



# RÜCKSTELLPROBEN DER MILCH FÜR DIE SPÄTERE ANALYSE

Diskussionsgruppen

**Autor**

Ernst Jakob

Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP-Haras,  
CH-3003 Bern





Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für  
Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF  
**Agroscope**

## Impressum

|               |  |
|---------------|--|
| ISSN          | 1661-0814 (online) /30.10.2013   |
| Herausgeberin | Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux<br>ALP-Haras<br>Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern<br>Tel. +41 (0)31 323 84 18, Fax +41 (0)31 323 82 27<br>info@agroscope.admin.ch, www.agroscope.ch |
| Fotos         | Forschungsanstalt Agroscope<br>Liebefeld-Posieux ALP-Haras   |
| Gestaltung    | RMG Design, CH-1700 Fribourg   |
| Copyright     | © 2013 ALP-Haras<br>Nachdruck bei Quellenangabe und Zustellung<br>eines Belegexemplars an die Herausgeberin gestattet.   |

# Inhaltsverzeichnis

|    |  |    |
|----|--|----|
| 1. | Einleitung   | 2  |
| 2. | Aussagekraft von Analysen gefrorener Rückstellproben | 2  |
| 3. | Rückstellproben fassen                               | 5  |
| 4. | Vorgehen für die Laboruntersuchung der Proben        | 9  |
| 5. | Analysenkosten optimieren                            | 10 |
| 6. | Zusammenfassung                                      | 12 |

# 1. Einleitung

Die Rohmilch kann Ursprung diverser Käsefehler sein. Aus verschiedenen Gründen ist es leider nicht möglich, die Milch vor der Verarbeitung auf alle möglichen Mängel zu prüfen. Laboranalysen sind teuer, erfordern bestimmte Geräte und Einrichtungen und liefern das Resultat oft erst, wenn die Milch bereits verarbeitet ist. Rückstellproben bieten die Möglichkeit, den Verursacher eines rohstoffbedingten Käsefehlers auch später noch zu identifizieren.

Das tägliche Fassen und Einfrieren von Milchproben der einzelnen Lieferanten hat sich in vielen Käsereien eingebürgert. Damit spätere Analysen aber auch brauchbare Ergebnisse liefern, müssen die Proben korrekt gefasst, eingefroren und gelagert werden. Der vorliegende Diskussionsgruppenstoff zeigt auf, was alles zu beachten ist. Ausserdem gehen wir der Frage nach, welche Prüfparameter in gefrorenen Rückstellproben noch untersucht werden können und wie es um die Aussagekraft der Prüfergebnisse bestellt ist.

## 2. Aussagekraft von Analysen gefrorener Rückstellproben

### 2.1 Veränderung der Probe durch das Einfrieren

Das Einfrieren der Milch kann zu verschiedenen Veränderungen in der Milch führen, die die Brauchbarkeit einer gefrorenen Milchprobe für spätere Analysen einschränken. Der Grund:

- Beim Einfrieren bilden sich Wasserkristalle, welche die Membranen von biologischen Zellen schädigen.
- Gelöste Stoffe wie die Milchsalze reichern sich im noch nicht gefrorenen Wasseranteil an und der pH-Wert verschiebt sich. Das führt zur Denaturierung empfindlicher Enzyme und anderer Eiweisse.
- In den Fettkügelchen bilden sich Fettkristalle, welche die Fettkügelchenmembran schädigen.

Die Folgen davon sind:

- Reduktion der Keimzahl vegetativer Mikroorganismen
- Anstieg der Menge von lipolysierbarem, bzw. freiem Fett
- Rückgang der Aktivität bestimmter Enzyme
- Im Extremfall kommt es zur Ausfällung des Caseins.

**Die negativen Auswirkungen des Einfrierens sind umso gravierender, je langsamer die Milch eingefroren wird, je höher die Temperatur im Tiefkühler ist und je stärker die Temperaturschwankungen während der Gefrierlagerung sind (siehe Tab. 1).**

Tiefkühltruhen sind für die Lagerung von Rückstellproben besser geeignet als Tiefkühlschränke, da sie temperaturstabiler sind.

