

يعد الحليب الغذاء الأكثر اكتمالاً من الناحية الغذائية في الطبيعة. تحتوي جميع أنواع الحليب، سواء كان بشرياً أو حيوانياً، على فيتامينات (بشكل رئيسي الثيامين، والريبوفلافين، وحمض البانتوثينيك، وفيتامينات أ، ب12، ود)، ومعادن (الكالسيوم، والبوتاسيوم، والصوديوم، والفوسفور، وعناصر نادرة)، وبروتينات (مظمها كازين)، وكربوهيدرات (بشكل رئيسي اللاكتوز)، ودهون. ومع ذلك، تختلف كميات هذه العناصر الغذائية الموجودة في أنواع الحليب المختلفة اختلافاً كبيراً. حليب الأبقار وحليب الماعز متطابقان تقريباً من جميع النواحي. يحتوي حليب الأم على أقل من نصف البروتينات والمعادن الموجودة في حليب الأبقار أو الماعز، ولكنه يحتوي على ما يقرب من 1.5 ضعف كمية السكر.

Experiment 6: Isolation of casein from milk and its evaluation

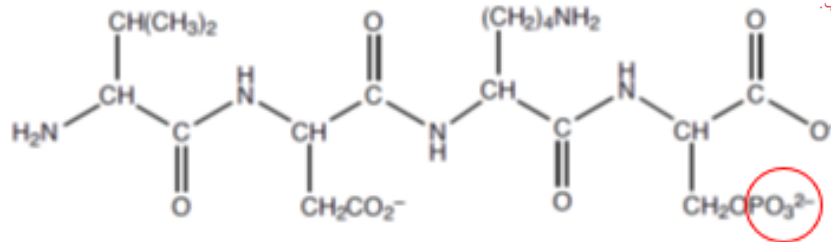
Introduction:

Milk is the most nutritionally complete food found in nature. All kinds of milk, human or animal, contain vitamins (principally thiamine, riboflavin, pantothenic acid, and vitamins A, B₁₂, and D), minerals (calcium, potassium, sodium, phosphorus, and trace metals), proteins (mostly casein), carbohydrates (principally lactose), and lipids (fats). The amounts of these nutrients present in different types of milk differ greatly, however. Cows' milk and goats' milk are almost identical in every respect. Human milk contains less than half of the proteins and minerals of cows' or goats' milk, but almost 1.5 times as much sugar.

Casein, the main protein in mammalian milk, is a phosphoprotein, meaning that phosphate groups are attached to the hydroxyl groups of some of the amino acid side-chains. Casein exists in milk as the calcium salt, calcium caseinate.

- The negatively charged phosphate groups are balanced by positive calcium ions and are responsible for the high nutritional calcium content in milk.

يتم موازنة مجموعات الفوسفات سالبة الشحنة بواسطة أيونات الكالسيوم الموجبة وهي المسؤولة عن المحتوى الغذائي العالي من الكالسيوم في حليب.

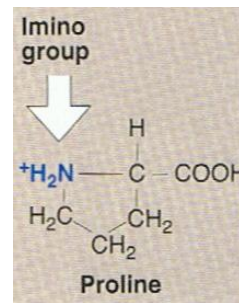


توجد جميع الأحماض الأمينية الأساسية تقريباً في بروتين الكازين بنسبة عالية.

- Almost all essential amino acids are found in casein protein in high proportion.
- It contains a fairly high number of proline residues, which do not interact. There are also no disulfide bridges. As a result, it has relatively little tertiary structure.
- Amino group of proline is found in a ring (imino group) preventing free rotation and thus limiting the formation of tertiary structure.

< يحتوي على عدد كبير نسبياً من بقايا البرولين، والتي لا تتفاعل مع مجموعة الإيمينو. كما لا توجد جسور ثنائية الكبريتيد، ونتيجة لذلك، فإنه يحتوي على بنية ثانوية قليلة نسبياً.

توجد مجموعة الأمينو للبرولين في حلقة (مجموعة إيمينو) HN مما يمنع الدوران الحر وبالتالي يحد من تكوين بنية البرولين الثالثية



كازينات الكالسيوم هي في الواقع خليط من ثلاثة بروتينات متشابهة على الأقل تختلف بشكل أساسي في الوزن الجزيئي وكمية مجموعات الفوسفور التي تحتوي عليها.

Calcium caseinate is actually a mixture of at least three similar proteins which differ primarily in molecular weight and the amount of phosphorus groups they contain.

