

# Über das Vorkommen der Xanthinoxidase sowie den Einfluss milchtechnologischer Verfahren auf die Xanthinoxidase-Aktivität der Kuhmilch — eine Übersicht

R. Sieber

Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, CH-3097 Liebefeld-Bern  
(Direktor: Prof. Dr. B. Blanc)

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Xanthinoxidase der Milch ist vom Amerikaner OSTER als ein neuer Risikofaktor für die koronaren Herzkrankheiten bezeichnet worden. In diesem Übersichtsartikel wird über das Vorkommen dieses Enzyms in biologischen Systemen berichtet. Im Menschen ist die Xanthinoxidase in verschiedenen Organen anzutreffen und stellt für einige Krankheiten einen empfindlichen Indikator dar. Bei einer Vielzahl von Säugetieren ist sie in der Milch nachzuweisen.

Die Xanthinoxidase der Kuhmilch ist wegen der Menge der verfügbaren Milch und wegen ihres hohen Gehaltes zum meistuntersuchten Enzym der verschiedenen Xanthinoxidasen geworden. Das Molekulargewicht der Xanthinoxidase beträgt ungefähr 150 000. Die Auswirkungen der verschiedenen milchtechnologischer Verfahren wie Kühlen, Lagerung bei tiefen Temperaturen, Gefrieren, mechanische Behandlung, Homogenisieren und Erhitzen auf die Xanthinoxidase-Aktivität der Milch werden eingehend besprochen. Die meisten dieser Verfahren erhöhen im allgemeinen die Enzymaktivität. Ein abschliessendes Erhitzen der Milch auf Temperaturen von über 80 °C vermag zu einer Inaktivierung beizutragen.

## 1 Einführung

Das Enzym Xanthinoxidase (XO) (Xanthine: oxygen oxidoreductase, EC 1.2.3.2), früher auch als Schardinger-Enzym oder als Xanthindehydrase bezeichnet, gehört zu den Molybdän-Hydroxylasen wie die Xanthindehydrogenase (EC 1.2.1.37), die Aldehydoxidase (EC 1.2.3.1) und die Sulfitoxidase (EC 1.8.3.1). Als Metalloprotein enthält es Flavinadeninindinukleotid, Molybdän, Eisen und sog. säurelabilen Schwefel im Verhältnis von 1 : 1 : 4 : 4; zudem besitzt es ein hohes Molekulargewicht [1]. Im Purinstoffwechsel katalysiert die Xanthinoxidase die Harnsäurebildung aus Hypoxanthin und Xanthin, wobei jedoch FRIED et al. [2] deren Hauptfunktion vielmehr in der Bildung von Wasserstoffsuperoxid und Superoxidationradikalen sehen, die bei verschiedenen biochemischen Reaktionen wie der Reduktion von Cytochrom c [3] mitwirken können. Ausserdem ist dieses Enzym in der Dünndarmmucosa an der Oxidation und am Einbau des Eisens in das Transferrin beteiligt [4, 5]. Als nichtspezifisches Enzym kann es weitere Purine, Pyrimidine, Aldehyde, Pteridine und andere heterozyklische Verbindungen oxidieren [1, 6—9]; dabei kann es in Abhängigkeit vom Sauerstoff als Oxidase oder von anderen Elektronenakzeptoren wie NAD als Dehydrogenase wirken. Durch Behandlung mit spezifischen chemischen Substanzen [10, 11] oder in Gegenwart von Enzymen wie der Sulfhydryloxidase [12, 13] werden zudem Umwandlungen zwischen der Oxidase (Typ O)- und Dehydrogenase (Typ D)-Form erzielt, wobei jedoch beispielsweise im Dünndarm von Mäusen die von der Dehydrogenase hergeleitete Oxidase andere Eigenschaften aufweist als die bereits neben der Dehydrogenase vorhandene Oxidase [14].

Vom Amerikaner OSTER [15] wird die Xanthinoxidase in homogenisierter Kuhmilch beschuldigt, als Risikofaktor an der Entstehung koronarer Herzkrankheiten beteiligt zu sein. Neben dem Vorkommen der Xanthinoxidase in biologischen Systemen wird im folgenden vor allem der Einfluss der Milchtechnologie auf die Enzymaktivität der Milch behandelt. In einer zweiten Arbeit soll dann auf die obige Hypothese eingegangen werden (SIEBER, Z. Ernährungswiss., im Druck).

## 2 Vorkommen der Xanthinoxidase

Die Xanthinoxidase ist ubiquitär anzutreffen. Beim Menschen ist eine Xanthinoxidase-Aktivität vor allem in Leber und Dünndarm [16–22] und in geringem Masse in Niere, Milz [17, 18, 21], Skelettmuskel, Herz [17, 21] wie auch teilweise im Serum [18–20, 23, 24] nachgewiesen worden. In Erythrozyten, Plasma, Nieren, Ovarien, Prostata, Fettgewebe, Skelettmuskel, Herz, Magen, Lunge, Hoden, Uterus, Mandeln, Gallenblase und Schilddrüse [20], Blut und Plasma [17, 25] ist sie nicht zu finden, während sie nach KRENITSKY et al. [21] in verschiedenen dieser Organe vorhanden ist. Histochemisch ist sie beim Menschen in Leber, Dünndarm, Zwölffingerdarm und Niere nachzuweisen [22].

Bei verschiedenen Krankheiten ist die Xanthinoxidase-Aktivität im Serum (akute Leberschädigung, infektiöse Hepatitis) oder in der Epidermis (Psoriasis) ein empfindlicher und spezifischer Indikator [19, 21, 23, 26–29]. Bei Brustkrebs [24] ist die Enzymaktivität erniedrigt; in der Leber ist sie bei Mangelernährung und chronischen Infektionen höher als bei Hepatitis und Leberzirrhose [30].

Dieses Enzym ist im weiteren im Blut, im Serum und in Organen verschiedener Tiere [16, 21, 22, 25, 31, 32], in einer höheren Pflanze: der Linse (*Lens esculenta*) [33], in mehreren Mikroorganismen [34–37], unter denen im allgemeinen die Xanthindehydrogenase nachzuweisen ist [35, 36–40], in Zellkulturen von Mäuseembryos [41] sowie in der Milch verschiedener Säugetiere [42] zu finden. Bei Ratte und Maus unterscheiden sich die Xanthinoxidasen des Dünndarms und der Leber in ihrem elektrophoretischen Verhalten und in ihrem Molekulargewicht [32, 43]. In der Rattenleber sind alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede der Aktivität dieses Enzyms vorhanden [44]. Bei Mäusen ist nach einer Infektion die Xanthinoxidase-Aktivität in Leber, polymorphonuklearen Leukozyten und Makrophagen erhöht [45, 46].

Die Xanthinoxidasen verschiedener Säugetierarten zeigen ein unterschiedliches Verhalten bei der Mikrokomplementfixation wie auch nach der Elektrophorese auf Stärkegel. In Abhängigkeit von der immunologischen Distanz zur Kuhmilchxanthinoxidase ordnen sie sich folgendermassen: Serum der laktierenden Kuh < Serum der nichtlaktierenden Kuh < Stierserum = Kuhleber < Affenleber < Rattenleber. Die Xanthinoxidase der Rattenleber beispielsweise unterscheidet sich in ungefähr 27 % der Aminosäuresequenz von derjenigen der Kuhmilch. Die elektrophoretische Trennung dieser verschiedenen Enzyme weist auf deren polymorphe Natur hin, wobei jene der Leber von Kuh, Affe und Ratte zwei Isomere (anionische und kationische Form) aufweisen [47].

## 3 Xanthinoxidase in der Milch von Säugetieren

SCHARDINGER [48] hat 1902 erstmals über das Vorhandensein der Xanthinoxidase in der Kuhmilch berichtet, als er mit der nach ihm benannten Reaktion die erste enzymatische Methode der Lebensmittelanalytik beschrieb. Dabei reduziert das Enzym unter Ausschluss von Luft und in Gegenwart von Formaldehyd Methyleneblau zum farblosen Leukomethyleneblau. Damit kann rohe von gekochter Milch unterschieden werden. Der Nachweis, dass ein Enzym in frischer Milch die Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure zu katalysieren vermag [42] und dass das Schardinger-Enzym und die Xanthinoxidase identisch sind [16, 49], stellen weitere Etappen in der Erforschung dieses Enzyms dar. 1939 ist es übrigens isoliert und gereinigt [50, 51], 1954 erstmals kristallisiert worden [52, 53].

Neben der Kuhmilch ist die Xanthinoxidase in der Milch folgender Säugetiere anzutreffen:

- Maus, Ratte, Meerschweinchen, Esel, Stute, Katze, Hund, Affe (*Erythrocebus patas*) [54]
- Schaf und Kaninchen [55, 56]

— Ziege [42, 57–60]

— Büffel [60, 61]

nicht aber beim Schwein und nach früheren Arbeiten auch nicht bei der Stute [55, 56]. In Ziegenmilch sind von MONGET et al. [62] nur Spuren der Xanthinoxidase aufgefunden worden. Deshalb haben sie deren Bestimmung zum Nachweis von Kuhmilch in Ziegenmilch vorge schlagen.

In der Humanmilch ist dieses Enzym von einigen Wissenschaftlern nicht [55, 56, 63] oder nur in wenigen Fällen [64] nachgewiesen worden. Andere haben über dessen Vorhandensein berichtet [65–69], wobei OWEN et al. [70] ihr positives Resultat auf ein Schütteln der Milch während des Transports zurückführen. In neuerer Zeit ist das Vorkommen der Xanthinoxidase in Humanmilch und -kolostrum mit polarographischen und radiochemischen Methoden bestätigt worden [71]. Im Kolostrum und in der Milch von Patientinnen mit Xanthinurie ist dagegen keine Xanthinoxidase-Aktivität festzustellen [69, 72].

