



Das Lebensmittelministerium



## Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch im EU-Hygienericht

Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft

Heft 16/2008

Freistaat  Sachsen

Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft

**Untersuchung von Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch und daraus hergestellter  
Erzeugnisse unter dem Aspekt des neuen EU-Hygierechts**

Dirk Krowas

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung und Aufgabenstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Prüfverfahren.....</b>	<b>2</b>
2.1	Untersuchungen der Rohmilch.....	2
2.2	Untersuchung der Milcherzeugnisse .....	3
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>4</b>
3.1	Untersuchung von Schaf-, Ziegen- und Büffelrohmilch auf den Gefrierpunkt.....	4
3.2	Untersuchung von Schaf-, Ziegen- und Büffelrohmilch auf die Keimzahl bei 30 °C.....	7
3.3	Prüfung der Anwendbarkeit verfügbarer Prüfmethode zum Nachweis von Hemmstoffen/Antiinfektiva.....	8
3.4	Nachweis der deklarierten Tierart im Endprodukt mittels PCR.....	10
<b>4</b>	<b>Schlussfolgerungen und Zusammenfassung.....</b>	<b>13</b>
<b>5</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>15</b>

## 1 Einführung und Aufgabenstellung

Produkte aus Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch stellen eine wertvolle Ergänzung des Angebotspektrums an Milcherzeugnissen und eine mögliche Alternative bei Kuhmilchallergie dar. Auch in Deutschland wächst stetig die Nachfrage nach entsprechenden Milchprodukten, die zum überwiegenden Teil in direkt vermarktenden oder kleineren Betrieben hergestellt und als Spezialitäten vertrieben werden.

Die lebensmittelrechtliche Qualitätseinschätzung der Milch und Milcherzeugnisse anderer Tierarten fand im neuen EU-Hygienerecht (VO (EG) 852/2004 und 853/ 2004; EU-Basis-VO 178/2002) Berücksichtigung, weicht im Vergleich zu den Regelungen von Kuhmilch/-erzeugnissen jedoch in einigen Punkten ab. So ergibt sich hinsichtlich der Umsetzung der Rechtsverordnungen Klärungs- bzw. Diskussionsbedarf, u. a. zu den Gütekriterien der Rohmilch anderer Tierarten als der Kuh. Mit dem Hintergrund des Schutzes der Verbraucher vor Täuschung und Irreführung (Lebensmittel und Futtermittelgesetzbuch LFGB § 11/ Artikel 8 VO (EG) 178/2002) ist darüber hinaus die Authentizität der aus dieser Milch hergestellten Produkte analytisch zu bestätigen.

Ziel des Projektes war es, Untersuchungen zu den folgenden Arbeitsschwerpunkten durchzuführen und unter dem Aspekt des neuen EU-Hygienerichts zu bewerten.

### Arbeitsschwerpunkte:

- Gefrierpunktbestimmungen von Schaf-, Ziegen- und Büffelrohmilch → Eignung zur Festlegung von Grenzwerten zur Gütekontrolle
- Anwendbarkeit standardisierter Methoden und Schnelltests zum Nachweis von Hemmstoffen/Antiinfektiva in Schaf-, Ziegen- und Büffelrohmilch (⇒ VO (EG) 853/ 2004)
- Bestimmung der Keimzahl 30 °C in Schaf-, Ziegen- und Büffelrohmilch → Auswertung hinsichtlich bestehender Grenzwerte (⇒ VO (EG) 853/ 2004)
- Nachweis der deklarierten Tierart und Prüfung auf Kuhmilchanteile im Endprodukt → Etablierung eines PCR-Verfahrens

Im Rahmen des Projektes wurden Rohmilchproben sowie Milcherzeugnisse von insgesamt 18 Betrieben untersucht. Davon wurden 11 Betriebe mit Mitteln des Sächsischen Staatsministeriums für Umwelt und Landwirtschaft gefördert und im Auftrag der Sächsischen Landesanstalt für bearbeitet. Zusätzlich wurden weitere sieben Betriebe, die durch das Land Brandenburg projektgefördert wurden, in das Untersuchungsprogramm einbezogen. In Tabelle 1 sind in anonymisierter Form die Betriebe mit den jeweiligen Probenzahlen an Rohmilch und Milchprodukten aufgelistet.

**Tabelle 1: Übersicht der am Projekt beteiligten Milch verarbeitenden Betriebe und Probenanzahl**

Tierart	Land Sachsen			Land Brandenburg		
	Betrieb Nr.	Anzahl Proben		Betrieb Nr.	Anzahl Proben	
		Rohmilch	Produkt		Rohmilch	Produkt
Büffel	SN 1	5	5	BB 1	3	4
	SN 2*	0	1			
	$\Sigma$ 2	5	6			
Ziege	SN 3	5	5	BB 2	5	3
	SN 4**	-	6	BB 3	3	2
	SN 4a	3	-	BB 4	6	5
	SN 4b	3	-	BB 5	2	3
	SN 5	4	5			
	SN 6	5	5			
$\Sigma$ 4	20	21	4	16	13	
Schaf	SN 7	5	4	BB 6	4	3
	SN 8	5	4	BB 7	3	1
	SN 9	5	3			
	SN 10	4	5			
	SN 11	5	5			
$\Sigma$ 5	24	21	2	7	4	

\* Betrieb SN 2 bezieht die Rohmilch aus dem osteuropäischen Ausland

\*\* Betrieb SN 4 ist ein reiner Verarbeitungsstandort → Rohmilchlieferanten SN 4a und SN 4b

## 2 Prüfverfahren

### 2.1 Untersuchungen der Rohmilch

Probenahme und Einsendung der Rohmilchproben lagen in der Verantwortung der jeweiligen Betriebe. Vorgegeben wurden eine Mindestprobenmenge von 200 ml, keine Konservierung und die Anlieferung der Proben innerhalb von 24 Stunden ohne Unterbrechung der Kühlkette.

