



# Spontane Lipolyse in Rohmilch

Ernst Jakob

Milchwirtsch. Tagung, 5. Februar 2018

Zentrum Liebegg, Gränichen

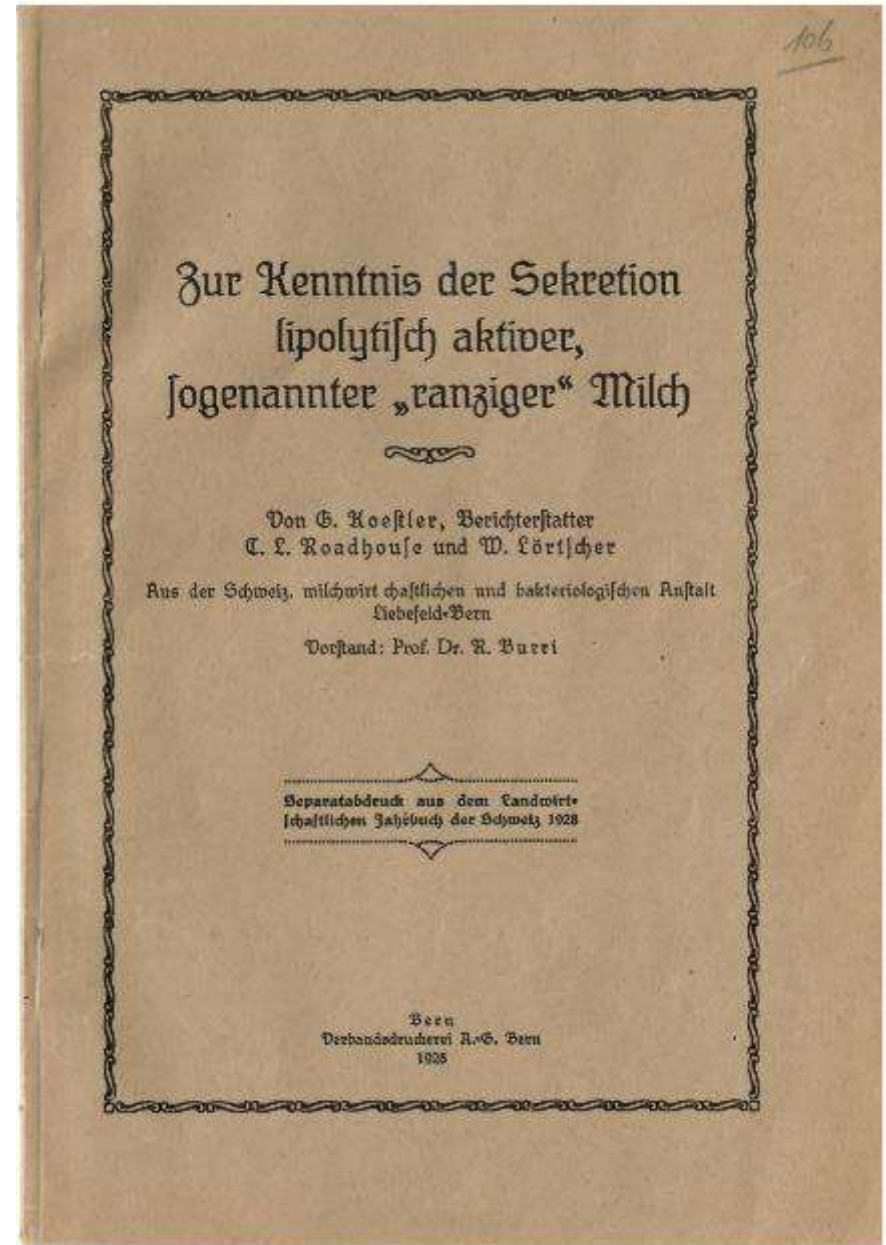


# Inhalt

- Bedeutung der Lipolyse für Milch und Milchprodukte
- Lipasen in der Milch
- Lipolysetypen (spontan, induziert, mikrobielle)
  - Induzierte Lipolyse
  - Spontane Lipolyse
- Einflussfaktoren auf die spontane Lipolyse
  - Jahreszeit
  - Fütterung
  - Rasse, Tageszeit
  - Laktationsstadiums, Trächtigkeit
  - Hormonbehandlungen
  - Genetische Einflussfaktoren
- Bedeutung für die Käseherstellung
- Lipolyse in Lieferantenmilch (Erste Ergebnisse Suisselab)

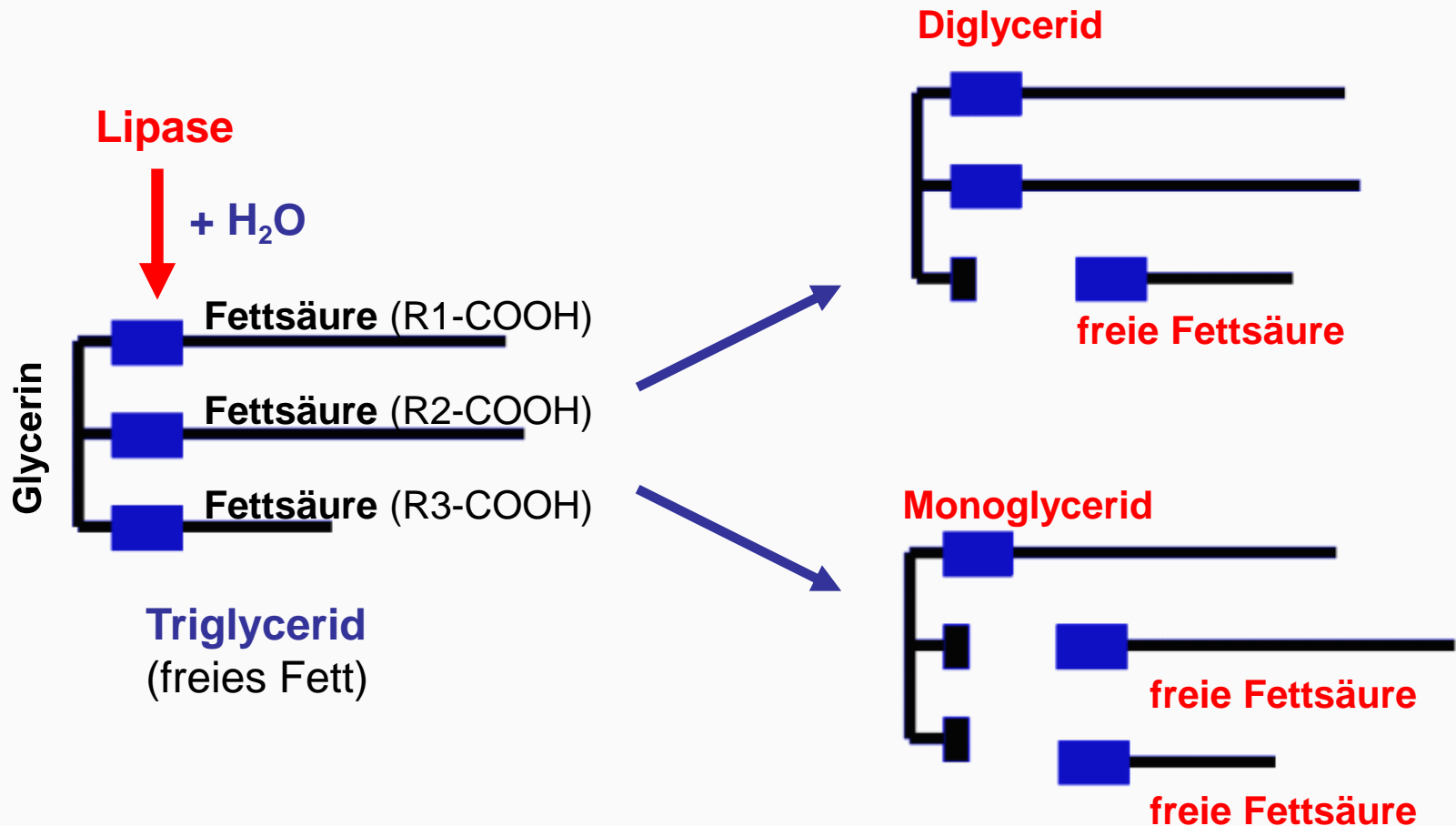


# Eine altes Thema



Publikation von 1928

# Lipolyse, die enzymatische Spaltung des Fettes



**Buttersäure wird bevorzugt freigesetzt!**

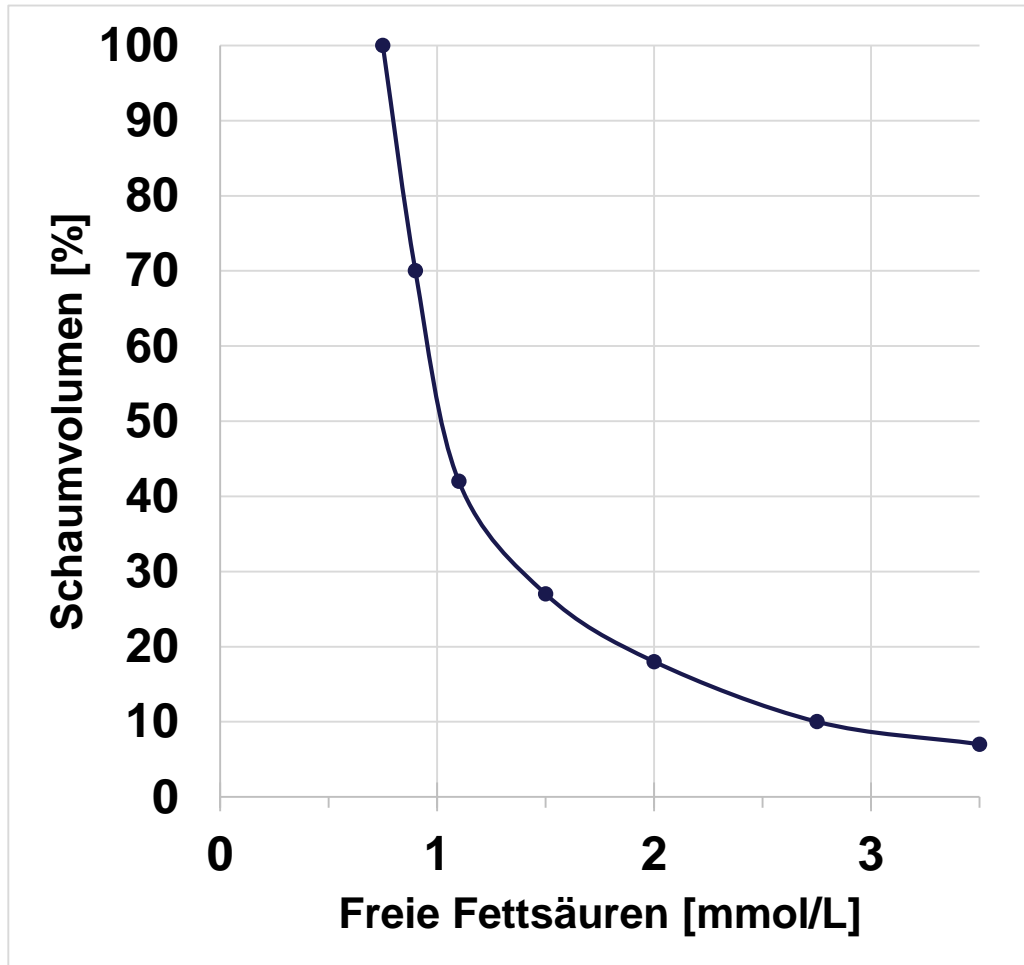


# Einfluss der FFS die Qualität von Milch und Milchprodukten

Produkt	Effekt
Milch	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ranziges Aroma &amp; Kratzen im Hals (Off-Flavour)</li><li>• Schlechte Aufschäumbarkeit</li></ul>
Rahm	<ul style="list-style-type: none"><li>• Off-Flavour</li><li>• Vermindertes Aufschlagvolumen</li><li>• Zu hoher Säuregrad im Butterfett (Deklassierung)</li></ul>
Butter	<ul style="list-style-type: none"><li>• Off-Flavour</li><li>• Zu hoher Säuregrad im Butterfett (→ keine Tafelbutter wenn FFS &gt; 12 mmol/kg)</li></ul>
Käse	<ul style="list-style-type: none"><li>• Off-Flavour</li></ul>



# Einfluss der FFS auf das Schaumbildungsvermögen der Milch



Anforderungen CNIEL F  
<0.36 mmol/kg Milch  
(Cu-Seifenmethode)

Schaumbildungsvermögen: Schaumvolumen in % des Schaumvolumens der Ausgangsmilch

Quelle: Deeth (2006)

