

Philipps-Universität Marburg
Fachbereich Chemie LA
Übungen im Experimentalvortrag
Leitung: Butenuth, Gerstner, Perst
Referent: Marco Hasenauer

Organischer Experimentalvortrag

Thema:

Milch und Milchprodukte

SS 2000

Inhalt:

1. Einleitung

2. Lipide und ihre Bedeutung für Milch und Milchprodukte

2.1. Emulsionstyp von Milch und Butter (V1/V2)

2.2 Triacylglyceride der Milch (V3)

2.3. Verdauung von Milchfett (V4)

3. Proteine und ihre Bedeutung für Milch und Milchprodukte (V5)

3.1. Aminosäuren der Milchproteine (V6)

3.2. Spezielle Proteine der Milch (Caseine) (V7/V8)

4. Literatur

1. Einleitung

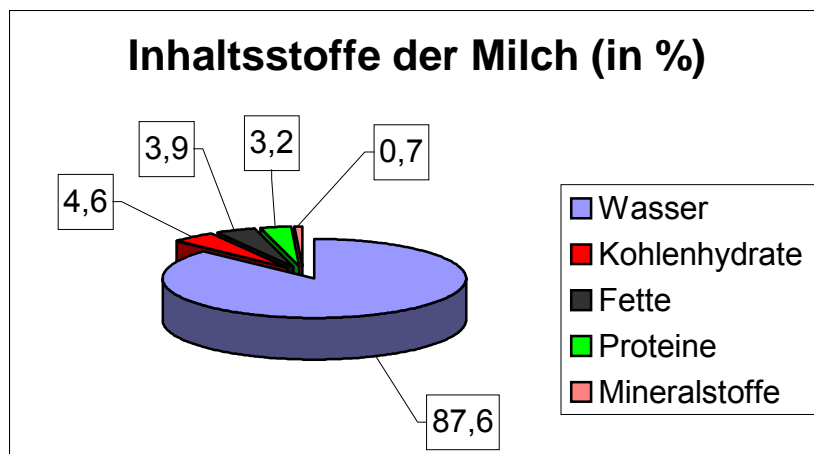
Definition: *Milch ist die aus Milchdrüsen weiblicher Säugetiere abgesonderte Flüssigkeit. Sie enthält als ausschließliche Nahrung des heranwachsenden Lebewesens alle wichtigen Nährstoffe. Unter Milch als Handelsware versteht man heute lediglich die Kuhmilch.*

Dieser Vortrag beschränkt sich auf die Betrachtung der Kuhmilch. Sie spielt für die Ernährung eine bedeutende Rolle, so betrug z.B. die Produktion an Kuhmilch 1990 weltweit: 445 507 000 t.

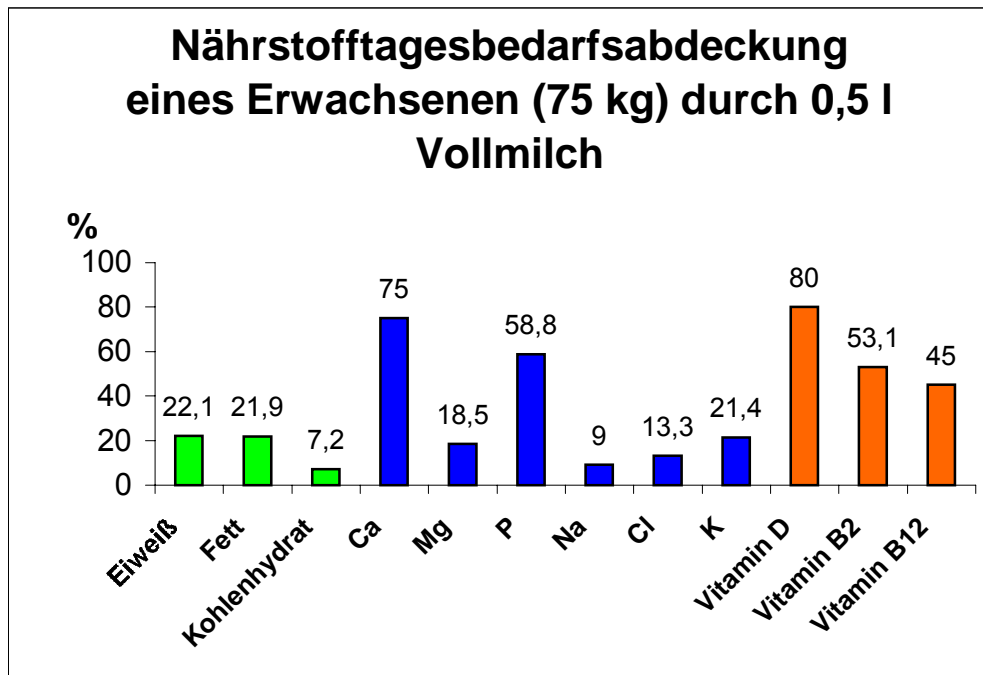
Die Inhaltsstoffe der Milch sind:

- Wasser
- Proteine
- Fette
- Kohlenhydrate
- Mineralstoffe
- Vitamine
- Aromastoffe
- Enzyme

Die Inhaltsstoffe mit dem größten Massenanteil sind in folgender Tabelle dargestellt:



Die Bedeutung der Milch für die Ernährung ist an folgender Tabelle zu erkennen. Abgebildet ist die Nährstofftagesbedarfsabdeckung:



Im folgenden wird die Betrachtung auf die Lipide und Proteinen und ihre Bedeutung für Milch und Milchprodukte eingeschränkt.

2. Lipide und ihre Bedeutung für Milch und Milchprodukte

Die Lipidfraktion der Milch setzt sich folgendermaßen zusammen:

Beispiele aus der Lipidfraktion	Anteil an Gesamtlipid %
Triacylglyceride	95-96
Diacylglyceride	1,3-1,6
Monoacylglyceride	0,02-0,04
Ketosäureglyceride	0,9-1,3
Hydroxysäureglyceride	0,06-0,08
Freie Fettsäuren	0,1-0,4
Phospholipide	0,8-1,0
Sphingolipide	0,06
Sterine	0,2-0,4

Hervorgehoben werden die Triacylglyceride, da sie den größten Massenanteil einnehmen, die Monoacylglyceride, die eine besondere Funktion bei der Verdauung haben und die Phospholipide, die bei der Emulsionsbildung des Fettes in Milch als Emulgator wirken.

2.1. Emulsionstyp von Milch und Butter:

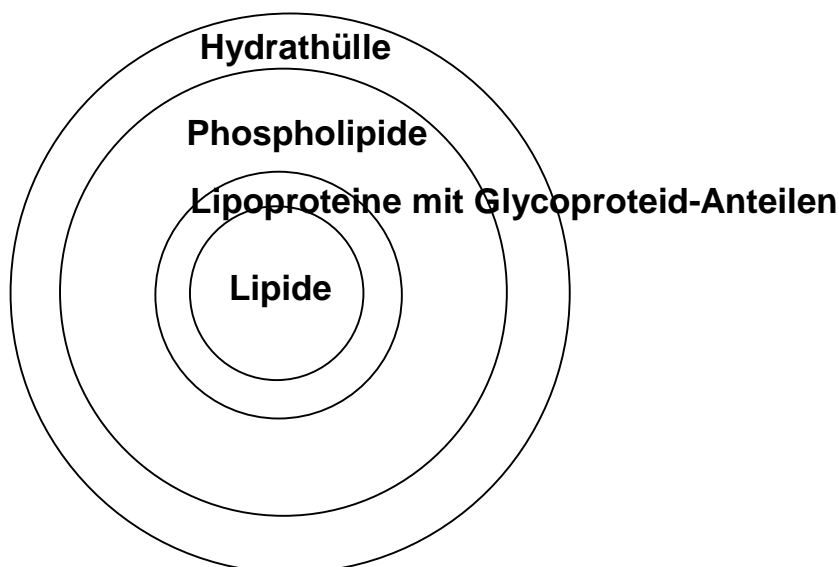
In einem ersten Versuch wird demonstriert, dass Milch und Sahne O/W-Emulsionen sind. Milch und Sahne sind mit Wasser verdünnbar ohne dass eine Phasentrennung erfolgt.

