

MEDEDELINGEN VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN,
NEDERLAND 61 (10) 1-79 (1961)

DE INVLOED VAN KOPER, IJZER EN MANGAAN
BIJ HET ONTSTAAN VAN KOELHUISGEBREKEN
VAN BOTER¹

(with a summary in English)

door/by

J. W. MENDER

Laboratorium voor Zuivelbereiding en Melkkunde van de
Landbouwhogeschool te Wageningen, Nederland

(Ontvangen/Received 18.7.1961)

INHOUD

	blz.
1. INLEIDING	2
2. DE TOEGEPASTE ANALYSEMETHODEN	7
2.1. Het bepalen van het gehalte aan koper	7
2.2. Het bepalen van het gehalte aan ijzer	9
2.3. Het bepalen van het gehalte aan mangaan	10
3. HET GEHALTE VAN MELK AAN KOPER, IJZER EN MANGAAN	11
3.1. Inleiding	11
3.2. Het gehalte van melk aan koper	11
3.2.1. Literatuuroverzicht	11
3.2.2. Laatste onderzoeken op dit gebied	13
3.2.3. Discussie	17
3.3. Het gehalte van melk aan ijzer	19
3.3.1. Literatuuroverzicht	19
3.3.2. Eigen onderzoek	19
3.3.3. Discussie	21
3.4. Het gehalte van melk aan andere metalen	21
3.4.1. Literatuuroverzicht	21
3.4.2. Discussie	23
3.5. Slotbeschouwing	24
4. DE INVLOED VAN KOPER, IJZER EN MANGAAN BIJ HET ONTSTAAN VAN KOELHUISGEBREKEN VAN BOTER	26
4.1. Inleiding	26
4.2. Eigen onderzoek over de invloed van koper, ijzer en mangaan	28
4.2.1. De toegepaste werkwijze	28
4.2.2. Overzicht van de resultaten	29
4.3. Van nature aanwezig koper en toegevoegd koper	33

¹) Dit onderzoek werd verricht onder leiding van Prof. Dr. H. MULDER. Het onderzoek werd gesteund door een subsidie uit het MARSHALLfonds.

20418808

5. DE WIJZE, WAAROP KOPER EN IJZER IN MELK VOORKOMEN	38
5.1. Inleiding	38
5.2. Het koper in de melk	39
5.2.1. Het gehalte van botervet aan koper	41
5.2.2. Het koper in de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes	44
5.2.3. Het koper in het melkplasma	49
5.3. Het ijzer in de melk	54
5.3.1. Het ijzer in de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes	55
5.4. Slotbeschouwing	57
6. NADERE BESCHOUWINGEN EN PROEFNEMINGEN OVER DE INVLOED VAN KOPER BIJ HET ONT- STAAN VAN KOELHUISGEBREKEN	62
6.1. Het toevoegen van koper-eiwitverbindingen aan boter	62
6.2. Beschouwingen over koperverbindingen, in het bijzonder koper-eiwitverbindingen	63
6.3. De katalytische werking van koper-eiwitverbindingen	67
6.4. Activering van het van nature aanwezige koper	69
6.5. Slotbeschouwing	71
7. OXYDATIEGEBREKEN BIJ BOTER BEREID UIT BIEST	72
SAMENVATTING	74
SUMMARY	76
LITERATUUR	78

1. INLEIDING

Zolang boter wordt gemaakt en bewaard heeft de duurzaamheid van dit zo hoog gewaardeerde voedingsmiddel de aandacht gehad van praktijk en onderzoek. Vroeger was de duurzaamheid natuurlijk sterk afhankelijk van het optreden van bacterieel bederf. Later, toen de pasteur zijn intrede deed, hygiënischer werd gewerkt en bij lagere temperatuur kon worden bewaard, kwamen andere gebreken naar voren; vaak onder verschillende benamingen, maar samengevat als koelhuisgebreken.

Voor smaakgebreken aan botervet werd vroeger de typering ranzig algemeen gebruikt. Geleidelijk is men ertoe overgegaan deze benaming speciaal te gebruiken voor het smaakgebrek, dat het gevolg is van hydrolytische vetplitsing, welke o.a. wordt veroorzaakt door enzymen of door bepaalde vetplitsende micro-organismen, terwijl voor de oxydatiegebreken de typering „talkig” meer en meer gebruikt werd. Later werd het oxydatiegebrek nader gekarakteriseerd al naar de mate, waarin het gebrek optreedt door de smaakbenamingen: vettig, spekkig, olieachtig, tranig.

Reeds voor de eeuwwisseling verscheen een aantal publicaties over dit gebrek. Meestal werd toen de „oliceachtige” of „vissige” smaak toegeschreven aan oorzaken van bacteriologische aard, ook wel aan de voeding van oliehoudende koeken of vismeel aan het vee. Naar uit latere onderzoeken is gebleken, hebben we hier doorgaans te doen met een chemisch proces, hoogstwaarschijnlijk een oxydatieproces.

In 1905 constateerden GOLDING & FEILMAN (27), dat melk, die over een vertind koperen koeler werd geleid, waarvan een gedeelte van de vertinning was versleten na verloop van tijd een talkige smaak kreeg. De eerste, die wees

op de mogelijkheid, dat we hier te doen hebben met een oxydatiegebrek was ROGERS (66). ROGERS c.s. (67) (68) vonden, dat het gebrek niet voorkwam bij boter uit niet gezuurde room bereid en voorts, dat ijzer- en koperzouten in belangrijke mate het ontstaan van het gebrek bevorderden. HUNZIKER & HOSMAN (36) constateerden, dat contact met koperdraad en in mindere mate contact met ijzer in de vorm van roestige spijkers een talkige smaak aan de boter veroorzaakte.

SOMMER & SMIT (73) publiceerden in 1923 een vrij uitvoerig onderzoek over wat zij noemden de vissige smaak in boter.

Ter voorkoming van het gebrek propageerden zij het volgende:

1. Avoid making butter from high acid cream.
Use sweet cream or reduce the acidity of the cream by neutralizing;
2. Avoid excessive salting;
3. Avoid overworking;
4. Do not allow the cream, especially sour cream, to come into contact with poorly tinned iron or copper utensils;
5. Pasteurize the cream preferably at 145 °F for 30 minutes.

Deze opsomming geeft duidelijk aan, wat reeds toen als de belangrijkste oorzaken voor het ontstaan van koelhuisgebreken werden beschouwd:

het zuren van de room;

het zout in de boter;

de zuurstof;

ijzer en koper;

terwijl het pasteuriseren van de room, een behandeling, waarbij reducerende stoffen worden gevormd de duurzaamheid van de boter gunstig bleek te beïnvloeden. Bovengenoemde factoren worden nog steeds als belangrijke factoren bij het ontstaan van koelhuisgebreken beschouwd.

Het aantal factoren, dat bij het optreden van koelhuisgebreken bij boter een rol speelt is groot en men heeft ze – althans in de praktijk – niet altijd geheel in de hand. Daarom is een statistische verwerking van praktijkresultaten vaak misleidend. Als voorbeeld kan genoemd worden, dat men statistisch een correlatie kan vinden tussen het voorkomen van resp. koper, ijzer en mangaan en het optreden van koelhuisgebreken (46); hieruit mag dan niet de conclusie getrokken worden, dat ook ijzer en/of mangaan het optreden van koelhuisgebreken bevorderen. Door velen (o.a. POSTHUMUS (62)) werd erop gewezen, dat hier mogelijk een „bedrijfsfactor” in het spel zou kunnen zijn en dat in fabrieken, waar slecht bedrijfswater wordt gebruikt dikwijls ook wel iets aan de vertinning van koperen apparaten zal mankeren.

Door MULDER (59) werd erop gewezen, dat ofschoon tal van praktijkwaarnemingen er duidelijk op wijzen, het tot die tijd nooit onomstotelijk was bewezen, dat de genoemde metalen inderdaad een schadelijke invloed op de duurzaamheid van boter kunnen hebben. Proeven als die van HUNZIKER c.s. (36) waarbij boter in contact werd gebracht met roestige spijkers kunnen moeilijk overtuigend worden genoemd. Slechts door het uitvoeren van proeven op kleine schaal, waar men, veel beter dan bij praktijkproeven, in staat is de verschillende factoren in de hand te houden en men bovendien de mogelijkheid heeft de factoren, die men wenst te analyseren naar believen te variëren, zal men op fundamentele wijze kunnen aantonen of een metaal al of niet schadelijk is en in welke mate. In dit licht moeten wij de proeven zien uitgevoerd door

MULDER c.s. (59). Om de invloed van de metalen bij het ontstaan van koelhuisgebreken op ondubbelzinnige wijze vast te stellen zal het nodig zijn, dat men deze metalen afzonderlijk toevoegt, liefst aan de room waaruit de boter bereid wordt; daarna moet steeds uit dezelfde grondstof een blanco boter bereid worden, waarbij uitdrukkelijk dient gesteld te worden, dat deze blanco boter zodanig bereid moet zijn, dat geen verontreiniging met een of ander metaal kan hebben plaats gehad. De proeven van MULDER c.s. werden op deze wijze uitgevoerd; zo kwam duidelijk vast te staan, dat indien koper als koperzout werd toegevoegd de duurzaamheid van de boter sterk verminderde. Toegevoegde mangaan- en ijzerzouten bleken geen invloed op de duurzaamheid te hebben. Wel veroorzaakten deze zouten reeds aan de verse boter een smaakafwijking, die karakteristiek is voor de betrokken zoutoplossing: ijzer gaf een „metaalsmaak”, mangaan een zoetige smaak.

Het is wel zeer verwonderlijk, dat het zo lang heeft moeten duren, voordat de zuivelindustrie in belangrijke mate aandacht is gaan besteden aan deze feiten en dat het zelfs thans vaak nodig blijkt op een aantal principiële punten de nadruk te leggen. Uit het in de aanvang vermelde literatuuroverzicht blijkt, dat al tientallen jaren geleden waarschijnlijk werd gemaakt, dat bepaalde metalen de smaak van boter ongunstig kunnen beïnvloeden en er was dus alle reden om deze metalen als schadelijk te beschouwen en alles op alles te zetten ze uit de zuivelbedrijven te weren. Het is daarom opmerkelijk, dat – ook nadat een meer nauwkeurig en zuiverder onderzoek de genoemde waarnemingen in de meest essentiële onderdelen had bevestigd (59) – nog steeds proeven werden genomen, waarbij werd nagegaan of toegevoegd koper inderdaad schadelijk voor de duurzaamheid is. Dergelijke statistische waarnemingen moesten toch volkomen overbodig zijn; men bewijst de praktijk hiermede bepaald geen dienst; men kan er slechts nogmaals mee bevestigen wat reeds door de praktische boterbereiding en door het wetenschappelijk onderzoek jaren geleden geconstateerd werd.

Het was niet de bedoeling bij dit onderzoek uitvoerig in te gaan op het chemisme van de oxydatiegebreken; daarom volstaan we hier met enkele opmerkingen van algemene aard.

Voor het tot stand komen van oxydatiegebreken is behalve de chemische eigenschappen – vooral van vet en vetachtige bestanddelen – ook de fysische structuur van het produkt van belang. Algemeen wordt aangenomen, dat de phosphatiden bij het ontstaan van oxydatiegebreken een belangrijke rol spelen. Bij melk, waarin vrijwel alle vetbolletjes omgeven zijn door oppervlaktelaagjes rijk aan phosphatiden is dit van groot belang. Door melk te homogeniseren wordt een belangrijke structuurverandering bereikt; in de eerste plaats worden de vetbolletjes verkleind, waardoor een aanmerkelijk groter totaal vetoppervlak wordt verkregen. Door deze toeneming zal een groot gedeelte van het vetbolletjesoppervlak zich van een nieuwe oppervlaktelaag moeten voorzien, terwijl een gedeelte van de oorspronkelijke oppervlaktelaagjes in het plasma zal zijn terecht gekomen. Het is niet uitgesloten, dat een dergelijke structuurverandering de gevoeligheid van de melk voor oxydatiegebreken verandert. Ook de samenstelling van het plasma is van belang. Zo speelt de aanwezigheid van natuurlijke pro- of antioxydanten waarschijnlijk een rol. Ook de wijze van bewerking is een factor van belang. Genoemd werd reeds het homogeniseren, een andere belangrijke bewerking is het pasteuriseren.

Ook karnemelk heeft zijn eigen oxydatiegebrek (61). De voor karnemelk

zo typische karnemelksmaak, die men b.v. niet kent bij aangezuurde melk met eenzelfde vetgehalte is nl. ook een oxydatiegebrek. Het is zeer waarschijnlijk, dat het hier niet de combinatie vetbolletjes + oppervlaktelaagjes, maar de aanwezigheid van vrije fosfatiden is, die het oxydatieverschijnsel doet ontstaan. Een belangrijke voorwaarde voor het tot stand komen van dit gebrek bij karnemelk is de lage pH van het zure product.

Ook bij het ontstaan van oxydatiegebreken bij boter is naar men veronderstelt de oxydatie van fosfatiden van grote betekenis; een lage pH is hier eveneens van betekenis: koelhuisgebreken komen namelijk wel voor bij boter bereid uit gezuurde room, niet bij boter bereid uit zoete room.

Wij wijzen er echter op, dat „karnemelksmaak” altijd voorkomt bij karnemelk bereid uit gezuurde room; boterplasma, ook van boter die geen koelhuisgebrek vertoont, ja zelfs van enkele dagen oude boter, zal altijd de smaak vertonen, die wij bij karnemelk hebben leren kennen als „karnemelksmaak”. Deze smaak wordt bij boter echter in zodanige mate overheerst door andere smaakcomponenten, dat ze niet als oxydatiegebrek wordt geconstateerd.

Het feit, dat in het plasma van de boter dit oxydatiegebrek voorkomt, behoeft dus niet noodzakelijk te betekenen, dat de boter het koelhuisgebrek zal krijgen.

De smaak, die met het koelhuisgebrek samenhangt is gelocaliseerd in het vet (80). Voor het tot stand komen van het koelhuisgebrek zal waarschijnlijk de structuur van de boter van groot belang zijn. Deze is vrij gecompliceerd. Hoewel de vetphase bij boter quantitatief een belangrijke plaats inneemt kan toch niet gesproken worden van een ongecompliceerde continue vetphase. In boter komen zeer veel vetbolletjes voor omgeven door oppervlaktelaagjes. Ook in deze oppervlaktelaagjes komen nog fosfatiden voor, deze fosfatiden zullen op een andere wijze voorkomen dan de fosfatiden, die in het boterplasma of in de karnemelk aanwezig zijn.

Uit inleidende proeven gedaan door MULDER, KLEIKAMP & KING (57) bleek, dat het gebrek metalig-vettig bij boter niet wordt veroorzaakt door de smaak van abnormaal grote hoeveelheden metaalzout. Het koelhuisgebrek komt eerst na zekere tijd naar voren. Door toevoeging van antioxydanten is het gebrek te bestrijden. Wanneer het gebrek optreedt, kan men meestal constateren, dat het peroxydgetal van het vet verhoogd is. De hier besproken oxydatiegebreken komen niet voor bij ondermelk, wel bij room. Dit alles wijst erop, dat we hier te doen hebben met oxydatie van vet en/of van vetachtige stoffen. Van belang is ook de zuurheidsgraad van de room. Het gebrek treedt namelijk op bij boter uit gezuurde room. Het feit, dat verschillende factoren, die in het plasma gelocaliseerd zijn (pH van het boterplasma, koperzouten, zoutgehalte van de boter, bepaalde antioxydanten) invloed hebben op de uiteindelijke smaak van het botervet ten aanzien van oxydatiegebreken, doet vermoeden, dat de stoffen, die zich in het plasma bevinden een belangrijke rol spelen bij het tot stand komen van het gebrek. Door botervet te emulgeren in ondermelk en vervolgens uit de zo verkregen room weer boter te bereiden konden MULDER & KLEIKAMP (56) nimmer een boter krijgen met tranige smaak. Dit gelukte wel, wanneer botervet in karnemelk geëmulgeerd werd. Dit is een aanwijzing, dat ook stoffen van de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes van belang zijn bij het ontstaan van koelhuisgebreken.

Het chemisme, dat leidt tot het ontstaan van koelhuisgebreken bij boter is nog lang niet geheel bekend.

Algemeen gesproken kan over de gang van zaken bij het ontstaan van koelhuisgebreken het volgende gezegd worden: het gebrek is gelocaliseerd in de vetphase, bij het tot stand komen van het gebrek blijken echter zowel het plasma als de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes – met name de fosfatiden – van belang te zijn.

Naast de meest ingeburgerde smaakbenamingen: vettig, spekkig, olieachtig, tranig, waarbij de laatste benaming het koelhuisgebrek in zijn ergste vorm weergeeft, wordt wel eens de typering vissig gebruikt voor boters, die in sterke mate koelhuisgebrek bezitten. Hoewel wij bij onze proeven veel boter hebben beoordeeld met een ernstige mate van koelhuisgebrek, gebeurde het echter zelden, dat wij de typering vissig gebruikten. Wij vermoeden, dat de benaming vissig vaak toegepast is voor boters met een tranige smaak en bovendien nog een andere smaakafwijking.

De factoren, die invloed hebben bij het ontstaan van koelhuisgebreken kunnen we onderscheiden in:

- 1e factoren, waarop we geen of weinig directe invloed kunnen uitoefenen. Dit zijn over het algemeen factoren, die samenhangen met de samenstelling van de grondstof.
- 2e factoren, die wel te beïnvloeden zijn. Deze hangen ten nauwste samen met de bereidingswijze.

Tot de eerste groep van factoren zouden we kunnen rekenen: de samenstelling van het vet, mogelijk de samenstelling van de fosfatiden en voorts de aanwezigheid van natuurlijke antioxydanten en pro-oxydanten, hetzij in de vetphase hetzij in het plasma. De vetsamenstelling hangt ten nauwste samen met de voeding van het dier. Hetzelfde geldt voor de hoeveelheid natuurlijke anti-oxydanten. Ook een eventuele variatie in de samenstelling van de gemakkelijk oxydeerbare fosfatiden zou weleens van belang kunnen zijn. Hierover is nog weinig bekend.

Van de tweede groep van factoren zouden we willen noemen: de invloed van de pH van het boterserum; de temperatuur, waarbij de room wordt gepasteuriseerd; verontreiniging met oxydatie katalyserende stoffen b.v. sporen koper. Uiteraard is hier ook de zuurstof een belangrijke factor.

De invloed van metalen bij het ontstaan van oxydatiegebreken in het algemeen en bij het ontstaan van koelhuisgebreken bij boter in het bijzonder is al een aantal jaren in onderzoek. Vooral is hierbij aandacht besteed aan koper, ijzer en mangaan. Dat aan deze metalen een dergelijke invloed werd toegedacht zal zijn veroorzaakt door het feit, dat zij in bepaalde gevallen katalyserend kunnen werken bij oxydatiereacties (b.v. het drogen van oliën) en ook doordat de mogelijkheid van vóórkomen in zuivelproducten zeker niet denkbeeldig is: ijzer en mangaan komen vaak in bedrijfswater van zuivelfabrieken voor. Vaak werd langs statistische weg aangetoond, dat er een zekere correlatie bestaat tussen het gehalte van één van deze metalen en het vóórkomen van oxydatiegebreken bij melk- en zuivelproducten, zonder dat van een oorzake-lijk verband kon worden gesproken. Wij wezen reeds op het misleidende element, dat in dergelijke proefnemingen kan schuilen.

Het doel van het hier beschreven onderzoek is om de invloed van deze metalen nader te bestuderen. Het is hierbij van groot belang te weten hoe hoog

van nature het gehalte van de melk aan deze metalen is en hoe deze metalen in de melk voorkomen. Hieruit kunnen we dan met enige benadering concluderen hoe hoog het metaalgehalte van de boter kan zijn. Daar koper, ijzer en mangaan vaak tegelijkertijd voorkomen meenden wij goed te doen de invloed van deze metalen niet alleen afzonderlijk te bestuderen, maar ook de mogelijke combinaties van deze metalen. Om de invloed van deze metalen aan de boter te bestuderen is het nodig zoveel mogelijk alle andere invloeden uit te schakelen. De proefomstandigheden dienen dus zoveel mogelijk gelijk genomen te worden. Vooral dient de mogelijkheid van toevallige infectie met genoemde metalen uitgesloten te worden. Dit is te verwezenlijken door bij de proeven gebruik te maken van „kopervrij” gemaakt glaswerk. Bij een laboratoriumproef is men beter in staat de verschillende uitwendige invloeden in de hand te houden dan bij een praktijkproef. Eén factor is echter in geen van beide gevallen in de hand te houden, namelijk de samenstelling van de grondstof. We dienen dit bij de beoordeling van de resultaten steeds te bedenken. Het moet hierbij van belang geacht worden, dat de boters over het gehele jaar bereid werden.

Bij de betreffende hoofdstukken zullen wij nader ingaan op de wijze van uitvoering der proeven.

2. DE TOEGEPASTE ANALYSEMETHODEN

2.1. HET BEPALEN VAN HET GEHALTE AAN KOPER

Kleine hoeveelheden koper kunnen zeer geschikt bepaald worden volgens een colorimetrische methode, waarbij natrium-diaethyldithio-carbinaat of dithizon als reagens gebruikt worden; wij gaven aan dithizon de voorkeur. Alvorens de eigenlijke bepaling te kunnen toepassen is eerst een destructie van de organische stof nodig. Dit kan via de droge of via de natte verassing. Droge verassing met gebruik van dithizon als reagens werd toegepast door KOPPEJAN & VAN DER BURG (44) en VAN DER WAARDEN (80). Deze methode is vooral aan te bevelen, wanneer vetrijke producten onderzocht moeten worden. Daar wij behalve boter ook veel melk en vetarme producten te onderzoeken hadden werd door ons aan de natte verassing de voorkeur gegeven. Alleen voor het onderzoek van botervet op metaalgehalte werd droge verassing toegepast.

De bepaling van het gehalte van melk aan koper werd als volgt uitgevoerd: Benodigd glaswerk: kookkolven van 250 ml, bekersglasjes van 50 ml, glazen spuitfles voor salpeterzuur, druppelpipet voor waterstofperoxyd, enkele maatcilinders, maatkolfjes van 25 ml, 6 scheitrechters van 100 ml, glasparels. Chemicaliën: geconcentreerd zwavelzuur p.a.; salpeterzuur 60% chemisch zuiver; ammonia $\pm 25\%$; waterstofperoxyd 30% p.a.; tetrachloorkoolstof p.a., dithizon.

Het goed gereinigde glaswerk werd gedurende minstens een week in verdund salpeterzuur ($\pm 5\%$) bewaard en voor het gebruik met dubbel gedestilleerd water uitgespoeld. Salpeterzuur, ammonia en tetrachloorkoolstof werden voor het gebruik overgedestilleerd in glazen apparatuur, die kopervrij gemaakt was.

Dithizon werd als volgt gezuiverd van oxydatieproducten: Een oplossing

van 20 mg dithizon in 100 ml tetra werd met 75 ml verdund ammonia (1 : 200) geëxtraheerd door schudden; dithizon ging hierbij over in verdunde ammonia, de oxydatieproducten bleven in de tetraphase achter. Na verwijderen van de tetraphase werd de ammonia-oplossing onder schudden aangezuurd met 30 ml 1% zwavelzuur, tevens werd 100 ml tetra toegevoegd. Dithizon ging daarbij over in de tetraphase. De tetraphase werd nog enkele malen gewassen met dubbel gedestilleerd water. De oplossing van dithizon in tetra werd in een bruine fles bewaard.

Destructie: $\pm$ 50 gram melk werd tot op 0,5 gram nauwkeurig gewogen in een kookkolf. Hieraan werd toegevoegd $7\frac{1}{2}$ ml zwavelzuur en enige glasparels. Na beginnende verkoling werd druppelsgewijs salpeterzuur toegevoegd. De destructie met salpeterzuur werd zolang voortgezet tot de oplossing kleurloos of lichtgeel gekleurd was. Daarna werd nog $\pm$ een half uur gekookt en werden de kolfjes vervolgens afgekoeld. Daarna werden enige druppels waterstofperoxyd 30% toegevoegd en verwarmd tot dat het opbruisen beëindigd was. Dit werd herhaald totdat de vloeistof volkomen kleurloos was geworden. Tot slot werd de vloeistof nog gedurende ongeveer een half uur gekookt om alle waterstofperoxyd te verwijderen.

De bepaling met dithizon geschiedde nu als volgt: Aan de kolfjes werd na afkoeling 10 ml dubbel gedestilleerd water toegevoegd. Vervolgens werd met ammonia geneutraliseerd tot kleuromslag van congoroodpapier. Daarna werd zoveel zwavelzuur aan de geneutraliseerde vloeistof toegevoegd tot het congoroodpapier juist weer blauwviolet gekleurd was. De vloeistof werd nu quantitatief overgebracht in een scheitrechter en hierin viermaal uitgeschud, met 5 ml dithizonoplossing en tenslotte met 5 ml tetrachloorkoolstof. De verzamelde extracten werden vervolgens in de vier volgende scheitrecters uitgeschud met verdunde ammonia (1 : 200), waardoor overmaat dithizon verwijderd werd; in de laatste scheitrechter mocht de ammonia niet meer gekleurd zijn. De violette tetra-oplossing werd met 5 ml zwavelzuur (1%) gewassen door schudden in de zesde scheitrechter. De tetra-oplossing werd nu in een maatkolfje van 25 ml opgevangen en met tetra aangevuld tot 25 ml. Van deze vloeistof werd nu de kleurintensiteit bepaald in een Stufenphotometer bij filter S 53. Aan de hand van een ijkcurve werd vervolgens het kopergehalte afgeleid. Elke serie bepalingen werd vergezeld door minstens één blanco bepaling, waarbij dezelfde gedragslijn werd gevolgd als bij de werkelijke bepaling en ongeveer dezelfde hoeveelheden chemicaliën werden gebruikt.

Ook de bepaling van het gehalte van boter aan koper geschiedde volgens de natte verassing. Meestal werd een hoeveelheid boter van $\pm$ 75 gram afgewogen in een centrifugebuis. Het botervet werd door verwarming gesmolten en door centrifugeren van het boterplasma gescheiden. Het botervet werd nu grotendeels afgegoten. De overgebleven laag botervet kon na stollen gemakkelijk van het plasma verwijderd worden. Het aan de onderkant van deze vetlaag bevindende plasma werd met dubbel gedestilleerd water bij het overige plasma gespoeld. In het plasma werd nu – als bij melk beschreven – het kopergehalte bepaald.

Ter illustratie van de reproduceerbaarheid van de bij toepassing van deze methode verkregen cijfers dienen de in tabel 1 vermelde cijfers, welke naar willekeur zijn gekozen uit een groot aantal bepalingen; zowel lage als hoge gehalten zijn hierbij betrokken.

TABEL 1. Resultaten van duplobepalingen bij melk en boter. (Kopergehalte in gamma's per kg)

Melk	Boter
21-22	25-27
26-28	27-31
37-36	38-39
47-52	45-45
74-79	74-76
92-96	98-101
114-120	121-113
185-185	182-192
747-740	195-201
1115-1138	234-242

Toevoegen van een bekende hoeveelheid koper aan melk gaf de in tabel 2 vermelde resultaten.

TABEL 2. Bepaling van het kopergehalte van melk na toevoeging van een bekende hoeveelheid koper. (Kopergehalte in gamma's per kg)

Kopergehalte van de melk	Toegevoegd	Kopergehalte na toevoeging	
		berekend	bepaald
26	25	51	53
26	50	76	81
26	91	117	114
26	199	225	217
26	401	427	416
34	50	84	86
34	500	534	533

Tevens zij hier verwezen naar de in hoofdstuk 5 beschreven oproomproeven, waarbij de gehalten aan koper werden bepaald van volle melk en van de door oproming verkregen room en ondermelk. De gevonden waarden voor room + ondermelk bleken goed te kloppen met die van volle melk, dit is wel het beste bewijs voor de betrouwbaarheid van de gevolgde werkwijze.

2.2. HET BEPALEN VAN HET GEHALTE AAN IJZER

Hierbij werd gebruik gemaakt van de door VAN DER WAARDEN (80) beschreven methode, waarbij o-phenanthroline als reagens gebruikt werd. Ook hier werd echter – in tegenstelling met de door VAN DER WAARDEN gevolgde werkwijze – de natte destructie toegepast. De voorbehandeling van de melk was geheel als onder 2.1 beschreven, echter werd bij de destructie zo mogelijk wat minder zwavelzuur gebruikt nl. 5 ml. Na de destructie werd zover mogelijk ingedampt. Na toevoeging van een weinig water werd 2 ml van een 10-procentige hydroxylamine-zoutzuuroplossing toegevoegd om reductie van alle ijzer in de tweewaardige vorm te bewerkstelligen; vervolgens werd – na afkoeling – $\frac{1}{2}$ ml van een $1\frac{1}{2}\%$ o-phenanthroline-oplossing toegevoegd; daarna werd zoveel geconcentreerd ammonia toegevoegd tot de oplossing ten aanzien van congoroodpapier zwak alkalisch was geworden. De nu rood gekleurde vloeistof werd door centrifugeren van zoutkristallen bevrijd; de bovenstaande

vloeistof in een maatkolfje van 50 of 100 ml overgegoten, het neerslag nog enkele malen met dubbel gedestilleerd water uitgewassen en uitgecentrifugeerd, waarna bovenstaande vloeistof steeds weer bij de vloeistof in het maatkolfje werd gevoegd. Met dubbel gedestilleerd water werd vervolgens aangevuld tot 50 of 100 ml, waarna de extinctie bepaald werd in de fotometer bij filter S 50. Aan de hand van een ijkcurve werd het ijzergehalte afgeleid.

De bepaling van ijzer in boter geschiedde naar analogie van wat onder 2.1 voor de koperbepaling in boter is beschreven.

Ter illustratie van de reproduceerbaarheid geven wij de volgende cijfers, willekeurig gekozen uit een groot aantal bepalingen (tabel 3).

TABEL 3. Resultaten van duplobepalingen bij melk en boter. (Ijzergehalte in gamma's per kg)

Melk	Boter
123-119	59-62
139-142	119-116
164-175	167-165
222-214	153-131
280-277	157-136
381-394	425-397
533-549	491-487

Het toevoegen van een bekende hoeveelheid ijzer aan de melk gaf de in tabel 4 vermelde resultaten.

TABEL 4. Bepaling van het ijzergehalte van melk, na toevoeging van een bekende hoeveelheid ijzer. (Ijzergehalte in gamma's per kg)

Ijzergehalte van de melk	Toegevoegd	Ijzergehalte na toevoeging	
		berekend	bepaald
203	161	364	374
225	96	321	310
225	246	471	472
270	109	379	387
270	167	437	447
270	224	494	481
542	233	775	754

Ter verdere illustratie van de betrouwbaarheid wijzen we hier op de in de opzooimproeven van hoofdstuk 5 opgenomen balansen voor ijzer.

2.3. HET BEPALEN VAN HET GEHALTE AAN MANGAAN

De bepaling van het gehalte aan mangaan van boter werd uitgevoerd na de bepaling van het gehalte aan koper. De vloeistof – overgebleven na de koperbepaling – werd overgebracht in een kwartsschaaltje, vervolgens ingedampt tot droog. Dan werd het schaalje in een oven op $\pm 500^{\circ}\text{C}$ geplaatst, totdat de inhoud van het schaalje geen dampen meer afgaf. Na afkoelen werd de as opgelost in verdund zwavelzuur en vervolgens werd de vloeistof overgegoten in een buis van ± 7 mm doorsnede. Aan de vloeistof werd nu ± 50 mg perjodaat toegevoegd. Dan werd de buis gedurende 25 minuten in een bad kokend

water gehouden. De kleurintensiteit van deze vloeistof werd nu vergeleken met die van de standaardreeks, bestaande uit een serie verdunde permanganaat-oplossingen, die zich in buizen bevonden van hetzelfde formaat. Bij toepassing van deze methode bleek ons, dat de kleur na de reactie bij boter, waaraan geen mangaan was toegevoegd zo gering was, dat een betrouwbare bepaling van deze kleine hoeveelheid mangaan eigenlijk niet mogelijk was. Wij hebben dan ook afgezien van het op grote schaal bepalen van mangaan in boter.

