



Chemia żywności  
**Katedra Analizy Środowiska**

# Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

## Ćwiczenie nr 3

### Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

Chemia żywności

Gdańsk, 2016

### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

## 1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Białka są naturalnymi produktami zbudowanymi z reszt  $\alpha$ -L-aminokwasowych, połączonych w łańcuchy polipeptydowe wiązaniami trans-peptydowymi (jedynie przed każdą resztą proliny występuje konfiguracja cis). Budowa i właściwości białek, w tym białek obecnych w mleku, opisane są w pozycji 2 i 3 spisu literatury. Najistotniejsze informacje niezbędne do wyjaśnienia przeprowadzonych procesów/reakcji podano poniżej.

### 1. 1. Struktura i właściwości fizykochemiczne białek

#### Struktura pierwszo-, drugo-, trzecio- i czwartorzędowa

Różnorodność białek wynika ze składu i sposobu uszeregowania reszt różnych aminokwasów w cząsteczce (struktury pierwszorzędowej). Chemiczne właściwości i wymiary reszt aminokwasów powiązanych w określonej sekwencji decydują o konformacji białek (kształcie łańcuchów polipeptydowych - strukturze drugorzędowej), o ich przestrzennym ułożeniu w cząsteczce (strukturze trzeciorzędowej), a także o wzajemnym oddziaływaniu podjednostek przy tworzeniu struktur czwartorzędowych. Białka o określonej konformacji mają charakterystyczne właściwości biologiczne oraz cechy funkcjonalne w żywności.

#### *Denaturacja*

Pod wpływem wielu czynników fizycznych i chemicznych następuje nieodwracalne zniszczenie struktury białka zwane procesem *denaturacji*. Denaturacja białka dotyczy zmian w II, III- i IV-rzędowej strukturze białka natywnego, które prowadzą do utraty aktywności biologicznej lub innej indywidualnej cechy charakterystycznej przy zachowaniu jego struktury pierwszorzędowej. Podczas denaturacji niszczone są wiązania wodorowe, a w obecności odczynników redukujących zerwaniu ulegają wiązania disulfidowe. Denaturacja może być procesem odwracalnym (tzw. renaturacja) lub nieodwracalnym. Podczas denaturacji zachodzą zmiany rozpuszczalności i przesunięcie punktu izoelektrycznego. Rozwinięcie łańcucha peptydowego może prowadzić do wzrostu lepkości, a także zmian absorpcji w nadfiolecie. Obserwuje się również często procesy agregacji i wytrącania, co jest związane ze zmianami stopnia hydratacji i rozpuszczalności białek. Najważniejszymi metodami fizycznymi denaturacji są: ogrzewanie, silne mieszanie, wytrząsanie, naświetlanie promieniowaniem nadfioletowym, rentgenowskim i jonizującym lub działanie ultradźwiękami. Denaturacja chemiczna zachodzi pod wpływem związków, które są zdolne do rozerwania wiązań wodorowych, na przykład pod wpływem roztworu mocznika o stężeniu 6-8 mol/l lub chlorku guanidyny o stężeniu 4 mol/l, na skutek działania kwasów lub zasad (wartość

### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

pH poniżej 3 lub powyżej 9), soli metali ciężkich, a także 1% roztworu dodecylsulfianu sodu (SDS).

#### ***Rozpuszczalność w wodzie***

Białka na ogół są rozpuszczalne w wodzie. Niektóre z nich mogą rozpuszczać się w rozcieńczonych kwasach lub zasadach, jeszcze inne w rozpuszczalnikach organicznych. Posiadają zdolność wiązania cząsteczek wody. Efekt ten nazywamy **hydratacją**. Początkowo pęcznieją, a następnie rozpuszczają się tworząc cząstki koloidalne.

Białka ulegają procesowi koagulacji i procesowi odwrotnemu - peptyzacji. Koagulacja jest to przejście zolu w żel, a peptyzacja jest to przejście żelu w zol.

Na rozpuszczalność białek ma też wpływ stężenie soli nieorganicznych. Ich małe stężenie wpływa dodatnio na rozpuszczalność polipeptydów, jednak przy pewnym stężeniu następuje uszkodzenie otoczki solwatacyjnej, co powoduje wypadanie białek. Proces ten nie narusza struktury białka, jest odwracalny i nosi nazwę **wysalania białek**.