- 1 - Alpha- and beta-casein have molecular weights in the 25,000 range and possess about 9 and 4-5 phosphate groups per molecule, respectively. They are both insoluble in water.

يبلغ الوزن الجزيئي لبروتين ألفا وبيتا كازين حوالي 25000 ويحتويان على حوالي 9 و4-5 مجموعات فوسفات لكل جزيء، على التوالي. كلاهما غير قابل للذوبان في الماء.

يبلغ الوزن الجزيئي لكابا-كازين حوالي 8000 ويحتوي على 2-1 مجموعة فوسفات لكل جزيء. وهو مسؤول عن إذابة نوعي الكازين الآخرين في الماء عن طريق تعزيز تكوين المذيلات.

- **Kappa-casein** has a molecular weight of about **8,000** and **possesses 1-2 phosphate groups per molecule**. It is **responsible** for **solubilizing the other two caseins in water** by promoting the formation of **micelles**.

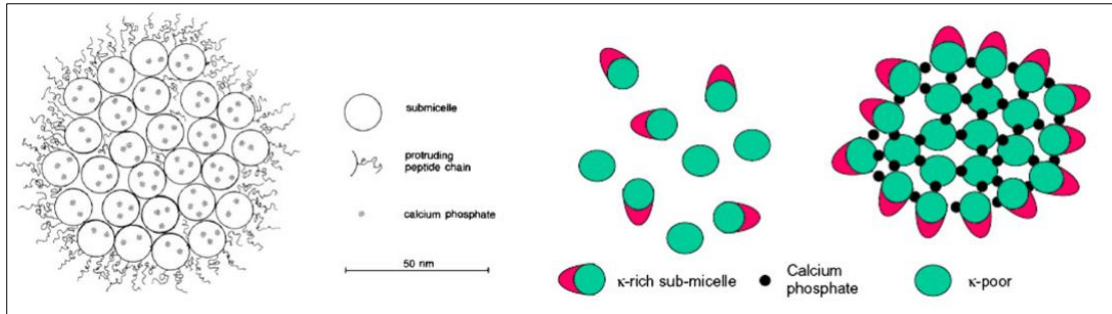
تظهر مذيلات الكازين تشابهاً محدوداً فقط مع مذيلات السطح من حيث أن الأجزاء المحبة للماء تقع على السطح وهي كروية الشكل. ومع ذلك، وعلى النقيض تماماً من مذيلات السطح، فإن الجزء الداخلي من مذيل الكازين يكون شديد الترطيب. ترتبط جزيئات الكازين في المذيلات معاً بواسطة أيونات الكالسيوم والتفاعلات الكارهة للماء.

suspension

Casein micelles show only limited resemblance with surfactant-type micelle in a sense that the hydrophilic parts reside at the surface and they are spherical. However, in sharp contrast to surfactant micelles, the interior of a casein micelle is highly hydrated. The caseins in the micelles are held together by calcium ions and hydrophobic interactions.

Casein micelles are considered as colloidal particles formed by casein aggregates wrapped up in soluble κ -casein molecules. The outer surface of the micelle are rich with κ -casein, has protruding hairs of negative charges which induce a steric repulsion between micelles, thus preventing them to coagulate and hence stabilizes the milk.

تعتبر ميسيلات الكازين جسيمات غروانية تتكون من تجمعات الكازين المغلفة بجزيئات كازين-K قابلة للذوبان. السطح الخارجي للميسيل غني بكازين-K، وله شعيرات بارزة من الشحنتات السالبة التي تحدث تناقضاً فراغياً بين الميسيلات، مما يمنعها من التكتل وبالتالي يُثبت الحليب.



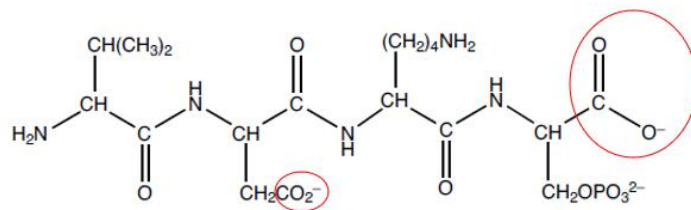
Casein and pH:

At high pH, casein will have a net negative charge due to ionization of its acidic side chains ($-\text{COO}^-$). Because casein is ionized at high pH values, it is soluble in dilute sodium hydroxide solution.