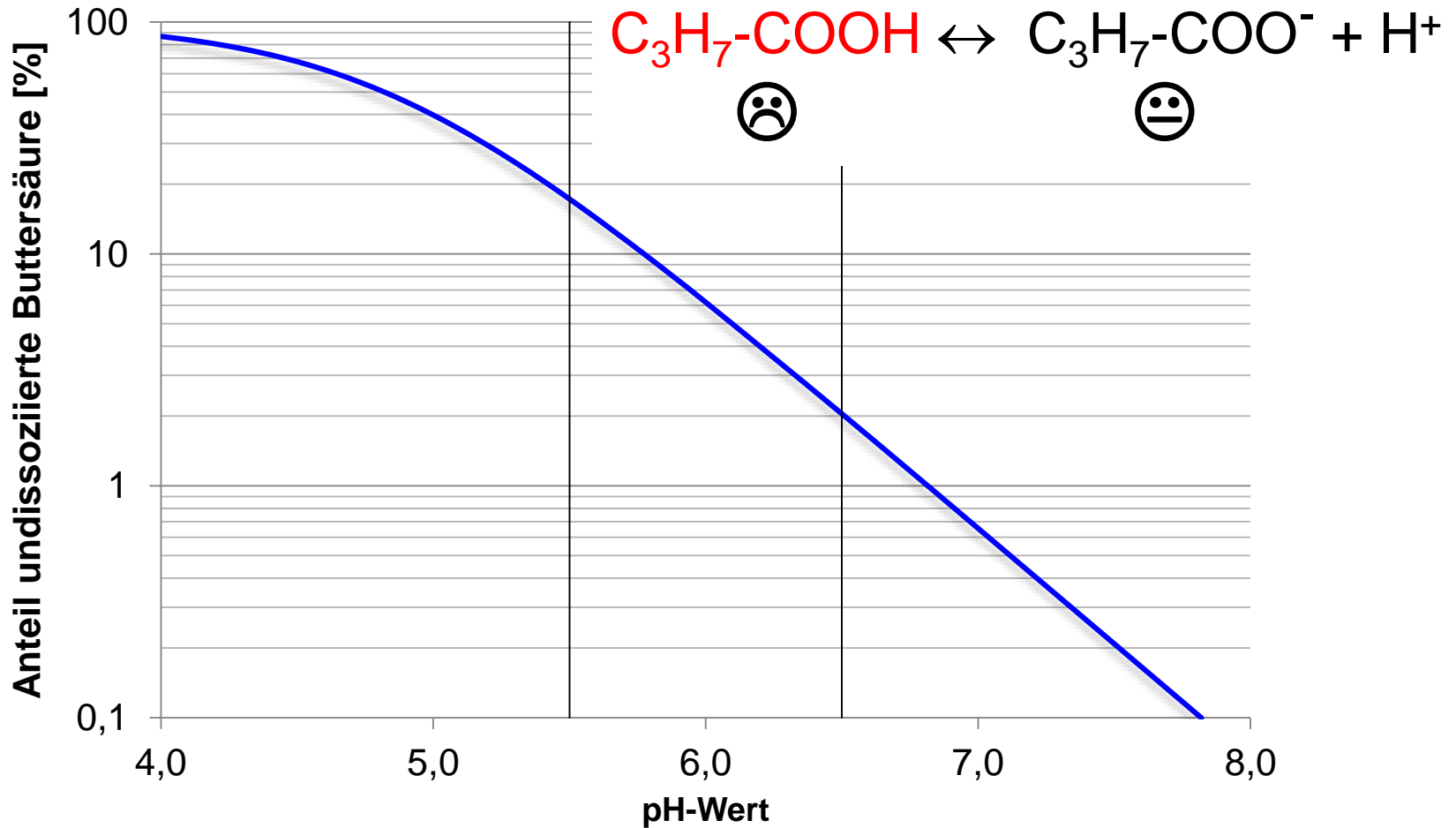
# Sensorische Wahrnehmung von freien Fettsäuren in Milch

	Schwellenwert in Pastmilch*
FFA	1.25 - 2.5 meq/100 g Milchfett
FFA	0.5 - 1.0 mmol/L Milch

\* Quelle: Wiking, 2005. Dissertation Universität Uppsala

Toleranzwert AFR: 0.34 mmol/kg

# Einfluss des pHs auf die sensorische Wahrnehmung von Buttersäure







# Lipasen in der Rohmilch

## 1. die milcheigene Lipoproteinlipase LPL

- Die LPL sorgt, gebunden an die Zellen, für die Freisetzung von FFS aus den im Blut zirkulierenden Fettkörperchen und deren Übergabe an die Zellen
- Rohmilch enthält genug Lipase, um alles Milchfett zu spalten (2-3 mg/L), trotzdem ist Lipolyse in der Regel minimal:
  1. Fettkügelchenhülle schützt vor Angriff der LPL
  2. LPL und Milchfett liegen in frischer Milch von einander getrennt vor (LPL in frischer Milch an Casein gebunden)
  3. In der Milch mangelt es an LPL-Aktivatoren (im Blut sind es v.a. Lipoproteine)
  4. Milch enthält Substanzen, welche die LPL inhibieren (FFA, Proteosepeptide, ev. auch Kupfer)



# Lipasen in der Rohmilch

## 1. die milcheigene Lipoproteinlipase LPL

### Gehalt in der Milch

- Kuhmilch 2.96  $\mu\text{g/mL}$
- Ziegenmilch 9.40  $\mu\text{g/mL}$
- Schafmilch 2.87  $\mu\text{g/mL}$
- Konzentration erhöht gegen Ende Laktation und bei erhöhter Zellzahl

### Eigenschaften

- Temperaturoptimum 33-37°C
- pH-Optimum pH 8.5
- Hitzestabilität: 72°C/15s: Restaktivität <5%
- Hitzestabilität: 78°C/10s: Vollständige Inaktivierung



# Lipasen in der Rohmilch

## 2. Mikrobielle Lipasen

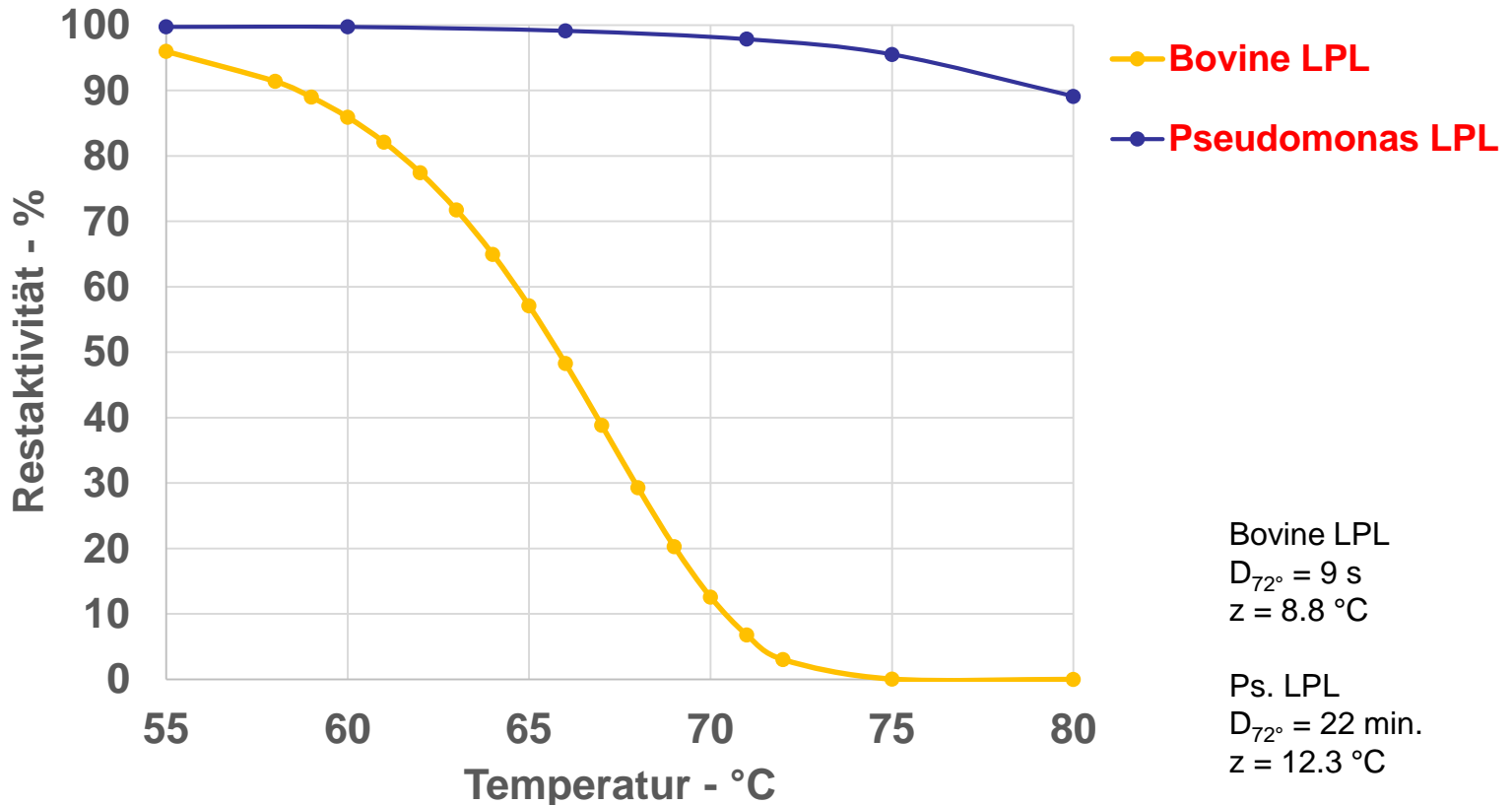
### Mikrobielle Lipasen

- Pseudomonaden, Bacillus spp.; Hefen
- Aktivität der mikrobiellen Lipase in der Milch ist abhängig von der Keimzahl der Lipolyten und Lagerdauer
- Fettkügelchenmembran schützt nur beschränkt vor mikrobiellen Lipasen (Deeth, 2006)
- Wesentlich bessere Stabilität als LPL
- Hohe Hitzeresistenz



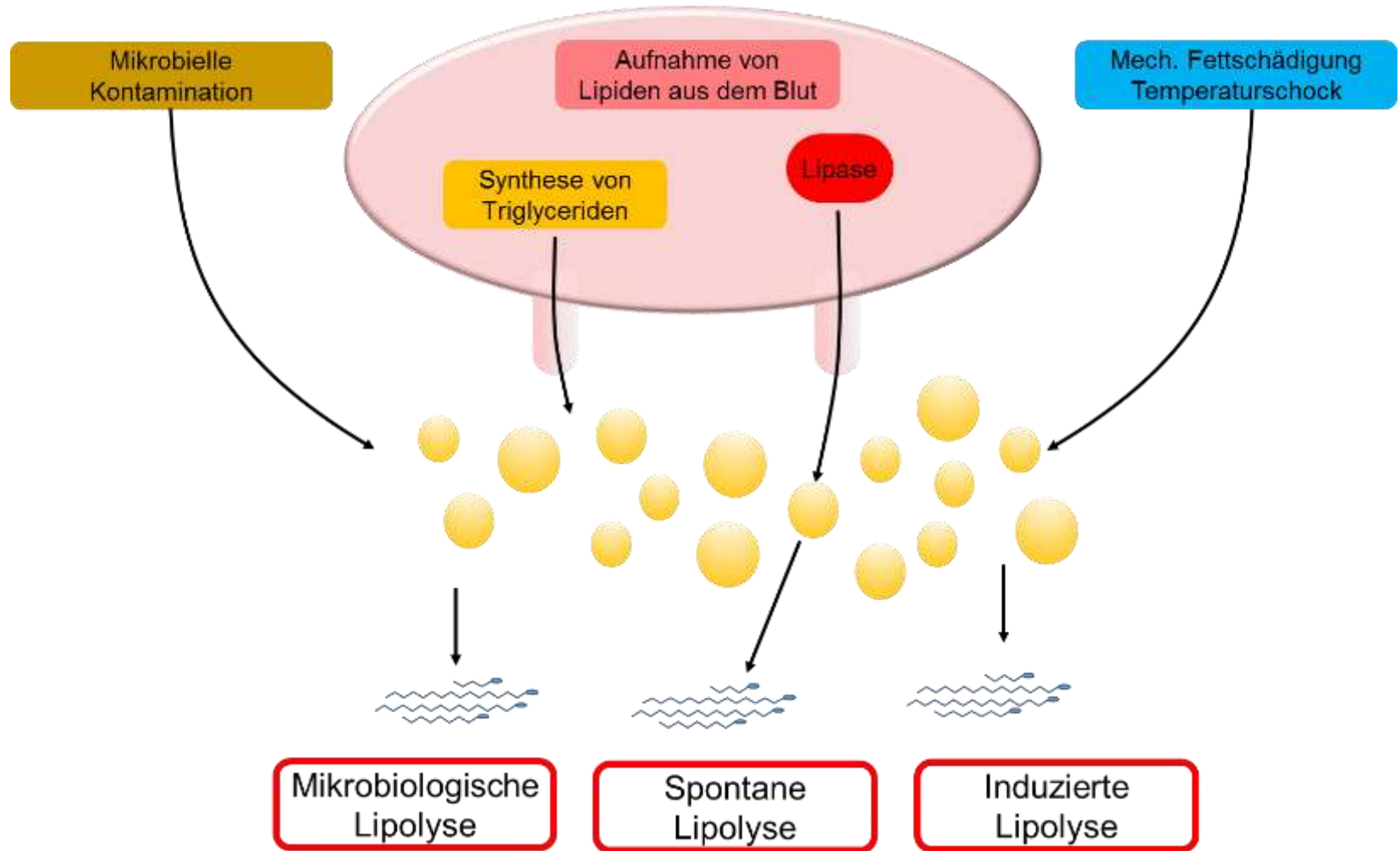
# Hitzestabilität von boviner und mikrobieller Lipoproteinlipase

Inaktivierung zweier Lipoproteinlipasen in Abhängigkeit von der Temperatur (Zeit=15 s)





# Die Lipolyse-Typen



Quelle: Heuchel & Chilliard (1988)