#### ***Odczyn białka / punkt izoelektryczny***

Podstawowe struktury aminokwasów tworzących białko zawierają różne grupy funkcyjne - kwasowe, zasadowe, pierścienie aromatyczne, grupy alkoholowe, atomy siarki itp., stąd w zależności od pH roztworu, w jakim się znajdują przybierają - jako całość - ładunek ujemny lub dodatni. Ładunek cząsteczki białka w roztworze o określonym stężeniu jonów wodorowych zależy od ilościowego stosunku aminokwasów zasadowych (lizyny, histydyny i argininy) i aminokwasów kwasowych (kwasu glutaminowego i asparaginowego). Od sumarycznego ładunku cząsteczki zależy z kolei jej stabilność w środowisku o różnym pH. W środowisku o wysokim stężeniu jonów wodorowych (niskie pH) cząsteczka białka zyskuje ładunek dodatni, podczas gdy w środowisku o niskim stężeniu jonów wodorowych (wysokie pH) ma ładunek ujemny. Wartość pH, przy którym sumaryczny ładunek cząsteczki wynosi 0, nosi nazwę **punktu izoelektrycznego**. W punkcie izoelektrycznym białko nie wykazuje ruchliwości elektroforetycznej oraz charakteryzuje się najniższą rozpuszczalnością w wodzie.

#### ***Wysalanie białek***

Wysalaniem białek, jak wspomniano, nazywamy proces wytrącenia z roztworu białek rozpuszczalnych w wodzie przez wysokie stężenie soli. Stosuje się w tym celu sole, których jony łatwo tworzą wodziany. Zjawisku wysalania sprzyjają te aniony, które tworzą wiązania wodorowe

### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

lub mają dużą elektryczność. Elektrolity wielowartościowe działają silniej od jednowartościowych. Sole wiążące wodę pozbawiają białka płaszcza wodnego, sprzyjając ich asocjacji w większe agregaty o zmniejszonej rozpuszczalności, które wypadają z roztworu. Stężenie soli potrzebne do wysalania białek zależy od ich właściwości oraz pH środowiska. Najłatwiej wysoliczyć białko w jego punkcie izoelektrycznym, ponieważ cząsteczki na zewnątrz obojętne łatwo asocjują w większe agregaty wypadające z roztworu. Do wysalania najczęściej stosuje się  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ .

Wysalanie białek jest procesem odwracalnym, usunięcie soli, np. przez dializę, sprawia, że wytrącone białko ponownie rozpuszcza się i wykazuje swe biologiczne właściwości.

## 1.2. Skład chemiczny mleka

Mleko to płynna wydzielina wyspecjalizowanych gruczołów ssaków służąca jako pokarm dla młodych osobników. Skład mleka różnych gatunków zwierząt różni się dość znacznie i został szczegółowo opisany w pozycji 2 spisu literatury. Mniejsze różnice w składzie występują między poszczególnymi rasami i osobnikami. Jest ono źródłem wysokowartościowych białek, łatwo przyswajalnego tłuszczu, soli mineralnych (w tym wapnia, fosforu, potasu) oraz witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E, K) i w wodzie (z grupy B). Mleko niektórych ssaków nie nadaje się do bezpośredniej konsumpcji przez człowieka, np. mleko fok zawiera 12 razy więcej tłuszczu, a także więcej białka niż mleko krowie. Istotnym składnikiem mleka jest laktoza - disacharyd nadający mleku charakterystyczny słodkawy posmak.

Najczęściej wykorzystywanym przez człowieka jako produkt spożywczy jest mleko krowie. Skład chemiczny mleka krowiego zależy od wielu czynników, jak np. paszy, rasy i wieku zwierzęcia itp. Występują w nim różne składniki (Tabela 1), m.in. substancje mineralne: wapń, fosfor, magnez, chlor, potas, siarka, żelazo i jod. Związki mineralne znajdują się w ilości około 0,7%.

**Tabela 1. Skład mleka krowiego** (<http://www.nutrilife.pl/index.php?art=25>)

| Substancja        | Mleko krowie       |
|-------------------|--------------------|
| Białko            | 3,3 - 4,3 g/100 ml |
| Tłuszcze          | 3,9-5,7 g/100 ml   |
| Cukier laktoza    | 4,5-4,9 g/100 ml   |
| Fosfor            | 30,7 mmol/l        |
| Wapń              | 30,11 mmol/l       |
| Ilość kcal/100 ml | 61-66 kcal         |
| pH                | 6,6                |
| Sucha masa        | 12,6-15,4 g/100 ml |

### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

Białka mleka należą do białek pełnowartościowych o wysokiej wartości biologicznej, zawierają bowiem wszystkie aminokwasy egzogenne niezbędne do budowy białka ustrojowego oraz wzrostu człowieka. Pod tym względem ustępują jedynie białku jaja kurzego, będącego „dietetycznym wzorcem”. Doskonale uzupełnia produkty roślinne, jak pieczywo, kasze, mąki, warzywa, które zawierają białko niepełnowartościowe. Wartość energetyczna (kaloryczna) mleka - w zależności od zawartości tłuszczu – wynosi około 500 -700 kcal/kg i pokrywa ok. 25% przeciętnego dziennego zapotrzebowania człowieka na energię. Jest więc to produkt stosunkowo niskokaloryczny, przy dużej zawartości białka.

Białka mleka dzieli się ze względu na ich budowę, rolę biologiczną i właściwości funkcjonalne na kazeiny, białka serwatki oraz otoczki kuleczek tłuszczowych (Tabela 2).

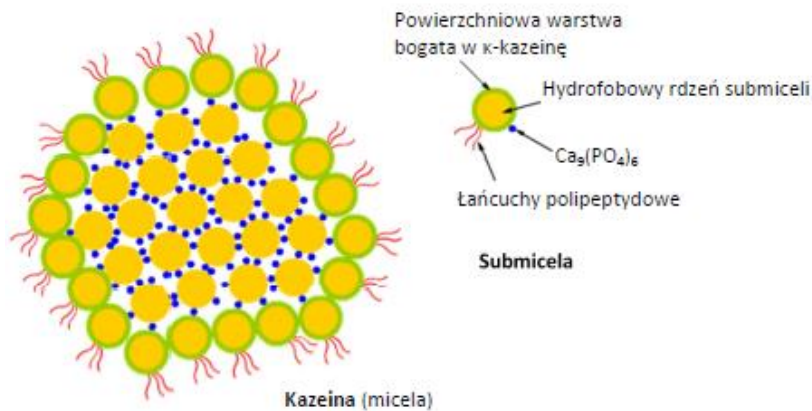
**Tabela 2 Zawartość białek w mleku krowim** (<http://www.food-info.net/pl/qa/qa-fp1.htm>).

| Białko                              | g/kg białka | Udział w całkowitej zawartości białka |
|-------------------------------------|-------------|---------------------------------------|
| <b>Kazeina</b>                      |             |                                       |
| α-s1-kazeina                        | 10.0        | 30.6                                  |
| α-s2-kazeina                        | 2.6         | 8.0                                   |
| β-kazeina                           | 10.1        | 30.8                                  |
| κ-kazeina                           | 3.3         | 10.1                                  |
| Całkowita zawartość kazeiny         | 26.0        | 79.5                                  |
| <b>Białka serwatki</b>              |             |                                       |
| α-laktoalbumina                     | 1.2         | 3.7                                   |
| β-laktoglobulina                    | 3.2         | 9.8                                   |
| Albumina surowicy krwi              | 0.4         | 1.2                                   |
| Immunoglobuliny                     | 0.7         | 2.1                                   |
| Pozostałe                           | 0.8         | 2.4                                   |
| Całkowita zawartość białek serwatki | 6.3         | 19.3                                  |
| Kuleczki tłuszczowe                 | 0.4         | 1.2                                   |
| Całkowita zawartość białka          | 32.7        | 100                                   |

**Kazeiny** są heterogeniczną grupą fosfoprotein, złożoną z 20 składników; są to najważniejsze białka mleka krowiego, jego zawartość wynosi 2,4-2,6%. W mleku krowim 40% kazeiny stanowi frakcja α, 30% frakcja β, a dalsze 10% frakcja κ. Kazeiny strącają się z surowego, odtłuszczonego mleka w temp. 20°C przy pH 4,6; w mleku występują w postaci miceli tworzących roztwór koloidalny. Kuliste micelle mają kształt maliny (średnica 20-300 nm), a ich masa micelarna wynosi  $10^7$ - $10^{10}$ . Micelle posiadają porowatą strukturę i są wyraźnie widoczne pod mikroskopem; cząstki miceli wypełniają mniej niż połowę jej objętości. Taka budowa sprzyja wiązaniu wody, jonów, laktozy i enzymów. W 1 ml mleka jest około  $7 \cdot 10^{13}$  miceli, które stanowią łącznie od 5 do 6% objętości mleka. Micelle utworzone są z podjednostek złożonych z 25-30 cząsteczek kazeiny α, β, κ, których domeny hydrofobowe są zwrócone do wnętrza, a hydrofilowe w kierunku rozpuszczalnika (Rys. 1). Podjednostki te, podobnie jak micelle, mają budowę sferyczną, a ich średnica nie przekracza

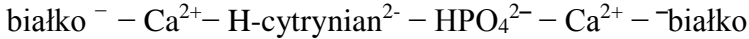
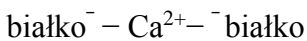
### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

10-20 nm.



