

339. beretning fra forsøgslaboratoriet

Udgivet af Statens Husdyrbrugsudvalg

**En kolorimetrisk metode
for proteinbestemmelse i melk**

**A Colorimetrical Method for Determination
of Protein in Milk**

Av

Arvid E. Haugen



KØBENHAVN

1963

STATENS HUSDYRBRUGSFORSØG

Statens Husdyrbrugsudvalg

Forstander *Johs. Larsen*, Greve, Tåstrup, formand,
gårdejer *S. Grue-Sørensen*, Hjerm,
(valgte af De samvirkende danske Landboforeninger),
konsulent *Henning Rasmussen*, Ringkloster, Hylke,
husmand *Alfred Richardt*, Ll. Torøje, Fakse,
(valgte af De samvirkende danske Husmandsforeninger),
forstander *L. Lauridsen*, Graasten, næstformand,
(valgt af Det kongelige danske Landhusholdningsselskab),
gårdejer *Verner Andersen*, Gundsøllille, Roskilde,
(valgt af Landsudvalget for Svineavlens Ledelse),
parcellist *Olav Rasmussen*, Frøslev, Store Heddinge,
(valgt af Landsudvalget for Fjerkræavl),
forpagter *J. Filipsen*, Holmelund, Korinth,
(valgt af De samvirkende Kvægavlsforeninger med kunstig sædooverføring).
Udvalgets sekretær: Kontorchef, agronom *H. Ærsøe*.

Landøkonomisk Forsøgslaboratorium

Dyrefysiologisk afdeling

Forstander: professor *P. E. Jakobsen*.
Forsøgsleder: cand. polyt. *I. G. Hansen*,
- lic. agro. *Grete Thorbek*.

Husdyrbrugsafdelingerne

Forsøg med kvæg:

Forstander: professor dr. med. vet. *A. Neimann-Sørensen*,
Forsøgsleder: agronom *Johs. Brolund Larsen*,
- agronom *E. O. Nielsen*,
- agronom *Preben E. Andersen*,
- agronom *H. Ejlersen Hansen*.

Forsøg med svin, heste og pelsdyr:

Forstander: professor, dr. *Hj. Clausen*.
Forsøgsleder: agronom *N. J. Højgaard Olsen*,
- agronom *R. Nørtoft Thomsen*,
- dr. agro. *A. Madsen*,
- agronom *Per Jonsson*,
- agronom *H. E. Nielsen*.

Forsøg med fjerkræ:

Forstander: lektor, agronom *J. Bælum*.
Forsøgsleder: agronom *Vagn Pedersen*.

Avlsbiologiske forsøg:

Leder: forsøgsleder, dr. agro. *J. Nielsen*.

Kemisk afdeling

Forstander: cand. polyt. *J. E. Winther*.
Afdelingsleder: ingeniør *H. C. Beck*,
- mejeribrugskandidat *K. Steen*.

Kontor og sekretariat

Kontorchef: agronom *H. Ærsøe*.
Ekspeditionssekretær: agronom *H. Bundgaard*.
Bogholder: Sv. *Vind-Hansen*.

Udvalgets, forsøgslaboratoriets og afdelingernes adresse er:
Rolighedsvej 25, København V.

Tlf. (01) 35 81 00 (omst.).

339. beretning fra forsøgslaboratoriet.

Udgivet af Statens Husdyrbrugsudvalg.

En kolorimetrisk metode for proteinbestemmelse i melk

A Colorimetrical Method for Determination
of Protein in Milk

Av

Arvid E. Haugen



I kommission hos Landhusholdningsselskabets forlag,
Rolighedsvej 26, København V.
Trykt i Frederiksberg Bogtrykkeri

1963

Innholdsfortegnelse.

Forord	3
1. Innledning	5
2. Oversikt over analysemetoden	5
3. Konservering av melk til kolorimetrisk proteinbestemmelse	6
4. Størrelsen av melkeprøvene	6
5. Fortynning af melk med høyt proteininnhold	7
6. Uttaking av melkeprøver	8
7. Fiksering av melkeproteinet til filterpapiret	9
8. Farging av serum- og melkeprotein	12
9. Farging med amidosvart 10 B for kvantitativ proteinbestemmelse i melk	14
10. Kvantitativ måling av fargebindingen	19
11. Analysemetodens sikkerhet som laboratoriemetode for proteinbestemmelse i melk fra enkeltkyr	22
12. Praktisk bruk av analysemetoden ved proteinbestemmelse i melk fra enkeltkyr	28
13. Analysesikkerheten for melk med særlig lavt eller særlig høyt proteininnhold	29
14. Analyse av melk som avviker fra det normale	30
15. Gyldigheten av en regressjonsligning for bestemmelse av proteininnholdet ut fra fargemengden som bindes av melken	35
16. Kontrollanalyser utført etter Kjeldahl	35
17. Kjemikalier og analysevæsker	35
18. Utstyr	36
19. Beskyttelsesforanstaltninger mot metanolforgiftning	44
20. Sammendrag	45
21. Summary	47
22. Litteratur	54
23. Hovedtabeller	56
Beretninger og forsøgsrapporter vedrørende arbejder, hvor den her beskrevne hurtigmetode er omtalt eller har været benyttet	68
Tidligere udsendte beretninger fra forsøgslaboratoriets dyrefysiologiske afdeling	70

Forord.

Formålet med de forsøg, der er beskrevet i denne beretning, har været at udarbejde en hurtigmetode til bestemmelse af protein i mælk. Med udarbejdelse af en sådan metode vil det blive overkommeligt at foretage omfattende undersøgelser over forhold, der kan øve indflydelse på malkekvægets proteinproduktion, hvilket vil være af meget stor betydning på grund af mælkeproteinets særstilling som et meget vigtigt næringsstof i den menneskelige ernæring.

Mælken indhold af protein kan påvirkes ved fodringen, men blot i begrænset omfang. Det er derimod muligt at øge malkekvægets produktion af protein ved i højere grad end hidtil at tage hensyn til denne produktionsegenskab i avlsarbejdet.

Det er min opfattelse, at det ud fra en global betragtning vil være af stor værdi, om der ved det fremtidige avlsarbejde inden for kvægbruget ikke alene tages hensyn til avlsdyrenes anlæg for produktion af mælkefedt, men at anlæg for produktion af mælkeprotein også tages i betragtning, så mulighederne for en øgning af malkekvægets proteinproduktion udnyttes.

Den her omtalte hurtigmetode er gennem de sidste 3 år benyttet ved en række arbejder, der er offentliggjort i de beretninger og forsøgsrapporter, der er anført side 68. Det fremgår heraf, at der er tale om en lang række biologiske undersøgelser af forskellig art.

Metoden, der er udarbejdet af A. E. Haugen, er udmærket anvendelig i praksis, og det er derfor mit håb, at den i fremtiden vil blive benyttet til fremme af malkekvægets proteinproduktion.

København, september 1962.

P. E. Jakobsen.

Arbeidet med denne analysemetode er kommet i stand på initiativ av professor P. E. Jakobsen, København, og er bygget på hans idé. For at jeg har fått overlatt denne idé å arbeide med er jeg professor P. E. Jakobsen stor takk skyldig.

Norges Lantbruksvitenskapelige Forskningsråd har støttet meg økonomisk da jeg ved imøtekommenhet fra professor Johs. Høie hadde permisjon ved Norges Landbrukshøgskole for å bearbeide materialet og skrive denne beretning.

Den lengste tiden jeg har arbeidet med analysemetoden, for det meste ved siden av andre oppdrag ved Dyrefysiologisk Afdeling og ved Afdeling for Forsøg med Svin, har jeg hatt ansettelse ved Landøkonomisk Forsøgslaboratorium.

Under det avsluttende arbeide med utformingen av analysemetoden sommeren 1959 var laboratorieassistent frk. Nancy Heidemark min medarbeider og ytet meg utmerket hjelp.

De vitenskapelige assistenter, agronomene K. Jensen, B. Lund Jensen og M. Sørensen har sørget for uttaking og forsendelse av et stort antall melkeprøver til bruk under uteksperimenteringen av metoden.

Tegning av kurver etc. er utført av tegneren Poul H. Winther, København.

Konsulent Arve Johannessen, Oslo, har gitt verdifulle råd med hensyn til språket og har hjulpet meg med korrekturen.

Uten her å kunne nevne alle som har vist meg vennlig imøtekommenhet under mitt arbeide, vil jeg likevel få nevne nå avdøde forsøgsleder K. Hansen ved Afdeling for Kvægforsøg, som jeg en tid hadde den glede å samarbeide med og som jeg står i stor takknemlighetsgjeld til for vennlighet og støtte.

Statens Husdyrbrugsudvalg har velvilligst gitt tillatelse til at dette arbeide offentliggjøres som beretning fra Landøkonomisk Forsøgslaboratorium og alle utgifter til medhjelp, kjemikalier, utstyr og trykning er dekket av denne institusjon.

Jeg retter en hjertelig takk til alle, både enkeltpersoner og institusjoner i Danmark og Norge som har ytet meg hjelp og støtte.

Vollebekk i september 1962.

Arvid E. Haugen.

1. Innledning.

Den analysemetode som skal omtales i det følgende, er en kolorimetrisk mikrometode. Melkeprøvene blir sendt fra gårdene til analyselaboratoriet i tørr tilstand, oppsugd i filtrerpapir. Derved unngår en forsendelse av prøveflasker. Analysemetoden bygger forøvrig på at melkeproteinet på grunn av proteinstoffenes amfolyttiske karakter vil binde seg med anionaktive fargestoffer i et medium av passende surhetsgrad.

Ved valg av fargestoff var det en rekke alternativer, men da amidosvart 10 B lot til å være velegnet, ble analysemetoden utformet for bruk av dette fargestoff.

Arbeidet med uteksperimenteringen av analysemetoden og dens tilpassning til bruk ved rutineanalyser i større målestokk, er utført på Forsøgslaboratoriets Dyrefysiologiske Laboratorium.

I forbindelse med bearbeidingen av materialet, som fant sted etter at forfatteren ble ansatt ved Norges Landbrukshøgskole, er det ytterligere utført noen supplerende analyser. Ved velvillig imøtekommenhet har jeg fått sende melkeprøver oppsugd i filtrerpapir til Forsøgslaboratoriets Dyrefysiologiske Laboratorium, hvor de er farget og målt. Det vesentligste av arbeidet er utført av laboratorieassistent fru Cornelia Banyai.

For supplerende analyser, som det var mest praktisk å utføre på stedet (Nest siste avsnitt side 12 og tabell 5 og 6), har professor Peter Solberg vært så vennlig å stille til disposisjon arbeidsplass på Meieriinstituttets avdeling for kjemi og bakteriologi ved Norges Landbrukshøgskole.

Analysemetoden er tidligere kort beskrevet, *Haugen* (1959, 1961a og 1961b).

2. Oversikt over analysemetoden.

- a. Melkeprøver på 1/20 ml avsettes på filtrerpapirstrimler, festet på stativ. Det avsettes 2 prøver for hver ku. Det er plass til prøver fra 7 kyr på en 415 mm lang og 40 mm bred filtrerpapirstrimmel.
- b. Prøvene tørkes og kan deretter legges i konvolutt og sendes som et vanlig brev.
- c. Proteinet fikseres til filtrerpapiret ved nedsenking 15 minutter i en oppløsning av 1 % sublimat i etanol og deretter 5 minutter i en oppløsning av 1 $\frac{0}{00}$ sublimat i etanol.
- d. Prøvene tørkes ved hjelp av varmluftsvifte ved 30–40 °C.
- e. Farging 30 minutter i en oppløsning av 70 g amidosvart 10 B i 5.70 l metanol, 4.50 l vann og 1.00 l iseddiksyre.

- f. Utvasking umiddelbart etter fargingen i 4 trin, henholdsvis $\frac{1}{2}$, 30, 45 og 45 minutter i en blanding av 5.70 l metanol. 4.50 l vann og 1.00 l iseddiksyre.
- g. Tørking ved hjelp av varmluftsvifte.
- h. Innen stativet med prøvene flyttes fra et denaturerings-, fargings- eller utvaskingsbad, holdes stativet over badet for avdrysning ca. $\frac{1}{2}$ minutt.
- i. Filtrerpapirstrimlene klippes over mellom melkeprøvene og de enkelte prøver legges på glass som påfylles 100 ml elueringsvæske. Elueringsvæsken består av 5.7 l metanol, 4.7 l vann og 150 g vannfritt natriumkarbonat. Elueringstid 20 timer. Glassene lukkes med propp for å hindre fordamping.
- j. Fargestyrken i eluatet måles fotometrisk. Maksimal lysabsorpsjon ved 627.5 nm (m_{μ})¹.
- k. Proteininnholdet i melken bestemmes ut fra den målte optiske tetthet i eluatet, ekstinksjonen²), ved hjelp av omregningstabell utarbeidet på grunnlag av parallellanalyser etter kjeldahlmetoden og den kolorimetriske metode.
- l. Etter trinn b og g er prøvene lagringsdyktige.

3. Konservering av melk til kolorimetrisk proteinbestemmelse.

I visse tilfelle, som når det gjelder kontroll av analysearbeidet, kan det være nødvendig at flasker med melk sendes til laboratoriet.

For å unngå at melkeprøvene blir sure, må de tilsettes et konserveringsmiddel. Kaliumbikromat, som er vanlig brukt til konservering av melkeprøver til fettbestemmelse, ser ut til å virke inn på melkeproteinets evne til å binde farge.

Sublimat er brukt av *Steinsholt* (1957) til konservering av melkeprøver uten at proteinets fargebindingsevne er påviselig forandret.

Til konservering av kontrollprøver på 50–70 ml har en brukt 3 dråper mett, vandig oppløsning av sublimat. Denne konservering er ikke effektiv for lengre tids lagring av melkeprøvene, men en har ønsket å holde den tilsatte mengde av dette meget giftige konserveringsmiddel så langt nede som mulig.

4. Størrelsen av melkeprøvene.

Den mengde melk som kan absorberes i et lite område av et filtrerpapir, er sterkt begrenset og dette setter en øvre grense for størrelsen av melkeprøvene. På den annen side vil det være vanskelig å avmåle et meget lite kvantum melk tilstrekkelig nøyaktig. Ved bruk av tykt filtrerpapir oppnår en å få en større melkeprøve absorbert, men dette har ikke økt analysesikkerhe-

¹) $1 \text{ nm} = 10 \div 9 \text{ m}$.

²) Ekstinksjonen er den negative logaritme til prosent lystransmisjon.

ten. For melkeprøver på $\frac{1}{10}$ ml eller mer, har analysesikkerheten knapt vært så god som ved en prøvestørrelse på $\frac{1}{20}$ ml. Det er derfor valgt å arbeide med en prøvestørrelse på $\frac{1}{20}$ ml ved den kolorimetriske proteinanalyse.

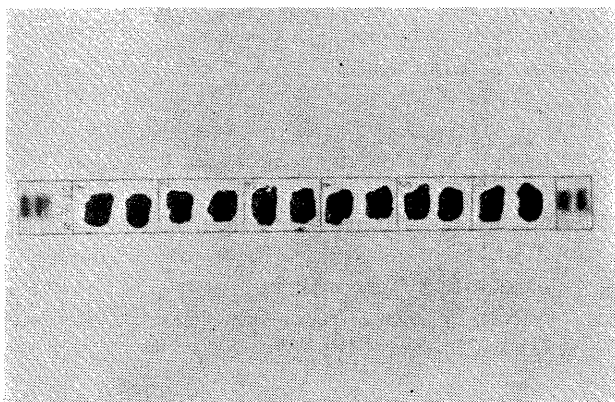


Fig. 1. Farget filtrerpapirstrimmel. Melkeprøver fra 6. kyr.
Stained strip of filter paper. Milk samples from 6 cows.

For at konsentrasjonen pr. arealenhet filtrerpapir ikke skal bli unødig stor og for å oppnå fullstendig absorpsjon av melkeprøven i filtrerpapiret, er det nødvendig å fordele prøven over et areal på 3–4 cm² (Fig. 1). Blir ikke hele melkeprøven absorbert i filtrerpapiret, men blir liggende å tørke ovenpå dette, kan i verste fall deler av prøven falle av filtrerpapiret under analysearbeidet. For alminnelig gjennomsnittsmelk spiller dette forhold liten rolle, men kan være årsak til analysefeil når en arbeider med særlig tørrstoffrik melk.

5. Fortynning av melk med høyt proteininnhold.

Som nevnt side 13, er analysemetoden ikke sikker når proteininnholdet i prøvene er høyere enn ca. 6 %. Melkeprøver som en venter vil ha særlig høyt proteininnhold, må derfor fortynnes før prøvene avsettes på filtrerpapiret. Et fortynningsforhold på 1 volum vann : 1 volum melk er brukt for vanlig kumelk med høyt proteininnhold. En slik blanding av melk og vann vil ha lavere spesifikk vekt enn ufortynnet melk med tilsvarende proteininnhold, men dette vil bli oppveid av at en blanding av like volum melk og vann vil inneholde litt over 50 vekt% melk. Analysefeil p.g.a. fortynningen vil således være uten betydning når avmålingen av melk og vann utføres nøyaktig.

Analyse av kolostrummelk ser ut til å gi mest tilfredsstillende resultat når melken fortynnes med 2 deler vann.

Ved arbeidet med fortynnet melk har det p.g.a. konstantleddet i regresjonsligningen (side 27), vært nødvendig først å slå opp i tabellen og finne proteinprosenten i fortynningen og deretter foreta den nødvendige omregning.

6. Uttaking av melkeprøver.

Behandlingen av melken før avmåling.

Melkeprøvene avmåles ved ca. 20° C. Før prøvene tas ut, må fløte og melk være fullstendig blandet. Har melken stått en tid, vil det ofte være nødvendig å varme den opp for å få melk og fløte blandet. Maksimumstemperaturen er satt til 40° C, samme temperatur som benyttes ved fettbestemmelse i melk etter Gerber.

I løpet av den tid det tar å få oppvarmet melk avkjølt igjen, vil det stige fløte opp til overflaten. Hver enkelt prøveflaske må derfor vendes opp ned et par ganger umiddelbart før prøven tas ut.

Luftblærer i melken vil sjenere prøvetakingen og en bør derfor unngå kraftig rysting av prøveflaskene.

Utstyr til avmåling af melkeprøvene.

Ved de orienterende undersøkelsene ble det benyttet sprøyte til avmåling av melken. En var imidlertid utsatt for at sprøytenålen ble tilstoppet av slike fremmedlegemer som kan forekomme i melk.

En gikk så over til å bruke $1/20$ ml konstriksjonspipette, carlsbergpipette, Glick (1949). Denne type viste seg velegnet, selv om en heller ikke nå helt unngikk vanskeligheter med tilstopping. Det ble også tidlig på det rene at ved bruk av meget tynnveggede pipetter, ville faren for brekkasje være stor når arbeidet foregikk ute på gårdene. I mange tilfeller var det også umulig å se at et mindre stykke av pipettespissen manglet, noe som førte til feil ved avmålingen av melkeprøvene. Ved bruk av carlsbergpipetter med kraftigere konstruksjon har en imidlertid vært lite sjenert av slike vanskeligheter.

Kapillarpipette har også vært forsøkt. Denne pipettetype er mer robust enn carlsbergpipetten og det har ikke vært vanskeligheter p.g.a. tilstopping. Kapillarpipetten ble prøvet av øvet personale under gode laboratorieforhold og gav da noe dårligere avmålingsnøyaktighet enn carlsbergpipetten.

Ved det videre arbeide med analysemetoden er det derfor brukt carlsbergpipette.

Avmåling av melkeprøvene.

Under det arbeide som ligger til grunn for denne beretning, har fremgangsmåten ved avmålingen av melkeprøvene vært følgende:

Melken suges opp til den står et par mm over innsnevringen på carlsbergpipetten. I løpet av den tid det deretter tar å løfte pipetten fra prøveflasken, vil melkesøylen falle til en ubetydelighet over nivåstreken på pipetten.

Pipetten tørres ren for melk utvendig ved at en plastsvamp klemmes forsiktig sammen om pipetten og trekkes hurtig henover denne.

Etter avtørringen kontrolleres det at det ikke er luftblærer i melken.

Fininnstillingen av melkesøylen i pipetten foregår ved at en lar pipettespissen forsiktig berøre hånden. Særlig ved arbeide med tørrstoffrik melk har denne metode for fininnstilling gitt nøyaktigere avmåling enn når over-skuddsmelk i pipetten fjernes ved å blåses ut.

Når melken skal overføres til filtrerpapiret, lar en pipettespissen hvile loddrett på filtrerpapiret og melken blåses ut mens en lar pipetten gli langsomt henover filtrerpapiret. Når den siste melken blåses ut av pipetten, bør denne trekkes henover tørt papir for å unngå at små melkedråper blir blåst utover og at noe av melken på grunn av kapillarvirkning suges tilbake i pipetten. For å oppnå fullstendig tømning av pipetten, må melken blåses ut med jevnt, ikke for kraftig trykk.

Etter applikeringen strykes pipettespissen på to sider mot kanten av filtrerpapiret for at melk som p.g.a. adhesjon kan være trukket opp utenpå pipetten under applikeringen skal komme med i analysen. De fargede prikker langs kanten av filtrerpapirstrimlene illustrerer dette (Fig. 1).

Det bør være en avstand mellom de enkelte melkeprøver på ca. 1 cm.

Under den fortsatte praktiske bruk av analysemetoden ved Dyrefysiologisk Laboratorium blir melkesøylen innstilt ved å la pipettespissen forsiktig berøre den innvendige side av prøveflasken, hvorefter pipetten tørres av utvendig og melkeprøven avsettes på filtrerpapiret, *Jakobsen* (1962).

Tørking, oppbevaring og forsendelse av filtrerpapir med melkeprøver.

Filtrerpapir med melkeprøver vil være tørre få timer etter at prøvene er avsatt når de står ved værelsetemperatur. Ved bruk av varmluftsvifte med arbeidstemperatur på 30–40° C, vil prøvene være tørre i løpet av en times tid. Maksimumtemperaturen er satt så lavt som 40° C for å være sikret mot mulige analysefeil på grunn av oppvarming av melken.

Tørre prøver kan oppbevares i flere måneder (Tabell 1 og Hovedtabell III) og filtrerpapirstrimlene med prøvene kan brettes sammen og sendes i vanlig konvolutt. For å være sikret mot at noe av melkeprøvene skal bli overført fra ett filtrerpapir til et annet ved påvirkning av fuktighet under forsendelsen, er filtrerpapirene blitt lagt enkeltvis i pergamylomslag.

Under tørking og lagring må filtrerpapirstrimlene beskyttes mot fluer, da flueekskremer vil binde amidosvart og derved føre til for høye analysetall.

7. Fiksering av melkeproteinet til filtrerpapiret.

Grassmann og *Hannig* (1952) fikserte serumprotein til elektroforetogrammer ved oppvarming til 100° C i 30 minutter og *Schneider* (1951) og *Jakobsen* (1957) benyttet sublimat i etanol til fikseringen. For melkeprøver

Tabell 1. Melkeprøver oppbevart henholdsvis farget og ufarget.

