

Novartis Pharma AG
Schullabor



Was steckt in der Milch?

Experimente zum Nachweis von Eiweiss, Zucker und Fett
2018

Herausgeber

Novartis Pharma AG, CH-4002 Basel

Autoren:

Dr. Christiane Röckl Michel, Simone Kurtz

Guido Hess*, Andreas Schultheiss*

Kontaktadresse:

Novartis Pharma AG

Schullabor

WKL-122.2.28

Postfach

CH-4002 Basel

Tel. 061/696 93 93

E-Mail: kontakt.schullabor@novartis.com

Internet: www.novartis.ch/schullabor

Verbreitung und Veröffentlichung des gesamten Inhalts oder Teilen davon ist nur mit Einverständnis des Herausgebers und Quellennachweis erlaubt.

Kopien für den Schulgebrauch sind erwünscht.

* „Lebenskreis Ernährung“, Herausgeber Schullabor, Novartis International AG, Basel 1999

Inhalt

Versuch 1: Proteine in der Milch.....	4
Wissen	4
Ziele	4
Methode	4
Experiment 1 Teil A: Abtrennung der Milchproteine.....	5
Experiment 1 Teil B: Proteinnachweis nach Bradford.....	5
Auswertung	6
Versuch 2: Fettgehalt in Milchprodukten	8
Wissen	8
Ziele	8
Methode	8
Experiment 2: Fettanteil verschiedener Milcharten	9
Auswertung	9
Versuch 3: Milchzucker Lactose	10
Wissen	10
Ziele	10
Methode	10
Experiment 3: Glucosebestimmung in Milch.....	11
Auswertung	11
Milch	12
Zusammensetzung der Milch	12
Haltbarmachung der Milch	12
Einstellung des Fettgehalts	12
Herstellung verschiedener Milchprodukte	13

Versuch 1: Proteine in der Milch

Wissen

Ein Protein ist eine Kette aus verschiedenen Aminosäuren. Die Länge der Kette und die Art der Aminosäuren sind von Protein zu Protein unterschiedlich. Alle Aminosäuren haben dieselbe Grundstruktur und einen individuellen Rest.

Die Aminosäuren im Protein sind zu einem speziellen Raummuster angeordnet. Jedes Protein besitzt eine individuelle, komplizierte Raumstruktur, die sich aus der Art und Anzahl der Aminosäuren ergibt, aus dem es zusammengesetzt ist. Chemische Einflüsse oder Hitze zerstören die Raumstruktur eines Proteins. Dies führt zu einer reduzierten Löslichkeit, das Protein fällt aus. Man sagt auch, das Protein gerinnt oder koaguliert.

Die Veränderung der Proteinstruktur nennt man Denaturierung. Da die Wirkung eines Proteins von seiner räumlichen Struktur abhängt, führt die Denaturierung des Proteins zum Verlust seiner biologischen Eigenschaften.

Im Versuch werden die Milchproteine ausgefällt. Die häufigsten Milchproteine mit etwa 80% der Gesamtproteinmenge sind die Caseine. Die übrigen Proteine werden auch als Molkeproteine bezeichnet. Diese beiden Proteinfractionen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften. Während die Caseine bei einer Senkung des pH-Wertes schnell ausflocken, koagulieren die Molkeproteine bei einer Erhöhung der Temperatur.

Ziele

Das Prinzip der Denaturierung von Proteinen verstehen.

Verschiedene Fällungsmethoden kennen.

Die Herstellung von Sauermilchprodukten (Joghurt, Sauermilch, Quark,...) und Käse vergleichen.

Eine Nachweismethode für Proteine nennen können.

Methode

Bradford-Test

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bindet an Proteine und ändert dabei seine Farbe von rotbraun zu blau. Die blaue Farbe ist umso intensiver, je mehr Protein in der Probe vorhanden ist. Mithilfe eines Spektrometers lassen sich Farbe und Farbintensität einer Flüssigkeit bestimmen. Für den Bradford-Test wird das Spektrometer so eingestellt, dass die Intensität der blauen Farbe gemessen wird. Vergleicht man die gemessenen Werte mit einer Standardkurve, kann man die Proteinkonzentration einer Flüssigkeit bestimmen.