عند درجة حموضة عالية، يكون للكازين شحنة سالبة صافية بسبب تأين سلاسله الجانبية الحمضية (COO^-). ولأن الكازين يتأين عند قيم pH عالية، فإنه يذوب في محلول هيدروكسيد الصوديوم المخفف.

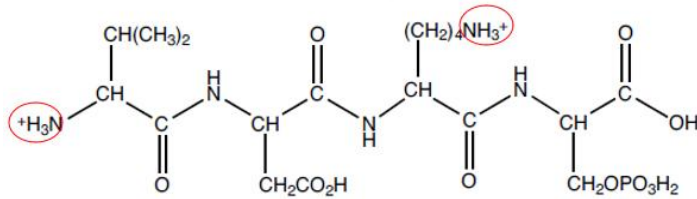
* Casein is readily dispersible in dilute alkalis and in salt solutions such as sodium oxalate and sodium acetate

* يتشتت الكازين بسهولة في القلويات المخففة وفي محاليل الأملاح مثل أكسالات الصوديوم وأستات الصوديوم



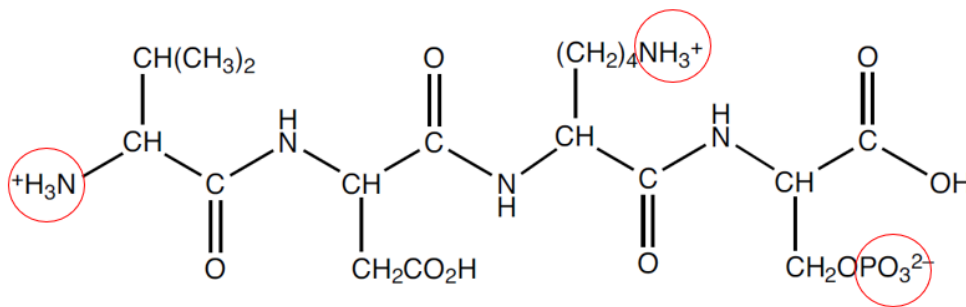
At low pH, casein will have a net positive charge due to protonation of its basic side chains ($-\text{NH}_3^+$). Because casein is ionized at low pH values, casein is also soluble in strongly acidic solutions.

عند درجة حموضة منخفضة، سيكون للكازين شحنة موجبة صافية بسبب بروتنة سلاسله الجانبية القاعدية ($-\text{NH}_3^+$). نظراً لأن الكازين يتأين عند قيم pH منخفضة، فإن الكازين يكون قابلاً للذوبان أيضاً في المحاليل الحمضية القوية.



عند قيم الأس الهيدروجيني المتوسطة، يحتوي الكازين على عدد متساو من المجموعات المشحونة إيجاباً وسلباً، ويكون صافي شحنة البروتين صفراً. الكازين غير قابل للذوبان في المحاليل المتعادلة لأنه غير مشحون في ظل هذه الظروف.

At intermediate pH values, casein will contain an equal number of positively and negatively charged groups and the protein will have a net charge of zero. Casein is insoluble in neutral solutions because it is not charged under these conditions.



عادةً ما تكون ذوبانية البروتين في أدنى مستوياتها عند نقطة التعادل الكهربائي (IP). تُعرف نقطة التعادل الكهربائي بأنها الرقم الهيدروجيني الذي تكون عنده الشحنة الصافية للبروتين صفراً. بالنسبة للكازين، نظراً لمجموعات الفوسفات المرتبطة به، فإن نقطة التعادل الكهربائي قريبة من الرقم الهيدروجيني = 4 (تتراوح من 4.6 إلى 4.8).

The solubility of a protein is usually at a minimum at its isoelectric point (IP). The isoelectric point is defined as the pH at which a protein has a net charge of zero. For casein, due to the attached phosphate groups, the isoelectric point is close to pH = 4 (ranges from 4.6-4.8).

Casein isolation:

بما أن درجة حموضة الحليب هي 6.6 (وهي أعلى من نقطة التعادل الكهربائي للكازين)، فإن الكازين يحمل شحنة سالبة في الحليب، مما يحدث تناقضاً فراغياً بين المذيلات، وبالتالي يمنعها من التخثر، ومن ثم يثبت الحليب.