<i>Storage of stained and unstained milk samples.</i>											
Oppbevart ufarget, dager	36	90		35	89		29	83		28	82
<i>Storage of unstained samples, days</i>											
Oppbevart farget, dager	54	2		54	2		54	2		54	2
<i>Storage of stained samples, days</i>											
Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ku nr.	Ekst.	Ekst.
9	.345	.349	17	.352	.351	34	.298	.296	36	.256	.250
10	.361	.369	34	.313	.312	36	.260	.260	38	.281	.271
J 55	.315	.317	37	.271	.269	38	.281	.276	J 55	.329	.330
J 56	.337	.337	38	.291	.290	J 55	.321	.319	69	.278	.270
J 57	.309	.309	J 57	.305	.304	J 58	.402	.411	75	.391	.388
84	.302	.300	J 58	.382	.389	69	.273	.270	84	.289	.286
98	.300	.300	70	.261	.259	70	.238	.235	211	.261	.256
189	.278	.274	269	.269	.269	84	.279	.273	281	.315	.310
199	.255	.249	337	.339	.342	331	.369	.371	331	.365	.361
336	.365	.370	342	.369	.363	337	.342	.344	337	.344	.348
Middel	.317	.317		.315	.315		.306	.306		.311	.307

De anførte ekstinksjoner er middel av 3 parallellanalyser.

fikk en ikke reproducerbare resultater ved å bruke Grassmann og Hannigs metode, noe som kan bero på at fikseringen ikke var fullstendig. En undersøkelse av Lewin og Hillon (1956) tyder på at de frie basiske proteingrupper i blodserum ikke blir blokkert av enkle kvikksølvforbindelser. Ved egne undersøkelser tyder analysesikkerheten på at sublimat er velegnet til fiksering av melkeprotein til filtrerpapir (Fig. 5 og 6).

Tabell 2. Denaturering med HgCl_2 i etanol.

<i>Denaturation by HgCl_2 in ethanol.</i>			
% HgCl_2	0.6	1.0	2.5
Prøve nr.	Ekst.	Ekst.	Ekst.
1	.299	.299	.300
2	.312	.314	.311
3	.319	.319	.323
4	.329	.329	.331
5	.350	.352	.353
6	.424	.419	.427
7	.440	.441	.445
8	.498	.497	.500
Middel	.371	.371	.374

De anførte ekstinksjoner er middel av 3 parallellanalyser.

En undersøkelse har vist at melkeprøver denaturert med 2.5 % sublimat i etanol bandt ca. 1 % mer amidosvart enn prøver som var denaturert i en oppløsning av 0.6 eller 1 % sublimat (Tabell 2). For å unngå for stor tilblanding av sublimat i fargen, valgte en imidlertid å benytte følgende fremgangsmåte ved fikseringen: De lufttørre filtrerpapirstimler holdes først nedsenket 15 minutter i en oppløsning av ca. 1 % sublimat i etanol, så 5 minutter i en oppløsning av ca. 1 % sublimat i etanol og tørkes deretter ved værelsetemperatur eller ved hjelp av varmluftsvifte.

Tørketemperaturen har vært holdt under 40° C.

Foruten at en ved denatureringen får fiksert proteinet til filtrerpapiret, vil denatureringsvæsken trekke ut en betydelig del av melkefettet og derved gjøre det lettere for fargeoppløsningen å trenge inn i prøvene.

Det ble ikke funnet noen forskjell på analyseresultatene enten en brukte 90 % eller absolutt etanol, men fordi denatureringsvæskene opptar vann både fra filtrerpapirene og fra atmosfæren, valgte en å bruke absolutt etanol for at denatureringsvæskene kunne brukes lenger, uten at vanninnholdet ble av betydning. Fettet som trekkes ut av melkeprøvene, vil også forurense denatureringsvæsken.

Når væsken med ca. 1 % sublimat er brukt 50 ganger blir den skiftet ut med væsken med 1 % sublimat som tilsettes 1 % sublimat. Det blandes ny denatureringsvæske med 1 % sublimat. Ved denne fremgangsmåte er forbruket av denatureringsvæske ca. 1 ml pr. melkeprøve.

For at flere prøver kan behandles samtidig, blir filtrerpapirene før dena-

tureringen spennt opp på rammer med plass til 4 papirer og rammene samles i et stativ for 10 rammer (Fig. 11).

8. Farging av serum- og melkeprotein.

Vanlig brukte fargestoffer.

Forskjellige kation- og anionaktive fargestoffers evne til å binde seg til protein er blitt utnyttet til kvantitativ proteinanalyse i forbindelse med papirelektroforese. De mest brukte fargestoffer er amidosvart 10 B, bromfenolblått, azocarmin, *Wunderly* (1953) og bromcresolgrønt, *Franglen* (1953).

Til kvantitativ proteinanalyse av melk ved felling av proteinet med fargestoff har *Moustgaard* og *Neimann-Sørensen* (1959) og *Ashworth, Seales* og *Erb* (1960) brukt orange G. Det mest brukte fargestoff er imidlertid amidosvart 10 B, *Steinsholt, Døvle* og *Solberg* (1960), *Posthumus* (1960) og *Raadsveld* (1961).

Forskjellige fargestoffers affinitet til protein.

Stor affinitet mellom farge og protein er fordelaktig, både fordi fargebindingen til selve filterpapiret blir av mindre betydning som feilkilde, og fordi det oppnås stor forskjell i ekstinksjonsverdi mellom prøver med forskjellig proteininnhold – selv om det brukes et forholdsvis stort kvantum elueringsvæske for å minske avmålingsfeilen på denne.

Pezold og *Peiser* (1953) har ikke funnet noen vesentlig forskjell mellom amidosvart 10 B og bromfenolblått når det gjelder den mengde farge som bindes til protein, mens de har funnet at det bindes atskillig mindre av azocarmin enn av ovennevnte fargestoffer.

Grassmann og *Hannig* (1954) har ved direkte fotometri, hvor en ikke sjeneres av den destruksjon av fargestoff som enkelte elueringsvæsker kan forårsake, funnet at amidosvart 10 B bindes i større mengde til protein enn både bromfenolblått og azocarmin.

Ved de ovenfor nevnte undersøkelser er forskjellige kvanta oppløsning av blodserumprotein avsatt på filterpapirstrimler, som så er farget på samme måte som elektroforetogrammer.

Sommerfelt (1953) har i forbindelse med papirelektroforese funnet at blodserumprotein farges sterkere av amidosvart 10 B enn av bromfenolblått.

Ved egne undersøkelser med melkeprøver er det funnet at bromcresolgrønt gir større optisk tetthet i eluatet enn amidosvart 10 B. En har da benyttet samme teknikk som *Franglen* og *Martin* (1954) har angitt for farging av elektroforetogrammer med unntak av at en har denaturert proteinet med sublimat og at både fargings- og elueringstiden er forlenget til 5 timer. For prøver med høyere proteininnhold enn 5 % er det imidlertid ikke funnet rettlinjert proporsjonalitet mellom proteininnholdet og ekstinksjonen i eluatet.

Sammenhengen mellom ekstinksjon ved farging med amidosvart 10 B og prosent kjeldahlprotein er undersøkt for melkeprøver med proteininnhold

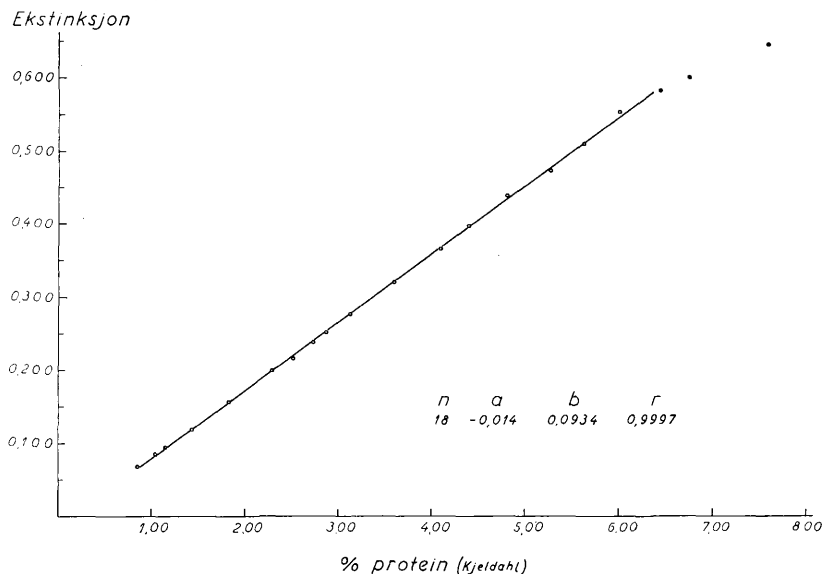


Fig. 2. Sammenhengen mellom prosent kjeldahl-protein og mengde amidosvart bundet til $\frac{1}{20}$ ml skummetmelk uttrykt ved ekstinksjonen.

The correlation between percentage of Kjeldahl-protein and the amount of Amido black combined with $\frac{1}{20}$ ml milk expressed as extinction.

fra ca. 0.9 % til ca. 7.6 %. Det er funnet rettlinjet proporsjonalitet opp til et proteininnhold på ca. 6 % (Fig. 2). Ved undersøkelsen er det benyttet skummet melk med ca. 3.1 % protein. For å skaffe prøver med lavere proteininnhold, er melken fortynnet med vann og for å skaffe prøver med høyere proteininnhold, er melken kondensert ved et undertrykk på ca. 70 cm kvikksølv. Det er brukt skummet melk med henblikk på å unngå at eventuelle smørklumper i den kondenserte melken skulle sjenere pipetteringen.

Proteinets fargebindingsevne.

Grassmann og Hannig (1952 og 1954), Pezold og Peiser (1953) og Franglen og Martin (1954) har påvist at det både bindes ulike mengder farge pr. enhet serumalbumin og serumglobulin og pr. enhet av de forskjellige serumglobuliner. Guillien og Hermann (1955), Simon (1957) og Heide og Biel (1958) har funnet at proteinkonsentrasjonen i enkelte partier av et elektroforetogram kan bli så stor at fargebindingen ikke lenger er kvantitativ og at dette forhold kan føre til at albumininnholdet blir bestemt for lavt i forbindelse med elektroforese av blodserum.

De undersøkelser som er utført av førstnevnte forfattere tyder på at farging med amidosvart 10 B gir den prosentvis minste forskjell i registrert fargebinding pr. enhet av de forskjellige serumproteiner. En kan ikke se

bort fra at amidosvart 10 B byr på denne fordel også ved farging av melkeprotein.

Det har ikke vært mulig å undersøke de forskjellige melkeproteiners evne til å binde ulike fargestoffer på grunn av vanskeligheter med å skaffe rene melkeproteiner som er så skånsomt behandlet at en undersøkelse umiddelbart ville ha gyldighet for frisk melk.

9. Farging med amidosvart 10 B for kvantitativ proteinbestemmelse i melk.

Fargeoppløsningens sammensetning.

Grassmann og *Hannig* (1952) brukte ufortynnet metanol med 10 volum% iseddiksyre til fargings- og utvaskingsbad for elektroforetogrammer. 50 % metanol tilsatt 10 % iseddiksyre har også vært brukt ved farging med amidosvart 10 B, *LKB* (1956).

Følgende fargebad er brukt ved den kolorimetrisk proteinanalyse i melk: 5.70 l metanol, 4.50 l vann, 1.00 l iseddiksyre, 70 g amidosvart 10 B.

pH i fargeoppløsningen og gjentatt bruk av samme fargeoppløsning.

Schober og *Hetzel* (1956) har ved proteinbestemmelse i melk med amidosvart etter fellingsmetoden funnet at fargebindingen avtar ganske betydelig når pH verdien i fargeoppløsningen stiger fra 2.2 til 3.5. Ved høyere pH enn 3.5 har de ikke funnet reproducerbare proteinverdier.

Når en farger melkeprøver oppsugd i filterpapir med amidosvart, stiger pH verdien i fargeoppløsningen ved gjentatt bruk av denne. Det ser imidlertid ikke ut til at en stigning i pH verdien i fargebadet fra ca. 2.9 i nyblandet oppløsning til ca. 3.6 etter 3 måneders bruk har påvirket analyseresultatet (Tabell 3). Grunnen til dette kan være at fargebadet ikke inneholder oppløste stoffer som reagerer med melkeprotein i konkurranse med fargestoffet.

Under det kontinuerlige arbeide med proteinanalysene er fargebadet skiftet ut etter å være brukt ca. 100 ganger. Forbruket av fargeoppløsning er ca. 0.5 ml pr. prøve.

Tabell 3. Proteinprosenten bestemt kolorimetrisk ved stigende pH i fargebadet sammenholdt med % kjeldahlprotein. 26/5: pH 2.9, 21/8: pH 3.6.

Percentage of protein determined colorimetrically at increasing pH in dye solution as compared with percentage of Kjeldahl-protein. May 26th: pH 2.9.

Aug. 21st: pH 3.6.

Analysedato	26/5	28/5	2/6	9/6	16/6	11/8	12/8	13/8	14/8	18/8	19/8	20/8	21/8
% prot. kolorim. . .	3.54	3.52	3.36	3.62	3.63	3.38	3.47	3.14	3.17	3.55	3.54	3.51	3.51
% » Kjeldahl . .	3.53	3.48	3.31	3.57	3.53	3.44	3.49	3.22	3.22	3.58	3.58	3.54	3.47

De anførte proteinprosent er middel av 8–10 melkeprøver.

Tabell 4. Fargingstidens innflytelse på fargebindingen.

Influence of duration of staining process on amount of stain combined with milk protein.

Farget Stained		10 min.	20 min.		30 min.		40 min.		50 min.	
Se- rie	Prøve nr.	a Ekst.	b Ekst.	Farge- binding % av a	c Ekst.	Farge- binding % av a	d Ekst.	Farge- binding % av a	e Ekst.	Farge- binding % av a
1	1	.322	.333	103.4	.337	104.7	.338	105.0	.339	105.3
	2	.276	.284	102.9	.285	103.3	.286	103.6	.288	104.3
	3	.319	.336	105.3	.338	106.0	.340	106.6	.342	107.2
	4	.280	.289	103.2	.291	103.9	.294	105.0	.293	104.6
Middel		.299	.311	104.0	.313	104.7	.315	105.4	.316	105.7
2	1	.281	.285	101.4	.289	102.8				
	2	.258	.259	100.4	.262	101.6				
	3	.232	.233	100.4	.236	101.3				
	4	.327	.338	103.4	.340	104.0				
Middel		.275	.279	101.5	.282	102.5				

De anførte ekstinksjoner er middel av 12 parallellanalyser.

Oppspenning av filtrerpapirene.

Før fargingen må det kontrolleres at filtrerpapirene er spent stramt opp på rammene, slik at de ikke berører hverandre. Kleber filtrerpapirene sammen under fargingsprosessen, vil bindingen av farge til melkeprøvene bli nedsatt.

Fargingstiden.

En fargingstid på 10 minutter er benyttet for elektroforetogrammer av *Grassmann* og *Hannig* (1952). Ved proteinbestemmelse i melk vil stoffkonsentrasjonen i filtrerpapiret være så stor at en forlengelse av fargingstiden er nødvendig for at den maksimale mengde farge skal bli bundet til proteinet.

Det er forsøkt med fargingstider fra 10 til 50 minutter (Tabell 4). Innenfor dette tidsintervall stiger fargebindingen med fargingstiden, men den største stigning, 3–4 %, er funnet ved en økning av fargingstiden fra 10 til 20 minutter. Stigningen i fargebindingen ved en ytterligere økning av fargingstiden fra 20 til 30 minutter er ca. 1 %, og endda ca. 1 % ved økning fra 30 til 50 minutter.

Undersøkelsen tyder også på at økningen i fargebinding ved forlengelse av fargingstiden er størst for prøver med høyt proteininnhold. Dette bekreftes av en mer omfattende undersøkelse, hvor det er funnet at regressjonslinjen for ekstinksjon på prosent kjeldahlprotein er steilere ved farging i 30 minutter enn ved farging i 10 minutter (Fig. 3, regressjonslinje 1 og 2). Undersøkelsen bekrefter videre at regressjonslinjen ligger høyere ved farging i 30 minutter enn ved farging i 10 minutter.

Det er valgt å benytte en fargingstid på 30 minutter ved det videre arbeid.

Utvasking.

Etter fargingen må fargen vaskes ut av den del av filtrerpapiret hvor det ikke er avsatt melk. Utvasking med metanol tilsatt 10 % iseddiksyre gir liten utvasking av den fargen som er bundet til proteinet, men forbruket av metanol vil være relativt stort. *Drevon* (1954) har utarbeidet en ekstraksjonsmetode for elektroforetogrammer som gjør det mulig å nedsette væskeforbruket betydelig. Metoden krever imidlertid ekstra håndtering av filtrerpapirene og er derfor ikke prøvd i forbindelse med proteinanalyse i melk, da det er lagt vekt på å gjøre analysemetoden lite arbeidskrevende. Ved å erstatte en del av metanolen i vaskevæsken med vann, kan kjemikalieutgiftene settes ned, men utvaskingen av proteinbundet farge blir større. For å oppnå reproducerbare analyseresultater må derfor utvaskingstiden overholdes meget nøye når det brukes vannholdig væske. Dessuten økes kravet til nøyaktig avmåling av de enkelte ingredienser i væsken. Det forhold mellom metanol og vann en velger å bruke har, i alle fall når vanninnholdet ikke

overstiger 50–60 %, ikke sett ut til å påvirke analysenes reproducerbarhet når bare blandingsforholdet holdes konstant.

For å gjøre analysemetoden så billig som mulig, er det benyttet 50 % metanol tilsatt 10 % iseddiksyre til utvaskingen.

Etter at fargingen er avsluttet holdes stativet med filtrerpapirene over fargekaret til avdrypping $\frac{1}{2}$ minutt, hvorefter utvaskingen foretas som angitt på fig. 12 i fire bad. Først $\frac{1}{2}$ minutt i bad I under stadig heving og senking av stativet. Deretter 30 minutter i bad II og så 45 minutter i hvert av badene III og IV. Det har vist seg overflødig å holde stativet i bevegelse under utvaskingen i badene II, III og IV. Innen prøvene flyttes fra ett bad over i et annet holdes stativet en kort stund over badet for at det meste av vaskevæsken kan renne av. Væsken fra bad I og II helles ut etter bruk, mens væsken fra bad III og IV kan brukes til neste analyseserie som henholdsvis bad I og II etter at nødvendig etterfylling av væske er foretatt.

For å få fjernet all overflødig farge fra stativ etc. må væsken i de fire utvaskingsbadene stå litt høyere enn væsken i fargebadet og stå helt over klemmene som holder filtrerpapirene. For å holde kvantum væske pr. filtrerpapir konstant, er karene innvendig utstyrt med et nivåmerke. Når væsken fra de to siste utvaskingsbad brukes om, har forbruket av vaskevæske vært ca. 70 ml pr. enkelt-prøve ved 12 prøver pr. filtrerpapir og ca. 60 ml ved 14 prøver pr. filtrerpapir.

Straks prøvene er flyttet over i bad II, må filtrerpapirstrimlene, som utvider seg i væsken, strammes på rammene slik at de ikke berører hverandre. Strammingen foregår ved at papirholderne dreies ca. 30° . Avstanden mellom filtrerpapirene er 18 mm. Ved å øke avstanden mellom rammene, ville en slik stramming av filtrerpapirene være overflødig, men ved en økning av avstanden vil også forbruket av vaskevæske øke.

Etter utvaskingen blir prøvene tørket ved hjelp av varmluftsvifte. Tørketemperaturen har vært holdt under 40°C for å unngå varmedestruksjon av fargestoffet. Heller ikke under tørkingen må filtrerpapirene berøre hverandre.

For å motvirke at analyseresultatene blir påvirket av den mengde fargeoppløsning som blir ført med stativ og rammer over i 1. utvaskingsbad, er vasketiden i dette gjort kort, men likevel lang nok til at stativ og rammer blir grundig skyllet og en del fargeoppløsning fjernet fra filtrerpapirstrimlene.

En sammenligning er gjort mellom den fargemengde som fortsatt er bundet til proteinet etter endt utvasking når trinn 1 i utvaskingen er sløyfet (Fig. 3, regressjonslinje 2), og når dette trinn er med (Fig. 3, regressjonslinje 3).

Undersøkelsen viser at det er ca. 3 pct. mindre farge tilbake i proteinet etter en utvasking i 4, enn etter en utvasking i 3 trinn. Dette må antas vesentlig å bero på en lavere fargekonsentrasjon i de følgende utvaskingsbad når trinn 1 tas med.

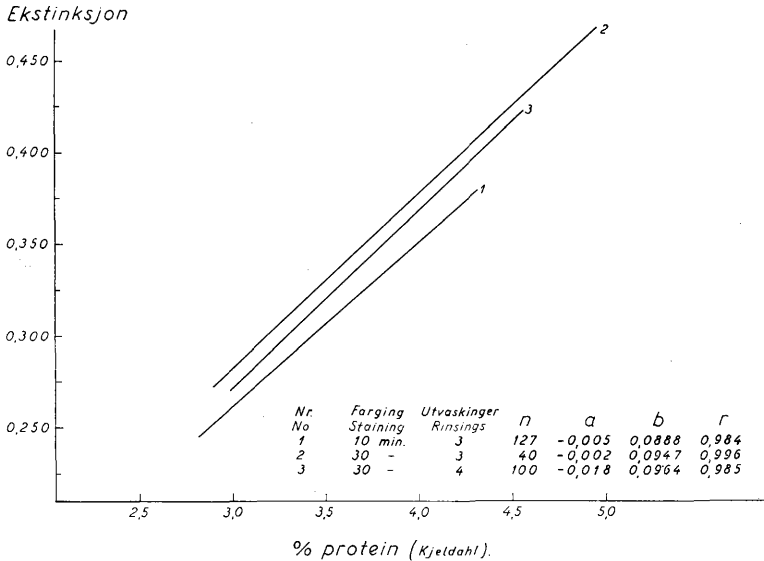


Fig. 3. Sammenhengen mellom prosent kjeldahl-protein og mengde amidosvart bundet til $\frac{1}{20}$ ml melk ved forskjellig fargingstid og forskjellig antall utvaskinger uttrykt ved ekstinksjonen.

The correlation between percentage of Kjeldahl-protein and the amount of Amido black combined with $\frac{1}{20}$ ml milk at different lengths of the staining process and different numbers of rinsings expressed as extinction.

Regressjonslinje 2 er omtrent parallell med linje 3 (Fig. 3). Dette tyder på at forskjellen mellom den mengde farge som utvaskes fra proteinet ved de to fremgangsmåter er omtrent den samme enten proteininnholdet i melkeprøvene er høyt eller lavt.

Fargekonsentrasjonen i vaskevæsken påvirkes av antall filterpapir som utvaskes i en gitt mengde væske. Derfor må antall filterpapir pr. analyse-serie holdes konstant. Ledige plasser i stativet kan fylles ut med filterpapir uten melkeprøver, da undersøkelser har vist at analyseresultatene ikke påvirkes av antall melkeprøver pr. analyseserie når bare arealet av filterpapir holdes konstant, idet den mengde farge som avgis fra melkeproteinet er svært liten.

Restfarge i filterpapiret.

De deler av filterpapiret hvor det ikke er avsatt melk blir ikke fullstendig avfarget i løpet av de 2 timer utvaskingen varer. Den fargemengde som blir tilbake er imidlertid helt ubetydelig idet det dreier seg om en ekstinksjonsverdi på ca. 0.0003 pr. cm^2 filterpapir. Dette tilsvarer ca. 0.003 pct. protein. Analysefeil p.g.a. variasjoner i fargebindingen til papiret eller på grunn av ulik størrelse av de filterpapirstykker som bærer prøvene, vil således være uten betydning.

Oppbevaring av fargede melkeprøver.

Undersøkelser tyder på at fargede prøver holder seg uforandret i lang tid når de oppbevares tørt og mørkt. Det er ikke påvist sikker forskjell mellom prøver som er oppbevart farget i 2 dager og i 8 uker. (Tabell 1).

10. Kvantitativ måling av fargebindingen.

Direkte fotometri.

