid method to ice cream and ingredients for ice cream. *J. Dairy Sci.* 35, 4, 305—313 (1952)
- 32) *Hüllin, R. P.*, und *R. L. Noble*, The determination of lactic acid in microgram quantities. *Biochem. J.* 55, 289—291 (1953)
- 33) *Kleinert, J.*, Die Bestimmung der Milchsäure in biologischem Material. *Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg.* 44, 232—247 (1953)
- 34) *Stark, J. B.*, *A. E. Goodban* und *H. S. Owens*, Determination and concentration of lactic acid in industry juices. *J. Agric. and Food Chem.* 1, 564—566 (1953)
- 35) *Schober, R.*, *I. Prinz* und *C. Walter*, Möglichkeiten zur Mikrobestimmung von Milchsäure und ihrer sterischen Konfiguration in Milch und Molkeerzeugnissen. *Milchwissenschaft* 10, 1, 25—28 (1964)
- 36) *Nanni, G.*, und *I. Baldwin*, Micromethod for the determination of lactic acid. *J. Biochem.* 13, 135—137 (1964)
- 37) *Rebelein, H.*, Kolorimetrische Bestimmung der Äpfelsäure in Verbindung mit der gleichzeitigen Bestimmung der Wein- und Milchsäure in Most und Wein. *Dtsch. Lebensmittel-Rdsch.* 60, 5, 140—144 (1964)
- 38) *Lehmann, K. B.*, Hygienische Untersuchungen über Mehl und Brot; III. Qualitative und quantitative Untersuchung über den Säuregrad des Brotes. *Arch. Hyg.* 19, 363—409 (1893)
- X. Neue Studien über die Acidität des Brotes. Ihre Ursachen und beste Bestimmungsmethode. *Arch. Hyg.* 44, 214—237 (1902)
- 39) *Johnson, A. H.*, Identification and estimation of the organic acids produced during bread dough and cracker dough fermentation. *Cereal Chem.* 2, 345—364 (1925)
- 40) *Schulz, A.*, Die Bakterienflora des Vollkornschrotsauerteiges. *Vorratspflege u. Lebensmittelforsch.* 4, 74 (1941)
- 41) *Schulz, A.*, Entwicklung und physiologische Aktivität der Bakterien- und Hefe-flora bei den Sauerstufen des Vollkornbrotes und ihr Einfluß auf Geschmack und Güte des Vollkornbrotes. *Mehl u. Brot* 41, 377—379 (1941)
- 42) *Schulz, A.*, Bestimmung der Milchsäure und Essigsäure. *Getreide, Mehl u. Brot* 5/6, 44 (1949)
- 43) *Moufang, E.*, Ein Beitrag zur Säurebildung bei der Gärung. *Z. ges. Brauwes.* 36, 24 (1913)
- 44) *Hurlbert, R. B.*, *H. Schmitz*, *A. F. Brumm* und *V. R. Potter*, Chromatographische Trennung von säurelöslichen Nucleotiden. *A. biol. Chem.* 209, 23—39 (1954)
- 45) *Salkowski, E.*, Über die Verbindung des Traubenzuckers mit Kupferoxyhydrat. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 3, 79—97 (1897)
- 46) *Kottmeyer, G.*, Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung kleinster Milchsäuremengen. *Biochem.* 324, 160—164 (1953)
- 47) *Pijanowski, E.*, *M. B. Wojtoeta* und *A. Jedra*, Vergleichende Studien über die Bestimmung kleiner Mengen Milchsäure in roher Milch. *Nahrung* 8, 621—635 (1964)
- 48) *Mitchell, L. C.*, Report lactic acid in dairy products. *J. Assoc. off. agric. Chemists* 34, 2, 252—260 (1951)
- 49) *Peterson, I.*, Der Einsatz eines Ionenaustauschers zur Bestimmung von Milchsäure in Molkeerzeugnissen. *Medd. Alnarpsinst Mejeriavd.* 49, 8—16 (1956)
- 50) *Velasco, J.*, und *C. R. Noll*, Eine verbesserte Methode zur Bestimmung von Milchsäure in Proben von Trockenmagermilch. *J. Assoc. off. agric. Chemists.* 40, 1081—1084 (1957)
