

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

ONDERZOEKINGEN OVER DE LEBSTREMMING

DOOR

W. VAN DAM.

Het komt nogal eens voor, dat de melk van sommige koeien regelmatig, of van tijd tot tijd, niet of slecht stremt na toevoeging van leb. Ter opsporing van de oorzaak daarvan werden de hieronder medegedeelde onderzoekingen verricht.

Het is een reeds lang bekend feit, dat toevoeging van oplosbare calciumzouten aan melk den stremmingstijd aanzienlijk verkort. Voegt men nu deze verbindingen toe aan niet stremmende melk, dan kan in den regel weer een normaal coaguleerende vloeistof verkregen worden. Daaruit volgt dus, dat de oorzaak van het verschijnsel zeer waarschijnlijk niet gelegen is in afwijkingen in de samenstelling der melk wat betreft de eiwitten, bepaaldelijk de caseïne. Het lag voor de hand een gebrek aan oplosbare kalkzouten in deze melk aan te nemen, maar uit de analyses, vroeger verricht door OTT DE VRIES en BOEKHOUT ¹⁾, bleek dit niet het geval te zijn, althans de verschillen met de cijfers, voor normale melk gevonden, waren zóó gering, dat de afwijking bezwaarlijk hieraan kon worden toegeschreven.

Welke veranderingen ondergaat de melk dan door de toevoeging van kalkzouten? Ten eerste wordt de zuurgraad, d. w. z. het aantal cM³. loog van bepaalde sterkte ($\frac{1}{10}$, $\frac{1}{9}$ of ook wel $\frac{1}{4}$ norm.) dat noodig is, om 100 cM³. melk tegenover phenolphthaleïne te neutraliseeren, verhoogd. In de tweede plaats wordt een deel der kalkzouten in niet filtreerbaren vorm (door een chamberlandfilter) overgevoerd; volgens de algemeene opvatting over de stremming kan dit gedeelte echter niet daartoe bijdragen.

Het eerste gedeelte van mijn onderzoek nu is in hoofdzaak eene studie over den zuurgraad van de melk, en het verband, dat er bestaat tusschen dezen en den stremtijd.

Over het begrip „zuurgraad” moeten eenige opmerkingen in het algemeen voorafgaan.

Op grond van de nieuwere opvattingen over oplossingen van zouten, zuren en basen, moet men aannemen, dat eene oplossing van een zuur sterker is, naarmate er meer waterstofionen in voor-

¹⁾ Landwirtschafil. Vers. Stat. Bd. 55 (1901) 221. Zie ook: Landbouwkundig Tijdschrift 1900, 314.

W. van Dam

komen. Zoutzuur b.v. is een veel sterker zuur dan azijnzuur; dit beteekent, dat in eene oplossing van zoutzuur in water, welke een bepaald aantal grammoleculen per liter bevat, meer H-ionen aanwezig zijn dan in hetzelfde volume verdund-azijnzuur, dat per liter evenveel grammoleculen bevat als de zoutzuuroplossing. Nemen we b.v. 25 cM³. zoutzuur en 25 cM³. azijnzuur, beide $\frac{1}{10}$ norm. Voor neutralisatie van beide is natuurlijk 25 cM³. $\frac{1}{10}$ norm. loog noodig, maar de hoeveelheden H-ionen verhouden zich als 250:1.

Indien nu voor twee monsters melk dezelfde „zuurgraad” wordt gevonden, d. w. z. indien 100 cM³. van beide hetzelfde aantal cM³. $\frac{1}{10}$ norm. loog ter neutralisatie noodig hebben, blijkt daaruit volstrekt niet, dat de hoeveelheid H-ionen in beide gevallen dezelfde is. Dit zou alleen het geval zijn, indien de samenstelling der beide melkmonsters, wat betreft die verbindingen, welke H-ionen leveren kunnen, niet verschilde.

Het is dus duidelijk, dat men onderscheid dient te maken tusschen den *potentieelen zuurgraad*, d. i. den in de melkchemie gebruikelijken, door titreeren te vinden, en den *reëlen of actueelen zuurgraad*, die het aantal H-ionen per volume-eenheid aangeeft. Met den laatsten werd tot heden geene rekening gehouden en toch zijn het de in de melk aanwezige H-ionen, die op de snelheid der lebstremming invloed zouden kunnen uitoefenen.

Voor het bepalen van de concentratie aan H-ionen zijn tal van methoden te gebruiken. Eene goede manier is o.a. deze, dat men de snelheid bepaalt, waarmede rietsuiker onder bepaalde omstandigheden wordt geïnverteerd, waaruit dan berekend kan worden het H-ionengehalte der vloeistof.

Door BREDIG ¹⁾ werd eene zeer mooie methode aangegeven, die berust op de ontleding van de diazoazijnester in glycolzure ester en stikstof onder invloed van water en H-ionen. Echter, voor het onderzoek van melk moest toevoeging van chemicaliën vermeden worden; daarom heb ik eene poging gedaan, van eene zuiver physische werkwijze gebruik te maken, waarbij de melk volkomen intact blijft. Ze werd door HÜBER ²⁾ toegepast voor de bepaling der OH-ionen-concentratie in bloed, echter met weinig succes. Voor de details zij verwezen naar OSTWALDS „Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung Physiko-Chemischer Messungen,” hier moge alleen in het kort het beginsel, waarop ze berust, worden aangegeven.

Wanneer een metaal, b.v. zilver of koper, in zuiver water wordt gedompeld, gaat eene kleine hoeveelheid metaalionen, dus atomen + eene positieve elektrische lading in het water over. Langs chemischen weg is de aanwezigheid daarvan in het water niet aan te toonen; daarvoor is de hoeveelheid veel te gering, maar gemakkelijk kan worden waargenomen, dat de vloeistof *positief*, het zilver *negatief* electrisch is. Hoe meer zilverionen

¹⁾ Zeitschr. f. Electrochemie II, 525 (1905).

²⁾ Pfügers Archiv, Bd. 81, 522 (1900).

in het water overgegaan zijn, des te grooter is de negatieve lading van de zilverstaaf; bij een bepaalde concentratie aan zilverionen in de vloeistof ontstaat er een toestand van evenwicht. De neiging van de ionen, om zich weer met het metaal te vereenigen en daaraan hunne positieve lading af te staan is dan even groot als die van het metaal, om ionen in de vloeistof te stuwen. Indien we nu de zilverstaaf, in plaats van in water, dompelen in eene verdunde oplossing van een zilverzout, waarin dus reeds een groot aantal Ag-ionen aanwezig is, dan kan verwacht worden, dat veel minder Ag-ionen door de staaf in deze oplossing gestuwd worden; de reeds van te voren aanwezige ionen werken dit tegen. De negatieve lading van het zilver zal dus in dit geval kleiner zijn dan bij gebruik van water. Nu is door NERNST eene theorie uitgewerkt, welke het mogelijk maakt, voor iedere concentratie aan Ag-ionen in de vloeistof, de negatieve lading van het metaal te berekenen, dus ook uit de *gemeten* lading van het metaal, de concentratie aan Ag-ionen in de vloeistof te vinden.

Precies dezelfde redeneering geldt nu voor vloeistoffen, waarvan we het H-ionen-gehalte willen weten. Hierbij doet zich echter de moeilijkheid voor, dat men niet met staafjes of plaatjes van waterstof werken kan; NERNST vond echter, dat een stukje platina, verzadigd met waterstofgas, daarvoor in de plaats kan treden. Bij mijne onderzoekingen gebruikte ik om bijzondere redenen dunne goudplaatjes, welke van te voren met een uiterst dun laagje platina werden bedekt. Deze werden in de te onderzoeken melk gedompeld en de optredende potentiaalverschillen gemeten, waaruit de concentratie aan H-ionen in de melk werd berekend. Het spreekt vanzelf, dat ik mij door herhaalde metingen aan eenzelfde monster van de voldoende nauwkeurigheid der methode overtuigde, terwijl ook van tijd tot tijd bepalingen werden verricht met oplossingen van bekend H-ionen-gehalte ter contrôle van het geheele, nogal ingewikkelde instrumentarium, dat voor dergelijke onderzoekingen noodig is.

Om na te gaan, of zich bij de niet stremmende melk eene afwijking toonde in het H-ionengehalte, onderzocht ik monsters van verschillende koeien van de Proefzuivelboerderij, om te zien, tusschen welke grenzen de concentraties zich bewegen.

Voor 12 monsters werden de volgende waarden gevonden:

Tabel I.

C_H (= concentratie aan H-ionen).

