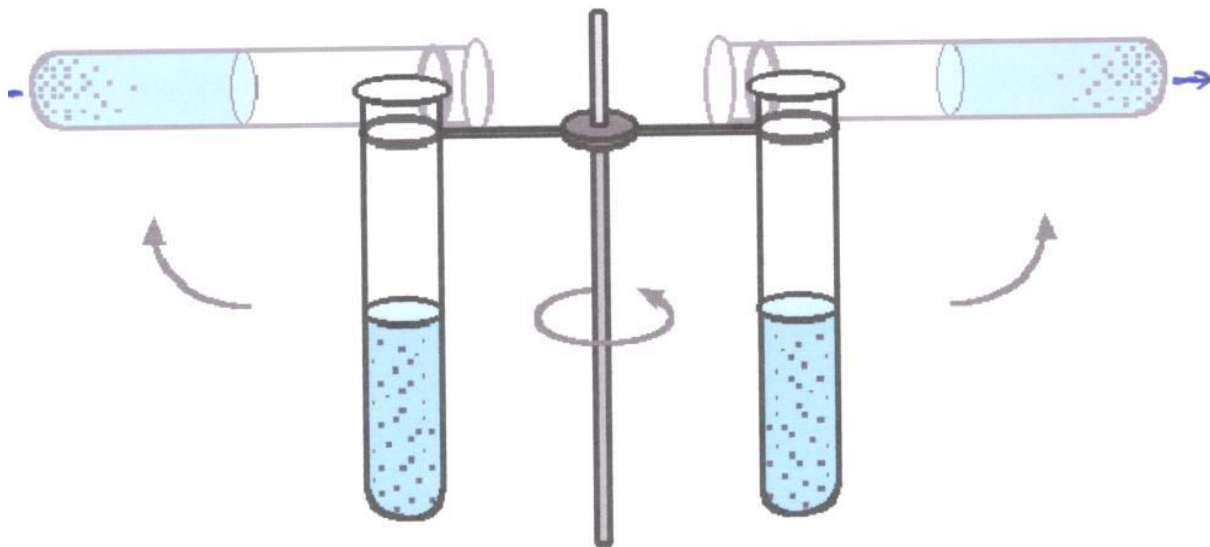


### Versuch 1: Entrahmung

#### Grundlagen

Rohmilch bildet beim Stehen schon nach 30 – 60 Minuten eine sichtbare Rahmschicht. Ursache ist der Dichteunterschied zwischen der Milchflüssigkeit und den Fettkügelchen. Es tritt hierbei keine Zerstörung der Emulsion ein, es ändert sich nur das Verteilungsgleichgewicht der Fettkügelchen. Eine weitere Möglichkeit des Aufrahmens ist das Zentrifugieren, das wesentlich schneller geht.

Beim Zentrifugieren wird eine Emulsion oder eine Suspension in ein starkwandiges Reagenzglas gegeben und in eine Zentrifuge gehängt. Durch eine schnelle Rotation entsteht eine Fliehkraft, wobei der Stoff mit der größeren Dichte ganz außen an den Boden des Reagenzglases „flieht“.



Die Trennung von Sediment und Überstand erfolgt nach dem Zentrifugieren durch Dekantieren.

#### Materialien

- Zentrifuge und Zentrifugengläser
- Milch, Sahne, Rohmilch

#### Durchführung

1. Zentrifugengläser bis zu 3/4 mit der Probe füllen
2. gleichmäßig in die Zentrifuge einordnen
3. bei 6.500 Umdrehungen 6 Minuten zentrifugieren

#### Beobachtung

#### Ergebnis

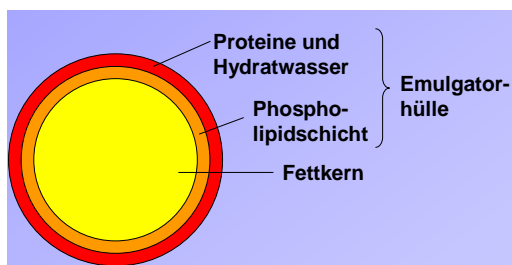
### Versuch 2: Milch als Emulsion

#### Grundlagen

Emulsionen sind disperse Systeme zweier oder mehrerer ineinander unlöslicher Flüssigkeiten. Eine der flüssigen Phasen bildet dabei das Dispersionsmittel, in dem die anderen Phasen in Form feiner Tröpfchen verteilt sind.

Es kommen die beiden Emulsionstypen Öl in Wasser (O/W) und Wasser in Öl (W/O) vor. Beispiele aus dem Alltag für O/W-Emulsionen sind Milch, Mayonnaise oder Körperlotion, für W/O-Emulsionen Butter, Margarine oder Salben. Der Durchmesser der dispergierten Tröpfchen in Emulsionen liegt zwischen  $10^{-2}$  und  $10^{-6}$  cm, die meisten Emulsionen zeigen eine uneinheitliche Teilchengröße und sind damit polydispers.

In der Milch sind die Lipide (Fettanteile) mit Proteinen und Phospholipiden umgeben, die als Emulgator wirken.



Nur O/W-Emulsionen sind mit Wasser ohne Phasentrennung verdünnbar, was gleichzeitig als einfacher Nachweis für diesen Emulsionstyp dient.

#### 2.1 Anfärben von Butter

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

#### Material

- Projektionsmikroskop
- Objektträger
- Deckgläser
- Mörser
- Butter
- Sudanrot B (lipophil)
- Methyleneblau (hydrophil)

#### Durchführung

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 sind deutlich die rötlich angefärbte Fettphase und die darin blau angefärbten Wassertropfen erkennbar.

### 2.2 Tyndall-Effekt

#### Grundlagen

Milch ist eine Emulsion von Fetttropfchen im Milchplasma (wässrige Milchlösung ohne Fett).

Da der Durchmesser der Fetttropfchen im Bereich der Wellenlängen des sichtbaren Lichts liegt, streuen sie einfallendes Licht (Tyndall-Effekt). Ein Lichtstrahl, der durch eine Lösung von wenigen Tropfen Milch in Wasser fällt, ist als Kegel zu erkennen.