Rysunek 1. Struktura miceli kazeinowej

W miceli podjednostki połączone są mostkami utworzonymi przy jony wapniowe, fosforanowe i cytrynianowe:



Niecała kazeina występuje w mleku w postaci micelarnej, czyli kompleksu fosforokazeinowego. Pewna jej część (do 8 -10%) stanowi tzw. kazeinę rozpuszczalną, która występuje w postaci pojedynczych cząsteczek. Pomiedzy kazeiną cząsteczkową i micelarną istnieje stan równowagi, zależny od stężenia jonów wapnia- Wzrost stężenia jonów wapniowych przesuwą równowagę w kierunku postaci micelarnej, natomiast gdy stężenie jonów wapniowych maleje, następuje dysocjacja miceli.

Micelle kazeinowe, w świeżym mleku przy pH ok. 6,6 mają ujemny ładunek elektryczny, czyli występuje przewaga zdysocjowanych grup kwasowych nad zasadowymi. Warunkuje to tworzenie się wokół miceli warstw hydratacyjnych o jednoimiennych ładunkach. Warstwy te odpychają się, stabilizując roztwór koloidalny kazeiny.

Micelle kazeinowe cechuje wysoka stabilność podczas ogrzewania świeżego mleka – koagulację cieplną powoduje dopiero długotrwałe ogrzewanie w temp. ponad 100°C. Proces koagulacji kazeiny w mleku można wywołać także wieloma innymi czynnikami:

- ✓ *Poprzez zakwaszenie mleka do punktu izoelektrycznego, w którym ilość zdysocjowanych grup kwasowych i zasadowych w micelach kazeiny jest jednakowa (w świeżym mleku*

### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

w temp. 20°C odpowiada wartości pH 4,6). Zakwaszenie mleka może być osiągnięte w wyniku fermentacji mlekowej laktozy, która podczas dłuższego przechowywania mleka pod wpływem bakterii kwasu mlekowego przekształca się w kwas mlekowy. Bezpośrednie dodanie do mleka kwasu mlekowego, siarkowego (VI) czy octowego również powoduje koagulację kwasową kazeiny.

- ✓ *Dodatek soli metali*, takich jak  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , lub wprowadzenie do mleka znacznych ilości soli dysocjujących, np.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ . Powoduje się wówczas koagulację przez wysalanie.
- ✓ *Działając na mleko enzymami*, np. podpuszczką, chymozyną czy pepsyną. Wytrącanie kazeiny zachodzi na drodze koagulacji enzymatycznej.

Nie wszystkie wymienione metody prowadzą do selektywnego wydzielenia kazeiny. Często temu procesowi towarzyszy wytrącanie się pozostałych białek mleka, np. ogrzewanie mleka w temp. 80°C z wodnym roztworem  $\text{CaCl}_2$  pozwala na wytrącenie 90% białek zawartych w mleku w postaci obfitego skrzepu.

Mechanizm kwasowej koagulacji kazeiny można przedstawić w następujący sposób. Przy pH mleka ok. 6,65 ogólny ładunek elektryczny miceli kazeinowych jest ujemny. Otoczone są więc cząsteczkami wody przy czym bieguny dodatnie jej dipoli zwrócone są w kierunku miceli, a ujemne na zewnątrz. W ten sposób micelle otoczone zostają warstwą hydratacyjną o jednoimiennym zewnętrznym ładunku elektrycznym i dlatego wzajemnie odpychają się, co stabilizuje roztwór koloidalny kazeiny, a warstwa hydratacyjna uniemożliwia także bezpośredni kontakt między micelami. Stopień hydratacji miceli zależy jest m.in. od wartości ich ładunku elektrycznego, Stopień jonizacji tych grup zmienia się przy zmianach wartości pH środowiska. Dodawanie do mleka kwasu octowego do momentu osiągnięcia punktu izoelektrycznego, powoduje utratę przez micelle zdolności wiązania wody, a zatem warstwy hydratacyjne. Siły odpychania między micelami zanikają, następuje wzajemne zbliżenie się w agregaty z wytworzeniem żelu.

