

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION TE HOORN.

De invloed van den zuurgraad van de melk op de vernietiging der peroxydase door verhitten.

DOOR

A. BOUMA en W. VAN DAM.

(Ingezonden 10 April 1918).

Nu ook in ons land tengevolge van het Koninklijk Besluit, waarbij pasteurisatie van centrifugemelk en wei verplichtend gesteld is, de reactie van STORCH een grootere praktische beteekenis heeft gekregen, kwam het ons wenschelijk voor onze kennis van de factoren, die invloed uitoefenen op de dooding der peroxydase door verwarming van de melk, zoo mogelijk nog een weinig uit te breiden. Hieronder zijn de uitkomsten medegedeeld van een onderzoek, dat ten doel had vast te stellen, in hoeverre de zuurgraad van de melk invloed heeft op de snelheid, waarmede genoemd enzym bij een bepaalde temperatuur onwerkzaam wordt gemaakt.

In de litteratuur vindt men een groot aantal onderzoekingen vermeld, die alle ten doel hadden na te gaan bij welke temperatuur de peroxydase eigenlijk wordt gedood. De uitkomsten daarvan liepen zeer sterk uiteen en uit de verkregen cijfers kon wel geconcludeerd worden, dat van een bepaalde temperatuur, waarbij het enzym gedood zou worden, geen sprake kan zijn. Voor dengene, die bekend was met het begrip „reactiesnelheid” moest het wel duidelijk zijn, dat het gebrek aan overeenstemming bij de proeven van verschillende onderzoekers vermoedelijk was toe te schrijven aan de omstandigheden, waaronder ze genomen werden. Door een uitstekend onderzoek van VAN ECK ¹⁾ werd volkomen klaarheid gebracht in deze zaak. Deze onderzoeker stelde zich niet de vraag: wat is de hoogste temperatuur, die het enzym nog verdragen kan, maar hij bepaalde de reactiesnelheid voor het afsterven bij een bepaalde temperatuur. Hij ging hiertoe als volgt te werk.

In een vloeistofthermostaat van de gewenschte temperatuur werd een kolf met een hoeveelheid melk gebracht, die te voren snel

1) Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel 22. 393. (1911).

verhit was op dezelfde temperatuur of *iets* hooger. Na eenigen tijd, als de melk de gewenschte temperatuur had aangenomen, werd een kleine hoeveelheid snel afgepipetteerd en onmiddellijk in een in ijs geplaatst dunwandig buisje overgebracht, waardoor dus de vernietiging der peroxydase ophield. Met tussenpoozen werd deze operatie herhaald. Dat door regelmatig roeren, zoowel van het water als van de melk, voor een zoo goed mogelijke warmteverdeeling werd gezorgd, spreekt van zelf. Op deze wijze werd dus een serie buisjes met melk verkregen, waarin minder peroxydase voorkwam, naarmate ze langer aan de temperatuur van den thermostaat was blootgesteld geweest. Het kwam er nu, voor de berekening van de reactieconstante, op aan de relatieve hoeveelheden peroxydase in een bepaald volume der melk in deze buisjes te bepalen. VAN ECK maakte zich voor dit doel een serie melkmonsters, die verkregen werd door vermenging van gesteriliseerde, dus levend-enzymvrije melk, met niet verwarmde melk. Door de hoeveelheden van beide te veranderen kon een, wat de hoeveelheid peroxydase betreft, regelmatig afnemende serie gemaakt worden. Aan deze mengsels werden nu op de gewone wijze parafenyleendiamine en waterstofsuperoxyd toegevoegd, waardoor een sterker blauwkleuring optreedt, naarmate het peroxydasegehalte hooger is. Met de kleuren van deze schaal werden dan de kleuren van de uit de proefkolf gepipetteerde hoeveelheden melk, die op dezelfde wijze met de genoemde reagentia behandeld waren, vergeleken, ter vaststelling van de relatieve hoeveelheden enzym, die na een zekeren tijd verwarmen nog niet gedood waren. Bij substitutie der gevonden waarden en de overeenkomstige tijden in de bekende vergelijking voor reacties van de eerste orde: $K = \frac{1}{t} \log \frac{A-x}{A}$ waarin A de hoeveelheid aanwezig enzym bij het begin der proef en x de hoeveelheid vernietigd enzym na een tijd t beduidt, werden voor K nagenoeg constante waarden gevonden, waarvan het gemiddelde de reactiesnelheid aangeeft. Zoo vond VAN ECK voor K bij 70,3°, 70,8°, 71,45° en 72,25° C. resp. 0,0165, 0,0276, 0,0462 en 0,0792. Uit deze cijfers blijkt duidelijk de groote invloed van de temperatuur op de snelheid, waarmede het enzym vernietigd wordt. In aansluiting aan dit onderzoek verrichtte ook ZILVA ¹⁾ eenige metingen van de reactiesnelheid bij verschillende temperaturen. Met behulp van de bekende formule van VAN 'T HOFF-ARRHENIUS bepaalde hij voorts den temperatuurcoëfficiënt, die 2,23 per graad bedroeg. De kennis van deze grootte stelde hem in staat te berekenen, na hoeveel tijd bij verschillende temperaturen 90% van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid peroxydase vernietigd is. Waar een hoeveelheid van $\pm 1\%$ van de peroxydase der melk door de Storchesche reactie nog nauwelijks aantoonbaar is, berekenden we zoowel uit de cijfers van ZILVA als uit die van VAN ECK, na

