

Untersuchung von Vollmilch

1. Theorie:

1.1. Inhaltsstoffe der Milch in g/l:

Wasser	870	Na ⁺	0,5	Peroxidase (⇒ Abbau von H ₂ O ₂)	
Lactose	45	K ⁺	1,5	Lipase (⇒ Ranzigwerden)	
Lipide	38	Mg ²⁺	0,1	Proteinasen (⇒ Käsureifung)	
Caseine	28	Ca ²⁺	1,2	Vitamin A (⇒ Farbe der Butter)	0,1
Albumine/Globuline	6	HPO ₄ ²⁻	3,1	Vitamin B ₂ (⇒ Farbe der Molke)	1,0
		Cl ⁻	1,0	Vitamin C (Antioxidationsmittel)	10
		Citrat	1,8	Vitamin D	0,001

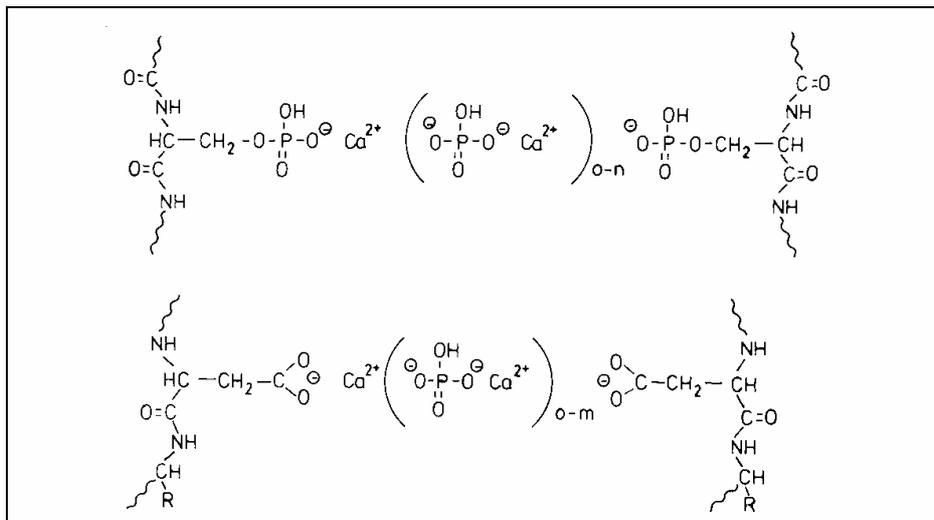
1.2. Caseine

Albumine und Globuline besitzen eine relativ **starre Kugelform**, die unter Energiezufuhr schnell zerbricht. Dagegen sind Caseine sehr **hitzestabil** und denaturieren erst bei 120°C. Dies lässt sich durch die ungeordnete und **variable Struktur** erklären, die bei Temperaturerhöhung viel Energie in Form von Bewegungsenergie aufnehmen kann, ohne dabei zerstört zu werden.

1.2.1. α_{s1}-, α_{s2}- und β- Caseine als Träger von Mineralstoffen

Diese Peptide bestehen aus jeweils ca. 200 Aminosäuren, darunter 8 bzw. 11 bzw. 5 Serinresten. Charakteristisch ist der hohe Anteil an **Phosphat, Citrat, Ca²⁺ und Mg²⁺**.

Phosphat und Citrat können entweder mit Serinresten kovalent verestert (**organisches Phosphat** bzw. Citrat) oder über Mg²⁺ und Ca²⁺ ionisch an organisches Phosphat gebunden sein (**anorganisches Phosphat** bzw. Citrat):

