

210. Beretning fra Forsøgslaboratoriet.

Udgivet af Statens Husdyrbrugsudvalg.

Om Fosfataseprøvens Anvendelighed ved Kontrol med Pasteuriseringsbestemmelsernes Overholdelse

Ved

A. C. ANDERSEN og H. VESTESEN



1944

KØBENHAVN

210. Beretning fra Forsøgslaboratoriet.

Udgivet af Statens Husdyrbrugsudvalg.

A. Om Kontrol med Mælkens og Mejeriprodukternes Pasteurisering

Ved A. C. ANDERSEN

B. En Metode til Bestemmelse af Fosfatase i Mælk

Ved H. VESTESEN

C. Om Metodens Anvendelighed

Ved A. C. ANDERSEN



I Kommission hos Ejvind Christensens Forlag,
Vesterbrogade 60, København V.

Trykt i Frederiksberg Bogtrykkeri.

1944

STATENS HUSDYRBRUGSFORSØG

Statens Husdyrbrugsudvalg

Forstander *Johs. Petersen-Dalum*, Hjallesø, Formand.
Gaardejer *P. M. Pedersen*, Skjærring, Mørke,
valgte af De samvirkende danske Landboforeninger.
Konsulent *J. Albrechtsen*, Aarhus,
Parcellist *Sofus Jensen*, Atterup, Grevinge,
valgte af De samvirkende danske Husmandsforeninger.
Forstander *L. Lauridsen*, Graasten, Næstformand,
valgt af Det kgl. danske Landhusholdningsselskab.
Gaardejer *M. Byriel*, Lyngby, Sporup,
valgt af Landsudvalget for Svineavlens Ledelse.
Statskonsulent *W. A. Kock*, Charlottenlund, København,
valgt af Statens Fjerkræudvalg.
Udvalgets Sekretær: Forstander, cand. polyt. *A. C. Andersen*.

Landøkonomisk Forsøgslaboratorium

Dyrefysiologisk Afdeling

Forstander: Professor *Holger Møllgaard*,
Forsøgsleder: Landbrugskandidat, Dr. agro. *Aage Lund*,
— cand. polyt. *I. G. Hansen*.

Husdyrbrugsafdelingerne

Forsøg med Kvæg:

Forstander: Professor *L. Hansen Larsen*,
Forsøgsleder: Landbrugskandidat *H. Wenzel Eskedal*,
— Landbrugskandidat, Dr. agro. *V. Steensberg*,
Beregner: Landbrugskandidat *P. S. Østergaard*.

Forsøg med Svin, Fjerkræ og Heste m. m.:

Forstander: Professor *Johs. Jespersen*,
Forsøgsleder: Landbrugskandidat *Fr. Haagen Petersen*,
— Landbrugskandidat *Dr. Hjalmar Clausen*,
— Landbrugskandidat *J. Bælum*.

Kemisk Afdeling (herunder Statens Foderstofkontrol)

Forstander: cand. polyt. *A. C. Andersen*,
Afdelingsleder: cand. polyt. *J. E. Winther*.

Statens Foderstofkontrol:

Inspektør: cand. polyt. *J. Gredsted Andersen*,
Fuldmægtig: Landbrugskandidat *Harald M. Petersen*.

Kontor og Sekretariat

Leder: Forstander, cand. polyt. *A. C. Andersen*,
Fuldmægtig: Landbrugskandidat *Holger Ærsøe*,
Bogholder: *A. Lindahl*.

Udvalgets, Forsøgslaboratoriets og Afdelingernes Adresse er:
Rolighedsvej 25, København V.

Til

Statens Husdyrbrugsudvalg.

Paa Foranledning af Landbrugsministeriets Erhvervsdirektorat og med særlig Bevilling til Arbejdets Udførelse blev der for et Aars Tid siden her i det kemiske Laboratorium paabegyndt en Undersøgelse af Fosfataseprøvens Anvendelighed til Kontrol med Vallens Lavpasteurisering under de her i Landet almindelige Forhold.

Som et første Resultat af dette Arbejde fremsendes hoslagt en Redegørelse for en Række Undersøgelser over Fosfataseprøven i al Almindelighed, idet jeg henstiller til Udvalget, at den offentliggøres som en Beretning fra Forsøgslaboratoriet.

København, Marts 1944.

A. C. Andersen.

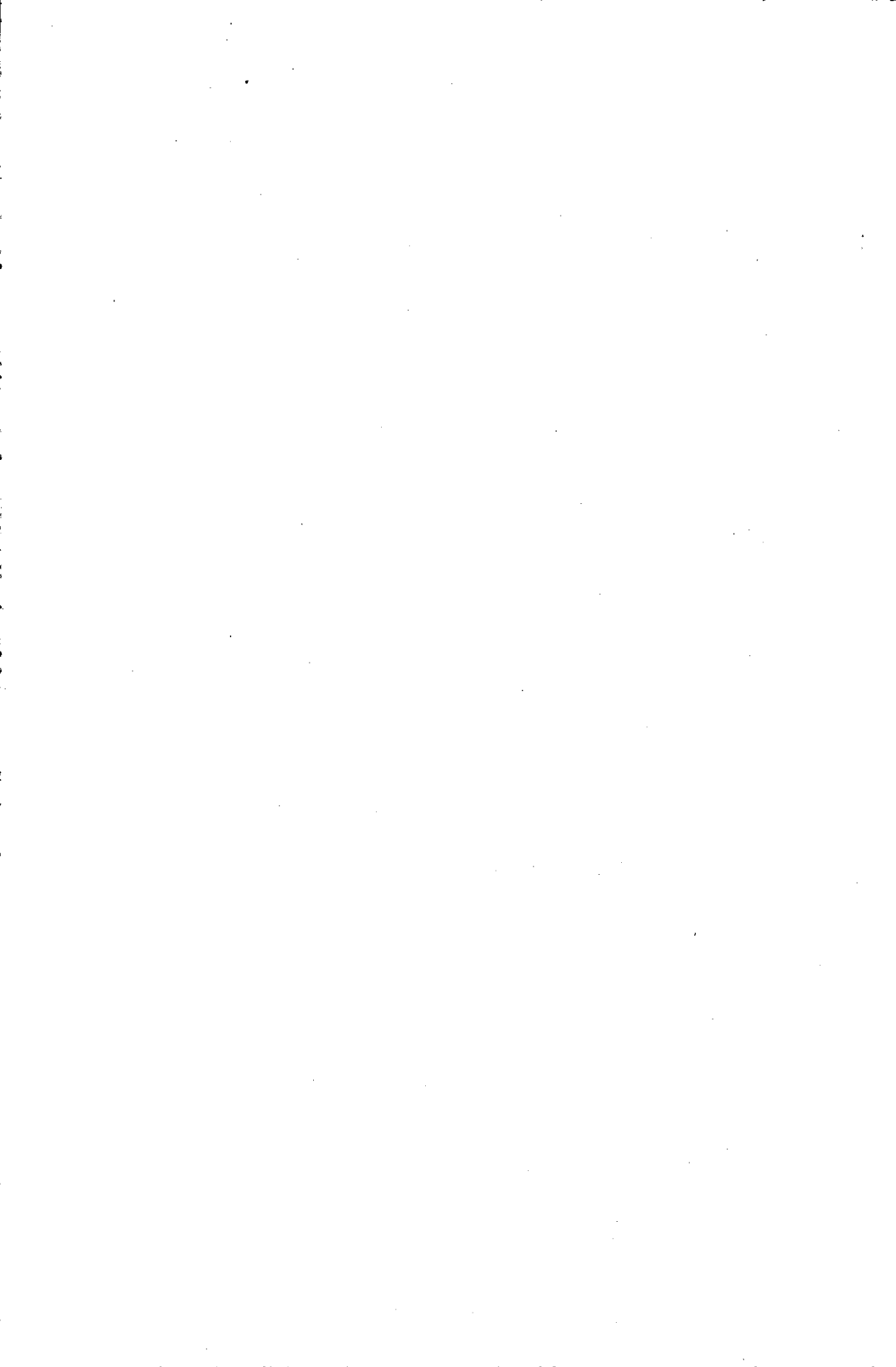
Ovennævnte Redegørelse har været forelagt *Statens Husdyrbrugsudvalg* og er godkendt til Offentliggørelse i Forsøgsvirksomhedens Publikationer.

Odense, April 1944.

Johs. Petersen-Dalum,
Formand.

INDHOLDSFORTEGNELSE

	Side
A. Om Kontrol med Mælkens og Mejeriprodukternes Pasteurisering ..	7
B. En Metode til Bestemmelse af Fosfatase i Mælk	18
Forskrift for Analysens Udførelse	19
Bemærkninger vedrørende Metodens enkelte Afsnit	20
C. Om Metodens Anvendelighed	31
Metodens Sikkerhed	31
Konserveringsmidlernes Indflydelse	37
Afsluttende Bemærkninger	41
Sammendrag	43
Litteraturfortegnelse	44
Oversigt over tidligere udsendte Beretninger fra Forsøgslaboratoriets kemiske Afdeling	45



A. Om Kontrol med Mælkens og Mejeriprodukternes Pasteurisering.

Ved

A. C. Andersen.

Siden det ved Lov af 26. Marts 1898 om Foranstaltninger til Bekæmpelse af Tuberkulose hos Hornkvæg for første Gang blev paabudt, at Mejerierne skulde pasteurisere al Skummetmælk og Kærnemælk, der udleveres til Kreaturføde, har Kontrollen med Overholdelsen af dette Paabud været baseret paa den Storch'ske Prøve, som grunder sig paa følgende Forhold.

Al raa Mælk indeholder Peroxydase, hvorved forstaas et Enzym, som er i Stand til at overføre Ilt *fra* et Overilte *til* et eller andet Stof, der let optager Ilt. Hvis man derfor sætter lidt Brintoverilte og lidt Parafenyldiamin til en Prøve raa Mælk, vil dennes Peroxydase bevirke, at der overføres Ilt *fra* Brintoverilten til Parafenyldiaminet; at en saadan Iltoverførsel har fundet Sted, viser sig ved, at Blandingen antager en blaa Farve. Saafermt Mælken derimod først har været opvarmet blot en ganske kort Tid til over 80° , vil dens Peroxydase være ødelagt; ved Tilsætning af Brintoverilte og Parafenyldiamin kan der da ingen Iltoverførsel finde Sted, og Blandingen beholder Mælkens hvide Farve uforandret.

Den Storch'ske Prøve stiller kun smaa Krav med Hensyn til Apparater og Kemikalier, saaledes at den er billig at benytte, og den er samtidig meget let og hurtig at udføre i Laboratoriet. En Analytiker kan uden Vanskelighed undersøge i Hundredvis af Mælkeprøver om Dagen, og da Metoden i en øvet Analytikers Hænder saa at sige ingen Usikkerhedsmomenter indeholder, kan man vanskeligt faa en bedre Metode til Brug ved Kontrol med Pasteuriseringsbestemmelsernes Overholdelse.

For ikke at give positiv Reaktion — d. v. s. Reaktion for utilstrækkelig Opvarmning — skal Mælken imidlertid have været opvarmet til over 80° i en passende, men dog ret kort Tid. En saadan Temperatur

har vist sig at være højere end nødvendigt for at gøre Mælken smittefri, og den bibringer Mælken en Smag, som mange finder ubehagelig, ligesom den høje Temperatur ogsaa er temmelig haardhændet over for Mælkens Proteinstoffer og Vitaminer. Som Følge heraf er en Pasteurisering, der lader sig kontrollere ved den Storch'ske Prøve, mindre velegnet, naar Talen er om Mælk til Menneskeføde, og der har derfor i Aarenes Løb været sat meget Arbejde ind paa at finde andre Metoder til med fornøden Sikkerhed at afgøre, om Mælk har været underkastet en saadan Opvarmning, at den uden at have været opvarmet saa stærkt, at den ikke længere giver positiv Reaktion ved den Storch'ske Prøve, dog alligevel kan betragtes som smittefri.

De senere Aars Undersøgelser har vist, at saadanne Metoder kan baseres paa et andet i Mælken tilstedeværende Enzym, *Fosfatase*, som ødelægges ved en noget lavere Temperatur end den ovenomtalte Peroxydase, og som er karakteriseret ved under passende Omstændigheder at kunne spalte visse sammensatte Fosforsyreforbindelser.

Undersøgelser herhjemme (1) og i Udlandet har godtgjort, at al raå Mælk indeholder Fosfatase. Der kan ganske vist være betydelig Forskel paa Fosfatasemængden i de enkelte Køers Mælk, men noget Fosfatase er der altid, og i Blandinger af flere Køers Mælk vil det forskellige Fosfataseindhold i de enkelte Køers Mælk i nogen Grad udlignes, og naturligvis udlignes desto mere, jo flere Køers Mælk der indgaar i Blandingen (sml. S. 33).

Som alle andre Enzymer ødelægges Fosfatase ved Opvarmning til en passende Temperatur i en passende Tid. Jo længere Tid Mælken holdes opvarmet, des lavere kan Temperaturen være. Der kræves saaledes $\frac{1}{2}$ Time ved 63° , men kun nogle Sekunder ved 73° for at ødelægge Fosfatasen, og det træffer sig nu saa heldigt, at Varmebehandling, som netop ødelægger Fosfatasen, kan anses for fuldt tilstrækkelige til at gøre Mælken smittefri.

Saafermt man paa en overkommelig Maade med fornøden Sikkerhed kan konstatere Tilstedeværelsen af tilstrækkeligt smaa Mængder Fosfatase, vil en betryggende Pasteuriseringskontrol derfor kunne baseres paa en Undersøgelse af, om den pasteuriserede Mælk endnu indeholder Fosfatase.

Som Resultat af de senere Aars Arbejde er der efterhaanden fremkommet flere Metoder til Paavisning af, om den opvarmede Mælks Fosfatase er ødelagt eller ej, og nye Metoder, resp. nye Modifikationer

af ældre Metoder synes stadig at fremkomme. Disse Metoder er i Modsætning til den Storch'ske temmelig komplicerede, og Udfaldet af Undersøgelserne kan paavirkes ved smaa Ændringer i Fremgangsmaaden, hvilket imidlertid fra forskellig Side er blevet betragtet som en Fordel, fordi det derigennem er muligt i nogen Grad at »afstemme« Analyseforskriften — og dermed altsaa Analyseresultaterne — efter de Krav, som man ønsker at stille til Pasteuriseringsens Effektivitet.

