

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

ONDERZOEK NAAR KENMERKEN TER ONDERSCHIEDING
VAN MELK- EN BOTERPOEDER,

DOOR

H. A. SIRKS.

(Ingezonden 31 Januari 1934.)

Dit onderzoek werd ingesteld, omdat het wenschelijk scheen, over een methode te beschikken, waardoor de uit boter of botervet en afgeroomde melk bereide, zogenaamde „boterpoeders” zouden kunnen worden onderscheiden van uit volle melk bereide melkpoeders.

De volgende punten werden daarvoor in onderzoek genomen.

I. Frequentiebepalingen der vetbolletjes naar hun grootte.

Aan de uitvoering van zulke bepalingen in melkpoederoplossingen staan verschillende bezwaren in den weg.

Reeds in waterige oplossing en sterker in citraatoplossing heeft bij matige verwarming een samenvloeien van vetbolletjes plaats. Dit is waarschijnlijk een gevolg van het verhittingsproces, dat de melk heeft ondergaan.

Uit een onderzoek van melk van een melkpoederfabriek, vóór en nadat deze melk door vóórbehandeling (verwarmen en eenigszins indampen) was geschikt gemaakt voor de poederbereiding, bleek dat reeds hierdoor de frequentie der vetbolletjes grooter dan $7,5 \mu$ toenam; bovendien trad een vermeerdering der kleinste vetbolletjes in.

Verder is het op reproduceerbare wijze afmeten van kleine hoeveelheden melkpoederoplossing met samengevloeid vet, — zullen zij een juist gemiddelde vertegenwoordigen — niet gemakkelijk uit te voeren.

Enkele metingen der frequenties van de kleinere vetbolletjes, welke bij eenige melk- en boterpoeders werden uitgevoerd, gaven verder geen aanleiding om op dit gebied groote verschillen te verwachten, zoodat het niet waarschijnlijk is, dat frequentiebepalingen der vetbolletjes als middel zullen kunnen dienen ter onderscheiding van melk- en boterpoeders.

(1) C. 1.

201 319

II. Reacties van Kreis en Fellenberg op „talkachtigheid” en „ransigheid” van botervet.

Deze reacties werden toegepast op het door directe aetherextractie verkregen botervet uit verse en uit oude melk- en boterpoeders.

Voor de Kreis-reactie kan men bijv. 5 cc gesmolten vet 30 sec. schudden met 10 cc sterk HCl en dan 5 cc van een 1 $\frac{0}{100}$ aetherische phloroglucine-oplossing toevoegen. Na schudden ontstaat dan in de waterige laag een rose tot aalbesroode kleur, wanneer het botervet reeds door oxydatie of door hydrolytische processen was aangetast. Bij de reactie volgens Fellenberg ontstaat dan een min of meer intensieve blauwkleuring, als bijv. 1 cc vet, in 1 cc petroleumaether opgelost, geschud wordt met 2 cc van een oplossing, die per 100 cc 0,5 g fuchsine, 1,2 g Na_2SO_3 7 aq en 10 cc n. HCl bevat. Beide reacties vereischen eenigen tijd om de maximale sterkte te bereiken. Dit werd bij een aantal oude boters bevestigd.

Het vet van een aantal verse melkpoeders gaf aldus onderzocht, zooals te verwachten was, slechts negatieve reacties; ook na vele maanden onder goede omstandigheden (koel, goed afgesloten en in het donker) bewaren der poeders, waren de reacties van het opnieuw geëxtraheerde vet hoogstens zwak positief; vooral de Kreis-reactie bleef nagenoeg geheel uit.

Bij de 6 in verschen toestand onderzochte boterpoeders gaf slechts één een zeer zwakke Kreis- en een zwakke Fellenberg-reactie.

Na 1½ jaar goed bewaren gaven 2 boterpoeders, opnieuw geëxtraheerd, zwakke tot matige reacties; de overige 4 gaven, na 6 tot 13 maanden bewaren, allen een negatieve Kreis- en een vrij zwakke, hoewel duidelijke Fellenberg-reactie.

Bij verhitting op 96° van het uit een melkpoeder en een boterpoeder geëxtraheerd vet aan de lucht in een dunne laag, bleek er geen verschil te bestaan, wat betreft den verhittingsduur, noodig om reacties te verkrijgen, welke in beide gevallen na 2 uur nog zwak, na 3 uur duidelijk positief waren.

Volgens de onderzoekingen van GREENBANK en HOLM ¹⁾ over den weerstand van botervet tegen O_2 -opname bij verhitting, is het echter waarschijnlijk dat het vet uit met *oude* boter bereid poeder na veel kortere verhitting sterke positieve reacties zal geven, wanneer dit vóór de verhitting nog niet of weinig het geval was. Dit punt kon echter, wegens het ontbreken van geschikt materiaal, niet nader onderzocht worden.

¹⁾ *Industr. and Engin. Chemistry*, Vol. 15 (1921), blz. 1051; Vol. 16, blz. 598.