Blandt andre har *Grassmann og Hannig* (1952 og 1954) og *Røtger* (1953) vist at mengden av farge som er bundet til proteinfraksjonene på et elektroforetogram, kan måles ved hjelp av direkte fotometri. Metoden er arbeidsparende, men i forbindelse med den metodikk som er beskrevet i det foregående, har det ikke vært mulig å bruke direkte fotometri på grunn av den store fargekonsentrasjon i feltene med absorbert melk.

Eluering.

En mer omstendelig metode for bestemmelse av den bundne fargemengde er benyttet av *Turba og Enenkel* (1950) og andre: Elektroforetogrammet klippes over mellom de enkelte proteinfraksjoner, fargen trekkes ut med 0.1 n NaOH og fargestyrken i eluatet måles fotometrisk.

Franglen og Martin (1954) har imidlertid vist at amidosvart 10 B er ubestendig selv i 0.01 n NaOH.

Wunderly (1953) oppgir at en oppløsning av 5 pct. natriumkarbonat i 50 pct. metanol kan brukes til eluering av amidosvart.

Bestandigheten av amidosvart 10 B er undersøkt i en elueringsvæske av 5.7 l metanol, 4.7 l vann og 150 g vannfrit natriumkarbonat.

I en oppløsning av amidosvart-pulver i elueringsvæske har det i løpet av få timer funnet sted en betydelig destruksjon av fargestoff både ved 32° C og 44° C. Også ved 23° C har det foregått en merkbar destruksjon av fargestoffet (Tabell 5).

Tabell 5. Amidosvart 10 B oppløst i elueringsvæske og oppbevart ved forskjellig temperatur.

Amido black 10 B, dissolved in eluting solution and stored at different temperatures.

Oppbevaringstid Period of storing	0 timer 0 hours	3 timer 3 hours	6 timer 6 hours	19 timer 19 hours	28 timer 28 hours
Oppbevarings- temperatur Storing temperature	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.
23° C	.537	.532	.530	.524	.518
32° C	.536	.527	.521	.504	.496
44° C	.535	.515	.509	.467	.446

De anførte ekstinksjoner er middel av 2 parallellanalyser.

En ønsket også å undersøke hvordan amidosvart som har vært bundet til melkeprotein, forholder seg i elueringsvæsken. For i løpet av kort tid å få et eluat med passende fargekonsentrasjon, er et større antall melkeprøver eluert i 10 minutter i en forholdsvis liten mengde elueringsvæske. Ved oppbevaring ved 23° C i 28 timer er det ikke konstatert noen nedgang i fargestyrken. Ved oppbevaring ved 32° C er destruksjonen av fargestoffet ubetydelig, mens det ved oppbevaring ved 44° C har vært en tydelig nedgang i fargestyrke allerede i løpet av 3 timer (Tabell 6).

Tabell 6. Eluerte melkeprøver oppbevart ved forskjellig temperatur.

Eluted milk samples stored at different temperatures.

Oppbevaringstid <i>Period of storing</i>	0 timer ¹⁾ <i>0 hours</i>	3 timer <i>3 hours</i>	6 timer <i>6 hours</i>	19 timer <i>19 hours</i>	28 timer <i>28 hours</i>
Oppbevarings- temperatur <i>Storing temperature</i>	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.
23° C	.543	.544	.541	.541	.544
32° C	.544	.539	.534	.533	.539
44° C	.541	.528	.525	.520	.525

De anførte ekstinksjoner er middel av 2 parallellanalyser.

1) 15 minutter ved 23° C før 1. måling.

Melkeprøver som er eluert på vanlig måte og oppbevart ved værelse-temperatur, har ved en annen undersøkelse ikke vist noen nedgang i ekstinksjonsverdi i tiden fra 24 til 48 timer etter at prøvene er påfylt elueringsvæske. Etter at prøvene hadde stått ytterligere 4 dager i et solvindu, var fargestyrken falt med ca. 5 %, noe som antagelig skyldes høy temperatur og kraftig belysning (Tabell 7).

Tabell 7. Eluerte melkeprøver oppbevart først i vanlig dagslys og deretter i direkte sollys.

Eluted milk samples first subjected to ordinary daylight and then to direct sunlight.

Oppbevaringsmåte <i>Storage</i>	Skjermet mot direkte sollys <i>Protected against direct sunlight</i>		I solvindu <i>Subjected to direct sunlight</i>
Oppbevaringstid <i>Period of storing</i>	1 dag <i>1 day</i>	2 dager <i>2 days</i>	4 dager <i>4 days</i>
Prøve nr.	Ekst.	Ekst.	Ekst.
1	.252	.252	.237
2	.277	.277	.264
3	.320	.318	.307
4	.366	.367	.351
5	.396	.397	.376
6	.439	.440	.422
Middel	.342	.342	.326

De anførte ekstinksjoner er middel av 6 parallellanalyser.

Ovenstående undersøkelse tyder således på at den destruksjon av fargestoff som foregår i elueringsvæsken i løpet av et par dager er ubetydelig ved temperaturer opp til ca. 30° C.

Etter eluering i 12 timer er det i enkelte tilfelle fortsatt konstatert farge i filtrerpapiret. For å unngå feil på grunn av mangelfull eluering, er elueringstiden satt til minimum 20 timer.

Filtrerpapirstykket i elueringsglasset vil hindre fullstendig diffusjon i væsken. Selv etter lang elueringstid må derfor glasset vendes opp ned noen ganger før fargestyrken måles for at en kan være sikker på at eluatet er homogent.

For eluering av de fargede melkeprøver er det brukt følgende væske: 5.7 l metanol, 4.7 l vann og 150 g vannfrit natriumkarbonat, subsidiært 5.7 l metanol, 4.5 l vann og 400 g natriumkarbonat med 2 mol. krystallvann. Til elueringen er det benyttet 100 ml væske pr. melkeprøve.

Mindre avvik i elueringsvæskens sammensetning har ikke sett ut til å påvirke analyseresultatene.

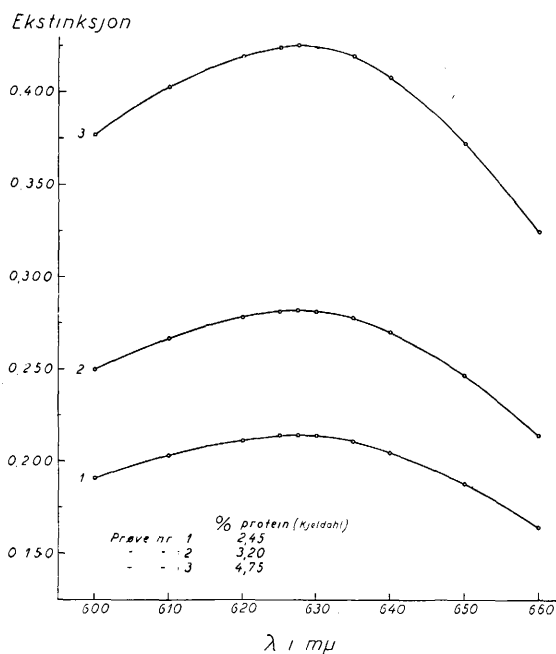


Fig. 4. Lysabsorpsjonen i eluat fra melkeprøver ved bølgelengder fra 600 til 660 nm.

Absorption of light in eluat from milk samples at wavelengths ranging from 600 to 660 nm.

Måling av optisk tetthet i elueringsvæsken.

Den største lysabsorpsjon i eluatet er funnet ved bølgelengden 627.5 nm, men det er praktisk talt ingen forskjell i lysabsorpsjon innenfor området 625–630 nm (Fig. 4). Ved målingene er det brukt et Beckman DU spektrofotometer og firkantet kuvette med 10 mm lysvei. Som referanse er det brukt destillert vann.

11. Analysemetodens sikkerhet som laboratoriemetode for proteinbestemmelse i melk fra enkeltkyr.

Fargetettheten i eluatet målt med Beckman DU spektrofotometer.

Målingene er utført ved bølgelengden 627.5 nm. Det er brukt kuvette og referanse som ovenfor nevnt.

Den første undersøkelse som ble foretatt etter at det var funnet fram til en brukbar analyseteknikk, omfattet 127 melkeprøver, og det ble utført 6 parallellanalyser for hver prøve (Hovedtabell I). I gjennomsnitt for samtlige melkeprøver er middelavviket¹⁾ beregnet på de enkelte ekstinksjoner ± 0.0036 . Overensstemmelsen mellom analyser utført i samme serie er således meget god.

For å undersøke analyseresultatenes reproducerbarhet ble 2 serier analyser av de samme melkeprøver utført på forskjellig tidspunkt (Tabell 8 og Hovedtabell II). Forskjellen mellom analysene uttrykt ved middelavviket²⁾ på ekstinksjonene for tilsammen 78 melkeprøver i 8 prøveserier var ± 0.0051 og for 1 prøveserie som omfattet 52 melkeprøver ± 0.0043 .

Foruten de tilfeldige avvik er det også funnet nivåforskjell mellom analyser utført på forskjellig tidspunkt. Når det unntas en enkelt prøveserie på 9 melkeprøver, hvor forskjellen mellom middeltallet to forskjellige analysedager var ca. 2.5 %, var differansen mindre enn 1 %.

Selv om de differanser som ble funnet mellom prøver analysert på forskjellig tidspunkt, stort sett var meget små, ble undersøkelsene fortsatt. Mellom 3 analyseserier fra 45 melkeprøver som ble farget samtidig, men eluert og målt fotometrisk på forskjellige dager var differansen ca. 0.5 %. Av de samme melkeprøver ble 2 serier både farget og målt på forskjellig tidspunkt. Mellom disse var differansen ca. 1 %. (Tabell 9 og Hovedtabell III).

$$1) s = \sqrt{\frac{\sum (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{n (q - 1)}} \quad \begin{array}{l} x_{ij} = \text{ekst. for j. parallellanalyse.} \\ \bar{x}_j = \text{middel-ekst. for j parallellanalyser.} \\ n = \text{antall melkeprøver.} \\ q = \text{antall parallellanalyser pr. melkeprøve.} \end{array}$$

$$2) s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n}} \quad \begin{array}{l} d = \text{differansen mellom 2 kolorimetriske analyser.} \\ n = \text{antall melkeprøver.} \end{array}$$

Tabell 8. Analyseresultatenes reproduserbarhet.

<i>Repeatability of analytical results.</i>									
Prøveserie, nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Sample series, no.</i>									
Antall melkeprøver	10	10	9	10	10	10	9	10	52
<i>No. of milk samples</i>									
Analyseserie 1, ekst. middel ..	.308	.293	.317	.276	.309	.305	.298	.306	.340
<i>Analytical series 1, average ext.</i>									
Analyseserie 2, ekst. middel ..	.306	.292	.316	.276	.311	.303	.290	.307	.338
<i>Analytical series 2, average ext.</i>									
Differanse	.002	.001	.001	.000	÷ .002	.002	.008	÷ 0.01	.002

Tabell 9. Analyseresultatenes reproduserbarhet (45 melkeprøver).

<i>Repeatability of analytical results (45 milk samples).</i>				
Seriene farget samtidig, men målt på forskj. dag, ekst. middel	-	.336	.335	.337
<i>Series stained simultaneously, but measured on diff. days, average ext.</i>				
Seriene både farget og målt på forskj. dag, ekst. middel	.338	-	-	-
<i>Series stained as well as measured on diff. days, average ext.</i>				

Det viser seg således at en må regne med nivåforskjell mellom analyse-resultatene fra forskjellige analyseserier. Det har ikke vært mulig å fastslå grunnen til ovennevnte systematiske forskjell med sikkerhet, men det er en rekke ting som kan ha vært årsak: Forskjellig avlesing av fotometret når forskjellige personer foretar målingene, innstillingen av fotometret, svingninger i temperaturen i farge- og vaskevæske, eller destruksjon av amidosvart i elueringsvæsken når temperaturen i laboratoriet var høy.

Pedersen (1961) har pekt på at fargeinnholdet kan være noe forskjellig i de forskjellige fabrikkasjonsserier av amidosvart. Fargebadet som brukes ved denne analysemetode inneholder imidlertid så stort overskudd av farge at de vanlige svingninger i fargepreparatets renhet og vanninnhold ikke vil påvirke analyseresultatene.

Den systematiske forskjell som er funnet mellom analyser utført på forskjellig tidspunkt, er som det framgår av det foregående, meget liten, i middel mindre enn 1 % og er i flere tilfeller heller ikke signifikant. Analysenes reproducerbarhet må derfor sies å være tilfredsstillende.

Fargebindingen i melkeprøver fra enkeltkyr er sammenholdt med prosent kjeldahlprotein. Undersøkelsene bekrefter at fargebindingen er rettlignet proporsjonal med prosent kjeldahlprotein innenfor et visst område. For bestemmelse av proteininnholdet ut fra målt ekstinksjon er konfidensintervallet for en analyse med 95 % konfidenssannsynlighet bestemt til ± 0.14 prosentenheter protein når prøvene er farget i 10 minutter (Fig. 5). Ved farging i 30 minutter er det tilsvarende konfidensintervall bestemt til ± 0.12 (Fig. 6). Det kan se ut som om farging i 30 minutter har gitt den største analysesikkerhet. Dette kan imidlertid ikke tas som gitt, idet den første undersøkelse,

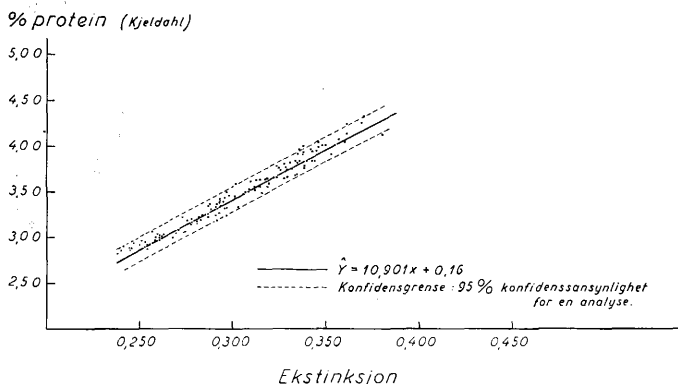


Fig. 5. Sammenhengen mellom mengde amidosvart bundet til $\frac{1}{20}$ ml melk, uttrykt ved ekstinksjonen, og prosent kjeldahl-protein. Farging 10 min. 3 utvaskinger.

The correlation between the amount of Amido black combined with $\frac{1}{20}$ ml milk, expressed as extinction, and percentage of Kjeldahl-protein. Staining 10 min. 3 rinsings.

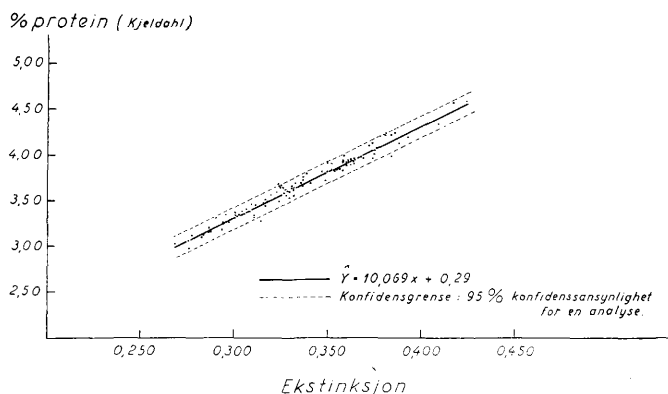


Fig. 6. Sammenhengen mellom mengde amidosvart bundet til $\frac{1}{20}$ ml melk, uttrykt ved ekstinksjonen, og prosent kjeldahl-protein. Farging 30 min. 4 utvaskinger.

The correlation between the amount of Amido black combined with $\frac{1}{20}$ ml milk, expressed as extinction, and percentage of Kjeldahl-protein. Staining 30 min. 4 rinsings.

som omfatter 127 prøver, er analysert over et tidsrom på 3 måneder, mens den annen undersøkelse, som omfatter 100 melkeprøver, er utført på én dag. Den første undersøkelse omfatter melkeprøver fra 33, og den siste fra 84 kyr.

Fargetettheten i eluatet målt med Beckman C kolorimeter.

Da analysemetoden ble tatt i praktisk bruk, ble det anskaffet et Beckman C kolorimeter med gjennomstrømmingskuvette, fordi dette apparat er hurtig å arbeide med. Analysenøyaktigheten kan imidlertid ikke ventes å være så stor som for et spektrofotometer.

Da det på daværende tidspunkt ikke var mulig å skaffe firkantede gjennomstrømmingskuvetter i serier med nøyaktig samme lysvei, ble det brukt rund gjennomstrømmingskuvette av standardtype med 10 mm innvendig diameter. Lysfiltret som ble benyttet, var det røde standardfilter til apparatet med maksimal transmisjon for lys med bølgelengden 660 nm. Målingene ble utført ved hjelp av blå-følsom fotoselle med måleområde 350 nm–660 nm. Som referanse ble det brukt destillert vann.

For å fjerne væskerester etter foregående prøve, ble kuvetten skyllet en gang med den nye prøve før denne ble målt.

Ved de første prøver en gjorde med apparatet, ble det funnet en betydelig og signifikant forskjell mellom måledager for regressjonen ekstinksjon på prosent kjeldahlprotein (Fig. 7). For prøver som var analysert på samme dag, var det derimot ikke vesentlig større avvik enn ved nedenfor omtalte undersøkelse.

Etter at det var foretatt en forbedring av føringen for kuvetten og apparatet var utstyrt med en ekstra spenningsstabilisator, var målenøyaktigheten

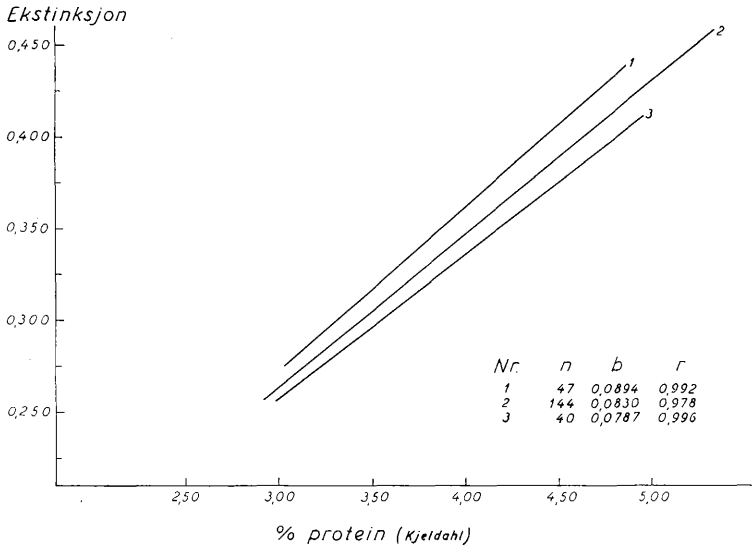


Fig. 7. Fargetettheten i eluatet målt med Beckman C kolorimeter, orienterende undersøkelser. Regressjonslinjer for 3 analyseserier.

Optical density in eluate, measured with a Beckman C colorimeter, preliminary trials. Regression lines for 3 series of analyses.

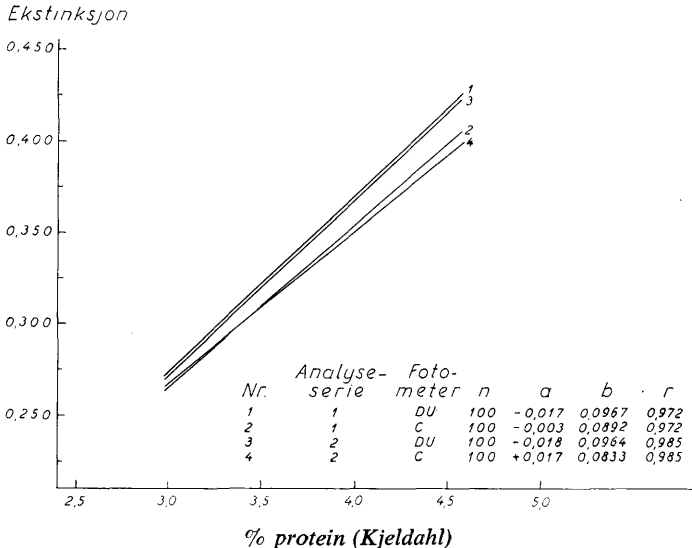


Fig. 8. Sammenligning mellom Beckman DU spektrofotometer og Beckman C kolorimeter for måling av fargetettheten i eluatet.

2 analyseserier av 100 melkeprøver målt på begge apparater.

Comparison between Beckmann DU spectrophotometer and Beckman C colorimeter for measurement of optical density in eluate.

2 analytical series of 100 milk samples measured with both apparatuses.

vesentlig forbedret. Ved en undersøkelse som omfattet 100 melkeprøver, var middelavviket mellom to analysedager beregnet på ekstinksjonene ± 0.0072 . (Hovedtabell IV). De samme to analyseserier ble målt på Beckman DU apparatet og for målingene på dette apparat var middelavviket ± 0.0040 .

Regressjonslinjene for de to analyseseriene faller ikke helt sammen hverken for Beckman C eller Beckman DU apparatet (Fig. 8). Da den samme analyseserie har gitt de høyeste ekstinksjonsverdier på begge apparater, ligger årsaken til denne, forøvrig ikke signifikante forskjell mellom analyseserier utført på samme apparat sannsynligvis ikke utelukkende i ekstinksjonsmålingen. For målingene på Beckman DU apparatet representerer avstanden mellom regressjonslinjene ca. 0.02 prosentenheter protein. At regressjonslinjene er noe steilere for prøver målt med Beckman DU enn med Beckman C apparatet (Fig. 8) kan skrive seg fra at målingene med førstnevnte apparat er utført ved tilnærmedesvis monokromatisk lys, mens det filter som er brukt i Beckman C apparatet har relativt stor båndbredde.

I et materiale på vel 300 melkeprøver som var innsendt til laboratoriet, konserverert med sublimat, ble proteinprosenten bestemt både etter den kolorimetrisk metode ved bruk av Beckman C apparatet og etter Kjeldahls metode (Hovedtabell V).

Omregningen fra ekstinksjon til prosent protein ble foretatt ved hjelp av en tabell utarbeidet på grunnlag av regressjonsligningen: Prosent protein = ekstinksjonen $\times 11.156 + 0.10$.

Av praktiske grunner gir omregningstabellen bare proteininnholdet i trin på 0.05 prosentenheter. De forhøyingsfeil dette fører til, vil imidlertid være av liten praktisk betydning.

For hver analyseserie som er utført, er det tatt med 4–8 melkeprøver med kjent proteininnhold for å kunne påvise en eventuell nivåforskjell mellom analyseseriene. I de tilfelle den gjennomsnittlige ekstinksjonsverdi for kontrollprøvene har avveket mer enn ± 0.005 enheter fra den fastlagte regressjonslinje, er det foretatt korreksjon av de målte ekstinksjonsverdier. Denne korreksjonsmåte er fremfor alt enkel å bruke i praksis og med de forholdsvis små korreksjoner som har forekommet, sjelden mer enn hva som tilsvarer 0.10–0.15 prosentenheter protein, kan en regne med at korreksjonen blir tilnærmet riktig også for melkeprøver med proteininnhold som avviker nokså meget fra gjennomsnittet for kontrollprøvene.