Saafermt en Pasteuriseringskontrol skal baseres paa en Paavisning af, om Mælkens Fosfatase er ødelagt eller ej, er det derfor ikke nok at foreskrive, at aktiv Fosfatase ikke maa kunne paavises i Mælken efter Pasteuriseringen. Det maa paabydes ikke alene hvilken Metode, der skal benyttes ved Fosfatasens Paavisning, men det maa i alle Enkelt-heder fastsættes, hvorledes Prøven skal udføres, og denne Forskrift maa Analytikeren nøje overholde.

Fosfatasens Navn er afledet af dens Evne til at spalte visse Fosforsyreforbindelser — Fosforsyreestere — under Vandoptagelse, og der dannes da Fosforsyre og det Stof, hvormed denne var forbundet.

En Paavisning af Tilstedeværelsen af Fosfatase kan derfor baseres paa en Paavisning *enten* af den ved Fosfatasevirkningen frigjorte Fosforsyre *eller* af det Stof, som Fosforsyren forud var forbundet med, og som er blevet frigjort sammen med denne.

Det første Princip — Paavisning af den frigjorte Fosforsyre — var det først anvendte, og det er i 1937 herhjemme benyttet af *Stein* (2) i hans Modifikation af *Kay og Graham's* oprindelige Metode (3). Da al Mælk imidlertid fra Naturens Haand indeholder Fosforsyre i ikke helt ubetydelige Mængder, kan det ikke ved en simpel kvalitativ Reaktion afgøres, om der under Indvirkning af Fosfatase er fraspaltet Fosforsyre. Det er nødvendigt at udføre kvantitative Fosforsyrebestemmelser saavel i en Prøve af selve den Mælk, der foreligger til Undersøgelse, som i en Prøve af samme Mælk, efter at denne har henstaaet med Fosforsyreester en passende Tid under passende Omstændigheder (Temperatur, Surhedsgrad m. m.), saaledes at den Mængde Fosfatase, som eventuelt maatte være til Stede, har kunnet udfolde sin Virkning, d. v. s. frigøre Fosforsyre. Ud fra Differensen mellem Resultaterne af disse kvantitative Fosforsyrebestemmelser skal det saa afgøres, om der er fraspaltet Fosforsyre, d. v. s., om den undersøgte Mælk indeholdt Fosfatase eller ej, altsaa om Mælkens Pasteurisering har været tilstrækkelig.

Nu ligger det i Sagens Natur, at denne Differens i Grænsetilfældene — d. v. s. i saadanne Tilfælde, hvor Mælken kun mangler lidt i at være behørigt pasteuriseret — maa være lille i Forhold til Mælkens naturlige Fosforsyreindhold, og dens Størrelse vil da blive meget stærkt paavirket af den uundgaaelige Usikkerhed (den saakaldte tilfældige Fejl) paa hver af de enkelte kvantitative Fosforsyrebestemmelser. Steins Metode er derfor hverken særlig følsom eller særlig paa-lidelig i Grænseområdet.

Denne Omstændighed i Forbindelse med, at den kvantitative Fosforsyrebestemmelse i sig selv er temmelig kompliceret og tidsrøvende, kan det formentlig tilskrives, at Steins Metode til Paavisning og Bestemmelse af Fosfatase hidtil ikke har fundet større Anvendelse i Praksis, end Tilfældet er.

Det andet Princip — Paavisning af det Stof, som var forbundet med Fosforsyren, og som blev frigjort sammen med denne ved den eventuelle Tilstedeværelse af Fosfatase — ligger til Grund for de Metoder, der i de seneste Aar er fremkommet og undersøgt saavel her hjemme som i Udlandet. Som Resultat af disse Undersøgelser foreligger en hel Række Metoder, der dog i større eller mindre Grad er Modifikationer af en nyere Metode af *Kay og Graham* (4). Den vigtigste af disse er utvivlsomt *Scharers* Metode (5), der har tiltrukket sig megen Opmærksomhed og været underkastet ret indgaaende Efterprøvninger, saaledes bl. a. fra dansk og svensk Side (6, 7, 8) med tilsyneladende gode Resultater, men der er dog ogsaa fremkommet Indvendinger mod Metoden, her hjemme saaledes fra Statens Forsøgsmejeri (9).

Scharers Metode foreligger i to forskellige Former, nemlig som formentlig mere nøjagtig Laboratoriemetode og som Hurtigmetode, hvilken sidste skulde kunne anvendes ambulant. Grundlinierne for begge er følgende.

Til en Prøve af den Mælk, der skal undersøges, sættes en passende »Stødpudeblanding« og noget Dinatriumfenylfosfat, hvorefter Blandingen hensættes i Termostat ved 37° i en foreskreven Tid. Derpaa tilsættes et specielt Reagens (Dibromkinonklorimid, *Gibb's Reagens*).

Saafermt Mælkens Opvarmning har været en saadan, at der endnu er Fosfatase til Stede, vil noget af Dinatriumfenylfosfatet under Henstanden ved 37° være blevet spaltet til Natriumfosfat og Fenol, og dette sidste vil med det tilsatte specielle Reagens danne en Forbindelse (Dibromindofenol), som er blaa.

Fremkomsten af en blaa Farve viser altsaa, at der har været aktiv Fosfatase i Mælken — d. v. s., at Mælken ikke har været forskriftsmæssigt opvarmet. Jo mere Fosfatase, der var tilbage i Mælken, des mere Fenol dannes der, og desto kraftigere blaa bliver Blandingen. Mængden af frigjort Fenol — og dermed altsaa paa en vis Maade Mængden af tilstedeværende Fosfatase i Mælken — bestemmes ved Sammenligning af den fremkomne blaa Farve med de Farver, der fremkommer, naar Reagenset sættes til Opløsninger med kendt Fenolindhold.

Jo nærmere Mælken er ved at have været forskriftsmæssig opvarmet, des mindre Fosfatase vil der være tilbage i den, og des svagere vil den ved Reaktionen dannede Farve derfor ogsaa være. Da Farvestyrken tillige kan paavirkes ved smaa Afvigelser fra den for Reaktionsens Udførelse foreskrevne Fremgangsmaade, er det af Betydning, at den givne Forskrift følges meget nøje.

Selv om Mælken har været aldrig saa omhyggeligt pasteuriseret, og selv om man ved Udførelsen af Fosfataseprøven nøje følger Forskriften, vil der dog ved Reaktionen altid fremkomme en svag Farvetone. Ved Afgørelsen af, om en given Mælkeprøve har været tilstrækkeligt opvarmet eller ej, vil det derfor være nødvendigt at bedømme, om den fremkomne Farve er stærkere eller svagere end en vis Norm, der maa fastsættes under Hensyn dels til de Krav, der ønskes opfyldt ved Mælkens Pasteurisering, og dels til den Forskrift, der skal følges ved Fosfataseprøven.

En Vanskelighed ved Fosfataseprøvens Anvendelse til Kontrol med Pasteuriseringsbestemmelsernes Overholdelse har det været, at saa godt som alle foreliggende Forskrifter gaar ud paa, at Mælken skal undersøges i frisk Tilstand — helst selve Produktionsdagen; kan dette ikke gennemføres, maa Prøverne opbevares isafkølede, indtil Undersøgelse kan finde Sted. Fosfataseprøven er derfor hovedsagelig blevet gennemarbejdet med Henblik paa dens Anvendelse ved Kontrollen med Pasteuriseringen af den Konsummælk (Drikkemælk og anden Husholdningsmælk), der leveres til større Byer, hvor Forskrifter for Prøvetagning og Undersøgelse ifølge Sagens Natur lettest kan overholdes. De fleste Undersøgelser er derfor ogsaa udført med Sødsmælk, men man har dog været klar over, at selv om Fosfatasen ved at følge Mælkefedtet fortrinsvis samler sig i Fløden, bliver der dog tilstrækkeligt Fosfatase tilbage i Skummetælken til, at Fosfataseprøven ogsaa kan benyttes til Kontrol med Skummetælakens Pasteurisering.

Ved en Række Undersøgelser i Sverige over Fosfataseprøvens Anvendelighed til Kontrol med Konsummælkens Pasteurisering kom *G. Sjöström* (8) i Aaret 1939 til det Resultat, at Mælk, der skal undersøges for Fosfatase efter Steins Metode, meget vel kan konserveres, og da bedst med Kaliumdikromat, medens Konserveringsmidler ikke kan anvendes til Prøver, der skal undersøges efter Scharers Metode.

To Aar senere offentliggjorde *K. E. Thomé* en kort Undersøgelsesrække til Belysning af Fosfataseprøvens Anvendelighed over for Valle (10). Ifølge Resultaterne af disse Undersøgelser gaar der tilstrækkelig Fosfatase over i Vallen til at muliggøre Fosfataseprøvens Anvendelse, men det er nødvendigt, at Vallen undersøges — eller konserveres til Undersøgelse efter Steins Metode — inden den er blevet for sur, thi med Vallens tiltagende Syrning synker Fosfataseaktiviteten, hvorved en eventuelt utilstrækkelig Pasteurisering unddrager sig Paavisning. Ved de af Thomé offentliggjorte Undersøgelser var de friske Prøver blevet undersøgt baade efter Steins og Scharers Metoder, men de (med Kaliumdikromat) konserverede kun efter Steins Metode, idet Thomé ligesom Sjöström gør gældende, at Scharers Metode ikke kan anvendes ved konserverede Prøver.

I Sverige, hvor Pasteuriseringsbestemmelserne i vidt Omfang kan ændres ved kongelig Anordning, blev det — formentlig paa Grundlag af Sjöströms og Thomés Undersøgelsesresultater — ved Kundgørelse af 22. Maj 1942 fastsat, at Mælk, Fløde eller Valle, der falder ind under Pasteuriseringspaabudet, fra 1. Juli 1942 at regne skal være højpasteuriseret, lavpasteuriseret eller langtidspasteuriseret, saaledes at forstaa, at højpasteuriserede Produkter ikke maa give positiv Reaktion ved Storchs Prøve, medens lav- eller langtidspasteuriserede ikke maa give positiv Reaktion ved Steins Fosfataseprøve.

For Kærnemælk og alle Surmælksprodukter (Yoghurt m. m.) er det i Sverige udtrykkeligt foreskrevet, at de altid skal være fremstillet af højpasteuriseret Mælk eller Fløde. Ved Mælkens eller Flødens Syrning ødelægges nemlig Fosfatasen, og dermed er det udelukket at bygge en Kontrol med de sure Mælkeprodukters betryggende Pasteurisering paa en Fosfataseprøve.

Hvad Valle angaar, er Højpasteurisering, saa vidt vides, endnu stadig paabudt i de faa Distrikter (»län«) i Sverige, hvor Valle for Tiden kræves pasteuriseret. Det synes imidlertid at være Hensigten, at Lav- eller Langtidspasteurisering ogsaa skal kunne godkendes for Valle,

og da dette ifølge Thomés ovennævnte Undersøgelser er forbundet med nogle Vanskeligheder, er det allerede nu foreskrevet, at Prøver af Valle kun maa udtages under eller umiddelbart efter Afslutningen af Ostningen — forudsat at det ikke er Vallen, men Ostemælken som pasteuriseres. For saa vidt selve Vallen derimod pasteuriseres efter Ostningens Afslutning, skal Prøverne udtages umiddelbart efter Pasteuriseringen.

Naar Steins Fosfataseprøve, trods dens Ulemper, i Sverige er fastsat som den afgørende Prøve, d. v. s. som den Prøve al lav- og langtidspasteuriseret Mælk skal kunne bestaa, staar dette sikkert i Forbindelse med, at man har ønsket alle afgørende Fosfataseundersøgelser udført i eet eneste Laboratorium, nemlig Statens lantbrukskemiska Kontrollanstalt ved Stockholm, at Prøverne for at kunne forsendes til nævnte Kontrollanstalt maa konserveres, og at Steins Metode ifølge Sjöströms Undersøgelser er den eneste af de efterprøvede Metoder, som med Sikkerhed kan bringes i Anvendelse over for konserveret Mælk.

Som tidligere anført er Steins Metode meget omstændelig og tidsrøvende, og for ikke at overbebyrde Statens lantbrukskemiska Kontrollanstalt har man saa truffet den Ordning, at der af Mælkeprodukter, som skal underkastes Fosfataseprøve, altid udtages Dobbeltprøver, saa vidt muligt paa et saadant Tidspunkt af Dagen, at en foreløbig Undersøgelse kan gennemføres samme Dag. Prøverne skal af Prøvetageren uopholdelig indleveres til det nærmeste Laboratorium eller Apotek, hvormed Sundhedsstyrelsen har truffet Overenskomst. Her underkastes den ene af Prøverne, uden at være konserveret, omgaaende en Fosfataseprøve efter Scharers Hurtigmetode, og dersom denne Undersøgelse skønnes at give til Resultat, at den paabudte Pasteurisering ikke har fundet Sted, indsendes Dubletprøven i konserveret Tilstand til Statens lantbrukskemiska Kontrollanstalt, hvor den afgørende (retsgyldige) Undersøgelse gennemføres efter Steins Metode.

Her i Danmark er der i Tidens Løb vedtaget forskellige Love om Bekæmpelse af Tuberkulose hos Husdyrene, men disse Love blev samlet til een ved Lov Nr. 346 af 29. Juli 1942 om Bekæmpelse af Tuberkulose hos Kvæg, Svin og Fjerkræ. Ifølge denne Lov lyder Pasteuriseringspaabudet paa, at ethvert Mejeri er pligtigt at underkaste al Fløde og Mælk, hvoraf der tilvirkes Smør, og al Skummetmælk, der ikke benyttes til Tilvirkning af Ost, samt Valle en saadan Opvarmning, at Fløden, Mælken og Vallen hverken straks efter Opvarmningen eller senere giver Reaktion med Parafenyldiamin og Brintoverilte (Storchs

Prøve) eller ved anden af Landbrugsministeren foreskrevne Prøve. Desuden er det Mejerierne forbudt at udlevere saadanne Produkter som Returnmælk fra Bysalg, Affaldsmælk, Mælkerester, Spildmælk og lignende, medmindre disse Produkter først har været underkastet en ganske tilsvarende Opvarmning.

Herved er Pasteuriseringspaabudet blevet udvidet til ogsaa at omfatte Valle, idet der i de senere Aar er iagttaget Tilfælde, som tyder paa, at tuberkuløs Smitte er blevet overført gennem Valle.

Man havde tænkt sig Vallens Pasteurisering hovedsagelig gennemført ved Tilledning af Damp til den Beholder, hvori Vallen opsamles. Herimod blev der imidlertid fra Mejeribrugets Side efter Lovens Vedtagelse fremført Betæneligheder under Henvisning til det ved en saadan Fremgangsmaade forøgede Brændselsforbrug, og der blev samtidig stillet Forslag om, at man for Vallens Vedkommende nøjedes med at kræve Lavpasteurisering gennemført, hvilket Krav vilde kunne opfyldes gennem Lavpasteurisering af Ostemælken.