Mechanizm koagulacji enzymatycznej kazeiny oparty jest na odłączeniu hydrofilowych fragmentów submicel. Po zewnętrznej części miceli kazeinowej znajdują się submicelle, które charakteryzują się sferycznym nagromadzeniem hydrofilowej frakcji  $\kappa$ -kazeiny (Rys. 1). Skrzep podpuszczkowy powstaje w wyniku odłączenia przez enzym proteolityczny (podpuszczkę) fragmentu  $\kappa$ -kazeiny. Od miceli odłączany jest fragment o silnych właściwościach hydrofilowych, fragment ten określany jest jako glikomakropeptyd. Fragment  $\kappa$ -kazeiny, który pozostał

### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

w submiceli (określany jako para- $\kappa$ -kazeina) nie posiada właściwości hydrofilowych. W ten sposób micelle kazeinowe, po stracie fragmentów hydrofilowych, w efekcie oddziaływań hydrofobowych, łączą się ze sobą dodatkowo tworząc mostki wapniowe. Liczba mostków warunkuje zwięzłość skrzepu, zaś zwiększenie oddziaływań hydrofobowych (związane ze stopniowym traceniem cząsteczek glikomakropeptydu) przyczynia się do separacji serwatki od masy serowej. Na stabilność skrzepu wpływa efektywność enzymatycznego odszczepiania hydrofilowej frakcji  $\kappa$ -kazeiny (glikomakropeptydu) oraz skuteczność tworzenia mostków wapniowych, co w pierwszym przypadku zależy od ilości zdenaturowanej  $\beta$ -laktoglobuliny związanej z  $\kappa$ -kazeiną, w drugim przypadku od zawartości w układzie jonów wapnia.

**Białka serwatki.** Serwatka, tzw. odciek pozostający po strąceniu kazein z chudego mleka, jest mieszaniną czterech głównych składników stanowiących około 80% frakcji ( $\beta$ -laktoglobuliny,  $\alpha$ -laktoalbuminy, immunoglobuliny oraz albuminy osocza) oraz wielu innych występujących w małych ilościach, w tym dużej liczby enzymów. W mleku występują w rozproszeniu i są bardzo trudne do wydzielenia w postaci skrzepu. Białka te nie zawierają fosforu, natomiast są bogate w lizynę.  $\beta$ -Laktoglobulina ulega denaturacji podczas silnego ogrzania, co ma niekorzystny wpływ na wydzielenie skrzepu przy pomocy podpuszczki.  $\alpha$ -Laktoalbumina jest bardziej odporna na wysokie temperatury; pasteryzacja (80-90°C) nie powoduje jej koagulacji, stąd pozostaje ona w serwatce. Cząsteczki albuminy osocza w środowisku kwaśnym asocjują. Immunoglobuliny (makroglobuliny) są złożoną mieszaniną białek o dużej masie cząsteczkowej i właściwościach odpornościowych. Pasteryzacja mleka niszczy tę frakcję białek.

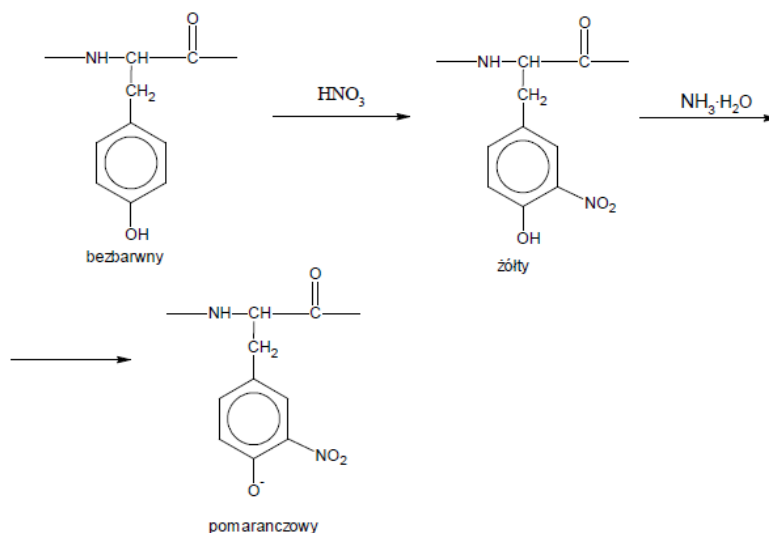
W mleku zidentyfikowano około 60 rodzimych enzymów we frakcji kazein, wśród białek serwatki i w białkowej otoczce kuleczek tłuszczowych. Niektóre z nich mają istotne znaczenie w technologii mleczarstwa (m.in. peroksydaza, fosfataza alkaliczna, plazmina, lipazy).