Ved den her nevnte undersøkelse ble det funnet et middelavvik¹⁾ på ± 0.094 prosentenheter protein mellom analyseresultatene etter de to metoder. Forklaringen på en del av avviket er at det ikke er fullt samsvar mellom regressjonen ekstinksjon på prosent kjeldahlprotein i dette materiale og i det materiale som ligger til grunn for ovennevnte regressjonsligning. Den

¹⁾ $s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n}}$ d = differansen mellom % protein bestemt kolorimetrisk og etter Kjeldahl.
 n = antall melkeprøver.

kolorimetrisk analysemetode viste ved undersøkelsen i middel 0.01 prosentenheter protein mer enn kjeldahlmetoden for de prøver som hadde lavere proteinprosent enn gjennomsnittet for materialet og 0.06 prosentenheter lavere verdier enn kjeldahlmetoden for de prøver som hadde høyere proteinprosent enn gjennomsnittet (Tabell 10). Regressjonsligningene var imidlertid ikke signifikant forskjellige og omregningstabellen er brukt uforandret i det følgende.

Tabell 10. Sammenligning mellom den kolorimetrisk analysemetode når Beckman C kolorimeter er brukt og kjeldahlmetoden.

*Comparison of the colorimetric method and the Kjeldahl method.
Beckman C colorimeter used.*

Proteininnhold i melkeprøvene	2.82%–3.58%	3.59%–4.65%	2.82%–4.65% (sum)
<i>Protein content of milk samples</i>			
Antall melkeprøver	171	157	328
<i>No. of milk samples</i>			
Kjeldahl, % protein, middel	3.29	3.91	3.59
Kolorimetrisk, % prot., middel	3.30	3.85	3.57
Differanse	÷ 0.01	0.06	0.02

De anførte ekstinksjoner er middel av 2–3 parallellanalyser.

De undersøkelsene som er foretatt, viser at en må regne med noe større usikkerhet på analyseresultatene ved bruk av Beckman C kolorimeter enn ved bruk av spektrofotometer. Overensstemmelsen med kjeldahlanalysen er likevel så vidt god at det må være forsvarlig å bruke Beckman C kolorimeter ved rutinebestemmelse av protein i melk.

12. Praktisk bruk av analysemetoden ved proteinbestemmelse i melk fra enkeltkyr.

Ved bruk av analysemetoden for avkomsprøve- og forsøksstasjoner avsatte assistentene på stasjonene melkeprøvene på filtrerpapirstrimler som ble sendt til Dyrefysiologisk Laboratorium. På laboratoriet ble analysearbeidet utført som beskrevet foran og ekstinksjonen i eluatet målt med Beckman C kolorimeter. Det ble tatt to parallellanalyser for hver melkeprøve.

En kontrollerte arbeidet ved at det regelmessig ble sendt flasker med melk til laboratoriet for kjeldahlanalyse. Før flaskene ble sendt, hadde assistentene avsatt prøver av melken på filtrerpapir på samme måte som for de øvrige kyr.

For 532 slike kontrollprøver (Hovedtabell VI)¹⁾ viste den kolorimetrisk analysemetode i middel 0.08 prosentenheter høyere proteinverdi enn kjeldahlmetoden, og forskjellen var statistisk sikker. Middelavviket mellom ana-

¹⁾ En del av tallene i hovedtabell VI og også noen av tallene i hovedtabell V er ikke samlet av forfatteren, men skriver seg fra den fortsatte bruk av analysemetoden ved Forsøgslaboratoriets Dyrefysiologiske Afdeling, København.

lyser utført etter de to metoder var ± 0.142 prosentenheter protein. Det er ved denne undersøkelse brukt den samme tabell for omregning fra ekstinksjon til prosent protein og foretatt korreksjoner på samme måte som omtalt for Beckman C apparatet i foregående avsnitt. En del av disse analysene er utført i samme tidsrum og tildels også i samme melk som den undersøkelse som er omtalt til slutt i foregående avsnitt.

Årsaken til den noe dårligere overensstemmelse med kjeldahlanalysen ved praktisk bruk av den kolorimetriske analysemetode enn ved bruk av analysemetoden som ren laboratoriemetode, må således sannsynligvis søkes i avmålingen av melkeprøvene. Det har vist seg at en del av de pipetter som har vært brukt ikke har holdt den garanterte nøyaktighet, $\pm 0.5\%$. Det er også konstatert at det i enkelte tilfelle har vært brukt pipetter med brukket spiss, idet, det som tidligere nevnt, kan være meget vanskelig å konstatere slik skade på de mest tynnveggede pipetter. Avmålingen av melkeprøvene på stasjonene har vært utført av ca. 50 personer og selv om sikkerheten i arbeidet etter kort tids øvelse var bra, kan en ikke se bort fra at noe av den forskjell som er funnet mellom melkeprøver analysert etter de to metoder, kan skyldes manglende rutine i den første tiden.

Uten tvil har de ovennevnte vanskeligheter med pipettene vært årsak til en del av analysefeilene. Det er derfor ikke foretatt en mer inngående undersøkelse av dette kontrollmaterialet, selv om det blev konstatert at analyse-nøyaktigheten ved praktisk bruk av metoden i den første tid ikke var så god som når alle ledd i analysen ble utført på laboratoriet.

13. Analysesikkerheten for melk med særlig lavt eller særlig høyt proteininnhold.

Melk med lavt proteininnhold.

Ved de forskjellige undersøkelser som har vært utført, har det vært med en del melkeprøver med proteininnhold under 3.0% . Det er ikke noe som tyder på at regressjonen ekstinksjon på prosent protein ikke er den samme for proteinfattig melk, som for melk med høyere proteininnhold (Fig. 2, 5 og 6).

For 26 melkeprøver med lavere proteininnhold enn 3.0% , analysert kolorimetrisk ved hjelp av Beckman C apparatet (Hovedtabell V og VI), gav den kolorimetriske analyse i middel 0.02 prosentenheter høyere proteinverdier enn kjeldahlanalysene. Middelvviket var ± 0.078 prosentenheter eller $\pm 2.7\%$ av det gjennomsnittlige proteininnhold, som for materialet var 2.92% .

Melk med høyt proteininnhold.

Ved en mindre undersøkelse ble det, som tidligere omtalt, funnet at det for prøver av kondensert, skummet melk var rettlinjett sammenheng mellom proteininnhold og fargebinding opp til ca. 6% protein (Fig. 2).

Melk med et proteininnhold på 6% vil i regelen være så viskos at det er vanskelig å få fordelt $\frac{1}{20}$ ml melk over et større areal av filtrerpapiret enn

ca. 3 cm². Dette tilsvarer en proteinkonsentrasjon på ca. 1 mg pr. cm². *Heide og Biel* (1958) har funnet at bindingen av amidosvart til serumalbumin ikke er kvantitativ ved en proteinkonsentrasjon i Whatman filtrerpapir nr. 1 på 0.2 mg protein pr. cm², men fant kvantitativ fargebinding ved en proteinkonsentrasjon på 0.07 mg pr. cm².

Guillien og Hermann (1955) angir som grunn til at de ikke har funnet kvantitativ binding av bromthymolblått til serumprotein ved høy proteinkonsentrasjon i elektroforetogrammer at proteinmolekylene ligger så tett leiret at ikke alle fargebindende valenser kan nyttes. Ut fra denne formodning kan det være nærliggende å trekke den slutning at melkeprøvenes store fargebindingsevne selv ved høy proteinkonsentrasjon henger sammen med at det mellom proteinmolekylene leires molekyler av melkens øvrige bestanddeler som i større eller mindre grad blir fjernet fra filtrerpapiret under denaturerings- og fargingsprosessen. En kan heller ikke se bort fra at forhold som protein kvalitet og behandlingen av prøvene før fargingen kan ha innflytelse.

I det kontrollmaterialet som er analysert med Beckman C apparatet (Hovedtabell V og VI) er det bare 17 melkeprøver som har hatt et proteininnhold på over 4.5 % og ingen av prøvene inneholdt over 5 % protein. I middel for de 17 prøvene lå den kolorimetriske analysemetode 0.03 prosentenheter lavere i proteinverdi enn kjeldahlmetoden. Middelavviket var ± 0.215 prosentenheter eller ± 4.6 % av den gjennomsnittlige proteinprosent, som for disse prøvene var 4.69. Undersøkelsen, som forøvrig er beheftet med noe usikkerhet av grunner som omtalt side 29, tyder på at en må regne med større avmålingsfeil på melkeprøvene, både relativt og totalt, for tørrstoffrik melk enn for melk med lavt eller middels tørrstoffinnhold. Det er ikke funnet systematiske feil som kan tilskrives den høye proteinprosent.

Ved undersøkelsene er det som før nevnt benyttet kuvette med 10 mm lysvei. Der det forekommer en del melkeprøver med høyt proteininnhold, kan det imidlertid være en fordel å bruke kuvette med noe mindre lysvei, f.eks. 8 mm. Derved vil en oppnå at alle avlesninger vil foregå innenfor det område av kolorimeterets skala hvor intervallene er relativt store. En sikrer seg også at en arbeider innenfor det måleområde på kolorimeteret hvor Lambert-Beers lov om rettlinjett sammenheng mellom fargekonsentrasjon og lysvei på den ene side og ekstinksjon på den annen side gjelder, slik at det for melkeprøver med ekstremt høyt proteininnhold bare er fargebindingen som er den usikre faktor.

14. Analyse av melk som avviker fra det normale.

Kolostrummelk.

Tabell 11 og 12 viser at de proteinverdier en får ved bruk av denne kolorimetriske metode for analyser av ufortynnet kolostrummelk, er meget lavere enn de verdier en får ved kjeldahlmetoden.

Tabell 11. Kolostrummelk og melk fra kyr kort tid etter kalving.*Colostrum and milk from cows shortly after calving.*

Ku nr.	14			16		
	% protein			% protein		
Tid fra kalving ¹⁾	Kolori-metrisk a	Kjel-dahl b	Diffe-ranse a-b	Kolori-metrisk a	Kjel-dahl b	Diffe-ranse a-b
13 timer ²⁾	—	—	—	5.63	12.49	÷ 6.86
20 »	5.65	15.10	÷ 9.45	—	—	—
30 »	—	—	—	5.73	6.88	÷ 1.15
2 døgn ³⁾	5.10	5.41	÷ 0.31	4.83	4.91	÷ 0.08
3 »	—	—	—	4.78	4.83	÷ 0.05
4 »	4.40	4.38	0.02	4.70	4.81	÷ 0.11
5 »	4.32	4.50	÷ 0.18	4.63	4.68	÷ 0.05
6 »	4.04	4.09	÷ 0.05	4.62	4.59	0.03
7 »	3.99	4.06	÷ 0.07	4.47	4.41	0.06
8 »	—	—	—	4.36	4.29	0.07

Ku nr.	24			108		
	% protein			% protein		
Tid fra kalving ¹⁾	Kolori-metrisk a	Kjel-dahl b	Diffe-ranse a-b	Kolori-metrisk a	Kjel-dahl b	Diffe-ranse a-b
15 timer	6.82	9.94	÷ 3.12	—	—	—
24 »	—	—	—	6.61	7.52	÷ 0.91
40 »	6.02	6.43	÷ 0.41	5.04	5.24	÷ 0.20
3 døgn	5.20	5.53	÷ 0.33	4.44	4.69	÷ 0.25
4 »	5.12	5.46	÷ 0.34	4.48	4.47	0.01
5 »	5.02	5.23	÷ 0.21	4.49	4.43	0.06
6 »	4.93	5.03	÷ 0.10	—	—	—
7 »	4.70	4.77	÷ 0.07	3.87	3.80	0.07
8 »	4.47	4.44	0.03	3.91	3.94	÷ 0.03

1) Time from calving. 2) Hours. 3) Days.

Tabell 12. Kolostrummelk, 1. gangs melking etter kalving.*Colostrum, first milking after calving.*

Ufortynnet kolostrummelk <i>Colostrum, undeluted</i>					Fortynnet kolostrummelk <i>Colostrum, deluted</i>				
Ku nr.	% protein		Differanse		% protein		Differanse		
	Kolori-metrisk a	Kjel-dahl b	a÷b	%	Kolori-metrisk a	Kjel-dahl b	a÷b	%	
J 33	8.19	11.40	÷ 3.21	28.2	3.81	3.92	÷ 0.11	2.8	
101	7.67	12.42	÷ 4.75	38.2	4.27	4.31	÷ 0.04	0.9	
103	7.37	9.75	÷ 2.38	24.4	3.66	3.48	0.18	5.2	
J 325	8.22	11.47	÷ 3.25	28.3	3.97	4.01	÷ 0.04	1.0	

En del av forskjellen kan forklares ut fra at det ikke er rettlinjet proporsjonalitet mellom ekstinksjon og melkeprøvenes proteininnhold for større proteinprosenten enn ca. 6.0. Det er imidlertid temmelig store avvik også for melk med ca. 5 % kjeldahlprotein. Det kunne være nærliggende å tro, at

avvikene for en del skyldes den kvalitative forskjell mellom proteinet i kolostrummelk og vanlig melk. Av tabell 12 fremgår det imidlertid, at når kolostrummelken fortynnes med en passende mengde vann, kan det oppnås relativt god overensstemmelse.

Under analysearbeidet har det sett ut til, at den viskose kolostrummelk ikke blir ordentlig absorbert i filtrerpapiret, slik at noe av melken blir liggende som en hinne utenpå dette. Det vil da bli forholdsvis stor proteinkonsentrasjon på et lite område av filtrerpapiret og det er dessuten fare for at noe av den inntørkede melk kan bli skyllet bort under analyseprosessene.

Tabell 13. Melk fra kyr kort tid etter kalving. Fjøs kontroll to dager etter hverandre.

Milk from cows in an early stage of lactation. Milk record two days in succession.

Ku nr.	Dager etter kalving Days from calving	1. kontroll 1st record			2. kontroll 2nd record		
		% protein		Differanse a÷b	% protein		Differanse a÷b
		Kolorimetrisk a	Kjeldahl b		Kolorimetrisk a	Kjeldahl b	
A 17	14	3.44	3.49	÷ 0.05	3.54	3.50	0.04
452	11	3.63	3.66	÷ 0.03	3.57	3.65	÷ 0.08
484	17	3.76	3.79	÷ 0.03	3.89	3.90	÷ 0.01
84	7	3.57	3.59	÷ 0.02	—	—	—
38	8	—	—	—	3.43	3.43	0
38	14	3.27	3.27	0	3.26	3.22	0.04
84	15	3.28	3.29	÷ 0.01	3.39	3.34	0.05
281	7	—	—	—	3.75	3.71	0.04
75	3	—	—	—	4.67	4.68	÷ 0.01

Undersøkelser tyder på at en uten fortynning av melken kan bestemme proteininnholdet med vanlig sikkerhet i alle fall en uke etter kalving (Tabell 11 og 13).

Sinamelk.

Det er analysert melkeprøver fra 4 forskjellige kyr som var ved å holde opp å melke, og for 3 av kyrne ble melken analysert 2 dager etter hverandre (Tabell 14). For alle analyser viser den kolorimetriske bestemmelse lavere proteininnhold enn kjeldahlmetoden uten at årsaken er påvist.

Tabell 14. Analyser av sinamelk.

Analyses of milk from cows becoming dry.

Ku nr	1. kontroll 1st record			2. kontroll 2nd record		
	% protein		Differanse a÷b	% protein		Differanse a÷b
	Kolorimetrisk a	Kjeldahl b		Kolorimetrisk a	Kjeldahl b	
92	3.38	3.45	÷ 0.07	3.38	3.52	÷ 0.14
211	—	—	—	4.97	5.49	÷ 0.52
487	4.72	4.87	÷ 0.15	5.02	5.24	÷ 0.22
493	5.25	5.38	÷ 0.13	5.31	5.61	÷ 0.30

Tabell 15. Melk fra kyr med jurlidelser. Fjøs kontroll to dager etter hverandre.

Milk from cows afflicted with udder ailments. Milk record two days in succession.

Ku nr.	1. kontroll 1st record			2. kontroll 2nd record			Anmerkninger Remarks
	% protein		Diffe- ranse a÷b	% protein		Diffe- ranse a÷b	
	Kolori- metrisk a	Kjel- dahl b		Kolori- metrisk a	Kjel- dahl b		
233	3.44	3.46	÷ 0.02	3.38	3.45	÷ 0.07	kronisk mastitis
199	2.96	2.96	0	3.00	3.04	÷ 0.04	» »
293	2.97	2.96	0.01	3.12	3.15	÷ 0.03	akutt »
43	3.65	3.66	÷ 0.01	3.61	3.66	÷ 0.05	kronisk »
67	2.76	2.84	÷ 0.08	2.74	2.85	÷ 0.11	skadet spene, blod i melken
177	3.25	3.36	÷ 0.11	3.20	3.37	÷ 0.17	coli-mastitis?
325	4.24	4.37	÷ 0.13	4.20	4.37	÷ 0.17	akutt mastitis, penicillinbeh.
344	4.22	4.06	0.16	3.82	4.06	÷ 0.24	» »
D 52	3.37	3.37	0	3.43	3.34	0.09	kronisk mastitis, gr. β -strept.
D 57	3.70	3.73	÷ 0.03	3.70	3.62	0.08	» » » »
403	4.00	4.36	÷ 0.36	4.38	4.37	0.01	akutt » » » »
421	4.24	4.38	÷ 0.14	4.22	4.33	÷ 0.11	» » » »

Melk fra kyr med jurlidelser.

Det er foretatt proteinanalyse 2 dager etter hverandre for 11 kyr med mastitis og for 1 ku som hadde blodtilblandet melk på grunn av en utvendig skade (Tabell 15). Såvel melkeprøvene fra sistnevnte ku, som de fleste prøver fra kyr med akutt mastitis viste lavere proteininnhold etter den kolorimetriske metode enn etter kjeldahlmetoden.

For de kyrs vedkommende, som har akutt mastitis, er det mulig at forklaringen ligger i, at klumper av puss og vevsrester, som forøvrig også binder amidosvart, lett blir skyllet vekk fra filterpapiret under analyseprosessene.

Varmebehandlet melk.

Det er ikke utført en systematisk undersøkelse av hvilken innflytelse oppvarming av melken har på dens evne til å binde amidosvart, men for noen få prøver av vanlig kondensert helmelk har den kolorimetriske metode gjennomgående gitt lavere proteinverdier enn kjeldahlanalysene. Dette er i overensstemmelse med hva som er funnet av *Johnsen og Hadland* (1959). Det er nærliggende å anta at den nedsatte fargebinding skyldes oppvarmingen av melken under steriliseringsprosessen.

Blåsur melk.

Melk som er koagulert, kan ikke avmåles med konstrikjonspipette, men en kan i praksis få med blåsure melkeprøver å gjøre. Derfor er det av melk, som er oppbevart ved 15° C, tatt prøver med mellomrom inntil melken har koagulert. Det ble ikke funnet noen forskjell i fargebindingsevne mellom søt og blåsur melk (Tabell 16).

Tabell 16. Analyser av søt og blåsur skummet melk oppbevart ved 15° C.

Analyses of sweet and sour, uncoagulated, skim milk kept in storage at 15° C.

Døgn fra 1. prøve- taking ¹⁾	0	³ / ₄	1 ²⁾	1 ¹ / ₄	1 ¹ / ₂	2	2 ¹ / ₄	2 ¹ / ₂ ³⁾	3 ⁴⁾
Prøve nr.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.
1	.258	.259	.258	.257	.261	.260	.261	.258	.257
2	.291	.291	.291	.290	.294	.291	.294	.290	.289
3	.334	.333	.314	.332	.333	.330	.336	.330	.324
4	.372	.372	.369	.371	.371	.370	.376	.370	—
5	.396	.387	.392	.390	.395	.391	.396	.388	.381
6	.415	.410	.419	.415	.413	.410	.413	.409	.405
7	.426	.421	.422	.424	.427	.422	.424	.420	.421
8	.443	.441	.436	.440	.446	.440	.441	.432	.439
Middel	.367	.364	.363	.365	.368	.364	.368	.362	—

1) Days from the first sampling.

Anmerkninger:

2) Prøvene lukter surt.

3) » begynner å koagulere.

4) Prøve 4 koagulert. Samtlige prøver koagulert 6 timer senere.

Remarks:

2) Samples have a sour odour.

3) » begin to coagulate.

4) Sample 4 coagulated. All samples coagulated 6 hours later.

15. Gyldigheten av en regressjonsligning for bestemmelse av proteininnholdet ut fra fargemengden som bindes av melken.

Innflytelsen av analyseteknikk og utstyr.

En regressjonsligning for omregning av ekstinksjonsverdiene som måles i eluatet, til prosent protein er, med de begrensninger som er angitt foran, gyldig for analyser utført etter samme fremgangsmåte.

Det kan likevel ikke uten videre regnes med at kolorimetre av samme type gir nøyaktig samme måleresultat. Forøvrig er kuvettens lysvei avgjørende for lysgjennomgangen i prøven og følgelig for kolorimeterets utslag.

Det må derfor ved de enkelte laboratorier foretas bestemmelse av sammenhengen mellom melkens proteininnhold og den registrerte fargebinding. Sikkerheten av dette grunnleggende arbeide vil være avhengig av antall melkeprøver som legges til grunn for beregningen, og av prøvenes fordeling innenfor det intervall i prosent protein som skal benyttes som analyseområde.

Betydningen av férasen.

Hvorvidt det kan oppnås større analysesikkerhet ved å arbeide med en regressjonsligning for hver férase er ikke undersøkt. Imidlertid har det vært melk fra alle de tre danske melkeraser, R.D.M., S.D.M. og Jersey, med i de undersøkelser som er gjort over analysemetodens sikkerhet og de relativt snevre konfidensintervaller som er funnet ved bruk av Beckman DU apparatet (Fig. 5 og 6), tyder ikke på at det er meget å vinne ved å behandle de tre nevnte féraser hver for seg.

16. Kontrollanalyser utført etter Kjeldahl.

De nødvendige kjeldahlanalyser i forbindelse med undersøkelsene er utført som rutineanalyser sammen med laboratoriets øvrige kjeldahlanalyser. For hver melkeprøve er det utført 2 parallellanalyser. Ved større avvik mellom parallellanalysene enn 1 % er det utført nye analyser. Ved omregning fra total N til protein er det brukt faktoren 6.37.

17. Kjemikalier og analysevæsker.

Kjemikalier.

Amidosvart 10 B (Amido-black) for elektroforese, Merck
Vannfritt natriumkarbonat, Na_2CO_3 , p.a. (mol.vekt 105.99)

Sublimat, HgCl_2 , p.a.

Iseddiksyre, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, 99–100 % (farmakopestandard)

Etanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, abs.

Metanol, CH_3OH , p.a.

Metanol, CH_3OH , ren, kontrollert vare for teknisk bruk (må ikke gi uklarhet ved tilsetning av dest. vann)

Vann, H_2O , destillert eller avionisert.

Det er benyttet ledningsvann rensset i ionbytterapparat med 3 søyler resiner:

Søyle	1	Amberlite	IR -120 (H)
»	2	»	IRA-400 (OH)
»	3	»	IR -120 (H) + Amberlite IRA-400 (OH)

Fikseringsvæsker.

Fikseroppløsning	1	10 l	etanol	tilsatt	79 g	sublimat
»	2	10 »	»	»	8 »	»

Fargevæske.

5.70 l metanol (p.a.) og 2.00 l vann blandes. 70 g amidosvart oppløses i 2.50 l vann og 1.00 l iseddiksyre. Blandingen av metanol og vann helles langsomt i fargeoppløsningen under omrøring. På grunn av varmetoning i væsken må den stå til avkjøling før bruk. Samtidig vil eventuelle uoppløselige partikler synke til bunns, slik at de kan fjernes ved dekantering. pH verdien i ubrukt fargevæske er ca. 2.90.

Vaskevæske.

5.70 l metanol (ren), 4.50 l vann og 1.00 l iseddiksyre. Væsken avkjøles før bruk. Sammensetningen av vaskevæsken er, som før nevnt, av største betydning for analyseresultatet, og under praktisk bruk av analysemetoden bør det føres kontroll med blandingen ved hjelp av densimeter og pH-måling. Spesifikk vekt og pH i vaskevæsken ved 20° C er henholdsvis 0.928 og ca. 2.70.