3. HET GEHALTE VAN MELK AAN KOPER, IJZER EN MANGAAN

3.1. INLEIDING

Zowel in plantaardige als in dierlijke weefsels komen allerlei metalen steeds voor. Van verschillende metalen is gebleken, dat zij een belangrijke functie vervullen bij de physiologische processen van mens, dier en plant. Een tekort aan deze metalen gaat dikwijls met ziekteverschijnselen gepaard.

Algemeen kunnen we stellen, dat melk van de meeste metalen, die in voedingsmiddelen en in dierlijke weefsels voorkomen een kleine hoeveelheid bevat. Zo vermeldde DREA in 1938 (22), dat melk steeds de volgende metalen bevat: aluminium, barium, koper, ijzer, lood, zilver, strontium, titanium en vanadium. Later werden nog aangetoond o.a. zink, mangaan, cobalt, molybdeen. Melk bevat dus een grote verscheidenheid aan metalen; van vele van deze elementen staat de betekenis nog niet vast. Vergelijken we melk met andere voedingsmiddelen dan blijkt het metaalgehalte wel erg laag te zijn. Meestal ligt het metaalgehalte van andere voedingsmiddelen 10 tot 1000 maal hoger. Behalve het gehalte van de voedingsmiddelen is echter van belang de hoeveelheid, die dagelijks hiervan wordt opgenomen. Zo bezien is melk een voedingsmiddel, waarmee een belangrijke hoeveelheid van allerlei metalen wordt opgenomen.

In verband met ons onderzoek over de invloed van enkele metalen op het ontstaan van koelhuisgebreken achtten wij het van fundamenteel belang eerst meer te weten over de van nature in melk aanwezige hoeveelheid van deze metalen. De gehalten in boter hangen uiteraard ten nauwste samen met de gehalten in melk.

Het Zuivel Kwaliteitscontrôle Bureau (38) vermeldt, dat het kopergehalte van boter over het gehele jaar niet constant is. Het is a priori niet te zeggen of deze variatie veroorzaakt wordt doordat het van nature in melk of boter aanwezige koper varieert of doordat in het ene jaargetijde meer besmetting met koper plaatsvindt dan in het andere jaargetijde. Voor het vaststellen van een maximumgrens aan het metaalgehalte van boter is het van belang te weten, welke hoeveelheden van nature in melk en boter kunnen voorkomen en door welke factoren dit gehalte beïnvloed wordt.

3.2. HET GEHALTE VAN MELK AAN KOPER

3.2.1. Literatuuroverzicht

Verscheidene onderzoekers hebben de laatste tientallen jaren getracht enig inzicht te krijgen in het kopergehalte van de melk. De verkregen uitkomsten

liepen aanvankelijk sterk uiteen en waren naar onze huidige opvattingen veel te hoog. De oorzaak hiervan zal zijn geweest, dat men de melk onderzocht zonder dat men voldoende voorzorgen nam om de melk zonder besmetting met koper op de plaats van onderzoek te verkrijgen, waardoor – naar wij mogen veronderstellen – het grootste gedeelte van het kopergehalte werd ingenomen door koper, dat van buitenaf in de melk was gekomen. Een tweede oorzaak kan zijn, dat men tijdens de uitvoering van de analyse niet de nodige voorzorgen nam of infectie met koper (b.v. vanuit het gebruikte glaswerk of via de gebruikte chemicaliën) te voorkomen.

BROEK (18) gaf in een tabel een overzicht van het gehalte van melk aan koper, zoals in de loop der jaren door verschillende onderzoekers werd gevonden. In onderstaande tabel vermelden wij hieruit alleen die cijfers, die betrekking hebben op rauwe melk, aangevuld met enkele cijfers, die wij zelf in de literatuur vonden.

TABEL 5. Overzicht van door verschillende onderzoekers gevonden kopergehalten van melk

Onderzoekers	Jaar	Cu-gehalte (gamma per L melk)	Aantal mon- sters	Opmerkingen
FLEURENT & LEVI	1920	1400	1	
BERTRAND	1920	500	1	
SUPPLEE & BELLIS	1922	200–800	23	In glas opgevangen
HESS, SUPPLEE & BELLIS	1923	550	1	
RICE & MISCALL	1923	500		„Niet met Cu in aan- raking geweest”
MC HARGUE	1925	380	1	„Niet met Cu in aan- raking geweest”
KING & ETZEL	1927	430	5	
QUAM & HELLWIG	1928	260–520	14	In glas opgevangen
ELVEHJEM & LINDOW	1929	140	3	
ELVEHJEM, STEENBOCK & HART	1929	123–174	25	In glas opgevangen
GRENDDEL	1930	90–140	7	
KEIL & NELSON	1931	240	1	In glas opgevangen
GEHARDT & SOMMER	1931	320–1175	16	
ZONDEK & BANDMANN	1931	150–200	90	
DAVIES	1931	150–600	15	In vertinde emmers opgevangen
MC FARLANE	1932	92; 68; 72	3	In glas opgevangen
REMY	1932	1400	2	
ZBINDEN	1932	500–850	25	
CONN C.S.	1935	50–132	18	In glas opgevangen
BROEK	1935	15– 50		In glas opgevangen
GRIMMER (29)	1934	200–300	12	In glas opgevangen

Uit de tabel blijkt, dat de opgegeven waarden zeer uiteenlopen. Over het algemeen werd weinig of niets opgegeven ten aanzien van de voorgeschiedenis van de melk en ook niet ten aanzien van de voorzorgen tijdens de analyse. Aan deze resultaten mogen we dan ook niet de minste waarde hechten. Met uitzondering van de analyses van BROEK; hij vermeldt, dat de door hem onderzochte melk in speciaal voorbehandeld glaswerk werd opgevangen. Het glaswerk werd namelijk met chroomzuur gereinigd en vervolgens uitgestoomd. Ook het bij de analyses gebruikte glaswerk werd op dergelijke wijze voorbehandeld.

Volgens ELVEHJEM, STEENBOCK & HART (25) bevat koemelk bij normale

voeding gemiddeld $\pm 0,1$ mg koper per liter. Bij een vijfvoudige hoeveelheid koper – als kopersulfaat toegediend – werd geen verhoging geconstateerd.

LIEBSCHER (50) diende zoveel koper met het voeder toe, dat per koe in 41 dagen gemiddeld 108 gr koper werd opgenomen. Dit veroorzaakte geen verhoging in het kopergehalte van de melk.

Door THOMAS (76) werd als gemiddeld kopergehalte van schapenmelk opgegeven: 460 gamma per l. Het gehalte van schapenmelk werd niet beïnvloed, wanneer met het voeder twintig maal zoveel koper werd toegediend als normaal.

3.2.2. *Laatste onderzoeken op dit gebied*

Het antwoord op de vraag hoe het van nature in melk aanwezige koper kan variëren werd al in belangrijke mate door BROEK gegeven. BROEK bepaalde het gehalte aan koper in melk van een aantal koeien gedurende een belangrijk gedeelte van de lactatieperiode en gedurende verschillende perioden van het jaar. Het was vooral de bedoeling van dit onderzoek om de invloed van de voeding op de hoeveelheid koper in melk na te gaan. Het gehalte van melk aan koper bleek gedurende de proef zeer weinig te variëren. Als gemiddelden voor het kopergehalte van de melk van een zevental koeien vond BROEK de volgende cijfers:

I vóór de partus; gemiddelden van		5 waarnemingen : 28 gamma/l.			
II	„ „	10	„	: 30	„ „
III	„ „	16	„	: 27	„ „
IV	„ „	15	„	: 23	„ „
V	„ „	10	„	: 20	„ „
VI	„ „	16	„	: 30	„ „
VII	„ „	10	„	: 27	„ „

Individuele verschillen waren praktisch niet aanwezig. De afzonderlijke waarnemingen bleken te variëren van ± 15 tot ± 50 gamma per l. Bij bovengenoemde waarnemingen was de periode dadelijk na de partus niet betrokken. Een variatie in de voeding bleek geen invloed gehad te hebben op het gehalte van de melk aan koper. Als voedermiddelen werden toegepast: als bijvoeding in het einde van de weideperiode: tulpenbollen en lijnmeel, gedroogde bietenpulp; op stal: hooi en krachtvoerrantsoen, kuilgras en tulpenbollen als bijvoeder. Ook de overgang van weide naar stal bleek geen invloed te hebben op het kopergehalte van de melk. Wel vond BROEK dadelijk na de partus bij koe I zeer hoge kopergehaltenes:

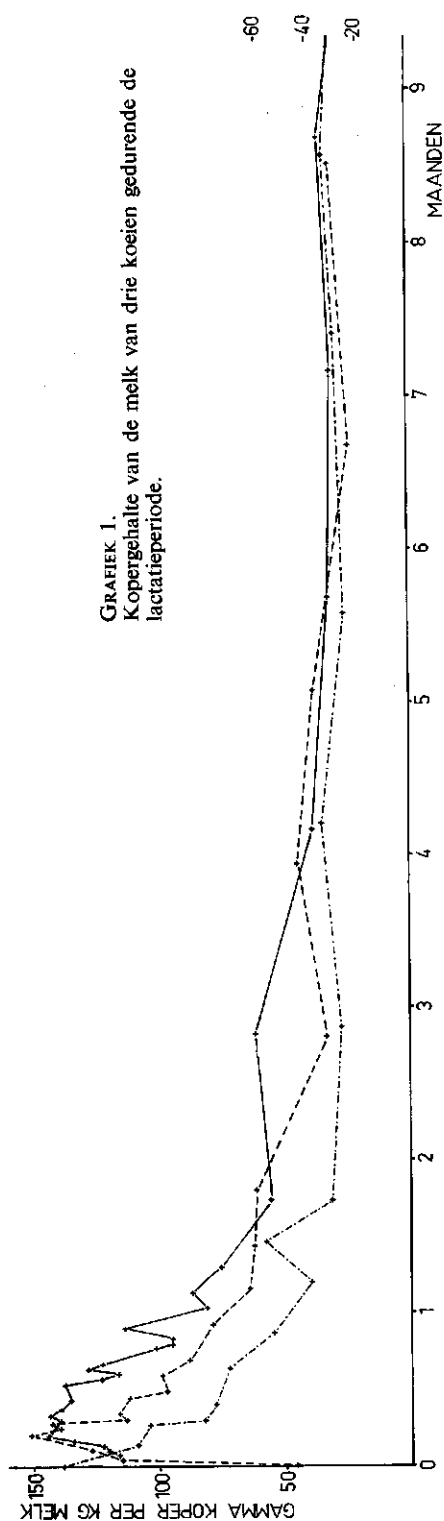
140 gamma per l (vlak na de partus)
102 gamma per l (7 dagen later).

Het hoge kopergehalte van deze melk was voor BROEK aanleiding om een aantal monsters biest op kopergehalte te onderzoeken. Hij vond:

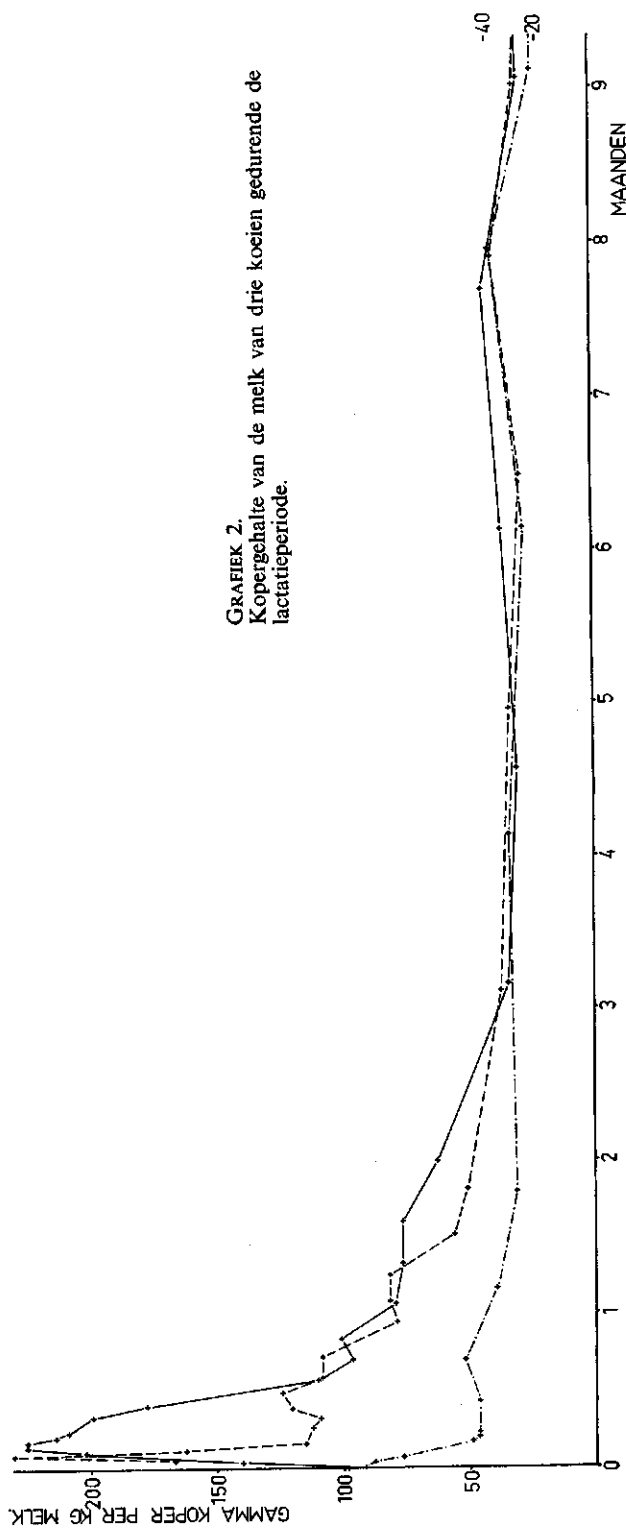
	gamma koper/l. melk
1e melk na de partus	160
2e „ „ „ „	140
3e „ „ „ „	71

BROEK vermeldde voorts nog een proef, waarbij met de voeding van een koe een abnormale hoeveelheid koper werd toegediend. Aan het diest werd nl.

GRAFIEK 1.
Kopergehalte van de melk van drie koeien gedurende de lactatieperiode.



GRAFIEK 2.
Kopergehalte van de melk van drie koeien gedurende de lactatieperiode.



dagelijks 2 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ aq}$ toegevoegd. Na 17 dagen werd deze hoeveelheid verhoogd tot 3 gram per dag. De koe kreeg hiermede ruim 5 maal zoveel koper als bij de oorspronkelijke voeding. Deze voeding bleek het kopergehalte van de melk niet te beïnvloeden.

Ook door MULDER (54) werden dergelijke proeven genomen. Een aantal dieren werd zoveel koper in de vorm van kopersulfaat toegediend, dat zij verschijnselen van kopervergiftiging begonnen te vertonen. Ook hier werd geen invloed op het kopergehalte van de melk geconstateerd.

In een recent onderzoek van KING & DUNKLEY (40) kwam naar voren, dat er geen verschil bestaat tussen weide- en stalvoeding wat betreft de invloed van deze voeding op de hoeveelheid van nature in de melk aanwezig koper. Zij vonden echter bij toediening van een grote hoeveelheid koper in de vorm van kopersulfaat (nl. 10 gram) een toename van het kopergehalte van de melk. Dit onderzoek had betrekking op vier koeien, slechts in één geval was het gehalte van de melk aan koper duidelijk toegenomen (van 40 tot 110 gamma per kg). Deze proeven zijn weinig overtuigend.

ALLCROFT & UVAROV (4), die door intramusculaire of subcutane injecties van koperglycine in staat waren het kopergehalte van lever van normale dieren op te voeren, slaagden er niet in dit voor bloed en melk te bereiken.

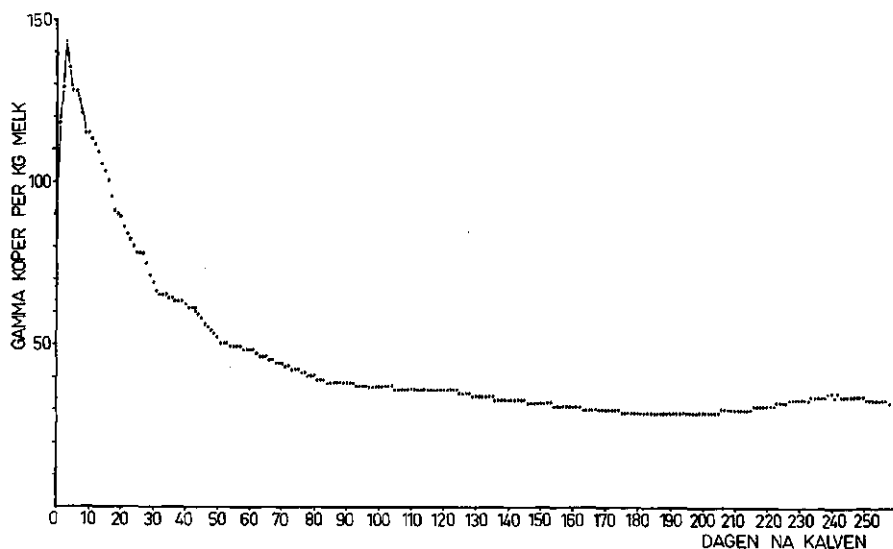
Tenslotte vermelden we nog een proef van BROEK (18), welke betrekking heeft op het koper in de melk tijdens het melken. Het gehalte van de melk aan verschillende bestanddelen kan tijdens het melken sterk variëren. BROEK heeft daarom van een aantal koeien, zowel de eerste als de laatste melk op het gehalte aan koper onderzocht. De resultaten zijn in de volgende tabel verenigd.

Kopergehalte	
eerste melk gamma/l.	laatste melk gamma/l.
27,5	29,0
45,0	43,0
35,0	36,0
22,0	21,0

De verschillen in gehalten van eerste en laatste melk liggen binnen de bepalingsfout.

Over het gehalte van melk aan koper gedurende de lactatieperiode werd reeds bericht door KOPPEJAN & MULDER (45). Zij onderzochten de melk van een zestal individuele koeien op het gehalte aan koper gedurende de gehele lactatie. Bij deze proeven werden de nodige voorzorgen genomen om besmetting met koper te voorkomen. De bij dit onderzoek verkregen resultaten worden weergegeven in de grafieken 1 en 2. Grafiek 3 geeft het rekenkundig gemiddelde van de zes lactatiekrommen weer.

Evenals BROEK vinden deze onderzoekers, dat de hoeveelheid koper, die van nature in de melk aanwezig is in de eerste dagen van de lactatieperiode aanmerkelijk groter is dan in het verdere verloop. Het blijkt, dat de variaties, niet bij alle koeien dezelfde zijn. Meestal is het gehalte aan koper van de eerste biest iets lager dan dat van de melk die enkele dagen later geproduceerd wordt. Hierna daalt het kopergehalte vrij snel. Bij sommige koeien wordt het hoogste kopergehalte zeer snel (in 2 à 3 dagen) bereikt; bij andere koeien wordt de top later bereikt soms pas na een week. Soms blijft het kopergehalte slechts één



GRAFIEK 3. Kopergehalte van melk gedurende de lactatieperiode. Rekenkundig gemiddelde van lactatiekrommen van zes koeien.

dag op een hoog niveau, soms duurt het enkele dagen tot een week voordat het gehalte aan koper weer afneemt. De snelheid, waarmee dit kopergehalte afneemt kan ook weer zeer verschillend zijn. In een enkele geval kwam het voor, dat het kopergehalte van de eerste biest het hoogste was en hierna dadelijk een daling intrad. Over het geheel genomen kan men ten aanzien van de hoeveelheid koper in melk van individuele koeien het volgende zeggen: De eerste biest heeft reeds een vrij hoog kopergehalte: 50—100 gamma per kg. De eerste dagen neemt het gehalte aan koper meestal sterk toe, soms wel tot boven 200 gamma per kg. Na verloop van soms enkele dagen, soms enkele weken daalt het kopergehalte weer. Een maand na het kalven ligt het kopergehalte meestal tussen de 40 en 80 gamma per kg; in de loop van enkele weken daalt het dan geleidelijk tot het normale niveau, waarna het gedurende de gehele verdere lactatieperiode vrij constant blijft. Tenslotte kunnen we nog de vraag stellen of het mogelijk is bij koeien, die aan kopertekort lijden, een stijging van het gehalte aan koper in de melk teweeg te brengen door toediening van koper met de voeding. Hierover verzamelden we enkele gegevens:

datum	Kopergehalte in gamma's per kg melk								
	4/10	6/10	11/10	31/10	1/11	2/11	14/11	29/11	6/12
Koe I	25,5		28,5	21	27	26	25	33	28
Koe II		22	27,5	23,5	25,5	27,5	37		25

Het betrof hier koeien, die uiterlijke verschijnselen vertoonden van koperdeficiëntie. Vanaf 31 oktober kregen deze koeien per dag 1 kg koek à 2 gram koper bijgevoerd; vóór die datum werd geen extra koper met het voeder toegediend. De ziekteverschijnselen waren al spoedig verdwenen. Het kopergehalte van de melk bleek practisch niet beïnvloed te zijn.

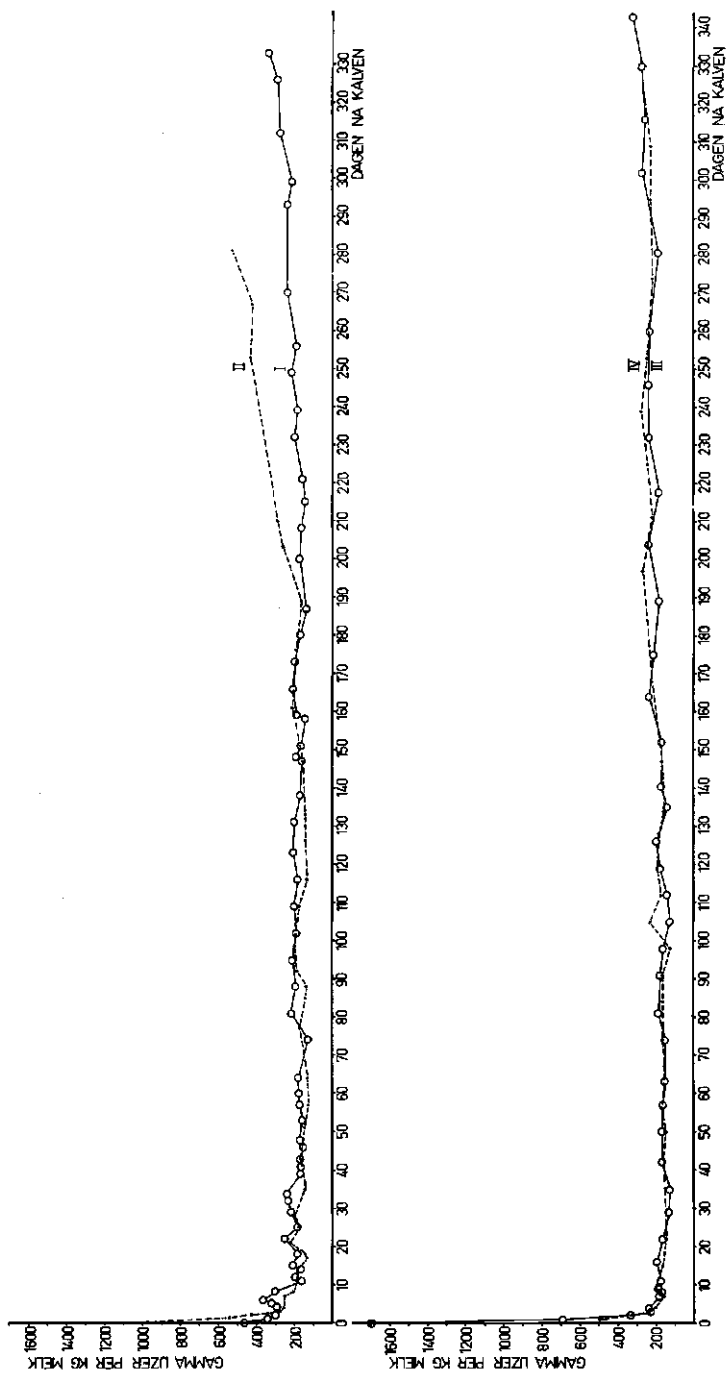
3.2.3. *Discussie*

Uit het voorgaande kunnen we concluderen, dat het kopergehalte van melk wel vrij belangrijk kan variëren gedurende de lactatieperiode, maar dat uitwendige invloeden – voor zover bekend – hierbij geen rol spelen. Het tijdstip van de lactatie schijnt dus het kopergehalte in hoofdzaak te bepalen. Er zijn geen duidelijke aanwijzingen verkregen, dat het kopergehalte van melk door voeding is te beïnvloeden. Dit geldt met name voor de overgang stal-weide. Ook zijn er aanwijzingen verkregen, dat wanneer een koe met de voeding te weinig koper toegediend krijgt, het gehalte van de melk hierdoor niet beïnvloed wordt. Deze kwestie is echter naar onze mening nog onvoldoende onderzocht.

Vooraf in verband met de variaties, die in het kopergehalte van boter kunnen optreden, werd vaak verondersteld, dat voeding voor het kopergehalte van melk van belang was. Zo constateerde KEESTRA (38), dat in de maand mei steeds een duidelijke daling van het gemiddelde kopergehalte van boter optrad, wat hij toeschreef aan de overgang stal-weide. Gedurende de gehele weideperiode bleef het kopergehalte relatief laag, met een minimum in de periode van augustus tot en met oktober. Bij het opstellen der koeien trad dan weer een vrij duidelijke stijging in het kopergehalte van de boter op. Hieruit werd geconcludeerd, dat „stalboter” van nature een hoger kopergehalte heeft dan „weideboter” en dat de voeding van het vee invloed heeft op het kopergehalte van de melk en dus ook op dat van de boter.

Het door KEESTRA geconstateerde kan echter met behulp van het voorgaande op geheel andere wijze verklaard worden. Als gevolg van de variatie in het gehalte aan koper van de melk gedurende de lactatieperiode mogen we verwachten, dat ook het natuurlijk kopergehalte van de gemengde melk geleverd aan de fabrieken in de loop van het jaar aan zekere variatie onderhevig is, omdat het kalven der koeien niet regelmatig over het jaar verspreid is. Vooral in het voorjaar zal de hoeveelheid koper, die van nature in deze melk aanwezig is iets hoger kunnen zijn dan in de rest van het jaar. Omstreeks de tijd, dat de koeien in de weide gaan zal een belangrijk percentage van deze koeien een aantal weken van tevoren gekalfd hebben. We mogen verwachten, dat de vrij plotselinge daling in het kopergehalte van de melk van de individuele koeien zijn weerslag vindt in dat van de gemengde melk. Ook in het najaar kalft een vrij groot aantal koeien. Het percentage koeien, dat in het najaar kalft is over het algemeen gering. Daar staat echter tegenover dat de koeien, die in het vroege voorjaar zullen gaan kalven, al belangrijk minder melk gaan geven. Deze twee factoren samen zouden misschien al iets verhogend kunnen werken ten aanzien van het koper in de melk. Een belangrijk bijverschijnsel in de winterperiode is dat er meer kans bestaat op grotere koperinfecties op de boerderij en in de fabriek. Doordat in deze periode kleinere hoeveelheden melk worden verwerkt zal het kunnen voorkomen, dat een bepaalde bron van koperbesmetting in een kleinere hoeveelheid van het product terecht komt, wat dus neerkomt op een hogere concentratie.

KRUISHEER & KROL (47) suggereren, dat mogelijke verschillen in het gehalte aan koper van de boter in verschillende delen van het land een gevolg zou zijn van verschil in voedingsomstandigheden. Wanneer echter, zoals bij deze onderzoekers het geval was, langs statistische weg wordt gevonden, dat een aantal boters in verschillende delen van het land verschillen in hun gehalte aan koper, dienen wij ons eerst af te vragen, of dit de van nature aanwezige hoeveelheid koper is. Op het uiteindelijke kopergehalte van de boter



GRAFIEKEN 4 EN 5. IJzergehalte van de melk van twee koeien gedurende de lactatieperiode.

hebben zoveel factoren invloed, dat het geen zin heeft om hieruit conclusies te trekken ten aanzien van het gehalte in de grondstof: melk, laat staan over de invloed van de voeding van de koe op de samenstelling van deze melk.

3.3. HET GEHALTE VAN MELK AAN IJZER

3.3.1. Literatuuroverzicht

Ook voor het gehalte van melk aan ijzer worden in de literatuur zeer uiteenlopende waarden opgegeven, zij het dat deze variatie verhoudingsgewijs geringer is als voor koper. In een literatuuroverzicht vermelden LAGONI, WORTMANN & MERTEN (48), dat de opgegeven waarden voor ijzer uiteenlopen van 100—1400 gamma per kg.

ELVEHJEM, HERRIN & HART (24) gaven voor het gehalte aan ijzer van de melk van zes verschillende koeien de volgende cijfers: 187, 367, 204, 213, 238, 288 gamma per kg. Het ijzergehalte bleek hier dus ongeveer 100% te kunnen variëren. Zij vonden geen duidelijk verschil in de hoeveelheid ijzer in de melk bij koeien, die waren gevoederd met Alfalfahooi, wat 0,0151% ijzer bevatte of timotheehooi, wat 0,0071% ijzer bevatte. Bij geitenmelk verkregen zij geen verhoging van het ijzergehalte door de dieren Fe_2O_3 of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ toe te dienen met het voeder, zelfs niet wanneer de dieren op deze wijze het vijfvoudige van de normale hoeveelheid ijzer kregen toegediend.

HENRIQUE & ROCHE (33) vonden, dat toediening van ijzerlactaat oraal of door intraveneuze inspuiting geen verhoging van het ijzergehalte van de melk veroorzaakte.

Herhaaldelijk is aangetoond, dat men door toedienen van grote hoeveelheden ijzer niet in staat is het ijzergehalte van koemelk te verhogen. Ook bij moedermelk en bij varkensmelk kon dit niet worden aangetoond (78).

GRIMMER (29) gaf op voor het gehalte aan ijzer van koe- en geitenmelk: 500—600 gamma per l.

Volgens SCHÄFER, BREYER & KARTE (71) bevat koemelk gemiddeld ± 67 gamma %, schapenmelk ± 64 gamma % en geitenmelk ± 25 gamma % aan ijzer.

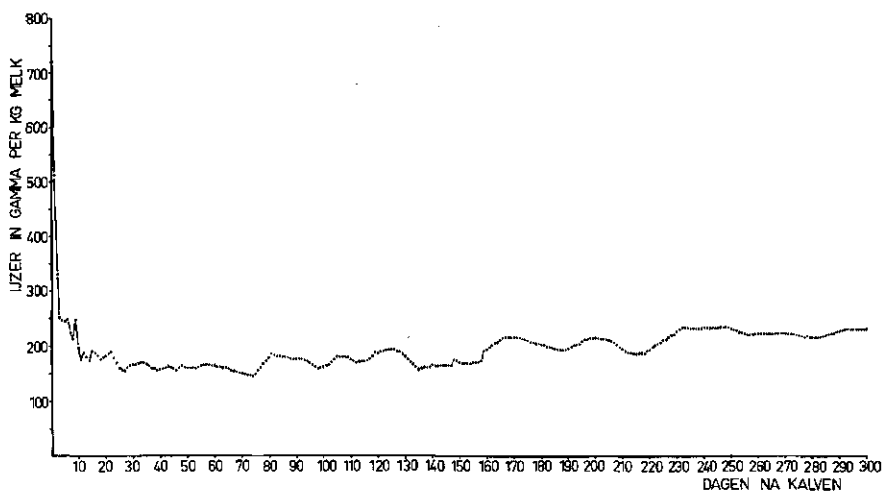
De redenen voor het vinden van vaak uiteenlopende waarden voor het ijzergehalte zullen wel dezelfde zijn als voor het vinden van afwijkende kopergehaltes: geen voldoende voorzorgen nemen om infectie met het metaal te voorkomen.

3.3.2. Eigen onderzoek

Uit het voorgaande kunnen we de conclusie trekken, dat tot nu toe betrekkelijk weinig bekend is over de hoeveelheid ijzer, die van nature in melk aanwezig is. Teneinde hierover meer ingelicht te zijn, werd in samenwerking met MEIJERS een onderzoek verricht over het verloop van het gehalte aan ijzer gedurende de lactatieperiode van een viertal individuele koeien:

Koe	I	kalfdatum	15 oktober 1953,
„	II	„	15 februari 1954,
„	III	„	22 maart 1954,
„	IV	„	29 maart 1954.