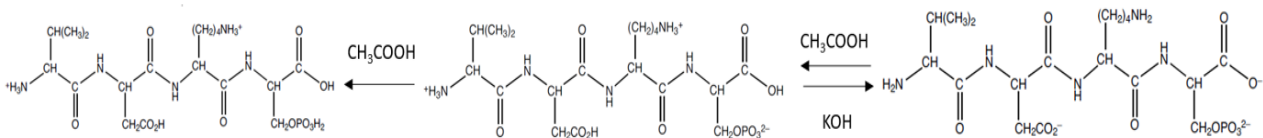
Since milk's pH is 6.6 (which is higher than the isoelectric point of casein), so casein has a negative charge in milk; which induce a steric repulsion between micelles, thus preventing them from coagulation and hence stabilizes the milk.

To precipitate the casein → acetic acid is added dropwise until the isoelectric point is reached.

Note: if excess CH₃COOH is added the precipitate redissolves.

لترسيب الكازين، يُضاف حمض الاسيتيك قطرة قطرة حتى الوصول إلى نقطة التعادل الكهربائي.

ملاحظة: إذا أُضيف فائض من CH₃COOH، فإن الراسب يذوب مرة أخرى.



Casein is insoluble in ethanol which is a property used to isolate it from the unwanted fat.

Unlike many proteins, casein is not coagulated by heat

الكازين غير قابل للذوبان في الإيثانول، وهي خاصية تُستخدم لعزله عن الدهون غير المرغوب فيها. على عكس العديد من البروتينات، لا يتخثر الكازين بالحرارة

Casein has many uses including:

1. Paint الطلاء

طلاء الكازين مادة سريعة الجفاف وقابلة للذوبان في الماء، استخدمها الفنانون منذ عهد المصريين القدماء كنوع من أنواع طلاء التمبرا، وكان يستخدم على نطاق واسع من قبل الرسامين التجاريين كمادة مفضلة حتى أواخر الستينيات، عندما أصبح الكازين أقل شيوعاً مع ظهور طلاء الأكريليك.

Casein paint is a fast-drying, water-soluble medium used by artists since ancient Egyptian times as a form of tempera paint, and was widely used by commercial illustrators as the material of choice until the late 1960s when, with the advent of acrylic paint, casein became less popular.

2. Glue الغراء

كانت المواد اللاصقة القائمة على الكازين، والمصنوعة من الكازين والماء والجير المطفاً وهيدروكسيد الصوديوم، شائعة في أعمال النجارة، بما في ذلك صناعة الطائرات.

Casein-based glues, formulated from casein, water, hydrated lime and sodium hydroxide were popular for woodworking, including for aircraft.

3. Cheese making: صناعة الجبن:

يتكون الجبن من البروتينات والدهون الموجودة في الحليب، وعادةً ما يكون حليب الأبقار أو الجاموس أو الأغنام. ويتم إنتاجه عن طريق تخثر الكازين. عادةً ما يتم حميض الحليب ثم تخثيره بإضافة المنفحة، التي تحتوي على إنزيم محلل للبروتين، ويتم الحصول عليها عادةً من معدة العجول. يتم فصل المواد الصلبة وضغطها للحصول على شكلها النهائي.

Cheese consists of proteins and fat from milk, usually the milk of cows, buffalo, goats, or sheep. It is produced by coagulation of casein. Typically, the milk is acidified and then coagulated by the addition of rennet, containing a proteolytic enzyme, typically obtained from the stomachs of calves. The solids are separated and pressed into final form.



During the process of clotting, milk-clotting proteases act on the soluble portion of the caseins, κ -casein, thus originating an unstable micellar state that results in clot formation. When coagulated with chymosin, casein is sometimes called paracasein. **Chymosin** is an aspartic protease that specifically hydrolyzes the peptide bond in Phe105-Met106 of κ -casein, and is considered to be the most efficient protease for the cheese-making industry. **Calf rennet**, which consists of over 90% chymosin, is commonly used in cheese industries for the curdling of milk.



أثناء عملية التخثر، تعمل بروتيازات تخثر الحليب على الجزء القابل للذوبان من الكازين، كازين-K، مما يؤدي إلى حالة ميسيلية غير مستقرة ينتج عنها تكوين الجلطة. عند تخثره بواسطة الكيموسين، يُطلق على الكازين أحياناً اسم باراكازين. الكيموسين هو بروتياز أسبارتيك يقوم على وجه التحديد بتحليل الرابطة الببتيدية في Phe105-Met106 من كازين-K، ويُعتبر البروتياز الأكثر كفاءة لصناعة الجبن. يُستخدم منفحة العجل، التي تتكون من أكثر من 90% من الكيموسين، بشكل شائع في صناعات الجبن لتخثير الحليب.