## 4 Über das Vorkommen der Xanthinoxidase in der Kuhmilch

Die Xanthinoxidase der Kuhmilch wurde wegen der verfügbaren Milchmenge und ihres hohen Gehaltes (mehr als 100 mg pro Liter) [50, 51] zum meistuntersuchten Enzym innerhalb der verschiedenen Xanthinoxidasen [1, 42, 73, 74]. Dabei ist die Xanthinoxidase in der Kuhmilch in einer aktiven wie auch inaktiven Form [75–78] vorhanden und kann mit Dithioerythritol in den D-Typ [10, 11, 79] überführt werden. Aus roher, frischer Kuhmilch wird die Xanthinoxidase zu 70% als Oxidase und nach der Reinigung aus Kuhmilch mit Dithioerythritol zu 96% als Dehydrogenase bestimmt, die sich bei Abwesenheit des Dithioerythritols reversibel in den Oxidasetyp umwandelt [79]. Nach diesen Untersuchungen [11, 79] umfasst das Enzym vier Formen:

Typ D ↔ Typ O (reversibel) → Typ O (irreversibel) → inaktive Form(en),

wobei es sich bei den letzteren um die «Demolybdo»- und die «Desulfo»-Xanthinoxidase handelt [1].

In roher Kuhmilch ist die Xanthinoxidase mit unterschiedlichen Aktivitäten nachgewiesen worden (Tab. 1). Ihre Aktivität wird in verschiedenen Einheiten angegeben: pro ml Milch, pro g Milch oder pro mg Protein. Dabei ist unter einer Einheit (U) die Absorption von 0,036 zu verstehen; diese ist äquivalent zu ungefähr  $0,3 \times 10^{-7}$  Mol reduziertem Triphenyltetrazoliumchlorid [80–83, 94]. Mit mU wird jene Enzymmenge definiert, welche die Bildung von einem Mikromol Harnsäure bei 25°C katalysiert [88, 90, 91]. Mit  $\mu\text{l O}_2/\text{ml/h}$  wird die Menge des Sauerstoffs angegeben, die in einer Stunde bei der Oxidation des Hypoxanthins oder Xanthins umgesetzt wird [85–88].

## 5 Über die Lokalisation der Xanthinoxidase in der Kuhmilch und ihre Herkunft

Die Xanthinoxidase-Aktivität von frischer Rohmilch korreliert im originären Zustand mit dem Fettgehalt [96]; nach GANDHI und AHUJA [60] jedoch steht sie in der Milch von Kühen, Ziegen und Büffeln mit dem Fettgehalt in negativer Beziehung.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Xanthinoxidase in der Kuhmilch [97–107] wie auch in der Büffelmilch [107, 108] neben vielen anderen Enzymen [99, 100, 103, 105–107] vor allem in der Fettkügelchenmembran lokalisiert ist. Diese ist äusserst komplex aus Proteinen, Phospholipiden, Glykoproteinen, Triglyzeriden, Cholesterin, Enzymen und anderen Bestandteilen aufgebaut [109–111]. Dabei befindet sich zwischen dem Triglyze-

Tab. 1. Xanthinoxidase-Aktivität in roher Kuhmilch

Autor	Dimension	Aktivität	n
ZITTLE et al. [80]	U/ml	25 <sup>a</sup>	
STANNARD [81]	U/ml	47,2	
ERWIN und RANDOLPH [82]	U/mg Protein	12,0	3
ZMARLICKI et al. [83]	U/ml	60,8	3
KITCHEN et al. [84]	U/ml	15,6–21,4	
GUDNASON und SHIPE [85]	µl O <sub>2</sub> /ml/h	80,5	15
HART et al. [86]	µl O <sub>2</sub> /ml/h	486	27
THOMASOW und MROWETZ [87]	µg O <sub>2</sub> /ml/h	155,4	5
ZIKAKIS und WOOTERS [88]	µl O <sub>2</sub> /ml/h	61,2	4
HALDEN [89]	mU/g	0,263–0,270	
CERBULIS und FARRELL [90]	mU/ml	110±25	6
DEMOTT und PRAEPANITCHAI [91]	mU/ml	208±4,3	8
HOLBROCK und HICKS [92]	mU/ml	67,2±23,5 <sup>b</sup>	22
WÜTHRICH et al. [63]	IU	175±45	5
GREENBANK und PALLANSCH [93]	U	217	10
BANDYOPADHYAY et al. [94]	U	3,0	
BLANC [95]	IU	240–350	13

<sup>a</sup> Magermilch

<sup>b</sup> Milchserum

ridkern des Fettkügelchens und seiner äusseren Membran eine proteinhaltige, 10–50 nm umfassende Schicht [112]. Letztere enthält neben verschiedenen Polypeptiden in bedeutenden Mengen die Xanthinoxidase und ein saures Glykoprotein [104, 111–113]. Dabei weist sie in Präparaten von Fettkügelchen aus Kuh- und Muttermilch, die durch Gefrierätzung hergestellt wurden, parakristalline Bezirke auf, an denen diese beiden Proteine beteiligt sein dürften [114]. Auch die Anwendung der Immunoabsorption an intakten Milchfettkügelchen zeigt, dass die Xanthinoxidase teilweise durch die äussere Oberfläche der Fettkügelchenmembran verborgen ist [115] und einer Jodierung nicht zugänglich ist [116]. Unter den Proteinen der Fettkügelchenmembran macht die Xanthinoxidase mehr als 8% aus [102, 117]. Aus Buttermilch haben BRILEY und EISENTHAL [101] mit Hilfe der Gelfiltration drei Enzymfraktionen isoliert:

- Xanthinoxidase gebunden an die Fettkügelchenmembran,
- Xanthinoxidase in einer löslichen, Lipoprotein enthaltenden Fraktion und
- freie Xanthinoxidase.

Auch im Membranmaterial der Magermilch ist eine Xanthinoxidase-Aktivität nachzuweisen [100].

Der Mechanismus der Milchfettkügelchensekretion aus der laktierenden Zelle ist nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Theorien sind bereits diskutiert worden; dabei soll die Fettkügelchenmembran teilweise von der Plasmamembran oder von Membranen der sekretorischen Vesikeln des Golgiapparates abstammen oder auch aus dem Zytoplasma abgeleitet sein [111]. Die Xanthinoxidase ist nicht Bestandteil der Plasmamembran [118], sondern ist im Zytoplasma lokalisiert. Dies kann mit Hilfe von immunologischen Techniken in den milchsezernierenden Epithelzellen gezeigt werden. Durch Homogenisieren und Fraktionieren des Milchdrüsenorgans kann das Vorhandensein dieses Enzyms zu mehr als 80% in löslicher Form festgestellt werden [119]. Daneben ist es noch in den Fraktionen der Mitochondrien und

Mikrosomen, was auch auf eine Membranassoziation hindeutet [119, 120], wie auch in den Epithelzellen der Kapillarblutgefässe nachgewiesen worden [120, 121]. Die Xanthinoxidase der Kapillaren ist derjenigen der Milch strukturell ähnlich [120]. Nach Untersuchungen an Ratten wird die Xanthinoxidase über das Blut in die Brustdrüse transportiert [122].

## 6 Molekulargewicht der Xanthinoxidase

Die Xanthinoxidase ist funktionell als ein dimeres Molekül mit zwei identischen Polypeptiden und unabhängigen Zentren anzusehen, dessen Molekulargewicht (MG) 265 000–308 000, im Durchschnitt ungefähr 283 000, beträgt [1, 75, 123–127]. Für das Monomere wird in verschiedenen Arbeiten [75, 104, 125–131] ein Molekulargewicht von weniger als 100 000 [127, 131] bis 181 000 [128] angegeben. Bei der Isolierung ohne proteolytische Enzyme wurde ein solches von 149 000–157 000 festgestellt:

149 000 ± 7000 [130]  
 150 000 [129]  
 153 000 [104]  
 155 000 [120]  
 150 000–157 000 [126]

Diese Werte stimmen mit dem Molekulargewicht einer Polypeptidfraktion der Milchfettkügelchenmembran überein [103, 106, 116, 132–134].

Eine Behandlung der nativen Xanthinoxidase mit proteolytischen Enzymen führt zu veränderten chromatographischen und physikalischen Eigenschaften [135, 136]. Fragmente mit einem Molekulargewicht von 130 000 sind nach einer Behandlung mit Trypsin festgestellt worden, von 89 000 und 38 000 nach einer solchen mit Pankreatin [126], von 92 000, 42 000 und 20 000 nach einer solchen mit Trypsin, Chymotrypsin oder Subtilisin [129] und von 50 000–70 000 nach einer solchen mit einer Protease [120]. Bereits bei der Isolierung mit Pankreatin werden Enzyme mit tieferem Molekulargewicht gefunden [126, 129]. Eine Aufbewahrung unter verschiedenen Bedingungen zeigt ebenfalls einen Abbau des nativen Enzyms:

4°C während 30 Tagen: MG 90 000, 42 000, 24 000 [104]  
 37°C während 24 Stunden: MG 133 000 [104]  
 –10°C während 6 Wochen: MG 130 000, 90 000, 60 000, 40 000 und 20 000 [130]

Nach MANGINO und BRUNNER [104] muss für den Abbau der Xanthinoxidase eine endogene Milchprotease verantwortlich gemacht werden, deren Aktivität in gewaschener Buttermilch 39mal grösser ist als in Magermilch und die unter geeigneten Inkubationsbedingungen eine begrenzte Proteolyse katalysiert. Aus den Untersuchungen von MATHER et al. [119] ist zu schliessen, dass die Xanthinoxidase während des Aufenthaltes der Milch in den Alveolen der Milchdrüsen keinem extensiven proteolytischen Abbau unterworfen ist, auch wenn in der Molkefraktion bzw. in der Fettkügelchenmembran geringe Mengen mit einem Molekulargewicht von 43 000 bzw. von 90 000 nachgewiesen wurden.

## 7 Bedeutung der Xanthinoxidase

Die biologische Bedeutung der Xanthinoxidase in der Milch ist nicht klar. Da die Milch aber die einzige Nahrung für das neugeborene Individuum darstellt, das im Verdauungstrakt noch keine voll entwickelte Enzymtätigkeit besitzt, ist wohl hier eine Funktion zu vermuten. Neben ihrer Beteiligung im Nukleinsäureabbau ist die Xanthinoxidase als Quelle von Superoxidradikalen [3] anzusehen. Diese Radikale können zur Peroxidation der Linolensäure [137], zur

Autoxidation der Linolsäure [138] und in der Milch zur Peroxidation des Milchfettes führen [139]. Jedoch kann die Superoxiddismutase, die als Enzym mehrmals in der Kuhmilch nachgewiesen wurde [92, 140–143] als schützendes Agens gegenüber einer Fettoxidation wirken. Von einigen Autoren [144–148] wird ein Zusammenhang zwischen der Xanthinoxidase-Aktivität — vor allem einer hohen Aktivität — und der Entstehung eines Oxidationsgeschmacks in der Milch festgestellt. Andere haben dagegen keine Korrelation gefunden [149] oder Ergebnisse vorgestellt, die eher auf eine antioxidative Wirkung hindeuten [150, 151]. Nach ALLEN und WRIEDEN [152] besitzt die Xanthinoxidase in einem milchähnlichen Modellsystem nur eine geringe Wirkung auf die Lipidoxidation. Hingegen in Gegenwart von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und in geringerer Masse auch von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen wirkt sie oxidierend, wodurch ihre Wirkung auf eine metallkatalysierte Oxidation des Milchfettes nicht ignoriert werden kann. Im übrigen erhöht eine Hitzedenaturierung der Xanthinoxidase deren oxidierende Fähigkeit [153].