De lactatiekrommen worden voor koe I en II weergegeven in grafiek 4, voor koe III en IV in grafiek 5. Figuur 6 geeft het rekenkundig gemiddelde van de



GRAFIEK 6. IJzergehalte van melk gedurende de lactatieperiode. Rekenkundig gemiddelde van lactatiekrommen van drie koeien.

curven van drie koeien nl. I, III en IV. Koe II werd hierin niet opgenomen, omdat deze koe vergeleken met de drie andere een veel kortere lactatieperiode had.

In deze curven vallen op de hoge gehalten tijdens de eerste dagen van de lactatie. In tegenstelling tot koper blijkt hier het hoogste gehalte steeds bij de eerste biest op te treden. Daarna treedt al vrij spoedig een daling in. Meestal is na enkele dagen het gehalte aan ijzer al normaal te noemen. De verklaring voor het hoge ijzergehalte is niet moeilijk te geven: meestal bevat biest nl. wel iets bloed. Bij de koeien III en IV werd dit nagegaan, door een kleine hoeveelheid melk in een glazen buis te centrifugeren en het sediment te beoordelen.

	Dagen na kalven	IJzergehalte in gamma's per kg melk	Sediment
Koe III	0 (1e biest)	1693	bloed
	1	694	bloed
	2	334	iets bloed
	3	223	geen bloed te constateren
Koe IV	1	500	iets bloed
	2	232	geen bloed te constateren

Het is dus waarschijnlijk, dat het hoge gehalte aan ijzer in de eerste dagen van de lactatie uitsluitend te danken is aan kleine hoeveelheden bloed, die in de melk voorkomen. Voor het overige gedeelte van de lactatieperiode kunnen we zeggen, dat de hoeveelheid ijzer varieert van ± 150 tot ± 250 gamma per kg.

Wel is er een tendens, dat het ijzergehalte in het laatste deel van de lactatieperiode iets hoger wordt. Bij koe II komt dit zelfs zeer duidelijk naar voren, bij koe IV nauwelijks. Zo vonden we:

	Dagen na kalven	IJzergehalte in gamma's per kg melk
Koe I	299	208
	312	279
	326	290
	333	345
	362	388
Koe II	203	259
	210	289
	253	435
	267	421
	281	524
Koe III	281	185
	302	270
	316	255
	330	276
	343	320
Koe IV	239	274
	253	242
	274	215
	295	225
	309	225
	323	267

3.3.3. Discussie

Naar aanleiding van het voorgaande mogen we het waarschijnlijk achten, dat het van nature in melk aanwezige ijzer tussen betrekkelijk nauwe grenzen zal schommelen. Ook het gehalte aan ijzer van gemengde melk zal aan weinig variatie onderhevig zijn en als gevolg hiervan zal ook de van nature in boter aanwezige hoeveelheid over het algemeen niet boven zekere grens komen.

Dat voeding invloed zou hebben op het gehalte van melk aan ijzer is nooit gebleken.

3.4. HET GEHALTE VAN MELK AAN ANDERE METALEN

3.4.1. Literatuuroverzicht

Over het gehalte van melk aan mangaan is nog weinig onderzoek verricht. BROEK (18) geeft in een literatuuroverzicht de volgende tabel.

TABEL 6. Overzicht van door verschillende onderzoekers gevonden mangaangehaltes van melk

Onderzoeker	Jaar	Melksoort	Mangaangehalte (gamma per l.melk)	Aantal monsters
MC. HARGUE	1924	rauwe koemelk	30	1
		colostrum (koe)	200	1
RICHARDS	1930	koemelk	39-43	5
		colostrum (koe)	70-50	9
SKINNER, PETERSON	1931	koemelk	17-48	6
		colostrum (koe)	44	1
KEMMERER, TODD	1931	koemelk	30	6
SATO, MURATA	1932	koemelk	30	6
		colostrum (koe)	60	3
BROEK	1935	koemelk	7-40	
		colostrum (koe)	7- 9	6

Hieruit blijkt, dat de waarden, die BROEK voor het mangaangehalte vond, lager liggen dan die der voorgaande onderzoekers. Hij vond echter dat door

middel van de voeding invloed is uit te oefenen op het gehalte van melk aan mangaan. Door voeding van bietenpulp, een zeer mangaanrijk voedermiddel, kon hij een zodanige verhoging van het mangaangehalte der melk bewerkstelligen, dat dit op het niveau kwam, zoals dat door eerdere onderzoekers was gevonden. Vóór toediening van bietenpulp of tulpenbollen bleek de hoeveelheid mangaan in melk 9 à 10 gamma per liter te zijn; na toediening stegen de gehalten tot 22 à 30 gamma per liter. De individuele verschillen waren over het algemeen zeer gering. BROEK meent dan ook, dat de koeien tijdens de eerste periode van zijn proef met het voedsel te weinig mangaan toegediend kregen. Ook toediening van mangaanzout (nl. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) bleek verhogend te werken, zij het in mindere mate als bietenpulp. BROEK vond verder, dat de hoeveelheid mangaan in de melk na de partus niet toenam, zoals het geval was bij koper en zink. In enkele gevallen vond hij in de biest zelfs minder mangaan dan in de latere melk. SATO & MURATA (69) vonden in colostrum wel meer mangaan dan in normale melk (zie tabel 6).

De kans op infecties met mangaan schijnt minder groot te zijn dan de kans op infecties met koper. Het bleek geen verschil te maken of de melk al of niet in speciaal voorbehandeld glaswerk werd opgevangen.

Over de invloed van de toediening van mangaan met de voeding op het gehalte van de melk aan mangaan vermeldt de literatuur nog het volgende: KEMMERER & TODD (39) gaven bij het rantsoen een hoeveelheid mangaansulfaat, waardoor de opgenomen hoeveelheid mangaan vijfmaal zo groot werd. Het mangaangehalte van de melk bleef echter gelijk.

Volgens ARCHIBALD c.s. (5) (11) veroorzaakt toediening van extra mangaan in de vorm van mangaansulfaat met de voeding wel duidelijke verhoging van het gehalte aan mangaan in de melk; gevonden werd gemiddeld voor melk onder normale omstandigheden 24 gamma/l en gemiddeld voor melk na toediening van mangaanzout 46 gamma/l.

Van de andere metalen, die in melk voorkomen neemt zink een belangrijke plaats in. Voor het gehalte van melk aan zink geeft BROEK (18) het in tabel 7 vermelde literatuuroverzicht.

TABEL 7. Overzicht van door verschillende onderzoekers gevonden zinkgehalten van melk

Onderzoeker	Jaar	Melksoort	Zn mg/l	Aantal
WEITZEL	1914	koemelk	3.6	1
BIRCKNER	1919	marktmelk	3.6-5.6	12
		rauwe melk	2.0-5.4	15
ELVEHJEM, TODD	1932	marktmelk	2.68-2.76	7
SATO & MURATA	1932	koemelk (mengmelk)	gem. 3.34	7
BROEK	1935		1.94-4.96 gem. 3.43	

De in de loop der tijd gevonden gehalten voor zink blijken dus niet belangrijk te variëren. Volgens SATO & MURATA (69) en ook volgens BROEK (18) geldt voor zink, dat het gehalte dadelijk na de partus hoger ligt; de hoeveelheid zink daalt echter snel na de partus. Uit de proeven van BROEK is tevens gebleken, dat het zinkgehalte van de melk niet of slechts weinig afhankelijk is van de rantsoenen, zoals ze in de praktijk gegeven worden. Volgens SATO & MURATA is het zinkgehalte onmiddellijk na de partus vrij hoog (4.78—18.66 mg per l).

Er treedt echter een zeer snelle daling op en na ongeveer 10 dagen is de normale waarde bereikt. BROEK vermeldt het volgende voorbeeld:

1e melk na de partus	5.84 mg/l.
2e „ „ „ „	4.21 mg/l.
3e „ „ „ „	3.77 mg/l.

Door VAN DER BAS (15) werd hier in het laboratorium gevonden voor het gehalte van melk aan zink gedurende de lactatieperiode:

Aantal dagen na kalven	Zink mg/l
1 (morgenmelk)	5.50
1 (avondmelk)	6.30
2	7.35
3	7.20
4	7.40
6	6.50
8	6.00
10	5.50
12	5.35
15	5.30
18	4.85
22	4.50
25	4.30
29	4.95
36	4.30
72	4.90

Volgens BROEK & WOLFF (19) beïnvloedt toediening van 8 of 12.5 gr zink-sulfaat met de voeding het zinkgehalte van de melk niet. ARCHIBALD (6) diende gedurende 3 maanden 10 gram zinkoxyde per koe aan het voeder toe. Het gemiddelde gehalte aan zink steeg van 3.9 tot 5.1 mg per liter melk.

ARCHIBALD (9) vond, dat molybdeen van nature in de melk voorkomt; de hoeveelheid varieert van 40 tot 70 gamma per l. Toediening van 272 mg molybdeen per dier per dag in de vorm van ammoniummolybdaat gedurende 2 maanden deed het Mo-gehalte van de melk toenemen tot het vijfvoudige.

Ook het gehalte aan cobalt werd door ARCHIBALD (7) bepaald. Hij vond gemiddeld 0.6 gamma per l melk. Toediening van cobaltacetaat, waardoor de dieren per dag 120 mg cobalt extra kregen, verhoogde het cobaltgehalte van de melk tot $\pm$ 2.4 gamma per l.

Nikkel kon door ARCHIBALD (8) in zorgvuldig in glaswerk opgevangen melk niet worden aangetoond, ook niet indien met het voeder gedurende 2 maanden 145 mg Ni per dag per dier werd toegediend.

Voor het gehalte aan aluminium vond ARCHIBALD (10) gemiddeld 0.46 mg per l. Na toediening gedurende 4 maanden van 114 mg aluminium in de vorm van $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ vond hij voor het gehalte aan aluminium gemiddeld 0.81 mg per l.

3.4.2. Discussie

Uit het gegeven literatuuroverzicht blijkt, dat het niet mogelijk is een algemeen geldende regel te geven ten aanzien van de factoren, welke het gehalte van melk aan verschillende metalen beïnvloedt. Wel blijkt, dat enkele metalen nl. koper, ijzer en zink in dit opzicht grote overeenkomst vertonen. Van deze drie metalen kan gezegd worden, dat het gehalte van de melk in het begin van

de lactatie belangrijk hoger is dan normaal, dat na deze beginperiode het gehalte gedurende de gehele verdere lactatie vrij constant blijft en dat voeding waarschijnlijk geen invloed heeft op het gehalte der melk aan deze metalen. De gegevens, welke over andere metalen verkregen werden zijn vaak in strijd met elkaar of te summier om tot duidelijke conclusies te kunnen komen.

3.5. SLOTBESCHOUWING

De gegevens over de van nature in melk aanwezige hoeveelheden aan verschillende metalen geven ons aanleiding tot volgende beschouwingen. Zowel bij koper als bij ijzer is van enige invloed van de voeding op het gehalte aan een dezer metalen niets gebleken. Hieraan kan worden toegevoegd, dat voor zink waarschijnlijk hetzelfde geldt. Hoe het in dit opzicht voor mangaan ligt, is nog niet geheel duidelijk. De indruk werd verkregen, dat door voeding het gehalte van de melk aan mangaan wel te beïnvloeden is. Het is echter zeer wel mogelijk, dat de dieren tijdens de uitvoering van de proeven een tekort aan mangaan hadden, zodat door toediening van mangaan het gehalte op het „normale” niveau werd gebracht.

Interessant is het verloop van de gehalten tijdens de lactatie. Ook hier blijkt mangaan ten opzichte van de andere metalen een uitzonderingspositie in te nemen. Bij koper en ijzer is in de aanvang van de lactatie het gehalte aan deze metalen hoger dan in de verdere lactatie. Dit blijkt volgens BROEK (18) en VAN DER BAS (15) ook voor zink het geval te zijn.

Dat het gehalte aan ijzer in de eerste dagen van de lactatieperiode zo hoog is, is gemakkelijk te verklaren, omdat in deze periode meestal wel wat bloed in de melk voorkomt. Of afgezien hiervan eveneens een belangrijke verhoging in het gehalte aan ijzer zou zijn opgetreden is uiteraard langs chemisch analytische weg moeilijk vast te stellen. Het gehalte aan ijzer heeft meestal na enkele dagen het normale niveau bereikt, het gehalte aan koper meestal na enkele weken. Opvallend blijft in ieder geval het gedrag van koper in dit opzicht en ook van zink. Een physiologische verklaring hebben wij hiervoor niet kunnen vinden.

Het staat wel vast, dat koper voor dieren onmisbaar is; waarschijnlijk speelt het een rol bij de vorming van haemoglobine. In welke vorm koper werkzaam is, is niet bekend. Van het met het voeder toegediende koper wordt slechts een gering deel door het dier opgenomen. Veel koper wordt uitgescheiden met de faeces, dit bevat het niet geresorbeerde koper en het koper, dat via de gal en via de darmwand is uitgescheiden. Wat de koperstatus van het dier betreft, is veel aandacht besteed aan bloed en aan de lever. Als kopergehalte van bloedserum van koeien wordt o.a. opgegeven: door FRENS (26) 0.8—1.2 mg per liter serum; bij koperdeficiente dieren ligt dit gehalte duidelijk lager: 0.6—0.7 mg per l. Volgens KAPPELLE (37) wordt een dergelijke verlaging van het kopergehalte van bloed bij koperdeficiente dieren niet altijd geconstateerd en is het kopergehalte van bloedserum van normale dieren zeer afhankelijk van de landstreek.

Over het algemeen kunnen we zeggen, dat gedurende de eerste dagen van de lactatieperiode vele physiologische processen van de koe als gevolg van de plotselinge veranderingen zodanig zijn verstoord, dat hiervoor geen vaste regels zijn op te geven. Dit blijkt wel uit de zo zeer afwijkende samenstelling, die de melk gedurende deze dagen heeft. Maar ook wanneer de melk wat zijn overige

samenstelling betreft dadelijk na de biestperiode als normaal beschouwd kan worden, zien we dat – althans voor het koper – de toestand nog enige tijd vrij abnormaal blijft. Ook is opmerkelijk, dat het kopergehalte van de eerste biest in de regel nog niet zo erg hoog is, de top wordt meestal pas enkele dagen later bereikt.

Uiteraard moeten wij de melk in de eerste plaats zien uit een oogpunt van voeding voor het kalf. Het hoge kopergehalte van de melk in de aanvang van de lactatie valt samen met een uitzonderlijke grote behoefte van het kalf aan koper gedurende de eerste dagen van zijn groei. Uit een onderzoek van VAN DER GRIFT (28) is gebleken, dat het kalf bij zijn geboorte een grote reserve aan koper meekrijgt in de lever. Deze extra hoeveelheid blijkt na 1 à 2 maanden grotendeels te zijn opgebruikt. Mogelijk krijgt het kalf via de melk nog een belangrijke aanvulling van deze vrij plotselinge behoefte.

Het kopergehalte van de lever van het drachtige dier ondergaat vóór het kalven een vrij sterke daling. Deze daling begint enige maanden vóór het kalven. We mogen aannemen, dat deze daling samenhangt met de reserve aan koper, die in de lever van het kalf gevormd dient te worden. Het lage gehalte aan koper van de lever van het moederdier blijft in de regel nog ongeveer een maand na het kalven in stand, daarna vindt weer een stijging plaats. Het gehalte van het bloedserum blijft gedurende deze tijd vrij constant. Het zou dus kunnen zijn, dat door het plotselinge verdwijnen van het kalf er voor de koe voor zijn regelmatige afvoer van koper voorlopig geen andere uitweg te vinden is dan o.a. via de melk; geleidelijk herstelt zich het evenwicht dan weer: na ongeveer een maand gaat het kopergehalte van de lever van het moederdier weer vrij snel stijgen, het kopergehalte van de melk daalt dan ook weer tot zijn normale waarde. Een en ander geeft echter nog geen bevredigende verklaring omtrent het betrekkelijk lage kopergehalte van de eerste biest.

Houden wij de eerste periode van de lactatie buiten beschouwing dan kan gezegd worden, dat het gehalte van de melk aan de hier onderzochte metalen gedurende de verdere lactatieperiode zeer constant is.

In verband met ons verdere onderzoek is het van belang te weten:

- 1e dat het gehalte van melk aan koper en ijzer niet wordt beïnvloed door variatie in voeding. Ook de overgang van stal naar weide en omgekeerd heeft geen invloed op het gehalte van de melk aan deze metalen. Zelfs het opzettelijk toedienen van buitensporige hoeveelheden van deze metalen aan de dieren bleek het gehalte in de melk niet te beïnvloeden.
- 2e dat de hoeveelheid van nature in melk aanwezig koper en ijzer betrekkelijk constant is. Wel is het zo, dat het gehalte aan koper en ijzer van de melk van individuele koeien in de aanvang van de lactatie belangrijk hoger kan zijn; het gehalte aan koper van de gemengde melk, zoals dat aan de fabrieken wordt aangevoerd, zal als gevolg hiervan enigszins verhoogd kunnen zijn; vooral in het voorjaar, wanneer in een korte periode veel koeien kalven zal dit misschien merkbaar zijn; maar grote afwijkingen zullen nooit voorkomen.

Van de overige sporenelementen kan gezegd worden, dat vrijwel ieder element, waarvan de physiologische betekenis bekend is ook – vaak in zeer geringe hoeveelheden – in melk voorkomt.

4. DE INVLOED VAN KOPER, IJZER EN MANGAAN BIJ HET ONTSTAAN VAN KOELHUISGEBREKEN VAN BOTER

4.1. INLEIDING

Zoals in hoofdstuk 1 al is opgemerkt bestonden reeds rond de eeuwwisseling bezwaren tegen het gebruik van bepaalde metalen in de zuivelindustrie in verband met hun invloed bij het ontstaan van koelhuisgebreken van boter. Vooral de onderzoeken van ROGERS (66, 67, 68) en SOMMER & SMIT (73) hebben dit duidelijk gemaakt. Pas na de tweede wereldoorlog is men op grote schaal begonnen de strijd aan te binden tegen dit in economisch opzicht zo schadelijk gebrek. Het werd toen ook pas goed mogelijk door de toepassingsmogelijkheden van niet-roestend staal.

De inzichten in de wijze van ontstaan van koelhuisgebreken zijn in de loop der jaren belangrijk verdiept. Onderzoeken over de invloed van koper, ijzer en mangaan bij het ontstaan van koelhuisgebreken van boter werden gedaan door KRUISHEER c.s. (46). Zij constateerden een duidelijke invloed van koper. Zij spraken echter over kopergehalten van meer dan 200 gamma per kg boter, wat volgens de hedendaagse opvattingen al neerkomt op een zeer grote besmetting met koper. Zij constateerden wel een statistisch verband tussen het ijzergehalte (ijzer werd hier toegediend als ferrolactaat) en het oxydatiegebrek bij boter, echter bleek ook een correlatie te bestaan tussen het kopergehalte en het ijzergehalte van de boter. Over een werkelijke invloed van het ijzer viel hier dus geen conclusie te trekken. Bij toevoeging aan de boter van mangaanlactaat werd geen invloed van dit zout op het koelhuisgebrek geconstateerd. Als bezwaar van deze proeven kan genoemd worden – zoals deze onderzoekers zelf ook al beweerden – dat de zouten toegevoegd werden door de boter te mengen met een oplossing van metaalzouten, waartoe nodig was, dat de boter enigszins opgewarmd werd ($\pm 29^\circ\text{C}$), waarbij het vet gedeeltelijk in vloeibare toestand kwam en verwacht mag worden, dat er een zekere ontmenging plaatsvond. Als gevolg van deze wijze van bewerking is het waarschijnlijk, dat er een zekere mate van structuurvernietiging plaatsvond. Dit achten wij in verband met wat gezegd is over de invloed van de oppervlaktelaagjes bij het ontstaan van koelhuisgebreken niet gewenst. (56).

MULDER c.s. (59) voegden metaalzouten toe aan de room of aan het waswater. IJzer werd hier toegevoegd als ferrolactaat en als ferriammoniumaluin. In geen der beide gevallen werd een invloed op het oxydatiegebrek geconstateerd. Wel had reeds de verse boter een metalige smaak – de smaak van het ijzerzout. Deze smaak was gelocaliseerd in het boterserum en niet in het botervet. Zelfs boters met ijzergehalten hoger dan 2000 gamma's per kg vertoonden na zes maanden nog geen koelhuisgebrek. Het bleek, dat het geen verschil maakte of het ijzer was toegevoegd aan de room dan wel aan het waswater.

Het koper werd aan de room of aan het waswater toegevoegd in de vorm van cuprilactaat. Het koper bleek wel degelijk een grote invloed te hebben op het ontstaan van koelhuisgebreken. Zo kon in één geval geconstateerd worden, dat een toename van het kopergehalte van de boter van 40 tot 100 gamma per kg bij een drie maanden oude boter een tranige smaak veroorzaakte. Ook hier werd praktisch geen verschil waargenomen tussen de boters waar koper werd toegevoegd aan de room of met het waswater.

Mangaanzout toegevoegd via het waswater veroorzaakte aan de boter een

zwakke zoetige smaak. Geconcludeerd werd, dat mangaan alléén geen koelhuisgebrek veroorzaakt.

Door VAN DER WAARDEN (80) en door TOLLENAAR (77) werd eveneens aandacht besteed aan de koelhuisgebreken in verband met het metaalgehalte. Hierop zullen we in volgende hoofdstukken terugkomen.

Het metaalgehalte van de boter wordt bepaald door:

- 1e het gehalte van melk aan het metaal en de verdeling van het metaal over de bestanddelen van de melk.
- 2e factoren, die bij de bereiding een rol spelen, waardoor mogelijke besmetting van metaal kan optreden.

Als factoren zouden wij voorts nog kunnen noemen enkele punten, die ten nauwste samenhangen met de wijze van bereiding, zoals het vetgehalte van de room, het al of niet wassen van de boter. Op het natuurlijke metaalgehalte van de boter – dus het metaalgehalte, dat bepaald wordt door het van nature in de melk aanwezige koper – is weinig invloed uit te oefenen. Wél moet het mogelijk zijn metaalinfecties tot het uiterste te beperken.

Door RITTER (65) werd een onderzoek ingesteld naar de invloed van verschillende metalen op de smaak van melk. Alle door hem onderzochte koperlegeringen bleken de oxydatiegebreken in melk in duidelijke mate te bevorderen. Uit zijn proeven kwam verder naar voren, dat vertind en verchroomd materiaal, aluminium en zijn legeringen evenals roestvrij staal geen invloed op de smaak van melk hebben. Nikkel, zink en ijzer bleken de smaak van melk in ongunstige zin te beïnvloeden.

Het is bekend, dat belangrijke verontreinigingen door koper plaats kunnen vinden door niet voldoende vertinde koperen leidingen, pasteurs of pompen, door het vóórkomen van koperen kranen. Een zeer kort stukje leiding kan al zeer gevaarlijk zijn. Ook komt het wel voor, dat het boterwaswater in hoge mate met koperzout is verontreinigd; bijvoorbeeld doordat aan leidingwater kopersulfaat is toegevoegd voor de algenbestrijding, of doordat het water in koperen boilers werd opgewarmd. IJzer en mangaan kunnen vooral via het waswater in de boter terecht komen. Ook op de boerderij kan een mogelijkheid van metaalverontreiniging liggen. Zo is uit een onderzoek van RAADSVELD gebleken, dat het gebruik van koperen zeefplaatjes op de boerderij het gehalte van de melk aan koper kan verhogen (63), reden waarom deze de laatste tijd vervangen worden door roestvrij stalen.

Koperverontreinigingen op de zuivelbedrijven zijn vooral in de jaren na de oorlog in belangrijke mate teruggelopen, zoals blijkt uit een samenvatting op dit gebied uit de jaarverslagen van het Zuivel Kwaliteitscontrôle Bureau (81).

In tabel 8 wordt aangegeven de jaarlijkse gemiddelde waarden van de koper- en ijzergehalten van een groot aantal door het Z.K.B. onderzochte botermonsters.

Deze verlaging van het metaalgehalte van de boter is uiteraard gepaard gegaan met een verbetering van de duurzaamheid van de boter. De inzichten inzake de schadelijkheid van metalen en met name koper voor de kwaliteit van boter zijn echter schoorvoetend door de praktijk aanvaard. Nog steeds blijken belangrijke infecties met koper te kunnen plaatsvinden, doordat men vaak op ogenschijnlijk onbeduidende plaatsen koper in de apparatuur heeft ingeschakeld.

TABEL 8. Overzicht van de door het Z.K.B. gevonden jaargemiddelden voor het gehalte van boter aan koper en ijzer

Jaar	Koper gamma/kg	IJzer gamma/kg
1941	280	600
1942	230	570
1943	245	635
1944	250	570
1946	250	670
1947	235	695
1948	205	495
1949	155	435
1950	145	435
1951	110	365
1952	100	320
1953	85	295
1954	85	300
1955	85	280
1956	75	260
1957	65	225
1958	60	255
1959	55	225

Aan de invloed van verschillende metalen bij het ontstaan van koelhuisgebreken bij boter werd reeds door verschillende onderzoekers aandacht besteed. Veelal werd dit zo gedaan, dat men een aantal praktijkboters op smaak beoordeelde en tevens het gehalte van deze boters aan metalen bepaalde. Meestal werd dan een bepaalde correlatie geconstateerd, waaruit de nodige conclusies werden getrokken. Wil men echter bewijzen, dat een bepaald metaal invloed heeft op de smaak van de boter, dan zal men:

- 1e boter moeten bereiden, waarvan men met zekerheid kan zeggen, dat geen verontreinigingen met metaal heeft plaats gevonden.
- 2e hiernaast boter bereiden, uitgaande van dezelfde grondstof, waaraan echter opzettelijk een bepaalde hoeveelheid van het metaal b.v. in de vorm van een zout is toegevoegd. Van beide boters zal uiteraard het gehalte aan het bewuste metaal bepaald moeten worden. Op deze wijze werden de reeds besproken proeven van MULDER c.s. (59) uitgevoerd.

4.2. EIGEN ONDERZOEK OVER DE INVLOED VAN KOPER, IJZER EN MANGAAN

4.2.1. De toegepaste werkwijze

Bij de bereiding gingen we ervan uit, dat we:

- 1e verontreiniging met sporen metaal moesten vermijden.
- 2e voor zover mogelijk alle uitwendige factoren, die invloed zouden kunnen hebben op de kwaliteit van de boter gelijk lieten zijn.

Om aan de eerste voorwaarde te voldoen maakten we bij de gehele boterbereiding gebruik van te voren kopervrij gemaakt glaswerk, zoals in hoofdstuk 3 beschreven is. Wanneer in het volgende gesproken wordt van glazen apparatuur, wordt dan ook steeds bedoeld: kopervrij gemaakt glaswerk.

De melk werd „kopervrij” gewonnen en dadelijk na het melken overgegoten in donkerbruine glazen flessen. In deze bruine flessen werd ze vervolgens naar het laboratorium getransporteerd; hier werd ze in een donkere koele ruimte

weggezet om tot de volgende morgen gelegenheid te hebben om op te romen. De ondermelk werd vervolgens met behulp van een glazen hevel verwijderd. De room werd in porties van ± 1 l. gepasteuriseerd. Het pasteuriseren geschiedde door een erlenmeyer met room onder voortdurend roeren in een bad met kokend water te plaatsen totdat de temperatuur van de room 80°C was geworden, dadelijk hierna werd de erlenmeyer in een bak met stromend leidingwater geplaatst om af te koelen tot 20°C . Na het pasteuriseren werden alle porties room weer verzameld in een glazen fles en van hieruit in een aantal gelijke porties verdeeld in bruine flessen. Hier werden de oplossingen van metaalzouten en zuursel toegevoegd, waarna de room bij deze temperatuur (20°C) te zuren werd gezet. Deze handelingen (ontromen, pasteuriseren, toevoeging van metaalzouten en zuursel) vonden doorgaans in de morgenuren plaats. Tegen de avond begon de room in de regel dik te worden. Dan werd ze in de koelkast geplaatst bij $\pm 7^{\circ}\text{C}$, waarin ze onder langzaam afkoelen nog enige tijd doorzuurde. De volgende morgen was de room goed doorgezuurd en was de temperatuur van de room zodanig gedaald, dat ze meestal in vrij korte tijd ($\frac{1}{2}$ tot 1 uur) kon worden gekarnd. Het karnen geschiedde door de flessen met room in een door een motor aangedreven karnapparaat te plaatsen, waarin de flessen om de horizontale as wentelden. (De hoeveelheid room werd zodanig gekozen, dat de flessen iets minder dan half vol waren). Nadat de boter uitgekard was, werd de karnemelk afgegoten en de boter éénmaal gewassen met tweemaal gedestilleerd water. Nadat de boter gewassen was, werd ze op een ruw gemaakte (gezandstraald) glazen plaat gedeponeerd. Hierop werd de boter gekneed, waarbij gebruik gemaakt werd van een ruw gemaakte glazen cylinder. Hierna werd de boter in kleine glazen potjes gebracht. Van iedere partij boter werden 3 potjes gevuld met de bedoeling deze na 3, 6 en 9 maanden te proeven; de rest van de boter werd bewaard voor analyse op metaalgehalte.

Het zuursel werd bereid door aan de ondermelk, verkregen door opromen van kopervrij gewonnen melk, 0,5 à 1% boterzuursel toe te voegen. (De ondermelk was vooraf gepasteuriseerd door haar gedurende $\pm$ een half uur in een bad met kokend water te plaatsen). Van dit zuursel werd steeds 4 à 5% aan de room toegevoegd.

De toegevoegde zouten waren zouten van de metalen Cu, Fe en Mn. Naast toevoegingen van het zout van één metaal werden ook steeds toevoegingen van verschillende combinaties van de drie metaalzouten toegepast. Zo zijn alle mogelijke combinaties van de drie metalen als toevoeging toegepast. IJzer werd zowel in de tweewaardige als in de driewaardige vorm toegevoegd.

De porties boter werden alle bewaard bij een temperatuur van -20°C .

4.2.2. *Overzicht van de resultaten*

De resultaten van de proefnemingen zijn samengevat in tabel 9.

TABEL 9. De invloed van koper, ijzer en mangaan bij het ontstaan van koelhuisgebreken.