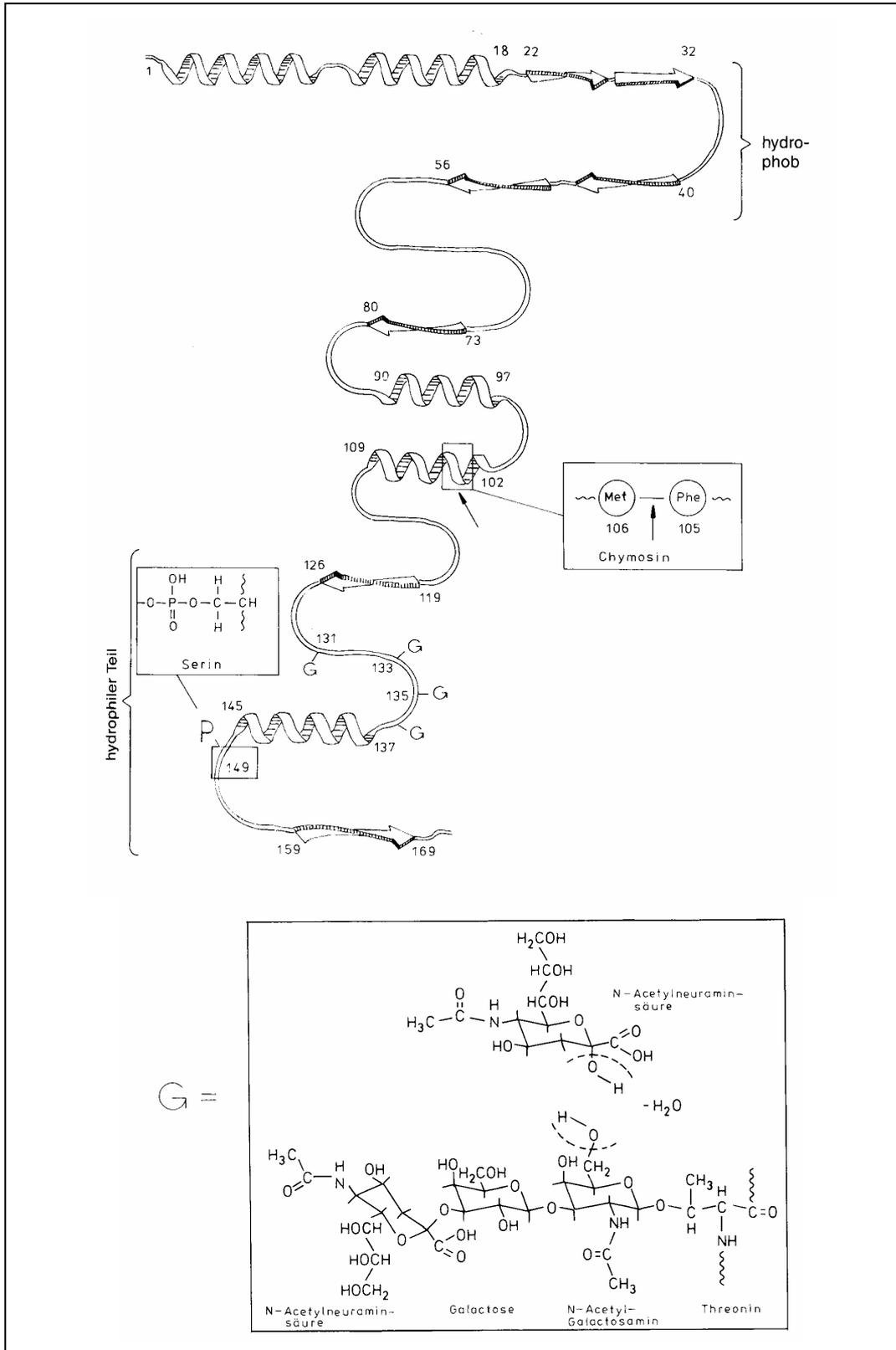


1.2.3. γ - Casein als Schutzkolloid

γ - Casein ist ein **Glykoprotein**, das ebenfalls aus ca. 200 Aminosäuren und zusätzlich vier **Trisaccharidresten** besteht, die jeweils o-glycosidisch an **Threonin** gebunden sind.