### 2.2 Aussagekraft der Ergebnisse

Die Auswirkung des Einfrierens der Proben auf Mikroorganismen ist je nach Keimgruppe recht unterschiedlich. Anaerobe Sporen werden, wie Versuche von ALP gezeigt haben, nicht beeinflusst. Auch Propionsäurebakterien überleben in Milch eine Gefrierlagerung bei  $-24^{\circ}\text{C}$  recht gut (Abb. 1).

Problematisch ist dagegen die Untersuchung sehr heterogener Keimgruppen wie der aeroben mesophilen Keime oder der psychrotrophen Keime in gefrorenen Proben. Innerhalb solcher Gruppen gibt es recht empfindliche Keime. Wie die Arbeit von Wendorff und Rauschendorf (siehe Tab. 1) an der Universität Wisconsin zeigt, nimmt die aerobe mesophile Keimzahl in Schafmilch durch das Einfrieren um rund 50% ab, die Keimzahl der coliformen Keime sogar noch stärker. Nach sechs Monaten zeigt sich zudem ein deutlicher Einfluss der Lagertemperatur. Bei  $-15^{\circ}\text{C}$  leiden die Keime sichtbar stärker als bei  $-27^{\circ}\text{C}$ . Bei unterschiedlicher Zusammensetzung der Keimflora in den Proben, kann es durchaus sein, dass sich das Einfrieren von Probe zu Probe verschieden auf die aerobe mesophile Keimzahl oder eine andere heterogene Keimgruppe auswirkt. Dadurch ist auch die Vergleichbarkeit der Prüfergebnisse infrage gestellt.

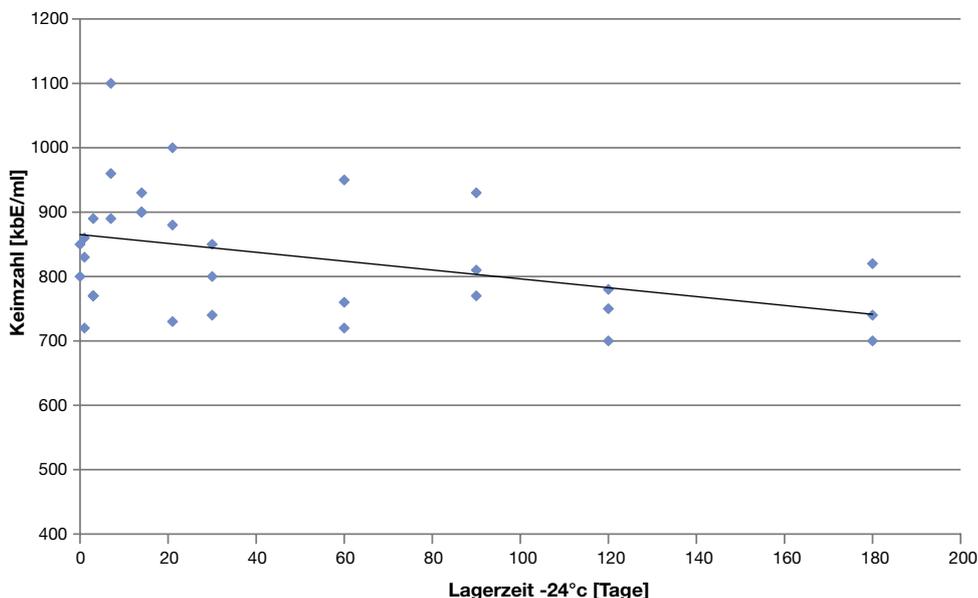


Abb. 1: Auswirkungen der Gefrierlagerung auf die Keimzahl der Propionsäurebakterien in künstlich kontaminierter Rohmilch (Versuch ALP).