Boter nr.	Cu- gehalte v.d.boter gamma per kg	Fe- gehalte v.d.boter gamma per kg	Mn- gehalte v.d.boter gamma per kg	Peroxydgetal		Smaak na			Toe- voegingen	Datum van bereiding
				6 mnd	9 mnd	3 mnd	6 mnd	9 mnd		
4- 0	92	351				0	0	0		11- 6-1953
- 1	430	165				+++	+++	+++	Cu	-
- 2	513	620				+++	+++	+++	Cu Fe	-
- 3	388	396	43			+++	+++	+++	Cu Fe Mn	-
5- 0	32	163	6			0	0	0		18- 6-1953
- 3	360	521	39			+++	+++	+++	Cu Fe Mn	-
- 4	32	556	15			0	0	0	Fe	-
- 5	45	472	43			0	0	0	Fe Mn	-
- 6						0	0	0	Mn	-
6- 0	45	141			0.79	0	0	0		2- 7-1953
- 3	464	462	44		1.65	+++	+++	+++	Cu Fe Mn	-
- 5	40	477				0	0	0	Fe Mn	-
- 6	48		50		0.68	0	0	0	Mn	-
- 7	431	185	49		1.57	+++	+++	+++	Cu Mn	-
7- 0	38		13		0.58	0	0	0		9- 7-1953
- 1	400		7		1.57	+++	+++	+++	Cu	-
- 7	362		52		1.53	+++	+++	+++	Cu Mn	-
8- 0	40	142	10		0.48	0	0	0		17- 7-1953
- 2	403	800			1.70	+++	+++	+++	Cu Fe	-
- 3	478	972			1.74	+++	+++	+++	Cu Fe Mn	-
- 4	52	834			0.63	0	0	0	Fe	-
9- 0	33	129			0.57	0	0	0		24- 7-1953
- 1	504	99			1.56	+++	+++	+++	Cu	-
- 2	454	692			1.75	+++	+++	+++	Cu Fe	-
- 4	40	598			0.51	0	0	0		-
10- 0	41	145				0	0	0		31- 7-1953
- 5	39	870				0	0	0	Fe Mn	-
- 6	40		49			0	0	0	Mn	-
- 7	542		76		1.49	++	++	++	Cu Mn	-
11- 0	42	178			0.35	0	0	0		6- 8-1953
- 1	435	182			1.49	++	+++	+++	Cu	-
-21	438	674			1.33	++	+++	+++	Cu Fe	-
-41	53	779			0.47	0	0	0	Fe	-
12- 0	32	246			0.39	0	0	0		13- 8-1953
- 1	127	262			0.77	+	+	+	Cu	-
-31	144	605			0.87	+	+	+	Cu Fe Mn	-
- 7	104				0.78	+	+	+	Cu Mn	-
13- 0	49	205			0.49	0	0	0		20- 8-1953
- 1	134	167			0.93	+	++	++	Cu	-
- 2	112	546			0.93	+	+	++	Cu Fe	-
-21	127	474			1.02	+	+	++	Cu Fe	-
14- 0	33	74			0.43	0	0	0		28- 8-1953
- 1	149	118			1.02	++	+++	+++	Cu	-
- 6	45		61		0.48	0	0	0	Mn	-
- 7	179		50		0.96	++	+++	+++	Cu Mn	-
15- 0	32	61				0	0	0		3- 9-1953
- 4	33	411				0	0	0	Fe	-
-41	27	489				0	0	0	Fe	-
- 5	36	455				0	0	0	Fe Mn	-
-51	33	403				0	0	0	Fe Mn	-
16- 0	33					0	0	0		10- 9-1953
- 1	117	194				+	+	++	Cu	-
-31	128	500				+	+	++	Cu Fe Mn	-
-6	33					0	0	0	Mn	-

TABEL 9. Vervolg

Boter nr.	Cu- gehalte v.d.boter gamma per kg	Fe- gehalte v.d.boter gamma per kg	Mn- gehalte v.d.boter gamma per kg	Peroxydgetal		Smaak na			Toe- voegingen	Datum van bereiding
				6 mnd	9 mnd	3 mnd	6 mnd	9 mnd		
- 7	124	133				+	+	++	Cu Mn	-
17- 0	61	144		0.56	0.73	0	0	0?		18- 9-1953
- 1	238	177		1.41	1.43	+++	+++	+++	Cu	-
-51	50	432				0	0	0	Fe Mn	-
- 6	47					0	0	0	Mn	-
- 7	264	138		1.21	1.41	+++	+++	+++	Cu Mn	-
18- 0	47	170			0.63	0	0	0		24- 9-1953
- 1	266	191			1.17	+	++	++	Cu	-
-21	247	537			1.13	+	++	++	Cu Fe	-
19- 0	34					0	0			25- 9-1953
- 1	166	183			1.21	+	++	++	Cu	-
- 2	150	401			1.23	+	+	+	Cu Fe	-
21- 0	19	167		0.55	0.39	0	0	0		8-10-1953
- 1	86	168		0.90	0.93	0	++	++	Cu	-
- 3	93	635		0.80	0.93	0	?	?	Cu Fe Mn	-
-31	101	614		1.02	1.01	0	?	?	Cu Fe Mn	-
51- 0	52			0.30	0.49		0	0		2- 6-1955
- 1	137			0.72	1.01		++?	+	Cu	-
- 7	160			0.69	1.01		++?	+	Cu Mn	-
53- 0	37			0.43	0.75	0	0	0		22- 6-1955
- 1	103			1.12	1.52	++	++	++	Cu	-
- 7	151			1.24	1.50	++	++	++	Cu Mn	-
- 3				1.09	1.52	++	++	++	Cu Fe Mn	-
54- 0	27			0.11	0.26		0	0		27- 7-1955
- 5				0.13	0.28		0	0	Fe Mn	-
- 6				0.09	0.27		0	0	Mn	-

Enkele opmerkingen bij de tabel 9.

Als koperzout werd gebruikt: CuSO_4 .

Als ferrozout werd gebruikt: FeSO_4 (bij boters 4, 5 en 6) Mohr's zout (bij boters 8, 9, 10, 13, 15, 19, 20, 21).

Als ferrizout: ferriammoniumsulfaat (bij boters 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 21).

Als mangaanzout werd gebruikt: MnCl_2 .

De mate, waarin het koelhuisgebrek voorkwam, is aangegeven door + tekens:

- 0 geen koelhuisgebrek te proeven.
- ? twijfelachtig.
- + geringe mate van koelhuisgebrek (vettig).
- ++ duidelijk koelhuisgebrek (vettig tot licht tranig).
- +++ uitgesproken tranig.

Bij de proeven 4 t/m 11 werd toegevoegd:

1000 gamma koper per l. room.

4000 gamma ijzer per l. room.

500 gamma mangaan per l. room.

Bij de proeven 12 t/m 21 werd toegevoegd:

- 170 gamma koper per l. room.
- 2000 gamma ijzer per l. room.
- 500 gamma mangaan per l. room.

Aangezien het gehalte van de boter aan mangaan nog vrij laag bleek te zijn, werden later nog enkele partijen boter gemaakt met de verschillende combinaties van metalen. De toegevoegde hoeveelheid mangaan was nu ongeveer het vijfvoudige (2400 gamma per l. room) van de hoeveelheid, die eerst toegevoegd werd (500 gamma). Het betreft hier de boters nr. 51, 53 en 54.

Uit de resultaten komt duidelijk naar voren de sterk overheersende invloed van koper. Bij de eerste proeven (4 tot en met 11) bleek de invloed van het koper zo groot te zijn, dat de boters na drie maanden reeds een uitgesproken tranige smaak vertoonden. Een eventuele invloed van het ijzer of van het mangaan op het koelhuisgebrek zou in dit geval moeilijk geconstateerd kunnen worden. In verband hiermede werd bij de volgende proeven van een kleinere hoeveelheid toegevoegd koper gebruik gemaakt (12 t/m 21). Sprekend voor de invloed van koper zijn hierbij een aantal voorbeelden, waarbij de boter een Cu-gehalte had van ca. 100 gamma per kg en het koelhuisgebrek reeds na drie maanden duidelijk waar te nemen was.

Voorts blijkt uit de genomen proeven, dat noch ijzer – het zij als ferro, het zij als ferrizout toegevoegd – noch mangaan enige invloed heeft op het ontstaan van koelhuisgebreken. Ook bij al de mogelijke combinaties van koper, ijzer en mangaan, die we bij deze proefnemingen hebben toegepast, kon alleen invloed van koper geconstateerd worden.

In die gevallen, waar ijzerzout werd toegevoegd werd een duidelijk metalige smaak geconstateerd: dezelfde smaak, die een oplossing van het zout in water ook al heeft. Deze smaak is van het begin af al aan de boter te constateren en is gelocaliseerd in het boterplasma. Het is vaak moeilijk een boter met dergelijke ijzersmaak op koelhuisgebreken te beoordelen. In dergelijke gevallen werd de boter uitgesmolten en alleen het botervet op smaak beoordeeld. Hetzelfde kan voor de mangaansmaak gezegd worden. De smaak van het mangaanzout is enigszins zoetig. Wanneer in dergelijke gevallen toch twijfelgevallen voorkomen, kan het peroxydgetal nog een duidelijke aanwijzing geven, b.v. boters no. 19-2, 21-3, 21-31.

Interessant in dit opzicht is boter nr. 21. Boter 21-1 met kopergehalte 86 gamma per kg, had na 6 maanden een tranige smaak. De boters 21-3 en 21-31 met nog iets hoger kopergehalte bleken moeilijk op smaak te beoordelen te zijn, doordat ijzer- en mangaansmaak overheersten. Uit de toename van het peroxydgetal ten opzichte van 21-0 kan echter geconcludeerd worden, dat ook deze boters evenals 21-1 een duidelijk oxydatiegebrek moeten hebben.

De grootte van het peroxydgetal is op zichzelf geen maatstaf voor het koelhuisgebrek. Bij een bepaald peroxydgetal blijkt de ene boter nog geen smaak te vertonen, die aan koelhuisgebrek doet denken, terwijl de andere boter reeds duidelijk een dergelijke smaak vertoont. Wel kan over het algemeen gezegd worden, dat in die gevallen, waarbij het peroxydgetal duidelijk hoger ligt (enkele tienden) dan het peroxydgetal van de blancoboter (bedoeld wordt de boter, waaraan geen metaal is toegevoegd) er vrijwel steeds sprake is van koelhuisgebreken.

De resultaten van de hiervoor beschreven proeven willen we als volgt samenvatten:

- 1e in geen der gevallen, waarbij geen koper werd toegevoegd, trad koelhuisgebrek op.
- 2e in alle gevallen, waarbij koper werd toegevoegd, trad wel koelhuisgebrek op.
- 3e de metalen ijzer en mangaan bleken geen invloed te hebben; noch afzonderlijk noch gecombineerd met elkaar of gecombineerd met koper.

Hiermede zijn de door MULDER c.s. (59) gevonden resultaten bevestigd. Na het voorgaande zal het duidelijk zijn, dat in het vervolg van dit onderzoek, de nadruk is komen te liggen op koper. Vooral zal ook aandacht worden besteed aan toevoeging van zeer geringe hoeveelheden koper.

4.3. VAN NATURE AANWEZIG EN TOEGEVOEGD KOPER

Uit de voorgaande proeven kwam naar voren, dat het van nature aanwezige koper in de boter zelden meer dan 50 gamma per kg is. Opvallend was voorts, dat ook in die gevallen, waar een betrekkelijk geringe hoeveelheid koper aan de boter bleek te zijn toegevoegd soms na 3 maanden, soms na 6 maanden bewaren, al een vrij duidelijk koelhuisgebrek geconstateerd kon worden. Dit doet de vraag rijzen, wat de invloed is, wanneer we nog geringere hoeveelheden koper zouden toevoegen. In dit geval krijgt het natuurlijk koper een relatief belangrijker aandeel in het totale kopergehalte van de boter.

Uit de gevonden kopergehaltenes van de proefboters is gebleken, dat een kopergehalte van 50 gamma per kg boter al hoog genoemd kan worden, althans bij boter, die bereid is met uitsluiting van koperinfectie. We mogen verwachten, dat dit in het algemeen zal gelden voor boter bereid uit room van gemengde melk. Zoals uit het verloop van het kopergehalte van de melk gedurende de lactatieperiode is gebleken, vertoont de curve in het begin van de lactatie een top. Door dus uit te gaan van melk van nieuwmelkse koeien, moet het mogelijk zijn boter te bereiden met een hoog gehalte aan natuurlijk koper. Bij de hierna te bespreken proeven is van deze mogelijkheid gebruik gemaakt. Tevens werd de invloed van zeer kleine koperinfecties bestudeerd door de hoeveelheid toegevoegd koperzout nog geringer te doen zijn dan bij voorgaande proeven. Zo zullen thans hoeveelheden gebruikt worden overeenkomend met 25 à 50 gamma per l. room. De resultaten zijn verzameld in tabel 10.

Door uit te gaan van melk met een hoog gehalte aan van nature aanwezig koper bleken we dus in staat te zijn – zonder koper toe te voegen – boter te verkrijgen met een hoog gehalte aan koper. De zo verkregen boters hadden niet zelden een kopergehalte hoger dan 100 gamma per kg boter. Het bleek nu, dat bij geen van deze boters een duidelijk koelhuisgebrek geconstateerd kon worden, ook niet na bewaren van de boter gedurende 9 maanden. Wel waren er enige twijfelgevallen. De peroxydgetallen lagen bij deze boters over het algemeen iets hoger dan bij de boters met een laag gehalte aan natuurlijk koper. Een uitzondering op deze algemene regels vormden de boters bereid uit biest; hierop zal in een apart hoofdstuk nader ingegaan worden. Daarentegen zijn we bij onze proeven tal van voorbeelden tegengekomen, waarbij het kopergehalte door toevoeging op hetzelfde niveau was gekomen, deze boters vertoonden vrijwel zonder uitzondering duidelijk koelhuisgebreken.

TABEL 10. De invloed van het van nature aanwezige koper en van kleine hoeveelheden toegevoegd koper

Boter nr.	Cu-gehalte van de boter gamma per kg	Peroxydgetal na			Smaak na		
		3 mnd	6 mnd	9 mnd	3 mnd	6 mnd	9 mnd
27-0	45	0.31	0.48	0.44	0	0?	?
-1	142	0.60	0.76	0.88	++	+++	+++
28-0	73		0.59			0?	?
-1	105		0.78			+	++
29-0	55	0.25	0.30	0.46	0?	0?	0
-1	72	0.28	0.31	0.46	0?	?	+
30-0	102	0.40	0.48	0.71	0	0	0
-1 A	118	0.48	0.55	0.77	?	+	+
-1 B	170	0.45	0.55	0.86	0	+	+
31-0	94		0.48	0.68		0	0
-1 A	143		0.61	0.83		+	+
-1 B	198		0.68	0.92		+	++
32-0	59		0.59	0.69		0	0
-1	128		0.78	0.92		++	++
33-0	52		0.51	0.61		0	0
-1 A	75		0.53	0.76		0	+
-1 B	97		0.62	0.79		+	++
-1 C	123		0.62	0.93		+	++
35-0	94		0.57	0.84		0	0
-0 A	116		0.53	0.84		?	0?
-1	119		0.69	0.85		+	+
36	95	0.85	0.89	0.99	0	0	0?
37	99	0.81	1.01	1.28	0	?	?
38	58	0.47	0.58	0.75	0	0	0
39	121	0.78	0.91	1.04	0	0?	?
45-0	40	0.20	0.15	0.27	0	0	0
-1	133	0.76		1.08	++		+++
46-0	64	0.54	0.64	0.65	0	0?	0
-1	96	0.61	0.62	0.65	0	0	0?
47	59	0.47	0.49	0.58	0	0	0
49	72	0.60	0.60	0.66	0?	0?	?
58-0	24	0.04	0.14		0	0	
-1	71	0.17	0.43		0	+	
-1 A	162	0.40	0.80		++	++	
59-0	105	0.46	0.67	1.02	0	0	?
-1	202	0.64	1.07	1.42	+	++	++
60	135	0.43	0.80	1.10	0	0	0
61	85	0.34	0.50	0.63	0	0	0
62	120	0.50	0.81	1.02	0	0?	0?
63	100	0.20	0.55	0.67	0	0	0
64-0	100		0.42	0.34	0	0	0
-1	117		0.35	0.46	0	0	?
65-0	99		0.58	0.52	0	0	0
-1	142		0.55	0.77	?	?	+
66-0	53	0.37	0.73	0.80	0	0	0
-1	82	0.44	0.80	0.93	+	+	+
67-0	82	0.39	0.52	0.57	0	0	0
-1	117	0.38	0.63	0.67	0	+	+

Datum van bereiding	Melk genomen op ... dagen na kalven	Opmerkingen
7-1-1954		
-		Toegevoegd 50 gamma Cu per liter room
20-2-1954	3	Nieuwe melk
-		Toegevoegd 40 gamma Cu per liter room
25-2-1954	4; 8	Nieuwe melk
-		Toegevoegd 50 gamma Cu per liter room
4-3-1954	5; 17	Nieuwe melk
-		Toegevoegd 25 gamma Cu per liter room
-		Toegevoegd 50 gamma Cu per liter room
5-3-1954		
-		Toegevoegd 25 gamma Cu per liter room
-		Toegevoegd 50 gamma Cu per liter room
12-3-1954	7; 18	Nieuwe melk
-		Toegevoegd 50 gamma Cu per liter room
18-3-1954	4; 30	Nieuwe melk
-		Toegevoegd 25 gamma Cu per liter room
-		Toegevoegd 50 gamma Cu per liter room
-		Toegevoegd 100 gamma Cu per liter room
7-4-1954	5; 7	Nieuwe melk
-		Id. boter niet gewassen
-		Toegevoegd 50 gamma Cu p. liter room; boter wel gewassen
3-2-1955		Nieuwe melk; boter niet gewassen
24-2-1955	4	Nieuwe melk
25-2-1955	4	Nieuwe melk
-	5	Nieuwe melk
1-4-1955	10	Nieuwe melk; boter niet gewassen
-		Toegevoegd 50 gamma Cu p. liter room; boter wel gewassen
21-4-1955	5	Nieuwe melk; boter niet gewassen
-		Toegevoegd 30 gamma Cu p. liter room; boter wel gewassen
-	5	Nieuwe melk; boter niet gewassen
28-4-1955	5	Nieuwe melk; boter niet gewassen
19-1-1956		
-		Toegevoegd 33 gamma Cu per liter room
-		Toegevoegd 133 gamma Cu per liter room
3-2-1956		Nieuwe melk; boter niet gewassen
-		Toegevoegd 40 gamma Cu p. liter room; boter niet gewassen
18-2-1956	11	Nieuwe melk; boter niet gewassen
23-2-1956	17	Nieuwe melk; boter niet gewassen
23-2-1956	13	Nieuwe melk; boter niet gewassen
24-2-1956	9	Nieuwe melk; boter niet gewassen
1-3-1956	14	Nieuwe melk; boter niet gewassen
-		Toegevoegd 50 gamma Cu p. liter room; boter niet gewassen
1-3-1956	19	Nieuwe melk; boter niet gewassen
-		Toegevoegd 50 gamma Cu per liter room
15-3-1956	9; 12	Nieuwe melk; boter niet gewassen
-		Toegevoegd 50 gamma Cu per liter room
29-3-1956	10	Nieuwe melk; boter niet gewassen
-		Toegevoegd 50 gamma Cu per liter room

TABEL 11. Een vergelijking tussen van nature aanwezig koper en toegevoegd koper

Boter met hoog natuurlijk kopergehalte							
Boter nr.	Cu-gehalte van de boter gamma per kg	Smaak na			Peroxydgetal		
		3 mnd	6 mnd	9 mnd	3 mnd	6 mnd	9 mnd
30 - 0	102	0	0	0	0.40	0.48	0.71
31 - 0	94		0	0		0.48	0.68
35 - 0	94		0	0		0.57	0.84
36	95		0	0	0.85	0.89	0.99
59 - 0	105	0	0	?	0.46	0.67	1.02
60	135	0	0	0	0.43	0.80	1.10
61	85	0	0	0	0.34	0.50	0.63
62	120	0	0	0	0.50	0.81	1.02
63	100	0	0	0	0.20	0.55	0.67
64 - 0	100	0	0	0		0.42	0.34
65 - 0	99	0	0	0		0.58	0.52
67 - 0	82	0	0	0	0.39	0.52	0.57

Uit de proeven, waarbij kleine hoeveelheden toegevoegd koper zijn toegepast, blijkt, dat zelfs in die gevallen, waarbij het kopergehalte van de boter door toevoeging van koper met 25 gamma per kg steeg al een duidelijke toename van de gevoeligheid voor het koelhuisgebrek viel waar te nemen. Ook in die gevallen, waar sprake was van een hoog natuurlijk kopergehalte bleek bij dergelijke geringe toevoegingen van koper een duidelijke toename van de gevoeligheid voor het ontstaan van koelhuisgebreken.

In tabel 11 zijn enkele voorbeelden nogmaals vermeld.

Het verschil in invloed tussen het van nature aanwezige koper en het toegevoegde koper werd nog gedemonstreerd door middel van volgende proeven (zie tabel 11a). Drie porties boter werden als volgt bereid:

1. Uitgegaan werd van melk van nieuwmelkse koeien met een hoog gehalte aan natuurlijk koper. Deze melk lieten we opromen. De zo verkregen room werd op de gebruikelijke wijze gepasteuriseerd, gezuurd en gekarnd (NN).
2. Aan een gedeelte van de onder 1 verkregen room werd ondermelk toegevoegd, verkregen door melk van oudmelkse koeien te laten opromen. De room en de ondermelk werden wederom te romen gezet. De room, die we verkregen werd op de gebruikelijke wijze tot boter verwerkt (NO).
3. Boter werd bereid als onder 2 beschreven, echter werd nu alvorens de ondermelk aan de room werd toegevoegd een hoeveelheid koper bij de ondermelk gevoegd (NO₁).

TABEL 11a. Een vergelijking tussen van nature aanwezig koper en toegevoegd koper

Boter nr.	Kopergehalte van de boter gamma per kg	Beoordeling van de boter
83 - NN	103	na 9 mnd geen koelhuisgebreken
- NO	37	na 9 mnd geen koelhuisgebreken
- NO ₁	56	na 9 mnd. iets vetig
85 - NN	83	na 9 mnd geen koelhuisgebreken
- NO	57	na 9 mnd geen koelhuisgebreken
- NO ₁	75	na 3 mnd. beginnend koelhuisgebrek

Boter met toegevoegd koper

Boter nr.	Cu-gehalte van de boter gamma per kg		Smaak na			Peroxydgetal		
	na toev.	zond.toev.	3 mnd	6 mnd	9 mnd	3 mnd	6 mnd	9 mnd
12 - 1	127	32	+	+	+			0.77
13 - 1	134	49	+	++	++			0.93
16 - 1	117	33	+	+	++			
21 - 1	86	19	0	++	++		0.90	0.93
28 - 1	105	73		+	++		0.78	
30 - 1 A	118	102	?	+	+	0.48	0.55	0.77
32 - 1	128	59		++	++		0.78	0.92
33 - 1 B	97	52		+	++		0.62	0.79
35 - 1	119	94		+	+		0.69	0.85
45 - 1	133	40	++		+++	0.76		1.08
53 - 1	103	37	++	++	++		1.12	1.52
66 - 1	82	53	+	+	+	0.44	0.80	0.93
67 - 1	117	82	0	+	+	0.38	0.63	0.67

Hoewel dus niet alle boters onder invloed van een bepaalde hoeveelheid koper op dezelfde wijze veranderingen zullen vertonen, kunnen we toch naar aanleiding van voorgaande proeven enkele algemene conclusies trekken: Koper, dat door besmetting in de boter terecht komt heeft in tegenstelling tot het van nature in de melk aanwezige koper een zeer schadelijke invloed op de smaak van koelhuisboter. Het is mogelijk boter te bereiden met een zeer hoog gehalte aan natuurlijk koper, zonder dat koelhuisgebreken gaan optreden. Daarentegen blijken zeer kleine infecties met koper – soms van 25 gamma per kg boter – een duidelijke schadelijke invloed te hebben op de kwaliteit van de boter.

In de praktijk zal het van nature in de boter aanwezige koper nooit die extreme waarden bereiken, die wij bij onze proeven vonden. Wel zal misschien de invloed van de melk van veel nieuwmelkse koeien in het voorjaar merkbaar kunnen zijn aan het gehalte aan natuurlijk koper in de boter. Dit kopergehalte zal o.a. ook afhangen van de bewerking van de boter: b.v. het al of niet wasen van de boter, het vetgehalte van de room. Over het algemeen zal het gehalte aan koper niet hoger dan 50 gamma per kg boter zijn.

In verband met wat in het voorgaande is gezegd over het kopergehalte van boter willen we aandacht besteden aan de door het Zuivel Kwaliteitscontrôle Bureau gestelde eisen aan het kopergehalte van boter. Het recht tot het gebruik van het kwaliteitsmerk hangt nl. sinds 1953 niet alleen af van de resultaten van de organoleptische keuring, doch ook van het kopergehalte van de boter. De eisen, die aan het kopergehalte gesteld worden zijn in de loop der jaren drastisch verlaagd:

	voor de periode van 1/5-31/10	voor de periode van 1/11-30/4
ingaaude 1 mei 1952	135 gamma per kg boter	175 gamma per kg boter
1 sept. 1955	110 " " " "	150 " " " "
1 sept. 1956	90 " " " "	130 " " " "
1 jan. 1958	80 " " " "	120 " " " "
1 mei 1959	70 " " " "	100 " " " "

Bij het steeds verlagen van deze grenzen zal men tot een punt komen, dat men de grens niet verder kan verlagen, omdat men rekening moet houden met de variaties, die in het gehalte aan natuurlijk koper kunnen optreden. Misschien is deze grens al bereikt of zelfs overschreden. Immers het mag nooit de bedoeling van het Z.K.B. zijn om door middel van het stellen van normen invloed uit te oefenen op de bereidingswijze.

Toch is het mogelijk zodanige variaties in de bereidingswijze toe te passen, dat dit duidelijk merkbaar is aan het kopergehalte van de boter. Zo zal iedere bereidingswijze, die tengevolge heeft, dat veel bestanddelen van de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes en veel eiwit in de boter terecht komen, gepaard gaan met een hoger gehalte aan natuurlijk koper. Na wat in hoofdstuk 3 gezegd is over de variatie van het gehalte van melk aan koper lijkt het ons niet juist om een afzonderlijke grens voor de winterperiode en voor de zomerperiode te stellen. Dat het gehalte van boter aan koper des winters in de regel hoger ligt, kan alleen maar verklaard worden, doordat in de winterperiode relatief grotere besmettingen met koper plaatsvinden (kleinere hoeveelheden melk). Door nu in deze periode hogere grenzen voor het kopergehalte te stellen wordt een dergelijke situatie zelfs min of meer getolereerd.

Bovenstaande argumenten en het hierna volgende doen ons afvragen, of een dergelijke maatregel wel voldoende nuttig effect heeft. De maatregel zal tot gevolg hebben, dat men in vele gevallen al tevreden is, wanneer het kopergehalte van de boter even beneden de gestelde grens is. Meestal is dit niet het meest wenselijke kopergehalte. Men dient ernaar te streven de kopergehalten zo laag mogelijk te houden door infecties met koper te voorkomen. Hoe hoog dit gehalte dan wel moet zijn is nooit met zekerheid te zeggen. Het kan beduidend onder de gestelde grens liggen. Vele boters hebben een kopergehalte van ± 20 gamma per kg. Bij een vrij belangrijke koperbesmetting zou men toch nog beneden de vastgestelde norm kunnen blijven, met een grote kans op geringe duurzaamheid van de boter. Daarentegen is het mogelijk boter met goede duurzaamheid te bereiden zonder dat van besmetting met koper sprake is, terwijl men toch boven de gestelde grens komt b.v. door boter niet te was- sen en door uit te gaan van een beperkte hoeveelheid melk, welke afkomstig is van nieuwmelkse koeien.

Het zou van groot belang zijn, indien we over een methode beschikten om het actieve koper in de boter te bepalen. Uit het volgend hoofdstuk zal blijken, dat dit niet op eenvoudige wijze te verwezenlijken is.

5. DE WIJZE, WAAROP KOPER EN IJZER IN MELK VOORKOMEN

5.1. INLEIDING

De onderzoekingen over de invloed van metalen op koelhuisgebreken bij boter hebben vooral naar voren doen komen, dat zeer kleine hoeveelheden koper toegevoegd aan melk of room schadelijk zijn voor de duurzaamheid van de boter; dit in tegenstelling tot het van nature in de melk aanwezige koper. De vraag was nu hoe dit verschil in gedrag tussen het van nature aanwezige koper en het toegevoegde koper is te verklaren. Aan het koper zelf kan het niet liggen, mogelijk wel aan de vorm, waarin het koper in de melk voorkomt. Daarbij zat bij ons de gedachte voor, dat indien het van nature aanwezige koper en het toegevoegde koper duidelijk zouden verschillen in hun wijze van vóór-

komen, dit zou kunnen leiden tot een bepalingmethode, waarbij onderscheid gemaakt zou kunnen worden tussen de beide wijzen van vóórkomen.

Om een indruk te krijgen op welke wijze koper in de melk voorkomt werd eerst aandacht besteed aan: de vetphase. Vervolgens werd aan de hand van oproomproeven nagegaan hoe het staat met de verdeling van het koper over de verschillende melkbestanddelen, waarbij vooral aandacht werd besteed aan de melkvetbolletjes met hun oppervlaktelaagjes enerzijds en het melkplasma anderzijds. Tenslotte werd het melkplasma nog aan een nader onderzoek onderworpen. Hierbij was o.a. van belang de vraag of er al of niet koper in ionvorm voorkomt.

Daar wij, zoals uit hoofdstuk 3 blijkt, al aandacht hadden besteed aan het gehalte van melk aan ijzer, was er voor ons aanleiding ook aan de verdeling van ijzer in melk de nodige aandacht te besteden. Zo werd door middel van een aantal oproomproeven getracht inzicht te verkrijgen in de verdeling van dit metaal over de verschillende bestanddelen van de melk.

5.2. HET KOPER IN DE MELK (LITERATUUROVERZICHT)

De vraag op welke wijze de metalen in melk en zuivelproducten voorkomen werd reeds door verscheidene onderzoekers op verschillende wijze belicht. Voor het kopergehalte van het vet worden over het algemeen zeer lage waarden opgegeven, b.v.

MAC ILROY (53)	: sporen koper.
VAN DER WAARDEN (80)	: geen koper.
DEN HERDER & KROL (34)	: 25 gamma koper per kg vet.
TOLLENAAR (77)	: 10 tot 40 gamma koper per kg vet, meestal 10 tot 20 gamma per kg.

De gevonden waarnemingen zijn over het algemeen weinig met elkaar in overeenstemming.

Door TOLLENAAR (77) is aangetoond, dat het mogelijk is het koper van de boter grotendeels in de vetphase op te hopen door toevoeging van bepaalde chemische verbindingen, die in staat zijn met koper in vet oplosbare complexen te vormen.

Over de wijze van voorkomen van koper in melk is aandacht besteed door RICE & MISCALL (64), en later door DAVIES (20).

RICE & MISCALL (64) beweren, dat wanneer melk – besmet met koper – wordt gecentrifugeerd de hoeveelheid koper in ondermelk en room zich verdeelt in verhouding tot de hoeveelheid water, die deze producten bevatten. Zij trekken hieruit de voorbarige conclusie, dat het koper in de waterphase is opgelost en daar het koper niet met het vet is meegegaan, menen zij, dat er geen koper in het vet is opgelost.

DAVIES (20) komt op grond van zijn proeven tot de conclusie, dat koper gebonden is aan het eiwit van de melk. Uit dialyseproeven met behulp van collodionmembranen wordt de conclusie getrokken, dat in gezuurde melk een gedeelte van het koper in ionvorm voorkomt. DAVIES werkt bij zijn proeven met melk, waarvan het gehalte aan koper wel uitzonderlijk hoog is (13 mg per kg of meer). Dit zijn niet de kopergehalten waar we in de praktijk mee te maken hebben. Tegen dialyseproeven is een aantal bezwaren in te brengen, hierop zal onder 5.2.3. nader ingegaan worden.

Volgens MCILROY (53) komt in serum van boter (uit niet gezuurde room bereid) geen vrij koper voor.

HARTMANN (32) ging na hoe het koper verdeeld is over de verschillende bestanddelen in de melk. Hiertoe werd aan melk, die 75 gamma koper per 200 ml bevatte, een gelijke hoeveelheid 1% azijnzuuroplossing toegevoegd. Door centrifugeren werd de caseïne fractie afgescheiden, door hittecoagulatie de albumine-globuline fractie. Door opromen verkregen room werd gekarnd. De verkregen boter werd door smelten bij 40 °C gescheiden in vetfractie en eiwitfractie. Hij vond, dat de 75 gamma koper als volgt over de verschillende fracties was verdeeld:

caseïne fractie	7 gamma =	117 gamma % van de fractie					
albumine-globuline fractie	20 gamma =	2000	„	„	„	„	„
serum	40 gamma =	23	„	„	„	„	„
vetfractie	0.5 gamma =	6	„	„	„	„	„
eiwitfractie van de boter	0.75 gamma =	750	„	„	„	„	„

Wij moeten ons hier echter afvragen in hoeverre als gevolg van het toepassen van de kunstgrepen deze verdeling nog in overeenstemming is met de oorspronkelijke toestand.

VAN DER WAARDEN (80) ging de koperverdeling in boterserum van gezuurde boter na; door ultrafiltratie werd eerst de waterphase gescheiden, vervolgens werd de kolloidale phase met behulp van petroleumaether in twee fasen gescheiden. Vóór deze behandeling werd Cu-zout aan het boterserum toegevoegd. VAN DER WAARDEN vond globaal de volgende verdeling:

- ± 6% van het koper komt in de waterphase voor,
- ± 35% in de fosfatidephase,
- ± 60% in de eiwitphase.