$0,16 \times 10^{-6}$	norm.	$0,15 \times 10^{-6}$	norm.
$0,18 \times$	”	$0,21 \times$	”
$0,16 \times$	”	$0,23 \times$	”
$0,19 \times$	”	$0,14 \times$	”
$0,14 \times$	”	$0,23 \times$	”
$0,32 \times$	”	$0,22 \times$	”

Deze waarden bewegen zich dus tusschen 0,14 en $0,32 \times 10^{-6}$ norm. zuur; voor twee monsters niet stremmende melk werd gevonden: 0,16 en $0,22 \times 10^{-6}$, waaruit volgt, dat gebrek aan H-ionen niet als de oorzaak van de afwijking dezer monsters kon worden beschouwd.

Wat de grootheid zelf betreft, ziet men, dat ze nadert tot het waterstofionen-gehalte van zuiver water, dat bij 18° C. $0,08 \times 10^{-6}$ norm. bedraagt.

De *actueele zuurgraad* van de melk blijkt dus ongeveer honderd-duizend maal kleiner te zijn dan de potentieele; immers, voor de neutralisatie van 100 cM³. melk is ± 20 cM³. $\frac{1}{10}$ norm. KOH noodig, hetgeen wijst op 20 mGr. H per L. d.i. 0,020 norm., terwijl $\pm 0,20 \times 10^{-6}$ norm. voor den actueelen zuurgraad werd gevonden.

Maakt men zich eene oplossing van ongeveer gelijke deelen $\frac{1}{10}$ norm. mono- en binatriumphosphaat, dan vindt men in deze vloeistof ongeveer hetzelfde aantal H-ionen als voor de melk werd gevonden. Daaruit kan men echter geene conclusies trekken omtrent de samenstelling van het serum, want behalve de phosphaten zijn nog andere waterstofverbindingen gedeeltelijk gedissocieerd, b.v. de melksuiker en de caseïne.

Na dit resultaat lag het voor de hand, de rol die de kalkzouten bij de stremming spelen, nader na te gaan. De algemeene opvatting over dit punt is deze, dat de stremmingstijd in de eerste plaats afhankelijk is van de hoeveelheid opgeloste kalkzouten in de melk; REICHEL en SPIRO ¹⁾ kwamen tot de conclusie, dat niet de kalkzouten als zoodanig, maar de hoeveelheid calciumionen maatgevend zou zijn voor den tijd van coaguleeren (bij overigens gelijke omstandigheden natuurlijk). Het sneller stremmen bij toevoeging van een weinig zuur aan de melk werd dan ook toegeschreven aan het in oplossing gaan van kalkzouten ²⁾. OTT DE VRIES en BOEKHOUT ³⁾ hebben er echter op gewezen, dat ook de zuurgraad als zoodanig een rol speelt. Zij vonden n.l. dat gekookte melk, die geruimen tijd met koolzuurgas behandeld was, goed stremde, terwijl na uitpompen van het CO₂ geen stremming meer intrad; het gehalte aan oplosbare kalkzouten was bij het uitpompen niet noemenswaard gedaald.

Van fysisch-chemisch standpunt beschouwd, blijkt dus uit deze proef, dat de H-ionen invloed uitoefenen op de leebwerking; dit is een ook bij andere enzymen waargenomen verschijnsel. Bekend is b.v. dat de verteringssnelheid van eiwit door pepsine o.a. van de hoeveelheid H-ionen afhankelijk is. Om dus over de werking van de kalkzouten bij de stremming een idee te krijgen,

HOFMEISTER'S Beiträge 7, p. 478 (1905).

SÖLDNER. Landw. Versuchsstat. 35, p. 352 (1888).

l. c.

was het in de eerste plaats noodig, na te gaan het verband tusschen H-ionengehalte en stremtijd. Hierbij doet zich echter de moeielijkheid voor, dat men het H-ionengehalte van de melk niet kan veranderen, zonder gelijktijdig de Ca-ionen in de vloeistof te wijzigen. Door toepassing van een kunstgreep slaagde ik erin, den invloed van de verandering van de hoeveelheid Ca-ionen, bijna geheel uit te schakelen. Reeds in het jaar 1877 heeft HAMMARSTEN ¹⁾ erop gewezen, dat men bij het stremmingsproces met twee, wel van elkaar te onderscheiden factoren te maken heeft, n.l. de omzetting van de caseïne in paracaseïne en daarnaast de precipitatie van de paracaseïnekalk, de stremming dus. Alleen voor het laatste zijn kalkzouten noodig; het omzettingsproces kan plaats hebben bij volkomen afwezigheid van kalkzouten. Uit het feit, dat de stremming des te eerder intreedt, naarmate meer kalkzouten aanwezig zijn, trekt HAMMARSTEN dan de conclusie, dat de kalkzouten ook invloed uitoefenen op het fermentatieve proces. Dat behoeft, geloof ik, geenszins het geval te zijn. Mijns inziens terecht zegt LÖRCHER, naar aanleiding van zijne onderzoekingen ²⁾ over dit punt:

„Dass die Kalksalze *nur* durch Ausfällung des Paracaseïns beschleunigend wirken, ist durch diese Versuche nicht wiederlegt; dass die Kalksalze den Process der Umformung des Caseïns durch Lab beschleunigen, nicht bewiesen. Da wir also nur bestimmt wissen, einmal, dass die Kalksalze (innerhalb gewisser Grenze) die Labgerinnung beschleunigen, zum andern, dass sie bei der Ausfällung des Paracaseïns theilhaftig sind, weiter aber nichts, so hat die Hypothese, dass die Kalksalze durch ihre ausfällende Wirkung gerinnungsbeschleunigend wirken, am meisten für sich.“

Ik ben op de volgende manier te werk gegaan. Van een monster gemengde ³⁾ melk werden eenige porties door toevoeging van zoutzuur en van kaliumhydroxyd op verschillend H-ionengehalte gebracht, daarbij natuurlijk zorg dragende, dat het volume voor allen hetzelfde was; het gehalte aan oplosbare kalkzouten was dus dan niet hetzelfde voor de verschillende porties.

In de eerste plaats werd nu in zoo kort mogelijken tijd het H-ionengehalte der verschillende vloeistoffen bepaald; daar ik vijf à zes bepalingen per dag kon doen, kon dit geschieden, zonder dat vrees voor vermeerdering der H-ionen door melkzuurvorming behoefde te bestaan. Voor alle zekerheid echter werd de eerst onderzochte vloeistof aan het einde van den dag nog eens onder handen genomen, waarbij niet de minste vermeerdering kon worden geconstateerd.

¹⁾ Zur Kenntniss des Caseïns und der Wirkung des Labfermentes.

²⁾ PFLÜGERS Archiv 69, p. 141.

³⁾ Voor alle in dit onderzoek verrichte bepalingen werd gemengde melk van de proefzuivelboerderij gebruikt: zooals uit de analyses, op zeer verschillende tijden verricht, blijkt, is de samenstelling daarvan opvallend constant wat betreft de grootheden, die voor mij van belang waren.

Gelijktijdig werden nu de stremtijden bepaald, echter niet op de gewone wijze, want dan zou, wegens het veranderd oplosbare kalkgehalte, geen conclusie getrokken kunnen worden wat betreft den invloed der H-ionen. Om deze moeielijkheid te ontgaan (reeds hierboven werd op dit bezwaar gewezen) werd de stremtijd bepaald bij eene groote overmaat aan oplosbare kalkzouten, zóó groot, dat vergeleken daarbij, het gehalte van de door toevoeging van HCl en van KOH bereide porties, heel klein was. De inwerking van de leb had echter plaats in de porties, waaraan nog geen overmaat kalkzouten was toegevoegd; na eenigen tijd inwerking was een moment te vinden, waarop eene *bepaalde* hoeveelheid chloorcalcium *onmiddellijk* precipitatie gaf, terwijl dit een paar seconden te voren nog niet het geval was.

Een voorbeeld met de gevonden getallen zal dit duidelijk maken.

Een van de porties, b.v. die, waaraan toegevoegd was zóóveel zoutzuur, als overeenkomt met 10 cM³. $\frac{1}{10}$ norm. per 100 cM³. melk, (de concentraties van zuur en loog waren zóó gekozen, dat altijd 1 cM³. per 25 cM³. melk toegevoegd werd, om te sterke verdunning te voorkomen) werd verdeeld over een zes- of zevental wijde reageerbuisen op voet, die in een thermostaat van OSTWALD werden geplaatst. In iedere buis werd 25 cM³. gepipetteerd. Zes andere buizen, in ieder 1 cM³. leboplossing, werden eveneens in het bad geplaatst en na \pm een kwartier de eerste 25 cM³. in eens in een buis met leb gestort (niet omgekeerd!). Na eenige seconden inwerking (nauwkeurig met behulp van een chronometer bepaald) de bovenbedoelde overmaat Ca Cl₂ (in 1 cM³. opgelost) erin geblazen en de tijd bepaald, welke van toen af verliep tot intreding van de stremming.