Kazeina wykazuje podobne właściwości chemiczne jak inne białka, dlatego też daje podobne reakcje charakterystyczne na obecność wiązań peptydowych czy pierścieni aromatycznych. Obecność wiązania peptydowego można wykryć za pomocą reakcji biuretowej opisanej w Ćwiczeniu 1. Obecność aminokwasów zawierających grupę aromatyczną (fenyloalaninę, tryptofan, tyrozynę) zarówno wolnych, jak i wchodzących w skład peptydów i białek wykrywa się za pomocą reakcji ksantoproteinowej, natomiast obecność wolnych aminokwasów korzystając z reakcji ninhydrynowej.



### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

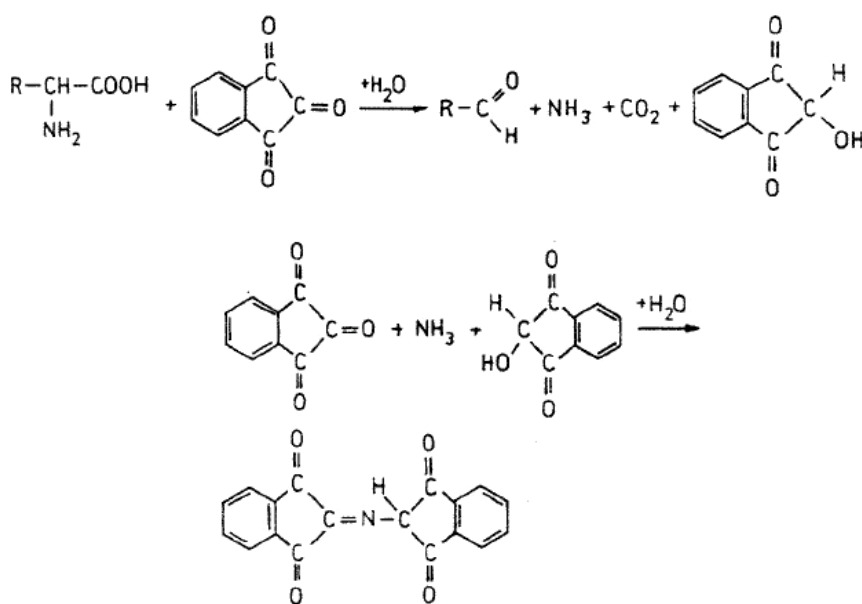
#### 1.2. Wykrywanie aminokwasów aromatycznych - próba ksantoproteinowa



Rys. 2. Schemat przemian zachodzących podczas próby ksantoproteinowej

Aminokwasy aromatyczne, do których zalicza się fenyloalaninę, tyrozynę i tryptofan, występujące zarówno w formie wolnej jak i związanej w białku, pod wpływem stężonego kwasu  $\text{HNO}_3$  ulegają nitrowaniu, w wyniku czego powstają pochodne nitrowe o barwie żółtej. Po zalkalizowaniu, związki nitrowe słabo dysocjują i barwa roztworu zmienia się na pomarańczową (Rys. 2). Próbę tę dają również inne związki aromatyczne, np. fenol, benzen itp.

#### 2.3. Reakcja ninhydrynowa



Rys. 3. Reakcja aminokwasów z ninhydryną

### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

Aminokwasy pod wpływem ninhydryny ulegają utlenieniu do iminokwasów (Rys. 3). Kolejne etapy przemian to deaminacja i dekarboksylacja oraz wytworzenie aldehydu skróconego o 1 atom węgla. W wyniku kondensacji utlenionej i zredukowanej w powyższym procesie cząsteczki ninhydryny oraz amoniaku powstaje kompleks o fioletowo-niebieskiej barwie (maksimum absorpcji przy  $\lambda = 570 \text{ nm}$ ), którego natężenie jest proporcjonalne do zawartości azotu aminowego aminokwasu. Reakcja z ninhydryną może służyć do ilościowego oznaczania aminokwasów metodą spektrofotometryczną. Dodatni odczyn ninhydrynowy dają obok aminokwasów, peptydów i białek także sole amonowe, aminocukry i amoniak.

## **2. WYKONANIE ĆWICZENIA**

### **2.1. Cel ćwiczenia**

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z niektórymi czynnikami powodującymi wytrącanie kazeiny z roztworu oraz z badaniem właściwości tego białka, tj. wyznaczeniem punktu izoelektrycznego, wykrywaniem aminokwasów aromatycznych, wolnych aminokwasów oraz jonów wapniowych.