Tab. 1: Einfluss der Gefrierlagerung bei -15° und bei -27°C auf die Keimzahlen in Schafmilch (nach Wendorff &amp; Rauschenberger, 2001)

| Lagerdauer<br>Monate | Aerobe mesophile Keime |       | Coliforme Keime |       |
|----------------------|------------------------|-------|-----------------|-------|
|                      | -15°C                  | -27°C | -15°C           | -27°C |
| 0 (frisch)           | 8200                   | 8200  | 44              | 44    |
| 1                    | 4100                   | 4100  | 26              | 10    |
| 2                    | 2500                   | 3200  | 21              | 9     |
| 3                    | 3400                   | 3700  | 12              | 12    |
| 6                    | 2200                   | 2800  | <1              | 8     |
| 9                    | 340                    | 2700  | <1              | 8     |
| 12                   | 610                    | 1800  | <1              | 5     |

Wie sich das Einfrieren der Proben auf verschiedene käse-  
reispezifische Prüfparameter der Milch auswirkt, ist in  
Tabelle 2 zusammengefasst.

Untersuchungsergebnisse von gefrorenen Proben, die nicht  
die genau gleiche Behandlung erfahren haben, können in

der Regel nicht miteinander verglichen werden. Gleich-  
wohl: Werden in einer gefrorenen Milchprobe z.B. 5000  
koagulasepositive Staphylokokken pro ml gezählt, so wird  
sie natürlich zu Recht beanstandet, denn tiefer war der  
Wert in der frischen Milch bestimmt nicht, vorausgesetzt  
die Probe wurde korrekt behandelt.

Tab. 2: Eignung tiefgekühlter Milchproben für ausgewählte Laboruntersuchungen

| Prüfparameter                | Einfluss des Einfrierens  | Bemerkung   |
|------------------------------|---|---|
| Anaerobe Sporen (MPN)        | keiner  | Sporen sind gefrierresistent  |
| Anaerobe Sporen (Filtration) | Kein Einfluss auf die Sporenzahl, aber<br>ev. verschlechterte Filtrierbarkeit |   |
| Aerobe mesophile Keime       | Deutlich reduzierte Keimzahl  | Zusammensetzung der Keimflora der<br>Milchprobe beeinflusst den Effekt.<br>Nicht empfohlen!                         |
| Lipolytische Keime           | Deutlich reduzierte Keimzahl  | Zusammensetzung der Keimflora der<br>Milchprobe beeinflusst den Effekt.<br>Nicht empfohlen!                         |
| Propionsäurebakterien        | etwas reduzierte Keimzahl   | Relativ gute Überlebensrate<br>Vergleich gleich behandelte Proben<br>untereinander zulässig                         |
| Psychrotrophe Keime          | Deutlich reduzierte Keimzahl  | Zusammensetzung der Keimflora der<br>Milchprobe beeinflusst den Effekt.<br>Nicht empfohlen!                         |
| Salztolerante Keime          | Reduzierte Keimzahl   | Zusammensetzung der Keimflora der<br>Milchprobe beeinflusst den Effekt.<br>Nicht empfohlen!                         |
| Freie Buttersäure (GC)       | Einfrieren wird empfohlen!  | Einfrieren verhindert die Vermehrung<br>lipolytischer Keime und eine Fettschä-<br>digung beim Transport der Proben. |

## 3. Rückstellproben fassen

### 3.1 Einzelgemelke oder Mischproben

Die spätere Untersuchung einer eingefrorenen Rückstellprobe soll natürlich ein Ergebnis liefern, das den Zustand der frischen Milch möglichst gut wiedergibt. Dies ist am besten gewährleistet, wenn die Probe sofort kalt gestellt und spätestens nach 2 h eingefroren wird.

Bei zweimal täglicher Milchanlieferung werden also idealerweise zwei separate Proben gefasst. Bei der späteren Untersuchung kann dann die Probe der Abendmilch im Labor mit der Probe des folgenden Morgens vereint werden, um genügend Probenmaterial für einen Sporennachweis zu haben (vgl. Tab. 3) bzw. um Untersuchungskosten zu sparen. Es gibt aber auch Betriebe, welche die Proben der Abendmilch in den nur zur Hälfte gefüllten Probenröhrchen über Nacht kalt stellen und am folgenden Tag ein gleiches Volumen der Morgenmilch des jeweiligen Lieferanten hinzufügen. Dieses Vorgehen ist vertretbar, sofern die Proben sofort gekühlt werden und die Probenröhrchen nach dem Hinzufügen des Anteils vom Morgen sofort eingefroren werden.