Uit het voorgaande zijn alleen deze conclusies te trekken:

- 1°. Het negatief uitvallen der reacties van KREIS en FELLEBERG in het uit het poeder geëxtraheerde vet sluit het gebruik van boter bij de bereiding niet uit.
- 2°. Bij het vet der onderzochte melkpoeders bestond na langen tijd bewaren nog geen noemenswaardige, bij dat der boterpoeders eenige neiging om reacties te geven.
- 3°. Het vinden van een matige of sterke KREIS- of FELLEBERG-reactie in een onbekend versch poeder zou het vermoeden wettigen, dat hier minderwaardige boter was gebruikt.

III. Kleurstofopname door de melkvetbolletjes.

Naar aanleiding van de microscopische onderzoekingen van H. BAUER ¹⁾ over de verschillen, welke diverse vetbolletjes van één en dezelfde melk vertoonen in hun vermogen om bepaalde toegevoegde kleurstoffen te absorberen, werd nagegaan of er in dit opzicht ook belangrijke verschillen waren te vinden tusschen natuurlijke botervetemulsies (melk, melkpoederoplossing) en kunstmatige emulsies (boterpoederoplossingen).

Proeven werden genomen met Sudan III, osmiumzuur, indophenol en met nog enkele andere in vet oplosbare kleurstoffen.

1. *Sudan III.* BAUER had hiermede gevonden, dat een deel der vetbolletjes van versche melk aanvankelijk geen kleurstof opnam.

Dit kon met Sudan III (10 cc 200 maal verdunde melk mengen met 0,08 cc ½ % alcoholische Sudanopl.) slechts in zóó ver worden bevestigd, dat in een zelfde micr. praeparaat sommige vetbolletjes lichter geel gekleurd waren dan andere even groote of zelfs kleinere vetbolletjes. Bovendien werden er heel enkele intensief rood gekleurde bolletjes aangetroffen.

Ook bij 10 maal kleinere kleurstof-concentratie werden alle vetbolletjes binnen 24 uur nog gekleurd.

Bij de onderzochte melk- en boterpoederoplossingen werden geen opvallende verschillen gevonden wat betreft de snelheid of intensiteit, waarmede de vetbolletjes van dezelfde grootte werden gekleurd.

2. *Osmiumzuur.* Wanneer men 10 cc 200 maal verdunde melk voegt bij 0,1 cc van een 1 % osmiumzuuroplossing in water, dan verkrijgt men een ge-

¹⁾ *Bioch. Zeitschr.*, 32 1911, blz. 362.

leidelijke grauw-zwarte verkleuring der vetbolletjes, met grooter verschillen in intensiteit en duidelijker „abnormale kleuring” dan met Sudan, d.w.z. verscheidene bolletjes zijn veel minder gekleurd dan andere, die even groot of zelfs kleiner zijn. Ook bij melk van één koe afkomstig treedt dit verschijnsel op.

Ook de vetbolletjes van melkpoederoplossingen konden evenals melk langzamer of sneller gekleurd worden, al naar de concentratie van het osmium-zuur, doch „abnormale kleuring” doet zich hier niet of slechts in zeer geringe mate voor.

Een oplossing van boterpoeder gedroeg zich in dit opzicht geheel als de melkpoederoplossingen.

3. *Indophenol*. Gebruikt werd een ongeveer verzadigde oplossing van indophenol in alcohol van 70 %.

a. Proeven met melk.

Wanneer 10 cc van 200 maal verdunde versche melk gemengd werden met 0,3 à 0,4 cc indophenoloplossing, dan bleek onder het microscoop, dat de vetbolletjes al naar hun grootte spoedig min of meer paars gekleurd werden, met uitzondering van sommige — zoowel kleine als groote —, die nog geen kleurstof opgenomen hadden. Eerst na geruimen tijd ($\frac{3}{4}$ tot $1\frac{1}{2}$ uur) werden ook deze gekleurd. Werde de melk pas verscheidene uren na het melken onderzocht, dan werden geen of veel minder ongekleurde bolletjes aangetroffen. Verwarming op 60 à 70° van deze melk direct vóór het onderzoek deed de eigenschap om ook ongekleurde bollen te vertoonen weer terugkeeren.

Dit alles is in overeenstemming met hetgeen BAUER had gevonden.

Bij verder onderzoek bleek nog, dat het plaatsen van de op 70° verwarmde melk in ijs gedurende 15 minuten den invloed van de verwarming weer grotendeels te niet doet.

Voorafgaande ontkalking van versche melk met natriumoxalaat, waardoor de doorlaatbaarheid der vetbolletjes-omhulsels misschien beïnvloed kan worden belet niet het ongekleurd blijven van sommige bollen na toevoeging van indophenol.

De melk van afzonderlijke koeien vertoonde het verschijnsel in zeer uiteenlopende mate; soms waren meer dan de helft der grootere vetbolletjes (4 μ en grooter) ongekleurd.

b. Proeven met room en „gewasschen” room.