Alle vier Trisaccharidreste liegen ziemlich dicht beieinander und bilden einen ausgeprägt **polaren Bereich**, der für die **emulgierende** Wirkung verantwortlich ist.

Im Gegensatz zu den anderen Caseinen besitzt γ - Casein nur einen einzigen Serinrest und kann entsprechend wenig Ca^{2+} bzw. Phosphat binden:



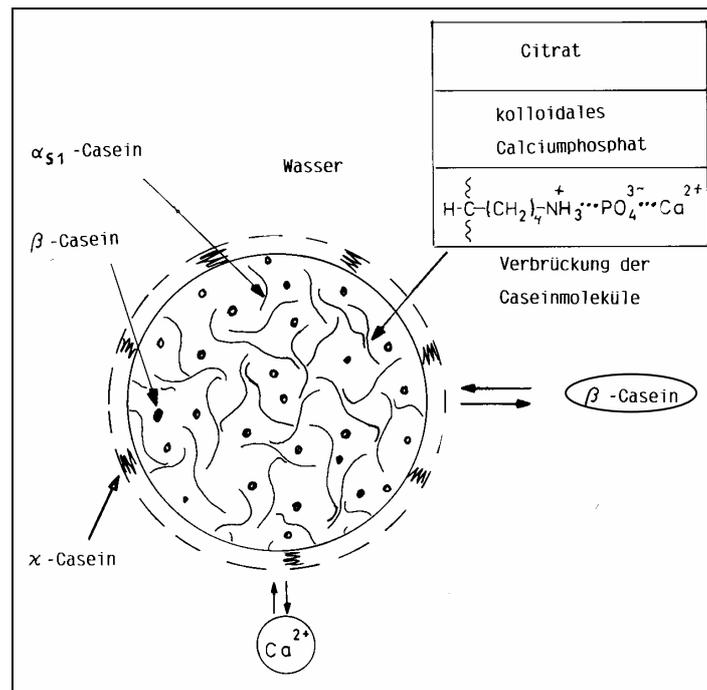
1.2..3. Aufbau der Caseinmicelle

Die über Phosphat, Citrat, Ca^{2+} und Mg^{2+} **vernetzten** α_{s1} - und β -Caseine bilden das Skelett der Micelle und sind über das gesamte **Innere** der Micelle zufällig verteilt. Das γ -Casein befindet sich an der **Oberfläche** und ist mit dem Kern über Disulfidbrücken und van-der-Waals-Kräfte der unpolaren Kettenbereiche verbunden, während die polare Trisaccharideinheit nach außen zum Wasser hin gerichtet ist.

Sowohl das β -Casein als auch das **anorganische Calciumphosphat** kann bei Erwärmung aus der Micelle ins Serum **diffundieren** und bei Abkühlung wieder eingelagert werden.

Bei der Erwärmung von Milch bildet sich daher **kolloidales Calciumphosphat** (Suspension) im Serum, das beim Abkühlen wieder von den Micellen absorbiert wird.

Die Caseinmicelle ist vergleichbar mit den **Lipoproteinen** im tierischen Blut, bei denen ebenfalls Glykproteide die Funktion eines Emulgators für unpolare Fette und Cholesterinester im Inneren der Micelle übernehmen. Auch die Lipoproteine können ihre „Fracht“ reversibel an das Blutserum abgeben.



1.3. Fällung der Caseine durch Säuren oder Salze

Die isoelektrischen Punkte (IEP) der Milchproteine sind:

α - und β -Caseine:	4,8
γ -Casein:	5,8
α -Lactoglobulin:	4,5
β -Lactoalbumin:	4,2

An diesen pH-Werten liegen jeweils ungefähr gleich viele positiv geladene Ammoniumreste $\text{R}-\text{NH}_3^+$ und negativ geladene Carboxylatreste $\text{R}-\text{COO}^-$ vor. Diese Gruppen bilden **paarweise untereinander H-Brücken**, so dass das gesamte Molekül nach **außen hin elektrisch neutral** und relativ unpolar wirkt. Die Zahl der H-Brücken zu den umgebenden Wassermolekülen und damit die **Wasserlöslichkeit** des Proteins ist bei diesem pH-Wert also minimal.