#### Materialien

- Becherglas, hohe Form (250 ml)
- Pasteurpipette
- Taschenlampe/Laserpointer
- schwarzes Tonpapier
- Schere
- Klebstreifen
- Milch
- Wasser

#### Durchführung

Das Becherglas wird bis unter den Rand mit Wasser gefüllt und mit wenigen Tropfen Milch versetzt. Das schwarze Papier wird trichterförmig gerollt, so dass eine Öffnung von 1 cm Durchmesser entsteht und mit einem Klebestreifen befestigt. Der Raum wird verdunkelt (Licht aus!). Das Licht der Taschenlampe wird durch die Trichteröffnung auf das Becherglas geleitet. Der Strahlengang wird als Kegel sichtbar.

### Versuch 3: Hitzebehandlungen

#### Grundlagen

Durch die Hitzebehandlung der Milch werden pathogene Krankheitskeime abgetötet, Proteine denaturiert und Enzyme inaktiviert. Diese Inaktivierung der Enzyme ist eine Möglichkeit den Grad der Erhitzung festzustellen.

#### 3.1 Xanthinoxidase in Milch

##### Materialien

- 2 Reagenzgläser groß
- Wasserbad 40 °C
- Messpipetten 5 ml
- Rohmilch
- pasteurisierte Milch
- Formaldehyd-Lösung (0,4 %)
- Methylenblau-Lösung (0,04 % in Wasser)
- Paraffinöl

##### Durchführung

In zwei Demonstrationsreagenzgläser werden je 20 ml Milch gegeben (1x Rohmilch, 1x pasteurisierte Milch). Anschließend gibt man in beide Gläser je 3 ml Formaldehyd-Lösung und 2 ml Methylenblau-Lösung, dann überschichtet man zum Sauerstoffausschluss etwa 2 cm hoch mit Paraffinöl. Beide Reagenzgläser werden in ein Wasserbad (40 °C) gestellt.

##### Auswertung

Nach etwa 5 Minuten beobachtet man eine Entfärbung des Reaktionsgemisches, das Rohmilch enthält, während das Gemisch mit pasteurisierter Milch blau bleibt. Rohmilch enthält das sog. Schardinger-Enzym, eine Aldehyd-Dehydrogenase. Das Enzym überträgt Wasserstoff von Formaldehyd auf Methylenblau, welches zum farblosen Leukomethylenblau reduziert wird. Da das Schardinger-Enzym bei Erhitzen auf 60 °C zerstört wird, fehlt es in der pasteurisierten Milch, es tritt dort keine Entfärbung ein. Diese Reaktion wird auch in der Molkereitechnik zum Nachweis der Pasteurisierung angewendet.

### 3.2 Peroxidasenachweis in Milch nach Storch

#### Grundlagen

Lactoperoxidase katalysiert den Abbau von Wasserstoffperoxid. Der dabei freigesetzte atomare Sauerstoff oxidiert eine farblose 1,4-Phenylendiamin-Lösung zu violetterem Indoamin (Storchsche Reaktion). Die Intensität der Färbung ist proportional zur Enzymkonzentration.

Positive Peroxidasereaktion: 30 Sekunden nach dem Durchmischen färbt sich pasteurisierte Milch blau.

Negative Peroxidasereaktion: 30 Sekunden nach dem Durchmischen kein Farbumschlag.

#### Materialien

- Probenröhrchen mit Verschluss (mind. 15 ml)
- 5 ml, 10 ml Vollpipette
- 5 ml Messpipette
- 2 x 100 ml Messkolben
- dunkelbraune Flasche
- 1,4-Phenylendiamin
- Schwefelsäure konz.
- 30%iges Wasserstoffperoxid

#### Herstellung der Lösungen

##### a) 1,4-Phenylendiamin-Lösung

2 g 1,4-Phenylendiamin (  $C_6H_8N_2$  ) werden im warmen Wasser (50 °C) gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wird in einer dunkelbraunen Flasche mit Glasstopfen kühl und dunkel aufbewahrt. 1,4-Phenylendiamin-Lösung bildet innerhalb von 1 – 2 Tagen nach dem Ansetzen einen Niederschlag, der zu entfernen ist.

##### b) Wasserstoffperoxid-Lösung

9 ml Wasserstoffperoxid mit einem Massenanteil von ca. 30 % werden in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Zur Stabilisierung wird 1 ml konzentrierte Schwefelsäure je Liter Lösung zugegeben. Wasserstoffperoxid-Lösung ist einen Monat haltbar, sofern sie in einer Flasche mit Glasstopfen als Schutz gegen organische Verbindungen im Dunkeln aufbewahrt wird.

#### Durchführung

- 5 ml der Milchprobe in ein sauberes Probenröhrchen mit geeignetem Verschluss geben
- 5 ml 1,4-Phenylendiamin-Lösung dazu geben
- zwei Tropfen Wasserstoffperoxid-Lösung zugeben

Auf den 30 Sekunden nach dem Durchmischen auftretenden Farbumschlag ist zu achten. Ein später als 30 Sekunden nach dem Zusatz der Reagenzien auftretender Farbumschlag ist eine unspezifische Reaktion.

### 3.3 Peroxidasenachweis mit Guajaktinktur

#### Durchführung

Versetzen Sie die unterschiedlich hitzebehandelten Proben mit Guajaktinktur.

#### Ergebnis

In der Rohmilch zeigt eine Blaufärbung Peroxidase an. H-Milch zeigt keine Blaufärbung, da die aktive Peroxidase bei Temperaturen von über 80 °C zerstört wird.

### 3.4 Nachweis der alkalischen Phosphatase

- a) mit Lactognost-Reagenz
- b) mit Testreagenz

### Versuch 4: Homogenisierung

#### Grundlagen

Milch wird homogenisiert, um die Absetzgeschwindigkeit der Fett-Tröpfchen zu verringern. Die Milch wird dafür durch feine Düsen gepresst, wodurch die Größe der Fett-Tröpfchen deutlich verringert und die Emulsion stabilisiert wird. Die Homogenisierung kann in der Schule mit Hilfe eines Pflanzensprengers veranschaulicht werden.

#### Materialien

- Pflanzensprenger
- 2 Schraubdeckelgläser
- Messzylinder
- Salatöl
- Wasser

#### Durchführung

In zwei Schraubdeckelgläsern werden jeweils 8 ml Salatöl mit 200 ml Wasser versetzt. Nach dem Verschließen werden beide Gefäße gleich stark geschüttelt. Der Inhalt des einen Gefäßes wird dann rasch in den Pflanzensprenger überführt und durch die Sprengerdüsen zurück in das Schraubglas gesprüht. Beide Emulsionen werden nun optisch untersucht; die Absetzgeschwindigkeit der Fetttropfchen in beiden Emulsionen wird verglichen.