Werde centrifugeroom met hoog vetgehalte met de 15-voudige hoeveelheid water van ruim 30° gemengd en gecentrifugeerd, de verkregen room nogmaals

aldus behandeld en zoo vervolgens, dan daalde het N-gehalte van den room (berekend per 100 g vet) aanvankelijk snel, maar bleef na 3 à 4 wasschingen bijna constant.

Blijkbaar wordt een groot deel der door de vetbolletjes geadsorbeerde N-houdende stoffen hardnekkig vastgehouden. ¹⁾

Onderzocht werd nu verder, of door de wasschingen in de centrifuge het weerstandsvermogen van een deel der vetbolletjes tegen de indophenolkleuring ook vermindert. Daarvoor werden de diverse porties ongewassen en meer malen gewassen room met water tot op een vetgehalte van 3 % verdund en telkens direct vóór het onderzoek 10 minuten op 65° à 70° verhit en dan afgekoeld.

Bij toepassing der indophenolkleuring bleek, dat algemeen de gewassen room een geringer aantal ongekleurde vetbolletjes vertoonde dan de oorspronkelijke room. Ook was in de meeste gevallen dit aantal des te kleiner, naarmate meer wasschingen hadden plaats gehad. Het weerstandsvermogen der vetbolletjes-omhulsels tegen de kleuring schijnt dus door de wasschingen, hoewel niet opgeheven, toch aanzienlijk te worden verminderd.

c. Proeven met emulsies van botervet in centrifugemelk.

In verband met het vorige schijnt het niet onmogelijk, dat ook emulsies van botervet in centrifugemelk, door een afwijkende samenstelling der vetbolletjes-omhulsels, zich ten opzichte van de indophenolkleuring anders zullen gedragen dan melk.

Uit gesmolten botervet en verwarmde centrifugemelk werden door eenigen tijd karnen emulsies bereid op de wijze, zooals vroeger bij een onderzoek over den invloed van den aggregaatstoestand van het melkvet op de oprooming is beschreven. ²⁾

De uit die emulsies verkregen roomen werden met centrifugemelk of met water op een vetgehalte van 3 % gebracht en als gewoonlijk met indophenol onderzocht na verwarming op 65° à 70°.

Bij de herhaalde malen uitgevoerde proeven kon geen enkele maal het ongekleurd blijven van ook maar een enkele vetbol worden geconstateerd.

Blijkbaar zijn de bij het emulgeeren van botervet gevormde vetbolletjes-omhulsels meer gelijk van samenstelling dan bij melk en bieden zij geen van allen weerstand aan de kleuring.

¹⁾ STORCH, *Milchw. Zeit.*, XVI, 1897, blz. 244.

PALMER and WIESE, *Journ. of Dairy, Science* XVI, 1933, blz. 41.

²⁾ *Versl. van landbk. onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, N°. XXXII, 1927, blz. 7.

d. *Melk- en boterpoeders.*

Na het voorgaande bestond er kans, dat ook bij de resp. uit melk en uit botervetemulsies bereide poeders nog het verschillend gedrag der grondstoffen tegenover de indophenolkleuring zou zijn terug te vinden.

Zowel oplossingen der poeders in water als in 5 % trinitriumcitraat werden onderzocht.

Voor het microscopisch onderzoek bleek het wenschelijk om zoowel eventueel onopgelost eiwit als samengelooopen vet, althans in hoofdzaak, uit te sluiten door behandeling der warme oplossingen in een scheidrechter.

De kleuring had bij de onderzochte *melkpoeders* vrijwel hetzelfde karakter als bij melk; dus een matig getal ongekleurde vetbolletjes. Ook gaf weer het onderzoek na verwarmen op 60°—70° de hoogste cijfers en daalde het aantal ongekleurde vetbolletjes na lang staan der melkpoederoplossing bij laboratoriumtemperatuur of in de ijskast tot nul.

Ontkalking, op enkele melkpoeders toegepast, had geen invloed van betekenis op het aantal der ongekleurde vetbolletjes.

Wat de *boterpoeders* betreft, de verwachting dat deze, evenals de onderzochte botervetemulsies, wellicht geen ongekleurde vetbolletjes zouden geven werd niet bevestigd; althans bij de 3 onderzochte poeders werd steeds een zeker aantal zich niet-kleurende vetbolletjes aangetroffen.

4. *Andere kleurstoffen.* Van een 10-tal in vet oplosbare kleurstoffen (Grübler) werden nog geschikt bevonden om de melkvetbolletjes voor microscopisch onderzoek te kleuren: „Scharlach Rot”, „Brilliant Braun” en „Fett-Ponceau” en evenzoo van een 7-tal „Oil Soluble Dyes” (British Drughouses), „Brown Dye”, „Red Dye” en „Yellow Dye”.

„Red Dye” geeft tinten, die veel aan Sudan III doen denken.

Geen van deze kleurstoffen gaven bij de langzame kleuring der vetbolletjes van melk, melkpoeder of boterpoeder bijzondere verschijnselen te zien.

