303 C 64

HET CASEINAATPHOSPHAATCOMPLEX VAN MELK

C. J. SCHIPPER

NN08201.303

HET CASEINAATPHOSPHAATCOMPLEX VAN MELK

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD
VAN DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE OP
GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS,
IR. W. F. EIJSVOOGEL,
HOOGLERAAR IN DE HYDRAULICA, DE BEVLOEIING,
DE WEG- EN WATERBOUWKUNDE EN
DE BOSCHBOUWARCHITECTUUR,
TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT
VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN
OP VRIJDAG 9 JUNI 1961 TE 16 UUR

DOOR

C. J. SCHIPPER

DRUK: V.R.B. KLEINE DER A 3-4 - GRONINGEN

STELLINGEN

Stelling 1: Het phosphaat in het caseinaatphosphaatcomplex van melk is geen secundair phosphaat, geen tertiair phosphaat of hydroxyapatiet maar een complex phosphaat, dat eigenschappen bezit als een ionenuitwisselaar. (Dit proefschrift).

Stelling 2: Bij het onderzoek naar de structuur van melk moet gebruik worden gemaakt van melk van individuele koeien. (Lit.: De samenstelling van Nederlandse Melk, Mulder, v.d. Have, Schipper 1959. Uitgave Laboratorium voor Zuivelbereiding en Melkkunde van de Landbouwhogeschool).

Stelling 3: Een afdoende verbetering van de hygiënische kwaliteit van de boerderijmelk zal praktisch alleen verkregen kunnen worden, indien het produceren van melk van uitgesproken slechte kwaliteit volkomen onrendabel wordt gemaakt.

Stelling 4: De hygiënische kwaliteit van boerderijmelk moet behalve naar de uitslag van het laboratorium-onderzoek tevens beoordeeld worden naar de omstandigheden, waaronder de melk op de boerderij wordt gewonnen en bewaard.

Stelling 5: Het verdient aanbeveling zodanige maatregelen te nemen, dat antibiotica bestemd voor de behandeling van rundvee alleen beschikbaar worden gesteld voorzien van een gekleurde verklikstof. Bovendien is er behoefte aan wettelijke bepaling, waardoor het beschikbaar stellen ervan aan banden gelegd wordt.
(Aanbeveling Internationale Zuivelbond, Wenen, septem- 1960).

Stelling 6: Arbeidsparende maatregelen mogen niet tot gevolg hebben, dat genoegen genomen wordt met een geringere kwaliteit van boerderijmelk.

Stelling 7: Het gebruik van melkleidingen biedt zeker op boerderijen met minder dan twintig koeien thans nog geen financiële voordelen.

Stelling 8: Ondanks de in Nederland over het algemeen goede gezondheid en goede voedingstoestand van schoolkinderen is het verstrekken van schoolmelk ten zeerste aan te bevelen.

Stelling 9: Het is noodzakelijk, dat leerlingen reeds bij het lager onderwijs meer vertrouwd worden gemaakt met eenvoudige hygiënische begrippen.

INHOUD

	blz.
INLEIDING	13
Hoofdstuk I: LITERATUUR	15
1.: Titratiemethoden.	15
1.1.: De methode Ling.	15
1.2.: De methode Pyne en Ryan.	17
1.3.: De methode Sörensen.	19
2.: De methode van der Burg.	21
2.1.: Het onderzoek van van der Burg.	21
2.2.: Het onderzoek van Evenhuis en de Vries.	23
3.: De methode waarbij gebruik gemaakt wordt van het verschil in samenstelling tussen melk en ultrafiltraat (resp. wei, dialysaat, centrifugaat).	25
3.1.: Onderzoekingen, waarbij ultrafiltraat gebruikt werd.	26
3.1.1.: Het onderzoek van van Slyke en Bosworth.	26
3.1.2.: Het onderzoek van White en Davies.	27
3.2.: Onderzoekingen, waarbij wei gebruikt werd.	27
3.2.1.: Het onderzoek van Evenhuis en de Vries.	27
3.3.: Onderzoekingen, waarbij gebruik gemaakt werd van een centrifuge.	28
3.3.1.: Onderzoekingen, waarbij de gelen onderzocht werden.	29
3.3.1.1.: Het onderzoek van de Kadt en van Minnen.	29
3.3.1.2.: Het onderzoek van Ramsdell en Whittier.	30
3.3.2.: Onderzoekingen, waarbij gecentrigugeerd werd en door extrapolatie de samenstelstelling van het phosphaat gevonden werd.	30
3.3.2.1.: Het onderzoek van Ramsdell en Hufnagel.	30
3.3.2.2.: Het onderzoek van Edmonson en Tarassuk.	31
3.3.2.3.: Het onderzoek van Ford et al.	31
4.: De methode, waarbij het caseinaatphosphaatcomplex kunstmatig bereid wordt.	32
4.1.: Het complex bereid door Porcher.	32
4.2.: Het complex bereid door Powell en Palmer.	33
4.3.: Het onderzoek van Wright.	33
4.4.: Het onderzoek van Pyne.	33
4.5.: Het onderzoek van Eilers.	33
5.: Samenvatting en discussie.	35
Hoofdstuk II. BEREKENINGEN BETREFFENDE DE SAMENSTELLING VAN HET COMPLEX	37
1.: De toelaatbaarheid van het gebruik van wei als hulpvloeistof.	37
1.1.: De verandering, die de caseïne ondergaat tijdens het stremmen.	37
1.2.: Het gedrag van het calcium en de phosphaatphosphor van het complex tijdens het stremmen.	37
1.2.1.: De samenstelling van wei vergeleken met die van ultrafiltraat of dialysaat.	38
2.: De berekeningen.	39
2.1.: De gebruikte gegevens.	39
2.2.: De berekeningen van het calcium en de phosphaatphosphor per g caseïne in het complex aanwezig.	40
2.2.1.: Berekeningen, waarbij de hoeveelheid caseïnecalcium per g caseïne verondersteld wordt constant te zijn.	40
2.2.1.1.: De berekende verhouding phosphaatcalcium phosphaatphosphor.	42
2.2.1.1.1.: De frequentieverdeling van de berekende waarden.	44
2.2.1.1.2.: De invloed van de bepalingsfouten op de gevonden variatie in de berekende waarden.	45
2.2.1.1.3.: Het verschil in phosphaatsamenstelling tussen de koeien onderling.	48
2.2.1.2.: De invloed van het in het complex aanwezige magnesium op de uitkomst van de berekeningen.	49
2.2.1.3.: De invloed van het in het complex voorkomende citroenzuur op de uitkomsten van de berekeningen.	50
2.2.2.: Berekeningen, waarbij de samenstelling van het phosphaat constant verondersteld wordt.	52
3. Discussie.	55
Hoofdstuk III. HET CALCIUMPHOSPHAAT	58
1.: Inleiding.	58

blz.
2.: Eigen onderzoek. 59
2.1.: Neerslagen verkregen in gedestilleerd water, waaraan calciumhydroxyde en phosphorzuur werden toegevoegd. 59
2.1.1.: De gevolgde methode. 59
2.1.2.: Nadere bijzonderheden van de proeven. 61
2.1.2.1.: Analysemethoden. 61
2.1.2.2.: Algemeen. 61
2.1.2.3.: De invloed van de pH. 62
2.1.2.3.1.: Het optreden van kristallisatie. 64
2.1.2.3.2.: Het afstaan en opnemen van calcium. 65
2.1.3.: Röntgendiagrammen. 66
2.1.4.: Voorlopige conclusie. 68
2.1.5.: De invloed van het uitwassen op de molaire verhouding Ca/P van de neerslagen. 68
2.1.5.1.: Uitwassen met gedestilleerd water. 68
2.1.5.2.: Uitwassen met loog. 69
2.1.6.: De invloed van de temperatuur bij de vorming van het phosphaat. 69
2.1.7.: Verdere eigenschappen van het phosphaat. 71
2.2.: De neerslagen, die ontstonden als ook andere ionen aanwezig waren. 73
2.2.1.: De neerslagen, die ontstonden bij aanwezigheid van magnesium. 73
2.2.1.1.: Eigen onderzoek. 73
2.2.2.: De neerslagen, die ontstonden bij aanwezigheid van citroenzuur. 76
2.2.2.1.: Eigen onderzoek. 76
2.2.3.: De invloed van natrium en kalium. 78
2.2.4.: Uitwisseling van ionen. 79
2.2.5.: Het neerslag gevormd in een oplossing met zoutconcentratie's overeenkomend met die van melk. 81
3.: Discussie. 81

Hoofdstuk IV. HET BASEBINDEND VERMOGEN VAN CASEÏNE. HET CASEÏNECALCIUM 85

1.: Inleiding. 85
2.: Eigen onderzoek. 87
2.1.: Potentiometrische titratie's van caseïne. 87
2.1.1.: De bereiding van "zuivere" caseïne. 87
2.1.2.: De analyse van de caseïne. 88
2.1.2.1.: De analysemethoden. 88
2.1.2.2.: De analyseresultaten. 88
2.1.3.: De potentiometrische titratie's als zodanig. 90
2.2.: De aanwezigheid van natrium en kalium in het caseïnaatphosphaat. 94
2.2.1.: De berekening van eventueel in het complex aanwezig natrium en kalium. 94
2.2.2.: De bepaling van de hoeveelheid natrium en kalium in het complex. 96
2.2.3.: De uitwisseling van caseïnecalcium tegen natrium. 96
3.: Discussie. 98

Hoofdstuk V. CALCIUMCASEÏNAAT EN CALCIUMPHOSPHAAT 100

1.: Potentiometrische titratie's. 100
1.1.: Potentiometrische titratie's van phosphorzuur met calciumhydroxide in aanwezigheid van caseïne. 101
1.2.: Potentiometrische titratie's van phosphorzuur met calciumhydroxyde in aanwezigheid van andere organische stoffen dan caseïne. 103
1.3.: Balansproeven met citroenzuur en glycerinephosphorzuur. 108
1.3.1.: Balansproeven met citroenzuur. 108
1.3.2.: Balansproeven met glycerinephosphorzuur. 109
1.4.: Samenvatting en discussie. 110
2.: Het bereiden van kunstmatige caseïnaatphosphaatcomplexen. 111
2.1.: Nadere bijzonderheden betreffende de bereiding. 112
2.1.1.: De bereiding van het calciumcaseïnaat. 112
2.1.2.: Bijzonderheden, waargenomen tijdens de bereiding van het kunstmatige caseïnaatphosphaatcomplex. 114
2.1.3.: De berekening van de samenstelling van het kunstmatige complex. 114
2.1.3.1.: De samenstelling bij afwezigheid van natriumchloride. 115
2.1.3.2.: De invloed van natriumchloride op de samenstelling. 116
2.1.3.3.: Uitwisseling van calcium uit het phosphaat van het complex tegen natrium. 119
2.2.: Het bereiden van kunstmatige ondermelk. 121
2.2.1.: De bereidingswijze. 121
2.2.2.: De resultaten. 121
2.3.: Röntgenfoto's. 122
2.3.1.: Resultaten van de röntgenfoto's. 122
3.: Discussie. 123

	blz.
Hoofdstuk VI. HET CASEÏNAATPHOSPHAATCOMPLEX VAN MELK	125
1.: Algemene beschouwing.	125
2.: Het Utrechts Melkgebrek.	127
3.: Het veranderen van de phosphaatsamenstelling door verhitten van melk.	130
4.: Het toevoegen van oxalaat aan melk en de titratiemethoden behandeld in hoofdstuk I.	130
5.: De formoltitratie en het caseïnaatphosphaatcomplexen.	131
6.: Het colloidale phosphaat en het onderzoek van melk en melkproducten.	134
SAMENVATTING	135
LITERATUURLIJST	140

INLEIDING

Op welke wijze men de caseinedeeltjes van de melk ook ophoopt, hetzij door de melk te stremmen met leb, hetzij door haar te centrifugeren of te ultrafiltreren, altijd hoopt men met de caseine calcium en phosphorzuur mee op en wel in tamelijk constante verhoudingen. Caseine komt dan ook in melk niet in zuivere toestand voor, maar is altijd verbonden met calcium en phosphorzuur. De aard van de verbinding is reeds lang een onderwerp van studie.

Hammersten (1879) - één van de eersten, die zich erover uitsprak- meende, dat calciumcaseïnaat als schutcolloid calciumphosphaat in oplossing houdt. Ook nu nog zijn sommige onderzoekers deze mening toegedaan. In de loop van de jaren werden echter nog een drietal andere theoriën ontwikkeld.

Volgens één van deze theoriën zou de "verbinding" -meestal aangeduid als het calciumcaseïnaatphosphaatcomplex- bestaan uit calciumcaseinaat, waaraan calciumphosphaat geadsorbeerd is, volgens een andere uit calciumcaseinaat, dat dubbelzouten heeft gevormd met calciumphosphaat. Ook werd de theorie opgesteld volgens welke het complex zou bestaan uit calciumcaseinaat met phosphorzuurionen geadsorbeerd aan de NH_2 groepen en calciumionen geadsorbeerd aan de COOH groepen.

Als calciumphosphaat in het complex voorkomt, doet zich de vraag voor, welk phosphaat aanwezig is. In oudere publicaties wordt wel de mening verdedigd, dat alleen secundair phosphaat aanwezig is. In latere wordt over het algemeen aangenomen, dat er tertiair phosphaat of een mengsel van veel tertiairphosphaat met een weinig secundair in het complex voorkomt. In een enkele recente publicatie wordt gesproken over hydroxyapatiet.

Veel van de moeilijkheden bij het onderzoek worden veroorzaakt door het in het complex aanwezige calcium. Dit is nl. niet langs analytische weg te scheiden in bij het caseine behorend calcium en door het phosphaat gebonden calcium.

Men heeft zijn toevlucht genomen tot allerlei veronderstellingen. Nu eens wordt verondersteld, dat caseine in melk een constante hoeveelheid calcium bindt en wordt de samenstelling van het phosphaat berekend, dan weer, dat de samenstelling van het phosphaat constant is, zodat de hoeveelheid calcium door de caseine gebonden, kan worden berekend.

Zoals zal blijken zijn beide veronderstellingen niet voldoende gegrond. Bij het opstellen van de genoemde theoriën zijn zij echter van beslissende invloed geweest. Voor de juistheid van geen van de theoriën heeft men dan ook voldoende bewijzen.

Teneinde verwarring te voorkomen zullen bij de bespreking van literatuur en eigen onderzoek de volgende benamingen worden gebezigd.

Caseïne: het eiwit, dat bij aanzuren van melk tot pH 4,6 - 4,7 daaruit neerslaat.

Caseïnephosphor:	één van de bouwstenen van caseïne, in de caseïne als een "ester" aanwezig, niet in zuur oplosbaar.
Caseïnecalcium:	calcium gebonden aan de zure groepen van de caseïne.
Phosphaatphosphor:	de anorganische phosphor van het complex, in zuur oplosbaar.
Phosphaatcalcium:	calcium behorend bij de phosphaatphosphor.

HOOFDSTUK I

LITERATUUR

Bij het onderzoek van het complex zijn in het verleden zeer uiteenlopende methoden toegepast. Meestal trachtte men het complex af te scheiden en te analyseren.

Daartoe werd zowel gebruik gemaakt van filtreren als van centrifugeren en van stremmen met leb. Uit het verschil in samenstelling van melk en serum (centrifugaat, wei) poogde men de samenstelling van het complex te berekenen. Ook werden andere methoden o. a. de zgn. "Lingtitratie" gebruikt.

In het volgende wordt een kritisch overzicht gegeven van de toegepaste methoden en de daarmee bereikte resultaten.

1. TITRATIEMETHODEN.

1.1. De methode Ling.

De zgn. Lingtitratie is gebaseerd op de waarneming van Van Slyke en Bosworth (lit. 89), dat de hoeveelheid loog, nodig voor het titreren van melk tot het omslagpunt van phenolphtaleïne (pH ca 8,3) kleiner wordt, wanneer aan de melk een bepaalde hoeveelheid van een neutrale oplossing van kaliumoxalaat toegevoegd wordt. Pyne en Ryan (lit. 74) en Pyne (lit. 70) kwamen tot de conclusie, dat dit verschijnsel veroorzaakt werd door de reactie van colloidaal tertiair phosphaat uit het caseinaatphosphaatcomplex, schematisch weergegeven als

$$Ca_3(PO_4)_2 + 3K_2 \text{ oxalaat} \longrightarrow \underset{KOH}{K_3PO_4} + \underset{K_2HPO_4}{} + Ca \text{ oxalaat}$$

Op deze theorie baseerde Ling (lit. 60) een methode ter bepaling van de hoeveelheid colloidaal tertiair phosphaat. Uitgaande van dezelfde melk, titreerde hij met loog tot het omslagpunt van phenolphtaleïne achtereenvolgens: de melk (M_1); de melk na toevoeging van oxalaat (M_2), de uit de melk door lebstremming verkregen wei (W_1) en dezelfde wei na toevoeging van oxalaat (W_2).

De bij titratie M_2 uit het colloidale phosphaat vrijgekomen hoeveelheid "alkali" (x) kon berekend worden uit de verschillen in de bij de resp. titratie's benodigde hoeveelheden loog.

$$(M_1 - M_2) - (W_1 - W_2) = x$$

Indien het colloidale phosphaat als $Ca_3(PO_4)_2$ aanwezig was, zouden 2 mmol vrijgekomen KOH met 1 mmol colloidaal $Ca_3(PO_4)_2$ overeen moeten stemmen. De uitkomsten van de titratie's omgerekend op mmol P_2O_5 moesten dan overeenkomen met de langs analytische weg bepaalde hoeveelheid colloidaal P_2O_5.

Ling vond een vrij goede overeenstemming tussen beide waarden. De analytisch bepaalde hoeveelheid P_2O_5 was echter altijd even groter dan de uit de titratie berekende. Hij schreef dit toe aan de

aanwezigheid van een weinig colloidaal magnesiumphosphaat, wat niet met kaliumoxalaat reageert. Er zij hier echter reeds opgemerkt (zie hoofdstuk II), dat niet alleen magnesium maar ook citroenzuur in het complex voorkomt, zodat zijn verklaring te eenzijdig is.

Ling (lit. 61) berekende m. b. v. de methode tevens, dat per g caseine in melk 10 mg caseinecalcium gebonden zijn. Uit de resultaten van zijn onderzoek concludeerde hij verder, dat er een physische binding tussen de beide colloiden calciumphosphaat en calciumcaseinaat bestaat. De laatste opvatting werd door Eilers (lit. 21) bestreden op grond van resultaten verkregen uit proeven uitgevoerd op dezelfde wijze als door Ling.
Ramsdell en Whittier (lit. 76) centrifugeerden het caseinaatphosphaat uit melk. Het verkregen gel werd, nadat het uitgewassen en gedroogd was, gesuspendeerd in gedestilleerd water al of niet in aanwezigheid van kaliumoxalaat. Bij de titratie van de suspensie met loog tot pH 9,08 bleek de uit het complex door kaliumoxalaat vrij gemaakte "alkali" overéén te stemmen met die hoeveelheid, welke uit $Ca_3(PO_4)_2$ vrij zou kunnen komen.

Door de Ling titratie toe te passen op melk en op verhitte melk vond Van der Burg (lit. 9), dat bij verhitten van melk het colloidale phosphaat ($Ca_3(PO_4)_2$) toenam, terwijl het caseïnecalcium af nam. Het is onbegrijpelijk, dat Van der Burg aan de resultaten verkregen met deze methode enige waarde toekende, daar de grondgedachte ervan volkomen in strijd is met de door hem zelf ontwikkelde theorie over de opbouw van het caseinaatphosphaatcomplex. (zie bladz. 21).

Het heeft er alle schijn van, dat degenen, die de methode toegepast hebben, veelal uit het oog verloren, dat niet de samenstelling van het phosphaat als zodanig bepaald wordt maar slechts de hoeveelheid "alkali", welke vrij komt door de reactie van het colloidale phosphaat met oxalaat.
Het is zeer goed mogelijk, dat ook basisch phosphaat (hydroxyapatiet) of zuur phosphaat (secundair phosphaat) in het complex voorkomt. Een soortgelijke veronderstelling werd ook reeds door ter Horst (lit. 50) geuit.

Pyne en Ryan (lit. 75) bestreden deze veronderstelling echter. Zij vonden bij toepassing van de Lingtitratie meer $Ca_3(PO_4)_2$ dan overéén kwam met de analytisch bepaalde hoeveelheid phosphaatphosphor.
Het door hen gevonden verschil schreven zij toe aan de gevolgde methodiek en wel aan een niet volledig tot hetzelfde eindpunt titreren van de melk en de wei.
Bij melk zou tot een hogere pH getitreerd en dientengevolge meer loog verbruikt worden. Het blijft dan echter opmerkelijk, dat door Ling juist het tegenovergestelde gevonden werd.
Indien Pyne en Ryan bij de Lingtitratie titreerden tot een hogere

pH (pH 8,5 - 9,00, "verbeterde Lingtitratie") berekenden zij evenwel, dat 93% van het phosphaat tertiair was.

1.2. De methode Pyne en Ryan.

De methode (lit. 75) is gebaseerd op de volgende redenering.
Wanneer kaliumoxalaat toegevoegd wordt aan melk komt er "alkali" vrij hoofdzakelijk door omzetting van colloidaal carciumphosphaat, maar ook, zij het in geringe mate, door de omzetting van opgeloste zouten en door de omzetting van calciumcaseinaat.
De totale hoeveelheid vrijkomend "alkali" kan bepaald worden door de melk terug te titreren tot de oorspronkelijke pH. Door deze hoeveelheid te verminderen met de hoeveelheid nodig voor de omzetting van de opgeloste zouten en van calciumcaseinaat kan de "alkali" vrij komend uit het colloidale phosphaat berekend worden.
De door de omzetting van de opgeloste zouten vrijkomende hoeveelheid "alkali" kan bepaald worden door de terugtitratie van wei, waaraan kaliumoxalaat toegevoegd is.
De hoeveelheid uit het calciumcaseinaat vrijkomend kan bepaald worden door aan een calciumcaseinaatoplossing met een ionensterkte, overeénkomend met die van melk, evenveel kaliumoxalaat toe te voegen als bij melk gebruikelijk is en de oplossing terug te titreren tot de pH van melk.
Door gebruik te maken van de tabel van Sörensen voor phosphaatbuffers en de totale hoeveelheid colloidaal phosphaat te bepalen uit het verschil in zuur oplosbaar phosphor van melk en melkdialysaat kan de samenstelling van het colloidale phosphaat in de oorspronkelijke melk aanwezig berekend worden.
Wanneer de Lingtitratie, de verbeterde Lingtitratie of de door hen ontworpen methode gebruikt werden bij dezelfde melk, vonden zij resp. 103%, 93% en 88% tertiair phosphaat. In het laatste geval zou de resterende 12% als secundair phosphaat in het complex aanwezig zijn.

Door Pyne en Ryan werd al opgemerkt, dat de methode niet geschikt is, indien de hoeveelheid caseinecalcium in melk niet dezelfde is als in de caseineoplossing. Indien de door hen bij de terugtitratie gevonden waarde (0,055 ml 0,1 N zuur/g caseine) vervangen wordt door de door Sandelin (lit. 80) opgegevene (0,08 ml 0,1 N zuur/g caseine) dan wordt voor het door hen gegeven voorbeeld (2,8% caseine) 73% tertiair phosphaat i.p.v. 80% gevonden.

In hoofdstuk IV en volgende zal worden aangetoond, dat de hoeveelheid calcium in melk aan caseïne gebonden (caseïnecalcium) niet gelijk behoeft te zijn aan die gebonden aan caseine in calciumcaseinaatoplossingen van dezelfde pH. Verder komt in het complex magnesium en citroenzuur voor (zie hoofdstuk II).
Hiermee werd door Pyne en Ryan geen rekening gehouden.

Evenhuis en de Vries (lit. 27) concludeerden, dat noch de Lingtitratie noch de methode Pyne en Ryan voor het beoogde doel geschikt

is. Zij toetsten de methoden m.b.v. een kunstmatig bereide oplossing, welke colloidaal phosphaat bevatte. Deze werd verkregen door melk aan te zuren tot pH 4,6, het neergeslagen caseïne af te filtreren en de zure "wei" vervolgens te neutraliseren met NaOH tot de oorspronkelijke pH van de melk. Bij de neutralisatie sloeg een niet zuiver calciummagnesiumphosphaat neer met een molaire Ca + Mg/P verhouding = 1,60.

Met de Lingtitratie (eindpunt pH 9,00, potentiometrisch bepaald) werd door hen minder phosphor in het neerslag teruggevonden dan bij de analyse daarvan. Zij trokken uit deze resultaten de conclusie, dat de Lingtitratie bij melk te lage waarden voor de phosphor zou geven en dientegevolge te hoge verhoudingen mmol Ca + Mg / mmol P. De methode Pyne en Ryan zou zeker te lage uitkomsten geven.

Evenhuis en de Vries verloren weer uit het oog, dat de Lingtitratie berust op de veronderstelling, dat uit 1 mmol colloidaal $Ca_3(PO_4)_2$ 2 mmol KOH vrijkomt. Indien in het complex secundair phosphaat aanwezig is, zal er met deze titratie minder phosphor berekend worden.

Verder mag niet zo maar aangenomen worden, dat de toestand in melk dezelfde is als in de geneutraliseerde wei. In het neerslag kan secundair phosphaat aanwezig geweest zijn, ondanks het feit, dat daarin een verhouding Ca + Mg/P = 1,60 werd gevonden. Evenhuis en de Vries vergaten n.l. de hoeveelheid citroenzuur in het neerslag te bepalen. Dit is niet erg logisch, want het magnesium werd wel bepaald. Het citroenzuur kan echter een belangrijke invloed hebben op de gevonden verhouding.

De analyse van het neerslag was bovendien zeer onvolledig. 20-30% werd omschreven als onbekende stof (zie ook blz. 27).

CONCLUSIE.

Indien de beide methoden kritisch beschouwd worden, blijft als het enige, dat vaststaat over, dat door toevoeging van een neutrale verzadigde kaliumoxalaatoplossing aan melk de pH daarvan stijgt. Dit wijst erop, dat in het complex waarschijnlijk calciumphosphaat als zodanig aanwezig is en dat dit phosphaat in totaal in een basischer vorm dan secundair phosphaat aanwezig zal zijn. Beide methoden mogen echter niet zonder meer gebruikt worden voor een quantitatieve bepaling van het phosphaat.

Het is bekend, dat bij titraties van phosphorzuur met calciumhydroxyde de instelling van het evenwicht niet momentaan plaats vindt. Het definitieve eindpunt wordt eerst na lange tijd bereikt. Het is de vraag of bij de titratie's al de in de melk voorkomende opgeloste anorganische phosphor neergeslagen wordt, en of dit in melk en wei in dezelfde mate het geval is. Door Boulet en Rose (lit. 7) werd aangetoond, dat in wei uit verse melk tot pH 10,00 phosphaat blijft precipiteren. Verder is het niet bekend of in wei en melk éénzelfde phosphaat neerslaat. De aanwezigheid van caseine zou het ontstaan van "tertiair" phosphaat kunnen bevorderen (Eilers, lit. 21).

Door Pyne en Ryan (lit. 75) is niet voldoende weerlegd, dat eventueel in het complex aanwezig secundair phosphaat geen rol zal spelen bij de Lingtitratie.
Door hen werd een mogelijke foutenbron van deze titratie aan de reeds bekende toegevoegd. Titreren tot pH 9,00 ondervangt het door Boulet en Rose geopperde bezwaar niet. De methode Pyne en Ryan is gebaseerd op te veel veronderstellingen.
Met de titraties zal altijd een uitkomst gevonden worden, die ongeveer overeenstemt met de verwachte. Dit des te meer, indien alleen met gemiddelden van een aantal proeven rekening wordt gehouden (zie hoofdstuk II). De methoden verschaffen verder geen voldoende basis voor berekening van de hoeveelheid caseinecalcium. Afdoende argumenten voor de wijze, waarop calciumphosphaat aan calciumcaseinaat gebonden is, kunnen door de toepassing ervan niet gevonden worden.

1.3. De methode Sörensen (de formoltitratie).

Meermalen gebruikt voor het bepalen van het eiwitgehalte van melk is deze titratie door Pyne (lit. 69 en 70) en Van der Burg (lit. 9) betrokken in het onderzoek van het caseinaatphosphaatcomplex. De bij hun onderzoek verkregen resultaten werden gebruikt als argument ten gunste van bepaalde bindingen van het phosphaat aan caseine.

Door Kometiani (lit. 55) werd gevonden, dat de formoltiter van melk na verhitten hoger was dan er voor. Bij het verhitten werd de caseine echter niet gehydrolyseerd, daar het aantal aminogroepen bepaald volgens de methode van Van Slyke (lit. 88) constant bleef. Kometiani schreef de verhoging gedeeltelijk toe aan de afsplitsing van calcium van de carboxylgroepen van caseine.

Pyne (lit. 69) nam waar, dat de formoltiter van melk ongeveer 11% toenam, indien van tevoren door toevoeging van kaliumoxalaat het calcium geprecipiteerd werd. Bij kunstmatige complexen van caseine werd hetzelfde waargenomen, bij gelatinecomplexen echter niet. De reactieve groepen van de caseine zouden door calciumphosphaat geblokkeerd zijn, echter vrij komen, indien het calcium onttrokken werd. Het door Kometiani en hemzelf gevondene deed Pyne veronderstellen, dat calciumphosphaat met calciumcaseinaat een dubbelzout vormt. Als verder argument voor deze opvatting voerde hij aan, dat door Gyorgi (lit. 37) waargenomen werd, dat de hoeveelheid opgelost anorganisch phosphor toenam, wanneer melk bij constante pH onder inwerking van pancreas enzym tegen water gedialyseerd werd. De totale hoeveelheid anorganische phosphor nam daarbij niet toe. Als struktuur voor het dubbelzout werd door Pyne de volgende schematische voorstelling gegeven.

$$(NH_2)_p \text{ ---- } R \begin{cases} (COOH)k \\ (COOH\tfrac{1}{2}Ca)m \\ (COOCaPO_4Ca)n \end{cases}$$

Het is eenvoudig deze theorie te weerleggen, want niet het aantal

vrijkomende carboxylgroepen is maatgevend voor het gebruik van NaOH bij de tweede titratie (Kometiani, Pyne) maar het aantal NH_2 groepen, waaraan formaline gebonden wordt. (Harris, lit. 38, 39, 40 Van der Burg, lit. 9).

Van der Burg (lit. 9) vond, dat tijdens het zuur worden van met zuursel geënte melk het aantal getitreerde aminogroepen toenam, totdat een zuurtegraad van 27, 8 ml 0, 1 n loog/100 ml bereikt was. De formoltiter bleef daarna gelijk. Alle phosphaat zou dan van de caseine afgesplitst zijn. Volgens Ling (lit. 61) was dit laatste echter het geval bij 75 ml 0, 1 n/100 ml.
Het is niet waarschijnlijk, dat het grote verschil alleen toegeschreven moet worden aan de door Ling gevolgde methode (Lingtitratie).
Tegenover de waarnemingen van Van der Burg staan die van Schober en Fricker (lit. 84). De formoltiter van melk veranderde bij hun onderzoek niet, wanneer de melk geënt werd met een "normaal" zuursel. Ook sterilisatie zou geen merkbare invloed uitoefenen.
Het is ook wel begrijpelijk, dat de formoltiter van melk niet verandert door aanzuren alleen. Als al het phosphaat al opgelost wordt (zie ook hoofdstuk III) zal bij het uitvoeren van de formoltitratie door het vooraf neutraliseren met loog weer phosphaat aan de caseine gebonden kunnen worden op dezelfde wijze, als het oorspronkelijk aanwezig was.

Mede op grond van het bovenstaande (zie verder blz. 27) was Van der Burg van mening, dat in het caseinaatphosphaatcomplex phosphorzure ionen aan de NH_2 groepen van het aminozuur lysine geadsorbeerd zouden zijn. Het door Kometiani gevondene zou een sterk argument ten gunste van Van der Burg kunnen zijn (ter Horst lit. 50), daar de Van Slyke titratie in een sterk zuur milieu, de Sörensentitratie daarentegen in een zwak alkalisch milieu plaats vindt.
Door verhitting zouden de phosphorzure ionen van de NH_2 groepen afgesplitst kunnen worden, waardoor deze toegankelijk zouden zijn voor formaldehyde. Echter het Van Slyke getal bepaald door Kometiani, dat groter zou moeten zijn dan de formoltiter, was aanzienlijk kleiner.

Als een ondersteuning voor zijn zienswijze zag Van der Burg ook het feit, dat formaline gedeeltelijk de adsorbtie verhinderde van calciumcaseinaat aan calciumphosphaat. Hij nam nl. waar, dat, wanneer aan calciumcaseinaatoplossingen resp. toegevoegd werden 1° "tertiair" calciumphosphaat, 2° "tertiair" calciumphosphaat en formaline, 3° formaline en na drie uur "tertiair" calciumphosphaat, bij gelijke pH per g $Ca_3(PO_4)_2$ resp. 158, 162 en 80 mg caseine geadsorbeerd werden. Ook albumine zou geadsorbeerd worden en de tijd speelde een rol.
Het is echter niet duidelijk, waarom deze verminderde adsorbtie van calciumcaseinaat aan calciumphosphaat een argument oplevert voor de door hem veronderstelde adsorbtie van phosphorzuurionen aan de NH_2 groepen van caseine.

Evenhuis en de Vries (lit. 23) waren van mening, dat veranderingen in de formoltiter niet toegeschreven konden worden aan het opheffen van een chemische band tussen calciumphosphaat en calciumcaseinaat.

De verandering na verhitten zou veroorzaakt worden door omzetting van het calciumphosphaat. De lagere formoltiters van melk, waaraan geen oxalaat toegevoegd was, door het langzame precipiteren van calciumphosphaat tijdens het toevoegen van NaOH bij de eerste titratie, gevolgd door een gedeeltelijk oplossen daarvan tijdens het toevoegen van de formaline.

Indien voldoende lang bij de laatste titratie gewacht werd, meenden zij geen verschil te vinden (zie ook bladzijde 131). Ook zij namen waar, dat aanzuren van melk de formoltiter ongewijzigd liet. (zie vorige bladzijde.)

CONCLUSIE.

Hoewel aangenomen kan worden, dat de aanwezigheid van calciumphosphaat in het complex bij de formoltitratie een zekere rol speelt, is noch door Pyne noch door Van der Burg voldoende aangetoond, dat dit zijn oorzaak zou vinden in een chemische binding van calciumphosphaat aan calciumcaseinaat. Het door Evenhuis en de Vries gevondene zou erop kunnen wijzen, dat deze binding niet bestaat. De eigenschappen van calciumphosphaat zullen van invloed kunnen zijn bij de titratie (zie hoofdstuk III en IV.)

2. DE METHODE VAN DER BURG.

2.1. Het onderzoek van Van der Burg. (lit. 9 en 10)

In de samenvatting van zijn werk geeft Van der Burg zijn opvatting over het caseinaatphosphaatcomplex als volgt weer:

In melk komt caseine voor als een calciumzout, dat een hoeveelheid calcium en PO_4 in oplossing houdt. De molaire verhouding van dit Ca en PO_4 varieert, is gemiddeld echter 1,50. Calcium wordt chemisch gebonden aan het organische phosphaat van de caseine in een daarmee aequivalente hoeveelheid en vormt zodoende calciumcaseinaat. Slechts de vrije amino- en carboxylgroepen blijven over als ladingscentra, waaraan calcium en anorganisch PO_4 gebonden zouden kunnen worden. Uit de formoltiters verkregen na verhitting van melk zowel als na oxalaat toevoeging blijkt, dat de positieve aminogroepen van lysine een rol spelen bij de binding van de negatieve phosphorzuurgroepen.

Voor het calcium blijven dus alleen de negatieve carboxylgroepen over. Bij het verhitten van melk worden calcium en phosphorzure ionen van het caseine afgesplitst, welke in het serum precipiteren als $Ca_3(PO_4)_2$ en in die toestand aan het caseine geadsorbeerd worden of schematisch:

$$Ca = PO_4 \text{----} R \begin{cases} (PO_4)Y \\ (Ca\ )X \end{cases}$$

Bij zijn onderzoek maakte Van der Burg gebruik van de door Guittonneau (lit. 36) waargenomen eigenschap van bepaalde micro-or-

ganismen calciumphosphaat aan de melk te onttrekken, wanneer zij daar tezamen mee verhit worden. Van der Burg gebruikte met zuur uitgewassen en geneutraliseerde gistsuspensie's. De hoeveelheid calciumphosphaat, welke precipiteerde op de gistcellen, bleek evenredig met de duur van verhitten. In het serum zou echter steeds een bepaalde hoeveelheid calcium en phosphorzuur in oplossing blijven. Er moest dus aanvulling vanuit het caseinaatphosphaatcomplex plaats vinden. Bij verhitting zonder gistcellen zou het calciumphosphaat neerslaan op de caseine.

Wanneer van te voren zonder gist verhitte melk opnieuw vernit werd met gist, werd slechts weinig phosphaat op de gist afgezet. Voor het verhitten zou het phosphaatcalcium en de phosphaatphosphor dan ook in een andere toestand aanwezig zijn dan er na.

De rechtevenredigheid tussen de verhittingsduur en het neerslaan van calciumphosphaat bleek bij verhitten van melk zonder gist niet te bestaan. Het op de caseine precipiterende phosphaat zou het in oplossing gaan vanuit de oorspronkelijke toestand tegengaan.

Er is reeds op gewezen (bladz. 21), dat de verhoogde formoltiter gevonden na verhitten van melk geen voldoende bewijs oplevert voor de door Van der Burg veronderstelde verbreking van een chemische band tussen phosphaationen en caseine.

De door Van der Burg waargenomen verminderde adsorbtie van calciumcaseinaat aan calciumphosphaat (lit. 10) bij hogere pH levert geen enkel bewijs voor de door hem veronderstelde "adsorbtie" van calcium- en phosphaationen (zie ook bladz. 20). Zijn veronderstelling, dat bij hogere pH de COOH-groepen geinactiveerd zouden worden en dat daardoor een vermindering van adsorbtie zou optreden is niet erg aannemelijk. Zeer terecht werd door ter Horst (lit. 50) opgemerkt, dat dit eerder voor de NH_2 groepen van lysine te verwachten zou zijn. Volgens haar zou de verminderde adsorbtie bij hogere pH eerder toe te schrijven zijn aan de toename van de dispersiteit van caseine.

Evenhuis en de Vries (lit. 27) namen de verminderde adsorbtie waar zowel voor caseine als voor wei-eiwitten en concludeerden, dat noch de verklaring van Van der Burg noch die van ter Horst juist was.

Naar onze mening is het zeer goed mogelijk, dat de verminderde adsorbtie toegeschreven moet worden aan een verandering in eigenschappen van het phosphaat bij hogere pH (zie hoofdstuk III).

Volgens Van der Burg zou verder door de caseinephosphor een aequivalente hoeveelheid calcium gebonden worden. Deze mening is slechts gegrond op het feit, dat door anderen (Lehman (lit. 59), Soldner (lit. 92), Palmer en Richardson (lit. 66), Ling (lit. 61), Richmond (lit. 78)) geschreven werd, dat bij pH 6,70 in verse melk 10,4; 11,0; 10,5; 10,1; en 10 mg per g caseine voorkomt. Deze hoeveelheid is inderdaad ongeveer aequivalent met de caseinephosphor.

Dezelfde veronderstelling was al eerder geuit door de Kadt en van Minnen (lit. 54).

Van der Burg trachtte haar aannemelijk te maken. De polariseer-

baarheid van de phosphorzuurgroepen van de caseine is veel groter dan die van de COOH groepen, terwijl het dubbelgeladen calciumion sterk polariserend werkt. Volgens Eilers (lit. 21) komt de sterkte van de zuurgroepen van de caseinephosphor ongeveer overeén met die van de primaire en secundaire van phosphorzuur, welke resp. een pK waarde hebben van 2, 3 en 6, 5. De caseinephosphor zal dan ook in melk gemakkelijk zouten met calcium kunnen vormen. Echter ook de COOH groepen kunnen dit doen, terwijl in de volgende hoofdstukken (hoofdstuk IV en V) zal worden aangetoond, dat de in de literatuur opgegeven waarde voor het caseinecalcium niet juist is.

Door de Lingtitratie toe te passen op met gist en zonder gist verhitte melk (zie bladz.16) vond Van der Burg, dat ook het caseinecalcium (hier wordt daarmee alleen het calcium gebonden aan de phosphorgroepen van de caseine bedoeld) bij aanwezigheid van gist gedeeltelijk afgesplitst wordt. Bij melk zonder gist zou de hoeveelheid ervan gelijk blijven. Het calcium "geadsorbeerd" aan de COOH groepen zou sneller in oplossing gaan. Door Ling (lit. 61) werd éénzelfde verschil gevonden tussen caseinecalcium en het op andere wijze in het complex voorkomende calcium (phosphaatcalcium).

Het door Van der Burg gevonden verschil in gedrag van aan caseinephosphor gebonden en op andere wijze in het complex aanwezige calcium is moeilijk te verklaren uit de voorstelling, welke hij had van de opbouw van het complex.

Zowel het calcium gebonden aan de phosphorzuurgroepen als dat aan de COOH groepen zal daaraan gebonden zijn zoals bij een normaal zout. Er kan dan ook noch van aan COOH groepen geadsorbeerd calcium noch van aan vrije aminogroepen "geadsorbeerde" PO_4 ionen gesproken worden. De gevormde zouten zullen zeer weinig gedissocieerd moeten zijn, daar anders onmiddellijk onopgelost calciumphosphaat gevormd wordt (zie hoofdstuk V). Het lijkt echter niet erg waarschijnlijk, dat dergelijke zouten slecht gedissocieerd zijn.

Mochten al phosphaationen geadsorbeerd zijn, dan zullen dit bij de pH van melk zeker geen PO_4^{--}-ionen zijn maar HPO_4^{--}-ionen. Er is de gedachte geopperd, dat aan de vrije aminogroepen van de caseine $CaPO_4^-$-ionen gebonden zouden zijn.

Het bestaan daarvan is verondersteld door Greenwald (lit. 34).

Indien het totaal van argumenten door Van der Burg aangevoerd als bewijs voor zijn opvatting kritisch wordt beschouwd, blijkt dus, dat geen enkel bewijs voor de juistheid van deze opvatting geleverd is.

2.2. Het onderzoek van Evenhuis en de Vries.

Door Evenhuis en de Vries (lit. 22, 23, 24, 25) worden uit met dezelfde methode uitgevoerde proeven geheel andere conclusies getrokken. Zij vonden, dat behalve op gistcellen calciumphosphaat ook kon precipiteren op andere stoffen en veronderstelden, dat bij verhitten van melk een herkristallisatie van calciumphosphaat plaatsvindt. Deze kristallisatie zou bevorderd worden door op de gist aanwezige kristallisatiecentra.

Phosphaat neergeslagen op gist bij hogere temperatuur zou gro-

ver zijn en daardoor minder snel oplossen dan het op het oppervlak van caseine zeer fijn verdeelde calciumphosphaat. Op gist geprecipiteerd phosphaat bleek nl. evenals phosphaat neergeslagen na verhitten van wei slechts zeer langzaam op te lossen, zelfs wanneer de pH tot 4,7 verlaagd werd. Zij veronderstelden, dat ook het phosphaat aanwezig op de caseine na verhitten moeilijker op zou lossen.

Het caseinecalcium van melk zou bij verhitten eveneens voor een groot deel afgesplitst worden en uitgewisseld tegen natrium en kalium. Melk verhit met gist en daarna gecentrifugeerd met een supercentrifuge bleek n.l. meer caseine te bevatten dan melk op dezelfde manier behandeld zonder gist. De hoeveelheid calcium en magnesium in de oorspronkelijke melk was echter dezelfde. De deeltjesgrootte van de caseine zou afnemen.

Evenhuis en de Vries (lit. 24) kwamen tot de mening, dat in rauwe melk een mengsel van phosphaten in het complex aanwezig is, waarvan de samenstelling nogal zou kunnen variëren. Zij argumenteerden deze opvatting door erop te wijzen, dat door verschillende onderzoekers zeer varierende uitkomsten verkregen werden voor de molaire verhouding Ca/P van het phosphaat bij verschillende monsters melk. (De Kadt en van Minnen 1,25-1,78 (lit. 54), van Slyke en Bosworth 1,17-2,07 (lit. 90)) en dat door Gericke (lit. 32) werd gevonden, dat bij de bereiding van secundair phosphaat hydroxyapatiet ontstaan kan, terwijl bij verhitten van secundair phosphaat eveneens hydroxyapatiet precipiteert en monocalciumphosphaat in oplossing gaat. Verder werden door D'Ans en Knutter (lit. 2) geen aanwijzingen gevonden voor het ontstaan van tertiair calciumphosphaat tussen $CaHPO_4$ $2H_2O$ en apatiet.

Het mengsel van phosphaten zou bij verhitten, afhankelijk van de verhittingstemperatuur en duur, min of meer volledig omgezet worden in hydroxyapatiet.

Hiermee was in overeenstemming, dat het phosphaat bij hun proeven neergeslagen op de gistcellen een molaire verhouding Ca + Mg/P = 1,66 had. De door Van der Burg gevonden verhouding 1,50 zou door het niet bepalen van magnesium verklaard worden. Bij hun verder onderzoek (zie bladz. 27) kwamen Evenhuis en de Vries echter terug van deze opvatting over de toestand in rauwe melk.

CONCLUSIE.

Het is mogelijk, dat bij verhitten herkristallisatie van het phosphaat op kan treden. Het is bekend, dat calciumphosphaat met een molaire verhouding Ca/P tussen 1,00 en 1,50 bij verhitten omgezet kan worden in hydroxyapatiet (Carlström lit. 12). In rauwe melk zou aan caseine zeer goed een phosphaat gebonden kunnen zijn, dat na verhitten een andere samenstelling krijgt. Daarmee zouden de waarnemingen van Van der Burg te verklaren zijn.

Door het onderzoek van Evenhuis en de Vries komt de theorie van Van der Burg op nog lossere schroeven te staan dan al het geval was.

Uit beider onderzoek bleek, dat de toestand van het phosphaat voor het verhitten van melk een andere is dan die er na.

3. DE METHODE WAARBIJ GEBRUIK GEMAAKT WORDT VAN HET VERSCHIL IN SAMENSTELLING TUSSEN MELK EN ULTRAFILTRAAT (RESP. WEI, DIALYSAAT EN CENTRIFUGAAT).

Er is opgemerkt (blz 13) dat het caseinaatphosphaatcomplex door ultrafiltratie, lebstremming of centrifugeren uit melk te verwijderen is. Indien het calcium- en phosphorgehalte voor en na de verwijdering ervan bepaald wordt, bestaat in principe de mogelijkheid het calcium- en phosphorgehalte van het complex te berekenen. Door veel melk tegen een klein volume water te dialyseren zou éénzelfde mogelijkheid verkregen worden na analyse van de melk en het dialysaat.

Een voorwaarde voor de juistheid van de berekening is echter, dat tijdens de bewerkingen geen verschuivingen in de oorspronkelijke verdeling van het calcium en phosphorgehalte van het complex optreden. Verder dienen correctiefactoren gebruikt te worden, teneinde de verkregen volumina ultrafiltraat etc. in overeénstemming te doen zijn met de in de berekening betrokken hoeveelheid melkserum.