¹⁾ The biochem. Journal. Vol. VIII. (1914).

hoeveel tijd 99 % van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid enzym bij verschillende temperaturen verdwijnt. Tabel I bevat de uitkomsten dezer becijfering.

TABEL I.

Temperatuur.	K volgens ZILVA.	K volgens VAN ECK	Tijd, noodig voor de vernietiging van 99 pct. der peroxydase.
70	0,0133	0,0130	150 min.
71	0,0297	0,0290	66 "
72	0,0663	0,0648	30 "
73	0,148	0,145	13 1/2 "
74	0,330	0,323	6 "
75	0,737	0,723	2 1/2 "
76	1,643	1,614	1 " 12 sec.
77	3,663	3,607	30 sec.
78	8,169	8,062	14 "
79	18,328	18,019	6 "
80	40,72	40,4	2 1/2 "

Uit deze tabel blijkt ten eerste, dat de waarden voor K, afgeleid uit de waarnemingen van beide onderzoekers, vrijwel aan elkaar gelijk zijn. Voorts zijn de cijfers der laatste kolom in goede overeenstemming met hetgeen de ervaring leert, al is een nauwkeurige vergelijking niet mogelijk, omdat steeds een zekere tijd noodig is om de melk tot de bepaalde temperatuur te verwarmen, gedurende welken tijd ook reeds enzym wordt vernietigd.

Zoowel VAN ECK als ZILVA wijzen in hunne verhandeling op de omstandigheid, dat met de beteekenis van den zuurgraad der melk nimmer rekening gehouden werd, ofschoon STORCH er reeds op gewezen had, dat de peroxydase bij een lagere temperatuur afsterft, naarmate de zuurgraad van het medium hooger is. ZILVA deed dus ook een poging om den invloed van den reëlen zuurgraad te vinden. Hij uit zich daarover als volgt ¹⁾:

„Experiments were instituted with the object of studying the effect of acidity and alkalinity on the rate of inactivation of peroxydase in milk. The H-ion concentration of the milk was determined by the gas-chain method. Unfortunately the determination of (H) concentration in a medium like milk is fraught with many technical difficulties, and the results obtained, though definitely showing the general effect of acidity and alkalinity, are not exact enough for publication in detail. The result arrived at is that a small increase in acidity retards and in alk. accelerates the rate of inactivation. Thus the addition of such a quantity of lactic acid as changed the P_H of the milk from about 6,57 to 5,75 brought down the constant at 70° C. from 0,01333 to 0,01086,

¹⁾ l. c.

while the addition of potash wick changed the P_H to about 8,26 increased the rate of inactivation at the same temperature to such an extent, that the peroxydase content of the milk came down to 2 % in the preliminary heating."