Til Kontrol med saadan Lavpasteurisering mente man, at Fosfataseprøven kunde anvendes, men under Hensyn til *dels*, at denne Prøve endnu ikke kunde betragtes som tilstrækkeligt underbygget for Formaalet, og *dels*, at ogsaa Lavpasteuriseringen vilde kræve Brændselsmængder, som det under Krigen kunde blive vanskeligt at fremskaffe, bemyndigedes Landbrugsministeren ved Lov Nr. 439 af 31. Oktober 1942 til at undtage Valle fra Pasteuriseringspaabudet — dog ikke for mere end eet Aar ad Gangen. I Medfør af denne Bemyndigelse er Bestemmelsen om Vallens Pasteurisering da blevet suspenderet, først til 1. Oktober 1943 og derefter til 1. Oktober 1944, samtidig med at Forsøgslaboratoriets kemiske Afdeling blev anmodet om at tage op til nærmere Undersøgelse Spørgsmaalet om, hvorvidt en Kontrol med Vallens Lavpasteurisering under de her i Landet foreliggende Omstændigheder kan gennemføres paa Grundlag af Fosfataseprøven. Efter at de fornødne Midler var stillet til Raadighed til Lønning af Assistance, blev de ønskede Undersøgelser paabegyndt først paa Aaret 1943.

Den Metode, som det — uanset Sjöströms og Thomés ovennævnte Resultater — ved de af Forsøgslaboratoriet paabegyndte Undersøgelser laa nærmest at forsøge bragt i Anvendelse, var Scharers Laboriemetode, saaledes som den er beskrevet af *Jepsen* og *Madelung* i deres indgaaende Arbejde over nogle Fosfatasemetoders Forhold over for Konsummælk (7). For at opnaa det nødvendige direkte Kendskab til

denne Metode og derigennem ogsaa fornøden Erfaring med Hensyn til Resultaternes Reproducerbarhed blev der derfor gennemført en Række Bestemmelser af Fosfatase i pasteuriseret Skummetmælk, hvortil der var sat smaa, men bekendte Mængder raa Sødsmælk — et Omraade hvor Metodens Anvendelse ikke skulde give Anledning til særlige Vanskeligheder.

En Række Undersøgelser af denne Art førte imidlertid til den Slutning, at Resultaterne ikke kunde anses for tilfredsstillende paa det for Metodens Anvendelighed som Grundlag for retslige Afgørelser mest betydningsfulde Omraade, nemlig Grænseomraadet mellem paa den ene Side tilstrækkeligt pasteuriseret Mælk og paa den anden Side Mælk, som kun manglede lidt i at være tilstrækkeligt pasteuriseret. Som en væsentlig Kilde til Usikkerhed maa nævnes følgende: Naar der kun er ganske lidt aktiv Fosfatase i Mælken, bliver der kun fraspaltet meget lidt Fenol; den ringe Fenolmængde kan med det tilsatte Reagens kun give Anledning til Dannelsen af en ret svag Farve, og denne viste sig da jævnlgt, men ikke altid, at være af en hel anden Farvetone end de Farvestandarder, som den skulde sammenlignes med, og som blev forskriftsmæssigt fremstillet af svage, vandige Fenolopløsninger af kendt Koncentration. End ikke de svageste af selve disse Farvestandarder fik altid samme Farvetone, idet de undertiden blev grønlige i Stedet for blaa.

Et Forsøg paa efter foreliggende Litteraturangivelser at erstatte de af kendte Fenolkoncentrationer fremstillede Farvestandarder med Blandinger af Opløsninger af farvede uorganiske Salte (Kobber-, Kobolt- og Jernsalte) faldt heller ikke tilfredsstillende ud.

Det kan i denne Forbindelse nævnes, at der fra amerikansk Side er berettet om Forsøg, hvor 13 forskellige Laboratorier undersøgte de *samme* 6 omhyggeligt pasteuriserede Mælkeprøver efter *samme* Arbejdsforskrift (Scharers Hurtigmetode) og med Anvendelse af *samme* Reagensopløsninger og *samme* Farvestandarder, og at kun 7 af de 13 Laboratorier kom til det — rigtige — Resultat: at alle 6 Prøver var tilstrækkeligt opvarmede (11).

For at undgaa den direkte Brug af Farvestandarder blev det forsøgt at maale Farvestyrken ved Hjælp af et Pulfrich-Fotometer. Der er ganske vist — som ogsaa Sjöström (8) har gjort opmærksom paa — ikke Proportionalitet mellem de blaa vandige Opløsningers Lysabsorption (Ekstinktion) og de Fenolmængder, som Dibromindofenolet svarer

til; men denne Vanskelighed kunde man nok komme uden om gennem en eksperimentel Fastlægnings af en Kurve, som under de givne Forsøgsbetingelser udtrykker Afhængigheden mellem Ekstinktion og Fenolmængde, idet man saa af Kurven vilde kunne aflæse den til en funden Ekstinktion svarende Fenolmængde. Større Betænkelighed voldte det, at det undertiden var vanskeligt at faa de Opløsninger, hvis Ekstinktion skulde maales, saa klare og blanke, som det maa forlanges, for at en Absorptionsmaaling skal kunne give paalidelige Resultater. Saavel *Winther* (6) som *Jepsen* og *Madelung* (7) angiver ogsaa lejlighedsvis at have haft Vanskelighed ved at faa klare Filtrater ved *Scharers* Laboratoriemetode — de har imidlertid med Rette ikke lagt videre Vægt paa denne Omstændighed, fordi de ikke gjorde Filtraterne til Genstand for optiske Maalinger.

For den paatænkte Undersøgelse af Fosfataseprøvens Anvendelighed over for Valle maatte det imidlertid anses for paakrævet at raade over en virkelig sikker Metode til Bestemmelse af selv ganske smaa Fosfatasemængder, selv om Sikkerheden kun kunde opnaas paa Bekostning af Metodens Enkelhed.

Den paa Statens Forsøgsmejeri udarbejdede Metode, om hvilken der endnu kun foreligger en foreløbig Meddelelse (9), turde man ikke regne med at anvende over for Valle; Metoden — som for øvrigt er temmelig kompliceret, hvilket dog selvfølgelig ikke udelukker dens Anvendelse ved afgørende Undersøgelser — beror nemlig paa en Udfældning af Fosfatasen sammen med noget af Mælkens Protein med paafølgende Paavisning af Fosfatasen i Bundfaldet, og det tør ikke forudsættes, at der altid i Valle vil være Protein nok til, at den for Prøvens Anvendelighed og Udfaldets Paalidelighed nødvendige Udfældning vil fremkomme.

I et senere Arbejde (12) har *Scharer* foreslaaet at skærpe Udfaldet af Fosfataseprøven efter hans Hurtigmetode gennem en Udrystning af det dannede Dibromindofenol med Butylalkohol; ligesom Farvens Tilstedeværelse eller Ikke-Tilstedeværelse lettere og sikrere bedømmes i et saadant butylalkoholisk Udtræk end i den tyndere, vandige Opløsning, var det muligt, at man ogsaa med Fordel vilde kunne foretage fotometrisk Bestemmelse paa Udtrækket i Stedet for paa den gennem Laboratoriemetoden ved Fældning med Blyacetat og Filtrering vundne vandige Opløsning.

Civilingeniør *H. Vestesen*, som var engageret til at bistaa ved de

ønskede Undersøgelser over Fosfataseprøvens Anvendelighed til Kontrol med Vallens Lavpasteurisering under de her i Landet foreliggende Omstændigheder, gik derfor i Gang med *dels* at undersøge Muligheden for at grunde en virkelig kvantitativ Bestemmelse af de ved Scharers Fosfataseprøve dannede smaa Fenolmængder paa en Ekstraktion af Dibromindofenolet med Butylalkohol med paafølgende Maaling af det butylalkoholiske Udtræk i Pulfrich-Fotometret, og *dels* at undersøge andre af de foreliggende Modifikationer af Scharers Metode.

Det viste sig snart, at der var adskillige Vanskeligheder at bekæmpe, navnlig i Forbindelse med Ekstraktionen for ved denne at faa helt klare Ekstrakter, men omsider lykkedes det Vestesen at overvinde disse Vanskeligheder og naa frem til en tilstrækkelig paalidelig Metode.

I det følgende vil Hr. Vestesen beskrive den Metode, som hans Arbejde har ført til, og som, bortset fra Ekstraktionen og den derpaa grundede fotometriske Maaling, nærmest er en Modifikation af *Aschaffenburg* og *Neave's* Metode (13), der igen er en Modifikation af Scharers Hurtigmetode.

Den omhandlede Metode vil blive benyttet ved de kommende Undersøgelser over Muligheden af under de her i Landet almindelige Forhold at grunde en Kontrol med Vallens tilbørlige Pasteurisering paa en Bestemmelse af dens Indhold af Fosfatase. Naar vi uden at afvente Resultaterne af disse Undersøgelser har valgt allerede nu i alle Enkeltheder at offentliggøre den Metode, som vi mener med Fordel at kunne benytte og derfor ogsaa agter at benytte, skyldes det den Interesse for Fosfatasebestemmelse, som for Tiden er til Stede ogsaa her hjemme, og som bl. a. er kommet til Udtryk gennem de senere Aars Publikationer.

Det er i øvrigt ikke Tanken, at den beskrevne Metode bør bringes i Anvendelse paa alle til Undersøgelse for Pasteuriseringsgrad i Kontroløjemed udtagne Prøver af Mælk og/eller Valle — dertil er den, dens mange betydelige Fordele tiltrods, dog lidt for omstændelig.

Metoden maa derimod anses for særdeles velegnet til sikker og afgørende Bestemmelse af Fosfataseindholdet i saadanne Prøver, om hvis behørlige Lav- eller Langtidspasteurisering der ud fra foreløbige Prøver er Grund til at tvivle.

B. En Metode til Bestemmelse af Fosfatase i Mælk.

Ved

H. Vestesen.

Ved Analysens Udførelse benyttes følgende:

Kemikalier.

- 1) Dinatriumfenylfosfat. Saafremt Præparatet indeholder frit Fenol, maa dette fjernes ved Vaskning med Æther, hvorefter Præparatet tørres, først i Luften, senere i Ekssiccator. I Stedet for selve Dinatriumfenylfosfatet kan benyttes »Ewo's Fosfatasetabletter I«, der gaar i Handelen i to Størrelser.
- 2) Dibromkinonklorimid, resp. »Ewo's Fosfatasetabletter II«.
- 3) Vandfrit, normalt Natriumkarbonat, Na_2CO_3 .
- 4) Surt Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, NaHCO_3 .
- 5) Kloroform.
- 6) 93 pCt.'s Alkohol.
- 7) Normal Butylalkohol, n-Butanol. Den almindelige Handelsvare fraktioneres, bedst med en lille Kolonne, efter Tilsætning af 1 ml Natronlud pr. l Butanol. Den Fraktion, der gaar over mellem 114° og 116° , anvendes. Fraktionerne med lavere Kogepunkt kan med Fordel samles og rektificeres.
- 8) Æthylæther.
- 9) Benzol, ren.

Opløsninger.

- 1) *Pufferopløsning.* 2,2 g vandfrit, normalt Natriumkarbonat + 8,7 g Natriumbikarbonat opløses ad 1 l i destilleret Vand. Opløsningen mættes med Kloroform.
- 2) *Puffersubstrat.* 1 lille »Ewo's Tablet I« — eller 0,055 g Dinatriumfenylfosfat — opløses i 50 ml Pufferopløsning. (Substratopløsningen fremstilles frisk hver Dag).

- 3) *Reagensopløsning*. 1 »Ewo's Tablet II« — eller 0,0133 g Dibromkinonklorimid — opløses i 2 ml Alkohol. (Fremstilles frisk hver Dag).
- 4) *Ekstraktionsvædske*. 100 ml Benzol + 150 ml Æther + n-Butanol ad 1 l.

Andet Tilbehør.

- 1) Reagensglas: Længde 180 mm; Diameter (indv.) 16 mm. Hertil gode Gummipropper.
- 2) Pipetter: 0,5 ml, 1 ml, 5 ml og 10 ml. Hertil Vatfiltre. Se S. 21.
- 3) To Vandtermostater, den ene indstillet paa 25 °, den anden paa 37 °.
- 4) Ekstraktionsapparat. (Se Fotografi og Detailtegning S. 26—27).
- 5) Afsugningsapparat. (Se skematisk Tegning S. 27).
- 6) Pulfrich-Fotometer.

Forskrift for Analysens Udførelse.

Afmaaling.

Da Fløde indeholder mere Fosfatase end den Mælk, hvorfra Fløden stammer, maa Mælkeprøven blandes meget omhyggeligt, umiddelbart før Afpipettering til Analyse foretages, om fornødent ved forsigtig Vugning af Flasken under Opvarmning til 37 °—40 ° og derpaa følgende Afkøling.

Der afpipetteres (Vatfilter! Se S. 21) 1 ml Mælk i hvert af 2 Reagensglas, A og B. Glasset B anbringes i Vandbad ved 80 ° i 5 Minutter for at inaktivere eventuelt tilstedeværende Fosfatase.

Inkubation.

Til begge Glas sættes efter Afkøling 2 Draaber Kloroform og 10 ml Puffersubstrat, (Vatfilter!). Reagensglassene lukkes med Gummipropper, omrystes kraftigt og anbringes i Termostat ved 37 ° i nøjagtigt 90 Minutter. Derefter afbrydes Inkubationen, ved at Glassene anbringes 5 Minutter i Vandbad ved 80 °.

Indofenoldannelse.

Efter Forløbet af de 5 Minutter hensættes Glassene en halv Snes Minutter i en Beholder med Vand af Stuetemperatur, hvorefter 0,5 ml Reagensopløsning tilsættes med en 0,5-ml-Pipette (Vatfilter!), idet hvert

af Glassene rystes under Tilsætningen, saa at Reagenset hurtigt blandes med Vædsken i Glasset. Dernæst tilproppes Glassene, vendes op og ned et Par Gange og anbringes i Termostat ved 25° , hvor de staar i 1 Time.

Til Modvirkning af Emulsionsdannelse ved den paafølgende Ekstraktion anbringes Glassene derefter $\frac{1}{4}$ Time ved 37° ; dette kan dog undlades ved Undersøgelser af Skummetmælk.

Farveekstraktion.

