

das Chlorophylleisen einen braunen Farbton, der von Phäophytin deutlich verschieden ist. Dagegen konnte festgestellt werden, daß geringe Zusätze von Calciumhydroxyd zum Aufgußwasser beim Sterilisieren nicht nur die Phäophytinverfärbung des Chlorophylls wesentlich verringert, sondern auch einen Einfluß anwesender fremder Metallionen auf die Verfärbung verhindert.

## Beiträge zur Kenntnis des Proteinschwefels

### VI. Mitteilung\*

#### Bindungsformen des Schwefels in Milch\*\*

Von

RUDOLF SPRINGER und RICHARD WOLLER

Mitteilung aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 6. November 1956)

Der Auffindung schwefelhaltiger Verbindungen in Milch ist in Anbetracht der Bedeutung des Schwefels als lebensnotwendigem Bestandteil der Nahrung großer Wert beigemessen, zumal die Milch allein den Säugling mit diesem Bioelement versorgt. Milch wird demzufolge, ähnlich dem Ei, alle die Stoffe enthalten müssen, die der Organismus benötigt, auch die schwefelhaltigen. Frauenmilcheiweiß ist bekanntlich von KÜHNAU bei der Ermittlung des „biologischen Wertes“ von Nahrungsproteinen als Standard verwendet worden.

Tabelle 1. Bindungsformen des Schwefels in Milch

Bindungsform des Schwefels	ermittelt nach Hydrolyse mittels Salzsäure		ermittelt nach Hydrolyse mittels Jodwasserstoffsäure	
	Schwefel in 100 ml Milch mg	Anteil am Gesamtschwefel %	Schwefel in 100 ml Milch mg	Anteil am Gesamtschwefel %
Gesamtschwefel . . . . .	46,97	100,00	46,97	100,00
Sulfatschwefel . . . . .	1,20	2,56	1,20	2,56
<i>Im Hydrolisat</i>				
Methioninschwefel . . . . .	27,87	59,34	28,03	59,68
Cystinschwefel . . . . .	10,27	21,87	10,42 <sup>1</sup>	22,18 <sup>1</sup>
Cysteinschwefel . . . . .	0,27	0,75		
Schwefelwasserstoffwechsel . . . . .	Spuren	—	4,81 <sup>2</sup>	10,24 <sup>2</sup>
Sulfatschwefel (zusätzlich bei der Hydrolyse entstanden) . . . . .	4,58	9,75		
<i>Summe</i> . . . . .	44,19	94,27	44,46	94,66
Nicht ermittelter Schwefel . . . . .	2,78	5,73	2,51	5,34

\* SPRINGER, R., u. K. E. QUENTIN: Biochem. Z. **322**, 180 (1951); **322**, 486 (1952); **325**, 21 (1953) [1.—3. Mitt.]; Arch. Pharmaz. **288/60**, 448 (1955) [5. Mitt.]. — SPRINGER, R., u. R. WOLLER: Biochem. Z. **325**, 376 (1954) [4. Mitt.].

\*\* Die Arbeit ist von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert worden, wofür wir herzlich danken.

<sup>1</sup> Bei der Hydrolyse mittels Jodwasserstoffsäure werden Cystin und Cystein gemeinsam erfaßt.

<sup>2</sup> Bei der Jodwasserstoffhydrolyse „abspaltbarer Schwefel“ (Sulfat- und Sulfidschwefel). Der ursprüngliche Sulfatschwefel ist in Abrechnung gebracht.

Der menschliche und tierische Schwefelstoffwechsel ist durch die Aufnahme von Proteinschwefel, seinen Einbau in artigenes Eiweiß und Enzyme sowie schließlich durch den Abbau zum Sulfatschwefel, sog. oxydiertem Schwefel, charakterisiert.

In der Milch sind bisher an schwefelhaltigen Verbindungen hauptsächlich schwefelhaltige Aminosäuren (frei und im Proteinverband), Sulfat und unter besonderen Bedingungen Sulfid gefunden worden. Kleine Schwefelmengen liegen als Baustein des Vitamin B<sub>1</sub> und möglicherweise einiger noch nicht ermittelter Stoffe vor.

Die Literaturangaben bezüglich des Schwefelgehaltes der Milch und der Bindungsformen des Schwefels darin weisen außerordentliche Abweichungen auf. Vielfach wird von den Verfassern nur die eine oder andere Verbindung bestimmt, etwa der „flüchtige“ Schwefel sowie der Sulfatschwefel, oder es stellen Autoren eine Aminosäurebilanz im Milcheiweiß auf und erfassen im Zuge ihrer Ermittlungen auch die schwefelhaltigen Aminosäuren.