IV. Over het aantal der in melk, melkpoeder en boterpoeder voorkomende leukocyten.

Het aantreffen van onbeschadigde leukocyten in verschillende vloeistoffen van de melkverwerking afkomstig, als karnemelk, boterkneedvocht en wei gaf aanleiding te onderzoeken of deze cellen ook nog in melkpoeder te vinden zouden zijn, wat inderdaad het geval bleek te zijn. Hiermede was het vooruitzicht geopend, dat leukocytentellingen misschien dienstig zouden kunnen zijn, om uit volle melk bereide poeders te onderscheiden van die, welke bereid

zijn uit ondermelk en boter (boterpoeders), daar het bekend is ¹⁾, dat centrifugemelk veel minder leukocyten bevat dan de bijbehorende volle melk.

Voor de bepaling van het aantal Lc (leukocyten) in melkpoeders kon de voor die bepaling in melk zeer geschikte methode van BREED ²⁾, waarbij 0,01 cc melk op een objectglas over 1 cm² verdeeld, na droging, ontvetting, fixatie en kleuring, microscopisch wordt onderzocht, niet zonder meer worden toegepast.

Voor het verkrijgen van een homogene melkpoederoplossing, waarbij geen Lc-insluitende caseïnedeeftjes meer voorkomen, is het noodig het poeder met een 3 à 5 % trinatriumcitraat-oplossing te behandelen. Maar na drogen en ontvetten van 0,01 cc dezer oplossing op een objectglas is fixatie in alcohol — zooals bij melk — niet voldoende om het gedroogde laagje zoodanig te bevestigen, dat het tegen water bestand is. Een aan de kleuring voorafgaande harding door formalinedamp bleek, daarvoor noodzakelijk. (Voor de volledige beschrijving der methode, zie de „Bijlage”).

Met de methode-BREED en de voor melkpoeder geschikt gemaakte methode werden vervolgens een groot aantal Lc-tellingen verricht, waarvan het resultaat hier in 't kort is weergegeven.

In de eerste plaats werd dit gedaan met 6 monsters volle gemengde melk van 4 fabrieken en met de daaruit verkregen centrifugemelk.

Gemengde melk N° :	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Gem.
Aantal Lc per mm ³ in de volle melk	1257	1116	584	563	696	1392	935
Aantal Lc per mm ³ in de centrifugemelk	607	602	237	268	284	544	424
Percentage van het Lc-getal der centrifugemelk, uitgedrukt in dat der volle melk	48,3	53,9	40,6	47,6	40,8	39,1	45,1

In de centrifugemelk komt dus gewoonlijk minder dan de helft der Lc uit de volle melk terecht; een uit volle melk gemaakt poeder zal dus heel wat meer Lc bevatten dan het uit de bijbehorende centrifugemelk en boter bereide poeder.

¹⁾ E. HEKMA, *Versl. landbk. onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, N°. XXX, 1925, blz. 162.

²⁾ BREED and BREW, *New York Agr. Exp. Stat. Geneva N. Y., Techn. Bull. N°. 49.*

Om hierover wat meer te weten te komen werd in een aantal monsters melk, melkpoeder ¹⁾ en boterpoeder het Lc-getal bepaald met het volgende resultaat.

	Minim.	Max.	Gem.
25 monsters volle melk (waaronder 16 van de Proefzuivelboerderij)	563	1257	875
Idem zonder de 16 genoemde monsters (dus 9 van 5 fabrieken)	563	1028	757
15 monsters volle melkpoeder van 12 fabrieken . .	421	1097	652
8 monsters boterpoeder, waarschijnlijk van 7 fabr.	173	596	383

Hoewel dus de verhouding der Lc-gehalten voor boterpoeder en melkpoeder iets grooter is dan voor centrifuge- en volle melk, liggen de gemiddelde waarden toch nog flink uiteen.

Daar de voor boter- en melkpoeder gevonden minima en maxima nog al ver uiteenliggen — het maximum van boterpoeder is 175 hooger dan het minimum van melkpoeder — zullen sommige Lc-getallen zoowel bij boterpoeder als bij melkpoeder kunnen voorkomen.

Uit de gevonden cijfers zullen we dus — voor zoover dit althans met het beperkte getal onderzochte monsters mogelijk is — het volgende kunnen besluiten.

- 1°. Wordt in een poederoplossing een zeer laag Lc-getal gevonden, bijv. 200 à 400 Lc per mm³, dan is de kans zeer groot, dat we met boterpoeder te doen hebben.
- 2°. Is het gevonden getal hoog, bijv. 600 of meer, dan is de kans, dat centrifugemelk gebruikt is, gering en zal dit eigenlijk alleen kunnen voorkomen, als de oorspronkelijke melk abnormaal veel Lc bevatte, bijv. doordat er melk van zieke koeien was gebruikt (mond- en klauwzeer, uierontsteking).
- 3°. Wanneer echter in een monster getallen worden gevonden tusschen 400 en 600 Lc per mm³, dan is daaruit geen conclusie te trekken.