Handhabung der Mikroliterpipetten

Allgemeine Bemerkungen:

- Stelle die Pipetten nur für Volumina ein, für die sie konzipiert sind! (Kein gewaltsames Überdrehen!)
- Tauche die Pipetten nur mit Pipettenspitze in eine Lösung!
- Benutze immer eine frische Pipettenspitze für verschiedene Lösungen!

Pipetten für verschiedene Volumenbereiche:

20-200 µl (gelb markierte Pipetten)	→ gelbe Pipettenspitzen verwenden
100-1000 µl (blau markierte Pipetten)	→ blaue Pipettenspitzen verwenden
500-5000 µl (lila markierte Pipetten)	→ weisse Pipettenspitzen verwenden

Experiment 1 Teil A: Abtrennung der Milchproteine

1. Beschrifte 3 Falconröhrchen mit A1, A2, A3.
2. Drehe am Waschbecken den Hahn für warmes Wasser auf. Warte, bis das Wasser heiss ist, und miss dann 50 ml warmes Wasser mit dem Messzylinder ab. Giesse das Wasser in das Becherglas.
3. Miss 50 ml Milch mit dem Messzylinder ab und giesse die Milch ebenfalls in das Becherglas.
4. Pipettiere 1000 μ l der verdünnten Milch aus dem Becherglas in Röhrchen A1.
5. Stelle das Becherglas auf den Magnetrührer und gib den Magnetfisch ins Becherglas. Schalte den Magnetrührer mit dem Schalter auf der rechten Seite ein (Stufe 5).
6. Gib mit der Pipette 10'000 μ l (2 x 5000 μ l) Essigsäure zu. Lass das Becherglas 2 Minuten auf dem Magnetrührer stehen. Die Milchproteine flocken aus.
7. Schalte den Magnetrührer ab. Stelle das Becherglas auf den Labortisch und entferne den Magnetfisch mit dem Magnetstab.
8. Giesse den Inhalt des Becherglases in den Filter. Die Milchproteine bleiben als Niederschlag im Filter hängen.
9. Warte 5 Minuten, bis alle Flüssigkeit durch den Filter getropft ist.
10. Gib 2 schmale Löffel vom Niederschlag im Filter in Röhrchen A2. Schiebe den Niederschlag mit dem Wattestäbchen vom Löffel.
11. Werfe den Filter in den Entsorgungsbeutel und bringe den Trichter zum Waschbecken.
12. Pipettiere 1000 μ l vom Filtrat (= Molke) aus dem Erlenmeyerkolben in Röhrchen A3.
13. Pipettiere je 9000 μ l (2 x 4500 μ l) dest. Wasser in die Röhrchen. Schraube die Deckel zu und schüttle die Röhrchen gut.

Experiment 1 Teil B: Proteinnachweis nach Bradford

1. Beschrifte 4 Falconröhrchen mit B1, B2, B3, B4.
2. Pipettiere:

Röhrchen B1	4900 μ l dest. Wasser	100 μ l Probe A1 aus Exp. A
Röhrchen B2	4900 μ l dest. Wasser	100 μ l Probe A2 aus Exp. A
Röhrchen B3	4900 μ l dest. Wasser	100 μ l Probe A3 aus Exp. A
Röhrchen B4	5000 μ l dest. Wasser	-

3. Mische auf dem Vortexmixer.
4. Auf Deinem Arbeitsplatz stehen die 4 Küvetten C1, C2, C3, C4.
Achtung: Die Küvetten sind bereits mit der blauen Coomassie-Lösung gefüllt. Pass auf, dass sie nicht umkippen.
5. Pipettiere 1500 μ l von Reagenzglas B1 in die Küvette C1. Anschliessend pipettierst du 1500 μ l von den Reagenzgläsern B2, B3, und B4 in die entsprechenden Küvetten C2, C3 und C4.

