

## 169. Elektronenmikroskopische Grössenbestimmung der Calciumcaseinatteilchen in Kuhmilch

von **Hs. Nitschmann**.

(29. IV. 49.)

Bei der bekannten Polydispersität der Calciumcaseinatteilchen in der Milch scheint die Elektronenmikroskopie sehr geeignet, um über die Grössenverteilung exakte Auskunft zu geben. Die Aufgabe sieht einfach aus, wirft aber immerhin einige Probleme auf, die einerseits die Präpariertechnik, andererseits die Berechnung der Teilchengewichte aus der Abbildung betreffen.

Die Präparierung kann, wie bei kolloiden Suspensionen üblich, so geschehen, dass man von der genügend verdünnten Magermilch ein Tröpfchen auf der Trägerfolie verdunsten lässt und das Präparat zur Erhöhung der Kontraste goldbeschattet. Die Molkenproteine stören nicht, da ihre Menge gering ist und sie zudem molekular gelöst sind. Sie werden deshalb nicht abgebildet. Auch der Milchezucker und die Salze stören das Bild nicht. Die Frage ist somit nur, womit die nötige Verdünnung der Milch (1:100 bis 1:500) vorgenommen werden soll. Destilliertes Wasser ist ungeeignet, denn es bewirkt eine Dispergierung der Caseinatteilchen, ein Umstand, der bei früheren Arbeiten nicht immer beachtet wurde. Diese Dispergierung kann leicht daran erkannt werden, dass die Trübung einer mit destilliertem Wasser stark verdünnten Magermilch mit der Zeit abnimmt, wie übrigens schon 1929 von *Schneck*<sup>1)</sup> beobachtet worden ist.

Wir haben selbst in einem *Pulfrich*-Nephelometer von *Zeiss* den Gang des Trübungsgrades einer 1:200 verdünnten Magermilch zeitlich verfolgt. (Siehe Kurve I in Fig. 1.) Die sofort nach dem Zusetzen des Wassers gemessene Trübung wurde gleich 100 gesetzt. (Messungen mit Grünfilter L2, Durchlässigkeitsmaximum bei 530  $\mu$ .) Die Trübung nimmt besonders am Anfang sehr rasch ab; nach ca. 1 Stunde wird ein Endwert erreicht, der nur 15% des Ausgangswertes beträgt. Die Messungen wurden bei 12° (Temperierung mit Brunnenwasser) vorgenommen. Merkwürdigerweise ist der Abfall der Trübung bei Zimmertemperatur langsamer. Trotzdem kann man beim Verdünnen der Milch mit Wasser nicht hoffen, die Caseinteilchen in ihrer ursprünglichen Grösse abzubilden<sup>2)</sup>.

An diesem Zerfall der Teilchen ist in erster Linie die Herabsetzung der Calciumionenkonzentration in der Lösung schuld. Die

<sup>1)</sup> *A. Schneck*, *Milchwirtschaftl. Forsch.* **7**, 1 (1929).

<sup>2)</sup> Da wir uns im sog. *Rayleigh*-Bereich befinden (Teilchengrösse klein gegen Wellenlänge des Lichtes), ist die Intensität des Streulichtes proportional dem Teilchenvolumen, wenn Konzentration und Brechungsindices konstant bleiben. Da die restliche Trübung zu einem grossen Teil von Fettspeuren herrührt (vgl. *W. Lotmar* und *Hs. Nitschmann*, *Helv.* **24**, 242 (1941)), beträgt die durchschnittliche Volumenverminderung der Caseinteilchen in unserem Versuch sicher noch viel mehr als 85%.

Calciumbindung des Caseins folgt dem Massenwirkungsgesetz<sup>1)</sup>, und bekanntlich kann man das in der Milch recht grobdisperse Casein in den molekulargelösten Zustand überführen, wenn man dem System bei konstant gehaltenem  $p_H$  die freien Calciumionen entzieht. Magermilch wird klar, wenn man sie z. B. mit Citrat versetzt (Komplexbildung).

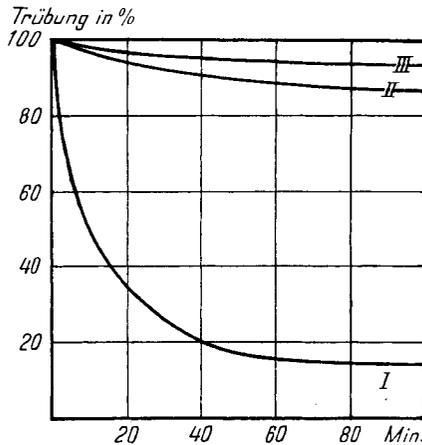


Fig. 1.