Keinesfalls sollen die Abendproben eingefroren und die Morgenmilch dann hinzugefügt werden. Denn für die Probe des Abendgemelks läuft dies auf ein zweimaliges Einfrieren hinaus, was unbedingt zu vermeiden ist.

Für die meisten Untersuchungen unbrauchbar sind Mischproben von vier oder mehr Lieferungen eines Lieferanten.

### 3.2 Wahl der Probengefäße

Die Probengefäße sollten folgende Anforderungen erfüllen:

- Ausreichende Robustheit bei  $-18^{\circ}\text{C}$
- Ausreichendes Volumen (minimales Probenvolumen plus genügend Kopfraum)
- Dichter Schraubverschluss

Gut bewährt haben sich Röhrchen aus Polypropylen, das im Unterschied zu Polystyrol auch bei tiefen Temperaturen nicht spröde wird. Da sich Milch beim Gefrieren um ca. 8% ausdehnt, dürfen die Röhrchen nicht zu stark gefüllt sein und sollten einen Schraubdeckel haben. Die Grösse der Röhrchen richtet sich im Übrigen danach, ob Morgen- und Abendmilch getrennt eingefroren werden oder nicht und nach der für die vorgesehene Methode der Sporenanalyse notwendigen Milchmenge (vgl. Tab. 3).

In der Romandie, wo es sich eingebürgert hat, Morgen- und Abendmilch getrennt einzufrieren und die Milch im Bedarfsfall mit der MPN-Methode zu untersuchen, werden vorwiegend Probenröhrchen mit einem Volumen von 13 ml verwendet, die mit ca. 11 ml Milch gefüllt werden (siehe Abb. 2). Die Röhrchen sind bei den milchwirtschaftlichen Laboratorien in Moudon und Grangeneuve erhältlich.

Tab. 3: Minimales Probenvolumen für eine Auswahl von Untersuchungskriterien

| Prüfparameter                | Minimales Probenvolumen                         |
|------------------------------|---|
| Hemmstoffe                   | 5 ml  |
| Freie Buttersäure (GC)       | 10 ml   |
| Propionsäurebakterien        | 10 ml   |
| Enterokokken                 | 10 ml   |
| Anaerobe Sporen (MPN)        | 20 ml (Methode Romandie)<br>30 ml (Methode ALP) |
| Anaerobe Sporen (Filtration) | 40 ml   |

In der Deutschschweiz, wo für die Sporenanalysen in der Regel die Filtrationsmethode zum Einsatz kommt, sind Röhrchen von 25 ml oder 50 ml Volumen zweckmässig. Ungeeignet sind die in der Milchprüfung verwendeten Probengefäße. Die Klappdeckel dieser Gefäße springen beim Einfrieren der Proben auf.



Abb. 2: In der Romandie oft verwendete 13 ml PP-Röhrchen mit Lagerschachtel (hinten) und Kühlblock zur Sofortkühlung (vorne)

Abb. 3: Universaltuben 50 ml aus Polypropylen kosten ca. 30-40 Rappen pro Stück



Abb. 4: Unverzichtbare Hilfsmittel für eine korrekte Probenahme

### 3.3 Vorgehen bei der Probenahme

Bei der Probenahme ist grundsätzlich gleich vorzugehen wie bei der Probenahme für die Milchprüfung (siehe „Arbeitsanweisung für die Durchführung der manuellen Probenahme der Milchprüfung (MP)“ von Suisselab).

**Milch vor der Probenahme gut aufrühren.** Dies ist besonders wichtig, weil sich Bakterien gerne an Fettkügelchen anheften und sich daher im Rahm anreichern. Die Fettgehalte, die in MP-Proben manchmal beobachtet werden, lassen vermuten, dass hier nicht allzu selten Fehler gemacht werden.

**Repräsentative Probe sicherstellen.** Wird Milch in Kannen angeliefert, muss jeder Kanne so viel Milch entnommen

und in das Probengefäß überführt werden, dass die Zusammensetzung der Probe so ist, als hätte man den Inhalt der Kannen als Ganzes gemischt (siehe Abb. 6). Bei fünf oder mehr Kannen ist es unumgänglich, aus jeder Kanne eine volle Kelle zu entnehmen und erst in einem Mischbehälter zu mischen. Danach werden 45 ml der Mischung ins Probengefäß abgefüllt.