Met eenige verwondering zagen wij in de hier aangehaalde regels de opmerking, dat de bepaling van de waterstof-ionenconcentratie van een vloeistof als melk, technische bezwaren oplevert. Door verschillende onderzoekers toch werd bij deze metingen geen bezwaar ondervonden. Intusschen dient opgemerkt te worden, dat ZILVA genoodzaakt was de bepalingen bij 70° C. uit te voeren, een temperatuur waarbij, voor zoover ons bekend, nog geen aciditeitsmetingen van melk waren verricht. Zooals hieronder blijken zal kunnen 'zich bij deze temperatuur inderdaad groote bezwaren voordoen, wanneer men niet in de gelegenheid is te werken met geheel verse melk, die met eenige zorg bij het melken verkregen is. Uit de drie door ZILVA medegedeelde cijfers blijkt, dat een verandering van de waterstof-ionenconcentratie van $0,27 \times 10^{-6}$ tot $1,75 \times 10^{-6}$ norm. de reactieconstante deed dalen van 0,0133 tot 0,0109, terwijl een vermindering van de reële aciditeit tot $5,5 \times 10^{-9}$ norm., waardoor phenolphthaleïne dus nog nauwelijks eenigermate gekleurd wordt, de dooding van het enzym zoodanig versnelde, dat *gedurende* het verwarmen tot 70° C. reeds 98 % der oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid peroxydase vernietigd was. Deze weinige aanwijzingen van ZILVA, waardoor de groote invloed van de hydroxylionen waarschijnlijk werd, maakten een nader onderzoek naar de beteekenis van den zuurgraad wenschelijk.

I. De meting van den reëelen zuurgraad van de melk bij 70° C.

Deze werd op de gewone wijze uitgevoerd door potentiaalmeting. Als afleidingselectrode, waarvoor bij lagere temperaturen een calomelelectrode het gemakkelijkst is, werd gebruikt het door MICHAELIS aanbevolen standaardacetaatmengsel (zoowel ten opzichte van azijnzuur als natriumacetaat $\frac{1}{10}$ norm.) met waterstofelectrode. De H-ionenconcentratie van deze vloeistof, die bij kamertemperatuur $2,38 \times 10^{-5}$ norm. bedraagt, werd vastgesteld met behulp van een $\frac{1}{1000}$ en $\frac{1}{100}$ normaal HCl gaselectrode. De gebruikte electrodevaatjes waren van Jenaglas vervaardigd; de gasruimte was klein ten opzichte van de gebruikte hoeveelheid vloeistof. Met het verschil in spanning van het waterstofgas in de beide elektroden, dat optreedt tengevolge van het verschil in dampspanning van de beide vloeistoffen, is geen rekening gehouden. Zooals bekend, is de hier bedoelde invloed zeer klein. Bij de berekening werd de dissociatie van het gebruikte zoutzuur als volledig beschouwd. Niettegenstaande de electrodevaatjes vóór de proef gedurende een half uur uitgestoomd werden, meenden wij bij voortgezette waarneming een langzame aantasting van

het glas te kunnen constateeren bij deze hooge temperatuur. Intusschen was deze niet van dien aard, dat geen voldoende nauwkeurige uitkomsten verkregen konden worden.

Twee metingen tegen $\frac{1}{1000}$ norm. HCl leverden bij 70° C. voor het acetaatmengsel: 2,52 — en $2,65 \times 10^{-5}$ norm. H. Een derde bepaling, anderhalf jaar later, met een ander instrumentarium verricht tegen $\frac{1}{100}$ norm. HCl, leverde weer $2,65 \times 10^{-5}$ norm., zoodat wij de waarde $2,6 \times 10^{-5}$ norm. hebben aangenomen als basis voor onze berekeningen van den reëelen zuurgraad van de melk bij deze temperatuur.

Bij het experimenteren met melk deden zich al spoedig zeer onaangename verschijnselen voor. Meestal werd niet alleen geen constante instelling verkregen, maar bij het zoeken naar den nulstand voor den electrometer werden zóó onmogelijke waarden gevonden, dat het zeer twijfelachtig was, of langs dezen weg wel bruikbare uitkomsten te wachten waren. In sommige gevallen echter werd gedurende eenige minuten een constante instelling gevonden, maar dan zag men plotseling den meniscus van den electrometer weer uit het gezichtsveld verdwijnen. Het verschijnsel herinnerde levendig aan een „vergiftiging” van de electrode door in de melk aanwezige stoffen. Om deze zoo mogelijk te voorkomen herhaalden wij de proeven met melk, die onder de noodige voorzorgen gewonnen, en na het melken onmiddellijk afgekoeld was. Bij de metingen deed zich nu het bovengenoemde verschijnsel niet meer voor. Intusschen werd toch ook dan in eenige gevallen geen constante instelling waargenomen: het potentiaalverschil werd langzamerhand, maar regelmatig kleiner, echter niet meer dan een paar millivolts in één à twee uur, zoodat ook in deze ongunstige gevallen toch waarden verkregen konden worden voor de waterstofionenconcentratie, die zeker niet ver van de werkelijke waarde verwijderd zijn. Voor iedere bepaling werden opnieuw geplatineerde elektroden gebruikt.