Zeitlicher Verlauf der Trübung von Magermilch nach dem Verdünnen 1:200.

Kurve I: Native Milch, verdünnt mit destilliertem Wasser.

Kurve II: Mit Formalin fixierte Milch, verdünnt mit destilliertem Wasser.

Kurve III: Native Milch, verdünnt mit 0,01-m.  $\text{CaCl}_2$ .

Das sicherste Mittel zur Erhaltung der Teilchengröße wäre Verdünnen mit ultrafiltriertem Milchserum. Für die Elektronenmikroskopie geht das jedoch wegen des hohen Gehaltes des Serums an gelösten Festkörpern nicht. Es liegt aber nahe, das Verdünnen mit einer Calciumsalzlösung vorzunehmen, die gleiche Calciumionenkonzentration aufweist wie das Serum (ca. 0,01-n.<sup>2)</sup>). Die zeitliche Veränderung der Trübung einer Magermilch, welche 1: 200 mit einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung dieser Konzentration verdünnt wurde, ist durch Kurve III in Fig. 1 wiedergegeben. Selbst nach einer Stunde hat der Trübungsgrad nur um wenige Prozent abgenommen. Wir haben von so verdünnter Magermilch eine Reihe von elektronen-mikroskopischen Aufnahmen gemacht und auf ihnen über 2000 Teilchen nach Grössenklassen ausgezählt (Tab.). Die Zeit vom Verdünnen bis zum Eintrocknen des Tröpfchens auf dem Objektträger betrug nicht mehr als  $\frac{1}{4}$  Stunde, so dass eine merkliche Desaggregation nicht stattgefunden haben kann. Bei dieser Arbeitsweise birgt aber das Eintrocknen eine Fehlerquelle. Hierbei steigt nämlich die Calciumionen-

<sup>1)</sup> A. Chanutin, St. Ludewig und A. V. Masket, J. Biol. Chem. **143**, 737 (1942).

<sup>2)</sup> E. R. Ling, J. Dairy Res. **8**, 173 (1937).

konzentration sehr stark, was Anlass zu einer Teilchenaggregation geben könnte. Wir glauben zwar nicht, dass der Effekt bedeutend sein kann, da das Eintrocknen im Vakuum rasch vor sich geht, besonders am Schluss, wenn die Calciumchloridkonzentration wirklich gross wird. Für die Richtigkeit unserer Annahme spricht auch, dass die Teilchengrössenstatistik ein sehr ähnliches Bild ergeben hat, wie bei einer zweiten Präpariermethode.

Dieselbe besteht darin, dass man die Proteinteilchen mit Formaldehyd in ihrer Grösse und Form so fixiert, dass sie beim Zusatz von destilliertem Wasser nicht mehr zerfallen können. Wenn man Magermilch mit 0,4—0,8% Formaldehyd versetzt, sie mindestens 24 Stunden stehen lässt und alsdann 1 : 200 mit destilliertem Wasser verdünnt, so zeigt diese Lösung praktisch dieselbe Trübung wie nicht formalisierte Milch, die mit 0,01-m.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung verdünnt wurde. Der zeitliche Abfall der Trübung ist auch hier sehr gering und macht nach 1 Stunde nur einige Prozent aus. Trotzdem Formaldehyd in molekular-dispersen Proteinlösungen, wenn dieselben nicht zu verdünnt sind, durch  $\text{CH}_2$ -Brücken zusammengehaltene Molekelkomplexe entstehen lässt<sup>1)</sup>, scheinen die viel grösseren Calciumcaseinateilchen der Milch isoliert zu bleiben. Nur die schon zuvor zu einem kugeligen Teilchen zusammengepackten Caseinmolekeln werden durch Brückenbindungen miteinander verschweisst. Die so fixierten Teilchen werden sogar durch Zugabe von Citrat, das zu einem völligen Entzug des Calciums führt, nicht mehr dispergiert (keine oder nur sehr geringe Verminderung der Trübung). Von Magermilch, welche auf diese Weise mit Formalin fixiert und dann nur mit destilliertem Wasser verdünnt wurde, haben wir ebenfalls Aufnahmen gemacht und ausgemessen.

Bevor wir uns dem Ergebnis der Grössenstatistik zuwenden, seien zu den Photographien selbst, von denen hier nur eine wiedergegeben sei (Fig. 2), einige Bemerkungen gemacht.