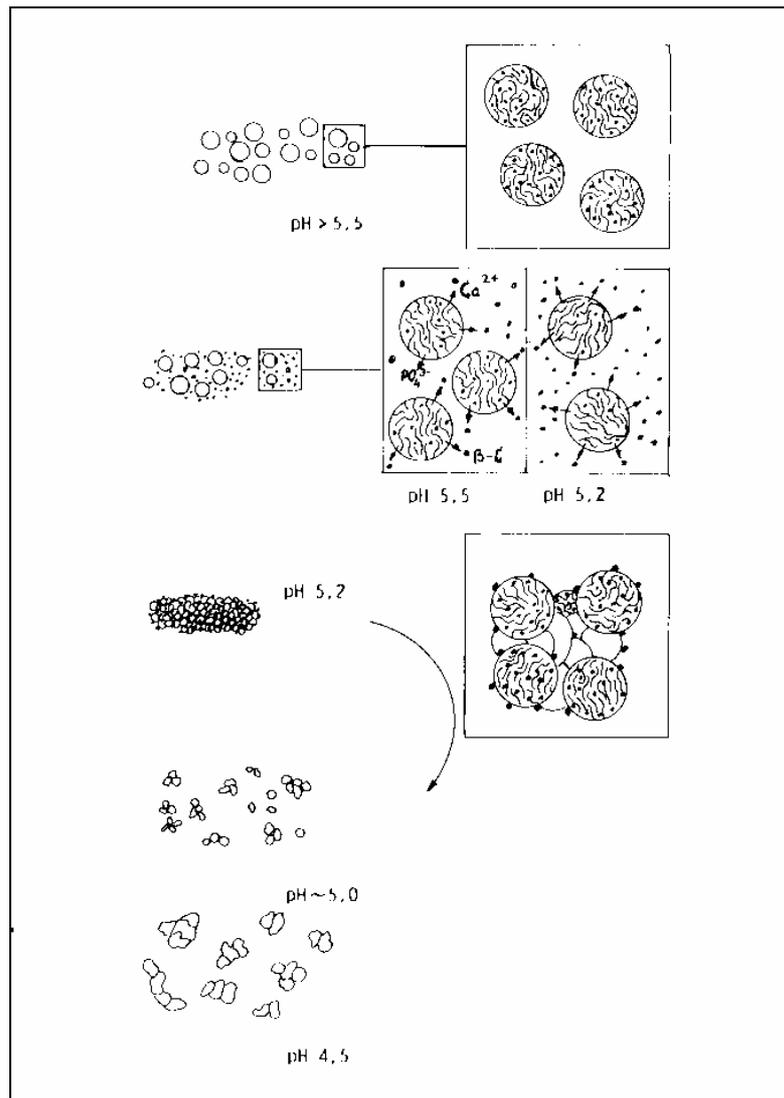
Beim pH-Wert 6,7 der Frischmilch sind dagegen die negativ geladenen Carboxylatgruppen $\text{R}-\text{COO}^-$ im Übergewicht und werden in Ermangelung positiv geladenen Ammoniumreste von H_2O -Molekülen bzw. H_3O^+ -Ionen umhüllt. Diese **Hydrathüllen** „tragen“ das Protein im umgebenden Wasser.

Durch Zugabe von H_3O^+ -Ionen (z.B. bei der **Milchsäuregärung**) oder Na^+ -Ionen (z. B. beim „**Aussalzen**“ mit Na_2CO_3 in 2.2.) wird die Hydrathülle durch die zusätzlich positiv geladenen Ionen **verdrängt** und das Molekül wird nach außen hin wieder neutral, d.h., die Löslichkeit verringert sich.