Im weiteren wird diskutiert, dass das von der Xanthinoxidase erzeugte Wasserstoffsuperoxid die Bildung des Hypothiocyanats als aktivem antibakteriellem Agens des Laktoperoxidasesystems in der Milch fördert [154].

## 8 Beeinflussung der Xanthinoxidase-Aktivität der Kuhmilch

Die Xanthinoxidase-Aktivität der Kuhmilch unterscheidet sich sowohl zwischen den einzelnen Rassen [90, 92] wie auch innerhalb derselben [155, 156], was nach ZIKAKIS und TREECE [155] auf einen genetischen Polymorphismus hindeutet (Tab. 2). Während der Laktation [81, 92, 144, 157] wie auch im Verlaufe eines Jahres [83, 156] variiert die Enzymaktivität, nicht aber in Morgen- und Abendmilch [81, 158]. Nach STANNARD [81] ist die Aktivität in der Mitte der Laktation um die Hälfte niedriger als am Anfang und am Ende. Nach HOLBROOK und HICKS [92] sinkt sie während der Laktation zwar ab, doch ist dies statistisch nicht zu sichern. Milch von Kühen mit Mastitis weist teils höhere [156, 159, 160], teils niedrigere Xanthinoxidase-Aktivitäten auf [82, 84] als solche von gesunden Kühen.

Die Xanthinoxidase-Aktivität der Kuhmilch ist nach KIERMEIER und CAPELLARI [161, 162] von der Menge des im Futter enthaltenen, organisch gebundenen Molybdäns abhängig, was nach HART et al. [86] auf eine Veränderung im Proteingehalt des Futters wie auch auf verschiedene Diäten zurückgeführt werden kann. Bereits KIERMEIER und VOGT [163] hatten eine Bezie-

Tab. 2. Einfluss der Rasse auf die Xanthinoxidase-Aktivität

Rasse	Aktivitätsgruppe	Anzahl Kühe	Einheit	Aktivität	Referenz
Brown Swiss		100	mU/ml	108,0	90
Holstein		165		106,0	90
Guernsey		60		59,7	90
Ayrshire		50		58,0	90
Jersey		30		70,2	90
Milking Shorthorn		50		79,0	90
Holstein		11	mU/ml	60,5	92
Jersey		11		77,5	92
Guernsey	niedrige	21	$\mu\text{l O}_2/\text{ml/h}$	$30 \pm 0,9$	155
	mittlere	50		$52 \pm 0,9$	155
	hohe	21		$80 \pm 1,5$	155
Holstein	niedrige	8		$28 \pm 1,5$	155
	mittlere	20		$48 \pm 1,9$	155
	hohe	11		$75 \pm 2,1$	155

hung zwischen der Alkalität des Bodens und der Enzymaktivität der Milch festgestellt und einen Zusammenhang zwischen letzterer und dem Molybdängehalt des Futters diskutiert. Die orale Verabreichung von Ammoniummolybdat an Kühe [162], ferner von Natriummolybdat an Kühe und Ziegen [86] erbrachte jedoch nur einen Anstieg des Molybdäns in der Milch, nicht aber eine Änderung der Xanthinoxidase-Aktivität; dieses letztere traf auch bei Ziegen zu, denen Riboflavinsupplemente verabreicht wurden [59]. Zwischen der Enzymaktivität und dem Molybdängehalt [86, 164] wie auch zwischen der Aktivität und dem Fett-, Eiweiss- und Phosphorgehalt der Milch waren statistisch gesicherte Beziehungen festzustellen, nicht aber zum Kalium-, Natrium-, Kalzium- [164] und Kupfergehalt [165]. Organische Insektizide beeinflussen weder *in vivo* noch *in vitro* die Xanthinoxidase-Aktivität der Kuhmilch [166].

## 9 Vorkommen der Xanthinoxidase in Milchprodukten

Nach Trennung der Milch in Magermilch und Rahm ist die Enzymaktivität zu 86% im Rahm [81] oder 6,2mal mehr im Rahm als in der Magermilch [98] zu finden. Nach KITCHEN et al. [84] sind dagegen nur 21% der Aktivität der Vollmilch im Rahm und 54% in der Magermilch vorhanden, was nach STANNARD [81] auf eine Beschädigung der Fettkügelchen während der Zeit zwischen Milchgewinnung und Untersuchung zurückzuführen sein dürfte. CERBULIS und FARRELL [90] haben nach der Verarbeitung von zwei Milchproben, die eine Aktivität von 126,0 mU/l aufwiesen, in roher Magermilch 84,6 mU/l und im rohen Rahm 211,0 mU/l gemessen. Bei Kuhmilch [84] sind 65% der ursprünglich im Rahm vorhandenen Enzymaktivität und bei Büffelmilch [108] 43,2% in die Buttermilch übergegangen, was auf eine lockere Bindung des Enzyms an die Fettkügelchenmembran hinweist. In der Magermilch ist die Xanthinoxidase nicht mit dem Kasein verbunden [84].

Auch andere Milchprodukte enthalten noch eine Xanthinoxidase-Aktivität. So ist ausser in roher Magermilch und in rohem Rahm auch in Sauerrahm und teilweise in Eiscreme, Kindernährmitteln, in kommerzieller Magermilch (pasteurisiert und homogenisiert), nicht aber in eingedampfter Milch, in Magermilchpulver und in erhitzten Milchprodukten wie in Buttermilch, Joghurt, Butter, Rahm sowie in verdorbenem Sauerrahm eine enzymatische Aktivität nachgewiesen worden [88, 90]. In verschiedenen Käsesorten ist eine Enzymaktivität noch vorhanden; so ist in 16 von 25 [90] und in 69 von 111 Käsen (im Durchschnitt  $72,0 \pm 7,6$  mU/g) [88] eine solche festgestellt worden, wobei in diesen beiden Untersuchungen die Resultate für einige Käse, wie Gouda, Parmesan, Cheddar, Ricotta, Cottage, Rahmkäse, nicht übereinstimmen. Verschiedene Faktoren können die Enzymaktivität eines Käses beeinflussen:

- Pasteurisieren der Milch,
- Erhitzen des Käses,
- Kuh- oder Ziegenmilch als Ausgangsprodukt,
- Typ der Kulturen oder Mikroorganismen für die Reifung (gewisse Mikroorganismen enthalten Xanthinoxidase [34, 35]),
- Behandlung von Provolone und Romanokäse mit Benzoylperoxid [88, 90].

## 10 Kühlen der Milch

Kuhmilch wird gewöhnlich nach dem Melken gekühlt. Untersuchungen über den Einfluss des Abkühlens von frisch gemolkener Rohmilch auf die Xanthinoxidase-Aktivität zeigen, dass sie dadurch stark erhöht wird. Da in den wenigsten Fällen in der Literatur angegeben ist, zu welchem Zeitpunkt die Lagertemperatur erreicht wurde, muss davon ausgegangen werden, dass

sich die Abkühlung im Verlaufe der ersten 24 Stunden vollzieht. Unter Einbezug dieser Werte ist im allgemeinen ein starkes Ansteigen der Enzymaktivität festzustellen (Tab. 3).

Einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat dabei die Geschwindigkeit, mit der die Milch abgekühlt wird. So erbrachte die Geschwindigkeit von 1,5 °C/Stunde bis zur Lagerungstemperatur von 6 °C eine wesentlich höhere Aktivität in der Magermilch als bei einer Abkühlung von 8 °C/Stunde. Dieses unterschiedliche Ansteigen wird der langsamen Abkühlungsgeschwindigkeit und der damit länger einwirkenden Abkühlungszeit zugeschrieben. Dadurch wird das Enzym teilweise von der Fettkügelchenmembran abgelöst und geht somit verstärkt in die Magermilch über [96, 167], in der nach einer 24stündigen Lagerung bei 4 °C 66–80% der Aktivität zu finden sind [85]. Auch die Beschädigung der Membran durch die beim Abkühlen auftretende Kristallisation der Triglyzeride dürfte zur Erhöhung der Aktivität beitragen [115].

Tab. 3. Einfluss des Abkühlens auf die Xanthinoxidase-Aktivität

	Zeit Stunden	Temp. °C		Aktivität		Einheit	Referenz
		Anfang	Ende	Anfang	Ende		
Rohmilch	0–22	30	0	0,1	ca. 28	mV/min	96,167
Rohmilch	0–4	37	0	11–12	ca. 15	mV/min	168
Vollmilch kath. <sup>1</sup> masch. <sup>2</sup>	3	25	5	0,24	1,70	µl O <sub>2</sub> /ml/min	87
				1,95	2,73	µl O <sub>2</sub> /ml/min	
Rohmilch	0–24		4	0,209	0,228	U/ml	91
Rohmilch	0–24	37	4	61,2	222,1	µl O <sub>2</sub> /ml/h	88
Vollmilch	0–24		5	45	72	mU/ml	169
Vollmilch	0–24		4	80	161	µl O <sub>2</sub> /ml/h	85
Rohmilch	0–24		4	20,8	ca. 237	mU/ml	91
Vollmilch verarbeitet	0–24		4	12 %iger	Anstieg		88
Magermilch kath. <sup>1</sup> masch. <sup>2</sup>	3			0,32	0,77	µl O <sub>2</sub> /ml/h	87
				0,77	0,95	µl O <sub>2</sub> /ml/h	
Magermilch	0–24		5	20	37	µl O <sub>2</sub> /ml/h	169
Rahm	0–24		5	187	232	µl O <sub>2</sub> /ml/h	169

<sup>1</sup> kath. = mit einem Katheter gewonnen.

<sup>2</sup> masch. = mit der Maschine gemolken.

<sup>3</sup> keine Angaben.