Versuch 1: Verdünnen von Milch und Sahne mit Wasser

Anleitung: In jeweils einem Demoreagensglas werden Milch und Sahne mit Wasser verdünnt. Es tritt keine Phasentrennung auf.

Betrachtet man die Struktur der Fettverteilung in der Milch lässt sich beobachten, dass kleine Fetttropfen im Plasma fein verteilt vorliegen. Milch ist eine O/W-Emulsion in einer grob dispersen Form. Schematisch lassen sich die Fetttöpfchen in der Milch folgendermaßen darstellen:

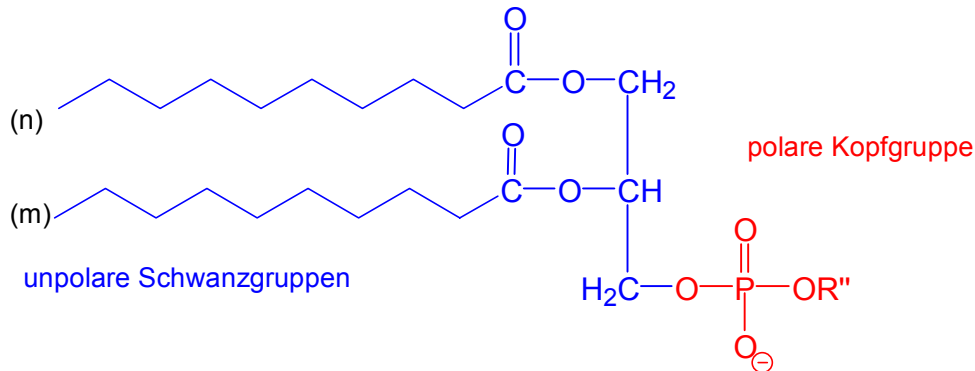
Schematische Darstellung der Fetttöpfchen



Hierbei beträgt der Durchmesser der Fettkügelchen 0,1 bis 10µm und die Schichtdicke der Hülle etwa 8 – 9 nm.

Die Phospholipide fungieren als Emulgator. Aufgrund ihrer Struktur wirken sie als amphiphile Teilchen, die Membranen und Micellen bilden können.

Phospholipid



Mit dem nächsten Versuch soll gezeigt werden, dass Butter ein W/O-Emulsion ist.

Versuch 2: Anfärben von Butter

Material:

- Projektionsmikroskop
- Objektträger
- Deckgläser
- Mörser

Chemikalien:

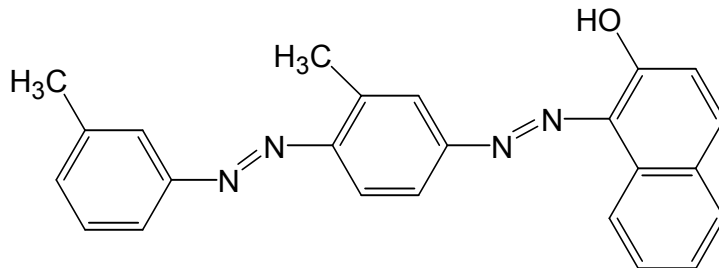
- Butter
- Sudanrot B
- Methyleneblau

Anleitung:

Im Mörser wird ein Stück Butter mit einer Spatelspitze Sudanrot B und einer Spatelspitze Methyleneblau gut verrieben. Die so angefärbte Butter wird unter dem Mikroskop betrachtet. Es ist deutlich die rötlich angefärbte Fettphase und die darin blau angefärbten Wassertropfen erkennbar.

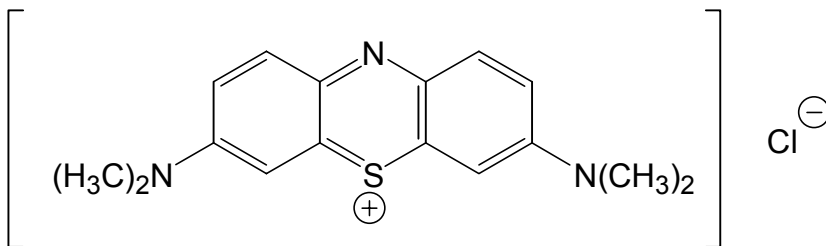
Auswertung:

Sudanrot B ist ein fettlöslicher Bisazofarbstoff. Er färbt die Fettphase rötlich.



Sudanrot B

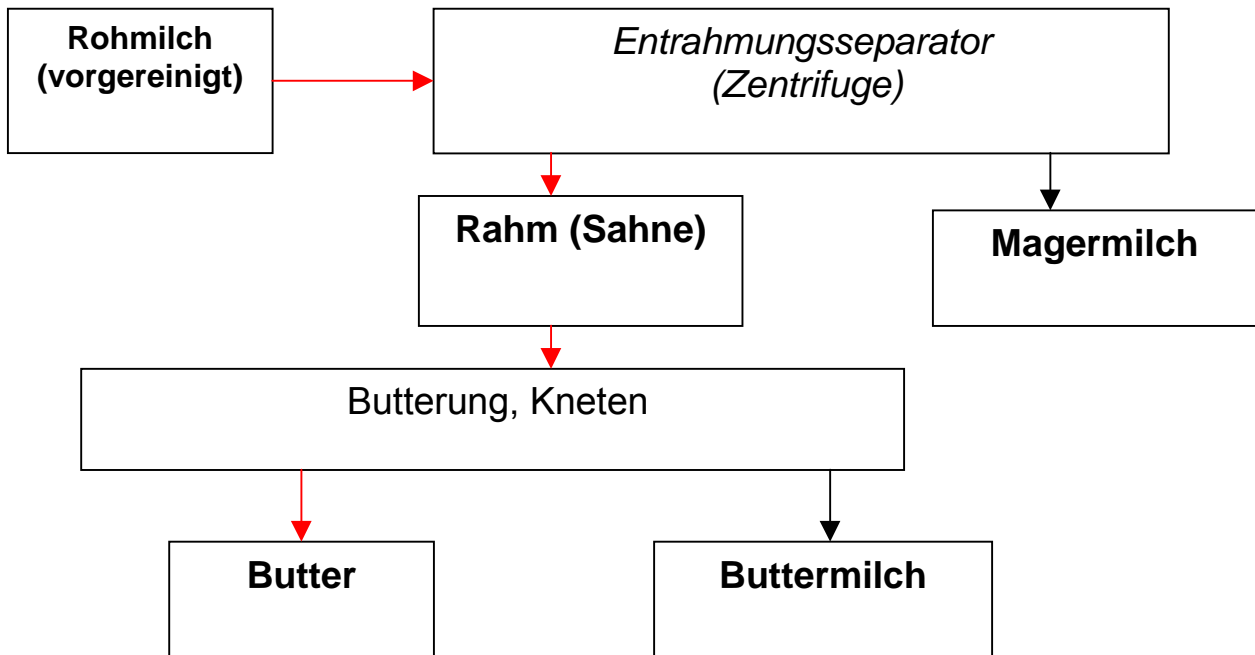
Methylenblau ist ein wasserlöslicher Phenothiazinfarbstoff. Er färbt die im Fett eingeschlossenen Wassertropfen blau.