Im **Inneren** der Caseinmicellen werden außerdem die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen durch H_3O^+ verdrängt und **diffundieren** zusammen mit teilweise protonierten Phosphat- und Citratresten aus der Micelle ins Wasser, wo sie sich zu feinstverteiltem **kolloidalem $\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$** verbinden.

Infolge der Auflösung der Phosphatbrücken lösen sich auch die **β -Caseine** aus der Micelle. Sobald der IEP des γ -Caseins erreicht ist, und die Hydrathüllen um die Restmicellen verschwinden, beginnt die Zusammenballung (**Aggregation**) der Micellen zu kleinen Komplexen, die schließlich auch die β -Caseine wieder aufnehmen und ein **Gel** bilden.

Dieses Gel enthält so gut wie **keine Mineralstoffe** mehr, entsprechend gering sind die Mineralstoffgehalte von **Sauermilchprodukten** wie Sauermilchkäse, Joghurt, Dickmilch oder Sauermilch:



1.4. Fällung der Caseine durch Enzyme

Bei der Labgerinnung wird γ -Casein durch das Enzym Chymosin zwischen Phe_{105} und Met_{106} gespalten. Dadurch wird der polare Teil mit den Trisacchariden abgespalten. Die „nackten“ Micellen besitzen keine ausreichende Hydrathülle mehr, lagern sich zusammen und bilden ein Gel, welches nahezu alle Mineralstoffe enthält. Entsprechend hoch ist der Mineralstoffgehalt in Labkäse.

1.5. Fällung der Albumine und Globuline durch Erhitzen

α -Lactoalbumin ist der Rest des Enzymkomplexes für die Synthese von Lactose; während die Rolle von β -Lactoglobulin ungeklärt ist. Beim Erhitzen der Milch werden die Disulfidbrücken der Albumine und Globuline zerstört, was zur Denaturierung und Zusammenlagerung führt. Die Aggregatbildung der β -Lactoglobuline ist für die Hautbildung verantwortlich.

2. Durchführung

Geräte

6 Reagenzgläser mit Ständer, 1 Becherglas 250 ml, 1 Becherglas 100 ml, 1 Erlenmeyerkolben 250 ml, 2 große Trichter, 3 große Filterpapiere, 5 Pipetten, Magnetrührer, Glasstab, Brenner mit Dreibein und Drahtnetz, pH-Teststreifen, **Schutzbrille**

Chemikalien

100 ml Vollmilch, Konz. Ethansäure, ges. Na_2CO_3 -Lösung, verdünnte CuSO_4 -Lösung, konz Salpetersäure, Fehling I und II-Lösungen

2.1. Abtrennung der Caseine durch Säurefällung

1. 50 ml Milch werden im großen Becherglas mit warmem Leitungswasser auf 250 ml verdünnt.
2. Anschließend wird der pH-Wert mit Teststreifen bestimmt.
3. Unter Rühren werden 3 - 6 ml konz. Essigsäure zugetropft, bis der IEP bei pH 4,6 erreicht ist und die Caseine in dicken Flocken ausfallen.
4. Man rührt noch 1 - 2 min und filtriert dann in den Erlenmeyerkolben. Dies dauert eine Weile.
5. Während der Filtration werden die 6 Reagenzgläser beschriftet:
 - Filtrerrückstand 1 (Caseine) + Biuret
 - Filtrat 1 (Molke) + Biuret
 - Filtrerrückstand 2 (Albumine und Globuline) + Biuret
 - Filtrat 2 (Sirte) + Biuret
 - Filtrat 2 (Sirte) + Fehling
 - Filtrat 2 (Sirte) + Xanthoprotein
6. Um die Filtration zu beschleunigen, kann der Filter ausgewechselt werden. Die Filtration kann beendet werden, sobald sich ca. 50 ml Molke im Erlenmeyerkolben gesammelt haben.
7. Jeweils ein Teil des Filtrates 1 (Molke) und des Filtrerrückstandes 1 (Caseine) werden in die entsprechenden Reagenzgläser abgefüllt.
8. Die restliche Molke wird in das kleine Becherglas gefüllt und in 2.2. weiterverarbeitet.