Dan hetzelfde met de tweede buis, waarbij echter langer gewacht werd met het toevoegen van Ca Cl₂, zoodat nu een korter tijd noodig was, om de stremming te doen intreden. Zoo voortgaande kon het moment gevonden worden, waarop bij toevoeging van het chloorcalcium *onmiddellijk* stremming intrad.

- | | | | | | | |
|----|--------|--------------|--------------------|-------------|-------------|------------|
| 1. | Na 20" | lebinwerking | Ca Cl ₂ | toegevoegd, | toen na 25" | stremming. |
| 2. | " 40" | " | " | " | " " 12" | " |
| 3. | " 60" | " | " | " | " " 3" | " |
| 4. | " 70" | " | " | " | " " 0" | " |
| 5. | " 65" | " | " | " | " " 1" | " |

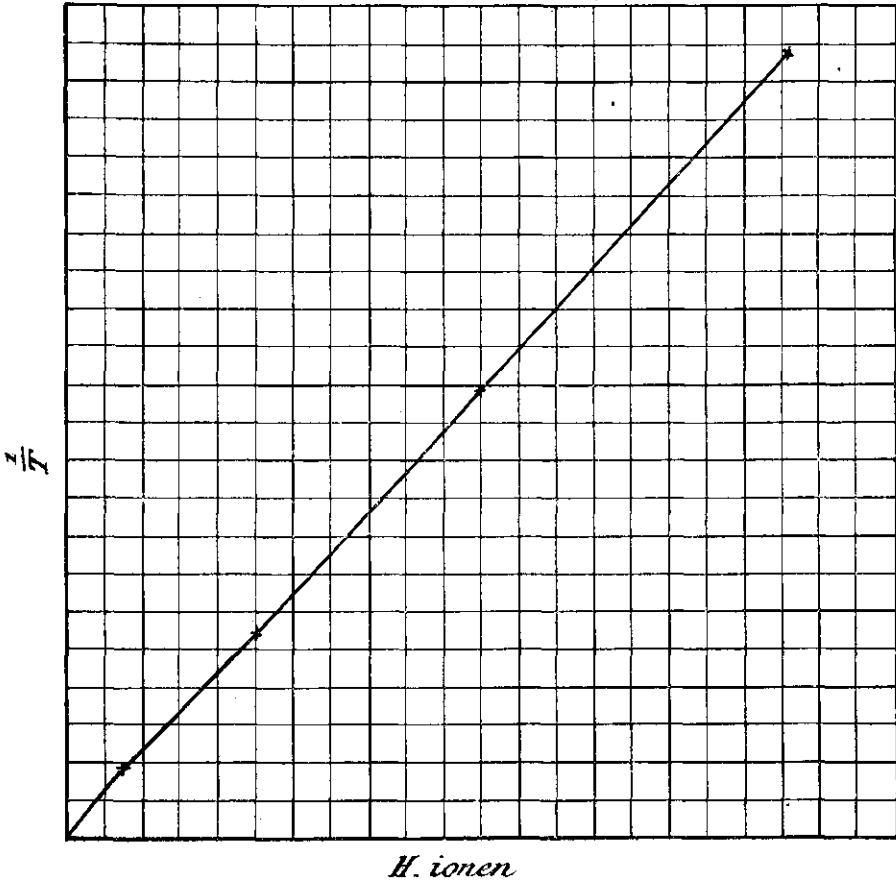
Na 65"—70" was dus, onder den invloed der leb een zoodanige toestand ingetreden, dat eene bepaalde Ca Cl₂ oplossing de paracaseïne onmiddellijk precipiteerde.

Precies op dezelfde wijze werd nu voor de overige porties, met ander H-ionengehalte, te werk gegaan en zoodoende werd dus de invloed van de kalkzouten uitgeschakeld. Nevensstaand tabelletje geeft het resultaat aan:

Tabel II.

Toegevoegd per 100 melk.	C_H	Stremtijd in sec.
7,5 cM ³ . $\frac{1}{10}$ n. HCl	$0,48 \times 10^{-6}$	40''—44''
2,5 " " " "	$0,24 \times 10^{-6}$	72''—75''
2,5 " " " KOH	$0,12 \times 10^{-6}$	145''—150''
10 " " " "	$0,034 \times 10^{-6}$	400''—410''

Stellen we deze uitkomst grafisch voor, dan krijgen we:



We zien dus, dat de stremmingssnelheid evenredig vermeerderd met het waterstof-ionengehalte, of ook: de stremtijd is omgekeerd evenredig met het gehalte aan waterstof-ionen.

Deze proeven werden 3-maal herhaald, steeds met hetzelfde resultaat. Er zij echter nogmaals op gewezen, dat hierbij dus van de veronderstelling werd uitgegaan, dat de geringe hoeveei-

heden opgeloste kalkzouten van de melk op het omzettingsproces van de caseïne geen invloed uitoefenen. Hiervoor pleit nog het volgende.

Wanneer men de op de hierboven aangegeven wijze bepaalde stremtijden vergelijkt met die, welke men vindt, indien direct de overmaat Ca Cl_2 wordt toegevoegd, dus vóór de menging met leb, dan blijkt, dat voor de melk met hooger H-ionengehalte het verschil in stremtijd ongeveer nul is; voor geringe concentraties is dit zeer groot, b.v.:

Tabel III.

Per 100 cM ³ . melk toegevoegd.	Direct Ca Cl_2 (‰/100).	Vroeger gevonden.
1. 7,5 $\frac{1}{10}$ n. HCl	44"	40"—44"
2. 2,5 " " "	50"	72'—75"
3. 2,5 " " KOH	58"	145"—150"
4. 10 " " "	68"	400"—410"

Het blijkt dus, dat bij 1 geen verschil in stremtijd werd waargenomen: het is hier onverschillig, of men het chloorcalcium toevoegt vóór de lebinwerking of later. Voor 2, 3 en 4 ziet men steeds groter verschillen optreden. Dit verschijnsel nu vindt eene zeer eenvoudige verklaring hierdoor, dat toevoeging van Ca Cl_2 het gehalte aan H-ionen wijzigt, zooals uit het volgende tabelletje blijkt:

Tabel IV.

Toegevoegd Ca Cl_2 ‰/100.	C_H .
0	$0,17 \times 10^{-6}$
0,1	$0,18 \times "$
0,5	$0,28 \times "$
1	$0,34 \times "$
2	$0,58 \times "$

Door toevoeging van $\frac{2}{100}$ Ca Cl_2 zien we dus het H-ionengehalte drie à viermaal groter worden. Dit is echter niet meer het geval, wanneer vooraf eene hoeveelheid HCl aan de melk wordt toegevoegd, zooals de volgende meting leert:

Tabel V.

Toegev. $\frac{1}{10}$ HCl per 100 melk.	Stremtijd.		C_H zonder Ca Cl_2 .	C_H met Ca Cl_2 .
	Direct Ca Cl_2 ‰/100.	Later.		
0	36"	73"	$0,16 \times 10^{-6}$	$0,51 \times 10^{-6}$
5	38"	45"	—	—
15	24"	26"	$1,13 \times 10^{-6}$	$1,63 \times 10^{-6}$

Door toevoeging van het Ca Cl_2 zien we dus bij de niet aangezuurde melk het H-ionengehalte weer 3 à 4-maal groter worden, bij de aangezuurde daarentegen slechts stijgen van 1,13 tot 1,63. Bij de melk zonder HCl werkt dus de leb in het eene geval

in een medium met drie à viermaal meer H-ionen dan in het andere; dit verklaart het grootte verschil in stremtijd. Is van te voren HCl toegevoegd, dan is de relatieve toename der H-ionen door CaCl_2 toevoeging klein en we zien de stremtijden tot elkaar naderen. Dat hier geene omgekeerde evenredigheid gevonden wordt voor stremtijd en H-ionen is zeer verklaarbaar. Evenals toevoeging van keukenzout, kaliumchloride en andere zouten de lebwerking tegengaan, zoodra ze in eenigszins grootere concentratie aanwezig zijn, kan ook van het chloorcalcium hetzelfde verwacht worden. Zoo vond ik bij melk, waaraan $15 \text{ cm}^3 \cdot \frac{1}{10}$ norm. HCl per 100 cm^3 . was toegevoegd:

Direct CaCl_2 ($\frac{4^0}{100}$)	Later
24"	20"

Hier was dus de stremtijd duidelijk langer, als de leb inwerkte bij aanwezigheid van veel CaCl_2 dan zonder die toevoeging, d.w.z. de remmende invloed van het CaCl_2 was hier sterker dan de versnellende van de H-ionen.