Methylenblau

Die Umkehr des Emulsionstyp von Milch zu Butter erklärt sich aus dem Herstellungsprozess der Butter. Sie wird durch den mechanischen Vorgang des Knetens und der Butterung bewirkt. Der Herstellungsprozess von Butter ist im folgendem schematisch dargestellt:

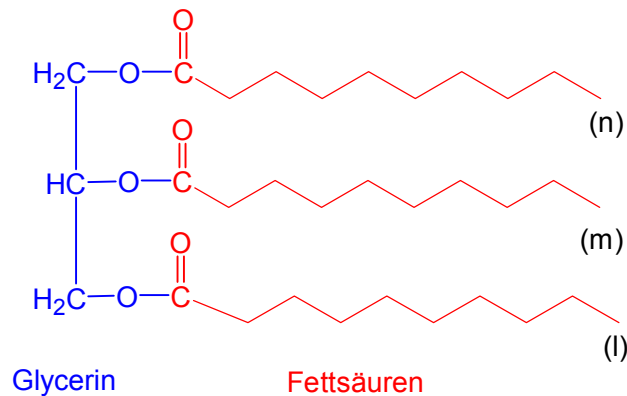
Herstellung von Butter



2.2 Triacylglyceride der Milch

Triacylglyceride sind Ester aus Glycerin und Fettsäuren. Ihre Struktur ergibt sich wie folgt:

Allgemeine Darstellung eines Triacylglycerides



Die Triacylglyceride der Milch setzen sich aus unterschiedlichen Fettsäuren zusammen. Einige Beispiele werden tabellarisch dargestellt:

Beispiele von Fettsäuren der Triacylglyceride in der Milch			
Fettsäuren	Gew. %	C-Atome	
Buttersäure	2,79	4	
Caprinsäure	3,04	10	
Myristinsäure	8,94	14	gesättigt
Palmitinsäure	23,8	16	
Stearinsäure	13,2	18	
Ölsäure	25,5	18	
Linolsäure (essentiell)	2,1	18	ungesättigt
Linolensäure (essentiell)	0,38	18	

Im nächsten Versuch wird nun zuerst eine Verseifung der Triacylglyceride der Butter und anschließend Buttersäure in Butter als Buttersäureethylester nachgewiesen.

Versuch 3a: Verseifung der Triacylglyceride von Butter

Material:

- Bunsenbrenner
- Demoreagensglas
- Spritzflasche

Chemikalien:

- 10 g Butter
- einige Plätzchen KOH
- dest. Wasser

Anleitung:

Die Butter und die KOH Plätzchen werden in das Reagensglas gegeben. Anschließend wird das Gemisch über dem Bunsenbrenner einige Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen wird ein Teil des Reaktionsgemisches abgetrennt und für einen folgenden Versuch aufgehoben. Zum zweiten Teil des Reaktionsgemisches wird etwas dest. Wasser gegeben. Beim Schütteln tritt eine Schaumbildung auf.

Auswertung:

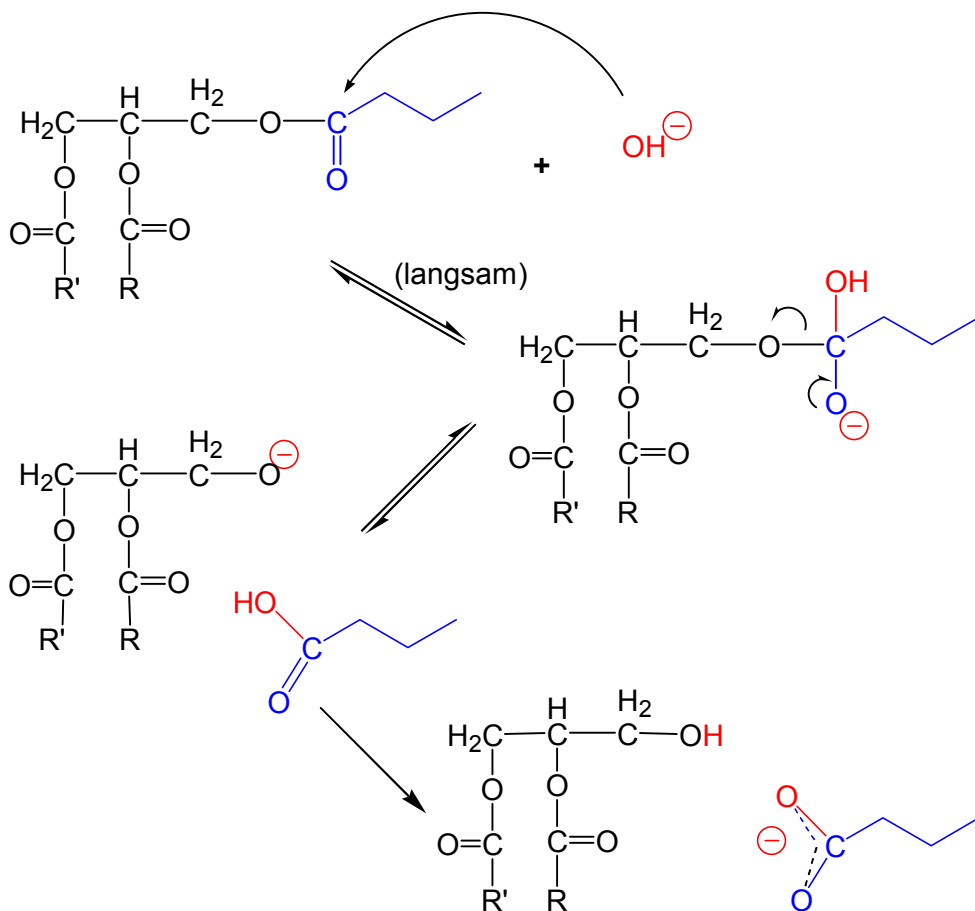
Die Schaumbildung wird durch die entstandenen Seifen bewirkt, es hat eine alkalische Esterhydrolyse stattgefunden.

Reaktion:



Der Reaktionsmechanismus der Verseifung lässt sich folgendermaßen darstellen:

Mechanismus der Verseifung (B_{AC}2)



Versuch 3b: Nachweis der Buttersäure in Butter als Buttersäureethylester

Material:

- 2 Demoreagensgläser
- 2 Pipetten

Chemikalien:

- abgetrenntes Reaktionsgemisch aus Versuch 3a
- Glaswolle
- konz. Schwefelsäure
- Ethanol

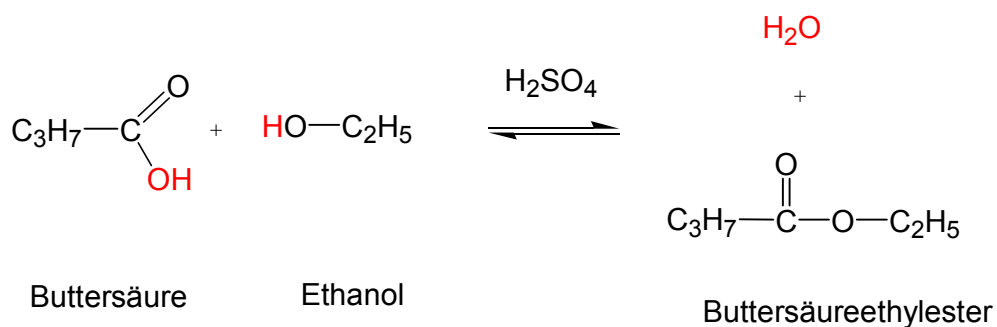
Anleitung:

Zu dem Reaktionsgemisch aus Versuch 3a gibt man im Überschuss Ethanol. Anschließend wird mit konz. Schwefelsäure angesäuert. Mit einer Pipette werden einige Tropfen aus dem Reaktionsgemisch vorsichtig auf Glaswolle, die sich in einem Demoreagensglas befindet, aufgebracht. Bei der so hergestellten Probe ist ein Geruch von Ananas wahrzunehmen.