Fragen zu 2.1.

- a) Was ist der IEP?
- b) Zeichnen Sie ein Dipeptid aus Lysin und Asparaginsäure bei pH 1, am IEP und bei pH 13.
- c) Warum ist die Löslichkeit von Aminosäuren und Proteinen am IEP am geringsten?
- d) Welche Puffersysteme verhindern die Ausfällung der Proteine im Blut?

2.2. Abtrennung von Globulin und Albumin durch Erhitzen und Aussalzen

1. Das Filtrat 1 (Molke) wird mit 5 - 10 ml ges. Na_2CO_3 -Lösung in **kleinen Portionen** versetzt, bis pH 6 erreicht ist (**mit Teststreifen kontrollieren!**) und die Albumine und Globuline in feinen Flocken ausfallen.
2. Anschließend kocht man **vorsichtig** und unter **ständigem Rühren** noch 1 - 2 min auf, um die Ausflockung (Koagulation) der Proteine zu fördern. (Wenn die Molke **anfängt** zu steigen, sofort den Brenner wegnehmen)
3. Mit dem **sorgfältig gereinigten und proteinfreien** Trichter filtriert man direkt in ein **sauberes** Reagenzglas.
4. Der Filtrerrückstand 2 (Albumine und Globuline) wird in das entsprechenden Reagenzglas gekratzt.
5. Das Filtrat 2 (Sirte) wird auf die **drei** entsprechenden Reagenzgläser verteilt.

Fragen zu 2.2.

- a) Wie nennt man die Zerstörung der Tertiärstruktur eines Proteines?
- b) Welche Möglichkeiten gibt es noch, um die Tertiärstruktur eines Proteins zu zerstören?
- c) Nennen Sie zwei wichtige Funktionen von Proteinen im Blut, die durch die Tertiärstruktur bestimmt werden.
- d) Beschreiben Sie Chancen und Risiken eines Fieberanfalls im Hinblick auf b)

2.3. Untersuchung auf Zucker und Eiweiße

Da bei allen Nachweisen konzentrierte Lauge verwendet und teilweise auch erhitzt wird, muss in diesem Abschnitt ständig die **Schutzbrille** getragen werden!

1. Die folgenden Lösungen werden mit **einem Tropfen** (!) verdünnter CuSO_4 -Lösung versetzt und geschüttelt:
 - Filtrerrückstand 1 (Caseine) gelöst in 2 m NaOH
 - Filtrat 1 (Molke) versetzt mit etwas 2 m NaOH
 - Filtrerrückstand 2 (Albumine und Globuline) gelöst in 2 m NaOH (erwärmen und schütteln)
 - Filtrat 2 (Sirte) versetzt mit etwas 2 m NaOH
2. Filtrat 2 (Sirte) wird mit 2 Tropfen konz Salpetersäure (ätzend und krebserregend!) versetzt und leicht erwärmt.
3. Filtrat 2 (Sirte) wird mit je 2 ml Fehling I und II (Vorsicht Lauge!) versetzt und leicht erwärmt

Fragen zu 2.3.

- a) Zeichnen Sie die Strukturformel eines aus zwei Glycinmolekülen aufgebauten Dipeptides bei pH 14.
- b) Beschreiben Sie die Bildung eines Kupfer-Biuret-Komplexes aus zwei Molekülen des Dipeptides aus a)
- c) Warum bildet sich der Biuret-Komplex nur in stark basischen Lösungen?
- d) Beschreiben Sie die Reaktion von Fehling-Lösung mit Lactose in Strukturformeln.
- e) Notieren Sie die Beobachtungen und Ergebnisse aller sechs Nachweise aus 2.3.
- f) War die Abtrennung der Proteine erfolgreich? Wenn nicht, woran könnte es liegen?