¹⁾ Onder het Lc-getal van melkpoeder en boterpoeder wordt hier steeds verstaan het aantal Lc per mm³ van een oplossing van 12,5 g poeder in 100 cm³ 3 % of 5 % citraatoplossing.

Men zou daarna meer zekerheid kunnen krijgen, door op de betreffende fabriek volle melk en daaruit bereide centrifugemelk, alsook onder toezicht uit die melk bereid melkpoeder te bemonsteren en te onderzoeken op Lc.

In verband met de bovengenoemde gegevens zou hieruit waarschijnlijk wel iets zijn te besluiten over de „echtheid” van het onderzochte monster melkpoeder.

V. Bereiding van „boter” uit emulsiroom en uit melk- en boterpoeders.

Volgens PEDERSEN ¹⁾ kan men uit room, door centrifugeeren van een botervetemulsie in centrifugemelk bereid, slechts zeer moeilijk eenige boter, en dan nog van abnormale consistentie, verkrijgen.

Wanneer er zich inderdaad in dit opzicht sprekende verschillen geregeld voordoen tusschen zulken „emulsie-room” en echten melkroom, dan zouden misschien ook de uit boterpoeder- en melkpoederoplossingen bereide roomen, bij karnen daarvan, gemakkelijk te onderscheiden zijn.

Om dit na te gaan werden de volgende proeven genomen.

1. Er werd een vergelijkende karnproef genomen met een uit in centrifugemelk geëmulgeerd botervet verkregen zoeten room en een normalen zoeten room met hetzelfde vetgehalte.

Het resultaat was, dat hoewel de karntijd van den emulsiroom wat langer was en de karnemelk wat meer vet bevatte, toch in beide gevallen boter werd verkregen van ongeveer gelijke, vrij behoorlijke stevigheid en gelijk uiterlijk.

2. Uitgaande van een melkpoeder en een boterpoeder, op één fabriek op denzelfden dag bereid, werden de hieruit bereide „melk”, „room” en „boter” met elkaar vergeleken.

De door oplossen der poeders in warm water verkregen hoeveelheden van 8 l „melk” (met $\pm 2,8$ % vet) onderscheidden zich alleen door de iets minder fijne verdeling van het eiwit bij de boterpoederoplossing, waarop zich verder bij staan op den „room” in mindere mate een zeer vetrijk, samengeloopen vet bevattend laagje afscheidde dan bij de melkpoederoplossing.

De uit deze „melken” door centrifugeeren verkregen „roomen” hadden hetzelfde uiterlijk en scheidten spoedig een laagje samengeloopen vet af, dat werd verwijderd, waarna zij met de bijbehorende centrifugemelken tot op 10 % vet werden verdund.

Van elk dezer „roomen” werd 1 l in ijs gekoeld, en na zuren bij 15°, gelijktijdig gekarnd bij 16° — 16 $\frac{3}{4}$ °.

¹⁾ *Mölkerei-Zeitung*, (Berlin) 1918, N°. 3, blz. 176.

Uit beide werd „boter” verkregen na vrij korten karntijd, vooral van den melkpoederroom. De opbrengst was slecht; de boters waren slap van consistentie en de melkpoederboter kleefde sterk aan het glas.

Ook het karnen van de diep gekoelde en gezuurde melk- en boterpoederoplossingen zelf gaf geen sprekende verschillen te zien. De botervorming bij $16\frac{1}{2}^{\circ}$ — 17° ging, vooral bij de boterpoederoplossing, nog veel gebrekkiger dan bij de „roomen”. Een behoorlijk groote boterkorrel kon bij geen van beide gekarnde „melken” worden verkregen; de boteropbrengst was zeer slecht.

Uit deze proeven volgt, dat het karnen van uit melkpoeder en boterpoeder verkregen „melk” of „room” geen geschikte methode kan opleveren om deze poeders te onderscheiden, wegens de weinig sprekende verschillen, die zich daarbij voordoen.

VI. Afwijkend gedrag van oud botervet bij verzeeping.

Door HANUS ¹⁾ werd in 1900 waargenomen, dat het gesmolten vet van geruimen tijd aan licht en lucht blootgestelde boter, bij de verzeeping met sterke loog en glycerine, eerst een bruine, geleachtige massa gaf, die bij verder verhitten vloeibaar werd en na verzeeping haar bruine kleur behield, welke verschijnselen bij versch botervet niet optreden.

Deze waarnemingen van HANUS konden bevestigd worden, toen het vet van eenige ransige, beschimmelde boters op dit punt werd onderzocht. Bovendien bleek ook, dat bij de verzeeping een abnormaal sterk schuimen optrad, na het ophouden waarvan het helder en homogeen worden der zeepoplossing veel langzamer plaats vond dan bij normaal botervet.

Deze verschijnselen zullen dus misschien in sommige gevallen dienst kunnen doen om het gebruik van oude boter bij de poederbereiding te constateeren.