Efter at Glassene igen er vendt op og ned et Par Gange, pipetteres der 5 ml Ekstraktionsvædske ned i hvert af dem. Medens Vædsken løber ud af Pipetten, holdes dennes Spids ind mod Reagensglassets Side. Glassene anbringes i Ekstraktionsapparatet, idet man forsigtigt fører dem ned i vandret Stilling. Der ekstraheres i 1 Time, hvorunder Glassene roterer 70 à 80 Gange i Minuttet. Efter Ekstraktionen tages Glassene forsigtigt ud af Apparatet, rejses langsomt op i lodret Stilling, anbringes i et Stativ, og derefter suges det øverste, klare Vædske lag over i et rent Glas ved Hjælp af et særligt udtrukket og bøjet Glasrør, se S. 29.

Ekstinktionsmaaling.

Ekstinktionen af de saaledes fremkomne klare Opløsninger maales i et Pulfrich-Fotometer med Filter S. 61. Der foretages 4 Indstillinger med tilhørende Aflæsninger, og Middeltallet af de aflæste Værdier omregnes til Ekstinktion pr. cm. Resultatet fremkommer som Differensen mellem de omregnede Værdier for Glassene A og B.

Fenolmængden, som svarer til den dannede Mængde Dibromindofenol, faas, udtrykt i mg Fenol pr. ml Mælk, ved Multiplikation af den fundne Ekstinktion pr. cm med 0,0146, idet der har vist sig at være Proportionalitet mellem Fenolmængde og Ekstinktion pr. cm, naar Bestemmelsen udføres som ovenfor beskrevet, se herom S. 30.

Bemærkninger vedrørende Metodens enkelte Afsnit.

Afpipetteringen.

Da der til hver Bestemmelse kun benyttes 1 ml Mælk, er det til Opnaaelse af god Reproducerbarhed ved Analyserne nødvendigt, at man er meget omhyggelig med Afpipetteringen saavel som med at blande hver enkelt Mælkeprøve, saaledes at den er homogen, naar der pipet-

teres af. De benyttede Pipetter skal være omhyggeligt rensede med Krom-Svovlsyre.

For at undgaa, at der kommer Spytfosfatase i Analysen, foretages Afpipetteringen — og i øvrigt alle forekommende Afpipetteringer — med et Vatfilter i Pipettens øvre Ende. Dette sker nemmest ved, at man med en lille Stump Gummislange af passende Kaliber hæfter et kort Stykke Glasrør med løst stoppet Bomuld til Pipettens Mundstykke.

Inkubationen.

I Analyseforskriften er det anført, at Pufferopløsningen mættes med Kloroform, og at der yderligere tilsættes 2 Draaber Kloroform til Analyseblandingen. Denne Foranstaltning foretages for at hindre substratspaltende Bakterier i at virke under Inkubationen. Ved Undladelse af Kloroformtilsætning har vi nemlig iagttaget, at der lejlighedsvis kan optræde falske Reaktioner for Fosfatase.

Naar der, som det fremgaar af Kemikalielisten, anvendes en Karbonatpuffer i Stedet for den af Scharer angivne Boratpuffer, skyldes dette dels, at Fremstillingen af en Karbonatpuffer er enklere, dels ogsaa at man med Karbonatpufferen kan anvende en langt større Totalkoncentration — og derved opnaa en større Pufferkapacitet — end ved Boratpufferen, idet Karbonatet i Modsætning til Boratet ikke hæmmer Fosfatasevirkningen.

Til Fastlæggelse af den rette Brintionkoncentration anvender Aschaffenburg og Neave (13) en tynd Opløsning af normalt Natriumkarbonat. Dette lader sig ogsaa nok gøre, saa længe der alene er Tale om Undersøgelse af frisk, normal Mælk, men dersom Metoden tillige skal kunne bruges over for flere Dage gamle, konserverede Mælkeprøver — hvilket jo er Forudsætningen for de af os paabegyndte Undersøgelser —, ligger Sagen anderledes. I saadan Mælk vil der nemlig i Almindelighed trods Konserveringen have udviklet sig noget Syre, og det er derfor nødvendigt, at Pufferen er i Besiddelse af en tilstrækkelig Kapacitet til, at Forholdet mellem dens »Syre«- og »Base«-Mængder ikke i større Udstrækning ændres ved den i Mælken eventuelt tilstedeværende Syremængde.

Den angivne Karbonatpuffer er med Hensyn til Brintionkoncentration og Pufferkapacitet indstillet saaledes, at pH i Pufferen uden Tilstedeværelse af Mælk er ca. 9,25, og at Formindsnelsen i pH ved Tilsætning af 1 ml frisk Mælk til 10 ml Puffer er ca. 0,05. Under de

samme Omstændigheder vil Formindskelsen, forårsaget af gammel kaliumdikromatkonserveret Mælk, ifølge vore Erfaringer være mindre end 0,10 pH-Enheder, forudsat at Mælken blev konserveret, medens den endnu var frisk. Under denne Forudsætning vil pH altsaa i enhver Analyse komme til at ligge mellem Yderværdierne 9,15 og 9,25.

Ved Valget af denne pH-Værdi, som er noget mindre end den sædvanligt foreskrevne Værdi paa ca. 9,6, er der taget særligt Hensyn til Forholdene ved Fenolreaktionen, hvorom nærmere nedenfor (S. 38).

Indofenoldannelsen (Fenolreaktionen).

Det anvendte Fenolreagens (Dibromkinonklorimid, Gibb's Reagens) er et ret instabilt Stof, som navnlig i Opløsning destrueres ved Hentstand under Dannelsen af brune Forbindelser. Derfor er det i Analyseforskriften anført, at Reagensopløsningen bør fremstilles frisk, hver Dag den skal bruges. Det har endvidere vist sig, at Reagenset er særlig instabilt i den alkaliske Mælkeblending, hvori det skal reagere med det eventuelt tilstedeværende Fenol. Sætter man Reagens til en fortyndet pufferet Mælkeblending, vil der derfor efter en forholdsvis kort Tids Forløb næppe være paaviselige Mængder af udestrueret Dibromkinonklorimid tilbage.

Ved Arbejde med de forskellige Modifikationer af Scharers Metode bemærker man snart, at der efter Reagenstilsætningen foruden det blaa Indofenol ogsaa dannes Stoffer med gulbrune eller rødbrune Farver. Det er klart, at der ved disse Stoffers Opstaaen sker et Tab af Reagens. Det lader sig derfor ikke gøre uden videre at lægge støkiometriske Betragtninger til Grund for Fastlæggelsen af den Reagensmængde, der skal anvendes i Analysen.

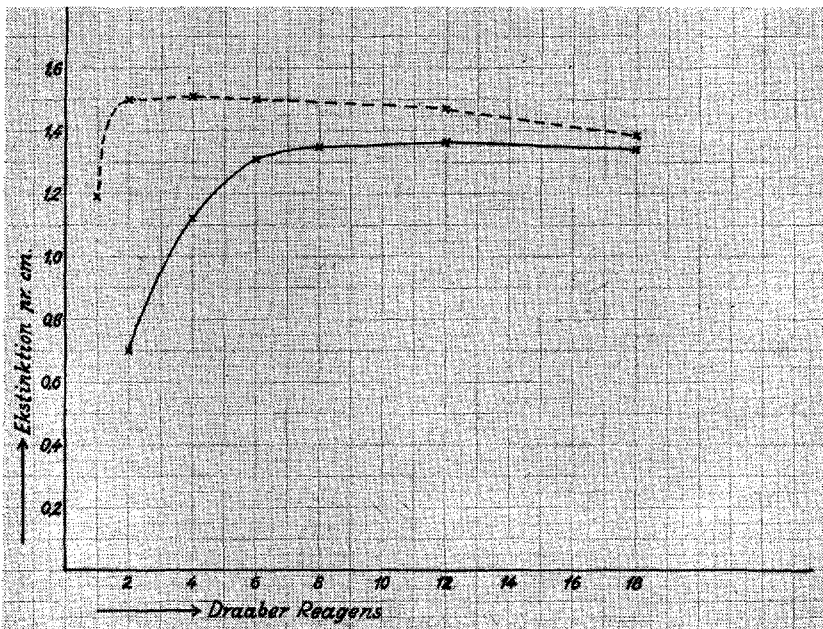
En kvantitativ Bestemmelse af det ved Fosfatasevirkningen dannede Fenol kræver naturligvis, at alt Fenol omdannes til Dibromindofenol. Om dette Maal er naaet, kan konstateres ved, at Ekstinktionen for en given Fenolmængde ikke fortsat vokser med stigende Mængder af Reagens. Til Fastsættelse af den for Opnaaelsen af dette Formaal nødvendige Reagensmængde er der udført flere Forsøg, ved hvilke der til konstante Mængder Fenol i pufferet Mælkeblending blev sat stigende Mængder Reagens.

Med disse Forsøg for Øje fremstilledes en Opløsning af ca. 1,5 g krystalliseret Fenol i 1 l destilleret Vand, og Opløsningens nøjagtige Indhold af Fenol bestemtes efter Koppeschaars Metode, se herom Tread-

wells Lehrbuch der analytischen Chemie, Bd. II, Quantitative Analyse (1921). Ud fra denne Stamopløsning fremstilledes derefter ved Fortynding Fenolopløsninger af de ønskede Koncentrationer, som bragtes til at reagere med vekslende Reagensmængder, hvorefter det dannede Dibromindofenol ekstraheredes og maalttes i Fotometeret.

For hvert Led i hvert Forsøg udførtes en »Blindprøve«, d. v. s. en ganske tilsvarende Bestemmelse uden Fenol, saaledes at den Ekstinktion, der hidrørte fra andre Aarsager end det dannede Indofenol, kunde fradrages.

Ekstinktionens Afhængighed af Reagensmængden.



Kurvetavle 1.

I hosstaaende Kurvetavle 1 gengiver den fuldt optrukne Kurve Resultatet af et saadant Forsøg, hvor der var tilsat 0,020 mg Fenol pr. ml frisk, pasteuriseret Mælk. Til Portioner à 1 ml af denne Mælk + 10 ml Pufferopløsning sattes henholdsvis 2—4—6—8—12 og 18 Draaber Reagensopløsning, svarende til henholdsvis 0,39 — 0,78 — 1,17 — 1,56

— 2,34 og 3,51 mg Dibromkinonklorimid, medens den støkiometriske (beregnete) Mængde udgør kun 0,063 mg.

Det fremgaar af Kurven, *dels* at Ekstinktionen til at begynde med vokser med stigende Reagensmængder (svarende til, at Indofenoldannelsen i dette Omraade er ufuldstændig) for senere at blive konstant, uafhængig af Reagensmængden, og *dels* at den nødvendige Reagensmængde er overordentlig meget større end den beregnede Mængde.

Gaar man ud fra, at Forklaringen herpaa skal søges i en Destruktion af Reagenset i Analyseblandingen, maaske i Form af en Omsætning med Bestanddele af Mælken, vil der være Tale om et Kapløb mellem to Processer: paa den ene Side Reagensets Destruktion — paa den anden Side Indofenoldannelsen. Da langt Størstedelen af Reagenset er forsvundet efter en Times Forløb, skal altsaa ogsaa Indofenoldannelsen være tilendebragt inden for dette Tidsrum. Da endvidere Indofenolets Dannelseshastighed er voksende med stigende Reagenskoncentration, gælder det om, at Begyndelseskonzentrationen af Reagens er saa stor, at Indofenolreaktionen kan naa at forløbe til Ende, inden alt Reagens er forsvundet fra Opløsningen. Det er derfor foreskrevet ovenfor, at Blandingen af Analysen og Reagenset bør ske saa hurtigt som muligt.

Naar Dibromkinonklorimidet anvendes til Fenolbestemmelse i vandige Pufferopløsninger, der ikke indeholder Mælk, behøves der et meget mindre Reagensoverskud for at faa alt Fenol omdannet til Indofenol, se hertil den punkterede Kurve paa Kurvetavle 1, som viser et ganske tilsvarende Forsøg, kun uden Mælk — altsaa i ren, vandig Opløsning. Dette er ganske i Overensstemmelse med, hvad andre har fundet ved Scharers Laboratoriemetode, idet det Gang paa Gang er konstateret, at den udviklede Farvestyrke for samme Mængde Fenol er væsentligt mindre i Mælkefiltratet end i de rene vandige Fenolstandarder — et Fænomen, der er blevet karakteriseret som »Mælkens hæmmende Virkning«, se saaledes 34. Beretning fra Statens Forsøgsmejeri (9).

I Analyseforskriften er det angivet, at der til hver Fosfataseprøve skal bruges 0,5 ml Reagensopløsning (= 3,3 mg Dibromkinonklorimid), skønt dette efter Kurvetavle 1 er betydeligt mere, end der udkræves for at faa Indofenolreaktionen til at løbe til Ende. Aarsagen hertil er *dels*, at forskellige Mælkeprøver kan udvise en lidt forskellig »hæmmende Virkning«, og at Overskud af Reagens ikke skader, naar der er Mælk til Stede, *dels* ogsaa at konserverede Mælkeprøver virker adskilligt mere »hæmmende« end friske, se herom S. 38—39.

Ved Scharers almindelige Laboratoriemetode lader det sig ikke uden videre gøre at forøge Reagensmængden. Selv om man nemlig gaar bort fra at bedømme Prøvens Udfald ved kolorimetrisk Sammenligning med Fenolstandarder og anvender en egentlig optisk Maaling — altsaa en Ekstinktionsbestemmelse — vil Reagensets Destruktionsprodukter ved deres store Egenekstinktion medføre for stor Usikkerhed. Naar dette ikke er Tilfældet ved den her beskrevne Ekstraktionsmetode, er Aarsagen den, at Mælkens Bestanddele i meget væsentlig Grad tilbageholder Reagensets Destruktionsprodukter, saa at de ikke gaar med Dibromindofenolet over i Ekstraktionsvædsken.