## 11 Kühlung der Milch

Durch eine Lagerung der Milch, die nach der Abkühlung während mehreren Tagen bei tiefen Temperaturen aufbewahrt wird, verändert sich im allgemeinen die Xanthinoxidase-Aktivität nicht mehr allzu stark, meist ist ein Absinken festzustellen (Tab. 4). Bei der Untersuchung von CERBULIS und FARRELL [90], bei der ein Anstieg nachgewiesen wurde, kann aus den vorhandenen Unterlagen nicht zwischen der Wirkung der Abkühlung und der Lagerung unterschieden werden.

Bei der Kühlung steigt die membrangebundene Xanthinoxidase-Aktivität in der Buttermilch um 124 % an, was auf gewisse strukturelle Veränderungen in der Fettkügelchenmembran hindeutet, während diejenige in der Magermilch nicht beeinflusst wird. Die Aktivität der freien Xanthinoxidase sinkt in der Buttermilch um 21 %, während sich diejenige in der Magermilch um 164 % erhöht [169].

Tab. 4. Veränderung der Xanthinoxidase-Aktivität während der Lagerung bei tiefen Temperaturen

Milch	Zeit	Temperatur °C	XO-Aktivität		Einheit	Referenz
			Anfang	Ende		
Roh	6d	2	110±25	124±30	mU/ml	90
<sup>a</sup> Brown Swiss	6.–12.d	2	101,0	89,8	mU/ml	90
Holstein	6.–12.d	2	97,4	90,5	mU/ml	90
Guernsey	6.–12.d	2	86,2	101,0	mU/ml	90
Ayrshire	6.–12.d	2	85,2	79,7	mU/ml	90
Jersey	6.–12.d	2	125,0	105,0	mU/ml	90
Milking Shorth.	6.–12.d	2	59,3	39,7	mU/ml	90
Roh mager	90h	6	keine Veränderung			96,167
Roh	4.–72.h	0	unverändert			168
Roh	24.–48.h	4	unverändert			85
Roh	2.–4.d	4	leicht abfallend			91
Roh frisch	2.–7.d	4	langsamer Abfall			88
Vollmilch verarbeitet	2.–10.d	4	fluktierend			88
Mager	10d	4	geringe Veränderung			88
Konsummilch:	6d	2	39,2	43,3 (15) <sup>b</sup>	mU/ml	90
pasteurisiert			45,1	47,8 (9) <sup>b</sup>	mU/ml	90
homogenisiert	9d	2	47,8	40,4 (9) <sup>b</sup>	mU/ml	90

<sup>a</sup> Die Werte vor dem Beginn der Lagerung sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

<sup>b</sup> Anzahl Proben.

## 12 Gefrieren der Milch

Eine Aufbewahrung der frischen Rohmilch bei Temperaturen von –20 °C erhöht nach 3 Tagen die Aktivität um beinahe das 15fache auf 579,6 mU/ml [88]. Ebenso führt eine Lagerung der frischen Milch bei –21 °C während 12 Stunden zu einem zwei- bis vierfachen Anstieg der Aktivität gegenüber dem ursprünglichen Wert [168]. Eine Aufbewahrung von verarbeiteter Vollmilch bei –20 °C verändert die Enzymaktivität nur wenig [88], und eine eingefrorene Milch hat nach drei Jahren etwa einen Drittel seiner Aktivität verloren [90].

## 13 Mechanische Behandlung der Milch

Die Rohmilch wird zwischen der Erzeugung und dem Konsum einer immer stärker werdenden mechanischen Beanspruchung ausgesetzt, die durch eine zunehmende Automatisierung in der Milchindustrie und die immer länger werdenden Lagerzeiten bedingt ist. Dabei kann die Milch bewegt, geschüttelt, gerührt sowie durch andere Strömungsvorgänge mechanisch beansprucht werden. Bei folgenden Bedingungen der mechanischen Behandlung nimmt die Xanthinoxidase-Aktivität der Milch zu:

- Schütteln bei 25 °C und Rühren während 5–35' [170];
- Mixen bei 5000 min<sup>-1</sup> während 20' bei 15 und 25 °C (membrangebundene Xanthinoxidase in Kuh- und Büffelmilch) [171];
- Rühren mittels eines Magnetrührers während 1–2 Stunden [168];
- Rühren mit Hilfe eines Propeller-Rührwerkes (480 min<sup>-1</sup>) bis 100' oder eines Strahlmischers (2860 min<sup>-1</sup>) bis 2' und 4' [172, 173];
- Strömen bei Reibungsschubspannungen von 1–9,8 Pa während 5–30' [167, 174].

Entscheidend ist dabei die Zeit, während der die Milch der mechanischen Behandlung ausgesetzt ist, sowie die Art der Milch (Voll- oder Magermilch). So beginnt die Enzymaktivität bei einer Reibungsschubspannung von 1 Pa, beim Übergang von der laminaren in die turbulente Strömung, anzusteigen und weist bei 9,8 Pa nach 5 Min. eine Zunahme von über 40% und nach 30 Min. eine solche von über 50% auf; dabei nehmen Voll- und Magermilch in ihrer Aktivität unterschiedlich zu [167, 174]. Auch der Druck, der im folgenden Kapitel unter Homogenisieren eingehend behandelt wird, und der Ultraschall [170] beeinflussen die Enzymaktivität. Daneben treten durch diese Vorgänge am Milchlipp noch weitere Veränderungen auf [175]; erste sensorisch feststellbare Geschmacksabweichungen erfolgen jedoch erst bei Reibungsschubspannungen von 14,7 Pa [106].

Die Veränderungen durch die mechanische Behandlung der Milch beruhen auf einer mehr oder weniger quantitativen Ablösung des Enzyms von der Fettkügelchenmembran durch die daran angreifenden Druck- und Schubspannungskräfte [96, 167]. Dies zeigt sich beispielsweise in einem Aktivitätsanstieg in der Magermilchfraktion sowohl nach der Durchströmung der Milch mit Luft, Stickstoff oder Sauerstoff als auch mit gleichzeitigem Rühren [81]. Ein 100%iger Anstieg der Aktivität von membrangebundener Xanthinoxidase in Kuh- und Büfelmagermilch ist nach dem Rühren bei einer Temperatur von 15 °C zu beobachten [171].

#### 14 Homogenisieren der Milch

Als ein Spezialfall der mechanischen Behandlung der Milch ist der Einfluss des Homogenisierens auf die Xanthinoxidase-Aktivität näher zu erläutern. Dieses milchtechnische Verfahren, dessen Einfluss auf die Fettkügelchen und die dabei auftretenden physikalischen Erscheinungen sowie der ernährungsphysiologische Wert der homogenisierten Milch sind ausführlich beschrieben worden [176–179].

Das Ziel des Homogenisierens von Milch und Rahm ist die Verhinderung der Phasentrennung. Dies wird durch die Reduktion des mittleren Durchmessers der in diesen Produkten vorhandenen Fettkügelchen erreicht. So beträgt der Durchmesser in nichthomogenisierter Milch 3,5 µm und in homogenisierter Milch weniger als 1 µm. So ist er bei einem Homogenisationsdruck von 50 bar 0,90 µm und bei einem solchen von 150 bar 0,46 µm (es handelt sich dabei um den Mittelwert der mit der Fettoberfläche gewichteten Verteilung) [180]. Mit dieser Reduktion gehen gleichzeitig eine Zunahme der Anzahl der Fettkügelchen (etwa um den Faktor 100) — was sich anschaulich im elektronenmikroskopischen Bild zeigen lässt [181] — und eine Vergrößerung der Oberfläche um den Faktor 6–10 einher [178, 182], was den Einbau von oberflächenaktivem Material aus dem Serum in eine neue Membran bedingt. Während des Homogenisierens werden Kaseine und undenaturierte Molkenproteine an die Grenzschicht zwischen Fett und Serum absorbiert [183]; so sind im elektronenmikroskopischen Bild die Fettkügelchen in homogenisierter Milch und im Rahm von kleinen und grossen Kaseinmizellen sowie nichtmizellarem Protein umgeben [181, 183].

Das Homogenisieren der Milch erhöht im allgemeinen die Xanthinoxidase-Aktivität [85, 91, 93, 94, 168, 170]. So steigt bei 7 ungekühlten Milchproben die Aktivität um 59–89% gegenüber frischer Rohmilch an [85]. Zwischen der Enzymaktivität und dem Druck beim Homogenisieren kann eine lineare Beziehung innerhalb des Druckbereichs von 6,9–27,5 MPa aufgezeigt werden, wobei ein zusätzlicher Homogenisationsdruck von 0,1 MPa einen Anstieg von 0,16 mU/ml nach sich zieht [91]. Auch die zweistufige Homogenisation von rekombinierter Milch führt zu einer höheren Enzymaktivität in Abhängigkeit des angewendeten Druckes [94]. In einem aus pasteurisierter Milch (90 °C während 15 Sek.) hergestelltem Konzentrat mit 50% Trockenmasse steigert sich die Aktivität beim Homogenisationsdruck von 31,0 und 41,4 MPa, jedoch nicht bei 55,2 MPa. Beim Druck von 31,0 MPa wird nach einer

vorangehenden Pasteurisierung der Milch bei 62 °C während 30 Minuten eine Verminderung, jedoch bei einer Pasteurisierung bei 74 °C während 15 Sekunden keine Veränderung der Enzymaktivität des Konzentrates festgestellt [93]. In drei Milchproben aus einer Molkerei, die im rohen Zustand 109,2 mU/ml enthielten, hat sich nach dem Homogenisieren die Enzymaktivität auf 31,9 mU/ml vermindert (eine Probe davon zeigte 0), was nach den Autoren auf die routinemässige Erwärmung der Milch auf 60–65 °C vor dem Homogenisieren zurückzuführen sein dürfte [90].

Bei einer an die Homogenisation anschliessenden Lagerung bei 4 °C steigt die Enzymaktivität während den ersten 24 Stunden an, fällt aber nachher ab. Die Regressionsanalyse der Xanthinoxidase-Aktivität bei den vier angewendeten Druckbedingungen [17,2, 20,7, 24,1 und 27,6 MPa] über die Zeit ergab kubische Funktionen [91].