Elueringsvæske.

150 g vannfritt natriumkarbonat oppløses i 4.7 l vann og 5.7 l metanol (ren), tilsettes. Væsken avkjøles og filtreres. pH verdien i elueringsvæsken er ca. 11.5.

18. Utstyr.

Det analyseutstyr som er beskrevet i det følgende er dels ting som er tatt i bruk av forfatteren da analysemetoden høsten 1959 ble tatt i anvendelse for rutineanalyser, dels er det ting som ble omtalt på møte i N.J.F.'s husdyrseksjon sommeren 1961 som forslag til rasjonalisering av analysearbeidet.

Registreringsskjemaer.

For registrering av analyseresultatene er det brukt skjemaer med karbonisert bakside (Fig. 9) i blokker á 4 skjemaer for å få det nødvendige antall kopier for arkivering og distribusjon uten ekstra skrivearbeide. På gårdene utfylles skjemaets hode og rubrikkene for kynnes kjennemerke, samt flaske-

Proteinbestemmelse i mælk

Station

Hold efter tyren.....

Prøver udtaget den / 196 af.....

Fl. nr.	Ko nr.	% protein	1	2		Gns.		Anm.

Farvet / . Elueret / . Målt /

Måler..... Skriver..... Revisor.....

Korrektion.....

Fig. 9. Skjema for registrering og distribusjon av analyseresultatene.
Form for recording and distributing the analysis results.

nummer hvis dette ikke er det samme som kunummer, i overensstemmelse med merkingen av filterpapirene. På laboratoriet påføres de målte ekstinksjoner, prosent protein, etc.

Filtrerpapir.

Til oppsuging av melkeprøvene er det benyttet filtrerpapir, 415×40 mm, av fabrikatet Carl Schleicher & Schüll, (Selecta Nr. 2043 b Mgl.) Denne filtrerpapirkvalitet er velegnet, men en billigere kvalitet i samme tykkelse kan sannsynligvis brukes.

Ved hjelp av blyantstreker er filtrerpapiret delt opp i 6 eller 7 felter, hvert felt med plass til 2 melkeprøver (Fig. 1). Denne inndeling kan også gjøres av fabrikkens ved at det presses tverrgående merker i filtrerpapirstrimlene.

Pipette.

Ved avmåling av melkeprøvene er det brukt $\frac{1}{20}$ ml konstrikjonspipette, carlsbergpipette, med $\pm 0.5\%$ nøyaktighet. Det har vist seg nødvendig at pipettene har en relativt kraftig konstruksjon.

For å gjøre oppsugingen av melkeprøven mer bekvem og samtidig gjøre det lettere å se når melken er sugd tilstrekkelig høyt opp i pipetten, er pipetten forsynt med et ca. 10 cm langt munnstykke av stiv gummislange.

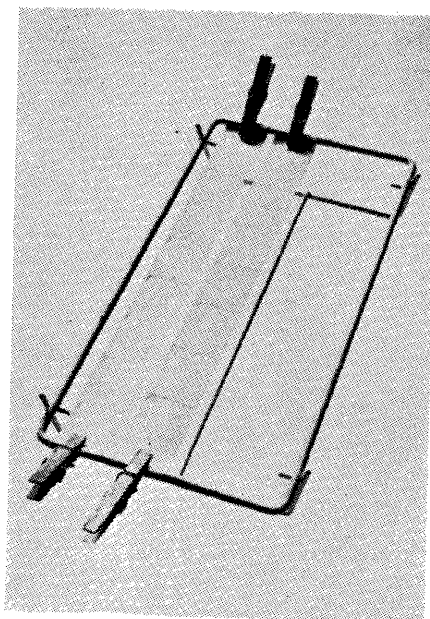
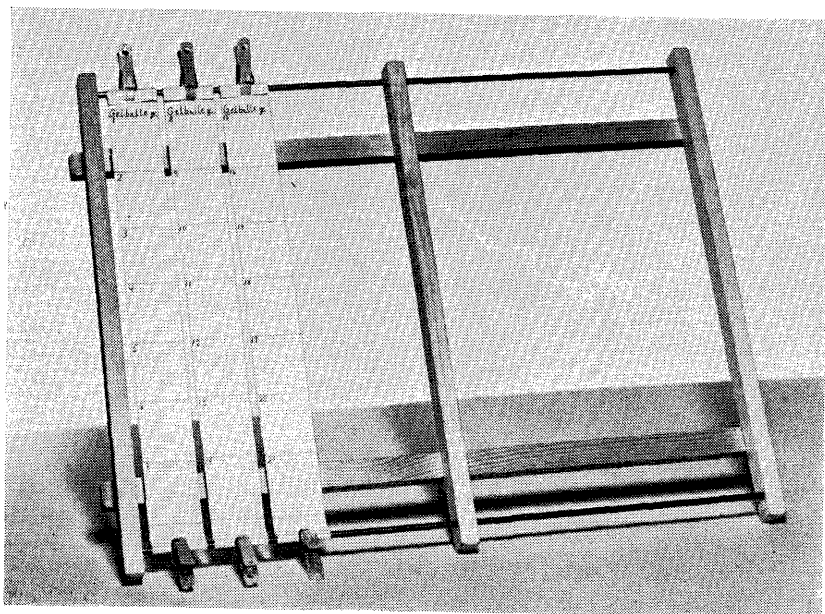


Fig. 10 A. To typer stativer for oppspenning av filtrerpapirene under aplikeringen av melkeprøvene.
Two types of frames for stretching the filter papers during the application of the milk samples.

Fig. 10 B.



Plastsvamp.

Til avtørring av pipetten har en brukt et lite stykke skumplast, ca. 3 cm tykt.

Stativ, rammer, papirholdere.

Under avpipetteringen av melkeprøvene er filtrerpapirene ved hjelp av klyper festet til et stativ. Det har vært to typer stativer i bruk. Den ene stativtype (Fig. 10 A) består av en løs ramme av plastovertrukket metaltråd som hviler på en ramme av samme materiale. Rammen har samme dimensjoner som nedennevnte glassramme. Stativ og rammer er forarbeidet av maskinmester C. Albrechtsen, Dyrefysiologisk Afdeling. Det andet stativ (Fig. 10 B), som er konstruert av assistent Niels Gade, Gelballegård, Lunderskov, består av to tynne messingrør festet i en treramme. Hvert av stativets to felter er 240 mm brede og har plass til 5 filtrerpapir.

Under det senere analysearbeide er filtrerpapirene festet til rammer av 6 mm glasstav. Rammene har plass til 4 filtrerpapir og måler 390×200 mm utvendig. I det lange løp vil rammer av rustfritt stål (syrefast) være vel så fordelaktig som glassrammer. Filtrerpapirene er spent på rammene med rustfri stålklammer av fabrikat Buch & Holm A/S, København.

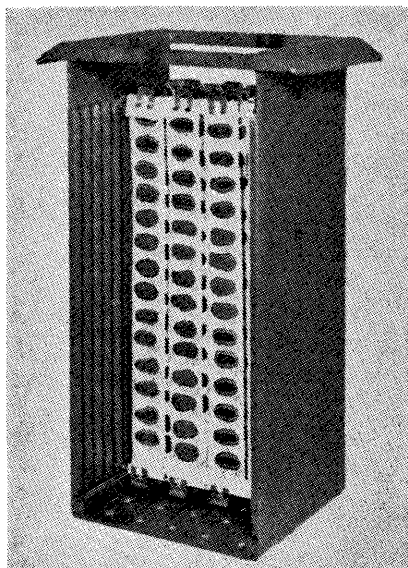


Fig. 11. Analysestativ av truvidur med filtrerpapirstrimler festet til rammer ved hjelp av klemmer av rustfritt stål. Innvendig mål 202×180 mm. Utvendig høyde 450 mm.

Truvidur analysis rack, with filter paper strips fastened to frames by means of stainless steel clips. Internal dimension 202×180 mm. External height 450 mm.

Samlestativ for rammene og analysekar.

For å kunne denaturere og farge et større antall melkeprøver samtidig, blir rammene med filtrerpapirene samlet i et stativ (Fig. 11). Stativet er laget av 4 mm plate av truvidur, en polyester fra Dynamitt A.G. Innvendig

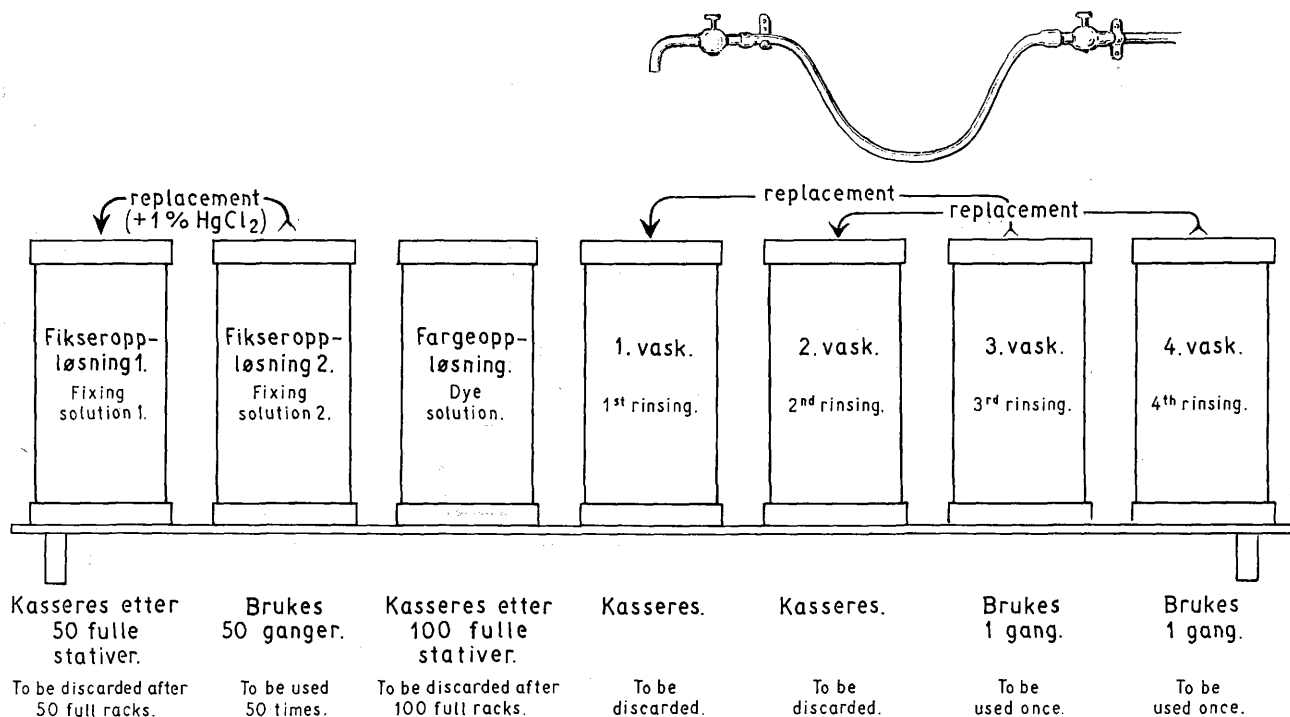


Fig. 12. De nødvendige analysekar og bruken av analysevæskene. Karene av truvitur eller rustfritt stål.

Innvendig mål $190 \times 210 \times 430$ mm.

The requisite analysis jars and use of the analysis liquids. Jars made of Truvitur or stainless steel.

Internal dimensions $190 \times 210 \times 430$ mm.

i stativet er sideplatene påsveiset 10 mm brede lister av samme materiale med 8 mm mellomrum som styring for rammene. Stativets bunn er perforert og to av sidene er åpne for å unngå at kraftig strømning i analysevæskene skal rive filterpapirstrimlene i stykker når stativet flyttes fra bad til bad.

Analysekarene (Fig. 12) er også laget av truidur, men de vil være mer solide om de forarbeides i rustfritt stål (syrefast). Karene er innvendig utstyrt med et nivåmerke til rettledning ved ifyllingen av analysevæske. Kanten av karene er planslipt og når karene ikke er i bruk, er de dekket med lokk for å hindre fordampning. Håndtak på karene vil lette håndteringen. Karene for vaskevæske bør utstyres med tappekran for å lette tømningen. Avløp for væsken kan skaffes ved at det monteres en renne med vannlås til forkanten av bordet med analysekarene.

Stativ og analysekar er levert av firma Buch & Holm A/S, København, etter forfatterens skisser.

Varmluftsvifte.

Til tørking av filterpapirene etter denaturerings- og utvaskingsprosessen er det benyttet en hårtørker. Tørketemperaturen er regulert ved hjelp av avstanden mellom viften og stativet med prøvene.

Blandekar, filter og lagertanker for analysevæskene.

Hvis ikke analyseantallet er særlig stort, kan analysevæskene blandes på store flasker eller ved hjelp av en vanlig spannrører for melk i et rustfritt stålkar med tappekran. Forbruket av vaske- og elueringsvæske pr. melkeprøve er imidlertid så vidt stort, at en ved større drift bør ha blandekar med propellrør.

For filtrering av elueringsvæsken behøves ikke annet utstyr enn trakt og filterpapir. For større drift vil filtreringen kunne ordnes ved at et trykfilter, f.eks. et carlson-filter eller et seitz-filter, settes inn mellom blandekar og lagertank.

For oppbevaring av analysevæskene kan en bruke beholdere av polyetylen eller rustfritt stål (syrefast).

Blandekar og lagertanker til analysevæskene må ha tettsluttende lokk, både for å hindre at væskenes sammensetning skal forandres på grunn av fordampning og for at metanoldampen ikke skal forårsake forgiftning.

Elueringsglass og stativer.

Erlenmeyerkolber, 100 ml, med gummipropp er blitt brukt ved eluering av melkeprøvene. Under elueringsprosessen sto kolbene kronologisk i kurver av plastovertrukket jerntråd.

Ved å bruke reagensglass, 130 ml, i stativ er en gardert mot forveksling av glassene uten at annen merking er nødvendig enn stativets nummer avmerket ved plassen for 1. glass i stativet.

Da det utføres 2 parallellanalyser for hver melkeprøve, vil det være en fordel med 2 rekker prøveglass i stativet, og hvis en ønsker å bruke det senere omtalte pipetteringsapparat, vil 10 glass i hver rekke være passe.

Apparatur for avmåling av elueringsvæske.

Under uteksperimenteringen av metoden, ble elueringsvæsken avmålt med en vanlig 100 ml automatpipette. Denne pipettetype er noe sen å arbeide med, men på grunn av lang leveringstid på annet egnet utstyr, ble den også benyttet etter at analysekapasiteten ved overgang til praktisk bruk av metoden kom opp på ca. 1000 prøver pr. dag.

For tiden brukes det en pipetteringsmaskin ved Forsøgslaboratoriets Dyrefysiologiske Afdeling. Maskinen fremstilles av firma Buch & Holm A/S, København, og er modifisert for avmåling av 100 ml elueringsvæske av firmaet i samarbeide med forsøgsleder, cand. polyt. J. G. Hansen, Dyrefysiologisk Afdeling. Pipetteringsmaskinen (Fig. 13) er en stempelpumpe som avmåler porsjonene av elueringsvæske enkeltvis i hurtig rekkefølge.

Det finnes også en multi-ventilpipette (Fig. 14) for samtidig avmåling av en serie like store kvanta væske, *Johnsen* og *Hadland* (1961). En 100 ml ventilpipette, spesialslipt for nøyaktig avmåling av 100 ml elueringsvæske

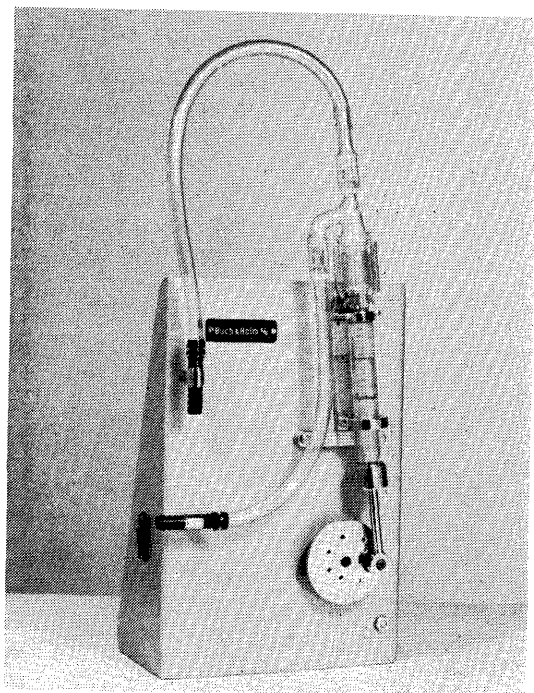


Fig. 13. Pipetteringsmaskin. *Pipetting apparatus.*

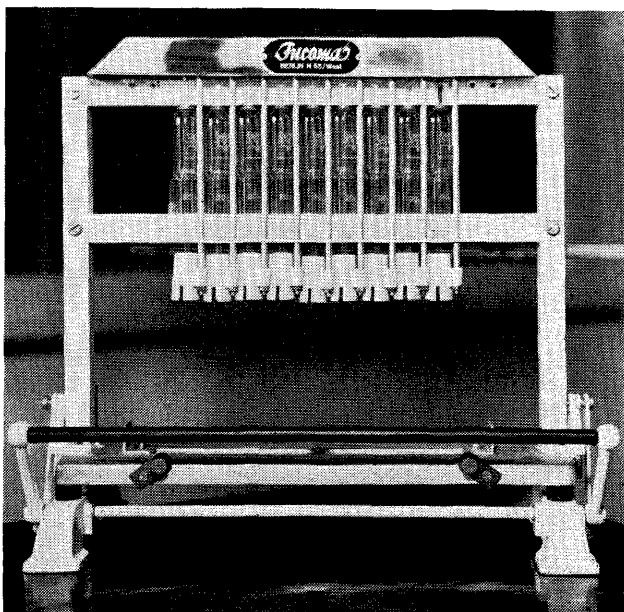


Fig. 14. Multi-ventilpipette. *Multi valve pipette.*

er laget til denne apparattype av firma Fucoma, Berlin, etter skisse levert av firma R. Bjørnstad, Ski pr. Oslo. Med dette apparat fylles et antall glass samtidig og apparatet kan utstyres med en eller to rekker pipetter.

Fotometer, skriver, etc.

Under uteksperimenteringen av analysemetoden ble fargetettheten i eluatet bestemt ved hjelp av et Beckman DU spektrofotometer med firkantet kuvette med 10 mm lysvei. Som spenningsstabilisator og transformator ble Struers Konstavolt benyttet.

Til rutineanalysene er brukt et Beckman C kolorimeter utstyrt med apparatets røde standardfilter med maksimal transmisjon for lys med bølglengden 660 nm, og med blå-følsom fotoselle med måleområde 350 nm – 660 nm.

På grunn av store svingninger i nettspenningen, ble det tatt i bruk en ekstra spenningsstabilisator for å holde apparatets driftstrøm på ca. 220 V. Beckman C apparatet kan også brukes ved 110 V spenning og der det er stor variasjon i nettspenningen, kan det brukes en vanlig stabilisator med 110 V sekundærspenning.

Til Beckman C apparatet er det brukt rund gjennomstrømmingskuvette med 10 mm innvendig diameter. Horisontal forskyvning av kuvetten kan føre til forandring av lysveien og for å gjøre styringen av kuvetten i kuvet-

teholderen sikrere, ble kuvetten påsmeltet to små, diametralt stilte glassknaster. Kuvetteholderen bør limes fast til kolorimeteret. Både når det gjelder støf øring av kuvetten og for å kunne erstatte en knust kuvette med en annen med øyaktig samme lysvei, vil det være en fordel å benytte firkantede gjennomstrømningskuvetter, levert i garantert ensartede serier.

For å oppnå hurtig tømning av gjennomstrømningskuvetten, er denne forbundet til en vannstrålepumpe med en slange. Under avlesningen av kolorimeteret, blir slangen klempt sammen ved hjelp av en fotpedal. Dette utstyr føres av firma Struers, København.

I løpet av det siste års tid er det bl.a. kommet et nytt Beckman spektrofotometer på markedet, modell DB. Forfatteren har ikke hatt mulighet for å prøve dette apparatet med gjennomstrømningskuvette, men det er sannsynlig at det vil være bedre egnet til bruk i forbindelse med analysemetoden enn de to apparater som er nevnt foran.

De moderne automatiske skrivere vil registrere måleresultatet meget hurtig og en unngår den mulighet for ukontrollerbar feilavlesning og feilskrivning som er tilstede ved visuell avlesning av fotometeret. Før målingen av hver ny prøve, blir kuvetten skyllet med litt av prøven. For å unngå at disse skyllinger blir registrert av skriveren, kan fotpedalen for vannstrålepumpen kobles til en bryter for skriverens servomotor.

Flasker og kassetter til forsendelse av kontrollprøver.

Ved forsendelse av melk fra gårdene til kontrollanalyse etter kjeldahlmetoden er det brukt glassflasker, 100 ml, med gummipropp. Flasker av plast som tåler varmesterilisering kan med fordel brukes. Prøveflaskene blir merket ved hjelp av gummiproppene som er utstyrt med et rundt metallskilt med innpreget nummer. Nummerskiltet er festet med 2 metallstifter, som går et par cm ned i proppen. Merkesystemet er tidligere benyttet av *Taraldsen* (1959).

Til emballering av flaskene under forsendelsen er det benyttet firkantede treklosser med utboret hull til én flaske. Kassetten lukkes med en kork, som sikres ved hjelp av klebeband eller en snor. Kassetten er høvlet utvendig for at merkelapp og frimerke kan klebes direkte på en av sidene. For å beskytte flasken mot brekkasje, må klaringen mellom flasken og kassetten være minst mulig og det bør legges vatt eller skumplast i bunnen av kassetten.

19. Beskyttelsesforanstaltninger mot metanolforgiftning.

Da metanoldamp er giftig, må det være god ventilasjon i arbeidslokale og det bør være avtrekkshatt over farge- og vaskebadene og over pipetteringsapparatet. Tørkingen av fargede prøver bør foregå i skap med avtrekk.

Der det dreier seg om store mengder analysevæske, må det være eget lokale, med spesielt god ventilasjon, for blanding og lagring av analysevæ-

sker og lagring av metanol. Uvedkommende må ikke ha adgang til metanollageret.

Emballasje og tappekraner for metanol må merkes tydelig med navnet *metanol og giftmerke*.

20. Sammendrag.

En ny kolorimetrisk metode for proteinbestemmelse i melk er beskrevet. Utformingen av metoden er basert på at proteinbestemmelsene utføres på et analyselaboratorium, men da prøvene, som utgjør $\frac{1}{20}$ ml melk, kan sendes i tørr tilstand, oppsugd i filterpapir, vil forsendelsesomkostningene være minimale.

På laboratoriet farges filterpapirene med amidosvart etter samme prinsipp som ved farging av elektroforetogrammer. Den fargemengde som bindes til melkeprotein, bestemmes ved at fargen trekkes ut med en elueringsvæske og fargetettheten i væsken måles fotometrisk. En oversikt i 12 punkter over analysemetoden finnes på side 5 og 6.

Tørre, ubehandlede melkeprøver kan oppbevares i lang tid når de ikke utsettes for fuktighet. Det samme gjelder fargede prøver som oppbevares tørt og mørkt. Eluerte melkeprøver bør ikke stå mer enn et par døgn og oppbevaringstemperaturen bør ikke være vesentlig høyere enn 30° C.