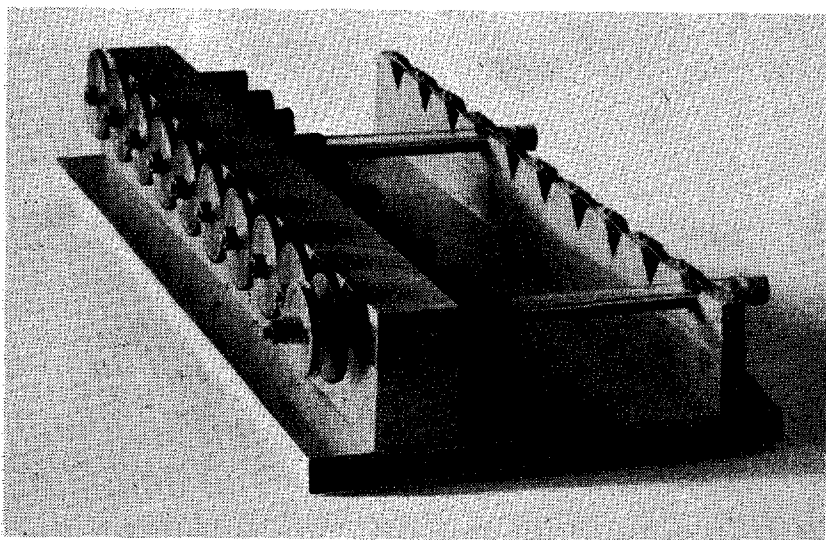
Ekstraktionen.

De første Forsøg med Ekstraktion af Indofenolfarvestoffet foregik efter den i Aschaffenburg og Neaves Fosfatasemetode angivne Fremgangsmaade: Naar Farveudviklingen var til Ende, tilsattes ren Butylalkohol, og Reagensglassene vendtes paa den foreskrevne Maade op og ned det foreskrevne Antal Gange. Glassene fik derefter Lov til at staa et Stykke Tid, for at de to Faser skulde skille sig saa meget ud fra hinanden, at en til Maaling i Fotometret tilstrækkelig stor Mængde af den butylalkoholiske Opløsning kunde trækkes af i klar Tilstand.

Mælkefortyndingen og Butanolen udviste imidlertid alt for stor Tendens til Emulsionsdannelse, og den dannede Emulsion var meget stabil, saaledes at Afsugning af den butylalkoholiske Opløsning i mange Tilfælde var uigennemførlig selv efter længere Tids Henstand. Ved den af Aschaffenburg og Neave foreskrevne Metodik har man for øvrigt kun ringe Mulighed for at bringe Farvestoffet i sikker Fordelingslignevægt mellem de to Faser, og det er derfor klart, at Vending af Glassene selv med et bestemt foreskrevet Antal Vendinger er for ureproducerbar til, at man herpaa kan basere en nøjagtig Bestemmelse af Mængden af det dannede Indofenol.

Man gik derfor over til at lade Ekstraktionsprocessen foregaa ved Hjælp af et til dette Formaal konstrueret Apparat — se Figur 1, der viser et Apparat til 10 Reagensglas ad Gangen.

Princippet er det ganske simple, at man lader Reagensglasset med Indhold af Analyseblanding og Ekstraktionsvædske rotere i vandret Stilling om Glassets Længdeakse. Herved tilvejebringes en Strømning i begge Faser, saaledes at stadig nye Vædske dele kommer i Berøring med hverandre, uden at de to Vædskelag rystes sammen.



Figur 1.

Som det fremgaar af hosstaaende skematiske Tegning (Figur 2), hviler hvert Reagensglas paa to Steder, A og B. Et Tværnsnit gennem A viser, hvorledes Glasset holdes paa Plads i en Udskæring i Træet ved Hjælp af en Staaifjeder. Den roterende Bevægelse frembringes ved en Elektromotor, som trækker en Række Tandhjul, og Rotationen overføres til Glasset ved B, idet Glasset stikkes ind i den ene Ende af et paa Omdrejningsaksen siddende Stykke Gummislange.

Der prøvedes først med ren Butanol som Ekstraktionsvædske. Det lykkedes hurtigt at indstille Omdrejningshastigheden saaledes, at der ikke dannedes Emulsion, og det voldte ingen Vanskelighed at bestemme den Tid, ved hvilken der ikke gik mere Farve over i Ekstraktionsmidlet — saaledes at Ligevægten altsaa havde indstillet sig.

Rotationen og den dermed forbundne intime Berøring mellem Mælkefasen og Butanolfasen bevirkede imidlertid, at der vandrede ganske fine Mælkepartikler over i Butanolfasen. Naar Butylalkoholen blev trukket af, var den derfor ikke helt klar, hvilket bevirkede, at Maalingen i Pulfrich-Fotometret blev upaalidelig.

Efter en stor Mængde forgæves Forsøg viste det sig, at en Tilsætning af Benzol til Butylalkoholen hindrede denne i at optage Mælkepartikler. Benzoltilsætningen havde imidlertid samtidig den ubehage-

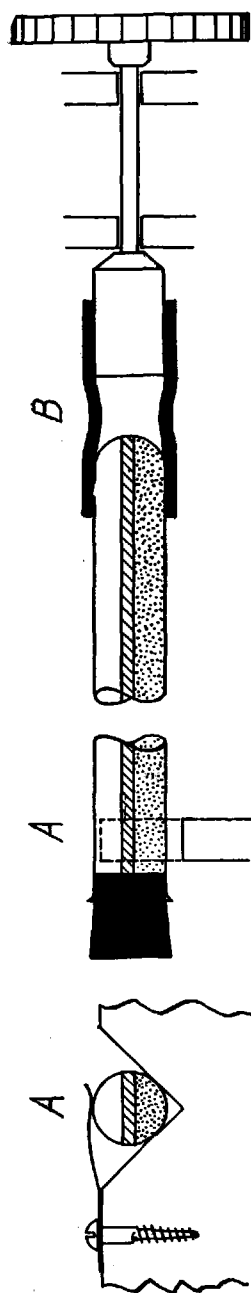


Figure 2.

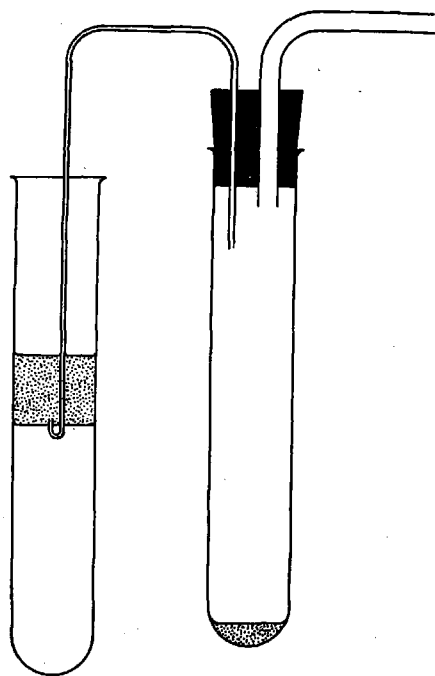


Figure 3.

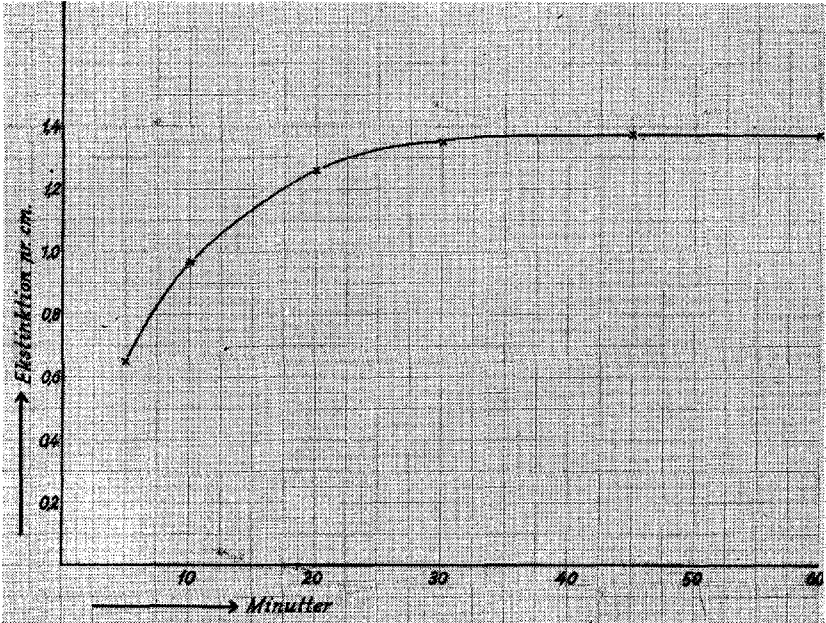
lige Virkning, at Tendensen til Skum- eller Emulsionsdannelse blev forøget, hvilket dog kunde modvirkes ved en Tilsætning af Æther.

En Række Forsøg med de tre Komponenter, Butylalkohol, Benzol og Æther, i forskelligt Blandingsforhold førte efterhaanden frem til Ekstraktionsvædske S. 19 angivne Sammensætning, der har staaet sin Prøve ved alle senere udførte Undersøgelser af Mælk.

En Forøgelse af *Rotationshastigheden* ud over de S. 20 foreskrevne 70 à 80 Omdrejninger pr. Minut er ikke tilraadelig, naar Emulsionsdannelse skal undgaas.

Til Bestemmelse af *Rotationstiden* er der udført flere Forsøgsrækker, hvor et Antal Reagensglas med Analyseblanding, i hvilke der var udviklet lige store Mængder Indofenol, ekstraheredes med lige store Mængder Ekstraktionsvædske, men med varierende Ekstraktionstider. Resultaterne af et saadant Forsøg fremgaar af hosstaaende Kurve 2, der viser, at Ekstinktionen til at begynde med vokser med Tiden og senere holder sig konstant. Det ses, at Ekstraktionen er fuldstændig

Ekstinktionens Afhængighed af Rotationstiden ved 70 Omdrejninger pr. Minut.



Kurvetavle 2.

efter ca. trekvart Times Forløb — ved 70 Omdrejninger pr. Minut —, men da fortsat Ekstraktion ikke skader, er der af Sikkerhedshensyn i Analysegangen foreskrevet 1 Times Rotationstid ved 70 à 80 Omdrejninger pr. Minut.

Til Aftrækning af det farvede Butanollag efter Rotationen har vi som foran anført anvendt et udtrukket (udvendig Diameter 1 à 1,5 mm) og bøjet Glasrør, se foranstaaende Figur 3. Ved Hjælp af en Vandluftpumpe bringes der et lille Undertryk i det Reagensglas, hvortil Ekstrakten skal suges over. Af Figuren fremgaar, at Rørets nederste Ende er bøjet saaledes, at Vædskestrømmen under Afsugningen bevæger sig nedad. Denne Forholdsregel er truffet for at forhindre, at der suges noget af det underste Vædskeleg med over.

Under normale Forhold vil man naturligvis foretrække et passende tyndt Metalrør i Stedet for det tynde Glasrør. Saadanne Rør kan imidlertid ikke fremskaffes i Øjeblikket.

Den beskrevne Metode til Afsugning har den Fordel, at den er praktisk og let at arbejde med. Naar Røret blot er tilstrækkelig tyndt, kræves der paa Grund af dets ringe indre Overflade ingen særlige Foranstaltninger til dets Rensning mellem de enkelte Afsugninger.

Ekstinktionsmaalingen.

Ved denne benyttes et Pulfrich-Fotometer, og der foretages, som foran anført, 4 Indstillinger med tilhørende Aflæsninger, idet der efter de to første flyttes om paa Kuvetterne, saaledes at den, som før var i højre Synsfelt, nu kommer over i venstre, og omvendt. Sammenligningskuvetten skal indeholde ren Ekstraktionsvædske, og Feltet med Dibromindofenolopløsningen skal altid være stillet paa fuld Lysstyrke. Ved hveranden Indstilling føres Kontrollfeltet fra større Lysstyrke til mindre — ved de øvrige fra mindre Lysstyrke til større. Der maales med Filter S 61, og Ekstinktionen pr. cm beregnes af Middeltallet af de 4 Aflæsninger ved Division med Lagtykkelsen, maalt i cm.

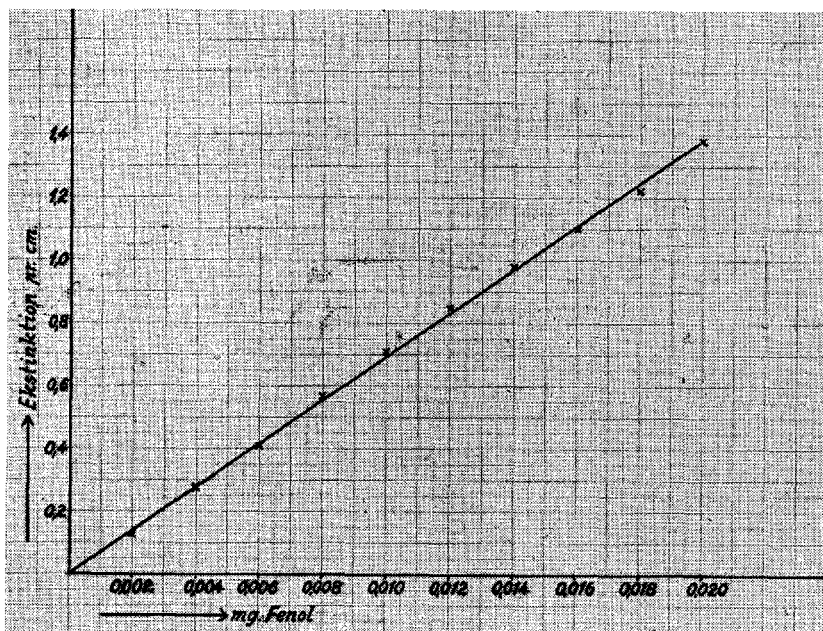
Opløsningerne af Dibromindofenol i Ekstraktionsvædsken er holdbare, ogsaa ved Henstand i Lyset, saaledes at Ekstinktionsmaalingerne ikke nødvendigvis skal udføres samme Dag. Skal de opbevares til næste Dag, maa de dog naturligvis henstaa i omhyggeligt tilproppede Glas.

Fosfataseaktiviteten.

Som Maal for Fosfataseaktiviteten kunde man i Praksis meget vel direkte anvende den fundne Ekstinktion pr. cm Vædskeleg. Det er imid-

lertid blevet almindeligt at udtrykke Fosfataseaktiviteten ved den fraspaltede Fenolmængde, og denne kan man regne sig til ved en simpel Multiplikation af Ekstinktionen pr. cm med Faktoren 0,0146, hvorved Fenolmængden faas udtrykt i mg Fenol pr. ml Mælk. At der bestaar en retliniet Afhængighed mellem Fenolmængden og Ekstinktionen pr. cm, illustreres af hosstaaende Kurvetavle 3.

Ekstinktionens Afhængighed af Fenolmængden.



Kurvetavle 3.

Anmærkning.

Hvis man i særlig Anledning vil arbejde ved pH ca. 9,6 i Stedet for, som her foreskrevet, ved pH ca. 9,2, kan Pufferopløsningen fremstilles af 4,6 g vandfrit, normalt Natriumkarbonat + 6,8 g Natriumbikarbonat, opløst i destilleret Vand ad 1 l.