#### Beobachtung

#### Ergebnis

## Milch – Versuche – Milchsorten

---

### Versuch 5: Verkostungen verschieden erhitzter Milchsorten

Die Schülerinnen und Schüler erhalten eine Reihe nummerierter Gläser/Becher, die mit unterschiedlichen Milchproben gefüllt wurden sowie eine Liste der verwendeten Milchsorten.

z. B.

A) frische Vollmilch, pasteurisiert, homogenisiert, 3,5 % Fett

B) H-Milch, homogenisiert, 1,5 % Fett

C) Milch mit natürlichem Fettgehalt, pasteurisiert, homogenisiert

D) Sterilmilch

E) Vollmilch, pasteurisiert, homogenisiert, länger haltbar, 3,5 % Fett

Durch Betrachtung des Erscheinungsbildes und Verkostung der Milchsorten wird eine Zuordnung vorgenommen.

### Auswertung

Milchprobe	1	2	3	4	5
Milchsorte A - E					

### Inhaltsstoffe der Milch

#### Versuch 1: Fällung und Auftrennung der Milchproteine

##### Grundlagen

Milchproteine bestehen zu 80 % aus Casein und 20 % aus Molkeproteinen (Albumine und Globuline). Diese beiden Fraktionen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften. Während die Caseine bei einer Senkung des pH-Werts oder durch Labenzym schnell ausflocken, treten die Molkeproteine bei einer Erhöhung der Temperatur zu sichtbaren Aggregaten zusammen. Dieser Fakt kann für eine Auftrennung genutzt werden.

##### Materialien

Milch,	1 Becherglas (250 ml)
dest.Wasser,	Glasstab, Messzylinder (100 ml)
Essigsäure (w = 10 %),	Tropfpipette, Thermometer
Natriumcarbonat	2 Trichter und 2 Faltenfilter
	2 Erlenmeyerkolben (100 ml)
	pH-Messgerät
	Heizplatte, Spatel
	6 Reagenzgläser für folgende Versuche

##### Sicherheit

Essigsäure ist ätzend, Schutzbrille tragen.  
Vorsichtiges Erhitzen der Molke, Siedesteine verwenden  
Vorsicht beim Umgang mit sensibler pH-Elektrode

##### Durchführung

1. 25 ml Vollmilch werden mit 25 ml dest. Wasser versetzt und auf 40 °C erhitzt.
2. Unter Rühren wird tropfenweise Essigsäure mit w = 10 % zugegeben, bis ein pH-Wert von 4,6 erreicht ist. Die Milch gerinnt.
3. Das Gemisch wird einige Minuten stehen gelassen. Anschließend wird der Niederschlag über einen Faltenfilter abfiltriert.  
Der Niederschlag besteht aus Casein und etwas Milchfett, welches bei dem Verfahren mit ausgefällt wird.  
Bei dem klaren Filtrat handelt es sich um die Molke. Sie ist schwach sauer, enthält alle Inhaltsstoffe der Milch außer Casein.
4. Das Filtrat wird mit einigen Spatelspitzen Natriumcarbonat auf einen pH-Wert  $\approx$  6 eingestellt.
5. Die Lösung wird dann auf der Heizplatte vorsichtig aufgeköcht (Siedesteine benutzen). Sie schäumt auf und die Molkeproteine flocken aus.
6. Molkeproteine werden über einen Faltenfilter abfiltriert.  
Das klare Filtrat ist die Molke. Sie ist proteinfrei und wird für die folgenden Versuche aufbewahrt.

##### Hinweis

##### **Für die Nachweisreaktionen**

Verteilung der Caseine (Niederschlag in Schritt 3) und der Molkeproteine (Niederschlag in Schritt 6): Sie werden auf jeweils 3 Reagenzgläser 1 bis 3 verteilt.



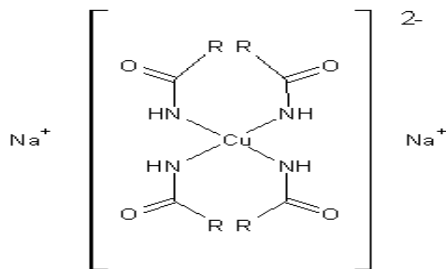
### Versuch 2: Nachweise der Proteine

#### 2.1 Biuret-Reaktion

##### Grundlagen

Gibt man zu der Proteinaufschlämmung die gleiche Menge verdünnter Natronlauge und fügt anschließend wenige Tropfen einer Kupfersulfat-Lösung (Fehling I) hinzu, kommt es zu einem hellblauen Niederschlag, der beim Schütteln zu einer Violettfärbung führt.

Mit Proteinen und Peptiden mit mindestens zwei Peptidgruppen entsteht ein violetter Kupfer(II)-Komplex.



##### Materialien

Reagenzglas 1 mit Casein aus Versuch 1  
Reagenzglas 1 mit Molkeproteinen aus Versuch 1  
Natronlauge (w = 4 %)  
Kupfersulfat-Lösung (Fehling I)  
Glycin-Lösung  
Tyrosin-Lösung  
Harnstoff-Lösung

Messzylinder (10 ml)  
Tropfpipette  
3 Reagenzgläser  
Reagenzglasgestell

##### Sicherheit

Natronlauge ist ätzend, Schutzbrille tragen.

Kupfersulfat-Abfälle in Schwermetallabfall-Behälter geben.

##### Durchführung

1. Casein im Reagenzglas 1 wird mit wenig Wasser (ca. 3 ml) aufgeschlämmt.
2. Zugabe von ca. 3 ml Natronlauge zur Aufschlämmung
3. Zugabe von 3 – 4 Tropfen Kupfersulfat-Lösung (Fehling I). Anschließend wird geschüttelt und evtl. etwas erwärmt.
4. Wiederholung der Schritte 1 bis 3 mit Molkeprotein, den Aminosäure-Lösungen und der Harnstoff-Lösung.