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Auffinden und mit der mengenmäßigen Bestimmung von Bindungsformen des Schwefels in frischer unbehandelter Kuhmilch.

Zahlreiche Milchproben, zu verschiedenen Jahreszeiten untersucht, wiesen eine erstaunlich geringe Abweichung in dem Gehalt an schwefelhaltigen Substanzen auf, so daß die hier mitgeteilten Werte als Normen gewertet werden können (Tab. 1).

Die Milch ist mit ihrem Schwefelgehalt, der etwa 50 mg/100 ml beträgt, unter Berücksichtigung des hohen Wassergehaltes und der im Vergleich zu anderen Lebensmitteln verhältnismäßig großen Menge, die davon genossen wird, zu den schwefelreichen Lebensmitteln zu rechnen. Es gelang, etwa 95% dieses Schwefels in sechs verschiedenen Anteilen zu erfassen.

Der *Proteinschwefel* macht etwa 82% des Gesamtschwefels aus. Überraschend hoch liegt mit fast 60% des Gesamtschwefels und 73% des Proteinschwefels der Schwefelanteil des *Methionins*. Beim Vergleich mit dem ebenfalls von uns untersuchten Rinderblutserum<sup>1</sup> fällt auf, daß dort der Anteil des Methioninschwefels am Gesamtschwefel nur 32% beträgt. Bei der Bildung der Milch findet im Milchprotein offensichtlich eine Anreicherung an Methionin statt. Es stellt dieser Befund erneut die Bedeutung dieser Aminosäure als Bestandteil des Nahrungsproteins unter Beweis.

Einen hohen Methioningehalt des Milchproteins teilte BLOCK<sup>2</sup> mit (3,3—3,4% des Milcheiweißes, der von uns gefundene Methioningehalt entspricht 3,5% des Milchproteins), während z. B. KUGENEW<sup>3</sup> sowie KUIKEN und PEARSON<sup>4</sup> weit weniger ermitteln konnten. Vielfach arbeiteten Autoren, die niedrigere Methioninanteile fanden, nach mikrobiologischen Bestimmungsverfahren oder nach chemischen, denen ein enzymatischer Proteinaufschluß voranging. Daß mit Hilfe des mikrobiologischen Tests gefundene Methioningehalte niedriger sind als die nach chemischen Methoden erhaltenen, ist bereits öfter beobachtet worden. Auf enzymatischem Wege werden, wie eigene Befunde lehrten<sup>5</sup>, je nach angewandtem Enzympräparat die schwefelhaltigen Aminosäuren mehr oder weniger, aber stets unvollständig, aus dem Proteinverband in freie Säuren übergeführt.

Etwa 22% des Gesamtschwefels beträgt der *Cystein-Cystin*-Anteil. Hinsichtlich der Differenzierung zwischen Cystin und Cystein sei bemerkt, daß diese hier nach erfolgter Salzsäurehydrolyse stattfand. Damit ist nicht unbedingt der ursprüngliche Verteilungsgrad charakterisiert. Es ist bekannt, daß beim „Denaturieren“ von Eiweiß, z. B. schon beim Kochen der Milch, Bindungsänderungen der schwefelhaltigen Proteinbestandteile eintreten können. Neuderdings wies FREYTAG<sup>6</sup> auf die Möglichkeit der Bildung von Sulfhydrylgruppen bei der Hitzedenaturierung hin.

<sup>1</sup> SPRINGER, R., u. R. WOLLER: Arch. Pharmaz. **287/59**, 565 (1954).

<sup>2</sup> BLOCK, R. J.: Advances Protein Chem. **2**, 119 (1945).

<sup>3</sup> KUGENEW, P.: Milichind. (russ.) **12**, 119 (1945); ref. in Chem. Zbl. **1952**, 2597.

<sup>4</sup> KUIKEN, K., u. P. B. PEARSON: J. Nutrit. **39**, 167 (1949).

<sup>5</sup> SPRINGER, R., u. K. E. QUENTIN: Zit. S. 387, Anm. \* [5. Mitt.].

<sup>6</sup> FREYTAG, H.: Fol. Pharmac. (Folya Farmasötika) **3**, 125 (1925).