Het is overbodig nog in bijzonderheden te bespreken, hoe de door andere onderzoekers ¹⁾ verkregen resultaten zeer eenvoudig verklaard kunnen worden door het hierboven medegedeelde.

Nu dus gevonden was, hoe de H-ionen op het stremmingsproces invloed uitoefenen, kon nagegaan worden wat de rol van de oplosbare kalkzouten is. Door een paar voorloopige proeven werd het waarschijnlijk, dat bij toevoeging van zuur aan de melk, de versnelling van de stremming, uitsluitend of bijna uitsluitend, een gevolg is van de vermeerdering der H-ionen, en dus niet of bijna niet van de verhooging van het oplosbare kalkgehalte. De volgende proef werd genomen.

Een monster melk werd in vijf gelijke deelen verdeeld; aan iedere portie werd weer eene hoeveelheid HCl toegevoegd en de actueele zuurgraad bepaald gelijktijdig met den stremtijd. Bovendien werd nog voor iedere portie het oplosbare kalk- en phosphorzuurgehalte bepaald; de bedoeling hiervan zal nader blijken. Voor dit doel werd de melk door Chamberlandkaarsen onder een druk van zes atmosferen gefiltreerd. Voor het verkrijgen van 50 cm^3 . filtraat moest drie à vier uren gefiltreerd worden, zoodat het noodig was, de flesschen met de verschillende porties in ijs te bewaren. Zes en dertig uren na het melken was de laatste hoeveelheid gefiltreerd; van merkbare melkzuurvorming was, bij de genomen voorzorgen, na dien tijd nog geen sprake. In de volgende tabel zijn de resultaten samengebracht.

¹⁾ B. v. ARTHUS et PAGÈS. Arch. de Physiologie 22, pag. 331 en 540.
LÖRCHER. Pflügen Archiv. 69, p. 141.

Tabel VI.

$\frac{1}{10}$ HCl per 100 melk.	$C_H \times 10^{-6}$	Stremtijd.		Ca O in mGr. per 100 serum.	$P_2 O_5$ in mGr. per 100 serum.	Opgel. atomen Ca	
		Gev.	Ber.			Opgel. mol. $P_2 O_5$.	
0	0,16	145"	—	48	88,6	—	
5	0,40	56"	58"	61,4	107	1,8 : 1	
10	0,67	33"	35"	— 1)	— 1)	—	
15	1,00	23"	23"	83,8	123	2,7 : 1	
20	1,73	22"	13"	101,1	131	3,2 : 1	

In de vierde kolom zijn de stremmingstijden opgegeven, welke berekend zijn, uitgaande van de veronderstelling, dat de oplosbare kalkzouten geen invloed uitoefenen, uit de gevonden concentraties van de H-ionen.

Behalve voor de hoogste concentratie, is de overeenstemming tusschen de gevonden en berekende waarden uitstekend. Dit resultaat zou dus leiden tot de gevolgtrekking, dat het *gehalte* aan oplosbare kalkzouten geen invloed op de stremming uitoefent, eene opvatting, die volkomen in strijd is met de meening, die men over de rol dezer zouten algemeen heeft ²⁾. De hier medegedeelde resultaten vormden echter naar mijne meening een zoo krachtig argument tegen de bestaande opvatting, dat ik me genoodzaakt zag de gronden, welke daarvoor aangevoerd worden, een voor een aan een nader onderzoek te onderwerpen.

1. Toevoeging van chloorcalcium aan melk verkort den stremmingstijd enorm.

Door dit feit alleen reeds, is men ertoe gekomen, aan de opgeloste zouten de oorzaak daarvan toe te schrijven. Zooals reeds gezegd, zijn REICHEL en SPIRO ³⁾ door een uitvoerig onderzoek tot de conclusie gekomen, dat de stremtijd een functie is van het gehalte aan calcium-ionen. Zij gingen op de volgende manier te werk.

Aan een bepaald volume melk werd 1 cM³. CaCl₂ opl. toegevoegd van verschillende concentraties en de stremmingstijd bepaald, waarbij deze waarden gevonden werden:

1) Analyse mislukt.

2) Een uitstekend overzicht over het geheele onderwerp geeft FULD. Ergebnisse der Physiologie, Bd. I, (1902), p. 468.

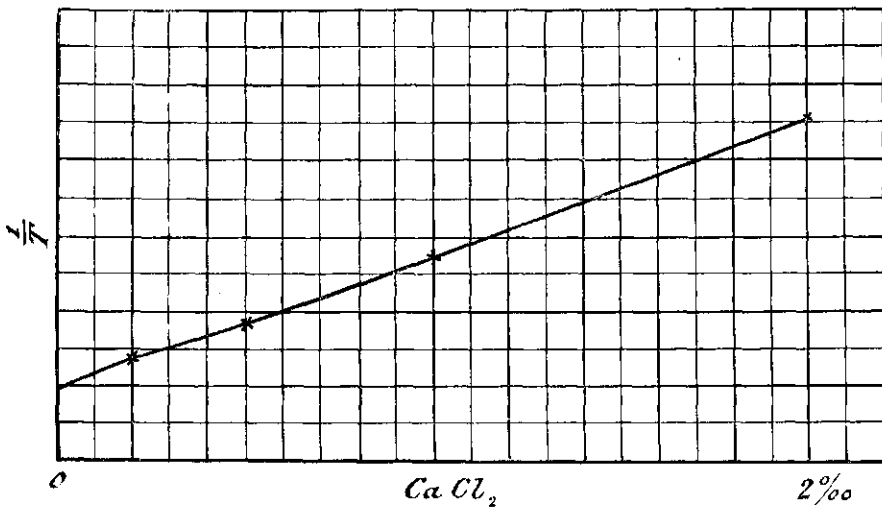
3) l. c. Zie ook ARRHENIUS. Immunochemie, p. 48.

Tabel VII.

Ca Cl ₂ ‰	Stremtijd.	(p + 0,6) t.
0	48"	28,8
0,05	45,6"	29,6
0,1	41,6"	29,1
0,2	36"	28,8
0,5	26,4"	29,0
1,0	18,2"	29,1
2,0	11"	28,6
5,0	7,4"	41,4
10,0	9,2"	97,5
20,0	15"	309

In de 3de kolom zijn aangegeven de waarden voor het product $(p + 0,6) t$, waarin $p = \text{Ca Cl}_2$ gehalte en t de stremtijd. Zooals men ziet is dit product voor niet al te hooge concentratie nagenoeg constant. Het getal 0,6, dat aan p moet worden toegevoegd om de constante waarden te krijgen, moet dan volgens REICHEL en SPIRO, opgevat worden als de hoeveelheid calciumionen, die in de melk, zonder Ca Cl₂-toevoeging, aanwezig is. Aannemende een oplosbaar kalkgehalte van 0,08 pCt. Ca O (volgens SÖLDNER), zou 37 pCt. van de kalkzouten gedissocieerd zijn¹⁾. Neemt men het door REICHEL en SPIRO zelf medegedeelde cijfer, n.l. 0,05 pCt., dan wordt gevonden 60 pCt.²⁾.

Stelt men hun resultaat grafisch voor, dan wordt de volgende lijn verkregen,



¹⁾ REICHEL en SPIRO geven op 60‰. Dit moet op eene vergissing berusten; althans in de verhandeling van SÖLDNER, Versuchsstat. Bd. 35 (zijne dissertatie had ik niet ter beschikking) vond ik het hierboven opgegeven cijfer van 0,08‰ Ca O.

²⁾ Het cijfer van SÖLDNER is het hoogste, dat in de litteratuur voorkomt. DECLAUX, OTT DE VRIES en BOEKHOUT en REICHEL en SPIRO geven alle in goede overeenstemming 0,05‰, een cijfer, dat ook ik herhaaldelijk vond.

waaruit zij besluiten: De stremtijd is omgekeerd evenredig met het gehalte aan calcium-ionen.

Hierbij is echter geen rekening gehouden met het feit, dat van het aan de melk toegevoegde chloorcalcium een deel in onoplosbaren toestand overgaat, voor welk gedeelte dus van ionen niet meer gesproken kan worden. Ten tweede verandert het waterstof-ionengehalte in de vloeistof; ook hiermede dient rekening gehouden te worden.

De conclusie, waartoe deze schrijvers komen, is dus niet gerechtvaardigd. Het regelmatig verloop van de door hen gevonden lijn kon echter bezwaarlijk aan een toeval worden toegeschreven; om opheldering te krijgen over hun resultaat heb ik onderzocht, welk gedeelte van het toegevoegde chloorcalcium bij de verschillende door hen gebezigde concentraties in den onoplosbaren vorm overgaat. Daartoe werden weer eenige porties van eenzelfde monster melk met verschillende hoeveelheden CaCl_2 gemengd, zoo snel mogelijk door een Chamberlandfilter gefiltreerd en in het filtraat het kalkgehalte bepaald. Door een paar proeven overtuigde ik me, dat het chloor-quantitatief in het serum overgaat. (Een spoor bleef achter, echter zóó weinig, dat er geen rekening mee behoeft gehouden te worden; de oorzaak zal wel in adsorbtie gelegen zijn).