### **2.2. Wykonanie ćwiczenia [1]**

#### *Analizowane produkty spożywcze:*

- Mleko krowie świeże
- Mleko krowie przechowywane w temperaturze pokojowej

#### *Odczynniki:*

- 1 M NaOH, 6 M NaOH
- 0,2 M octan sodu ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )
- 0,2 M kwas octowy ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )
- 1 % Roztwór glicyny
- 0,5 % Wodny  $\text{CuSO}_4$
- 0,2 % Roztwór  $\text{CaCl}_2$
- Stężony  $\text{HNO}_3$
- Nasycony roztwór szczawianu amonu
- Nasycony roztwór siarczanu amonu
- 0,1% Roztworu ninhydryny
- 2 M Kwas octowy
- Stężony kwas azotowy (V)  $\text{HNO}_3$

### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

#### **Sprzęt i akcesoria:**

- Stawy: probówki 14 szt.
- Łapa do probówek
- Pipety 1 ml x 6 szt.
- Pipety 2 ml 2 szt.
- Pipety 5 ml 1 szt.
- Pipety 10 ml 1 szt.
- Kolba stożkowa 100 ml 3 szt.
- Kolba stożkowa 200 ml 4 szt.
- Łapa do kolby stożkowej 1 szt.
- Kolba ssawkowa próżniowa 1 szt.
- Pompka wodna 1 szt.
- Cylinder miarowy 50 ml 3 szt.
- Cylinder miarowy 100 ml 1 szt.
- Lejek większy 3 szt.
- Sączki bibułowe
- Termometr 1 szt.
- Papierki lakmusowe
- Łażnia z lodem 1 szt.
- Wrząca łaźnia wodna 1 szt.
- Płyta grzejna 1 szt.
- Bagietka szklana 3 szt.

#### **2.2.1 Badanie odczynu mleka**

Papierkiem lakmusowym zbadać odczyn mleka świeżego oraz przechowywanego w temperaturze pokojowej. Porównać wyniki.

#### **2.2.2. Wytrącanie kazeiny z mleka świeżego**

**NICZEGO NIE WYLEWAĆ DO ZAKOŃCZENIA EKSPERYMENTÓW!!!**

##### **2.2.2.1. Z użyciem kwasu octowego – CH<sub>3</sub>COOH**

Do kolby stożkowej 200 ml wlać 25 ml mleka, dodać 25 ml wody o temp. 38°C, a następnie porcjami łagodnie mieszając 1 ml 2 M kwasu octowego. Całość pozostawić na 10 minut, po czym zdekantować ciecz nad osadu przez lejek z sączkiem bibułowym gładkim do drugiej kolby. Osad

### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

osuszać między kartkami bibuły i pozostawić do przygotowania roztworu kazeiny. Ciecz po odsączeniu kazeiny można stosować do wytrącania globulin i albumin.

#### **2.2.2.2. Z użyciem siarczanu amonu – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

Do kolby stożkowej 100 ml wlać 5 ml mleka i dodać 35 ml nasyconego roztworu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Następnie całość pozostawić w łaźni z lodem w temp.  $2^\circ\text{C}$  do wytrącenia kazeiny, po czym zdekantować ciecz z nad osadu przez lejek z sączkiem bibułowym gładkim do drugiej kolby.

#### **2.2.2.3. Z użyciem chlorku wapnia – $\text{CaCl}_2$**

Do kolby stożkowej 200 ml wlać 25 ml mleka, ogrzać je do temp  $80^\circ\text{C}$ , a następnie dodać porcjami łagodnie mieszając 25 ml 0,2% roztworu  $\text{CaCl}_2$ . Całość pozostawić na 10 min, po czym zdekantować ciecz z nad osadu przez lejek z sączkiem bibułowym gładkim do drugiej kolby. Kazeina w tym przypadku wytrąca się w postaci ko-precypitatu z białkami serwatkowymi.

### **2.2.3. Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazeiny**

#### ***Przygotowanie roztworu kazeiny***

Do kolby stożkowej 100 ml odważyć 1 g wytrąconej w punkcie 2.2.2.1. kazeiny i dodać 50 ml wody ogrzanej do temp  $40^\circ\text{C}$  oraz 4 ml 1 M NaOH. Po rozpuszczeniu kazeiny roztwór zobojętnić wobec papierka lakmusowego dodając 4 ml 1 M kwasu octowego.