Hoewel van vrijwel alle genoemde hulpvloeistoffen gebruik gemaakt is, wordt in de literatuur weinig aandacht besteed aan de vraag, welke er van werkelijk met melkserum overeenstemt. In hoofdstuk II zal hierop ingegaan worden.

Bij de methoden wordt in de melk al het calcium bepaald evenals in de gebruikte hulpvloeistof. Het in de laatste vloeistof gevonden calcium wordt na correctie van het volume van deze vloeistof voor de t.o.v. melkserum eruit verwijderde bestanddelen afgetrokken van de hoeveelheid in de melk. De hoeveelheid calcium van het complex is dan bekend.

Het gehalte aan phosphaatphosphor van het complex kan op verschillende manieren gevonden worden. Phosphor komt in de melk in vier vormen voor n.l. als:

a. colloidaal caseinephosphor, niet oplosbaar in trichloorazijnzuur.
b. colloidaal phosphaatphosphor, evenals
c. opgelost anorganisch phosphor wel oplosbaar in trichloorazijnzuur.
d. opgelost organisch phosphor, gedeeltelijk oplosbaar in trichloorazijnzuur maar bij de phosphorbepaling als zodanig slechts mee bepaald, indien de organische stof gedestrueerd wordt.

Door de hoeveelheid phosphor gevonden in het trichloorazijnzuurserum van melk te verminderen met die uit trichloorazijnzuurserum van de hulpvloeistof is de phosphaatphosphorhoeveelheid te vinden {(2 + 3 + 4) - (3 + 4)}.

Door melk te verassen en in de as phosphor te bepalen vindt men het totaal phosphorgehalte van melk. In de hulpvloeistof kan op dezelfde wijze de totale opgeloste phosphor bepaald worden.

Sommige onderzoekers hebben alleen het totaal phosphorgehalte bepaald en de hoeveelheid opgeloste phosphor, waardoor de colloidale phosphor bekend wordt.

De phosphaatphosphor wordt dan gevonden door in caseine een

constante hoeveelheid caseinephosphor te veronderstellen. (Van Slyke en Bosworth). Anderen bepaalden alleen de zuur oplosbare phosphor in melk en hulpvloeistof.

Zijn zowel het colloidale calcium als de phosphaatphosphor bekend, dan wordt voor de verdeling van het calcium gebruik gemaakt van diverse veronderstellingen. Men stelt dan of het caseinecalcium per g caseine constant en berekend de samenstelling van het phosphaat of men veronderstelt een constante samenstelling van het phosphaat en berekent de hoeveelheid caseinecalcium per g. caseine.

3.1. Onderzoekingen waarbij ultrafiltraat gebruikt werd.

3.1.1. Het onderzoek van Van Slyke en Bosworth.

Van Slyke en Bosworth (lit. 89) bepaalden van melk van individuele koeien en van het ultrafiltraat daarvan het totale calcium en phosphorgehalte. Zonder op het ultrafiltraat een volumecorrectie toe te passen werd het colloidale calcium en de colloidale phosphor berekend. Zij veronderstelden, dat caseine 0,71% caseinephosphor bevat. De na aftrekken van deze caseinephosphor overblijvende hoeveelheid phosphor werd gerekend phosphaatphosphor te zijn. De verhouding caseinephosphor/phosphaatphosphor bleek niet constant te zijn, waaruit zij merkwaardigerwijze concludeerden, dat calciumphosphaat niet chemisch gebonden kon zijn.

Het caseinecalcium stelden zij gelijk aan de hoeveelheid nodig om caseine te neutraliseren t.o.v. phenolphtaleïne (0,90 m aeq/g caseine). De gemiddelde verhouding Ca/P in het phosphaat daarna berekend kwam overeen met die van secundair phosphaat. De verhoudingen berekend voor de afzonderlijke monsters varieerden echter belangrijk.

Zoals door hen zelf later reeds werd opgemerkt (lit. 91) komt in caseine niet 0,71% maar 0,85% caseinephosphor voor. Bij de berekeningen werd dus te veel phosphaatphosphor gevonden. De hoeveelheid caseinecalcium was eveneens te hoog. Het basebindend vermogen van caseine bij pH 8,3 - 8,4 (omslagpunt phenolphtaleïne) is aanmerkelijk groter dan bij pH 6,7 (de pH van melk).

De analyseuitkomsten van Van Slyke en Bosworth werden door Eilers (lit. 21) gebruikt voor een herberekening, waarbij voor het caseinephosphor 0,85% van de caseine en voor het caseinecalcium bij pH 6,7 0,75 m aeq. per g caseine verondersteld werd. De laatste waarde werd afgeleid uit de door Hoffman en Gortner (lit. 48) uitgevoerde potentiometrische titraties van caseine met calciumhydroxyde. Op deze wijze werd gevonden, dat het phosphaat als tertiair phosphaat aanwezig moest zijn, hoewel ook dan grote afwijkingen daarvan bij de individuele monsters gevonden werden.

Er zou ook zuurder phosphaat voor kunnen komen (secundair phosphaat) of de caseine zou minder calcium dan de veronderstelde hoeveelheid binden.

Ook door Van der Burg werd een herberekening met de door Van Slyke en Bosworth bepaalde waarde uitgevoerd, waarbij eveneens het caseinephosphor op 0,85% gesteld werd. Het caseinecalcium

zou met deze phosphor aequivalent zijn (0, 54 maeq.). Voor de verhouding phosphaatcalcium/phosphaatphosphor werd dan een spreiding bij de individuele monsters gevonden van 1,20-1,95. Het gemiddelde was 1,56.

3.1.2. Het onderzoek van White en Davies.

White en Davies (lit. 99) bepaalden bij hun onderzoek zowel de caseinephosphor als de phosphaatphosphor en tevens het colloidale calcium, magnesium en citroenzuur. Ook zij brachten geen correctie aan op het volume van het ultrafiltraat voor de t.o.v. melkserum eruit verwijderde bestanddelen. Het colloidale calcium werd door hen verdeeld onder aanname van de juistheid van de door Pyne en Ryan (lit. 75) met hun titratiemethode berekende hoeveelheid tertiair phosphaat. Er is reeds geconcludeerd, dat deze methode niet voldoende betrouwbaar is (zie blz.18).

Met behulp van de gemaakte veronderstelling werd berekend, dat caseine in melk 12 mg caseinecalcium bindt. White en Davies spraken zich niet uit over de wijze, waarop het magnesium en citroenzuur in het complex voorkomen en evenmin over de wijze, waarop het phosphaat aan de caseine gebonden is.

3.2. Onderzoekingen, waarbij wei gebruikt werd.

3.2.1. Het onderzoek van Evenhuis en de Vries.

Evenhuis en de Vries (lit. 27) maakten gebruik van wei als hulpvloeistof. Hoewel zij aanvankelijk van mening waren (lit. 24), dat de samenstelling van het colloidale calciumphosphaat variabel zou kunnen zijn, kwamen zij bij hun verdere onderzoek tot de opvatting, dat dit niet het geval is.

Het in het complex voorkomende phosphaat zou een constante samenstelling hebben met een molaire verhouding Ca + Mg/P= 1,60, omdat in aangezuurde melk, waaruit de caseine verwijderd was, een phosphaat van deze samenstelling neersloeg, wanneer de vloeistof met loog geneutraliseerd werd tot de pH van melk. Indien gelatine, arabische gom of caseine aan de zure vloeistof toegevoegd werd of indien tot een hogere pH (8,00-9,00) getitreerd werd, zou éénzelfde phosphaat neerslaan. Het zou bij verhitten herkristalliseren tot hydroxyapatiet (Ca + Mg/P = 1,667).

Bij berekeningen uitgevoerd naar aanleiding van analyses van melk en daarbij behorende lebwei veronderstelden zij de aanwezigheid van dit phosphaat. In gemengde melk werd door hen dan ook in vergelijking met andere onderzoekers minder caseinecalcium berekend, zelfs indien het magnesium meeberekend werd. (Evenhuis en de Vries-caseinecalcium + magnesium 10,0 mg per g caseine; andere onderzoekers caseinecalcium 10,5 mg).

In melk van individuele koeien werd een aanzienlijke variatie gevonden (7,0 - 12,7 mg caseinecalcium + magnesium per g caseine). Deze variatie werd toegeschreven aan de "abnormale samenstelling" van de melk. Zo zou bij een bepaald monster het citraatgehalte in de wei, bij een ander het phosphaatgehalte abnormaal zijn. Ook de samenstelling van het colloidale phosphaat, hoewel constant volgens hen, zou abnormaal kunnen zijn.

Het lijkt ons toe, dat de samenstelling van gemengde melk eerder abnormaal genoemd moet worden dan die van melk van individuele koeien. Hun veronderstelling zal voor melk van individuele koeien dus niet juist zijn (hoofdstuk II).

De argumentatie voor de aanwezigheid van het calciummagnesiumphosphaat met de molaire verhouding Ca + Mg/P = 1,60 is vrij zwak. Het phosphaat neergeslagen tijdens de neutralisatie van zure, van caseine bevrijde melk hoeft helemaal niet eenzelfde samenstelling te hebben als het oorspronkelijk in de melk aanwezige phosphaat. De omstandigheden, waaronder het gevormd werd, waren zeer verschillend van de in de uiercel heersende (zie hoofdstuk III). De analyse ervan was bovendien onvolledig (zie bladz 18).

Evenhuis en de Vries (lit. 27) merkten op, dat, hoewel "aangenomen mag worden, dat in melk een klein deel van de caseine aan calciumphosphaat geadsorbeerd is", bij hun proeven aangetoond werd, dat zelfs, wanneer de door hitte coaguleerbare eiwitten uit de "wei" afgescheiden zijn, de bereiding van colloidale calciumphosphaatoplossingen in deze "wei" mogelijk is, zodat ook de andere eiwitten van de melk als schutcolloid kunnen worden gebruikt".

De caseine zou dus in melk op twee verschillende manieren het colloidale phosphaat in oplossing houden n.l. a. door adsorbtie, b. als schutcolloid. Het feit, dat colloidale calciumphosphaatoplossingen konden ontstaan in de geneutraliseerde zure "wei", behoeft helemaal niet in te houden, dat de niet coaguleerbare eiwitten als schutcolloid dienst doen. "Colloidale phosphaten" kunnen ook ontstaan in gedestilleerd water, dat alleen calcium en phosphorzuur bevat (zie hoofdstuk III).

Daar bij de neutralisatie van zure "wei" tot pH 6,7 slechts betrekkelijk weinig eiwit uit de "wei" aan het tijdens deze neutralisatie gevormde phosphaat geadsorbeerd werd (ongeveer 25% van het gewicht van het phosphaat), is er volgens Evenhuis en de Vries weinig reden een chemische binding van calciumphosphaat aan caseïne te veronderstellen.

Deze redenering is niet erg overtuigend. Het eiwit aanwezig in de zure wei was geen caseine. Ten opzichte van phosphaat zal caseine zich anders kunnen gedragen dan het serumeiwit. Verder zullen de omstandigheden, waaronder het phosphaat gevormd wordt, van belang kunnen zijn.

Het is moeilijk de inhoud van de mededelingen van Evenhuis en de Vries te doorgronden. In hun niet gemakkelijk leesbare publicatie's worden zeer veel suggestie's gedaan en veronderstellingen gemaakt. De argumentatie voor een verandering van het phosphaat tijdens verhitten lijkt overtuigend (zie bladz. 23). Hun opvatting over de toestand in de rauwe melk is dat zeer beslist niet.

3.3. Onderzoekingen, waarbij gebruik gemaakt werd van een centrifuge.

Het onderzoek kan op tweeërlei manier uitgevoerd worden. De Kadt en van Minnen centrifugeerden met bepaalde snelheden en onderzochten de uitgecentrifugeerde gelen.

Door Amerikaanse onderzoekers werd veelal de overblijvende vloeistof geanalyseerd. De hoeveelheid totaal stikstof, overblijvend na centrifugeren met oplopende snelheden, werd uitgezet in grafiek tegen het totaal calcium of phosphor. Door extrapolatie tot het caseinepercentage nul kon berekend worden hoeveel caseine, calcium en phosphor na elke charge verwijderd was.

3.3.1. Onderzoekingen, waarbij de uitgecentrifugeerde gelen onderzocht werden.

3.3.1.1. Het onderzoek van de Kadt en van Minnen.

De Kadt en van Minnen (lit. 54) centrifugeerden ondermelk van gemengde melk met een Sharples centrifuge en analyseerden het verkregen gel.

Van het gel werden bepaald de hoeveelheid caseine, totaal calcium, totaal phosphor en zo nu en dan magnesium of citroenzuur. Er werd aangenomen, dat in caseine 0,26 mmol (=0,81%) caseinephosphor voorkomt en dat hieraan een aequivalente hoeveelheid caseinecalcium gebonden is ($\simeq$10,5 mg Ca/g caseine).

Voor de verhouding phosphaatcalcium/phosphaatphosphor werd gemiddeld 1,53 gevonden. Er zou in het complex tertiair phosphaat aanwezig zijn. De waarden bij de verschillende proeven varieerden echter van 1,34 tot 1,78.

De Kadt en van Minnen veronderstelden, dat het phosphaat aanwezig is als dubbelzout.

$$\text{Cas} - - PO_4 \begin{cases} Ca - PO_4 = Ca \\ Ca - PO_4 = Ca \end{cases}$$

of geadsorbeerd aan de caseine.

De door hen verkregen uitkomsten stemden goed overéén met die verkregen door Ling. Het in het complex gevonden magnesium en citroenzuur (resp. 0,05 en 0,02 - 0,03 mmol/g caseine) werd niet in de berekeningen betrokken, daar de hoeveelheden ervan ongeveer aequivalent waren. Kalium, natrium en chloor zouden niet in het complex voorkomen. Ondanks het verschil in deeltjesgrootte zouden de caseinaatphosphaatdeeltjes in melk éénzelfde samenstelling hebben. (zie ook bladz. 31).

Tegen het onderzoek van de Kadt en van Minnen zijn de volgende bedenkingen aan te voeren (zie ook ter Horst lit. 50).

a. De phosphaatphosphor werd niet bepaald. Aangenomen werd, dat caseine 0,26 mmol caseinephosphor per gram bevat. Door hen is niet onderzocht of deze hoeveelheid constant is. Zij lijkt wat aan de lage kant te zijn, daar andere onderzoekers 0,85% $\simeq$ 0,27 mmol opgeven.

b. Er is geen enkel bewijs door hen geleverd, dat de hoeveelheid caseinecalcium er aequivalent mee is.

c. De gevonden spreiding in de voor het phosphaat berekende verhouding is zo groot, dat het de vraag is of geconcludeerd mag worden, dat altijd tertiair phosphaat aanwezig is.

3.3.2.1. Het onderzoek van Ramsdell en Whittier.

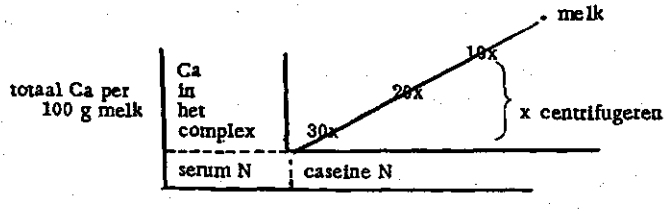
Ramsdell en Whittier (lit. 76) centrifugeerden melk eveneens met een Sharples centrifuge. Het verkregen gel werd in water gesuspendeerd en de suspensie nogmaals gecentrifugeerd. Nadat dit proces nog éénmaal herhaald was, werd het gel gedroogd bij 20° C en na bewaren geanalyseerd. Bepaald werden het stikstof-, calcium-, totaal phosphor- en phosphaatphosphor gehalte. Het gel bleek geen chloor en lactose meer te bevatten.
Uit de resultaten verkregen door het gedroogde gel te suspenderen in water en op de suspensie de Lingtitratie toe te passen (zie ook bladz 16) concludeerden zij, dat het phosphaat als tertiair phosphaat aanwezig was. Dit zou niet chemisch gebonden zijn, omdat er een variatie gevonden werd in de verhouding van de hoeveelheid calciumcaseinaat t.o.v. die van calciumphosphaat. Aan het caseine zou 1,18% caseinecalcium gebonden zijn. Deze hoeveelheid zou echter bij verschillende monsters melk niet altijd gelijk zijn.

Afgezien van het feit, dat met de Lingtitratie nooit de juiste samenstelling van het phosphaat te bepalen is, is het verder de vraag of het herhaald oplossen en centrifugeren van het gel geen veranderingen in de samenstelling ervan veroorzaakt heeft, terwijl uit de variatie in de verhouding van de hoeveelheden calciumcaseinaat en calciumphosphaat niet zonder meer geconcludeerd mag worden, dat geen chemische binding mogelijk is.

3.3.2. Onderzoekingen, waarbij gecentrifugeerd werd en door extrapolatie de samenstelling van het phosphaat gevonden werd.

3.3.2.1. Het onderzoek van Ramsdell en Hufnagel.

Ramsdell en Hufnagel (lit. 77) centrifugeerden van te voren geanalyseerde ondermelk bij verschillende snelheden. In de overblijvende vloeistof werden het totaal calcium, het totaal phosphor en het totaal stikstof percentage bepaald. Door extrapolatie van de verhoudingen totaal Ca/totaal N en zuuroplosbaar P/totaal N tot het serum N werd de hoeveelheid calcium, phosphaatphosphor en caseine van het complex berekend.



In het complex veronderstelden zij 1,07% caseinecalcium (Söldner). Zij berekenden, dat tertiair phosphaat in het complex aanwezig moest zijn.
Men kan zich afvragen of extrapolatie tot het serum N gehalte de juiste waarde geeft voor het gehalte aan calcium en phosphor van het serum.

Indien de kleinste caseinedeeltjes een andere samenstelling zouden hebben dan de grotere, is extrapolatie niet geoorloofd. Verder werd noch het magnesium noch het citroenzuur, dat in het complex aanwezig is, bepaald.

3.3.2.2. Het onderzoek van Edmonson en Tarasuk.

Volgens Edmonson en Tarasuk (lit. 19) bestaat het complex uit calciumcaseinaat en calciumphosphaat. De samenstelling van het laatste werd door hen op dezelfde wijze berekend als door Ramsdell en Hufnagel. Zij vonden een gemiddelde molaire verhouding Ca/P=1,45. Het phosphaat zou dan ook als tertiair phosphaat aanwezig zijn. De samenstelling van de deeltjes van verschillende grootte was volgens hen constant. Dit werd ook door de Kadt en van Minnen gevonden (zie bladz. 29).

Van Slyke en Bosworth (lit. 89) vonden wel een verschil in de samenstelling van de grotere en de kleinere deeltjes bij proeven, waarbij ondermelk herhaalde malen door een centrifuge geleid werd en het centrifugeslib geanalyseerd werd. Hostettler en Rijchener (lit. 52) meenden, dat de grotere deeltjes meer calcium en phosphor bevatten.

Eilers vond geen verschil in de samenstelling van de deeltjes van verschillende grootte. Hij centrifugeerde ondermelk, waaraan wat chloroform toegevoegd was, met een supercentrifuge, zodat het grof verdeelde caseinaatphosphaat afgescheiden werd en het fijn verdeelde in de centrifugewei achter bleef. Wanneer zowel met de ondermelk als met de centrifugewei de Lingtitratie werd uitgevoerd en het colloidale phosphaat per procent caseine werd berekend, bleek geen verschil.

3.3.2.3. Het onderzoek van Ford et al.

Met dezelfde methode werd de samenstelling van het complex door Ford et al. (lit. 29) onderzocht. Daar de verhouding totaal Ca/totaal N en totaal P/totaal N ook bij langer centrifugeren constant bleef, zou het overgrote deel van de caseinedeeltjes een gelijke samenstelling hebben. Slechts de grootste deeltjes ($\leq$15%) zouden meer zuuroplosbaar phosphor bevatten. De verhouding in het phosphaat bleek te variëren van 1,33 - 1,48 (gemiddeld 1,40), wanneer een met het caseinephosphor (0,85%) aequivalente hoeveelheid caseinecalcium verondersteld werd. Bij de berekening werd een correctie aangebracht voor het gebonden water (0,52 g/g caseine). Ook zij concludeerden, dat tertiair phosphaat aanwezig was. Wanneer de sedimenten in water verdeeld en nogmaals gecentrifugeerd werden, vonden zij een variatie in de verhouding van 1,46 - 1,64 (gemiddeld 1,54). De uitkomsten stemden goed overeen met die van de Kadt en van Minnen.

Tegen hun onderzoek zijn dezelfde bezwaren aan te voeren als tegen dat van de Kadt en van Minnen. Hoewel opgemerkt werd, dat magnesium in het complex voorkomt (Alexander 0,15%, lit. 1) en dat dit van invloed zou kunnen zijn op de uitkomsten, werd het niet

bepaald evenmin als het citroenzuur. Bij het overgrote deel van de caseinedeeltjes zou de verhouding colloidaal-calcium: phosphaat-phosphor: caseinephosphor = 5 : 2 : 2 zijn, wat op een verbinding van 2 mmol calciumcaseinaat met 1 mmol calciumphosphaat zou wijzen, een uitermate nafeve conclusie.

In enkele volgende publicatie's (lit. 30, 31) werd opgemerkt, dat ook van de kleinste deeltjes de verhouding caseinephosphor/totaal N dezelfde is als van de grotere. In melk zouden zij in dezelfde samenstelling voorkomen als deze.

CONCLUSIE.

Het is duidelijk, dat, of men nu gebruik maakt van lebstremming, ultrafiltreren of centrifugeren, de uiteindelijke conclusie's zeer sterk afhankelijk zijn van de gemaakte veronderstellingen. Dezelfde analyseresultaten kunnen daardoor leiden tot verschillende meningen. De veronderstellingen, waarmee werd gewerkt, waren echter onvoldoende gegrond.

4. DE METHODE, WAARBIJ HET CASEINAATPHOSPHAATCOMPLEX KUNSTMATIG BEREID WORDT.

Als uitgangsmateriaal wordt bij deze methode bij het iso-electrisch punt neergeslagen en min of meer gezuiverde caseine gebruikt. Op de één of andere wijze wordt daarna een complex bereid, waarin caseine, calcium en phosphor voorkomen.

Meestal heeft men bij het bereiden ervan er niet op gelet of de omstandigheden, waarbij werd gewerkt, enigszins overeénkwamen met die, welke in de uiercel aanwezig zullen zijn.

4.1. Het complex bereid door Porcher.

Porcher (lit.67) voegde aan een sterk alkalische calciumcaseinaatoplossing phosphorzuur toe tot pH 7,00.

Volgens hem kwam de bij pH 7,00 aan zuivere caseine gebonden hoeveelheid calcium overeen met de hoeveelheid caseinecalcium in melk, terwijl de overmaat calcium met het phosphorzuur phosphaat vormde en wel zodanig, dat 1 mmol phosphorzuur nodig was om 1,25 mmol calciumhydroxyde te neutraliseren. Porcher meende hieruit te mogen concluderen, dat in het complex een gelijke hoeveelheid secundair en tertiair phosphaat aanwezig is.

Afgezien van het feit, dat hij zonder meer veronderstelde, dat al het calcium bij de terugtitratie met phosphorzuur neergeslagen werd, is de conclusie toch al onjuist, omdat, indien gelijke hoeveelheden van beide phosphaten (mmol) aanwezig zouden zijn geweest, niet 1,25 maar 1,33 mmol calcium hydroxyde nodig zou zijn geweest voor de neutralisatie van 1 mmol phosphorzuur. Bij de synthese zal dus of veel meer secundair phosphaat gevormd zijn of een aanzienlijke hoeveelheid calcium en phosphorzuur moet in oplossing gebleven zijn.

4.2. Het complex bereid door Powell en Palmer.

Door Powell en Palmer (lit. 68) werden complexen bereid volgens Porcher en door aan calciumcaseinaat (pH 6,70) gelijktijdig calciumhydroxyde en phosphorzuur toe te voegen zodanig, dat de eind-pH 6,70 was.

Zij onderzochten de lebstremming ervan. De complexen gedroegen zich na verhitten t.o.v. stremsels als een mengsel van gelijke hoeveelheden calciumcaseinaatsuspensie en calciumphosphaatsuspensie. Zij concludeerden hieruit, dat het phosphaat niet chemisch gebonden is.

4.3. Het onderzoek volgens Wright.

Wright (lit. 101 en 102) veronderstelde, dat, wanneer oplossingen van Na_2HPO_4 en $CaCl_2$ bij elkaar gevoegd worden, secundair calciumphosphaat neerslaat en dat, wanneer aan calciumcaseinaat of aan natriumcaseinaat met calciumchloride Na_2HPO_4 toegevoegd wordt, geen vrij $CaHPO_4$ ontstaat doch een tamelijke stabiele colloidale oplossing, waarin door caseine secundair calciumphosphaat in oplossing gehouden wordt. Wright onderzocht verder de diffusie evenwichten tussen een natriumcaseinaat oplossing en een door een semipermeabele wand daarvan gescheiden calciumchlorideoplossing. Het calcium bleek zich op te hopen in de eiwitoplossing. Indien aan het natriumcaseinaat ook Na_2HPO_4 toegevoegd werd, bleek 90% van het calcium zich in de caseine oplossing op te hopen, terwijl 70-75% van het phosphaat erin achter bleef. Wanneer minder phosphaat toegevoegd werd hoopte zich minder calcium op; meer toevoegen gaf een grotere ophoping.

De veronderstellingen van Wright zijn op geen enkele bepaling gebaseerd. Zijn diffusieproeven zouden erop kunnen wijzen, dat caseine een actieve rol speelt bij de vorming van het complex. De pH van de vloeistoffen werd echter niet gemeten.

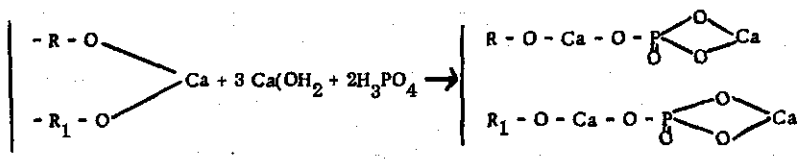
4.4. Het onderzoek van Pyne.

Uit het feit, dat kunstmatige complexen bereid volgens Porcher zich hetzelfde gedroegen bij de formoltitratie met en zonder oxalaat als melk, meende Pyne (lit. 69 en 70) te mogen concluderen, dat calciumcaseinaat en calciumphosphaat met elkaar chemisch verbonden zijn (zie ook bladz. 19). Dit zou des te meer waarschijnlijk zijn, daar bij gelatinephosphaatcomplexen bereid volgens De Toni (lit. 93) een zelfde verschijnsel niet waargenomen werd.

4.5. Het onderzoek van Eilers.

Door Eilers (lit. 21) werd phosphorzuur potentiometrisch getitreerd met calciumhydroxyde al of niet bij aanwezigheid van caseine. Wanneer phosphorzuur langzaam getitreerd werd, ontstond vrijwel alleen secundair phosphaat. Indien sneller getitreerd werd, was de hoeveelheid calciumhydroxyde, nodig om tussen pH 5 - 7 éénzelf-

de pH waarde te bereiken als bij de langzame titratie,groter.
Zij kwam dan ongeveer overeen met die hoeveelheid, welke voor de vorming van tertiair phosphaat nodig zou zijn. Als caseine aanwezig was, was dit ook bij langzaam titreren het geval. Caseine zou dus het ontstaan van tertiair phosphaat bevorderen.
Wanneer echter opklimmende hoeveelheden phosphorzuur (200, 400,800en1000mg) in aanwezigheid van dezelfde hoeveelheid caseine getitreerd werden, zou boven 700 mg steeds meer secundair phosphaat gevormd worden, daar beneden vrijwel alleen tertiair phosphaat. Bij éénzelfde hoeveelheid caseine zou dus een zeker maximum in de te vormen hoeveelheid tertiair phosphaat optreden. Caseine zou dan ook de beperkende factor zijn voor de vorming daarvan. Deze waarnemingen en het feit, dat bij aanwezigheid van caseine het evenwicht zich aanmerkelijk sneller instelde dan bij afwezigheid daarvan, deed Eilers concluderen, dat calciumcaseinaat en calciumphosphaat chemisch gebonden zijn in het complex. Voor de reactie gaf hij de volgende vergelijking.



Bij de titratie van de caseine met opklimmende hoeveelheden phosphorzuur was de hoeveelheid benodigd calcium kleiner dan overeen zou komen met de vorming van tertiair phosphaat. Eilers verklaarde dit tekort door aan te nemen, dat niet alle tertiaire zuurgroepen van het phosphorzuur met calcium hadden gereageerd.
Het is echter waarschijnlijker, dat bij de titratie's ook, indien caseine aanwezig was, in het begin van de titratie secundair phosphaat gevormd werd. De door hem gevolgde methode mag dan ook niet toegepast worden, indien men de samenstelling van het caseinaatphosphaatcomplex ontstaand in een betrekkelijk klein pH traject (bijv. 6,6 - 6,8) wil bestuderen (zie hoofdstuk III en volgende).
Het bewijs voor het aanwezig zijn van een chemische binding is niet overtuigend. Het is zeer wel mogelijk, dat niet de hoeveelheid caseine bepalend is voor de hoeveelheid tertiair phosphaat, die ontstaan kan, maar de verhouding phosphorzuur t.o.v. op een bepaald moment aanwezig calcium. Bij een teveel aan phosphorzuur zal ook secundair phosphaat kunnen ontstaan. (zie hoofdstuk III en V.). Het is evenwel duidelijk, dat caseine het ontstaan van basischer phosphaat dan secundair bevorderde bij de titratie's. Ook stelde het evenwicht zich sneller in als caseine aanwezig was.
Door Evenhuis en de Vries werd eveneens gebruik gemaakt van kunstmatig samengestelde complexen. Hun werk is reeds eerder besproken.

5. SAMENVATTING EN DISCUSSIE.

Hoewel door de meeste onderzoekers aangenomen wordt, dat in het complex phosphaat voorkomt met een molaire verhouding phosphaatcalcium/phosphaatphosphor = 1,50, is dit niet met zekerheid aangetoond.

Dat deze waarde vermeld wordt kan zowel veroorzaakt worden door het voor caseinecalcium veronderstelde als door het feit, dat de gemiddeld gevonden waarde ongeveer overeenstemde met de voor het phosphaat veronderstelde. Te weinig wordt meestal rekening gehouden met de grote variatie's, gevonden in de monsters melk van individuele koeien.

Bij de berekeningen is verder weinig aandacht besteed aan het voorkomen van magnesium en citroenzuur. Deze kunnen de uitkomsten daarvan sterk beinvloeden.

De hoeveelheid caseinecalcium is niet voldoende nauwkeurig bekend. Een bewijs, dat zij aequivalent is met de hoeveelheid caseinephosphor is niet geleverd. Integendeel, het is mogelijk, dat zowel deze hoeveelheid als de samenstelling van het phosphaat varieert. Een veronderstelling, welke door geen enkele onderzoeker is onderzocht.

Het is zeer goed mogelijk, dat het caseinecalcium in evenwicht is met de samenstelling van het melkserum. Indien de hoeveelheid citroenzuur of phosphorzuur ten opzichte van de hoeveelheid caseine op een bepaald moment tijdens een lactatie verandert, bestaat de mogelijkheid, dat ook de verdeling van het calcium over de phasen van de melk anders zal zijn. Bij een mogelijk "tekort" aan calcium zullen andere ionen (natrium, kalium, magnesium) dit tekort kunnen aanvullen. Het is zeer de vraag of dit "tekort" zich alleen manifesteerd in het serum. Het lijkt niet onwaarschijnlijk, dat ook een gedeelte van het caseinecalcium dan door andere ionen vervangen zou kunnen worden.

De samenstelling van het phosphaat zal eveneens niet altijd gelijk behoeven te zijn. Het is zelfs de vraag of "tertiair" calciumphosphaat chemisch wel zo gemakkelijk ontstaat als door vrijwel alle onderzoekers van het complex is verondersteld.

De wijze waarop net phosphaat aan het caseinaat gebonden is, is niet bekend. Er is geen enkel overtuigend bewijs noch voor een chemisch gebonden zijn, noch voor een geadsorbeerd zijn ervan aan de caseine. Dat alle calcium en phosphorzuur geheel afzonderlijk als ionen geadsorbeerd zouden zijn, is echter niet waarschijnlijk.

Het in de literatuur vermelde geeft aanleiding tot de volgende conclusie's.

1e. Caseinedeeltjes in melk bestaan uit caseine, calcium en phosphorzuur, welke stoffen op de een of andere wijze innig verbonden zijn. Er komen echter ook magnesium en citroenzuur in voor.

2e. Bij toevoegen van kaliumoxalaat aan melk of aan het geisoleerde

complex, gesuspendeerd in water, komt "alkali" uit het complex vrij. Dit is een vrij sterke aanwijzing, dat er calciumphosphaat in aanwezig is en dat dit basischer is dan secundair phosphaat.

3e. Na verhitten van melk is de toestand van dit phosphaat een andere dan voor het verhitten.

4e. Het phosphaat in het complex oefent invloed uit op de formoltiter. Niet duidelijk is of dit toegeschreven moet worden aan een binding ervan aan de caseine of aan het gedrag van het phosphaat als zodanig bij deze titratie.

5e. De zoutvorming tussen calcium en phosphorzuur wordt door de aanwezigheid van caseine beinvloed. Deze invloed is waarschijnlijk zodanig, dat in aanwezigheid van caseine een basischer phosphaat ontstaat.

HOOFDSTUK II

EIGEN ONDERZOEK

BEREKENINGEN BETREFFENDE DE SAMENSTELLING VAN HET COMPLEX.

In de jaren 1953-1959 werden hier in het laboratorium zeer veel analyses uitgevoerd van melk van individuele koeien en de daaruit bereide lebwei (lit. 64). Van de verkregen gegevens wordt in het volgende gebruik gemaakt.

1. DE TOELAATBAARHEID VAN HET GEBRUIK VAN WEI ALS HULPVLOEISTOF.

Bij de berekeningen werd verondersteld, dat de verdeling van het calcium en phosphaatphosphor over de phasen van de melk tijdens het stremmen niet belangrijk verandert. Men kan zich afvragen in hoeverre deze veronderstelling juist is. Door de inwerking van stremsel wordt het caseinaat-phosphaatcomplex immers omgezet in een paracaseinaatphosphaatcomplex, wat zich in bepaalde opzichten anders gedraagt.

Ook de chemische samenstelling blijft niet ongewijzigd, zodat mogelijkerwijs het gebruik van wei als hulpvloeistof de uitkomsten van de berekeningen zou kunnen beinvloeden.

1.1. De verandering, die de caseine ondergaat tijdens het stremmen.

Caseine is geen enkelvoudig eiwit. Volgens de resultaten verkregen bij recente onderzoekingen bestaat het uit een ingewikkeld complex van phosphoproteinen, waarvan dikwijls drie hoofdcomponenten onderscheiden worden n. l. (α-, β-, en γ-caseine. De α caseine op zijn beurt schijnt weer te bestaan uit minstens twee componenten, wel aangeduid als α_s en κ-caseine. Vooral de laatste zou bij het stremmen aangetast worden en gesplitst in een onoplosbaar gedeelte, de para-κ-caseine en een oplosbaar deel (lit. 96).

Het onoplosbare deel vormt tesamen met andere componenten van de caseine de paracaseine. Wanneer de chemische samenstelling daarvan vergeleken wordt met de caseine is vrijwel geen verschil aantoonbaar.

Het oplosbare deel wordt meestal aangeduid als de "weiproteose". Het is gebleken uit een uitvoerig onderzoek hier in het laboratorium uitgevoerd, dat het ongeveer 4% van de stikstof van de caseine bevat. Tenminste een deel ervan bleek zeer moeilijk in zoutvrije toestand te verkrijgen.

1.2. Het gedrag van het calcium en de phosphaatphosphor van het complex tijdens het stremmen.

De mogelijkheid is dus niet uitgesloten, dat de weiproteose zo beladen met calcium en phosphorzuur in oplossing gaat, als zij van te voren in caseine aanwezig was. Daardoor zal de wei meer calcium

en phosphaatphosphor bevatten dan het oorspronkelijke melkserum. Indien van deze vermeerdering een schatting gemaakt wordt op grond van de van de caseine afgesplitste N-hoeveelheden en onder aanname, dat het afgesplitste deel éénzelfde hoeveelheid calcium en phosphaatphosphor bevat per éénheid N als de caseine, zou de wei maximaal t.o.v. het oorspronkelijke melkserum ongeveer 8% calcium en 4% phosphaatphosphor meer bevatten. Van het calcium in melk komt nl. ± 2/3 voor in het complex, ± 1/3 in het serum, zodat een afsplitsing van 4% uit het complex het gehalte in het serum 8% hoger doet worden. Van de phosphaatphosphor komt ongeveer 50% in het complex en 50% in het serum voor.

Hoewel deze toename niet gering is, zal zij, indien de afsplitsing op de geschetste wijze plaats vindt, niet van veel invloed zijn op de berekeningen, daar stikstof, calcium en phosphorzuur in dezelfde verhouding als zij in het complex voorkomen, afgesplitst worden en dit op de verhoudingen in het overblijvende deel geen invloed uitoefent.

Van meer invloed zou het zijn, indien door de stremming de verhouding, waarin calcium en phosphaatphosphor voorkomen, veranderde.

1.2.1. De samenstelling van wei, vergeleken met die van ultrafiltraat of dialysaat.

Het is moeilijk hier enige controle op uit te oefenen. Ook, indien wei meer calcium of phosphaatphosphor bevat dan b.v. ultrafiltraat of dialysaat uit dezelfde melk, bewijst dit nog niet, dat wei niet gebruikt mag worden. Ultrafiltraat zal altijd minder calcium en phosphaatphosphor bevatten dan het melkserum, daar bij het filtreren ook de "opgeloste" melkeiwitten achter blijven, welke zeer waarschijnlijk eveneens met calcium en phosphaatphosphor verbonden zijn (hoofdstuk III en V).

Bij dialysaat is dit eveneens het geval. Centrifugaat daarentegen bevat wel alle oplosbare stikstofcomponenten, echter tevens afhankelijk van de gebruikte centrifugaal kracht een grotere of kleinere hoeveelheid van het calciumcaseinaatphosphaatcomplex.

De gevolgde methodiek is van invloed op de samenstelling van de verkregen vloeistoffen. Bij dialyse is een verschuiving in het ionen - evenwicht mogelijk, zowel door de optredende verdunning van het melkserum als door de vrij lange duur van het procedé. Ook de temperatuur, waarbij gedialyseerd wordt, kan van invloed zijn. Adsorbtie van ionen aan het dialysemembraam en onvolledige dialyse van calcium en citraat (uitzeefeffect) kunnen optreden.

Bij oudere onderzoekingen werd als ultrafilter veelal een Pasteur-Chamberlandkaars gebruikt. Bij deze werkwijze maakte de lange duur en de meestal lage temperatuur, waarbij gefiltreerd werd, het optreden van verschuivingen in de verdeling van de ionen mogelijk. Moderner is de ultrafiltratietechniek, waarbij het filtraat onder druk door een cellophaan membraam geperst wordt. Daarbij doen zich dezelfde bezwaren gelden als bij dialyseren (adsorbtie ionen. uitzeefeffect).

Het is echter mogelijk gebleken,mits een bepaalde werkwijze en het juiste materiaal gebruikt wordt, dialysaat, wei en centrifugaat uit dezelfde melk te bereiden, welke onderling slechts geringe verschillen vertoonden in de gehaltes van de in het melkserum voorkomende ionen (lit. 18). Dat dit mogelijk is ondanks de geheel verschillende bereidingsmethoden, geeft een sterke aanwijzing, dat de samenstelling van de wei v. w. b. deze ionen weinig van het melkserum af zal wijken.

Pyne (lit. 71) verrichtte proeven, waarbij de samenstelling van wei vergeleken werd met die van dialysaat. Wanneer het laatste als standaard voor vergelijking gebruikt werd, bleek lebwei eveneens een bevredigende hulpvloeistof te zijn, hoewel de hoeveelheid door hem in de wei gevonden phosphaatphosphor aan de lage kant was. In een latere publikatie (lit. 73) merkte hij op, dat de ideale hulpvloeistof voor de bepaling van de phosphaatphosphor nog niet te bereiden is en dat de gelijkheid in het phosphaatgehalte van lebwei en een door hem bereide melk, welke geen colloidaal phosphaatphosphor bevatte, deed vermoeden,dat beide voor het verkrijgen van een nauwkeurige waarde van de opgeloste phosphaatphosphor in melk gebruikt kunnen worden.

Ook Eilers (lit. 21) was van mening,dat wei gebruikt kan worden, hoewel zijn conclusie niet gerechtvaardigd wordt door de door hem verschafte gegevens. Voor de phosphaatphosphor van wei en ultrafiltraat werd bij zijn proeven resp. gevonden 0,030% en 0,036%, voor calcium 0,056% en 0,058%. Het grote verschil in phosphaatphosphor kan moeilijk anders verklaard worden dan door het optreden van verschuivingen in het evenwicht bij de proeven. Er werd bij 2°C door een Pasteur-Chamberland kaars gefiltreerd, echter gestremd bij 40°C.

CONCLUSIE.

Tegen het gebruik zowel van ultrafiltraat als van dialysaat of van wei als hulpvloeistof kunnen bedenkingen gemaakt worden. Hoewel het caseinaatphosphaatcomplex tijdens het stremmen een zekere verandering ondergaat, zal dit niet of slechts in zeer geringe mate tot uiting komen in een toe- of afname van het opgeloste calcium en de opgeloste phosphaatphosphor. Er is dus weinig bezwaar tegen het gebruik van de analyseresultaten van wei bij de berekeningen.

2. DE BEREKENINGEN.

2.1 De gebruikte gegevens: Bij het onderzoek werd gebruik gemaakt van analyse's van melk en wei van individuele koeien, welke tijdens de lactatieperiode zo dikwijls,als mogelijk was, bemonsterd werden.

Veel onderzoekers hebben gemengde melk gebruikt. Dit kan echter tot totaal verkeerde conclusie's aanleiding geven, zoals door een eenvoudige berekening is aan te tonen.

2.2. De berekeningen van het calcium en de phosphaatphosphor per g caseine in het complex aanwezig.

Naar aanleiding van de beschikbare gegevens werd eerst van de melk van een twaalftal koeien het calcium en de phosphaatphosphor berekend per g caseine in het complex aanwezig. De percentages gevonden in de wei werden omgerekend in de overeénkomende percentages van het melkserum door die van de wei te vermenigvuldigen met een door Ling aangegeven correctiefactor. (lit. 60).

$$\frac{100 - (\text{vet \% melk} + \text{totaal stikstof \%} \times 6,38 - 0,4)}{100}$$

Voorbeeld.

In melk aanwezig 3,99% vet, 0,441% caseine N en 0,665 totaal N. De correctiefactor voor de wei wordt dan 0,9218 en de hoeveelheid calcium en phosphaatphosphor per g caseine.

		melk /100 g	wei /100 g	wei gecorr.	totaal in complex van 100 g melk	per g caseine
Ca	mmol	2,82	0,92	0,85	1,97	0,70
p	"	1,55	0,74	0,68	0,87	0,31

De uitkomsten van de berekeningen werden grafisch uitgezet. In grafiek 1 is voor één koe de variatie ervan tijdens een lactatie weergegeven. Ook van de hoeveelheid magnesium en citroenzuur per g caseine, het caseinepercentage en de totale hoeveelheid colloidaal calcium en phosphaatphosphor per 100 g melk is de variatie weergegeven. (grafiek 1).

De grafieken lieten zien, dat

a. hoewel de totale hoeveelheid colloidaal calcium per 100 g melk toenam gedurende de lactatie, deze hoeveelheid berekend per g caseine afnam. Aan het einde van de lactatie steeg de hoeveelheid per g caseine bij sommige koeien wel, bij andere niet.

b. voor de colloidale phosphaatphosphor hetzelfde gold als voor het calcium.

c. er een nauw verband bestond tussen het colloidale calcium en de phosphaatphosphor.

d. voor het colloidale calcium en de phosphaatphosphor de variatie in de hoeveelheid per g caseine tamelijk groot was.

e. deze hoeveelheden voor de verschillende koeien niet helemaal gelijk waren. In de grafieken lag het niveau voor de ene koe iets hoger dan voor de andere.

f. in het complex altijd magnesium aanwezig was (± 0,05 mmol/g caseine) en zeer waarschijnlijk ook altijd citroenzuur. Het voorkomen van natrium en kalium zal later (zie hoofdstuk IV en V) aangetoond worden.

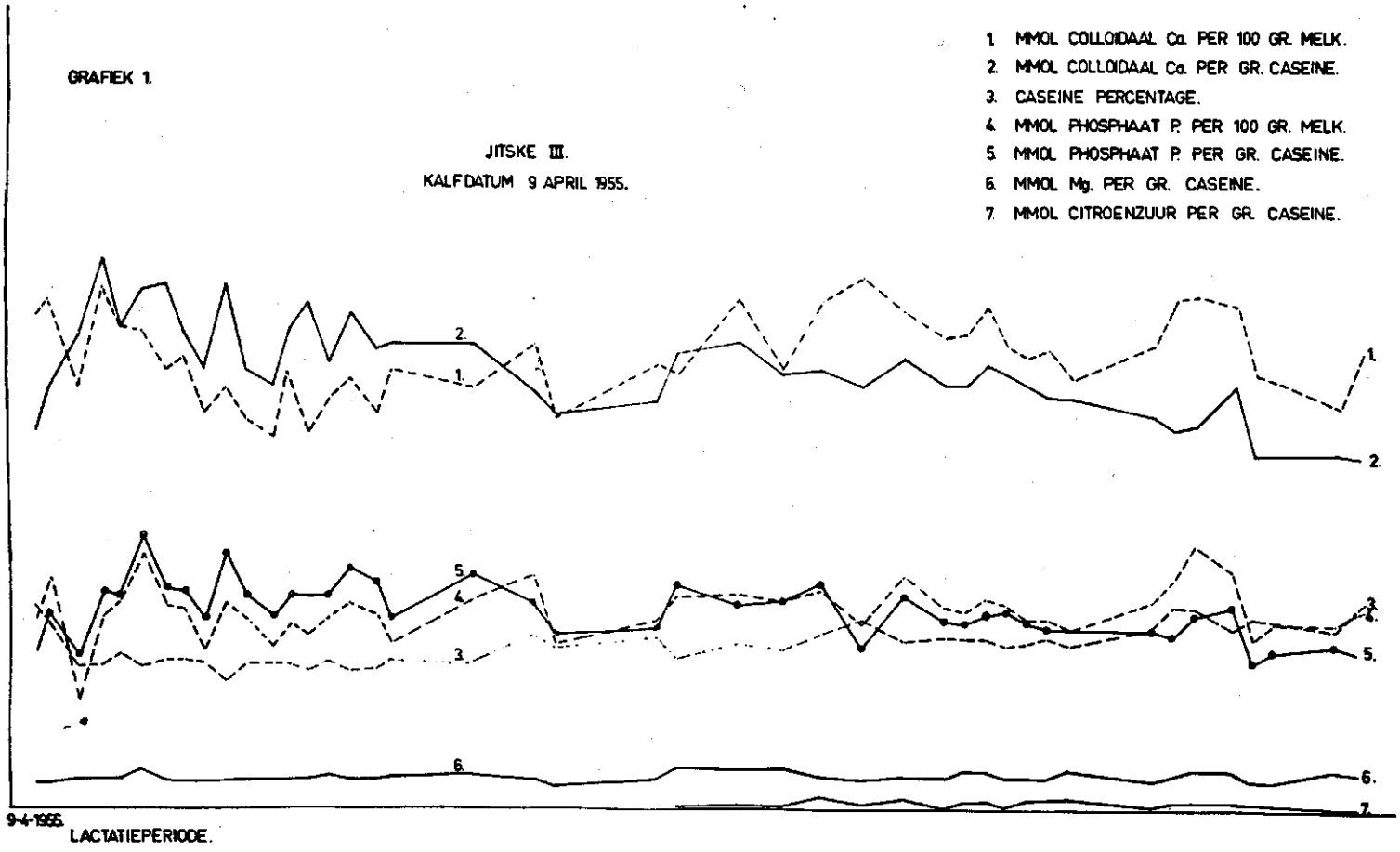
2.2.1. Berekeningen, waarbij de hoeveelheid caseinecalcium per g caseine verondersteld wordt constant te zijn.