Entsprechende Probenahmegefäße stellte die MLUA Oranienburg den Betrieben zur Verfügung. Die Untersuchung zur Gesamtkeimzahl (30 °C) erfolgte zusätzlich und nur aus Proben Brandenburger Betriebe. Das Programm für die Rohmilchuntersuchungen ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Untersuchungsverfahren und Probenanzahlen der Rohmilchuntersuchungen**

		Anzahl Proben		
		Sachsen	Brandenburg	Σ
➤ Gefrierpunktbestimmung:				
Thermistor-	§ 64 LFGB L01.00-29	47	26	73
Kryoskopverfahren				
➤ Nachweis von Hemmstoffen/Antiinfektiva:				
BRT-MRL				
BRT-AS spezial	§ 64 LFGB L01.01-5 bzw. L01.00-11			
Delvotest		49	26	75
Beta Star	nach Angaben des Testherstellers			
Snap-Test				
➤ Bestimmung der Gesamtkeimzahl:				
Keimzahl 30 °C	§ 64 LFGB L 00.00-88	-	26	26

## 2.2 Untersuchung der Milcherzeugnisse

Neben der Rohmilch wurden zur Prüfung der tierartbezogenen Angaben Erzeugnisse – vornehmlich Frisch-, Weich-, Schnittkäse und Joghurt - der Betriebe untersucht (siehe Tab. 3). Alle Proben wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) auf die jeweilige Tierart und auf enthaltene Kuhmilchanteile geprüft. Der qualitative Nachweis von Schaf-, Ziegen- und Rind-spezifischer DNA erfolgte mittels kommerzieller PCR-Fertigkits nach Herstellerangaben. Die ausgewählten CIBUS-Testsysteme sind vom Hersteller für den Tierarten-Nachweis aus Lebensmitteln als geeignet empfohlen. Die verwendeten Systeme beinhalten alle Komponenten zur DNA-Isolation und Aufreinigung aus rohen und verarbeiteten Lebensmitteln sowie zur Durchführung der tierartenspezifischen PCR.

Der Nachweis von büffelspezifischer DNA erfolgte nach BOTTERO et. al (2002) über mitochondriale Cytochrom (cyt) b-Sequenzen. Aus der gleichen Literatur wurde zur Absicherung der Ergebnisse der kommerziellen Testsysteme ein zusätzlicher rindspezifischer PCR-Nachweis übernommen. Die Auswertung der PCR erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung über den Größenvergleich der PCR-Produkte.

**Tabelle 3: Proben-/Untersuchungszahlen zum PCR-Nachweis der deklarierten Tierart**

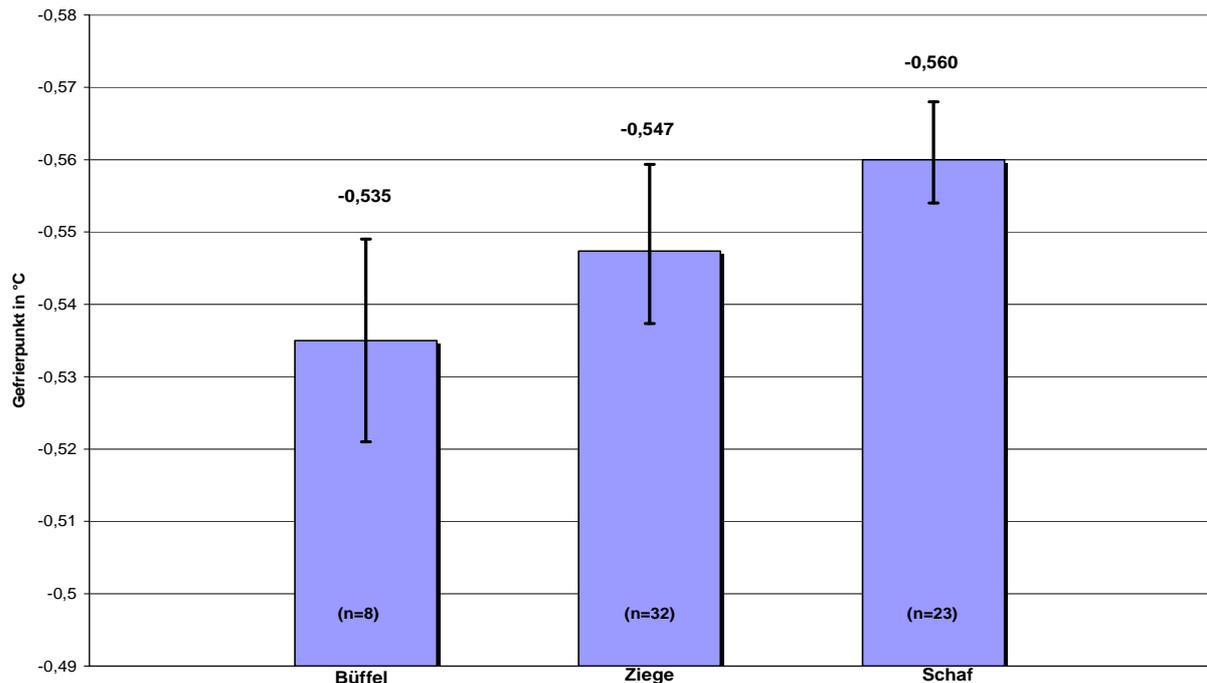
		Anzahl Proben [Anzahl Untersuchungen]		
		Sachsen	Brandenburg	Σ
PCR-Nachweis	Rind	48 [71]*	21 [25]*	69 [96]
	Schaf	21 [21]	4 [4]	25 [25]
	Ziege	21[21]	13 [13]	34 [34]
	Büffel	6 [12]*	4 [8]*	10 [20]

\* Alle Büffelmilcherzeugnisse und alle Proben mit Verdacht auf Kuhmilchanteile wurden mit zwei unterschiedlichen Primersystemen geprüft.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Untersuchung von Schaf-, Ziegen- und Büffelrohmilch auf den Gefrierpunkt

Die Ergebnisse der Gefrierpunktbestimmung sind in Tabelle 4 zusammenfassend dargestellt. Die für die einzelnen Tierarten gemessenen Gefrierpunkte (siehe Abb.1) liegen im Mittel alle unter dem Gefrierpunktbereich für Kuhmilch, wobei sich die untersuchten Büffelrohmilchproben diesem Bereich mit einem Mittelwert von  $-0,535\text{ °C}$  am stärksten nähern. Der Gefrierpunkt von Ziegenrohmilch liegt mit  $-0,547\text{ °C}$  bereits deutlich tiefer und den niedrigsten Gefrierpunkt weist im Vergleich Schafrohmilch mit  $-0,560\text{ °C}$  auf.