Für die blosse Betrachtung geben die beiden beschriebenen Präpariermethoden gleichartige Bilder. Die zunächst gleich auffallende Polydispersität des Caseins war bereits aus einer Reihe früherer Arbeiten bekannt, bei denen andere Untersuchungsmethoden angewendet wurden<sup>2)</sup>. Auch hatte man — insbesondere auf Grund von Viskositätsmessungen — angenommen, dass die Form der Teilchen nicht stark von der Kugelform abweicht. Auf unsern Aufnahmen haben die Teilchen die Form von runden Brötchen. Zweifellos waren

<sup>1)</sup> *H. Fränkel-Conrat* und *H. S. Olcott*, *Am. Soc.* **70**, 2673 (1948), Anmerkung 25, und unveröffentlichte elektrophoretische Untersuchungen von *Hs. Nitschmann* und *H. Zürcher*.

<sup>2)</sup> Eine Zusammenstellung solcher Arbeiten findet sich im Buche von *H. Eilers*, *R. N. J. Saal* und *M. van der Waarden*, *Chemical and Physical Investigations on Dairy Products*, Amsterdam 1947.

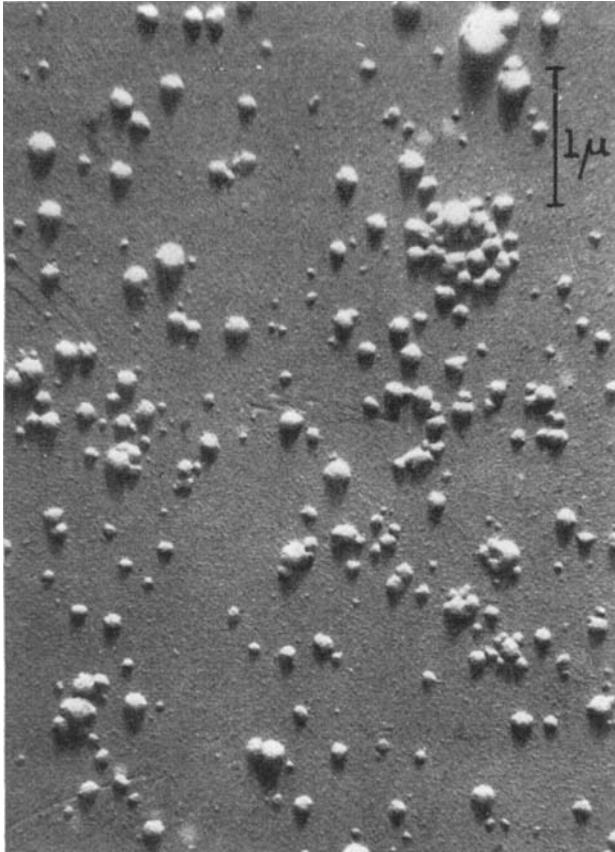


Fig. 2.

Magermilch (Februar-Mischmilch), mit 0,4% Formaldehyd fixiert.  
Verdünnung 1 : 100 mit destilliertem Wasser. Auf Glas präpariert, mit  
Benzol gewaschen, goldbeschattet und mit Formvarlackfolie abgezogen.  
Elektronenmikroskopische Abbildung 1 : 18000.

sie in der Suspension kugelig und sind erst beim Eintrocknen flachgedrückt worden. Wir haben es demnach in der Milch mit kleinen plastischen Gelkügeln zu tun, die ihre Form einfach der Oberflächenspannung und nicht etwa ganz besonderen Bedingungen bei ihrer Entstehung in der Milchdrüse verdanken. Das beweisen eigene elektronenmikroskopische Aufnahmen von künstlicher Magermilch, wie man sie aus Natriumcaseinatlösung durch Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  erhalten kann. Auch hier findet man nämlich runde Calciumcaseinatteilchen von ähnlicher Grössenordnung wie in natürlicher Milch.

#### Teilchengrössenstatistik.

Wir haben bei jeder der beiden Präpariermethoden auf 3 vergrösserten Aufnahmen die Teilchen nach Grössenklassen von 40—80, 80—120, 120—160, 160—200, 200—240 und 240—280  $m\mu$  gezählt. Das Auflösungsvermögen des uns zur Verfügung stehenden Mikroskopes<sup>1)</sup> geht zwar noch weiter herunter als 40  $m\mu$ , doch weiss man dort nicht mehr ganz sicher, was man eigentlich sieht. Die Grössenverteilung, die wir bei den beiden Präparationen gefunden haben, ist aus der Tabelle ersichtlich. Mehr noch als der Durchmesser der Teilchen im Bilde interessiert ihre wirkliche Grösse resp. ihr Gewicht vor dem Eintrocknen. Dieser Wert kann nur annähernd berechnet werden. Wir sind dabei folgendermassen vorgegangen.

