

Juni 1995 / 303 P/W

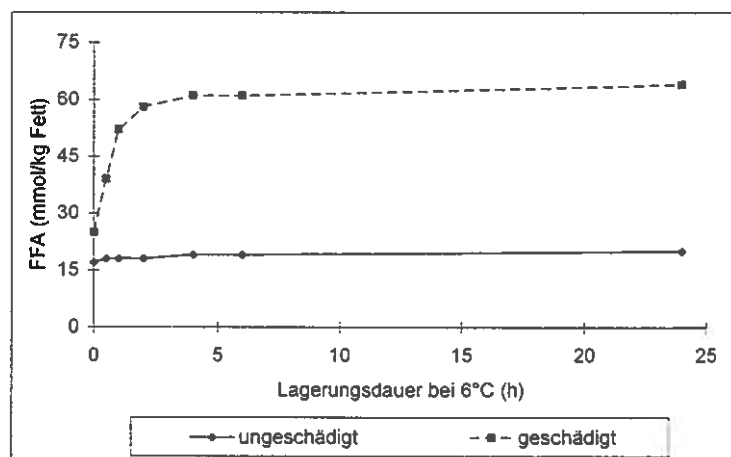
Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld-Bern

Die Bestimmung der freien Fettsäuren in Milch und Rahm

IV. Standardisierung der Extraktion von freien Fettsäuren und Untersuchung der Probenstabilität

V. Chemische und thermische Stabilisierung der Proben

M. Imhof, P. Knecht und J.O. Bosset



Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **86**, 157-181 (1995)

Die Bestimmung der freien Fettsäuren in Milch und Rahm

IV. Standardisierung der Extraktion von freien Fettsäuren und Untersuchung der Probenstabilität

The Determination of Free Fatty Acids in Milk and Cream

IV. Standardisation of the FFA-extraction and Study of the Sample Stability

Key words: Free fatty acids, Extraction, Titration, Sample stability, Milk, Cream

Miroslava Imhof, Paul Knecht und Jacques Olivier Bosset
Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft,
Liebefeld-Bern

Einleitung

Die kurz- und mittelkettigen freien Fettsäuren (von C4 bis ca. C12, abgekürzt FFA), die für unerwünschte Geschmacksfehler (ranzig oder seifig) von Milch und Milchprodukten verantwortlich sind (1–4), stammen aus der Hydrolyse der Mono-, Di- und Triglyceride. Die Glyceridhydrolyse (Lipolyse oder Fettspaltung) ist eine Reaktion, die spontan durch milcheigene oder mikrobiell gebildete Lipasen stattfinden kann. Mechanische und thermische Beanspruchungen sowie mikrobielle Kontaminationen des Produktes können diese enzymatische Reaktion fördern oder beschleunigen. Daneben produzieren die vorhandenen Keime Milchsäure aus Lactose. Ohne spezielle Massnahmen würde diese Säure mit den zu bestimmenden freien Fettsäuren titriert.

Zur Beurteilung des Hydrolysezustands von MilCHFett werden 3 verschiedene Kennzahlen angewendet:

- Der Gehalt an freien Fettsäuren *bei einer sofortigen FFA-Extraktion (abgekürzt FFA/sofort)* ist ein Mass für das «*lipolysierte Fett bei der Probenahme*».
- Der Gehalt an freien Fettsäuren *nach einer 24stündigen (für Rahm) bzw. 48stündigen (für Milch) Inkubationsdauer bei 37 °C (5) (abgekürzt FFA/24 h bzw. FFA/48 h)* ist ein Mass für das «*gesamt lipolysierbare*» Fett.
- Die Differenz zwischen dem Wert FFA/24 h (bzw. FFA/48 h) und demjenigen FFA/sofort (abgekürzt Δ) ist ein Mass für das «*lipolysierbare*» Fett während der Inkubation.

Diese drei FFA-Werte orientieren über den Lipolysengrad, über die physikalische Schädigung sowie über die mikrobielle Kontamination des MilCHFettes. Normalerweise haben hohe FFA-Werte in der Praxis (19) eine Stufenkontrolle der technischen Ausrüstungen und Anlagen wie Melkmaschinen, Pumpen, Rührer und Hofkühlanlagen bei der Milchgewinnung sowie der Kannen, Zisternen, Tanks und Zentrifugen beim Milchtransport und bei der -verarbeitung zur Folge.