**Abbildung 1: Mittelwerte und mittlere Streuung der Gefrierpunktbestimmungen von Büffel-, Ziegen- und Schafrohmilch**

Mit wenigen Ausnahmen streuen die Werte der einzelnen Betriebe mit 0,5 bis 1,7 % nur wenig um den jeweiligen betriebsbezogenen Mittelwert (vgl. Tab. 4). Zwischen den Betrieben traten Schwankungen im Mittel zwischen 1,7 und 2,5 % (vgl. Abb. 1) auf. Von den aus Sachsen angelieferten Proben wiesen sieben (drei Ziegen-, vier Schafproben) einen deutlich abgesenkten Gefrierpunkt ( $< -0,590\text{ °C}$ ) auf. Zusätzlich durchgeführte pH-Wert-Messungen zeigten (pH-Werte zwischen 5,91 und 5,31), dass die Gefrierpunktniedrigung mit einer beginnenden Säuerung einherging und vermutlich ursächlich auf die Stoffwechselaktivität einer entsprechend hohen Keimzahl zurückzuführen ist. Unterstützt wird diese Aussage durch zwei im Gefrierpunkt abweichende Proben eines Schafmilch produzierenden Betriebes aus Brandenburg (BB 6). In diesen Proben wurden jeweils Gesamtkeimzahlen  $> 3,0 \times 10^6$  KbE/ml festgestellt. Während für vier Betriebe diese Abweichungen Einzelfälle darstellten, wiesen die Betriebe SN 11 (drei von vier Proben) und der Betrieb BB

6 (zwei von vier Proben) wiederholt stark erniedrigte Gefrierpunkte auf. Die angesprochenen Werte fanden in der Ergebnisdarstellung (Abb. 1) und in der Mittelwertberechnung keine Berücksichtigung.

**Tabelle 4: Zusammenfassung der Gefrierpunktbestimmungen von Büffel- Schaf- und Ziegenrohmilch pro Betrieb**

Tierart	Büffelrohmilch		Schafrohmilch						
	SN1	BB1	SN7	SN8	SN9	SN10	SN11	BB6	BB7
Betrieb									
Probenanzahl	5	3	4	5	5	4	4	4	3
Mittelwert	-0,544	-0,519	-0,567	-0,566	-0,551	-0,579	-0,610	-0,600	-0,549
Ø Mittelwertabweichung	0,008	0,007	0,003	0,005	0,003	0,021	0,025	0,040	0,004
min	-0,557	-0,53	-0,572	-0,575	-0,555	-0,62	-0,659	-0,666	-0,554
max	-0,527	-0,511	-0,561	-0,558	-0,546	-0,561	-0,566	-0,559	-0,542

Tierart	Ziegenrohmilch								
	SN3	SN4a	SN4b	SN5	SN6	BB2	BB3	BB4	BB5
Betrieb									
Probenanzahl	5	3	3	4	5	5	3	6	2
Mittelwert	-0,572	-0,586	-0,530	-0,536	-0,563	-0,540	-0,553	-0,550	-0,554
Ø Mittelwertabweichung	0,020	0,052	0,010	0,009	0,014	0,012	0,010	0,007	0,001
min	-0,601	-0,664	-0,545	-0,547	-0,599	-0,55	-0,561	-0,566	-0,554
max	-0,547	-0,545	-0,515	-0,52	-0,55	-0,522	-0,539	-0,54	-0,553

Der Gefrierpunkt der Kuhmilch dient gemäß Milch-Güteverordnung zur Qualitätseinstufung der Anlieferungsmilch. Als Beurteilungsgrenze gilt in Sammelmilchproben ein Gefrierpunkt von -0,515 °C. Erhöhte Gefrierpunkte gelten als Indiz für eine mögliche Verwässerung der Milch und führen bei Bestätigung des Verdachts zu Milchgeldabzug. Entsprechende Festlegungen für Milch anderer Tierarten gibt es derzeit nicht.

Zur Bewertung des Gefrierpunktes von Milch anderer Tierarten steht wenig Literatur zur Verfügung. Die voneinander abweichenden gemittelten Gefrierpunkte der einzelnen Tierarten sind auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Milch zurückzuführen. Die vergleichende Darstellung in Tabelle 5 soll diesen Zusammenhang verdeutlichen.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Milch verschiedener Tierarten (Angaben als Mittelwerte in %)**

	Rind	Schaf	Ziege	Büffel
Lactose	4,6	4,4	4,2	4,8 <sup>*)</sup>
Veraschungsrückstand	0,7	0,9	0,8	0,8
Eiweiß	3,6/3,4 <sup>*)</sup>	4,6/5,2 <sup>*)</sup>	3,2/3,7 <sup>*)</sup>	3,8

Quelle: Töpel, A.: „Chemie und Physik der Milch“, 3. Auflage 2004, Tab. 1.1, S. 2 (auszugsweise)

<sup>\*)</sup> Buckenhüskes, H. J.: Vortrag zum Oranienburger Milchforum 2005

Der Gefrierpunkt der Milch hängt dabei in erster Linie von der Konzentration der echt gelösten Bestandteile (Lactose, Salze) ab. Der höhere Veraschungsrückstand - der in Beziehung zum Salzgehalt steht- und der zumindest bei Schafmilch deutlich erhöhte Proteinanteil sind nur zwei Merkmale, die zur Absenkung des Gefrierpunktes gegenüber Kuhmilch führen können.