# Induzierte Lipolyse

## Mechanische Schädigung der Fettkügelchenmembran → freies Fett

### Im Milchproduktionsbetrieb

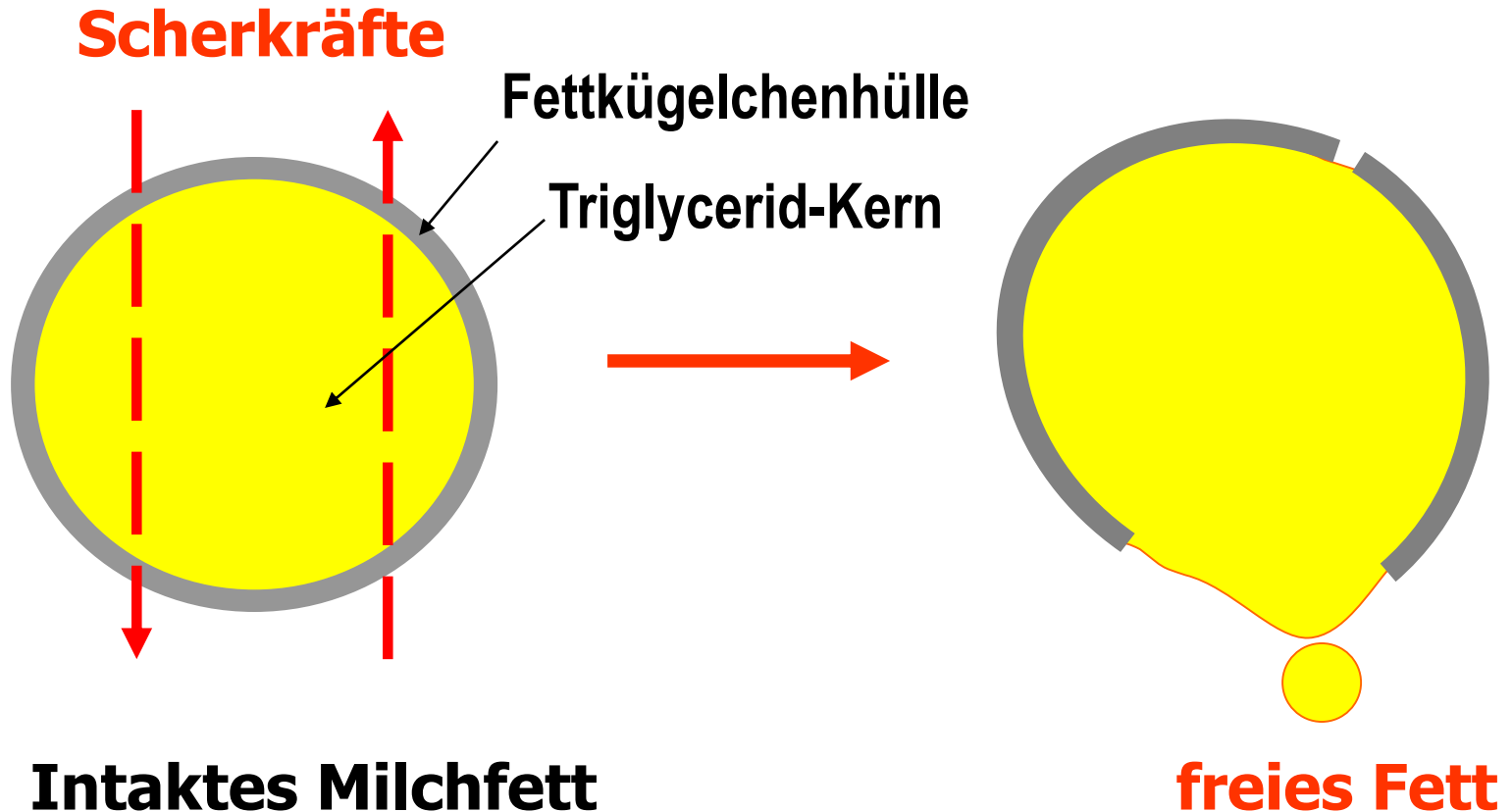
- Übermässiger Lufteinlass bei den Zitzenbechern, Stosswellen (**Schaumbildung**), senkrechte Rohrleitungen
- **Anfrieren** der Milch im Lagertank

### Im Milchverarbeitungsbetrieb

- **Pumpen**, besonders wenn Luft eingezogen wird
- Hohe Strömungsgeschwindigkeiten (Laminare Strömung → turbulente Strömung)
- Schaumbildung
- Vermischung von Rohmilch und homogenisierter Milch (z.B. Betriebskulturen mit UHT-Vollmilch)

**Temperaturwechsel 37 °C → <10° C → RT**

# Induktion der Lipolyse durch mechanische Fettschädigung



$\geq 35\text{ }^{\circ}\text{C}$

$>25-35\text{ }^{\circ}\text{C}$

$\geq 15-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

$<15\text{ }^{\circ}\text{C}$

$<10\text{ }^{\circ}\text{C}$

**Fettkugeltyp A**  
Hohe Formstabilität, Fettkugel beinhaltet einen flüssigen Fettkern  
Temperaturbereich: ab  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  -  $> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$

Das Fettkügelchen ist aufgrund des flüssigen Kernes mechanisch nahezu unempfindlich und deformierbar, Belastungen  $T_{xy}$ ,  $T_{xz}$ ,  $T_{zy}$  wirken und deformieren das Fettkügelchen, stabiler viskooser Bereich.



**Fettkugeltyp B**  
Formstabilität nimmt ab, erste Schicht unterhalb der Fettkugelmembran legt teilweise Kristallein vor  
Temperaturbereich:  $> 25 - 35\text{ }^{\circ}\text{C}$

Die Deformierbarkeit des Fettkügelchens nimmt ab, da Triglyceride sich ausbilden. Die Bildung von freiem Fett ist gering, da das Fettkügelchen aufgrund des flüssigen Kernes noch sehr formbar auf Scherbeanspruchung reagiert. Freies Fett dient als Kittsubstanz zur Bildung von Fettkügelagglomeraten. Leicht instabiler viskoelastischer Bereich.



**Fettkugeltyp C**  
Formstabilität am geringsten, da die Kristallisation der TAG zunimmt. Das System versprödet zunehmend. Die Dispersionsmatrix wird bei mechanischer Beschädigung oberhalb von  $\gamma_w$  zerstört.  
Temperaturbereich: ab  $15 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$

Vermehtes freies Fett dient als Kittsubstanz zur Bildung von Fettkügelagglomeraten. Da das Fettkügelchen empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen ist, aufgrund der dünnen kristallinen Schicht, kann viel freies Fett ausfließen. Instabiler kritischer Bereich. Nicht elastisch deformierbar.



**Fettkugeltyp D**  
Formstabilität nimmt wieder zu, da kristalline Schicht unterhalb der Fettkugelmembran sich vergrößert.  
Temperaturbereich:  $< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$

Freies Fett dient als Kittsubstanz zur Bildung von Fettkügelagglomeraten. Leicht instabiler viskoelastischer Bereich.



**Fettkugeltyp E**  
Formstabilität wieder hergestellt, da kristalline Schicht unterhalb der Fettkugelmembran am größten.  
Temperaturbereich:  $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$

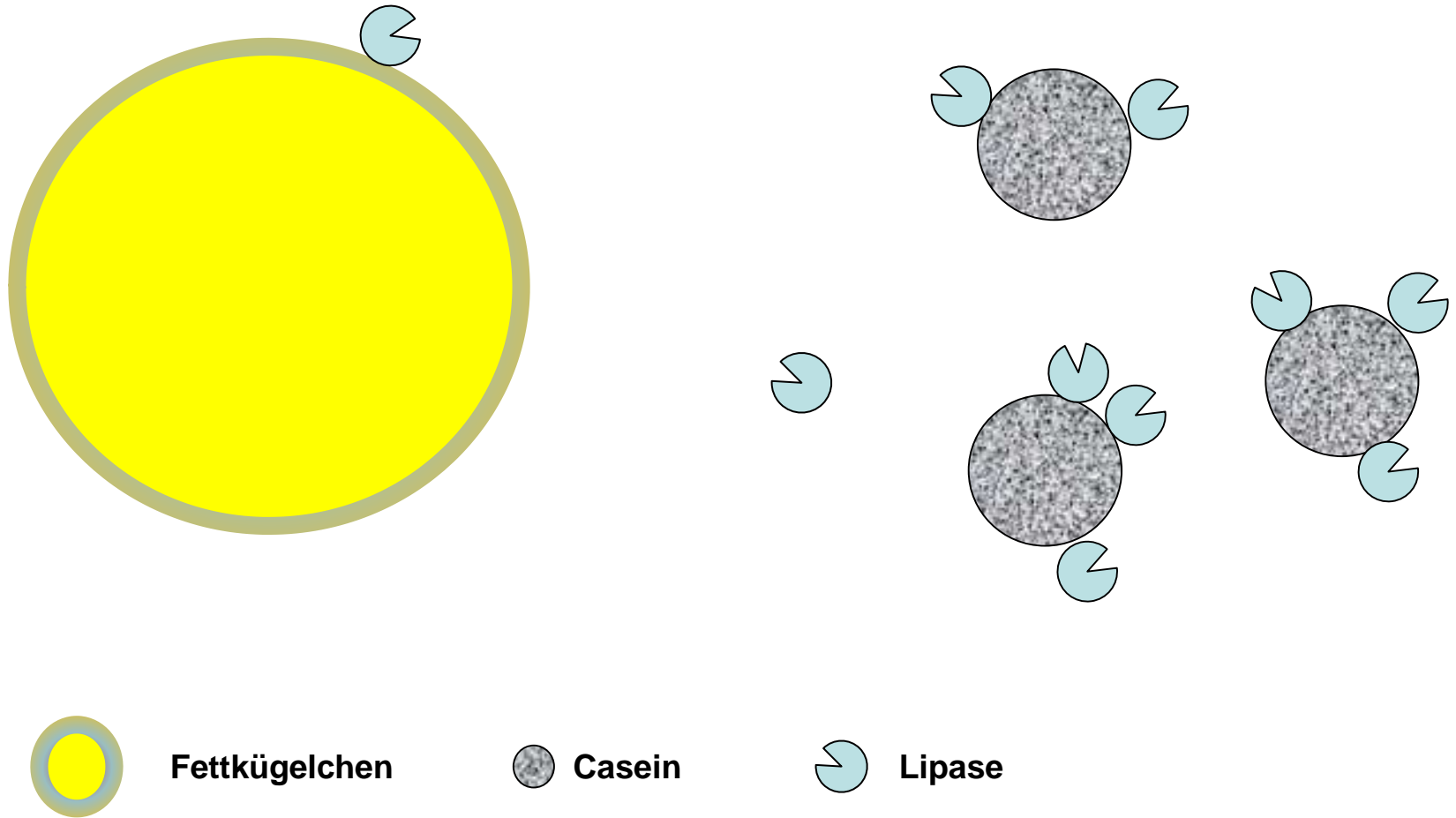
Das Fettkügelchen ist aufgrund der dicken und spröden kristallinen Schicht nahezu unempfindlich gegenüber Scherbeanspruchung. Die Fettkugelmembran kann durch Reibung zerstört werden, jedoch freies Fett kann nicht ausfließen, da es von der dicken schützenden kristallinen Schicht umgeben ist. Stabiler viskoelastischer Bereich.





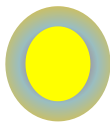
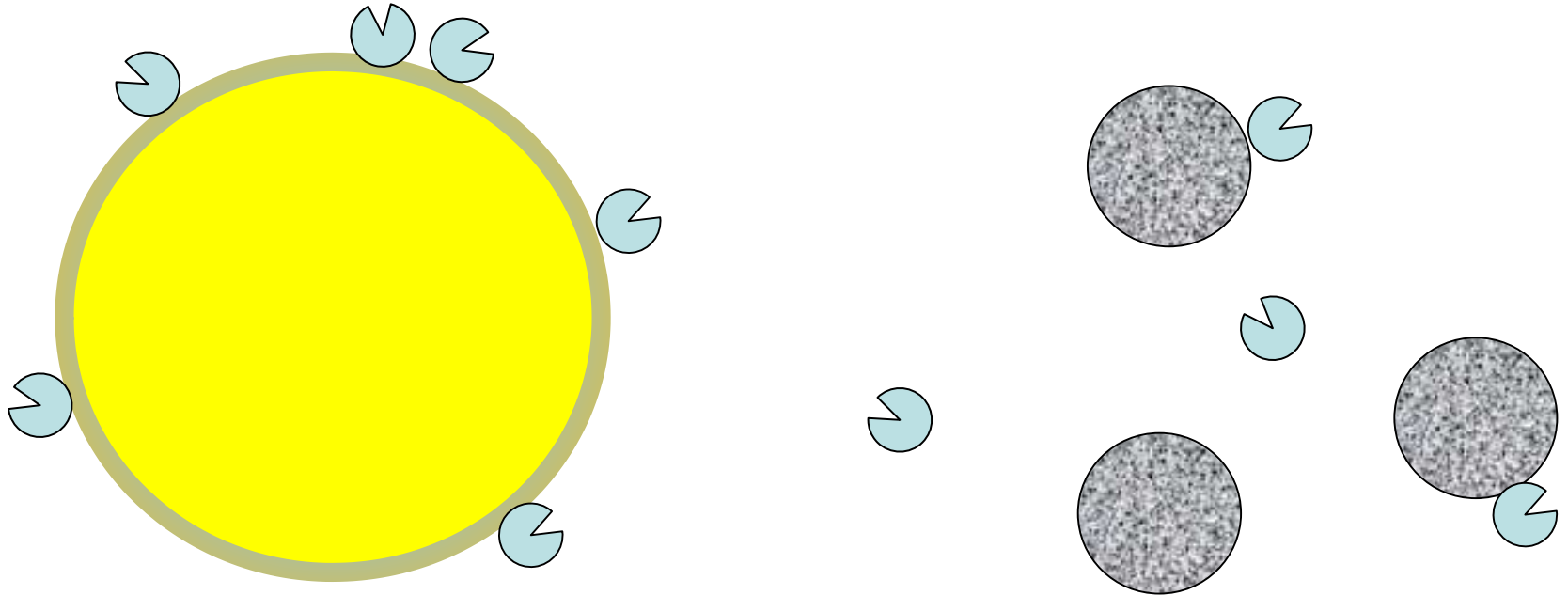
# Induktion der Lipolyse durch Kühlung