Voor de hoeveelheid caseinecalcium per g caseine worden in de literatuur de volgende waarden opgegeven.

GRAFIEK 1.

JITSKE III.

KALFDATUM 9 APRIL 1955.



Lehman	: 10,4	mg/g	caseine	(lit. 59)
Söldner	: 11,0	"	"	(lit. 92)
Palmer en Richardson	: 10,5	"	"	(lit. 66)
Richmond	: 10,1	"	"	(lit. 70)
Ling	: 10,0	"	"	(lit. 60)
De Kadt	: 10,5	"	"	(lit. 54)
Evenhuis en de Vries	: 10,0	"	"	(lit. 27)
White en Davies	: 12,0	"	"	(lit. 99)
Ramsdell en Whittier	: 10,2-11,8	"	"	(lit. 76)

De gemiddelde waarde ervan is ongeveer aequivalent met de caseinephosphor (0,85 van de caseine, waarde vermeld in de literatuur en door ons gevonden, hoofdstuk IV).

Naar aanleiding van deze gegevens werd bij de volgende berekeningen verondersteld, dat de caseine in het complex 0,27 mmol calcium bindt (0,27 mmol ∾ 0,85% caseinephosphor.) Wij willen er echter nogmaals op wijzen, dat de overeenstemming van deze gemiddelde waarde met de hoeveelheid, die door de caseinephosphor gebonden zou kunnen worden, geen enkel bewijs levert, dat het caseinecalcium ook inderdaad altijd met de caseinephosphor aequivalent is (zie hoofdstuk IV).

2.2.1.1. De berekende verhouding phosphaatcalcium-phosphaatphosphor.

De verhouding phosphaatcalcium/phosphaatphosphor was nu te berekenen.

Voorbeeld.

totaal calcium per g caseine mmol	caseine calcium per g caseine mmol	phosphaatcalcium per g caseine mmol	phosphaat phosphor per g caseine mmol	verhouding mmol Ca/mmol P
0,70	0,27	0,43	0,31	1,39

De voor de twaalf koeien berekende waarden zijn weergegeven in tabel I.

De volgende conclusie's worden duidelijk gedemonstreerd door grafiek 2. Hierin zijn voor twee van de twaalf koeien de berekende waarden uitgezet tegen het tijdstip, waarop het monster tijdens de lactatieperiode werd genomen.

a: De molaire verhouding phosphaatcalcium / phosphaatphosphor vertoonde enige variatie.

b: Afgezien van deze variatie leek de verhouding bij melk van éénzelfde koe gemiddeld gelijk te blijven gedurende de lactatie.

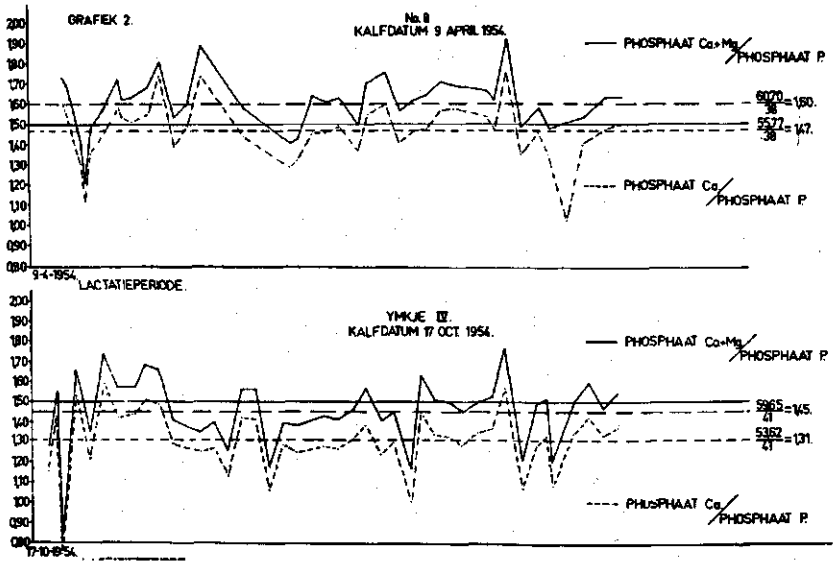
c: De verhouding verschilde van de melk van diverse koeien weinig, maar toch kwamen individuele verschillen voor (zie verder).

In de grafiek is ook de verhouding phosphaatcalcium + magnesium/ phosphaatphosphor uitgezet (zie verder).

TABEL 1

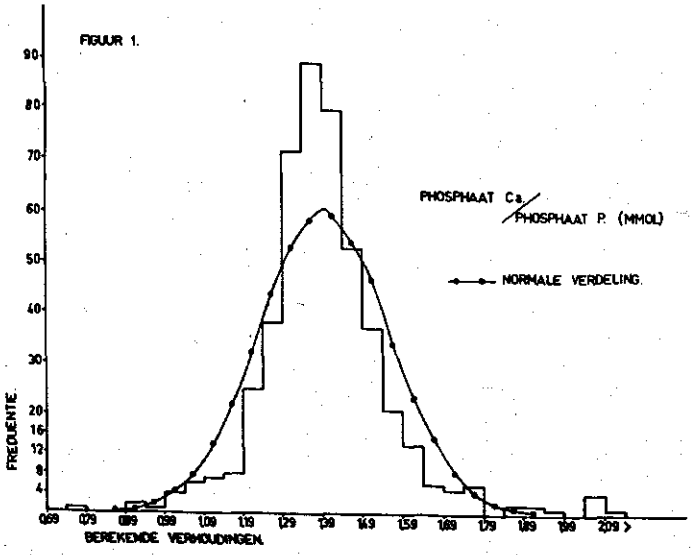
VERHOUDING PHOSPHAATCALCIUM/PHOSPHAATPHOSPHOR GEDURENDE DE LACTATIEPERIODE BIJ VERSCHILLENDE KOEIEN.

Sneeuwwitje	Marie V	Jonge Jitske II	Marie IV	No 8	Irma II	Ymkje IV	Augusta II	Jitske III	Augusta I	Tweeling 27	Jonge Marie II
1,47	1,28	1,37	1,29	1,60	1,34	1,16	1,23	1,40	1,54	1,42	1,49
1,52	1,33	1,22	1,50	1,55	1,77	1,43	1,45	1,33	1,34	1,36	1,43
1,41	1,54	1,29	1,54	1,30	1,17	0,74	1,37	2,07	1,38	1,30	1,56
1,25	1,40	1,43	1,28	1,12	1,38	1,53	1,46	1,78	1,47	1,36	1,20
1,28	1,51	1,29	1,32	1,36	1,31	1,22	1,38	1,51	1,43	1,32	1,57
1,39	1,42	1,34	1,22	1,46	0,93	1,59	1,73	1,32	1,00	1,27	1,44
1,49	1,46	1,40	1,26	1,58	1,26	1,42	1,49	1,39	1,96	1,36	1,41
1,35	1,42	1,37	1,34	1,53	1,21	1,44	1,36	1,46	1,72	1,38	1,56
1,38	1,47	1,33	1,32	1,51	1,30	1,51	1,40	1,49	1,32	1,44	1,46
1,19	1,42	1,40	1,36	1,55	1,25	1,49	1,42	1,42	1,59	1,62	1,50
1,63	1,49	1,34	1,25	1,75	1,28	1,29	1,35	1,31	1,52	1,39	1,78
1,34	1,30	1,30	1,23	1,39	1,24	1,25	1,34	1,38	1,50	1,29	1,28
1,52	1,18	1,38	2,05	1,49	1,29	1,27	1,46	1,52	1,36	1,20	1,61
1,39	1,42	1,37	1,24	1,74	1,20	1,13	1,36	1,36	1,41	1,35	1,16
1,35	1,49	1,34	1,34	1,44	1,32	1,42	1,53	1,35	1,43	1,43	1,66
1,38	1,36	1,51	1,35	1,29	1,21	1,41	1,39	1,20	1,51	-	1,45
1,15	1,39	1,41	1,41	1,33	1,38	1,06	1,53	1,33	1,46	-	1,72
1,24	1,42	1,84	1,37	1,46	1,20	1,29	1,29	1,61	1,37	-	1,41
1,23	1,68	1,30	1,55	1,46	-	1,25	1,42	1,32	1,49	-	1,42
1,62	1,43	2,07	0,92	1,49	-	1,28	1,11	1,26	1,32	-	1,30
1,50	1,09	1,48	-	1,37	-	1,27	1,46	1,35	1,28	-	1,44
1,13	1,41	1,91	-	1,55	-	1,32	1,39	1,38	1,21	-	1,36
1,40	1,38	-	-	1,60	-	1,39	1,56	1,33	1,36	-	1,24
1,22	1,37	-	-	1,41	-	1,24	1,41	1,51	1,05	-	1,19
1,30	1,33	-	-	1,47	-	1,30	1,40	1,33	1,35	-	1,20
1,24	1,22	-	-	1,48	-	1,00	1,36	1,44	1,48	-	1,19
1,93	1,30	-	-	1,57	-	1,45	1,48	1,65	1,26	-	1,47
1,32	1,43	-	-	1,58	-	1,34	1,45	1,36	1,41	-	1,48
1,25	1,29	-	-	1,54	-	1,33	-	1,40	1,30	-	1,51
0,96	1,62	-	-	1,48	-	1,29	1,12	1,44	1,35	-	1,41
1,72	1,52	-	-	1,76	-	1,35	1,40	1,40	1,36	-	1,43
1,35	1,27	-	-	1,35	-	1,37	1,43	1,39	1,31	-	1,58
1,27	1,08	-	-	1,46	-	1,57	1,40	1,43	1,33	-	1,43
1,42	1,39	-	-	1,35	-	1,07	1,27	1,41	1,23	-	1,31
1,41	1,47	-	-	1,03	-	1,28	1,07	1,40	1,41	-	1,57
1,23	1,47	-	-	1,40	-	1,33	1,69	1,29	1,47	-	1,37
1,09	1,48	-	-	1,47	-	1,08	1,37	1,26	1,31	-	1,43
1,27	1,69	-	-	1,50	-	1,34	1,29	1,15	1,43	-	1,44
1,03	1,47	-	-	-	-	1,42	1,38	1,31	1,66	-	1,34
1,36	1,46	-	-	-	-	1,33	1,37	1,32	1,45	-	1,44
1,33	1,26	-	-	-	-	1,37	1,45	1,23	1,88	-	1,50
1,33	1,15	-	-	-	-	-	1,40	1,17	1,61	-	1,41
1,25	1,39	-	-	-	-	-	1,34	1,23	1,58	-	1,55
1,40	1,31	-	-	-	-	-	1,33	-	1,56	-	1,44
1,59	1,47	-	-	-	-	-	1,46	-	1,43	-	1,46
1,38	1,36	-	-	-	-	-	1,41	-	1,43	-	1,43
1,34	1,51	-	-	-	-	-	1,27	-	1,33	-	1,36
1,34	1,43	-	-	-	-	-	1,29	-	1,33	-	1,44
1,30	-	-	-	-	-	-	1,36	-	1,36	-	1,51
1,38	-	-	-	-	-	-	1,28	-	1,34	-	1,40
1,33	-	-	-	-	-	-	1,31	-	1,37	-	1,31
1,24	-	-	-	-	-	-	2,05	-	1,36	-	1,29
1,24	-	-	-	-	-	-	1,62	-	1,44	-	1,67
1,35	-	-	-	-	-	-	1,33	-	1,63	-	1,39
1,36	-	-	-	-	-	-	1,48	-	-	-	1,34
1,33	-	-	-	-	-	-	1,36	-	-	-	1,35
1,53	-	-	-	-	-	-	1,38	-	-	-	1,31
1,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,37
1,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,36
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,47
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,35
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,34
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,42
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,33
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,44
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,42
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,39
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,40
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,33



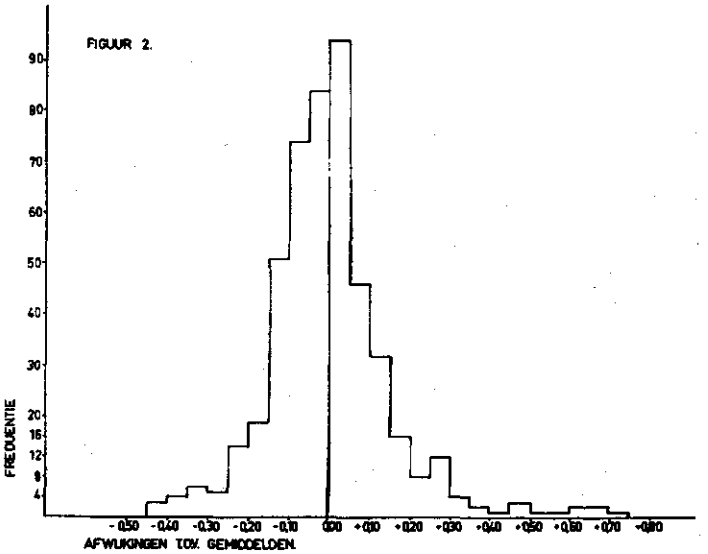
2.2.1.1.1. De frequentieverdeling voor de berekende waarde.

Indien van 483 berekende waarden de frequentie uitgezet werd, waarmee een bepaalde verhouding voorkwam, bleek een verdeling op te treden (figuur 1), welke van een normale toevalsverdeling afweek (X^2 toets, $p \ll 0,001$).



Hetzelfde was het geval met de frequentieverdeling verkregen,

wanneer men de rekenkundige gemiddelden van alle koeien liet samenvallen en de afwijkingen van de afzonderlijke waarden t.o.v. deze gemiddelden ter weerszijden uitzette.



2.2.1.1.2. De invloed van de bepalingsfouten op de gevonden variatie in de berekende waarden.

De gevonden variatie zou veroorzaakt kunnen zijn door de toevallige bepalingsfouten. Teneinde dit te controleren werd nagegaan hoe groot de standaardafwijking in het berekende quotient was louter tengevolge van de spreiding optredende bij de bepaling van de oorspronkelijke grootheden.

Als formule voor het quotient laat zich berekenen:

$$Ca/P = Q = \frac{31}{40.1} \times \frac{(a-b)-0,011 \times 6,37(e-f)}{(c-d)}$$

Hierin stellen a, b, c, d, e en f resp. voor:

a. : g calcium per 100 g melk
b. : g calcium in wei uit 100 g melk
c. : g anorganisch phosphor per 100 g melk
d. : g anorganisch phosphor in wei uit 100 g melk
e. : g totaal N per 100 g melk
f. : g niet caseine N per 100 g melk

De spreiding, die op zou kunnen treden in de correctiefactor van de wei, werd verwaarloosd.

*De standaardafwijkingen van a, b, c. etc. werden geschat door van 75 duplo verschillen, die volgens toeval uit het totale cijfermateriaal getrokken waren, het gemiddelde te berekenen en dit gemiddelde verschil vervolgens te vermenigvuldigen met 0,89 (0,89 x

* De wiskundige verwerking werd verzorgd door de afdeling: BEWERKING WAARNEMINGS UITKOMSTEN T.N.O. onderafdeling Wageningen.

het verschil geldt voor de schatting van deze afwijking bij reeksen van twee waarnemingen).

Aangenomen werd daarbij, dat σ_a evenredig toenam met a, σ_b met b etc. Er werd dus gewerkt met de variatiecoefficienten Ca, Cb, Cc etc. De geschatte waarden hiervoor waren dan resp.:

Ca = 0,4% Cd = 0,5%
Cb = 0,8% Ce = 1,0%
Cc = 0,5% Cf = 1,0%

Daar de spreiding van het gemiddelde van belang was en gezien bij de berekening voor de waarden van a, b, c etc. gemiddelden van duplowaarden werden gebruikt moesten de waarden voor Ca, Cb, Cc etc. nog door $\sqrt{2}$ gedeeld worden. Verder werd aangenomen, dat de afwijkingen van a, b, c, etc. onderling niet gecorreleerd waren. Uit de gegeven formule van Q en uit de waarden Ca, Cb, Cc etc. is nu voor C_Q de volgende benaderingsformule te berekenen.

$$C_Q^2 \simeq \frac{0,29^2a^2 + 0,57^2b^2 + 0,07^2 \times 0,71^2 (e^2 + f^2)}{\{(a-b) - 0,07 (e-f)\}^2} + \frac{0,36^2(c^2 + d^2)}{(c - d)^2}.$$

Bij de berekeningen werden voor a, b, c etc. niet de hoeveelheden genomen, gevonden bij elk monster melk afzonderlijk, maar de rekenkundig gemiddelde waarden in g per 100 g melk van de tijdens de lactatieperioden gevonden hoeveelheden. Deze gemiddelde waarden zijn weergegeven in de tabel II.

TABEL II

IN GRAMMEN

Naam koe	a	b	c	d	e	f
Marie IV	0,108	0,036	0,060	0,034	0,504	0,094
Jonge Jitske II	0,130	0,039	0,064	0,021	0,554	0,125
Augusta I	0,125	0,038	0,065	0,028	0,565	0,110
Marie V	0,117	0,036	0,064	0,034	0,517	0,101
Augusta II	0,123	0,036	0,059	0,029	0,569	0,138
No 8	0,125	0,042	0,059	0,032	0,461	0,103
Sneeuwwitje IV	0,124	0,038	0,070	0,039	0,609	0,124
Ymkje IV	0,107	0,031	0,066	0,037	0,506	0,098
Jitske III	0,116	0,034	0,059	0,029	0,582	0,153
Jonge Marie II	0,127	0,037	0,063	0,032	0,592	0,124
Tweeling XXVII	0,113	0,040	0,059	0,033	0,489	0,104
Irma II	0,115	0,036	0,061	0,033	0,580	0,116

Met de verkregen waarden werd voor de verschillende koeien de C_Q berekend.
Gezien: 1e alle veronderstellingen,
2e het feit, dat, daar in de formule van Q ook variabelen in de noemer staan, voor C_Q alleen een benaderingsformule kan worden afgeleid.
3e in plaats van de variabelen een gemiddelde waarde genomen is en C_Q eigenlijk alleen geldt voor de toevalligge fout van de gemiddelde Q,
geeft de uitkomst C_Q dus meer een aanwijzing voor de orde van grootte van de variatiecoefficient.

Het bleek, dat de C_Q van de verschillende koeien niet significant verschillend was. (tabel III)

Voor elke koe werd de standaardafwijking van Q berekend, welke werd vergeleken met de variatiecoefficient veroorzaakt door de toevallige bepalingsfouten (C_Q).

Beide werden uitgedrukt in percentages van het gemiddelde ($\bar{Q}$). Bij de berekeningen werden enkele zeer extreme waarden uit de tabellen van enkele koeien weggelaten (getoetst welke). Dit had een gering verschil in de standaardafwijking bij die koeien tengevolge.

TABEL III

RESULTATEN

Koe	Werkelijk gevonden standaard afwijking in % van $\bar{Q}$	Variatiecoefficient veroorzaakt door toevallige analyse fouten, in % van $\bar{Q}$.
Sneeuwwitje	9,0	1,4
Marie V	9,4	1,3
Jonge Jitske II	5,1	1,0
Marie IV	7,4	1,4
No 8	10,0	1,2
Irma II	5,0	1,4
Ymkje IV	12,4	1,3
Augusta II	10,5	1,2
Jitske III	8,9	1,2
Augusta I	11,5	1,2
Tweeling 27	7,0	1,4
Jonge Marie II	8,6	1,2

Het verschil in de berekende calciumphosphaat verhoudingen voor de afzonderlijke melkmonsters genomen gedurende de lactatieperiode van éénzelfde koe zal dus slechts voor een zeer gering gedeelte veroorzaakt worden door de toevallige bepalingsfouten. De samenstelling van het phosphaat in deze monsters zal dus niet gelijk geweest zijn, aangenomen dat de veronderstelling (0,27 mmol caseinecalcium/g caseine) juist was.

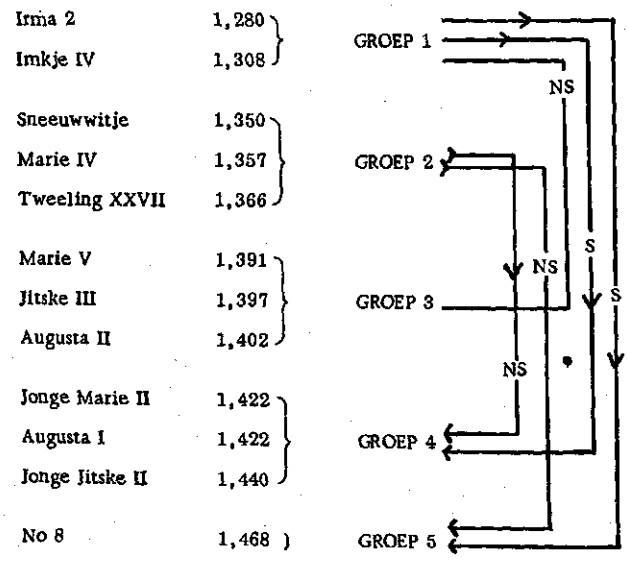
2.2.1.1.3. Het verschil in phosphaatsamenstelling tussen de koeien onderling.

Op bladzijde 42 onder c werd geconcludeerd, dat de verhoudingen voor de verschillende koeien niet op een volkomen gelijk niveau lagen. Teneinde na te gaan of er een reëel verschil bestond tussen de koeien werd over de berekende verhoudingen van alle koeien een variantieanalyse uitgevoerd (F toets).

Daar de "spreiding binnen koeien" niet voor alle koeien gelijk was en ook significant verschillend zou kunnen zijn, was strikt genomen een variantieanalyse niet geoorloofd. Uit de analyse bleek evenwel dat de "spreiding tussen koeien" sterk significant groter was dan op grond van de "spreiding binnen koeien" kon worden verwacht. Gezien de zeer geringe overschrijdingskans ($p < 0,001$) kon dan ook zonder voorbehoud het verschil reëel geacht worden.

Om na te gaan of het verschil mogelijk te wijten was aan slechts één of enkele afwijkende waarden, werd een nadere specificatie verkregen door volgens de methode Scheffé (lit. 82) de contrasten in de variantieanalyse te beoordelen. Het principe van de "yardstick analyse" volgens Scheffé berust op het volgende: Ter bepaling van de realiteit (significantie) van elk tweetal te vergelijken gemiddelden wordt het verschil tussen beide gemiddelden bepaald en een hiervoor geldend 95% betrouwbaarheidsinterval berekend. Indien dit betrouwbaarheidsinterval de waarde nul niet bevat, dan volgt, dat het betreffende verschil tussen de gemiddelden significant is.

De twaalf koeien werden gegroepeerd naar oplopende waarden van de gemiddelden ($\bar{Q}$). Er werden vijf groepen verkregen. Nagegaan werd of de verschillen tussen deze groepen significant waren.



De verschillen tussen groep 1 en groep 4 en tussen groep 1 en groep 5 bleken significant, alle andere verschillen niet.

Gezien de significantie van deze verschillen, was de samenstelling van het phosphaat van de melk voor de koeien uit groep 1 niet dezelfde als die voor de koeien uit groep 4 en 5. Het is dus mogelijk, dat in principe de samenstelling van het phosphaat voor de melk van verschillende koeien varieert, althans als de hoeveelheid caseinecalcium per g caseine constant is, zoals bij de aanvang van de berekeningen werd verondersteld.

2.2.1.2. De invloed van het in het complex aanwezige magnesium op de uitkomsten van de berekeningen.

Bij de voorgaande berekeningen werd de aanwezigheid van magnesium in het complex verwaarloosd. Bij de nu volgende is het wel daarin opgenomen. Eenvoudigheidshalve werd verondersteld, dat het zich ten opzichte van caseine en phosphorzuur gelijk gedraagt als calcium.

Voorbeeld.

In een vorig voorbeeld werd per g caseine berekend 0,70 mmol Ca en 0,31 mmol phosphaatphosphor. Voor dezelfde melk daar gebruikt werd nu het magnesium berekend.

Cas %	mmol Mg per 100 g melk	mmol Mg per 100 g wei	mmol Mg wei gecorr.	mmol Mg per g caseine	mmol Ca + Mg per g caseine
2,81	0,54	0,37	0,34	0,07	0,77

Caseine Ca + Mg	phosphaat Ca + Mg	Ca + Mg/P in het phosphaat
0,27	0,50	1,61

Voor calcium alleen werd gevonden 1,39 (zie bladz.42).

De voor de melk van de twaalf koeien berekende waarde van de verhouding phosphaat Ca + Mg/phosphaat P is voor een tweetal koeien weergegeven in grafiek 2 (zie bladz.44).

De ten opzichte van calcium geringe hoeveelheid magnesium bleek een grote invloed te hebben. De variatie in de verhouding tussen de verschillende monsters melk van éénzelfde koe was even groot als wanneer het magnesium niet meeberekend werd. Het verschil in samenstelling van het phosphaat bleef dan ook bestaan voor de afzonderlijke monsters.

In tabel IV zijn voor alle koeien de gemiddelde verhoudingen ($\bar{Q}$) weergegeven, zowel voor die van phosphaat Ca/phosphaat P als voor die van phosphaat Ca + Mg/phosphaat P.

Het verschil tussen de gemiddelden ($\bar{Q}$) van de verschillende koeien, waargenomen voor de verhouding phosphaat Ca/phosphaat P bleek alhoewel in verminderde mate eveneens te bestaan voor de verhouding phosphaat Ca + Mg/phosphaat P.

De conclusie, dat het phosphaat bij de verschillende koeien mogelijk niet dezelfde samenstelling had, bleef dus eveneens gehandhaafd.

TABEL IV

Koe	Ca/P	N	Ca+Mg/P	N	Ca+Mg/P - Ca/P
Marie IV	1,36	20	1,52	20	+ 0,16
Jonge Jitske II	1,44	22	1,59	22	+ 0,15
Augusta I	1,42	54	1,56	53	+ 0,14
Marie V	1,39	48	1,54	47	+ 0,15
Augusta II	1,42	57	1,58	57	+ 0,16
No 8	1,47	38	1,60	38	+ 0,13
Sneeuwwitje IV	1,35	59	1,50	59	+ 0,15
Ymkje IV	1,31	41	1,46	41	+ 0,15
Jitske III	1,40	43	1,56	42	+ 0,16
Jonge Marie II	1,42	70	1,57	69	+ 0,15
Tweeling 27	1,37	15	1,50	15	+ 0,13
Irma II	1,28	18	1,46	18	+ 0,18

2.2.1.3. De invloed van het in het complex voorkomende citroenzuur op de uitkomsten van de berekeningen.

Door andere onderzoekers was reeds gevonden (lit. 54, 95, 99), dat in het complex ook citroenzuur voorkomt. Uit de door ons gebruikte gegevens (lit. 64) was dit eveneens af te leiden.

Het citroenzuur moet in de berekeningen opgenomen worden, daar het evenals magnesium een invloed zou kunnen hebben op de berekende verhoudingen. Het is ons inziens onjuist om te stellen (De Kadt en van Minnen), dat de hoeveelheid magnesium aequivalent is met die van citroenzuur en daarom beide uit de berekeningen weg te laten, daar het magnesium meestal in grotere hoeveelheden aanwezig bleek te zijn (zie grafiek 1).

Voorbeeld.

Berekend was reeds, dat in het complex (zie bladz.) 0,50 mmol phosphaat Ca + Mg en 0,31 mmol phosphaatphosphor voorkwamen.

	mmol per 100 g melk	mmol per 100 g wei	mmol wei gecorr.	mmol per g caseïne
Citroenzuur	0,698	0,693	0,639	0,02

Werd het citroenzuur in rekening gebracht dan werd de verhouding Ca + Mg/P + citroenzuur = 1,52.
Resp. werd dus gevonden Ca/P = 1,39
Ca+Mg/P = 1,62
Ca + Mg/P + citroenzuur = 1,52.

Het citroenzuur zou voor kunnen komen, als het tertiaire calciumzout. Bij potentiometrisch titreren van citroenzuur met calciumhydroxyde wordt de derde zuurgroep reeds bij pH 6,00 geneutraliseerd (lit. 21).

Wiley (lit. 100) vond, dat bij concentratie's, zoals deze optreden in melk, waterige oplossingen van calciumcitraat bij pH 6-7 oververzadigd waren. Na een week precipiteerde tertair calciumcitraat. Indien het citraat als het tertiaire zout in rekening gebracht werd, bleef de berekende verhouding hetzelfde.

$$\frac{\text{Colloidaal Ca+Mg - caseine Ca+Mg - citraat Ca+Mg}}{\text{phosphaatphosphor}} = \frac{0{,}77-0{,}27-0{,}03}{0{,}31} = 1{,}52$$

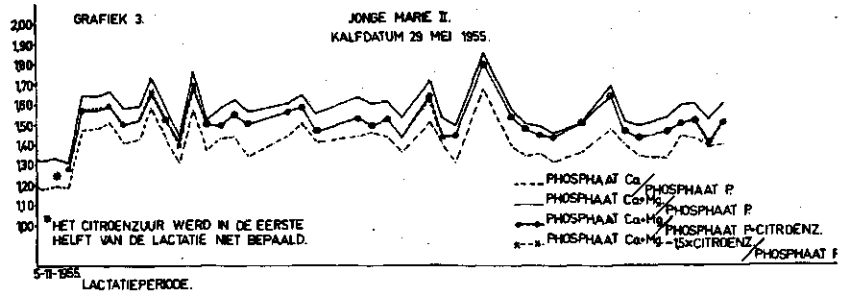
In tabel V zijn voor een viertal koeien de verhoudingen aangegeven voor het phosphaat resp. als:

Ca/P, Ca + Mg/P, Ca + Mg/P + citroenzuur.

TABEL V

Jitske III			Jonge Marie II			Irma 2			Tweeling 27		
Ca/P	Ca+Mg/P	Ca+Mg/P+citr.	Ca/P	Ca+Mg/P	Ca+Mg/P+citr.	Ca/P	Ca+Mg/P	Ca+Mg/P+citr.	Ca/P	Ca+Mg/P	Ca+Mg/P+citr.
1,33	1,51	1,50	1,19	1,31	1,28	1,34	1,47	-	1,42	1,52	1,45
1,51	1,70	1,65	1,47	1,64	1,57	1,77	2,02	1,95	1,36	1,44	1,44
1,33	1,53	1,51	1,48	1,64	1,57	1,17	1,35	1,33	1,30	1,41	1,32
1,44	1,59	1,51	1,51	1,66	1,59	1,38	1,52	-	1,36	1,49	1,49
1,65	1,82	1,78	1,41	1,58	1,50	1,31	1,51	1,46	1,32	1,49	1,42
1,36	1,51	1,44	1,43	1,59	1,52	0,93	1,08	-	1,27	1,40	1,40
1,40	1,56	1,56	1,31	1,44	1,41	1,26	1,47	1,41	1,36	1,49	1,49
1,44	1,64	1,58	1,57	1,76	1,68	1,21	1,37	-	1,38	1,50	1,39
1,47	1,66	1,60	1,37	1,52	1,50	1,30	1,47	1,45	1,44	1,58	1,58
1,39	1,55	1,54	1,43	1,58	1,49	1,25	1,52	-	1,62	1,81	1,78
1,43	1,59	1,52	1,44	1,62	1,55	1,28	1,43	1,41	1,39	1,58	1,51
1,41	1,58	-	1,34	1,56	1,50	1,24	1,43	-	1,29	1,43	1,36
1,40	1,62	1,52	1,44	1,58	-	1,29	1,50	-	1,20	1,34	1,31
1,29	1,45	1,42	1,44	1,60	1,56	1,20	1,41	-	1,35	1,49	1,44
1,26	1,45	-	1,50	1,64	1,59	1,32	1,49	1,46	1,43	1,58	1,44
1,15	1,35	1,31	1,41	1,55	1,46	1,21	1,35	-	-	-	-
1,31	1,50	1,44	1,55	1,72	-	1,38	1,51	1,43	-	-	-
1,32	1,51	-	1,44	1,63	1,53	1,20	1,35	-	-	-	-
1,23	1,40	-	1,46	1,60	1,49	-	-	-	-	-	-
1,17	1,40	-	1,43	1,61	1,52	-	-	-	-	-	-
1,23	1,45	1,43	1,36	1,53	1,43	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,44	1,58	-	-	-	—	-	-	-
-	-	-	1,51	1,71	1,63	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,40	1,53	1,44	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,31	1,49	1,44	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,29	1,46	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,67	1,84	1,79	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,39	1,57	1,53	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,34	1,50	1,47	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,35	1,49	1,44	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,31	1,45	1,43	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,37	1,51	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,36	1,50	1,50	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,47	1,68	1,64	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,35	1,51	1,46	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,34	1,49	1,43	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,52	1,72	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,33	1,53	1,46	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,44	1,59	1,50	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,43	1,60	1,52	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,39	1,52	1,41	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,40	1,60	1,50	-	-	-	-	-	-
-	-	-	1,33	1,53	-	-	-	-	-	-	-

Van één koe zijn de gegevens tevens graphisch weergegeven. (grafiek 3).



De invloed, zowel van magnesium als van citroenzuur op de gevonden waarden was duidelijk. Het verschil tussen de gevonden verhoudingen van de monsters melk van éénzelfde koe bleef bestaan. Het verschil tussen de gemiddelde waarden van de individuele koeien leek door de opname van het citroenzuur kleiner te worden.

2.2.2. Berekeningen, waarbij de samenstelling van het phosphaat constant verondersteld werd.

Indien uitgegaan werd van een phosphaat met een constante samenstelling en voor magnesium verondersteld werd, dat het zich als calcium gedroeg en voor citroenzuur, dat het aanwezig was als tertiair citraat, kon de hoeveelheid caseinecalcium + magnesium berekend worden.

Voorbeeld.

Verondersteld werd een phosphaat met een verhouding Ca + Mg/P = 1,50.

mmol Ca /g caseine	mmol Mg /g caseine	mmol P /g caseine	mmol citroenzuur /g caseine	mmol Ca+Mg /g caseine
0,70	0,07	0,31	0,02	0,770

mmol Ca+Mg in citraat	mmol Ca+Mg in phosphaat	mmol caseine Ca + Mg
0,03	0,465	0,275

Indien i.p.v. 1,50 resp. 1,60 en 1,40 genomen was, (1,60 Evenhuis en de Vries, 1,41 als 12% diphosphaat aanwezig is, Pyne en Ryan) zou 0,24 mmol en 0,31 mmol caseine-calcium + magnesium gevonden zijn.

Wanneer voor het twaalftal koeien het caseinecalcium en het caseinecalcium + magnesium berekend werden resp. met in het phosphaat een verhouding Ca/P = 1,50 en Ca + Mg/P = 1,50, werd, zoals te verwachten was, een variatie gevonden tussen de monsters melk van éénzelfde koe. Wanneer magnesium in de berekening opgenomen werd, was de gevonden waarde hoger.

TABEL VI

Koe	caseinecalcium gemiddeld ($\bar{x}$)	(n)	caseinecalcium + magnesium gemiddeld ($\bar{x}$)	(n)
Augusta II	0,23	(57)	0,29	(57)
Jonge Jitske II	0,24	(22)	0,30	(22)
No 8	0,25	(38)	0,30	(38)
Ymkje IV	0,20	(41)	0,25	(41)
Augusta I	0,24	(53)	0,29	(53)
Jonge Marie II	0,24	(53)	0,30	(69)
Sneeuwwitje IV	0,22	(59)	0,27	(59)
Tweeling 27	0,22	(15)	0,27	(15)
Marie IV	0,22	(20)	0,27	(20)
Marie V	0,23	(47)	0,28	(47)
Jitske III	0,24	(42)	0,29	(42)
Irma II	0,20	(18)	0,25	(18)

Werd ook het citroenzuur in de berekeningen opgenomen en hetzelfde analyse materiaal gebruikt als voor tabel V, dan bleek voor het caseinecalcium + magnesium bij een verhouding Ca + Mg/P in het phosphaat resp. 1,40; 1,50 en 1,60 ook nu weer de variatie te blijven bestaan tussen de monsters melk van eenzelfde koe (tabel VII), bladz. 54

Het gemiddelde ($\bar{x}$) was voor de resp. koeien:

TABEL VIII

Koe	Ca + Mg/P =1,40	Ca + Mg/P = 1,50	Ca + Mg/P = 1,60
Jitske	0,308	0,275	0,242
Irma II	0,293	0,262	0,231
Jonge Marie II	0,312	0,273	0,236
Tweeling 27	0,287	0,252	0,217

Wanneer alleen calcium in de berekening betrokken werd en voor het phosphaat de verhouding 1,50 gekozen, dan werd voor het caseinecalcium (gemiddelde tabel VI) minder dan 0,27 mmol/g caseine gevonden. Werden ook magnesium en citroenzuur erin opgenomen, dan stemde bij de verhouding Ca + Mg/P = 1,50 de gemiddelde hoeveelheid caseinecalcium + magnesium daarmee overeén (tabel VIII).

Dit bewijst echter niet, dat de verhouding inderdaad 1,50 is en ook niet, dat de veronderstelde aanwezigheid van 0,27 mmol caseinecalcium + magnesium juist is. De gevonden variatie tussen de ver-

TABEL VII

Caseine Ca + Mg/g.cas.

in phosphaat Ca+Mg/P=1,40				in phosphaat Ca+Mg/P=1,50				in phosphaat Ca+Mg/P=1,60			
Jitske III	Jonge Marie II	Tweeling 27	Irma 2	Jitske III	Jonge Marie II	Tweeling 27	Irma 2	Jitske III	Jonge Marie II	Tweeling 27	Irma 2
0,307	0,217	0,290	-	0,270	0,175	0,249	-	0,232	0,143	0,207	-
0,358	0,341	0,295	0,404	0,323	0,299	0,255	0,381	0,288	0,257	0,215	0,357
0,310	0,351	0,239	0,254	0,275	0,305	0,205	0,210	0,239	0,259	0,170	0,176
0,305	0,349	0,300	0,298	0,272	0,308	0,266	0,273	0,239	0,266	0,232	0,247
0,375	0,315	0,275	0,286	0,348	0,268	0,241	0,260	0,320	0,221	0,206	0,233
0,285	0,320	0,267	-	0,248	0,278	0,232	-	0,212	0,235	0,197	-
0,321	0,368	0,297	0,270	0,289	0,330	0,265	0,237	0,256	0,292	0,233	0,204
0,329	0,319	0,268	-	0,297	0,279	0,232	-	0,265	0,240	0,195	-
0,337	0,272	0,324	0,285	0,304	0,234	0,292	0,254	0,271	0,196	0,263	0,223
0,316	0,367	0,407	-	0,282	0,333	0,372	-	0,248	0,299	0,337	-
0,309	0,305	0,302	0,273	0,278	0,269	0,274	0,243	0,236	0,234	0,245	0,213
-	0,303	0,254	-	-	0,264	0,224	-	-	0,226	0,193	-
0,309	0,325	0,230	-	0,278	0,287	0,190	-	0,247	0,250	0,149	-
0,276	0,308	0,284	-	0,246	0,271	0,243	-	0,215	0,234	0,202	-
-	-	0,280	0,286	-	-	0,245	0,257	-	-	0,209	0,227
0,236	0,336	-	-	0,203	0,295	-	-	0,169	0,254	-	-
0,283	0,339	-	0,281	0,249	0,302	-	0,244	0,214	0,264	-	0,201
-	0,291	-	-	-	0,253	-	-	-	0,214	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	0,318	-	-	-	0,278	-	-	-	0,242	-	-
0,279	0,304	-	-	0,252	0,268	-	-	0,224	0,232	-	-
-	0,313	-	-	-	0,277	-	-	-	0,241	-	-
-	0,280	-	-	-	0,240	-	-	-	0,207	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	0,341	-	-	-	0,311	-	-	-	0,281	-	-
-	0,282	-	-	-	0,245	-	-	-	0,209	-	-
-	0,267	-	-	-	0,243	-	-	-	0,207	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	0,382	-	-	-	0,353	-	-	-	0,325	-	-
-	0,316	-	-	-	0,290	-	-	-	0,254	-	-
-	0,295	-	-	-	0,261	-	-	-	0,228	-	-
-	0,285	-	-	-	0,248	-	-	-	0,211	-	-
-	0,280	-	-	-	0,244	-	-	-	0,208	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	0,307	-	-	-	0,269	-	-	-	0,232	-	-
-	0,343	-	-	-	0,313	-	-	-	0,283	-	-
-	0,294	-	-	-	0,256	-	-	-	0,219	-	-
-	0,281	-	-	-	0,243	-	-	-	0,206	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	0,313	-	-	-	0,253	-	-	-	0,214	-	-
-	0,310	-	-	-	0,268	-	-	-	0,227	-	-
-	0,323	-	-	-	0,280	-	-	-	0,237	-	-
-	0,272	-	-	-	0,228	-	-	-	0,185	-	-
-	0,315	-	-	-	0,271	-	-	-	0,228	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

schillende monsters van dezelfde koe en tussen de gemiddelden van alle koeien is daarmee niet in overeénstemming.

3. DISCUSSIE.

De bij de berekeningen verkregen waarden kwamen vrij goed overeen met de resultaten van in de literatuur vermeld onderzoek, waarbij gebruik werd gemaakt van een andere methode (centrifugeren, ultrafiltreren). Tegen de opvatting, dat wei geschikt is als hulpvloeistof bij het berekenen van de samenstelling van het complex, kan dus weinig bezwarends ingebracht worden.

Door het grote aantal gegevens was het mogelijk vast te stellen, dat, indien het caseinecalcium per g caseine constant en calciumphosphaat aanwezig is, de samenstelling van het laatste bij dezelfde koe niet steeds geheel dezelfde is tijdens een lactatie. Dit was ook het geval, indien magnesium en citroenzuur in de berekeningen opgenomen werden.

Verder bleek, dat ook de gemiddelde ($\bar{Q}$) samenstelling van het colloidale phosphaat in melk van de ene koe niet altijd gelijk was aan die van een andere.

Het in rekening brengen van magnesium en citroenzuur nivelleerde dit verschil tussen het phosphaat van de individuele koeien wel enigszins, maar niet geheel.

Het bestaan van dergelijke verschillen is niet ondenkbaar. Ook voor andere vormen van biologisch phosphaat zijn zij beschreven. Bij het onderzoek van de samenstelling van beenderen en tanden is (volgens Carlström lit. 12) gebleken, dat deze niet alleen varieert van de éne diersoort tot de andere, maar dat ook verschillen optreden bij éénzelfde soort van individu tot individu, van tand tot tand van hetzelfde dier en zelfs van de éne plaats tot een andere in hetzelfde been.

Het is niet waarschijnlijk, dat het phosphaat als secundair phosphaat voorkomt. Indien lage verhoudingen in het phosphaat gevonden worden, zou een mengsel van secundair en basischer phosphaat aanwezig kunnen zijn. In hoofdstuk III zal aangetoond worden, dat dit echter niet waarschijnlijk is.

Er is nog eens duidelijk aangetoond, dat men magnesium en citroenzuur niet mag verwaarlozen, zoals in veel publicaties geschiedde.

Hoewel de hoeveelheid magnesium betrekkelijk gering is t.o.v. calcium, bleek, dat het een grote invloed had op de voor het phosphaat berekende verhouding.

Aangenomen werd echter, dat magnesium zich t.o.v. phosphorzuur en caseine op dezelfde wijze zou gedragen als calcium. Om te illustreren, welke invloed het heeft, wanneer het zich anders gedraagt, volgt hieronder een berekening, waarbij verondersteld wordt, dat secundair magnesiumphosphaat in het complex voorkomt.

Voorbeeld.

mmol Ca per g caseine	mmol Mg per g caseine	mmol P per g caseine	mmol citroenzuur per g caseine	Mg als $MgHPO_4$	P als $MgHPO_4$
0,70	0,07	0,31	0,02	0,07	0,07

Ca als citraat	caseinecalcium	phosphaatcalcium	phosphaatphosphor	Ca/P in phosphaat
0,03	0,27	0,40	0,24	1,667

Op deze wijze berekend zou dus hydroxyapatiet ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) in het complex aanwezig kunnen zijn.

Citroenzuur zou afzonderlijk van het phosphaat voor kunnen komen als tertiair citraat. Uit onderzoek verricht in verband met de samenstelling van beenderen (lit. 12, 58) en over het precipiteren van citraat in tegenwoordigheid van phosphaat (lit. 57) verkrijgt men echter de indruk, dat tussen het precipiteren van phosphaat en citraat een nauwere betrekking bestaat.

Later zal blijken, dat ook natrium en kalium in het complex voorkomen.

Het is zonder meer duidelijk, dat zonder verder onderzoek geen uitsluitsel over de samenstelling van het phosphaat gegeven kan worden. Het leek noodzakelijk na te gaan, welk phosphaat ontstaat onder omstandigheden, welke voor zover mogelijk in overeenstemming zijn met die in de uiercel (hoofdstuk III en V).

De samenstelling van het phosphaat zou echter constant kunnen zijn. Uit de resultaten van de berekeningen volgt dan, dat per g caseine niet altijd evenveel caseinecalcium (+ magnesium) gebonden zal zijn bij monsters melk van éénzelfde koe gedurende de lactatieperiode en aan de caseine van verschillende koeien. Het basebindend vermogen van caseine, zowel van éénzelfde koe gedurende een lactatieperiode als van verschillende koeien onderling diende dus vergeleken te worden (hoofdstuk IV).

Het is vreemd, dat na soortgelijke berekeningen als door ons uitgevoerd door andere onderzoekers een uitspraak gedaan wordt over de wijze, waarop het phosphaat aan de caseine gebonden is. Dit is louter en alleen op grond daarvan nooit mogelijk. Zelfs een bewijs, dat calciumphosphaat voorkomt, wordt er niet door geleverd.

Dat dit niet het geval is, lijkt ons echter onwaarschijnlijk. (zie hoofdstuk I, III en V).