Gaar man i øvrigt frem efter Forskriften, vil man under disse Forhold finde en højere Fosfataseaktivitet, men naar Inkubationstiden nedsættes til 1 Time, faar man samme Resultat som ved Inkubation i 1½ Time ved pH 9,2.

C. Om Anvendeligheden
af den af H. Vestesen
udarbejdede Metode til Bestemmelse af Fosfatase
i frisk og i konserveret Mælk.

Ved
A. C. Andersen.

(De nedenfor omtalte Analyser er paa faa Undtagelser nær udført af Civilingeniørerne H. Vestesen og G. Mandal-Bertelsen).

1. Metodens Sikkerhed.

Af Overensstemmelsen mellem samtidig udførte Dobbeltbestemmelser kan beregnes, at Middelfejlen paa Middeltallet af to Fosfatasebestemmelser svarer til en Fenolmængde paa 0,00018 mg pr. ml Mælk ved en fraspaltet Mængde paa omkring 0,02 mg pr. ml, og til en Fenolmængde paa 0,00014 mg pr. ml Mælk ved en fraspaltet Mængde paa omkring 0,01 mg pr. ml.

Fosfatasemængder, som fraspalter Fenolmængder af den anførte Størrelsesorden, kan altsaa uden Vanskelighed bestemmes kvantitativt med en Middelfejl paa nogle faa Procent af Værdien.

Til umiddelbar Vurdering af Metodens Sikkerhed tjener følgende Forsøg.

Pasteuriseret Skummetmælk, som yderligere var opvarmet til 80 ° i Laboratoriet og derefter afkølet igen, blev tilsat 0,5 pCt. raa Sødme (Børnemælk), hvorefter Blandingens Indhold af Fosfatase bestemtes efter foranstaaende Forskrift af 4 forskellige Analytikere, af hvilke de to aldrig før havde arbejdet med Metoden. Hver af Analytikerne udførte to Bestemmelser, og Resultaterne af samtlige Bestemmelser er sammenstillet i hosstaaende Tabel 1, udtrykt i mg ved Fosfatasevirkningen fraspaltet Fenol pr. ml Mælk.

Metodens Paalidelighed kan ogsaa demonstreres gennem en Undersøgelse af, hvor smaa Indblandinger af raa Mælk i kogt Mælk der med

Tabel 1.

4 forskellige Analytikeres Fosfatasebestemmelser i samme Mælk
(0,5 pCt. raa Mælk i kogt Mælk).

Analytiker	Fundet mg Fenol pr. ml Mælk	
V	0,0121 0,0121	} 0,012
M	0,0110 0,0112	} 0,011
T	0,0116 0,0116	} 0,012
C	0,0114 0,0117	} 0,012

Sikkerhed kan paavises. Hertil fremstilledes 5 Blandinger af indkøbt pasteuriseret Mælk (der til yderligere Sikkerhed blev opvarmet til 80 ° i Laboratoriet og afkølet igen) med henholdsvis 0,1 pCt. — 0,25 pCt. — 0,5 pCt. — 0,75 pCt. og 1,0 pCt. raa Mælk (Børnemælk), og i hver af disse Blandinger udførtes af 2 Analytikere Fosfatasebestemmelse efter Forskriften. Nogle Dage efter — og derfor med en anden Portion raa Mælk — gentoges Forsøget paa ganske samme Maade. Resultaterne af Bestemmelserne findes sammenstillet i hosstaaende Tabel 2, udtrykt i mg ved Fosfatasevirkningen fraspaltet Fenol pr. ml Mælk. De to Analytikere er betegnet ved henholdsvis V og M.

Tabel 2.

2 forskellige Analytikeres Fosfatasebestemmelser i Mælkeprøver med forskelligt Indhold af raa Mælk.

pCt. raa Mælk indblandet i kogt Mælk	mg fraspaltet Fenol pr. ml Mælk			
	Forsøg I		Forsøg II	
	V	M	V	M
0,1	0,003	0,002	0,002	0,002
0,25	0,005	0,005	0,004	0,004
0,5	0,010	0,009	0,008	0,008
0,75	0,014	0,013	0,012	0,012
1,0	0,017	0,017	0,015	0,016

Tilstedeværelsen af 0,1 pCt. raa Mælk i effektivt pasteuriseret Mælk lader sig altsaa med Sikkerhed paavise ved Metoden — i hvert Fald naar den raa Mælk har et Fosfataseindhold som den Børnemælk, der blev anvendt i disse Forsøg (sml. nedenfor).

Til Sammenligning kan anføres, at Stein (2) angiver ved sin Metode at kunne paavise en Tilblanding paa 0,4—0,6 pCt. raa Mælk, og at Jepsen og Madelung (7) kommer til det Resultat, at Steins Metode giver tydeligt Udslag for en Tilsætning af 1 pCt. raa Mælk, medens Scharers Metode ved en Inkubationstid paa 20 Timer giver Reaktion for en Tilsætning af 0,2 pCt. raa Mælk.

Det maa i denne Forbindelse tages i Betragtning, at den raa Mælks Fosfataseindhold ikke er konstant. Som allerede omtalt S. 8 er der Forskel paa Fosfataseindholdet i de enkelte Køers Mælk, hvilken Forskel dog i nogen Grad vil være udlignet i Blandinger af Mælk fra flere Køer, og naturligvis udlignet desto mere, jo flere Køers Mælk der indgaar i Blandingen. Ikke des mindre vil Fosfataseindholdet i almindelig Blandingsmælk, saaledes som denne udgaar fra Mejerierne, kunne variere ret betydeligt. Stein (2) fandt saaledes ved Undersøgelse af almindelig dansk Konsummælk til Tider indtil 70 pCt. mere Fosfatase end til andre Tider, og Jepsen og Madelung (7) har ved Undersøgelse af Blandingsmælken fra 5 store Besætninger fundet Variationer paa tæt ved 100 pCt. i Fosfataseindholdet.

For ogsaa ved Hjælp af den heromhandlede Metode at søge dette Forhold belyst, har vi til forskellige Tider bestemt Fosfataseindholdet i den almindelige raa Børnemælk, der forhandles i København. Fremgangsmaaden herved var den, at 99 Dele Mælk, som i Laboratoriet var opvarmet til over 80° og afkølet igen, blandedes med 1 Del af den raa Børnemælk, hvorefter Fosfataseindholdet bestemtes i Blandingen.

Resultaterne af disse Bestemmelser er sammenstillet i hosstaaende Tabel 3, der — foruden yderligere at illustrere Overensstemmelsen mellem Dobbeltbestemmelser — viser Fosfataseaktiviteter svarende til fra 0,018 til 0,032 mg ved Fosfatasevirkningen fraspaltet Fenol.

Disse Variationer i Fosfataseindhold svarer altsaa ganske til, hvad Stein (2) saavel som Jepsen og Madelung (7) tidligere har fundet, sml. ovenfor.

Saafermt det ovenfor i Tabel 2 gengivne Forsøg var blevet udført paa et Tidspunkt, da Børnemælken indeholdt Fosfatase svarende til 0,032 i Stedet for til 0,016 mg Fenol, vilde Indblandingen af 0,1 pCt.

Tabel 3.

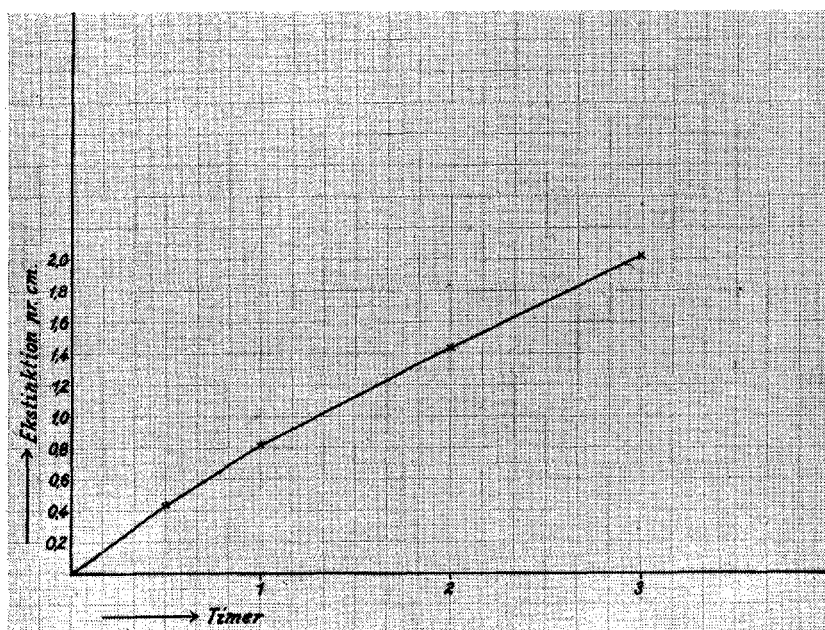
Fosfatasebestemmelser i højpasteuriseret Mælk med en Tilsætning af 1 pCt. raa Mælk (Børnemælk).

Dato	mg Fenol pr. ml Mælk	Dato	mg Fenol pr. ml Mælk
12-11 43	0,0279 } 0,0276 } 0,028	2-12 43	0,0273 } 0,0276 } 0,027
15-11 43	0,0272 } 0,0272 } 0,027	8-12 43	0,0295 } 0,0298 } 0,030
16-11 43	0,0283 } 0,0280 } 0,028	10-12 43	0,0298 } 0,0304 } 0,030
18-11 43	0,0295 } 0,0289 } 0,029	14-12 43	0,0308 } 0,0317 } 0,031
19-11 43	0,0315 } 0,0315 } 0,032	4-1 44	0,0298 } 0,0289 } 0,029
23-11 43	0,0295 } 0,0292 } 0,029	10-1 44	0,0283 } 0,0295 } 0,029
24-11 43	0,0267 } 0,0261 } 0,026	13-1 44	0,0321 } 0,0310 } 0,032
26-11 43	0,0257 } 0,0266 } 0,026	31-1 44	0,0245 } 0,0239 } 0,024
29-11 43	0,0277 } 0,0283 } 0,028	16-3 44	0,0183 } 0,0175 } 0,018
30-11 43	0,0286 } 0,0277 } 0,028	21-3 44	0,0175 } 0,0178 } 0,018

raa Mælk selvfølgelig have givet et endnu større Udslag, d. v. s. man vilde med samme Sikkerhed have kunnet eftervise en Indblanding paa mindre end 0,1 pCt. raa Mælk i den pasteuriserede.

I den foran givne Analyseforskrift er Inkubationstiden fastsat til 90 Minutter, men Metoden kan, om ønskes, gøres meget mere fintmærkende gennem en Forlængelse af Inkubationstiden. Som Eksempel er i hosstaaende Kurvetayle 4 gengivet Resultaterne af et Forsøg, hvortil er anvendt kogt Mælk med et Indhold af 0,5 pCt. raa Børnemælk. Der er benyttet Inkubationstider paa $\frac{1}{2}$, 1, 2 og 3 Timer, medens Analyseforskriften er fulgt paa alle andre Punkter.

Af Kurven ses, at Ekstinktionen — og dermed altsaa den fundne Fenolmængde — inden for det foreliggende Omraade er nogenlunde proportional med Inkubationstiden, saaledes at man ved at forøge

Ekstinktionens Afhængighed af Inkubationstiden.*Kurvetavle 4.*

Inkubationstiden fra de foreskrevne 90 Minutter til 3 Timer vilde faa næsten dobbelt saa stor en Ekstinktion pr. cm og altsaa ogsaa en næsten dobbelt saa stor Fenolmængde fraspaltet.

I den foran beskrevne Form, altsaa med en Inkubationstid paa $1\frac{1}{2}$ Time, maa Metoden imidlertid anses for at være fuldt ud tilstrækkelig fintmærkende — den er i hvert Fald, saa vidt det kan ses, i denne Henseende alle hidtil beskrevne Metoder overlegen, samtidig med at Resultatet fremtræder som et objektivi Maaleresultat i Stedet for at hvile paa et subjektivt Skøn. Da en Forlængelse af Inkubationstiden desuden betyder en uønsket Forlængelse af den Tid, der medgaar til Gennemførelsen af en Analyse, har vi ikke fundet tilstrækkelig Anledning til at foreskrive en længere Inkubationstid end 90 Minutter.

Som nærmere omtalt foran (se S. 20) fremkommer Resultatet af en Fosfatasebestemmelse efter den heromhandlede Metode som Forskellen i maalt Ekstinktion pr. cm (eller i deraf beregnet mg Fenol pr. ml. Mælk)

mellem A (den foreliggende Mælkeprøve) og B (en inaktiveret Portion af samme Mælk). En væsentlig Fordel ved Metoden er, at der gennem en saadan Blindprøve korrigeres for den Farve, som altid optræder i større eller mindre Grad, men som ikke kan føres tilbage til Fenol, fraspaltet det tilsatte Substrat (Dinatriumfenylfosfat) ved Indvirkning af tilstedeværende Fosfatase.

Det skal i denne Forbindelse bemærkes, at G. Sjöström i sit flere Gange citerede Arbejde (8) angiver, at de inaktiverede Prøver ved hans Undersøgelser viste en Farve, svarende til omkring 0,0025 mg Fenol, og at ogsaa Sjöström trækker det ved Blindprøven fundne Fenolindhold fra det ved den aktive Prøve fundne Fenolindhold og kun betragter Differensen som et Udtryk for den til Undersøgelse foreliggende Mælks Fosfataseaktivitet.

Ved de efter den heromhandlede Metode hidtil anstillede Fosfatasebestemmelser har »Blindprøverne« højst haft en Ekstinktion pr. cm paa 0,25, svarende til 0,0035 mg Fenol pr. ml Mælk. Der er her ikke Tale om en konstant Værdi; Blindværdien svinger tværtimod fra Prøve til Prøve, og Variationerne kan hidrøre fra Forskelligheder saavel i Mælkeprøverne som i det anvendte Reagens (Dibromkinonklorimid). Ved afgørende Undersøgelser — og da ikke mindst ved Undersøgelser til retslig Brug — maa det derfor anses for absolut paakrævet at korrigere for Blindværdien for derigennem at udelukke enhver Mulighed for Abnormiteter hos de til Undersøgelse foreliggende Mælkeprøver saavel som hos det til de paagældende Undersøgelser benyttede Reagenspræparat.