## Verteilung der Lipase in frisch gemolkener Milch



# Induktion der Lipolyse durch Kühlung

## Verteilung der Lipase nach Kühlung $<15^{\circ}$



Fettkügelchen



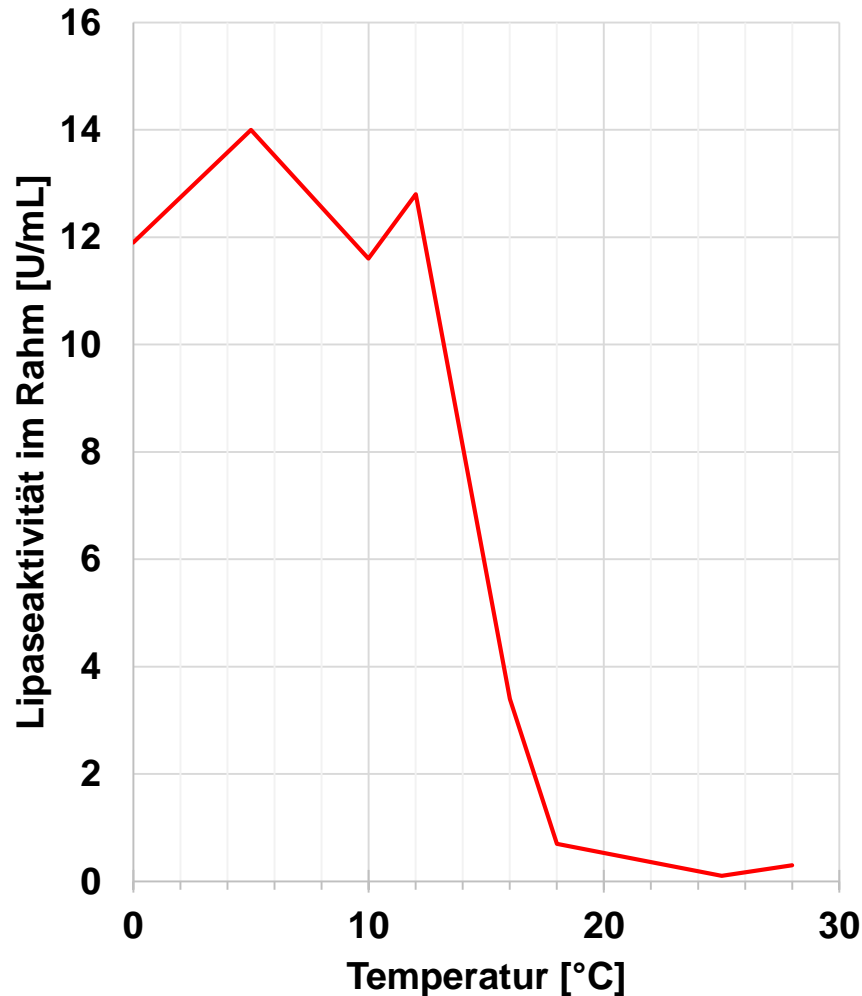
Casein



Lipase



# Einfluss der Temperatur auf die Verteilung der LPL zwischen Rahm und Magermilch



nach Sundheim et al., 1987



# Spontane Lipolyse

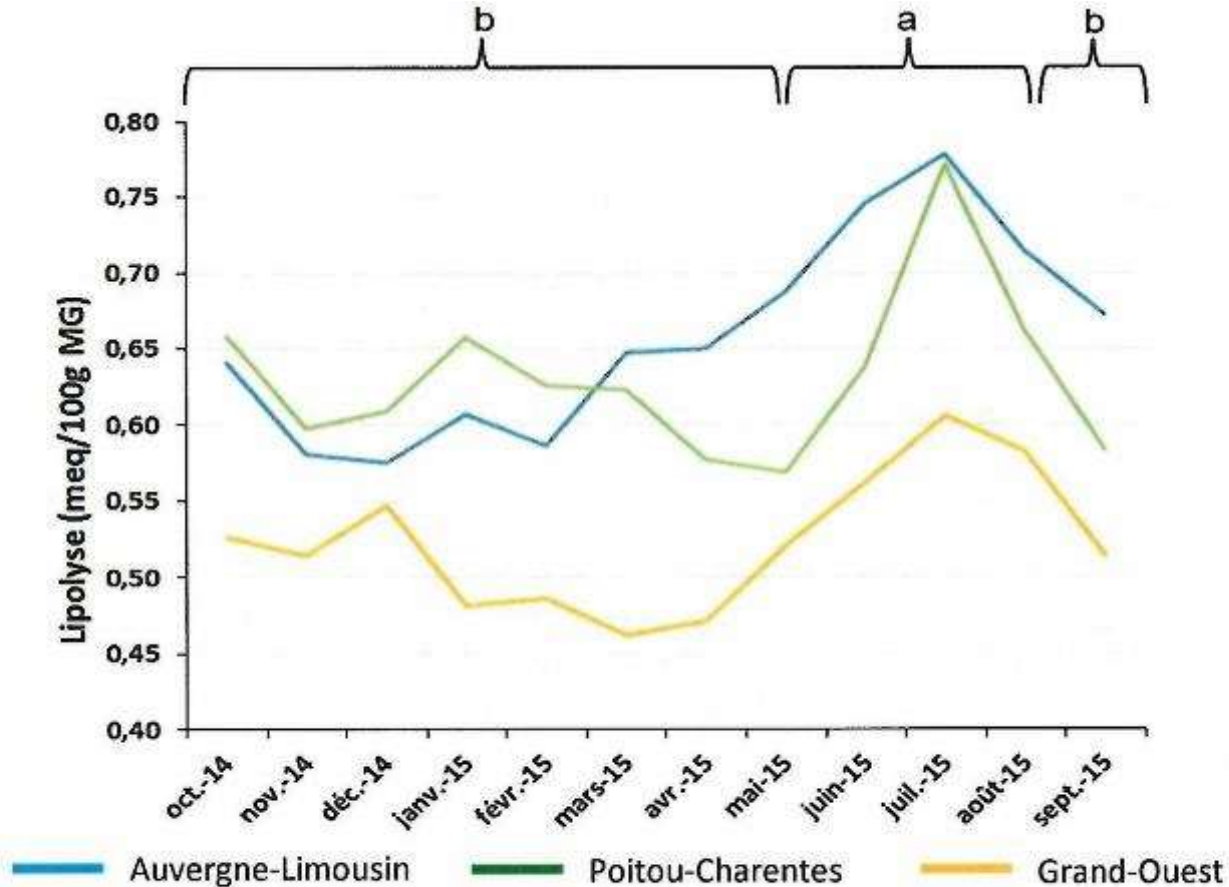
## Bekannte Einflussfaktoren

- Jahreszeit
- Fütterung
- Energieversorgung der Kuh
- Tageszeit
- Zwischenmelkzeit
- Laktationsstadium
- Geschlechtshormone
- Kuhrasse, Individuum

Einflussmechanismen nur teilweise geklärt



# Jahreszeitliche Schwankungen der Lipolyse in Lieferantenmilchproben (Frankreich)



**Figure 1** : Variations saisonnières de lipolyse (n=770). Les lettres a et b représentent des différences significatives au seuil de  $p < 0,05$ .  
*Vanbergue, 2017. Diss. Univ. Rennes / INRA*



# Spontane Lipolyse Einfluss der Fütterung

Elise Vanbergue, 2017. Diss. Univ. Rennes / INRA

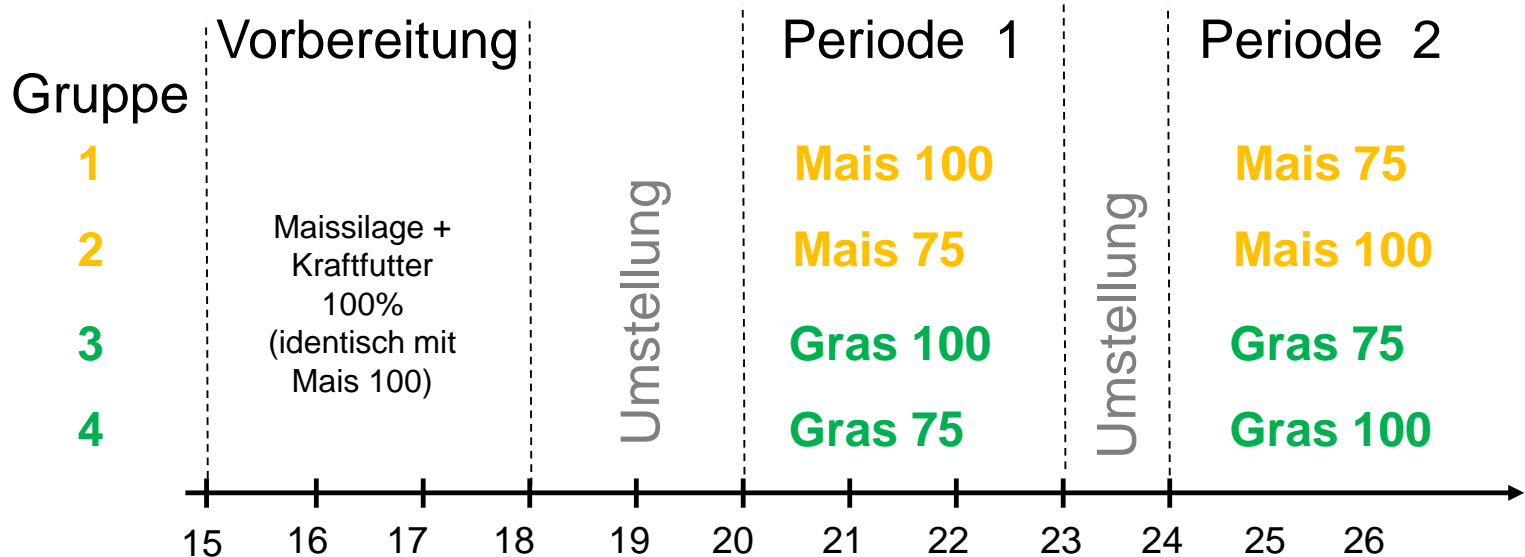
32 Kühe Holstein franz.

Bei Versuchsbeginn ca. 90 Tage in Laktation

4 Gruppen

Experiment unter Stallhaltung, ohne Weidegang

Gras 75: Grassilage 75% des ad libitum-Bedarfs



Probenahmen: Je 2 Proben (Abendgemelk + Morgengemelk) in Kontrollperiode und am Ende von Periode 1 und Periode 2



# Spontane Lipolyse Einfluss der Fütterung

Elise Vanbergue, 2017. Diss. Univ. Rennes / INRA

	Mais 100	Mais 75	Gras 100	Gras 75	Futter	Energie
Milchmenge - kg	34.4	30.2	32.3	27.8	0.015	<0.001
Fett - %	3.31	3.45	3.76	3.75	0.002	n.s.
Protein - %	3.01	2.89	3.07	2.93	n.s.	<0.001
Lipase mU/mL	MM 818 AM 815	819 831	786 784	804 813	n.s. n.s.	n.s. n.s.
Lipolyse 0-24h mEqu/100g Fett	MM 0.35 AM 0.68	0.46 0.86	0.17 0.51	0.25 0.90	<0.001 n.s.	0.004 <0.001

Mais 100: Maissilage + Krafftutter, Energie = 100% des ad libitum-Bedarfs

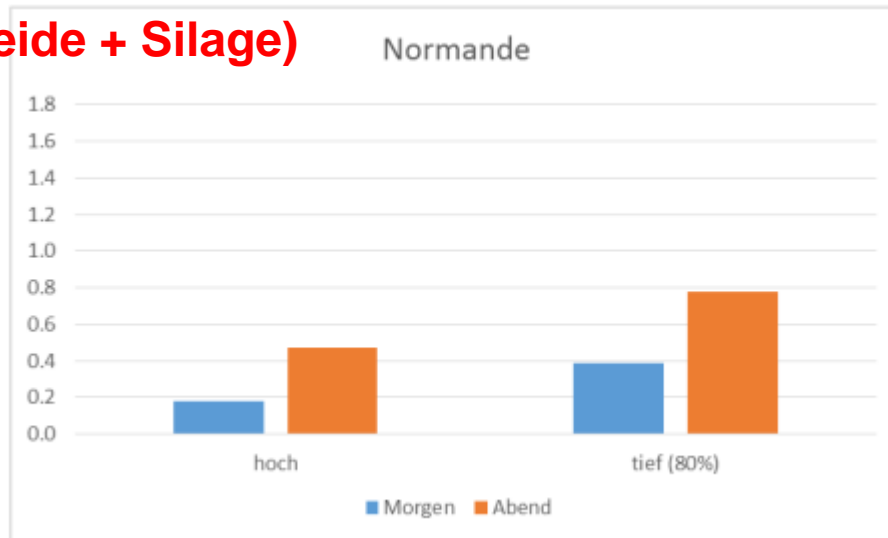
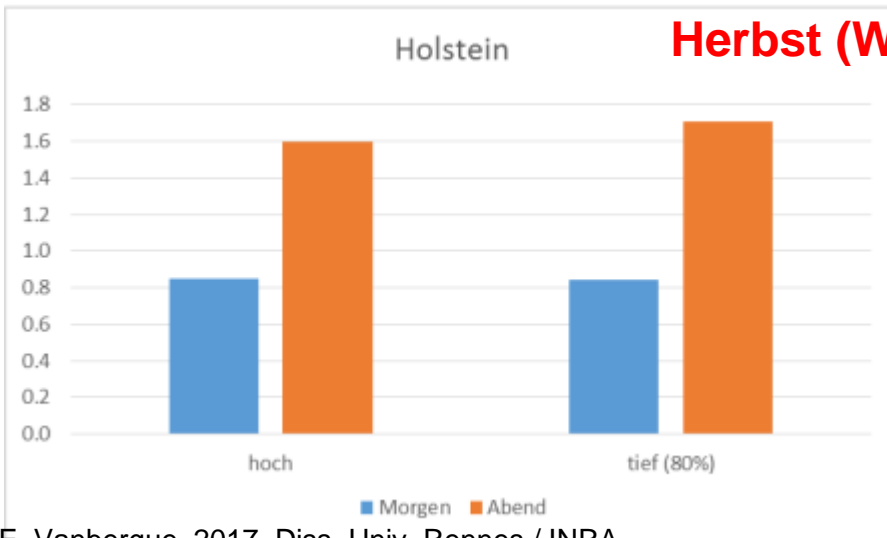
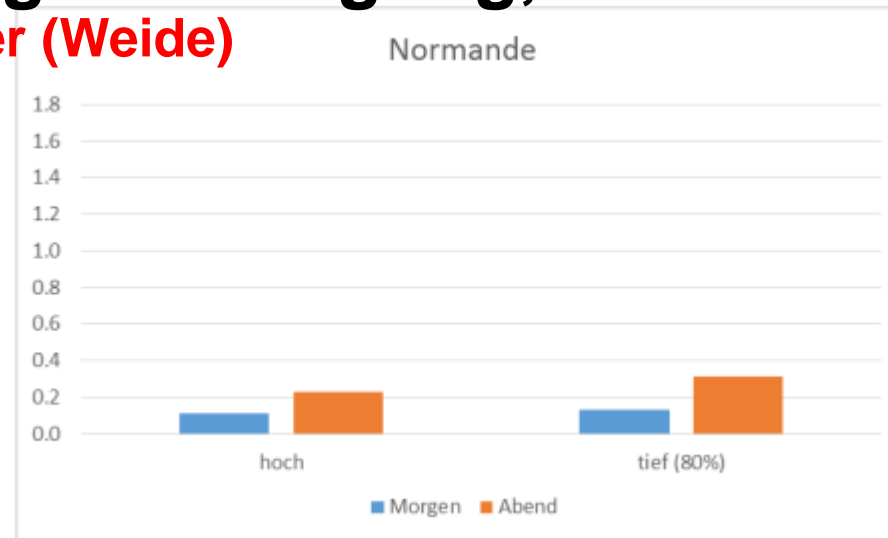
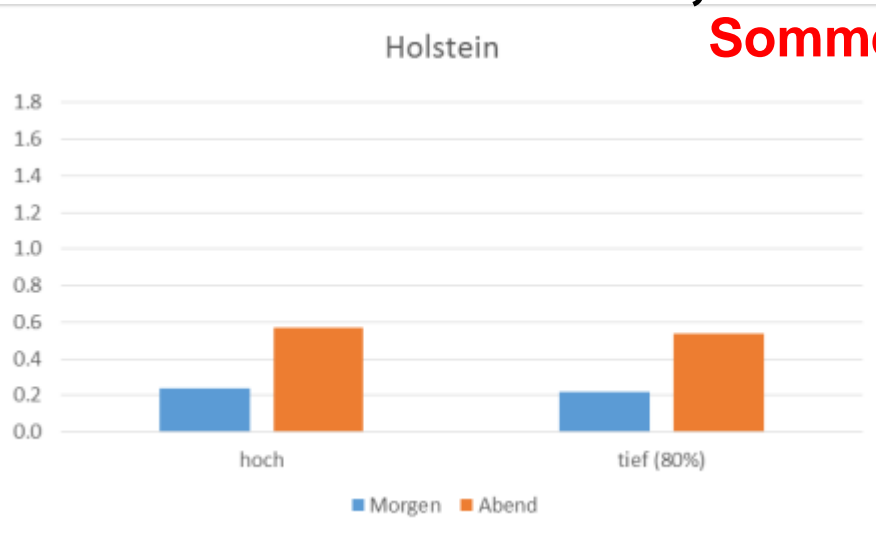
Mais 75: Maissilage + Krafftutter, Energie = 75% des ad libitum-Bedarfs