Van de verkregen uitkomsten zouden enkele als argument aangevoerd kunnen worden ten gunste van de theorie, dat calciumphosphaat aan calciumcaseinaat physisch gebonden is. Uit de grafieken bleek nl. dat:

a. Wanneer de hoeveelheid totaal calcium per g. caseine sterk stijgt of daalt, dit meestal ook het geval is met de hoeveelheid phosphaatphosphor, terwijl de verhouding phosphaatcalcium/phosphaatphosphor (bij de veronderstelling caseinecalcium constant) of

de hoeveelheid caseinecalcium (bij de veronderstelling samenstelling phosphaat constant) gelijk blijft, zodat er dus per g caseine meer phosphaat vastgehouden wordt.

b. Hoewel (2) de totale hoeveelheid colloidaal calcium en phosphaatphosphor per 100 g melk de neiging heeft te stijgen met het caseinepercentage gedurende een lactatie, zowel de hoeveelheid calcium als phosphaatphosphor per g caseine daalt.

HOOFDSTUK III

HET CALCIUMPHOSPHAAT

INLEIDING.

Door de onderzoekers van het caseinaatphosphaatcomplex wordt over het algemeen verondersteld, dat hetzij secundair phosphaat, hetzij tertiair phosphaat of een mengsel van beide phosphaten in dit complex aanwezig is en de indruk wordt gewekt, dat naar de mening van genoemde onderzoekers slechts deze mogelijkheden zouden bestaan. Uit de literatuur handelend over calciumphosphaten blijkt echter, dat niet alleen de reactie tussen calciumionen en ionen van phosphorzuur van gecompliceerde aard is, maar dat ook de precipiterende zouten veelal moeilijk te definieren zijn.

Secundair calciumphosphaat laat zich vrij gemakkelijk uit een oplossing afscheiden, met tertiair calciumphosphaat is dit bepaald niet het geval. (lit. 3, 4, 11, 12, 17, 43, 46, 81, 94).
Zeer veel neerslagen als tertiair calciumphosphaat in de handel gebracht blijken, hoewel de molaire verhouding Ca/P ervan ongeveer overéénkomt met de theoretische waarde 1, 50 bij röntgenographisch onderzoek roosters te bezitten, welke overeenkomen met dat van hydroxyapatiet ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) (lit. 8, 81, 94).
De aard an een dergelijk phosphaat kan dus niet louter en alleen op grond an een chemische analyse vastgesteld worden.
Het feit, dat de chemische analyse veelal niet overéénstemt met de resultaten van het röntgenonderzoek wordt op uiteenlopende manieren verklaard. Gericke (lit. 32) meende aangetoond te hebben, dat wanneer oplossingen van Na_2HPO_4 en $CaCl_2$ bij elkaar gevoegd werden, altijd een mengsel van kristallijn secundair phosphaat en amorph hydroxyapatiet ontstond. De hoeveelheid van beide in het mengsel zou afhankelijk zijn van de omstandigheden.
Hij baseerde deze mening op door hem verkregen röntgendiagrammen. Ook wanneer alleen een hydroxyapatietrooster gevonden werd, zou een mengsel aanwezig zijn.
Anderen zijn van mening, dat men meestal geen mengsels van secundair phosphaat en hydroxyapatiet verkrijgt, maar alleen hydroxyapatiet, ook wanneer de chemische analyse niet met de uitslag van het röntgenonderzoek overéénkomt. (lit. 4, 12, 46, 94). Indien de molaire verhouding Ca/P in het neerslag lager is dan 1, 667 wordt hetzij een adsorbtie van phosphorzure ionen aan de oppervlakte van de zeer kleine apatiet kristallieten verondersteld (lit. 12, 46, 94) hetzij een inwendige substitutie in het apatietrooster van Ca^{++}ionen door H^+-ionen (lit. 4).

Behalve secundair phosphaat, tertiair phosphaat en hydroxyapatiet worden in de literatuur ook nog andere phosphaten vermeld. Zo meent Bjerrum (lit. 4) aangetoond te hebben, dat een phosphaat kan ontstaan met een molaire verhouding Ca/P = 1, 33 (in formule

$Ca_4H(PO)_3$, waarvan het bestaan ook al eerder vermeld werd. Zijn mening wordt door andere onderzoekers niet gedeeld. Deze (lit. 12, 44) menen, dat ook dit phosphaat gezien moet worden als hydroxyapatiet, waaraan ionen geadsorbeerd zijn.

Ook van phosphaten basischer dan hydroxyapatiet is het bestaan verondersteld. (lit. 28, 35). Het is volgens Carström (lit. 12) waarschijnlijk, dat dit eveneens hydroxyapatieten zijn geweest. De hoge verhouding zou door adsorbtie van calciumhydroxyde veroorzaakt zijn.

In hoofdstuk II werd bij de berekeningen uitgevoerd met de veronderstelling, dat de hoeveelheid caseinecalcium per g caseine constant is, gevonden, dat zowel bij éénzelfde koe als tussen verschillende koeien onderling verschil zou kunnen bestaan in de samenstelling van het eventueel in het complex aanwezige calciumphosphaat. Er werd geconcludeerd, dat het voorkomen van alleen secundair phosphaat niet waarschijnlijk is. De uitkomsten van de berekeningen deden tevens vermoeden, dat het evenmin waarschijnlijk was, dat alleen tertiair phosphaat, indien deze stof bestaanbaar zou zijn, of een mengsel van secundair en tertiair phosphaat aanwezig was. Indien het laatste het geval was, had de berekende verhouding namelijk nooit hoger kunnen worden dan 1,50. Dit was echter wel zo.

Gezien de literatuur over phosphaten zou alleen een mengsel van secundair phosphaat en hydroxyapatiet of hydroxyapatiet, waaraan bepaalde ionen geadsorbeerd zijn, voor kunnen komen.

Hoewel het hydroxyapatiet waarschijnlijk wel de meest stabiele vorm van phosphaat is onder de omstandigheden, waarbij de genoemde onderzoekers werkten, wil dit echter nog niet zeggen dat dit ook het geval is voor de omstandigheden, waaronder melkvorming plaats vindt. De pH en de temperatuur bij het ontstaan van het phosphaat zullen b.v. van belang kunnen zijn. Het is bekend, dat ieder mengsel van neergeslagen calciumphosphaten met een verhouding mmol Ca/mmol P tussen 1,00 en 2,00 door de temperatuur te verhogen (tot bijv. 100°C) min of meer volledig omgezet kan worden in hydroxyapatiet of althans in een phosphaat, dat een röntgendiagram heeft overeenkomend met dat van hydroxyapatiet. Tijdens de vorming van het phosphaat zal het al of niet aanwezig zijn van andere ionen (o.a. magnesium en citroenzuur) van invloed kunnen zijn.

Deze veronderstellingen gaven ons voldoende aanleiding om te onderzoeken van welke aard het calciumphosphaat is, dat neerslaat bij een pH en temperatuur zoals die vermoedelijk aanwezig zijn in de uiercel.

2. EIGEN ONDERZOEK.

2.1. Neerslagen verkregen in gedestilleerd water, waaraan calciumhydroxyde en phosphorzuur werden toegevoegd.

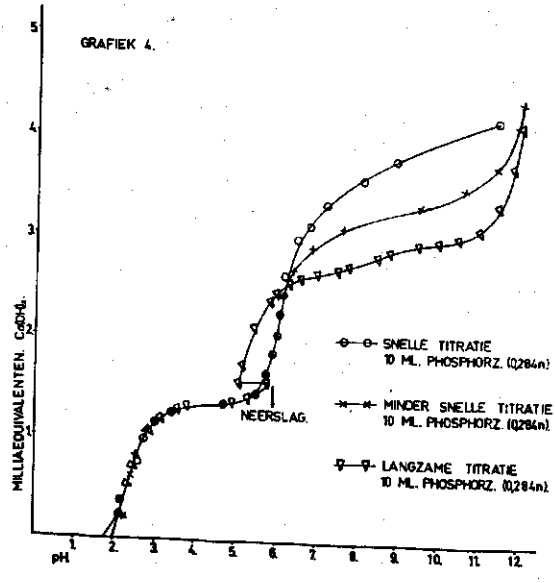
2.1.1. De gevolgde methode: Aanvankelijk werd voor het onderzoek van deze neerslagen de potentiometrische titratie van phosphorzuur met calciumhydroxyde gebruikt, welke ook door Holt et al. en ande-

ren (lit. 49, 98) bij het onderzoek van beenderphosphaten en door Eilers (lit. 21) bij het onderzoek van het caseinaatphosphaatcomplex werd toegepast.

Indien bij deze titratie beide oplossingen een sterkte hadden van 1 normaal, bleek, dat de snelheid van titreren van invloed was op de hoeveelheid calciumhydroxyde nodig voor de neutralisatie van het phosphorzuur tussen pH 5 en 8. Bij langzaam titreren kwam het benodigde aantal ml's ongeveer overéén met de hoeveelheid vereist voor de vorming van secundair calciumphosphaat. Werd echter sneller getitreerd dan was meer nodig, zodat een minder zuur phosphaat gevormd moest zijn.

Bij onze titratie's werd gebruik gemaakt van een z.g. automatische titrator, waarmee snel of langzaam base toegevoegd kon worden onder gelijktijdige controle van de pH. Een normaal oplossing werd verkregen door calciumoxyde op te lossen in een oplossing van suiker en water.

Titratie curve phosphorzuur (1 n) met calciumhydroxyde (1 n) (grafiek 4).



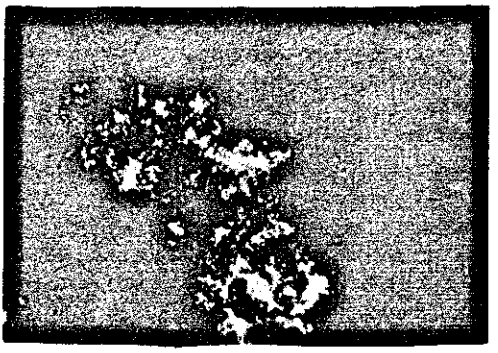
Het verschijnsel, dat ook door Eilers werd waargenomen, maakte het onmogelijk de samenstelling van het phosphaat gevormd bij éénzelfde pH waarde (bijv. pH 6, 7) te bepalen. Volgens Eilers zou bij het sprongsgewijs teruglopen van de pH voornamelijk tertiair phosphaat gevormd worden. Uit onze waarnemingen bleek, dat het teruglopen van de pH echter alleen plaats vond, indien secundair phosphaat gevormd werd en niet bij de vorming van minder zuur ("tertiair") phosphaat.

De proefopzet was ook niet logisch. Het is immers niet erg waarschijnlijk, dat in de uiercel eerst phosphorzuur opgehoopt wordt tot

een pH 2,00 is bereikt, gevolgd door neutralisatie daarvan met calciumhydroxyde. Aannemelijker is het te veronderstellen, dat in deze cel voortdurend calcium- en phosphaationen tesamen gebracht worden bij een vrijwel constante pH.

Hoewel het niet mogelijk is de omstandigheden in deze cel geheel na te bootsen, kan men er naar streven haar te imiteren. Met dit doel voor ogen lieten wij in gedestilleerd uitgekookt water langzaam calciumhydroxydeoplossing druppelen uit een buret. Terzelfdertijd werd uit een andere buret zoveel phosphorzuur van overeenkomende sterkte toegevoegd als nodig was om de pH constant te houden. Dit was met de genoemde automatische titrator gemakkelijk uit te voeren.

Bij de proeven werd de oplossing na korte tijd troebel. Even later ontstond een vlokkig gelatineus lijkend neerslag, waarvan de hoeveelheid toenam naarmate het experiment werd voortgezet. Het neerslag precipiteerde meestal langzaam.



Amorph phosphaat
donker veld

De analyse van het gecentrifugeerde en met gedestilleerd water uitgewassen neerslag, gevormd door titratie bij pH 6,75 (de pH van melk) gaf een molaire verhouding Ca/P = 1,35 - 1,40.

Het aan de lucht gedroogde preparaat vertoonde een röntgendiagram, overeenkomend met dat van hydroxyapatiet. Met behulp van de microscoop en gepolariseerd licht (gipsplaatjes) konden geen kristallen worden waargenomen.

2.1.2. Nadere bijzonderheden van de proeven.

2.1.2.1. Analyse methoden: Calcium en magnesium werden bepaald volgens de complexon methode (lit. 41). Phosphor volgens de molybdaat methode (lit. 83). De neerslagen werden voor de analyse opgelost in trichloorazijnzuur. Natrium en kalium werden vlamphotometrisch bepaald (lit. 42), citroenzuur volgens de pentabroomacetonmethode (lit.21), chloor zowel volgens de methode Volhardt als volgens Davies (lit. 20).

2.1.2.2. Algemeen. Indien op de aangegeven wijze phosphorzuur en calciumhydroxyde bij elkaar werden gevoegd moest aanvankelijk meer calciumhydroxyde toegevoegd worden dan phosphorzuur (beide

in maeq) om de pH (pH 6,70) constant te houden. Nadat zekere hoeveelheden van beide toegevoegd waren, bleef de verhouding van toevoeging constant. De molaire verhouding Ca/P van de getitreerde hoeveelheden lag dan echter reeds ver boven die van secundair phosphaat. Ondanks de relatief lage pH precipiteerde dus een minder zuur phosphaat.

TABEL IX

pH 6,70; 100 ml H_2O; $Ca(OH)_2^*$ 0,495 n; $H_3PO_4^*$ 0,310 n

tijd min.	toegevoegd m.aeq. H_3PO_4	toegevoegd m.aeq. $Ca(OH)_2$	mmol verh. Ca/P toegevoegd.
10	0,85	0,74	0,87
25	1,39	1,50	→ troebeling 1,08
40	2,10	2,84	1,35
55	2,83	3,95	1,40
75	4,26	6,00	1,41
95	4,90	6,92	1,41
125	5,97	8,45	1,42

* $Ca(OH)_2$ gesteld met oxaalzuur t.o.v. phenolpthaleïne
H_3PO_4 " " NaOH " "

Reeds na toevoeging van weinig calciumhydroxyde en phosphorzuur trad een troebeling op, welke bij voortzetting van het experiment toenam. Een plotseling uitkristalliseren van phosphaat vond niet plaats. Bij het optreden van de troebeling was geen sneller toevoegen van één van beide oplossingen ($Ca(OH)_2$) noodzakelijk voor het handhaven van de pH. Een plotselinge pH verandering (daling) deed zich dus niet voor.

De vorm, waarin het phosphaat gedurende de proef precipiteerde, werd microscopisch onderzocht. Aanvankelijk ontstond een zeer fijn vlokkig neerslag, dat bij het voortzetten van de titratie grover werd. Onderzocht met gepolariseerd licht (gekruiste nicols, gipsplaatjes) vertoonde het geen kristallen. Soms evenwel ontstonden, hoewel bij het begin (pH 6,70) vlokken waargenomen werden, tijdens het verdere verloop van de proef kristallen (rozetten) en wel als de pH door te snel bijdruppelen van phosphorzuur tijdelijk enigszins daalde.

Bij deze waarnemingen kregen wij de indruk, dat de pH 6,70 een grens vormde waarbeneden grof kristallijn en waarboven vlokkig amorph phosphaat ontstond. Dit vermoeden werd bij verdere proeven bevestigd.

2.1.2.3. De invloed van de pH.

Indien phosphorzuur en calciumhydroxyde bijeen werden gevoegd resp. bij pH 6,00, 6,50, 6,70, 7,00 en 7,50 bleek bij pH 6,00 en 6,50 altijd kristallijn secundair phosphaat, bij pH 7,00 en 7,50 altijd het vlokkige neerslag te ontstaan. Bij pH 6,70 ont-

stond het laatste alleen, indien de pH nauwkeurig op deze waarde werd gehouden. Andere factoren, zoals de sterkte van de titratievloeistoffen, de hoeveelheid water, de wijze van toevoegen met de titrator, bleken binnen ruime grenzen geen invloed te hebben op de verschijningsvorm van het neerslag.

Bij "lagere" pH waarden (6,70, 7,00) scheen de vloeistof overzadigd te moeten zijn, voordat de troebeling optrad. Bij "hogere" pH (8,50, 9,00) ontstond vrijwel direct een neerslag.

Proef: pH 6,70, 150 ml H_2O, H_3PO_4 1,108 n, Ca $(OH)_{2x}$, 1,442 n. De troebeling ontstond, nadat 1,40 - 1,86 maeq. H_3PO_4 en 0.89 - 2,09 maeq Ca $(OH)_2$ toegevoegd waren. Nadat doorgetitreerd was, totdat 2,55 maeq. H_3PO_4 en 3,49 maeq Ca $(OH)_2$ bijéengevoegd waren, werd het neerslag gecentrifugeerd en geanalyseerd. De molaire verhouding Ca/P in het neerslag was 1,35. Aan de gecentrifugeerde heldere vloeistof werd vervolgens weer phosphorzuur en calciumhydroxyde toegevoegd. Er ontstond opnieuw een troebeling, nadat 0,66-1,85 maeq Ca $(OH)_2$ en 0,86-1,31 maeq H_3PO_4 toegewaren. Na toevoeging van 2,49 maeq Ca (OH) en 1,75 maeq H_3PO_4 bleek het neerslag bij analyse een molaire verhouding Ca/P = 1,34 te bezitten. De daarna nogmaals getitreerde heldere vloeistof werd troebel, nadat 0,82 maeq H_3PO_4 en 1,00 maeq. Ca $(OH)_2$ toegevoegd waren.

Het neerslag, dat aanwezig was na toevoegen van 4,85 maeq. Ca $(OH)_2$ en 3,49 m. aeq H_3PO_4 had een molaire verhouding Ca/P = 1,38.

Bij de vele titraties uitgevoerd bij pH 6,70 (de pH van melk), werden vrijwel altijd molaire verhouding tussen 1,35 en 1,40 in het neerslag gevonden. Indien titratie's werden uitgevoerd bij verschillende toenemende pH waarden stegen zij echter (tabel X).

TABEL X

pH	mmol Ca/mmol P direct na het titreren	mmol Ca/mmol P na 2 dagen staan en dan afcentrifugeren en analyseren
6,00	0,96	
6,50	1,01	
6,75	1,36	1,38
7,50	1,41	1,41
8,50	1,43	
9,50	1,45	
11,00	1,55	

Teneinde na te gaan of de samenstelling van een neerslag door verandering van de pH van de oplossing eveneens te veranderen zou zijn, werd bij de volgende proeven gewerkt bij pH ± 11,00. Nadat voldoende neerslag was ontstaan, werd van de vloeistof een deel af-

gezonderd en gecentrifugeerd, waarna zowel het neerslag als de heldere vloeistof geanalyseerd werd. Aan het overgebleven deel werd phosphorzuur toegevoegd, totdat de pH tot een bepaalde waarde gedaald was en gedurende een half uur constant was. Daarna werd wederom een gedeelte afgezonderd en aan de resterende oplossing phosphorzuur toegevoegd en zo vervolgens, totdat de pH 4, 80 bereikt was. De analyseresultaten van een dergelijke proef zijn weergegeven in tabel XI.

TABEL XI

pH	neerslag Ca/P	oplossing Ca/P	% teruggevonden Ca	P
11,30	1,57		96	98
9,25	1,53	3,26	99	98
7,80	1,43	1,75	100	99
6,60	1,38	0,88	100,5	98
6,25	1,35	0,70	98	96
5,75	1,29	0,53	97	108
5,10	1,16	0,53	99	101
4,80	1,03	0,50	95	101

Indien uitgegaan werd van phosphaat neergeslagen bij pH 7, 00 en door middel van toevoeging van calciumhydroxyde de pH werd verhoogd, werd bij éénzelfde wijze van werken gevonden.

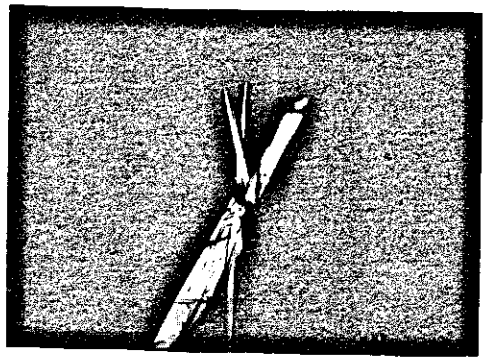
TABEL XII

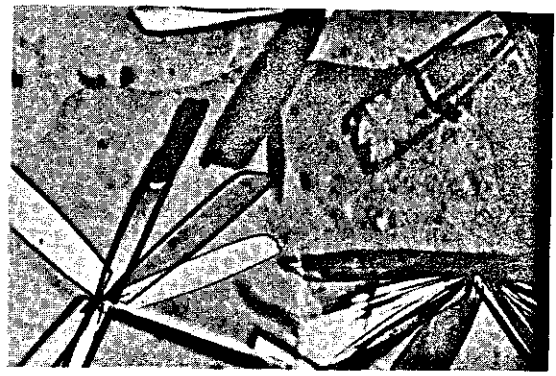
pH	neerslag Ca/P	oplossing Ca/P	% teruggevonden Ca	P
7,10	1,35	0,82	100	99
8,00	1,39	1,44	99	99
9,00	1,48	2,64	101	99
10,00	1,53	±10,00	99	99,5
11,00	1,69	±27,00	100,5	99

2.1.2.3.1. Het optreden van kristallisatie.

Indien aan de oplossing met neerslag verkregen bij pH 6, 70 en hoger phosphorzuur toegevoegd werd, trad kristallisatie van het phosphaat op, als de pH tot 5, 75 gedaald was. Bij deze pH en lager ontstonden in met de tijd toenemende mate kristallen. In het neerslag waren dan bij lage pH naast de vlokkige conglomeraten lange scherpe kristalnaalden aanwezig. (Zie afbeeldingen)

Zij ontstonden ook, indien in plaats van phosphorzuur zoutzuur werd gebruikt voor het verlagen van de pH.





Analyse toonde aan, dat de kristallen bestonden uit secundair phosphaat. Röntgenfoto's bevestigden de analyseresultaten. De kristallisatie leek niet eerder op te treden dan nadat de pH beneden 6,00 was gedaald.

2.1.2.3.2. Het afstaan en opnemen van calcium.

Er is reeds opgemerkt (bladz. 63), dat bij verlaging of bij verhoging van de pH van de vloeistof de verhouding Ca/P in het neerslag lager resp. hoger werd. Het bleek eveneens mogelijk de verhouding Ca/P in het neerslag reversibel te regelen.

Als eerst door pH verlaging met HCl de verhouding in het neerslag verlaagd was, kon deze verhouding door daarna NaOH aan de vloeistof toe te voegen tot de oorspronkelijke pH waarde ook tot ongeveer de oorspronkelijke waarde teruggebracht worden. (zie tabel XIII)

De pH had dus een grote invloed op de samenstelling van het vlokkige phosphaat. Afhankelijk van de pH waarde werden hogere of lagere verhoudingen in het neerslag gevonden. Uit het microscopisch onderzoek werd echter niet de indruk verkregen, dat de neerslagen bestonden uit mengsels van twee phosphaten.

Dit leek des te meer onwaarschijnlijk, omdat bij verlagen van de pH en daarna weer instellen op de oorspronkelijke waarde ongeveer éénzelfde verhouding gevonden werd als oorspronkelijk aanwezig.

Er ontstond klaarblijkelijk dan ook geen mengsel van phosphaten bij de titratie's maar steeds éénzelfde soort phosphaat. Dit bezat kennelijk de eigenschap onder invloed van de pH meer calciumionen op

TABEL XIII

	Oorspronkelijk	na pH verlaging		na pH verhoging	
Proef 1:					
pH	7,50	6,00	HCl	NaOH	7,50
verhouding Ca/P	1,43	.....		NaOH	1,46
Proef 2:					
pH	7,50	5,50	HCl	NaOH	7,50
verhouding Ca/P in het neerslag	1,43	1,36		NaOH	1,41
Proef 3:					
pH	9,00	5,95	HCl	NaOH	9,00
verhouding Ca/P in het neerslag	1,51	1,38		NaOH	1,54

te nemen of af te staan dan overeenkwam met het neerslaan resp. oplossen van calciumphosphaat als zodanig. Het kan klaarblijkelijk calciumionen afstaan zonder van structuur te veranderen.

Bij pH 6,70 (de pH van melk) zou het een molaire verhouding Ca/P = 1,35-1,40 hebben. Wanneer het in zuurder milieu (pH < 6,00) gebracht werd, zou het kunnen kristalliseren tot secundair phosphaat.

2.1.3. Röntgendiagrammen.

Teneinde enige controle te hebben op de resultaten verkregen bij de analyse en het microscopisch onderzoek, werden sommige neerslagen röntgenographisch onderzocht. Het maken van de diagrammen geschiedde in het laboratorium voor Bodemkunde en Geologie van de Landbouw Hogeschool. ** De diagrammen werden opgenomen met behulp van cobaltstraling (CoKα) en van een camera met een effectieve straal van 27,4 mm.

Bij een phosphaatneerslag verkregen bij pH $\pm$ 7,00 vertoonde het kristalrooster overeenstemming met dat van hydroxyapatie (photo 1433 zie bladz.67).

De bij pH 9,00 neergeslagen phosphaten waren amorph (photo 1437, zie bladz.67).

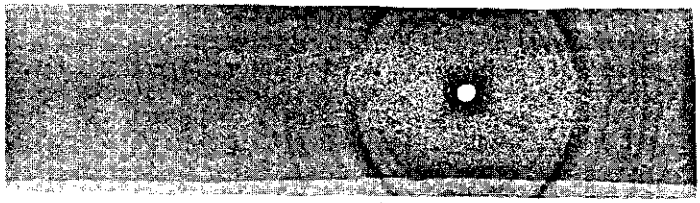
Bij samenvoeging van phosphorzuur en calciumhydroxyde bij pH 9,00 ontstond vrijwel direct een neerslag. De kans, dat dan kleine kristallieten gevormd worden met zodanige afmetingen, dat röntgenographisch geen kristalrooster kan worden waargenomen is dan misschien wel groter, maar het is zeer de vraag of hierin de verklaring mag worden gezocht. Dat de kristallieten ook bij pH 7,00 al zeer klein van afmetingen waren, zou misschien uit de weinig scherpe lijnen van de diagrammen van de phosphaten neergeslagen bij die pH afgeleid kunnen worden.

In de diagrammen werden geen lijnen gevonden, welke erop wezen, dat secundair phosphaat in de neerslagen aanwezig was. Dit

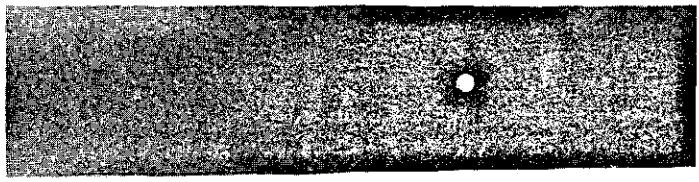
** Voor het verrichte röntgenographisch onderzoek ben ik Dr. J.Ch.L. Favejee zeer erkentelijk.

was wel het geval bij de diagrammen verkregen van de kristallen ontstaan na de verlaging van de pH met HCl (photo 1382 zie bladz.

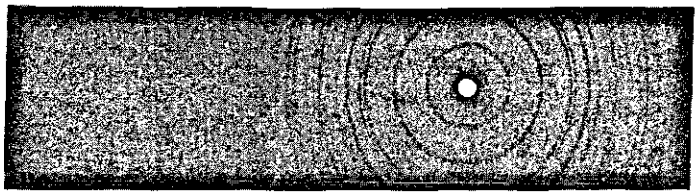
Uitwassen van het neerslag (10x) met gedestilleerd water had op de diagrammen geen invloed, drogen bij 100°C van het neerslag gevormd bij pH 7,00 evenmin.
Werd het phosphaat neergeslagen bij pH 9,00 echter bij 100°C gedroogd, dan veranderde het oorspronkelijk amorphe neerslag en kwam het hydroxyapatietrooster te voorschijn. Enkele uren verhitten bij 900°C van een bij pH 7,00 verkregen en daarna 10 x met gedestilleerd water uitgewassen neerslag gaf eveneens een ander diagram. Dit kwam dan overeen met dat van tertiair calciumphosphaat (photo 1450 bladz.68).
Een soortgelijke omzetting werd ook door anderen waargenomen (lit. 8, 12, 45, 94) voor phosphaten met een molaire verhouding Ca/P tussen secundair phosphaat en hydroxyapatiet.



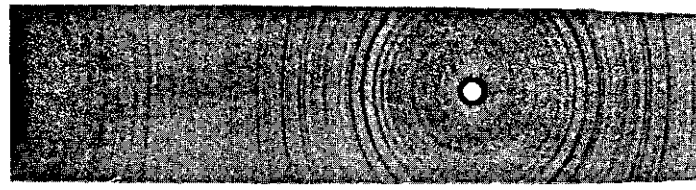
no 1433
Hydroxyapatiet.



no 1437
Amorph phosphaat.



no 1382
Secundair calcium-
phosphaat.



no 1450
tertiair calcium-
phosphaat.

2.1.4. Voorlopige conclusie: Uit de verkregen diagrammen en de gevonden verhoudingen Ca/P bleek, dat bij een pH (± 7,00) waarbij men zou verwachten, dat secundair phosphaat ontstond, een basischer phosphaat werd gevormd. Er werd geen enkele aanwijzing voor gevonden, dat in de neerslagen tevens secundair phosphaat aanwezig was.

Evenmin was er reden om aan te nemen, dat het gevormde phosphaat tertiair calciumphosphaat zou zijn. De röntgendiagrammen wezen op het ontstaan van hydroxyapatiet. Hierbij moet opgemerkt worden, dat de lijnen in het diagram tamelijk zwak waren.

Het is de vraag of zuiver hydroxyapatiet gevormd werd, want de verhouding Ca/P van de neerslagen was niet in overeenstemming met die van hydroxyapatiet.

Daar geen enkele aanwijzing werd gevonden, dat de neerslagen uit mengsels van twee phosphaten bestonden, werd voorlopig geconcludeerd, dat bij de proeven een complex phosphaat ontstond. (zie ook verder)

2.1.5. De invloed van het uitwassen op de molaire verhouding Ca/P van de neerslagen.

2.1.5.1. Uitwassen met gedestilleerd water.

Sommige onderzoekers (zie bladz. 58) zijn van mening, dat het niet met elkaar in overeenstemming zijn van de resultaten van de chemische analyse met die van het röntgenonderzoek veroorzaakt wordt door de adsorbtie van phosphorzuur aan het oppervlakte van hydroxyapatiet kristallen. Voor deze opvatting worden wel als argumenten aangevoerd, dat bij hoge temperatuur (900°C) een omzetting in β tertiair calciumphosphaat plaats vindt en verder, dat door uitwassen phosphorzuur uit het neerslag te verwijderen is (lit. 12, 94).

Indien het door ons bij pH 7,00 verkregen phosphaat 10 x met gedestilleerd water uitgewassen werd, bleef de molaire verhouding Ca/P haar oorspronkelijke waarde behouden, en ook dan vertoonde het preparaat na verhitten tot 900° C het röntgendiagram van β tertiair calciumphosphaat. (photo 1450)

pH.	Ca/P voor het uitwassen	Ca/P na 10 x uitwassen	Röntgendiagram	
			na 10 x uitwassen direct	na 10 x uitwassen en verhitten op 900°C
7,00	1,40	1,38	hydroxyapatiet	β tertiair calciumphosphaat.

Soortgelijke ervaringen werden door Trömel en Möller (lit. 94) opgedaan met een handelspreparaat van tertiair calciumphosphaat.

2.1.5.2. Uitwassen met loog.

Indien van geadsorbeerd phosphorzuur sprake zou zijn, kan beter met loog uitgewassen worden. Als met 0,01 n NaOH uitgewassen werd, steeg de verhouding in het phosphaat wel enigszins. De verhouding (1,667) van hydroxyapatiet werd echter nog lang niet bereikt.

pH	Ca/p oorspr.	na 3 x uitwassen met H_2O	na 3 x uitwassen 0,01 NaOH
7,00	1,38	1,38	1,47

Dit was eveneens het geval, wanneer het neerslag 3 x met water uitgewassen werd, vervolgens aan de lucht gedroogd en daarna gedurende 24 uur in gedestilleerd, uitgekookt, met NaOH op pH 8,00 resp. 9,00 gebracht water geroerd werd.

	pH 7,00	pH 8,00 na 24 uur roeren	pH 9,00 na 24 uur roeren
Ca/P in neerslag	1,39	1,45	1,47
Ca/P in oplossing		0,15	0,12
pH in de oplossing na 24 uur roeren		6,38	6,61

De hoeveelheid phosphorzuur, welke in oplossing ging, was zeer gering. Het leek dan ook niet waarschijnlijk, dat de lage verhouding in het neerslag (1,39 t.o.v. 1,667) toegeschreven moest worden aan een adsorbtie van phosphorzuur aan het oppervlakte van hydroxyapatiet kristallieten. Het zelfde kan waarschijnlijk ook uit de volgende eenvoudige berekening geconcludeerd worden.

Stel het aantal mmol geadsorbeerd phosphor = X. De verhouding Ca/P in het neerslag was 1,39, dus $Ca/P = \frac{5}{3 + x} = 1,39$ of $x = \pm 0,6$.

Eén zesde van de hoeveelheid phosphor zou dan geadsorbeerd voor moeten komen. Deze hoeveelheid is nogal groot (zie verder discussie).

2.1.6. De invloed van de temperatuur bij de vorming van het phosphaat.

Hoewel melk meestal bij kamertemperatuur onderzocht wordt, is de temperatuur bij het ontstaan ervan 38,0 - 38,5°C. Verder wordt melk bij de verwerking ervan vrijwel altijd verhit. Het was dus van belang na te gaan of de samenstelling van het phosphaat veranderde onder invloed van de temperatuur.

Indien het phosphaat neergeslagen werd bij 38°C i.p.v. bij kamertemperatuur was de verhouding Ca/P in het neerslag enigzins hoger. Gevonden werd resp. 1,47; 1,41; 1,46.

Bij de pH metingen bij 38°C werd het toestel geijkt op een phosphaatbuffer volgens Sörensen (1/15 mol $NaHPO_4$, 1/15 mol KH_2PO_4), daar deze weinig temperatuurgevoelig was. De afwijking bij 38°C

was maximaal 0,1 - 0,2 pH éénheid t.o.v. die bij kamertemperatuur. De samenstelling van het neerslag ondervond hiervan weinig invloed. Bij de instelling van de titrator werd er rekening mee gehouden.

De eigenschappen van het phosphaat bleven dezelfde, als het neergeslagen werd bij 38° C. Ook nu werd gevonden, dat de verhouding Ca/P afnam, als de pH van de vloeistof met zoutzuur verlaagd werd, en weer toenam, als daarna NaOH toegevoegd werd.

		HCl		NaOH	
pH :	pH 9,00	⟶	pH 5,90	⟶	pH 9,00
Ca/P :	1,50	⟶	1,42	⟶	1,57

Indien bij kamertemperatuur neergeslagen phosphaat met de moedervloeistof opgekookt werd steeg de verhouding Ca/P van het neerslag, terwijl de vloeistof zuurder werd. Wanneer het neerslag eerst gecentrifugeerd en uitgewassen werd en daarna in gedestilleerd water werd opgekookt, steeg de verhouding Ca/P.

Proef Calciumphosphaat neergeslagen bij pH 7,00

	no 1	no 2
	Ca/P	Ca/P
oorspronkelijk neerslag	1,45	1,37
neerslag na uitwassen	1,43	1,34
in de moedervloeistof overgebleven na centrifugeren	1,27	0,96
na ½ uur koken van het neerslag in de moedervloeistof, neerslag	1,56	-,-
heldere vloeistof	0,68	0,85
uitgewassen neerslag opgekookt in water	1,56	1,49
uitgewassen neerslag na opkoken nogmaals uitwassen	-,-	1,53

Bij volgende proeven werd phosphaat neergeslagen bij kamertemperatuur zowel bij pH 7,00 als bij pH 9,00. Nadat voldoende neerslag was ontstaan, werd de vloeistof in drie portie's verdeeld. Daarvan werd de eerste portie (a) gecentrifugeerd en zowel het verkregen neerslag als de bovenstaande heldere vloeistof geanalyseerd.

De tweede portie (b) werd 5 uur opgekookt in gedestilleerd water met terugvloeikoeler en gecentrifugeerd, waarna eveneens het neerslag en de erbovenstaande heldere vloeistof werden geanalyseerd.

De derde portie werd direct gecentrifugeerd. Het daaruit verkregen neerslag werd uitgewassen en in drie delen verdeeld. Het eerste deel (c_1) werd met gedestilleerd water opgekookt en daarna gecentrifugeerd. Van het neerslag en de bovenstaande vloeistof

werd de verhouding Ca/P bepaald. Het tweede deel (c_2) werd bij kamertemperatuur gedroogd na uitpersen tussen filtreerpapier en vervolgens geanalyseerd. Het derde (c_3) werd gedurende 24 uur bij 100°C gedroogd en daarna geanalyseerd.

De in de neerslagen en vloeistoffen gevonden verhoudingen zijn weergegeven in tabel XIV.

TABEL XIV

Verhoudingen Ca/P

	pH 7,00		pH 9,00	
a. oorspronkelijke neerslag	1,50	1,43	1,57	1,53
oorspronkelijke oplossing **	2,42	1,42	3,29	4,19
b. neerslag na opkoken	1,56	1,54	1,65	1,63
oplossing na opkoken **	0,49	0,36	0,88	1,25
c_1 neerslag na uitwassen en opkoken	1,53	1,54	1,59	1,65
daarbij behorende oplossing **	0,97	0,37	0,86	1,26
c_2 oorspronkelijk neerslag uitgewassen en aan de lucht gedroogd	1,48	1,51	1,52	1,59
c_3 oorspronkelijk neerslag uitgewassen en gedroogd bij 100°C	1,60	1,56	1,57	1,65

** De oplossingen bevatten meestal slechts zeer geringe hoeveelheden calcium en phosphor. De nauwkeurigheid van de berekende verhoudingen was daardoor betrekkelijk gering.

Hoewel de bij de proeven gevonden verhoudingen niet alle in overeenstemming waren met de verwachte, kan er evenwel toch geconcludeerd worden, dat, wanneer op de één of andere wijze de temperatuur verhoogd werd, dit resulteerde in een hogere verhouding Ca/P van het phosphaat en dat bij het opkoken van de oorspronkelijke oplossing met neerslag de vloeistof zuurder werd. (lagere Ca/P verhoudingen dan oorspronkelijk).

Dit is in overeenstemming met datgene wat in de literatuur vermeld wordt. (lit. 12)

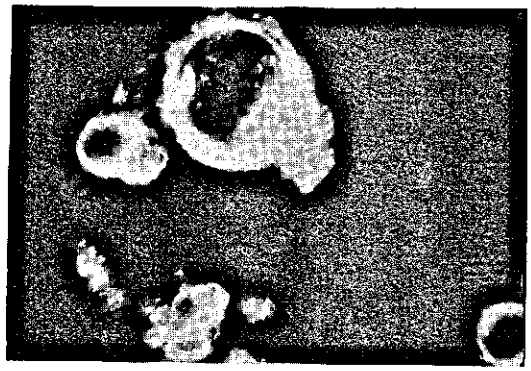
Van de preparaten c2 en c3 uit tabel XIV werden röntgenfoto's gemaakt. Bij pH 7,00 werden met dat van hydroxyapatiet overeenkomende diagrammen gevonden, bij pH 9,00 was het aan de lucht gedroogde phosphaat amorph, het bij 100°C gedroogde vertoonde eveneens een met dat van hydroxyapatiet overéénkomend diagram.

2.1.7. Verder eigenschappen van het phosphaat.

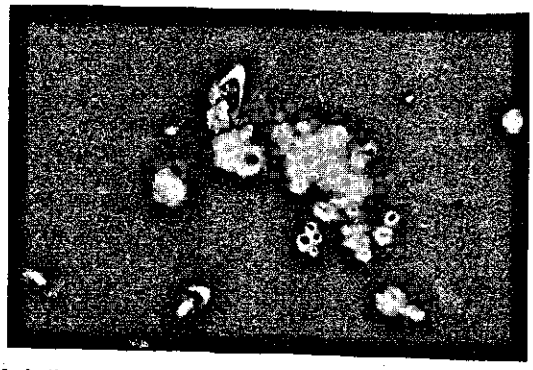
Het bleek, dat het phosphaat zich sterk hechtte aan allerlei stoffen. Vetbolletjes, verkregen uit driemaal gewassen room, waarvan bekend is, dat zij negatief geladen zijn, zij het dan zeer zwak, werden door het neerslaande phosphaat (pH 6,70) omhuld en wel zodanig, dat vrijwel al het vet met het phosphaat geprecipiteerd kon worden. Dit was ook mogelijk met uitgesmolten en in water gesuspendeerd botervet. Ook op gistcellen (neutrale suspensie) zette het neerslag zich zeer gemakkelijk af, terwijl het zich hechtte aan glaswanden.

Indien phosphorzuur en calciumhydroxyde op de beschreven wijze aan een neutrale dispersie van C. M. C. (carboxymethylcellulose)

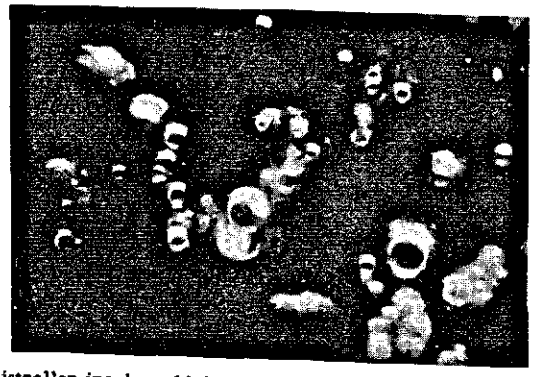
toegevoegd werden, werden ook hiervan de deeltjes omgeven door calciumphosphaat (zie verder hoofdstuk V).



Uitgesmolten en in water gesuspendeerd botervet ingekapseld in calciumphosphaat. (donker veld).



Vetbolletjes uit 3 x gewassen room ingekapseld door calciumphosphaat. (donker veld).



Gistcellen ingekapseld door calciumphosphaat (donker veld).

2.2. De neerslagen die ontstonden als ook andere ionen aanwezig waren.

2.2.1. De neerslagen die ontstonden bij aanwezigheid van magnesium.

In het caseinaatphosphaatcomplex van melk komt magnesium voor. In welke vorm is nog niet bekend. Het zou kunnen zijn, dat een calciummagnesiumphosphaat aanwezig is, waarin de calciumionen gedeeltelijk door magnesiumionen vervangen zijn. Carlström (lit. 12) was echter van mening, dat hoewel in uit oplossingen geprecipiteerde phosphaten (hydroxyapatiet) ook magnesium voor kan komen, niet van een calcium-magnesium hydroxyapatiet gesproken mag worden.

Hendricks en Hill (lit. 47) verklaarden de aanwezigheid van magnesium in dergelijke phosphaten door de adsorbtie van een $MgOH^+$ ion aan het oppervlakte van de kristallieten. Dit ion zou voorkomen in ongeveer neutrale oplossingen. Deze opvatting zou gesteund worden door oplosbaarheidsproeven door anderen met deze phosphaten uitgevoerd (lit. 16, 62).

Verder is gevonden (lit. 12), dat neerslagen verkregen uit oplossingen, waarin 20% van de calciumionen door magnesiumionen vervangen was, röntgendiagrammen gaven met twee of drie zeer brede banden karakteristiek voor een amorph apatiet. Magnesium zou de groei van de apatietkristallieten verhinderen, daar het bepaalde plaatsen aan het oppervlakte daarvan opvulde, waardoor een uitgroeien van het kristalliet op die plaatsen niet meer plaats vond.

Bjerrum (lit. 4) meende, dat in apatietroosters calciumionen niet door magnesiumionen vervangen kunnen worden en wel op grond van het feit, dat geen magnesium in het hydroxyapatietrooster opgenomen werd, indien dit phosphaat in aanwezigheid van magnesiumoxyde bij hoge temperatuur gesynthetiseerd werd. (Jensen en Moller).

2.2.1.1. Eigen onderzoek.

Bij een oplossing van magnesiumchloride werden op de beschreven wijze calciumhydroxyde en phosphorzuur toegevoegd. (pH 7,00). Na afloop van de proef werden de toegevoegde en teruggevonden hoeveelheden bepaald.

Balansproef	mmol Ca	mmol Mg	mmol P	mmol Cl	Ca/P	Ca+Mg/P
teruggevonden in neerslag :	3,75	1,63	4,13	-	0,91	1,30
in oplossing :	2,46	11,32	0,31	26,31		
totaal :	6,21	12,95	4,44	26,31		
totaal toegevoegd :	6,07	13,56	4,38	27,02		
teruggevonden % :	102	95,5	101	97		

Het neerslag werd niet uitgewassen, bij de berekeningen werd een correctie toegepast.

Microscopisch was geen verschil waar te nemen tussen het bij

deze proef verkregen neerslag en dat verkregen, wanneer geen magnesium aanwezig was. Het preparaat lichtte niet op met gepolariseerd licht.

Bij enkele andere proeven werd gevonden:

TABEL XV

Proef	pH	mg Mg per 100 ml H_2O	Ca/P in neerslag	Ca+Mg/P in neerslag	Bijzonderheden
1a	7,00	11,35	0,98	1,02*	oorspronkelijk neerslag
b			1,17	1,20*	na 3 x uitwassen
c			1,19	1,21	na 3 x uitw. en drogen aan de lucht.
2a	7,00	117,6	0,90	1,65*	oorspronkelijk neerslag
b			0,92	1,18*	na 3 x uitwassen
c			0,94	1,21	na 3 x uitwassen en drogen aan de lucht.
3a	7,00	146,5	1,05	1,35	oorspronkelijk neerslag
b			1,35	1,48	na 10 x uitwassen
4a	7,00	146,5	1,13	1,42	oorspronkelijk neerslag
b			1,16	1,30	na 5 x uitwassen
c			1,17	1,32	na 10 x uitwassen

* Voor verklaringen zie bladz. 75

Ook nu werd bij microscopiseren geen verschil gevonden t. o. v. neerslagen ontstaande in oplossingen zonder magnesium. Van de preparaten 1c. 2c en 4c werden röntgenopnamen gemaakt. De phosphaten bleken amorph (foto no. 1445). Van preparaat 4c werd tevens een gedeelte verhit op 900°C. Ook hiervan werd een röntgendiagram gemaakt. Dit kwam overeén met dat van β tertiair phosphaat.

De karaktersitieke lijnen waren verschoven ten opzichte van die van β tertiair phosphaat verkregen bij verhitten tot 900°C uit een neerslag, waarin geen magnesium voorkwam (photo 1448).

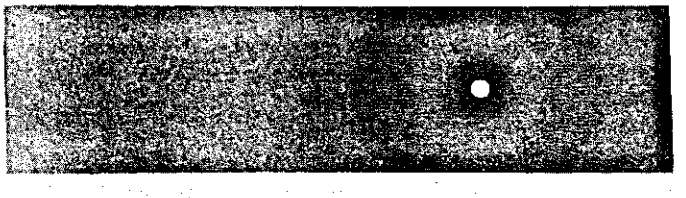


photo no 1445
Calciummagnesiumphosphaat
Amorph.