Auswertung:

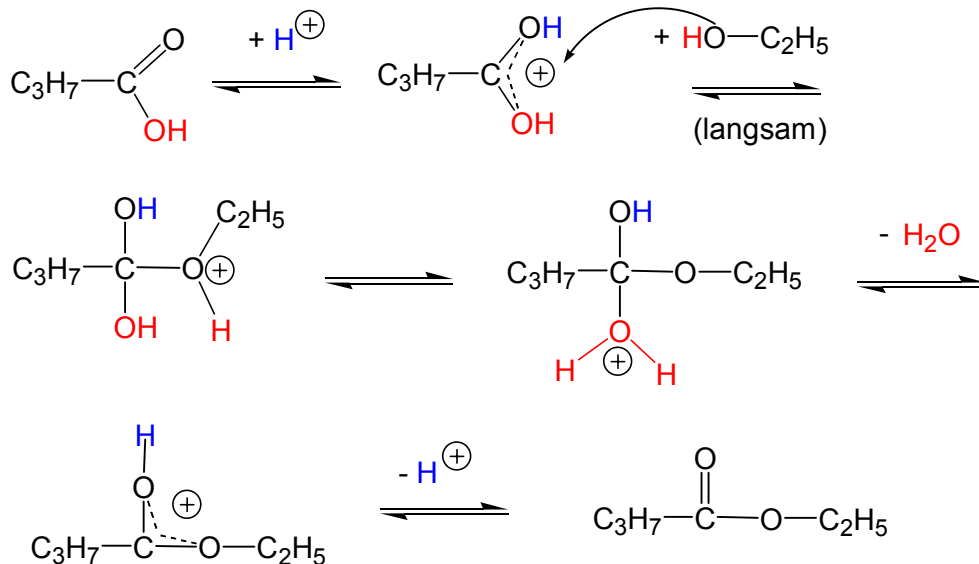
Der Ananasgeruch stammt vom entstandenen Buttersäureethylester. Es hat eine säurekatalysierte Veresterung mit der in Versuch 3a u.a. freigewordenen Buttersäure und dem zugegebenen Ethanol stattgefunden.

Säurekatalysierte Veresterung



Der Mechanismus der Reaktion lässt sich wie folgt beschreiben:

Mechanismus der säurekatalysierten Veresterung (A_{AC}2)



2.3. Verdauung von Milchfett

Im Dünndarm werden die Triacylglyceride der Milch mit Hilfe der Pankreaslipase in Fettsäuren und Monoacylglyceride gespalten. (Gallensäure fungiert bei diesem Vorgang als Emulgator)

Die Pankreaslipase ist ein kolloid-wasserlösliches Protein dessen pH-Optimum bei ca. 8 liegt.

Die entstehenden Monoacylglyceride sind im Dünndarm leicht resorbierbar. Sie können zudem Micellen ausbilden und unterstützen damit die Aufnahme von Fetten und fettlöslichen Vitaminen in die Darmwand.

In nächsten Versuch soll die Spaltung von Milchfetten in Fettsäuren und Monoacylglyceriden mit Pankreaslipase anhand einer pH-Wert Änderung demonstriert werden.

Versuch 4: Verdauung von Milchfett

Material:

- Magnetrührer mit Thermofühler
- 2 Bechergläser (250 ml)

Chemikalien:

- frische Vollmilch
- 0,1 molare NaOH-Lösung
- Phenolphthalein
- Pankreaslipase

Anleitung:

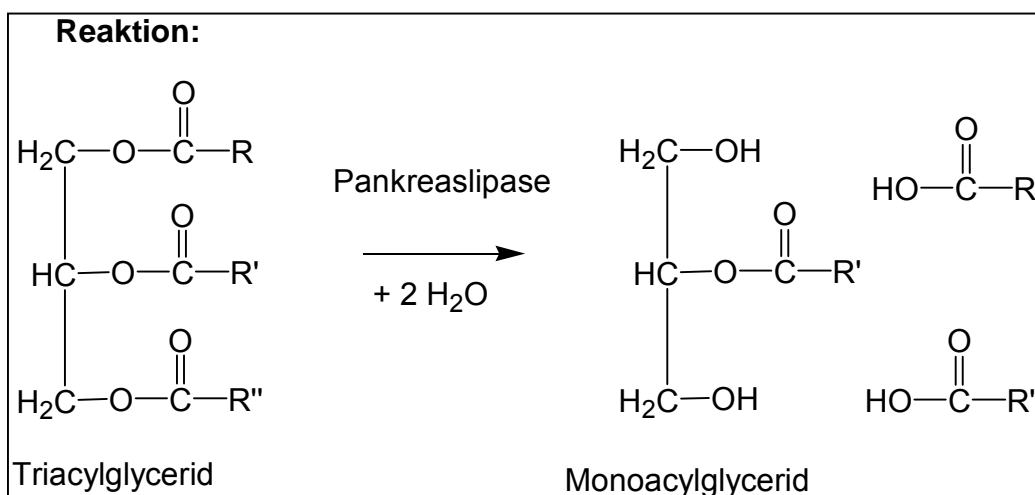
Man füllt 100 ml frische Vollmilch in ein Becherglas. Nach Zugabe von Phenolphthalein wird so lange 0,1 molare NaOH zugegeben, bis der Umschlagspunkt des Indikators erreicht wird und die Milch rötlich gefärbt ist. Eine Hälfte der so erhaltenen Lösung wird als Vergleichsprobe in ein zweites Becherglas abgetrennt.

Die andere Hälfte wird auf ca. 37° C erwärmt und eine Spatelspitze Pankreaslipase zugegeben.

Nach wenigen Minuten wechselt die Farbe der Lösung von Rot nach Weiß.

Auswertung:

Es hat folgende Reaktion stattgefunden:



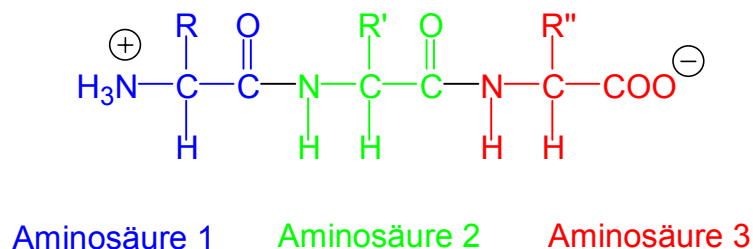
Die bei der Spaltung der Triacylglyceride freiwerdenden Fettsäuren bewirken ein Sinken des pH-Wertes bis unter den Umschlagspunkt des Indikators.

3. Proteine und ihre Bedeutung für Milch und Milchprodukte

Proteine sind natürlich vorkommende Polypeptidmoleküle. Sie setzen sich aus Aminosäuren, die über Peptidbindung miteinander verknüpft sind, zusammen. Dabei bildet die Sequenz der Aminosäuren die Primärstruktur des Proteins.

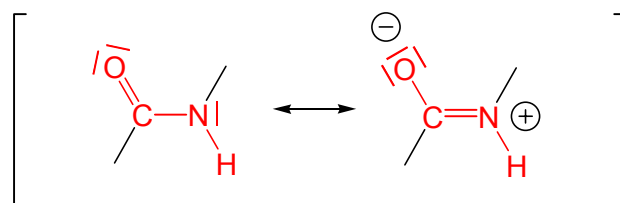
Beispiel einer Primärstruktur:

Primärstruktur eines Tripeptids



Die Peptidbindung besitzt einen partiellen Mehrfachbindungscharakter. Dabei nehmen das Sauerstoff-, Kohlenstoff-, Stickstoff- und Wasserstoffatom eine planare Anordnung an. Diese Eigenschaften können mit Hilfe der mesomeren Grenzstrukturen der Peptidbindung verdeutlicht werden.

Peptidbindung



In dem folgenden Versuch sollen Proteine der Milch anhand dieser Struktur der Peptidbindung nachgewiesen werden.