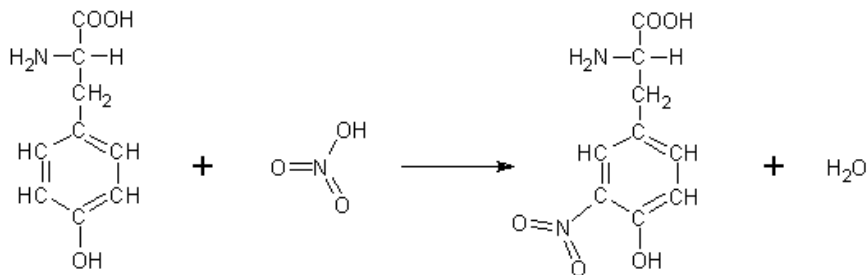
## 2.2 Xanthoprotein-Reaktion

### Grundlagen

Aromatische Aminosäuren und Proteine, die aromatischen Aminosäuren in der Peptidkette enthalten, werden nachgewiesen.

Hierzu erhitzt man die Protein-Aufschlämmung, die Aminosäure-Lösungen und die Harnstoff-Lösung mit Salpetersäure.

Die Gelbfärbung geht auf eine Nitrierung der aromatischen Ringsysteme zurück, die auch bei unsauberem Arbeiten mit Salpetersäure auf der Haut beobachtet werden kann.



### Materialien

Reagenzglas 2 mit Casein aus Versuch 1  
Reagenzglas 2 mit Molkeprotein aus Versuch 1  
Glycin-Lösung  
Tyrosin-Lösung  
Harnstoff-Lösung  
Salpetersäure konzentriert

3 Reagenzgläser  
Reagenzglasgestell  
Messzylinder (10 ml)  
Heizplatte  
Wasserbad

### Sicherheit

Vorsicht: Salpetersäure ist ätzend, Schutzbrille tragen.

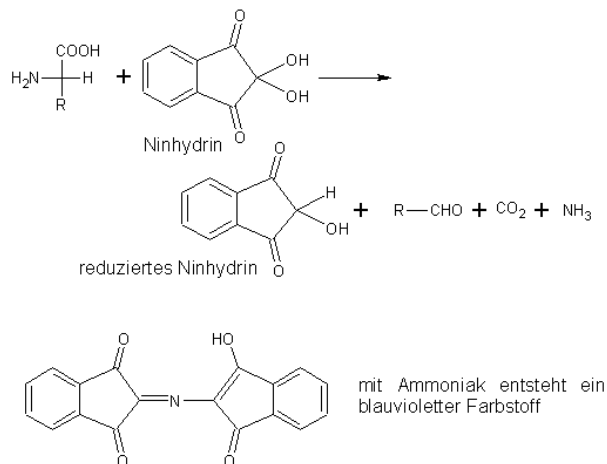
### Durchführung

1. Casein im Reagenzglas 2 wird mit wenig Wasser aufgeschlämmt.
2. Zugabe von ca. 3 ml konzentrierte Salpetersäure, eventuell wird leicht erwärmt.
3. Wiederholung der Schritte 1 und 2 mit Molkeproteinen, den Aminosäure-Lösungen und der Harnstoff-Lösung.

## 2.3 Ninhydrin-Reaktion

### Grundlagen

Der Nachweis funktioniert bei Peptiden mit freien Aminogruppen, also nicht bei Prolin, aber z. B. auch sehr schlecht bei langkettigen Peptiden, da es hier wenig freie Aminogruppen gibt. Die Aminogruppe reagiert über Ammoniak mit Ninhydrin. Es entsteht der blau-violette Farbstoff.



### Materialien

Reagenzglas 3 mit Casein aus Versuch 1  
 Reagenzglas 3 mit Molkeprotein aus Versuch 1  
 Glycin-Lösung  
 Tyrosin-Lösung  
 Harnstoff-Lösung  
 Ninhydrin-Lösung (w = 1 % in Propan-2-ol)

3 Reagenzgläser  
 Tropfpipetten  
 Heizplatte  
 Messzylinder

### Sicherheit

Ninhydrin von Zündquellen fernhalten.

### Durchführung

1. Casein im Reagenzglas 3 wird mit wenig Wasser aufgeschlämmt.
2. Zugabe von wenigen Tropfen Ninhydrin-Lösung.
3. Einige Minuten warten oder im Wasserbad erhitzen.
4. Wiederholung der Schritte 1 bis 3 mit Molkeprotein, den Aminosäure-Lösungen und der Harnstoff-Lösung.

### Beobachtung

Füllen Sie die Tabelle aus, indem Sie Ihre Beobachtungen notieren.

zu untersuchende Substanz	Casein	Molkeprotein	Tyrosin	Glycin	Harnstoff
Biuret-Reaktion					
Xanthoprotein-Reaktion					
Ninhydrin-Reaktion					

### Versuch 3 Nachweise der Mineralstoffe in der Molke

#### Grundlagen

Milch enthält Mineralstoffe. Die Konzentration an Calcium, Kalium, Chlorid und Phosphat liegen im Bereich von 1 bis 3 g/l.

Diese Ionen können einfach nachgewiesen werden. Eiweiße in der Probe können die Nachweise stören, da sie beim Zusatz von Säure, Ionen (Aussalzen, Fällung), und bei einer Erhöhung der Temperatur ausflocken bzw. durch Zugabe konzentrierter Salpetersäure nitriert werden (Xanthoprotein-Reaktion). Deshalb empfiehlt es sich, mit der eiweißfreien Molke zu arbeiten.

#### 3.1 Nachweis von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

##### Vorversuch 3.1.1 Denaturierung von Casein mit Hilfe von Lab

#### Grundlagen

Die Caseinfällung mit Hilfe von Lab ist nur bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen möglich. Durch die Labenzyme treten die Caseinmicellen zu sichtbaren Aggregaten zusammen. Sogenannte Calciumphosphatverbrückungen halten die einzelnen Submicellen sowie die Caseinmicellen zusammen. Casein fällt aus.

#### Materialien

Lab-Lösung	2 Reagenzgläser
Milch	Reagenzglasgestell
Ammoniumoxalat-Lösung (w = 5 %)	Messzylinder (10 ml)

#### Durchführung

1. In Reagenzglas 1 werden 5 ml Milch gegeben und 5 ml Lab-Lösung.
2. In Reagenzglas 2 werden 5 ml Milch + 5 ml c + 5 ml Ammoniumoxalat-Lösung gegeben.

#### Beobachtung + Ergebnis

	RG 1	RG 2
Fällung von Casein		
Ergebnis		

### Versuch 3.1.2 Qualitativer Nachweis von Calcium

#### Grundlagen

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen reagieren mit Ammoniumoxalat-Lösung. Dabei entsteht schwerlösliches Calciumoxalat.