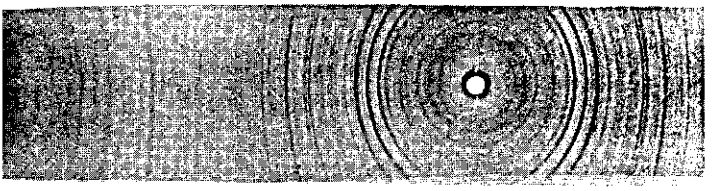


photo no 1448
Calciummagnesiumphosphaat. Diagram overeénkomend met dat van β tertiair calciumphosphaat

Tussen het diagram van het amorphe phosphaat verkregen bij pH 9,00 zonder magnesium en dat van het bij pH 7,00 met magnesium verkregene was geen verschil. De banden lagen op dezelfde plaats.
Bij pH 7,00 had het phosphaat zonder magnesium een diagram als hydroxyapatiet, dat met magnesium was amorph. Indien magnesium aanwezig was, zal daardoor dus het phosphaat of in een andere modificatie neergeslagen geweest zijn of de groei van de kristallieten zodanig afgeremd, dat de roosters niet meer waarneembaar waren.

Uit de chemische analyse viel moeilijk iets met zekerheid te concluderen. Na het uitwassen van het neerslag was de verhouding, Ca+Mg/P nu eens hoger dan weer lager dan ervoor. De hoeveelheid vloeistof, die mee uitgecentrifugeerd werd en de daarin opgeloste hoeveelheden magnesium beïnvloedden de oorspronkelijk gevonden verhoudingen sterk. Ook na 10 x uitwassen bleek magnesium echter in gemakkelijk aantoonbare hoeveelheden in het neerslag aanwezig. De verhoudingen Ca+Mg/P leken over het algemeen lager dan die van phosphaten, waarin geen magnesium aanwezig was.
(Ca+Mg/P: 1,20 - 1,30; Ca/P: 1,35 - 1,40).
Het is zeer waarschijnlijk, dat magnesium het calcium gedeeltelijk vervangen had in het rooster. De verhoudingen Ca/P in de calcium-magnesiumphosphaten waren laag (zie tabel XV resp. 1,17, 0,92, 1,35, 1,16 en 1,17). Dit zal niet veroorzaakt zijn door de aanwezigheid van secundair magnesiumphosphaat. Slechts éénmaal werd een diagram gevonden overeenkomend met dat van secundair-phosphaat. Bij al de andere proeven werd noch bij het microscopisch noch bij het röntgenografisch onderzoek voor de aanwezigheid daarvan een aanwijzing gevonden. Wel werd het gevormd bij een proef, waarbij aan gedestilleerd water oplossingen van $MgCl_2$ en Na_2HPO_4 gedruppeld werden bij constante pH (bij pH 7,00 en 8,00, resp. met HCl en NaOH constant gehouden).
Ook het feit, dat na 10 x uitwassen nog steeds magnesium in gemakkelijk aantoonbare hoeveelheden in het neerslag voorkwam, wees niet op de aanwezigheid van secundair magnesiumphosphaat. Een adsorbtie van $(MgOH)^+$ ionen leek gezien het resultaat van het uitwassen evenmin erg waarschijnlijk.
Het meest aannemelijk was de vorming van een complex calciummagnesiumphosphaat. Of de t.o.v. de Ca/P verhouding in calci-

umphosphaat lage Ca+Mg/P verhouding en de amorphe structuur door een andere "kristalopbouw" veroorzaakt werden of door het ontstaan van kleinere kristallieten met een relatief groter adsorberend oppervlakte was niet uit te maken (zie verder discussie).

2.2.2. De neerslagen, die ontstonden bij aanwezigheid van citroenzuur.

Ongeveer 5 - 10% van de totale hoeveelheid citroenzuur in de melk aanwezig komt voor in het caseinaatphosphaatcomplex (lit. 64, 95, 99).
Pyne (lit. 73) concludeerde, dat dit citraat niet door dialyse uit het complex te verwijderen was.
De aanwezigheid van citroenzuur bij het ontstaan van calciumphosphaat bevordert het neerslaan van minder zuur phosphaat dan secundair (lit. 65, 73, zie hoofdstuk V).

Door Kuiper (lit. 57) is gevonden, dat uit oplossingen van citroenzuur en calciumphosphaat calciumphosphaatcitraat neersloeg, wanneer calciumionen in overmaat aanwezig waren t. o. v. phosphorzuur en citroenzuur.
Het onoplosbare complex dissocieerde volgens hem echter gemakkelijk, daar het citraat alleen precipiteerde, indien calciumionen in overmaat aanwezig waren t. o. v. de hoeveelheid noodzakelijk voor de reactie met phosphaat en citraat.
Daar slechts kleine hoeveelheden citraat onder bepaalde voorwaarden tesamen met grote hoeveelheden calciumphosphaat precipiteerden en de hoeveelheid citraat in het neerslag slechts vermeerderde, indien ook grotere hoeveelheden calciumphosphaat neersloegen, zou het citraat niet aan het phosphaat geadsorbeerd zijn.
Door Pyne en Mc Gann (lit. 73) werd als hypothetische formule voor het colloidale phosphaatcitraat in melk voorgesteld $3\,Ca_3(PO_4)_2\,CaHcitr.^-$. De mogelijkheid, dat magnesium eveneens in het phosphaat voor zou komen, werd door deze onderzoekers uitgesloten geacht gezien de oplosbaarheid van het magnesiumphosphaat.

2.2.2.1. Eigen onderzoek.

Indien citroenzuur bij constante pH (6,70) samengevoegd werd met calciumhydroxyde, was zoveel van het laatste nodig als overeén kwam met de vorming van tertiair citraat. Afhankelijk van de sterkte van de citroenzuuroplossing ontstond al of niet een neerslag. Indien een neerslag gevormd werd, gebeurde dit meestal na afloop van de proef en na een zekere tijd. De vloeistof scheen gemakkelijk met calciumcitraat oververzadigd te kunnen zijn.
Indien citroenzuur en phosphorzuur in zodanige verhoudingen gemengd werden als waarin ze in melk aanwezig zijn en dit mengsel bij constante pH met calciumhydroxyde samengevoegd werd, ontstond een neerslag, dat uit calcium, phosphorzuur en citroenzuur bleek te bestaan. Getracht werd na te gaan in welke vorm het citroenzuur in dit phosphaat aanwezig was.

Proef: pH 6,70 toegevoegd 4,39 m.aeq. Ca en 3,56 m.aeq. phosphorzuur + citroenzuur.

	teruggevonden in het neerslag	teruggevonden in de oplossing
mmol Ca	1,48	0,73
mmol P	0,98	0,25
mmol citroenzuur	0,14	0,32
mmol Ca/P + citroenzuur	1,31	1,27

Bij een andere proef werd aan 200 ml natriumcitraatoplossing bij pH 7,00 calciumhydroxyde en phosphorzuur toegevoegd en het gevormde neerslag gecentrifugeerd en daarna evenals de achterblijvende heldere vloeistof geanalyseerd.

	In neerslag	In oplossing
mmol Ca :	2,51	3,44
" P :	1,62	4,02
" Na :	0,37	12,59
" citroenzuur	0,31	3,63

Indien het natrium opgelost was in de mee uitgecentrifugeerde vloeistof, was in het neerslag ± 7 ml vloeistof aanwezig d.w.z., dat het neerslag bestond uit 2,39 mmol Ca, 1,48 mmol P en 0,18 mmol citroenzuur. De molaire verhouding Ca/P + citroenzuur was dan 1,44.

Door de aanwezigheid van het natriumcitraat bleef meer calcium en phosphorzuur in oplossing dan wanneer een gelijke hoeveelheid calciumhydroxyde bij 200 ml gedestilleerd uitgekookt water werd gedruppeld en de pH met phosphorzuur constant gehouden werd. De hoeveelheid phosphorzuur benodigd voor het constant houden van de pH was eveneens groter. Het natriumcitraat vertraagde het neerslaan van het phosphaat.

Werd in plaats van een natriumcitraatoplossing een oplossing van calciumcitraat (pH 7,00) gebruikt, dan trad geen vertraging op in het neerslaan van het phosphaat. Reeds na toevoeging van weinig phosphorzuur en calciumhydroxyde aan de calciumcitraat oplossing (pH 7,00, constant) ontstond een troebeling.

Indien het neerslag uit een dergelijke vloeistof gecentrifugeerd werd en in de heldere vloeistof de molaire verhouding Ca/P + citroenzuur werd bepaald, bleek deze 1,49 te zijn.

Voor de verhouding in het neerslag werd berekend Ca/P + citroenzuur = 1,52.

Bij deze berekening werd een correctie toegepast voor de mee uitgecentrifugeerde vloeistof. De hoeveelheid citroenzuur, welke van de toegevoegde hoeveelheid niet in de vloeistof teruggevonden werd, werd verondersteld in het neerslag aanwezig te zijn.

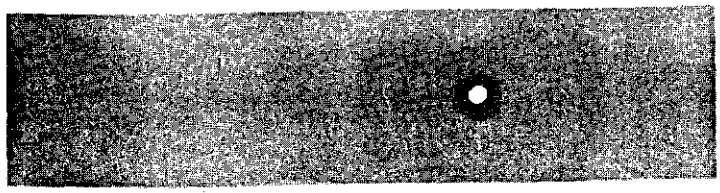
De verhouding Ca/P in het neerslag was 2,01 en na 3 x uitwassen met gedestilleerd water 1,90. In het neerslag was dus een belangrijke hoeveelheid citroenzuur aanwezig.

Van het uitgewassen en daarna aan de lucht gedroogde preparaat

werd een röntgendiagram gemaakt. Het phosphaat was amorph. In het diagram kwamen drie brede banden voor, waarvan er twee op dezelfde plaats lagen als de banden van amorph calciummagnesiumphosphaat.

Microscopisch was er geen verschil waar te nemen met de neerslagen verkregen zonder aanwezigheid van citroenzuur.

Bij herhalen van het experiment werd hetzelfde gevonden. De molaire verhoudingen waren nu echter in het neerslag.
oorspronkelijke verhouding Ca/P = 1,91
na 3 x uitwassen verhouding Ca/P = 1,80
berekende verhouding Ca/P + citroenzuur = 1,34.



Amorph calciumphosphaatcitraat.

Uit de eigen proeven en het in de literatuur vermelde werd de conclusie getrokken, dat citroenzuur evenals magnesium gemakkelijk tesamen met phosphaat neerslaat.

Het neerslaan van calciumphosphaat scheen het neerslaan van citraat te bevorderen. Evenals dit het geval was bij magnesium werd ook nu geen aanwijzing gevonden, dat calciumcitraat als afzonderlijk zout neersloeg.

De amorphe structuur van het phosphaat zou op een gelijke wijze kunnen ontstaan als wanneer magnesium aanwezig is. Het citroenzuur zou dus phosphorzuur gedeeltelijk kunnen vervangen in het rooster of aan de oppervlakte plaatsen bestemd voor phosphorzuur in kunnen nemen (zie verder discussie).

2.2.3. De invloed van natrium en kalium.

Daar in het caseinaatphosphaatcomplex van melk natrium en kalium voorkomen (zie hoofdstuk IV) en het mogelijk was, dat deze in het phosphaatgedeelte van dit complex aanwezig zijn, werd onderzocht in hoeverre de verhouding Ca/P van het phosphaat veranderde, indien het neergeslagen werd in oplossingen, welke natrium-resp. kaliumchloride bevatten.

Bij de proeven kon geen invloed van het natrium en kalium op de verhouding in het phosphaat aangetoond worden.

	proef I			proef II		
Toegevoegd per 100 ml H_2O	a	b	c	a	b	c
a. geen zout	-	-	-	-	-	-
b. mg NaCl	-	1,30	-	-	1000	-
c. mg KCl	-	-	260	-	-	1000
verhouding Ca/P in het neerslag	1,41	1,38	1,38	1,35	1,43	1,44

Indien natrium en kalium van invloed waren op de verhouding Ca/P in het neerslag, zou de bij proef 1 gevonden invloed juist tegenovergesteld zijn aan die gevonden bij proef 2. Er was dus niet met zekerheid te concluderen, dat door de aanwezigheid van natrium-en kaliumionen de verhouding beïnvloed werd (zie echter verder 2.2.4).

2.2.4. Uitwisseling van ionen.

Het zou niet ondenkbaar zijn, dat een complex zout als het beschreven phosphaat de eigenschappen van een ionenwisselaar zou bezitten.

Getracht werd het calcium uit een neerslag uit te wisselen tegen natrium.

Daartoe werd calciumphosphaat op de gebruikelijke wijze neergeslagen, zowel bij pH 7,00 als bij pH 9,00. Het neerslag werd uitgewassen met gedestilleerd water en vervolgens gedeeltelijk in een 20% NaCl oplossing gebracht, gedeeltelijk in gedestilleerd water. Nadat het 24 uur in deze vloeistoffen opgeroerd was, werden zowel het dan aanwezige neerslag als de oplossing geanalyseerd (tabel XVI).

TABEL XVI

Molaire verhoudingen Ca/P

		pH 7,00				pH 9,00			
Experiment		1	2	3	4	1	2	3	4
oorspr.	neerslag	1,42	1,42	1,45	1,41	1,64	1,52	1,60	1,52
"	oplossing	2,19	1,31	2,56?	0,82	1,39	5,31	17,00	4,72
neersl.	na uitwassen	-	-	1,42	1,40	-	-	1,59	1,50
"	na 24 uur in H_2O	1,52	-	1,46	1,51	1,54	-	1,54	1,47
opl.	idem	1,09	-	0,86	0.82	2,24	-	2,90	1,12
neersl.	na 24 uur in NaCl.	1,38	1,41	1,40	1,43	1,48	1,53	1,53	1,45
opl.	idem	2,23	2,42	2,21	2,54	2,40	7,46	13,64	3,00

De verhoudingen in de neerslagen, welke in de zoutoplossing gebracht waren, veranderden weinig t.o.v. die gevonden in de uitgewassen neerslagen. Die van de neerslagen, welke in water gebracht waren, waren echter hoger dan deze, wanneer het neerslag gevormd was bij pH 7,00; lager, wanneer het gevormd was bij pH 9,00.

Merkwaardigerwijze benaderden de gevonden verhoudingen dan in alle gevallen die van "tertiair" phosphaat.

De verhouding Ca/P in de keukenzoutoplossing was na 24 uur aanmerkelijk hoger dan die in het gedestilleerde water. Een zekere uitwisseling van calcium tegen natrium leek dan ook niet uitgesloten. Door Cameron en Bell (lit. 11) werd bij proeven over de

oplosbaarheid van "$Ca_3(PO_4)_2$" eenzelfde soort verschijnsel waargenomen. Naarmate bij de door hen uitgevoerde proeven meer kaliumchloride in de oplossing aanwezig was, ging meer calcium in oplossing dan phosphorzuur.

Bij de beschreven proeven werd calciumphosphaat neergeslagen in gedestilleerd uitgekookt water. De daarin geprecipiteerde calciumphosphaatdeeltjes waren zeer veel grover dan die welke in het caseinaatphosphaatcomplex van melk voor zullen komen. Teneinde het calciumphosphaat fijner te verdelen werd het bij pH 6,70 neergeslagen in een met een druppel calciumhydroxyde op pH 6,70 gebrachte oplossing van gedeeltelijk verstijfseld rijstebloem. (proef 1 : 0,5%, proef 2 : 0,125% rijstebloem)

De verkregen vloeistof (± 400 ml.) werd in 2 portie's verdeeld. Aan één ervan werd natriumchloride toegevoegd. Na een aantal uren- de vloeistof werd gedurende deze tijd met een mechanische roerder geroerd- werd er ultrafiltraat uit bereid m.b.v. een gelijksoortig apparaat als beschreven is door Koops (lit. 56). De eerste 10 ml ultrafiltraat werden weggeworpen.

Van de tweede portie werd eveneens ultrafiltraat bereid. In de ultrafiltraten werd het calcium en phosphorgehalte bepaald.

	Ultrafiltraat uit vloeistof waaraan geen zout toegevoegd was.		Ultrafiltraat uit vloeistof waaraan zout (10 g/200 ml) toegevoegd was.	
Proef 1	Ca %	P %	Ca %	P %
Eerste 10 ml filtraat	-	-	-	-
Volgende 20 ml "	0,0102	0,0081	0,0185	0,0122
" 20 ml "	0,0103	0,0086	0,0185	0,0122
Proef 2				
Eerste 10 ml filtraat	-	-	-	-
volgende 20 ml "	0,0037	0,0020	0,0091	0,0052
" 20 ml "	0,0033	0,0020	0,0091	0,0053

Onder invloed van het zout loste dus een deel van het calciumphosphaat op.

Bij een derde proef werd nagegaan of in het phosphaat van het neerslag natrium aanwezig was. De opzet van de proef was dezelfde als bij de vorige. De vloeistof, welke na het bereiden van het ultrafiltraat in de ultrafiltratiebuis achter bleef, werd gecentrifugeerd. Het centrifugaat werd bij de portie, waaraan natriumchloride was toegevoegd, uitgewassen tot chloorvrij met gedestilleerd water (5 x). Ook het centrifugaat uit de portie zonder zout werd 5 x uitgewassen.

Daarna werden zowel de oorspronkelijke vloeistoffen als de ultrafiltraten en de neerslagen geanalyseerd.

Proef 3	Ca %	P %
Oorspronkelijke vloeistof	0,0541	0,0336
Ultrafiltraat zonder zout	0,0060	0,0127
Ultrafiltraat met zout	0,0148	0,0210

In de neerslagen was aanwezig:

	mmol Ca	mmol P	mmol Na
neerslag zonder zout	1,09	0,75	-
neerslag met zout	1,00	0,68	0,03

Uit de proeven werd geconcludeerd, dat het phosphaat bereid volgens de beschreven methode, de eigenschap bezat ionen uit te wisselen tegen ionen uit de vloeistof. (zie verder hoofdstuk V bladz. 119).

2.2.5. Het neerslag gevormd in een oplossing met zoutconcentratie's overeenkomend met die van melk.

Uit oplossingen, welke magnesium, natrium, kalium, citroenzuur en chloor bevatten in ongeveer gelijke concentratie's als aanwezig in melk en waaraan op de bekende wijze calcium en phosphorzuur toegevoegd werden, precipiteerden neerslagen, welke ongeveer dezelfde samenstelling hadden als in hoofdstuk II berekend voor het anorganische deel van het caseinaatphosphaatcomplex. (bij veronderstelling caseinecalcium constant).

Proef.

Een oplossing, welke resp. bevatte 11-12 mg Mg, 40 mg Na, 143 mg Cl, 142 mg K, 50 mg P en 154 mg citroenzuur per 100 ml, werd met enkele druppels NH_4OH op pH 6,70 gebracht. Daarna werd calciumhydroxyde en phosphorzuur toegevoegd.

Het verkregen neerslag bleek bij microscopisch onderzoek niet kristallijn te zijn. Onder gekruiste nicols lichtte het niet op. De molaire verhouding Ca+Mg/P+citroenzuur was 1,46.

Analyse	neerslag	oplossing	totaal	toegevoegd	teruggevonden %
mmol P	2,46	3,22	5,68	5,79	98,0
" Ca	3,69	0,21	3,90	3,88	100,5
" Mg	0,12	0,44	0,56	0,59	95,0
" citroenz.	0,15	0,69	0,84	0,885	95,0

3. DISCUSSIE.

Zowel uit de resultaten van het onderzoek als uit de bestudering van de literatuur is duidelijk gebleken, dat de vorming van calciumphosphaten van een zeer veel gecompliceerder karakter is dan veelal door onderzoekers van het caseinaatphosphaatcomplex verondersteld werd. De zouten, welke bij ons onderzoek ontstonden, waren moeilijk te definieren. Terwijl de neerslagen, die verkre-

gen werden door calciumhydroxyde en phosphorzuur bij constante pH waarden boven pH 6,70 samen te voegen, in gedroogde toestand röntgendiagrammen vertoonden, welke wezen op een rooster overéénkomend met dat van hydroxyapatiet, was de chemische analyse daarmee niet in overéénstemming. De molaire verhoudingen Ca/P waren aanmerkelijk lager dan op grond van de diagrammen verwacht werd. Dit verschil werd echter zeer beslist niet veroorzaakt door de aanwezigheid van secundair phosphaat in de neerslagen, daar dan, wanneer een verhouding 1,40 gevonden werd een mengsel van 2 mmol secundair phosphaat t.o.v. 1 mmol hydroxyapatiet aanwezig geweest moest zijn.
Deze hoeveelheid secundair phosphaat was zeker in de röntgendiagrammen teruggevonden, als zij aanwezig geweest was.

Eénzelfde verschil tussen röntgendiagrammen en chemische analyse werd ook door andere onderzoekers waargenomen bij op geheel andere wijze bereide calciumphosphaten. Sommigen van hen waren van mening, dat het veroorzaakt wordt door adsorbtie van ionen van phosphorzuur aan het oppervlakte van hydroxyapatiet kristallieten. Carlström (lit. 12) gaf zijn mening als volgt weer:
It seems likely that the surface properties of these colloidal praecipitates will produce an adequate explanation of their composition, en verder "In addition to the chemosorption there may be physical adsorbtion of ions from the surrounding solution."

Bij ons onderzoek bleek, dat uitwassen vrijwel geen verandering teweeg bracht in de molaire verhouding Ca/P bij calciumphosphaat, waarin geen andere ionen aanwezig waren en de verhouding ongeveer 1,40 was. Als er sprake is van adsorbtie zal in deze neerslagen (Ca/P = 1,40) ongeveer 16% van het phosphor geadsorbeerd moeten zijn (zie berekening blz.69). Dat in een zo sterke mate physische adsorbtie van phosphorzuur aan een ongeveer neutraal zout op zal treden lijkt niet erg waarschijnlijk.
Indien zoveel "extra" phosphorzuur aan het oppervlak voor zou komen, kan men ook moeilijk van een "chemosorbtie" spreken bij een phosphaat, dat alleen uit calcium- en phosphorzuur-ionen bestaat. Het phosphaat zal dan, of bestaan uit een mengsel van calciumphosphaten of het moet een ondefinieerbaar complex phosphaat zijn, waaraan niet de naam hydroxyapatiet gegeven mag worden, ondanks het feit, dat het röntgendiagram van het preparaat lijkt op dat van hydroxyapatiet.

Van chemosorbtie zal desnoods wel gesproken kunnen worden, indien andere ionen dan die van calcium en phosphorzuur in het oppervlakte van het phosphaat op de één of andere wijze aan de zoutvorming deelnemen. De resultaten van de proeven wijzen er wel op, dat een dergelijke mogelijkheid voor magnesium en citroenzuur zou kunnen bestaan.
In hoeverre het voorkomen van magnesium en citroenzuur in de neerslagen echter als een oppervlakte verschijnsel moet worden beschouwd is nog niet duidelijk. Indien één van deze stoffen aan-

wezig was in het neerslag, wees het röntgendiagram uit dat het phosphaat amorph was. Dit zou veroorzaakt kunnen zijn door een zodanige kristalliet grootte, dat bij de gebruikte methodiek de roosters niet meer waargenomen konden worden. De opname van magnesium en citroenzuur op bepaalde plaatsen in het oppervlak zou dan de verdere aangroei van de kristallen op die plaatsen verhinderd kunnen hebben. De afmetingen van de kristallieten zullen in dat geval niet veel groter geweest zijn, dan overeén kwam met een naar verhouding gering aantal éénheidscellen.

Wanneer in dat geval echter 20 tot 30% van de kationen van het neerslag uit magnesium bestaat, kan moeilijk nog van oppervlakte verschijnselen gesproken worden. (zie 2.2.1.)

Er zijn andere onderzoekers, welke de theorie aanhangen dat inwendige substitutie's in dergelijke phosphaten zijn opgetreden.

De mening van Bjerrum (lit. 4) is in de volgende bewoordingen weergegeven:

"Auf Grund aller bekannten Tatsachen wird die Auffussung vertreten, dass alle diese Niederschlage (d.w.z. precipitaten met verhoudingen Ca/P 1,4 tot 1,7). Hydroxyapatiet Gitter enthalten und dasz der varierende neutralisationsgrad durch Aufname von Protonen an Hydroxylionen und Phosphationen am Gitter verursacht wird unter gleichzeitiger Austreibung von Calciumionen, die durch H_2O Molekeln erzetst werden. "Deze substitutie zou deels plaats vinden in het binnenste van het rooster, deels in de vorm van een adsorbtie, waarbij in de elementair cellen in of vlakbij het oppervlak een sterkere substitutie plaats zou vinden dan in het inwendige.

Voor de phosphaten, welke alleen uit calcium en phosphorzuur bestaan, zou deze opvatting juist kunnen zijn. Het voorkomen van magnesium en citroenzuur zal dan echter op een andere wijze verklaard dienen te worden.

Met de ons ter beschikking staande gegevens kan echter geen afdoende verklaring gegeven worden van de inwendige structuur van de verkregen phosphaten.

Dit zal misschien mogelijk zijn, indien een veel uitgebreider röntgenonderzoek en een meer nauwkeurige analyse van het phosphaat dan door ons verricht kon worden, uitgevoerd wordt.

Voor het beoogde doel waren de verkregen resultaten echter van veel belang. Het is wel gebleken, dat indien phosphaat als zodanig in het caseinaat phosphaatcomplex aanwezig is, dit zeer waarschijnlijk geen secundair phosphaat, tertiairphosphaat of een mengsel van deze beide zal zijn. Het zal daarentegen een complexe structuur hebben, terwijl de samenstelling min of meer afhankelijk zal zijn van de omstandigheden, waaronder het gevormd wordt. Op de variabiliteit van de samenstelling zullen vooral magnesium en citroenzuur van invloed zijn, waarschijnlijk niet alleen door de hoeveelheid, waarin zij voorkomen, maar ook door de invloed, die zij uitoefenen op de structuur van het phosphaat. Het afzonderlijk voorkomen van magnesiumphosphaat en calciumcitraat in het ca-

seinaatphosphaatcomplex leek gezien de verkregen resultaten (röntgendiagrammen) niet erg waarschijnlijk.

Het sterk oppervlakte actieve karakter van het phosphaat (vasthechten aan carboxymethylcellulose, vetbolletjes, glaswanden e.d.) is hoewel geen bewijs toch wel een aanwijzing, dat "adsorbtie" van dergelijke phosphaten aan calciumcaseinaat in melk zeer wel mogelijk is.

Indien dit zo is, zullen bij verwerking van rauwe melk bepaalde handelingen (verhogen temperatuur, indampen) de samenstelling van het phosphaat doen veranderen.

Voor verhitten, dus in rauwe melk, zal dan een complex phosphaat met een variabele samenstelling aanwezig zijn. Na verhitten een phosphaat, dat zowel wat betreft zijn chemische samenstelling als zijn röntgendiagram veel overeenkomst zal vertonen met hydroxyapatiet.

Men zou dan kunnen zeggen, dat hydroxyapatiet de stabiele vorm is, doch dat deze stabiele toestand in de rauwe melk niet wordt bereikt. Het phosphaat in rauwe melk mag dan echter geen hydroxyapatiet genoemd worden.

HOOFDSTUK IV

HET BASEBINDENDVERMOGEN VAN CASEINE. HET CASEINE-CALCIUM

1. INLEIDING.

In de literatuur (zie hoofdstuk I en II) wordt herhaaldelijk vermeld, dat in het caseinaatphosphaatcomplex van melk 10-11 mg caseinecalcium per g caseine gebonden is. Veelal wordt aangenomen, dat deze hoeveelheid gelijk is voor iedere melk (gemengde melk, melk van individuele koeien).

Het is de vraag in hoeverre deze veronderstelling verantwoord is. Een directe bepaling is niet mogelijk; de vermelde waarden werden verkregen door middel van berekeningen naar aanleiding van veronderstellingen. De methode van berekenen zowel als de veronderstelling hebben echter veel invloed.

Daar de zuurgroepen van de caseinephosphor een ongeveer met bovengenoemde waarde overeénstemmende hoeveelheid calcium zouden kunnen binden, is wel verondersteld (zie hoofdstuk I), dat altijd een met deze groepen aequivalente hoeveelheid caseinecalcium in het complex aanwezig is. Deze veronderstelling is natuurlijk aantrekkelijk, maar zij is wel wat eenzijdig. Er komen in caseine carboxylgroepen voor met een sterker zuur karakter dan de tweede zuurgroep van phosphorzuur. Deze zouden, indien de veronderstelling juist zou zijn, op andere wijze moeten zijn geneutraliseerd bijv. door inwendige zoutvorming of door andere positieve ionen.

In het complex komt altijd magnesium voor. Het zou mogelijk zijn, dat dit het caseinecalcium gedeeltelijk vervangt evenals het dat kan doen met phosphaatcalcium. Op grond van de resultaten, vermeld in hoofdstuk III, lijkt het ons echter het meest waarschijnlijk, dat het merendeel van het magnesium en al het citroenzuur in het phosphaat aanwezig zijn.

Hoewel het bij vroeger onderzoek (lit. 54) niet gelukte natrium en kalium in het complex aan te tonen, werd door ter Horst (lit. 51) aangetoond, dat ook in aanwezigheid van een overmaat calcium altijd een zekere hoeveelheid natrium aan de caseine gebonden wordt. Carr (lit. 13) vond, dat in oplossingen van caseine de hoeveelheid calcium gebonden aan de caseine afhankelijk was van de hoeveelheid natrium, die aanwezig was. Door Pyne (lit. 72) werd een uitwisseling van caseinecalcium tegen natrium en kalium mogelijk verondersteld, zelfs indien deze in concentratie's voorkomen zoals in melk.

Tijdens de bewerking van dit proefschrift verscheen een artikel van Davies en White (lit. 99), waarin het voorkomen van natrium en kalium in het complex waarschijnlijk werd gemaakt.

Uit het verschil gevonden tussen het gehalte aan kalium en natrium in melk en dat in ultrafiltraat concludeerden genoemde onder-

zoekers, dat ongeveer 5% van het natrium en 6% van het kalium in melk aan het eiwit gebonden moest zijn. Deze waarden komen ongeveer overeén met de door ons gevondene (zie verder).

Indien van caseine het basebindend vermogen wordt onderzocht, blijkt, dat bij pH waarden overeénkomend met die van melk meer calcium gebonden wordt dan overeénstemt met de binding van base alleen aan de phosphorzure groepen van caseine.

Door ter Horst (lit. 51) werd bij centrifugeproeven met oplossingen van caseine aangetoond, dat bij pH 6, 65-6, 75 per g caseine 0, 357-0, 380 mg ion calcium gebonden werd. Door Eilers (lit. 21) werd bij potentiometrisch titreren van 2 g Hammersten caseine een ongeveer gelijke waarde gevonden. Uit de grafieken gegeven door Ramsdell en Whittier (lit. 76) blijkt, dat ook hun caseine bij pH 6, 70 aanmerkelijk meer calcium dan de veronderstelde 11 mg had gebonden. (nl. 13, 5 mg ≏ 0, 34 mmol Ca/g caseine). Daar zij ten onrechte het verschil in het basebindend vermogen van caseine bij pH 6, 40 en pH 6, 70 bagatelliseerden, kwamen zij tot de conclusie, dat de hoeveelheid caseinecalcium in het complex en die gebonden bij de potentiometrische titratie's ongeveer gelijk zijn.

Door andere onderzoekers (lit. 15, 66) werden wel lagere en ongeveer met het caseinephosphor aequivalente waarden opgegeven. Het is niet altijd na te gaan, hoe deze verkregen werden. Het is bekend, dat het uitermate moeilijk is een asvrije caseine te verkrijgen. De aanwezigheid van verontreinigingen kan echter de bij het potentiometrisch titreren verkregen uitkomst belangrijk beinvloeden (zie verder).

Bij pogingen om asvrije caseine te bereiden kan men verder misschien te drastisch te werk gaan, waardoor wijzigingen in de caseine worden veroorzaakt.

Het bepalen van het basebindend vermogen van een willekeurig preparaat van caseine is dan ook niet voldoende. Men moet tevens controleren of de caseine normale eigenschappen heeft. Enige controle daarop is mogelijk door behalve het asgehalte tevens het phosphorgehalte en het stikstofgehalte te bepalen.

Klaarblijkelijk is door geen van de bovengenoemde onderzoekers het belang van hun waarnemingen voor de verklaring van de opbouw van het caseinaatphosphaatcomplex in de melk ingezien. Er is immers tot nu toe geen enkele reden te veronderstellen, dat caseine in melk een ander basebindend vermogen heeft dan de gezuiverde caseine. Bij de berekeningen van de samenstelling van het complex heeft men van de resultaten van de titratie geen gebruik gemaakt. Het maakt evenwel een groot verschil uit of rekening wordt gehouden met de meestal opgegeven hoeveelheid 10-11 mg caseinecalcium per g caseine-of met de hiervoor genoemde 14-15 mg (resp. ≏ 0, 27 mmol ≏ "ester" P of ≏ 0, 37 mmol) zoals uit het volgende voorbeeld duidelijk blijkt.

VOORBEELD.
per g caseine in het complex:

mmol totaal Ca : 0,70 mmol P:0,31
mmol Mg : 0,07 mmol citroenzuur 0,02
mmol Ca + Mg : 0,77

Indien 0,27 mmol Ca verondersteld wordt is voor het phosphaat en het citraat over:
0,77 - 0,27 = 0,50 mmol Ca+Mg of Ca+Mg/P+citroenzuur = 0,50/0,33= 1.51

Indien 0,37 mmol Ca verondersteld wordt, is voor het phosphaat en citraat over:
0,77 - 0,37 = 0,40 mmol Ca+Mg of Ca+Mg/P+citroenzuur = 0,40/0,33 = 1,21

2. EIGEN ONDERZOEK.

De resultaten zullen worden vermeld van potentiometrische titratie's uitgevoerd met bij pH 4, 6 - 4, 7 uit melk neergeslagen en daarna gezuiverde caseine. Er werd aan het volgende aandacht besteed.
a. Hoeveel calcium wordt door een dergelijke caseine gebonden bij een pH overeénkomend met die van melk? Is deze hoeveelheid ongeveer aequivalent met het caseinephosphor?
b. Is het calciumbindend vermogen van caseine voor verschillende koeien en voor caseine van éénzelfde koe gedurende de lactatieperiode gelijk.
c. Wanneer éénzelfde waarde voor de caseine in het complex geldt, als gevonden bij de titratie's is dan een eventueel verschil tussen deze waarde en de hoeveelheid in de literatuur genoemd caseinecalcium te verklaren door de aanwezigheid van andere ionen?

2.1. Potentiometrische titratie's van caseine.

Bij de titraties werd gebruik gemaakt van een automatische titrator. Er werd vooral aandacht besteed aan het basebindend vermogen bij pH 6, 70, de normale pH voor melk van Nederlandse koeien.

2.1.1. De bereiding van "zuivere" caseine:

Aanvankelijk werd de caseine bereid uit ondermelk verdund met 2 à 3 maal het volume aan gedestilleerd water. Met azijnzuur (10%) werd langzaam en onder roeren aangezuurd tot pH 4, 6-4, 7. Na bezinken van de caseine werd de bovenstaande vloeistof afgeheveld en vervangen door gedestilleerd water. Vervolgens werd de caseine opgelost met natriumhydroxyde tot pH 6. 70 en weer neergeslagen met azijnzuur (10%). De bewerkingen werden enkele malen herhaald.
Nadat de caseine voor de vierde maal neergeslagen was, werd zij éénmaal met gedestilleerd water uitgewassen en vervolgens met alcohol 96% en aether behandeld en aan de lucht gedroogd. Bij deze bereidingswijze bleef het aspercentage te hoog (1 à 2% van de droge stof). Het basebindend vermogen was bij pH 6,70 0,50-0,64 maeq. base per g caseine. Teneinde het asgehalte te verlagen werd vervolgens vaker uitgewassen; éénmaal na iedere keer, dat de caseine neergeslagen was en na de laatste maal neerslaan vijf keer. Er werd dan ± 0, 40 - 0, 50% as, berekend op de droge stof, gevonden. Werd

evenwel het N-gehalte van de drogestof bepaald en de daarvoor gevonden waarde met 6,37 vermenigvuldigd, dan was slechts 98-99% van de afgewogen droge caseine als eiwit te verantwoorden.

De indruk werd verkregen, dat ondanks het uitwassen nog azijnzuur in de caseine achterbleef. Mede omdat de aanwezigheid van zoutzuur gemakkelijker aan te tonen zou zijn, werd daarom bij de verdere proeven dit zuur gebruikt. Ook de daarmee verkregen caseine bleek nog as te bevatten (0,20-0,30% van de droge stof). Chloor was echter niet aan te tonen of slechts in zeer geringe mate (enkele honderdsten van %) aanwezig in deze caseine's.

2.1.2. Analyse van de caseine.

Daar 0,20-0,30% as overeén zou komen met 0,5 - 1,0 mg calcium per g caseine (± $\frac{1}{4}$ van het as %) en dit de uitkomst van de titratie's met 5-10% zou kunnen verlagen, werd getracht te bepalen, welke niet uit de caseine zelf afkomstige ionen aan het gevonden aspercentage bijdroegen. De caseine's werden daarom behalve op vocht, as, phosphor en stikstofgehalte, tevens onderzocht op het gehalte aan calcium, magnesium, natrium, kalium en chloor.

2.1.2.1. Analyse methoden.

Het vochtgehalte werd bepaald door de caseine te drogen tot constant gewicht in een droogstoof bij 105° C.

De percentages van de andere bestanddelen werden omgerekend in procenten van de droge caseine.

Het asgehalte werd bepaald door de caseine te verassen op een vrije vlam (werkelijk as %); soms werd tevens verast in aanwezigheid van geconcentreerd zwavelzuur (sulfaatas). Het sulfaataspercentage bleek ongeveer 0,1% hoger te zijn dan het werkelijk aspercentage.

Het phosphorgehalte werd bepaald door de caseine met behulp van zwavelzuur en salpeterzuur (+ perhydrol) te destrueren en het gevormde phosphorzuur te bepalen volgens de molybdaatmethode (lit. 83).

Voor het bepalen van het stikstofgehalte werd de microKjehldahlmethode gebruikt (kwik, zwavelzuur).

Calcium en magnesium werden bepaald volgens de complexonmethode (lit. 42) in dezelfde vloeistof als waarin het phosphor bepaald werd.

Ter controle werden blanco bepalingen uitgevoerd in een op dezelfde wijze als bij de aanwezigheid van caseine verkregen vloeistof.

Natrium en kalium werden vlamphotometrisch bepaald (lit. 41) in de oplossing, die werd verkregen door een gewogen hoeveelheid caseine met behulp van ammonia (25%) op te lossen in gedestilleerd water.

Chloor werd zowel volgens de methode Volhardt als met die van Davies bepaald (lit. 20).

2.1.2.2. Analyse resultaten.

Deze zijn voor een aantal caseine's weergegeven in tabel XVII.

TABEL XVII

Caseïne bereid	bereidingsmethode caseïne	vocht %	% van de droge stof									Maand na afkalven
			P	N	Ca	Mg	Na	K	Cl	as	Nx 6,37	
1 cas. gemengde melk	azijnzuur NaOH 1 x uitgewassen	10,7	0,82	15,43	0,02	-	0,02	-	-	1,41	98,29	
2 cas. gemengde melk	idem 1 x uitwassen	10,2	-	15,36	0,11	-	0,14	-	-	1,30	97,84	
3 cas. gemengde melk	azijnzuur NaOH veelvuldig uitgewassen	11,0	0,82	15,53	-	-	0,02/ 0,03	-	-	0,45	98,93	
4 cas. gemengde melk	azijnzuur KOH niet uitgewassen	12,3	0,76	15,23	0,09	-	0,03	0,48	-	2,16	97,00	
5 cas. gemengde melk	HCl NaOH veelvuldig uitgewassen	10,7	0,83	15,62	-	-	-	-	-	0,55	99,37	
6 cas. gemengde melk	idem	12,0	0,84	-	-	-	-	-	-	0,30	-	
7 cas. gemengde melk	HCl NaOH veelvuldig uitgewassen	10,7	0,79	15,51	-	-	0,03	-	0,27	0,62	98,80	
8 cas. gemengde melk	idem	12,4	0,82	15,54			0,05		-	0,53	99,00	
9 cas. melk van ind. koe Augusta 8	idem	14,0	0,85	15,57	+	-	++	-	0,02	0,17	99,20	1
10 idem	idem	13,3	0,86	15,59	+	-	++	-	0,025	0,31	99,30	2
11 idem	idem	11,3	0,87	15,57	+	-	++	-	0,02	0,28	99,20	3
12 cas. melk v. ind. koe Marie V	idem	12,8	0,84	15,62	+	-	++	-	0,01	0,27	99,50	4
13 idem	idem	11,4	0,87	15,60	+	-	++	-	-	0,28	99,40	5
14 cas. melk v. ind. koe Rika 37	idem	12,7	0,86	15,62	+	-	++	-	0,07	0,19	99,50	5
15 idem	idem	11,7	0,87	15,59	+	-	++	-	-	0,30	99,30	6
16 cas. melk ind. koe Mina XX	idem	13,7	0,84	15,56	+	-	++	-	0,02	0,27	99,10	8
17 idem	idem	13,5	0,87	15,60	+	-	++	-	0,01	0,23	99,40	9
18 idem	idem	11,8	0,87	15,60	+	-	++	-	-	0,29	99,40	10

Het asgehalte verkregen bij het gebruik van zoutzuur was meestal 0,2 - 0,3%. Dit percentage kon niet verantwoord worden met de in de caseine gevonden hoeveelheden "verontreinigingen". Er werden wel altijd sporen natrium, calcium en chloor gevonden. Vooral bij de caseine's 7 en 8 (zie tabel X VII) was nogal wat chloor achtergebleven. Wanneer deze caseine's in gedestilleerd water werden gebracht, was de pH lager dan 4,60. Magnesium werd nooit aangetoond, kalium alleen dan, wanneer bij de bereiding in plaats van NaOH, KOH gebruikt werd.

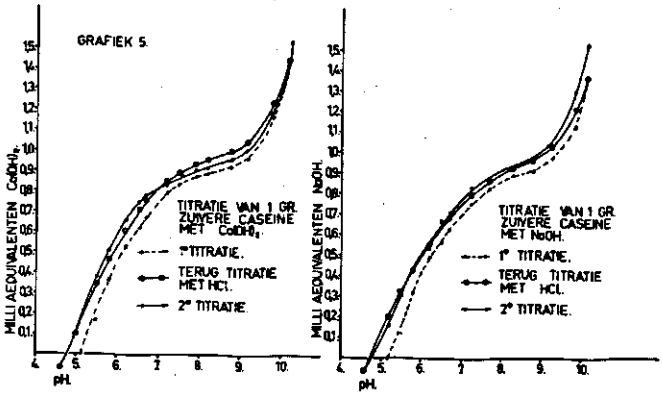
Het phosphorgehalte van met behulp van HCl bereide caseine's lag meestal tussen 0,84-0,87% (de no's 9 t/m 18). In de literatuur wordt opgegeven 0,85%.
De door ons gevonden waarden kwamen daar goed mee overeén. De melk, waaruit de caseine werd bereid, was afkomstig van verschillende koeien en uit verschillende stadia van lactatie.

Het stikstofgehalte lag bij de bereiding van caseine met zoutzuur vrijwel altijd tussen 15,55% en 15,65%, wat overeen kwam met 99,0-99,5% berekend eiwit, wanneer als omrekeningsfactor 6,37 gebruikt werd. Ook indien 0,1% (± ¼ van het asgehalte) hierbij werd opgeteld, werd geen 100% verkregen. Het bleek evenwel, dat ondanks de behandeling met alcohol en aether dikwijls nog vetachtige stoffen (bepaald met de Röse-Gottlieb methode) in de caseine achtergebleven waren (0,1-0,2%). Verder is nog geen rekening gehouden met het suikergehalte van caseine (ca 0,3%), terwijl mogelijk nog enig water in de caseine achter gebleven was bij de bepaling van het vochtgehalte. Het is echter ook mogelijk, dat de factor 6,37 iets aan de lage kant is. Uit de analysecijfers werd niet de indruk verkregen, dat bij het zuiveren een bepaalde component van de caseine verwijderd werd.

2.1.3. De potentiometrische titratie's als zodanig.

Voor de titratie's werden caseine's gebruikt zowel bereid uit gemengde melk als afkomstig uit melk van individuele koeien.
Een gewogen hoeveelheid caseine werd in 250 ml uitgekookt gedestilleerd water, waaraan ± 1 g keukenzout was toegevoegd, met calciumhydroxyde of natriumhydroxyde (± 1 n) getitreerd tot opklimmende pH waarden. Meestal werd, wanneer de pH 8,50 bereikt was, met zoutzuur (± 1 n) teruggetitreerd tot het isoelectrische punt van caseine (pH 4,6-4,7). Soms werd eerst tot hogere pH getitreerd (pH10,0-10,5) en daarna teruggetitreerd tot pH 4,6-4,7.
Daar de uitkomst van de eerste titratie mogelijkerwijs beinvloed zou kunnen worden door de aanwezigheid van verontreinigen (kationen) werd vervolgens nogmaals tot pH 8,50 getitreerd. Bij deze laatste titratie vormden zich nu en dan geleiachtige neerslagen.
Na afloop van de titratie werd het stikstofgehalte van de oplossing bepaald (macroKjehldahl of microKjehldahl methode) en met behulp van het voor het bereiden van een bepaalde pH waarde benodigde aantal maeq. base berekend hoeveel calcium resp. natrium door 1 g caseine bij die pH "gebonden" werd. Voor de berekening van de hoeveelheid caseine totaal aanwezig in de vloeistof werd als omre-

keningsfactor 6, 37 aangehouden. In grafiek 5 worden enkele voorbeelden gegeven van het verloop van de titratiecurven resp. bij gebruik van calciumhydroxyde en natriumhydroxyde.



Uit de in de grafiek weergegeven titratiecurven bleek, dat de caseine bij de eerste titratie minder loog bond bij dezelfde pH dan bij de terugtitratie en de 2e titratie met loog, wat tot uiting kwam in een verschuiving naar links voor de curve van de laatste twee titratie's. Deze verschuiving werd ook door Gortner en medewerkers (lit. 33) en door Eilers (lit. 21) waargenomen echter bij titratie's, waarbij geen keukenzout aanwezig was. Bij de aanwezigheid van neutrale zouten zouden de curven samenvallen (Eilers). De invloed van deze zouten op het verloop van de titratie's berust volgens Eilers op de instelling van evenwichten volgens Donnan tussen ionen in het water in de onmiddellijke nabijheid van het gedissocieerde deeltje en in de rest van de waterphase. Bij electrolytarme oplossingen zouden deze evenwichten een aanmerkelijke afwijking tussen de pH waarden in beide delen van de vloeistof veroorzaken.

Daar altijd voldoende neutraal electrolyt in de oplossing aanwezig was, bij de door ons uitgevoerde titratie's konden de verschuivingen van de curven moeilijk toegeschreven worden aan de instelling van Donnan evenwichten. Zij zullen waarschijnlijk veroorzaakt zijn deels door het niet volledig kationen vrij zijn van de caseine, deels door een minder snel "oplossen" van de caseine bij de eerste titratie.

Indien caseine's met een hoger asgehalte getitreerd werden, werden bij de eerste titratie en bij gelijke pH waarden lagere titratiewaarden gevonden dan bij caseine's met een lager asgehalte. Ook bij caseine's met een asgehalte van 0, 20-0, 30% werd bij de terugtitratie met zoutzuur tot pH 4,60 en de tweede titratie met calciumhydroxyde of natriumhydroxyde tot pH 8,50 altijd meer loog gebonden door de caseine dan bij de eerste titratie tot pH 8, 50. De orde van grootte van deze grotere hoeveelheid was zodanig als op grond van het asgehalte van de caseine verwacht kon worden. De curven verkregen bij de terugtitratie met zoutzuur en die bij de tweede titratie met loog vielen echter vrijwel samen.