Gras 100: Grassilage + Krafftutter, Energie = 100% des ad libitum-Bedarfs

Gras 75: Grassilage + Krafftutter, Energie = 75% des ad libitum-Bedarfs

# Spontane Lipolyse

## Einfluss Rasse, Energieversorgung, Saison

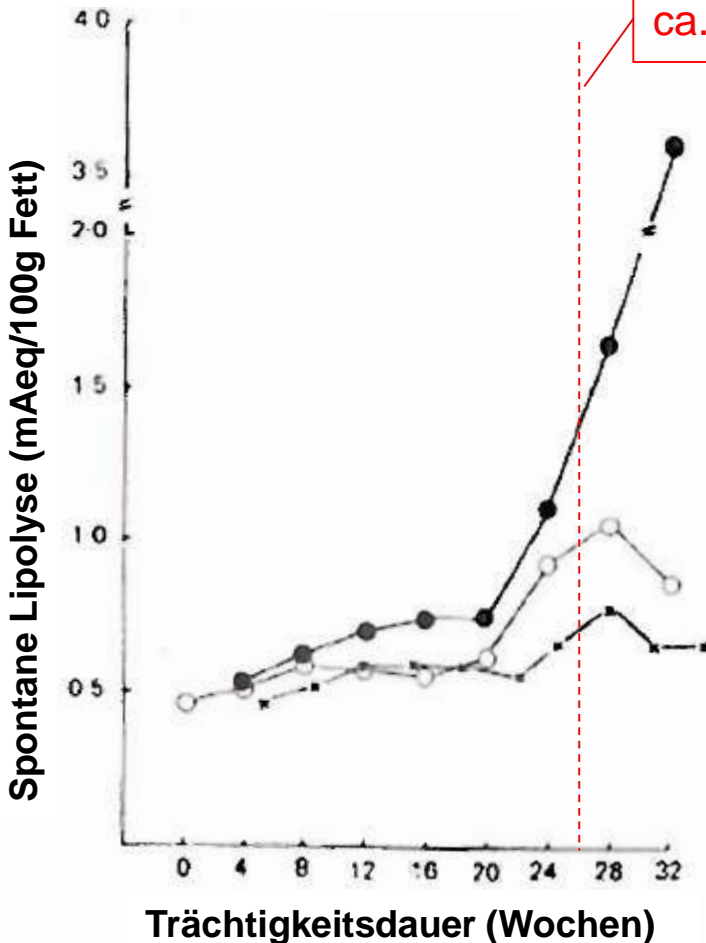


E. Vanbergue, 2017, Diss. Univ. Rennes / INRA





# Einfluss der Trächtigkeitsdauer auf die spontane Lipolyse



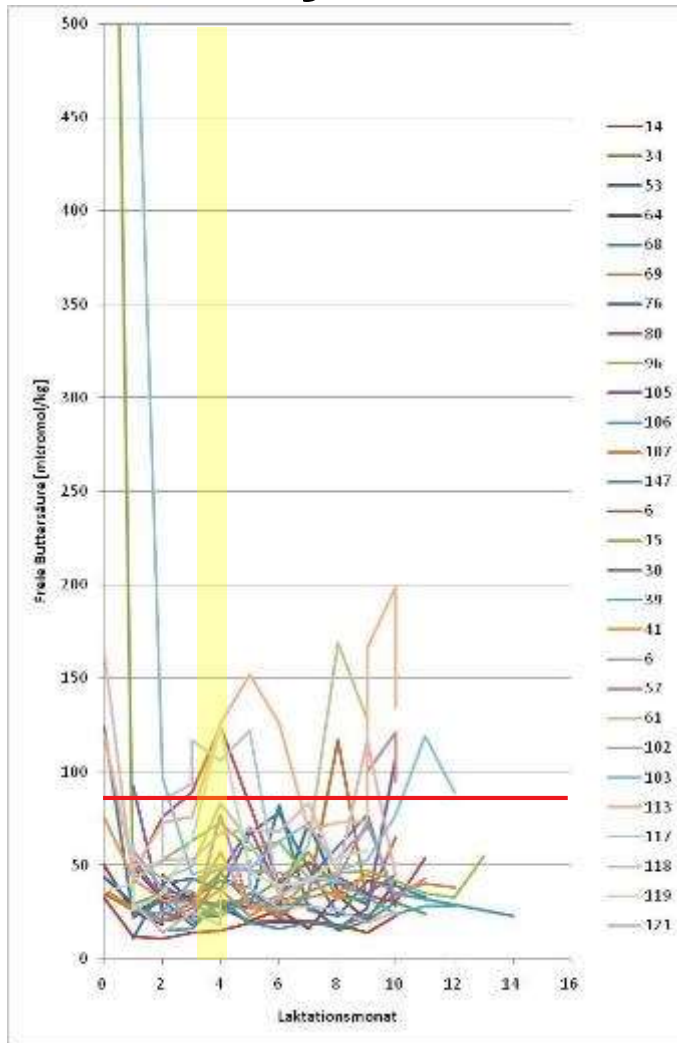
ca. 9 Monate in Laktation

- 18 Kühe Aug.-Sept. trocken gestellt
- 23 Kühe Juni-Juli trocken gestellt
- x 12 Kühe nicht trächtig geworden

Chazal & Chilliard, 1986



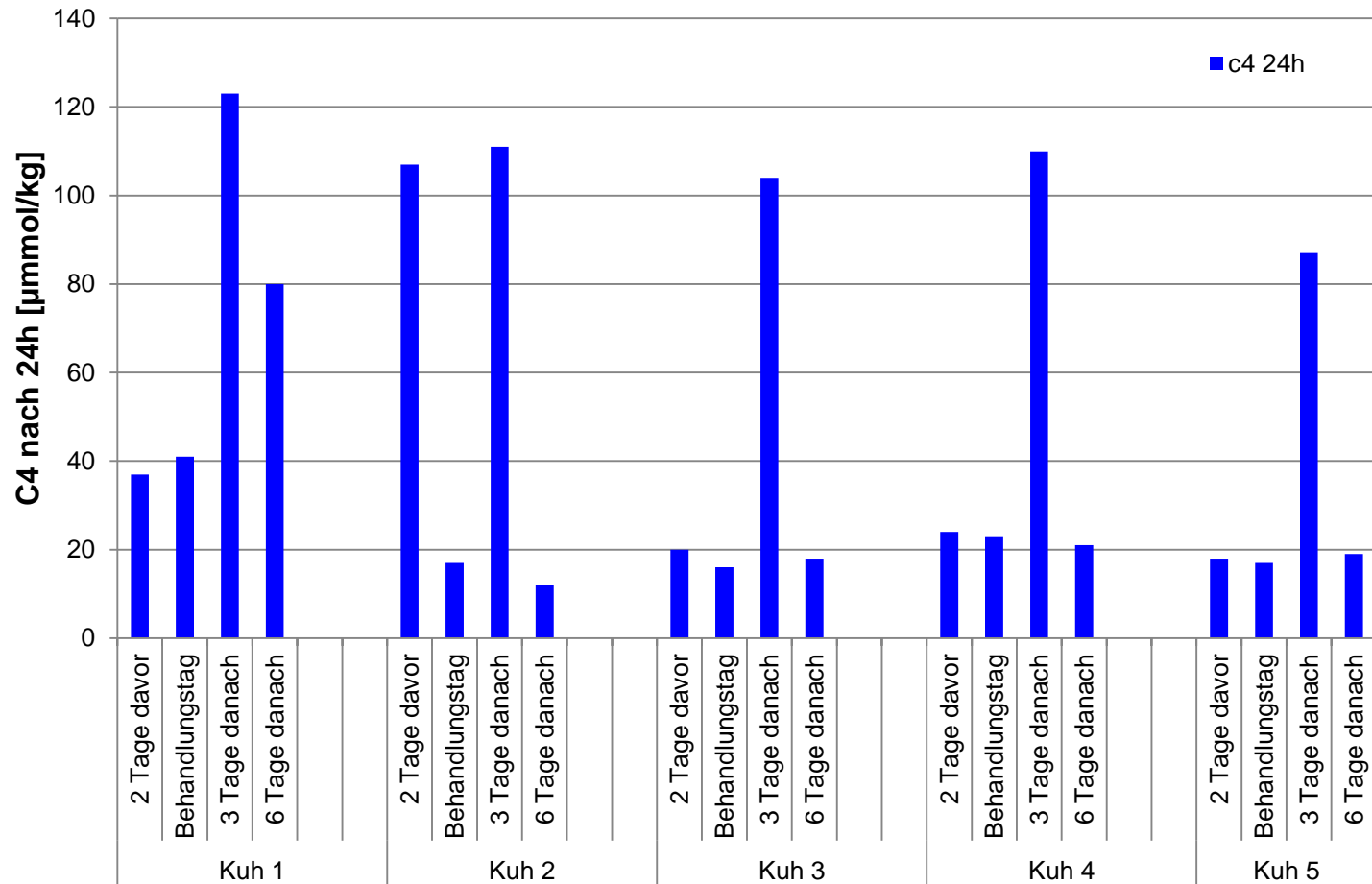
# Einfluss des Laktationsstadiums und des Brunstzyklus auf die Lipolyse in Milch



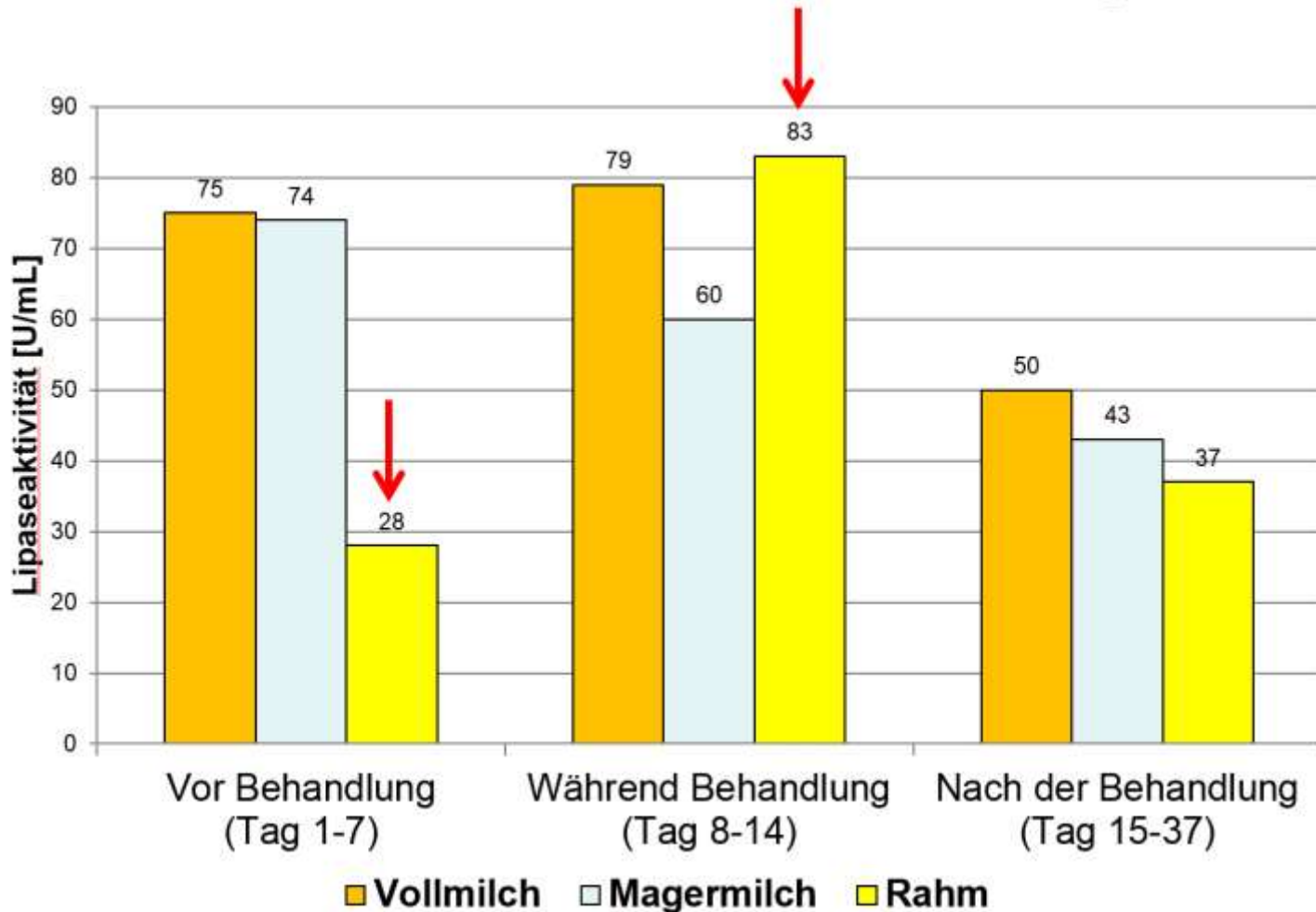
## Versuch von Agroscope

- Grosse Unterschiede zwischen den Tieren
- Extrem hohe Werte kommen vor allem in den ersten 30 Tagen der Laktation vor
- Häufig kleiner Peak im Umfeld der Brunst (ca. 90 d)
- Vermehrt zu hohe Lipaseaktivität auch gegen Ende der Laktation