Den klassiske kjeldahlanalyse er både benyttet som sammenligningsgrunnlag for å bestemme den kolorimetriske analysemetodes sikkerhet og ved utarbeidelsen av formlene for omregning av de fotometriske måleresultater til prosent protein. Hvor stor del av den forskjell som er funnet mellom analyser, utført etter de to metoder som kan føres tilbake til kjeldahlanalysene, er ikke undersøkt.

Ved de grunnleggende undersøkelser ble den kolorimetriske proteinbestemmelse utført ved hjelp av Beckman spektrofotometer model DU. Ved to undersøkelser som omfattet ca. 100 melkeprøver, ble det – med 95 % konfidenssannsynlighet for en analyse – funnet konfidensintervaller på henholdsvis ± 0.12 og ± 0.14 prosentenheter kjeldahlprotein. For vel 100 melkeprøver, hver med 6 parallellanalyser, var middellavviket på de enkelte ekstinksjoner ca. $\pm 1\%$ av måleverdiene. 175 melkeprøver ble analysert 2 eller flere ganger med 3–6 parallellanalyser hver gang. Det ble funnet systematisk forskjell mellom analyser utført på forskjellig tidspunkt. Denne forskjell var til dels helt ubetydelig, men undersøkelsen tyder på at en må regne med slik systematisk forskjell av størrelsesorden ca. 1% av måleverdiene.

Det er ikke undersøkt hvorvidt det er noen forskjell mellom de forskjellige feraser med hensyn til melkeproteinets fargebindingsevne. De relativt snevre konfidensintervaller som er funnet i ovennevnte undersøkelser, hvor det var med melk fra alle de tre danske melkeferaser, tyder ikke på at der er meget å vinne i analysesikkerhet ved å behandle hver rase for seg.

Etter at analysemetodens sikkerhet som laboratoriemetode for bestem-

melse av proteininnholdet i melk fra enkeltkyr var undersøkt, ble metoden tatt i praktisk bruk. For å kunne utføre målingen av fargetettheten i elueringsvæsken hurtig, ble et Beckman C kolorimeter med gjennomstrømmingskuvette benyttet.

For ca. 300 melkeprøver hvor proteininnholdet er bestemt ved hjelp av Beckman C apparat, er det funnet et middelviki på ± 0.094 prosentenheter protein ved sammenligning med kjeldahlanalyse av de samme melkeprøver. Alle ledd i analysene ved denne undersøkelse er utført på laboratoriet.

Under den praktiske bruk av analysemetoden tar assistentene på gårdene ut melkeprøvene og avsetter dem på filterpapiret. I forbindelse med dette er det regelmessig blitt sendt melkeprøver til Dyrefysiologisk Laboratorium for kontrollanalyse etter at assistenten på gården først har applikert prøver av melken. For ca. 500 slike kontrollprøver ble det funnet at den kolorimetriske analyse i middel hadde gitt 0.08 prosentenheter høyere proteinverdier enn kjeldahlanalysen. Uttrykt ved middelviki var forskjellene mellom melkeprøver analysert etter de to metoder ± 0.142 prosentenheter protein. En del av de forskjeller som er funnet skyldes at noen av de konstruksjonspipetter som har vært brukt var uegnede.

Erfaringene fra arbeidet med proteinanalysene har vist at nøyaktig avmåling av en melkeprøve på $\frac{1}{20}$ ml krever øvelse og nøyaktighet hos prøvetakeren og en lys og hensiktsmessig arbeidsplass.

For skummet melk, kondensert ved lav temperatur, er det funnet retlinjet proporsjonalitet mellom ekstinksjon og proteininnhold fra ca. 1 % til ca. 6 % protein. Det vil således være nødvendig å fortynne melkeprøver med særlig høyt proteininnhold før analyseringen. For 17 melkeprøver med proteininnhold mellom 4.5 % og 5 %, som er analysert ved hjelp av Beckman C apparatet, var middelviki ved sammenligning med kjeldahlanalysen ± 0.215 prosentenheter eller ± 4.6 %. Dette tyder på at en må regne med noe mindre avmålingsnøyaktighet når det tas prøve av tørrstoffrik enn av tørrstofffattig melk.

Det er utført en del analyser av melk som avviker fra det normale. Proteininnholdet i kolostrummelk kan ikke bestemmes uten videre, men ved fortynning av kolostrummelken med vann i forholdet 1 : 2 er det oppnådd forholdsvis god overensstemmelse med kjeldahlanalysene. Undersøkelsen tyder på at proteininnholdet kan bestemmes med vanlig sikkerhet uten fortynning ca. en uke etter kalving.

Sinamelk fra 4 kyr er analysert og den kolorimetriske metode har gitt noe lavere proteinprosent enn kjeldahlmetoden.

Også for melk fra kyr med jurlidelser ser det ut til at den kolorimetriske proteinbestemmelse er mer usikker enn for vanlig melk.

Noen få analyser av sterilisert, kondensert melk tyder på at sterk varmebehandling av melken nedsetter melkeproteinets fargebindingsevne.

En mindre undersøkelse over syrningsprosessens innvirkning på fargebindingen i melken, tyder på at såsant melken ikke er koagulert, kan den analyseres med samme sikkerhet som søt melk. Koagulert melk kan, på grunn av vanskelighetene med avmålingen, ikke analyseres ved hjelp av denne kolorimetriske metode.

Kjemikalier og analysevæsker, samt laboratoriestyr og andre hjelpemidler til bruk under arbeidet med rutineanalyser av protein i melk er beskrevet i meldingen.

21. Summary.

Introduction.

A colorimetric method for determination of protein in milk is described.

The determination must be effected in an analytical laboratory, but as the milk samples, which are $\frac{1}{20}$ ml in volume, can be sent in dry state, absorbed into filter paper, the cost of dispatch will be very small.

At the laboratory the filter paper is stained by means of amido-black, on the same principle as in the staining of electrophoretograms. The amount of stain which is combined with the milk protein is determined by extracting the stain by means of an eluting solution and then measuring photometrically the degree of stain in the liquid.

The suitability of the method for protein determination in milk from individual cows is examined.

Conservation of milk for colorimetric protein analysis.

Research has indicated that $K_2Cr_2O_7$ affects the power of the milk protein to bind the stain. Samples of fresh milk, which for purposes of control have been sent to the laboratory, have therefore been given an addition of 3 drops saturated, aqueous solution of $HgCl_2$ per 50–70 ml milk. Conservation with this amount of $HgCl_2$ is effective only for a few days' storage of the milk samples, unless these are refrigerated.

Taking of samples.

The milk samples are taken at about 20° C. Stored samples are heated to 35–40° C, shaken and cooled. Just before the taking of the samples the bottles are turned upside down a couple of times. Any formation of froth will make an accurate measurement difficult.

For measurement of the samples use is made of a constriction pipette holding $\frac{1}{20}$ ml. The pipette is calibrated with an accuracy of $\pm 0.5\%$.

The samples are applied to strips of filter paper measuring 415×40 mm (Fig. 1). Filter paper of this size can be divided into as many as 7 fields, each with space for two milk samples. Division of the filter paper into fields can be performed by pencil strokes or by mechanically impressed transversal lines. Selecta filter paper No. 2043 b Mgl, Schleicher & Schüll, was used at the laboratory, but a cheaper kind may well be employed.

Before applying the samples, the pipette is dried on the outside with a plastic sponge. During application the pipette is passed slowly over the filter paper, and, as the remainder of the milk is blown out of the pipette, the latter is drawn along dry paper, in order to avoid small drops of milk being blown about and any milk being drawn back into the pipette by capillary action. After application the tip of the pipette is dried off on two sides against the edge of the filter paper, in order that milk which may have been drawn up along the outside of the pipette shall be included in the analysis. The milk sample is distributed over an area of 3–4 cm². This is particularly important when operating with milk having a high content of solids.

Dilution of milk with high protein content.

The analytical method has not been found reliable for milk which has a higher content of protein than approx. 6% (Fig. 2). Milk which is particularly rich in protein must therefore be diluted before the application. Dilution with equal parts of water has been used.

Drying, storing and dispatch of filter paper containing milk samples.

Filter paper containing milk samples can be dried by allowing to stand for a while at room temperature, or by means of a hot air fan working with low temperature.

Dry samples can be kept for a long time (Table 1 and Main Table III). During drying and storage the filter papers must be protected against insects, as the excrements of these bind stain.

Filter paper containing dried milk samples can be folded and sent in an ordinary envelope.

Fixing of the milk protein to the filter paper.

The protein is fixed to the filter paper by immersion for 15 minutes in 1% HgCl_2 in ethanol. Then the filter papers are immersed for 5 minutes in 1‰ HgCl_2 in ethanol, in order to restrict the amount of HgCl_2 which is transferred to the stain solution. After the fixing the filter paper is dried in the way described in the foregoing section.

Staining of the milk samples.

Amido-black has been found suitable for the staining of milk samples. One must count on some variations in stain content in the preparations which are now on the market, but small deviations in stain concentration will not affect the analysis results, as the staining solution contains a large excess of pigment.

The stain solution is mixed in the following way: 5.70 l methanol p.a., 2.00 l water are mixed and whilst being stirred, poured slowly into a

solution of 70 g amido-black in 2.50 l water and 1.00 l acid aceticum glaciale. The pH in the stain solution is approximately 2.90.

The milk samples are kept immersed in the stain solution for 30 minutes.

To remove the stain from that part of the filter paper where no milk is deposited, the following rinsing solution is used: 5.70 l methanol, technical, 4.50 l water and 1.00 l acid aceticum glaciale. The specific weight and pH of the rinsing solution at 20° C are approximately 0.928 and 2.70 respectively. In practice the composition of the rinsing solution should be checked by means of a densimeter and pH measurement. The rinsing solution is cooled to room temperature before use. Use of the reagents is illustrated in Fig. 12.

The rinsing is effected in the following four stages: 1) The rack holding the filter papers is moved up and down in the rinsing solution for half a minute. 2) The same is repeated, without movement of the rack, for 30 minutes. 3) Ditto for 45 minutes. 4) Ditto for 45 minutes. The filter paper strips must not touch one another during the staining, rinsing or drying process. When an analysis rack (Fig. 11), with small distance between the filter papers is used, the papers must be made taut after stage 1 in the rinsing process, by turning the clips. The filter papers are dried by means of a hot air fan operating with low temperature.

Stained milk samples which are stored in a dry place and in darkness can be kept for a long time (Table 1).

Quantitative measurement of stain bond.

The strips of filter paper are cut across between the samples and the separate pieces laid in test tubes, covered with 100 ml eluting solution, closed with rubber stopper and allowed to stand for at least 20 hours.

The eluting solution used at the laboratory consists of 150 g Na_2CO_3 , anhydr., 4.7 l water and 5.7 l methanol, technical. The solution is cooled and filtered before use. The pH of this eluting solution is approximately 11.5.

The optical density in the eluate is measured photometrically and the wavelength should be 627.5 nm (Fig. 4). The elution tubes are turned upside down a couple of times before the measurement.

Amido-black which is dissolved in the eluting solution directly will, even at room temperature, quickly decline in optical density (Table 5). Amido-black which has first been combined with protein and subsequently dissolved in eluting solution appears to be more stable, but at high temperature or under strong illumination the intensity of colour will decrease (Tables 6 and 7). Eluted milk samples should therefore not be kept at temperatures much higher than 30° C and not longer than 2 or 3 days.

Reliability of the analytical method as a laboratory method for protein determination in milk from individual cows.

The classical Kjeldahl analysis has been used both as basis of comparison for determining the reliability of the colorimetric analytical method and

in the drawing up of formulas and tables for conversion of the photometrical measurement results to percentage of protein. What proportion of the differences found between analyses performed according to the two methods that can probably be ascribed to errors in the Kjeldahl analysis, has not been investigated.

In the conversion of percent Kjeldahl-N to percent Kjeldahl-protein, the factor 6.37 has been used.

In the basic investigations the colorimetical protein determination was performed by means of a Beckman DU spectrophotometer, with cuvette with 10 mm light-path. Distilled water was used as reference. In two investigations comprising about 100 milk samples there were found, with 95% probability of reliability for an analysis, reliability intervals of ± 0.12 and ± 0.14 percentage units Kjeldahl-protein respectively. For 127 milk samples, each with 6 parallel analyses, the mean deviation, calculated on the basis of the individual extinctions, was approx. $\pm 1\%$ of the measurement figures. 175 milk samples were analysed twice or several times, with 3–6 parallel analyses each time. Systematic differences were found between the analyses performed on different days. These differences were in some cases quite insignificant, but the investigations indicate that one must reckon with such systematic differences to the extent of about 1% of the measurement values (Tables 3, 8 and 9, Main Tables I, II, III and IV. Figs 5 and 6).

In order to be able, in practical use of the analytical method to perform quick measurements of the optical density in the eluate, use was made of a Beckmann C colorimeter, with round through-flow cuvette with an inside diameter of 10 mm. The red, standard filter, with maximum transmission at wave-length 660 nm, was used, and the measurements were performed by means of a blue-sensitive photo-cell having a measuring range of 350–660 nm. Distilled water was used as reference.

Between the two series of tests, the results of which are given in Figs 7 and 8 respectively, the apparatus has been fitted with an extra voltage stabilisator, and the control of the cuvette in the adapter has been improved by fusing on to the cuvette two small, diametrically placed, glass knobs.

In a material consisting of about 300 samples, where the protein content is determined by means of the Beckman C apparatus and a conversion table drawn up on the basis of another material, there was found a mean deviation of ± 0.094 percentage units protein in comparison with the Kjeldahl analysis. All the steps of the analysis in the investigation were carried out at the laboratory (Table 10, Main Table V).

Practical use of the analytical method in the determination of the protein content in milk from individual cows.

In application of the method samples of liquid milk are regularly sent

to the laboratory for control analysis, after the workers at the farms having taken samples in the usual way. In the case of approx. 500 such control samples it was found that the colorimetric analytical method had on an average given 0.08 percentage units higher protein values than the Kjeldahl method. Expressed as a mean deviation the difference was ± 0.142 percentage units protein. A proportion of the differences found is due to the fact that some of the constriction pipettes used were unsuitable, and for this reason no thorough analysis of this material was carried out. (Main Table VI).

In the case of 17 milk samples with protein content between 4.5 and 5%, which were analysed by means of the Beckman C apparatus (Main Tables V and VI), the mean deviation was ± 0.215 percentage units in comparison with the Kjeldahl analysis, or relatively $\pm 4.6\%$. This suggests that it is necessary to reckon with a somewhat smaller degree of pipetting accuracy when samples are taken from milk rich in solids than from milk poor in solids. No systematic errors have been found which can be ascribed to the high protein percentage.

No investigation has been made as to whether there is any difference between the different breeds of cattle as regards the colour-binding power of the milk. The relatively narrow intervals of reliability which have been found in investigations including milk from the 3 Danish milk breeds do not suggest that there is much to be gained in analytical certainty by using a regression equation for each breed (Figs 5 and 6).

The work on the milk analyses shows that accurate measurement of a milk sample of $\frac{1}{20}$ ml requires practice and exactness in those performing this work, and light and convenient premises.

Analysis of milk which deviates from the normal.

The protein content in colostrum cannot be determined immediately, but by diluting it with water in the proportion 1 : 2 relatively good agreement was found with the Kjeldahl analyses. Experience has shown that the protein content can be determined with normal certainty about one week after calving, without having to dilute the milk (Tables 11, 12 and 13).

Milk from 4 cows which were almost dry, was examined. The colorimetric method showed somewhat lower protein percentages than the Kjeldahl method (Table 14).

Also in the case of milk from cows afflicted with udder ailments it appears that the colorimetric protein determination is less reliable than it is for ordinary milk (Table 15).

Some few analyses which have been performed on sterilized, condensed milk suggest that a strong heat treatment reduces the power of the milk protein to bind amido black.

A small investigation of the effect of the acidifying process on the stain bond in the milk shows that, unless the milk has coagulated, it can be

analysed with the same accuracy as fresh milk. Coagulated milk cannot be analysed by means of the colorimetric method, owing to the difficulty of pipetting the milk off (Table 16).

Chemicals, appliances etc.

On page 35 a list is given of chemicals for making the various reagents, and on pages 36–44 there is a description of the equipment taken into service when the analytical method was adopted for routine analyses. Account is also given of some suggestions for rationalization which were put forward at the meeting of N.J.F.'s Livestock Section at Kalnes, Norway, 1961. Some supplementary information is given below.

In the making of the reagents use has been made of de-ionised water which has passed through three columns of resins.

The form (Fig. 9) has a carbon back, and is made up into pads with 4 copies.

For stretching of the filter papers during application of the milk samples two types of frames have been used (Fig. 10 A and 10 B). The frame at the top has room for 4 filter papers and consists of a frame and a holder made of plastic-covered metal wire. The frame at the bottom consists of two thin brass tubes fastened to a wooden frame and has room for 10 filter papers. The filter papers are fastened to the frame by means of ordinary clothes clips.

The frames used for stretching the filter papers during the analyses (Fig. 11) measure 390×210 mm on the outside and the diameter of the material of which they are made is 6 mm. The frames may be of glass or of polished stainless steel. The clips are made of stainless steel.

The analysis rack (Fig. 11) is made of a 4 mm sheet of the polyester Truvidur. For operating the frames the rack is fitted with lists, 10 mm wide, made of Truvidur, and welded on at intervals of 8 mm. The rack can hold 10 frames.

The jars (Fig. 12) can be made of Truvidur or stainless steel. The four jars for the rinsing solution should be fitted with a crane at the bottom and an outlet gutter with trap should be installed under the cranes. A hand lever will facilitate moving of the jars.

The consumption of rinsing and eluting solutions is relatively large, 60–70 ml and 100 ml respectively per single analysis. For large-scale operation it will therefore be convenient to use mixing vats of stainless steel, with lid and mechanical stirrer. Filtration of the eluting solution can be arranged by placing a filter (for example, Carlson or Seitz) between the mixing vat and the storage tank.

The pipetting device (Fig. 13) is a piston pump which measures off single portions of 100 ml eluting solution rapidly. The multivalve pipette (Fig. 14) measures off simultaneously a number of portions of eluting solution, and the apparatus can be fitted with one or two rows of pipettes. Racks

containing two rows of 10 reagent tubes holding 130 ml, are included in the apparatus

To obtain rapid emptying of the through-flow cuvette during the photometrical measurement, the cuvette is connected by a hose to a water-spraying pump. For reading of the colorimeter the flow of liquid is stopped by squeezing the hose with a foot pedal.

In the investigations use has, as already mentioned, been made of a cuvette with 10 mm light path. Where the investigation relates to milk samples with a high protein content it may be an advantage to use cuvettes with a somewhat smaller light path, for example 8 mm, as all the readings will then be taken within the range of the colorimetric scale where the intervals are relatively large. A further advantage is that the work proceeds within the range of measurement on the colorimeter in which the Lambert-Beer's law holds good, even if it includes samples with an extremely high protein content.

The reason why a round cuvette has been used for the Beckman C apparatus is that rectangular through-flow cuvettes were unprocurable in matched series at the time routine analyses were to be started.

Besides the two photometers mentioned earlier there is now on the market an apparatus, the Beckman spectrophotometer DB, which seems well fitted for use. There has not been opportunity to try the apparatus with a through-flow cuvette.

If it is desired to use a recorder for registration of the measurement results, the recorder's servomotor can be coupled to a switch on the foot pedal which regulates the flow of liquid from the cuvette.

For dispatch of the milk for control analysis, either glass bottles, or plastic bottles which bear heat sterilization, may be used. For purposes of identification, the bottles are fitted with a rubber stopper bearing a fixed metal label with embossed number. As packing material is used a square block of wood with hole for the bottle. The cassette is closed with a cork held in place by tape or string.

Out of regard for the risk of poisoning from methanol vapour, attention must be given to the ventilation of the laboratory.

22. Litteratur.

- Ashworth, U. S., Seales, R. og Erb, R. E. (1960): An Improved of Procedure for the Determination of Milk Proteins by Dye Binding. *J. Dairy Sci.*, 43, 614.
- Drevon, B. (1954): Perfectionnement a l'électrophorèse sur papier des protéines sériques: Décoloration des bandes par extraction au Kumagawa. *Bull. Sté. Chim. Biol.*, 36, 921.
- Franglen, G. T. (1953): An Improved Apparatus for the Filter Paper Electrophoresis of Serum and Other Proteins. *J. Clin. Pat.* 6, 183.
- Franglen, G. T. og Martin, N. H. (1954): The Interaction of Dyes with Proteins on Paper with Special Reference to Paper Electrophoresis. *The Biochemical J.* 57, 626.
- Glick, D. (1949): *Techniques of Histo- and Cytochemistry*, 172.
- Grassmann, W. og Hannig, K. (1952): Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese. *Hoppe-Seyler's Zschr. f. physiol. Chemie*, 290, 1.
- Grassmann, W. og Hannig, K. (1954): Beiträge zur Methodik der Papierelektrophoretischen Serumanalyse. *Klinische Wochenschrift*, 32, 838.
- Guillien, R. og Hermann, G. (1955): Über die Adsorption von Bromphenolblau an zellulosegebundene Serumeiweisse. *Zschr. f. Naturforschg.*, 10b, 206.
- Haugen, A. E. (1959): Kvantitativ bestemmelse af protein i mælk. *Årbog, Forsøgslaboratoriets Efterårsmøde*, 371.
- Haugen, A. E. (1961a): Protein content of cows' milk. Effect of transition from indoor feeding to grazing. *Festschr. z. VIII. Intern. Tierzuchtkongr. in Hamburg, Schlussber.*, 145.
- Haugen, A. E. (1961b): En kolorimetrisk metode til kvantitativ proteinbestemmelse i mjølk. *Nordisk Jordbrugsforskning*, 43, 157.
- Heide, K. og Biel, H. (1958): Korrektur der bei Transparenzmessungen von Papierelektrophoresen auftretenden Störungen. *Behringwerk-Mitteilungen*, 35, 75.
- Jakobsen, P. E. (1957): Proteinbehov og proteinsyntese ved fosterdannelse hos drøvtyggere. 299. beretning fra forsøgslaboriet, København, 30.
- Jakobsen, P. E. (1962): Personlig meddelelse.
- Johnsen, O. og Hadland, G. (1959): Amidosvart-metoden for proteinanalyser i ost og andre mjølkeprodukter. *Melding nr. 84 fra Meieriinst. ved Norges Landbrukshøgskole*.
- Johnsen, O. og Hadland, G. (1961): Amidosvart-metode med direkte fargemåling og automatisk registrering av proteininnholdet. *Melding nr. 100 fra Meieriinst. ved Norges Landbrukshøgskole*.
- Lewin, J. og Hillon, P. (1956): Fixation et coloration des électrophorégrammes des protéines. *Ann. de Biol. Clin.*, 14, 22.
- LKB (1956): Prospekt, *LKB-Produkter AB, Stockholm*.
- Moustgaard, J. og Neimann-Sørensen, A. (1959): Komælkenes proteinindhold. *Årsber., Inst. f. Sterilitetsf., København*, 113.
- Pedersen, Aa. H. (1961): Undersøgelser over metoder til bestemmelse af besætningsmælks sammensætning specielt med henblik på proteinindholdet. 130. beretning fra Statens Forsøgsmejeri.