#### 15 Erhitzen der Milch

Die Aktivierung wie auch die Inaktivierung der Xanthinoxidase beim Erhitzen der Kuhmilch hängt im wesentlichen von den angewendeten Temperatur/Zeit-Bedingungen ab (Abb. 1). Es

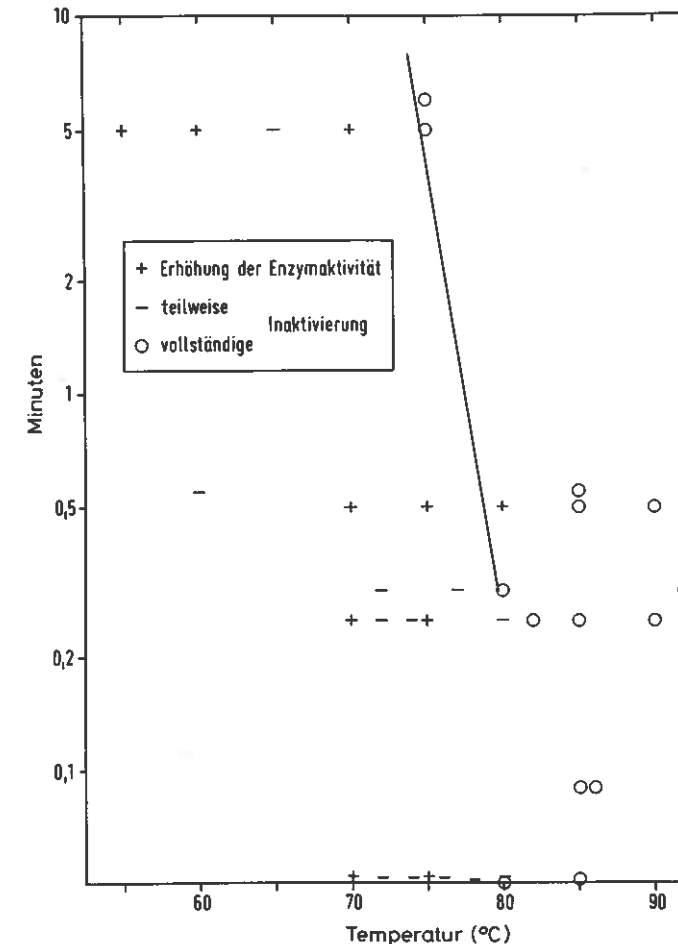


Abb. 1. Zeit/Temperatur-Bedingungen für die Aktivierung bzw. Inaktivierung der Xanthinoxidase in der Milch.

ist möglich, dass durch die Erhitzung der Milch, die ein aktives und ein inaktives Enzym [77] enthält, letzteres dadurch aktiviert wird [76]. Inhibitoren und Aktivatoren werden durch eine Erhitzung der Milch auf 91,4 °C während 4,2 Sek., bei der die Xanthinoxidase inaktiv ist, nicht beeinflusst [184].

Der Einfluss der Wärme ist nach verschiedenen Autoren in einem Temperaturbereich von 55–70 °C aktivitätssteigernd (Tab. 5). So wird beispielsweise die Aktivität der freien wie der membrangebundenen Xanthinoxidase bei der Erhitzung bei 60 °C während 5 Minuten in Buttermilch und Magermilch erhöht [169].

Demgegenüber stehen jedoch Beobachtungen, die bereits bei diesen Temperaturen auf eine teilweise Inaktivierung der Xanthinoxidase hindeuten (Abb. 1). Nach ZITTLE et al. [80] ist Magermilch bei 55, 60, 65 und 75 °C während 0–20 Minuten durchwegs eine Aktivitätsverminderung festzustellen. Auch eine Temperaturbehandlung auf 60 °C während 35 Sekunden führt zu einer teilweisen Inaktivierung; dabei fällt mit steigender Temperatur die Enzymaktivität sukzessive ab, wobei aber bei 64–65 °C und bei 70 °C ein unregelmässiger Kurvenverlauf festzustellen ist [185]. In Übereinstimmung damit zeigt sich bei der thermischen Denaturierung bei 61,4 °C ein erstes Denaturierungsmaximum [186]. Bei einer gleichbleibenden Temperatur von 65 °C sinkt die Aktivität in den ersten 3 Minuten auf einen Drittel des Ausgangswertes ab und ist nach 15 Minuten noch nachweisbar [93]. Ebenso führen folgende Temperatur-/Zeit-Bedingungen zu einer teilweisen Inaktivierung des Enzyms:

60, 65 und 70 °C während 5 Minuten [91];  
60–80 °C während 35 Sekunden [185];  
62 °C während 30 Minuten [93];  
72 °C während 15 [93] und 20 Sekunden [152];  
74 °C während 15 Sekunden [93];  
77 °C während 18 Sekunden [158];  
72, 74, 76, 78 °C momentan [87] und  
80 °C während 0 und 15 Sekunden [83].

Eine vollständige oder fast vollständige Inaktivierung der Xanthinoxidase in der Kuhmilch wird je nach den angewendeten Zeiten bei Temperaturen von über 75–80 °C erreicht (Abb. 1 und Tab. 6); in diesem Temperaturbereich (77,6 °C) ist bei der Differential-Scanning-Kalorimetrie ein weiteres Denaturierungsmaximum zu verzeichnen [186]. Einzig ZMARLICKI et al. [83] berichten nach einer Temperaturbehandlung bei 80 °C während 30 Sekunden noch von einer durchschnittlichen Erhöhung der Enzymaktivität um 55 %, nicht aber nach 0 und 15 Sekunden Heisshaltezeit (Tab. 5). Bei 75 °C und 5 Minuten Heisshaltezeit ist das Enzym praktisch inaktiv [80, 91], aber nach einer solchen von 35 Sekunden ist noch eine Aktivität von 45–

Tab. 5. Erhöhung der Xanthinoxidase-Aktivität in Milch und Milchprodukten durch verschiedene Erhitzungsbedingungen

	Temperatur °C	Zeit Sekunden	Erhöhung in %	Autor
Vollmilch	55	300	13	DEMOTT und PRAEPANITCHAI [91]
Vollmilch	60	300	38	BHAVADASAN und GANGULI [169]
Magermilch	60	300	30	BHAVADASAN und GANGULI [169]
Rahm	60	300	43	BHAVADASAN und GANGULI [169]
Vollmilch	70	300	60–105	GUDNASON und SHIPE [85]
Vollmilch	70	0, 15, 30	73, 43, 94	ZMARLICKI et al. [83]
Vollmilch	75	0, 15, 30	53, 23, 50	ZMARLICKI et al. [83]
Vollmilch	80	30	55	ZMARLICKI et al. [83]

Tab. 6. Temperatur/Zeit-Bedingungen, bei denen die Xanthinoxidase vollständig inaktiviert wird

Temperatur °C	Zeit Sekunden	Autor
75	300	DEMOTT und PRAEPANITCHAI [91]
75	360	ZITTLE et al. [80]
80	momentan	THOMASOW und MROWETZ [87]
80	20	MONGET et al. [62]
80	20	ALLEN und WRIEDEN [152]
82	15	BANDYOPADHYAY et al. [94]
85, 90	0, 15, 30	ZMARLICKI et al. [83]
84–85	35	KIERMEIER und VOGT [185]
85	900	POLONOVSKI et al. [187]
85	5	KIERMEIER und VOGT [185]
86	3–5	KIERMEIER und VOGT [185]
90	15	GREENBANK und PALLANSCH [93]
92	20	BLANC [95]

60 % vorhanden [185]. Nach einer Temperaturanwendung von 80 °C während 15 Sekunden ist noch eine Aktivität unter 10 % [94], bei der gleichen Temperatur während 5 Sekunden eine solche von 17–42 % [185] nachzuweisen. Bei Temperaturen von 85 und 90 °C während 0, 15 und 30 Sekunden verbleiben noch Restaktivitäten von 0,5–1,8 % [83].

In pasteurisierter Milch ist eine Aktivität von 0,142–0,150 mU/g gegenüber 0,263–0,270 mU/g der frischen Milch [89] und in bei 74 °C während 15 Sekunden erhitzter Milch eine solche von 80 % [188] nachgewiesen worden. Ultraheerhitzte und sterilisierte Milch weisen keine Xanthinoxidase-Aktivität mehr auf [95, 188].

## 17 Beeinflussung der Xanthinoxidase-Aktivität durch Homogenisieren und Erhitzen

Die gleichzeitige Anwendung des Homogenisierens und des Erhitzens der Milch führt zu einer Verminderung der Xanthinoxidase-Aktivität.

So fällt nach dem Homogenisieren und anschliessendem Pasteurisieren der Milch die Xanthinoxidase-Aktivität ab [189]. Nach der Hitzebehandlung der Milch (77 °C, 18 Sek.) ergibt die Homogenisierung bei 13,8 MPa eine zusätzliche Verminderung [158]. Nach der molkereimässigen Verarbeitung von roher, gekühlter Sammelmilch, die eine Aktivität von 110 ± 25 mU/ml aufweist, zeigt sich in der homogenisierten, pasteurisierten Konsummilch eine mittlere Enzymaktivität von 34,2 mU/ml, in pasteurisierter, homogenisierter, mit Vitamin D angereicherter Milch (18 Proben) eine solche von 38,6 ± 20,3 mU/ml [90] und in kommerziell verarbeiteter Vollmilch eine solche von 63,0 ± 6,5 mU/ml; dabei weisen jene 4 von 12 Firmen, die eine Hochpasteurisierung durchführen, die niedrigsten Werte auf [88]. Auch nach Ho und CLIFFORD [190] ist in homogenisierter Konsummilch eine um 59 % geringere Aktivität gegenüber frischer Milch festzustellen. In homogenisierter, pasteurisierter Konsummilch (Vollmilch und Drink) wie auch in homogenisierter, uperisierter Milch verschiedener schweizerischer Molkereien hat keine Xanthinoxidase-Aktivität mehr festgestellt werden können; die bei der Pasteurisierung angewendeten Temperaturen liegen oberhalb 85 °C und die Heisshaltezeit meist zwischen 10 und 20 Sekunden [191]. Nach der Homogenisierung und Kurzzeiterhitzung auf 140 °C während 5 Sekunden wird die Xanthinoxidase praktisch inaktiviert [89]. Eine Lagerung der ultraheerhitzten Milch bei 4 °C während 4 Wochen [191] wie auch eine solche von uperisierter und sterilisierter Milch bei Raumtemperatur während 3 und 6 Monaten [188] haben zu keiner Reaktivierung der Enzymaktivität geführt.