يحتوي حليب البقر على العديد من البروتينات. الكازين هو أحد البروتينات الرئيسية - حوالي 80%. عند إزالة الكازين من الحليب، تُعرف البروتينات المتبقية باسم بروتينات مصل اللبن (20%). مصل اللبن مادة مائية (مصل الحليب). يتكون من العديد من البروتينات الكروية (بيتا لكتوغلوبولين، ألفا لكتالبرومين). لا يمتلك الكازين بنية ثلاثية جيدة. علاوة على ذلك، يحتوي مصل اللبن على اللاكتوز والفيتامينات والمعادن على عكس الكازين.

من ناحية أخرى، يستخدم المصطلح البريطاني مصطلح كازينوجين للبروتين غير المتخثر وكازين للبروتين المتخثر. كما هو موجود في الحليب، فهو ملح للكالسيوم.

British terminology, on the other hand, uses the term **caseinogen** for the **uncoagulated protein** and **casein** for the **coagulated protein**. As it exists in milk, it is a salt of calcium.

Cow's milk contains several proteins. Casein is one of the major proteins -around 80%. When casein is removed from milk, the remaining proteins are known as wey proteins (20%). Wey is a watery substance (milk serum). It consists of several globular proteins (beta lactoglobulin, alpha lactalbumin). Casein doesn't have a good tertiary structure. Further wey contains lactose, vitamins and minerals in contrast to casein.

4. Protein supplement مكمل بروتيني

من الخصائص الجذابة لجزيء الكازين قدرته على تكوين هلام أو جلطة في المعدة، مما يجعله فعالاً للغاية في إمداد العناصر الغذائية. تستطيع الجلطة توفير إطلاق بطيء ومستدام للأحماض الأمينية في مجرى الدم، يستمر أحياناً لعدة ساعات. غالباً ما يتوفر الكازين على شكل كازين متحلل، حيث يتم تحلله بواسطة بروتياز مثل التربسين. يلاحظ أن الأشكال المتحللة لها طعم مر، وغالباً ما يرفض الرضع وحيوانات المختبر هذه المكملات لصالح الكازين السليم

An attractive property of the casein molecule is its **ability to form a gel or clot in the stomach**, which makes it very **efficient in nutrient supply**. The **clot is able to provide a sustained slow release of amino acids into the blood stream**, sometimes **lasting for several hours**. Often casein is available as **hydrolyzed casein**, whereby it is **hydrolysed** by a **protease** such as **trypsin**. **Hydrolysed forms** are noted to taste bitter and **such supplements are often refused by infants and lab animals** in favour of intact casein



Procedure:

Material:

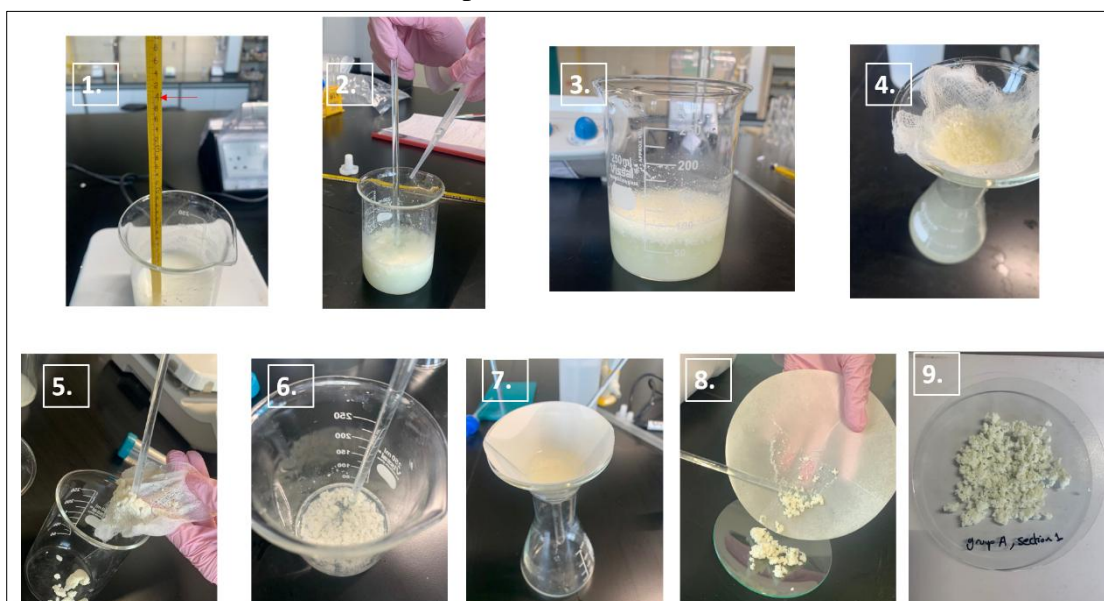
1. 100 mL of Milk (10% w/v)
2. Acetic acid (CH_3COOH) (10% v/v), dropper.
3. Ethanol (95% v/v) (flammable)
4. Diethyl ether (highly flammable)
5. Thermometer 100°C (ethanol or mercury thermometer).
6. Hot plate.
7. Graduated cylinder.
8. Beaker.
9. Volumetric flask.
10. funnel
11. Spatula.
12. Glass rod.
13. Muslin cloth
14. Filter paper
15. Watch glass.