Bij de aanwending van deze proef op zes beschikbare boterpoeders kon in vier gevallen een sterker en langer schuimen dan normaal worden waargenomen, verschijnselen als gelvorming en bruinkleuring deden zich niet voor.

VII. Verschillen in verkleuring bij het drogen van melk- en boterpoeders.

Bij het drogen van melk- en boterpoeders bij 103° à 105° in de electrische droogstoof gedurende 2 uur viel het op, dat het hierbij donkerder worden van tint over 't algemeen bij de boterpoeders van meer beteekenis was dan bij de melkpoeders.

¹⁾ *Zeitschr. f. Nahr. u. Gen.mittel*, III, 1900, blz. 325.

Dit kon het best worden waargenomen, als ± 5 g van eenige melkpoeders en boterpoeders in duplo in droogglaasjes werden gebracht en van elk poeder er één werd gedroogd en één niet. Na gelijk maken van het oppervlak der poeders door aandrukken, bijv. met een passende glazen stop, kon bij goede verlichting het bedoelde verschil in tint-verandering worden geconstateerd. Met een geschikten photometer zou dit misschien quantitatief kunnen geschieden.

Van de 8 boterpoeders, die werden ontvangen, waren er 6 die het bedoelde verschijnsel vertoonden, terwijl 2 zeer weinig veranderden. Het verschijnsel treedt dus niet altijd op; het zou dus alleen wanneer het zich opvallend voordeed een aanwijzing kunnen geven om zoo'n poeder nog eens nader te onderzoeken.

VIII. Proefbereiding van melk- en boterpoeder aan een zuivelfabriek.

Volgens inlichtingen aan de fabriek verkregen, bestond de voor de melk- en boterpoeders gebruikte melk uit avondmelk en ochtendmelk, die direct na ontvangst was gepasteuriseerd bij 82° — 84° C, gekoeld tot 13° C en kort vóór het poederen was verhit tot $\pm 60^{\circ}$ C, nadat — evenals de gebruikte centrifugemelk — deze was voorzien van 1 g natriumbicarbonaat per l.

De voor de melkpoederbereiding gebezigde melk was met centrifugemelk tot op 3 % vet verdund; deze melk was *niet* uit denzelfden voorraad afkomstig, waaruit de voor de boterpoederbereiding gebruikte centrifugemelk was bereid.

In de poedermelk met 3 % vet werden gevonden 1028 leukocyten per mm^3 en in het daaruit bereide melkpoeder (12,5 g opgelost in 100 cc 5 % citraatoplossing) 838 Lc per mm^3 .

De centrifugemelk bevatte het abnormaal hoge getal 902 Lc per mm^3 , het hieruit en uit boter verkregen boterpoeder (alsvoren opgelost) 596 Lc per mm^3 , beide getallen de hoogste van al de onderzochte monsters centrifugemelk en boterpoeder.

Deze getallen wijzen erop, in de eerste plaats, dat wegens het betrekkelijk geringe verschil in Lc-getal van de poedermelk met 3 % vet en de centrifugemelk, het waarschijnlijk is, dat deze grondstoffen, althans gedeeltelijk, niet van dezelfde koeien afkomstig zijn en in de tweede plaats, dat de melk waarvan de centrifugemelk is verkregen, gedeeltelijk afkomstig is van niet geheel gezond vee. Hierdoor is het overigens nog niet onbelangrijke verschil in Lc-getal bij het melkpoeder en het boterpoeder kleiner dan gewoonlijk.

Overigens vertoonden het melkpoeder en boterpoeder weinig verschil; de reacties in het geëxtraheerde vet volgens KREIS en FELLEBERG waren bij

beide negatief; de verzeeping verliep normaal; de kleurverandering bij drogen der poeders was in dit geval nagenoeg gelijk.

Eenige kleine verschillen in de uit de poeders bereide melk, room en boter zijn reeds vermeld in het daarop betrekking hebbende hoofdstuk V.

BIJLAGE.

Gewijzigde methode Breed.

De volgende methode, een wijziging van de methode BREED, werd geschikt bevonden voor de bepaling van het aantal leukocyten in melkpoeder en boterpoeder en ook in melk.

Oplossing. Van het poeder wordt 12,5 g met 100 cc op 50° à 60° verwarmde 3 % of 5 % trinitriumcitraatoplossing, aanvankelijk door aanwrijving met weinig vloeistof, in oplossing gebracht. Men voegt een paar druppels formaline toe en laat de oplossing, die af en toe wordt omgeschud, geruimen tijd staan tot, op misschien een zeer gering bezinksel na, goede homogeniteit is verkregen.

Afmeting. Van deze oplossing brengt men na verwarmen op 40° en afkoelen op 20°, na goede menging, met een micro-pipetje tweemaal 0,01 cc binnen de op een objectglas geëtste omtrekken van twee vierkantjes van 1 cm², waarna de vloeistof met een rechthoekig omgebogen platinadraadje gelijkmatig over de vierkantjes wordt verdeeld. Het objectglas moet goed horizontaal zijn geplaatst.