# Einfluss der Hormonbehandlung zur Brunstinduktion auf die Fettspaltung in der Milch



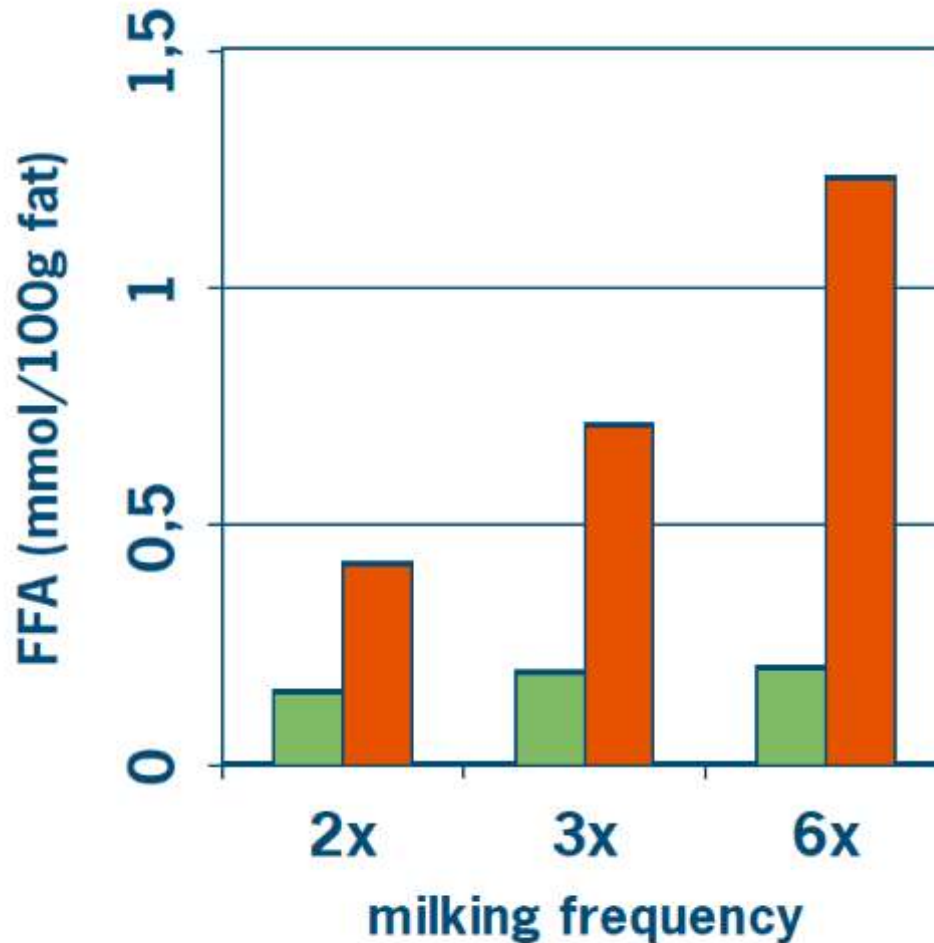
# Einfluss der Hormonbehandlung zur Brunstinduktion auf Verteilung der Lipaseaktivität in zwischen Rahm und MM



Bachman K.C. 1982. J. Dairy Sci.



# Zwischenmelkzeit / Melkfrequenz

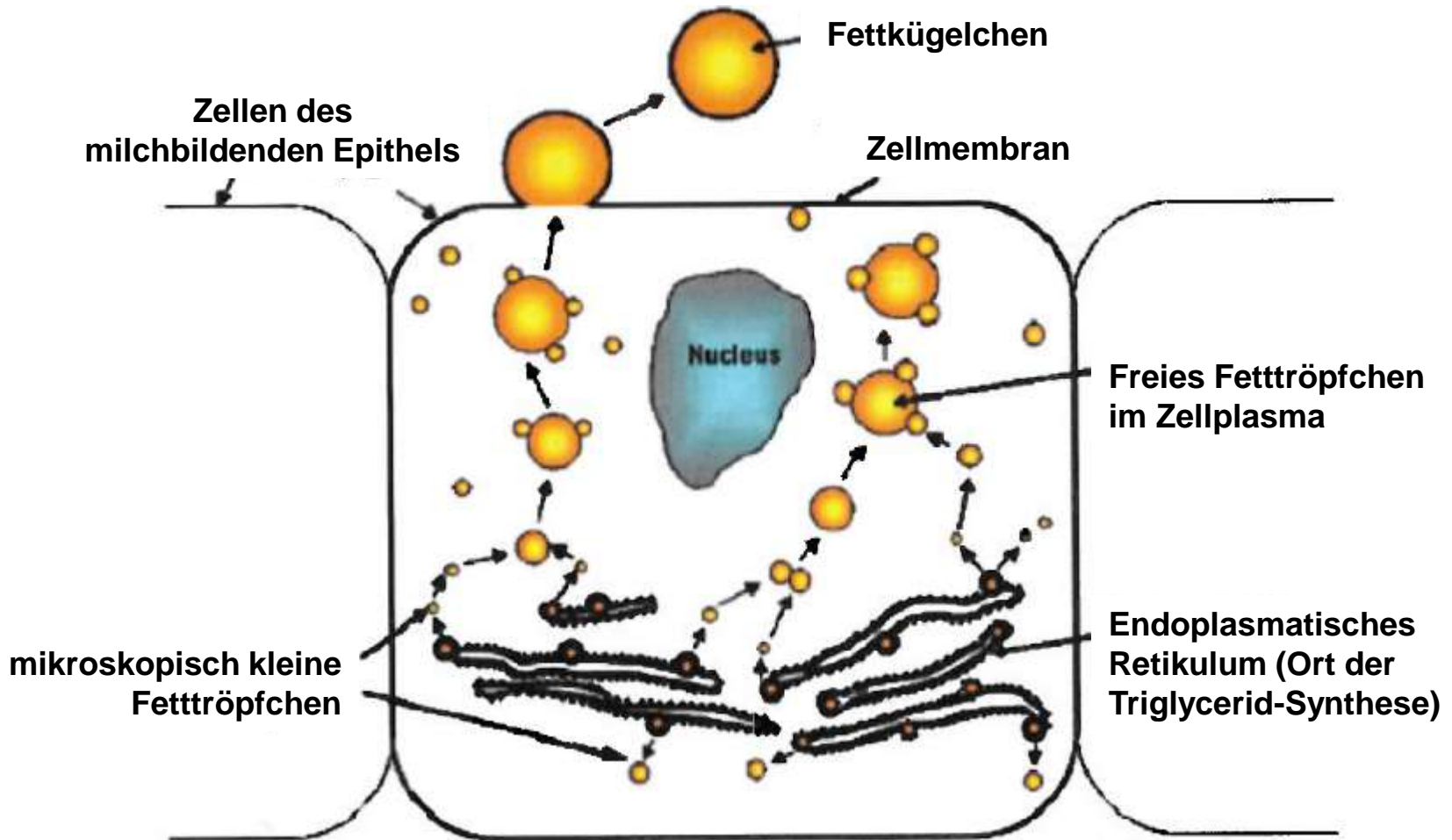


Slaghuis, 2004 (Univ, Wageningen NL)

■ 0 hours at 5°C  
■ 24 hours at 5°C



# Bildung und Ausscheidung der Fettkügelchen in die Milch

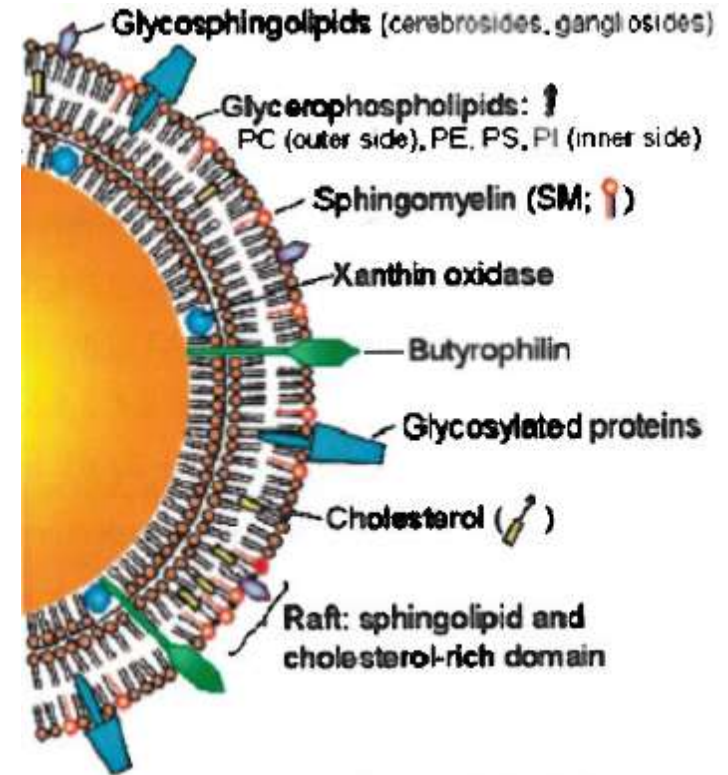




# Einfluss der Zwischenmelkzeit

## Kurze Zwischenmelkzeit →

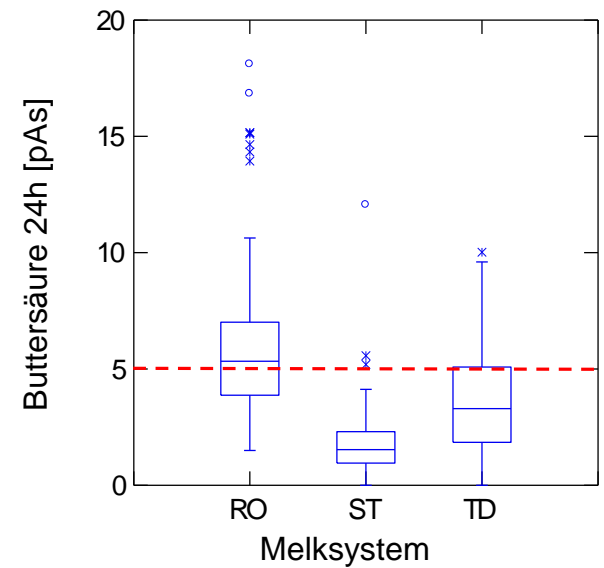
- Fettgehalt der Milch ↓
- Fettmenge in 24 h ↑
- Grösse der Fettkügelchen ↑
- Rel. zur Fettmenge, weniger Membranmaterial
- Geringeres Membranpotential
- Stärkere Neigung zu Koaleszenz



Quelle: Wiking L. 2005. Milk Fat Globule Stability - Lipolysis with Special Reference to Automatic Milking Systems. Disseration, Swedish University of Agricultural Sciences



# Einfluss der Melktechnik auf die Lipolyse



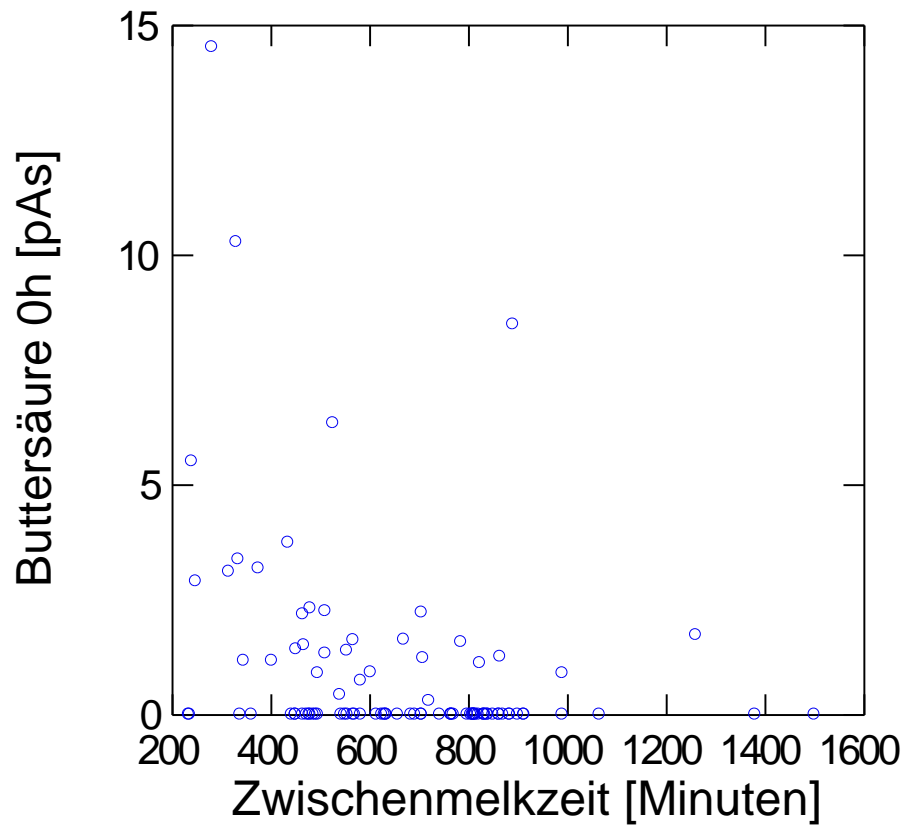
RO = Melkroboter, ST = Melkstand, TD = Rohrmelkanlage





# Einfluss von Zwischenmelkzeit und Kuh

Individuelle Gemelksproben aus Betrieb mit frei zugänglichem Melkroboter (Lipolyse in ungelagerter Probe)