YouTube link:

<https://www.youtube.com/watch?v=Agc4S5hTb6g>

Method:

1. Weigh an empty 250 ml beaker, then place 100 ml of milk and weigh the milk
2. warm the milk to 40°C on a hot plate.



3. Once temperature is reached, remove the beaker containing milk from the hot plate and start adding acetic acid slowly (drop by drop) to the milk while stirring with a stirring rod. Mixing should be performed slowly, rapid mixing will dissolve the precipitate.

Note: never transfer the acetic acid all at once.

4. keep adding acetic acid drop by drop until milk clots starts to form and the casein is precipitated (~2 ml CH_3COOH). This point means that you have reached a pH of 4.6-4.8.



Your result from step 4 should look like **image 1**. If you got a result that looks like image 2, this means you have passed the isoelectric point and need to repeat the experiment again. Ask your instructor to provide you with milk to repeat the experiment again.

5. Leave to stand for 5 min and filter/decant through muslin cloth (you may need to wait for 10-15 minutes for the filtration to be completed).
6. Collect the casein precipitate and transfer into a beaker using spatula. And suspend the precipitate in 50 ml mixture of equal volume of **ethanol and ether** (1:1), mix by glass rod so that the extra fat may come down to the solvent system. Note: Be very careful not to spill the precipitate.

Important Notes

When using Ethanol: ether AVOID INHALATION! Perform all operations in a certified chemical fume hood, and a ventilated area. AVOID CONTACT! Make sure to wear goggles and protective gloves and a face mask.

عند استخدام الإيثانول: الإيثر، تجنب الاستنشاق! قم بإجراء جميع العمليات في خزانة تهوية كيميائية معتمدة، وفي منطقة جيدة التهوية. تجنب التلامس! تأكد من ارتداء نظارات واقية وقفازات واقية وقناع للوجه

- filter the precipitate again using filter paper. Wait until the solution is totally filtered.
- Once all the solvent has been removed from casein. Remove the powder and spread out on a watch glass (or petri dish, weighing boat) until it is completely dry (usually overnight).

Note: label your watch glass/weighing boat with your group name and section number.

- Weigh your sample and calculate the percent yield you obtained

$$\%casein = \frac{\text{gram casien}}{\text{grams of milk}} \times 100$$

$$\%casein = \frac{5}{105} \times 100$$

$$\% casein = 4.7\%$$

Normal Range 3-5 %, depending on the type of milk:

NUTRITION INFORMATION		
	Servings Per Pack: 5 Serving Size: 200ml	
	Per Serving	Per 100ml
Energy	92 kcal (386 kJ)	46 kcal (193 kJ)
Protein	6.8 g	3.4 g
Total Fat	2.4 g	1.2 g
-Saturated Fat	1.6 g	0.8 g
-Trans Fat	0.0 g	0.0 g
Cholesterol	8 mg	4 mg
Carbohydrate	11.0 g	5.5 g
Dietary Fibre	0.0 g	0.0 g
Sodium	100 mg	50 mg
Calcium	260 mg	130 mg
Vitamin A	300 mcg	150 mcg
Thiamine (Vitamin B1)	0.50 mg	0.25 mg
Vitamin D3	4 mcg	2 mcg

25% lower in saturated fat and higher in calcium as compared to regular milk.

NUTRITION FACTS (AVERAGE PER 100 ML)	
Energy	36.5 kcal / 152.4 kJ
Fat	0.3 g
Protein	3.3 g
Carbohydrate	4.7 g
Calcium	100 mg