Nach einer 5tägigen Lagerung der Milch bei 4°C ist die Hitzeempfindlichkeit der Xanthinoxidase gegenüber einer eintägigen Lagerung erhöht. Die Kombination: 24stündige Lagerung, Homogenisieren und Erhitzen führt gegenüber der unhomogenisierten oder frischen Milch zu grösseren Aktivitätsverlusten [85].

## 16 Weitere Einflüsse

Die Inkubation von frischer, ungekühlter Milch mit lipolytischen und proteolytischen Enzymen wie Steapsin, Lactivase und Pankreatin erbringt eine Aktivitätssteigerung der Xanthinoxidase von 80–110% [85]. Auch der Zusatz von Lab, Pankreatin, Trypsin und Chymotrypsin führt zu einer Aktivitätssteigerung um das Doppelte und im Falle des Labenzym bis auf das Vierfache gegenüber der unbehandelten Rohmilch, während Carboxypeptidase nicht aktivierend wirkt [192]. Diese Aktivitätssteigerung ist dadurch zu erklären, dass die Xanthinoxidase durch diese enzymatischen Behandlungen von der Fettkügelchenmembran abgelöst oder in Monomere zerlegt wird [101, 102, 193].

Detergentien wie Laurylsulfat und Tween 60 führen zu einer Aktivitätssteigerung des Enzyms [170]. Die Isolierung des Enzyms aus Kuhmilch mit Hilfe von Detergentien (Desoxycholat, Triton X100) ergibt im angereicherten Extrakt eine höhere Aktivität als eine Isolierung mit Pankreaslipase [194]; ebenso erhöht sich die Enzymaktivität einer Membransuspension der Fettkügelchen von Büffelmilch nach der Behandlung mit denselben Detergentien wie auch von Tween 20 [195]. Daneben existieren verschiedene chemische Substanzen, die in geringen Mengen wie auch bei kurzen Anwendungszeiten die Xanthinoxidase-Aktivität der Milch erhöhen, bei stärkeren Konzentrationen und längerer Dauer dieselbe hemmen [187, 192].

## 17 Schlussfolgerung

Die milchtechnologischen Verfahren

- Kühlen
- mechanische Behandlung (Rühren, Strömen)
- Homogenisieren

erhöhen im allgemeinen die Xanthinoxidase-Aktivität der Milch. Durch die Lagerung bei tiefen Temperaturen wird sie nicht mehr weiter beeinflusst. Beim Erhitzen sind die Einflüsse zu differenzieren. In einem Temperaturbereich von 55–70°C, in einem Einzelfall bis 80°C wird nach einigen Autoren die Aktivität erhöht, nach anderen wird die Xanthinoxidase bei diesen Temperaturen teilweise und bei einer Behandlung von über 80°C vollständig inaktiviert.

Die Milch wird heute, bevor sie zum Konsumenten gelangt, meist folgenden Verfahrensschritten unterworfen:

Mechanische Behandlung beim Melken — Abkühlen auf 4°C auf dem Bauernhof — mechanische Behandlung während des Transportes zur Molkerei — Erwärmen — Homogenisieren — Erhitzen.

Unter diesen Umständen kommt es zu einer Erhöhung der Xanthinoxidase-Aktivität in der Milch. Durch das abschliessende Pasteurisieren oder Ultraheizerhitzen wird die Aktivität vermindert, oder das Enzym wurde inaktiviert.

## DANK

Herrn Dr. M. RÜEGG danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

## RÉSUMÉ

*Présence de la xanthine-oxydase et influence des traitements technologiques sur son activité dans le lait de vache — une revue*

Le chercheur américain OSTER considère la xanthine-oxydase du lait comme un nouveau facteur de risques pour les cardiopathies coronaires. Cet article de revue rapporte sur la présence de cette enzyme dans des systèmes biologiques. On rencontre la xanthine-oxydase dans différents organes du corps humain et elle est indicatrice de plusieurs maladies. Elle a été détectée dans le lait de nombreux mammifères.

Parmi les diverses xanthines-oxydases, celle du lait de vache est la plus fréquemment analysée parce que ce lait est disponible en grande quantité et qu'il contient cette enzyme à un taux très élevé. Son poids moléculaire est de 150 000 environ. Les effets que les traitements technologiques tels que refroidissement, stockage à basses températures, congélation, traitement mécanique, homogénéisation et chauffage exercent sur l'activité de la xanthine-oxydase dans le lait de vache ont été étudiés à fond. La plupart de ces traitements augmentent, en général, l'activité de cette enzyme, alors qu'un traitement thermique final à plus de 80°C peut contribuer à l'inactiver.

## ABSTRACT

*Occurrence of xanthine oxidase and influence of milk processing on its activity in bovine milk — A review*

According to the American scientist OSTER, the presence of xanthine oxidase in milk is a new risk factor for coronary heart diseases. The review reports on the occurrence of this enzyme in biological systems. Xanthine oxidase is found in several organs of the human body and is a sensitive indicator for various diseases. It has been detected in the milk of many mammals.

Of all xanthine oxidases that of bovine milk is the most frequently investigated one because of the great quantity of milk available and due to its high level. Its molecular weight is about 150 000. The paper studies in detail the effects that milk processing techniques such as cooling, low temperature storage, freezing, mechanical treatment, homogenization and heating exert on bovine xanthine oxidase. Most of these techniques increase the activity of this enzyme, whereas a final heat treatment of milk at temperatures of over 80°C may contribute to its inactivation.

## LITERATUR

- 1 BRAY, R.C.: in «The Enzymes» Vol. XII B, 299–419, 1975.
- 2 FRIED, R., FRIED, L.W., BABIN, D.R.: Eur. J. Biochem. 33, 439–445, 1973.
- 3 McCORD, J.M., FRIDOVICH, I.: J. Biol. Chem. 243, 5753–5760, 1968.
- 4 TOPHAM, R.W., WOODRUFF, J.H., WALKER, M.C.: Biochem. 20, 319–324, 1981.
- 5 TOPHAM, R.W., WALKER, M.C., CALISCH, M.P., WILLIAM, R.W.: Biochem. 21, 4529–4535, 1982.
- 6 BERGMANN, F., LEVENE, L., TAMIR, I., RAHAT, M.: Biochim. Biophys. Acta 484, 275–289, 1977.
- 7 BERGMANN, F., FRANK, A., GOVRIN, H.: Biochim. Biophys. Acta 570, 215–220, 1979.
- 8 PAN, S.-S., BACHUR, N.R.: Mol. Pharmacol. 17, 95–99, 1980.
- 9 JOSEPHY, P.D., PALCIC, B., SKARSGARD, L.D.: Biochem. Pharmacol. 30, 849–853, 1981.
- 10 WAUD, W.R., RAJAGOPALAN, K.V.: Arch. Biochem. Biophys. 172, 365–379, 1976.
- 11 BATELLI, M.G., LORENZONI, E., STIRPE, F.: Biochem. J. 131, 191–198, 1973.
- 12 CLARE, D.A., BLAKISTONE, B.A., SWAISGOOD, H.E., HORTON, H.R.: Arch. Biochem. Biophys. 211, 44–47, 1981.
- 13 BATELLI, M.G.: FEBS Lett. 113, 47–51, 1980.
- 14 KRENITSKY, T.A., TUTTLE, J.V.: Arch. Biochem. Biophys. 185, 370–375, 1978.
- 15 OSTER, K.A.: Am. J. Clin. Res. 2, 30–35, 1971.
- 16 MORGAN, E.J.: Biochem. J. 20, 1282–1291, 1926.
- 17 WATTS, R.W.E., WATTS, J.E.M., SEEGMILLER, J.E.: J. Lab. Clin. Med. 66, 688–697, 1965.
- 18 RAMBOER, C.H.: J. Lab. Clin. Med. 74, 828–835, 1969.
- 19 SHAMMA'A, M.H., NASRALLAN, S., CHAGLIASSIAN, T., KACHADURIAN, A.K., AL-KHALIDI, U.A.S.: Gastroenterology 48, 226–230, 1965.