PAVIC (2002) gibt für Büffelmilch mit -0,525 °C einen ähnlichen Gefrierpunkt wie Kuhmilch an. Die Angaben für Ziegenrohmilch mit -0,560 °C und Schafrohmilch mit -0,566 °C liegen unter den in diesem Projekt ermittelten Gefrierpunkten. PAVIC (2002) wies in seiner Arbeit jedoch auf eine Gefrierpunktänderung in Schafmilch in Abhängigkeit von der Laktationsphase auf (Laktationsbeginn: -0,564 °C, Mitte: -0,566 °C, Laktationsende: -0,570 °C) hin. In der untersuchten Rohmilch wurde zur Mitte und zum Ende der Laktationsphase ein signifikant höherer Veraschungsrückstand sowie erhöhte Fett- und Proteingehalte bei gleichzeitig geringeren Gehalten an Lactose und titrierbarer Säure festgestellt. Für Kuhmilch sind Abhängigkeiten des Gefrierpunktes von der Laktationsphase, des Gesundheitszustandes, der Rasse, der Jahreszeit und der Fütterung beschrieben worden (BUCHBERGER 2000). Ausdruck dieser Abhängigkeit ist die Streuung der betriebsbezogenen Ergebnisse um den jeweiligen Gesamtmittelwert.

Im Ergebnis unserer Untersuchungen zeigt sich, dass eine Ableitung einer artspezifischen Beurteilungsgrenze - als Indiz für eine Verwässerung - für Schaf- und Ziegenrohmilch ohne Aufnahme zusätzlicher Daten noch nicht vorzunehmen ist. Lediglich für Büffelrohmilch ist aufgrund des ähnlichen Gefrierpunktes ein Bezug auf den Grenzwert von -0,515 °C für Kuhmilch möglich.

Für Schaf- und Ziegenrohmilch ist ein solcher Grenzwert entsprechend den tieferen Gefrierpunkten niedriger als für Kuhmilch zu definieren. Unter Berücksichtigung des Grenzwertes von Kuhmilch, können ermittelte Gefrierpunkte von Ziegenrohmilch mit -0,515 °C (SN 4b), -0,520 °C (SN 5) und -0,522 °C (BB 2) als Hinweis auf eine mögliche Verwässerung gewertet werden, können aber auch aus fütterungsbedingten (Energie-mangel/Proteinüberschuss) Unterschieden in der Milchzusammensetzung resultieren.

Die geringe Streubreite der Ergebnisse oberhalb des Mittelwertes von Schafrohmilch ergab keinen Hinweis auf eine mögliche Verwässerung.

### 3.2 Untersuchung von Schaf-, Ziegen- und Büffelrohmlch auf die Keimzahl bei 30 °C

Die Keimzahl 30 °C wurde als Parameter für die angelieferte Rohmilch von sieben Brandenburger Betrieben untersucht. In Tabelle 7 ist das geometrische Mittel der ermittelten Keimzahl der beprobten Betriebe dargestellt. Im Anhang III Abschnitt IX der VO (EG) 853/2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs ist die Keimzahl bei 30 °C als bakteriologische Anforderung an rohe Kuhmilch sowie für die Rohmilch anderer Tierarten mit Grenzwerten definiert (siehe Tab. 6).

**Tabelle 6: Anforderungen an Rohmilch hinsichtlich der Keimzahl bei 30 °C nach VO (EG) 853/2004 (Anhang III Abschnitt IX)**

	Kuhmilch	Milch anderer Tierarten
Keimzahl bei 30 °C (pro ml) <sup>1)</sup>	$\leq 1,0 \times 10^5$	$\leq 1,5 \times 10^6$
<b>zur Herstellung von Rohmilcherzeugnissen</b>	$\leq 1,0 \times 10^5$	$\leq 5,0 \times 10^5$

<sup>1)</sup> als geometrisches Mittel über zwei Monate bei mindestens zwei Probenahmen im Monat

Im Vergleich zur außer Kraft gesetzten Milchverordnung ist die Gesamtkeimzahl für Rohmilch anderer Tierarten als Kühe einheitlich auf  $1,5 \times 10^6$  pro ml festgesetzt worden (*galt gemäß MilchVO nur für Schaf- und Ziegenrohmlch zur Herstellung wärmebehandelter Konsummilch und anderen Milcherzeugnissen, für Büffelrohmlch  $\rightarrow \leq 1,0 \times 10^6$  KbE/ml*). Legt man diese Anforderung den im Projekt ermittelten Keimzahlwerten zu Grunde, so wird dieses Kriterium von allen beprobten Betrieben eingehalten (Tab. 7). Vier von sieben Betrieben halten ebenso den für rohe Kuhmilch festgelegten Grenzwert von  $\leq 1,0 \times 10^5$  pro ml ein.

Für Rohmilch, die zur Herstellung von Rohmilcherzeugnissen bestimmt ist, gelten für Milch anderer Tierarten strengere Regelungen. Die Gesamtkeimzahl ist hier - wie bisher in der MilchVO auch - mit einem Wert von  $\leq 5,0 \times 10^5$  pro ml geregelt. Mit diesem Bezug überschreitet die Rohmilch aus Betrieb BB 7 mit einer gemittelten Keimzahl von  $7,9 \times 10^5$  pro ml den vorgegebenen Wert und ist für diesen Verwendungszweck zu beanstanden.

**Tabelle 7: Ergebnisse der Bestimmung der Keimzahl bei 30 °C**

	Betrieb (Proben)	Geometrisches Mittel der Keimzahl 30 °C in KbE/ml
Büffelrohmilch	BB 1 (n=3)	$4,6 \times 10^4$
Ziegenrohmilch	BB 2 (n=5)	$3,0 \times 10^5$
	BB 3 (n=3)	$1,8 \times 10^5$
	BB 4 (n=6)	$7,2 \times 10^3$
	BB 5 (n=2)	$6,3 \times 10^4$
Schafrohmilch	BB 6 (n=4)	$2,3 \times 10^3$
	BB 7 (n=3)	$7,9 \times 10^5$

### 3.3 Prüfung der Anwendbarkeit verfügbarer Prüfmethode zum Nachweis von Hemmstoffen/Antiinfektiva

Neben den bakteriologischen Anforderungen an rohe Kuhmilch und Rohmilch anderer Tierarten sind in der VO (EG) 853/2004 ebenso die Vorschriften in Bezug auf die Gehalte an Antibiotikarückständen festgelegt. Rohmilch darf nicht in Verkehr gebracht werden, wenn der Gehalt an Rückständen und Antibiotika über den zugelassenen Mengen für Stoffe liegt, die in den Anhängen I und III der VO (EWG) 2377/90 aufgeführt sind.