- Pezold, F. A. og Peiser, U. (1953): Untersuchungen über die Affinität Papierelektrophoretisch Aufgetrennter und Denaturierter Serumproteinfraktionen gegenüber den Eiweissfarbstoffen Amidoschwarz, Azocarmin und Bromphenolblau. *Klinische Wochenschrift*, 31, 982.
- Posthumus, G. (1960): De bepaling van het eiwitgehalte in melk op grote schaal door middel van de kleurstofbindingsmethode. *Nederlands Melk- en Zuivel-tijdschrift*, 14, 319.
- Raadsveld, C. W. (1961): Mass Protein Testing of Milk. *Dairy Eng.*, 78, 243.
- Rötger, H. (1953): Ein neues Lichtelektrisches Auswertegerät des Papier-Elektrophoresestreifens. *Klinische Wochenschrift*, 31, 85.
- Schneider, G. (1951): Brauchbarkeit und Anwendungsbereich der Papierelektrophorese für Serumproteine. *Acta Chem. Sca.*, 5, 1020.
- Schober, R. og Hetzel, H. F. (1956): Über eine einfache, Kolorimetrische Bestimmung von Milchproteine. *Milchwissenschaft*, 11, 123.
- Simon, K. (1957): Fehlerquellen der Papierelektrophorese. *Zschr. inn. Med.*, 12, 113.
- Sommerfelt, S. Chr. (1953): Comments Regarding the Evaluation of Paper Electrophoresis of Proteins. *The Scand. J. of Clin. & Lab. Inv.*, 5, 105.
- Steinsholt, K. (1957): En kolorimetrisk metode til kvantitativ bestemmelse av protein i mjølk. *Melding nr. 55 fra Meieriinst. ved Norges Landbrukshøgskole*.
- Steinsholt, K., Døvle, H. og Solberg, P. (1960): Om den kvantitative kolorimetriske bestemmelse av mjølkeprotein ved hjelp av amidosvart 10 B. *Meldinger fra Norges Landbrukshøgskole*, 39, 18.
- Taraldsen, T. K. *Analysen, Hamar, Norge*, (1959): Personlig meddelelse.
- Turba, F. og Enenkel, H. J. (1950): Elektrophorese von Proteinen in Filtrierpapier. *Naturwissenschaften*, 37, 93.
- Wunderly, Ch. (1953): Die Papierelektrophorese. *Chimia*, 7, 145.

23. Hovedtabeller.

Hovedtabell I. Reproduserbarheten på parallellanalyser innenfor samme analyse-serie. Fargetettheten i eluatet målt med Beckman DU spektrofotometer.

*Repeatability of parallel analyses within the same analytical series.
Optical density in eluate measured with a Beckman DU spectrophotometer.*

Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.
Prøver uttat 26/5-59. Farget 14/6. Målt 27/6.						
1	.336	.327	.334	.339	.326	.332
9	.343	.338	.332	.333	.330	.334
43	.325	.323	.325	.324	.329	.324
44	.330	.332	.331	.332	.327	.324
47	.278	.278	.279	.283	.282	.275
88	.290	.291	.293	.289	.290	.285
277	.309	.310	.311	.311	.307	.306
281	.286	.280	.284	.281	.283	.280
287	.315	.313	.316	.317	.312	.317
289	.297	.295	.298	.300	.294	.299

Prøver uttat 28/5-59. Farget 13/6. Målt 1/7.						
1	.327	.326	.331	.331	.333	.330
9	.324	.328	.325	.324	.325	.330
43	.321	.319	.320	.317	.314	.316
44	.329	.328	.330	.321	.326	.328
47	.294	.293	.294	.293	.295	.293
88	.291	.296	.293	.293	.292	.293
277	.311	.308	.309	.306	.305	.309
281	.281	.281	.282	.279	.279	.281
287	.316	.313	.317	.320	.307	.316
295	.289	.285	.288	.288	.286	.287

Prøver uttat 2/6-59. Farget 13/6. Målt 11/7.						
1	.323	.323	.320	.318	.320	.330
9	.339	.335	.331	.335	.340	.334
43	.315	.326	.308	.310	.310	.318
44	.309	.309	.317	.311	.310	.308
47	.251	.255	.257	.253	.253	.256
88	.268	.268	.269	.264	.269	.267
277	.288	.293	.292	.291	.290	.293
281	.278	.278	.278	.270	.267	.272
287	.274	.277	.278	.277	.277	.277
289	.279	.282	.282	.277	.276	.278

Prøver uttat 9/6-59. Farget 13/6. Målt 14/7.						
1	.340	.339	.340	.333	.338	.342
9	.336	.334	.337	.335	.333	.330
43	.333	.336	.338	.337	.334	.333
44	.334	.334	—	.330	.331	.327
47	.291	.290	.293	.293	.291	.292
88	.299	.295	.293	.293	.293	.290
277	.315	.321	.317	.319	.314	.320
281	.306	.303	.312	.305	.305	.305
289	.298	.298	.306	.298	.301	.299

Hovedtabell I (fortsat).

Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.
Prøver uttatt 16/6-59. Farget 17/6. Målt 22/7.						
1	.338	.341	.339	.340	.334	.347
9	.346	.339	.345	.340	.333	.347
43	.335	.344	.338	.336	.340	.340
44	.327	.332	.330	.330	.334	.330
47	.289	.291	.295	.291	.289	.291
88	.298	.295	.299	.297	.292	.293
277	.310	.310	.317	.313	.313	.315
281	.305	.307	.307	.307	.306	.306
287	.318	.322	.318	.314	.314	.314
289	.299	.304	.305	.295	.295	.296

Prøver uttatt 11/8-59. Farget 13/8. Målt 18/8.

9	.337	.345	.332	.334	.338	.336
J. 28	.327	—	.331	.347	.332	.331
J. 40	.287	.288	.286	.293	.293	.289
90	.293	.294	.302	.293	.295	.299
171	.249	.249	.252	.246	.246	.248
189	.251	.253	.254	.252	.252	.256
223	.254	.260	.262	.259	.260	.262
J.342	.350	.348	.347	.344	.339	.340

Prøver uttatt 12/8-59. Farget 13/8. Målt 19/8.

9	.327	.329	.332	.326	—	.327
10	.344	.347	.346	.342	.341	.355
J. 28	.337	.350	.349	.339	.337	.334
J. 40	.291	.291	.297	.292	.288	.292
90	.302	.298	.303	.302	.298	.305
91	.287	.288	.292	.286	.287	.290
171	.262	.257	.262	.256	.259	.264
189	.254	.255	.259	.280	.254	.260
223	.264	.263	.264	.263	.261	.267
J.342	.353	.345	.353	.347	.352	.348

Prøver uttatt 13/8-59. Farget 19/8. Målt 25/8.

J. 55	.254	.250	.250	.246	.246	.250
J. 56	.303	.298	.304	.295	.304	.309
77	.293	.297	.301	.296	.299	.299
88	.273	.274	.273	.271	.273	.275
171	.237	.242	.245	.235	.238	.242
189	.238	.237	.240	.238	.237	.237
199	.265	.264	.266	.261	.264	.264
229	.243	.244	.249	.243	.244	.244
233	.288	.288	.288	.288	.288	.292
343	.334	.342	.331	.334	.321	.322

Hovedtabell I (fortsat).

Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.
Prøver uttatt 14/8-59. Farget 19/8. Målt 25/8.						
J. 55	.254	.251	.255	.248	.252	.252
J. 56	.307	.312	.309	.302	.311	.313
88	.284	.283	.284	.279	.279	.285
171	.258	.258	.256	.258	.257	.261
189	.240	.239	.242	.242	.239	.242
199	.262	.259	.262	.264	.262	.263
229	.243	.246	.246	.244	.243	.247
233	.291	.291	.292	.293	.288	.288
289	.274	.279	.281	.273	.276	.277
343	.343	—	.342	.340	.336	.334

Prøver uttatt 18/8-59. Farget 19/8. Målt 26/8.						
9	.331	.326	.328	.327	.322	.320
10	.361	.354	.369	.361	.357	—
91	.294	.297	.295	.293	.292	.296
189	.260	.261	.261	.258	.259	.259
199	.261	.263	.262	.258	.260	.264
229	.252	.252	.254	.248	.247	.250
243	.295	.293	.292	.298	.292	.299
342	.337	.339	.337	.340	.343	.343
343	.355	.354	.363	.354	.359	.353
344	.363	.359	.359	.356	.343	.321

Prøver uttatt 19/8-59. Farget 26/8. Målt 7/9.						
9	.327	.322	.322	.324	.324	.324
10	.369	.372	.369	.369	.370	.371
91	.297	.293	.293	.295	.290	.290
189	.263	.263	.259	.259	.260	.258
199	.263	.263	.264	.263	.262	.263
229	.248	.244	.244	.243	.243	.242
243	.297	.299	.299	.297	.297	.295
342	.352	.341	.336	.334	.333	.334
343	.353	.342	.342	.344	.344	.341
344	.354	.358	.354	—	.351	—

Prøver uttatt 20/8-59. Farget 25/8. Målt 4/9.						
9	.327	.321	.327	.327	.327	.321
10	.371	.369	.366	—	.366	.360
J. 60	.321	.316	.320	.317	.314	.308
85	.314	.313	.311	.314	.314	.314
91	.288	.293	.294	.292	.293	.294
189	.262	.261	.261	.257	.257	.258
199	.270	.272	.271	.269	.272	.270
229	.248	.247	.247	.248	.247	.246
331	.335	.335	.331	.340	.337	.342
344	.339	.344	.343	.331	.339	.339

Hovedtabell I (fortsat).

	Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.
Prøver uttat 21/8-59. Farget 26/8. Målt 1/9.							
	10	.363	.362	.357	.366	.367	.367
J.	60	.323	.318	.319	.321	.319	.318
	85	.318	.313	.314	.313	.313	.308
	91	.285	.288	.287	.289	.280	.283
	95	.283	.283	.281	.277	.277	.277
	189	.258	.259	.259	.262	.258	.256
	199	.269	.271	.269	.269	.270	.267
	229	.254	.256	.252	.253	.252	.251
	331	.344	.346	.342	.349	.346	.349
	344	.377	.381	.381	.369	.371	.368

Hovedtabell II. Reproduserbarheten på analyseresultatene.
Fargetettheten i eluatet målt med Beckman DU spektrofotometer.

Repeatability of analytical results.

Optical density in eluate, measured with a Beckman DU spectrophotometer.

Analyseserie	1		2		1		2	
Prøveserie	Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Prøveserie	Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ekst.
1	1	.330	.336	2	1	.322	.322	
	9	.326	.326		9	.336	.329	
	43	.318	.319		43	.315	.310	
	44	.327	.326		44	.311	.309	
	47	.294	.288		47	.254	.258	
	88	.293	.283		88	.268	.268	
	277	.308	.306		277	.291	.294	
	281	.280	.278		281	.274	.274	
	287	.315	.313		287	.277	.279	
	289	.287	.284		295	.279	.280	
3	1	.339	.338	4	55	.252	.252	
	9	.334	.330		56	.309	.305	
	43	.335	.328		171	.258	.261	
	44	.331	.326		188	.282	.284	
	47	.292	.292		189	.241	.243	
	88	.294	.294		199	.262	.263	
	277	.318	.323		229	.245	.245	
	281	.306	.308		233	.291	.291	
	289	.300	.302		289	.277	.275	
					343	.339	.340	
5	9	.326	.328	6	10	.364	.355	
	10	.360	.362		J. 60	.310	.313	
	91	.295	.296		85	.313	.311	
	189	.260	.262		91	.285	.283	
	199	.261	.263		95	.280	.276	
	229	.251	.251		189	.259	.260	
	243	.295	.297		199	.269	.267	
	342	.340	.350		229	.253	.253	
	343	.356	.347		331	.346	.341	
	344	.350	.358		344	.375	.366	

Ovenstående ekstinksjoner er middel av 6 parallellanalyser.

Hovedtabell II (fortsat).

Analyseserie		1	2			1	2
Prøveserie	Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Prøveserie	Ku nr.	Ekst.	Ekst.
7	43	.315	.309	8	43	.313	.307
	67	.238	.236		67	.235	.236
	92	.295	.289		92	.293	.285
	177	.281	.275		177	.276	.277
	199	.255	.248		199	.258	.256
	233	.301	.292		211	.433	.438
	293	.260	.257		233	.291	.291
	325	.371	.359		293	.269	.267
	344	.363	.345		325	.361	.371
					344	.335	.344

Ovenstående ekstinksjoner er middel av 6 parallellanalyser.

Analyseserie		1	2			1	2
Prøveserie	Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Prøveserie	Ku nr.	Ekst.	Ekst.
9	10	.365	.364	9	18	.391	.386
	37	.337	.332		31	.334	.331
	38	.327	.328		35	.338	.332
	40	.340	.337		36	.368	.364
	44	.283	.283		37	.321	.316
	46	.408	.409		38	.311	.311
	55	.385	.381		J. 40	.340	.341
	58	.388	.388		43	.329	.328
	61	.364	.358		J. 57	.364	.362
	70	.299	.291		J. 58	.381	.384
	73	.422	.417		J. 65	.371	.369
	75	.367	.360		J. 67	.376	.374
	76	.394	.381		69	.332	.333
	85	.357	.356		70	.305	.303
	86	.314	.312		J. 73	.414	.424
	92	.305	.302		85	.330	.330
	101	.321	.320		88	.277	.276
	102	.339	.336		92	.305	.295
	105	.325	.324		95	.298	.298
	173	.396	.393		101	.313	.310
	223	.293	.288		104	.331	.330
	235	.306	.307		225	.316	.315
	341	.360	.355		279	.305	.306
	343	.320	.317		281	.308	.301
	9	.306	.309		283	.291	.287
	14	.364	.362		J. 330	.342	.349

Ovenstående ekstinksjoner er middel av 3 parallellanalyser.

**Hovedtabell III. Reproduserbarheten på analyseresultatene.
Fargetettheten i eluatet målt med Beckman DU spektrofotometer.**

Repeatability of analytical results.

Optical density in eluate, measured with a Beckman DU spectrophotometer.

Prøvene uttatt		3/8					10/8				
Analyseserie	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
Farget	16/8	24/8	24/8	24/8	10/9		16/8	24/8	24/8	24/8	10/9
Målt	19/8	26/8	2/9	3/9	13/9		19/8	26/8	2/9	3/9	13/9
Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.	Ekst.
8	.309	.305	.305	.310	.308	9	.319	.318	.318	.317	.319
(10)	.353	.352	.300	.355	.352)	10	.303	.301	.298	.301	.298
18	.325	.323	.323	.323	.321	J.35	.363	.361	.359	.362	.360
A.25	.305	.296	.294	.298	.299	38	.357	.357	.354	.354	.357
32	.361	.359	.354	.359	.355	43	.327	.326	.325	.324	.325
33	.334	.331	.329	.334	.331	44	.283	.287	.284	.285	.289
34	.370	.364	.358	.365	.364	J.57	.350	.350	.353	.352	.344
37	.330	.324	.322	.326	.325	J.58	.376	.375	.376	.379	.374
40	.328	.328	.327	.330	.327	J.61	.362	.361	.361	.363	.362
41	.389	.384	.384	.390	.385	64	.265	.269	.261	.265	.264
42	.345	.347	.345	.352	.342	J.67	.380	.375	.381	.377	.371
43	.362	.358	.358	.360	.360	70	.376	.374	.375	.378	.377
409	.299	.294	.292	.298	.295	(85	.315	.317	.276	.282	.275)
442	.331	.329	.326	.329	.327	88	.279	.278	.274	.279	.276
451	.327	.325	.323	.321	.325	93	.309	.311	.307	.315	.312
453	.350	.350	.348	.355	.349	94	.278	.276	.277	.280	.275
454	.325	.325	.324	.325	.326	106	.332	.332	.334	.332	.335
466	.364	.359	.356	.356	.359	225	.325	.327	.326	.331	.324
469	.363	.352	.355	.357	.358	235	.368	.372	.370	.374	.367
472	.367	.364	.361	.358	.361	(283	.326	.326	.310	.303	.298)
477	.341	.337	.340	.342	.336	287	.286	.284	.280	.285	.283
479	.340	.337	.335	.336	.340	325	.374	.376	.378	.379	.381
485	.346	.339	.341	.347	.339	330	.351	.354	.342	.338	.341
490	.369	.368	.366	.369	.365	332	.363	.360	.364	.361	.359

Ku nr. 10, 85 og 283 er utelatt ved beregningene da en antar at det har skjedd en forbyttning av prøvene.

De anførte ekstinksjoner er middel av 3 parallellanalyser.

Hovedtabell IV. Reproduserbarheten på analyseresultatene.**Fargetettheten i eluatet målt med Beckman C kolorimeter.***Repeatability of analytical results.**Optical density in eluate, measured with a Beckman C colorimeter.*

Prøverne tatt 17/5			24/5			3/8			10/8		
Analyseserie	1	2	1	2		1	2		1	2	
Farget	16/8	24/8	16/8	24/8		16/8	24/8		16/8	24/8	
Målt	19/8	26/8	19/8	26/8		19/8	26/8		19/8	26/8	
Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ku nr.	Ekst.	Ekst.	Ku nr.	Ekst.	Ekst.
10	.347	.347	9	.279	.302	8	.298	.296	9	.310	.305
37	.322	.321	14	.349	.343	10	.339	.333	10	.296	.291
38	.323	.319	18	.377	.367	18	.313	.313	J.35	.352	.342
40	.326	.325	31	.326	.319	A.25	.294	.293	38	.346	.341
44	.275	.271	35	.332	.322	32	.348	.341	43	.317	.315
46	.394	.387	36	.355	.349	33	.320	.319	44	.281	.279
55	.368	.361	37	.314	.306	34	.352	.348	J.57	.339	.332
58	.377	.369	38	.297	.303	37	.314	.315	J.58	.365	.357
61	.350	.345	J.40	.316	.325	40	.317	.320	J.61	.349	.346
70	.296	.286	43	.323	.316	41	.366	.361	64	.261	.258
73	.397	.394	J.57	.351	.344	42	.330	.329	J.67	.365	.355
75	.349	.343	J.58	.361	.362	43	.348	.342	70	.361	.355
76	.375	.360	J.65	.344	.351	409	.290	.286	85	.311	.304
85	.343	.341	J.67	.356	.355	442	.319	.322	88	.275	.272
86	.303	.300	69	.301	.323	451	.315	.316	93	.303	.300
92	.297	.295	70	.275	.298	453	.331	.331	94	.274	.273
101	.316	.311	J.73	.392	.399	454	.316	.315	106	.322	.321
102	.331	.324	85	.313	.319	466	.348	.344	225	.321	.316
105	.320	.314	88	.252	.271	469	.342	.339	235	.354	.353
173	.372	.372	92	.276	.287	472	.351	.345	283	.321	.315
223	.286	.280	95	.289	.290	477	.326	.322	287	.282	.279
235	.300	.299	101	.290	.301	479	.327	.326	325	.360	.358
341	.348	.339	104	.312	.321	485	.330	.326	330	.343	.338
343	.311	.305	225	.295	.302	490	.351	.349	332	.351	.344
			279	.297	.295						
			281	.300	.292						
			283	.271	.283						
			J.330	.325	.332						

De anførte ekstinksjoner er middel av 3 parallellanalyser.

Hovedtabell V. Sammenligning mellom den kolorimetriske analysemetode og kjeldahlmetoden. Beckman C kolorimeter er brukt.

*Comparison of the colorimetric method and the Kjeldahl method.
Beckman C colorimeter used.*

% protein		% protein		% protein		% protein	
Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk
2.82	2.75	3.17	3.20	3.34	3.36	3.46	3.40
2.85	2.78	3.17	3.25	3.34	3.40	3.47	3.44
2.87	2.83	3.18	3.17	3.35	3.35	3.47	3.45
2.89	2.83	3.18	3.34	3.35	3.35	3.47	3.50
2.89	2.83	3.19	3.15	3.35	3.40	3.48	3.45
2.89	2.92	3.19	3.15	3.35	3.45	3.48	3.50
2.89	2.93	3.19	3.24	3.36	3.30	3.48	3.50
2.90	2.79	3.19	3.25	3.36	3.30	3.48	3.60
2.91	2.89	3.20	3.19	3.36	3.33	3.48	3.60
2.91	2.92	3.21	3.20	3.36	3.33	3.49	3.40
2.91	2.93	3.21	3.40	3.36	3.40	3.49	3.45
2.92	2.95	3.22	3.14	3.36	3.45	3.49	3.50
2.94	2.85	3.22	3.20	3.37	3.30	3.49	3.50
2.94	2.92	3.22	3.23	3.37	3.45	3.49	3.50
2.96	2.90	3.22	3.25	3.38	3.36	3.49	3.51
2.96	3.00	3.22	3.25	3.38	3.38	3.50	3.45
2.97	2.98	3.22	3.29	3.38	3.60	3.50	3.50
2.97	3.01	3.23	3.30	3.39	3.45	3.50	3.53
2.99	3.01	3.24	3.26	3.40	3.30	3.51	3.53
2.99	3.08	3.24	3.33	3.40	3.35	3.51	3.56
3.00	2.98	3.24	3.35	3.40	3.35	3.51	3.60
3.01	3.02	3.24	3.40	3.40	3.35	3.52	3.35
3.02	3.01	3.25	3.29	3.40	3.40	3.54	3.40
3.02	3.02	3.26	3.40	3.40	3.40	3.54	3.45
3.03	2.99	3.27	3.10	3.40	3.50	3.54	3.55
3.03	3.03	3.27	3.15	3.41	3.35	3.55	3.50
3.04	3.00	3.27	3.35	3.41	3.35	3.55	3.50
3.04	3.10	3.27	3.40	3.41	3.40	3.55	3.55
3.05	3.04	3.28	3.35	3.41	3.45	3.55	3.56
3.06	2.96	3.28	3.35	3.41	3.45	3.55	3.59
3.06	3.05	3.29	3.05	3.41	3.50	3.55	3.60
3.07	3.15	3.29	3.25	3.43	3.44	3.55	3.64
3.08	3.11	3.30	3.15	3.43	3.50	3.55	3.70
3.11	3.15	3.30	3.31	3.43	3.55	3.56	3.50
3.13	3.10	3.31	3.30	3.43	3.55	3.56	3.75
3.14	3.19	3.31	3.34	3.44	3.35	3.57	3.50
3.15	3.10	3.31	3.39	3.44	3.39	3.57	3.55
3.15	3.19	3.32	3.35	3.44	3.50	3.57	3.55
3.15	3.22	3.32	3.40	3.45	3.40	3.57	3.59
3.16	3.15	3.33	3.35	3.45	3.41	3.57	3.65
3.16	3.22	3.33	3.46	3.45	3.45	3.58	3.45
3.16	3.25	3.34	3.29	3.45	3.50	3.58	3.60
3.17	3.15	3.34	3.33	3.45	3.55	3.59	3.45

Hovedtabell V (fortsatt).