Tabel VIII.

‰ CaCl_2	mGr. Ca O per 100 serum.	Vastgelegd Ca O per 100 serum.	Vastgelegd ‰ van toegevoegd CaCl_2 .
0	48	—	—
0,5	66	7	56 ‰
1	72,8	25,2	50,4 „
1,5	83,7	39,3	52,4 „
2	108	40	40

Uit dit tabelletje blijkt dus, dat ± 50 pCt. van het toegevoegde chloorcalcium in den onoplosbaren toestand overgaat; op welke wijze de calcium-ionen gebonden worden is niet met zekerheid te zeggen, maar het ligt voor de hand eene binding aan de caseïne aan te nemen. Opmerkelijk is nog, dat bij de hoogere concentratie van het CaCl_2 (2 ‰) bijna niet meer calcium-ionen worden gebonden, dan voor de hoeveelheid van 1,5 ‰ . Ik kom daarop nog terug. Voegt men aan het serum chloorcalcium toe, dan ontstaat eene troebeling; het leek me van belang na te gaan, hoeveel Ca O ook voor dit geval wordt vastgelegd, om eenig idee te hebben over de hoeveelheid, die door de colloïdaal opgeloste stoffen in de melk wordt gebonden. Voor de kleinere concentraties (0,5 en 1 ‰) was echter de vloeistof niet van het neerslag te scheiden: de afscheiding was zeer gering. Voor 1,5 en 2 ‰ werd geprecipiteerd, resp. 15 en 20 mGr. Ca O per 100 serum. (Door de melk 39,3 en 40 mGr. zie tabel). Hierdoor is echter geenszins vastgesteld, dat bij toevoeging van het chloorcalcium

aan de melk ook 15 en 20 mGr. CaO op rekening van het serum moet gesteld worden. Bij de later te bespreken „oxalaat-melk” zal dit nader blijken; deze cijfers 15 en 20 geven de maximumhoeveelheden, die door het serum gebonden kunnen worden, aan. Zooals men ziet wordt in ieder geval de grootste hoeveelheid vastgelegd door het bij de filtratie niet doorlopend gedeelte, zooals gezegd, waarschijnlijk de caseïne.

Houdt men met deze uitkomst rekening, dan blijkt, dat de conclusie van REICHEL en SPIRO alleen hierom al foutief is, afgezien nog van de verandering der waterstof-ionen, maar bovendien blijkt, dat uit het feit, dat door toevoeging van chloorcalcium aan melk de stremtijd verkort wordt, volstrekt niet geconcludeerd mag worden, dat deze versnelling een gevolg is van de meerdere oplosbare kalkzouten. Ziet men van de andere argumenten, die voor de oplosbare kalkzoutenhypothese worden aangevoerd af, dan is er evenveel reden om het spoediger coaguleeren toe te schrijven aan eene verbinding van de caseïne met meer kalk dan in de oorspronkelijke melk, als aan de vermeerdering van de oplosbare kalkzouten. In dit verband is het nog van belang er op te wijzen, dat boven eene bepaalde concentratie van chloorcalcium geene calcium-ionen meer worden gebonden, zooals we hierboven zagen, en opvallend is het, dat dit juist die concentratie geldt, waarvoor in de lijn van REICHEL en SPIRO de afwijking van de rechte begint. Verder is hier de plaats, om nog op eene bijzonderheid te wijzen van tabel VI, p. 14. In de 5de en 6de kolom vindt men aangegeven, hoeveel CaO en P_2O_5 in het serum van met zoutzuur aangezuurde melk voorkomt en de 7de kolom geeft aan, hoeveel atomen calcium tegen 1 mol. P_2O_5 zijn opgelost. Terwijl voor 5 en 15 cm^3 . $\frac{1}{10}$ norm. HCl de verhouding 1:1,8 en 1:2,7 gevonden werd, leverde de toevoeging van 20 cm^3 . $\frac{1}{10}$ norm. HCl reeds 1:3,2. In dit laatste geval moeten dus calciumatomen in oplossing zijn gegaan, welke niet aan phosphorzuur gebonden waren; waarschijnlijk is hier de caseïnekalk aangeast en dan zou, in verband met het bovenstaande, daardoor volkomen verklaard zijn de afwijking die voor dit geval in den gevonden en berekenden stremtijd werd waargenomen. Dat de hier optredende vertraging veroorzaakt zou worden door de bovenbesproken remmende werking van het chloorcalcium in hooger concentratie is niet aan te nemen; immers 20 cm^3 . $\frac{1}{10}$ norm. HCl per 100 cm^3 . melk is aequivalent met 1,11 Ca Cl₂ $\frac{0}{100}$.

Deze beide feiten steunen dus de bovenbedoelde opvatting.

Ten slotte hebben de onderzoekingen van REICHEL en SPIRO me er nog toe gebracht, eene *directe* bepaling van de dissociatie van de kalkzouten in melkserum te doen. Natuurlijk kunnen in het algemeen de cijfers, bij het eene monster melk gevonden, niet direct vergeleken worden met die, welke een ander product opleverde, maar de waarden, welke ik vond wijken zoo enorm af van die, door REICHEL en SPIRO langs een omweg gevonden, dat het me van belang schijnt ook dit gedeelte van het onderzoek hier kort te vermelden.

Hierbij werd uitgegaan van den volgenden gedachtengang. Wanneer door melkserum een electricische stroom gevoerd wordt, dan heeft het transport van de electriciteit plaats door de in het serum aanwezige ionen; de niet gedissocieerde verbindingen dragen daartoe niets bij. Hiermede gaat echter gepaard eene concentratieverandering aan de electroden. Werd dus na het doorleiden van den stroom aan de negatieve electrode eene grootere concentratie aan calcium gevonden dan vóór de proef, dan was dit een bewijs voor het gedissocieerd zijn van de kalkzouten in het serum, maar bovendien kon uit de gevonden concentratieverandering de mate van dissociatie bij benadering berekend worden, indien gelijktijdig het kaliumgehalte vóór en na de proef werd bepaald. Op de details van de proef kan hier niet worden ingegaan ¹⁾; ik volsta dus met de mededeeling van de resultaten. Het transport van calcium-ionen was zóó gering, dat op eene dissociatie van hoogstens 12% kan gerekend worden; twee van de 3 verrichte bepalingen leverden veel lager uitkomst. Zooals men ziet, is het verschil met het door REICHEL en SPIRO opgegeven cijfer zóó groot, dat ook op grond hiervan hunne redeneering wel als foutief kan worden beschouwd. Tevens bleek hieruit, dat het geen zin had de proef ook met de niet stremmende melk uit te voeren, zooals eerst mijne gedachte was, omdat ik de oorzaak zocht in gebrek aan calcium-ionen bij deze melk.

2. Door toevoeging van een oplosbaar oxalaat aan melk, wordt ze onstrembaar.

Dit verschijnsel is altijd een krachtig argument geweest voor de werking van de oplosbare kalkzouten. Immers, zoo redeneert men, door de oxalaat-ionen wordt het calcium geprecipiteerd en het vermogen om te stremmen is daarmede verdwenen.

Door het voorafgaande sterk aan het twijfelen geraakt omtrent de rol der kalkzouten, ging ik over tot de volgende proef.

Aan een monster melk werd zóóveel kaliumoxalaat toegevoegd, als juist voldoende was, om al de opgeloste kalkzouten als calciumoxalaat neer te slaan; deze melk was na vijf uren nog niet gestremd. Na een paar uren werd door een Chamberlandfilter gefiltreerd en in het filtraat het nog aanwezige calcium bepaald. Men zou verwacht hebben geen of slechts sporen kalk te vinden. Het resultaat was echter anders:

Per 100 cM ³ . serum van de oorspronkelijke melk .	50 mGr. Ca O.
„ 100 „ „ „ „ oxalaatmelk.	38 mGr. Ca O.

Deze proef heb ik herhaald met volkomen hetzelfde resultaat; het toegevoegde kaliumoxalaat schijnt zich op eene bepaalde wijze te verdeelen over de opgeloste en de colloïdaal aanwezige kalk-

¹⁾ Voor deze onderzoekingen was het gebruik van hooge spanningen noodig. Gaarne breng ik ook hier mijn dank aan de Directie van de fabriek van gecondenseerde melk te Hoorn, die welwillend hare dynamo te mijner beschikking stelde.

zouten. In beide gevallen werd slechts 12 mGr. CaO van de 50 geprecipiteerd, zoodat er 38 in oplossing bleven. Het grootste deel van de oxalaat-ionen maakt zich dus meester van niet normaal opgelost calcium; het serum van de oxalaatmelk is volkomen vrij van oxalaat.