Det bør ogsaa bemærkes, at en af Grundene til, at Statens Forsøgsmejeri har taget Afstand fra Scharers almindelige Laboratoriemetode, netop er, at Metoden mangler fornøden Blindværdikorrektion. I Forsøgsmejeriets 38. Beretning (1943), S. 26, skriver *Svend Hartmann* og *Karl Andersen* saaledes: »Forsøgsresultaterne i denne Rapport er rent foreløbige, idet Undersøgelserne fortsættes. Hovedformaalet er at finde en brugbar og reproducerbar Hurtigmetode til nøjagtig Fastlæggelse af Mejeriprodukternes Varmebehandling. De Anker, vi i 1941 har rejst mod den almindelige 3 Timers Scharer Metode, viser sig at være berettigede, væsentlig paa Grund af manglende Blindkontrol og uregelmæssig Farveindikation med Gibbs Indikator.«

Om den i nærværende Beretning beskrevne og nærmere omtalte Metode kan kaldes en Hurtigmetode, kan naturligvis omtvistet, men

at Metoden giver sikre og reproducerbare Resultater, anser vi for bevist, i hvert Fald naar Talen er om Undersøgelser af Sødælk og Skummetælk.

2. Konserveringsmidlernes Indflydelse.

I den flere Gange citerede 2. Meddelelse fra de svenske Mejeriforsøg (8) har G. Sjöström ogsaa givet Meddelelse om en Række Undersøgelser over forskellige Konserveringsmidlers Indvirkning paa Fosfataseaktiviteten. Ifølge disse Undersøgelser er Kaliumdikromat det bedst egnede Konserveringsmiddel, og dets Tilstedeværelse angives af Sjöström at være uden direkte Indflydelse paa den ved Steins Metode fundne Fosfataseaktivitet. Hvad Scharers Laboratoriemetode angaar, er Forholdet ifølge Sjöström derimod et andet, idet der her allerede ved selve Tilsætningen af Kaliumdikromatet sker en Formindskelse af Fosfataseaktiviteten; men den saaledes formindskede Fosfataseaktivitet holder sig derefter nogenlunde konstant, i hvert Fald i nogle Dage. Om Scharers Hurtigmetode angiver Sjöström, at Farveudslaget paavirkes af Kaliumdikromatets Egenfarve, saaledes at negative Fosfataseprøver viser en gulgrøn, positive derimod en blaagrøn Farve, dog er Omslaget knapt saa tydeligt som ved ikke-konserverede Prøver.

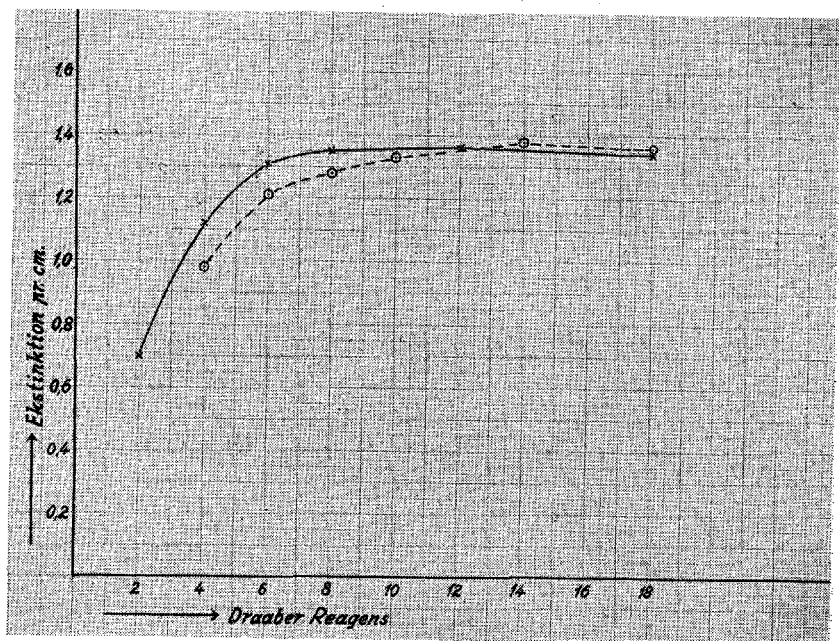
Sjöström er af den Opfattelse, at der bestaar en afgjort Forskel mellem Kaliumdikromatets Indflydelse paa Enzymspaltningen af henholdsvis Glycerylfosfat (Steins Metode) og Fenylfosfat (Scharers Metode) — en Forskel som kan tænkes at hidrøre fra, at mere end eet Enzym deltager i Spaltningsprocessen.

Ved vore Undersøgelser kunde vi bekræfte Sjöströms Iagttagelse af, at en Mælkeprøves Fosfataseaktivitet, maalt under samme Betingelser som ved Scharers almindelige Metode, umiddelbart nedsættes ved en Tilsætning af Kaliumdikromat til Mælken. Vi kom imidlertid snart til det Resultat, at det ikke var selve den enzymatiske Proces, der paa- virkedes af Kaliumdikromatets Tilstedeværelse, men derimod Fenolreaktionen, d. v. s. Reaktionen mellem det ved Fosfatasevirkningen frigjorte Fenol og det derefter tilsatte Reagens: Dibromkinonklorimid. Naar henses til den hæmmende Virkning paa nævnte Fenolreaktion, som Karl Andersen og Svend Hartmann (9) har paavist for forskellige Stoffers Vedkommende, er der heller intet mærkeligt heri. Maalet maatte derfor blive at søge Reaktionsbetingelserne saaledes ændret, at Kalium-

dikromatets hæmmende Virkning nedsattes mest muligt og helst helt ophævedes.

Gennem en Række Forsøg lykkedes det Vestesen at naa ogsaa dette Maal. Efter at Pufferopløsningens Sammensætning var ændret, saaledes at pH nedsattes til ca. 9,2 (sml. S. 22), viste det sig nemlig, at der af en given Mængde Fenol dannedes samme Mængde Dibromindofenol, hvad enten Reaktionen forløb i Nærværelse af frisk, ukonserveret Mælk, eller gammel, med 0,2 pCt. Kaliumdikromat konserveret Mælk.

Ekstinktionens Afhængighed af Reagensmængden.



Kurvetavle 5.

I hosstaaende Kurvetavle 5 er som Eksempel vist Resultaterne af et Forsøg, udført med frisk Mælk (den fuldt optrukne Kurve) og med 14 Dage gammel, med 0,2 pCt. Kaliumdikromat konserveret Mælk (den punkterede Kurve). Til begge Slags Mælk blev der sat Fenol og Puffer, saaledes at der i en Række Glas fandtes 1 ml Mælk + 0,020 mg

Fenol + 10 ml Puffer (af Sammensætning som anført S. 18), og til hvert af disse Glas sættes derefter henholdsvis (2) — 4 — 6 — 8 — (10) — (12) — (14) og 18 Draaber Reagensopløsning, svarende til henholdsvis (0,39) — 0,78 — 1,17 — 1,56 — (1,95) — (2,34) — (2,73) og 3,51 mg Dibromkinonklorimid, medens den støkiometrisk beregnede Mængde udgør kun 0,063 mg.

Af Kurven ses, at Ekstinktionen for den gamle, konserverede Mælks Vedkommende vokser langsommere med stigende Reagensmængder, end Tilfældet er for den friske Mælks Vedkommende. Ved et Forbrug paa omkring 12 Draaber Reagens, svarende til ca. 2,34 mg Dibromkinonklorimid, falder de to Kurver dog praktisk taget sammen, idet Afvigelserne her maa siges at falde inden for den uundgaaelige tilfældige Usikkerhed.

Det ligger i Sagens Natur, at forskellige Mælkeprøver ikke kan forventes at have helt den samme hæmmende Virkning. Hertil kommer, at Kaliumdikromatets Indflydelse maa forudsættes at variere noget fra Prøve til Prøve, og at den ifølge de indhøstede Erfaringer kan vokse med Prøvernes Alder. Da heller ikke selve det anvendte Fenolreagens (Dibromkinonklorimidet) kan paaregnes altid at forholde sig helt ens, idet det synes at være noget ubestandigt selv ved Opbevaring i fast Form, er der til hver Prøve foreslaaet anvendt 0,5 ml Reagensopløsning, svarende til ca. 3,3 mg Dibromkinonklorimid. Efter alt foreliggende at dømme kan man nemlig derved forudsætte at være paa den sikre Side med Hensyn til Reaktionens Forløb.

I hosstaaende Tabel 4 findes sammenstillet nogle Resultater af Bestemmelser af Fosfataseaktivitet i Mælkeprøver saavel i frisk Tilstand som efter Tilsætning af 0,2 pCt. Kaliumdikromat, og for sidstnævnte Prøvers Vedkommende tillige efter at Prøverne havde henstaaet med Kaliumdikromat i kortere eller længere Tid ved Stuetemperatur.

Som det fremgaar af Tabellen har hverken selve Tilsætningen af 0,2 pCt. Kaliumdikromat eller de saaledes konserverede Prøvers Henstand i 2 à 3 Uger ved Stuetemperatur bevirket en Nedgang af Betydning i Prøvernes Fosfataseaktivitet.

Mælk, der er konserveret med Kaliumdikromat, kan som bekendt ikke kontrolleres ved Hjælp af den Storch'ske Prøve, fordi selve Kaliumdikromatet reagerer kraftigt med de Storch'ske Reagenser. En Tilsætning af 1 pCt. Natriumbenzoat kan imidlertid bevare Mælken frisk i flere Dage, og en saadan Tilsætning er uden Indvirkning paa den

Tabel 4.

Fundet mg Fenol pr. ml Mælk ved Fosfatasebestemmelse til forskellig Tid i 3 Mælkeprøver, som opbevarede ved Stuetemperatur, konserveret med 0,2 pCt. Kaliumdikromat.

Dato	Frisk	Kons.	Dato	Frisk	Kons.	Dato	Frisk	Kons.
8-2 44	0,011	0,011	15-2 44	0,010	—	29-2 44	0,009	0,008
10-2 44		0,010	16-2 44		0,009	1-3 44		0,009
11-2 44		0,010	17-2 44		0,009	2-3 44		0,008
14-2 44		0,010	22-2 44		0,009	3-3 44		0,009
18-2 44		0,010	25-2 44		0,009	8-3 44		0,009
21-2 44		0,009	28-2 44		0,009	13-3 44		0,008
28-2 44		0,010	1-3 44		0,010			
			2-3 44		0,009			
			3-3 44		0,009			

Storch'ske Prøve. Da det lejlighedsvis kan være af Betydning at kunne underkaste en Mælkeprøve baade den Storch'ske Prøve og Fosfataseprøven, blev der i Tilknytning til de ovenomtalte Bestemmelser udført nogle Forsøg til Belysning af Natriumbenzoatets Indvirkning saavel paa selve Fenolbestemmelsen som paa Fosfatasereaktionen som Helhed betragtet.

Benzoatets Indvirkning paa selve Fenolbestemmelsen ses af følgende Forsøg, hvortil benyttedes frisk Mælk, Mælk konserveret med 0,2 pCt. Kaliumdikromat og Mælk konserveret med 1 pCt. Natriumbenzoat. I alle Tilfælde var der tilsat 0,020 mg Fenol pr. ml Mælk, og Fenolbestemmelserne udførtes med 10 ml Pufferopløsning + 1 ml Mælk + 0,5 ml Fenolreagens (Dibromkinonklorimid). Af de fundne Ekstinktioner — som altid efter Korrektion for Blindværdien — beregnedes følgende Værdier for Mængden af tilsat Fenol pr. ml Mælk.

Frisk, ukonserveret Mælk $\left\{ \begin{array}{l} 0,0203 \\ 0,0206 \end{array} \right\}$ 0,020 mg

Mælk med 0,2 pCt. Kaliumdikromat .. $\left\{ \begin{array}{l} 0,0203 \\ 0,0200 \end{array} \right\}$ 0,020 mg

Mælk med 1 pCt. Natriumbenzoat $\left\{ \begin{array}{l} 0,0197 \\ 0,0199 \end{array} \right\}$ 0,020 mg

Heraf kan drages den Slutning, at Natriumbenzoat ligesom Kaliumdikromat ingen nævneværdig skadelig (hæmmende) Virkning har paa selve Fenolbestemmelsen.

Benzoatets Indflydelse paa Fosfatasereaktionen som Helhed fremgaar af hosstaaende Tabel 5, hvori er sammenstillet nogle Resultater af Bestemmelse af Fosfataseaktivitet i Mælkeprøver saavel i frisk Tilstand som efter Tilsætning af 1 pCt. Natriumbenzoat — for sidstnævnte Prøvers Vedkommende tillige efter Henstand ved Stuetemperatur i indtil 2 Uger.

Tabel 5.

Fundet mg Fenol pr. ml Mælk ved Fosfatasebestemmelse til forskellig Tid i 2 Mælkeprøver, som opbevaredes ved Stuetemperatur, konserveret med 1 pCt. Natriumbenzoat.

Dato	Frisk	Kons.	Dato	Frisk	Kons.
8-2 44	0,011	0,011	29-2 44	0,009	0,009
10-2 44		0,011	1-3 44		0,009
11-2 44		0,010	2-3 44		0,009
14-2 44		0,009	3-3 44		0,008
21-2 44		0,007	8-3 44		0,007
			13-3 44		0,006

Det ses af Tabellen, at selve Tilsætningen af Natriumbenzoat ingen kendelig Indflydelse har haft paa Fosfataseaktiviteten, men at denne paa den anden Side begynder at synke efter faa Dages Forløb. Resultaterne bekræfter saaledes det gammelkendte Forhold, at Natriumbenzoat ikke er saa godt et Konserveringsmiddel som Kaliumdikromat.

3. Afsluttende Bemærkninger.

Som allerede berørt S. 17 har det ikke været Tanken, at den i denne Beretning beskrevne Metode skal bringes i Anvendelse over for alle til Undersøgelse for Pasteurisering udtagne Mælke- eller Valleprøver, men kun over for saadanne Prøver, om hvis behørig Lav- eller Langtidspasteurisering der er Grund til at tvivle.

Af de til Kontrol med Pasteuriseringsbestemmelsernes Overholdelse udtagne Prøver vil sædvanligvis kun et meget lille Antal være utilstrækkeligt opvarmet. Det er derfor formaalstjenligt at anvende en min-

dre kompliceret — og dermed mere overkommelig — Metode til en første Gennemgang af samtlige foreliggende Prøver for derigennem at faa fornøden Oplysning om, hvilke af dem der er Grund til at underkaste en mere indgaaende Undersøgelse. At de hurtige Metoder samtidig er mindre paalidelige, gør i denne Sammenhæng ikke saa meget, naar blot de Prøver, som ved denne første Gennemgang giver Anledning til Tvivl om Pasteuriseringens forskriftsmæssige Gennemførelse, bagefter bliver omhyggeligt undersøgt efter den mere komplicerede, men til Gengæld ogsaa sikre Metode.