Het toevoegen van natriumchloride had op de uitkomsten, verkregen bij de titratie met calciumhydroxyde wel enige invloed, zoals blijkt uit tabel XVIII, waarin het aantal maeq. calcium gebonden per g caseine is weergegeven voor éénzelfde caseine bij al of niet toevoegen van keukenzout.

TABEL XVIII

mg NaCl per 250 ml H^2O	1° titratie m aeq. Ca gebonden bij pH 6,70	2° titratie m aeq. Ca gebonden bij pH 6,70
0	0,74	0,77
250	0,76	0,78
500	0,79	0,79
1000	0,79	0,84 ?
2000	0,785	0,79

De hoeveelheid loog, die bij pH 6,70 door caseine gebonden werd, was hoewel enigszins varierend toch tamelijk constant.
Voor de caseine's afkomstig uit melk van een individuele koe, aan het begin of aan het einde van haar lactatie, van verschillende koeien of uit gemengde melk was de waarde gelijk.

Voor calcium bedroeg zij bij de tweede titratie met loog gemiddeld 0,80 maeq. calcium per g caseine met een variatie van 0, 74-0, 83, voor natrium werd de wat lagere waarde 0, 69 maeq gevonden met een variatie van 0, 66-0, 73, (zie tabel XIX). Het is moeilijk dit verschil zonder nader onderzoek te verklaren. Klaarblijkelijk wordt calcium tussen pH 4, 6 en 8.0 gemakkelijker door caseine gebonden dan natrium. Bij hogere pH (pH > 10) verdwijnt het verschil.

Het basebindend vermogen van caseine bleek aanmerkelijk groter te zijn dan overéén zou komen met een binding van calcium of natrium alleen aan de phosphorzuurgroepen van caseine. Zowel bij de eerste als bij de tweede titratie met loog werden hogere waarden gevonden dan 0, 54 maeq. (0, 85% phosphor ≙ 0, 27 mmol Ca ≙ 0, 54 maeq. base). Wanneer de door ons voor calcium gevondene vergeleken werden met enkele uit de literatuur afgeleide bleek een tamelijk goede overeenstemming. Door ons werd gevonden 0, 74-0, 83 maeq. calcium per g caseine, door Eilers (lit. 21) 0, 75, door ter Horst (lit. 51) 0, 72-0, 76, door Ramsdell en Whittier (lit. 76) 0, 68 maeq.
Het verschil tussen de waarden van de caseine's onderling leek meer toegeschreven te moeten worden aan de bepalingsmethode dan aan een werkelijk verschil; zowel het phosphorpercentage als het percentage stikstof van de caseines vertoonde weinig variatie. (zie tabel XVII).

TABEL XIX.

Basebindend vermogen van caseine bij pH 6,70

Caseïne bereid uit	Bereiding	Ca in maeq per g cas.			Na maeq per g caseïne			maanden na afkalven.
		1e titratie	terug titratie	2e titratie	1e titratie	terug titratie	2e titratie	
1 gemengde melk	azijnzuur NaOH 1xgewassen	0,56	0,54	-	-	-	-	
2 idem	idem	0,64	0,67	-	0,56	0,56	-	
3 idem	azijnz. NaOH veelvuldig gewassen	0,70	0,74	-	-	-	-	
4 idem	azijnz. NaOH niet uitgewassen	0,50	0,55	-	0,44	0,50	0,77	
5 idem	HCl- NaOH veelvuldig uitgewassen	0,80	0,84	-	-	-	-	
6 idem	idem	0,81	0,83	-	0,75	0,75	-	
9 melk ind. koe Augusta II	idem	0,73	0,75	0,74	0,61	0,60	0,66	1
10 idem	idem	0,83	0,82	0,83	0,67	0,68	0,73	2
11 idem	idem	0,77	0,81	0,80	0,66	0,65	0,73	3
12 melk ind. koe Marie V	idem	0,76	0,73	0,82	0,67	0,70	0,68	4
13 idem	idem	0,66	0,71	0,79	0,66	0,66	0,69	5
14 melk ind. koe Rika 37	idem	0,81	0,81	0,83	0,70	0,68	0,70	5
15 idem	idem	0,72	0,73	0,79	0,63	0,65	0,67	6
16 melk ind. koe Mina XX	idem	0,73	0,78	0,77	0,66	0,67	0,67	8
17 idem	idem	0,68	0,72	0,75	0,61	0,65	0,66	9
18 idem	idem	0,73	0,76	0,83	0,64	0,69	0,67	10

2.2. De aanwezigheid van natrium en kalium in het caseinaatphosphaat complex.

Indien de bij titratie's gebruikte caseine éénzelfde basebindend vermogen heeft als de caseine in het caseinaatphosphaatcomplex van melk- er is geen reden om te veronderstellen, dat dit niet het geval is, - dan zou een aanmerkelijke grotere hoeveelheid caseinecalcium in het complex voor kunnen komen dan veelal berekend werd (zie hoofdstuk I). Bij pH 6,70 - de pH van melk - zou dan 16 mg calcium per g caseine gebonden kunnen zijn, indien tenminste geen andere basen worden gebonden. Het is echter niet waarschijnlijk, dat inderdaad in het complex zoveel caseinecalcium aanwezig is, tenminste wanneer, zoals verondersteld wordt, calciumphosphaat aanwezig is. Bij de berekeningen zal de molaire verhouding Ca/P in het phosphaat dan lager worden dan op grond van de experimenten in hoofdstuk III vermeld te verwachten zou zijn en bijna overeénkomen met de Ca/P verhouding van secundair phosphaat. Voor de aanwezigheid van een dergelijk zout is echter geen enkele aanwijzing. De aanwezigheid van het calciumphosphaat met eigenschappen zoals beschreven in hoofdstuk III is waarschijnlijker. Er moest dan echter een andere verklaring te vinden zijn voor het lagere gehalte aan caseinecalcium in het caseinaatphosphaatcomplex.
Er is gebleken, dat caseine ook indien voldoende calcium aanwezig is, de neiging heeft natrium te binden. Een mogelijkheid zou dus kunnen zijn, dat in het complex behalve calcium ook natrium en kalium voorkomen en dat dientengevolge de hoeveelheid caseinecalcium lager is dan boven werd berekend. Deze veronderstelling werd nader onderzocht.

2.2.1. De berekening van eventueel in het complex aanwezig natrium en kalium.

Met dezelfde gegevens als gebruikt voor tabel VII hoofdstuk II werd berekend hoeveel maeq. natrium en kalium aanwezig zouden moeten zijn in het complex, indien aan de volgende voorwaarden werd voldaan.

1e Het basebindend vermogen van de caseine is 0,40 mmol calcium/g caseine.
2e De verhouding in het calciumphosphaat is voor Ca+Mg/P+ citroenzuur = 1,40.
3e Het magnesium gedraagt zich als calcium.
4e Het citroenzuur gedraagt zich als phosphorzuur.

De voorwaarden 2, 3 en 4 zijn niet geheel in overeenstemming met het in hoofdstuk III gevondene. De uitkomst van de berekeningen werd dan ook slechts als een voorlopige aanwijzing beschouwd voor de orde van grootte, waarin natrium en kalium voor zouden kunnen komen. De resultaten van de berekeningen zijn weergegeven in tabel XX.

Het gemiddelde van alle berekeningen was 0,19 maeq. Na + K/g caseine. Dit zou aequivalent zijn met 0,19 maeq. calcium, zodat

TABEL XX

Berekende maeq Na + K per g caseine

Jonge Marie II	Jitske III	Tweeling 27	Irma 2 *
0,37	0,19	0,22	* -.-
0,12	0,08	0,21	0,01
0,10	0,18	0,32	0,29
0,10	0,19	0,20	0,20
0,17	0,05	0,25	0,23
0,16	0,23	0,27	* -.-
0,06	0,16	0,21	0,26
0,16	0,14	0,26	-.-
0,26	0,13	0,15	0,23
0,07	0,17	0,01	* -.-
0,20	0,18	0,20	0,25
0,19	-.-	0,29	* -.-
0,19	0,25	0,34	-.-.
0,15	-.-	0,23	* -.-
0,18	0,33	0,24	0,23
-.-	0,23		* -.-
0,13			0,24
0,12			
0,22			
0,16			
0,19			
0,17			
0,24			
-.-			
0,12			
0,24			
0,17			
-.-			
0,04			
0,17			
0,21			
0,23			
0,24			
-.-			
0,19			
0,11			
0,21			
0,24			
-.-			
0,17			
0,18			
0,15			
0,26			
0,17			

* Bij de analyse van de melk en de wei werd in de gecorrigeerde wei meer citroenzuur gevonden dan in de melk

Gemiddeld:	Jonge Marie II	0,18 maeq Na + K
"	Jitske III	0,18 maeq Na + K
"	Tweeling 27	0,23 maeq Na + K
"	Irma II	0,22 maeq Na + K

in het complex ± 0,60 maeq = 0,30 mmol caseinecalcium voor zou komen, een waarde welke gezien de veronderstelling, vrij goed in overeenstemming was met de in de literatuur vermelde. In het complex in melk zou dus ongeveer drie-vierde gedeelte van de vrije zuurgroepen met calcium (en magnesium) en één-vierde met natrium en kalium zouten vormen. In ieder monster melk afzonderlijk zal de hoeveelheid calcium (+ magnesium) gebonden aan de caseine mede bepaald worden door andere aanwezige ionen. Zo zal, wanneer minder phosphorzuur en citroenzuur aanwezig zijn meer calcium aan de caseine gebonden kunnen zijn en minder natrium en kalium.

2.2.2. De bepaling van de hoeveelheid natrium en kalium in het complex.

Van een aantal monsters melk zowel gemengde als afkomstig van individuele koeien werd vervolgens in de melk en in de wei het percentage caseine, vet, natrium, kalium, chloor en lactose bepaald. De wei werd verkregen door de melk te doen stremmen met behulp van stremsel bereid uit gedroogde ongezouten kalfsmagen. Hoewel dit stremsel slechts sporen natrium en kalium bevatte, werd voor alle zekerheid ook aan de melk éénzelfde hoeveelheid van het stremsel, nadat het geinactiveerd was, toegevoegd. Als correctiefactor voor de wei werd dezelfde gebruikt als bij de berekeningen in hoofdstuk II. De resultaten zijn weergegeven in tabel XXI.

Het chloorgehalte was in de wei over het algemeen iets hoger dan in de melk. Het percentage lactose was nu eens in de wei dan weer in de melk wat hoger.
De hoeveelheid natrium en kalium daarentegen waren in de wei altijd lager dan in de melk. In het complex zouden dus zowel natrium als kalium voorkomen, indien tenminste geen verschuivingen in de verdeling over de phasen optreedt tijdens het stremmen. Evenmin als dit voor calcium waarschijnlijk werd geacht, wordt het dat voor natrium en kalium. Het aantal maeq natrium + kalium varieerde van 0,04 tot 0,24 maeq per g caseine. Het gemiddelde van alle waarnemingen was 0,15 maeq. Het leek dan ook waarschijnlijk, dat de veronderstellingen geuit naar aanleiding van de gegevens in tabel XX juist waren.

2.2.3. Uitwisseling caseinecalcium tegen natrium.

Dat ook, indien voldoende calcium aanwezig is, toch altijd natrium (en kalium) aan de caseine gebonden kan zijn, bleek uit de volgende proeven.

Een gewogen hoeveelheid caseine werd gesuspendeerd in gedestilleerd uitgekookt water en met calciumhydroxyde tot pH 6,70 getitreerd. Na afloop van de titratie werd het calciumgehalte in de oplossing bepaald. Een deel van de oplossing werd geultrafiltreerd en in het ultrafiltraat werd eveneens het calciumgehalte bepaald. Aan een ander deel (gelijk volumen) werd keukenzout toegevoegd. Na een zekere tijd roeren werd ook uit dit deel ultrafiltraat bereid en het calciumgehalte daarvan bepaald. Het ultrafiltraat gemaakt uit de oplossing, waaraan zout was toegevoegd, bevatte aanzienlijk meer calcium dan dat uit de oplossing zonder zout.

	Ca gehalte		
Proef:	Ca caseinaat	ultrafiltraat zonder zout	ultrafiltraat met zout
1	0,0474%	0,0048%	0,0299%
2	0,0444%	0,0034%	0,0137%

TABEL XXI

	Gemengde melk									melk van individuele koeien						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Caseïne %	2,51	2,37	2,39	2,60	2,58	2,37	2,48	2,61	2,63	2,69	2,50	2,54	2,33	2,50	2,48	2,43
mg Na per 100 g melk	44,7	36,6	43,9	44,3	37,7	48,1	38,2	45,0	39,3	110,0	49,7	59,4	50,4	53,0	51,3	43,2
mg Na in wei uit 100 g melk	41,8	33,7	39,5	41,9	35,9	44,5	36,1	41,4	38,1	102,2	47,6	37,5	47,8	42,5	48,6	41,9
mg K per 100 g melk	140,1	159,5	157,1	178,7	163,2	155,0	156,3	155,5	165,2	120,2	162,4	124,4	144,0	148,0	151,8	147,9
mg K in wei uit 100 g melk	132,1	146,6	147,3	161,7	149,9	141,7	144,8	153,4	158,3	110,0	152,6	116,6	138,8	142,3	141,4	146,2
mg Cl per 100 g melk	109,3	109,3	96,3	101,2	95,7	106,0	107,4	100,2	94,8	175,5	123,5	98,8	128,7	137,7	123,3	107,1
* mg Cl in wei uit 100 g melk	108,9	109,6	97,8	104,8	99,3	107,1	112,3	105,0	95,3	175,4	124,9	100,7	131,2	138,8	126,8	112,0
Lactose % melk	-	-	-	4,3	4,6	4,3	4,3	4,3	4,3	2,8	4,2	4,5	4,1	3,9	4,2	3,9
Lactose % wei gecorrigeerd	-	-	-	4,4	4,5	4,3	4,4	4,5	4,3	3,0	4,3	4,3	4,3	3,9	4,1	3,8
mmol Na in complex	0,13	0,13	0,19	0,10	0,08	0,16	0,09	0,16	0,05	0,34	0,09	0,08	0,11	0,46	0,12	0,06
mmol K in complex	0,21	0,33	0,25	0,44	0,34	0,34	0,30	0,03	0,18	0,25	0,25	0,20	0,13	0,15	0,27	0,04
mmol Na/g caseïne	0,05	0,05	0,08	0,04	0,03	0,07	0,04	0,06	0,02	0,13	0,04	0,03	0,05	0,18	0,05	0,02
mmol K/g caseïne	0,08	0,14	0,10	0,17	0,13	0,14	0,12	0,01	0,07	0,09	0,10	0,08	0,06	0,06	0,11	0,02
mmol Na+K/g caseïne	0,13	0,19	0,18	0,21	0,16	0,21	0,16	0,07	0,09	0,22	0,14	0,11	0,11	0,24	0,16	0,04

* Opgemerkt wordt, dat het Cl gehalte van de gecorrigeerde wei vaak iets hoger was dan van de melk. Dit werd door ons toegeschreven aan de methode (methode Volhardt en Davies) en ook aan het niet in rekening brengen van de hoeveelheid gebonden water.

Bij proef 1 werd aan 180 ml calciumcaseinaat 5 g keukenzout toegevoegd, bij proef 2 aan 180 ml 0,402 g. De caseineoplossing werd verkregen door bij proef 1 16,042 g caseine, bij proef 2 16,037 g caseine in 400 ml water te suspenderen en te titreren.

Bij de bereiding van het ultrafiltraat werd de eerste 10 ml filtraat weggeworpen. De bepaling van het calciumgehalte vond plaats in de 35 ml filtraat, die daarna verkregen werd.

Werd aan een suspensie van caseine voor de titratie zout toegevoegd en na afloop van de titratie het calcium en natriumgehalte zowel in de oorspronkelijke vloeistoffen als in eruit bereide ultrafiltraten bepaald, dan werd het volgende gevonden.

Proef		ml	N-gehalte	Ca-gehalte	Na mg/100 ml
1	oorspronkelijke opl.	180	0,540%	0,0508%	69,8
	ultrafiltraat 1 : 5		0,008%	-	-
	2 : 15		-	0,0141%	62,8
	3 : 25		-	0,0139%	60,3
2	oorspronkelijke opl.	180	0,523%	0,0522%	136,4
	ultrafiltraat 1 : 3		0,005%	-	-
	2 : 15		-	0,0196%	122,0
	3 : 15		-	0,0198%	123,0
	4 : 11		-	0,0210%	122,0

Ook bij deze proeven werd dus geconstateerd, dat bij de aanwezigheid van keukenzout vrijveel van het calcium in oplossing blijft, terwijl een gedeelte van het natrium aan de caseine gebonden wordt. De mate waarin caseinecalcium vervangen wordt door natrium, leek gezien de uitkomsten van de proeven afhankelijk van de hoeveelheid keukenzout, die toegevoegd werd. Bij proef 1 werd ongeveer 2 mg natrium per g caseine gebonden; bij proef 2 4,3 mg. Hetzelfde werd door Carr (lit. 13) waargenomen.

3. DISCUSSIE.

Bij het onderzoek van het basebindend vermogen van caseine bleek, dat dit bij pH 6,70 aanmerkelijk groter is dan met een binding van kationen alleen aan de phosphorzure groepen van caseine overeen zou komen, zoals door verscheidene onderzoekers werd verondersteld.

Indien caseine potentiometrisch getitreerd werd met calciumhydroxyde in aanwezigheid van natriumchloride bleek per g caseine bij de pH van melk ± 0,80 maeq calcium "gebonden" te worden. Voor natrium was dit ± 0,70 maeq.

Deze waarden waren dezelfde voor caseine's afkomstig uit verschillende soorten melk (gemengde melk, melk van individuele koeien in verschillende lactatie stadia).

De aanwezigheid van 0, 80 maeq. caseinecalcium in het caseinaatphosphaatcomplex leek echter niet waarschijnlijk, wanneer verondersteld werd, dat calciumphosphaat van dezelfde aard als beschreven in hoofdstuk III aanwezig was.

Bij een poging het verschil tussen de hoeveelheid caseinecalcium gevonden bij de titratie's en die veelal berekend uit de samenstelling van melk te verklaren, werd verondersteld, dat natrium en kalium in het caseinaatphosphaatcomplex aanwezig zouden zijn. De juistheid van dit vermoeden kon door berekeningen en proefnemingen bevestigd worden.

Het bleek, dat de hoeveelheid natrium + kalium aanwezig in het complex van melk in de orde van grootte van 0,15 maeq. per g caseine lag.

De waarde voor verschillende melkmonsters varieerde echter belangrijk.

Verondersteld werd, dat de hoeveelheid gebonden aan de caseine afhankelijk zou zijn van de verdere samenstelling van de melk. Met proeven, waarbij aan calciumcaseinaat keukenzout werd toegevoegd, werd aannemelijk gemaakt, dat o.a. het natriumchloride aanwezig in melk van invloed kan zijn op de hoeveelheid natrium aan de caseine in het complex gebonden.

De hoeveelheid caseinecalcium zal niet alleen afhankelijk zijn van het in de melk aanwezige natrium en kalium, maar ook van de hoeveelheid phosphorzuur en citroenzuur. (zie verder hoofdstuk V).

De veronderstelling, dat steeds een constante hoeveelheid caseinecalcium voor zal komen lijkt evenmin houdbaar, als de veronderstelling, dat het phosphaat steeds constant van samenstelling zal zijn. (zie hoofdstuk III).

HOOFDSTUK V

CALCIUM CASEINAAT EN CALCIUMPHOSPHAAT

Als bij de pH van melk calciumhydroxyde en phosphorzuur bijeen gebracht worden in gedestilleerd water, ontstaan gemakkelijk complexe phosphaten.

In deze phosphaten kunnen behalve calcium en phosphor magnesium en citroenzuur voorkomen en misschien ook natrium en kalium (zie hoofdstuk III). De samenstelling ervan varieert met die van de oplossing, waarin zij gevormd worden.

Wanneer de phosphaten gevormd worden in oplossingen, welke in samenstelling overeénkomen met het melkserum, hebben zij een samenstelling, die overeénkomt met die, welke voor het calciumphosphaat uit het caseinaatphosphaatcomplex van melk berekend kan worden (zie hoofdstuk II). Het lijkt dan ook niet onwaarschijnlijk, dat een phosphaat van gelijke aard in dit complex in melk aanwezig is.

Aan de caseine zal niet alleen calcium gebonden zijn maar tevens natrium en kalium en misschien ook magnesium (zie hoofdstuk IV). Evenals de samenstelling van het phosphaat waarschijnlijk niet voor iedere melk gelijk zal zijn, zal dit het geval zijn met het caseinaat. De structuur van het caseinaatphosphaatcomplex in melk zal dan ook variabeler zijn dan uit de literatuur (zie hoofdstuk I) volgt.

Teneinde een beter inzicht in deze structuur te verkrijgen werden potentiometrische titratie's uitgevoerd en kunstmatige caseinaatphosphaatcomplexen samengesteld.

1. POTENTIOMETRISCHE TITRATIE'S.

Volgens Eilers (lit. 21) oefent caseine, mits in voldoende hoeveelheid aanwezig, invloed uit op de potentiometrische titratie van phosphorzuur met calciumhydroxyde.

Het bleek hem, dat langzaam titreren zonder caseine resulteerde in de vorming van secundair phosphaat. Was echter caseine aanwezig dan was het aantal maeq. base nodig voor de neutralisatie van het phosphorzuur bij gelijke titratieomstandigheden groter dan overeen kwam met de vorming van secundair phosphaat.

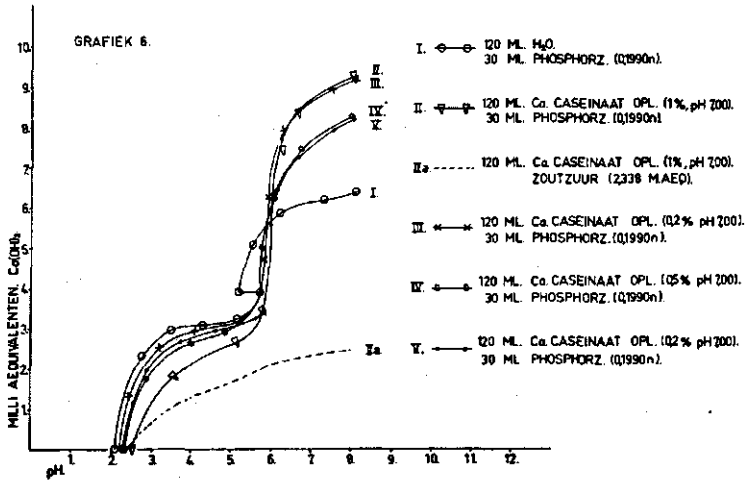
Eilers veronderstelde, dat in het laatste geval tertiair phosphaat gevormd werd echter alleen wanneer de verhouding caseine/phosphorzuur boven een bepaalde waarde bleef. Als zij daar beneden kwam, zou de overmaat phosphorzuur als secundair phosphaat neerslaan.

Uit zijn onderzoek trok Eilers de conclusie, dat caseine met calcium en phorphorzuur dubbelzouten vormt. Ook albumine en andere eiwitten zouden dit kunnen doen.

1.1. Potentiometrische titratie's van phosphorzuur met calciumhydroxyde in aanwezigheid van caseine.

Ofschoon de door Eilers gegeven verklaringen ons niet juist leken (zie ook hoofdstuk III) hebben we toch enkele soortgelijke titratie's uitgevoerd, daar de resultaten ervan van belang zouden kunnen zijn voor het verdere onderzoek.

Bij de titratie's werd in zoverre afgeweken van de door Eilers gevolgde werkwijze, dat eerst caseine getitreerd werd met calciumhydroxyde tot een bepaalde pH (pH 7-8,5) daarna phosphorzuur toegevoegd werd en vervolgens weer getitreerd werd tot dezelfde pH. De hoeveelheid base, nodig voor de laatste titratie werd uitgezet tegen de pH (grafiek 6).



Als calciumcaseinaat aanwezig was, was meer calciumhydroxyde nodig dan met de vorming van secundair phosphaat overéén kwam. Reeds tussen pH 5,5 - 6,5 moest zoveel base toegevoegd worden, dat vorming van alleen secundair phosphaat uitgesloten was. Dat de bij de titratie na toevoeging van phosphorzuur verbruikte hoeveelheid base nodig was voor de neutralisatie van het phosphorzuur blijkt uit grafiek 6, IIa.

Zonder calciumcaseinaat werd bij dezelfde snelheid van titreren secundair phosphaat gevormd.

In de vloeistof, waarin de titratie uitgevoerd werd, bezonk na afloop een neerslag. De bovenstaande vloeistof was volkomen helder. Het neerslag werd uitgecentrifugeerd en onderzocht op calcium en phosphaatphosphor. (zie tabel XXII)

Bij pH 8,00 zal door caseine per gram ±0,45 mmol calcium gebonden worden (waarde gevonden bij het onderzoek vermeld in hoofdstuk IV). Indien alle caseine met het phosphaat neergeslagen was, zou bij de resp. titratie's minimaal aan phosphaatcalcium in het neerslag aanwezig geweest zijn.

TABEL XXII

Neerslag	mmol Ca	mmol P
I*	2,78	2,97
II	3,58	2,32
III	4,26	2,83
IV	3,36	2,52
V	3,28	2,45

* zie grafiek 6

I : 2,78 - 0,0 = 2,78 mmol calcium
II : 3,58 - 0,45 x 1,2 = 3,04 " "
III : 4,26 - 0,45 x 1,2 x 0,2 = 4,15 " "
IV : 3,36 - 0,45 x 1,2 x 0,5 = 3,09 " "
V : 3,28 - 0,45 x 1,2 x 0,2 = 3,17 " "

De verhoudingen van calcium en phosphor in het phosphaat zouden minimaal dus geweest zijn: I : 0,94, II : 1,27, III : 1,47, IV : 1,22, V : 1,29.

Bij microscopisch onderzoek bleek alleen neerslag I kristallijn te zijn. (rozetten secundair calciumphosphaat). De andere neerslagen bestonden uit conglomeraten van aan elkaar gekitte deeltjes, welke met gekruiste nicols niet oplichtten.

De hoeveelheid caseine scheen van weinig invloed te zijn. Bij titratie II werd 1,2 g, bij titratie III 0,24 g gebruikt. Beide titratie's verliepen echter geheel gelijk. Het laatste was ook het geval bij de titratie's IV en V.

Het verloop van de titratiecurven II en III was anders dan van IV en V. Bij de titratie's II en III werd de caseine gedurende lange tijd getitreerd en na de titratie bleef de oplossing een nacht overstaan. Bij de titratie's IV en V werd de caseine sneller getitreerd en direct na afloop van de titratie phosphorzuur toegevoegd. Het is mogelijk, dat het verschil in titratiecurve veroorzaakt werd door de verschillende wijze van werken (zie verder bladz. 114).

Bij volgende proeven werd na afloop van de titratie van de caseine met calciumhydroxyde (pH 8,50) het stikstof- en het calciumgehalte van de vloeistof bepaald.

Aan twee portie's van dezelfde caseinaatoplossing (100 ml.) werden resp. 5 en 10 ml phosphorzuur van dezelfde sterkte toegevoegd. Daarna werden zij met calciumhydroxyde getitreerd tot pH 8,50 (grafiek 7) en daarna gecentrifugeerd. De overblijvende vloeistof werd geanalyseerd.

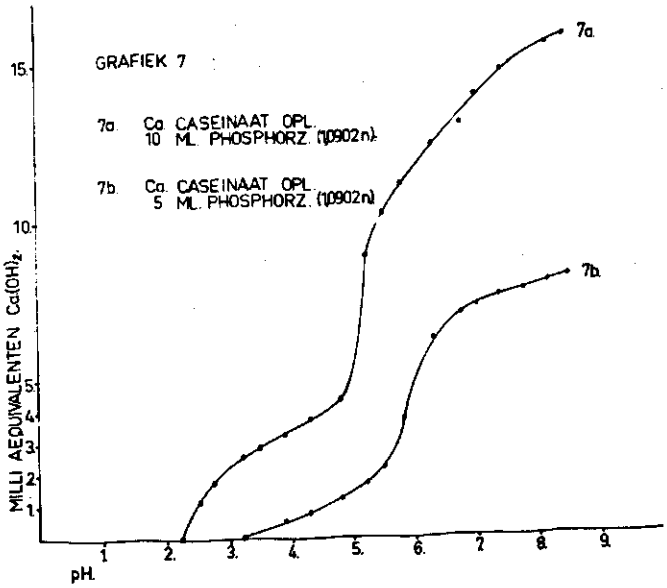
Proefresultaten.

	Titratie I Ca Caseinaat + 5 ml phosphorzuur toegevoegd	 teruggevonden in oplossing	Titratie II Ca caseinaat + 10 ml phosphorzuur toegevoegd	 teruggevonden in oplossing
g caseine	1,761	0,230	1,761	0,087
maeq Ca	1,73+8,17	1,022	1,73+15,79	1,150
maeq P	5,466	0,173	10,932	0,062

In het neerslag moest dus aanwezig zijn:

g caseine	1,531	1,674
maeq Ca	8,878	16,370
maeq P	5,293	10,872

Bij pH 8,50 bindt caseine per g maximaal (waarde bepaald bij titratie's, zoals uitgevoerd in hoofdstuk IV) 1,00 maeq Ca. Voor het phosphaat was dus resp. overgebleven:
bij titratie 1: 8,878 - 1,531 = 7,347 maeq Ca
bij titratie 2: 16,370 - 1,674 = 14,696 maeq Ca
De verhouding Ca/P in het phosphaat zou dus geweest zijn:
titratie 1: 7,347/5,293 = 1,39
titratie 2: 14,696/10,872 = 1,35
Per g caseine zou totaal (caseinecalcium en phosphaatcalcium) gebonden zijn:

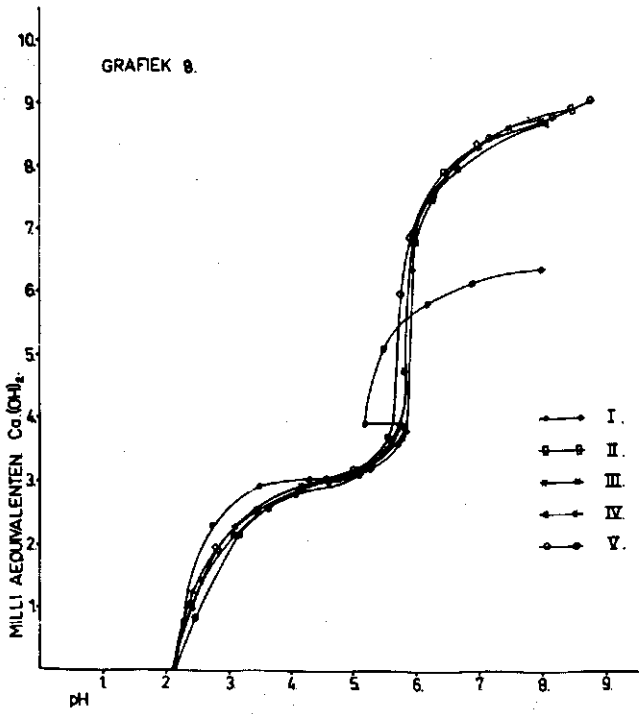


titratie 1: 8,878/1,531 = 5,80 maeq. Ca
titratie 2: 16,370/1,674 = 9,80 maeq. Ca
Wanneer alleen dubbelzouten gevormd waren op de door Eilers voorgestelde wijze, had per g caseine slechts 4 x 1,00 = 4,00 maeq calcium gebonden kunnen zijn.
De vorming van zuivere dubbelzouten leek dus niet erg waarschijnlijk. De resultaten wezen meer op een "adsorbtie".
Het was wel duidelijk, dat in aanwezigheid van calciumcaseinaat voor de titratie van éénzelfde hoeveelheid phosphorzuur meer base nodig was dan in afwezigheid daarvan.

1.2. Potentiometische titratie's van phosphorzuur met calciumhydroxyde in aanwezigheid van andere organische stoffen dan caseine.

Het feit, dat ook albumine en volgens Eilers waarschijnlijk alle eiwitten éénzelfde effect op de titratie hebben, zou een gevolg kunnen zijn van de specifieke structuur van deze stoffen. Van caseine zouden bepaalde actieve groepen bijv. de COOH groepen, de PO_4 groepen of de NH_2 groepen ervoor verantwoordelijk kunnen zijn. Ook de molecuulgrootte zou van belang kunnen zijn.

Als dit zo was zouden ook andere stoffen, welke één of meer van van deze groepen bevatten, éénzelfde effect kunnen hebben.
Er werden daarom titratie's uitgevoerd met een aantal hoogmoleculaire stoffen, welke wel COOH groepen bevatten echter geen phosphorzuurgroepen en NH_2 groepen.
Het bleek, dat stoffen zoals carboxymethylcellulose (C. M. C.), pectine en alginine in meer of mindere mate dezelfde eigenschap



I. 30 ml phosphorzuur (0,995 x 0,2 n)
120 ml H_2O
Na afloop van de titratie naaldvormige kristallen en rozetten als van secundair phosphaat.

Analyse neerslag: 2,78 mmol Ca
2,97 mmol P } → Ca/P = 0,94

II. 120 ml 0,2 C.M.C. (no HZ 858) met $Ca(OH)_2$ op pH 8,50 gebracht, daarna 30 ml phorphorzuur 0,995 x 0,2 n toegevoegd en gefiltreerd met calciumhydroxyde.

Na afloop van de titratie onder microscoop velletjes, welke door toevoegen van zoutzuur onzichtbaar werden.

Analyse neerslag: Ca 4,10 mmol
P 3,00 mmol } → Ca/P = 1,38

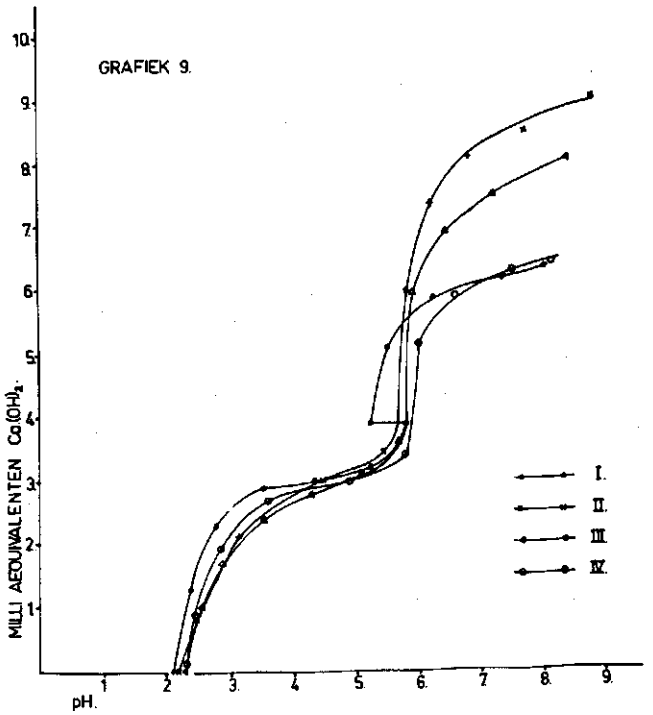
III. idem C.M.C. no XZ 550

Analyse neerslag: Ca 3,50 mmol
P 2,44 mmol } → Ca/P = 1,43

IV. idem C.M.C. no XT 843, werd i.p.v. 0,2%, 0,05% genomen dan werd ongeveer dezelfde curve verkregen.

V. idem C.M.C. no HZ 555.

Analyse neerslag: Ca 3,96 mmol
P 2,78 mmol } → Ca/P = 1,42



I. 120 ml H_2O
30 ml phosphorzuur 0,995 x 0,2 n

II. 120 ml C.M.C. no HZ 555 0,2%
30 ml phosphorzuur 0,995 x 0,2 n

III. 120 ml C.M.Z. 0,5% substitutiegraad 0,4
30 ml phosphorzuur 0,995 x 0,2 n

Na afloop van de titratie's bleek het "neerslag" onder de microscoop bekeken te bestaan uit een netwerk van doorzichtige bolletjes, waarop kleine kristalletjes afgezet waren, en uit ondoorzichtige velletjes. Kristalletjes en ondoorzichtige velletjes verdwenen, wanneer zoutzuur toegevoegd werd. Waarschijnlijk was op de bolletjes alleen secundair phosphaat, op de velletjes minder zuur phosphaat dan secundair phosphaat afgezet.

Analyse neerslag: Ca 3,46 mmol
P 2,66 mmol } → Ca/P = 1,29

IV. idem, 0,2% C.M.Z., substitutiegraad 0,4
Alleen een netwerk van bolletjes met kristallen.

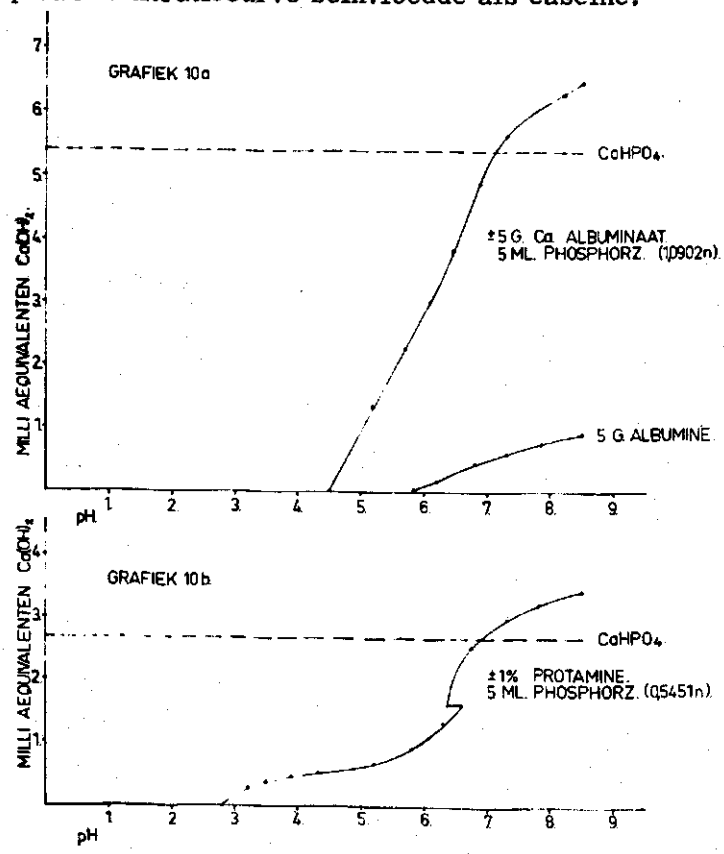
Analyse neerslag: Ca 2,55 mmol
P 2,40 mmol } → Ca/P = 1,06

bezaten, evenals carboxymethylzetmeel (C. M. Z.). Het laatste echter alleen, indien het in grote concentratie's aanwezig was. Enkele titratie's met C. M. C. en C. M. Z. zijn weergegeven in de grafieken 8 en 9.

Wanneer een basisch eiwit zoals protamine, een eiwit bereid uit zalm, bij de titratie aanwezig was, verliep de titratie curve geheel anders (grafiek 10b). De neutralisatie van het phosphorzuur werd klaarblijkelijk aanvankelijk vertraagd.

Eerst bij pH 6,60-6,70 ontstond phosphaat. De pH van de vloeistof liep plotseling en snel terug, waarschijnlijk tengevolge van het afzetten van secundair phosphaat.

Een potentiometische titratie van een mengsel van calcium albuminaat en phosphorzuur met calciumhydroxyde is weergegeven in grafiek 10a. Hoewel ook bij deze titratie meer base nodig was, dan wanneer secundair phosphaat zou zijn ontstaan (6,53 maeq i.p.v. 5,45), bleek uit de titratiecurve, dat ei-albumine niet zo sterk het verloop van de titratiecurve beïnvloedde als caseine.



Het leek dus wel waarschijnlijk, dat het voorkomen van vrije

zuurgroepen bepalend was voor het optreden van het verschijnsel. Het zou misschien mogelijk zijn, dat ook laagmoleculaire organische zuren éénzelfde effect op het verloop van de titratiecurven hadden.

Met een groot aantal organische zuren werden daarom proeftitratie's uitgevoerd en wel met: azijnzuur, citroenzuur, glycerinephosphorzuur, galacturonzuur, barnsteenzuur, maleinezuur, wijnsteenzuur, laevalinezuur, boterzuur, serine, tyrosine, threonine en proline.

Van deze zuren bleken glycerinephosphorzuur en citroenzuur de eigenschap ook te bezitten.

Uit de structuurformules van de op het verloop van de titratie van invloed zijnde stoffen blijkt, dat zij waarschijnlijk gemeen hebben het vermogen om in een bepaald pH gebied met calcium min of meer complexe zouten te vormen.

Hoewel C.M.C., alginine en pectine ook de viscositeit van de oplossingen vergroten en de uitkristallisatie van secundair phosphaat daardoor vertraagd zou kunnen worden, is het effect van deze stoffen daar niet alleen aan toe te schrijven. Glycerine, wat de viscositeit eveneens verhoogt, had geen enkele invloed op het verloop van de titratie's.

De invloed van de caseine op de titratie van phosphorzuur met calciumhydroxyde is dus niet specifiek. Ook andere stoffen hebben soortgelijke eigenschappen. Een verklaring kon nog niet gevonden worden. Men zou zich voor kunnen stellen, dat de genoemde stoffen door hun eigenschap min of meer complexe zouten met calcium te vormen de uitkristallisatie van secundair phosphaat in zodanige mate vertragen, dat de mogelijkheid ontstaat van overschrijding van het oplosbaarheidsproduct van minder zuur phosphaat.

De mate, waarin één en ander plaats zal vinden bij titratie's als door Eilers en door ons uitgevoerd zal afhangen van de concentratie van de caseine.

Indien deze te klein genomen wordt t.o.v. de hoeveelheid phosphorzuur, zal ook secundair phosphaat neer kunnen slaan en een mengsel ontstaan van secundair en minder zuur phosphaat.

De door Eilers waargenomen verschijnselen zouden daarmee te verklaren zijn. De caseine fungeert dan echter op een geheel andere wijze als beperkende factor dan door hem bedoeld. Zijn argument voor de vorming van alleen dubbelzouten heeft dan verder geen waarde.

Dat deze verklaring ongeveer de juiste zal zijn, was al af te leiden uit de proeven met caseine vermeld op bladz. 103 (V 1.1.). Als alleen dubbelzouten gevormd werden, had de hoeveelheid calcium per g caseine bij de daar vermelde proeven nooit boven 4,00 maeq. per g caseine uit mogen komen.

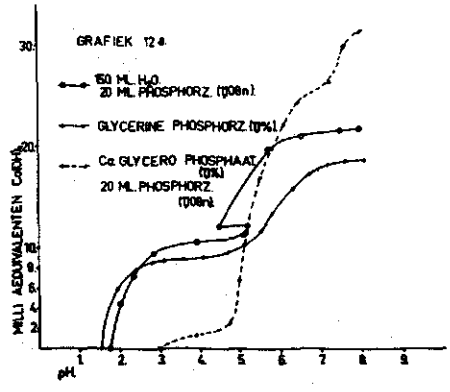
Daar citroenzuur en glycerinephosphorzuur een soortgelijk effect op de titratie uitoefenen, zou de vorming van dubbelzouten eveneens voor deze zuren verondersteld kunnen worden. Uit de resultaten van balansproeven bleek evenwel, dat ook met deze zuren niet alleen dubbelzouten gevormd worden.

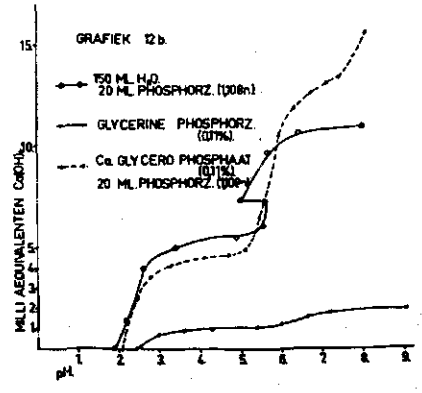
B

mmol	Ca	8,20	0,56
"	anorg. P	5,53	0,03
"	org. P*	0,50	0,43
"	Ca totaal/anorg. P + org. P	1,36	1,22
"	totaal Ca minus glycerine-phosphaat Ca/anorg. P	1,39	-

Balans		toegevoegd	teruggevonden	% teruggevonden van toegevoegd
mmol Ca	1,10%	25,13	25,23	100,4
	0,11%	8,59	8,76	102,0
mmol anorg. P	1,10%	11,08	11,01	99,4
	0,11%	5,54	5,56	100,4
mmol glyc. P	1,10%	9,60	9,85	102,6
	0,11%	0,96	0,93	96,9

*Het organische phosphor werd gevonden door het verschil in phosphorgehalte te bepalen van met zwavelzuur en salpeterzuur gedestrueerde en niet gedestrueerde neerslagen en oplossingen.





Bij titratie A zou, indien dubbelzouten gevormd waren, aan 1 mmol glycerinephosphorzuur 0,82 mmol phosphaatphosphor gebonden zijn, bij titratie B echter 11,08 mmol. Evenals bij citroenzuur was er bij glycerinephosphorzuur geen sprake van stoecheometrische verhoudingen. Het ontstaan van alleen dubbelzouten was dus niet erg waarschijnlijk. Er ontstond echter wel een phosphaat met een minder zuur karakter dan secundair phosphaat.

1.4. Samenvatting en discussie.

Uit het verloop van de titratiecurven verkregen bij potentiometrische titratie's van phosphorzuur met calciumhydroxyde in aanwezigheid van caseine mag niet geconcludeerd worden, dat alleen dubbelzouten van calciumcaseinaat en calciumphosphaat in het caseinaatphosphaatcomplex van melk aanwezig zijn.

Het ontstaan van minder zuur phosphaat dan secundair phosphaat wordt niet door de specifieke eiwitstructuur van caseine veroorzaakt, maar waarschijnlijk door het vermogen van caseine met

calcium complexe zouten te vormen. Door deze zoutvorming zal het neerslaan van secundair phosphaat vertraagd kunnen worden.

Ook sommige niet eiwitachtige stoffen (C. M. C, pectine, citroenzuur, glycerinephosphorzuur) hebben een soortgelijke invloed.

Tussen de hoeveelheid, die van het minder zure phosphaat ontstaat, en de hoeveelheid caseine bestaat slechts in zoverre verband, dat van het laatste voldoende aanwezig moet zijn om het neerslaan van secundair phosphaat bij de titratie te voorkomen.

In de precipitaten, die bij de titratie's ontstaan, komt steeds caseine voor.

Hetzelfde is het geval, indien i. p. v. caseine C. M. C., citroenzuur of glycerinephosphorzuur wordt gebruikt. De verhouding van het phosphaat t. o. v. de erin aanwezige stof (caseine, C. M. C. etc.) kan echter zodanig gevarieerd worden, dat een gewone dubbelzoutvorming tussen het phosphaat en die stof moeilijk aan te nemen is. Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat een gedeelte van de toegevoegde stof met het phosphaat verbonden blijft. Evenals dit in hoofdstuk III voor citroenzuur en magnesium toegeschreven werd aan de specifieke eigenschappen van het daar bereide phosphaat, zullen ook bij binding van caseine, C. M. C etc. de eigenschappen van het bij de titratie's ontstane phosphaat van belang zijn (zie verder hoofdstuk VI).