#### Materialien

Molke aus Versuch 1.1 (Molke <sub>V1</sub> )	3 Messpipetten (5 ml)
Molke aus gekaufter Molke (Molke <sub>M</sub> )	3 Reagenzgläser
Molke aus der Lab-Gerinnung (Molke <sub>L</sub> )	Reagenzglasgestell
Ammoniumoxalat-Lösung (w = 5 %)	Tropfpipetten

#### Durchführung

1. Jeweils 5 ml Molke werden in je ein Reagenzglas gegeben.
2. Zugabe von jeweils 20 Tropfen Ammoniumoxalat-Lösung zu jeder Probe.

#### Beobachtung

Bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bildet sich ein feiner weißer Niederschlag.

	Molke aus V 1	Molke aus gekaufter Molke	Molke aus Lab-Gerinnung	destilliertes Wasser
Zugabe von Ammoniumoxalat-Lösung				

#### Ergebnis

#### Erklärung

### Versuch 3.1.3 Quantitative Bestimmung der $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch komplexometrische Titration mit EDTA

#### Grundlagen

Bei der komplexometrischen Titration erfolgt die Bestimmung des jeweiligen Kations durch Komplexbildung.

In Komplexverbindungen wird das Zentralatom oder Zentral-Ion (in diesem Fall  $\text{Ca}^{2+}$ ) von anderen Atomen oder Molekülen (in diesem Fall EDTA) umgeben und ist fest gebunden.

Um den Äquivalenzpunkt der Titration zu erkennen, wird ein Metallindikator zugegeben (Eriochromschwarz), der mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einen weinroten Calcium-Indikator-komplex bildet.

Am Anfang der Reaktion sind also praktisch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an den Indikator gebunden. Bei Zugabe von EDTA wird das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion aus dem Indikator-komplex herausgelöst und an EDTA gebunden.

Am Äquivalenzpunkt verfärbt sich die weinrote Lösung grau-grün. Da diese Reaktion bevorzugt im alkalischen Milieu stattfindet, wird Ammoniak-Lösung zugegeben.

#### Materialien

EDTA-Lösung (Titriplex III, $c = 0,01 \text{ mol/l}$ )	Messzylinder (100 ml)
Ammoniaklösung konzentriert	3 Erlenmeyerkolben (300 ml)
Indikatorpuffertabletten	Stativ + Stativmaterial
100 ml Molke <sub>V1</sub> , 1 : 10 verdünnt	Bürette
100 ml Molke <sub>M</sub> 1 : 10 verdünnt	Glastrichter
Molke <sub>L</sub>	Messpipette 1 ml

#### Sicherheit

Ammoniak ist ätzend und giftig, Schutzbrille und unter dem Abzug arbeiten.

#### Durchführung

- 100 ml der 1 : 10 verdünnten Molke<sub>V1</sub> in den Erlenmeyerkolben geben.
- Indikatortablette darin auflösen.
- 1 ml konzentrierten Ammoniak zugeben.
- Titrationssystem aufbauen, mit EDTA-Lösung befüllen.
- Bis zum Äquivalenzpunkt titrieren.
- Wiederholung mit verdünnter Molke<sub>M</sub> aus gekaufter Molke und Molke<sub>L</sub> (unverdünnt) aus der Labgerinnung.

#### Beobachtung

	Molke <sub>V1</sub>	Molke <sub>M</sub>	Molke <sub>L</sub>
V(EDTA) in ml			
$c(\text{Ca}^{2+})$			

## Milch – Versuche – Milchsorten

---

### Ergebnis

$$c(\text{Ca}^{2+}) = V_T \cdot c_T / V \text{ (Molke)}$$

$V_T$  = Verbrauch an Titriplex III

$c_T$  = Stoffmengenkonzentration an Titriplex III = 0,01 mol/l

### Hinweis

Bei den verdünnten Molken muss das Ergebnis mit dem Faktor 10 multipliziert werden.

### Erklärung

Hinweis: 100 g Milch (3,5 % Fett) enthalten 120 mg  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

## 3.2 Nachweis von Phosphat

### Materialien

Molke (aus V1), Molke<sub>M</sub>, Molke<sub>L</sub>  
Ammoniummolybdat-Lösung (w = 5 %)  
Salpetersäure verdünnt

Reagenzglas, Reagenzglasgestell  
Messpipetten (5 ml, 2 ml)  
Tropfpipette  
Heizplatte, Wasserbad

### Sicherheit

Salpetersäure ist ätzend, Schutzbrille tragen.

### Durchführung

1. 5 ml der jeweiligen Molke werden in je ein Reagenzglas gegeben.
2. Zugabe von jeweils 2 ml verdünnter Salpetersäure und 10 Tropfen Ammoniummolybdat-Lösung.
3. Erwärmung im Wasserbad.

### Beobachtung

Bei Anwesenheit von Phosphat-Ionen bildet sich ein gelber Niederschlag von  $(\text{NH}_4)_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]\text{aq}$ .

### Ergebnis

### 3.3 Nachweis von Vitamin B<sub>2</sub>

#### Grundlagen

Milch ist ein wichtiger Lieferant von Vitamin B<sub>2</sub> (Riboflavin). Das Vitamin kann in der Molke durch seine gelb-grüne Fluoreszenz im UV-Licht nachgewiesen werden.

#### Materialien

10 ml mobile Phase: Eisessig/Wasser (v/v 1 : 1)  
stationäre Phase: Kieselgel, SIL GUV<sub>254 nm</sub>  
Milke  
Riboflavin-Lösung als Vergleichslösung

Kapillaren (10µl)  
Chromatografiegefäß  
2 Messpipetten (5 ml)  
UV-Lampe, Fön

#### Sicherheit

Eisessig ist ätzend, Schutzbrille tragen.

UV-Licht führt zu Verbrennungen auf der Haut und in den Augen.

Nicht ins UV- Licht schauen. Bei längerem Arbeiten Schutzhandschuhe tragen.