Zooals gezegd, deze melk stremt niet, niettegenstaande nog 38 mGr. CaO opgelost is. Verder werd nog aan oxalaatmelk, die dus niet meer stremde, chloorcalcium toegevoegd, om ze te regenereren en dan het gehalte aan oplosbare kalkzouten en stremtijd bepaald.

100 cM³. serum bevatten 48,6 mGr. CaO.

Aan 104 cM³. (d. i. 100 serum) melk toegevoegd 0,160 Gr. K₂C₂O₄. 1 aq., d. i. de met 0,0486 Gr. CaO aequivalente hoeveelheid.

Stremtijd oorspronkelijke melk 90"

Tabel IX.

Toegevoegd Ca Cl ₂ ‰ aan oxalaatmelk.	Stremtijd.	Opgel. Ca O in serum in mGr.	Vastgelegd Ca O door colloïdale verbindingen van 100 cM ³ .	C _H
0	∞	39	—	0,13 × 10 ⁻⁶
0,5	Na 1 uur niet gestremd.	38	25	
0,75	360"	40	37	
1	85"	48	40	0,15 × 10 ⁻⁶

Beschouwen we nu deze tabel, dan zien we, dat in de oxalaatmelk zonder toevoeging van chloorcalcium, die dus niet stremt, 39 mGr. CaO is opgelost, dus ook 39 mGr. CaO van de colloïdale kalk moet zijn geprecipiteerd. Uit de tweede horizontale rij zien we, dat al het toegevoegde chloorcalcium (25 mGr. CaO) is vastgelegd. Van de 39 mGr., welke als oxalaat geprecipiteerd waren, zijn dus 25 mGr. weer opgenomen. Na een uur was deze melk nog niet gestremd.

Uit de 3de rij blijkt, dat weer bijna al het toegevoegde chloorcalcium is vastgelegd (40 mGr. CaO opgelost tegen 39 in de oorspronkelijke melk) en nu stremt deze melk weer gewoon; echter nog na langer tijd dan de oorspronkelijke melk. *De oxalaatmelk zonder toevoeging, die op 1 mGr. CaO na hetzelfde gehalte aan oplosbare kalkverbindingen heeft, is volkomen onstrembaar.*

In de laatste rij vinden we den oorspronkelijken toestand van de melk weer ten naastenbij hersteld.

Ten slotte deed ik nog het volgende. Aan een gedeelte van een monster melk werd weer eene met de opgeloste kalkzouten aequivalente hoeveelheid kaliumoxalaat toegevoegd; van een ander gedeelte werden 100 cM³. in een dialysator gebracht en tegen herhaaldelijk ververscht gedestilleerd water gedurende 24 uren

gedialyseerd. Het diffusaat werd ingedampt en de kalk erin bepaald. De melk uit den dialysator, die echter van 100 op 140 cM³. was verdund, op stremtijd onderzocht.

Ca O in serum oorspronkelijke melk . . .	49,6 mGr.
” ” ” oxalaatmelk	37,7 ”
Na 6 uren de oxalaatmelk <i>niet</i> gestremd.	

Ca O in diffusaat 29,3 mGr. Na 1½ uur duidelijke stremming van de gedialyseerde melk. (De stremtijd is dus zeker korter geweest, maar werd niet nauwkeurig bepaald).

Hier zien we dus, dat de melk met 38 mGr. oplosbare kalkzouten, maar waarvan de caseïnekalk waarschijnlijk is aangetast, *niet* stremt, terwijl dezelfde melk, waarvoor het oplosbare kalkgehalte door diffusie gebracht is op $\frac{100}{140} \times 20,3 = 14,5$ mGr. Ca O nog zeer goed tot coaguleeren te brengen is. Men zou nog kunnen aanvoeren, dat bij het diffusieproces door de verdunning misschien kalkzouten in oplossing hebben kunnen gaan; onder punt 4, de verdunning van de melk, zal blijken, dat dit niet het geval is, of slechts voor een zeer klein gedeelte. Vatten we deze uitkomsten samen, dan blijkt, dat het niet stremmen van de oxalaatmelk veel meer een argument is voor de hierboven ontwikkelde opvatting dan voor de hypothese, dat de oplosbare kalkzouten in de eerste plaats een rol spelen. Het lag al te zeer voor de hand om aan te nemen, dat bij toevoeging van ammoniumoxalaat in de eerste plaats de normaal opgeloste kalkzouten zouden worden aangetast; uit mijne uitkomsten blijkt duidelijk dat dit niet het geval is.

3. Door toevoeging van een oplosbaar citraat wordt de stremtijd aanmerkelijk verlengd.

Ook hier leerden mijne uitkomsten, dat de bestaande opvatting niet juist is. Men neemt aan, dat door toevoeging van kaliumcitraat b.v. de kalkzouten worden neergeslagen, evenals door ammoniumoxalaat, daar calciumcitraat in water moeilijk oplosbaar is. Het tegenovergestelde is het geval; kaliumcitraat toont de eigenschap, om de kalkzouten der melk in oplossing te brengen en niettegenstaande dat zien we den stremtijd grooter worden. Ook hier heb ik bepaald, hoeveel atomen Ca worden opgelost op 1 μ mol. P₂O₅ en zooals uit onderstaande tabel duidelijk blijkt, moet weer een deel van de aan caseïne gebonden kalk worden opgelost. Doer een paar metingen van de H-ionen werd geconstateerd, dat niet eene verandering hierin de oorzaak van het langzamer stremmen kan zijn.

Tabel X.

Toegev. K Citr. ‰	Stremtijd.	mGr. Ca O per 100 serum.	mGr. P ₂ O ₅ per 100 serum.	Atomen Ca: mol. P ₂ O ₅	C _H .
0	1,45"	46	87,7	1,—	0,16 × 10 ⁻⁶
1,12	30'	56,4	93,4	4,7 : 1	0,14 × 10 ⁻⁶
0	1,45"	49,2	92,6	—	—
2,24	∞	62	99,8	4,5 : 1	—

Deze uitkomst laat zich in geen geval in overeenstemming brengen met de bewering: hoe meer oplosbare kalkzouten, hoe sneller stremming. Neemt men de calcium-ionen als de oorzaak hiervan aan, dan zou men evenwel dit resultaat zóó kunnen verklaren, dat door toevoeging van het kaliumcitraat de dissociatie van het calciumcitraat, dat in de melk aanwezig schijnt te zijn, wordt teruggedrongen, waardoor ten slotte in de citraatmelk toch minder Ca-ionen aanwezig zouden zijn dan in de oorspronkelijke, niettegenstaande ze meer opgeloste kalkzouten bevat. Over de dissociatie van calciumcitraat is echter in de litteratuur geene opgave te vinden. Geleidbaarheidsmetingen voor dit doel zijn onderhanden genomen.

Gaat men er van uit, dat de aan caseïne gebonden kalk een rol speelt, dan is de vertraging van de stremming door bovenstaande tabel op eenvoudige wijze volkomen verklaard.

4. Door verdunning van de melk wordt de stremtijd verlengd.

Reeds HAMMARSTEN heeft in zijne, reeds vroeger aangehaalde, uitvoerige verhandeling cijfers meegedeeld, om aan te toonen, hoe de stremtijd afhangt van de verdunning met water. Hoe meer water men toevoegt, des te langzamer coaguleert de vloeistof. De verklaring lag voor de hand: door de verdunning wordt de concentratie der kalkzouten geringer en dus moet de stremming later intreden.

Nu is het gemakkelijk aan te toonen, dat er nog andere oorzaken voor het verschijnsel kunnen worden aangegeven. Uit de volgende proef blijkt b.v. dat er bij het verdunnen eene verandering intreedt, wat de caseïnekalk betreft, 50 cM³. goed stremmende melk werden met hetzelfde volume gestedilleerd water verdund, het mengsel onmiddellijk in een destillatiekolf gebracht en bij een temp. van 24°—29° C. een vol. water, gelijk aan dat van het toegevoegde water, afgedestilleerd. Dit nam twee uren in beslag. Als er geene veranderingen in de melk hadden plaats gehad, had men voor de in de destillatiekolf terugblijvende melk denzelfden stremtijd kunnen verwachten als voor de versche melk. Gevonden werd:

Onverdunde melk	125"
Verdund en daarna afgedestilleerd	243"
Verdunde melk	± 15'.