2. HET BEREIDEN VAN KUNSTMATIGE CASEINAATPHOSPHAATCOMPLEXEN.

Zoals reeds gesteld werd bij het onderzoek vermeld in hoofdstuk III zou een preciese nabootsing van de processen, welke zich in de uiercel afspelen, de juiste methode zijn om inzicht te verkrijgen in de opbouw van het complex.

Men zou zich voor kunnen stellen, dat in deze cel gelijktijdig caseine gevormd wordt en calciumphosphaat en dat het phosphaat reeds direct met de in opbouw zijnde caseine verbonden wordt. Een dergelijk groeiproces na te bootsen in vitro is echter onmogelijk.

Indien men het caseinaatphosphaatcomplex synthetisch wil opbouwen zal men gebruik moeten maken van uit melk afgezonderde en gezuiverde caseine en daaraan op de één of andere wijze calcium en phosphorzuur moeten binden.

Het is mogelijk, dat een op een dergelijke wijze verkregen complex niet helemaal gelijk in opbouw en eigenschappen zal zijn als het langs natuurlijke weg in de uiercel gevormde. Toch kan het een belangrijk hulpmiddel zijn bij het onderzoek naar de aard en het gedrag van het natuurlijke, zoals zal blijken.

Hoewel ook door andere onderzoekers kunstmatige complexen samengesteld zijn (zie hoofdstuk I) werd door hen veelal noch enige aandacht geschonken aan de omstandigheden tijdens het ontstaan (pH, temperatuur, ionen concentratie, invloed andere ionen aanwezig in de oplossing) noch voldoende gecontroleerd of de samenstelling ten naaste bij overeenstemde met die van het in melk aanwezige complex.

Door ons werden caseinaatphosphaatcomplexen samengesteld bij kamertemperatuur en bij een pH overéénkomend met die van melk.

Uitgegaan werd van met zuur uit gemengde melk neergeslagen

en daarna gezuiverde caseine, welke met behulp van calciumhydroxyde opgelost werd bij pH 6,70.

Op de in hoofdstuk III beschreven wijze werd vervolgens bij deze pH gelijktijdig calciumhydroxyde en phosphorzuur toegevoegd.

Van de verkregen melk werd een gedeelte gestremd en later tevens een deel geultrafiltreerd. De "melk", de "wei" en het ultrafiltraat werden geanalyseerd. Daarbij werden dezelfde analysemethoden gebruikt als reeds eerder omschreven. Met de analyseresultaten werden berekeningen uitgevoerd. Bij andere proeven werd direct bij de bereiding van de caseineoplossing natriumchloride toegevoegd. Ook werd getracht een ondermelk te bereiden, welke in samenstelling met natuurlijke ondermelk overeénkwam.

De bij het onderzoek verkregen resultaten sloten aan bij het in de vorige hoofdstukken gevondene, terwijl een beter inzicht werd verkregen in de wijze, waarop het caseinaatphosphaatcomplex in melk voorkomt.

2.1. Nadere bijzonderheden betreffende de bereiding.

2.1.1. De bereiding van het calciumcaseinaat.

Bij de bereiding van de caseineoplossing werd gebruik gemaakt van de automatische titrator. Getitreerd werd tot pH 6,70 of tot 7,50 met calciumhydroxyde. In het laatste geval (zie verder) werd met zoutzuur teruggetitreerd tot pH 6,70. Soms werd, indien nog grove niet opgeloste stukjes caseine achtergebleven waren, door filtreerpapier gefiltreerd. Nadat de pH zonodig gecorrigeerd was, werden het stikstofpercentage en het calciumpercentage van de oplossing bepaald.

Het was niet gemakkelijk de pH van de vloeistof op de juiste waarde te brengen. Werd direct tot pH 6,70 getitreerd, al of niet in aanwezigheid van keukenzout, dan bleek de pH de volgende morgen vaak enkele tiende éénheden hoger te zijn. Werd van pH 7,50 met zoutzuur getitreerd tot pH 6,70 dan werd gemakkelijk wat te veel zoutzuur toegevoegd, doordat de pH meter van de automatische titrator weleens hogere waarden aan gaf dan overeenkwam met de werkelijke pH aanwezig in de vloeistof.

Een volkomen juiste bepaling van de hoeveelheid calcium "gebonden" per g caseine bij pH 6,70 werd daardoor bemoeilijkt. De waarden voor enkele oplossingen berekend zowel uit de toegevoegde hoeveelheden calciumhydroxyde als uit de analyseresultaten zijn weergegeven in tabel XXIII. Zij stemden over het algemeen vrij goed overéén met die gevonden bij de eerste titratie van de proeven vermeld in hoofdstuk IV en waren hoger dan overéén zou komen met de binding van calcium alleen aan de phosphorzuurgroepen van de caseine.

Een enkele maal (proef 4) werd wel een hoeveelheid berekend aequivalent met de phosphorzuurgroepen van de caseine. Het is echter waarschijnlijk, dat er dan iets niet in orde was met de automatische titrator, daar per g caseine aanmerkelijk meer zoutzuur toegevoegd moest worden om de pH van 7,50 tot 6,70 terug te brengen dan bij andere proeven noodzakelijk was. Wij meenden toch deze waarneming niet te mogen verwaarlozen.

TABEL XXIII

No	caseine uit gemengde melk	NaCl per 100 ml mg	getitreerd tot pH	pH gestegen tot	maeq Ca/g berekend uit: titratie	maeq Ca/g berekend uit: analyse	teruggetitreerd tot pH	maeq. HCl/g caseine	maeq Ca/g caseine berekend uit: titratie	maeq Ca/g caseine berekend uit: analyse
1	26-5-'59	-	6,70	6,90	0,74	0,75	-	-		
2	2-5-'60	-	6,70	6,90	0,71	0,72	-	-		
3	2-5-'60	-	7,10	7,30	0,72	0,76	6,70	0,124	0,60	0,64
4	20-6-'60	-	7,50	-	0,79	0,78	6,70	0,234	0,56	0,55
5	2-5-'60	± 500	6,80	-	0,75	0,76	-	-		
6	2-5-'60	± 100	6,80	7,00	0,74	0,73	-	-		
7	2-5-'60	± 500	7,50	-	0,83	0,87	6,70	0,148	0,68	0,72
8	20-6-'60	± 500	7,50	-	0,84	0,89	6,70	0,114	0,73	0,78
9	20-6-'60	± 100	7,50	-	0,82	0,83	6,70	0,184	0,63	0,65
10	5-9-'60	± 100	7,50	-	0,73	0,80	6,70	0,128	0,60	0,67

De aanwezigheid van natriumchloride had op de uitkomsten weinig invloed. Indien het aanwezig was, was de caseineoplossing doorzichtig (opalescerend) bij pH 6,70; indien niet, dan bleef zij bij de gebruikte caseineconcentratie's meestal troebel.

2.1.2. Bijzonderheden waargenomen bij de bereiding van het kunstmatige calciumcaseinaatphosphaatcomplex.

Wanneer aan een doorzichtige (opalescerende) oplossing van calciumcaseinaat calciumhydroxyde en phosphorzuur toegevoegd werden bij pH 6,70, werd de vloeistof reeds na toevoeging van enkele druppels melkachtig wit. De concentratie van het phosphorzuur in de vloeistof was dan nog niet zo groot, dat bij deze pH een neerslag van calciumphosphaat kon ontstaan door de zoutvorming tussen niet aan de caseine gebonden calciumionen en phosphorzuur. Het was waarschijnlijk, dat het phosphorzuur al dadelijk op een of andere wijze met de calciumcaseinaatdeeltjes verbonden werd. De aanwezigheid van caseinecalcium was daarbij van belang, want indien in plaats van calciumcaseinaat natriumcaseinaat gebruikt werd, bleef de vloeistof een zekere tijd doorzichtig evenals bij de titratie's in hoofdstuk III vermeld het geval was.

Het bleek mogelijk stabiele "kunstmelk" te bereiden. Deze melk bevatte echter niet zoveel calcium en phosphaatphosphor als in normale melk voorkomt. Wanneer zoveel calciumhydroxyde en phosphorzuur toegevoegd werden, dat dit wel het geval was, was de oplossing instabiel.

De wijze, waarop de caseineoplossing bereid werd, was van invloed. Werd een kunstmelk, welke was verkregen uit een tot pH 6,70 getitreerde caseineoplossing, gestremd, dan bleef de verkregen wei vaak troebel. Dit was niet het geval, wanneer de caseine eerst tot een hogere pH getitreerd was en daarna tot pH 6,70 teruggetitreerd.

2.1.3. De berekening van de samenstelling van het kunstmatige complex.

Op dezelfde wijze als in hoofdstuk II aangegeven is, werd vervolgens getracht de samenstelling van het kunstmatige complex te berekenen uit de analyse van de melk en de daaruit verkregen lebwei. Daarbij werd verondersteld, dat een soortgelijk calciumphosphaat tijdens het toevoegen van calciumhydroxyde en phosphorzuur ontstond als beschreven is in hoofdstuk III, terwijl de hoeveelheid caseinecalcium per g caseine werd berekend.

De gevonden waarden werden vergeleken met de in hoofdstuk IV voor het basebindend vermogen van caseine gevondene.

Wanneer "wei" als hulpvloeistof werd gebruikt, deden zich vrij veel moeilijkheden voor. Wanneer de kunstmelk werd gestremd, dan bleef altijd een groot deel van de stikstof in de wei achter. De aanwezigheid van natriumchloride was van invloed op de uitkomsten van de berekeningen. "Wei" was dan ook niet geschikt als hulpvloeistof bij deze proeven. Dit was wel het geval met ultrafiltraat. Indien van de analyseresultaten daarvan gebruik werd gemaakt bij de berekeningen, werd een goede overeenkomst gevon-

TABEL XXIV

No	caseine uit gemengde melk	per 100 ml melk			per 100 ml wei			correctiefactor	wei gecorrigeerd			complex					per g caseine		
		caseine g	mmol Ca	mmol anorg P	caseine g	mmol Ca	mmol anorg P	wei	caseine g	mmol Ca	mmol anorg. P	caseine g	mmol Ca	mmol anorg. P	mmol Ca	mmol anorg P	phosphaat mmol Ca (1,4xP)	caseine Ca mmol	basebindend verm. maeq
1	26-5-59	2,586	1,778	0,632	0,222	0,324	0,158	$\frac{100-(2,586-0,222)1,5}{100}$	0,214	0,312	0,152	2,372	1,466	0,480	0,618	0,202	0,283	0,335	0,67
2	2-5-60	0,924	0,776	0,418	0,093	0,307	0,290	$\frac{100-(0,924-0,093)1,5}{100}$	0,091	0,303	0,286	0,833	0,473	0,132	0,568	0,158	0,221	0,347	0,69
3	2-5-60	0,949	0,786	0,429	0,120	0,354	0,348	$\frac{100-(0,949-0,120)1,5}{100}$	0,118	0,350	0,344	0,831	0,436	0,085	0,525	0,102	0,143	0,382	0,76
		0,936	1,127	0,806	0,134	0,434	0,503	$\frac{100-(0,936-0,134)1,5}{100}$	0,132	0,429	0,497	0,804	0,698	0,309	0,868	0,383	0,536	0,332	0,66
4	20-6-60	0,828	0,748	0,494	0,064	0,406	0,442	$\frac{100-(0,828-0,064)1,5}{100}$	0,063	0,401	0,437	0,765	0,347	0,057	0,054	0,075	0,105	0,348	0,70
		0,796	1,122	0,768	0,076	0,449	0,519	$\frac{100-(0,796-0,076)1,5}{100}$	0,075	0,444	0,513	0,721	0,678	0,255	0,940	0,354	0,496	0,444	0,88

TABEL XXV

No	Caseïne uit gemengde melk	per 100 ml melk			per 100 ml wei			correctiefactor	gecorrigeerde wei			complex			per g caseïne									basebindend vermogen maeq
		g caseïne	mmol Ca	mmol anorg.P	g caseïne	mmol Ca	mmol anorg.P		g caseïne	mmol Ca	mmol anorg.P	g caseïne	mmol Ca	mmol anorg.P	mmol Ca	mmol anorg.P	phosphaat Ca mmol (1,4xP)	caseïne Ca mmol	mg Na melk	mg Na wei	mg Na wei gec.	mg Na complex	mmol Na per g cas.	
1	2-5-60	2,083	1,593	0,794	0,223	0,526	0,410	$\frac{100-(2,083-0,233)1,5}{100}$	0,223	0,510	0,398	1,860	1,083	0,396	0,582	0,213	0,298	0,284						0,56
2	2-5-60	2,631	1,833	0,800	0,223	0,489	0,306	$\frac{100-(2,631-0,223)1,5}{100}$	0,214	0,468	0,293	2,417	1,365	0,507	0,565	0,209	0,293	0,272						0,54
3	2-5-60	0,892	0,808	0,452	0,115	0,516	0,384	$\frac{100-(0,892-0,115)1,5}{100}$	0,114	0,510	0,380	0,778	0,290	0,072	0,373	0,092	0,129	0,244						0,48
		0,866	1,162	0,800	0,070	0,596	0,542	$\frac{100-(0,866-0,070)1,5}{100}$	0,069	0,589	0,535	0,797	0,573	0,265	0,119	0,332	0,465	0,254						0,51
4	20-6-60	0,879	0,805	0,413	0,102	0,489	0,329	$\frac{100-(0,879-0,102)1,5}{100}$	0,101	0,483	0,325	0,778	0,312	0,088	0,401	0,113	0,158	0,243						0,49
		0,873	1,177	0,752	0,076	0,521	0,494	$\frac{100-(0,873-0,076)1,5}{100}$	0,075	0,510	0,484	0,799	0,667	0,268	0,835	0,335	0,469	0,366						0,73
5	20-6-60	0,924	0,796	0,529	0,166	0,426	0,406	$\frac{100-(0,924-0,166)1,5}{100}$	0,164	0,421	0,401	0,760	0,375	0,128	0,493	0,168	0,235	0,258						0,52
		0,917	1,177	0,803	0,140	0,471	0,487	$\frac{100-(0,917-0,140)1,5}{100}$	0,138	0,466	0,481	0,779	0,711	0,322	0,913	0,413	0,578	0,345						0,69
6	9-9-60	1,006	0,716	0,436	0,229	0,347	0,355	$\frac{100-(1,006-0,229)1,5}{100}$	0,226	0,342	0,351	0,780	0,373	0,085	0,479	0,109	0,153	0,326	35,4	35,8	35,4	-	-	0,65
		0,968	1,092	0,784	0,147	0,409	0,474	$\frac{100-(0,968-0,147)1,5}{100}$	0,145	0,404	0,468	0,823	0,688	0,316	0,836	0,384	0,538	0,298	35,2	-	35,4	-	-	0,60
7	12-9-60	0,911	0,791	0,419	0,115	0,359	0,310	$\frac{100-(0,911-0,115)1,5}{100}$	0,114	0,355	0,306	0,797	0,436	0,113	0,547	0,142	0,199	0,348	38,4	37,6	37,1	1,3	1,6	0,77
		0,924	1,114	0,777	0,147	0,426	0,432	$\frac{100-(0,924-0,147)1,5}{100}$	0,146	0,421	0,427	0,778	0,693	0,350	0,891	0,450	0,630	0,261	36,8	36,6	36,2	0,4	0,5	0,54

den met de op grond van de resultaten vermeld in hoofdstuk III en IV verwachte uitkomsten.

2.1.3.1. De samenstelling bij afwezigheid van natriumchloride.

Aan de calciumcaseinaten no 1, 2, 3, en 4 (tabel XXIII) werden op de beschreven wijze calciumhydroxyde en phosphorzuur toegevoegd. Bij proef 3 en 4 werd, nadat een bepaalde hoeveelheid van beide toegevoegd was, de vloeistof in twee gelijke portie's verdeeld. De ene portie werd direct gebruikt voor de analyse van de "melk" en de bereiding en analyse van de "wei". Aan de andere werd eerst nog meer calciumhydroxyde en phosphorzuur toegevoegd.
De analyseresultaten en de voor het caseinecalcium berekende waarden zijn weergegeven in tabel XXIV.

De resultaten waren tamelijk goed in overeenstemming met de verwachte. Over het algemeen lagen de voor het caseinecalcium berekende waarden wat lager dan gevonden werden bij de titratie's vermeld in hoofdstuk IV.
Hoewel de hoeveelheid calcium per g caseine in het kunstmatige complex aanwezig bij de proeven 3b en 4b bijna dubbel zo groot was, als die bij de proeven 3a en 4a en de hoeveelheid phosphaatphosphor 4 à 5 maal zo groot, was de waarde berekend voor het caseinecalcium van dezelfde orde van grootte. Dit wees erop, dat de veronderstelling, dat calciumphosphaat van gelijke aard aanwezig was als neergeslagen bij proeven vermeld in hoofdstuk III, zeer wel juist kon zijn.
In de lebwei bleef vrij veel caseinestikstof achter (bij proeven 1, 2, 3a, 3b, 4a, 4b resp. 12, 5%; 10%; 13%; 14%; 8% en 10% van de totale hoeveelheid toegevoegd N). Bij de berekeningen werd daarom een correctie toegepast. Als correctiefactor werd gebruikt

$$\frac{100 - (N\% \times 6,37 \text{ melk} - N\% \times 6,37 \text{ wei}) \times 1,5}{100}$$

De factor 1,5 werd gebruikt, daar per g eiwit ± 0,5 g gebonden water werd verondersteld.
Bij de proeven 1, 2 en 3 werd normaal handelsstremsel gebruikt. Omdat de hoeveelheid daarin voorkomend natrium van invloed zou kunnen zijn op de hoeveelheid caseinecalcium, die werd gevonden (uitwisseling calcium tegen natrium, grotere oplosbaarheid natriumcaseinaat en daardoor meer stikstof in de wei), werd bij proef 4 zoutvrij stremsel gebruikt. Dit werd bereid uit gedroogde kalfsmagen door deze uit te trekken met gedestilleerd water.
Het percentage stikstof in de wei was dan wel wat lager (nl 8 à 10%) echter nog altijd aanmerkelijk groter dan overeenkwam met de hoeveelheid stikstof, welke als weiproteose-stikstof voor zou moeten komen (± 4%). Ook nu bleef een zekere variatie in de berekende hoeveelheid caseinecalcium bestaan (resp. 0,351 en 0,435).

2.1.3.2. De invloed van natriumchloride op de samenstelling.

Indien van te voren natriumchloride toegevoegd was bij de bereiding van het calciumcaseinaat en de samenstelling van het kunstmatige complex bereid in een dergelijke oplossing berekend werd, werden zeer varierende waarden voor het caseinecalcium gevonden. De hoeveelheden per g caseine waren dan dikwijls in overeenstemming met de in de literatuur vermelde voor normale melk en ongeveer aequivalent met de hoeveelheid caseinephosphor.

Het zou kunnen zijn, dat deze hoeveelheid caseinecalcium altijd in het complex aanwezig is, en dat de eventueel daarboven nog voorkomende hoeveelheid calcium gebonden is aan de andere groepen van de caseine en varieert met de hoeveelheid andere in de vloeistof aanwezige ionen. Bij het synthetiseren van het complex werd dit calcium klaarblijkelijk geheel of gedeeltelijk afgestaan voor de vorming van calciumphosphaat. (zie ook tabel XXIV, XXV en XXVI). In dit verband zij ook gewezen op de invloed, welke door calciumcaseinaat op de titratie van phosphorzuur met calciumhydroxyde wordt uitgeoefend en op het vermogen van caseine natrium te binden.

Er zou natrium in de plaats van het calcium aan de caseine gebonden kunnen zijn. Bij de proeven 6 en 7 (tabel XXV) werd de hoeveelheid natrium in het complex berekend. De melk werd gestremd met zoutvrij stremsel.

Bij proef 6 werd geen, bij proef 7 wel natrium in het complex gevonden. De variatie in de berekende waarden voor het basebindend vermogen van de caseine bleef.

Daar het mogelijk was, dat een ongelijkheid in samenstelling van de kunstmatig bereide calciumcaseinaatphosphaatdeeltjes van invloed was en daar ook de hoeveelheid stikstof in de wei nog altijd aanmerkelijk groter was dan verwacht werd, werd bij de volgende proeven niet alleen wei als hulpvloeistof gebruikt maar tevens ultrafiltraat en met behulp van beide het basebindend vermogen (maeq Ca + Na) van de caseine berekend.

Het ultrafiltraat werd verkregen m. b. v. een apparaat beschreven door Koops (lit. 56) en gebaseerd op een idee van Van Oss.

Er werd gefiltreerd onder een stikstofdruk van 7 atm.

De eerste 5-10 ml ultrafiltraat werden weggeworpen. Afhankelijk van de hoeveelheid "melk", welke beschikbaar was, werden daarna nog één of meer portie's van 25-35 ml filtraat opgevangen.

Met behulp van de analyse resultaten van de "melk", het ultrafiltraat en de "lebwei" werden berekeningen uitgevoerd, waarbij dezelfde veronderstellingen werden gemaakt als bij die uitgevoerd voor de tabellen XXIV en XXV.

De resultaten zijn weergegeven in tabel XXVI.

In het complex was dus inderdaad natrium aanwezig. De hoeveelheid, welke berekend werd, kwam ongeveer overéén met die in

TABEL XXVI

Basebindend vermogen caseine

Proef	Hulpvloeistof	Caseinecalcium mmol Ca	caseinenatrium mmol Na	maeq. Ca+Na (base)
1	lebwei	0,312	0,01	0,63
	ultrafiltraat I	0,297	0,12	0,71
	" II	0,288	0,11	0,68
2	lebwei	0,297	0,04	0,63
	ultrafiltraat	0,288	0,10	0,70
3	wei	0,348	0,01	0,71
	ultrafiltraat I	0,336	0,08	0,75
	" II	0,337	0,07	0,74
4	wei	0,328	0,03	0,69
	ultrafiltraat I	0,313	0,10	0,73
	" II	0,311	0,10	0,72

hoofdstuk II gevonden bij berekeningen uitgevoerd met behulp van de analyse van normale melk en de daaruit bereide lebwei.

In de "lebwei" van de kunstmelk zal het natrium verbonden geweest zijn met het in de "wei" in "oplossing" gebleven deel van de stikstof, zoals bleek uit een volgende proef. Daarbij werd kunstmelk bereid en uit deze "melk" lebwei en ultrafiltraat, terwijl de "wei" eveneens geultrafilteerd werd.

Analyseresultaten.	N %	Ca %	P %	Na %
Kunstmelk	0,259	0,0640	0,0280	0,0375
Ultrafiltraat uit "melk"	-	0,0127	0,0099	0,0346
"Wei"	0,010	0,0152	0,0114	0,0372
Ultrafiltraat uit "wei"	-	0,0133	0,0097	0,0346

Uit het verschil tussen de melk en de wei werd als basebindend vermogen van de caseine berekend 0,66 maeq. (Ca + Na), uit het verschil tussen de melk en het ultrafiltraat van de melk 0,714 maeq. calcium + natrium.

Uit de wei werd door ultrafiltreren nog verwijderd 0,010% N, 0,0019 % Ca, 0,0017 % P en 0,0026 % Na of per g "eiwit" 0,752 mmol Ca, 0,88 mmol P en 1,81 mmol Na. In het door ultrafiltreren uit de wei verwijderde "complex" werd dus naar verhouding aanzienlijk meer natrium gebonden dan uit dat, wat door de stremming verwijderd werd. Het basebindend vermogen van het "eiwit" was evenwel ongeveer gelijk als die van caseine (hoofdstuk IV), zoals uit een volgende berekening blijkt.

BEREKENING.

In het phosphaat zou aanwezig geweest moeten zijn 1,4 x 0,88 = 1,232 mmol Ca. Er was dus een tekort aan calcium en wel 1,232 - 0,752 = 0,580 mmol Ca.

Dit zal ook in het phosphaat door natrium vervangen kunnen zijn, zodat 1,16 mmol Na daarin aanwezig geweest moet zijn. Voor het "eiwit" bleef dus over 1,81 - 1,16 = 0,65 mmol Na/g caseine, een waarde ongeveer overeenkomend met de in hoofdstuk IV voor natrium vermelde. Het "eiwit" zal dus als natriumzout aanwezig geweest zijn.

Het is waarschijnlijk, dat de berekening van het basebindend vermogen met wei als hulpvloeistof voornamelijk door deze meerdere binding van natrium aan het in oplossing gebleven eiwit niet dezelfde

uitkomst geeft als gevonden werd in hoofdstuk IV en bij gebruik van ultrafiltraat.

Dat de samenstelling van de caseinaatphosphaatdeeltjes van de kunstmelk niet gelijk was, bleek uit een proef, waarbij een kunstmelk met opeénvolgende snelheden gecentrifugeerd werd.

De analyseresultaten van de bij deze proef gebruikte kunstmelk en de resp. na 30 minuten centrifugeren overblijvende vloeistoffen zijn weergegeven in tabel XXVII.

TABEL XXVII

toerental	caseine g	Ca mmol	P mmol	Na mmol
0	2,45	2,44	1,39	1,60
1000	2,41	2,39	1,36	1,60
3000	2,20	2,24	1,29	1,55
5000	1,82	1,87	1,13	1,53
10000	1,31	1,37	0,90	1,50
15000	1,02	1,07	0,77	1,46

Uit de analyseresultaten en het verschil in samenstelling tussen de "melk" en de gecentrifugeerde vloeistoffen werd het basebindend vermogen berekend van de caseine, die door het centrifugeren werd verwijderd. Daarbij werd hetzelfde verondersteld als bij vorige berekeningen (zie tabel XXVIII).

TABEL XXVIII

Verschil melk en vloeistof verkregen bij n toeren per minuut	caseine g	Ca mmol	P mmol	Na mmol	phosphaat Ca mmol (1,4xP)	maeq. basebindend vermogen per g caseine
n = 1000	0,04	0,05	0,03	0,00	0,04	-
" = 3000	0,25	0,20	0,10	0,05	0,14	0,68
" = 5000	0,63	0,57	0,26	0,07	0,36	0,78
" = 10000	1,14	1,07	0,49	0,10	0,69	0,75
" = 15000	1,43	1,37	0,62	0,13	0,87	0,79

Tevens werd berekend hoeveel calcium, phosphor en natrium per g caseine verwijderd werd door de centrifugering tussen de resp. snelheden (tabel XXIX).

TABEL XXIX

toerental	per g caseine		
	Ca mmol	P mmol	Na mmol
0 - 1000	1,25	0,75	0,000
1000 - 3000	0,71	0,33	0,240
3000 - 5000	0,97	0,42	0,044
5000 - 10000	0,98	0,45	0,065
10000 - 15000	1,04	0,45	0,115

Uit de tabel blijkt, dat de samenstelling van de deeltjes, die tussen de resp. snelheden verwijderd werden, niet volkomen gelijk was.

In de grote deeltjes kwam naar verhouding minder calciumphosphaat voor, de kleinere deeltjes bevatten meer natrium. Bij het

centrifugeren met lagere snelheden (n < 3000) zal waarschijnlijk vrij phosphaat uitgecentrifugeerd zijn. De hoeveelheden daarvan was echter gering (zie tabel XXVIII).

Het was dan ook begrijpelijk, dat voor de berekening van de samenstelling van het kunstmatige complex "wei" niet als hulpvloeistof gebruikt kon worden. Ultrafiltraat daarentegen moest uitkomsten geven, welke beter in overeénstemming waren met de verwachte.

Het basebindend vermogen van de caseine berekend m.b.v. de analyse van het ultrafiltraat was dan ook tamelijk goed in overeenstemming met de waarden gevonden in tabel XXIV (geen zout aanwezig) en ook met die vermeld in hoofdstuk IV.

Het gemiddelde van de waarden was 0,72 maeq. In hoofdstuk IV werd als gemiddelde gevonden 0,79 maeq voor calcium en 0,70 voor natrium. De caseine werd daar echter eerst tot een veel hogere pH (pH 8,50) getitreerd, vervolgens tot pH 4,6 teruggetitreerd en daarna weer getitreerd. Zij zal dan waarschijnlijk in een toestand zijn, waarin gemakkelijker alle daarvoor in aanmerking komende groepen met calcium bezet zullen worden dan bij de bereiding van het kunstmatige complex het geval was.

De resultaten maakten tevens waarschijnlijk, dat er calciumphosphaat was ontstaan en dat dit ongeveer de veronderstelde samenstelling had.

2.1.3.3. Uitwisseling van calcium uit het phosphaat van het complex tegen natrium.

Hoewel het zeer waarschijnlijk was, dat het natrium in het complex aanwezig voornamelijk als caseinenatrium voorkwam, was het niet uitgesloten, dat een gedeelte ervan in het phosphaat voorkwam. Ook als dit het geval was, had het op de uitkomst van de berekeningen van het basebindend vermogen van de caseine geen invloed.

Het was echter wel van belang aan te tonen, dat een uitwisseling van calcium uit het phosphaat van het complex tegen natrium mogelijk was. Een dergelijke uitwisseling werd immers ook gevonden voor het phosphaat neergeslagen op rijstzetmeel (hoofdstuk III).

Als zij ook aangetoond kon worden voor het phosphaat van het kunstmatige caseinaatphosphaatcomplex, zou dit de hypothese, dat in het kunstmatige complex een phosphaat van gelijke aard aanwezig was als neergeslagen bij de proeven in hoofdstuk III vermeld, aanmerkelijk versterken.

Een kunstmelk, verkregen door aan een calcium-caseinaat oplossing calciumhydroxyde en phosphorzuur toe te voegen bij constante pH (pH 6,70), werd in twee portie's verdeeld. Aan de éne portie (200 ml) werd 5 g natriumchloride toegevoegd.

Nadat dit een aantal uren de gelegenheid had gehad om in te werken, werd een klein deel van de oplossing gebruikt om het stikstof-, het calcium- en het phosphaatgehalte te bepalen.

Uit het resterende deel (180 ml) werd ultrafiltraat bereid. Van

de tweede portie werd eveneens het stikstof-, calcium- en phosphaatgehalte bepaald en ultrafiltraat bereid. Er werd echter geen zout aan toegevoegd.

TABEL XXX

Analyse resultaten

Proef 1	N %	Ca %	P %
"melk" zonder zout	0,308	0,0648	0,0207
"melk" met zout	0,308	0,0639	0,0202
ultrafiltraat uit "melk" zonder zout	0,011	0,0131	0,0057
ultrafiltraat uit "melk" met zout	0,007	0,0258	0,0079
Proef 2			
"melk" zonder zout*	0,313	0,0726	0,0209
ultrafiltraat uit "melk" zonder zout	0,015	0,0116	0,0043
ultrafiltraat uit "melk" met zout	0,004	0,0269	0,0079

* de "melk" werd geanalyseerd, voordat zout toegevoegd was.

Het bleek dus, dat wanneer natriumchloride toegevoegd werd, zowel calcium als phosphaatphosphor in oplossing gingen.

Werd berekend uit het verschil in samenstelling tussen de "melk" en het ultrafiltraat hoeveel calcium en phosphaatphosphor in het complex aanwezig was, dan bleek dit te zijn resp. :

		mmol Ca/g caseine	mmol P/g caseine
Proef 1	"melk" zonder zout	0,686	0,258
	"melk" met zout	0,505	0,210
Proef 2	"melk" zonder zout	0,804	0,284
	"melk" met zout	0,581	0,217

Van het calcium uit het complex loste dus door natriumchloride toe te voegen op bij proef 1: 26,4%, bij proef 2: 26,9%; van het phosphaatphosphor bij proef 1: 18,6%, bij proef 2: 23,6%.

Vooral naar aanleiding van het oplossen van phosphor kon geconcludeerd worden, dat in het complex zeer waarschijnlijk phosphaat van ongeveer gelijke aard aanwezig geweest zal zijn, als neergeslagen werd bij de proeven vermeld in hoofdstuk III.

Een zelfde proef werd uitgevoerd met het caseinaatphosphaatcomplex gecentrifugeerd uit natuurlijke ondermelk.

Twee portie's van elk 120 ml ondermelk werden gedurende 1 uur en 40 minuten gecentrifugeerd (n = 15000).

Het gecentrifugeerde gel van elke portie werd met water in 120 ml gesuspendeerd. Aan de ene portie werd 5 g zout toegevoegd, aan de andere niet. Daarna werd van beide ultrafiltraat bereid. De eerste 5 - 10 ml filtraat werd weggeworpen.

Analyseresultaten ultrafiltraat:

	N %	Ca %	P %
ultrafiltraat zonder zout	spoortje	0,0077	0,0064
ultrafiltraat met zout	spoortje	0,0257	0,0109

Ook uit het complex van normale melk kan dus calcium tegen natrium uitgewisseld worden.

2.2. Het bereiden van kunstmatige ondermelk.

Getracht werd kunstmatig ondermelk samen te stellen, waarin de verdeling van de ionen over de verschillende phasen van de "melk" ongeveer gelijk was als in normale ondermelk.

2.2.1. **De bereidingswijze:** Aan gedestilleerd uitgekookt water werd zoveel citroenzuur toegevoegd als gemiddeld in melk voorkomt. De citroenzuuroplossing werd met natriumhydroxyde getitreerd tot pH 6,70. Daarna werd magnesiumchloride en kaliumchloride toegevoegd in zodanige hoeveelheden, dat het magnesium-, kalium- en chloorgehalte overeénkwam met de gemiddeld in melk voorkomende. Vervolgens werd caseine toegevoegd en met calciumhydroxyde getitreerd tot pH 6,70, waarna bij constante pH calciumhydroxyde en phosphorzuur toegevoegd werden. Daarbij werd zoveel calciumhydroxyde gebruikt, dat de hoeveelheid calcium in de kunstmelk uiteindelijk ongeveer overeénkwam met die in normale melk. De hoeveelheid phosphor, die in de vorm van phosphorzuur toegevoegd kon worden zonder dat de pH van 6,70 afweek, was niet zo groot als de hoeveelheid anorganische phosphor, welke gemiddeld in normale melk aanwezig is.

2.2.2. **Resultaten:** Van de kunstmelk werd zowel wei als ultrafiltraat bereid. De "melk", de "wei" en het ultrafiltraat werden geanalyseerd. De analyseresultaten van enkele proeven zijn weergegeven in tabel XXXI.

TABEL XXXI

Kunstmatige melk

Per 100 ml	"melk"		"wei"		ultrafiltraat			
	No I	No II	No I	No II	No I	No IIa	No IIb	No IIc
% N	0,464	0,443	0,029	0,034	0,004	0,005	0,005	-
% Ca	0,104	0,101	0,030	0,033	0,026	0,021	0,023	-
% Mg	0,010	0,010	0,0065	0,007	0,005	0,004	0,005	
% P	0,038	0,037	0,0135	0,014	0,012	0,011	0,012	-
% citroenzuur	0,114	0,102	0,113	0,101	-	-	-	-
mg Na	37,6	36,8	37,4	37,0	36,7	31,8	32,8	33,2
mg K	130,8	125,6	130,8	127,2	-	104,0	108,0	104,8
mg Cl	148,2	139,0	150,6	145,6	-	-	-	-

De verdeling van de verschillende stoffen over de phasen van de melk was niet geheel in overeénstemming met die van normale melk. Over het algemeen kwam van alle stoffen bij de kunstmelk wat meer in het caseinaatphosphaatcomplex terecht dan bij normale melk. Het zal in principe wel mogelijk zijn synthetisch een ondermelk te bereiden, die vrij goed met een natuurlijke ondermelk overeénstemt. Bij de bereiding is het van belang de verschillende stoffen in de juiste volgorde toe te voegen. Zo zal als eerst magnesium toegevoegd wordt, daarna caseine en dan calcium naar verhouding meer magnesium in het complex aanwezig kunnen zijn dan bij normale ondermelk.

Indien ook lactose, organische zuren en andere in normale ondermelk voorkomende stoffen toegevoegd worden, zal dit ongetwijfeld van invloed zijn op de verdeling van de elementen over de phasen van de kunstmelk.

2.3. Röntgenfoto's.

Van enkele kunstmatig bereide complexen werden röntgenfoto's genomen.
Bij calciumcaseinaat (pH 6,70) werd calciumhydroxyde en phosphorzuur gedruppeld, zodanig dat de pH constant bleef.
Nadat zekere hoeveelheden toegevoegd waren, werd een deel van de vloeistof (50 ml) gecentrifugeerd. Aan het resterende werd nog meer calciumhydroxyde en phosphorzuur toegevoegd.
Het uit de eerste portie gecentrifugeerde gel werd, nadat met filtreerpapier de meeste vloeistof verwijderd was, verder gedroogd en bewaard boven P_2O_5. Het verkregen poeder werd in een mortier fijn gewreven.
Van de tweede portie werd de vloeistof geanalyseerd. Het stikstofgehalte was 0,2805%, het calcium- en phosphorgehalte resp. 0,075 en 0,039%. Het overblijvende deel werd gecentrifugeerd en de na centrifugeren achtergebleven vloeistof geanalyseerd.
Daarvan was het stikstof- calcium- en phosphorgehalte resp. 0,057%, 0,034%, en 0,026%. Een groot deel van de caseine (80%) bevond zich dus in het uitgecentrifugeerde gel. Het gel werd op dezelfde wijze behandeld als dat verkregen uit de eerste portie.

2.3.1. Resultaten.

De röntgendiagrammen wezen uit, dat het gedroogde gel een amorphe structuur bezat (foto 1457). Er waren twee brede banden in aanwezig. Deze lagen op dezelfde plaats als de brede banden, welke in de diagrammen gevonden werden van de volgende preparaten:

a. een preparaat van het caseinaatphosphaatcomplex gecentrifugeerd uit rauwe melk.

b. een preparaat van uit gekookte melk gecentrifugeerd boven P_2O_5 gedroogd caseinaatphosphaatcomplex.

c. preparaten verkregen uit melk, waaraan verschillende hoeveelheden calciumchloride toegevoegd waren (resp. 15 maeq. calciumchloride/L en 80 maeq. calciumchloride/L.
Door de toevoeging van 80 maeq. calciumchloride per liter werd 45% van het in de oorspronkelijke melk opgeloste anorganische phosphor neergeslagen.

d. een preparaat van met zuur neergeslagen en gezuiverde caseine.

Een van de twee banden viel bovendien samen met die van het amorphe phosphaat bereid bij 9,00 uit calciumhydroxyde en phosphorzuur en met die van het calciummagnesiumphosphaat. (zie hoofdstuk III). De tweede band, die in de diagrammen van deze

iosphaten gevonden werd, was niet aanwezig in de diagrammen an het kunstmatige caseinaatphosphaatcomplex.

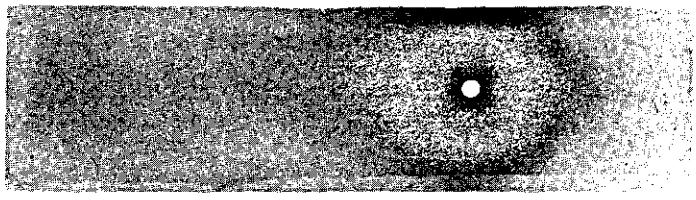


foto: 1457. Kunstmatig complex.

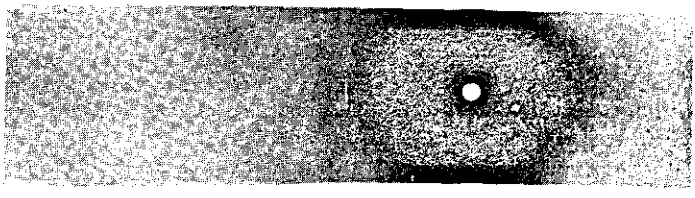


foto 1275: Complex uit rauwe melk.

3. SAMENVATTING EN DISCUSSIE.

Het is gebleken, dat de resultaten verkregen bij potentiometische titratie's van phosphorzuur met calciumhydroxyde in tegenwoordigheid van caseine geen enkel bewijs leveren voor de theorie, dat in het caseinaatphosphaatcomplex van melk calciumphosphaat met calciumcaseinaat voornamelijk dubbelzouten vormt. De aanwezigheid van caseine kan het verloop van dergelijke titratie's echter wel beïnvloeden.

Het is veel waarschijnlijker, dat het caseinaatphosphaatcomplex van melk in principe bestaat uit een complex phosphaat wat verbonden is met caseinaat, dat behalve calcium ook natrium en kalium bevat. (zie hoofdstuk VI).

Uit experimenten, waarbij kunstmatige caseinaatphosphaatcomplexen werden bereid bij de temperatuur en de pH van melk, werd berekend, dat de hoeveelheid caseinecalcium aanwezig in dergelijke complexen aanmerkelijk groter kan zijn dan overeén zou komen met de binding van calcium alleen aan de phosphorzure groepen van de caseine. Indien bij de bereiding van kunstmatige complexen slechts caseine, calcium en phosphorzuur gebruikt werden, werden voor het calciumbindend vermogen van caseine waarden berekend, welke ongeveer overeénstemden met die gevonden bij de potentiometische titratie's van caseine met calciumhydroxyde.

Indien ook natriumchloride bij de bereiding aanwezig was, kon aangetoond worden, dat een deel van het caseinecalcium door natrium vervangen was. De hoeveelheid natrium in dergelijke complexen aan de caseine gebonden kwam ongeveer overeén met de hoeveelheid natrium en kalium tezamen, gevonden in het complex van normale melk (hoofdstuk IV).

Bij de berekeningen werd verondersteld, dat in de kunstmatige

complexen een phosphaat van dezelfde aard aanwezig was als precipiteert, wanneer calciumhydroxyde en phosphorzuur bij pH 6,70 bij elkaar gevoegd worden (zie hoofdstuk III).

Zowel de overéénstemming van de hoeveelheid caseinecalcium berekend voor de kunstmatige complexen met die gevonden bij de potentiometische titratie's (hoofdstuk IV) als de overéénstemming tussen de hoeveelheid natrium in de kunstmatige complexen aanwezig met de hoeveelheid natrium en kalium tezamen gevonden in het complex van normale melk (hoofdstuk IV) deden het waarschijnlijk voorkomen, dat de veronderstelling juist was.

Dat een zodanig phosphaat aanwezig kan zijn, volgde eveneens uit de resultaten van experimenten, waarbij calcium uit het phosphaat uitgewisseld werd tegen natrium uit de vloeistof. Een soortgelijke uitwisseling werd ook gevonden voor het phosphaat bereid in gedestilleerd water bij eenzelfde pH en temperatuur als waarbij de kunstmatige complexen werden bereid (zie hoofdstuk III).

Het kunstmatige complex bleek een amorphe structuur te bezitten. Het phosphaat neergeslagen bij dezelfde pH uit een oplossing, welke slechts calcium en phosphorzuur bevatte, gaf een diagram overéénkomend met dat van hydroxyapatiet. Het diagram op de röntgenfoto van het kunstmatige complex vertoonde evenwel wel overéénkomst met dat van het amorphe calciummagnesiumphosphaat (pH 7,00) en het amorphe calciumphosphaat neergeslagen bij pH 9,00 (beschreven in hoofdstuk III) en tevens met dat van het uit melk afgezonderde en gedroogde caseinaatphosphaatcomplex.

Het is waarschijnlijk, dat de caseine evenals het magnesium en citroenzuur de vorm, waarin het phosphaat neersloeg, beïnvloedde (zie hoofdstuk VI).

HOOFDSTUK VI

HET CASEINAATPHOSPHAATCOMPLEX VAN MELK

1. ALGEMENE BESCHOUWING.

In hoofdstuk V werd getracht de opbouw van het caseinaatphosphaatcomplex te verklaren door de resultaten, verkregen bij het onderzoek vermeld in hoofdstuk III en die, verkregen bij het onderzoek vermeld in hoofdstuk IV, samen te voegen. Thans zal worden nagegaan of deze samenvoeging verantwoord is.

Het is wel waarschijnlijk (hoofdstuk V), dat het caseinaatphosphaatcomplex van melk in principe opgebouwd is uit caseinaat verbonden met een complex phosphaat.
De caseine zal zowel met calcium als met natrium, kalium en magnesium zouten vormen.
Het phosphaat zal hoofdzakelijk uit calcium en phosphorzuur bestaan. Het zal echter tevens magnesium en citroenzuur bevatten, terwijl natrium en kalium er mogelijk ook in voorkomen. De mogelijkheid, dat caseine aan de zoutvorming deelneemt mag niet uitgesloten geacht worden (zie verder).

De kunstmatige caseinaatphosphaatcomplexen, zoals zij bereid werden, zullen evenwel zeer waarschijnlijk niet geheel in structuur met de natuurlijke overeénstemmen. In de uiercel zal het ontstaan van caseine en het complexe phosphaat tegelijkertijd plaats vinden. Het is zelfs niet geheel ondenkbaar, dat het phosphaat als zodanig van belang is bij de opbouw van de caseine.
Bij onze proeven echter (hoofdstuk V) was de caseine gereed, voordat er phosphaat was gevormd.

Bij de bereiding van de kunstmatige complexen werden aanwijzingen gevonden, dat de wijze, waarop de caseine in melk voorkomt, beinvloed wordt door het ontstaan van phosphaat.
Werd n.l. aan calciumcaseinaat calciumhydroxyde en phosphorzuur toegevoegd bij een constante pH en in aanwezigheid van natriumchloride, dan werd de indruk verkregen, dat calcium gebonden aan de caseine uitgewisseld werd tegen natrium uit de oplossing en met het toegevoegde phosphorzuur phosphaat vormde. De hoeveelheid phosphorzuur aanwezig tijdens het ontstaan van melk zal dus van invloed kunnen zijn op de hoeveelheid calcium en daardoor op de hoeveelheid natrium resp. kalium en magnesium, welke aan de caseine gebonden zal worden. Evenzo zal de hoeveelheid citroenzuur van invloed kunnen zijn.
De verdeling van het calcium over de caseine, het citroenzuur en het phosphorzuur zal bepaald worden, niet alleen zoals door Eilers werd verondersteld (lit. 21) door de sterkte van de zuur-groe-

pen maar onder meer ook door de oplosbaarheidsproducten van de verschillende zouten. De omstandigheden zijn echter klaarblijkelijk gunstig voor de vorming van het complexe phosphaat.

Evengoed als de vorming van phosphaat van invloed zal zijn op de wijze, waarop de caseine in de melk voorkomt, zal het ontstaan van caseine de wijze, waarop het phosphaat wordt gevormd, beïnvloeden.
Bij het toevoegen van calciumhydroxyde en phosphorzuur bij constante pH aan calciumcaseinaat werd opgemerkt, dat reeds na toevoegen van enkele druppels van deze beide vloeistoffen - soms zelfs na toevoeging van alleen phosphorzuur en zonder dat de pH merkbaar veranderde - een heldere oplossing van calciumcaseinaat troebel werd. Indien i.p.v. calciumcaseinaat natriumcaseinaat gebruikt werd, gebeurde dit niet (hoofdstuk V). Verder ontstond bij de potentiometrische titratie's van phosphorzuur met calciumhydroxyde in aanwezigheid van calciumcaseinaat (hoofdstuk V 1) een minder zuur phosphaat dan wanneer caseine niet aanwezig was.