N = 95 Kühe

Melkintervalle zwischen 3.5 bis 25 h beobachtet

Melkintervalle < 7h : 9 von 12 Tieren mit erhöhten Buttersäurewerten

**Grosse individuelle Unterschiede → Warum?**

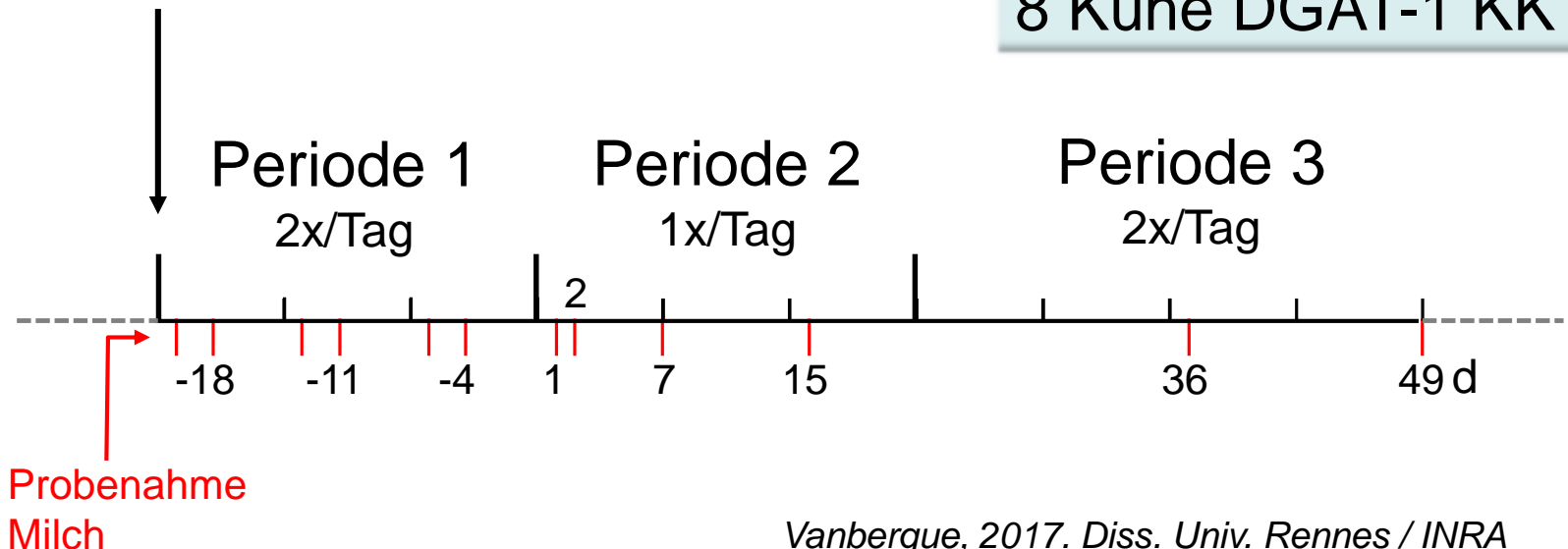
# Einfluss der **DGAT-1** Genvarianten auf die spontane Lipolyse

## Versuchsaufbau



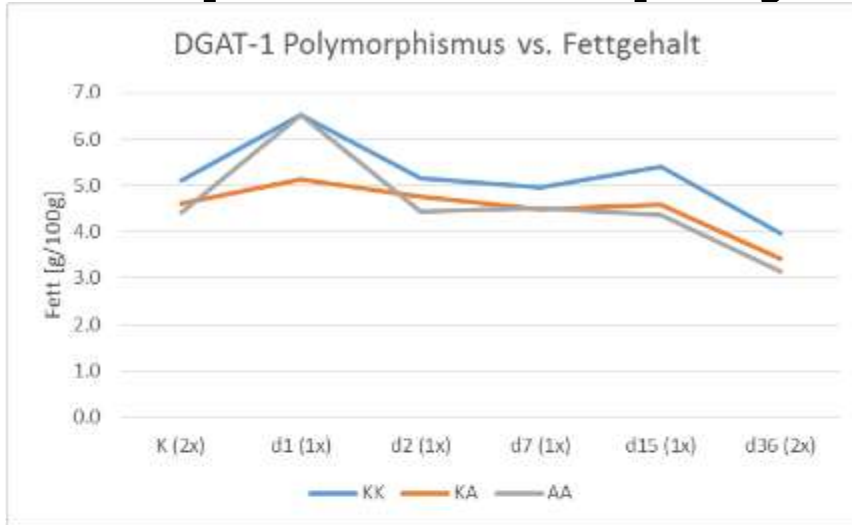
5 Kühe DGAT-1 AA  
8 Kühe DGAT-1 AK  
8 Kühe DGAT-1 KK

Laktationsstadium  
der 21 Kühe  
Ø 81±9 d



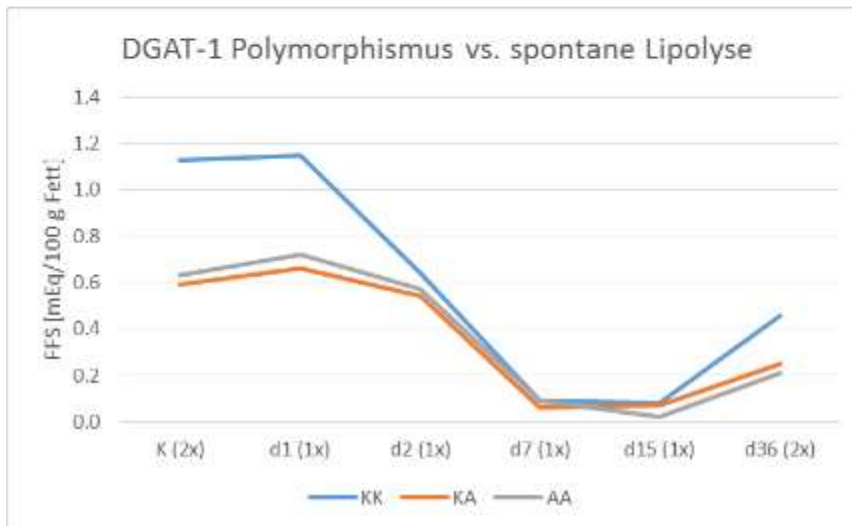
Vanbergue, 2017. Diss. Univ. Rennes / INRA

# Einfluss der **DGAT-1** Genvarianten auf die spontane Lipolyse



Fettgehalt

Effekt von DGAT-1  
 $P = 0.003$

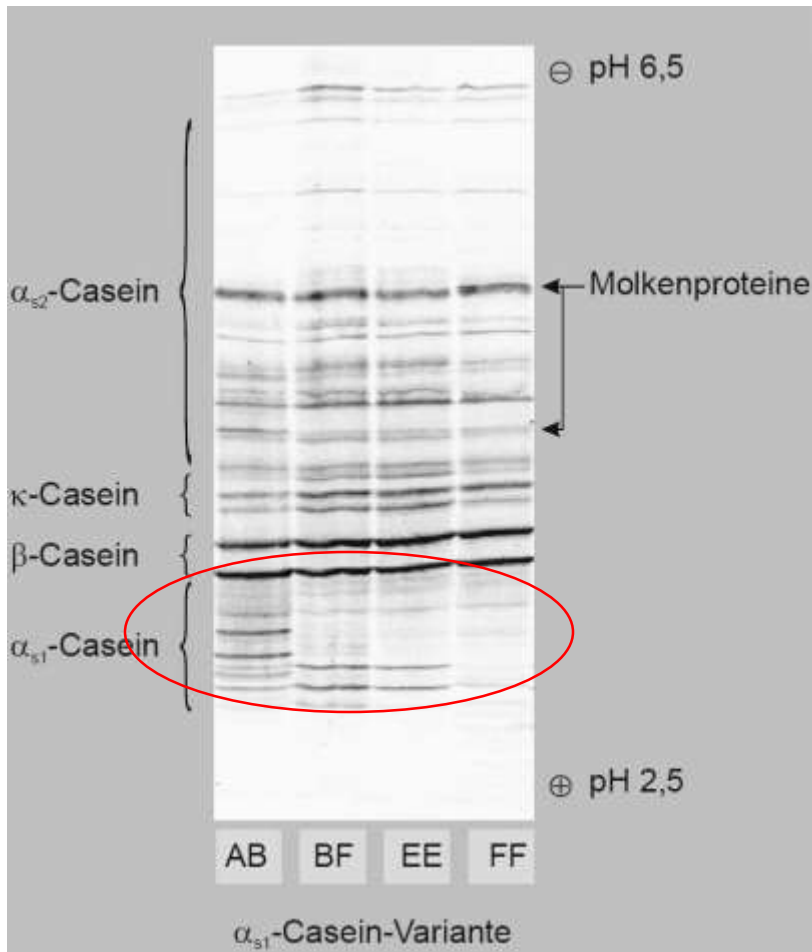


Lipolyse

Effekt von DGAT-1  
 $P = 0.013$



# Einfluss der $\alpha_{s1}$ -Caseinvarianten auf die Lipolyse in Ziegenmilch



**Elektropherogram (IEF) von Einzelgemelken von Ziegen mit verschiedenen  $\alpha_{s1}$ -Casein-Genotypen**

Quelle: Bühler T., Diss ETH Zürich, 2002



# $\alpha_{s1}$ -Cn-Varianten in Schweizer Ziegenrassen

Tab. 32 Allelfrequenzen von  $\alpha_{s1}$ -Casein aufgeteilt nach Expressionsgruppen „null-tief“ und „mittel-hoch“ der drei Versuchsherden.

Expressionstufen, bzw. Allele	Allelfrequenzen			
	Saanen- ziege (n = 37)	Toggen- burger (n = 57)	Gebirgs- ziege (n = 23)	Total (n = 117)
$\alpha_{s1}$ -Cn „null-tief“ (O / F, G)	0,22	0,91	0,52	0,62
$\alpha_{s1}$ -Cn „mittel-hoch“ (E / A, B, C)	0,78	0,09	0,48	0,38

(Diss. Th. Büeler, ETHZ, 2002)



# Lipaseaktivität, Lipolyse und $\alpha_{S1}$ -Caseinvarianten in einem Ziegenbestand

Ziege Nr.	Lipase [mU/L]	Freie Buttersäure [ $\mu$ mol/L]	$\alpha_{S1}$ Casein-Allele
59	38		F
100	591		E
107			E
22		97	F
Mittelw.	324	49	
129	718	762	F
122	1185	973	F
83	702	695	F
91	577	956	F
64		264	EF
Mittelw.	608	567	



# Korrelation zwischen Lipase-Aktivität und freien Fettsäuren (FFA) in der Milch

Bachman K.C. 1982. J. Dairy Sci.

	frisch	nach 24 h bei 4°C
Vollmilch	<b>0.06</b>	0.14
Rahm	0.45	<b>0.77</b>

- Frische Milch: Lipase ist v.a. caseingebunden → keine Korrelation
- Frischen Rahm: Korrelation zwischen Lipaseaktivität und Fettspaltung
- Nach Kühlagerung: Lipase ist v.a. an FK gebunden → hohe Korrelation zwischen Lipaseaktivität und Fettspaltung



# Spontane Lipolyse in Mischmilch

Milch	Lagerung	FFA (mmol/Liter)
Gemelk Patsy	5°C / 16h	0.5
Gemelk Thelma	5°C / 16h	4.8
Mischung 1:1 (hergestellt vor Kühlung)	5°C / 16h	0.9