- 51) *Dreus, E.*, Versuche zur Isolierung und Trennung wasserlöslicher, nichtflüchtiger, organischer Säuren aus Teig und Brot durch Ionenaustausch. *Brot u. Gebäck* 6, 140—141 (1956)
- 52) *Schweiger, A.*, Chromatographie von Milchsäure und einigen anderen org. Carbonsäuren auf Zellulose-Schichten. *Z. Lebensmittel-Unters.-Forsch.* 124, 1, 20—22 (1963)
- 53) *Frazeur, D. R.*, Method for determination of citric and lactic acids in dairy products. *J. Dairy Sci.* 44, 1638—1643 (1961)
- 54) *Buswell, R. J.*, Bestimmung von Milchsäure in Milchsäureglyceriden enthaltenden Backhilfsmitteln durch Verteilungschromatographie. *J. Amer. Oil Chemists Soc.* 41, 457—459 (1964)
- 55) *Kain, W.*, und *J. Schneider*, Milchsäureschnellbestimmung in Handelsweinen. *Mitt. Klosterneuburg* 14 A, 2, 83—87 (1964)
- 56) *Prey, V.*, *W. Braunsteiner*, *R. Goller* und *F. Stressler-Buchwein*, Bestimmung von Milchsäure in Zuckersäften. *Z. Zuckerindustr.* 14, 205—206 (1964)
- 57) *Hoffman, N. E.*, *J. J. Barboriak* und *H. F. Hardman*, Empfindliche GC-Methode zur Bestimmung von Milchsäure. *Analyt. Biochem (N. V.)* 9, 175—179 (1964)
- 58) *Flieg, O.*, Eine einfache Bestimmung der Milchsäure in Sauerfütter. *Biedermanns Zbl.* 9, 178 (1937)
- 59) *Tillmans, J.*, und *W. Luckenbach*, Ein neues Verfahren zum Nachweis neutralisierter Milch. *Z. Unters. Nahrungs- und Genussmittel* 50, 103—111 (1925)
- 60) *Stollenwerk, W.*, Über die Bestimmung der Säuren des Silofutters. *Landwirtschaftl. Jahrbücher* 76, 5 (1932)
- 61) *Smelik, J.*, und *O. Zeiser*, Determination par acidimétrie du lactate de calcium. *Lait* 34, 339—340 (1954)
- 62) *Fetzer, W. R.*, und *R. C. Jones*, Zur Bestimmung der freien und gesamten Säure in handelsüblicher Milchsäure. *Analyt. Chemistry* 24, 835 (1952)
- 63) *Strohecker, R.*, *H. Riffart* und *J. Haberstock*, Die stufenphotometrische Bestimmung der Milchsäure. *Vorratspflege und Lebensmittelforsch.* 1, 93—98 (1938)
- 64) *Mauer, H.*, Stufenphotometrische Bestimmung der Milchsäure. *Biochem. Z.* 319, 553—560 (1949)
- 65) *Bobtelsky, M.*, und *I. Bar-Gadda*, Milchsäurebestimmung durch Kupferkomplexe. *Bull. Soc. Chim. France* 276 (1953)
- 66) *Draganic, Z. D.*, The spectrophotometric determination of some organic acids with copper benzidine. *Analyt. Chim. Acta* 28, 394—397 (1963)
- 67) *Fuchs, H. J.*, Einige Verbesserungen d. kolorimetrischen Milchsäurebestimmungen nach Mendel-Goldscheider. *Biochem. Z.* 217, 405—408 (1930)
- 68) *Mc Allister, R. A.*, A semi-quantitative colour reaction for lactic acid. *Analyst.* 76, 901, 238—239 (1951)
- 69) *Ling, E. R.*, The determination of lactic acid in milk. *J. Sci. Food. Agric.* 2, 6, 279—288 (1951)
- 70) *Taylor, P. B.*, und *L. F. L. Clegg*, Ein Zurückweisungstest für Rohmilch. *J. Dairy Res.* 25, 32—51 (1958)
- 71) *Paulsen, J.*, Bestimmung der Milchsäure in Milch. *Kieler Milchwirtsch. Forsch.-Berichte* 3, 2, 131—145 (1951)
- 72) *Steinholt, K.*, und *H. E. Calbert*, A rapid colorimetric method for the determination of lactic acid in milk and milk products. *Milchwissenschaft.* 15, 1, 7—11 (1960)