Der Gehalt an freien Fettsäuren (FFA/sofort) gibt Aufschluss über den Zustand der Milch- und Rahmprouben zur Zeit der Extraktion, aber nicht unbedingt zur Zeit der eigentlichen Probenahme. Die Zeitspanne zwischen der extern ausgeführten Probenahme (Bauernhof, Milchsammelstelle, Lastwagen, Milchverarbeitungsbetriebe usw.) und der meistens im Laboratorium ausgeführten Extraktion kann sehr gross und variabel (mehrere Stunden) sein. Dazu wirken noch weitere negative, in der Praxis oft unkontrollierbare Einflüsse wie Temperaturschwankungen, Erschütterungen der Proben während des Transportes bis zum Laboratorium. Trotz ihrer grossen Bedeutung wurden diese Faktoren in der Literatur (6–8) eher vernachlässigt, was bei stark geschädigten Milch- oder Rahmprouben die oft unbefriedigenden, d. h. nicht aussagekräftigen Resultate erklären könnte.

Die vorherigen Untersuchungen (9–11) hatten die technisch-analytischen Aspekte der visuellen Titration nach *Deeth* et al. (12) und der potentiometrischen Titration nach *Bosset* et al. (9) der freien Fettsäuren in Laboratorien berücksichtigt. Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- die Extraktionsbedingungen der freien Fettsäuren mit einem neu entwickelten Rotationsmischer zu optimieren und zu standardisieren;
- die Stabilität der Proben vor der Extraktion der freien Fettsäuren in Funktion der Lagerungstemperatur und -dauer zu studieren.

Experimenteller Teil

Probenwahl

- Rohmilch (max. 45 g Fett/kg), Rohrahm (max. 445 g Fett/kg) und Rohhalbrahm (ca. 250 g Fett/kg) aus eigener Versuchskäserei, teilweise mechanisch und/oder thermisch geschädigt (siehe Probenbehandlung);
- Rohmilch aus einer Hofkühlanlage, teilweise mechanisch und thermisch geschädigt;
- «Milch-Drink», pasteurisiert, homogenisiert, aus dem Handel (27 g Fett/kg);
- Kaffeerahm, UHT-behandelt, homogenisiert, aus dem Handel (152 g Fett/kg).

Probenbehandlung (kontrollierte Schädigung)

Die Fettschädigung wurde mechanisch mit einem Homogenisator und/oder thermisch mit Temperaturänderungen in folgenden Modellversuchen untersucht:

– *Mechanische Schädigung:*

die Rohmilchproben während 30 s bei 20000 UpM mit einem Homogenisator behandeln (13).

– *Thermische Schädigung:*

die Rohmilchproben zweimal nacheinander im Wasserbad auf 30 °C aufwärmen und dann im Eiswasser auf 10 °C kühlen (13).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Schädigungsgrade simuliert:

- eine «leichte» Schädigung nur mit thermischer Einwirkung auf die Proben;
- eine «starke» Schädigung mit thermischer und mechanischer Einwirkung auf die Proben.

Analysenmethode

Der Gehalt an freien Fettsäuren wurde mit der bereits beschriebenen potentiometrischen Titrationsmethode (9) bestimmt. Die Messunsicherheit beträgt 1 mmol FFA/kg Fett. Die Unsicherheit der gerechneten Differenz Δ beträgt deshalb 2 mmol FFA/kg Fett. Die Bestimmungen wurden mindestens dreifach ausgeführt ($n \geq 3$).

Geräte und Zubehör

- | | |
|--|------------|
| – Polytron Homogenisator, PT 3000, Kinematika AG | 20 000 UpM |
| – Zentrifuge für Fettbestimmung, Original Gerber | 1 000 UpM |
| – Rotationsmischer, FAM-Entwicklung | 30 UpM |
| – Titrationsausrüstung, Metrohm AG (9) | |

Aufbau des Rotationsmischers

Der von der FAM-Mech. Werkstatt neu entwickelte Rotationsmischer ist aus der Abbildung 1 ersichtlich. Die Abbildung 2 zeigt den Stator (a), den Rotor (b) und die zum Rotor gehörende Klemmplatte (Pos. 12).