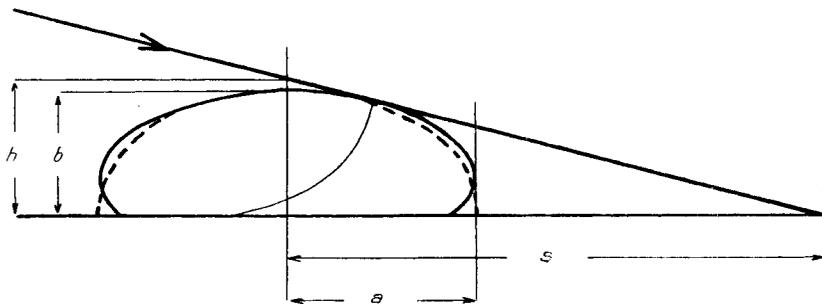


Fig. 3.

Zur Berechnung der Teilgewichte. Legende im Text.

Bei der Goldbedampfung war der Einfallswinkel des Golddampfes auf das Präparat so gewählt worden, dass die Schattenlänge ( $s$ ) das 4fache der Höhe ( $h$ ) des schattenwerfenden Objektes betrug. Ausmessung der Schattenlänge an einer grösseren Anzahl von Teilchen ergab, dass dieselbe im Mittel das 1,43fache des Teilchendurchmessers ( $2a$ ) betrug. Daraus lässt sich mit Hilfe einer graphischen Konstruktion (Fig. 3) die wirkliche Teilchenhöhe ( $b$ ) ungefähr ermitteln, wenn man annimmt, dass die eingetrockneten Teilchen die

<sup>1)</sup> Es handelt sich um ein Elektronenmikroskop der Firma Trüb, Tücher & Co., Zürich.

Form flacher Brötchen besitzen. Zur Berechnung ihres Volumens darf man wohl mit ziemlich guter Annäherung ein halbiertes abgeplattetes Rotationsellipsoid zugrunde legen, dessen grosse Halbachse = a und dessen kleine Halbachse = b ist. Die Rechnung ergibt, dass der Inhalt dieses halben Rotationsellipsoids ziemlich genau  $\frac{1}{3}$  des Volumens einer Kugel vom Radius = a beträgt<sup>1)</sup>. Nun ist aus Viskositätsmessungen bekannt<sup>2)</sup>, dass sowohl in künstlicher als auch in natürlicher Magermilch das Calciumcaseinat eine Voluminosität<sup>3)</sup> von 3,0—3,1 besitzt. Es sieht also so aus, als ob die Gelkugeln, wenn sie isoliert auf einer Unterlage zum Eintrocknen gebracht werden, nur in der Richtung senkrecht zu dieser Unterlage schrumpfen, so dass ihr Durchmesser parallel dazu praktisch unverändert bleibt.

Für die Berechnung der Teilchengewichte in Molgewichtseinheiten (siehe Tabelle) wurde für das trockene Material ein spezifisches Gewicht von 1,40 eingesetzt.

Grössenklassen		Häufigkeit (Anzahl) in %	
Durchmesser*) in $m\mu$	Molgewicht in Millionen	Präparation	
		a**)	b***)
40—80	10—81	20,8	32,0
80—120	81—266	35,5	34,0
120—160	266—625	23,3	23,7
160—200	625—1220	13,9	8,0
200—240	1220—2025	4,5	2,0
240—280	2025—3280	2,0	0,4

\*) Direkt im Bild ausgemessen. Annähernd gleich wie die Durchmesser der kugeligen, im Milchserum auf das 3fache Volumen gequollenen Teilchen.

\*\*\*) Verdünnung mit 0,01-m.  $CaCl_2$ . 2410 Teilchen.

\*\*\*) Formaldehydfixierung. 503 Teilchen.

Betrachten wir die in der Tabelle niedergelegten Ergebnisse, so können wir feststellen, dass bei beiden Präparaten das Häufigkeitsmaximum bei Teilchendurchmessern von 80—120  $m\mu$ , resp. „Mol“gewichten von 81—266 Millionen liegt<sup>4)</sup>. Teilchen von über 300  $m\mu$  kommen kaum vor oder sind jedenfalls als Zentrifugenschlamm eliminiert worden. Die untere Grenze der Teilchengrösse lässt sich aus den Aufnahmen nicht erschliessen. Sicher gibt es Teilchen von weniger als 40  $m\mu$  Durchmesser; sie können nur nicht mehr ganz sicher von den Untergrundrauhigkeiten unterschieden

<sup>1)</sup> Für  $a = 0,5$  fanden wir  $b = 0,33$ . Dann wird  $V(\text{Kugel}) : V/2(\text{Ellipsoid}) = 523 : 173 = 3,02$ .