Nach jedem Lieferanten müssen Schöpfkelle, Kannenrührer und gegebenenfalls das Mischgefäß mit heissem Wasser gespült werden (z.B. in Kanne mit heissem Wasser). Vor der nächsten Probenahme die Schöpfkelle und Mischbehälter gut abtropfen lassen.

Unmittelbar nach der Entnahme sind die einzelnen Proben mit Eiswasser zu kühlen.

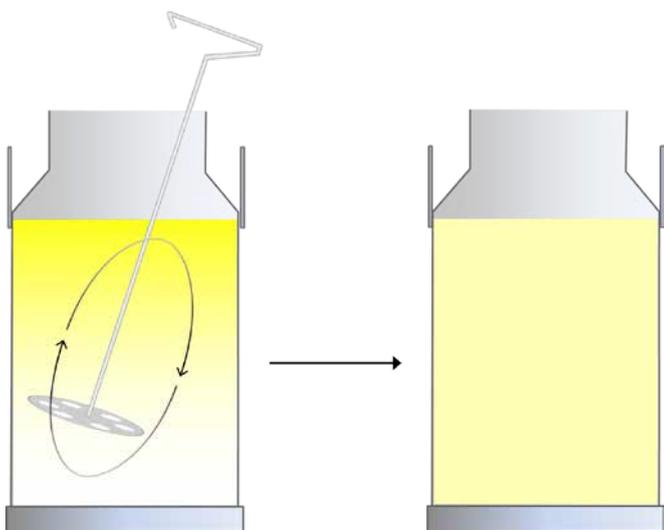


Abb. 5: Ein gründliches Aufrühren der Milch unmittelbar vor der Probenahme ist sehr wichtig

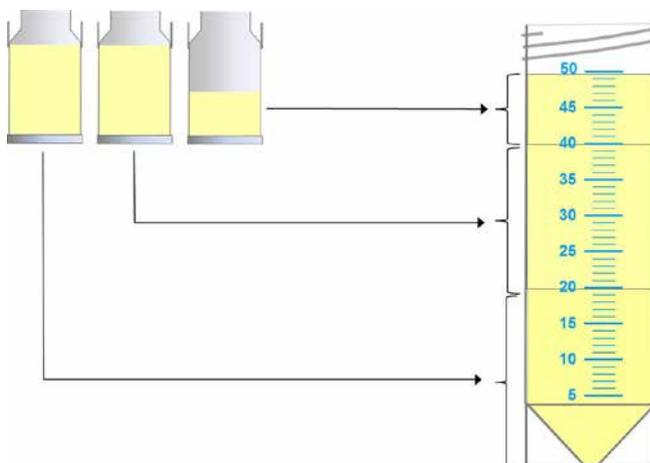


Abb. 6: Probenahme aus zwei bis max. vier Kannen.

### 3.4 Richtig einfrieren und lagern

Für die Qualität der Probe ist es umso besser, je schneller der Gefrierprozess abläuft. Kleine 13 ml Röhrchen sind diesbezüglich im Vorteil. Bei 50 ml Gefässen dauert das Einfrieren mindestens viermal länger. Die Wärmemenge, die einer bestimmten Menge Wasser von 0°C entzogen werden muss, um sie komplett in Eis von 0°C zu überführen, reicht aus, um dieselbe Wassermenge von 81°C auf 0°C abzukühlen! Die grosse Menge Kristallisationswärme kann nur dann effizient abgeführt werden, wenn die kalte Luft im Tiefkühler zwischen den Röhrchen zirkulieren kann. Das heisst: Grosse Probengefässe sollten in einem Gestell stehend eingefroren werden (siehe Abb. 7) und erst später in Schachteln oder Beuteln gepackt werden.

Es ist von Vorteil, die Proben geordnet zu lagern, so dass man später die ältesten, nicht mehr benötigten Proben, oder die für Analysen benötigten Proben einfach findet.