#### Durchführung

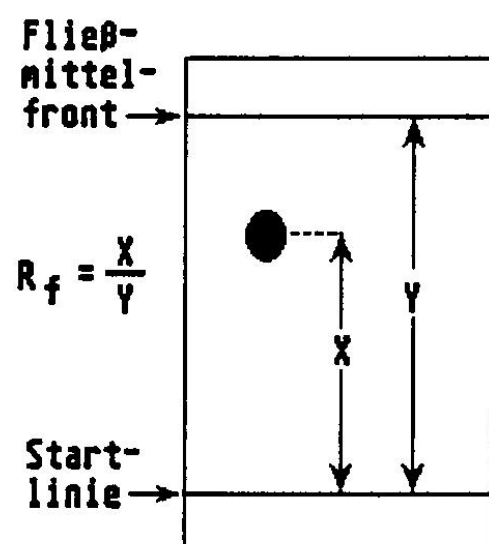
1. Das Chromatografie-Gefäß wird mit je 5 ml Eisessig und 5 ml Wasser befüllt und verschlossen.
2. Die DC-Platte wird vorbereitet, indem eine Startlinie und auf der Startlinie zwei Auftragungspunkte 1 und 2 mit Bleistift markiert werden. Die Beschichtung darf dabei nicht zerstört werden.
3. Auftragen von 5 – 10 µl der Vergleichslösung auf den Auftragungspunkt 1 mit Hilfe der Kapillare.  
Mit einer zweiten Kapillare wird die Molke auf den Auftragungspunkt 2 aufgetragen.
4. Das Chromatogramm wird vorsichtig in das Chromatografiegefäß gestellt.
5. Wenn das Fließmittel 2/3 der DC-Platte durchlaufen hat, werden das Chromatogramm entnommen, die Fließmittelfront markiert und die DC-Platte mit dem Fön getrocknet.
6. Zum Nachweis von Riboflavin wird die DC-Platte unter UV-Licht (366 nm) gelegt.

#### Beobachtung

Hinweis: Gleiche Stoffe laufen unter gleichen Bedingungen gleich weit.

#### Ergebnis

Bestimmung der R<sub>f</sub>-Werte von Riboflavin





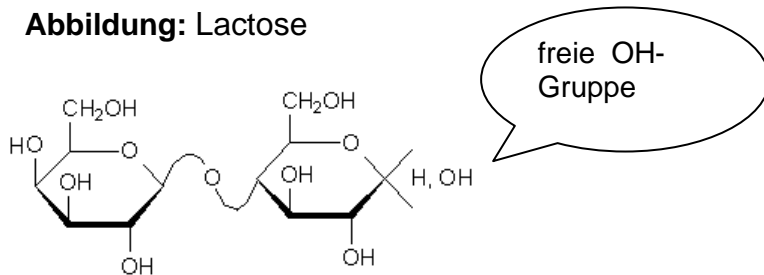
## 3.4 Nachweis von Milchzucker (Lactose)

### 3.4.1 Nachweis von reduzierenden Zuckern mit Fehling

#### Grundlagen

Das Disaccharid Lactose kommt ausschließlich in Milch und Milchprodukten vor. Es ist die Hauptkomponente der Kohlenhydratfraktion in der Milch. In geringen Mengen enthält Milch auch Glucose.

#### **Abbildung:** Lactose



In der Lactose sind D-Galactose und D-Glucose  $\beta$ -1,4-glycosidisch verknüpft. Aufgrund der freien OH-Gruppe reduziert Lactose Fehling-Lösung. In wässriger Lösung bilden sich  $\alpha$ - und  $\beta$ -Lactose im Verhältnis 2: 3 aus. Lactose wird bei der Herstellung vieler Sauermilchprodukte mikrobiell zu Milchsäure umgesetzt.

#### Materialien

Molke $v_1$	3 Reagenzgläser
Joghurt	Reagenzglasgestell
Fehling I und II	Heizplatte, Wasserbad
Reagenzglas	Messpipetten (5 ml, 1 ml)
Molke aus lactosefreier Milch	

#### Sicherheit

Fehling I enthält die Schwermetall-Ionen  $\text{Cu}^{2+}$ , Entsorgung im Schwermetallabfall.

#### Durchführung

1. Ca. 5 ml Molke werden in einem Reagenzglas mit je 1 ml Fehling Lösung I und II versetzt.
2. Ein Spatellöffel Joghurt wird in einem Reagenzglas mit ca. 5 ml Wasser aufgeschlämmt. Anschließend werden je 1 ml Fehling I und II zugegeben.
3. Molke aus lactosefreier Milch wird in einem Reagenzglas mit je 1ml Fehling I und II versetzt.
4. Alle drei Reagenzgläser werden vorsichtig im Wasserbad erhitzt.

#### Beobachtung und Ergebnis

	Molke	Joghurt	Molke aus lactosefreier Milch
Fehlingsche Probe			
Ergebnis			

### 3.4.2 Nachweis von Lactose durch Dünnschichtchromatografie

#### Grundlagen

Lactose kann spezifisch mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie nachgewiesen werden.

#### Materialien

2 ml Molke<sub>V1</sub> in 10 ml Propan-2-ol  
2 ml Molke aus lactosefreier Milch in 10 ml Propan-2-ol  
0,2 g Joghurt in 10 ml Propan-2-ol  
0,1 g Lactose in 10 ml Propan-2-ol (Vergleichslösung)  
0,1 g Glucose in 10 ml Propan-2-ol (Vergleichslösung)

**Mobile Phase:** Ethylacetat/Propan-2-ol/Natriumacetat-Lösung (v/v/v = 6,5 /2,4/1,2)

**Sprühreagenz:** 5 ml Anisaldehyd, 5 ml Schwefelsäure konz., 1 ml Eisessig, 90 ml Ethanol (96 %)

**Stationäre Phase:** Kieselgel Sil/Guv 256

6 Bechergläser (50 ml)  
Messpipette (10 ml)  
Heizplatte  
Messpipetten (5 ml, 1 ml)  
Zerstäuber  
Kapillaren  
Chromatografiegefäß  
Trockenschrank

#### Sicherheit

Schwefelsäure ist ätzend, Schutzbrille tragen.

#### Durchführung

1. Chromatografiegefäß mit der mobilen Phase befüllen und verschließen.
2. Oben aufgeführte Lösungen (Proben) herstellen. Eventuell muss auf der Heizplatte erwärmt werden.
3. Dünnschichtplatte vorbereiten. Startlinie ca. 1,5 cm vom unteren Rand vorsichtig mit Bleistift und die Auftragungspunkte 1, 2, 3 und 4 im Abstand von ca. 1 cm markieren. Die Beschichtung darf nicht verletzt werden.
4. Zweimaliges Auftragen der einzelnen Lösungen (Proben) mit Hilfe einer Kapillare (1 µl). Dazwischen mit dem Fön trocknen.
5. Das Chromatogramm wird in das mit mobiler Phase gefüllte Chromatografiegefäß gestellt.
6. Wenn die Fließmittelfront den oberen Rand fast erreicht hat, wird die Platte entnommen, die Fließmittelfront markiert und im Abzug getrocknet.
7. Nach dem Trocknen wird die Platte gleichmäßig mit dem Sprühreagenz im Abzug besprüht und 10 Minuten im Trockenschrank bei 110 °C entwickelt.