% protein		% protein		% protein		% protein	
Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk
3.59	3.55	3.71	3.70	3.89	3.85	4.03	3.85
3.59	3.60	3.72	3.70	3.89	3.90	4.04	3.75
3.59	3.65	3.72	3.70	3.89	3.90	4.04	3.93
3.59	3.65	3.72	3.75	3.90	3.70	4.04	4.08
3.59	3.65	3.72	3.80	3.90	3.80	4.07	4.05
3.60	3.65	3.72	3.80	3.90	3.85	4.08	4.00
3.61	3.50	3.73	3.60	3.91	3.60	4.08	4.00
3.61	3.50	3.73	3.71	3.91	3.81	4.09	4.00
3.61	3.54	3.73	3.85	3.91	3.84	4.09	4.10
3.61	3.60	3.75	3.65	3.92	3.70	4.11	3.89
3.61	3.65	3.75	3.70	3.92	3.80	4.12	4.05
3.62	3.55	3.75	3.78	3.92	3.84	4.12	4.30
3.62	3.55	3.75	3.86	3.92	3.95	4.13	4.00
3.62	3.59	3.76	3.60	3.93	3.95	4.13	4.10
3.62	3.60	3.76	3.65	3.94	3.80	4.16	4.00
3.62	3.65	3.76	3.70	3.94	3.90	4.17	4.05
3.63	3.57	3.76	3.70	3.94	3.90	4.17	4.20
3.63	3.63	3.76	3.75	3.94	3.92	4.19	4.25
3.63	3.65	3.76	3.75	3.95	3.85	4.22	4.05
3.63	3.70	3.76	3.75	3.95	3.90	4.22	4.10
3.64	3.55	3.76	3.85	3.96	3.80	4.23	3.90
3.64	3.55	3.77	3.69	3.96	3.80	4.24	4.10
3.64	3.60	3.78	3.75	3.96	3.80	4.25	4.18
3.64	3.60	3.78	3.86	3.96	3.82	4.26	4.10
3.64	3.64	3.79	3.70	3.96	3.89	4.28	4.20
3.64	3.74	3.79	3.75	3.96	3.95	4.29	4.05
3.65	3.67	3.80	3.74	3.97	3.95	4.30	4.05
3.66	3.60	3.81	3.70	3.97	4.00	4.30	4.30
3.66	3.60	3.81	3.77	3.98	3.93	4.31	4.05
3.66	3.69	3.81	3.81	3.99	3.95	4.31	4.19
3.66	3.70	3.82	3.80	4.00	3.70	4.40	4.15
3.66	3.76	3.83	3.80	4.00	3.84	4.40	4.25
3.68	3.70	3.83	3.82	4.00	3.95	4.40	4.35
3.68	3.80	3.83	3.87	4.00	3.95	4.49	4.45
3.69	3.60	3.83	3.90	4.00	3.98	4.50	4.45
3.69	3.65	3.83	3.91	4.00	4.03	4.64	4.50
3.69	3.70	3.84	3.75	4.01	4.00	4.73	4.40
3.69	3.82	3.87	3.85	4.01	4.00	4.74	4.55
3.71	3.65	3.87	4.00	4.02	3.85	4.93	4.65

Hovedtabell VI. Sammenligning mellom den kolorimetriske metode og kjeldahlmetoden når melkeprøvene til førstnevnte er applikert på forsøgs gårdene.
Comparison between the colorimetric method and the Kjeldahl method, when the milk samples analyzed by the former method are applied at the experiment stations.

% protein		% protein		% protein		% protein	
Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk
2.85	2.95	3.23	3.40	3.40	3.40	3.48	3.55
2.86	2.95	3.24	3.35	3.40	3.40	3.48	3.60
2.95	3.10	3.24	3.45	3.40	3.45	3.48	3.65
2.96	3.00	3.25	3.45	3.40	3.45	3.48	3.65
2.96	3.10	3.26	3.25	3.40	3.55	3.48	3.65
2.97	3.15	3.26	3.40	3.40	3.60	3.48	3.80
3.01	3.00	3.26	3.45	3.40	3.65	3.49	3.45
3.02	3.05	3.27	3.25	3.41	3.45	3.49	3.55
3.03	3.05	3.27	3.40	3.41	3.45	3.49	3.60
3.03	3.05	3.27	3.45	3.41	3.50	3.49	3.65
3.04	3.15	3.27	3.50	3.41	3.55	3.49	3.70
3.04	3.15	3.28	3.40	3.41	3.60	3.50	3.40
3.05	3.15	3.29	3.35	3.41	3.60	3.50	3.50
3.06	3.15	3.29	3.40	3.41	3.60	3.50	3.55
3.07	3.20	3.29	3.45	3.41	3.65	3.50	3.55
3.08	3.15	3.30	3.50	3.41	3.65	3.50	3.55
3.08	3.40	3.31	3.30	3.43	3.50	3.50	3.55
3.09	3.15	3.31	3.40	3.43	3.50	3.50	3.90
3.11	3.15	3.32	3.30	3.43	3.55	3.51	3.40
3.13	3.25	3.32	3.45	3.43	3.55	3.51	3.60
3.13	3.35	3.33	3.35	3.43	3.55	3.51	3.70
3.13	3.40	3.33	3.35	3.43	3.60	3.52	3.45
3.13	3.50	3.33	3.40	3.44	3.50	3.52	3.55
3.15	3.25	3.33	3.45	3.44	3.60	3.52	3.60
3.16	3.35	3.34	3.35	3.44	3.60	3.52	3.60
3.17	3.25	3.34	3.45	3.44	3.65	3.52	3.65
3.17	3.30	3.34	3.45	3.45	3.40	3.52	3.65
3.17	3.35	3.34	3.65	3.45	3.55	3.53	3.70
3.17	3.35	3.35	3.30	3.45	3.55	3.53	3.70
3.17	3.40	3.35	3.50	3.45	3.60	3.54	3.40
3.19	3.20	3.35	3.55	3.45	3.60	3.54	3.55
3.19	3.25	3.35	3.65	3.45	3.60	3.54	3.60
3.19	3.35	3.35	3.65	3.45	3.60	3.54	3.70
3.19	3.40	3.36	3.40	3.46	3.50	3.54	3.75
3.20	3.30	3.36	3.45	3.46	3.55	3.55	3.45
3.20	3.35	3.36	3.50	3.47	3.55	3.55	3.45
3.21	3.30	3.36	3.55	3.47	3.60	3.55	3.60
3.21	3.35	3.37	3.45	3.47	3.65	3.55	3.65
3.21	3.40	3.37	3.45	3.47	3.70	3.55	3.65
3.21	3.45	3.37	3.45	3.48	3.40	3.55	3.70
3.22	3.10	3.38	3.40	3.48	3.50	3.55	3.70
3.22	3.30	3.38	3.55	3.48	3.50	3.55	3.75
3.22	3.35	3.38	3.65				

Hovedtabell VI (fortsett).

% protein		% protein		% protein		% protein	
Kjeldahl	Kolori-metrisk	Kjeldahl	Kolori-metrisk	Kjeldahl	Kolori-metrisk	Kjeldahl	Kolori-metrisk
3.55	3.80	3.62	3.75	3.69	3.85	3.76	3.90
3.56	3.40	3.62	3.75	3.69	3.90	3.76	3.95
3.56	3.65	3.62	3.75	3.70	3.70	3.76	3.95
3.56	3.70	3.62	3.80	3.70	3.75	3.76	4.00
3.57	3.55	3.62	3.80	3.70	3.80	3.76	4.10
3.57	3.60	3.62	3.80	3.70	3.85	3.77	3.80
3.57	3.60	3.62	3.85	3.71	3.65	3.77	3.90
3.57	3.70	3.62	3.85	3.71	3.70	3.77	3.90
3.57	3.70	3.62	3.85	3.71	3.70	3.78	3.70
3.57	3.75	3.62	3.95	3.71	3.75	3.78	3.75
3.57	3.75	3.63	3.70	3.71	3.85	3.78	3.80
3.58	3.55	3.63	3.70	3.71	3.90	3.78	3.80
3.58	3.65	3.63	3.75	3.72	3.65	3.78	3.90
3.59	3.45	3.63	3.75	3.72	3.65	3.78	3.95
3.59	3.55	3.64	3.60	3.72	3.75	3.78	4.05
3.59	3.60	3.64	3.60	3.72	3.75	3.79	3.60
3.59	3.60	3.64	3.70	3.72	3.90	3.79	3.75
3.59	3.60	3.64	3.70	3.72	3.90	3.79	3.80
3.59	3.60	3.64	3.70	3.72	4.00	3.79	3.90
3.59	3.60	3.64	3.75	3.73	3.70	3.79	3.95
3.59	3.80	3.64	3.75	3.73	3.70	3.80	3.80
3.59	3.80	3.64	3.85	3.73	3.75	3.80	3.85
3.59	3.85	3.64	3.90	3.73	3.80	3.81	3.85
3.59	3.95	3.65	3.65	3.73	3.80	3.81	3.85
3.60	3.60	3.65	3.75	3.73	3.80	3.81	3.90
3.60	3.75	3.66	3.65	3.73	3.85	3.81	3.95
3.60	3.75	3.66	3.70	3.73	3.90	3.81	4.00
3.60	3.75	3.66	3.70	3.73	3.90	3.82	3.80
3.60	3.95	3.66	3.75	3.74	3.80	3.82	3.85
3.61	3.45	3.66	3.80	3.74	3.85	3.82	3.90
3.61	3.50	3.66	3.80	3.74	3.85	3.82	4.00
3.61	3.60	3.66	3.80	3.75	3.70	3.82	4.15
3.61	3.65	3.66	3.80	3.75	3.80	3.83	3.80
3.61	3.65	3.66	3.85	3.75	3.80	3.83	3.85
3.61	3.70	3.67	3.60	3.75	3.80	3.83	3.90
3.61	3.70	3.67	3.75	3.75	3.80	3.83	3.90
3.61	3.70	3.67	3.75	3.75	3.95	3.84	3.85
3.61	3.75	3.67	3.85	3.76	3.80	3.84	3.90
3.61	3.75	3.67	4.00	3.76	3.80	3.84	3.95
3.61	3.75	3.68	3.75	3.76	3.80	3.84	4.05
3.62	3.55	3.68	3.85	3.76	3.80	3.84	4.10
3.62	3.60	3.68	3.85	3.76	3.85	3.85	3.80
3.62	3.60	3.69	3.60	3.76	3.85	3.85	3.80
3.62	3.65	3.69	3.70	3.76	3.85	3.86	3.85
3.62	3.65	3.69	3.80	3.76	3.90	3.87	3.80
3.62	3.70	3.69	3.85				

Hovedtabell VI (fortsatt).

% protein		% protein		% protein		% protein	
Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk	Kjeldahl	Kolori- metrisk
3.87	3.85	3.95	4.10	4.03	4.05	4.22	4.45
3.87	3.90	3.95	4.10	4.03	4.10	4.23	4.10
3.87	3.95	3.95	4.10	4.04	4.05	4.23	4.25
3.87	3.95	3.95	4.10	4.04	4.10	4.24	4.10
3.87	4.00	3.96	3.70	4.04	4.10	4.24	4.20
3.87	4.00	3.96	3.90	4.04	4.30	4.24	4.25
3.87	4.10	3.96	3.90	4.06	4.00	4.24	4.60
3.88	3.75	3.96	3.95	4.06	4.10	4.25	4.35
3.89	3.75	3.96	4.00	4.06	4.15	4.25	4.50
3.89	3.80	3.96	4.05	4.06	4.50	4.26	4.15
3.89	3.85	3.96	4.05	4.07	4.40	4.26	4.15
3.89	3.90	3.96	4.10	4.08	4.00	4.26	4.30
3.89	3.95	3.96	4.10	4.08	4.10	4.27	4.25
3.89	4.00	3.96	4.10	4.08	4.10	4.27	4.30
3.89	4.00	3.96	4.25	4.08	4.20	4.27	4.35
3.89	4.00	3.97	3.90	4.09	4.05	4.28	4.10
3.89	4.05	3.97	3.95	4.10	4.05	4.29	4.30
3.89	4.05	3.97	3.95	4.10	4.20	4.30	4.20
3.89	4.10	3.97	4.00	4.10	4.25	4.30	4.30
3.90	3.70	3.97	4.00	4.10	4.25	4.31	4.20
3.90	3.75	3.97	4.00	4.12	4.10	4.34	4.25
3.90	3.90	3.97	4.05	4.12	4.15	4.40	4.35
3.90	3.95	3.97	4.25	4.12	4.15	4.40	4.40
3.90	4.00	3.97	4.35	4.12	4.35	4.40	4.45
3.90	4.00	3.98	3.90	4.13	4.25	4.41	4.50
3.90	4.00	3.98	4.35	4.14	4.20	4.42	4.40
3.91	3.55	3.99	4.05	4.15	4.10	4.42	4.55
3.91	3.95	3.99	4.05	4.15	4.20	4.45	4.45
3.91	3.95	3.99	4.05	4.16	4.15	4.48	4.70
3.91	4.00	3.99	4.10	4.16	4.45	4.49	4.50
3.91	4.05	3.99	4.25	4.16	4.45	4.49	4.55
3.92	3.80	3.99	4.35	4.17	4.15	4.50	4.55
3.92	3.80	4.00	3.85	4.17	4.20	4.51	4.50
3.92	3.90	4.00	3.85	4.17	4.25	4.52	4.55
3.92	3.90	4.00	3.95	4.17	4.40	4.55	4.70
3.92	4.00	4.00	4.05	4.17	4.45	4.57	4.75
3.92	4.05	4.00	4.05	4.19	4.25	4.62	4.65
3.93	4.05	4.00	4.10	4.19	4.25	4.62	4.70
3.94	3.95	4.01	4.10	4.19	4.30	4.64	4.65
3.94	4.05	4.01	4.15	4.20	4.45	4.64	5.00
3.94	4.10	4.01	4.25	4.21	4.20	4.71	4.55
3.94	4.20	4.02	3.70	4.21	4.25	4.73	4.85
3.95	3.95	4.02	4.05	4.22	4.10	4.78	5.00
3.95	4.00	4.02	4.10	4.22	4.15	4.85	4.45
3.95	4.00	4.03	4.00	4.22	4.25	4.93	4.70

Beretninger og forsøgsrapporter vedrørende arbejder, hvor den her beskrevne hurtigmetode er omtalt eller har været benyttet.

- A. E. Haugen:* Kvantitativ bestemmelse af protein i mælk. Forsøgslaboratoriets årbog 1959, s. 371.
- A. E. Haugen:* En kolorimetrisk metode til kvantitativ proteinbestemmelse i mjølk. Nordisk Jordbrugsforskning årgang 43, 1961, s. 157.
- A. E. Haugen:* Protein content of cows' milk. Effect of transition from indoor feeding to grazing. Final report of the VIIIth international congress of animal production, Hamburg 1961, s. 145.
- Kirsten Weidner:* Indretning og drift af et laboratorium til kolorimetrisk proteinbestemmelse. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 369.
- L. Hansen Larsen, K. Hansen og Ejner Nielsen:* Afkomsprøver med tyre XV. 324. beretning fra forsøgslaboratoriet, København 1960.
- Ejner Nielsen, Axel Nielsen og Børge Vesth:* Afkomsprøver med tyre. Forsøgslaboratoriets årbog 1961, s. 93.
- Ejner Nielsen, Axel Nielsen og Børge Vesth:* Afkomsprøver med tyre. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 123.
- Ejner Nielsen:* Afkomsprøver med tyre XVI. 329. beretning fra Forsøgslaboratoriet, København 1962.
- Ejner Nielsen:* Afkomsprøver med tyre XVII. 335. beretning fra Forsøgslaboratoriet, København 1963.
- Ejner Nielsen:* Komælkens proteinindhold. Ugeskrift for Landmænd 1962, (9) s. 126.
- Ejner Nielsen:* The Correlation between the Percentage of Fat and Protein in Milk from 1st Calf Cows at the Danish Progeny Testing Stations. XVI. International Dairy Congress, København 1962, s. 171.
- J. Brolund Larsen og Konrad D. Christensen:* Forsøg med malkekøer. Foderfedtets indflydelse på smørrets konsistens. Forsøgslaboratoriets årbog 1961, s. 15.
- J. Brolund Larsen, S. Klausen og B. Lund Jensen:* Forsøg med malkekøer. Forskellige mængder sildemel. Forsøgslaboratoriets årbog 1961, s. 12.
- J. Brolund Larsen, S. Klausen og B. Lund Jensen:* Forsøg med malkekøer. Forskellige mængder renprotein til mælkeproduktion. Forsøgslaboratoriets årbog 1961, s. 22.
- J. Brolund Larsen, S. Klausen og C. Svensgaard:* Forsøg med malkekøer. Moderate contra store mængder frisk roetop. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 7.
- J. Brolund Larsen, S. Klausen og C. Svensgaard:* Forsøg med malkekøer. Forskellige mængder sildemel. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 41.
- J. Brolund Larsen, P. D. Møller og S. Klausen:* Forsøg med malkekøer. Forskellige mængder renprotein til mælkeproduktion. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 52.
- Preben E. Andersen og S. Klausen:* Forsøg med malkekøer. Forskellige mængder renprotein til mælkeproduktion. Forsøgslaboratoriets årbog 1961, s. 24.
- Preben E. Andersen og John Lykkeaa:* Forsøg med malkekøer. Roetopensilage med forskelligt askeindhold. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 11.

- Preben E. Andersen og John Lykkeaa: Forsøg med malkekøer. Roer + roetop-ensilage contra kløvergræsensilage. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 13.*
- Preben E. Andersen og John Lykkeaa: Forsøg med malkekøer. Almindeligt kraftfoder contra kraftfoderpilller. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 37.*
- Preben E. Andersen og Marinus Sørensen: Forsøg med malkekøer. Forskudt malketid ved 2 gange daglig malkning. Forsøgslaboratoriets årbog 1961, s. 29.*
- Preben E. Andersen og Marinus Sørensen: The Influence of Milking Twice a Day at Unequal Intervals upon Butterfat and Protein Content in Milk. XVI. internationale mejerikongres, København 1962, s. 192.*
- Preben E. Andersen og Marinus Sørensen: Forsøg med malkekøer. Roetop + sukkerroeaffald, kunsttørret contra ensileret. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 17.*
- Preben E. Andersen og Marinus Sørensen: Forsøg med malkekøer. Roer contra kunsttørret kløvergræs. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 20.*
- Preben E. Andersen og Marinus Sørensen: Forsøg med malkekøer. Kunsttørret kløvergræs, snittet contra formalet og pelleteret. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 25.*
- Preben E. Andersen og Marinus Sørensen: Forsøg med malkekøer. Oliekager contra korn. Forsøgslaboratoriets årbog 1962, s. 57.*

B. Beretninger fra forsøgslaboratoriets dyrefysiologiske afdeling.

1899. 44. ber. Undersøgelser over Fedtdannelse i Organismen ved intensiv Fedt-fodring. (50 øre).
1917. 94. — Respirationsapparatet, dets Betydning og Anvendelse ved rationelle Forsøg over Hornkvægets Mælkeydelse. (1 kr.).
1923. 111. ber. Om Næringsværdien af Roer og Byg til Fedning og om Næringsstofferforholdets Betydning for Fodermidlernes Næringsværdi. (Udsolgt).
1929. 131. — Om Grundtrækkene i Malkekægets Ernæringslære. (1,50 kr.).
1933. 151. — Undersøgelser over Væksten hos Svin. I. Kalk- og Fosforsyreomsætningen hos unge, voksende Svin. (2,50 kr.).
1935. 162. — Undersøgelser over Væksten hos Svin. II. Energiomsætningen hos Svin. (Udsolgt).
1935. 163. — Undersøgelser over Væksten hos Svin. III. A. Fortsatte Undersøgelser over Calcium- og Fosforomsætningen hos unge, voksende Svin. B. Om kvantitativ Bestemmelse af Fosforsyre. C. Om kvantitativ Bestemmelse af Calcium i Foderstoffer og Stofskifteprodukter. D. Om Kalciumbestemmelse i Blodplasma. (1 kr.).
1936. 170. — Vedligeholdelsesstofskiftet hos voksende Svin. Bestemmelse af Fosfat i Blodserum. (1 kr.).
1936. 171. — Undersøgelser vedrørende Næringsværdibestemmelse i tørret Lucerne. (1 kr.).
1938. 180. — Experimentielle Undersøgelser vedrørende Svinets Avitaminose-A. (2 kr.).
1939. 184. — Carotinbestemmelse ved Hjælp af Pulfrich-Fotometer. (50 øre).
1940. 193. — Experimentel Rakitis hos Svin. Betydning af Foderets Indhold af Fytin og Fytase. (2 kr.).
1941. 196. — Bestemmelse af Næringsværdien i A.I.V.-Lucerne. (50 øre).
1943. 204. — Om Sulfidionens Virkning paa Resorptionen af Calcium og Fosfor hos voksende Svin. — Næringsværdibestemmelse af Roetopensilage. (1 kr.).
1945. 215. — Om organiske Oxyrers Virkning paa Resorptionen af Calcium og Fosfat i Tarmen. Om kvantitativ Bestemmelse i Proteinstoffer, Polypeptider og Aminosyrer i vore Fodermidler. (1,50 kr.).
1945. 218. — Undersøgelser over Karotinindholdet i Græsmarksplanter og andre Foderplanter. Hastigheden hvormed Foderets ufordøjelige Rester passerer Fordøjelseskanaalen hos Svin. Karotinets Resorption hos Svin. Mælkens Indhold af A-vitamin og Karotin. (1,50 kr.).
1946. 225. — Resorptionens Størrelse ved experimentelt fremkaldt Achylia gastrica. (2 kr.).
1947. 228. — Resorptionen af Calcium og Fosforsyre. (1 kr.).
1948. 234. — Om Proteinstoffernes Indflydelse paa Nyrefunktionen hos Hund. (Udsolgt).
1949. 240. — I. Undersøgelser over jodkaseinets virkning på mælkesekretionen og stofskiftet hos køer. II. Undersøgelser over fraktioneret jodkaseins og kønshormoners indflydelse på mælkekirtlens funktion hos geder. (2 kr.).
1949. 243. — Undersøgelser over B-vitaminernes betydning for svin. I. Mangel på alle B-vitaminer. II. Mangel på pantotensyre. III. Mangel på pyridoxin. (3 kr.).
1950. 252. — Undersøgelser over B-vitaminernes betydning for svin (fortsat). IV. Tiaminmangel og tiaminbehov. (2 kr.).
1952. 258. — Undersøgelser over B-vitaminernes betydning for svin (fortsat). V. Svinenes behov af pyridoxin (B₆) for maximal vækst- og foderudnyttelse. (3 kr.).
1954. 272. — Undersøgelser over den såkaldte »muskeldeneration« hos svin I. (4,50 kr.).

1955. 278. - Undersøgelser over den såkaldte »muskeldegeneration« hos svin II. Nogle virkninger af jodkasein og metyltiouracil på stofskifteprocesserne, muskulaturen og skjoldbruskkirtlen hos unge, voksende svin. (3 kr.).
1955. 279. - Undersøgelser over den såkaldte »muskeldegeneration« hos svin III. Virkningen af jodkasein, tyroxin og diiodhistidin på tilvækst, foderforbrug, muskulatur, skjoldbruskkirtel og kødkvalitet. (3 kr.).
1955. 282. ber. Den kvantitative vækstmålings metodik. Virkningen af indre og ydre faktorer på vækstprocesserne. (4 kr.).
1955. 283. - Virkningen af aureomycin på stofskiftet hos svin og stofskiftet hos galte og sogrise. Varmeproduktionen hos svin på forskellige alderstrin med særlig henblik på staldventilation. (3 kr.).
1955. 284. - Undersøgelser over den såkaldte »muskeldegeneration« hos svin IV. Studier over pathogenesen. (3,50 kr.).
1957. 299. - Proteinbehov og proteinsyntese ved fosterdannelse hos drøvtyggere. (8,00 kr.).
1959. 311. - Studier over pattegrises vækst og ernæring. I. Tilvækst og foderforbrug fra 5. til 64. dag samt kvælstofomsætningen fra 26. til 64. dag hos kunstigt ernærede pattegrise. (2 kr.).
1960. 319. - Undersøgelser over nysesygge og dens årsager. (3 kr.).
1960. 320. - Studier over pattegrises vækst og ernæring. II. Tilvækst og foderforbrug samt kvælstof-, fosfor- og calciumomsætningen hos kunstigt ernærede pattegrise i alderen fra 5. til 35. dag. (2,50 kr.).
1960. 322. - Fordøjelighedsforsøg med fjerkræ. 1. Fordøjelseskkanalen hos høns samt metodiske problemer ved gennemførelsen af fordøjelighedsforsøg (3,50 kr.).
1960. 326. - Fordøjelighedsforsøg med fjerkræ. 2. Forsøg med byg. Forholdet mellem mængden af fordøjede stoffer og omsættelig energi. (3,50 kr.).