De met niet *geheel* verse melk verkregen abnormale verschijnselen maakten den indruk, dat het misschien mogelijk zal zijn langs dezen weg veranderingen in de melk te constateeren, die langs andere wegen niet waarneembaar zijn. Om dit na te gaan zou een afzonderlijk onderzoek ingesteld moeten worden.

Wat nu de gevonden waarden voor α_H zelf betreft, kan opgemerkt worden, dat die bij 70° C. belangrijk hooger zijn dan bij kamertemperatuur. Reeds vroeger ¹⁾ werd er door een onzer op gewezen, dat in tegenstelling met den titerzuurgraad, die door verwarming afneemt, de reële zuurgraad toeneemt. In tabel II vindt men eenige hierop betrekking hebbende cijfers.

¹⁾ Deze verslagen No. VI, 93. (1909).

TABEL II.

18° C.		70° C.	
$2,06 \times 10^{-7}$	norm.	$5,42 \times 10^{-7}$	norm.
$1,82 \times 10^{-7}$	"	$4,86 \times 10^{-7}$	"
$1,83 \times 10^{-7}$	"	$4,28 \times 10^{-7}$	"
$1,76 \times 10^{-7}$	"	$5,06 \times 10^{-7}$	"
$1,65 \times 10^{-7}$	"	$4,6 \times 10^{-7}$	"
$1,99 \times 10^{-7}$	"	$5,13 \times 10^{-7}$	"

Door de verwarming op 70° C. werd dus de waterstofionen-concentratie 2,5 à 3 maal zoo groot als die bij 18° C. was. Deze vermeerdering speelt zonder twijfel ook een rol bij het neerslaan van de kaasstof door verwarming van melk, waarin reeds eenige zuurgisting heeft plaats gehad, bij de kookproef dus.

II. *De bepaling van de vernietigingssnelheid der peroxydase bij verschillende zuurgraden.*

De hierbij gevolgde werkwijze was bijna geheel dezelfde als die, welke VAN ECK en ook ZILVA toepaste. De verse, met zorg gemolken melk, werd na toevoeging van het noodige melkzuur of van loog in een vertind metalen busje snel op de gewenschte temperatuur gebracht en in den thermostaat overgebracht. Na eenige minuten werd dan de eerste hoeveelheid melk in een pipet opgezogen en op de hierboven aangegeven wijze snel afgekoeld, welke bewerking na verschillende tijden, gemeten met een chromometer, werd herhaald. Voor het pipetteeren en overbrengen in het in ijs geplaatste busje was 25 seconden noodig. De hoeveelheid peroxydase in de aldus verkregen vloeistoffen werd dan bepaald door vergelijking van de kleur, die bij vermenging met paraphenyleendiamine en waterstofsuperoxyde optrad, met de kleuren, die bij dezelfde bewerking de buisjes van de schaal vertoonden. De waarneming geschiedde steeds een kwartier na de vermenging met de reagentia. Indien aan de melk zuur of loog was toegevoegd werden de proefjes, vóór de bepaling der nog aanwezige hoeveelheid peroxydase, weder geneutraliseerd. De schaal werd eveneens op de vroeger aangegeven wijze aangelegd, door vermenging van eenigen tijd boven 80° C. verhitte melk met rauwe, in de verhoudingen als in tabel III aangegeven.

TABEL III.