Abb. 7: Ein Gestell stellt sicher, dass die Luft beim Einfrieren zwischen den Probengefässen zirkulieren kann und die Proben nicht umkippen.



Abb. 8: Für Ordnung im Tiefkühler sorgen. Vorher eingefrorene Proben lassen sich in Vacuumbeutel platzsparend lagern. Auch Kulturenversandschachteln eignen sich.

## 4. Vorgehen für die Laboruntersuchung der Proben

### 4.1 Transport der Proben ins Labor

- Sprechen Sie sich mit ihrem Labor ab, bevor Sie die Proben aus ihrem Tiefkühler holen.
- Die Proben sollten gefroren im Labor eintreffen, so dass das Labor sie unter kontrollierten Bedingungen auftauchen kann.
- Ist ein Postversand der Proben unumgänglich, müssen die Proben in einer Styroporbox vorzugsweise mit Trockeneis gekühlt versandt werden, und zwar als Express-Paket (z.B. mit dem Service Swiss-Express „Mond“ der Post).
- Steht kein Trockeneis zur Verfügung, mehrere dicke Kühlpakete direkt aus dem Tiefkühler dazu packen. Styroporbox zukleben. Das Paket möglichst knapp vor Annahmeschluss der Post vorbereiten und aufgeben.

### 4.2 Annahme im Labor

Das Labor muss bei Probeneingang kontrollieren, ob die Proben noch gefroren sind. Sind sie das nicht, muss geprüft werden, ob die Analyse noch Sinn macht. Eine Analyse auf freie Fettsäuren macht z.B. keinen Sinn mehr, wenn die Proben während des Versandes Proben ganz oder teilweise aufgetaut sind. Eine Untersuchung auf anaerobe Sporen ist aber noch möglich, wenn die Proben nicht schon ausgeflockt sind.

## 5. Analysenkosten optimieren

### 5.1 Grosse Schwankungen erfordern mehrfache Messungen

Wenn im Schadenfall die Rückstellproben der Milch der einzelnen Lieferanten untersucht werden müssen, kommt oft eine beträchtliche Anzahl von Proben zusammen. Natürlich bekäme man das genauesten Ergebnisse bezüglich der durchschnittlichen Qualität der Milch eines bestimmten Lieferanten, wenn man z.B. von einer vierzehntägigen Schadenperiode jede Milchlieferrung untersuchen würde.

Wie das Beispiel in Tab. 4 zeigt, können die Resultate eines Lieferanten von Tag zu Tag enorm streuen. Lieferant B hat offensichtlich ein Problem mit Sporenkontaminationen in der Milch. Trotzdem sind 9 von 14 Resultaten einwandfrei. Kann daraus geschlossen werden, dass die Milch von Lieferant B an diesen Tagen nicht für die Buttersäuregärung verantwortlich war? Nein!

Gross sind die durch die Probenahme und durch die Ungenauigkeit der mikrobiologischen Keimzählmethoden nahe der Nachweisgrenze bedingten Schwankungen. Darum gilt der Grundsatz „einmal ist keinmal“. Nur Durchschnittswerte mehrerer Messungen sind aussagekräftig genug (siehe dazu auch Tab. 6)

Tab. 4: Ergebnisse der Sporenanalyse der Milch zweier Lieferanten im Zusammenhang mit Buttersäuregärungen im Käse (Sporen/Liter).

| Tag | Lieferant A | Lieferant B |
|-----|-------------|-------------|
| 1   | <25         | 500         |
| 2   | <25         | 25          |
| 3   | <25         | <25         |
| 4   | <25         | <25         |
| 5   | <25         | <25         |
| 6   | <25         | <25         |
| 7   | <25         | >1250       |
| 8   | <25         | <25         |
| 9   | <25         | <25         |
| 10  | 125         | <25         |
| 11  | <25         | 100         |
| 12  | <25         | <25         |
| 13  | <25         | 1250        |
| 14  | <25         | <25         |

## 5.2 Mischproben untersuchen

Um die Analysenkosten auf ein vertretbares Mass zu begrenzen, können im Labor die verschiedenen Tagesproben eines bestimmten Milchlieferanten zu einer Mischprobe vereinigt werden. Mit der Mischprobe wird dann die Analyse durchgeführt und zwar als Doppel- oder Dreifachbestimmung (siehe Tab. 5). Allerdings lohnt sich das Mischen der Proben erst ab vier oder mehr Tagesproben, zumal dies mit einem gewissen Aufwand verbunden ist.