- 73) *Dewan and Green*, Determination of lactic acid. *Biochem. J.* 31, 10, 74 (1937)
- 74) *Pfleiderer, G.*, und *K. Dose*, Eine enzymatische Bestimmung der L(+)-Milchsäure mit Milchsäurehydrase. *Biochem. Z.* 326, 436—441 (1955)
- 75) *Hess, B.*, Über eine kinetisch-enzymatische Best. der L(+)-Milchsäure im menschlichen Serum und anderen biologischen Flüssigkeiten. *Biochem. Z.* 328, 110—116 (1956)
- 76) *Horn, H. D.*, und *F. H. Bruns*, Quantitative Bestimmung von L(+)-Milchsäure mit Milchsäurehydrogenase. *Biochem. biophys. Acta* 21, 378—380 (1956)
- 77) *Hamer, C. J. A. van den*, und *R. W. Elias*, A method for the determination of D(–)-lactic acid. *Biochem. biophys. Acta* 29, 556—562 (1958), s. auch in *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, 1962
- 78) *Hohorst, H. J.*, Enzymatische Bestimmung von L(+)-Milchsäure. *Biochem. Z.* 328, 509—521 (1957), s. auch in *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie 1962.
- 79) *Wieland, O.*, Optisch-enzymatische Bestimmung von L(+)-Milchsäure mit DPN-unabhängiger Milchsäure-Dehydrogenase aus Hefe. *Biochem. Z.* 329, 568—576 (1958), s. a. in *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie 1962.
- 80) *Fredland, I. M.*, und *L. S. Dietrich*, Eine enzymatische Schnellbestimmung von L(+)-Milchsäure. *Analyt. Biochem.* 2, 390—392 (1961)
- 81) *Olsen, G. F.*, Optical conditions for the enzymatic determination of lactic acid. *Clin. Chem.* 8, 1—10 (1962)
- 82) *Noll, F.*, Methode zur quantitativen Bestimmung von L(+)-Lactat mittels Lactat-Dehydrogenase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase. *Biochem. Z.* 346, 1, 41—49 (1966)
- 83) *Lundholm, L. E.*, *Mohme-Lundholm* und *N. Sredmyr*, Comparative unvestigation of methods for determination of lactic acid in blood and in tissue extracts. *Scan. J. Clin. Invest.* 15, 311—316 (1963 a)
- 84) *Schweiger, A.*, und *H. Günther*, Chemische und enzymatische Milchsäurebestimmung im Fleisch. *Mittbl. Fachgr. GDCH-Lebensm.- u. gerichtl. Chemie* 18, 7, 140—143 (1964)
- 85) *Schweiger, A.*, und *H. Günther*, A comparison of two methods for the determination of lactic acid in unisole. *J. Food Sci.* 29, 808—813 (1964)
- 86) *Langner, H. J.*, Vergleichende photometrische und GC-Milchsäurebestimmung in Bakteriennährböden. *Z. Lebensmittelunters.-Forsch.* 131, 4, 218—221 (1966)
- 87) *Lieb, H.*, und *M. K. Zacherl*, Ein verbesserter Apparat zur Bestimmung von Milchsäure. *Hoppe-Seyler's Z. physiolog. Chem.* 211, 211—216 (1932)
- 88) *Fredemann, T. E.*, *M. M. Cotonio* und *P. A. Schaffer*, The determination of lactic acid. *J. Biol. Chem.* 73, 335—358 (1927)
- 89) *Spicher, G.*, und *H. Stephan*, Die Mikroflora des Sauerteiges. I.—III. *Mitt. Zbl. Bakt. Abb. II*, 113, 80—106 (1959), 118, 453—471 (1964), 120, 685—712 (1966)
- 90) *Spicher, G.*, Ergebnisse neuerer mikrobieller Sauerteigstudien. *Dtsch. Lebensmittel-Rdsch.* 62, 2, 43—46 (1966), 62, 3, 78—81 (1966)
- 91) *Spicher, G.*, Die Milchsäurebakterien des Spontansauers. *Brot u. Gebäck* 20, 7, 136—141 (1966)