Versuch 5: Biuret- Reaktion mit Milch

Es handelt sich bei der Biuret- Reaktion um eine allgemeine Nachweisreaktion für Proteine. Es sind mindestens zwei CO-NH-Gruppen in einem Molekül nötig um die Bildung des Nachweiskomplexes (ein Kupferkomplexes) zu ermöglichen.

Material:

- Demoreagensglas
- Pipette

Chemikalien:

- Milch
- 2 molare NaOH
- verd. CuSO_4 -Lösung

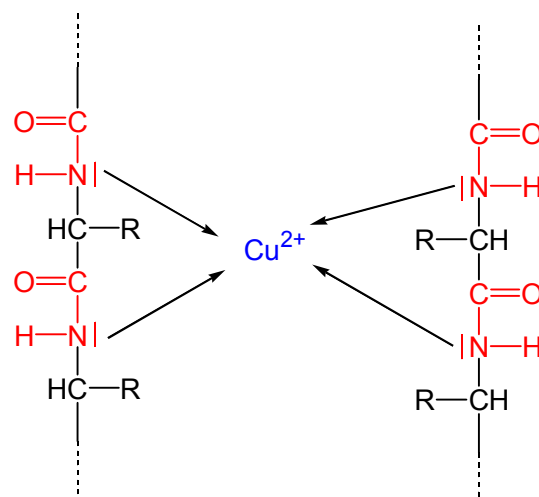
Anleitung:

20 ml Milch werden mit 20 ml 2 molarer NaOH versetzt. Bei Zugabe von wenigen Tropfen verd. CuSO_4 – Lösung tritt eine intensive Violettfärbung auf.

Auswertung:

Die Violettfärbung wird durch einen Kupfer-Protein-Komplex hervorgerufen.

Protein-Kupfer-Komplex



3.1. Aminosäuren der Milchproteine

Die in den Milchproteinen vorkommenden Aminosäuren lassen sich nach den Eigenschaften ihrer Reste in vier Gruppen aufteilen, in neutral unpolar, neutral polar, sauer und basisch. In einer Tabelle werden ihre Massenanteile am Gesamtprotein der Milch dargestellt:

Aminosäurezusammensetzung von Gesamtprotein der Milch (g Aminosäure/100g Protein)

Neutral unpolar:

Aminosäure	Anteil
------------	--------

L-Alanin	3,7
Glycin	2,2
L-Isoleucin	6,2
L-Leucin	10,4
L-Phenylalanin	5,3
L-Prolin	10,2
L-Valin	6,8

Neutral polar:

Aminosäure	Anteil
------------	--------

L-Cystein	0,8
L-Methionin	2,9
L-Serin	5,8
L-Threonin	4,8
L-Tryptophan	1,5
L-Tyrosin	5,4

Sauer:

Aminosäure	Anteil
------------	--------

L-Asparaginsäure	8,2
L-Glutaminsäure	22,8

Basisch:

Aminosäure	Anteil
------------	--------

L-Arginin	3,6
L-Histidin	2,8
L-Lysin	8,3

essentielle Aminosäuren

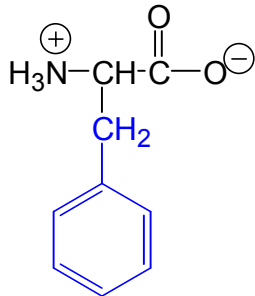
Bei den Aminosäuren handelt es sich um α -Aminosäuren, die L-Konfiguration besitzen.

Aus jeder Gruppe soll die Struktur der Aminosäuren anhand eines Beispiels gezeigt werden:

Beispiele von Aminosäuren

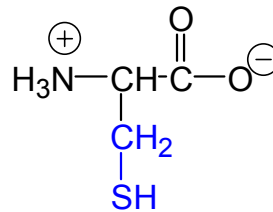
neutral unpolar:

Phenylalanin



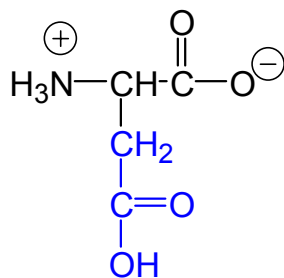
neutral polar:

Cystein



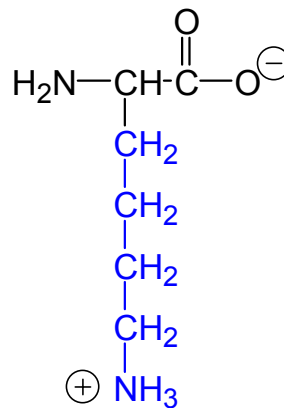
sauer:

Asparaginsäure



basisch:

Lysin



Mit dem nächsten Versuch sollen nun spezielle Aminosäuren der Milch nachgewiesen werden.

Versuch 6: Xanthoproteinreaktion mit Milch

Die Xanthoproteinreaktion ist ein spezieller Nachweis für aromatische Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan). Bei dieser Reaktion erfolgt eine Nitrierung des aromatischen Ringsystems.

Material:

- Demoreagensglas
- Bunsenbrenner

Chemikalien:

- Milch
- konz. Salpetersäure

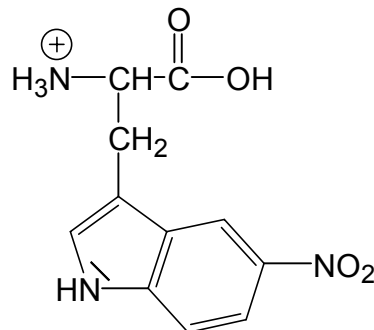
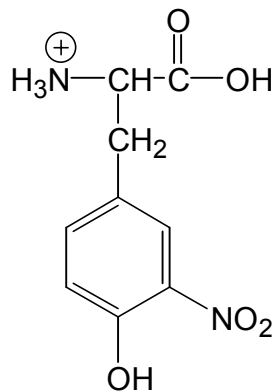
Anleitung:

Zu etwa 10 ml Milch gibt man 10 ml konz. Salpetersäure. Bei vorsichtigen Erwärmen über dem Bunsenbrenner tritt eine Gelbfärbung auf.

Auswertung:

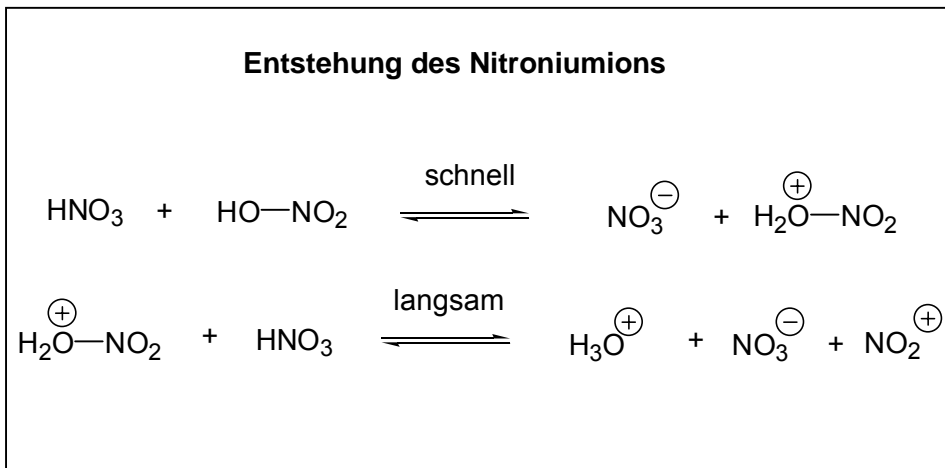
Die entstandene Gelbfärbung ergibt sich vorwiegend durch die Produkte der Nitrierung von Tyrosin und Tryptophan. Diese sind:

Produkte der Nitrierung von Tyrosin und Tryptophan



Der Mechanismus der Reaktion wird am Beispiel des Phenylalanins dargestellt. Es handelt sich um eine elektrophile Substitution am Aromaten.