#### Beobachtung

#### Ergebnis

### Säuerung der Milch

#### Versuch 1: Messung des pH-Werts

##### Grundlagen

Der pH-Wert der Milch ist abhängig von dem Anteil der Milchsäure in der Milch.

##### Materialien

- pH-Messelektrode
- Probengefäße mit
  - Rohmilch
  - frische Milch
  - Sauermilch
  - Buttermilch
  - Joghurt
  - ansaure Milch
- destilliertes Wasser

##### Sicherheit

Vorsichtiger Umgang mit sensibler pH-Elektrode.

##### Durchführung

Die pH-Elektrode wird in ein mit einem Milchprodukt gefüllten Probengefäß gehalten und der pH-Wert, sobald er länger als 5 Sekunden konstant ist, notiert. Bevor die nächste Probe gemessen wird, wird die Elektrode mit destilliertem Wasser gut abgespült.

##### Beobachtung

	Rohmilch	frische Milch	Sauermilch	Buttermilch	Joghurt	ansaure Milch
pH-Wert						

##### Ergebnis

## Milch – Versuche – Milchsorten

---

### Versuch 2: Bestimmung des Säuregrads von Milch nach Soxhlet-Henkel

#### Grundlagen

Milch wird sauer, weil Milchzucker (Lactose) mikrobiell zu Milchsäure umgesetzt wird. Zur Beurteilung des Frischegrades wird deshalb mit Natronlauge titriert. Da auch frische Milch einen pH-Wert  $<7$  aufgrund gelöster Salze (v. a. Hydrogenphosphate) aufweist, wird auf die Angabe einer Milchsäurekonzentration verzichtet. Dafür wird eine Gesamtsäurekonzentration nach Soxhlet und Henkel bestimmt und mit Hilfe der SHZ (Soxhlet-Henkel-Zahl) beurteilt.

Die SHZ gibt an, wie viele Milliliter Natronlauge ( $c = 0,25 \text{ mol/l}$ ) zur Titration von 100 ml Milch unter Verwendung von Phenolphthaleinlösung bis zum Erreichen einer bleibenden Rosafärbung verbraucht werden.

#### Materialien

- Stativ
- Probengefäße mit
  - frischer Milch
  - Sauermilch
  - Joghurt
  - ansaurer Milch
- Bürette
- 2 Weithalsrlenmeyerkolben
- Magnetrührer und Rührfisch
- Vollpipette (100 ml)
- Pelleusball
- Pasteurpipette
- Phenolphthaleinlösung
- Natronlauge  $c = 0,25 \text{ mol/l}$

#### Sicherheit

Schutzbrillenpflicht! Stark alkalische und ätzende Lauge!

#### Durchführung

Je 100 ml Milch, Sauermilch, Joghurt und ansaure Milch werden mit fünf Tropfen Phenolphthaleinlösung versetzt und mit Natronlauge titriert. Diese wird dazu in eine Bürette gefüllt und die Startmenge notiert. Die Titration erfolgt langsam unter Rühren, bis sich eine schwache Rotfärbung einstellt.

#### Beobachtung

	Joghurt	frische Milch	ansaure Milch	Sauermilch
SHZ Verbrauch in ml 0,25 mol/l NaOH auf 100 ml Probelösung				

#### Ergebnis

### Versuch 3: Gerinnung der Milch durch Milchsäure – Herstellung von Joghurt

#### Grundlagen

Durch den fermentativen Abbau des Milchzuckers durch Milchsäurebakterien gerinnt das Eiweiß der Milch, und die Flüssigkeit wird fest.

#### Materialien

- Topf
- Rührbesen
- Heizplatte
- Thermometer
- Milchsäurebakterien
- Milch
- Marmelade-, Joghurtgläser

#### Durchführung

1. 1 l Milch auf 43 – 45 °C erhitzen.
2. Bakterien einrühren.
3. In Gläser abfüllen und verschließen.
4. Bei 43 – 45 °C 6 bis 8 Stunden fermentieren.

### Versuch 4: Mikroskopie von Milchsäurebakterien

Die Beobachtung der Bakterien wird – von Spezialfällen abgesehen – stets an fixierten Objekten vorgenommen, da die Scharfeinstellung lebender Bakterien, die sich in Suspensionen befinden, schwierig ist. Ferner lassen sich fixierte Bakterien leicht färben.

Methylenblau wird in der Biologie und in der Medizin sehr häufig verwendet und zwar zur Anfärbung von Zellkernen oder zur Anfärbung von Bakterien. Robert Koch und dessen Schüler Paul Ehrlich haben die Anfärbbarkeit von Krankheitserregern mit Methylenblau als erste erkannt und angewendet.

#### Materialien

- Mikroskop
- Objektträger und Deckgläser
- Zentrifuge mit Zentrifugengläsern
- Tropfpipetten
- Methylenblau
- Bunsenbrenner
- Tiegelszange
- Petrischale
- Joghurt

#### Durchführung

##### Teil A: Herstellung der Bakteriensuspension

1. Verdünnen Sie eine Spatelspitze Joghurt mit Wasser und verwenden Sie davon einen Tropfen.
2. Geben Sie einen Löffel Joghurt in ein Becherglas mit 40 ml Wasser, stellen Sie eine Suspension her, zentrifugieren Sie diese. Verwenden Sie den Überstand.

##### Teil B: Hitzefixierung

1. Ein sauberer Objektträger wird sehr sorgfältig durch Abreiben mit einem ethanolgetränkten, fusselreien Tuch entfettet. Wenn sich Spuren von Fett auf dem Objektträger befinden, läuft die Suspension nach dem Auftragen wieder zusammen.
2. Mit der Tropfpipette oder dem Glasstab wird ein Tropfen einer Bakteriensuspension (Joghurt) auf den Objektträger gegeben. Diese muss zerfließen. Von jeder der hergestellten Suspensionen ein Präparat herstellen.
3. Ein Deckglas wird im Winkel von 45° so auf den Objektträger gestellt, dass sich die Flüssigkeit durch Anziehungskräfte in der Ecke zwischen Deckglas und Objektträger sammelt.
4. Nun wird die Unterkante des Deckglases gleichmäßig über den gesamten Objektträger geschoben. Die Suspension wird dabei über die gesamte Oberfläche verteilt, wobei die Dicke des Flüssigkeitsfilms abnimmt.
5. Den so entstandenen Ausstrich lässt man bei Zimmertemperatur an der Luft trocknen, er darf dabei nicht erhitzt werden.
6. Die Bakterien werden durch kurzzeitiges Erhitzen über einer Flamme fixiert. Dabei wird der Objektträger dreimal durch die Flamme gezogen (bei rauschender Flamme des Bunsenbrenners), wobei die Geschwindigkeit etwa 30 cm/sec betragen soll.  
Die Schichtseite ist oben.