Weil es jedoch keinen Nachweis zur Erfassung sämtlicher Tierarzneimittelrückstände gibt, werden Milchproben im Rahmen eines integrierten Nachweissystems (SUHREN 2002) routinemäßig zunächst mit geeigneten Such- und Screeningverfahren untersucht.

Hierbei kommen im ersten Schritt mikrobiologische Hemmstofftests zum Einsatz. Ein positiver Hemmstoffbefund bedeutet, dass in der Milch Substanz-/Konzentrationskombinationen vorhanden sind, die die Vermehrung/den Stoffwechsel des in dem Testsystem verwendeten Testmikroorganismus (*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) verhindern bzw. inhibieren. Lebensmittelrechtliche Konsequenzen entstehen jedoch erst dann, wenn die Hemmstoffe als Antiinfektiva identifiziert und quantifiziert sind.

Für Kuhmilch stehen eine Reihe von Hemmstoffsuchtests bzw. Gruppen-/substanzspezifischer Tests zum Auffinden von Hemmstoffen und Antibiotikarückständen zur Verfügung. Im Rahmen des Projektes wurden fünf kommerziell erhältliche Testsysteme eingesetzt, die für Kuhmilch routinemäßige Anwendung finden. Als mikrobiologische Hemmstofftests kamen der Delvotest SP sowie die Brillantschwarz-Reduktionstests BRT-MRL und BRT „AS-special“ vergleichend zum Einsatz. Ergänzend dienen der Snap-Test und Beta-Star als immunchemische Screeningverfahren der Gruppen-/substanzspezifischen Erfassung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Nachweisempfindlichkeiten der geprüften Testsysteme mit Bezug auf die in der VO (EWG) 2377/1990 festgelegten Höchstmengen (Maximum Residue Limits  $\rightarrow$  MRL's) ausgewählter Antibiotika und Sulfonamide.

**Tabelle 8: Nachweisgrenzen der eingesetzten Testsysteme im Vergleich mit den Höchstmengen nach VO (EWG) 2377/1990 (nach Herstellerangaben)**

Testsystem	Benzylpenicillin MRL: 4 µg/kg	Oxacillin MRL: 30 µg/kg	Oxytetracyclin MRL: 100 µg/kg	Sulfamethazin MRL: 100 µg/kg	Spiramycin MRL: 200 µg/kg
BRT-MRL	1-2	5-10	500-750	250-500	150-200
BR-Test „AS-special“	1-2	?	100-300	100-200	400-800
Delvotest SP-NT	2-3	10	800	100-250	800-1.000
SNAP-Test	2-3	30-40	-	-	-
Beta-Star	2-4	5-10	-	-	-

Zusätzlich zu den im Testsystem enthaltenen Positiv- und Negativkontrollen wurde zu jedem Prüftermin jeweils eine hemmstofffreie Schaf-, Ziegen- und Büffelmilchprobe mit einem Penicillinstandard auf MRL-Niveau (4µg/kg Milch) dotiert und als positive Vergleichsprobe im Test mitgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9: Zusammenfassung der Rohmilchuntersuchungen auf Hemmstoffe/Antiinfektiva mit verschiedenen Testsystemen**

		Rohmilchproben					
		Bundesland Sachsen			Bundesland Brandenburg		
		Büffel	Ziege	Schaf	Büffel	Ziege	Schaf
Gesamtanzahl Proben		<b>5</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>3</b>	<b>16</b>	<b>7</b>
Gesamtanzahl positiv getesteter Proben		<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>positiv getestet</b>	BRT-MRL	0	3	0	0	0	0
	BR-Test „AS-special“	0	0	0	0	0	1
	Delvotest SP	0	0	1	0	0	0
	SNAP-Test	0	0	1	0	0	1
	Beta-Star	0	0	0	0	0	0

Die Daten aus Tab. 9 zeigen beim Vergleich positiv getesteter Proben kein einheitliches Bild in den Ergebnissen der einzelnen Testsysteme.

Der BRT-MRL reagierte als einziger Test bei drei Ziegenrohmilchen hemmstoffpositiv. Vorläufige Bestätigungsreaktionen durch Einsatz von Penicillinase und p-Aminobenzoessäure (PABA) führten bei diesen Proben ebenso zu hemmstoffpositiven Ergebnissen, so dass kein Hinweis hinsichtlich des Vorliegens von  $\beta$ -Lactamantibiotika oder Sulfonamiden abgeleitet werden konnte. Der Delvotest zeigte nur bei einer Schafrohmilch zusammen mit dem SNAP-Test ein eindeutiges positives Ergebnis. Ebenso reagierte der BR-Test „AS-special“ bei einer Schafmilchprobe hemmstoffpositiv. Auch in diesem Fall zeigte nur der SNAP-Test eine entsprechende Reaktion. Beide Proben wiesen jedoch zum Zeitpunkt der Untersuchung einen kräftigen Fremdgeruch, einen Gefrierpunkt von -0,659 °C bzw. -0,666 und einen pH-Wert von < 5,4 auf. Es ist davon auszugehen, dass die positive Reaktion in den Tests nicht durch Antiinfektiva hervorgerufen wurde.

Bei einem Großteil der untersuchten Proben – Schafmilch 56 %, Ziegenmilch 35 % und Büffelmilch 44 % - reagierte der Delvotest nicht mit einem deutlichen Farbumschlag, so dass sämtliche Proben zunächst als hemmstoffverdächtig einzustufen waren. Für diese Proben erbrachten die anderen Testsysteme ein negatives Ergebnis. Mit einer gegenüber für Kuhmilch angegebenen, um 10 min verlängerten Inkubationszeit zeigte sich beim Delvotest ein verspäteter Farbumschlag, so dass es sich bei diesen Proben wahrscheinlich um „falsch-positiv“ Reaktionen handelt. Entsprechende Beobachtungen sind bereits 2004 von ZAADHOF beschrieben worden.