	Rauw.	Verhit		Rauw.	Verhit.
1	0,5	9,5	11	3,—	7,—
2	0,75	9,25	12	3,50	6,50
3	1,—	9,—	13	4,—	6,—
4	1,25	8,75	14	4,50	5,50
5	1,50	8,50	15	5,—	5,—
6	1,75	8,25	16	5,50	4,50
7	2,—	8,—	17	6,—	4,—
8	2,25	7,75	18	6,50	3,50
9	2,50	7,50	19	7,—	3,—
10	2,75	7,25	20	7,50	2,50

In de gevallen, waarin de reactie zeer snel verliep werd de hier aangegeven schaal eenigszins gewijzigd, maar het beginsel bleef volkomen hetzelfde. Terwijl de metingen van de reactiesnelheid plaats hadden, werd op de boven aangegeven wijze de waterstofionenconcentratie bepaald. Alle snelheidsmetingen werden uitgevoerd bij $70,55^{\circ}\text{C}$. In verband met den hoogen temperatuurcoëfficiënt der reactie hing een Beckmannthermometer in den thermostaat om gedurende de proef de temperatuurschommelingen te kunnen controleren. De gebruikte melk was steeds mengmelk van dezelfde koeien der Proefzuivelboerderij.

De verkregen uitkomsten zijn in de volgende tabellen opgegeven. De waarden van $A-x$ zijn in procenten van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid enzym aangegeven.

TABEL IV.

1. 96 melk + 4 cc. $\frac{1}{4}$ norm. melkzuur. $C_H = 2,03 \times 10^{-6}$.
Schommelingen van den thermometer $0,04^{\circ}\text{C}$.

Tijd. (In minuten).	$A - x$.	$K = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A-x}$.
0	55	—
15	42,5	0,0075
30	28,75	0,0094
45	20	0,0098
65	12,5	0,0099
85	8,75	0,0094
		Gem. 0,0092

2. 96 melk + 4 cc. $\frac{1}{4}$ norm. melkzuur. $C_H = 2,04 \times 10^{-6}$.
Schommelingen van den thermometer $0,04^{\circ}\text{C}$.

Tijd. (In minuten).	$A - x$.	K
0 —	67,5	—
15	45,—	0,0111
30	35,—	0,0095
45	26,2	0,0091
65	20,—	0,0081
85	13,7	0,0081
		Gem. 0,0092

3. 96 melk + 4 c.c. $\frac{1}{4}$ norm. melkzuur. $C_H = 1,78 \times 10^{-6}$.
Schommelingen van den thermometer $0,04^\circ \text{C}$.

Tijd. (In minuten).	A — x.	K.
0	70,—	—
15	47,5	0,0112
30	35,—	0,0100
46	22,5	0,0107
66	15,—	0,0101
86	10,—	0,0098
		Gem. 0,0103

Gem. K = 0,0096.

Deze uitkomsten geven tot de volgende opmerkingen aanleiding. Houdt men rekening met de technische moeilijkheden, aan dit onderzoek verbonden, dan zijn de gevonden waarden voor K als zeer voldoende te beschouwen. Bij de laatste proef was C_H iets lager dan bij de beide voorafgaande, zoodat eigenlijk geen gemiddelde van de drie series genomen mocht worden. De hierdoor gemaakte fout is echter niet grooter dan de waarnemingsfout zelf. Om bij herhaling van een proef de melk weer op volkomen dezelfde aciditeit te brengen, zou een afzonderlijke reeks metingen van H-ionenconcentraties moeten voorafgaan; dientengevolge zou de geheele proef niet op één dag kunnen beëindigd worden.

TABEL V.

98 melk + 2 cc. $\frac{1}{4}$ norm. melkzuur. $C_H = 1,15 \times 10^{-6}$.
Schommelingen van den thermometer $0,04^\circ \text{C}$.

Tijd. (In minuten).	A — x.	K.
0	63,5	—
15	47,5	0,0097
31	32,5	0,0097
46	23,75	0,0095
66	15,25	0,0091
86	11,25	0,0089
		Gem. 0,0094

De vermindering van den zuurgraad van $\pm 2 \times 10^{-6}$ tot ruim 1×10^{-6} norm. heeft dus blijkbaar nog weinig of geen invloed op de waarde van de reactieconstante. Ook de in tabel VI gevonden waarde voor melk zonder eenige toevoeging, waarvoor $C_H = 0,54 \times 10^{-6}$ gevonden werd, valt met die van de beide vorige tabellen nagenoeg geheel samen.

TABEL VI.

Melk zonder toevoeging. $C_H = 5,42 \times 10^{-7}$.
Schommelingen van den thermometer $0,05^\circ \text{ C}$.