Terwijl dus door het afdestilleeren van het water bij lage temperatuur de opgeloste kalkzouten weer op hun oorspronkelijk gehalte zijn teruggebracht, stremt deze melk half zoo snel als de oorspronkelijke. Over den aard van de verandering kan niets met zekerheid worden gezegd; het is verleidelijk, eene gedeeltelijke hydrolyse van de caseïnekalk aan te nemen, waardoor dus minder calcium aan caseïne gebonden zou zijn, terwijl bij het verdampen de oorspronkelijke toestand niet spoedig terugkeert, zooals ook in andere gevallen wordt waargenomen. Met het oog op den eigenaardigen toestand, waarin de caseïnekalk in de melk voorkomt, lijkt het me beter, aan dergelijke beschouwingen, die voor normale oplossingen zoo dikwijls den weg tot verklaring van verschijnselen aanwijzen, niet te veel waarde te hechten. Dat er veranderingen plaats hebben, die voor verdunde melk een langeren stremtijd doen verwachten, blijkt overtuigend uit de proef.

Een tweede punt, waarmede bij de verdunning met water ook nooit rekening is gehouden, is dit, dat tengevolge van de vergroting der hydrolyse van de opgeloste phosphaten, het H-ionengehalte door de verdunning moet achteruitgaan, waardoor de stremming trager wordt. Dat dit werkelijk het geval is, blijkt uit de volgende cijfers:

Melk, onverdund	$C_H = 0,16 \times 10^{-6}$.
Verdunning 1:1	$C_H = 0,10 \times 10^{-6}$.

Een tweede factor dus, die niet over het hoofd mag worden gezien.

Verder is de concentratie van de caseïnekalk van invloed. Hierover zijn uitvoerige onderzoekingen verricht door FULD¹⁾, die hem tot de conclusie voerden, dat de omzettingssnelheid van de caseïne in paracaseïne constant is, d.w.z. dat de stremtijd korter is, naarmate er minder kaasstof te verkazen is. Een gevolg hiervan zou zijn, dat voor verdunde melk de stremtijd korter moest zijn; dat dit niet het geval is, zegt hij, komt door de verdunning der kalkzouten, waarvan de invloed overweegt. Daarom heeft hij proeven genomen met wei als verdunningsvloeistof en vindt dan werkelijk een paar malen stremtijden, welke evenredig zijn met de caseïnehoeveelheid. De schrijver drukt zich echter eenigermate gereserveerd uit op dit punt. Ik heb dan ook kunnen aantoonen, dat wel degelijk de stremming langzamer gaat als er minder kaasstof aanwezig is en tevens is het nu duidelijk, hoe FULD door verdunnen met wei, welke door aanzuren van de melk en neutraliseeren van het filtraat, verkregen werd, tot totaal foutieve uitkomsten moest komen. De bijzonderheden zullen elders worden gepubliceerd.

Uit de volgende eenvoudige proef blijkt b.v. de invloed van de hoeveelheid caseïne. Een gedeelte van een monster melk werd

¹⁾ HOFMEISTERS Beiträge. Bd. II (1902), p. 169.

door een Chamberlandfilter gefiltreerd en met dit filtraat werd de melk verdund. Door deze verdunning wordt in de opgeloste zouten dus geene verandering gebracht; alleen de concentratie van de niet filtreerbare stoffen wordt kleiner.

Tabel XI.

Melk.	Serum.	Stremtijd.
10	0	23"
7,5	2,5	28"
5	5	37"
2,5	7,5	52"

Hierbij bleek nog op aardige wijze de invloed der H-ionen. Het maakt n.l. een groot verschil, of het serum direct, zóó als het uit de filter komt, voor de verdunning gebruikt wordt óf na het uitpompen van het bij de filtratie erin geperste gas, door middel van een kwikluchtpomp.

Tabel XII.

Melk.	Serum.	Uitgepompt.	Niet uitgepompt.
10	0	133"	131"
7,5	2,5	158"	153"
5	5	215"	184"
2,5	7,5	311"	225"

Het verschil in stremtijd is belangrijk en wordt grooter naarmate er meer serum wordt toegevoegd. Dat niet eene belangrijke vermindering van de H-ionen bij de verdunning de oorzaak der vertraging is, blijkt uit de volgende meting:

$$C_H \text{ melk} \dots\dots\dots 0,15 \times 10^{-6}.$$

$$C_H \text{ verdund } 1:1 \dots\dots\dots 0,13 \times 10^{-6}.$$

Uit deze verdunningsproeven kan besloten worden, dat de stremtijd langer is, naarmate de caseïnenkalk-concentratie kleiner is.

Ook dit zal dus bijdragen tot eene vertraging bij het stremmen van met water verdunde melk. Alles bijeengenomen, is het dus niet noodig, om de vermindering in concentratie van de kalkzouten als de oorzaak aan te nemen van den invloed der verdunning met water.

Toch heb ik bij deze verdunningsproeven één resultaat gekregen, dat zeer sterk pleit voor de werking van de oplosbare kalkzouten of calcium-ionen en waarvoor geene verklaring aan te geven is met behulp van de hierboven ontwikkelde opvatting. Van de volgende redeneering werd uitgegaan. Als de kalkzouten, welke zich in oplossing bevinden van geen invloed zijn, dan moet de stremtijd van met gewoon serum verdunde melk dezelfde zijn als wanneer dezelfde verdunning wordt teweeg

gebracht door oxalaatserum, d. w. z. serum van melk, waaraan eene hoeveelheid kaliumoxalaat werd toegevoegd, waardoor dus een deel der calciumzouten is neergeslagen. Zooals uit de volgende proef blijkt, is dit *niet* het geval.

Aan de melk werd weer toegevoegd de met de opgeloste kalkzouten aequivalente hoeveelheid kaliumoxalaat en gefiltreerd; van dezelfde melk werd een deel gefiltreerd zonder dat een oxalaat was toegevoegd.

1. 5 melk + 5 uitgepompt gewoon serum . . . 4 min. 50 sec.
5 „ + 5 „ oxalaatserum . . . 8 „ 48 „
2. 5 melk + 5 „ gewoon serum . . . 120"
5 „ + 5 „ oxalaatserum . . . 345"
3. Ammoniumoxalaat in plaats van kaliumoxalaat voor het neerslaan gebruikt.
5 melk + 5 gewoon serum 180"
5 „ + 5 oxalaatserum 330".

Het waterstof-ionengehalte dezer sera was volkomen hetzelfde na verwijdering van het opgeloste koolzuur.

Zooals gezegd, het is me niet gelukt voor dit resultaat eene verklaring te vinden zonder aan de calcium-ionen een grooten invloed op den stremmingstijd toe te schrijven. Neemt men deze aan, dan is het verschijnsel niet anders dan te verwachten was; toch blijkt ook hier niet de evenredigheid van calcium-ionen en stremmsnelheid te bestaan, immers voor het oxalaatserum zou eene minimale hoeveelheid calcium-ionen moeten worden aangenomen, want de melk is volkomen onstrembaar, zoodat door de verdunning met dit serum het calcium-ionengehalte op iets meer dan de helft wordt teruggebracht. De verhouding der stremtijden wijkt echter te veel van die van 1:2 af. De kalium- of ammonium-ionen zijn in deze concentratie van geen invloed, zooals een paar proeven met KCl en NH₄Cl uitwezen. Zeer zeker is hierin een sterk argument gelegen tegen de opvatting, waartoe al de in de voorgaande pagina's besproken resultaten voerden; stel ik echter deze hier tegenover, dan blijf ik het toch als zeer waarschijnlijk beschouwen, dat het meer of minder snel gepraecipiteerd worden van de paracaseïnekalk, behalve van de hoeveelheid leb en de temperatuur afhangt van den reëlen zuurgraad en van de hoeveelheid kalk, welke door de caseïne gebonden is. Deze hangt wel is waar weer samen met de calcium-ionen in de vloeistof, en in zooverre zijn deze zonder twijfel van beteekenis, maar over de evenwichten, die hierbij optreden, welke wegens de zeer gecompliceerde samenstelling der melk toch al ingewikkeld zijn, weten we eigenlijk zeer weinig, daar de eigenaardige toestand waarin zich de caseïnekalk in de melk bevindt, niet toelaat, zoo maar zonder meer, de voor electrolyten gevonden wetten van het evenwicht op de melk toe te passen.

Tabel VI zou er op wijzen, dat bij toevoeging van H-ionen de invloed der calcium-ionen op de hoeveelheid aan caseïne gebonden kalk onbeduidend is.