Im Ergebnis unserer Untersuchungen ist festzustellen, dass alle geprüften Testsysteme grundsätzlich für den Einsatz in Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch geeignet sind.

Anhand dotierter Schaf-, Ziegen- und Büffelmilchproben konnten mit allen Testsystemen eine Benzylpenicillinkonzentrationen auf MRL-Niveau (4 $\mu$ g/kg Milch) eindeutig detektiert werden. Für den Delvotest ist in zweifelhaften Fällen eine Verlängerung der Inkubationszeit um 10 - 20 min zur Reduzierung falsch-positiver Ergebnisse angeraten. Bleiben die beiden im Gefrierpunkt und pH-Wert stark abweichenden Schafrohmilchen (mit hemmstoffpositiver Reaktion im BR-AS spezial/Delvotest/SNAP-Test) unberücksichtigt, zeigt der BRT-MRL-Suchtest in diesen Untersuchungen die höchste Empfindlichkeit auf.

### **3.4 Nachweis der deklarierten Tierart im Endprodukt mittels PCR**

Der tierartenspezifische Nachweis in Milch- und Milchprodukten wurde auf DNA-Basis unter Anwendung der Polymerasenkettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die PCR ist die am weitesten verbreitete molekularbiologische Technik zur Identifikation der Tierarten in Lebensmitteln mit geringem Zeit- und Materialaufwand. Milch und Milchprodukte enthalten fast immer detektierbare DNA-Anteile der zur Milchgewinnung genutzten Tierart, hauptsächlich resultierend aus dem Anteil somatischer Zellen (REA 2001, BOTTERO 2002). Von Vorteil dabei ist, dass die DNA relativ stabil vorliegt

und selbst nach bearbeitungsintensiven Produktionsschritten oder Erhitzungsprozessen PCR-fähig und somit nachweisbar bleibt (LIPKIN 1993). Gemäß Herstellerangaben liegt die Nachweisgrenze bei den verwendeten PCR-Kits für die nachzuweisende Tierart in Produkten zwischen 0,1 und 1 %. Im Rahmen hausinterner Validierungsarbeiten konnte für Frisch-, Weich- und Schnittkäse eine Nachweisgrenze von 1 % (Anteil Rind in Milchprodukten anderer Tierarten) bestätigt werden. Die Prüfung zur Spezifität der eingesetzten Primersysteme erbrachte für die jeweilige nachzuweisende Tierart keine Kreuzreaktion mit DNA der anderen Tierarten.

Die Ergebnisse der Produktprüfungen (Frisch-, Weich-, Schnittkäse und Joghurt) sind in den Tabellen 10 und 11 zusammengefasst.

Die Verarbeitung von Milch der deklarierten Tierart konnte in allen Produkten bestätigt werden. Rindspezifische DNA ließ sich in 70 % der untersuchten Büffelprodukte, in 11 % der Ziegen- (*ohne Betrieb 4*) und in 16 % der Schafprodukte nachweisen. Eine Deklaration mit Hinweis auf die Verarbeitung von Kuhmilch war in diesen Fällen nicht zu finden. Alle Rind-verdächtigen PCR-Produkte wurden zur Bestätigung sequenziert (SEQLAB GmbH, Göttingen).

**Tabelle 10: Ergebnisse der Tierartenuntersuchungen von Milchprodukten mittels PCR/Betriebe Land Sachsen**

Tierart	Betrieb	Gesamtanzahl Proben	Anzahl Proben mit nachgewiesener	
			DNA der deklarierten Tierart	rindspezifischer DNA
Büffel	SN 1	5	5	3
	SN 2	1	1	1
Ziege	SN 3	5	5	1
	SN 4 <sup>a)</sup>	6	6	6
	SN 5	5	5	2
	SN 6	5	5	0
Schaf	SN 7	4	4	0
	SN 8	4	4	1
	SN 9	3	3	1
	SN 10	5	5	0
	SN 11	5	5	1
Summe		48	48 [100%]	16 [33%]

<sup>a)</sup> eine anteilige Verarbeitung von Kuhmilch wurde deklariert

**Tabelle 11: Ergebnisse der Tierartenuntersuchungen von Milchprodukten mittels PCR/Betriebe Land Brandenburg**

Tierart	Betrieb	Gesamtanzahl Proben	Anzahl Proben mit nachgewiesener	
			DNA der deklarierten Tierart	rindspezifischer DNA
Büffel	BB 1	4	4	3
Ziege	BB 2	3	3	0
	BB 3	2	2	0
	BB 4	5	5	0
	BB 5	3	3	0
Schaf	BB 6	3	3	1
	BB 7	1	1	0
Summe		21	21 [100%]	4 [19%]

Beim Abgleich der erhaltenen Sequenzen auf der Webseite des National Center for Biotechnological Information (NCBI) mit dem Programm BLASTN 2.2.14 wurde eine 100-%ige Übereinstimmung ermittelt und die Nukleotidabfolge eindeutig als rindspezifisch identifiziert.

Zur Interpretation der erzielten Ergebnisse wurde an die Betriebe des Landes Sachsen, bei denen rindspezifische DNA in den Milcherzeugnissen nachgewiesen wurde, ein Fragebogen zur Rinderhaltung, Kuhmilchgewinnung/-verarbeitung, Einsatz von Kälber-/Rinderlab sowie zum Einsatz von Kulturen auf Milchbasis verschickt. Die Ergebnisse dieser Umfrage sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Die nicht deklarierte anteilige Verarbeitung von Kuhmilch in Produkten, die als Schaf-, Ziegen- oder Büffelmilch vermarktet werden, ist gemäß §11 LFGB bzw. Artikel 16 der EU Basisverordnung als Irreführung und Täuschung des Verbrauchers einzuordnen.