Tijd. (In minuten).	A — x.	K.
0	47,5	—
15	30,—	0,0133
30	22,5	0,0108
45	17,5	0,0096
65	13,7	0,0083
83	10,—	0,0082
		Gem. 0,0092

Uit het voorafgaande volgt dus, dat de vorming van zóóveel melkzuur in de melk, dat ze zich nog juist laat pasteuriseeren, geen of nagenoeg geen invloed schijnt uit te oefenen op de snelheid, waarmede de peroxydase gedood wordt bij verhitting.

Bij de nu volgende proeven werden toenemende hoeveelheden natronloog aan de melk toegevoegd.

TABEL VII.

1. 99,5 melk + $\frac{1}{2}$ cc. norm. Na OH. $C_H = 2,37 \times 10^{-7}$.
Schommelingen van den thermometer $0,05^\circ \text{ C}$.

Tijd. (In minuten).	A — x.	K.
0	42,25	—
7	30,—	(0,0216)
14	25,—	0,0165
21	21,25	0,0143
31	17,5	0,0124
41	13,75	0,0120
51	10,—	0,0123
		Gem. 0,0134

2. 99,5 melk + $\frac{1}{2}$ cc. norm. Na OH. $C_H = 2,37 \times 10^{-7}$.
Schommelingen van den thermometer $0,03^\circ \text{ C}$.

Tijd. (In minuten).	A — x.	K.
0	55,—	—
7	42,5	0,0160
14	35,—	0,0140
21	27,5	0,0143
31	22,5	0,0125
41	18,75	0,0114
51	15,—	0,0110
		Gem. 0,0132

Bij de beide in tabel VII aangegeven proeven vielen de waarden voor K niet mooi constant uit. Toch is een stijging niet te miskennen.

TABEL VIII.

99 melk + 1 cc. norm. Na OH. $C_H = 1,0 \times 10^{-7}$.

Tijd. (In minuten).	A - x.	K.
0	52,5	—
5	40,—	0,0236
10	28,75	0,0262
15	21,25	0,0262
20	17,5	0,0238
30	10,—	0,0240
40	6,25	0,0231
		Gem. 0,0245

Uit tabel VIII blijkt nog duidelijker, hoezeer de hydroxylionen het vernietigingsproces versnellen. Door een daling van C_H van $2,37$ op 1×10^{-7} zien wij de waarde van K bijna verdubbelen. Na toevoeging van $1\frac{1}{2}$ c.c. norm. Na OH aan 100 melk werd de waarde van K zoo groot, dat de bepaling er van reeds groote moeilijkheden ondervond. Tabel IX geeft nog enkele cijfers hierover.

TABEL IX.

1. 98,5 melk + $1\frac{1}{2}$ cc. norm Na OH. $C_H = 0,33 \times 10^{-7}$ ¹⁾.

Tijd (In minuten)	A - x.	K.
0	23,75	—
5	12,5	0,055
10	7,5	0,050
		Gem. 0,052

2. 98,5 melk + $1\frac{1}{2}$ cc. norm. Na OH. $C_H = 0,33 \times 10^{-7}$ ²⁾.

Schommelingen van den thermometer $0,13^\circ$ C.

Tijd. (In minuten).	A - x	K.
0	42,5	—
3	28,—	0,060
6	21,75	0,048
9	15,—	0,050
12	11,25	0,048
17	7,5	0,044
		Gem 0,050

¹⁾ De instelling was bij deze meting niet zoo goed constant als bij de vorige, zoodat deze waarde eenigszins twijfelachtig is. Ze is misschien iets hooger, maar zal $0,4 \times 10^{-7}$ zeker niet overschrijden.

²⁾ De meting mislukte. Deze waarde is gelijk genomen aan die van de eerste proef. Ze wijkt daarvan slechts weinig af, zooals uit een viertal metingen bleek, welke verricht werden met gealcaliseerde morgenmelk van dezelfde koeien. Daarbij werden, zooals te verwachten was, slechts zeer weinig uiteenlopende waarden gevonden.

Ten slotte mogen nog enkele cijfers worden medegedeeld, die betrekking hebben op een bepaling, waarbij ammonia in plaats van natronloog aan de melk was toegevoegd. Indien het de hydroxylionen zijn, die de vernietiging der peroxydase door verwarming versnellen, kan verwacht worden, dat de waarde van K, bij gebruik van een andere base dan NaOH, geheel in de verkregen lijn valt. Tabel XI geeft eenige uitkomsten aan.