Ook kwam VAN DER WAARDEN tot de conclusie, dat toegevoegd koper op dezelfde wijze over de verschillende fasen is verdeeld als het oorspronkelijk aanwezige koper. Op deze gang van zaken is wel enige critiek uit te oefenen. In de eerste plaats komt het ons wenselijk voor, wanneer men koper toevoegt, dit te doen aan het niet gezuurde product. Immers – hoewel besmetting van gezuurde room of boter met koper niet uitgesloten is, is de besmettingskans in het veel grotere traject, dat het product doorloopt alvorens gezuurd te zijn in het algemeen groter. Doordat de eiwitten van de melk in het gezuurde product in geheel andere toestand verkeren dan in het niet gezuurde product, zou het kunnen zijn, dat ook de bindingseigenschappen ten aanzien van koper verschillend zijn. Ook VAN DER WAARDEN past dus een chemische behandeling toe, waarvan de gevolgen niet geheel te overzien zijn. Ook tegen dialyseproeven zijn bezwaren in te brengen (zie later). Zo is het niet zeker, dat al het dialyseerbare koper ook werkelijk vrij koper is. Voorts wordt de hoeveelheid koper in de waterphase bij boter, waaraan geen koper werd toegevoegd, bepaald door extrapoleren van de cijfers verkregen bij de hogere kopergehalten (dus na toevoeging van Cu). Hierdoor wordt dus kunstmatig de mogelijkheid, dat toegevoegd koper op andere wijze zou voorkomen als het van nature aanwezige koper, uitgeschakeld.

ALLAN (3) meent uit zijn proeven, waarbij gebruik gemaakt wordt van ascorbinezuur-oxydatie, te moeten concluderen, dat de wijze van binding van oorspronkelijk en toegevoegd koper in melk niet dezelfde is.

Door MULDER & KOPPEJAN (58) werd door middel van opzooiproeven reeds aangetoond, dat van nature in melk aanwezig koper voor een gedeelte voorkomt in de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes. Het percentage van het totaal in de melk aanwezige koper, dat zich op de vetbolletjes bevindt blijkt vrij sterk te variëren; gevonden werd 4 tot 43%, verreweg de meeste uitkomsten liggen tussen 10 en 25%. Het overige koper bevindt zich dus in het melkplasma. Het ogenschijnlijk geringe percentage, dat zich op de vetbolletjes bevindt is echter van grote betekenis. Gaan we er namelijk van uit, dat de vetphase praktisch geen koper bevat, dan betekent dit dat vrijwel al het op de vetbolletjes aanwezige koper zich bevindt in de zeer dunne oppervlaktelaagjes hiervan. De concentratie van dit metaal is hier dus zeer hoog.

Door gebruik te maken van radioactief koper en toepassing van elektroforese vonden Duitse onderzoekers (49), dat koper hoofdzakelijk op een eiwitfractie van de melk geaccumuleerd is.

5.2.1. Het gehalte van botervet aan koper

Onderzoekingen over het gehalte van botervet aan koper hebben uitgewezen, dat dit gehalte zeer gering of nihil is. De principiële vraag, of er al dan niet koper in het botervet voorkomt, was dus nog niet beantwoord. Over het algemeen werden de conclusies gebaseerd op zeer gering aantal analyses.

Teneinde over een aantal cijfers te beschikken werden in totaal 21 bepalingen gedaan in het botervet van 13 verschillende boters. De boter werd verwarmd tot 55 °C en gecentrifugeerd in een buizencentrifuge. Het zo verkregen botervet werd overgeschonken in andere centrifugebuizen en wederom op een temperatuur van ± 55 °C gebracht en gecentrifugeerd. Van het botervet werd steeds ± 50 gram in onderzoek genomen. Het botervet werd onderzocht volgens de methode van de droge verassing.

TABEL 12. Onderzoek van botervet op gehalte aan koper

Transmissiewaarden van de Tetra-extracten	Kopergehalte van de boter gamma's per kg	Dithizon in ml tetra
92.5 }		25
89 }		25
93 }		25
92.5 }		25
93 }		25
94 }		15
90 }		15
89 }		15
93.5 }		15
94 }		15
89 }		15
95.5 }		15
90 }		15
90 }		15
90 }		15
93.5 }		15
89 }		15
90.5 }	284	15
94 }	134	15
91.5 }		15
94 }	156	15
90-94	blanco	25

TABEL 13. Overzicht van de resultaten van opzooimproeven. De verdeling van koper over oppervlaktelaagjes

		A. Zonder toevoeging van koper							B. Met toevoeg			
Proef nr.		Gewicht gr.	Vet		Koper		Opvetb. 100 x	In plasma 100 y	In opp. laagjes in %	Gewicht gr.	Vet	
			%	balans gr.	gamma per kg	balans gamma's					%	balans gr.
I	M	6670	4.19	279	33.9	226	39	34		6120	4.19	256
	R	1331	18.90	252	34.8	46			4.8	1138	19.22	219
	O	5324	0.61	32	33.7	179	42	33		4974	0.79	39
	R + O			284		225						258
II	M	5647	4.60	260	45.6	258	102	43		5310	4.56	242
	R	1181	19.66	232	54.6	65			10.0	933	21.21	198
	O	4466	0.63	28	44.0	197	99	44		4377	1.01	44
	R + O			260		262						242
III	M	9060	4.31	390	35.9	325	110	30				
	R	1660	19.66	326	43.0	71			12.0			
	O	7392	0.90	67	35.7	264	89	35				
	R + O			393		355						
IV	M	5812	3.19	185	90.9	528	109	90				
	R	798	20.36	162	94.1	75			4.1			
	O	5014	0.44	22	86.9	434	123	88				
	R + O			184		509						
V	M	10051	4.39	441	154	1551	283	148				
	R	1433	20.17	289	176	252			7.8			
	O	8611	1.74	150	155	1336	264	153				
	R + O			439		1588						
VI	M	5620	4.08	229	115	649	212	111		4310	4.08	176
	R	703	24.97	176	136	96			7.6	575	24.73	142
	O	4908	1.13	55	109	536	218	108		3728	0.95	35
	R + O			231		632						177
VII	M	5245	3.80	199	26.4	139	151	22		5502	3.80	209
	R	808	20.45	165	45.7	38			22.5	804	21.65	174
	O	4486	0.61	27	24.6	110	156	24		4700	0.64	30
	R + O			192		148						
VIII	M	4694	3.54	166	18.4	86	92	16		5850	3.54	207
	R	680	19.30	131	30.5	21			17.3	980	18.35	180
	O	4010	0.90	36	17.2	69	83	17		4867	0.59	27
	R + O			167		90						207
IX	M	4461	4.90	219	20.4	91	81	17		5564	4.90	273
	R	926	19.40	180	29.7	28			20.6	1158	19.45	225
	O	3532	1.07	38	17.4	61	86	16		4400	1.10	48
	R + O			219		89						273
X	M		5.17		23.3		93	19.5			5.17	
	R		15.60		31.0				20.6		17.70	
	O		1.14		20.9		90	20			0.92	

koper					C. Met toevoeging van koper							
Koper		Opvetb. 100 x	In plasma 100 y	In opp. laagjes in %	Gewicht gr.	Vet		Koper		Opvetb. 100 x	In plasma 100 y	In opp. laagjes in %
nma kg	balans gamma's					%	balans gr.	gamma per kg	balans gamma's			
86	524	59	87	3.1	5243	4.19	220	533	2795	104	550	0.8
81	92				1000	19.22	192	472	472			
84	418	69	84		4235	0.61	26	557	2359	110	560	
	510						218		2831			
99	524	106	98	5.1	4950	4.61	228	536	2651	372	544	3.2
00	93				966	19.99	193	509	492			
97	425	112	97		3984	0.78	35	606	2412			
	518						228		2904			
					9703	4.31	418	566	5493	501	569	4.3
					1886	19.08	360	559	1054			
					7817	0.80	63	635	4964	617	639	
							423		6018			
					4410	3.19	141	575	2535	504	577	2.4
					678	18.83	128	564	382			
					3725	0.36	13	603	2244	375	603	
							141		2626			
					9152	4.39	402	664	6077	609	667	4.3
					1303	20.43	266	655	853			
					7843	1.62	127	646	5067	693	645	
							393		5920			
220	947	292	216	5.4	4423	4.06	180	645	2855	543	650	3.6
235	135				625	23.75	148	624	390			
221	824	288	218		3780	0.85	32	631	2385	603	631	
	959						180		2775			
187	1030	245	185	4.9								
196	158											
179	844	241	179									
171	1000	305	166	6.4								
192	188											
166	808	312	165									
	996											
171	954	141	173	4.4								
167	194											
166	733	166	166									
	927											
114		151	112	7.0								
119												
112		155	111									

Bij zeer geringe kopergehalten zijn de variaties in de blancobepaling van relatief grote invloed op de nauwkeurigheid van de bepaling. De transmissiewaarden van de blanco varieerden bij onze proeven van 90 tot 94 (gemiddeld 92). Bij een aantal bepalingen werd 15 ml dithizonoplossing in tetra gebruikt; gewoonlijk gebruikten we nl. 25 ml van de dithizonoplossing. In tabel 12 worden de gevonden transmissiewaarden opgegeven. Van enkele boters was het kopergehalte bekend, dit wordt in tabel 12 tevens vermeld.

Het blijkt, dat practisch alle waarnemingen binnen de waarden voor de blanco liggen. Uit de gevonden waarden kan dus de conclusie worden getrokken dat botervet geen koper bevat.

5.2.2. *Het koper in de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes*

Om na te gaan op welke wijze koper over de verschillende bestanddelen in melk verdeeld is, werd in de eerste plaats gebruik gemaakt van een door MULDER (55) geïntroduceerde methode. Door middel van deze methode is het mogelijk door berekening uit de gehalten van bij een oproomproef verkregen room en ondermelk en ook van de volle melk, het gehalte aan een bepaald bestanddeel b.v. koper in de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes te weten te komen. Deze methode heeft boven alle andere wijzen van uitvoering het voordeel, dat de oppervlaktelaagjes in hun natuurlijke toestand blijven; terwijl we ervan verzekerd kunnen zijn, dat niet als gevolg van toevoeging van chemicaliën bepaalde ongewenste veranderingen zijn opgetreden.

Uiteraard dienen bij de proeven die ten doel hebben de verdeling van het metaalgehalte te bestuderen, de nodige voorzorgen in acht te worden genomen om koperinfectie te voorkomen. De gehele behandeling geschiedde dan ook in van te voren koper vrij gemaakt glaswerk.

De proef werd als volgt uitgevoerd: Melk werd in een glazen vat gedurende de nacht op een koele plaats gezet; dit geschiedde bij voorkeur in een bak met gekoeld water. De volgende morgen was de melk opgeroomd en werd de ondermelk met behulp van een hevel verwijderd. De hoeveelheden volle melk, room en ondermelk werden gewogen. De vetgehalten van volle melk, room en ondermelk werden bepaald, evenals de kopergehalten.

De hoeveelheid koper op de vetbolletjes aanwezig werd nu met de volgende formules berekend:

1. $V_m x + (100 - V_m) y = A_m$
2. $V_r x + (100 - V_r) y = A_r$
3. $V_o x + (100 - V_o) y = A_o$

Formule 1 heeft betrekking op de volle melk, formule 2 op de room, formule 3 op de ondermelk. In deze formule is:

x het gehalte van de vetbolletjes aan koper,
 y het gehalte van het melkplasma aan koper,

V_m het vetgehalte van de volle melk, A_m het kopergehalte van de volle melk,
 V_r " " " " room, A_r " " " " room
 V_o " " " " ondermelk, A_o " " " " ondermelk.

We hebben hier drie vergelijkingen met twee onbekenden. Door 1 met 2 te combineren en door 3 met 2 te combineren kunnen we dus tweemaal de waarde voor x en y berekenen. Door het opstellen van balanssen voor vet en koper hebben we bovendien nog een controle op de juistheid van de analyses.

Daar wij zowel geïnteresseerd waren in de wijze van voorkomen van het van nature aanwezige koper als van het toegevoegde koper werd de koper-verdeling nagegaan bij melk, waaraan geen koper was toegevoegd en daarnaast bij dezelfde melk, waaraan wel koper was toegevoegd.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 13. De onder A vermelde proeven zijn uitgevoerd met melk, waaraan geen koper was toegevoegd, de onder B en C vermelde proeven met melk, waaraan wel koper was toegevoegd.

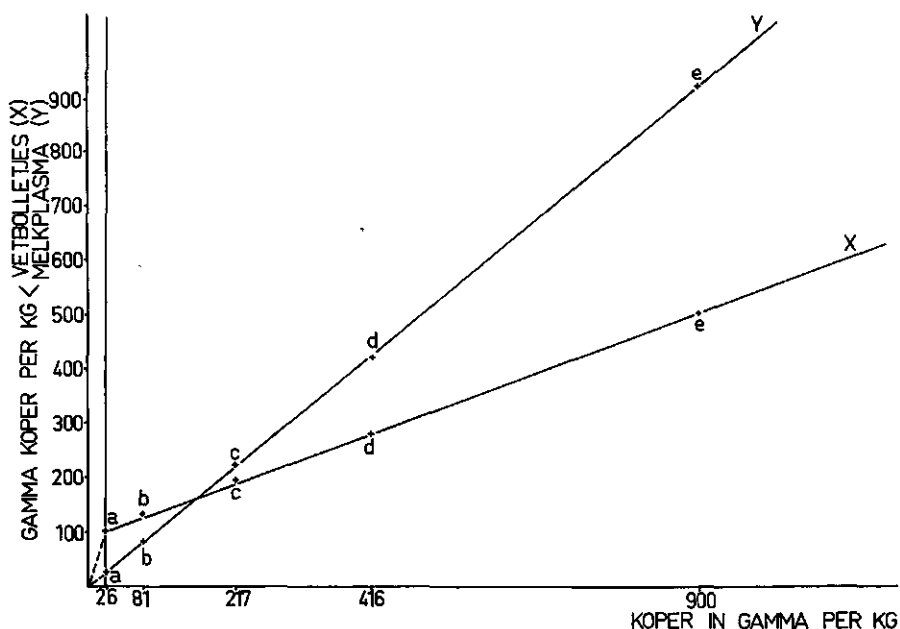
De cijfers van de tabel geven het volgende te zien:

- 1e de hoeveelheid koper, die van nature op de vetbolletjes aanwezig is, varieert van 4.1 tot 22.5% van de totaal in de melk aanwezige hoeveelheid koper.
- 2e er blijkt geen duidelijk verband te bestaan tussen het percentage van de totale hoeveelheid aanwezige koper, dat op de vetbolletjes geaccumuleerd is en het gehalte van de melk aan koper.
- 3e toevoeging van koper aan de melk geeft in alle gevallen een verhoging van de hoeveelheid koper op de vetbolletjes (x) doch vooral van de hoeveelheid koper in het melkplasma.
- 4e het percentage van de hoeveelheid koper dat op de vetbolletjes is geaccumuleerd blijkt echter na toevoeging van koper lager te zijn. Dit percentage wordt kleiner naarmate meer koper is toegevoegd.

Tenslotte vermelden wij nog een oproomproef XI, waarbij aan de melk vier verschillende hoeveelheden koper werden toegevoegd. In totaal werden zo dus vijf proeven gedaan. De resultaten van deze proeven worden in tabel 14 weergegeven.

TABEL 14. Proef XI. Oproomproeven bij melk, zonder toegevoegd koper (a) en met verschillende hoeveelheden toegevoegd koper (b t/m e)

Nr.		Gewicht gr.	Vet		Koper		Op vetb. 100 x	In plasma 100 y	In opp. laagjes %
			%	balans gr.	gamma per kg	balans gamma's			
a.	M	4966	3.28	163	25.8	128	94	23.5	12.7
	R	454	25.11	114	42.8	19			
	O	4512	0.91	41	22.7	102	105	22	
	R + O			155		121			
b.	M	5031	3.28	165	81	408	128	79	5.3
	R	544	23.84	130	91	50			
	O	4487	0.73	33	77	346	132	77	
	R + O			163		396			
c.	M	5037	3.28	165	217	1093	197	218	2.9
	R	544	22.22	121	213	116			
	O	4493	0.84	38	219	984	191	219	
	R + O			159		1100			
d.	M	4982	3.28	163	416	2073	267	421	2.2
	R	579	22.10	128	390	226			
	O	4403	0.72	32	418	1840	290	418	
	R + O			160		2066			
e.	M	5672	3.28	186	900	5105	526	913	1.6
	R	720	20.36	147	834	600			
	O	4952	0.66	33	923	4571	471	926	
	R + O			180		5171			



GRAFIEK 7. De bij oproomprouwen gevonden waarden voor x en y. De invloed van toevoeging van opklimmende hoeveelheden koper.

In grafiek 7 zijn de resultaten van deze proef als volgt weergegeven. Op de X-as is uitgezet; het kopergehalte van de melk in gamma/kg en op de Y-as resp. de gevonden waarden voor x (in gamma/kg vetbolletjes) en de waarden voor y (in gamma/kg plasma).

Duidelijk wordt hierdoor gedemonstreerd, dat van het natuurlijk koper relatief meer op de vetbolletjes aanwezig is dan van het toegevoegd koper. Deze proef bevestigt dus op duidelijke wijze de algemene tendens, die we bij voorgaande proeven (I t/m X) reeds geconstateerd hadden.

In bovengenoemde tabellen werd aangegeven hoeveel procent van het totaal in de melk aanwezige koper – ook na toevoeging van koper – aan de oppervlaktelaagjes van de vetbolletjes gebonden is. In tabel 15 wordt voor

TABEL 15. Percentage van de toegevoegde hoeveelheid koper, dat op de vetbolletjes bijgekomen is

	b	c	d	e
I	2.3	0.5		
II	0.6	2.5		
III		3.7		
IV		2.2		
V		3.2		
VI	2.9			
VII	4.5			
VIII	5.1			
IX	2.3			
X	3.5			
XI	1.9	1.6	1.5	1.5

dezelfde proeven aangegeven hoe groot het percentage van de toegevoegde hoeveelheid koper is, dat er op de vetbolletjes bijgekomen is als gevolg van de toevoeging.

We mogen aannemen, dat aan deze cijfers relatief grote fouten kunnen kleven. Het is echter duidelijk, dat ze alle van dezelfde grootte-orde zijn. Dit betekent dus, dat wanneer wij koper aan de melk toevoegen een vrij constant percentage hiervan steeds op de vetbolletjes terecht komt. De cijfers variëren van 0.6 tot 5.1. Gemiddeld werd gevonden 2.5%.

De resultaten van deze oproomprouven samenvattend kunnen we het volgende zeggen:

het van nature in de melk aanwezige koper komt hierin voor, gedeeltelijk – en wel voor het grootste gedeelte – in het melkplasma, gedeeltelijk op de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes. Gemiddeld vonden wij voor de verhouding plasma – vetbolletjes ongeveer 85 : 15. De op het eerste gezicht zo kleine hoeveelheid koper, die op de vetbolletjes aanwezig is, is hier echter verzameld in de oppervlaktelaagjes; dit betekent dus, dat hier de concentratie aan koper zeer hoog is. Voegen we koper aan melk toe, dan verdeelt dit koper zich over melkplasma en oppervlaktelaagjes der vetbolletjes, echter in een andere verhouding dan het van nature aanwezige koper. De hoeveelheid koper, die nu op de vetbolletjes wordt geaccumuleerd, is ten opzichte van de totale hoeveelheid koper duidelijk minder. Door berekening werd aannemelijk gemaakt, dat van het toegevoegde koper een vrij constant percentage ($\pm 2.5\%$) steeds op de vetbolletjes terecht komt.

De bij de oproomprouven gevonden resultaten zijn verkregen door combineren van verschillende analysecijfers. Het is niet voldoende dat aangetoond wordt, dat de analyses nauwkeurig kunnen worden uitgevoerd; ook dient nagegaan te worden in hoeverre de door berekening verkregen resultaten door analysefouten beïnvloed kunnen worden. Over de reproduceerbaarheid der analyses werd reeds in hoofdstuk 2 meegedeeld. Ook uit de bij de oproomprouven uitgevoerde balansberekeningen blijkt, dat de toegepaste methoden aanvaardbaar zijn.

Om te beoordelen in hoeverre de toegepaste combinatie der cijfers aanleiding zou kunnen geven tot fouten in het eindresultaat werd een foutenberekening toegepast. Hierbij werd gebruik gemaakt van een methode van POSTMA, zoals die door MULDER werd beschreven (55).

De foutenberekening werd toegepast op de volgende combinaties van vergelijkingen:

- I (volle melk en room met laag kopergehalte).
 $4x + 96y = 36$ (volle melk)
 $20x + 80y = 43$ (room)
- II (ondermelk en room met laag kopergehalte).
 $1x + 99y = 36$ (ondermelk)
 $20x + 80y = 43$ (room)
- III (volle melk en room met hoog kopergehalte).
 $4x + 96y = 99$ (volle melk)
 $20x + 80y = 100$ (room)

De resultaten van de foutenberekening der vergelijkingen worden weergegeven in de figuren I, II en III (grafiek 8). Hierin is:

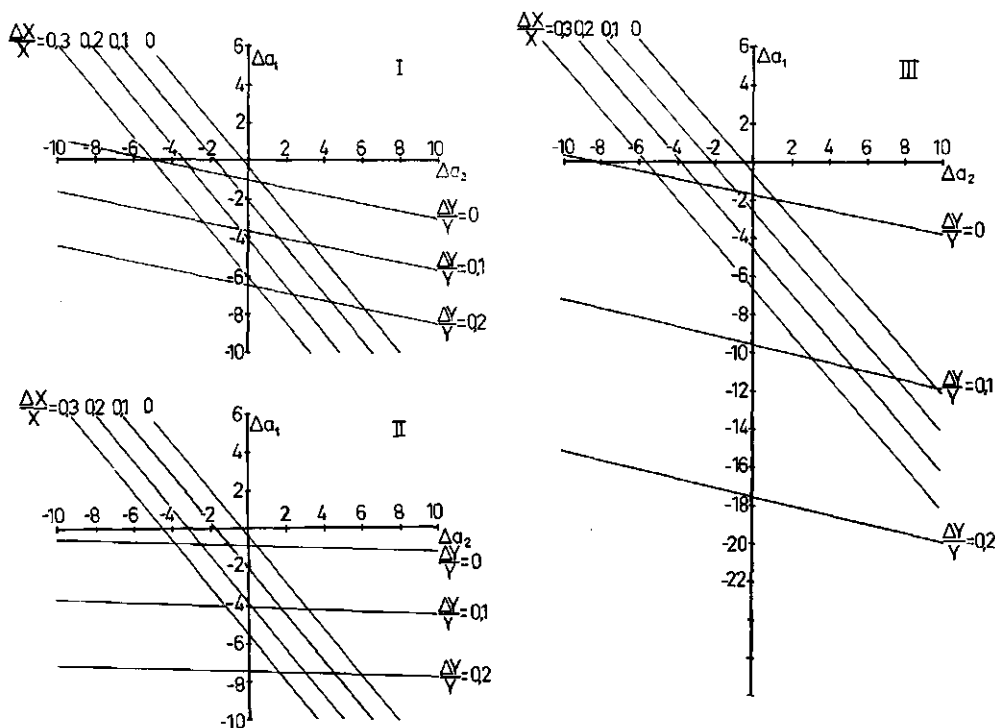
Δa_1 de absolute fout van a_1 (= kopergehalte van ondermelk of volle melk).
 Δa_2 de absolute fout van a_2 (= kopergehalte van de room).
 $\Delta y/y$ de relatieve fout in de y -waarde.
 $\Delta x/x$ de relatieve fout in de x -waarde.

Beschouwen we eerst de figuren, die betrekking hebben op de lagere kopergehalten (fig. I en II). Het blijkt, dat bij een absolute fout van 4 voor a_1 en ook een absolute fout van 4 voor a_2 een fout van 45% in de x -waarde mogelijk is. Deze fout wordt nl. bereikt als de analysefouten van hetzelfde teken zijn, dus of beide te hoog of beide te laag. Onder de gegeven omstandigheden zal dit wel de uiterste fout zijn, die bereikt kan worden.

Bij de hogere kopergehalten (fig. III) komen de lijnen voor $\Delta x/x$ iets verder uiteen te liggen. De kans, dat Δa_1 en Δa_2 — de absolute bepalingfouten — hogere waarden krijgen is echter ook groter.

Ook hier zal een fout van 45% in de x -waarde ongeveer het uiterste zijn wat bereikt kan worden. De analysefouten van room beïnvloeden in iets sterkere mate de fout in de x -waarde dan de analysefouten van ondermelk of volle melk.

De waarden voor y blijken door de analysefouten in veel geringer mate be-



GRAFIEK 8. Oproomproeven voor koper. Het verband tussen de nauwkeurigheid van de analysemethoden en de waarden voor $\frac{\Delta x}{x}$ en $\frac{\Delta y}{y}$

invloed te worden dan de waarden voor x . Een fout van 10% in de y -waarde ligt bij de lagere kopergehaltenes (I en II) nog binnen de mogelijkheden. Veel grotere afwijkingen in de y -waarde zullen nauwelijks bereikt kunnen worden. Bij de hogere kopergehaltenes (fig. III) blijkt, dat een fout van 10% in de y -waarde praktisch niet meer bereikt zal worden. De fout in de y -waarde wordt hoofdzakelijk bepaald door analysefouten van ondermelk of volle melk (Δa_1) en in veel mindere mate door analysefouten van room (Δa_2).

Vergelijken we volle melk met ondermelk (dus I met II) dan blijkt er geen noemenswaardig verschil te bestaan in de fout voor de x -waarde; de fout voor de y -waarde blijkt bij ondermelk nog minder afhankelijk te zijn van de analysefouten bij room.

5.2.3. *Het koper in het melkplasma*

Nadat in het voorgaande werd aangetoond:

- 1e dat in vet geen koper voorkomt,
- 2e dat in de oppervlaktelaagjes een gedeelte van het in de melk voorkomend koper is opgehoopt,
- 3e dat het grootste gedeelte (80 à 95%) van het in de melk voorkomend natuurlijk koper in het plasma voorkomt,
- 4e dat van het toegevoegde koper een nog groter percentage in het plasma terecht komt,

vroegen wij ons af: op welke wijze het koper in het plasma voorkomt. Wij wilden dit inzicht trachten te verkrijgen door zo min mogelijk in te grijpen in de natuurlijke toestand.

De volgende proeven werden gedaan:

- 1e het caseïne werd uit de melk verwijderd door deze zuur te laten worden en het gecoaguleerde eiwit uit te centrifugeren. Hierna werd het kopergehalte van het aldus verkregen vrij troebele serum bepaald, eveneens werd caseïne verwijderd door de melk door toevoeging van stremsel te laten stremmen en vervolgens te centrifugeren,
- 2e getracht werd zoveel mogelijk eiwit uit de melk te verwijderen door de melk eerst te pasteuriseren op hoge temperatuur ($\pm 93^\circ\text{C}$); vervolgens de melk door toevoeging van zuursel te laten zuren en vervolgens het eiwit uit te centrifugeren. Op deze wijze werd een helder serum verkregen. Het kopergehalte hiervan zal bij benadering een aanwijzing geven over de hoeveelheid koper, in melkplasma aanwezig, niet gebonden aan eiwit. Het helder serum werd ook wel verkregen, door het troebel serum (als onder 1e beschreven) te bereiden, dit op 93°C te pasteuriseren en dit serum nogmaals te centrifugeren. Ook werd op deze wijze uit gestremde melk helder serum bereid. Deze proeven zijn gedaan zowel bij melk zonder als met toegevoegd koper.

De proeven als hier beschreven werden uitgevoerd met ondermelk, room en karnemelk. De resultaten zijn verzameld in tabel 16.

Naar aanleiding van de gevonden waarden kunnen we het volgende zeggen:

- a. helder serum, bereid uit melk, waaraan geen koper was toegevoegd.

De kopergehaltenes van de serums bereid uit het hoog gepasteuriseerd product, bleken steeds zeer laag te zijn. Voor de producten, waaraan geen koper werd toegevoegd, varieerde het percentage van 0 tot 21% van de totaal in melk aanwezige hoeveelheid koper (Deze cijfers behoeven uiteraard een kleine cor-

TABEL 16. Koper in serum van melk, room en karnemelk, waaraan al of niet koper was toegevoegd

	Zonder toevoeging van koper aan de melk								
	Koper- gehalte	Serum (gezuurd)				Serum (niet gezuurd)			
		Gepast.		Niet gepast.		Gepast.		Niet gepast.	
	gamma per kg	gamma per kg	%	gamma per kg	%	gamma per kg	%	gamma per kg	%
Ondermelk	77	0	0	32	41.6				
	165	8.5	5.2						
	56.5	5	8.8						
	28	3	10.7						
	23	4	17.4						
	56	2	3.6						
	286	12	4.2	35	12.2				
	55	11	20.0						
	55	7.5	13.6						
	29	6	20.7	10	34.5	6.5	22.4	7	24.
	25	4.5	18.0						
	26	3	11.5						
	113	10	8.8	20	17.7	6	5.3	33	29.
	116	-1	0.0	23	19.8	15	12.9	17	14.
	242	24	9.9						
	122	13	10.7						
	25	4	16.0						
	56								
Room	66	12	18.2	17	25.8	7	10.6	17	25.
	45	4	8.9	5	11.1	2	4.4	8	17.
	38	0	0						
	15.5								
Karnemelk	119	12	10.1						
	119	10	8.4						
	29					0	0		
	39	0	0						
	36					3	8.3		
	89	6	6.7						
	128	21	16.4						
	242	15	6.2						
	196	24	12.2						

Met toevoeging van koper aan de melk								
Serum (gezuurd)				Serum (niet gezuurd)				Koper- gehalte
Gepast.		Niet gepast.		Gepast.		Niet gepast.		
gamma per kg	%	gamma per kg	%	gamma per kg	%	gamma per kg	%	gamma per kg
13	8.4	43	37.9	14	9.1	22	14.3	154
53	15.3							346
6	11.3							53
16	19.8							81
9	7.9							114
13	6.0							217
20	4.8							416
30	3.3	43	24.4	14	8.0	25	14.2	900
12	6.8							176
3	1.0							286
34	6.8							499
10	4.4							226
11	11.0							100
22	1.9							1172
8	1.8							449
10	5.7	45	25.7	14	8.0	50	28.6	175
53	7.1							746
8	8.7							92
16	11.6							138
16	7.3							218
12	2.7							438
64	6.1							1038
87	4.3	36	15.7	14	5.5	109	14.6	2038
17	7.4							229
19	4.3							443
31	4.3							729
80	7.9							1015
36	12.7	113	11.1	177	12.7	27	7.8	283
19	7.3							1390
36	13.4							260
22	6.4							347
27	6.8							268
25	9.5							342
58	15.8							396
34	16.2							262
								367
								210

Ondermelk

Room

Karnemelk

rectie, die verband houdt met de hoeveelheid droge stof, die uitgecentrifugeerd is).

Bij de beoordeling van deze cijfers dienen we het volgende te bedenken: de gevonden kopergehaltes waren over het algemeen zeer laag: de meeste gevonden waarden liggen beneden 10 gamma per kg. De relatieve fout van deze cijfers kan dus zeer groot zijn. Het heeft daarom geen zin alle cijfers afzonderlijk aan een beschouwing te onderwerpen; wij mogen slechts aandacht besteden aan het gemiddelde van een groot aantal bepalingen te meer daar gebleken is, dat het practisch ondoenlijk is, om volgens de beschreven werkwijze een serum te bereiden, dat zo volkomen helder is, dat we er zeker van kunnen zijn, dat er totaal geen eiwit meer in aanwezig is.

De gevonden cijfers voor helder serum geven aan, dat gemiddeld $\pm 9\%$ van het van nature in melk aanwezige koper in het helder serum aanwezig is. Dit cijfer is waarschijnlijk iets te hoog.

Uit een vergelijking van de serums bereid uit gezuurde en uit niet-gezuurde melk blijkt: dat er geen uitgesproken verschil bestaat tussen de kopergehaltes van deze beide soorten serum. Hieruit wordt dus geen aanwijzing verkregen, dat koper door het zuur worden van de melk in ionvorm overgaat.

b. Het kopergehalte van helder serum bereid uit melk, waaraan koper toegevoegd was.