Der Vitamin B<sub>1</sub>-Gehalt der Milch beträgt im Durchschnitt 0,045 mg/100 ml. Da das Aneurin einen Schwefelgehalt von 9,56% aufweist, sind in der Milch etwa nur 0,0045 mg/100 ml, d. h. nicht einmal 0,01% des Gesamtschwefels am Aufbau von Vitamin B<sub>1</sub> beteiligt.

*Schwefelwasserstoff* ist in unbehandelter Frischmilch offensichtlich nicht in nennenswerter Menge vorhanden, während bei Temperaturen über etwa 75° C stets „flüchtiger“ Schwefel auftrat. Wir konnten in Abhängigkeit von der Kochzeit eine nahezu lineare Zunahme an Schwefelwasserstoff beobachten. Der Verlust an flüchtigem Schwefel ist jedoch gering und beträgt im Höchstfall etwa 0,1 mg/100 ml (vgl. Abb. 1).

Unter den Bedingungen des Pasteurisierens und Sterilisierens von Milch konnten TOWNLEY und GOULD<sup>1</sup> ebenfalls das Auftreten von Schwefelwasserstoff feststellen. DIEMAIR und Mitarbeiter<sup>2</sup> fanden im Durchschnitt 0,13 mg/100 ml flüchtigen Schwefel nach Destillation unter Zusatz von Alkali.

Nach Zusatz von Mineralsäuren zu frischer Milch war keine Schwefelwasserstoffbildung nachweisbar, bei der Einwirkung 25%iger Salzsäure in der Siedehitze nur Spuren von H<sub>2</sub>S. Es war zunächst überraschend, daß hier, wie auch in Milch, die unter der Einwirkung der darin vorhandenen und sich vermehrenden Mikroorganismen sauer wurde, nur geringste Mengen Schwefelwasserstoff zu finden waren, die unter denen blieben, die beim Kochen der Milch ohne Säurezusatz flüchtig waren.

Vorhandene Sulfhydrylgruppen werden im sauren Milieu offensichtlich nicht ohne weiteres in Schwefelwasserstoff übergeführt. Nach KAUFMANN u. BUDWIG<sup>3</sup> gibt ein beobachtetes Zusammenwirken von ungesättigten Fettsäuren und Mercaptoamino-säuren Hinweise dafür, daß eine lockere Bindung im Sinne einer Assoziation zwischen Fettsäure und Sulfhydrylgruppe bestehen kann. Dieses Verhalten erklärt auch die „lipotrope Tendenz“ des Cysteins. — Durch die Säure werden die Thiolgruppen anscheinend aus ihrer Assoziationsbindung gelöst und sind dann leicht einer Oxydation durch Luftsauerstoff zu Disulfidgruppen zugänglich. Hierauf ist eine Entbindung von Schwefelwasserstoff nicht mehr ohne weiteres möglich. Die Verhinderung der Freisetzung von flüchtigem Schwefel aus Milch durch Zusatz von Oxydationsmitteln — auch von Cystin —, die von TOWNLEY u. GOULD<sup>1</sup> beschrieben worden ist, dürfte gleichfalls so zu deuten sein. Vor allem ist zu erwarten, daß Cystin, besonders dann, wenn es aus dem Proteinverband gelöst ist, durch Anlagerung von Säure geschützt ist. Bekanntlich sind Verbindungen wie „Cysteinhydrochlorid“ recht beständig.

Der hier mitgeteilte Gehalt an *Sulfatschwefel* stellt einen Durchschnittswert dar, der sich aus den Ergebnissen mehrerer Bestimmungsmethoden ergibt.

### Beschreibung der Versuche

Die Untersuchungen erfolgten an Kuhmilch, die als Durchschnittsgemerk des Morgens von sechs gesunden Rindern aus dem gleichen Gutshof stammte. Der größte Teil der Arbeiten beanspruchte die Sommermonate, eine Zeit, in der die Rinder Grünfütterung erhielten.

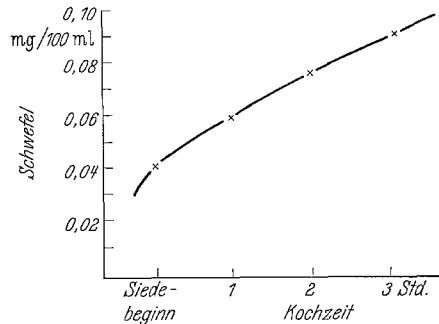


Abb. 1. Flüchtiger Schwefel beim Kochen von Milch

<sup>1</sup> TOWNLEY, R. G., u. J. A. GOULD: J. Dairy Soc. **26**, 689, 843, 853 (1943).