#### ***Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazeiny***

W 6 probówkach sporządzić roztwory buforu octowego o pH wzrastającym od 3,6 do 5,6 według tabelki zamieszczonej poniżej.

**Tabela 3. Sporządzenie roztworów buforu octowego o pH wzrastającym od 3,6 do 5,6**

| Składniki buforu octanowego [w ml] |                |     |     |     |     |     |
|------------------------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Odczynniki, odczyn i osad          | Numer próbówki |     |     |     |     |     |
|                                    | 1              | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |
| 0,2 M kwas octowy                  | 4,6            | 4,1 | 3,0 | 2,0 | 1,0 | 0,5 |
| 0,2 M octan sodu                   | 0,4            | 0,9 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 4,5 |
| pH                                 | 3,6            | 4,0 | 4,4 | 4,6 | 5,2 | 5,6 |
| Ocena obfitości osadu              |                |     |     |     |     |     |

Po wymieszaniu do każdej próbówki dodać 1 ml przygotowanego roztworu kazeiny, dokładnie

### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

wymieszać i pozostawić na 40 min (w tym czasie wykonać reakcję ksantoproteinową oraz na wykrywanie wapnia). Po 40 minutach obejrzyć roztworu w probówkach i wpisać wyniki do tabeli, pamiętając, że punktowi izoelektrycznemu kazeiny odpowiada pH, przy którym występuje najbardziej obfity osad. Brak osadu oznaczyć znakiem minus (-), osad słabo obfity znakiem plus (+), osad średnio obfity znakiem (++), osad bardzo obfity znakiem (+++).

#### **2.2.4. Wykrywanie aminokwasów aromatycznych, wolnych aminokwasów oraz jonów wapniowych występujących w kazeinie**

##### *Wykrywanie aminokwasów aromatycznych - reakcja ksantoproteinowa –(pod dygestorium)*

Do próbki odmierzyć 1 ml roztworu kazeiny, dodać 1 ml stężonego kwasu azotowego (V) i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 5 min. Ostudzić i dodać stopniowo 3,5 ml 6 M NaOH – ostrożnie! Zapisać obserwacje i wnioski.

##### *Wykrywanie wolnych aminokwasów – reakcja ninhydrynowa*

Przygotować 2 próbki. Do pierwszej wlać 1 ml roztworu kazeiny, do drugiej 1 ml roztworu glicyny. Następnie do probówek dodać po 1 ml 0,1% roztworu ninhydryny i ogrzewać mieszaninę we wrzącej łaźni wodnej przez 3 minuty. Zapisać obserwacje i wnioski. Jeśli bezbarwny roztwór zyskuje niebiesko-fioletowe zabarwienie, to badana substancja zawiera wolne aminokwasy.

##### *Wykrywanie wapnia w kazeinie*

Do jednej próbki odmierzyć 1 ml roztworu kazeiny, do drugiej 1 ml cieczy pozostałej po odsączeniu kazeiny w punkcie 2.2.2.1 i dodać po 1 ml nasyconego roztworu szczawianu amonu. O obecności wapnia świadczy wytrącanie się białego osadu szczawianu wapnia  $(\text{COO})_2\text{Ca}$ . Zapisać obserwacje i wnioski.

### **3. OPRACOWANIE WYNIKÓW**

#### *Sprawozdanie z ćwiczenia powinno zawierać:*

- Stronę tytułową
- Cel i zakres ćwiczenia
- Opis wykonania ćwiczenia (zasada oznaczenia, odczynniki, szkło, sprzęt, materiały, wykonanie ćwiczenia)
- Otrzymane wyniki
- Dyskusję i wnioski

### 3. Właściwości fizykochemiczne białek mleka – kazeiny

#### **4. LITERATURA**

1. Górską Agata, Łobacz Marta, Ćwiczenia laboratoryjne z chemii żywności Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2009.
2. Sikorski Zdzisław E. Chemia Żywności, Wyd. 6, WNT, Warszawa, 2012
3. Kumirska Jolanta, Gołębiowski Marek, Paszkiewicz Monika, Bychowska Anna, Analiza żywności, skrypt elektroniczny dla studentów Ochrony Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 2010, ISBN 978-83-7326-711-4, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.
4. Ziajka Stefan, Mleczarstwo: zagadnienia wybrane. Wydawnictwo ART, Olsztyn, 1997.
5. Jurczak M.E. Mleko – produkcja, badanie, przerób. Wyd. 2 popr. i uzup. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 1997.