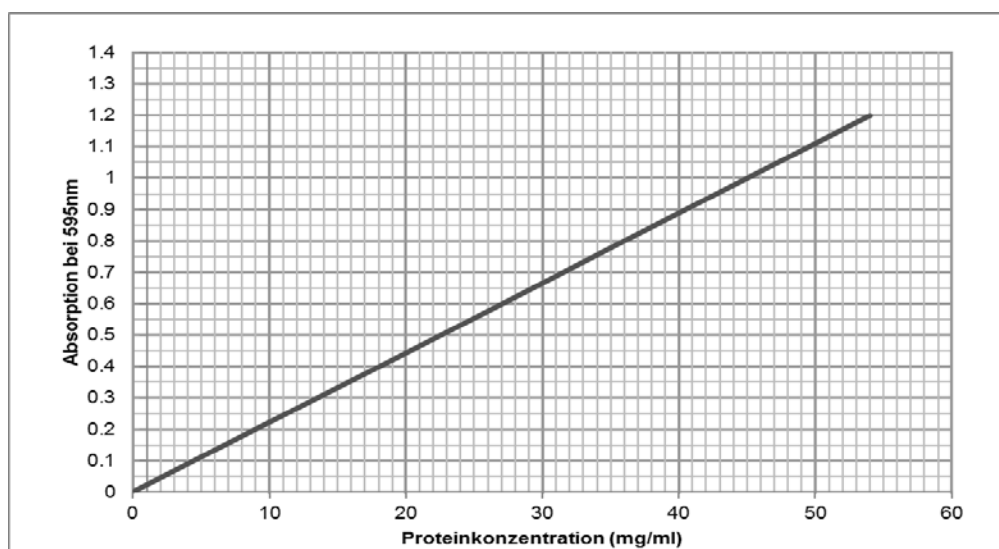
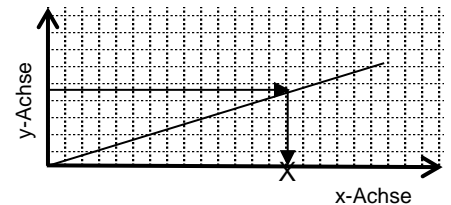
- Lass die Küvetten 5 Minuten stehen und beobachte die Farbveränderungen. Notiere die Farben in der Tabelle.
Achtung: Fass die Küvetten immer nur an den gerillten Seiten an.
- Stelle Küvette C1 in das Spektrometer. Die glatte Seite der Küvette muss zum Pfeil zeigen. Der im roten Feld angezeigte Wert ist die Absorption. Notiere den Wert in der Tabelle. Stelle die Küvette in den Küvettenständer zurück.
- Wiederhole die Messung mit den Küvetten C3 und C4. Notiere die Werte in der Tabelle. C2 kann nicht gemessen werden, da die Lösung wegen der Proteinflocken zu trüb ist.

Auswertung

	C1	C2	C3	C4
Farbe?				
Gemessene Absorption		Wird nicht gemessen		
Gemessene Absorption – Absorption von C4		Wird nicht bestimmt		0

Im Diagramm unten ist eine Standardkurve eingezeichnet. Damit kannst Du die Absorptionswerte in Proteinkonzentrationen umrechnen.

- Markiere auf der y-Achse die Absorptionswert für C1 (Gemessene Absorption – Absorption von C4).
- Zeichne auf dieser Höhe eine Linie parallel zur x-Achse ein.
- Markiere den Punkt, wo diese Linie die Standardkurve schneidet.
- Zeichne von diesem Punkt eine weitere Linie senkrecht nach unten.
- Lies ab, bei welchem Konzentrationswert diese zweite Linie die x-Achse schneidet.
- Wiederhole Punkt 1-5 mit C3.



Welche Proteinkonzentration erhältst du für

C1 = Milch: mg/ml C3 = Molke: mg/ml

Rechne die Proteinmenge in 100ml Milch aus: mg = g

Welche Proteinmenge pro 100ml Milch ist auf der Milchpackung angegeben? g.