Geht man von einer nicht beabsichtigten Beimengung von Kuhmilch aus, so deutet die Auswertung der schriftlichen Umfrage darauf hin, dass in vielen Fällen die unmittelbar benachbarte Haltung von Rindern sowie die Gewinnung und Verarbeitung von Kuhmilch als Ursache für entsprechende Kontaminationen im Herstellungsprozess in Betracht zu ziehen ist. Unachtsamkeit bzw. technologisch bedingte Verschleppung von Kuhmilch bei nicht vollständig getrennter Arbeitsweise der Milchgewinnung/-verarbeitung können dabei zu nachweisbaren Kuhmilchanteilen führen.

Darüber hinaus bietet der Einsatz von Zusatz- und Hilfsstoffen aus bzw. mit Anteilen von Kuhmilch (u. a. Kulturen auf Kuhmilchbasis, Kälber-/Rinderlab) die Möglichkeit eines Eintrags detektierbarer Rind-DNA.

Ohne Kenntnis der jeweiligen betrieblichen Produktionssituation sind Ursachen im Einzelfall für den Eintrag rindspezifischer DNA-Sequenzen in die Produkte kaum eindeutig zu benennen.

**Tabelle 12: Angaben zur Rinderhaltung, Kuhmilchgewinnung/-verarbeitung, Einsatz von Kälber-/Rinderlab in Betrieben mit nachgewiesenen Rindanteilen in den Milcherzeugnissen (nur Betriebe Land Sachsen)**

Betrieb	Tierart	Rinderhaltung			Kuhmilchgewinnung bzw. -verarbeitung			Einsatz von Kälber-/Rinderlab	Einsatz von Kulturen auf Kuhmilchbasis	Bemerkungen
		keine	getrennt	nicht getrennt	keine	getrennt	nicht getrennt			
SN 1	Büffel			x		x		x	o	keine Verarbeitung
SN 2	Ziege	keine Angaben			x			x	o	Rohmilcherzeugung im osteuropäischen Ausland
SN 3	Ziege		x			x		o	o	keine Kuhmilchverarbeitung
SN 5	Ziege	keine Angaben								
SN 8	Schaf	x			x				o	
SN 9	Schaf		x			x		o	o	
SN 11	Schaf	x			x			x	o	

x – zutreffend, o – nicht zutreffend

#### 4 Schlussfolgerungen und Zusammenfassung

Im Rahmen des Projektes wurden Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch und daraus hergestellte Erzeugnisse auf ausgewählte Parameter, die für Kuhmilch und z. T. auch für Milch anderer Tierarten bereits lebensmittelrechtlichen Charakter tragen, untersucht. Die Ergebnisse sollten dabei unter dem Aspekt der Festlegungen und der Umsetzung des neuen EU-Hygienerichts betrachtet und diskutiert werden.

Der Gefrierpunkt der Kuhmilch dient gemäß Milch-Güteverordnung zur Qualitätseinstufung der Anlieferungsmilch und gilt bei Werten über  $-0,515\text{ °C}$  als Indiz für eine mögliche Verwässerung der Milch. Entsprechende Festlegungen für Milch anderer Tierarten gibt es derzeit nicht. Die im Projekt für die einzelnen Tierarten bestimmten Gefrierpunkte liegen im Mittel alle unter dem Gefrierpunktbereich für Kuhmilch (Büffelrohmilch:  $-0,535\text{ °C}$ , Ziegenrohmilch:  $-0,547\text{ °C}$ , Schafrohmilch:  $-0,560\text{ °C}$ ). Weil der Gefrierpunkt insbesondere bei Einzelgemelken in Abhängigkeit verschiedener

Faktoren (Laktationsphase, Fütterung) stark schwanken kann, ist zur Ableitung artspezifischen Beurteilungsgrenzen die Aufnahme zusätzlicher Daten unabdingbar. Trotzdem ließ sich nach Auswertung der Daten zeigen, dass zur Qualitätseinstufung für Büffelrohmlch auf den Grenzwert für Kuhmilch Bezug genommen werden kann. Für Schaf- und Ziegenrohmlch ist durch die niedrigeren Gefrierpunkte ein im Vergleich zur Kuhmilch tiefer liegender Grenzwert zu definieren.

In der VO (EG) 853/ 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs ist für rohe Kuhmilch und Rohmilch anderer Tierarten die Keimzahl bei 30 °C als bakteriologische Anforderung mit unterschiedlichen Grenzwerten definiert. Während zur Herstellung sowohl von wärmebehandelter Milch und Milcherzeugnissen als auch von Rohmilcherzeugnissen für Kuhmilch ein Grenzwert von  $\leq 1,0 \times 10^5$  KbE pro ml gilt, liegt die Keimzahl für Rohmilch anderer Tierarten, die zur Herstellung wärmebehandelter Milch/Milcherzeugnissen bestimmt ist, bei  $\leq 1,5 \times 10^6$  KbE pro ml und zu Herstellung von Rohmilcherzeugnissen bei  $\leq 5,0 \times 10^5$  KbE pro ml. Von den sieben beprobten Betrieben hielten sechs Betriebe die gesetzlichen Anforderungen hinsichtlich der Keimzahl sowohl für die Herstellung von Rohmilcherzeugnissen als auch zur Herstellung wärmebehandelter Milcherzeugnisse ein.

Im Vergleich zur Anforderung an Rohmilch, die zur Herstellung wärmebehandelter Milch und Milcherzeugnisse genutzt wird, ist die für die Rohmilch anderer Tierarten geltende Gesamtkeimzahl von  $1,5 \times 10^6$  KbE pro ml als sehr hoch anzusehen und hygienisch betrachtet nicht unbedenklich, zumal keine zusätzlichen Forderungen hinsichtlich der Abwesenheit pathogener Keimgruppen bestehen.

Gemäß VO (EG) 853/ 2004 darf Rohmilch nicht in Verkehr gebracht werden, wenn der Gehalt an Rückständen und Antibiotika über den zugelassenen Mengen für Stoffe liegt, die in den Anhängen I und III der VO (EWG) 2377/90 aufgeführt sind. Fünf kommerziell erhältliche Testsysteme (BRT-MRL, BRT AS-special, Delvotest, SNAP-Test, Beta-Star) wurden hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit für Schaf-, Ziegen und Büffelrohmlch geprüft. 7 % der Proben (fünf von 75) sind als hemmstoffpositiv eingestuft worden.