## Milch – Versuche – Milchsorten

---

### Teil C: Färbung

1. Der Ausstrich wird auf zwei Holzstäbchen über eine Petrischale gelegt (oder über ein Färbebad) und mit Methylenblau überschichtet.
2. Die Farbe etwa 8 Minuten einwirken lassen.
3. Der Farbstoff wird anschließend vorsichtig unter tropfendem Wasser solange abgespült, bis keine Farbstoffwolken mehr ablaufen.
4. Nun lässt man das Präparat an der Luft trocknen.

### Beobachtung/Zeichnung

## **Versuch 5: Qualitativer Nachweis von Lactat**

### Materialien

- Reagenzgläser, Reagenzglasständer
- Eisen(III)-chlorid-Lösung, w = 10 %
- Milchsäure w = 90 %
- destilliertes Wasser
- Joghurt

### Durchführung

2 Tropfen Eisen(III)-chlorid-Lösung werden in ein Reagenzglas gegeben und solange mit destilliertem Wasser verdünnt, bis kaum noch eine Gelbfärbung zu erkennen ist. Die Lösung wird auf drei Reagenzgläser verteilt. Anschließend werden in ein Glas 2 – 3 Tropfen Milchsäure, in das zweite Glas etwas Joghurt (gelöst in Wasser und filtriert) gegeben. Das dritte Glas dient zum Farbvergleich.

### Beobachtung

Zeisiggrüne Färbung durch einen Eisen(III)-Lactat-Komplex

### Ergebnis

### Beispiele zur Käseherstellung

#### Versuch 1: Herstellung von Mozzarella

##### Chemikalien

- 4 l Vollmilch (gut kühlen)
- 7 g Zitronensäure in 70 g Wasser gelöst (Apotheke oder per Internet bestellen)
- 1,5 ml Lab (Apotheke oder per Internet bestellen)
- 170 ml Wasser

##### Geräte

- Heizplatte
- Thermometer
- Messzylinder
- Spritze

4 l Milch und die Zitronensäure-Lösung in einen Topf geben, kräftig rühren und auf etwa 36 °C erhitzen. Jetzt fügt man das Labenzym hinzu und zwar indem man das Lab in 170 ml Wasser gibt, rührt und diese Lösung dann in die Milch einrührt. Alles unter Rühren auf etwa 36 °C erhitzen. Nach circa 15 Minuten den Topf mit der jetzt schon eingedickten Masse von der Platte nehmen und diese in kleine Würfel schneiden, damit sie sich von der Molke absetzen kann. Jetzt alles in ein Sieb (grob) geben, anschließend die Masse noch in ein Sieb, welches mit einem sauberen Tuch ausgelegt ist. Diese Prozedur dauert ungefähr 30 Minuten. Der Käsebruch wird nun auf eine Abtropfplatte (Platte mit Löchern oder Sieb) gegeben und über Nacht aufbewahrt. Brettchen und Gewichte auf den Käse legen und 3 Stunden lang gut pressen. Salz in ½ Liter Wasser aufkochen, abkühlen lassen. Nach dem Pressen Käse für 4 Stunden in das Salzbad legen, im Kühlschrank aufbewahren, anschließend abspülen. Dieser Käse ist im Kühlschrank 3 – 5 Tage haltbar, um Austrocknen zu vermeiden, in einer verschlossenen Schüssel in der Molke.

Am besten eignet sich Mozzarella in Scheiben geschnitten zusammen mit Tomaten, Olivenöl, Pfeffer, Salz und nach Belieben mit frischem Basilikum und/oder Aceto Balsamico.



### Versuch 2: Herstellung von Frischkäse

1 l Vollmilch und 1 Becher saure Sahne (Säuerungskultur) werden vermischt und in einem Topf auf 32 °C erhitzt. Dann gibt man eine Labtablette zu, die man in wenig kaltem Wasser gelöst hat. Man rührt vorsichtig um und lässt den geschlossenen Topf bei konstanter Temperatur (vor der Heizung) 40 Minuten stehen. Durch Druck mit einem Finger kann man überprüfen, ob die Masse fest geworden ist. Man zerschneidet den Käsebruch in 3 x 3 cm große Stücke und lässt den Topf weitere 10 Minuten abgedeckt stehen. Die Molke beginnt auszutreten. Je kleiner die Stücke sind, desto härter wird der spätere Käse. Nun filtriert man den Käsebruch über ein großes Sieb von der Molke ab. Nach etwa 4 Stunden wendet man den Käse ein erstes Mal (mit Hilfe zweier Teller). Am nächsten Tag wiederholt man das Wenden zweimal (morgens und abends). Am zweiten Tag wird der Käse gesalzen (einige Prisen), nach 6 Stunden gewendet und auch von der anderen Seite großzügig gesalzen. Nach weiteren 6 Stunden kann der streichfähige Käse verzehrt werden. Er kann im Kühlschrank einige Tage gelagert werden.

Bei der Käseherstellung ist auf Sauberkeit zu achten. Alle Geräte sind vor Verwendung mit heißem Wasser abzuspülen.

#### Schritte der Käseherstellung

Werkzeug für die Käseherstellung: Topf, Kelle, Sieb, Schüssel, Messer, Thermometer  
Milch, saure Sahne, Lab

Eine Labtablette wird in etwas kaltem Wasser zerkleinert und dann der 32 °C warmen Milch zugegeben.

Nach 50 Minuten wird der zerkleinerte Käsebruch mit einer Kelle abgeschöpft.

Nach einigen Tagen Reifung und Salzen erhält man einen streichfesten Frischkäse, den man mit Zwiebeln, Pfeffer oder anderen Gewürzen verfeinern kann.

Die Molke wird abfiltriert.