Aufräumen

Die Molke im Erlenmeyerkolben benötigst Du noch für Experiment 3.

Schütte den Inhalt der Falconröhrchen ins Waschbecken und wirf die leeren Röhrchen in den Entsorgungsbeutel.

Spüle das Becherglas am Waschbecken aus und lass das Becherglas neben dem Waschbecken stehen.

Spüle den Magnetstab, den Magnetfisch und den Löffel am Waschbecken und lege sie in den Waschmaschinenkorb.

Die Küvetten mit der blauen Coomassie-Lösung werden von der Kursleiterin entsorgt.

Wasche anschliessend Deine Hände.

Versuch 2: Fettgehalt in Milchprodukten

Wissen

Milch ist eine Emulsion von MilCHFettkügelchen im Milchplasma. Unter Milchplasma versteht man die vollkommen fettfreie Milchflüssigkeit, in der alle weiteren Bestandteile gelöst sind. Die Fettkügelchen sind von einer Hülle umgeben. Fettkügelchen mit intakter Hülle sind mit Wasser mischbar.

In unbehandelter Rohmilch haben die Fettkügelchen einen Durchmesser von etwa 1 bis 5 Mikrometer (μm). Unbehandelte Milch rahmt innerhalb von 12- 24 Stunden auf, d. h. das MilCHFett sammelt sich an der Oberfläche an. Durch Homogenisierung wird die Größe der Fettkügelchen auf unter 1 μm Durchmesser reduziert. So behandelte Milch kann zwar immer noch aufrahmen, jedoch steigt die zur Aufrahmung benötigte Zeit sehr stark an.

Im Versuch wird das MilCHFett vom Milchplasma durch Zentrifugation getrennt. Wegen der kleineren Dichte des Fettes wird dieses sich nach der Zentrifugation in der oberen Phase anreichern, während das wässrige Milchplasma die untere Phase bildet. Je grösser die obere Phase ist, desto höher der Fettgehalt des Milchproduktes.

Ziele

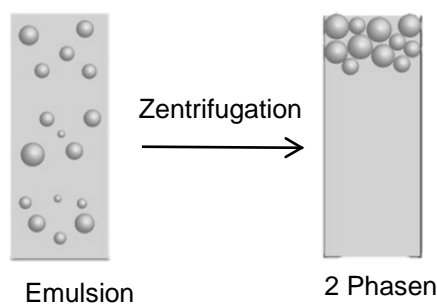
Wissen, was eine Emulsion ist.
Das Prinzip der Zentrifugation verstehen.
Erklären können, warum Trinkmilch homogenisiert wird.

Methode

Zentrifugation

Die Zentrifugation ist eine Methode zur Stofftrennung unter Ausnutzung der Massenträgheit. In einer Zentrifuge wird ein Stoffgemisch in einer gleichmäßigen Kreisbewegung beschleunigt. Stoffe mit höherer Dichte wandern aufgrund ihrer Trägheit nach außen, verdrängen die Bestandteile mit niedriger Dichte, die so in die Mitte gelangen. Getrennt werden können mit Hilfe der Zentrifugation Suspensionen (Gemische aus Flüssigkeit und Feststoffen), Emulsionen (Gemische aus verschiedenen Flüssigkeiten) und Gasgemische.

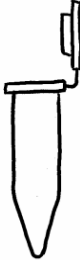
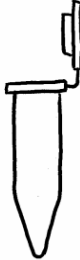
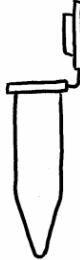
Milch ist eine Emulsion von MilCHFettkügelchen in wässrigem Milchplasma. Das Fett hat eine kleinere Dichte als das Plasma. Diesen Unterschied nutzt man bei der Abtrennung des Fettes mittels Zentrifugation aus.