<sup>2</sup> DIEMAIR, W., R. STROHECKER u. H. KELLER: Z. analyt. Chem. **116**, 385 (1939).

<sup>3</sup> KAUFMANN, H. P., u. J. BUDWIG: Fette u. Seifen **54**, 156 (1952).

Die Methoden, nach denen der *Gesamtschwefel*, der *mineralisch gebundene Schwefel* und die *schwefelhaltigen Aminosäuren* bestimmt wurden, sind in Mitteilung 1<sup>1</sup> beschrieben. In Mitteilung 2<sup>1</sup> ist dargelegt, wie die Salzsäurehydrolyse und in Mitteilung 3<sup>1</sup>, wie die Jodwasserstoffhydrolyse angeordnet waren.

Bei der Ermittlung des *Schwefelwasserstoffes* wird durch 500–1500 ml Milch, die sich in einem Glasschliffkolben befinden, Stickstoff geleitet. Ein Abführrohr für das Gas ist mit zwei hintereinandergeschalteten Absorptionsgefäßen verbunden, die jeweils mit etwa 10 ml einer wäßrigen Lösung, die 10% Cadmiumacetat und 10% Natriumacetat enthält, beschickt sind. Man entleert den Inhalt der Gefäße, der je nach der Menge des gebundenen Schwefelwasserstoffes mehr oder weniger stark gelb gefärbt ist, in einen Jodzählkolben und versetzt mit 10 ml einer 0,01 n-Jodeisessiglösung. Der Überschuß an Jod wird mit 0,01 n-Natriumthiosulfatlösung — gegen Reaktionsende unter Zusatz von 1 ml Stärkelösung (1%ig) — zurücktitriert.

$$\text{mg/100 ml Sulfidschwefel} = \frac{\text{ml der verbrauchten Jodeisessiglösung} \cdot 16}{\text{Menge der Untersuchungssubstanz in ml}}.$$

Zur Reinigung des Stickstoffs, der einer Bombe entnommen wird, dienen folgende drei Flüssigkeiten, die sich in hintereinandergeschalteten Waschflaschen befinden:

1. Alkalische Pyrogallollösung: 30 g Pyrogallol in etwas Wasser gelöst, zu 100 ml mit Wasser aufgefüllt und mit 0,25 ml 50%iger Natronlauge versetzt.

2. Silbernitratlösung: 0,01 n.

3. Bidestilliertes Wasser.

Die Bestimmung des *Sulfidschwefels* bei der Durchführung der Salzsäurehydrolyse ist in Mitteilung 4<sup>2</sup> beschrieben.

#### *Zusammenfassung*

Der Schwefelgehalt der Milch beträgt etwa 50 mg/100 ml. Es gelang, 95% des Schwefels in sechs verschiedenen Anteilen zu erfassen. Es ist bemerkenswert, daß 60% des gesamten Schwefels bzw. 75% des Proteinschwefels als Schwefelanteil des Methionins vorliegen.

Das Auffinden von „flüchtigem“ Schwefel unter verschiedenen Versuchsbedingungen wird beschrieben, sein Entstehen wird diskutiert.

## Lebensmittel als Ionenaustauscher

### *V. Mitteilung<sup>3</sup>*

### Über das Schicksal von Kaliumbromat und Kaliumnitrat bei der Lab- und Säuregerinnung von Milch und im Tilsiterkäse

Von

FRIEDRICH KIERMEIER und KLAUS DENTLER\*

*Mitteilung aus dem Chemischen und Physikalischen Institut der Süddeutschen Versuchs-  
und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan*

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Dezember 1956)

Die Anwendung von Kaliumbromat und Kaliumnitrat bzw. einer Mischung beider Salze in der Käserei als „Hilfsstoffe“ gegen Fehlgärungen ist heute vielfach üblich. Diese Tatsache hat uns zunächst angeregt, mit Caseinsuspensionen Modellversuche

<sup>1</sup> SPRINGER, R., u. K. E. QUENTIN: Zit. S. 387, Anm. \*.

<sup>2</sup> SPRINGER, R., u. R. WOLLER: Zit. S. 387, Anm. \*.

<sup>3</sup> Vgl. die vorangegangenen Mitteilungen in dieser Z.: **94**, 221 (1952); **95**, 85 (1952); **97**, 271 (1953).

\* Die Arbeit stellt einen Ausschnitt aus der Dissertation von K. DENTLER dar: Kaliumnitrat und Kaliumbromat als „Hilfsstoffe“ in der Käserei. Technische Hochschule München 1956.