Het leek waarschijnlijk, dat het phosphaat aan de oppervlakte van de caseinedeeltjes gevormd werd en er is alle reden om te veronderstellen, dat het zich ook gemakkelijk aan het caseineoppervlak hecht.
Dit houdt evenwel niet in, dat alle phosphaat in de caseinaatphosphaatdeeltjes aan het oppervlak van die deeltjes voorkomt. Het is n.l. niet uitgesloten, zoals reeds werd opgemerkt, dat ook chemische bindingen optreden. Er zullen geen zuivere dubbelzouten gekenmerkt door stoecheometrische verhoudingen aanwezig zijn (zie hoofdstuk V 1). Zeer waarschijnlijk zal er meer sprake zijn van calciumbruggen tussen "deeltjes" van het complexe phosphaat en de caseine. Op dezelfde wijze zal het phosphaat ook als brug kunnen dienen tussen twee actieve groepen van verschillende caseinemoleculen, bijv.

CASEINE - Ca - COMPLEXPHOSPHAAT - Ca - CASEINE

Volledigheidshalve moet opgemerkt worden, dat misschien ook aminogroepen van de caseine met het complexe phosphaat verbonden kunnen zijn.

In melk zullen de caseinaatphosphaatdeeltjes dan ook zeer waarschijnlijk bestaan uit deeltjes caseine, aanwezig als Ca, Na, K en Mg zout, onderling aaneengehecht niet alleen door calcium en waterstofbruggen maar ook door "deeltjes" complex phosphaat.
De afmetingen van de phosphaatdeeltjes t.o.v. die van de caseinedeeltjes zal echter wel zodanig zijn, dat gesproken kan worden van een fijne verdeling van het phosphaat over het oppervlak van de caseinedeeltjes.
De totale samenstelling van het complex zal niet voor iedere melk gelijk behoeven te zijn. Wanneer bij het onderzoek gebruik gemaakt wordt van monsters van gemengde melk van een groot aantal koeien zullen echter steeds ongeveer gelijke verhoudingen van bijv.

phosphaatcalcium en phosphaatphosphor per g caseine gevonden worden. Wanneer echter melk van individuele koeien regelmatig wordt onderzocht zullen in de loop van een lactatie afwijkingen van deze gemiddelde verhouding gevonden kunnen worden. Ook tussen koeien onderling zullen verschillen kunnen optreden (zie ook hoofdstuk II).

2. HET UTRECHTS MELKGEBREK.

Dat ook veranderingen in de samenstelling van het caseinaatphosphaatcomplex plotseling gedurende de lactatie voor kunnen komen, kan geïllustreerd worden met melk, welke het z.g. "Utrechts melkgebrek" vertoont.

Op fabrieken, waar de kwaliteit van de rauwe melk onderzocht wordt m.b.v. de alcoholproef, wordt zo nu en dan melk aangetroffen, welke ondanks een normaal bacteriengehalte en een normale of vaak ook een lagere zuurheidsgraad dan de normale toch schift bij toevoeging van een gelijk volume van alcohol 70%. Indien het gebrek ernstig is, kan de melk koken niet verdragen en het komt zelfs voor, dat dergelijke melk direct na het melken schift. Het gebrek treedt plotseling op, vaak bij koeien in volle productie. Het doet zich evenwel ook voor bij melk gewonnen aan het einde van de lactatie.

Als de oorzaak voor de instabiliteit als zodanig wordt in de literatuur genoemd een verhoogde calciumionenconcentratie van de melk (lit. 5, 6, 85, 86, 87).

Er werd verondersteld, dat deze verhoging een gevolg zou zijn van een verhoging van het totaal in het serum aanwezige calcium (ultrafiltrabel calcium) of van een verlaging van het citraatgehalte van de melk of van een verlaging van het phosphaatgehalte van het serum.

Door genoemde onderzoekers werd wel gevonden, dat de calciumionenconcentratie in het ultrafiltraat van de instabiele melk hoger was dan gewoonlijk in normale melk voorkomt. De verdere samenstelling van de melk (stikstofgehalte e.d.) werd echter niet onderzocht. De gegeven verklaring is dan ook meer van kwalitatieve aard dan van kwantitatieve.

De stabiliteit van een deeltje wordt niet alleen bepaald door het omringende milieu maar ook door de samenstelling van het deeltje als zodanig.

De verminderde stabiliteit zou dan ook mede door verandering in de samenstelling van het caseinaatphosphaatcomplex veroorzaakt kunnen worden en niet alleen toegeschreven mogen worden aan een verhoogde calciumionenconcentratie.

Van een aantal monsters melk, welke het gebrek vertoonde, werd nagegaan of de samenstelling van het caseinaatphosphaatcomplex een andere was dan die van normale melk.

Bij de berekeningen werd gebruik gemaakt van het verschil in samenstelling tussen de melk en de daaruit bereide lebwei. Als correctiefactor voor de wei werd dezelfde factor gebruikt als bij vorige berekeningen (hoofdstuk II).

De samenstelling van de melk en de wei is weergegeven in tabel

TABEL XXXII

Normale melk

								melk						wei*			
No	zuurheidsgraad °N	caseïne N%	vet %	Ca %	P %	Mg %	citroenzuur %	Na mg per 100 ml	K mg per 100 ml	Cl mg per 100 ml.	lactose %	Ca %	Mg %	P %	citroenzuur %	mate van instabiliteit	Bijzonderheden
1	12,1	0,534	4,05	0,114	0,034	0,016	0,115	± 124	± 78	235	+ 2,44	0,035	0,012	0,017	0,124	-	2 dagen voor droogzetten
2	-	0,407	-	0,108	0,055	0,010	0,143	39	151	95	4,81	0,039	0,008	0,033	0,147	-	
3	-	0,435	4,21	0,118	0,062	0,012	0,136	32	140	92	4,68	0,038	0,009	0,035	0,139	-	
4	-	0,417	3,88	0,103	0,060	0,010	0,133	28	162	87	4,66	0,038	0,007	0,038	0,141	-	
5	16,6	0,490	4,18	0,129	0,062	0,014	0,135	57	124	116	4,26	0,044	0,010	0,036	0,141	-	
6	16,7	0,502	4,77	0,139	0,061	0,014	0,134	73	111	127	4,00	0,043	0,011	0,028	0,131	-	
7	16,3	0,460	4,20	0,129	0,063	0,013	0,137	61	128	125	4,27	0,042	0,009	0,033	0,142	-	
8	-	0,363	2,86	0,110	0,052	0,010	0,144	35	163	122	4,61	0,043	0,008	0,031	0,152	-	
9	-	0,391	3,53	0,108	0,063	0,010	0,139	40	167	113	4,30	0,040	0,008	0,041	0,148	-	
10	-	0,425	3,25	0,109	0,060	0,012	0,124	39	154	93	4,60	0,039	0,009	0,037	0,130	-	
								Met 70% alcohol instabiele melk									
								melk						wei *			
11	13,4	0,526	4,53	0,157	0,066	0,013	0,116	47	141	165	4,13	0,039	0,008	0,018	0,108	+++	
12	15,9	0,557	4,76	0,162	0,066	0,013	0,126	46	138	166	4,09	0,043	0,009	0,020	0,121	+++	
13	14,6	0,452	3,94	0,117	0,055	0,010	0,131	24	103	121	4,28	0,036	0,007	0,027	0,128	++	
14	14,1	0,370	4,07	0,122	0,058	0,011	0,142	38	156	130	4,35	0,041	0,008	0,027	0 140	++	
15	14,4	0,427	4,16	0,125	0,058	0,012	0,142	39	171	160	4,36	0,038	0,008	0,027	0,141	++	
16	14,4	0,573	4,42	0,202	0,071	0,014	0,102	64	146	172	4,09	0,044	0,008	0,011	0,076	++++	
17	16,4	0,545	4,44	0,165	0,070	0,017	0,152	75	116	139	3,82	0,048	0,012	0,026	0,151	+	oud melkse koe
18	13,6	0,346	3,94	0,114	0,051	0,013	0,178	87	184	179	3,63	0,047	0,011	0,028	0,183	+	

* In de wei werden natrium en kalium niet bepaald. De monsters werden onderzocht aan het begin van het onderzoek.

XXXII. De in de tabel als normaal aangeduide melk was afkomstig van koeien, welke ongeveer in het zelfde stadium van lactatie waren als de koeien,waarvan de afwijkende melk was gewonnen.

In tabel XXXIII zijn de hoeveelheden colloidaal calcium, magnesium, phosphaatphosphor en citroenzuur berekend per g caseine aangegeven.

Het bleek (tabel XXXII), dat in de melk, indien het gebrek ernstiger was, het calcium en het chloorgehalte hoger waren dan in normale melk, terwijl het citroenzuurgehalte en lactosegehalte lager waren dan normaal. De anorganische in zuur oplosbare phosphor was niet duidelijk hoger, het natrium-, kalium-, en magnesiumgehalte gelijk aan het normale gehalte.

In de wei was het calciumgehalte betrekkelijk normaal evenals het magnesiumgehalte, het gehalte aan anorganisch in zuur oplosbaar phosphor en het citroenzuurgehalte waren echter lager.

Bij de instabiele melk was een belangrijke verschuiving opgetreden in de verdeling van verschillende elementen over de phasen van de melk. In het caseinaatphosphaatcomplex van deze melk kwamen per g caseine zowel meer calcium als magnesium, phosphorzuur en citroenzuur voor (zie tabel XXXIII).

TABEL XXXIII

No	mmol Ca per g caseine	mmol Mg per g caseine	mmol phosphaat P per g caseine	mmol citroenzuur per g caseine	instabiliteit
			Normale melk		
1	0,759	0,077	0,222	0,004	-
2	0,680	0,038	0,293	0,005	-
3	0,744	0,055	0,343	0,013	-
4	0,632	0,054	0,297	0,003	-
5	0,708	0,063	0,298	0,008	-
6	0,778	0,051	0,359	0,023	-
7	0,768	0,066	0,358	0,010	-
8	0,749	0,044	0,316	0,000	-
9	0,703	0,042	0,317	0,001	-
10	0,668	0,054	0,303	0,004	-
			Melk instabiel met 70% alcohol		
11	1,114	0,079	0,590	0,032	+++
12	1,052	0,076	0,536	0,028	+++
13	0,726	0,047	0,316	0,022	++
14	0,890	0,066	0,428	0,025	++
15	0,824	0,060	0,364	0,022	++
16	1,339	0,090	0,645	0,056	++++
17	0,882	0,072	0,409	0,021	+
18	0,795	0,051	0,341	0,017	+

De veronderstelling lijkt gerechtvaardigd, dat de instabiliteit niet zozeer veroorzaakt werd door een hogere calciumionenconcentratie maar meer door een veranderde samenstelling van het caseinaatphosphaatcomplex als zodanig.

Bij het bereiden van de kunstmelk (hoofdstuk V) werd een soortgelijk verschijnsel waargenomen. Indien meer calcium en phosphaatphosphor per g caseine in het kunstmatige complex afgezet

werd, werd de "melk" instabieler. In het algemeen nam dan echter de verhouding calcium/phosphor in de wei ook af (bijv. tabel XXIV monster 3a, 4a, 5a, 6a en 7a vergeleken met resp. 3b, 4b, 5b, 6b en 7b). De instabiliteit bij de kunstmelk was waarschijnlijk alleen toe te schrijven aan de grotere hoeveelheid "calciumphosphaat" afgezet op de caseine. Het lijkt niet onwaarschijnlijk, dat een zelfde verklaring gegeven kan worden voor de instabiliteit van de melk, die het "Utrechts Melkgebrek" vertoont. De physiologische oorzaak zal moeilijker te vinden zijn, vooral ook omdat het gebrek vaak even plotseling verdwijnt als het optreedt.

3. HET VERANDEREN VAN DE PHOSPHAATSAMENSTELLING DOOR VERHITTEN VAN MELK.

Door enkele onderzoekers (zie hoofdstuk I) werd waargenomen, dat de samenstelling van het phosphaat van het complex verandert, indien de melk wordt verhit.

In hoofdstuk III werd aangetoond, dat de molaire verhouding Ca/P van het complexe phosphaat, neergeslagen bij kamertemperatuur in gedestilleerd uitgekookt water en daarna opgekookt met de moedervloeistof, na het opkoken hoger was dan ervoor.

Daar in het caseinaatphosphaatcomplex van melk een gelijksoortig phosphaat aanwezig is, mag wel verondersteld worden, dat ook daarin de verhouding Ca/P van het complexe phosphaat na verhitten hoger zal zijn dan ervoor.

4. HET TOEVOEGEN VAN OXALAAT AAN MELK EN DE TITRATIEMETHODEN BEHANDELD IN HOOFDSTUK I.

Bij het onderzoek van het caseinaatphosphaatcomplex is veel gebruik gemaakt van het feit, dat door toevoeging van een verzadigde neutrale oplossing van kaliumoxalaat aan melk de zuurtegraad daarvan afneemt door het in oplossing gaan van colloidaal phosphaat (zie hoofdstuk I, Lingtitratie, verbeterde Lingtitratie, titratie volgens Pyne en Ryan.)

Op deze daling van de zuurtegraad werden bepalingen gebaseerd van de hoeveelheid colloidaal phosphaat.

De reactie, welke plaats vindt, werd wel als volgt schematisch weergegeven:

$$Ca_3(PO_4)_2 + 3K_2\ \text{oxalaat} \longrightarrow 3Ca\ \text{oxalaat} + 2K_3PO_4$$

$$2KOH + 2K_2HPO_4$$

Afgezien van andere factoren, welke van invloed zijn op de uitkomsten van dergelijke methoden, volgt uit ons onderzoek zonder meer, dat de titratiemethode van Ling en de z.g. verbeterde Lingtitratie nooit geheel juiste uitkomsten kunnen geven, daar geen tertiair phosphaat aanwezig is, maar een complex phosphaat van wisselende samenstelling.

Ook de methode volgens Pyne en Ryan zal geen juiste uitkomsten geven. De hoeveelheid caseinecalcium in melk is niet gelijk aan die gebonden door caseine in caseinaatoplossingen.

De afname van de zuurtegraad veroorzaakt door de toevoeging van oxalaat kan evengoed optreden als het complexe phosphaat aanwezig is, zoals met een eenvoudige berekening aangetoond kan worden. Uit de aanwezigheid van dit phosphaat met een molaire verhouding Ca/P van ongeveer 1, 40 volgt tevens, dat de door Ling met de Lingtitratie en de door Pyne en Ryan met hun methode teruggevonden hoeveelheden altijd wat lager moesten zijn dan de door hen verwachte hoeveelheden.

5. DE FORMOLTITRATIE EN HET CASEINAATPHOSPHAATCOMPLEX.

Zoals in hoofdstuk I is vermeld wordt bij de formaltitratie eveneens vaak wat van een verzadigde neutrale kaliumoxamaatoplossing toegevoegd. De formoltiters, die dan worden gevonden zijn hoger dan wanneer deze toevoeging niet plaats vindt. Het is wel zeker, dat deze hogere waarden ontstaan door het in oplossing gaan van colloidaal phosphaat uit het complex.

Het verschil werd door Pyne merkwaardigerwijze geinterpreteerd als veroorzaakt te zijn door het verbreken van een chemische binding tussen het caseinaat en het phosphaat (dubbelzouten), door Evenhuis en de Vries daarentegen uit het gedrag van het phosphaat. Het verschil zou verdwijnen, indien bij een titratie, waarbij geen oxalaat toegevoegd wordt, na het toevoegen van de formaline en het daarop volgende titreren met loog ongeveer een uur gewacht wordt met het bepalen van de eindwaarde.

In verband met het belang, dat de verschijnselen hebben t. a. v. de verklaring van de structuur van het caseinaatphosphaatcomplex, werden ook door ons enige proeven uitgevoerd. Direct zij daarbij opgemerkt, dat Evenhuis en de Vries niet logisch te werk gingen. Zij hadden ook bij het neutraliseren van de melk t. o. v. phenolphtaleine en voor de toevoeging van formaline moeten wachten tot zich een evenwicht had ingesteld.

Bij onze proeven werd de melk zowel snel als langzaam op pH 8, 40 gebracht of t. o. v. phenolphtaleine geneutraliseerd (eerste titratie). Na toevoeging van formaline werd de formoltiter van hetzelfde monster zowel direct als na een zekere tijd bepaald (eindtitratie).

Wanneer de eerste titratie snel (2 min.) uitgevoerd werd, was nog geen evenwicht ingetreden. Na toevoegen van de formaline werd bij de eindtitratie na langer staan een hogere formoltiter gevonden.

Bij een snelle eerste titratie en een snelle eindtitratie was de formoltiter van met oxalaat behandelde melk 13-14% hoger dan die van overéénkomstige melk zonder oxalaat. Dit verschil werd tot 6-8% genivelleerd, wanneer de eindtitratie na de formaline toevoeging niet snel doch langzaam werd uitgevoerd. De eindwaarden lagen dan hoger, zowel voor de melk met oxalaat als voor die zonder oxalaat.

Wanneer de eerste titratie langzaam geschiedde was het verschil bij een snelle eindtitratie 15-16% en na anderhalf uur 7-10% (tabel XXXIV).

Ook indien oxalaat toegevoegd wordt, is het noodzakelijk de titratie's niet te snel uit te voeren, zoals blijkt uit tabel XXXV.

TABEL XXXIV

50 ml melk, geen oxalaat toegevoegd.

Tijd uren	melk 1	melk 2	melk 3	melk 4	melk 5
			1e titratie		
0	8,62	10,22	9,82	8,57	9,20
formaline toegevoegd.					
			eindtitratie		
0	7,51	7,96	7,72	7,98	8,05
½	7,98	8,39	8,18	8,49	8,50
1	8,18	8,58	8,40	8,79	8,78
1½	8,31	8,68	8,55	8,95	8,90
dezelfde melk, geen oxalaat toegevoegd.					
			1e titratie		
0	8,61	10,26	9,84	8,63	9,16
½	8,96	10,61	10,30	9,09	9,58
1	9,09	10,80	10,49	9,31	9,78
1½	9,16	10,91	10,65	9,48	9,91
formaline toegevoegd.					
			eindtitratie		
0	7,36	7,85	7,59	7,89	7,96
½	7,79	8,27	8,02	8,38	8,42
1	8,15	8,50	8,33	8,65	8,68
1½	8,26	8,58	8,45	8,80	8,82
dezelfde melk met oxalaat					
			1e titratie		
0	3,71	4,81	4,56	3,33	3,72
formaline toegevoegd.					
0	8,46	9,05	8,75	9,08	9,18
½	8,67	9,17	9,01	9,28	9,41
1	8,77	9,31	9,13	9,47	9,52
1½	8,85	9,34	9,17	9,53	9,58
dezelfde melk met oxalaat					
			1e titratie		
0	3,70	4,78	4,52	3,39	3,74
½	3,81	4,94	4,60	3,49	3,88
1	3,84	5,10	4,66	3,58	3,94
1½	3,88	5,10	4,71	3,62	3,98
formaline toegevoegd.					
			eindtitratie		
0	8,44	9,09	8,74	9,05	9,16
½	8,60	9,29	8,95	9,34	9,34
1	8,73	9,37	9,10	9,44	9,44
1½	8,83	9,42	9,19	9,53	9,52

Er werden ook enkele titratie's uitgevoerd met:
a: calciumcaseinaat
b: kunstmatig bereide calciumcaseinaatphosphaatcomplexen.
c: calcium caseinaat, waaraan van te voren geprecipiteerd calciumphosphaat was toegevoegd.

TABEL XXXV

Formoltitratie's van 50 ml melk, waaraan 2 ml neutraal verzadigd kaliumoxalaat was toegevoegd.

Tijd dagen	melk 1	melk* 2	melk 3	melk* 4
		1e titratie		
0	3,00	3,04	2,69	2,72
1	3,44	3,41	3,00	2,86
2	3,68	3,52	3,11	2,94
3	3,88	3,64	3,23	2,97
4	4,04	3,72	3,30	2,97
6	4,25	3,89	3,43	2,97
formaline toegevoegd.				
		eindtitratie.		
0	8,49	8,61	8,44	8,64
1	9,08	9,11	9,05	9,08
2	9,27	9,22	9,22	9,12
3	9,37	9,30	9,31	9,15
4	9,50	9,37	9,40	9,15
5	9,58	9,37	9,47	9,15
7	9,70	9,37	9,60	9,15

* melk 2 en 4 werden onder stikstof bewaard.

Het al of niet toevoegen van oxalaat gaf alleen een verschil in de formoltiter bij de kunstmatig bereide complexen (tabel XXXVI).

TABEL XXXVI

Formoltiter per g caseine.

a : calciumcaseinaat	6,16
b1 : kunstmatig bereid caseinaatphosphaat-complex zonder oxalaat	5,09
b2 : idem met oxalaat	5,94
c1 : calciumcaseinaat met calciumphosphaat zonder oxalaat	6,13
c2 : idem, met oxalaat.	6,20

De waarden werden afgelezen anderhalf uur na het toevoegen van de formaline. Bij het calciumcaseinaat was de waarde dan eerst constant.

Uit de proeven bleek dus, dat het verschil tussen de formoltiters van melk, waaraan wel en waaraan geen oxalaat was toegevoegd niet geheel door langer wachten werd opgeheven. Door Pyne werd ongeveer hetzelfde gevonden (lit. 63). Uit zijn laatste onderzoek concludeerde Pyne nu echter tevens, dat het verschil in formoltiter geen argument is ten gunste van de door hem vroeger aangenomen dubbelzoutvorming tussen caseine en phosphorzuur.

De enige conclusie, welke uit ons onderzoek getrokken kon worden, was, dat de aanwezigheid van colloidaal phosphaat in melk op

de één of andere wijze de binding van formaline aan caseine verhinderd. Het is mogelijk, dat het complexe phosphaat alleen een sterische belemmering vormt voor deze reactie.

6. HET COLLOIDALE PHOSPHAAT EN HET ONDERZOEK VAN MELK EN MELKPRODUCTEN.

Bij het onderzoek van melk en melkproducten zal meer dan tot nu toe gebeurde met de zeer speciale aard van het phosphaat in het caseinaatphosphaatcomplex rekening moeten worden gehouden.

Bij het onderzoek naar het gedrag en de aard van het phosphaat werd gevonden (hoofdstuk III), dat tot pH 5,5 het oorspronkelijke phosphaat gedeeltelijk ontkalkt werd. Tussen pH 5, 5 en 5, 0 kan bovendien afhankelijk van de concentratie een kristallisatie van secundair phosphaat optreden. Beneden pH 5, 00 loste het oorspronkelijke phosphaat geheel op.

Men zal zich dan ook voor kunnen stellen, dat het bij het onderzoek van kaas van belang is te weten tot welke waarde de pH daalde tijdens de bereiding.

Indien deze waarde niet beneden pH ± 5,00 kwam, zal de kans bestaan, dat bij wat oudere kaas met een pH van bijv. 5, 3 het calciumphosphaat in een andere toestand aanwezig zal zijn dan bij een kaas van dezelfde ouderdom en met gelijke pH (5, 3), welke op jongere leeftijd bijv. een pH van 4, 7 had.

Op dezelfde wijze zal bij het neutraliseren van gezuurde producten de uiteindelijke toestand, waarin het phosphaat voorkomt, kunnen afhangen van de mate waarin zuring heeft plaats gevonden.

De verkregen resultaten zullen tevens van belang zijn voor de verklaring van de instabiliteit, welke op kan treden bij het bereiden van "geëvaporeerde" melk. Het verwijderen van water uit melk zal de samenstelling van het caseinaatphosphaatcomplex kunnen doen veranderen. De verdeling van de stoffen over de phasen van de melk zal na het indampen een andere kunnen zijn dan ervoor. Zeer waarschijnlijk zal het caseinaatphosphaatcomplex na het indampen meer anorganische stoffen bevatten. Men zou zich voor kunnen stellen, dat de stabiliteit mede zal afhangen van de mate, waarin deze verschuiving van opgeloste naar colloidaal aanwezige stoffen optreedt.

SAMENVATTING

In de literatuur worden teneinde theorieën betreffende de samenstelling en structuur van het caseinaatphosphaatcomplex van melk te bewijzen veel argumenten aangevoerd, welke bij kritisch onderzoek slechts weinig bewijskracht blijken te bezitten.

Wel geeft het in de literatuur vermelde aanleiding tot de volgende conclusie.

1. De caseinaatphosphaatdeeltjes van melk bestaan uit caseine, calcium en phosphorzuur, welke stoffen op één of andere wijze innig verbonden zijn.
   Ook magnesium en citroenzuur komen in het caseinaatphosphaatcomplex voor.
2. Wanneer kaliumoxalaat aan melk of aan het uit melk geïsoleerde en daarna in water gesuspendeerde complex wordt toegevoegd, wordt de oplossing alkalischer. Dit geeft een sterke aanwijzing, dat calciumphosphaat als zodanig in het complex aanwezig is en dat dit phosphaat minder zuur is dan secundair phosphaat.
3. De toestand van het phosphaat in het complex verandert door verhitten van melk.
4. Het phosphaat in het complex oefent invloed uit op de uitkomst van de formoltitratie. Niet duidelijk is of dit toegeschreven moet worden aan een binding van het phosphaat aan de caseïne of aan het gedrag van het phosphaat als zodanig bij dergelijke titratie's.
5. De zoutvorming tussen calcium en phosphorzuur wordt door de aanwezigheid van caseine beïnvloed. In aanwezigheid van caseine ontstaat bij potentiometrische titratie's van phosphorzuur met calciumhydroxyde gemakkelijker minder zuur phosphaat dan secundair phosphaat.

Met behulp van een groot aantal analyses van melk van individuele koeien en de daarbij behorende lebwei werden berekeningen uitgevoerd over de samenstelling van het complex. Daarbij werd aangenomen, dat het caseinaatphosphaatcomplex in principe bestaat uit calciumcaseinaat en calciumphosphaat.

De phosphaatphosphor en de hoeveelheid caseinephosphor kunnen bepaald worden. Het calcium kan door analyse echter niet verdeeld worden in caseinecalcium en phosphaatcalcium.

Wanneer verondersteld werd, dat de hoeveelheid caseinecalcium per g caseine altijd en dus ook in iedere melk gelijk is, bleek de berekende samenstelling van het phosphaat van het complex in de melk van een individuele koe gedurende de lactatie te varieren. Wiskundig kon tevens aangetoond worden, dat er verschil bestaan kan gedurende de lactatie tussen de zo berekende gemiddelde samenstelling van het colloidale phosphaat in de melk van verschillende koeien.

De uitkomsten van de berekeningen maakten het al heel onwaarschijnlijk, dat het colloidale phosphaat als secundair phosphaat aanwezig is.

Indien verondersteld werd, dat het phosphaat gedurende de lactatie

constant van samenstelling is, varieerde de berekende hoeveelheid caseinecalcium per g caseine bij een individuele koe en van individu tot individu.

Wanneer magnesium en citroenzuur in de berekeningen opgenomen werden, konden gelijke conclusie's getrokken worden. Wel hadden beide een belangrijke invloed op de berekende waarden als zodanig. Hiermede is door veel auteurs te weinig rekening gehouden.

Gezien de resultaten van de berekeningen en het verband, dat tussen de hoeveelheden van enkele bestanddelen van het complex bleek te bestaan, leek het niet onwaarschijnlijk, dat in het caseinaatphosphaatcomplex calciumphosphaat physisch gebonden is aan calciumcaseinaat. De gevonden variatie, hetzij in de samenstelling van het phosphaat (veronderstelling caseinecalcium constant) hetzij in de hoeveelheid caseinecalcium per g caseine (veronderstelling samenstelling phosphaat constant), maakte het noodzakelijk zowel een onderzoek in te stellen naar de aard van het phosphaat als naar de hoeveelheid calcium, welke door caseine bij de pH van melk wordt gebonden.

Bij oudere onderzoekingen over de vorming van calciumphosphaat in de natuur is men veelal uitgegaan van een hoeveelheid phosphorzuur, welke met calciumhydroxyde geneutraliseerd werd. Deze wijze van werken is niet juist, want in de cellen van de melkklier zal de pH niet dalen tot < 2.

Het phosphaat dat ontstond, wanneer calciumhydroxyde- en phosphorzuuroplossing druppelsgewijs bij constante pH (pH 6,70, de pH van melk) en kamertemperatuur bij elkaar gevoegd werden, bleek een samenstelling te hebben, die afweek van die van bekende phosphaten.

De molaire verhouding Ca/P was bij pH 6,70 1,35 - 1,40. Zij bleek afhankelijk van de pH, waarbij het phosphaat neergeslagen werd. Beneden pH 6,70 precipiteerde secundair phosphaat. Bij pH 9,00 was de verhouding Ca/P ± 1,50.

Door uitwassen met gedestilleerd water was meestal geen, soms slechts een geringe verandering in de verhouding Ca/P van het neerslag aan te brengen.

De samenstelling van het phosphaat was ook afhankelijk van de temperatuur.

Over het algemeen nam de verhouding Ca/P toe bij hogere temperaturen, zowel wanneer het phosphaat daarbij geprecipiteerd werd als wanneer het na neerslaan bij kamertemperatuur met de moedervloeistof verwarmd werd.

Onder invloed van pH-veranderingen bleek het phosphaat calcium op te kunnen nemen of af te kunnen staan zonder in principe van structuur te veranderen. Zo daalde bijv. wanneer de pH van 9,00 met HCl teruggebracht werd tot 5,95, de molaire verhouding Ca/P in het phosphaat van 1,51 tot 1,38. Werd de pH van de vloeistof met NaOH weer op pH 9,00 gebracht, dan steeg de verhouding Ca/P in het neerslag weer tot 1,54.

Het leek mogelijk het phosphaat door verlaging van de pH in zekere mate te ontkalken. Ook kon calcium uit het phosphaat uitgewis-

seld worden tegen natrium door het phosphaat te brengen in een natriumchloride oplossing.
Het phosphaat bezat klaarblijkelijk in zekere mate eigenschappen als een ionenwisselaar.
Werden de neerslagen röntgenographisch onderzocht, dan bleek het neerslag, dat ontstond, wanneer calciumhydroxyde- en phosphorzuuroplossing druppelsgewijs bij pH 6, 70 samengevoegd werden, een diagram te bezitten, dat overeenkomst vertoonde met dat van hydroxyapatiet. In het diagram waren de lijnen evenwel niet scherp.
Werd het phosphaat geprecipiteerd bij pH 9,00, dan was het amorph evenals het phosphaat, dat verkregen werd bij pH 7, 00 in aanwezigheid van magnesium of citroenzuur.
Indien één van deze stoffen of beide in de vloeistof aanwezig waren tijdens het neerslaan van het phosphaat, kwamen zij ook in het neerslag voor.
Er werden evenwel geen aanwijzingen gevonden, dat magnesiumphosphaat of calciumcitraat afzonderlijk in dergelijke neerslagen aanwezig waren.
De indruk werd verkregen, dat afhankelijk van de samenstelling van de vloeistof meer of minder complexe phosphaten gevormd kunnen worden.
Wanneer calciumhydroxyde en phosphorzuur druppelsgewijs bij pH 6, 70 toegevoegd werden aan een oplossing, welke andere ionen bevatte in een concentratie overeénkomend met die aanwezig in het serum van melk, dan ontstond een neerslag met een molaire verhouding Ca + Mg/ P + citroenzuur ongeveer gelijk aan die welke voor het phosphaat uit het caseinaatphosphaatcomplex van melk berekend kon worden.

De phosphaten "hechten" zich zeer gemakkelijk aan allerlei stoffen (vetbolletjes, uitgewassen room, uitgesmolten in water gesuspendeerd botervet, gisten, carboxymethylcellulose deeltjes). Ook aan het oppervlak van caseine zullen zij waarschijnlijk gemakkelijk worden vastgehouden.
Geconcludeerd werd dan ook, dat het zeer wel mogelijk is, dat een gelijksoortig complex phosphaat in het caseinaatphosphaatcomplex van melk aanwezig is. De samenstelling van het phosphaat zal enigszins met de samenstelling van de melk varieren.

Het basebindend vermogen van zuivere caseine bepaald door middel van potentiometrische titratie's bleek bij pH 6, 70 voor calcium ± 0, 80 maeq te zijn, voor natrium ± 0, 70 maeq. De waarden waren gelijk voor caseine, afkomstig uit verschillende soorten melk (gemengde melk, melk van individuele koeien in verschillende stadia van lactatie).
De aanwezigheid van 0, 80 maeq. caseinecalcium in het caseinaatphosphaatcomplex leek echter niet waarschijnlijk, tenminste niet wanneer verondersteld werd, dat in het complex calciumphosphaat van dezelfde aard als omschreven aanwezig is.
Bij een poging het verschil tussen de hoeveelheid caseinecalcium gevonden bij de titratie's en die veelal berekend uit de samenstelling van melk te verklaren werd verondersteld, dat natrium en kali-

um in het caseinaatphosphaatcomplex aanwezig zijn. De juistheid van dit vermoeden kon door proefnemingen bevestigd worden.

Het bleek, dat de hoeveelheid natrium en kalium tezamen aanwezig in het complex van melk in de orde van grootte van 0,15 maeq per g caseine lag. De waarde voor verschillende monsters melk liep belangrijk uitéén.

Verondersteld werd, dat de hoeveelheid natrium en kalium gebonden aan de caseine afhankelijk zou zijn van de verdere samenstelling van de melk. Met proeven, waarbij aan calciumcaseinaat keukenzout toegevoegd werd, werd aannemelijk gemaakt, dat o.a. de hoeveelheid zout aanwezig in melk van invloed kan zijn op de hoeveelheid natrium aan de caseine in het complex gebonden.

De hoeveelheid caseinecalcium zal echter meer nog afhankelijk zijn van de hoeveelheid phosphorzuur en citroenzuur.

Het onderzoek maakte het waarschijnlijk, dat zowel de veronderstelling, dat in het caseinaatphosphaatcomplex het phosphaat steeds constant van samenstelling is, als de veronderstelling, dat in dit complex per g caseine steeds éénzelfde hoeveelheid caseinecalcium aanwezig is, niet juist is.

Wanneer phosphorzuur toegevoegd werd aan calciumcaseinaat en daarna langzaam getireerd werd met calciumhydroxyde, ontstond geen secundair calciumphosphaat zoals bij afwezigheid van caseine, maar een minder zuur phosphaat. Dit was ook het geval, indien i.p.v. caseine andere stoffen (carboxymethylcellulose, pectine, citroenzuur, glycerinephosphorzuur) bij de titratie aanwezig waren.

Zeer waarschijnlijk hebben deze stoffen met caseine het vermogen gemeen tussen pH 5 en pH 7 met calcium complexe zouten te vormen. Door deze zoutvorming zal het neerslaan van secundair phosphaat vertraagd kunnen worden tengevolge waarvan direct een minder zuur phosphaat kan neerslaan.

Na afloop van de titratie's was in het neerslag tezamen met phosphaat altijd een hoeveelheid van de bij de titratie toegevoegde stof aanwezig. Tussen de hoeveelheid phosphaat en die van de toegevoegde stof in het neerslag was echter geen enkel stoecheometrisch verband. Ook niet indien de toegevoegde stof caseine was.

Er was dan ook geen reden om te concluderen, dat bij deze titratie's calcium met caseine en phosphorzuur alleen dubbelzouten vormt. De uitkomst van dergelijke titratie's kan dan ook niet als bewijs gebruikt worden voor de opvatting, dat in het caseinaatphosphaatcomplex al het phosphaat als dubbelzout aan de caseine gebonden is.

Dat in het caseinaatphosphaatcomplex van melk het complexe phosphaat zoals hiervoor beschreven voorkomt, kon met behulp van kunstmatige caseinaatphosphaatcomplexen waarschijnlijk gemaakt worden.

Ook het basebindend vermogen van de caseine zal ongeveer de waarde hebben, welke bij de potentiometrische titratie's van caseine voor de pH van melk (pH 6,70) gevonden werd.

Met behulp van de kunstmatige complexen kon tevens aangetoond worden, dat het zeer waarschijnlijk is, dat in het complex van melk slechts een deel van de vrije zuurgroepen van de caseine met calcium zouten vormt en dat een ander deel dit met natrium resp. kalium, magnesium zal doen. De mate, waarin één en ander plaats vindt, zal afhangen van de totale samenstelling van de melk.

Deze opvatting wijkt af van die van andere onderzoekers. Meestal wordt verondersteld, dat aan caseine alleen calcium gebonden is in een hoeveelheid aequivalent aan de caseinephosphor.

Uit het onderzoek in zijn geheel werd geconcludeerd, dat de caseinaatphosphaatdeeltjes van melk opgebouwd zijn uit deeltjes caseine, aanwezig als calcium-, natrium-, kalium- en magnesiumzouten en onderling aaneengehecht niet alleen door calcium- en waterstofbruggen maar ook door deeltjes complex phosphaat.

De afmetingen van de phosphaatdeeltjes t.o.v. die van caseinedeeltjes zullen zodanig zijn, dat van een fijne verdeling van het phosphaat over het oppervlak van de caseinedeeltjes gesproken mag worden.

De samenstelling van het complexe phosphaat zowel als de hoeveelheid caseinecalcium en de onderlinge verhoudingen, ofschoon tamelijk constant, zullen toch min of meer afhankelijk zijn van de totale samenstelling van de melk. Indien melk van veel koeien gemengd wordt zal steeds ongeveer dezelfde samenstelling voor het caseinaatphosphaatcomplex gevonden worden. Wanneer echter melk van individuele koeien regelmatig wordt onderzocht tijdens een lactatie zullen variatie's in deze samenstelling gevonden kunnen worden.

Met deze opvatting betreffende opbouw en structuur van het caseinaatphosphaatcomplex is geen van de conclusie's, waartoe het in de literatuur vermelde aanleiding geeft, in strijd.

Naar aanleiding van de ontwikkelde theoriën werden de formoltitratie en het Utrechts melkgebrek nader besproken.

The results of this investigation will be published in English in "The Netherlands Milk and Dairy Journal".

LITERATUURLIJST

1. Alexander, T.G., J.Dairy Sci. 39 (1956) 912.
2. d'Ans, J. & Knutter, R., Angew.Chem. 65 (1953) 578.
3. Bassett, H., J.Chem.Soc. (Lond.) 11 (1917) 620.
4. Bjerrum, N., Mat.Fyss.Medd.Dan.Vid.Selsk. 31 (1958) no. 7.
5. Boogaerdt, J., Dissertatie Utrecht 1954.
6. Boogaerdt, J., Nature 174 (1954) 884.
7. Boulet, M. & Rose, D., J.Dairy Res. 21 (1954) 229.
8. Bredig, M.A., Frank, H.H. & Füldner, H., Z.Electrochem. 38 (1932) 158.
9. Burg, P.van der, Dissertatie Wageningen 1946.
10. Burg, P.van der, Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 1 (1947) 69.
11. Cameron, F.K. & Bell, J.M., U.S.Dep.Agr.Bur. of Soils Bull. 41 (1907).
12. Carlström, D., Act.Radiol.Suppl. 121 (1955).
13. Carr, C.W., J.Dairy Sci. 42 (1959) 267.
14. Clark, W.M.J., J.Dairy Sci. 10 (1927) 195.
15. Cohn, E.J. & Berggren, R.E.L., J.Gen.Physiol. 7 (1924) 45.
16. Dallemagne, M.J. & Melon, J., Arch.Intern.Physiol. 58 (1950) 188.
17. Danneel, H. & Frölich, K.W., Z.Electrochem. 36 (1930) 302.
18. Davies, D.T. & White, J.C.D., J.Dairy Res. 27 (1960) 171.
19. Davies, W.L., Analyst 57 (1932) 79.
20. Edmondson, L.F. & Tarassuk, N.D., J.Dairy Sci. 39 (1956) 123.
21. Eilers, H., Versl.Landbouwk.Onderz. 50 (1945) 1087.
22. Evenhuis, N. & Vries, Th.R. de, Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 9 (1955) 146.
23. Evenhuis, N. & Vries, Th.R. de, Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 10 (1956) 1.
24. Evenhuis, N. & Vries, Th.R. de, Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 10 (1956) 101.
25. Evenhuis, N. & Vries, Th.R. de, Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 10 (1956) 180.
26. Evenhuis, N. & Vries, Th.R. de, Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 11 (1957) 111.
27. Evenhuis, N. & Vries, Th.R. de, Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 11 (1957) 213.
28. Fabry, C., Biochem. et Biophys.Act. 14 (1954) 401.
29. Ford, T.F., Ramsdell, G.A. & Landsman, Sh.G., J. Dairy Sci. 38 (1955) 843.
30. Ford, T.F., Ramsdell, G.A., Landsman, Sh.G. & Alexander, T.G., J.Dairy Sci. 40 (1957) 1395.
31. Ford, T.F. & Martinez-Mateo, J., J.Dairy Sci. 41 (1958) 1286.
32. Gericke, S., Angew.Chem. 65 (1953) 59.
33. Gortner, R.A., Robinson, A.D. & Palmer, P.S., J.phys. Chem. 36 (1932) 1857.
34. Greenwald, I., Redisk, J. & Kibrick, A.C., J.Biol.Chem. 135 (1940) 65.

35. Greenwald, I., J.Am.Chem.Soc. 16 (1944) 1305.
36. Guittonneau, G. & Brigando, J., Le Lait 16 (1936) 577.
37. Gyorgi, P., Biochem.Z. 142 (1923) 1.
38. Harris, Proc.Roy.Soc. London B 95 (1924) 440.
39. Harris, Proc.Roy.Soc. London B 95 (1924) 500.
40. Harris, Proc.Roy.Soc. London B 104 (1929) 413.
41. Have, A.J. van der, Ned.Melk en Zuiveltijdschr.8 (1954)157.
42. Have, A.J. van der & Mulder, H., Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 11 (1957) 128.
43. Hayek, E., Müllner, F. & Köller, K., Monatsh.f.Chem. 82 (1951) 959.
44. Hayek, E., Müllner, F. & Köller, K., Akad.Wiss.Wien.Mat. Nat.Abt. IIb 160 (1951) 168.
45. Hendricks, S.B., Jefferson, M.E. & Mosly, V.M., Z.f.Kristallogr. 81 (1932) 152.
46. Hendricks, S.B., Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 36 (1950) 731.
47. Hendricks, S.B. & Hill, W.L., Trans Macy.Conf. on Metabol. Interrel. 3 (1951) 173.
48. Hoffman, W.F. & Gortner, R.A., J.phys.Chem. 29 (1925) 769.
49. Holt, L.E., La Mer, V.K. & Chown, H.B., J.Biol.Chem. 64 (1925) 579.
50. Horst, M.G. ter, Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 1 (1947) 1006.
51. Horst, M.G. ter, Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 4 (1950) 246.
52. Hostettler, H. & Rychener E., Int.Dairy Congr. Stockholm II (1949) 175.
53. Jensen, T. & Moller, A., Act.Odant.Scand. 15 (1957) 132.
54. Kadt, G.S. de & Minnen, G.van, Rec.Trav.Chim.des P.B. 63 (1943) 577.
55. Kometiani, P.A., Milchwirtsch.Forsch. 12 (1931) 433.
56. Koops, J., Chem.Weekbl. 53 (1957) 406.
57. Kuyper, A.C., J.Biol.Chem. 123 (1938) 405.
58. Lees, H. & Kuiper, A.C., J.Biol.Chem 225 (1957) 641.
59. Lehman, J., Pflügers Archiv. 56 (1894) 558.
60. Ling, E.R., J.Dairy Res. 7 (1936) 145.
61. Ling, E.R., J.Dairy Res. 8 (1937) 173.
62. Logan, M.A. & Taylor, H.L., J.Biol.Chem. 125 (1938) 291.
63. McGann, T.C.A. & Pyne, G.T., J.Dairy Res. 27 (1960) 9.
64. Mulder, H., Have, A.J. van der & Schipper, C.J., De samenstelling van melk van Ned.Koeien. Wageningen 1959.
65. Mulder, H. & Schipper, C.J., Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 13 (1959) 137.
66. Palmer, L.S. & Richardson, G.A., Third Coll.Symp.Mon. Chem.Catal.Co N.Y. 3 (1925) 112.
67. Porcher, Ch., Le lait au point du vue colloidal (1929).
68. Powell, M.E. & Palmer, L.S., J.Dairy Sci. 18 (1935) 401.
69. Pyne, G.T., Biochem.J. 26 (1932) 1006.
70. Pyne, G.T., Biochem.J. 28 (1934) 940.
71. Pyne, G.T., J.Dairy Res. 11 (1940) 294.
72. Pyne, G.T. Dairy Sci.Abstr. 27 (1955) 267.
73. Pyne, G.T., McGann, T.C.A., J.Dairy Res. 27 (1960) 9.
74. Pyne, G.T. & Ryan, J.J., Proc.Roy.Dubl.Soc. 20 (1932) 471.

75. Pyne, G.T. & Ryan, J.J., J.Dairy Res. 17 (1950) 200.
76. Ramsdell, G.A. & Whittier, E.O., J.Biol.Chem.154 (1944) 413.
77. Ramsdell, G.A. & Hufnagel, C.F., Int.Dairy Congr. Den Haag III (1953) 1025.
78. Richmond, B., Analyst 36 (1911) 9.
79. Robinson, A.D., Gortner, R.A. & Palmer, Z.S., J.phys. Chem. 36 (1932) 1857.
80. Sandelin, A.E., Meijerit. Aika Kausk. 5 (1943) 1.
81. Schleede, A., Smidt, W. & Kindt, H., Z.Electrochem. 38(1932) 633.
82. Scheffé, H., Biometrica 40 (1953) 87.
83. Scheel, K.C., Z.f.anal.Chem. 105 (1936) 256.
84. Schober, R. & Fricker, A., Milchwissensch. 9 (1954) 83.
85. Seekles, L., Smeets, W.T.G.M., Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 1 (1947) 7.
86. Smeets, W.T.G.M., Thesis Utrecht (1952).
87. Smeets, W.T.G.M., Ned.Melk en Zuiveltijdschr. 9 (1955) 249.
88. Slijke, D.D. van, J.Biol.Chem. 16 (1913/1914) 531.
89. Slijke, L.L. van & Bosworth, A.W., J.Biol.Chem. 19 (1914) 67.
90. Slijke, L.L. van & Bosworth, A.W., J.Biol.Chem. 20 (1915) 135.
91. Slijke, L.L. van & Bosworth, A.W., Proc.World Dairy Congr. 2 (1923) 1145.
92. Söldner, F., Landwirtsch. Versuchsst. 35 (1888) 351.
93. Toni, G.M. de, Kolloid Z., 28 (1921) 145.
94. Trömel, G. & Möller, H., Z.anorg. Chem.205-206 (1932) 227.
95. Verma, I.S. & Sommer, H.H., J.Dairy Sci. 50 (1957) 331.
96. Waugh, D.F., Disc.Far.Soc. 25 (1958) 156.
97. Wendt, G.L. & Clark, H.S., J.Am.Chem.Soc. 45 (1923) 881.
98. White, J.C.D. & Davies, D.T., Int.Dairy Congr. Roma Vol. I Part II (1956) 288.
99. White, J.C.D. & Davies, D.T., J.Dairy Res. 25 (1958) 236.
100. Wiley, W.J., Biochem.J. 4 (1930) 858.
101. Wright, N.Ch., J.Agr.Sci. 16 (1926) 640.
102. Wright, N.Ch., J.Agr.Sci. 18 (1928) 478.