De hoeveelheden koper, die gevonden werden in helder serum bereid uit melk, waaraan koper werd toegevoegd liggen duidelijk hoger. Deze hoeveelheid blijkt toe te nemen naarmate meer koper toegevoegd werd. Het percentage koper van de totaal in de melk aanwezige hoeveelheid, dat in het helder serum aanwezig was, blijkt niet duidelijk af te wijken van het percentage van het serum bereid uit melk, waaraan geen koper was toegevoegd. Toch blijken deze cijfers over het algemeen iets lager te liggen bij het toegevoegde koper. Dit komt vooral tot uiting naarmate grotere hoeveelheden koper werden toegevoegd. Dit was voor ons aanleiding nog eens extra aandacht te besteden aan het helder serum van melk met toegevoegd koper. Hiertoe werd aan verschillende porties van eenzelfde melk steeds opklimmende hoeveelheden koper toegevoegd.

TABEL 17. Kopergehalte van helder serum van melk, waaraan opklimmende hoeveelheden koper werden toegevoegd

Toegevoegd gamma/kg	In helder serum gamma/kg	% van het toegevoegde koper, dat in serum aanwezig is
0	4,5	
500	47	8.4
1000	48	6.8
2000	14	0.7
4000	32	0.8
6000	88	1.5
8000	140	1.8
10000	210	2.1
15000	345	2.3

Ook hier komt duidelijk tot uiting, dat van het toegevoegde koper relatief minder in het helder serum aanwezig is dan van het natuurlijke koper. Vergelijken we de kopergehaltes van serums uit gezuurde en uit niet-gezuurde

melk, dan blijken geen duidelijke verschillen naar voren te komen; ook bij het toegevoegde koper wordt dus geen aanwijzing verkregen dat koper door zuur worden van de melk in ionvorm overgaat.

c. Het koper aan de eiwitfracties.

Uit vergelijking van de serums uit gepasteuriseerde en niet gepasteuriseerde melk blijkt, dat het kopergehalte van het niet-gepasteuriseerde serum steeds duidelijk hoger is. Dit wijst er dus op, dat de albumine-globulinefractie een belangrijk percentage van het koper in de melk bevat. Het grootste gedeelte van het in de melk aanwezige koper wordt echter met de caseïne neergeslagen. Vergelijken we melk met en zonder toegevoegd koper met elkaar, dan blijkt, dat hier geen duidelijk verschil bestaat in de percentages koper, die in niet-gepasteuriseerd serum aanwezig zijn. Ook wordt geen aanwijzing verkregen, dat er een duidelijk verschil is in de hoeveelheid koper, die aanwezig is in een dergelijk serum, dat bereid is door de melk te zuren of door de melk te stremmen.

Het heeft weinig zin aan de hand van de gevonden cijfers een gepreciseerde quantitatieve beschouwing op te zetten. Daarvoor zijn over het algemeen de kopergehalten te laag en dus de mogelijke bepalingfouten te groot en kleven er te grote onnauwkeurigheden aan de proef, wat verband houdt met de wijze van uitvoering: de heldere serums zijn meestal niet volledig helder.

In tabel 18 geven we enkele cijfers.

TABEL 18. Percentage van het totaal in melkplasma aanwezig koper gebonden aan de albumine-globuline-fractie

Melk zonder toegevoegd koper	Melk met toegevoegd koper
42	—
8	—
14	30
9	18
20	17
2	5
24	6
2	5

De gevonden cijfers geven aan, dat gemiddeld ongeveer 10 à 15% van het in de melkplasma aanwezige koper aan de albumine-globuline-fractie gebonden is. Dit geldt dus zowel voor het van nature aanwezige als voor het toegevoegde koper.

Practisch al het koper, dat bij serum uit niet gepasteuriseerde melk is uitgecentrifugeerd moet aan caseïne gebonden zijn. Het percentage van in melkplasma aanwezige koper dat aan caseïne gebonden is, bedraagt ongeveer 75 à 80%. Voor het toegevoegde koper geldt dezelfde redenering, daar de verhoudingscijfers hier ongeveer hetzelfde beeld geven als voor het van nature aanwezige koper.

Wanneer we het voorgaande samenvatten, moeten we tot de conclusie komen, dat het van nature in melkplasma aanwezige koper grotendeels aan het eiwit gebonden voorkomt (gemiddeld werd gevonden meer dan 90%). Voegen we koper aan de melk toe, dan blijken er geen principiële verschuivingen plaats te vinden in de verdeling van het koper over de verschillende bestanddelen van het melkplasma. Wel werd de indruk verkregen, dat naarmate meer

koper werd toegevoegd, relatief minder koper in het helder serum aanwezig was. We kunnen dus constateren, dat – voor zover het melkplasma betreft – het toegevoegde koper vrijwel geheel gebonden wordt aan het melkeiwit: dit geldt zowel voor de albumine-globuline-fractie als voor de caseïne-fractie. Verhoging van de zuurtegraad van de melk brengt geen merkbare verschuiving van de koperverdeling met zich mee.

De vraag is nu nog in welke vorm het koper voorkomt, dat wij in het helder serum vonden. Wanneer dit koper in ionvorm zou voorkomen zien wij niet in, dat toegevoegde koperionen bij de melk in relatief nog grotere mate aan eiwitten van de melk gebonden worden als het oorspronkelijke aanwezige koper. Ultrafiltratieproeven zullen ons inziens geen oplossing kunnen bieden. Laag moleculaire organische verbindingen zullen in het ultrafiltraat terecht kunnen komen, waardoor het nog niet mogelijk is antwoord te geven op de vraag of hierin aanwezig koper in ionvorm voorkomt of op een of andere wijze gebonden. Ultrafiltratieproeven hebben bovendien het bezwaar – zoals ons bij een oriënterende proef bleek – dat het filter b.v. de door ons gebruikte collodion-membranen, onder bepaalde omstandigheden koper kunnen opnemen en onder weer andere omstandigheden koper kunnen afstaan.

5.3. HET IJZER IN DE MELK

Door BARKAN (13) werd vastgesteld, dat ijzer in dierlijk serum niet ultrafiltreerbaar is. Door gebruik te maken van fractionnering door middel van ammoniumsulfaat toonden BARKAN & SCHALES (13a) aan, dat ijzer uitsluitend voorkomt aan de op deze wijze neergeslagen globuline-fractie. VAHLQUIST (79) maakt terecht bezwaar tegen de zeer grove methode van eiwit-scheiding door middel van ammoniumsulfaat. Door toepassing van dialyseproeven constateerde hij, dat in alkalisch milieu en bij de pH van het serum ijzer niet dialyseerbaar is. Eerst bij een pH van 4,5 wordt dialyseerbaar ijzer geconstateerd, wat bij verdere verlaging van de pH nog toeneemt. Door middel van elektroforese in het Tiseliusapparaat vond VAHLQUIST, dat ijzer in dierlijk serum zowel met het albumine als met het globuline (vooral α - en β -globuline) zich in het electrisch veld verplaatst. IJzertoevoeging kwam meer ten gunste van de albuminefractie.

SCHÄFER (70) constateerde, dat het ijzer gedeeltelijk gebonden is aan de vetbolletjes en gedeeltelijk aan het plasma-eiwit. Door middel van elektroforese van de serumeiwitten van melk werd gevonden, dat het ijzer zich hier uitsluitend bevindt aan de eiwitten, die samengevat worden onder de naam immuunglobulinen, terwijl β -lactoglobuline practisch ijzervrij is. Dit kon later door HORST & SCHÄFER (35) bevestigd worden aan de hand van papier-elektroforetische onderzoeken, waarbij aan de melk radioactief ijzer werd toegevoegd. Een specifiek dragereiwit, zoals ze wel bij andere dierlijke serums vonden (β -globuline) konden zij hier niet vinden. Verder bleek, dat ijzer niet door koper uit zijn eiwitverbinding wordt verdrongen.

SCHÄFER, BREYER & KARTE (71) menen, dat het aan de vetbolletjes gebonden ijzer werkelijk aan vet gebonden is, want ijzer was in duidelijk aantoonbare hoeveelheid aanwezig in het aetherextract van vrouwen- en koemelk. Het is echter niet uitgesloten, dat door een dergelijke chemische behandeling ingegrepen wordt in de verdeling van ijzer over de verschillende fasen; bovendien dient hierbij bedacht te worden, dat een aetherextract ook nog andere

dan vetachtige stoffen kan bevatten. Zij achten verder de mogelijkheid, dat ijzer behalve aan de immuunglobulinen ook nog aan de caseïne gebonden is, niet uitgesloten. Later vinden SCHÄFER c.s. (72) met behulp van papierelectroforese, dat ijzertoevoeging zich sterk ophoopt in één van de immuunglobulinen, dat met zijn electroforetische snelheid ongeveer overeenkomt met het β -globuline (siderophile) van het bloedserum.

VAN DER WAARDEN (80) paste ook voor het aantonen van de ijzerverdeling in boter zijn methode van chemische fractionnering der verschillende bestanddelen toe en kwam daarbij tot de conclusie, dat practisch al het ijzer hier gebonden is aan eiwit. Dit geldt zowel voor gezuurde als voor ongezuurde niet gezouten boter. Door toevoeging van keukenzout aan serum van boter uit gezuurde room ging daarentegen een deel van het aan eiwitten gebonden ijzer in ware oplossing.

Door MULDER & KOPPEJAN (58) werden reeds enige cijfers verzameld uit oproomproeven verkregen. Zij vonden, dat ongeveer 25% van het ijzer gebonden is aan de vetbolletjes, wat dus betekent, dat de concentratie in de oppervlaktelaagjes bijzonder hoog is. Toevoeging van ijzer aan de melk bracht geen verhoging teweeg van het aan de oppervlaktelaagjes gebonden ijzer.

5.3.1. *Het ijzer in de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes*

Op dezelfde wijze als voor koper beschreven onder 5.2.2 werden ook voor ijzer oproomproeven gedaan om een inzicht te krijgen in de verdeling van het ijzer over vet en plasma. Ook werden hierbij vergeleken melk zonder toevoeging en melk met toevoeging van ijzer.

De resultaten worden weergegeven in tabel 19.

Het percentage ijzer in de oppervlaktelaagjes van de totale hoeveelheid dat van nature in de melk voorkomt bleek bij onze proeven te variëren van 28 tot 59%. Gemiddeld werd gevonden: 44.7%. Toevoeging van ijzer aan de melk bracht over het algemeen geen merkbare verhoging teweeg van de hoeveelheid ijzer op de vetbolletjes aanwezig; in enkele gevallen bleek dit getal zelfs lager te liggen. Duidelijk kwam naar voren, dat het percentage ijzer aan de vetbolletjes van het totaal in de melk aanwezige hoeveelheid ijzer daalde, naarmate meer ijzer aan de melk werd toegevoegd.

Een foutenberekening werd opgesteld aan de hand van volgende vergelijkingen:

I	$4x + 96y = 225$	(volle melk)
	$20x + 80y = 421$	(room)
II	$1x + 99y = 138$	(ondermelk)
	$20x + 80y = 421$	(room)
III	$4x + 96y = 1927$	(volle melk)
	$20x + 80y = 1968$	(room)

Zie grafiek 9.

Gaan we er vanuit, dat bij de lagere ijzergehaltenes (I en II) een absolute fout in de bepaling van 20 gamma per kg een grote fout is, dan vinden we dus dat in het ongunstigste geval – nl. indien Δa_1 en Δa_2 hetzelfde teken hebben – de fout voor de x -waarde ongeveer 15% bedraagt.

Bij de hogere ijzergehaltenes (III) lopen de lijnen voor $\Delta x/x$ uiteen, echter is hier de absolute fout der bepalingen (Δa_1 en Δa_2) ook groter. Hierdoor zullen

TABEL 19. Overzicht van de resultaten van oproomproeven. De verdeling van ijzer over de oppervlaktelaag.

A. Zonder toevoeging van ijzer										B. Met toevoeging van ijzer		
Proef nr.		Gewicht gr.	Vet		IJzer		Op vetb. 100 x	In plasma 100 y	In opp. laagjes in %	Gewicht gr.	Vet	
			%	balans gr.	gamma per kg	balans gamma's					%	balans gr.
I	M	5647	4.60	260	204	1152	1572	138		5310	4.56	242
	R	1181	19.66	232	420	496			35.6	933	21.21	198
	O	4466	0.63	28	141	630	1598	132		4377	1.01	44
	R + O			260		1126						242
II	M	1670	4.19	279	225	1501	1501	119		6120	4.19	256
	R	1331	18.90	253	421	560			29.6	1138	19.22	219
	O	5324	0.61	32	137.5	732	1678	128		4974	0.79	39
	R + O			285		1292						258
III	M	5812	3.19	185	138	802	1884	81				
	R	798	20.36	162	447	357			59.3			
	O	5014	0.44	22	79	396	1918	71				
	R + O			184		753						
IV	M	10051	4.39	441	201	2020	2728	85				
	R	1433	20.51	289	618	886			59.1			
	O	8611	1.74	150	144	1240	2671	99				
	R + O			439		2126						
V	M	5620	4.08	229	215	1208	2254	128		4310	4.08	176
	R	703	24.97	175	659	463			43.3	575	24.73	142
	O	4908	1.13	55	135	663	2308	110		3728	0.95	35
	R + O			230		1126						177
VI	M		2.85		110		2009	54			2.85	
	R		16.50		359				51.1		18.00	
	O		0.21		74		1934	70			0.23	
VII	M		3.80		175		2219	94			3.80	
	R		17.60		467				47.3		18.75	
	O		0.30		103		2133	97			0.33	
VIII	M		4.15		269		1750	204			4.15	
	R		18.00		483				28.0		17.85	
	O		0.69		189		1876	177			0.70	
IX	M		4.12		213		2589	113			4.11	
	R		17.25		530				49.1		17.25	
	O		0.55		137		2486	124			0.45	

de relatieve fouten in de x -waarde niet veel verschillen van die voor de lagere ijzergehalten.

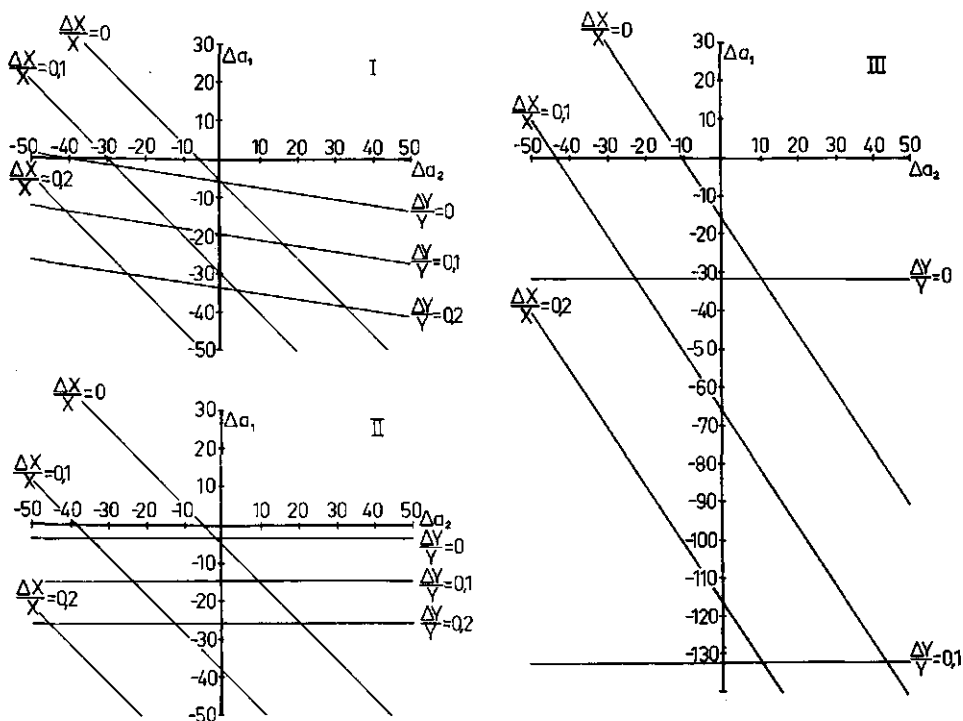
De fouten in de y -waarden zullen vrijwel nooit groter dan 10% worden. Deze fout wordt weer hoofdzakelijk bepaald door Δa_1 dus door de fout in de analyse van ondermelk of volle melk.

Het verschil tussen I en II (volle melk en ondermelk) bestaat hoofdzakelijk hierin, dat bij ondermelk de fout in de y -waarde geheel onafhankelijk blijkt van de fout in de bepaling van het gehalte van de room; hetgeen begrijpelijk is, omdat ondermelk praktisch geen vet bevat.

IJzer		Op vetb. 100 x	In plasma 100 y	In opp. laagjes in %	Gewicht gr.	Vet		IJzer		Op vetb. 100 x	In plasma 100 y	In opp. laagjes in %
umma er kg	balans gamma's					%	balans gr.	gamma per kg	balans gamma's			
399	2119	1734	335	20.0	4950	4.61	228	2076	10276	1666	2096	3.8
632	589				966	19.99	193	2010	1942			
250	1094	2122	231		3984	0.78	31	2077	8275	1732	2080	
	1683						224		10217			
389	2380	1543	339	15.9	5243	4.19	220	1927	10103	2108	1916	4.8
570	648				1000	19.22	192	1968	1968			
379	1885	1406	371		4235	0.61	26	1849	7831	2485	1845	
	2533						218		9799			
					4410	3.19	141	2820	12436	840	2885	0.9
					678	18.83	128	2500	1695			
					3725	0.36	13	2911	10843	694	2919	
							141		12538			
					9152	4.39	402	2725	24939	2761	2723	4.7
					1303	20.43	266	2731	3558			
					7843	1.62	127	2660	20862	3031	2654	
							393		24420			
529	2280	1960	468	11.7	4423	4.06	180	3231	14291	2302	3270	2.0
837	481				625	23.75	148	3040	1900			
467	1741	2009	452		3780	0.85	32	3412	12897	1801	3421	
	2222						180		14797			
304		1822	258	17.1								
540												
237		1827	233	25.8								
310		2119	238									
591												
253		2090	246									
390		1773	329	19.0								
590												
353		1803	348	27.1								
364		2381	277									
640												
267		2414	258									

5.4. SLOTBESCHOUWING

De resultaten van de in dit hoofdstuk besproken proeven hebben ons inzicht in de wijze van voorkomen van de metalen koper en ijzer in de melk in belangrijke mate verdiept. Op enkele punten zullen wij nog nader ingaan. Wij vonden, dat een belangrijk gedeelte van het van nature in melk aanwezige koper (5 tot 25%) aanwezig is op de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes. Van het toegevoegde koper komt slechts een klein gedeelte op de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes; wij vonden gemiddeld 2.5%. Wanneer wij



GRAFIEK 9. Opzomproeven voor ijzer. Het verband tussen de nauwkeurigheid van de analysemethoden en de waarden van $\frac{\Delta x}{x}$ en $\frac{\Delta y}{y}$

nu zien, dat in het melkplasma vrijwel al het toegevoegde koper aan eiwit gebonden wordt, vragen wij ons af, of ook het toegevoegde koper, dat op de vetbolletjes terecht komt, daar aan het eiwit gebonden wordt. Voor de hoeveelheid op de oppervlaktelaagjes aanwezig eiwit werd gevonden 1.2% van het totaal in melk aanwezige eiwit (60). Ook door andere onderzoekers werden percentages opgegeven, die van dezelfde grootte-orde zijn. De grote overeenstemming van het percentage eiwit met het percentage koper op de vetbolletjes geeft steun aan de veronderstelling, dat aan melk toegevoegd koper vrijwel uitsluitend aan eiwit gebonden wordt. De moeilijkheid is nu, dat ook het van nature aanwezige koper grotendeels gebonden aan eiwit voorkomt. Dit betekent dus, dat een eenvoudig analytisch onderscheid tussen het van nature in melk aanwezig koper en het toegevoegde koper niet voor de hand ligt.

In een recent onderzoek over de verdeling van koper en ijzer in melk werkten KING c.s. (41) met radioactief koper en ijzer. Ook zij namen duidelijke verschillen waar in de verdeling van natuurlijk en toegevoegd koper. Het van nature in de melk aanwezig koper was gedeeltelijk geconcentreerd op de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes (ca. 10—35% van het totaal aanwezige koper), terwijl het grootste gedeelte van het toegevoegde koper was gebonden aan de eiwitten van de ondermelk. Slechts 2 à 3% van het toegevoegde koper werd gebonden aan de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes. Natuurlijk

en toegevoegd koper voor zover aanwezig in de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes werden teruggevonden met de eiwitten van deze oppervlaktelaagjes; om dit laatste aan te tonen gebruikten deze onderzoekers echter ingrijpende chemische scheidingsmethoden. De verdeling van het van nature aanwezige ijzer kwam, evenals het van nature aanwezige koper, voor een groot deel ten goede aan de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes, maar niets van het toegevoegde ijzer werd gebonden aan de oppervlaktelaagjes. Het van nature aanwezige ijzer voor zover niet aan de oppervlaktelaagjes gebonden kwam volgens KING c.s. meer voor aan de wei-eiwitten dan aan caseïne. Ook hierbij werden ingrijpende chemische handelingen toegepast. Het van nature in melk aanwezige koper en ijzer bleek niet dialyseerbaar. Toegevoegd koper en ijzer waren iets dialyseerbaar en de hoeveelheid niet gebonden metaal nam toe naarmate de pH daalde tot 3.0. Toegevoegd koper gebonden aan de oppervlaktelaagjes was niet dialyseerbaar. Hoewel wij het niet geheel eens zijn met de wijze van uitvoering, blijkt toch op enkele essentiële punten een frappante overeenstemming met onze resultaten.

Opmerkelijk is, dat verschillende onderzoekers ultrafiltreerbaar of dialyseerbaar metaal steeds als niet-gebonden of als vrij metaal betitelen. Dit staat ons inziens niet onomstotelijk vast. Zoals in een volgend hoofdstuk zal worden uiteengezet zijn vele metalen en met name koper in staat om met vele organische stoffen complexe verbindingen aan te gaan. Het is dus heel wel denkbaar, dat het dialyseerbaar metaal gebonden is aan dialyseerbare lagere organische verbindingen; b.v. rest-stikstofverbindingen.

Wat het ijzer betreft, valt het op, dat steeds een vrij constante hoeveelheid (± 2000 gamma per kg vetbolletjes) aan de vetbolletjes aanwezig is. Dit ijzer zullen we vermoedelijk grotendeels op rekening moeten schrijven van een aantal bestanddelen, waarvan bekend is, dat ze in de vetbolletjes opgehoopt zijn en dat zij ijzer bevatten (o.a. peroxydase); ook voor koper kan dit ten dele het geval zijn.

In het voorgaande hebben wij aan de hand van een groot aantal proeven een gemiddelde indruk verkregen over de verdeling van koper en ijzer in de melk. Met de nu gebruikelijke analysemethoden zal het niet mogelijk zijn nog dieper in dit probleem door te dringen; immers naarmate we meer fractioneren, krijgen we steeds met kleinere hoeveelheden koper te doen. Fouten in de bepaling gaan een steeds grotere rol spelen.

Naar aanleiding van voorgaande beschouwingen kunnen wij de vraag stellen: is uit het metaalgehalte van melk of room het metaalgehalte van de boter af te leiden. Wanneer we een dergelijke analytische redenering willen opstellen, dienen we voorop te stellen, dat er factoren zijn, die met de bereiding samenhangen en die mede het gehalte aan metalen in de boter zullen bepalen, zoals het vetgehalte van de room, temperatuur en mechanische behandeling van de room, de mate van afkarnen (grove of fijne korrel), de invloed van het wassen, de invloed van het kneden. Reeds hieruit valt af te leiden, dat een goed verantwoorde berekening van het metaalgehalte van de boter uit het kopergehalte van melk of room niet mogelijk is.

Toch willen we trachten dit probleem te benaderen. Het metaalgehalte van boter wordt bepaald door:

1e de hoeveelheid metaal, die dank zij de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes in de boter aanwezig is. Hierbij is van belang de bij de oproomproeven verkregen waarde voor x te weten.

2e de hoeveelheid metaal, die dank zij het plasma van de room in de boter aanwezig is. Deze hoeveelheid wordt hoofdzakelijk bepaald door het aan eiwit gebonden koper. Hierbij is van belang de bij de opgroemprouven verkregen waarde voor y te weten.

We beschouwen nu eerst het gehalte aan koper, en nemen daarbij als voorbeeld de melk van opgroemprouf nr. XI.

Melk zonder toegevoegd koper: Het kopergehalte van de melk is 26 gamma per kg. Stellen we het eiwitgehalte van de hieruit bereide boter op 0.7%, dan zal – aangenomen dat het koper in de boter aan dezelfde bestanddelen gebonden blijft als in de oorspronkelijke room – ongeveer 5 gamma per kg boter ($\pm \frac{1}{3} \times y$ te danken zijn aan het aan eiwit gebonden koper. De rest van het koper is dus aanwezig in de – al of niet aan de vetbolletjes gebonden – oppervlaktelaagjes. Wanneer de oppervlaktelaagjes in de boter nog geheel intact zouden zijn en nog aanwezig op de vetbolletjes, dan zou het kopergehalte van de boter bij benadering gesteld kunnen worden op $0.80 \times x + 5$ gamma per kg. In dit theoretische geval zou het kopergehalte van de boter dus $80 + 5 = 85$ gamma per kg bedragen. Als gevolg van het kamproces is echter een belangrijk gedeelte van de oppervlaktelaagjes niet meer op de vetbolletjes aanwezig. Gaan we er vanuit, dat op de vetbolletjes oorspronkelijk ± 6 gr fosfatiden per kg vetbolletjes aanwezig is, dan zal het gehalte aan fosfatiden van boter, waarin de oppervlaktelaagjes nog geheel intact zijn $\pm 0.80 \times 6 = 4.8$ gram per kg zijn. In werkelijkheid is er gemiddeld ± 2 gram fosfatiden per kg boter aanwezig. (Hiervan is een gedeelte nl. $\frac{1}{6} \times y$ te danken aan het plasma van de melk; de waarde voor y is ± 0.2 gram per kg; deze term is dus te verwaarlozen). Wanneer we nu de fosfatiden als belangrijke representanten van de oppervlaktelaagjes beschouwen, dan blijkt dus dat $\frac{2}{4.8} \times 100 = 42\%$ van de oorspronkelijke oppervlaktelaagjes nog in de boter aanwezig is. In werkelijkheid mogen we dus in de boter verwachten een kopergehalte van: $0.42 \times x + 5 = 47$ gamma per kg. Hierin is x in dit geval 4 Cu_m ($\text{Cu}_m = \text{Cu}$ gehalte van de melk); deze factor blijkt bij de verschillende melken zeer sterk te kunnen variëren; in onze voorbeelden van opgroemprouven varieerde deze factor van 1 tot 5; dit betekent, dat – alleen als gevolg van een variatie in de x -waarde – het kopergehalte van de boter – berekend met bovenstaande formule – zou kunnen variëren van 15 tot 57 gamma per kg.

Uit bovenstaande volgt, dat het gehalte aan koper van boter, bereid uit melk, waaraan geen koper is toegevoegd, in hoge mate bepaald wordt door de hoeveelheid aan oppervlaktelaagjes der vetbolletjes gebonden koper.

Een dergelijke redenering kunnen we ook toepassen voor boter bereid uit melk, waaraan koper toegevoegd was. Bij het gegeven voorbeeld blijkt, dat voor het toegevoegde koper niet meer geldt $x = 4 \text{ Cu}_m$, maar $x = \frac{1}{2} \text{ Cu}_m$. Toevoeging van 390 gamma koper per kg melk (voorbeeld XI d) zal dus tengevolge hebben dat het kopergehalte van de boter wordt:

natuurlijk koper van de oppervlaktelaagjes	42 gamma per kg
” ” ” eiwit	5 ” ” ”
toegevoegd koper van de oppervlaktelaagjes $0.42 \times \frac{1}{2} \times 390 =$	80 ” ” ”
toegevoegd koper van eiwit	78 ” ” ”
Totaal: $42 + 5 + 80 + 78 =$	205 gamma per kg.

Gaan we er vanuit, dat toegevoegd koper, dat aan de oppervlaktelaagjes gevonden wordt, uitsluitend aan het eiwit hiervan gebonden wordt, dan zou dit aandeel in het kopergehalte van de boter dus dubbel geteld worden, nl. ook bij het toegevoegd koper van de plasma-eiwitten. Wij mogen echter zonder meer niet aannemen, dat het eiwit der oppervlaktelaagjes zich op dezelfde wijze over boterplasma en karnemelk verdeelt als de fosfatiden. In het gegeven voorbeeld moeten we de uitkomst waarschijnlijk als te hoog beschouwen. We zouden liever willen zeggen, dat het kopergehalte van deze boter zal variëren tussen ± 120 gamma en 205 gamma per kg. Duidelijk komt hier naar voren, dat het aandeel van het aan eiwit gebonden koper groter is naarmate meer koper wordt toegevoegd.

In grote trekken kunnen we zeggen, dat de in hoofdstuk 4 gevonden cijfers voor het gehalte van boter aan koper goed overeenstemmen met de hier door berekening gevonden waarden. Het lijkt er dus op, dat het koper van de oppervlaktelaagjes zich op dezelfde wijze over boterplasma en karnemelk verdeelt als de fosfatiden van de oppervlaktelaagjes. Het kopergehalte van boter, waaraan geen koper is toegevoegd, is van dezelfde grootte-orde als het kopergehalte van de oorspronkelijke melk. Na toevoeging van koper aan de melk, zal het kopergehalte van de hieruit bereide boter over het algemeen lager zijn dan het kopergehalte van de melk. Dit is dus een gevolg van het feit, dat van het toegevoegde koper relatief minder op de oppervlaktelaagjes terecht komt, dan van het van nature aanwezige koper. Naarmate meer koper werd toegevoegd zal het kopergehalte van de boter in steeds grotere mate worden bepaald door het aan eiwit gebonden koper.

Voor het gehalte van boter aan ijzer kunnen we een analoge redenering opbouwen: Gaan we uit van melk met natuurlijk ijzergehalte 200 gamma per kg, $x = 2000$ gamma per kg vetbolletjes; $y = 100$ gamma per kg plasma. Indien in de boter alle oppervlaktelaagjes aan de vetbolletjes verbonden zouden blijven, zou het ijzergehalte van de hieruit bereide boter zijn:

$$0.80 \times 2000 + 0.2 \times 100 = 1600 + 20 = 1620 \text{ gamma per kg.}$$

Veronderstellen we echter, dat van het ijzer van de oppervlaktelaagjes gemiddeld 42% in de boter blijft, dan vinden we voor het gehalte aan ijzer:

$$0.42 \times 2000 + 20 = 860 \text{ gamma per kg.}$$

Dit bedrag ligt aanmerkelijk hoger dan we normaal in dergelijke boter vinden. Dit zou er dus op wijzen, dat het ijzer van de oppervlaktelaagjes zich niet over boterplasma en karnemelk verdeelt zoals de fosfatiden, maar dat naar evenredigheid meer ijzer in de karnemelk terecht komt. Veronderstellen we, dat het ijzer van de oppervlaktelaagjes zich gelijkmatig over boterplasma en karnemelk verdeelt, dan vinden we voor het ijzergehalte van de (niet gewassen) boter:

$$\frac{1}{16} \times 2000 + 20 = 145 \text{ gamma per kg.}$$

Dit benadert meer de werkelijkheid. Bij toevoegen van 1000 gamma ijzer per kg melk zouden we in dit geval vinden:

$$125 \text{ gamma} + 200 \text{ gamma} = 325 \text{ gamma}$$

bij toevoegen van 2000 gamma:

$$125 \text{ gamma} + 400 \text{ gamma} = 525 \text{ gamma (Als waarde voor } x \text{ wordt } 2000 \text{ aangehouden).}$$

Ook deze cijfers blijken goed met de werkelijkheid overeen te stemmen.

Globaal gesproken zouden we kunnen zeggen, dat het ijzergehalte van de boter is:

$$(125 + \frac{1}{5} y) \text{ gamma per kg.}$$

Het lijkt er dus op, dat de ijzerverbindingen in oppervlaktelaagjes zich op een andere wijze over boterserum en karnemelk verdelen dan de koperbindingen en ook dan de fosfatiden.