Saa længe de udtagne Prøver foreligger i frisk, ukonserveret Tilstand, eller i hvert Fald kun konserveret med Natriumbenzoat, kan man til en saadan foreløbig Undersøgelse med Fordel benytte Scharers Hurtigmetode, saaledes som det f. Eks. sker i Sverige. Det er imidlertid meget muligt, at den af Forsøgsmejeriet (1) fremdragne, af *Ohmori* foreslaaede Anvendelse af Dinatrium-p-Nitrofenylfosfat som Substrat vil vise sig særlig formaalstjenlig i denne Henseende.

Hvis Prøverne derimod er konserveret med Kaliumdikromat, lader *Ohmori's* Modifikation sig ikke anvende; derimod vil Scharers Hurtigmetode nok kunne anvendes, naar den kombineres med en Udrystning med Butylalkohol. Man vil naturligvis ogsaa — og tilmed bedre — kunne benytte den i nærværende Beretning omhandlede Metode i afkortet Form, og derved altsaa som en Slags Hurtigmetode, idet man nedsætter Inkubationstiden til $\frac{1}{2}$ Time samt undlader den kvantitative Ekstraktion i Ekstraktionsapparatet med paafølgende Maaling i Fotometret for i Stedet at tilsætte lidt (2—5 ml) Ekstraktionsvædske og langsomt og forsigtigt at vende op og ned paa Glassene en halv Snes Gange. Af den Farve, som Ekstraktionsvædsken antager, vil man uden større Vanskelighed kunne skønne, om der er Anledning til at underkaste den paagældende Mælkeprøve en indgaaende Undersøgelse.

Hvor meget Fosfatase den pasteuriserede Mælk maa indeholde, uden at Pasteuriseringsforskrifterne kan anses for overtraadt, maa fastsættes i Forbindelse med Fastsættelse af den Forskrift, hvorefter Fosfatasebestemmelsen skal udføres.

Sammendrag.

Efter en kortfattet Redegørelse for saavel den Storch'ske Prøve som de senere tilkomne Fosfataseprøver og den førstes Fortrin og Mangler i Sammenligning med de sidstes er de danske og de svenske Pasteuriseringspaabud gjort til Genstand for en kort Omtale, i hvilken Forbindelse den i 1942 stedfundne Nyordning af den svenske Pasteuriseringskontrol ogsaa er berørt. Der er herunder peget paa, at de forskellige Fosfatasemetoder ikke fører til samme Resultat, og at det ogsaa for den enkelte Metode gælder, at Resultatet afhænger af, hvorledes Undersøgelsen udføres.

Saafermt en Pasteuriseringskontrol skal baseres paa en Fosfatasebestemmelse, er det derfor nødvendigt at foreskrive ikke alene, hvilken Metode der skal benyttes, men det maa i alle Detailler foreskrives, hvorledes Undersøgelsen skal udføres og Resultaterne tydes.

Der er derefter givet en detaljeret Arbejdsforskrift for en her i Laboratoriet gennemarbejdet Fosfatasebestemmelsesmetode, der bygger paa Aschaffenburg og Neave's Modifikation af Scharers Fosfataseprøve, og det er vist, at denne Metode giver fuldt ud reproducerbare Resultater; disse fremkommer som objektive Maaleresultater i Stedet for at hvile paa subjektive Skøn. Metoden maa anses for den for Tiden mest velegnede til afgørende Undersøgelse af, om en given Mælkeprøve indeholder mere Fosfatase, end der kan tolereres, naar Mælken skal betragtes som pasteuriseret.

I Modsætning til Scharers Fosfataseprøve paavirkes den foreliggende Metode ikke nævneværdigt af Tilstedeværelsen af Kaliumdikromat. Det er herved muligt at konservere de til Fosfatasebestemmelse udtagne Mælkeprøver, saafremt de ønskes opbevaret til senere Undersøgelse resp. forsendt til et andetsteds beliggende Laboratorium.

Litteraturfortegnelse.

1. 38. Beretning fra Statens Forsøgsmejeri (1943).
 2. *K. S. Stein*: Om Kontrollering af pasteuriseret Mælk med særligt Henblik paa langtidspasteuriseret og stassaniseret Mælk. Doktordisputats. København 1937.
 3. *H. D. Kay* og *W. R. Graham jr.*: Journal of Dairy Research 5, 54 og 63 (1933).
 4. *H. D. Kay* og *W. R. Graham jr.*: Journal of Dairy Research 6, 191 (1935).
 5. *H. Scharer*: Journal of Dairy Science 21, 21 (1938).
 6. *O. Winther*: Maanedsskrift for Dyr læger 50, 441 (1938).
 7. *Aage Jepsen* og *Poul Madelung*: Medlemsblad for den danske Dyr lægeforening 22, 85 og 117 (1939).
 8. *Gunnar Sjöström*: Meddelande No. 2 från Statens Mejeriförsök. Alnarp, Sverige (1939).
 9. *Karl Andersen* og *Svend Hartmann*: 34. Beretning fra Statens Forsøgsmejeri (1942), se ogsaa 38. Beretning (1943).
 10. *K. E. Thomé*: Meddelande No. 6 från Statens Mejeriförsök. Alnarp, Sverige (1941).
 11. Journal of The Association of official agricultural Chemists: 22, 497 (1939).
 12. *H. Scharer*: Journal of Milk Technology 1, 35 (1938), citeret efter Gunnar Sjöström (8).
 13. *Aschaffenburg* og *Neave*: Journal of Dairy Research 10, 485 (1939), citeret efter Imperial Bureau of Dairy Science, Technical Communication Nr. 1: The Phosphatase Test for Control of Efficiency of Pasteurization, by *H. D. Kay*, *R. Aschaffenburg* og *F. K. Neave* (Shinfield, near Reading, England).
-

U D D R A G

af Oversigten over hidtil udsendte Beretninger fra Landøkonomisk Forsøgslaboratorium.

C. Beretninger fra Forsøgslaboratoriets kemiske Afdeling.

I. Mejeriforsøg*).

1) Centrifuger m. m.

1883. 1. Ber. a. Kraftforbrug ved Burmeister & Wains lille og de Lavals Centrifuger. b. Skumningsforsøg med de samme Centrifuger. c. Almindelige Bemærkninger om Centrifuger. d. Anvendelse af skummet Mælk til Foder for Kalve og Svin. (Udsolgt).
1883. 2. — a. Fodring af Kalve og Grise med skummet Mælk fra Centrifuge og Bøtter. b. Holdbarhed af centrifugeret og ikke-centrifugeret Mælk. c. Forøgelse af centrifugeret Mælks Holdbarhed ved Opvarmning. (Udsolgt).
1885. 3. — A. Is, Bøtter og Centrifuge. Tandrup, Ravnholt, Lustrupholm og Ladelundgaard. B. Bøtter og forskellige Slags Fade. C. Smørudbytte Morgen og Aften. (Udsolgt).
1910. 70. — Sammenlignende Forsøg med Centrifuger. (2 Kr.).
1910. 71. — Aktieselskabet Titans nye Centrifuge. (50 Øre).

2) Fløde og Smør.

1886. 8. Ber. Afkøling af Smør. (50 Øre).
1890. 18. — Nogle Undersøgelser over Flødens Syrning. (Udsolgt).
1895. 32. — Syrningsforsøg. (50 Øre).
1896. 36. — Undersøgelser over Konsistensfejl hos Smørret samt over Smørrets og Mælkekuglernes Bygning. (Udsolgt).
1901. 48. — Smørudbyttet ved Fremstilling af vasket fersk Smør i Sammenligning med alm. salt Smør samt Forsøg over, hvilken Indflydelse Udluftningen af den søde Mælk har paa Smørrets Finhed og Holdbarhed. (50 Øre).
1905. 57. — Udluftning af Fløde med Ulanders Mælkerenser. Dishrowkærnen. (50 Øre).
1918. 101. — Forsøg med kombinerede Kærner. A. Kærnenes Fyldningsgrad. B. Renkærningstallet. C.¹⁾ (50 Øre).
1919. 102. — Fortsatte Undersøgelser over Fremstillingen af Syrevækkere. (1 Kr.).
1921. 106. — Ostesurt Smør. Den stærke Skylnings Indflydelse paa Smørrets kemiske Sammensætning og Kvalitet. (Udsolgt).
1926. 120. — Kombinerede Kærner: Kærningstemperaturens og Flødefedmens Indflydelse paa Renkærningen m. m. (50 Øre).

*) Ved Forsøgsmejeriets Oprettelse i 1923 overgik de egentlige Mejeriforsøg til dette.

¹⁾ Se III. »Kemiske Undersøgelser«.

3) Ost.

1886. 7. Ber. To Ostestillingsforsøg med Ost af skummet Mælk fra Is- og Centrifugemælkerier. (Udsolgt).
 1907. 61. — A. Forsøg med Ostning af pasteuriseret Mælk. B.¹⁾ (1 Kr.).
 1910. 69. — Forsøg med Paraffinering af Ost. (Udsolgt).
 1914. 86. — A. Ostning af Mælk af forskellig Fedme. B. Ostesagens Udvikling i Danmark. C. Forsøg med »Universalpasteuren«. D. Tabeller over Smørudbyttet af Mælk og Fløde. (50 Øre).
 1919. 103. — A. Ostning af raa, af momentant pasteuriseret og af langtidspasteuriseret Mælk. B. Ostens Svindforhold. C. Dobbeltanalyser. (1 Kr.).

4) Pasteurisering.

1891. 22. Ber. a.²⁾ b. Pasteurisering af sød Mælk og Fløde samt Anvendelse af god Syre som Middel til Bekæmpelse af forskellige Mælke- og Smørfejl. c. Holdbarhedsforsøg med pasteuriseret Mælk. (1 Kr.).
 1895. 35. — Et selvregulerende Pasteuriseringsapparat. (50 Øre).
 1899. 43. — Forsøg med Pasteuriseringsapparater. (1 Kr.).
 1900. 47. — Forsøg med Pasteuriseringsapparater (fortsat). (1 Kr.).
 1910. 71. — Opvarmning af sød Mælk og Fløde til 120 à 130 ° C. (50 Øre).

5) Andre Beretninger.

1887. 9. Ber. Betaling af sød Mælk i Fællesmejerier efter »Forskel i pCt. Fløde« (Differensberegning). (Udsolgt). Tillæg: Tabelværk med Tavle. (Udsolgt).
 1902. 54. — Lysanlæg i Mejerier. (1 Kr.).

II. De sammenhængende Rækker af Smørudstillinger.

1893. 28. Ber. Samlet Beretning om de »sammenhængende Rækker af Smørudstillinger« 1889—1892. (Udsolgt).
 1895. 33. — Anden samlede Beretning om de »sammenhængende Rækker af Smørudstillinger«. (Udsolgt).

III. Kemiske Undersøgelser.

1883. Tillæg til 1. Ber. a) Kemisk Sammensætning af nymalket Mælk og skummet Mælk, Kærnemælk og Valle. b) Vanskelighed med at faa Mælk. c) Mælkenæringsværdi. (Udsolgt).
 1885. 4. Ber. a.²⁾ b. Kemisk Undersøgelse af Mælken fra Køer med Yvertuberkulose. (Udsolgt).
 1885. 6. — Foreløbige Forsøg over Fedmen af og Kontrol med den til Fællesmejerier leverede Mælk. (Udsolgt).
 1895. 31. — Apparater til hurtig Fedtbestemmelse i Mælk (Babcock's, Gerber's og Lindstrøm's). (50 Øre).

¹⁾ Se III. »Kemiske Undersøgelser«.

²⁾ Se D. »Bakteriologiske Spørgsmaal«.

1898. 40. Ber. En kemisk Prøve til at afgøre, om Mælk eller Fløde har været opvarmet til mindst 80 ° C eller ikke. (Udsolgt).
1898. 41. — Sammenlignende Undersøgelser af forskellige Apparaters Anvendelighed til Kontrollering af Mælkens Fedme. (1 Kr.).
1900. 46. — Smørfedtets Lysbrydningsevne, Jodtal og Indhold af flygtige Syrer. (1 Kr.).
1905. 56. — Forskellige Metoder til Fedtbestemmelse i Mælk. Mælkens Renskumning ved forskellig Temperatur. (50 Øre).
1905. 58. — Den kemiske Analyse af Foderstoffer og dens Forhold til Fodringsforsøgene. (2 Kr.).
1907. 61. — A.³⁾ B. Metoder til Fedtbestemmelse i Mælk. (1 Kr.).
1907. 62. — Bestemmelse af Vandindholdet i Smør. (Udsolgt).
1913. 83. — Om Kød- og Benmælfodringens Indflydelse paa Knoglesystemets kemiske Beskaffenhed. (50 Øre).
1918. 101. — A. og B.³⁾ C. Den fedtfri Mælkevædskes Sammensætning. (50 Øre).
1920. 105. — Undersøgelser vedr. Høybergs Metode til Bestemmelse af Fedt i Mælk og Fløde. (50 Øre).
1923. 113. — A. Den danske Komælks gennemsnitlige Sammensætning. B. Bestemmelse af Fedt i Mælk. C. Om Kvælstofbestemmelser. (1 Kr.).
1924. 115. — Ostecontrolsørg. Bestemmelse af Fedt og Tørstof i Ost (Udsolgt).
1924. 116. — Om Gerbers Metode til Bestemmelse af Fedt i Mælk. (Udsolgt).
1925. 118. — Sammensætningen af dansk Smør og nogle Metoder til Undersøgelse af Smørret. (50 Øre).
1934. 155. — Fordøjelighedsforsøg med Malkekøer. I. Nogle Fodermidlers Fordøjelighed bestemt ved Forsøg med Grupper af Malkekøer. II. Om Bestemmelse af Proteinstoffernes Fordøjelighed gennem Dyreforsøg og ved Hjælp af Pepsin-Saltsyre. III. Om Bestemmelse af Fordøjelighed ved Edins saakaldte »Ledkropp«s Metode. (3 Kr.).
1938. 177. — Forsøg med Lupin som Foder til Malkekøer. I., II., IV.⁴⁾ III. Bestemmelse af Alkaloidindholdet i Lupin. (75 Øre).
1944. 208. — Undersøgelser over dansk Smørfedt. (1 Kr.).
1944. 210. — Om Fosfataseprøven. (75 Øre).

³⁾ Se I. »Mejeriforsøg«.

⁴⁾ Se A., I., 1., a. »Forskellige Fodermidler«.