Experiment 2: Fettanteil verschiedener Milcharten

1. Nummeriere 3 Eppendorfröhrchen.
2. Pipettiere 1000µl Vollrahm in das Röhrchen 1. Pipettiere entsprechend 1000µl Halbrahm in Röhrchen 2 und 1000µl Milch in Röhrchen 3. Verwende jedes Mal eine frische Pipettenspitze.
3. Stelle die Röhrchen in die Zentrifuge. Achte darauf, dass das Gewicht in der Zentrifuge ausgeglichen ist. Es müssen immer zwei Röhrchen einander gegenüberstehen.
4. Zentrifugiere die Röhrchen 15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit. In der Zwischenzeit kannst Du im Seminarraum eine Snack-Pause machen.
5. Nimm die Röhrchen aus der Zentrifuge und halte das Ergebnis in der untenstehenden Tabelle fest.

Auswertung

	Vollrahm	Halbrahm	Milch
Fettanteil	35 %	28 %	3.5 %
Nach der Zentrifugation			
Interpretation			

6. Lässt man Rohmilch stehen, setzt sich das Milchfett mit der Zeit an der Oberfläche ab. Mit welcher Behandlung kann dies verhindert werden?
-

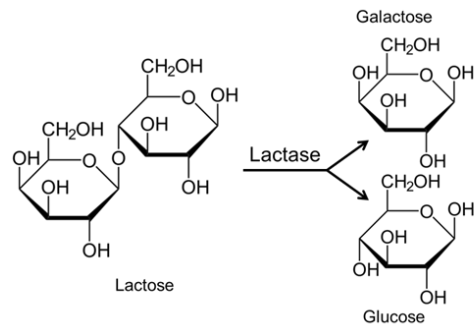
Aufräumen

7. Wirf die Eppendorfröhrchen in den Entsorgungsbeutel.

Versuch 3: Milchzucker Lactose

Wissen

Der Zweifachzucker (Disaccharid) Lactose wird durch eine enzymatische Reaktion in die beiden Einfachzucker (Monosaccharide) Glucose und Galactose gespalten. Diese Reaktion wird durch das Enzym Lactase bewerkstelligt und findet im Dünndarm statt. Die Einfachzucker können vom Körper als Energiequelle genutzt werden.



Säuglinge und Kleinkinder können Lactose in der Regel gut verdauen. Im Laufe des Lebens nimmt die Produktion der Lactase immer mehr ab, bis im Erwachsenenalter Lactose nicht mehr gespalten werden kann. Lactose gelangt dann in den Dickdarm und wird dort von Bakterien zu Säuren und Gasen abgebaut. Der Genuss von Milch führt so zu schweren Verdauungsstörungen, die sich durch starke Bauchschmerzen, Durchfall bis hin zu Krämpfen bemerkbar machen. Man bezeichnet diese Lebensmittelunverträglichkeit Lactoseintoleranz.

Bei den Säugetieren können die erwachsenen Tiere den Milchzucker nicht mehr verdauen. Dies trifft auch für die meisten Menschen zu. In Regionen, in der Milch von Haustieren seit Jahrtausenden als wichtige Nahrungsquelle dient, besitzen jedoch viele Erwachsene die Fähigkeit, Lactose zu verdauen. Während in Nord- und Mitteleuropa zwischen 80 und nahezu 100% der Menschen Lactose gut vertragen, sind es in Spanien und Griechenland nur noch 30 – 50%. Bei Asiaten sind Milchtrinker die absolute Ausnahme.

Grund für die Lactose-Toleranz bei Nord- und Mitteleuropäern ist eine Mutation im Gen, das für die Herstellung der Lactase zuständig ist. Als Folge der Veränderung wird das Gen nach der Stillphase nicht mehr abgeschaltet.

Ziele

Wissen, was Einfach- und Zweifachzucker sind.
Die Funktion des Enzyms Lactase verstehen.
Die Ursache der Lactose-Intoleranz kennen.
Erklären können, wie Lactose-freie Milch hergestellt wird.

Methode

Glucose Nachweis

Für Diabetiker gibt es Teststreifen, mit denen der Glucosegehalt im Urin gemessen werden kann. Enthält die zu untersuchende Lösung Glucose, verfärbt sich der Teststreifen von gelb nach grün.