20 SHAMMA'A, M.H., NASRALLAH, S.M., AL-KHALIDI, U.A.S.: Digest Dis. 18, 15—22, 1973.  
 21 KRENITSKY, T.A., TUTTLE, J.V., CATTAN, E.L. jr., WANG, P.: Comp. Biochem. Physiol. 49B, 687—703, 1974.  
 22 AMORY, N., DELBARRE, F., AUSCHER, C.: C.R. Acad. Sci. Paris 287, 1007—1009, 1978.  
 23 RAMBOER, C., PIENSSENS, F., DE GROOTE, J.: Digestion 7, 183—195, 1972.  
 24 MANGAT, I.S., PAMNANI, S.: Ind. J. Cancer 14, 317—319, 1977.  
 25 AL-KHALIDI, U.A.S., CHAGLIASSIAN, T.H.: Biochem. J. 97, 318—320, 1965.  
 26 McHALE, A., GRIMES, H., COUGHLAN, M.P.: Int. J. Biochem. 10, 317—319, 1979.  
 27 AL-KHALIDI, U.A.S., GEHA, R.S.: Clin. chim. Acta 14, 833—835, 1966.  
 28 GILER, S., SPERLING, O., BROSH, S., URCA, I., DE VRIES, A.: Clin. Chim. Acta 63, 37—40, 1975.  
 29 KIZAKI, H., MATSUO, I., SAKURADA, T.: Clin. Chim. Acta 75, 1—4, 1977.  
 30 BHIDE, S.V., SHAH, S., DESAI, M.P.: Biochem. Med. 9, 386—389, 1974.  
 31 WURZINGER, K.-H., HARTENSTEIN, R.: Comp. Biochem. Physiol. 49B, 171—185, 1974.  
 32 SACKLER, M.L.: J. Histochem. Cytochem. 14, 326—333, 1965.  
 33 KUMAR, R., TANEJA, V.: Biochim. Biophys. Acta 485, 489—491, 1977.  
 34 VILLELA, G.G., AFFONSO, O.R., MITIDIERI, E.: Arch. Biochem. Biophys. 59, 532—533, 1955.  
 35 WOOLFOLK, C.A., DOWNARD, J.S.: J. Bacteriol. 130, 1175—1191, 1977.  
 36 WOOLFOLK, C.A., DOWNARD, J.S.: J. Bacteriol. 135, 422—428, 1978.  
 37 MACHIDA, Y., NAKANISHI, T.: Agr. Biol. Chem. 45, 425—432, 1981.  
 38 LYON, E.S., GARRETT, R.H.: J. Biol. Chem. 253, 2604—2614, 1978.  
 39 OHE, T., WATANABE, Y.: J. Biochem. 86, 45—53, 1979.  
 40 VOGELS, G.D., VAN DER DRIFT, C.: Bacteriol. Rev. 40, 403—468, 1976.  
 41 CLYNES, M.M., HURLEY, M.P., SHANNON, M.F.: Biochem. Soc. Transact. 7, 72—74, 1979.  
 42 MORGAN, E.J., STEWART, C.P., HOPKINS, F.G.: Proc. Roy. Soc. B (London) 94, 109, 1922.  
 43 DUKE, E.J., JOYCE, P., RYAN, J.P.: Biochem. J. 131, 187—190, 1973.  
 44 LEVINSON, D.J., CHALKER, D.: Arthritis Rheum. 23, 77—82, 1980.  
 45 TUBARO, E., LOTTI, B., CAVALLO, G., CROCE, C., BORELLI, G.: Biochem. Pharmacol. 29, 1939—1943, 1980.  
 46 TUBARO, E., LOTTI, B., SANTIANGELI, C., CAVALLO, G.: Biochem. Pharmacol. 29, 1945—1948, 1980.  
 47 HO, C.Y., BARR, L.G., CLIFFORD, A.J.: Biochem. Genetics 17, 209—221, 1979.  
 48 SCHARDINGER, F.: Z. Unters. Nahrungs.-Genussm. 5, 1113—1121, 1902.  
 49 DIXON, M.: Enzymologia 5, 198, 1938—39.  
 50 BALL, E.G.: J. Biol. Chem. 128, 51—67, 1939.  
 51 CORRAN, H.S., DEWAN, J.G., GORDON, A.H., GREEN, D.E.: Biochem. J. 33, 1694—1706, 1939.  
 52 AVIS, P.G., BERGEL, F., BRAY, R.C., SHOOTER, K.V.: Nature 173, 1230, 1954.  
 53 AVIS, P.G., BERGEL, F., BRAY, R.C.: J. Chem. Soc. 1100—1105, 1955.  
 54 ZIKAKIS, J.P., RZUCIDLO, S.J., BIASOTTO, N.O.: J. Dairy Sci. 60, 533—541, 1977.  
 55 MODI, V.V., OWEN, E.C.: Nature 178, 1120, 1956.  
 56 MODI, V.V., OWEN, E.C., PROUDFOOT, R.: Proc. Nutr. Soc. 18, i, 1959.  
 57 KIERMEIER, F., HAISCH, K.: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 115, 416—417, 1961.  
 58 MITTAL, V.K., MATHUR, M.P.: Ind. J. Dairy Sci. 28, 296—297, 1975, zit. Dairy Sci. Abstr. 38, 623, 1976.  
 59 CROSSLAND, A., OWEN, E.C., PROUDFOOT, R.: Brit. J. Nutr. 12, 312—329, 1958.  
 60 GANDHI, M.P.S., AHUJA, S.P.: Zbl. Vet. Med. A 26, 765—769, 1979.  
 61 SHARMA, R.S., GANGULI, N.C.: Enzymologia 40, 337—344, 1971.  
 62 MONGET, D., GELIN, M., LAVIOLETTE, P.: Lait 59, 117—124, 1979.  
 63 WÜTHRICH, S., RICHTERICH, R., HOSTETTLER, H.: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 124, 336—344, 1964.  
 64 RODKEY, F.L., BALL, E.G.: J. Lab. Clin. Med. 31, 354—356, 1946.  
 65 BELAVADY, B.: Ind. J. Med. Res. 48, 654—660, 1960.  
 66 BRADLEY, P.L., GUNTHER, M.: Biochem. J. 74, 15P, 1960.  
 67 OWEN, E.C., HYTTEN, F.E.: Proc. Nutr. Soc. 19, XXVIII, 1960.  
 68 DEODHAR, A.D., RAJALAKSHMI, R., RAMAKRISHNAN, C.V.: Acta Paed. 53, 101—104, 1964.  
 69 GIBBS, D.A., ALLSOP, J., WATTS, R.W.E.: J. Molec. Med. 1, 167—170, 1976.  
 70 OWEN, E.C., HART, L.I., HYTTEN, F.E.: Proc. Nutr. Soc. 21, XV, 1961.  
 71 ZIKAKIS, J.P., DOUGHERTY, T.M., BIASOTTO, N.O.: J. Food Sci. 41, 1408—1412, 1976.

72 OLIVER, I., SPERLING, O., LIBERMAN, U.A., FRANK, M., DE VRIES, A.: Biochem. Med. 5, 279—280, 1971.  
 73 DE RENZO, E.C.: Adv. Enzymol. 17, 293—328, 1956.  
 74 BRAY, R.C.: in «The Enzymes» Vol. 7, 533, 1963.  
 75 HART, L.I., MCGARTOLL, M.A., CHAPMAN, H.R., BRAY, R.C.: Biochem. J. 116, 851—864, 1970.  
 76 MCGARTOLL, M.A., PICK, F.M., SWANN, J.C., BRAY, R.C.: Biochim. Biophys. Acta 212, 523—526, 1970.  
 77 EDMONDSON, D., MASSEY, V., PALMER, G., BEACHAM, L.M. III, ELION, G.B.: J. Biol. Chem. 247, 1597—1604, 1972.  
 78 NISHINO, T., NISHINO, T., TSUSHIMA, K.: FEBS Lett. 131, 369—372, 1981.  
 79 NAKAMURA, M., YAMAZAKI, I.: J. Biochem. 92, 1279—1286, 1982.  
 80 ZITTE, C.A., DELLAMONICA, E.S., CUSTER, J.H., RUDD, R.K.: J. Dairy Sci. 39, 522—527, 1956.  
 81 STANNARD, D.J.: J. Dairy Res. 42, 241—246, 1975.  
 82 ERWIN, R.E., RANDOLPH, H.E.: J. Dairy Sci. 58, 9—12, 1975.  
 83 ZMARLICKI, S., SATEK, A., KOPEC, A.: XX. Int. Milchwirt. Kongr. F. 324—325, 1978.  
 84 KITCHEN, B.J., TAYLOR, G.C., WHITE, I.C.: J. Dairy Res. 37, 279—288, 1970.  
 85 GUDNASON, G.V., SHIPE, W.F.: J. Dairy Sci. 45, 1440—1448, 1962.  
 86 HART, L.I., OWEN, E.C., PROUDFOOT, R.: Brit. J. Nutr. 21, 617—630, 1967.  
 87 THOMASOW, J., MROWETZ, G.: Milchwissenschaft 28, 233—237, 1973.  
 88 ZIKAKIS, J.P., WOOTERS, S.C.: J. Dairy Sci. 63, 893—904, 1980.  
 89 HALDEN, W.: Öst. Milchwirt. 29, 167, 1974.  
 90 CERBULLI, J., FARRELL, H.M. jr.: J. Dairy Sci. 60, 170—176, 1977.  
 91 DEMOTT, B.J., PRAEPANITCHAI, O.A.: J. Dairy Sci. 61, 164—167, 1978.  
 92 HOLBROOK, J., HICKS, C.L.: J. Dairy Sci. 61, 1072—1077, 1978.  
 93 GREENBANK, G.R., PALLANSCH, M.J.: J. Dairy Sci. 45, 958—961, 1962.  
 94 BANDYOPADHYAY, H.K., TANEJA, H.K., GANGULI, N.C.: Lebensm. Wiss. Technol. 12, 19—22, 1979.  
 95 BLANC, B.: Alimenta Sonderausgabe, 5—25, 1980.  
 96 BACK, W.-D., REUTER, H.: Milchwissenschaft 28, 137—141, 284—291, 1973.  
 97 MORTON, R.K.: Nature 171, 734, 1953.  
 98 ZITTE, C.A., DELLAMONICA, E.S., CUSTER, J.H., RUDD, R.K.: J. Dairy Sci. 39, 528—535, 1956.  
 99 DOWBEN, R.M., BRUNNER, J.R., PHILPOTT, D.E.: Biochim. Biophys. Acta 135, 1—10, 1967.  
 100 KITCHEN, B.J.: Biochim. Biophys. Acta 356, 257—269, 1974.  
 101 BRILEY, M.S., EISENTHAL, R.: Biochem. J. 143, 149—157, 1974.  
 102 BRILEY, M.S., EISENTHAL, R.: Biochem. J. 147, 417—423, 1975.  
 103 MATHER, I.H., WEBER, K., KEENAN, T.W.: J. Dairy Sci. 60, 394—402, 1977.  
 104 MANGINO, M.E., BRUNNER, J.R.: J. Dairy Sci. 60, 841—850, 1977.  
 105 KITCHEN, B.J.: J. Dairy Res. 44, 469—482, 1977.  
 106 MATHER, I.H., TAMPLIN, C.B., IRVING, M.G.: Eur. J. Biochem. 110, 327—336, 1980.  
 107 BHAVADASAN, M.K., GANGULI, N.C.: Ind. J. Biochem. Biophys. 13, 252—254, 1976.  
 108 BANDYOPADHYAY, A.K., GANGULI, N.C.: Milchwissenschaft 31, 425—428, 1976.  
 109 PATTON, S., KEENAN, T.W.: Biochim. Biophys. Acta 415, 273—309, 1975.  
 110 ANDERSON, M., CAWSTON, T.E.: J. Dairy Res. 42, 459—483, 1975.  
 111 MCPHERSON, A.V., KITCHEN, B.J.: J. Dairy Res. 50, 107—133, 1983.  
 112 FREUDENSTEIN, C., KEENAN, T.W., EIGEL, W.N., SASAKI, M., STADLER, J., FRANKE, W.W.: Exp. Cell Res. 118, 277—294, 1979.  
 113 FRANKE, W.W., HEID, H.W., GRUND, C., WINTER, S., FREUDENSTEIN, C., SCHMID, E., JARASCH, E.-D., KEENAN, T.W.: J. Cell Biol. 89, 485—494, 1981.  
 114 BUCHHEIM, W.: Naturwissenschaften 69, 505, 1982.  
 115 NIELSEN, C.S., BJERRUM, O.J.: Biochim. Biophys. Acta 466, 496—509, 1977.  
 116 MATHER, I.H., KEENAN, T.W.: J. Membrane Biol. 21, 65—85, 1975.  
 117 SWOPE, F.C., BRUNNER, J.R.: Milchwissenschaft 23, 470—473, 1968.  
 118 JARASCH, E.-D., BRUDER, G., KEENAN, T.W., FRANKE, W.W.: J. Cell Biol. 73, 223—241, 1977.  
 119 MATHER, I.H., SULLIVAN, C.H., MADARA, P.J.: Biochem. J. 202, 317—323, 1982.  
 120 BRUDER, G., HEID, H., JARASCH, E.-D., KEENAN, T.W., MATHER, I.H.: Biochim. Biophys. Acta 701, 357—369, 1982.