TABEL XI.

99 melk + 1 cc. norm. NH_4OH . $C_H = 1,1 \times 10^{-7}$ 1).
Schommelingen van den thermometer $0,02^\circ \text{C}$.

Tijd. (In minuten).	A — x.	K.
0	80	—
5	62	0,0221
10	50	0,0202
15	37,5	0,0219
20	27,5	0,0232
30	20	0,0201
40	12,5	0,0201
		Gem. 0.0213

Een tweede meting gaf $K = 0,0211$. In bovenstaande curve is deze waarde door een kruisje aangegeven; ze blijkt goed in de lijn te vallen, waaruit de conclusie getrokken mag worden, dat het zeer waarschijnlijk de hydroxylionen zijn, die hier de hoofdrol spelen.

Beschouwen wij nu de cijfers van tabel X wat nader, dan zien wij dus, zooals reeds werd opgemerkt, dat toevoeging van zuur aan de melk zoo goed als geen, toevoeging van alcaliën, een buitengewoon sterken invloed uitoefent op de snelheid, waarmede de peroxydase gedood wordt, zooals ook reeds door ZILVA¹⁾ was gevonden. Deze laatste invloed komt nog duidelijker uit, als men bedenkt, dat melk, welker reële zuurgraad $0,33 \times 10^{-7}$ norm. is, nog volstrekt geen roodkleuring van phenolphtaleïne veroorzaakt; deze kleuring treedt eerst in bij $\pm 1 \times 10^{-9}$ norm. H. Voegt men per 100 c.c. melk nog meer NaOH toe dan $1\frac{1}{2}$ c.c. norm., dan wordt het enzym zóó snel vernietigd, dat de reactiesnelheid niet meer te meten is.

Het resultaat van ons onderzoek kan dus zóó uitgedrukt worden, *dat voor melk uit de praktijk, die nog niet zóó zuur is, dat ze niet meer gepasteuriseerd kan worden, de zuurgraad geen merkbaaren invloed uitoefent op de snelheid, waarmede de peroxydase gedood wordt. Door geringe alcalisering der melk kan men het proces buitengewoon sterk bespoedigen.*

1) Deze waarde is misschien iets te hoog. Waarschijnlijk tengevolge van de toegevoegde NH_4OH , nam de zuurgraad schijnbaar langzaam toe, d.w.z. de electromotorische kracht nam af.

2) l.c.

**Ueber den Einfluss des Säuregrades der Milch auf die
Geschwindigkeit der Abtötung der Peroxydase
durch Erhitzen.**

(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen).

Es wurde der Einfluss studiert, welchen die Wasserstoff- bzw. Hydroxylionenconcentration der Milch auf die Geschwindigkeit der Abtötung der Peroxydase bei $70,55^{\circ}$ C. ausübt. Es wurde gefunden, dass die electrometrische Bestimmung des Säuregrades der Milch bei 70° C. nur dann ausführbar ist, wenn man mit völlig frischer, sehr sorgfältig gewonnener Milch arbeitet. Bei 70° C. zeigten sich die C_H Werte um $2\frac{1}{2}$ bis 3 Mal grösser als bei Zimmertemperatur. Zugabe von soviel Milchsäure zur Milch, dass beim Pasteurisieren noch gerade keine Gerinnung eintrat, hatte keinen wahrnehmbaren Einfluss auf die Geschwindigkeitsconstante der Enzymvernichtung bei der genannten Temperatur. Durch Zusatz von Lauge oder Ammonia wurde die Reactionsconstante sehr stark beeinflusst. Für reine Milch, deren $C_H = 5,4 \times 10^{-7}$ n. gefunden wurde, war die Reactionsconstante $K = 0,0092$; durch Zugabe von $1\frac{1}{2} \%$ n. Na OH fanden wir $C_H = 0,33 \times 10^{-7}$ n. und $K = 0,051$. In dieser Milch, die Phenolphthalein noch bei weitem nicht rosa färbte, wurde das Enzym also mehr als 5 Mal schneller vernichtet als in der nicht alcalisierten Flüssigkeit. Die erhaltenen Resultate wurden zur besseren Uebersichtlichkeit in einer Curve aufgezeichnet.