Experiment 3: Glucosebestimmung in Milch

1. Nummeriere drei Eppendorfröhrchen und setze darin die folgenden 3 Ansätze an:

	Milch	Laktase
1	1000µl Milch	-
2	1000µl Milch	50µl Laktase-Lösung
3	1000µl laktosefreie Milch	-

2. Mische das geschlossene Röhrchen 2 für 5 Sekunden auf dem Vortex-Mischer.
3. Lass die Ansätze 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen.
4. Beschrifte drei Glucoseteststreifen mit 1 – 3. Nimm einen Teststreifen und tauche diesen kurz in die Milch von Röhrchen 1. Tupfe den Teststreifen kurz trocken und warte 30-60 Sekunden.
5. Verwende nun die mit den Glucoseteststreifen mitgelieferte Skala, um die Glucosekonzentration zu bestimmen. Negativ bedeutet 0 mg/dl, normal sind 20 mg/dl.
6. Wiederhole die Glucosebestimmung mit den Ansätzen 2 und 3.

Auswertung

7. Trage die ermittelten Werte in die Tabelle ein.

	Milch	Laktase	Farbe Teststreifen	Glucose-Konzentration (mg/dl)
1	1000µl Milch	-		
2	1000µl Milch	50µl Laktase-Lösung		
3	1000µl laktosefreie Milch	-		

8. Vergleiche die erhaltenen Werte. Erkläre die Ergebnisse.

Aufräumen

9. Schliesse die Deckel der Eppendorfröhrchen und wirf die Röhrchen in den Entsorgungsbeutel.

Wasche Deine Hände. Jetzt bist Du mit der Laborarbeit fertig.

Milch

Zusammensetzung der Milch

Milch wird in den Milchdrüsen von Säugetieren gebildet und ist die erste Nahrung der jungen Säugetiere. Neben dem Hauptbestandteil Wasser enthält sie Proteine, Milchzucker und Milchfett, sowie zahlreiche Mineralstoffe und Vitamine.

Die Milch verschiedener Säugetiere unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung. Kuhmilch hat einen deutlich höheren Protein- und Mineralstoffgehalt als Muttermilch und ist deshalb für Säuglinge schwer zu verdauen.

Milch	Wasser	Protein	Fett	Lactose	Mineralstoffe
Mensch	87,6	1,2	4,1	6,9	0,2
Kuh	87,5	3,1	3,8	4,8	0,8
Schaf	82,7	5,3	6,3	4,9	0,9
Ziege	86,6	3,6	4,2	4,8	0,8
Pferd	90,0	2,2	1,5	5,9	0,4
Rentier	63,0	10,3	22,5	2,5	keine Angabe

Tabella 1: Zusammensetzung der Milch verschiedener Säugetiere
(Angaben in %)

Haltbarmachung der Milch

Rohmilch ist leicht verderblich, selbst bei sauberster Milchgewinnung gelangen Keime in die Milch. Zur Haltbarmachung wird die Milch erhitzt. Dabei werden krankheitserregende Mikroorganismen abgetötet. Folgende Verfahren werden zur Haltbarmachung angewandt.

Pasteurisieren

Beim Pasteurisieren wird die Milch sehr kurz (15-30 sec) auf 72-75°C erhitzt. Da dadurch nicht alle Mikroorganismen abgetötet werden, muss pasteurisierte Milch im Kühlschrank aufbewahrt werden und ist nur 3-6 Tage haltbar.

Ultrahoherhitzen (UHT)

Beim Ultrahoherhitzen wird die Milch für mindestens eine Sekunde auf Temperaturen zwischen 135-150°C gebracht. UHT Milch enthält keine Keime und ist ungekühlt bis zu 8 Wochen haltbar.