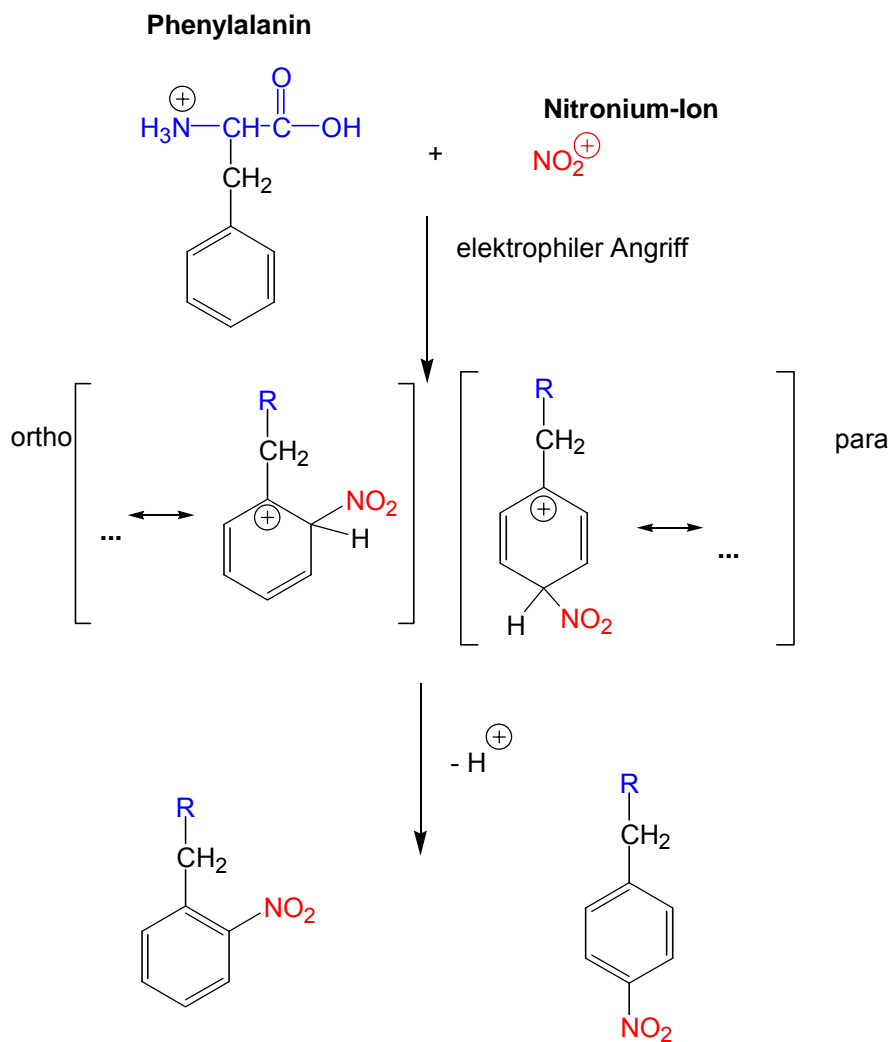
In einem ersten Schritt entsteht das elektrophile Teilchen:



Die weitere Reaktion lässt sich wie folgt formulieren:

Reaktionsmechanismus der Xanthoproteinreaktion

elektrophile Monosubstitution am Aromaten



3.2. Spezielle Proteine der Milch (Caseine)

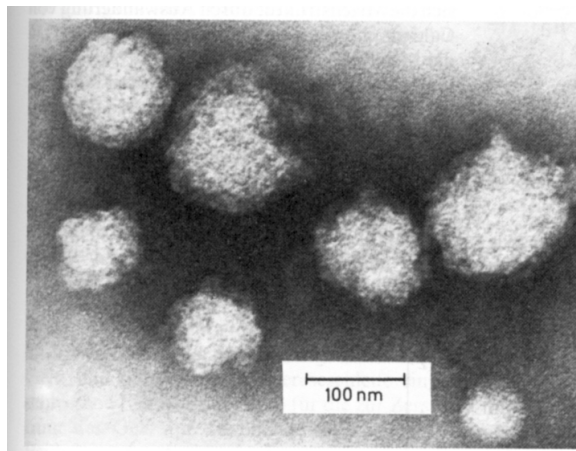
Bei den Milchproteinen lässt sich zwischen den Caseinen und den Molkenproteinen unterscheiden. Ihre Zusammensetzung in der Milch ergibt sich wie folgt:

Caseine 80 %		Molkenproteine 20 %	
α_s - Casein	40 %	Lactalbumin	12 %
β - Casein	24 %	Lactoglobulin	5 %
κ - Casein	12 %	Immunoglobuline	2 %
γ - Casein	4 %	andere	1%

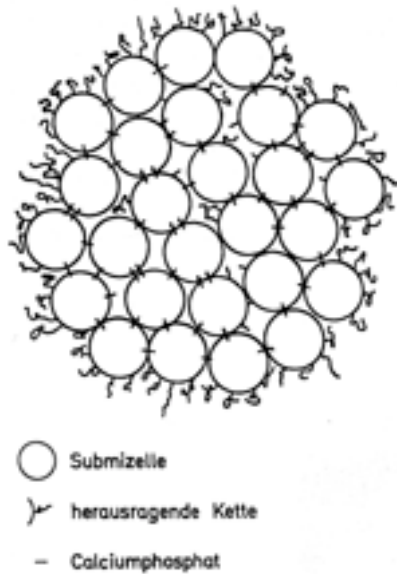
Im folgenden werden die Caseine der Milch betrachtet.

Die Caseinproteine bilden Micellen in der Milch. Ihr Micellendurchmesser beträgt 50 – 300 nm, so dass man von einer Suspension sprechen kann.

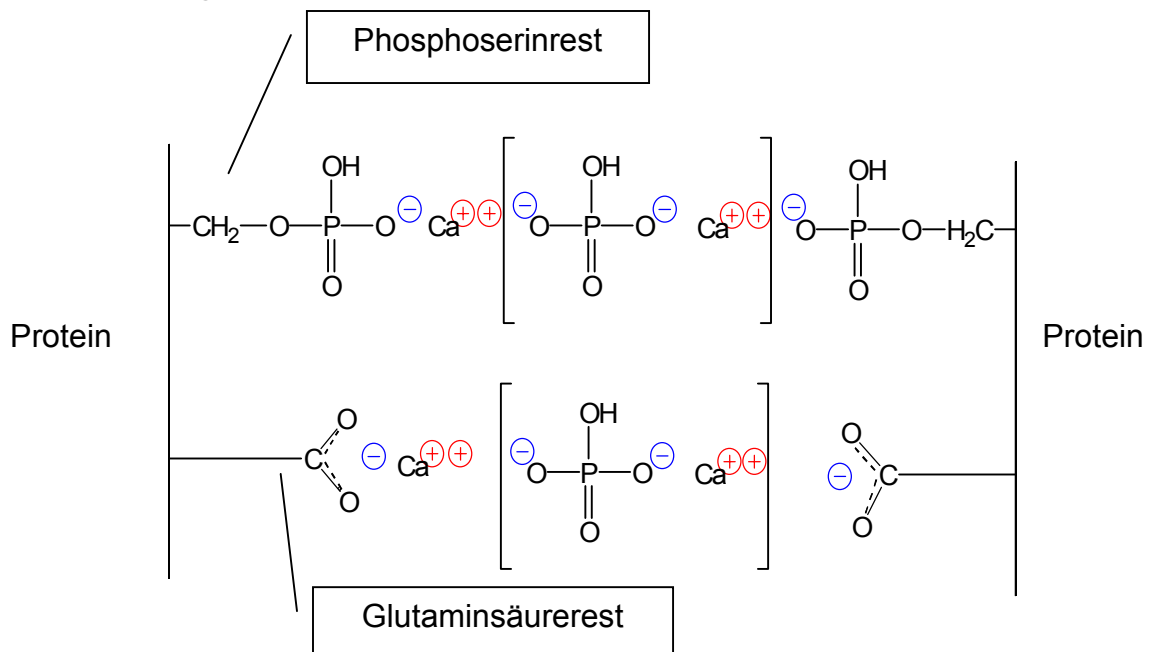
Aufnahme von Caseinmicellen im Rasterelektronenmikroskop



Schematisch lässt sich der Aufbau der Caseinmicellen folgendermaßen darstellen:



Die Caseinmicellen setzen sich aus mehreren Submicellen zusammen, die über Calciumphosphatbrücken miteinander verbunden sind. Die Verknüpfung über die Calciumphosphatbrücken lässt sich schematisch folgendermaßen formulieren:



Aus den Submicellen ragen die hydrophilen Teile des κ -Caseins wie Haare heraus. Sie ermöglichen die Ausbildung einer Hydrathülle.