Im Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen sind alle geprüften Testsysteme für den Einsatz in Schaf-, Ziegen- und Büffelrohmlch geeignet, wobei der BRT-MRL-Test die höchste Empfindlichkeit aufwies. Für den Delvotest ist in zweifelhaften Fällen eine Verlängerung der Inkubationszeit um 10 - 20 min zur Reduzierung falsch-positiver Ergebnisse angeraten.

Mit dem Hintergrund des Schutzes der Verbraucher vor Täuschung und Irreführung sind Erzeugnisse aus Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch auf Kuhmilchanteile geprüft worden. In 29 % der untersuchten Produkte konnten mittels PCR rindspezifische Anteile nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 1 %). Eine Deklaration mit Hinweis auf die Verarbeitung von Kuhmilch war in diesen Fällen nicht zu finden. Die Auswertung schriftlicher Umfragen deutet darauf hin, dass in vielen Fällen die unmittelbar benachbarte Haltung von Rindern sowie die Gewinnung und Verarbeitung von Kuh-

milch ursächlich für den Eintrag von detektierbaren Rindanteilen sein kann. Ohne Kenntnis der jeweiligen betrieblichen Produktionssituation sind Ursachen im Einzelfall für den Eintrag rindspezifischer DNA-Sequenzen in die Produkte kaum eindeutig zu benennen.

## 5 Literatur

- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASU) nach § 64 LFGB, 2004, L00.00-88: Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen - Koloniezählverfahren bei 30 °C
- ASU nach § 64 LFGB, 1996, L01.01-5: Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch - Agar-Diffusions-Verfahren (Brillantschwarz-Reduktionstest)
- ASU nach § 64 LFGB, 2002, L 01.00-11: Untersuchung von Lebensmitteln - Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch - Agar-Diffusions-Verfahren mit *Bacillus steothermophilus* (Brillantschwarz-Reduktionstest)
- ASU nach § 64 LFGB, 2002, L01.00-29: Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung des Gefrierpunktes von Milch - Thermistor-Kryoskop-Verfahren
- BOTTERO, M. T., CIVERA, T., ANASTASIO, A., TURI, R. M., ROSATI, S. 2002: Identification of cow's milk in "Buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. Journal of food protection, Vol. 65, No. 2, 362-366
- BUCHBERGER, J. 2000: Umweltfaktoren und Rohmilch – zum Einfluss so genannter Umweltfaktoren auf den Gefrierpunkt. Deutsche Molkereizeitung 121 (25), 118-125
- BUCKENHÜSKES, H. J. 2005: Ernährungsbezogene Bewertung von Ziegen-, Schafs- und Büffelmilch und daraus resultierende Marktchancen. Vortrag zum Oranienburger Milchforum 2005
- LIPKIN, E., SHALOM, A., KHATIB, H., SOLLER, M., FRIEDMANN, A., 1993: Milk as a source of desoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. Journal of Dairy Science, 1993 (76), 2025-2032
- PAVIC, V., ANTUNAC, N., MIOC, B., IVANKOVIC, A., HAVRANEK, J. L., 2002: Influence of stage of lactation on the chemical composition and physical properties of sheep milk. Czech. J. Animal Science, 47 (2), 80-84
- REA, S.; CHIKUNI, K.; BRANCIARI, R.; SANGAMAYYA, R. S.; RANUCCI, D.; AVELLINI, P., 2001: Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. Journal of Dairy Research, (68), 689-698
- SUHREN, G., 2002: Inhibitors and residues of veterinary drugs in milk – legal basis, detection methods and detection systems. Kieler milchwirtschaftliche Forschungsberichte 54 (1), 35-71
- TÖPEL, A., 2004: Chemie und Physik der Milch. 3. Auflage, Hamburg: Behr's Verlag, Tab. 1.1 S.2 (auszugsweise)
- Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 31/1, 1.2.2002

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene. Amtsblatt der Europäischen Union L 139/1, 30.4.2004

Verordnung (EG) NR. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs, Amtsblatt der Europäischen Union L 139, 47. Jahrgang

Verordnung (EWG) Nr. 2377/ 90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs  
Amtsblatt der Europäischen Union L 224

Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (Milch-Güteverordnung) vom 9. Juli 1980 in der Fassung der Sechsten Verordnung zur Änderung der Milch-Güteverordnung vom 30.10.2003, in Kraft ab dem 1. Januar 2004, BGBl. I S.2170

ZAADHOF, K.-J., SCHULZE, S., MÄRTELBAUER, E., 2004: Applicability of various microbial inhibitor tests as screening tests for the presence of antimicrobials in goat and ewe milk. Milchwissenschaft 59 (3/4), 179-183

## **Impressum**

- Herausgeber:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft  
August-Böckstiegel-Straße 1, 01326 Dresden  
Internet: [www.landwirtschaft.sachsen.de/flf/publikationen/](http://www.landwirtschaft.sachsen.de/flf/publikationen/)
- Autor:** Dirk Krowas  
Milchwirtschaftliche Lehr- und Untersuchungsanstalt Oranienburg e.V.  
Sachsenhausener Str. 7b  
16515 Oranienburg  
Telefon: 03301 631-0  
Telefax: 03301 70 21 64  
E-Mail: [info@mlua.de](mailto:info@mlua.de)
- Redaktion:** siehe Autor
- Endredaktion:** Presse- und Öffentlichkeitsarbeit  
Anne-Christin Matthies-Umhau, Ramona Scheinert, Matthias Löwig  
Telefon: 0351 2612-345  
Telefax: 0351 2612-151  
E-Mail: [anne-christin.matthies@smul.sachsen.de](mailto:anne-christin.matthies@smul.sachsen.de)
- ISSN:** 1861-5988
- Redaktionsschluss:** Juni 2008

Für alle angegebenen E-Mail-Adressen gilt:

Kein Zugang für elektronisch signierte sowie für verschlüsselte elektronische Dokumente

### **Verteilerhinweis**

Diese Informationsschrift wird von der Sächsischen Staatsregierung im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit herausgegeben. Sie darf weder von Parteien noch von Wahlhelfern zum Zwecke der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für alle Wahlen.