- 121 JARASCH, E.-D., GRUND, C., GRUBER, G., HEID, H.W., KEENAN, T.W., FRANKE, W.W.: *Cell* 25, 67—82, 1981.
- 122 BLAKISTONE, B.A., SISLER, E.C., AURAND, L.W.: *J. Dairy Sci.* 61, 168—175, 1978.
- 123 AVIS, P.G., BERGEL, F., BRAY, R.C., JAMES, D.W.F., SHOOTER, K.V.: *J. Chem. Soc.* 1212—1219, 1956.
- 124 ANDREWS, P., BRAY, R.C., EDWARDS, P., SHOOTER, K.V.: *Biochem. J.* 93, 627—632, 1964.
- 125 NELSON, C.A., HANDLER, P.: *J. Biol. Chem.* 243, 5368—5373, 1968.
- 126 WAUD, W.R., BRADY, F.O., WILEY, R.D., RAJAGOPALAN, K.V.: *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 695—701, 1975.
- 127 NATHANS, G.R., HADE, E.P.K.: *Biochim. Biophys. Acta* 526, 328—344, 1978.
- 128 MASSEY, V., BRUMBY, P.E., KOMAI, H., PALMER, G.: *J. Biol. Chem.* 244, 1682—1691, 1969.
- 129 NAGLER, L.G., VARTANYAN, L.S.: *Biochim. Biophys. Acta* 427, 78—90, 1976.
- 130 SULLIVAN, C.H., MATHER, I.H., GREENWALT, D.E., MADARA, P.J.: *Molec. Cellular Biochem.* 44, 13—22, 1982.
- 131 BIASOTTO, N.O., ZIKAKIS, J.P.: *J. Dairy Sci.* 58, 1238—1239, 1975.
- 132 KOBYLKA, D., CARRAWAY, K.L.: *Biochim. Biophys. Acta* 288, 282—295, 1972.
- 133 MANGINO, M.E., BRUNNER, J.R.: *J. Dairy Sci.* 58, 313—318, 1975.
- 134 MATHER, I.H.: *Biochim. Biophys. Acta* 514, 25—36, 1978.
- 135 NATHANS, G.R., HADE, E.P.K.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 66, 108—114, 1975.
- 136 SILVER, M.R., ZIKAKIS, J.P.: *J. Dairy Sci.* 62, (Suppl. 1) 234, 1979.
- 137 KELLOGG, E.W.III, FRIDOVICH, I.: *J. Biol. Chem.* 250, 8812—8817, 1975.
- 138 THOMAS, M.J., MEHL, K.S., PRYOR, W.A.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 83, 927—932 (1978); *J. Biol. Chem.* 257, 8343—8347, 1982.
- 139 AURAND, L.W., BOONE, N.H., GIDDINGS, G.G.: *J. Dairy Sci.* 60, 363—369, 1977.
- 140 HICKS, C.L., KORYCKA-DAHL, M., RICHARDSON, T.: *J. Dairy Sci.* 58, 796, 1976.
- 141 HILL, R.D.: *Aust. J. Dairy Technol.* 30, 26—28, 1975.
- 142 ASADA, K.: *Agr. Biol. Chem.* 40, 1659—1660, 1976.
- 143 KORYCKA-DAHL, M., RICHARDSON, T., HICKS, C.L.: *J. Food Protect.* 42, 867—871, 1979.
- 144 RAJAN, T.S., RICHARDSON, G.A., STEIN, R.W.: *J. Dairy Sci.* 45, 933—934, 1962.
- 145 AURAND, L.W., WOODS, A.E.: *J. Dairy Sci.* 42, 1111—1118, 1959.
- 146 AURAND, L.W., WOODS, A.E., ROBERTS, W.M.: *J. Dairy Sci.* 42, 961—968, 1959.
- 147 KIERMEIER, F., GRASSMANN, E.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 133, 310—317, 1966.
- 148 AURAND, L.W., CHU, T.M., SINGLETON, J.A., SHEN, R.: *J. Dairy Sci.* 50, 465—471, 1967.
- 149 SMITH, G.J., DUNKLEY, W.L.: *J. Dairy Sci.* 43, 278—280, 1960.
- 150 ASTRUP, H.N.: *J. Dairy Sci.* 46, 1425, 1963.
- 151 DELLAMONICA, E.S., CALHOUN, M.J., LAWSON, M.J., CRAIG, J.C. jr., ACETO, N.C.: *J. Dairy Sci.* 48, 602—604, 1965.
- 152 ALLEN, J.C., WRIEDEN, W.L.: *J. Dairy Res.* 49, 249—263, 1982.
- 153 ALLEN, J.C., HUMPHRIES, C.: *J. Dairy Res.* 44, 495—507, 1977.
- 154 BJÖRCK, L., CLAESSE, O.: *J. Dairy Sci.* 62, 1211—1215, 1979.
- 155 ZIKAKIS, J.P., TREECE, J.M.: *J. Dairy Sci.* 54, 648—654, 1971.
- 156 IZAK, S.: *Veterinarsky Casopis* No. 2 57—60 (1975), *zit. Dairy Sci. Abstr.* 38, 553, 1976.
- 157 KIERMEIER, F., VOGT, K.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 105, 194—197, 1956.
- 158 PEREIRA, R.R., KRISTOFFERSEN, T., HARPER, W.J.: *J. Dairy Sci.* 45, 645, 1962.
- 159 SINGH, L.N., GANGULI, N.C.: *Ind. J. Dairy Sci.* 28, 67—68, 1975, *zit. Dairy Sci. Abstr.* 38, 701, 1976.
- 160 HICKS, C.L.: *J. Dairy Sci.* 63, 1199—1204, 1980.
- 161 KIERMEIER, F., CAPELLARI, K.: *Naturwissenschaften* 44, 69, 1957.
- 162 KIERMEIER, F., CAPELLARI, K.: *Biochem. Z.* 330, 160—168, 1958.
- 163 KIERMEIER, F., VOGT, K.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 103, 355—361, 1956.
- 164 KIERMEIER, F., HEINRICH, C., MAIR-WALDBURG, H.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 119, 390—397, 1963.
- 165 KIERMEIER, F., STEGER, H.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 116, 344—348, 1962.
- 166 KIERMEIER, F., WILDBRETT, G., LETTENMAYER, L.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 133, 22—26, 1966.
- 167 BACK, W.-D.: *Dissertation, Universität Hannover*, 1975.
- 168 KIERMEIER, F., SOLMS-BARUTH, H.G.ZU: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 130, 291—295, 1966.
- 169 BHAVADASAN, M.K., GANGULI, N.C.: *J. Dairy Sci.* 63, 362—367, 1980.

- 170 ROBERT, L., POLONOVSKI, J.: *Discuss. Faraday Soc.* 20, 54—65, 1955.
- 171 BHAVADASAN, M.K., ABRAHAM, M.J., GANGULI, N.C.: *J. Dairy Sci.* 65, 1692—1695, 1982.
- 172 STELZER, E.: *Dechema-Monogr.* 77, 103—117, 1973.
- 173 SOLMS-BARUTH, H.G.ZU: *Dt. Milchwirt.* 22, 1370—1372, 1971.
- 174 REUTER, H.: *Milchwissenschaft* 33, 97—100, 1978.
- 175 KIRST, E.: *Nahrung* 24, 569—576, 1980.
- 176 MÜNSTER, W.: *Dt. Mol. Ztg.* 83, 2053—2057, 1962; 84, 7—9, 36—38, 98—100, 1963.
- 177 PRECHT, D.: *Kieler Milchwirt. Forschungsber.* 25, 29—47, 1973.
- 178 MULDER, H., WALSTRA, P.: *The milk fat globule. Centre for Agriculture Publishing and Documentation, Wageningen*, 1974.
- 179 TROUT, G.M.: *J. Dairy Sci.* 31, 627—655, 1948.
- 180 WALSTRA, P.: *Neth. Milk Dairy J.* 29, 279—294, 1975.
- 181 HENSTRA, S., SCHMIDT, D.G.: *Neth. Milk Dairy J.* 24, 45—51, 1970.
- 182 DOAN, F.J.: *Quart. Rev. Pediat.* 8, 194—201, 1953.
- 183 DARLING, D.F., BUTCHER, D.W.: *J. Dairy Res.* 45, 197—208, 1978.
- 184 HWANG, Q.-S., RAMACHANDRAN, K.S., WHITNEY, R.McL.: *J. Dairy Sci.* 50, 1723—1737, 1967.
- 185 KIERMEIER, F., VOGT, K.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 103, 198—211, 1956.
- 186 RÜEGG, M., MOOR, U., BLANC, B.: *J. Dairy Res.* 44, 509—520, 1977.
- 187 POLONOVSKI, M., BAUDU, L., NEUZIL, E.: *Lait* 29, 1—19, 128—140, 1949.
- 188 WÜTHRICH, S., RICHTERICH, R., HOSTETTLER, H.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 124, 345—348, 1964.
- 189 HICKS, C.L., JOHNSON, P.G., STOFER, W.C. jr.: *J. Dairy Sci.* 61, (Suppl. 1) 108—109, 1978.
- 190 HO, C.Y., CLIFFORD, A.J.: *J. Nutr.* 106, 1600—1609, 1976.
- 191 NICK, B.: *unveröffentlichte Resultate (1975); persönliche Mitteilung.*
- 192 KIERMEIER, F., SOLMS-BARUTH, H.G.ZU: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 132, 12—15, 1966.
- 193 KIERMEIER, F., SOLMS-BARUTH, H.G.ZU: *Naturwissenschaften* 52, 497 (1965).
- 194 ZIKAKIS, J.P., TREECE, J.M.: *J. Dairy Sci.* 53, 644, 1970.
- 195 BHAVADASAN, M.K., GANGULI, N.C.: *J. Dairy Sci.* 61, 697—700, 1978.