Droging. De droging geschiedt in 5 à 6 min. onder een op 2 cm afstand geplaatste 100 Watt-lamp of in een droogstoof bij 55°—60°.

Ontvetting. Hiervoor werd plaatsing gedurende 10 min. in een mengsel van gelijke deelen aether en alcohol een geschikt middel bevonden.

Harding. Na droging aan de lucht bij gewone temperatuur, wordt tot harding van het praeparaat overgegaan, maar eerst wordt het daarvoor geschikt gemaakt door plaatsing in verzadigden waterdamp gedurende 1 à 2 uur (bijv. door omgekeerd leggen op een glaasje met water, dat in een exsiccator met water wordt geplaatst). Hierna wordt het objectglas, omgekeerd op een droogglaasje met formaline gelegd (naast een tweede objectglas ter afsluiting) en gedurende 1½ uur aan den formalinedamp blootgesteld. Na korten tijd drogen aan de lucht is het praeparaat dan geschikt om gekleurd te worden.

Laat men de behandeling met waterdamp achterwege, dan schijnt de formaline niet gelijkmatig door te dringen en krijgt men later bij plaatsing in

een kleurstofoplossing een ongelijkmatige kleuring met eigenaardige gekleurde slangvormige gedeelten, die de telling der leukocyten zeer bemoeilijken.

Kleuring. Voor de kleuring bleek geschikt een gefiltreerde oplossing van 50 mg methyleenblauw in 100 cc water, waarin het praeparaat \pm 1 min. wordt geplaatst. Na afspoeling in water wordt het iets overkleurde praeparaat verzwakt in alcohol van 70 % en daarna van 94 % tot een op het oog lichtblauwe tint is verkregen. Na drogen aan de lucht wordt op elk vierkantje een druppel water gebracht en een dekglasmaasje.

Het praeparaat is dan voor microscopisch onderzoek gereed en kan in een vochtigen exsiccator dagenlang in goeden toestand worden bewaard.

Telling. De telling der leukocyten geschiedde nu als volgt:

Met gebruikmaking van Obj. D en Oculair 4 (Zeiss) werd de tubuslengte (15,95) zóó gekozen, dat het gezichtsveld een oppervlakte bestreek van $1/1500 \text{ cm}^2$. Met behulp van de verdeelde kruistafel van het microscoop, waarmee het objectglas in 2 onderling loodrechte richtingen kon worden verschoven, werd het praeparaat na iedere telling over de breedte van een gezichtsveld verplaatst en zoo een horizontale reeks over de volle breedte van het praeparaat (1 cm) geteld. Dit werd eenige malen na een kleine verschuiving (bijv. over 0,1 cm) in verticalen zin herhaald, tot er 200 of 300 velden, zoo regelmatig mogelijk over het geheele praeparaat verdeeld, waren geteld, wat vrij snel kon geschieden, daar elk veld doorgaans gemiddeld slechts 3 à 5 Lc bevat.

Berekening. Daar, zooals gezegd, 150 velden overeenkomen met $1/10 \text{ cm}^2$ van het praeparaat, dus met 1 mm^3 melkpoederoplossing, is het hierin voorkomende Lc-aantal gemakkelijk te berekenen.

Opmerkingen. Bij het toepassen van deze methode op een groot aantal monsters melk en melkpoeders werden de volgende ervaringen opgedaan.

1. Hoewel het gezichtsveld bij een praeparaat van een poederoplossing meestal minder homogeen is dan van een melkpraeparaat, zijn de omtrekken der leukocyten zelf, en ook de kernen, doorgaans veel mooier en vollediger te zien dan bij een melkpraeparaat volgens de gewone methode BREED, waar men feitelijk alleen kernen ziet. Dit is een gevolg van de citraatbehandeling die de eiwitfilm veel doorschijnender maakt. Voor de telling is dit een voordeel, daar men in twijfelachtige gevallen dan veel beter kan zien of men met volledige leukocyten of slechts met fragmenten daarvan heeft te doen.

Hoewel iets bewerkelijker, is de beschreven gewijzigde methode BREED ook voor volle melk, waarin dan 3 g natriumcitraat onder zachte verwarming wordt opgelost, dus wel aan te bevelen.

Bij melk of melkpoeder met een hoog Lc-getal, of bij een hoog eiwitgehalte, verdient een voorafgaande 2-malige verdunning met water aanbeveling.

2. In minder verse melk en in enkele melkpoederoplossingen bleken de Lc. zich soms gedeeltelijk te hebben samengebald of zich te hebben geconcentreerd op eiwitvliesjes. Alvorens met de telling van een praeparaat te beginnen, dient men zich daarom, bijv. bij zwakkere vergrooting, steeds op de hoogte te stellen, of dit het geval is.