Wie Tabelle 6 zeigt, ist eine Einzelbestimmung relativ unzuverlässig. Mit einer Wahrscheinlichkeit von rund 45% weicht ein einzelnes Sporenergebnis um 50 Sporen/L oder mehr vom erwarteten Wert (im Beispiel 100 Sporen/L) ab. Mit zwei oder drei Analysen verbessert sich die Zuverlässigkeit des Mittelwertes deutlich. Aber mit jeder weiteren Analyse wird der Zuwachs an Genauigkeit kleiner. Die Maximalzahl von drei Analysen gemäss Tab. 5 ist ein vernünftiger Kompromiss zwischen Analysenaufwand und Genauigkeit.

Als Ergebnis ausgewiesen wird – sofern möglich - der Mittelwert der Messungen. Wir empfehlen aus oben genannten Gründen nicht, Einzelwerte zu kommunizieren.

Die dargestellte Problematik der grossen Messunsicherheit und der begrenzten Aussagekraft von Einzelergebnissen von Keimzählmethoden im tiefen Konzentrationsbereich gilt nicht nur für die Sporen. Die dadurch bedingte Notwendigkeit von Mehrfachmessungen ergibt sich z.B. auch für die Propionsäurebakterien, wo die Beanstandungsgrenze ebenfalls im Bereich der Nachweisgrenze liegt.

Tab. 5: Vorgehen beim Herstellen und Untersuchen von Mischproben.

| Länge der Schadenperiode | Anzahl Messungen   | Verbindliches Ergebnis                     |
|--------------------------|--|--|
| 1 Tag                    | 1-2 (je nach vorhandener Milchmenge)   | Einzelwert bzw. Mittelwert aus 2 Messungen |
| 2 Tage                   | 2 Messungen an der Mischprobe der Proben von 2 Tagen oder Analyse der 2 Einzelproben | Mittelwert der 2 Messungen                 |
| 3 oder mehr Tage         | 3 Messungen an der Mischprobe aller Proben der Schadenperiode                        | Mittelwert aller Messungen                 |

Tab. 6: Vertrauenswürdigkeit des Mittelwertes von Sporenanalysen (Filtrationsmethode) in Abhängigkeit von der Anzahl Wiederholungen berechnet für eine Milch mit einem wahren Sporengehalt von 100 Sporen pro Liter.

| Anzahl Wiederholungen | Wahrscheinlichkeit für ein „richtiges“ Ergebnis (100 ± 25 Sporen/L) | 90% der Ergebnisse liegen im Bereich von ... |
|-----------------------|---|--|
| 1                     | 55.6%   | 25 - 175 Sporen/L                            |
| 2                     | 64.4%   | 50 - 150 Sporen/L                            |
| 3                     | 72.0%   | 58 - 142 Sporen/L                            |
| 4                     | 78.2%   | 63 - 131 Sporen/L                            |

## 6. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eingefrorene Rückstellproben bei der Rückverfolgung von Buttersäure- und Propionsäuregärungen gute Dienste leisten können. Auch in Fällen von Ranzigkeit im Käse konnte die Ursache anhand von Rückstellproben identifiziert werden. Wichtig ist, dass die Proben korrekt gefasst und eingefroren wurden und während der Lagerung nicht grossen Temperaturschwankungen ausgesetzt werden. Bevor die Proben im Schadenfall aus dem Tiefkühler geholt werden, die Instruktionen des untersuchenden Labors einholen.

Bei Buttersäuregärungen oder Propionsäuregärungen im Käse sollte die Verantwortung der Milchlieferanten anhand von Mehrfachanalysen der Milch beurteilt werden. Bei Schadenperioden von mehr als drei Tagen ist es sinnvoll, Mischproben herzustellen und den Mittelwert aus drei Messungen je Mischprobe für die Lieferantenbeurteilung zu verwenden.