Hoewel wij van mening zijn, dat aan berekeningen als hier uitgevoerd grote fouten kunnen kleven, menen wij hieruit de conclusie te kunnen trekken, dat het metaalgehalte van boter moeilijk af te leiden is uit het gehalte van melk of room. Dit geldt ook voor het van nature aanwezige koper. Het is dan ook niet gemakkelijk te zeggen, welke maximumgrens we aan het metaalgehalte van boter mogen stellen.

Ter illustratie van wat hierboven is besproken over het gehalte van boter aan koper volgen hier nog enkele cijfers. Het gehalte aan koper werd bepaald van room, boter en karnemelk van een vijftal verschillende karnsels. Hierbij werd de room (vetgehalte $\pm 20\%$) zowel gezuurd als niet gezuurd verkarnd. Als gemiddelde van de vijf bepalingen werd het volgende gevonden:

	gezuurd	niet gezuurd
room	51.1 gamma koper per kg	52.0 gamma koper per kg
boter	52.4 " " " "	30.5 " " " "
karnemelk	53.2 " " " "	56.0 " " " "

Het betreft hier steeds niet-gewassen boter; hierdoor zullen de kopergehalten hoger liggen dan doorgaans voor gewassen boter het geval zal zijn. Opvallend is, dat het kopergehalte van boter, bereid uit niet-gezuurde room duidelijk lager is, dan van boter bereid uit gezuurde room. Dit is waarschijnlijk voor een belangrijk deel te verklaren, doordat in de gezuurde boter meer vaste bestanddelen – met name eiwit – door de boterkorrels zijn vastgehouden.

Voor het kopergehalte van room, karnemelk en niet-gewassen boter, waarbij aan de room koper werd toegevoegd, werd als gemiddelde van steeds twee bepalingen (twee verschillende karnsels) het volgende gevonden:

	gezuurd	niet gezuurd
room	737 gamma koper per kg	770 gamma koper per kg
boter	534 " " " "	307 " " " "
karnemelk	758 " " " "	868 " " " "

Ook hier blijkt dus het kopergehalte van de niet-gezuurde boter duidelijk lager te liggen dan van de gezuurde boter. Voorts valt op, dat van het toegevoegde koper relatief minder in de boter terecht komt dan van het van nature aanwezige koper.

6. NADERE BESCHOUWINGEN EN PROEFNEMINGEN OVER DE INVLOED VAN KOPER BIJ HET ONTSTAAN VAN KOELHUISGEBREKEN

6.1. HET TOEVOEGEN VAN KOPER-EIWITVERBINDINGEN AAN BOTER

Nadat bij voorgaande proefnemingen was gebleken:

- 1e dat van nature in de melk aanwezig koper geen aanleiding geeft tot het ontstaan van koelhuisgebreken;

- 2e dat aan melk toegevoegd koper zelfs in zeer geringe hoeveelheden het ontstaan van koelhuisgebreken kan bevorderen;
- 3e dat het toegevoegde koper practisch geheel aan de plasma-eiwitten gewordt,

was het zeer waarschijnlijk, dat koper dat door toevoeging in de melk is gekomen en daarbij aan eiwit wordt gebonden een belangrijke rol speelt bij het ontstaan van koelhuisgebreken van boter.

Wij hebben gemeend de juistheid van deze veronderstelling te moeten toetsen, door enkele proeven te doen, waarbij aan boter bereid zonder toevoeging van koper een hoeveelheid koper-eiwitverbinding werd toegediend, bereid uit melk, waaraan koper toegevoegd was.

De bereiding van de koper-eiwitverbinding geschiedde als volgt: aan al of niet gepasteuriseerde melk werd koper toegevoegd in de vorm van kopersulfaat-oplossing, tevens werd zuursel toegevoegd. Wanneer de melk zuur geworden was, werd het uitgevlokte eiwit uitgecentrifugeerd. Het neerslag werd vervolgens nog viermaal met tweemaal gedestilleerd water gewassen en ge-centrifugeerd. De uiteindelijk verkregen eiwitmassa werd met een weinig tweemaal gedestilleerd water aangelengd tot een dikke brij. In deze vorm werd het eiwit over de nog niet geknede boterkorrels gesprendeld. Vervolgens werd door kneden getracht zoveel mogelijk van het eiwit in de boter te werken. De resultaten van de proeven worden in tabel 20 weergegeven.

Ook hier blijkt, dat bij alle boters waaraan geen koper werd toegevoegd geen koelhuisgebreken ontstaan, toevoeging van koper als kopersulfaat heeft wederom duidelijk invloed. Toevoeging van eiwit bereid zonder besmetting met koper heeft geen invloed, daarentegen heeft toevoegen van koper-eiwitverbinding in alle gevallen een zeer duidelijke invloed. Uit de resultaten blijkt tevens, dat toevoeging van koper in de vorm van koper-eiwitverbinding, waarvan het grootste gedeelte van het koper uit toegevoegd koper bestaat, het ontstaan van koelhuisgebreken bevordert in een mate, die zich niet onderscheidt van de invloed van koper, dat als kopersulfaat aan de room werd toegevoegd.

Combineren we de resultaten van deze proeven met de resultaten van de in hoofdstukken 4 en 5 beschreven proeven dan kunnen we zeggen, dat het wel zeer waarschijnlijk is, dat de vorm, waarin het toegevoegde koper werkzaam is, die van een koper-eiwitverbinding is.

6.2. BESCHOUWINGEN OVER KOPERVERBINDINGEN; IN HET BIJZONDER KOPER-EIWITVERBINDINGEN

Het is een bekende eigenschap van vele metalen, dat ze zich op verschillende wijze aan organische stoffen kunnen binden. De wijze van binding is afhankelijk van de eigenschappen, zowel van de organische stof als van het metaal als ook van het milieu. Het is bekend, dat vele organische stoffen als aminozuren, eiwitten, porphirinen stabiele complexen kunnen vormen met ionen van zware metalen (1), (2), (16), (43). Voor vele aminozuren is en wel in de eerste plaats ten aanzien van koper een betrekkelijk grote affiniteit aangetoond. De koper-eiwitverbinding is vooral bestudeerd bij dierlijk serumalbumine. Bij dialyseproeven vonden KLOTZ & CURVE (42) dat het albuminemolecuul in staat is veel koperionen te binden. Uit de onderzoekingen van KLOTZ c.s. (43) kwam naar voren, dat bij pH beneden 5,3, de hoeveelheid door eiwit

TABEL 20. De invloed van toegevoegde kopereiwitverbindingen

No. boter	Kopergehalte gamma/kg	Peroxydgetal				Smaak				Opmerkingen
		3 mnd.	6 mnd.	8 mnd.	9 mnd.	3 mnd.	6 mnd.	8 mnd.	9 mnd.	
70- 0	23	0.36	0.52		0.83	0	0		0	geen toevoeging toevoeging van Cu ⁺⁺ toevoeging van Cu-eiwitverb., bereid uit gepast. melk.
1	176	1.10	1.49		1.81	++	+++		+++	
11	59	0.45	0.61		0.93	0	0		+	
72- 0	19	0.12		0.28		0		0		geen toevoeging toevoeging van Cu ⁺⁺ toevoeging van melk-eiwit zonder toegev. Cu toevoeging van Cu-eiwitverb. bereid uit gepast. melk.
1	417	1.25		2.00		+++		+++		
10	22	0.33		0.53		0		0		
11	164	0.51		0.88		++		++		
79- 0	104	0.90	0.90		0.95	0	0		0	geen toevoeging toevoeging van Cu-eiwit verb. bereid uit gepast. melk.
11	122	1.00			1.05	0	+		++	
90- 0	45	0.13	0.34		0.43	0	0		0	geen toevoeging toevoeging van Cu-eiwit verb., bereid uit niet-gepast. melk.
11	163	0.34	0.65		0.86	++	++		++	
12	119	0.32	0.65		0.87	++	++		++	
91- 0	37	0.05	0.11		0.16	0	0		0	geen toevoeging. toevoeging van Cu-eiwit verb., bereid uit niet-gepast. melk.
11	87	0.09	0.25		0.48	?	+		+	
12	123	0.09	0.36			+	++			
92- 0	53	0.05	0.24		0.39	0	0		0	geen toevoeging toevoeging van Cu-eiwit verb. bereid uit niet-gepast. melk
11	206	0.10	0.50		0.80	0	++		+++	
12	385	0.40	0.67		0.96	+	+++		+++	

gebonden metaal toeneemt bij toenemende pH. Een klein gedeelte van het metaal komt onder de proefomstandigheden steeds in dialyseerbare vorm voor. Boven pH 5.3 blijkt een duidelijke toename van de hoeveelheid gebonden koper aan het eiwit op te treden, terwijl de aard van de binding verandert: werd bij de lagere pH binding aan carboxylgroepen geconstateerd, bij hogere pH was het koper gebonden aan de N-bevattende groepen. Mogelijk is bovengenoemde pH-invloed van belang bij de katalyserende werking van koper bij lage pH, zoals bij koelhuisgebreken van boter.

Behalve de genoemde verbindingen van koper aan een aantal bekende eiwitten zijn er nog enkele koper-eiwitverbindingen bekend, die dank zij het koperatoom over specifieke eigenschappen beschikken. Ze zijn zowel uit dierlijk als plantaardig materiaal geïsoleerd en hebben vrijwel alle oxidase-eigenschappen.

DILLS & NELSON (21) slaagden erin uit koemelk een koperbevattend eiwit te isoleren. Uit 40 liter niet gepasteuriseerde ondermelk verkregen zij ± 9 mg eiwit, bevattende 0.19 % Cu en 15 % N. Zij waren echter niet in staat een chemische reactie te vinden, welke door dit eiwit gekatalyseerd kon worden.

Door MACHEBOEUF & VISCONTI (52) is aandacht besteed aan de koperbin-

ding in het bloedserum. Zij kwamen aan de hand van dialyseproeven tot de conclusie, dat koper zich aan eiwitten bindt tot een complex en niet tot een dissocieerbaar koperzout. Ook BOYDEN & POTTEN (17) onderwierpen bloedserum aan dialyse en vonden eveneens, dat onder normale omstandigheden geen koper gedialyseerd kan worden. Bij pH lager dan 5 blijkt een duidelijke toename van de hoeveelheid dialyseerbaar koper op te treden, de hoeveelheid blijkt afhankelijk te zijn van het gebruikte zuur.

Onderzoekingen van GUBLER c.s. (30) (31) hebben een interessant licht geworpen op de wijze van binding van het serum-koper. Door aan het serum diaethylthiocarbaminaat toe te voegen konden zij aantonen, dat een groot gedeelte van het in serum voorkomend koper zodanig gebonden voorkomt, dat het niet in staat is direct met carbaminaat te reageren. Het percentage direct reageerbaar koper in plasma blijkt zeer klein te zijn; bij de mens: 4 %. Wanneer GUBLER c.s. koper aan bloedserum toevoegden constateerden zij, dat dit koper direct reageerde met diaethylthiocarbaminaat. Zij menen, dat koper dat uit de darm geresorbeerd wordt eveneens „los” gebonden is en in deze vorm getransporteerd wordt naar de lever en andere weefseldelen. De verhouding los gebonden tot stevig gebonden koper in plasma blijft steeds constant; dit geldt ook voor koper-deficiënte dieren.

Over de wijze van binding van koper aan de melkeiwitten is niet veel bekend. Eigen proeven hebben laten zien, dat er geen bepaalde voorkeur schijnt te bestaan van koper voor bepaalde melkeiwitten. In het voorgaande werd melding gemaakt van onderzoekingen over de koperbinding aan verschillende serum-eiwitten. Hoewel deze onderzoekingen een interessant licht werpen op de wijze, waarop koper aan eiwitten gebonden kan zijn, dienen wij ons terdege af te vragen, of we deze resultaten ook op de eiwitten van de melk kunnen toepassen. Wij willen er de nadruk op leggen, dat de meeste onderzoekingen werden verricht met hoeveelheden koper, die veel groter zijn dan die normaliter in melk (ook bij toevoeging van koper) voorkomen. Deze hoeveelheden zijn in melk doorgaans minder dan 1 atoom koper per molecuul eiwit; bij genoemde proeven betreft het meestal een aantal atomen Cu per molecuul eiwit. Kwesties als: verschil in wijze van binding tussen het van nature aanwezige koper en het toegevoegde koper komen bij genoemde proeven dan ook niet aan de orde.

De door koper veroorzaakte oxydatiegebreken in melk kunnen worden tegengegaan door aan de melk bepaalde stoffen toe te voegen, die bekend staan als chelaatvormers van koper. Als zodanig kunnen dienen ethyleendiaminotetra-azijnzuur (EDTA) en Na-diaethylthiocarbaminaat (DEDC); tetra-aethylthiuramdisulfide (TATD) en tetra-methylthiuramdisulfide (TMTD). Door dus koper in een zodanige gebonden vorm te brengen, dat het niet meer in staat is zijn katalytische werking te ontplooien, worden oxydatiegebreken tegengegaan. Door TOLLENAAR (77) werd in principe hetzelfde gedaan om koelhuisgebreken van gezuurde boter tegen te gaan; de kopercomplexen met TATD en TMTD bleken in de vetfase opgehoopt te worden: DEDC bleek op dezelfde wijze te werken. Volgens MACDOWELL (51) gaat hierbij $\pm \frac{2}{3}$ van het koper over in de vetfase. In tegenstelling met wat ARRINGTON & KRIENKE (12) voor melk vonden, vond MACDOWELL (51), dat EDTA geen invloed uitoefent op de smaak van koelhuishoter; het koper werd hier ook niet verplaatst van plasma naar vetfase.

Nadat bij onze onderzoekingen was gebleken, dat zowel het van nature aanwezige koper als het toegevoegde koper voor een zeer groot gedeelte aan eiwit

gebonden voorkomt en daar ook gebleken was, dat het toegevoegde koper, dat aan eiwit gebonden is wel degelijk van grote invloed is bij het ontstaan van koelhuisgebreken bij boter was ons verder onderzoek erop gericht aanwijzing te vinden op welke wijze beide soorten koper aan het eiwit gebonden zijn. Wij veronderstelden nl., dat het toegevoegde koper op een andere wijze aan het eiwit gebonden is dan het van nature aanwezige koper. Dit volgt eigenlijk al uit het duidelijke verschil dat we constateerden tussen de invloed van het van nature aanwezige koper en van het toegevoegde koper bij het ontstaan van de koelhuisgebreken en zou uit de volgende hypothese kunnen volgen.

Bij de opbouw van eiwitstoffen voor de melk in het dierlijk lichaam wordt uitgegaan van kleinere moleculen – hierbij wordt in de eerste plaats gedacht aan aminozuren – als bouwstenen. Ook deze hebben een grote affiniteit voor koper. Moeilijk is te voorspellen waar en in welk stadium van de opbouw de eiwitstoffen van de melk koper opnemen. Gaan we er echter vanuit, dat dit tijdens het opbouwproces geschiedt, dan zouden we ons kunnen voorstellen, dat het koper zodanig in het uiteindelijke eiwitmolecuul is opgenomen, dat het in een vrij inactieve vorm aanwezig is. Het bovenstaande betreft dus het van nature in de melk aanwezige koper. Van koper, dat aan de melk toegevoegd wordt, wordt verondersteld, dat het aan de zijketens van het eiwitmolecuul complex gebonden wordt en daarbij nog vrij beweeglijk is. Op deze wijze zou dus het verschillend gedrag tussen het natuurlijke koper en het toegevoegde koper verklaard kunnen worden.

Uitgaande van deze hypothese en mede naar aanleiding van genoemde proeven met chelaatvormers en tevens van de proeven van GÜBLER c.s. over koper in bloedserum werden door ons nog enige oriënterende proeven gedaan met het doel aanwijzing te krijgen over het verschil in wijze van voorkomen van koper aan eiwit.

Nadat gebleken was, dat toevoeging van citroenzuur, histidine en methionine (gebruikt werden steeds hoeveelheden van 0.5 ml van een 0.2% oplossing toegevoegd aan 200 gr melk) geen invloed hadden op de koperverdeling in melk, werden nog enkele proeven gedaan, waarbij carbaminaat toegepast werd. Deze proeven zijn niet op dezelfde wijze uit te voeren als door GÜBLER (30) (31) werd gedaan bij bloedserum. In bloedserum zijn de hoeveelheden koper zo groot en is het serum zo helder en kleurloos, dat aan de kleur van het serum na toevoeging van carbaminaat dadelijk al afgeleid kan worden, hoeveel koper aan carbaminaat gebonden wordt. Bij melk moeten wij een extractiemethode toepassen. We maakten hierbij gebruik van de eigenschap van kopercarbaminaat om in het melkvet op te lossen.

De proef werd als volgt uitgevoerd:

Vier centrifugebuizen werden gevuld met:

1e melk,

2e melk, waaraan koper was toegevoegd,

3e melk met enkele druppels carbaminaatoplossing,

4e melk met koper (als onder 2e) + carbaminaatoplossing.

Nadat deze melk gecentrifugeerd was (op 5000 toeren per minuut gedurende $\frac{3}{4}$ uur) werd van de ondermelk het kopergehalte bepaald. Eventuele kopercarbaminaatverbinding zal in de vetlaag zijn opgelost.

Voor het Cu-gehalte van de ondermelk werden nu de volgende waarden gevonden:

ondermelk	61 gamma per kg (uitgegaan werd van melk van nieuwmelkse koe)
ondermelk + Cu	177 gamma per kg
ondermelk + carbaminaat	18 " " "
ondermelk + Cu + carbaminaat	18 " " "

In het serum van de niet-gepasteuriseerde melk werd hier gevonden 17 gamma per kg voor ondermelk zonder toegevoegd koper en 40 gamma per kg voor ondermelk met toegevoegd koper.

Bij een andere proef vonden we:

		serum bereidt uit deze ondermelk:
ondermelk	26,5 gamma per kg	13 gamma per kg
ondermelk + Cu	358 " " "	60 " " "
ondermelk + carbaminaat	10 " " "	11 " " "
ondermelk + Cu + carbaminaat	60,5 " " "	35,5 " " "

Bij de derde proef werden de volgende resultaten gevonden:

ondermelk	55,5 gamma per kg
ondermelk + Cu	227 " " "
ondermelk + carbaminaat	21 " " "
ondermelk + Cu + carbaminaat	24 " " "

In het serum van de niet-gepasteuriseerde melk zonder toegevoegd koper werd gevonden 23 gamma per kg.

Ook werd nog uit ondermelk – bereid als bij bovenstaande proeven beschreven – caseïne gemaakt en hiervan het kopergehalte bepaald.

Gevonden werd:

voor caseïne bereid uit ondermelk	0,46 gamma/gr caseïne
" " " " ondermelk + Cu	2,08 " " "
" " " " ondermelk + carbaminaat	0 " " "
" " " " ondermelk + Cu + carbaminaat	0,02 " " "

Hieruit blijkt dus, dat het carbaminaat in staat is vrijwel alle koper aan caseïne te onttrekken. Steeds blijft echter een kleine hoeveelheid koper in het serum achter, dit zou een aanwijzing kunnen zijn, dat dit serum-koper vrij sterk gebonden is. Bij deze proeven bleek dus, zowel het van nature aanwezige als het toegevoegde koper grotendeels door carbaminaat aan het melkplasma te worden onttrokken. Een verschil in de aard van binding van koper aan eiwit kon met deze proef dus niet aangetoond worden. Misschien hebben wij niet de geschikte complexvormer gevonden en zijn de gebruikte aminozuren te zwak en is carbaminaat te sterk.

6.3. DE KATALYTISCHE WERKING VAN KOPEREIWITVERBINDINGEN

De katalytische werking van koper of koperverbindingen is in principe te bestuderen aan de invloed, die deze stoffen hebben bij de oxydatie van ascorbinezuur.

Volgens BARRON, DE MEIO & KLEMPERER (14) is ascorbinezuur niet autoxydabel in zure en neutrale oplossingen tot een pH 7.6. Om ascorbinezuur

te oxyderen is dus een katalysator nodig. Als zodanig kunnen worden genoemd koper en bepaalde enzymsystemen, die bekend zijn onder de naam oxidasen. In deze oxidasen speelt het koper meestal de actieve rol.

STOTZ, HARRER & KING (75) vonden, dat zowel koper als koperalbumine in staat zijn ascorbinezuuroxydatie te bevorderen. Het koperalbumine doet het echter in aanmerkelijk mindere mate. Als voorbeeld diene het volgende:

	hoeveelheid koper	zuurstofverbruik (ml O ₂ per uur)
koper	3×10^{-5} mM	420
Cu-albumine	2×10^{-4} mM	260

Een aantal stoffen blijkt de ascorbinezuuroxydatie door koper, zowel als door Cu-albumine in belangrijke mate of zelfs geheel te remmen. Zij staan bekend als typische koper-bindende stoffen b.v. DEDC, natriumsulfide, Nacyanide.

Ook in melk is de werking van koper als katalysator bestudeerd aan oxydatie van ascorbinezuur.

HARTMANN (32) vond, wanneer hij aan een ascorbinezuuroplossing van 3 mg per 100 ml (pH 6.5) 50 gamma koper toevoegde na 30 minuten slechts 0.6 mg % ascorbinezuur terug. Voegde hij 100 gamma koper toe, dan was het ascorbinezuur praktisch geheel verdwenen na 30 minuten. Voegde hij echter koper toe door melk aan de ascorbinezuuroplossing toe te voegen en wel zodanig, dat deze wederom 50 gamma koper per 100 ml bevatte, dan was na 30 minuten nog 1.9 mg van de 2.3 mg over. De melk bevatte zelf 10 mg Cu per l. Werd op dezelfde wijze 100 gamma koper toegevoegd dan was na 30 minuten nog 1.5 mg over.

Dit wijst er dus ook op, dat de katalyserende werking, die de koperionen bezitten, door het gelijktijdig aanwezig zijn van melkeiwitten niet volledig tot uiting kan komen; toch blijkt zowel koper aan albumine als koper in melk katalyserend te werken, de oxydatieve werking van koper wordt dus niet geheel te niet gedaan, doordat het koper aan eiwit gebonden werd. Bij een andere proef voegde HARTMANN aan melk toe:

1. 0.1 mg koper/l melk (als CuSO₄)
2. 0.2 mg koper/l melk (als CuSO₄)
3. 0.1 mg koper/l melk (als melk geïnfecteerd met 10 mg Cu/l)
4. 0.2 mg koper/l melk (als melk geïnfecteerd met 10 mg Cu/l)

In alle gevallen werd na 25 uren een duidelijke afbraak van ascorbinezuur geconstateerd van 3 mg % tot ± 1 mg %. Bij 2 en 4 verliep de ascorbinezuuroxydatie iets sneller dan bij 1 en 3. Tussen 2 en 4 en ook tussen 1 en 3 traden geen verschillen op.

In onderstaande tabel worden enkele resultaten vermeld van eigen proeven over de invloed van koper gebonden aan melkeiwit op de ascorbinezuuroxydatie in zuur milieu. De melkeiwitten werden op dezelfde wijze bereid als onder 6.1 beschreven.

- I caseïne bereid uit melk, waaraan geen koper werd toegevoegd, dus alleen van nature aanwezig koper bevattende.
- II caseïne bereid uit dezelfde melk, echter grotendeels van koper ontdaan door middel van carbaminaat.
- III als II, maar daarna weer koper toegevoegd.
- IV als I, maar bereid nadat koper aan melk was toegevoegd.

Van de eiwitten werd steeds ongeveer een gelijke hoeveelheid gebracht in een oplossing van ascorbinezuur in helder melkserum, bereid uit gepasteuriseerde en gezuurde melk.

TABEL 21. De invloed van kopereiwitverbindingen op de oxydatie van ascorbinezuur

	1		2		3	
	Halveringstijd voor ascorbinezuur-afbraak	Koper-gehalte gamma p. gr caseïne	Halveringstijd voor ascorbinezuur-afbraak	Koper-gehalte gamma p. gr caseïne	Halveringstijd voor ascorbinezuur-afbraak	Koper-gehalte gamma p. gr caseïne
I	22 uur	1.0	29 uur	1.4	20.5 uur	1.1
II	21.6 „	0.3	35 „	0.4	20.8 „	0.2
III			18.7 „	2.5	17.2 „	0.5
IV			14 „	3.5	9.7 „	3.4

De resultaten wijzen in de richting van grotere activiteit van het toegevoegde koper ten opzichte van het natuurlijke koper.

6.4. ACTIVERING VAN HET VAN NATURE AANWEZIGE KOPER

Uitgaande van onze hypothese, dat het van nature in melk aanwezige koper op een andere wijze aan het eiwitmolecuul gebonden is als het toegevoegde koper hebben we een aantal proeven gedaan bij door ons zelf bereide boters. Het is bekend, dat koper, dat aan eiwit gebonden is bij zeer lage pH praktisch geheel in ionvorm overgaat. Wanneer we dus room kunstmatig zuren tot een dergelijke zeer lage pH mogen we verwachten, dat al het koper dus ook het van nature aanwezige in ionvorm overgaat. Wanneer we hierna de pH weer hoger doen worden door toevoeging van loog mogen we verwachten, dat praktisch al het koper weer aan eiwit gebonden wordt, echter nu in een zodanige vorm als normaal het toegevoegde koper gebonden wordt. Dit zou dus betekenen, dat een op dergelijke wijze bereide boter – hoewel dus het kopergehalte praktisch hetzelfde of waarschijnlijk nog lager zal zijn – een grotere hoeveelheid „schadelijk” koper bevat, dan de op normale wijze bereide boter.

Wij maakten bij deze proeven voornamelijk gebruik van melk van nieuwmelkse koeien om hiermede dus te beschikken over melk met een betrekkelijk hoog gehalte aan natuurlijk koper. De van deze melk verkregen room werd in drie porties gesplitst. De eerste portie werd zonder enige toevoeging op de gebruikelijke wijze met zuursel geënt (0). Aan een tweede portie werd een bepaalde hoeveelheid van een neutraal mengsel van zoutzuur + natronloog toegevoegd. Vervolgens werd geënt met zuursel (00). Aan een derde portie werd eerst druppelsgewijs zoutzuuroplossing toegevoegd tot een voldoende lage pH bereikt was. Vervolgens werd de room door toevoeging van loogoplossing op zijn oorspronkelijke pH teruggebracht. Dan werd aan de room zuursel toegevoegd (0A). De hoeveelheid toegevoegde zuur + loog bepaalde de hoeveelheid neutraal mengsel, dat aan de tweede portie moest worden toegevoegd. De resultaten zijn samengevat in tabel 22.

Uit de resultaten blijkt duidelijk, dat de boters, die bereid waren uit room, die op een pH van 1.8 à 1.9 was geweest, gevoeliger zijn voor het ontstaan van koelhuisgebreken dan de beide andere boters en dit ondanks het meestal lager kopergehalte. Het koper in deze boter was als het ware geactiveerd.

TABEL 22. Activering van het van nature aanwezige koper door toepassing van lage pH

No. boter	Kopergehalte van de boter	Peroxydgetal			Smaak			Opmerkingen
		3 mnd.	6 mnd.	9 mnd.	3 mnd.	6 mnd.	9 mnd.	
79- 0	104	0.90	0.90	0.95	0	0	0	via pH 1.9
00	89	1.05	1.05	1.10	0	?	+	
0A	64	0.75	0.85	0.95	0	+	+	
80- 0	72	0.40	0.55	0.60	0	0	0	via pH 1.9
00	74	0.80	0.90	0.95	0	?	+	
0A	72	0.75	0.85	1.00	0	+	++	
86- 0	60		0.15	0.25	0	0	0	via pH 1.9
00	57		0.40	0.50	0	0	0	
0A	42		0.40	0.55	0	+	++	
87- 0	52		0.45	0.45	0	0	0	via pH 1.8
00	49		0.70	0.80	0	0	+	
0A	48		0.75	0.90	0	+	++	
88- 0	55		0.30	0.30	0	0	0	via pH 1.9
00	58		0.55	0.55	0	0	++	
0A	46		0.60	0.65	?	?	++	
89- 0	27		0.25	0.20	0	0	0	via pH 1.9
00	27	0.30	0.30	0.35	0	0	0	
0A	24	0.30	0.35	0.36	?	+	+	

Deze proef vormt dus mede een bevestiging van onze hypothese, immers hier werd aangetoond, dat het onschadelijke koper in een vorm is te brengen, waarin ze wel schadelijk is en dan dus te vergelijken met het toegevoegde koper. Alle boters die via lage pH bereid waren bleken na kortere of langere tijd het koelhuisgebrek te krijgen. Dit in tegenstelling tot de boters (0) waaraan geen loog of zuur werd toegevoegd. De boters, waaraan alleen neutraal mengsel van loog en zuur was toegevoegd, bleken ook een lichte geneigdheid te vertonen om koelhuisgebreken te krijgen, echter in mindere mate dan de boters (0A). Voor dit verschijnsel kunnen wij zonder meer geen verklaring geven. Mogelijk staat dit in verband met de schadelijke invloed van keukenzout op de kwaliteit van de boter. Ook bij deze proeven blijkt hoe zeer kleine hoeveelheden van het schadelijke koper al van betekenis kunnen zijn (zie boter 89).

Wij hebben ons nog afgevraagd, of het mogelijk zou zijn toegevoegd koper in een inactieve toestand te brengen. Door verhoging van de pH komt het melkeiwit in een beter gedispergeerde toestand. Toegevoegd koper zou onder deze omstandigheden mogelijk op een dergelijke wijze aan het eiwit gebonden worden, dat het – bij een daarop volgende verlaging van de pH tot die van gezuurde room – als het ware in de eiwitdeeltjes opgesloten zou worden op een wijze als we voor het natuurlijk koper veronderstelden. Wij hebben hiertoe enkele oriënterende proeven gedaan. Bij deze proeven hebben we zowel koper toegevoegd vóór de loogtoevoeging als op het ogenblik dat de loog toegevoegd was. Zowel pH's van ± 8 als van ± 10 werden toegepast. Het lukte ons niet op deze wijze boter te bereiden, die duidelijk minder sterke tranige smaak vertoonde dan de boter waaraan ook koper was toegevoegd en waarbij de pH rechtstreeks verlaagd werd. Vaak werd aan de boters een vissige en tevens

een zwavelwaterstofsmaak waargenomen. Een en ander zou erop wijzen, dat een zekere mate van eiwitafbraak heeft plaats gehad. Dit maakt een interpretatie van de uitslag van deze proefnemingen niet eenvoudiger.

6.5. SLOTBESCHOUWING

In dit hoofdstuk werd vooral aandacht besteed aan onderzoeken, die zijn gedaan om inzicht te krijgen in de wijze, waarop koper en eiwit met elkaar combineren, terwijl getracht werd verband te leggen met onze proeven over koper en melkeiwitten. Eiwitten zijn in staat zeer grote hoeveelheden koper te binden. De resultaten van vele proeven, die gedaan zijn om de aard van koper-eiwitverbindingen nader te doorgronden, mogen echter geen aanleiding zijn om deze klakkeloos toe te passen op de omstandigheden zoals we in melk en boter kennen. Naar aanleiding van onze proeven over het verschil in gedrag tussen het van nature aanwezige koper en het toegevoegde koper werd een hypothese opgesteld. We dienen hierbij vooral te bedenken, dat juist bij de zeer kleine hoeveelheden koper, waarmee we bij melk te maken hebben, de situatie wel eens anders zou kunnen liggen dan bij de meeste onderzoeken het geval was, waarbij vaak veel grotere hoeveelheden koper werden gebruikt. Ook een eventuele binding van koper aan het fosphaat van caseïne zou nog mogelijk kunnen zijn. De grotere gevoeligheid voor koelhuisgebreken van boter bereid uit gezuurde room ten opzichte van boter bereid uit zoete room zou naar aanleiding van de proefnemingen van KLOTZ & FIESS (43) aan serum-eiwitten te verklaren zijn uit een verschil in de wijze van binding van koper aan eiwitten bij de verschillende pH's.