Sterilisieren

Beim Sterilisieren wird die Milch unter erhöhtem Druck 30 min auf 110-120°C erhitzt. Dabei werden Mikroorganismen und Enzyme weitgehend inaktiviert. Sterilmilch ist ca. ein halbes Jahr ungekühlt haltbar, hat jedoch einen deutlich geringeren Nährwert als pasteurisierte Milch und eignet sich deshalb nicht als Nahrung für Säuglinge und Kleinkinder.

Einstellung des Fettgehalts

Der Fettgehalt der Rohmilch schwankt. Vollmilch oder teilentrahmte Milch haben hingegen einen festgelegten, immer gleichen Fettgehalt. Dafür wird zunächst der Rahm durch Zentrifugation von der Magermilch abgetrennt. Anschliessend wird der entrahmten Milch wieder ein Teil des Rahms zugeführt, bis der gewünschte Fettgehalt erreicht ist. Vollmilch muss mindestens 3.5% Fett enthalten, Milchdrink hingegen nur 2.2%.

Herstellung verschiedener Milchprodukte

Milch ist das Ausgangsprodukt zahlreicher Nahrungsmittel. Die wichtigsten Milchprodukte sind Sauermilchprodukte, Käse und Rahm-Erzeugnisse.

Sauermilchprodukte

Für die Herstellung von Sauermilch und Joghurt werden der pasteurisierten Milch Milchsäurebakterien zugesetzt. Die Mikroorganismen wandeln einen Teil des in der Milch enthaltenen Milchzuckers in Milchsäure um. Durch die sich bildende Säure kommt es zur Gerinnung des Milcheiweisses Casein.

Käse

Für die Herstellung von Käse wird die Milch zunächst unter ständigem Rühren langsam auf ca. 32°C erwärmt und mit Labferment und Milchsäurebakterien versetzt.

Das Labferment ist eine Enzymmischung, welches aus den Mägen saugender Kälber gewonnen wird. Das Kalb benötigt diese Enzyme, um das Milcheiweiss verdauen zu können. Labenzyme werden heutzutage zunehmend mit Hilfe gentechnisch veränderter Mikroorganismen produziert.

Nach einer Ruhezeit von rund 30 Minuten gerinnt die Milch und wird mit einer Käseharfe in Stücke geschnitten. Dabei trennt sich die eiweisshaltige Käsemasse (Käsebruch) von der Molke. Die Molke wird in einem Tuch oder direkt in Pressformen ausgepresst. Die jungen Käselaike werden nun für 2 bis 72 Stunden in einem Salzbad gelagert. Das Salz fördert den Geschmack und schützt den Käse vor Verderb.

Anschliessend folgt der Reifungsprozess, bei dem Bakterien Eiweiss und Fett umwandeln. So entsteht der charakteristische Geschmack des Käses. Damit sie nicht verderben, werden die Käselaike regelmässig mit Salzwasser gewaschen.

Rahm und Butter

Rahm wird durch Zentrifugieren von der Rohmilch abgetrennt. Die Fliehkraft trennt das leichtere MilCHFett von den schwereren Bestandteilen der Milch (Eiweiss, Milchzucker, Wasser).

Da frischer Rahm schnell verdirbt, wird er durch Erhitzen haltbar gemacht. Damit die Feinverteilung des MilCHFettes auch bei längerer Haltbarkeit bestehen bleibt, wird dem Rahm meist ein Bindemittel (wie Carrageen, ein Kohlenhydrat aus Rotalgen) zugesetzt. Beim Butterungsprozess wird der Rahm geschlagen. Dadurch werden die Fettkügelchen des MilCHFettes zerstört. Die Hülle bricht auf und das enthaltene Fett tritt aus. Die flüssigen Anteile mehrerer zerstörten Fettkügelchen vereinigen sich zu Butterkörnern, die auf der wässrigen Phase, der Buttermilch, schwimmen. Die Buttermilch wird abgelassen.

Anschliessend wird die Butter zu einer homogenen, geschmeidigen Masse geknetet, bis der Wassergehalt maximal 16 % ist. Aus der flüssigen Fett-in-Wasser-Emulsion (Milch und Rahm) ist eine feste Wasser-in-Fett-Emulsion (Butter) entstanden.