<sup>2)</sup> C. L. Hankinson und D. R. Briggs, J. Phys. Chem. **45**, 943 (1941); H. Eilers und Mitarbeiter, Verslag. Landbouwk. Onderzoekingen **50** (15) G., 1007 (1945).

<sup>3)</sup> Volumenfaktor bei Anwendung des Einstein'schen Viskositätsgesetzes für Suspensionen kugelförmiger Teilchen.

<sup>4)</sup> Bei diesen Gewichten ist zu bedenken, dass die Caseinteilchen der Milch ca. 6% Calciumphosphat enthalten.

werden. Wenn wir unsere Resultate mit denjenigen anderer Autoren<sup>1)</sup>, die früher Teilchengrößenbestimmungen an Milch vorgenommen haben, vergleichen, so stimmen sie am besten mit denjenigen von *B. Nicols* und Mitarbeitern<sup>2)</sup> überein. Diese Forscher haben an Magermilch, welche mit ultrafiltriertem Milchserum verdünnt wurde, Sedimentationsgeschwindigkeiten in der Ultrazentrifuge durch Lichtabsorptionsmessungen bestimmt. Sie errechnen daraus einen Größenbereich von 8—200  $m\mu$  Durchmesser für die nicht hydratisierten Teilchen. Bei einem Quellungsfaktor von 3 würde dies Durchmessern von 11,5—288  $m\mu$  entsprechen, was sich gut mit unsern Befunden deckt. Das Häufigkeitsmaximum fanden die Autoren bei Teilchendurchmessern von 80—90  $m\mu$  trocken, resp. 115—130  $m\mu$  gequollen. Dabei handelt es sich aber nicht um die Häufigkeit nach der Teilehenzahl, sondern nach dem Gewichtsanteil<sup>3)</sup>. Bei der Umrechnung unserer Werte auf Gewichtsanteile zeigt sich, dass bei Präparation a (Verdünnung mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung) die Teilchen mit Durchmessern von 160—200  $m\mu$  (gequollen) den grössten Gewichtsanteil ausmachen, bei Präparation b (Formolfixierung) diejenigen mit Durchmessern von 120—160  $m\mu$ . Schon bei den Häufigkeitswerten nach der Anzahl scheint ja das Maximum bei Präparation b gegenüber Präparation a nach etwas kleineren Werten verschoben. Die Gründe hierfür, sowie der Einfluss weiterer Milieuänderungen und der Vorgeschichte der Milch auf den Dispersitätsgrad des Caseins in derselben sind Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Der Verfasser dankt den Herren Dr. *Heinrich Studer* und Dr. *Heinz Pfister* für ihre Hilfe bei der Herstellung der Aufnahmen und ihrer Auszählungen.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden durch Mittel aus dem Arbeitsbeschaffungskredit des Bundes ermöglicht.

### Zusammenfassung.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Calciumcaseinatteilchen in der Magermilch (Kuh) kugelig und stark polydispers sind. Die Auszählung nach Größenklassen ergab, dass das Zahlenhäufigkeitsmaximum bei Teilchendurchmessern (gequollen) von 80—120  $m\mu$  liegt. Es wird erneut gezeigt, dass die Calciumcaseinatteilchen bei dem für die Präparierung erforderlichen Verdünnen der Milch zerfallen, wenn destilliertes Wasser verwendet wird. Dieser Fehlerquelle kann durch Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  oder vorherige Fixierung der Teilchen mit Formaldehyd begegnet werden.

Institut für organische Chemie der Universität Bern.

<sup>1)</sup> Zusammenstellung im bereits zitierten Buch von *H. Eilers* und Mitarbeitern.

<sup>2)</sup> *J. B. Nicols, E. D. Bailey, G. E. Holm, G. R. Greenbank* und *E. I. Deysher*, *J. Phys. Chem.* **35**, 1303 (1931).

<sup>3)</sup> Genauer handelt es sich um den sogenannten gewichts-optischen (weight-optical) Anteil. Näheres hierüber siehe bei *Nicols* und Mitarbeitern, loc. cit. oder bei *Svedberg* und *Pederson*, *The Ultracentrifuge*, Part III, Chapter B, 4.