Im nächsten Versuch wird gezeigt, dass durch die enzymatische Spaltung des κ -Caseins die Caseine der Milch gefällt werden können.

Versuch 7: Enzymatische Fällung des Caseins

Material:

- Magnetrührer mit Thermofühler
- Becherglas (250 ml)

Chemikalien:

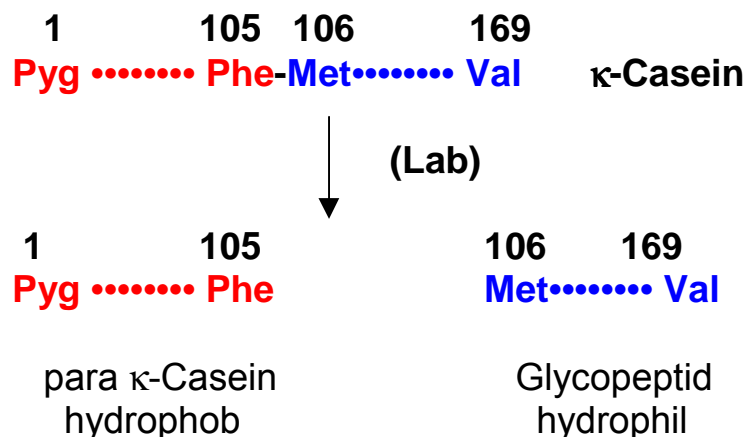
- frische Vollmilch
- Labferment

Anleitung:

Die Milch wird unter ständigem Rühren auf 37 °C erhitzt. Danach wird eine Spatelspitze Labferment zugegeben. Nach einigen Minuten ist ein weißer Niederschlag der Caseine zu erkennen.

Auswertung:

Durch Zugabe des Labferments wird in einer enzymatischen Reaktion das κ -Casein in zwei Teile gespalten:



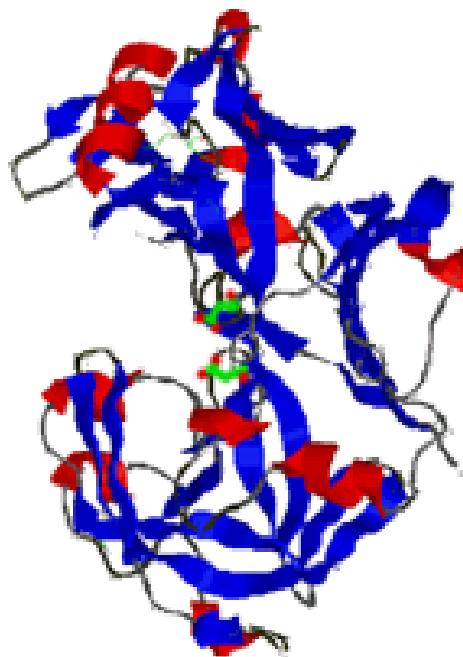
Die Caseinmicellen ändern durch den Verlust der hydrophilen Teile des κ -Casein ihre Hydrathüllenstärke. Sie können sich nun zusammenballen und fallen aus.

Das verwendete Labferment ist eine Asparaginsäureproteinase. Ihr pH Optimum liegt bei 6-7. Das Temperaturoptimum beträgt ca. 39°C

Die Primärstruktur des Enzyms besteht aus 326 Aminosäuren. Die Tertiärstruktur wird in folgendem Bild sichtbar:

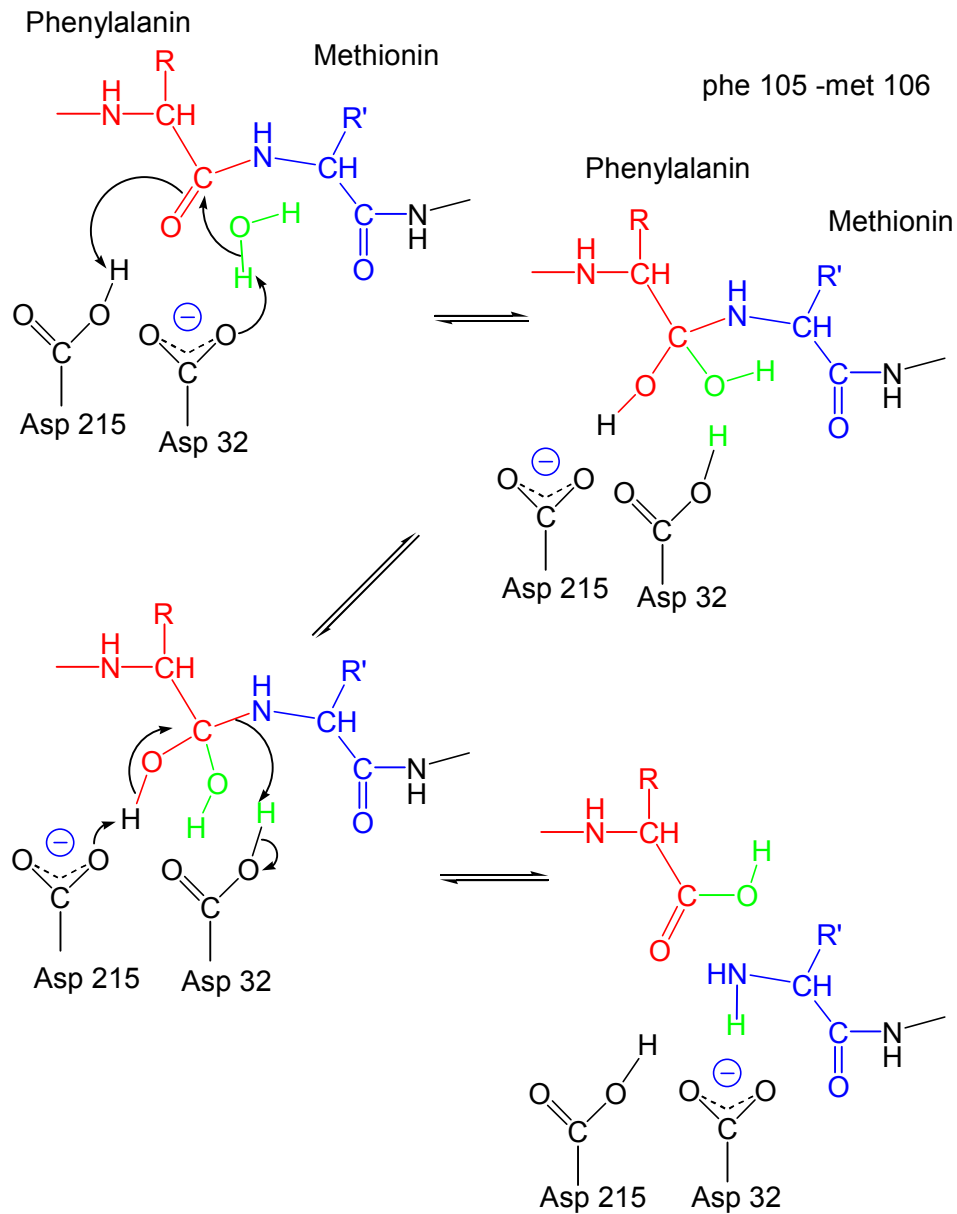
Struktur des Labenzym:

α -Helix-Struktur
 β -Faltblatt-Struktur
Schleifen
Aktives Zentrum
(ASP 215/ ASP 32)



Der Reaktionsmechanismus der Caseinspaltung lässt sich folgendermaßen darstellen:

Reaktionsmechanismus der Caseinspaltung



Die Fällung des Caseins mittels Lab findet in der Käseproduktion ihre Anwendung. Eine weitere Methode der Caseinfällung, die bei der Produktion von Joghurt eine Rolle spielt, ist die saure Fällung. Hier wird die Unlöslichkeit der Caseine am isoelektrischen Punkt genutzt.

Der isoelektrische Punkt (I.P.) ist die Bezeichnung für den pH-Wert einer wässrigen Lösung bei dem gelöste amphotere Elektrolyte ungeladen erscheinen.

Bei makromolekularen Ampholyten (z.B.: Proteine) ist der I.P. und Ladungsnullpunkt nicht zwingend identisch.

Der I.P. wird von der Anzahl der sauren und basischen Gruppen und deren Lage im Molekül beeinflusst. Proteine zeigen ein Löslichkeitsminimum am I.P..

Versuch 8: Bestimmung des isoelektrischen Punktes von Casein

Material:

- 5 Demoreagensgläser mit Halterung
- Becherglas
- Vollpipette 10 ml

Chemikalien:

- Casein
- NaOH – Lösung (1 molar)
- verd. Salzsäure (1 molar)
- Eisessig
- Natriumacetat
- dest. Wasser

Anleitung:

In jeweils einem Demoreagensglas werden 90 ml eines Essigsäureacetatpuffers mit definiertem pH-Wert vorgelegt.

1. Pufferlösung pH = 5,9
2. Pufferlösung pH = 5,3
3. Pufferlösung pH = 4,7
4. Pufferlösung pH = 4,1
5. Pufferlösung pH = 3,5

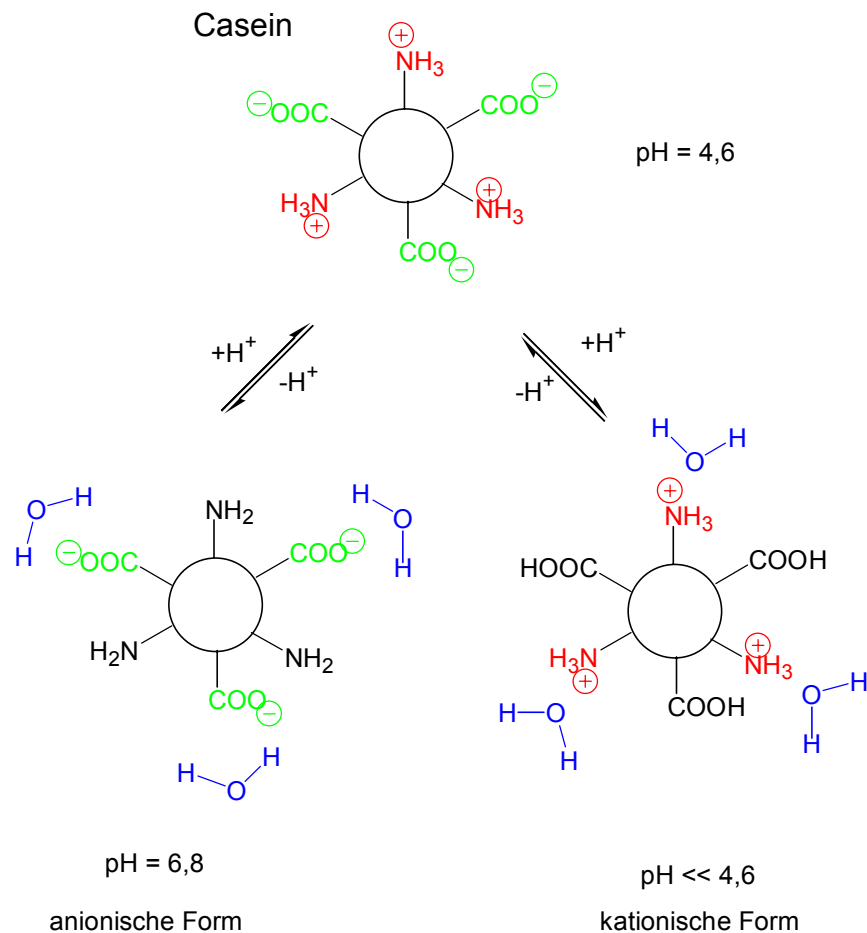
Zu jedem Puffer werden 10 ml einer Caseinlösung gegeben, die man folgendermaßen herstellt:

250 mg reines Casein wird in 20 ml dest. Wasser suspendiert und mit 5 ml NaOH (1 molar) in Lösung gebracht. Anschließend wird mit 5 ml HCl (1 molar) neutralisiert und mit dest. Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

Auswertung:

Der stärkste Niederschlag des Caseins ist bei der Pufferlösung mit pH ~ 4,7 zu sehen. Hier liegt ungefähr der I.P. des Caseins.

Schematisch lässt sich der Zustand des Caseins in Abhängigkeit des pH-Wertes folgendermaßen darstellen:



4. Literatur:

Apel, Jürgen; Wöhrmann, Holger: "Rund um die Milch" – ein Unterrichtskonzept. Naturwissenschaften im Unterricht. Chemie, 7 (1996) 33, S. 18-25

Becker, Hans Jürgen; Hildebrandt, Henry: Aus der Schule für das Leben. Das Lebensmittel Milch in der familialen Diskussion. Praxis der Naturwissenschaften. Chemie, 44 (1995) 7, S. 28-33

Becker, Jürgen: "Eiweiß in der Milch". Ein Verbraucherdiallog mit Bezug zum Unterricht. Naturwissenschaften im Unterricht. Chemie, 7 (1996) 33, S. 26-29

Belitz, Hans-Dieter: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer 1995, 4., überarb. Aufl., korrigierter Nachdr.

Gottschall, Kerstin; Pfeifer, Peter: Von der Milch zum Käse. Mit Anregungen für den projektorientierten Unterricht. Naturwissenschaften im Unterricht. Chemie, 7 (1996) 33, S. 30-33

Petz, Michael; Lampen, Rudolf: Arbeitsvorschriften für einfache lebensmittelchemische Versuche im Unterricht. Naturwissenschaften im Unterricht. Chemie, 43 (1995) 30, S. 41-44

Pfeifer, Peter: Das Thema "Milch" und der Chemieunterricht. Naturwissenschaften im Unterricht. Chemie, 7 (1996) 33, S. 4-8

Pilhofer, Werner: Die Milch - ein Hauptnahrungsmittel. Praxis der Naturwissenschaften. Biologie, 39 (1990) 2, S. 7-11

Stübs, Renate: Experimentelle Untersuchungen von Lebensmitteln. Milch, Kartoffeln. Chemie in der Schule, 44 (1997) 1, S. 6-14

Vollhardt, Peter, Schore: Organische Chemie, Weinheim VCH 1995, 2. Aufl.

Wöhrmann, Holger: Milch auf dem Prüfstand. Experimente rund um die Milch. Naturwissenschaften im Unterricht. Chemie, 7 (1996) 33, S. 11-17