Zijn er geen of slechts hier en daar kleine groepeerings van Lc. te zien, dan zal de telling gewoon kunnen plaats hebben en zullen de tellingen, bijv. elk van 200 velden, overeenkomende met $\frac{2}{15}$ van het praeparaat van 1 cm². meestal wel minder dan 10 % verschillen, wat in het algemeen als de hoogste toelaatbare grens is aangenomen. Bij grootere verschillen moeten meer velden of een nieuw praeparaat worden geteld.

Komen er echter veel groepjes van bijv. 30 en meer Lc. voor, dan zal men geen goed overeenstemmende dubbelbepalingen kunnen verkrijgen. In zulk een geval is het beter om te trachten een nieuw praeparaat te maken met minder samenballingen. Bij melkpoeder gelukt dit soms, door direct na het oplossen 10 druppels formaline per 100 cc toe te voegen; ook had het eenige dagen laten staan der oplossing een gunstige uitwerking.

Maar niet altijd gelukte dit en zoo kwamen er bij dit onderzoek dan ook enkele melkpoeders voor, blijkbaar uit minderwaardige melk gemaakt, waarvan de praeparaten, behalve veel bacteriën en veel onopgelost eiwit, naast half uiteengevallen Lc., steeds zooveel groepen en groepjes daarvan vertoonden, dat overeenstemmende tellingen niet te verkrijgen waren.

Resumeerende kan dus gezegd worden, dat het volgens bovenstaand onderzoek mogelijk schijnt om door enkele der besproken eigenschappen boterpoeders als zoodanig te herkennen, wanneer het poeders betreft, waarin oud, reeds scheikundig aangetast botervet is verwerkt.

Bij poeders die bereid zijn met nog in goeden staat verkeerende boter, komt als onderscheidingsmiddel eigenlijk alleen het leukocytengehalte in aanmerking.

In vele gevallen zal dit inderdaad een duidelijke aanwijzing kunnen verschaffen, die echter meestal door een verder onderzoek aan de betreffende fabriek zal moeten worden aangevuld.

**A study of the properties that will serve as a means to distinguish
milk powders from butter powders.**

SUMMARY.

1. Owing to the fact that the heating and drying of the material was found to cause considerable modifications in the size of the fat globules, it appeared to be impossible to distinguish milk powders from butter powders by a method based on the probably different distribution, according to size, of the fat globules in the original liquids viz. milk and an emulsion of butterfat in skimmilk.

2. Butter powders will be found to be recognizable as such by the application of KREIS and FELLEBERG'S well-known tests of tallowiness and rancidity, if the powders are made from old inferior butter. If this is not the case the fat in newly made powders will as a rule not react to these tests. Such powders were even found to react only very faintly, after being kept a very long time.

3. The fact observed by HANUS that heating with alkali and glycerine changes deteriorated butterfat into a brown jelly-like mass can in some cases be made use of to detect a butter powder. In examining a number of butter powders, the fat of which did not react to the HANUS test, the saponification of the fat was in most cases found to be attended with a very apparent, abnormally strong and continuous frothing.

4. On heating several milk powders and butter powders to 103°—105° C for two or three hours, the darkening of the yellowish tint with which this heating is attended, was generally found to be more apparent in the butter powders than in the milk powders. The properties referred to in 3 and 4, if observed in powders of unknown origin, are a sufficient ground for further examination, for instance by the method described in 7.

5. PETERSEN'S finding that cream prepared from an emulsion of butterfat in skimmilk is very hard to turn into butter, made it seem probable that the same would apply to cream made from a butter powder solution. However, in carrying out experiments with some quantities of cream prepared from a butterfat emulsion, from a butter powder solution and from a milk powder solution, it appeared that butter could easily be got from them, although the body and the quantity, especially in the case of the „powder cream” butters, were unsatisfactory.

6. The following phenomenon observed by BAUER and not hitherto explained suggested a more elaborate investigation. When a little of the colouring matter indophenol, which is soluble in fat, is added to fresh milk many of the

fat globules at once assume the colour, but there are always some that do not absorb the colouring matter or do not do so till after a considerable time. When this experiment was made with an emulsion of butterfat in skimmilk there was no such abnormality observable, all the fat globules at once absorbing the colouring matter. This suggested a similar experiment with a butter powder solution, i.e. a dried artificial butter emulsion. It was likely to show the same behaviour, in contrast to a milk powder solution which had been found to behave like milk.

Against expectation all the butter powder solutions, when examined with indophenol, showed a number of uncoloured fat globules. Butter powders and milk powders cannot therefore be distinguished in this way.

7. In view of the well-known fact that the number of leucocytes contained in whole milk is usually much greater than in skimmilk and of the fact, established by a preliminary examination, that powders contain a considerable number of undamaged leucocytes, it seemed very probable that a similar difference would be found to exist between milk powders and butter powders. We found by an elaborate investigation that butter powders do indeed on an average contain a much smaller number of leucocytes than milk powders. By slightly altering BREED'S method the number of leucocytes can easily be determined. In many cases this determination will give a useful indication as to whether the powder is an ordinary one or a butter powder.

In doubtful cases greater certainty can be obtained by subjecting the milk and the skimmilk from the factory where the powders were made to the same examination.