Wat ons in het bijzonder interesseerde was het verschil tussen het van nature aanwezige koper en het toegevoegde koper. Het bleek mogelijk (door toepassing van zeer lage pH) het van nature aanwezige – onschadelijke – koper te „activeren”. Wij stelden ons hierbij voor, dat het van nature aan eiwit gebonden koper, dat bij de lage pH in ionvorm overgaat, later wanneer de pH weer omhoog gebracht wordt, weer aan eiwit gebonden wordt, echter nu in een vorm die eigen is aan het toegevoegde koper. Dit resultaat geeft dus steun aan onze hypothese, dat het van nature aanwezige koper op een andere wijze aan het eiwit gebonden is dan het toegevoegde koper. Wij hebben gemeend in dit hoofdstuk hoofdzakelijk stil te moeten staan bij het complex koper-eiwit:

- 1e vanwege de quantitatief grote betekenis van deze vorm van koper in de melk, speciaal van het toegevoegde d.i. schadelijke koper.
- 2e omdat uit onze proeven over de wijze van voorkomen in melk naar voren was gekomen, dat er – quantitatief gezien – geen verschil was tussen de wijze van voorkomen in niet gezuurde en wel gezuurde melk, terwijl het kopergehalte van helder melkserum steeds uitzonderlijk laag bleek te zijn.
- 3e omdat gebleken is, dat toediening van koper-eiwitverbinding aan de boter evenals toediening van koperionen het ontstaan van koelhuisgebreken in de hand werkt.

De vraag, wat er gebeurt met de verdeling van koper over de bestanddelen in het boterplasma hebben wij onbeantwoord gelaten. Er zij aan herinnerd, dat zoals in hoofdstuk 5 is besproken een belangrijk gedeelte van het van nature aanwezige koper in de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes voorkomt.

Waarschijnlijk is, dat ook melkphosphatiden koper kunnen binden. Uit onderzoekingen van VAN DER WAARDEN (80) kwam zelfs naar voren, dat in boter koper meer aan phosphatiden gebonden wordt. Het bezwaar van deze proefnemingen was echter, dat hier met chemische isolatiemethoden gewerkt werd, waardoor mogelijk de natuurlijke toestand verstoord kon worden. Onze proeven, beschreven onder 6.4 wijzen in tegenovergestelde richting. Bij de hier bereide boters is steeds sprake van natuurlijk koper. Het kopergehalte van deze boters wordt dus bepaald door het aan oppervlaktelaagjes gebonden koper. Dat echter het kopergehalte van de boters 0A steeds lager liggen dan van boters 00 zou een aanwijzing kunnen zijn, dat ook natuurlijk koper van de oppervlaktelaagjes is afgegaan en met de plasmabestanddelen in de karnemelk is terecht gekomen.

De voorgaande proeven dienden als ondersteuning voor onze veronderstelling, dat het van nature aanwezige koper op een andere wijze aan eiwit gebonden is als het toegevoegde koper. Het bewijs is hiermede niet geleverd, immers door de behandeling van room via een lage pH werd een kunstmatige toestand geschapen en het laat zich moeilijk voorspellen welke veranderingen deze lage pH verder nog teweeg gebracht heeft, waardoor de duurzaamheid van de boter in ongunstige zin beïnvloed kon worden.

7. OXYDATIEGEBREKEN BIJ BOTER BEREID UIT BIEST

Voor het bereiden van boter uit melk met een hoog gehalte aan van nature aanwezig koper, gebruikten wij melk van nieuwmelkse koeien. Een enkele maal gebeurde het, dat we hierbij gebruik maakten van melk van koeien, die slechts enkele dagen (2 à 3 dagen) te voren gekalfd hadden. In hoofdstuk 3 hebben wij erop gewezen, dat het gehalte van melk aan koper in het begin van de lactatie zeer hoog kan zijn en dat het maximum meestal enkele dagen na het kalven wordt bereikt. Boter uit dergelijke melk had over het algemeen geen buitengewoon hoog kopergehalte. Opvallend was echter, dat sommige van deze boters een zeer uitgesproken koelhuisgebrek vertoonden: de smaak van deze boter kon meestal het beste getypeerd worden als zeer sterke levertraansmaak. Dit was voor ons aanleiding enkele boters te bereiden uit melk, gewonnen op de eerste of tweede dag na het kalven, dat wil dus zeggen uit biestmelk. De boters werden op dezelfde wijze bereid als in hoofdstuk 4 beschreven. In enkele gevallen werd naast boter zonder toegevoegd koper, boter bereid met opzettelijk toegevoegd koper.

De resultaten worden weergegeven in tabel 23.

De waarnemingen kunnen we als volgt samenvatten:

- 1e het gehalte van de boter aan koper was hoger dan normaal in boter, die zonder kopertoevoeging bereid is; het kopergehalte van de boter was gemiddeld lager dan bij de boters, die bereid werden uit melk met een van nature hoog gehalte aan koper uit het begin van de lactatieperiode, maar na de biestperiode.
- 2e de boters vertoonden reeds na 3 maanden in zeer duidelijke mate koelhuisgebreken; de smaak konden we dan meestal reeds typeren als: zeer sterke levertraansmaak. Toevoeging van koper aan een dergelijke boter had weinig of geen invloed meer. De smaak was over het algemeen sterker dan we na 9 maanden constateerden bij boter bereid uit normale melk en waarbij

TABEL 23. Oxydatiegebreken bij boter bereid uit biest.

Boter nr.	Kopergehalte van de boter gamma per kg	Peroxydgetal na			Smaak na			Opmerkingen
		3 mnd.	6 mnd.	9 mnd.	3 mnd.	6 mnd.	9 mnd.	
41-0	83	1.10	1.45		+	+++	+++	
1	101	1.25	1.40		+	+++	+++	koper toegevoegd
42-0	72	1.05	1.20		0	+	++	
1	81	1.15	1.55		+	+	++	koper toegevoegd
43-0	100	2.30	2.80		++++	++++	++++	
1	125	2.50	2.80		++++	++++	++++	koper toegevoegd
44	60	4.05	6.00		++++	++++	++++	
48	35	1.00	1.10	1.25	+++	+++	+++	
50	78	1.00	1.20	1.60	++	++	+++	

aan de room zoveel koper was toegevoegd, dat in de boters kopergehaltes voorkwamen van meer dan 400 gamma per kg.

3e de peroxydgetallen waren zeer hoog.

4e de boter, die als verse boter een vrij sterke gele kleur vertoonde, wat zou kunnen wijzen op een zeer hoog gehalte aan caroteen had na 3 maanden een merkwaardige grauwe lichtgele kleur.

Wij hebben nog aandacht besteed aan de vetzuursamenstelling van botervet van melk van de eerste dagen der lactatie. Bepaald werd hierin: het Joodadditiegetal van het vet en het gehalte aan de verschillende onverzadigde vetzuren. Voor melk van 2 koeien werden deze bepalingen verricht volgens de methode beschreven door STADHOUDERS & MULDER (74). De resultaten worden weergegeven in tabel 24.

Uit de resultaten blijkt, dat de vetzuursamenstelling van de melk van koe I gedurende de eerste 9 dagen van de lactatieperiode betrekkelijk constant bleef en niet duidelijk afweek van die, welke door STADHOUDERS & MULDER werd gevonden voor vet van normale melk. Wel was het Joodadditiegetal zeer laag. De vetzuursamenstelling bij de melk van koe II viel vooral op door het vrij hoge gehalte aan niet-geconjugeerde onverzadigde vetzuren, speciaal de tweevoudig en viervoudig onverzadigde vetzuren. Het gehalte aan tweevoudig onverzadigde niet-geconjugeerde vetzuren bleek echter ook na 7 dagen nog op hetzelfde niveau te liggen. Het gehalte aan viervoudig onverzadigde niet-geconjugeerde vetzuren was vooral op de eerste twee dagen van de lactatie vrij hoog. Na de tweede dag was het al aanmerkelijk gedaald.

Uit deze proeven kunnen we dus niet een definitieve conclusie trekken. De vraag, of de samenstelling aan onverzadigde vetzuren van het botervet van biest in duidelijke mate afwijkt van die van normale melk kan hier niet beantwoord worden. Behalve de vetzuursamenstelling van het botervet lijkt ons ook van belang aandacht te besteden aan de vetzuursamenstelling van de fosphatiden. Ook de vraag, of met bloed misschien bestanddelen in de biest komen, die een sterk pro-oxyderende werking hebben, zou onder ogen gezien moeten worden. Wij hebben hieraan verder geen aandacht besteed. Tijdens de studie verscheen een publicatie van VAN DUIN (23); hierin werd aangetoond, dat be-

TABEL 24. Het gehalte aan onverzadigde vetzuren in botervet van biest

Datum monstername	J-additie- getal	C ₂ geconj.	C ₃ geconj.	C ₄ geconj.	C ₂ niet- geconj.	C ₃ niet- geconj.	C ₄ niet- geconj.	Olie- zuur
I. Kalfdatum 3-4-1956								
3-4 avond	28.9	0.40	0.007	0.001	0.80	0.70	0.33	26.17
4-4 morgen	28.7	0.41	0.007	0.001	1.04	0.76	0.34	25.21
4-4 avond	29.2	0.44	0.008	0.002	0.98	0.73	0.34	25.91
5-4 morgen	27.5	0.45	0.012	0.001	1.16	0.72	0.31	23.79
6-4 morgen	28.5	0.46	0.014	0.002	1.10	0.74	0.29	25.01
9-4 avond	30.9	0.49	0.016	0.002	1.19	0.70	0.22	27.83
11-4 morgen	31.7	0.51	0.014	0.003	1.05	0.80	0.20	28.74
II. Kalfdatum 1-5-1956								
1-5 morgen	35.1	0.50	0.006	0.001	3.43	0.33	1.09	25.57
2-5 morgen	35.9	0.62	0.010	0.002				
2-5 avond	37.1	0.61	0.009	0.001	3.47	0.31	1.25	26.89
3-5 morgen	37.1	0.66	0.011	0.002	4.54	0.42	1.16	24.66
3-5 avond	36.2	0.69	0.012	0.001	2.86	0.65	0.76	27.91
4-5 morgen	35.0	0.70	0.015	0.002	3.54	0.73	0.80	24.77
4-5 avond	32.6	0.69	0.015	0.003	3.49	0.65	0.63	23.16
5-5 morgen	32.1	0.65	0.015	0.002				
7-5 morgen	35.4	0.67	0.016	0.002	3.93	0.49	0.65	25.83

smetting met bloed inderdaad het optreden van oxydatiegebreken kan bevorderen.

Het feit, dat boter bereid uit biest of zeer nieuwe melk zo snel koelhuisgebreken vertoont heeft uiteraard geen directe praktische betekenis, daar biestmelk niet mag worden verwerkt. Toch kan een verklaring van dit verschijnsel van belang zijn. Deze verklaring zouden we in twee richtingen kunnen zoeken: de gemakkelijke vorming van het smaakgebrek hangt samen

- 1e met een gemakkelijk oxydeerbaarheid van vet of vetachtige stoffen. Hiervoor zou de oorzaak dus gezocht moeten worden bij de samenstelling van vet of fosphatiden. Alleen aan de samenstelling van vet hebben wij enige aandacht besteed.
- 2e met het afwezig zijn van oxydatie-remmende invloeden of het aanwezig zijn van oxydatie-bevorderende invloeden in de melk.

Waarschijnlijk zouden we de veroorzakende factor al enigszins kunnen localiseren, door boter te bereiden uit ondermelk van biest en vet van normale melk of door boter te bereiden uit vet van biestmelk en normale ondermelk.

SAMENVATTING

Het onderzoek van MULDER c.s. (59), waarbij bleek, dat toevoeging van koperzouten tijdens de bereiding van boter de duurzaamheid van dit product in ongunstige zin beïnvloedde, terwijl toevoeging van ijzer- en mangaanzouten geen ongunstige invloed had, gaf logischerwijze aanleiding tot verder onderzoek. In de eerste plaats dienden wij te weten, hoe de hoeveelheid van nature in de melk aanwezig koper kan variëren. Uit een onderzoek, dat hiernaar werd ingesteld, kwam naar voren, dat inderdaad bij individuele koeien variatie mogelijk is. De belangrijkste factor hierbij is het tijdstip van lactatie. Vooral in de

eerste weken van de lactatie kunnen zeer hoge kopergehalten voorkomen. Individuele variaties in het gehalte van de melk komen vooral in de eerste weken van de lactatie voor. Van een invloed van de voeding op het gehalte van de melk aan koper is niets gebleken. Verwacht mag worden, dat de variatie in het kopergehalte, die verband houdt met de lactatie in het voorjaar, een – zij het geringe – stijging van het gehalte van de aan zuivelfabrieken ontvangen gemengde melk tengevolge kan hebben, daar dan veel koeien in een kort tijdsbestek kalven. Evenals voor koper hebben wij het gehalte aan ijzer gedurende de lactatie nagegaan. In grote trekken werd hier dezelfde tendens waargenomen. Wel kwam het voor, dat vooral in de allereerste dagen van de lactatie het gehalte van de melk aan ijzer uitermate hoog was. Dit kon echter worden toegeschreven aan de aanwezigheid van sporen bloed in deze melk.

Ten aanzien van de invloed van de metalen op het ontstaan van koelhuisgebreken van boter, stelden wij ons de vraag, of het van nature in de melk aanwezige koper dezelfde invloed zou hebben als het aan melk toegevoegde koper. Door uit te gaan van melk van individuele koeien, welke in het begin van de lactatie verkeerden, waren wij in staat boter te maken met een zeer hoog gehalte aan natuurlijk koper. De proefnemingen, die hierop betrekking hadden toonden aan, dat het steeds mogelijk was goed houdbare boter te maken, indien noch aan de melk noch tijdens de bereiding koper werd toegevoegd, ook wanneer het gehalte van de boter boven 100 gamma per kg kwam. Werdt tijdens de bereiding een zeer geringe hoeveelheid koper als koperzout toegevoegd, dan werd de houdbaarheid in de meeste gevallen duidelijk geringer; toevoegingen welke resulteerden in een verhoging van het kopergehalte van de boter van 25 gamma per kg en zelfs minder hadden een duidelijk waarneembare invloed op de houdbaarheid van de boter.

Ook de invloed van ijzer en mangaan werd nader bestudeerd. Hiertoe werden verschillende combinaties van deze metalen als toevoegingen toegepast. Evenals door MULDER werd gevonden hadden toevoegingen van ijzer en mangaanzout geen invloed bij het ontstaan van koelhuisgebreken. Verder bleek, dat van een onderlinge beïnvloeding van deze metalen geen sprake was, welke combinatie van de drie metalen ook gekozen werd. Alleen koper bleek dus de houdbaarheid in ongunstige zin te beïnvloeden. IJzer- en mangaanzouten brachten evenals MULDER schreef wel smaakafwijkingen te weeg; deze smaak was dadelijk na de toevoeging reeds aanwezig en had dus niets te maken met een chemische verandering in de boter. Het was de smaak van het betrokken metaalzout.

Het verschil in gedrag tussen het van nature in de melk aanwezige koper en het toegevoegde koper was voor ons aanleiding nader aandacht te besteden aan de wijze van voorkomen van enkele metalen in de melk. De resultaten kunnen als volgt worden samengevat:

Koper: In het vet van de melk komt geen koper voor. Naar aanleiding van oproomprouwen kon worden berekend, dat gemiddeld ongeveer 15 à 20% van het van nature in de melk aanwezige koper aan de oppervlaktelaagjes der vetbolletjes gebonden is. Het overige koper is in het melkplasma aanwezig en practisch geheel aan eiwit gebonden. Van toegevoegd koper komt een kleiner gedeelte – ca. 2.5% – in de oppervlaktelaagjes terecht. De rest komt in het plasma en wordt ook practisch geheel door eiwit gebonden. Voor het voorkomen van vrije koperionen werd geen aanwijzing gevonden, ook niet in zure melk.

IJzer: Het percentage van het van nature in melk aanwezige ijzer, dat in de oppervlaktelaagjes voorkomt is gemiddeld ongeveer 30 à 55%. Toegevoegd ijzer werd niet of nauwelijks aan de oppervlaktelaagjes gebonden.

Het verschil in gedrag tussen het van nature aanwezige koper en het toegevoegde koper kon nog op verschillende wijzen bevestigd worden. Ook kon worden aangetoond dat toevoeging aan boter van melkeiwit, waaraan koper was toegevoegd, het ontstaan van koelhuisgebreken bevorderde in gelijke mate als toevoeging van koper zonder eiwit. De resultaten deden vermoeden, dat het van nature aanwezige koper op een andere wijze aan de melkbestanddelen gebonden is dan het toegevoegde koper. Wij zijn er echter niet in geslaagd een methode te vinden, waarmee beide soorten koper afzonderlijk bepaald kunnen worden.

Tenslotte willen wij wijzen op de betekenis van de resultaten voor de praktijk. Toevoeging van – zelfs zeer geringe hoeveelheden – koper kan oorzaak zijn van het ontstaan van koelhuisgebreken van boter. Door een radicale verwijdering van alles in het bedrijf wat ook maar de geringste aanleiding zou kunnen geven tot besmetting van boter met koper moeten we in staat zijn normale gezuurde boter te maken zonder al te grote risico's te lopen, dat bij bewaring in het koelhuis oxydatiegebreken gaan optreden.

De laatste jaren valt er een tendens te bespeuren om boter te bereiden uit niet-gezuurde room met als enkele reden het optreden van koelhuisgebreken te voorkomen. Een dergelijke boter heeft zijn naam nog slechts te danken aan zijn chemische samenstelling, maar mist o.a. de typische aromatische eigenschappen van een goede boter, bereid uit gezuurde room. Ook andere wijzen van boterbereiding – vaak zeer omslachtig en onlogisch – als b.v. het karnen van in koelhuizen opgeslagen zoete room, zijn niet noodzakelijk.

Ook het stellen van grenzen aan het kopergehalte van de boter, zoals door het Z.K.B. geschiedt, kan hier niet de uiteindelijke oplossing brengen. Een grens voor de hoeveelheid koper, waaronder nooit koelhuisgebreken zullen voorkomen of waarboven altijd sprake zal zijn van koperbesmetting, is niet te geven. Een dergelijke grens kan zelfs de aandacht verslapen voor het feit, waar het om gaat n.l. te zorgen voor het voorkómen van de geringste koperbesmetting. Ook de koperbesmettingen, welke buiten het zuivelbedrijf in de melk kunnen komen, dus op de boerderij, dienen ten koste van alles tegengegaan te worden. Dat dit nog niet gebeurt, bewijst wel het nog veelvuldig voorkomen van koperen zeefplaatjes op de boerderij. Ook het gebruik van melkmachines met koperen of niet voldoende vertinde onderdelen zou in dit opzicht niet langer getolereerd moeten worden.

SUMMARY

From the results of experiments by MULDER et al (59), published in 1949, it appeared that the addition of copper-salts during the process of buttermaking had a harmful effect as regards the keeping quality of this product, while the addition of iron- or manganese-salts had no unfavourable effect. These findings gave cause for further investigation.

In the first place we should know: what is the quantity of natural copper in milk and which factors are able to influence this quantity. Determinations of the copper content in milk of individual cows during lactation clearly indicated

that usually only in the first weeks of lactation an important higher copper content is present. It was found that feeding had no influence on the quantity of copper in milk, even when abnormal quantities of copper were fed to the cows. During Spring – when most cows calve – it is possible that a higher content of natural copper will be found in the milk received at the Dairies. In the case of iron we found nearly the same trends and especially in the first few days of lactation very high iron contents are possible. This we could attribute to the presence of a little quantity of blood in the milk.

Concerning the influence of these metals on the cold-storage defects of butter, the question arised whether a higher natural copper content of milk had the same influence on this defect than added copper. To be able to examine this, milk from individual cows in their first weeks of lactation, was used for the buttermaking experiments; thus making it possible to obtain butter containing high content of natural copper. These experiments clearly showed that it was always possible to obtain butter of good quality after 9 months storage, even when the copper content was higher than 100 gamma per kilogram. Adding a small quantity of copper in the form of a copper-salt during butter-making usually caused oxidation defects of the butter in cold storage after a few months. Copper added to the cream which eventually gave an increase of the copper content in the butter of approximately 25 gamma per kg and even less, had a significant influence on the keeping quality of the butter. The influence of iron and manganese was also studied. All the metals in different possible combinations, were added to the cream. We found that iron- and manganese-salts had no influence, which is in agreement to that found by MULDER et al. Further it appeared that these three metals did not influence each other as to their effect on butter in whatever combinations they were used. The harmful influence as regards to cold-storage defects could thus only be ascribed to the added copper. Iron- and manganese-salts caused a flavour-defect, but it was the same as that of the salt solution itself and was present from the time it was added.

The difference in behaviour between natural and added copper was to us a motive to give attention in what chemical form these metals – and especially copper – are present in milk. The results were as follows:

Copper: No copper was found in the fat of milk. Approximately 15 to 20 per cent of the natural copper is bound to the surface layers of the fat globules. The rest of the copper is in the milk plasm and nearly totally bound to the proteins. Of the added copper a smaller part is bound to the surface layers of the fat globules (2.5%) and the rest to the proteins. We found no indication that copper-ions are present in milk, not even in soured milk.

Iron: The percentage of the natural iron bound to the surface layers of the fat globules is approximately 30 to 55 per cent. No added iron, or at the most a very small quantity was bound to the surface layers.

The difference in behaviour between natural and added copper could be confirmed in different ways. It could also be shown that the addition of milk proteins containing added copper to butter promoted the development of cold-storage defects and to the same extent when copper was added as such. From the results it could be deducted that the natural copper is bound in a different manner to the milk constituents than the added copper. We, however, did not succeed in developing a method by which both forms of copper could be determined separately.

Finally we want to stress the importance of these results as to its application in practice. The addition of a very small quantity of copper will nearly always cause cold-storage defects in butter. Only by the removal of everything in the dairy factory that could possibly cause the slightest degree of copper contamination would it be possible to manufacture normal sour butter, without running the risk of the development of cold-storage defects. During latter years there is a tendency to manufacture butter from sweet cream; the only reason being to prevent these cold-storage defects. This type of butter only owe its name for the sole reason of its chemical composition, but lack, amongst others, the typical aroma of a good butter as manufactured from soured cream. Any other methods of butter manufacture – usually tedious and illogical – e.g. the manufacture of butter from sweet cream that were held in cold-storage, are unnecessary.

By fixing a minimum limit for the copper content of butter (as done by the Office for Quality Control of Dairy Products) will also not solve this problem. It is impossible to set a limit for the copper content of butter, where, below this value one cannot be sure of not obtaining a flavour defect, or above, where there is no certainty of actual copper contamination. Such a limit will distract the attention from the main purpose i.e. to prevent even the slightest degree of contamination. It is also of importance that copper contamination should be prevented on the farm. The use of copper sieves or of milking machines with copper, or badly tin-coated accessories on the farm should not be tolerated.

LITERATUUR

1. ALBERT, A., *Biochem. Journal* **47**, 531 (1950).
2. ALBERT, A., *Biochem. Journal* **50**, 690 (1950).
3. ALLAN, J. E., *J. Dairy Research* **17**, 54 (1950).
4. ALLCROFT, R. & O. UVAROV. *The Veterinary Record* **71**, 797 (1959).
5. ARCHIBALD, J. G., *Milk Plant Monthly* **30** (9), 37 (1941).
6. ARCHIBALD, J. G., *J. of Dairy Science*, **27**, 257 (1944).
7. ARCHIBALD, J. G., *J. of Dairy Science*, **30**, 293 (1947).
8. ARCHIBALD, J. G., *J. of Dairy Science*, **32**, 877 (1949).
9. ARCHIBALD, J. G., *J. of Dairy Science*, **34**, 1026 (1951).
10. ARCHIBALD, J. G., *J. of Dairy Science*, **38**, 159 (1955).
11. ARCHIBALD, J. G. & H. G. LINDQUIST, *J. of Dairy Science*, **26**, 325 (1943).
12. ARRINGTON, L. R. & W. A. KRIENKE, *J. of Dairy Science*, **37**, 819 (1954).
13. BARKAN, G., *Z. physiol. Chem.* **216**, 1 (1933).
- 13a. BARKAN, G. & O. SCHALES, *Z. physiol. Chem.* **248**, 96 (1937).
14. BARRON, E. S. G., R. H. DE MEIO & F. KLEMPERER, *J. Biol. Chem.* **112**, 625 (1936).
15. BAS, J. M. v. D., Niet gepubliceerd verslag.
16. BORSOOK, H. & K. V. THIMANN, *J. Biol. Chem.* **98**, 671 (1932).
17. BOYDEN, R. & V. R. POTTEN, *J. Biol. Chem.* **112**, 285 (1937).
18. BROEK, A., Over het koper-, mangaan- en zinkgehalte van melk. Utrecht (1935).
19. BROEK, A. & L. K. WOLFF, *Acta brev.* **5**, 80 (1935).
20. DAVIES, W. L., *J. of Dairy Research* **4**, 255 (1933).
21. DILLS, W. L. & J. M. NELSON, *J. Amer. Chem. Soc.* **64**, 1116 (1942).
22. DREA, W. F., *J. of Nutrition* **16**, 325 (1938).
23. DUIN, H. VAN, *Nizo-Nieuws*, serie 7/IV. *Officieel Orgaan* **53**, 331 (1961).
24. ELVEHJEM, C. A., B. C. HERRIN & E. B. HART, *J. of Biol. Chemistry* **71**, 255 (1927).
25. ELVEHJEM, C. A., H. STEENBOCK & E. B. HART, *J. of Biol. Chemistry* **83**, 27 (1929).
26. FRENS, A. M., *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* **68**, 763 (1941).
27. GOLDING, J. & E. FEILMAN, *J. Soc. Chem. Ind., London* **24**, 1285 (1905).
28. GRIFT, J. v. D., *Verslagen van Landbouwkundige onderzoekingen* no. 61–10 (1955).
29. GRIMMER, W., *Deutsche Molkerei Zeitung* **59**, 33, 1114 (1938).

30. GUBLER, C. J., M. E. LAHEY, D. M. BROWN, E. L. SMITH, G. E. CARTWRIGHT & M. M. WINTROBE, *Federation Proc.* **10**, 356 (1951).
31. GUBLER, C. J., M. E. LAHEY, G. E. CARTWRIGHT & M. M. WINTROBE, *Journal of Clinical Investigation* **32**, 405 (1953).
32. HARTMANN, S., *Denmark Statens Forsøgsmejeri* **41**, Beretning (1944).
33. HENRIQUE, V. & A. ROCHE, *Bull. Soc. Chim. biol. Paris* **11**, 679 (1929).
34. HERDER, P. C. DEN & B. M. KROL, *Ned. Melk- en Zuiveltijdschrift* **4**, 42 (1950).
35. HORST W. & K. H. SCHÄFER, *Klinische Wochenschrift* **31**, 791 (1953).
36. HUNZIKER, O. F. & O. F. HOSMAN, *J. of Dairy Science* **1**, 320 (1918).
37. KAPELLE, D., *Landbouwkundig Tijdschrift* **63**, 302 (1951).
38. KEESTRA F., *Jaarverslag Z.K.B.* (1947).
39. KEMMERER, A. R. & W. R. TODD, *J. biol. Chem.* **94**, 317 (1931).
40. KING, R. L. & W. L. DUNKLEY, *J. of Dairy Science* **42**, 420 (1959).
41. KING, R. L., J. R. LUICK, I. I. LITMAN, W. G. JENNINGS & W. L. DUNKLEY, *J. of Dairy Science* **42**, 780 (1959).
42. KLOTZ, I. M. & H. CURVE, *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 1939 (1948).
43. KLOTZ, I. M., I. L. FALLES & J. M. URQUHART, *J. Phys. & Coll. Chem.* **54**, 18 (1950).
KLOTZ, I. M. & H. A. FIESS, *J. Phys. & Coll. Chem.* **55**, 101 (1951).
44. KOPPEJAN, C. A. & B. V. D. BURG, *Hand. Genootschap Melkkunde* **36** (1935).
45. KOPPEJAN, C. A. & H. MULDER, *Proc. Int. Dairy Congr. Den Haag*, 1400 (1953).
46. KRUISHEER, C. I., P. C. DEN HERDER, W. WERKER & J. G. VAN GINKEL, *Ned. Melk- en Zuiveltijdschrift* **3**, 25 (1949).
47. KRUISHEER, C. I. & B. M. KROL, *Ned. Melk- en Zuiveltijdschrift* **9**, 173 (1955).
48. LAGONI, H., A. WORTMANN & D. MERTEN, *Kieler Milchw. Forschungsber.* **9** (1) 79 (1957).
49. LEMBKE, A., *Kieler Milchw. Forschungsber.* **8**, 653 (1956).
50. LIEBSCHER, W., *11e Milchw. Weltkongr. Berlin* **1**, 130 (1937).
51. MC.DOWELL, A. K. R., *J. of Dairy Res.* **22**, 349 (1955).
52. MACHEBOEUF, M. & M. VISCONTI, *Annales de l'Institut Pasteur* **71**, 188 (1945).
53. MC.ILROY, R. J., *New Zealand J. Sci. Techn.* **17**, 710 (1935).
54. MULDER, H., *Persoonlijke mededeling*.
55. MULDER, H., *Ned. Melk- en Zuiveltijdschrift* **11**, 197 (1957).
56. MULDER, H. & J. H. B. KLEIKAMP, *Ned. Melk- en Zuiveltijdschrift* **1**, 225 (1947).
57. MULDER, H., J. H. B. KLEIKAMP & N. KING, *Ned. Melk- en Zuiveltijdschrift* **1**, 219 (1947).
58. MULDER, H. & C. A. KOPPEJAN, *Proc. 13th Int. Dairy Congr. Den Haag*, 1403 (1953).
59. MULDER, H., C. I. KRUISHEER, P. C. DEN HERDER & J. G. VAN GINKEL, *Ned. Melk- en Zuiveltijdschrift* **3**, 37 (1949).
60. MULDER, H. & J. W. MENDER, *Ned. Melk- en Zuiveltijdschrift* **12**, 1 (1958).
61. MULDER, H., J. W. MENDER, P. TIERSMA & A. ADAMSE, *Proc. 13th Int. Dairy Congr. Den Haag*, 486 (1953).
62. POSTHUMUS, G., *Ned. Weekblad voor Zuivelver. & Handel* **49**, 161 (1943).
63. RAADSVELD, C. W., *Officieel Orgaan* **51**, 275 (1959).
64. RICE, F. E. & J. MISCALL, *J. of Dairy Sc.* **6**, 261 (1923).
65. RITTER, W., *Schweiz. Milchztg.* **59** (1936).
66. ROGERS, L. A., *U.S.D.A. Bureau of An. Ind. circular* 146 (1909).
67. ROGERS, L. A., W. N. BERG, C. R. POTTEIGER & B. J. DAVIDS, *U.S.D.A. Bureau of An Ind. Bull.* 162 (1913).
68. ROGERS, L. A., S. C. THOMPSON & J. KIETHLY, *U.S.D.A. Bureau of An. Ind. Bull.* 148 (1912).
69. SATO, M. & K. MURATA, *J. of Dairy Science*, **15**, 451, (1932).
70. SCHÄFER, K. H., *Monatschrift für Kinderheilkunde* **99**, 69 (1951).
71. SCHÄFER, K. H., A. M. BREYER & H. KARTE, *Zeitschr. für Kinderheilkunde* **76**, 501 (1955).
72. SCHÄFER, K. H., A. M. BREYER, W. HORST, H. KARTE & W. LENZ, *Klin. Wschr.* **34**, 300 (1956).
73. SOMMER, H. H. & B. J. SMIT, *Agr. Exp. Station, University of Wisconsin, Res. Bull.* 57 (1923).
74. STADHOUDERS, J. & H. MULDER, *Ned. Melk- en Zuiveltijdschrift* **9**, 182 (1955).
75. STOTZ, E., C. J. HARRER & C. G. KING, *J. biol. Chem.* **119**, 511 (1937).
76. THOMAS, B. H., *Rep. Iowa Agric. Exp. Sta.* 87 (1937).
77. TOLLENAAR, F. D., *Bestrijding van koelhuisgebreken van boter met behulp van anti-oxydanten, diss., Utrecht* (1953).
78. UNDERWOOD, E. J., *Trace elements in human and animal nutrition* (1956).
79. VAHLQUIST, B., *Acta paediatr. (Stockholm) Suppl.* **5**, 28 (1941).
80. WAARDEN, M. v. D., *Verslagen van Landbouwkundige Onderzoekingen*, no. 50 (2) G (1944).
81. *Zuivel-Kwaliteitscontrole-Bureau. Jaarverslagen.*