Wat er bij de verdunning geschiedt, is evenmin met eenige zekerheid bekend; de mogelijkheid van eene verschuiving van de calciumatomen is hier niet uitgesloten. Volkomen onverklaard is ook het door REICHEL en SPIRO¹⁾ waargenomen verschijnsel, dat bij verdunning van de melk met keukenzoutoplossing, een groot verschil in stremtijd wordt gevonden voor de directe bepaling (onmiddellijk na de verdunning) en die, welke een uur later wordt uitgevoerd. De volgende tabel geeft hunne resultaten:

Tabel XIII.

% Na Cl.	Stremtijd.	
	Direct.	Na 1 uur.
0,5	5	5"
0,9	6,5	7"
1,7	9	12"
2,5	12	16,5"
4,5	16,5	28,5"
6,5	18,5	38"
8,5	19,5	49"

Het uitvoerig onderzoek, waarvan in de voorafgaande bladzijden een kort overzicht gegeven is, was noodig, om met eenige zekerheid te kunnen zeggen, in welke richting naar de oorzaak van het niet stremmen van melk moet worden gezocht. Op grond van mijne resultaten was het dus mogelijk, dat het gebrek een gevolg is van een te laag kalkgehalte van de melk, in dien zin, dat het gehalte aan aan caseïne gebonden kalk te klein is. De totaal-kalkbepaling in eenige monsters²⁾ melk gaf een resultaat, dat hiermede volkomen in overeenstemming is, zooals uit de volgende cijfers moge blijken:

mGr. Ca.O per 100 melk.

1.	138	Niet stremmend.
2.	137	" "
3.	135	Slecht stremmend.
4.	140	Niet stremmend.
5.	140	Slecht stremmend.
6.	115?	Niet stremmend.
7.	140	" "

¹⁾ l. c.

²⁾ Gedeeltelijk niet gepubliceerde analyses van OTT DE VRIES en BOEKHOUT.

8.	143	Slecht stremmend.
9.	150	" "
10.	154	Norm. stremmend.
11.	154	" "
12.	146	" "
13.	168	" "
14.	161	" "
15.	155	" "
16.	175	" "

Zooals men ziet, is het gehalte van de niet stremmende melk lager dan voor de normale.

Als antwoord op de oorspronkelijk gestelde vraag kan dus gezegd worden:

De oorzaak van het niet stremmen van de melk, zooals dat in Noord-Holland nogal eens voorkomt, is dus, in het algemeen, gelegen in gebrek aan kalk in de melk; zeer waarschijnlijk is de aan caseïne gebonden hoeveelheid te gering om coagulatie te verkrijgen.

Interessant is nog, in verband hiermede, het resultaat, verkregen met de toediening van phosphorzure kalk (biphosphaat) aan een dier van de Proefzuivelboerderij, dat regelmatig niet stremmende melk leverde. Door eene gift van 50 Gram per dag stremde na twee dagen de melk in 70", tegen 60" voor een monster gemengde melk, d. w. z. de melk was ongeveer normaal stremmend geworden en bleef dit, zoolang de phosphorzure kalk werd toegediend. Een kaas, uit \pm 20 L. van deze melk bereid, bleek echter na vier weken zeer slecht te zijn; de uitkomst van eene tweede en derde bereiding was zeer gunstig. Toen geen voederkalk meer gegeven werd, was na drie dagen de stremtijd weer sterk toegenomen; gedurende de daarop volgende dagen bleef de melk strembaar, hoewel slecht.

Bij eene guste koe, die in de laatste week van de lactatieperiode niet stremmende melk leverde, gaf phosphorzure kalk geen resultaat.

Untersuchungen über die Labgerinnung.

(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen).

Zweck dieser Untersuchungen war, die Ursache des nicht gerinnen der Milch von einzelnen Kühen festzustellen.

Es wurde darauf hingewiesen, dass man auch bei der Milch zu unterscheiden hat zwischen den gewöhnlichen, durch Titrieren

zu bestimmenden (potentiellen) Säuregrad und den absoluten (actuellen oder reellen) Säuregrad, d. h. die Wasserstoffionen-concentration. Letztere ist mittelst electricischer Messmethoden bestimmt worden; der gefundene Werth schwankt zwischen 0,14 und $0,32 \times 10^{-6}$ normal. Für nichtgerinnende Milch wurde gefunden 0,16 und $0,22 \times 10^{-6}$ normal H; Mangel an Wasserstoffionen konnte also nicht die Ursache des nicht Gerinnens sein. Diese Messungen machten es möglich zu untersuchen in welcher Weise die Gerinnungszeit abhängt vom Säuregrade der Milch: *Die Gerinnungszeit ist der Concentration der Wasserstoffionen umgekehrt proportional.*

Mit diesem Resultate wieder war es möglich herauszufinden, in welcher Weise die Gerinnungszeit beeinflusst wird von den löslichen Kalksalzen. Es zeigten sich diese aber mit groszer Wahrscheinlichkeit ohne merklichen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Gerinnung; ja, die Versuche sprechen dafür, dass eben der an Casein gebundene Kalk maszgebend ist für die Coagulation. Diese Auffassung, ganz abweichend von der gewöhnlichen, nach welcher es eben die löslichen Kalksalze sind, welche beschleunigend wirken, machte eine ausführliche Nachprüfung von den verschiedenen Argumenten welche für diese Hypothese immer angeführt werden, wünschenswerth.

Es wurde gefunden:

1°. Beim Versetzen von Milch mit Chlorcalcium bleibt nur $\pm 50\%$ des hinzugefügten Salzes gelöst, unabhängig von der Concentration der Lösung. Für extrem hohe Concentrationen aber ($< 2\%$) werden keine Calciumionen mehr festgelegt in nicht filtrirbarer Form. Daz denoch bei diesem Gehalt das Chlorcalcium beschleunigend wirkt, kann so erklärt werden, daz durch hinzufügen von diesem Salze, der Wasserstoffionen gehalt bedeutend gesteigert wird.

2°. Die Dissociation der Kalksalze in der Milch ist sehr gering; jedenfalls weniger als 12% .

3°. Durch hinzufügen von löslichen Oxalaten werden nicht in erster Linie die gelösten, wie allgemein angenommen, sondern die Kalksalze, welche sich in Pseudolösung befinden, gefällt. Bei einer Milch mit 50 mGr. CaO pro 100 cM³. Serum, wurden beim Versetzen mit den hiermit aequivalenten Menge Kaliumoxalat nur 12 mGr. CaO gefällt. Diese Milch war vollkommen gerinnungsunfähig. Durch Chlorcalciumlösung konnte sie aber regeneriert werden, trotzdem der Gehalt an normal gelösten Kalksalzen sich fast nicht vermehrt hatte (40 statt 39 mGr. pro 100 cM³. Serum).

4°. Daz lösliche Citraten die Gerinnung verzögern oder ganz aufheben, wird immer in derselben Weise, durch Fällen der

löslichen Kalksalze, erklärt; Calciumcitrat ist nämlich schwer löslich. Auch hier lehrt der Versuch etwas Anderes.

Durch versetzen mit löslichen Citraten gehen die „colloïdale Kalksalze“ in normale Lösung über. Der Gehalt an löslichen Kalksalze wird bedeutend *gesteigert*, und dennoch wird die Milch gerinnungsunfähig. Es wurde weiter gefunden, dass durch Kaliumcitrat ein Theil des an Casem gebundenen Calciums gelöst wird und somit hat sich auch dieses Ergebnis in vollkommener Uebereinstimmung mit der neuen Auffassung gezeigt.

5°. Es wurde gezeigt, dass die Verzögerung bei der Labung verdünnter Milch, welche man durch die Verdünnung der Kalksalze zu erklären gewohnt ist, erklärt werden kann durch vier Umstände, welche alle in der Richtung der längeren Coagulationszeit sich gelten lassen. Weiter ist darauf hingewiesen dass auf die Versuche über Verdünnung mit Molke kein groszer Werth gelegt werden darf, weil dabei der Einfluss von ganz geringen Aenderungen im Säuregrade nicht in Rechnung getragen wurde.

Die von mir gefundene Thatsache, dass Milch, welche verdünnt wurde mit gewöhnlichem Serum und mit Oxalatserum, ungleiche Gerinnungszeiten zeigt, habe ich nicht erklären können.

Die Ursache des nicht gerinnen der Milch wurde also schliesslich gesucht in Mangel an Kalk, und zwar an colloïdalem Kalke. Bei 16 Milchmustern, wovon acht schwer oder nicht gerinnend, wurde der Kalkgehalt der leicht gerinnenden Milch bedeutend höher gefunden als für die übrigen Muster.

Bei einem Thiere der hiesigen Versuchswirtschaft, das immer nicht gerinnende Milch lieferte, wurde durch eine Gabe von 50 Gram phosphorsaurem Kalke (Biphosphat) pro Tag, nach drei Tagen eine fast normal gerinnende Milch erhalten.