*Quelle: Deeth H. 2013. Lipase problems in the dairy industry.*

Sensorischer Schwellenwert 1.5-2 mmol FFA/L

**Spontane Lipolyse wird durch Mischen mit normalen Gemelken stark reduziert**

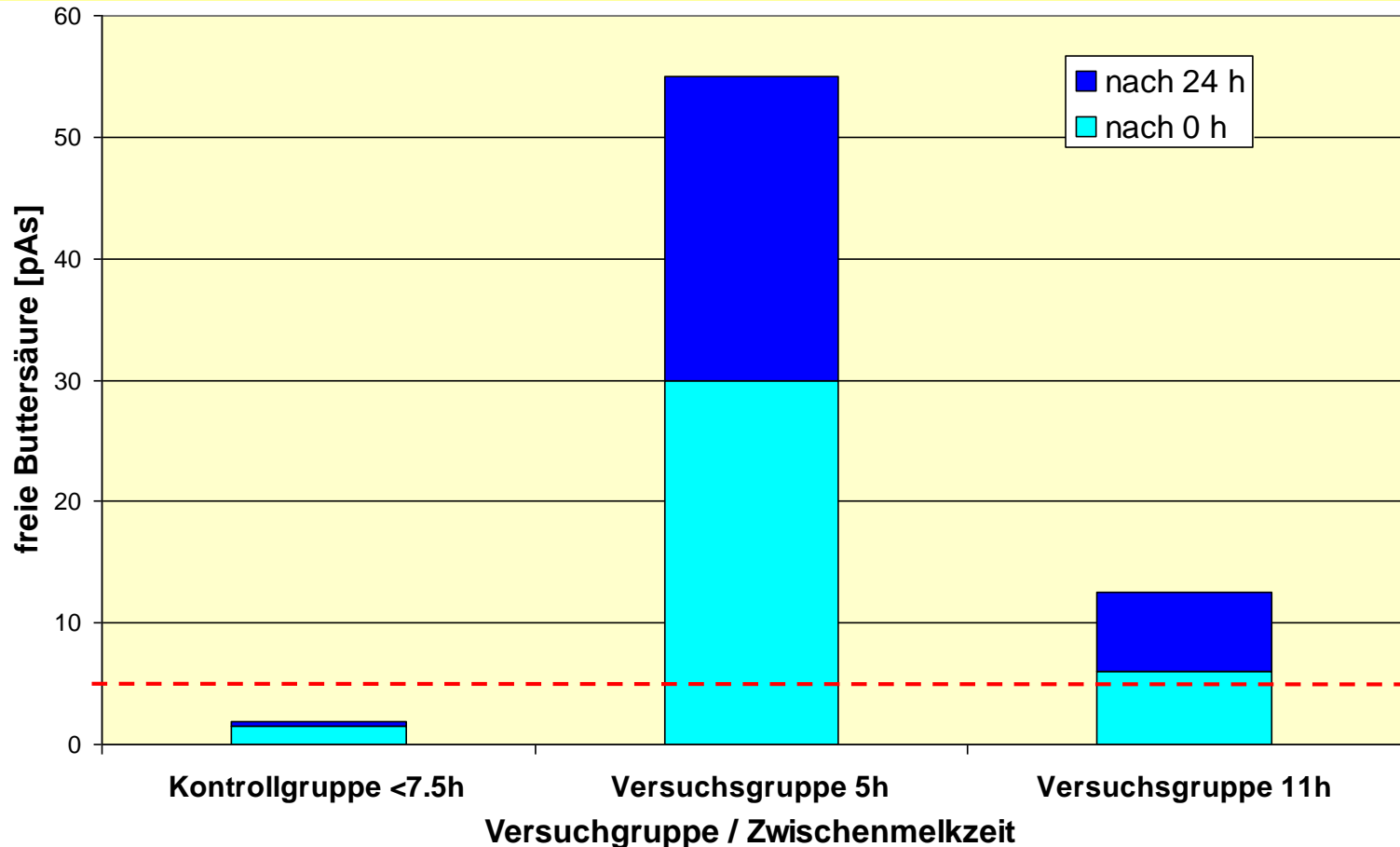




# Bedeutung für die Käseherstellung

# Versuchsfabrikation von Hartkäse (Typ Gruyère) mit spontan ranziger Milch

Milch der Kontroll- und Versuchsgruppen für den Verkäsungsversuch





# Käsefabrikationsversuch - Resultate

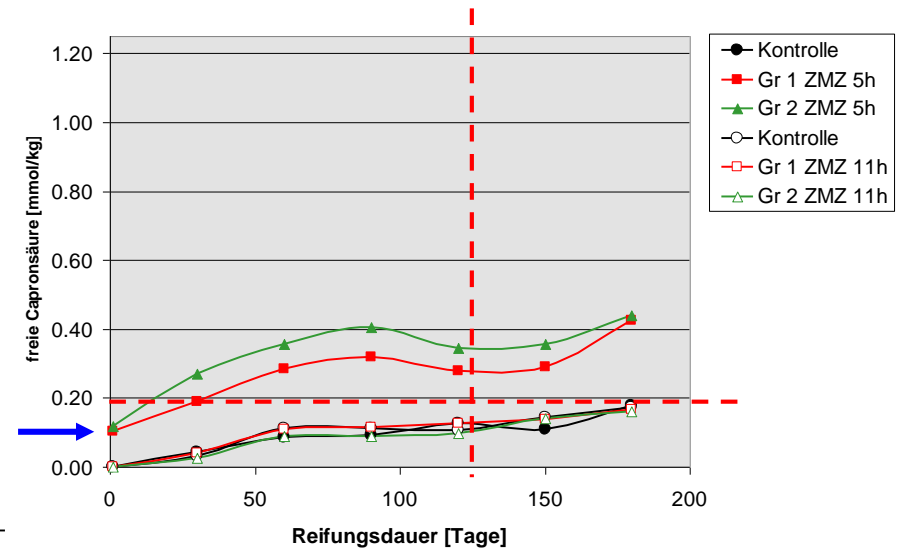
## Kessmilch

		Lipaseaktivität	freie Buttersäure	
		[IU/L]	[pAs]	[umol/kg]*
Serie 1	Kontrolle	60	0.9	21
	Gruppe 1 - ZMZ 5 h	152	19.3	443
	Gruppe 2 - ZMZ 5 h	159	20.8	478
Serie 2	Kontrolle	85	1.1	26
	Gruppe 1 - ZMZ 11 h	149	4.4	100
	Gruppe 2 - ZMZ 11 h	112	3.0	70

\* Einheiten nach neuer, verbesserter Methode (Schätzwerte berechnet aus pAs)

## Käse n-C6

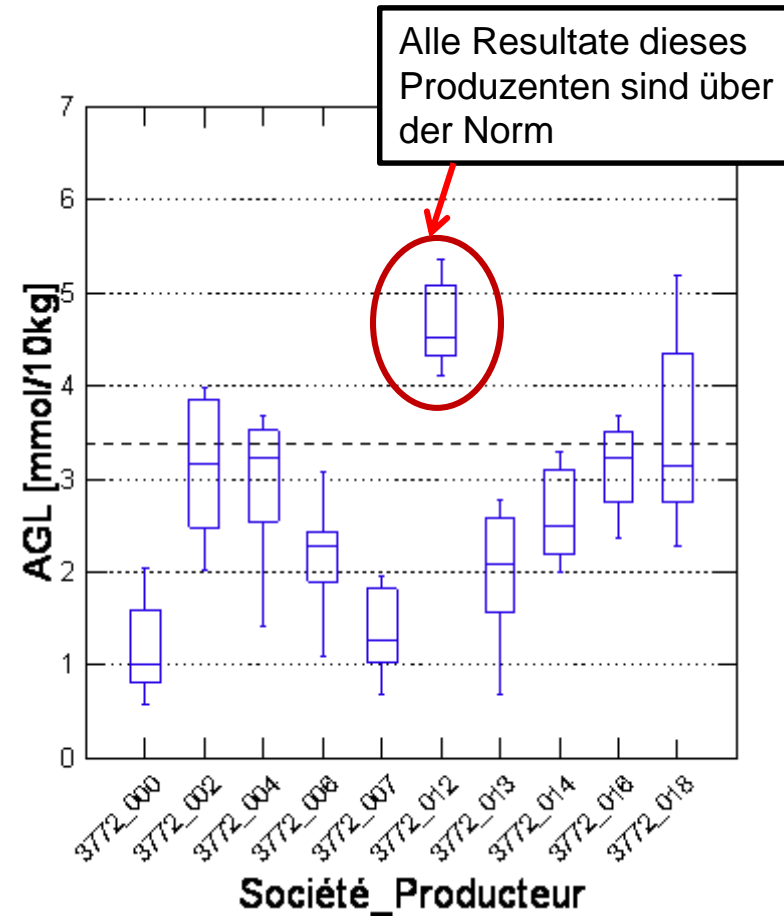
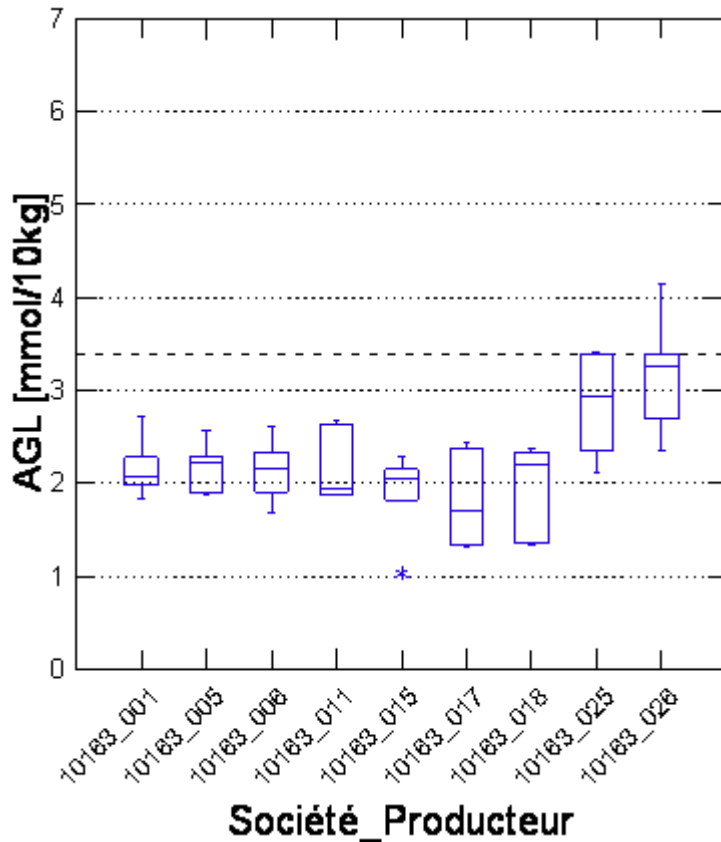
Taxation



# Schlussfolgerungen aus Käsestudien

- Lipolytische Aktivität in der Rohmilch hat nur einen begrenzten Einfluss auf die Lipolyse in Hartkäse
- Möglicherweise grössere Bedeutung bei Halbhartkäse
- Mikrobielle Lipasen sind wahrscheinlich entscheidend.
- Erhöhte FFA-Werte im jungen Käse: eher milcheigene Lipase verantwortlich
- Erhöhte FFA-Werte erst nach längerer Reifung: eher mikrobielle Lipasen verantwortlich
- Besonders gefährdet sind Käse ohne Oberflächenflora, da pH tief bleibt

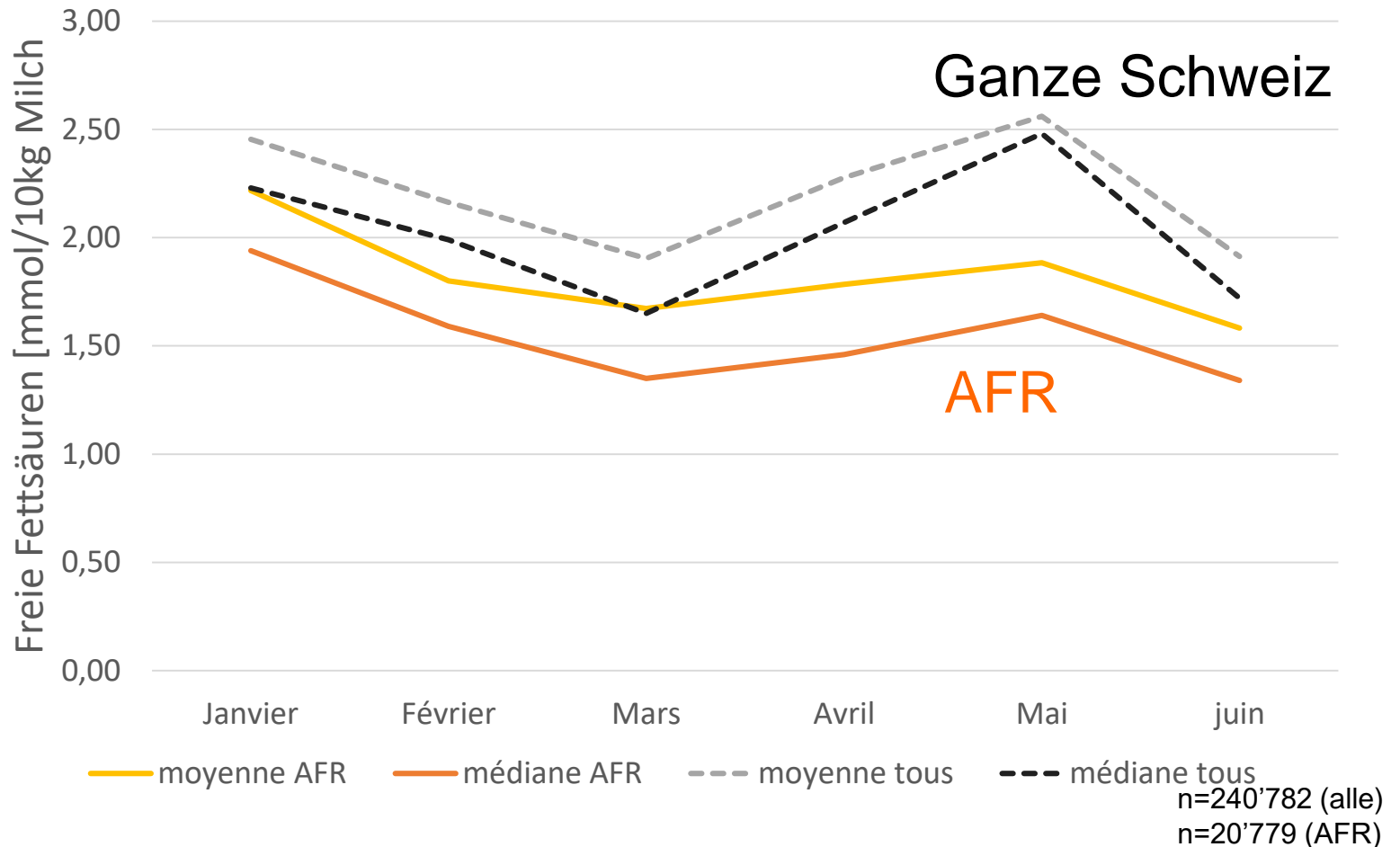
# Praxisversuch FFA-Messung mit FTIR (AFR – Suisselab - Agroscope)





# Freie Fettsäuren 2017

## Messungen von Suisselab





# Zusammenfassung

## Einflüsse auf die Fettspaltung in Milch

### Kuhrasse

- Holstein > Jersey (Bachman et al. J. Dairy Sci. 1988, 925-931)
- Holstein > Normande / Tarentaise (Diss. Vanbergue, 2017)

### Zellzahl

- FFA-Gehalt der Milch steigt um ca. 50% wenn die Zellzahl von 100'000 auf 1 Mio. ansteigt (Bachman et al. J. Dairy Sci. 1988, 925-931).

### Laktationsstadium

- Höhere FFA-Gehalte und häufiger spontane Ranzigkeit zu Beginn und gegen Ende der Laktation

### Hormonstatus

- Injektion von Estradiol/Progesteron führt zu Akkumulation der Lipaseaktivität in der Rahmphase und zu kurzfristigem Anstieg der FFA (Bachman J. Dairy Sci. 1982; 907; Agroscope, unpubl.)

# Zusammenfassung Einflüsse auf die Fettspaltung in Milch

## Fütterung

- Silage > Weide / frisches Gras
- Grassilage > Maissilage
- Energiedefizit → Lipolyse ↑

## Melkzeit

- Abend > Morgen

## Zwischenmelkzeit

- 3x > 2x > 1x (12 h > 8 h : FFA +50%; 8 h > 6 h : FFA +50%)
- robuste» und «sensible» Kühe

## Genetische Einflussfaktoren

- Genvariante K von DGAT-1
- Genvariante F und O bei Ziege



# Zusammenfassung Einflüsse auf die Fettspaltung in Milch

## Milchlagerung

- Lagerung der Milch  $<10^{\circ}\text{C}$  und anschliessende Erwärmung auf  $20 - 30^{\circ}\text{C}$  fördert die Lipolyse
- Höhere Milchlager-temp. fördert aber Keimwachstum  $\rightarrow$  mikrobielle Lipasen  $\uparrow$

**Noch viele offene Fragen**