Der Rotationsmischer besteht aus folgenden Positionen (Abb. 1 und 2):

Pos.	Anzahl	Bezeichnung (Dimensionen in mm)
1	1	Stator Al-U-Profil, Länge 390, Breite 220, Höhe 160, Dicke 3,5
2	4	Kugellager Ø 18/5x5
3	2	PVC-Zahnriemenscheiben Ø 68, Zähnezahl 40
4	1	Parvalux-Motor Typ SD 8-S TEFC, Bauform B3 (Firma Electro Müller AG, CH-2500 Biel 4) 220/380 V, 50 Hz, 1/25 PS, 1400/29 UpM
5	1	Schneckengetriebe, Übersetzung $i = 48 : 1$
6	2	PVC-Rotationsbolzen
7	4	V2a-Gewindestangen M8x230

8	24	V2a-Sechskantmuttern M8
9	4	V2a-Flügelmuttern M8
10	1	Al-Fussplatte, Länge 355, Breite 150, Dicke 2; 40 Bohrungen Ø 18
11	1	Al-Lochplatte, Länge 355, Breite 150, Dicke 2; 40 Bohrungen Ø 22
12	1	Al-Klemmplatte, Länge 355, Breite 150, Dicke 2
13	4	Schaumstoff-Selbstklebestreifen 20/10, Länge 330
14	4	Gummifüsschen 20/20x8 an der Unterseite des Stators

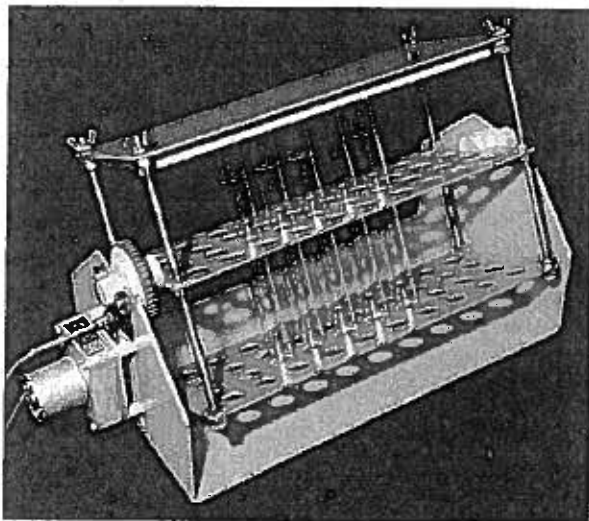


Abb. 1. Rotationsmischer

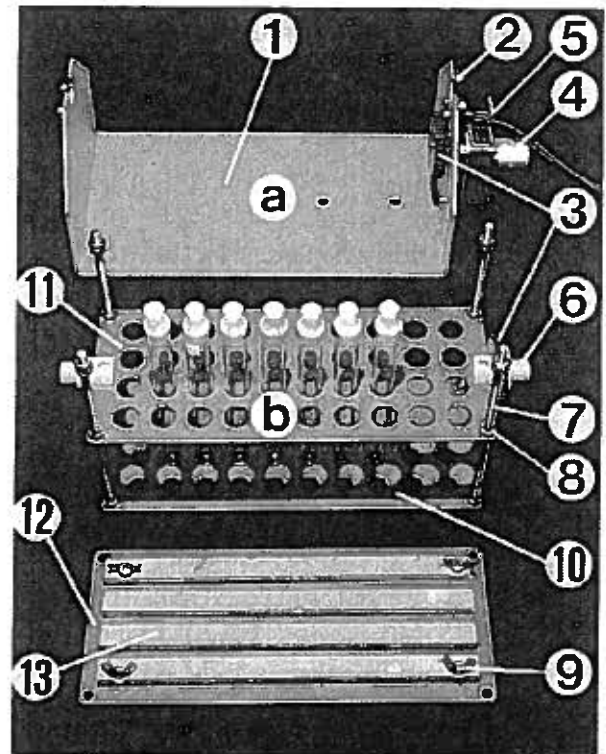


Abb. 2. Details zu Rotationsmischer

Der Stator (a) dient zur Rotoraufnahme und besteht aus einem U-Profil (Pos. 1) mit gekoppeltem Antrieb (Pos. 3–6). Antriebsseitig befinden sich zwei Kugellager (Pos. 2), welche dem Rotationsbolzen (Pos. 6) seitliche Führung verschaffen. Die Vertikalkraft wird über zwei Zahnriemenscheiben (Pos. 3) aufgenommen und dem Schneckengetriebe (Pos. 5) übertragen.

Der Rotor (b) ermöglicht die Aufnahme von maximal 40 Reagenzgläsern. Er besteht aus einer Fussplatte als Unterteil (Pos. 10), einer Lochplatte als Mittelteil (Pos. 11) und einer Klemmplatte als Oberteil (Pos. 12). Vier Gewindestangen (Pos. 7) dienen zur Plattenpositionierung. Das Fixieren der Rotorplatten erfolgt durch Konterung mit je zwei Sechskantmuttern (Pos. 8).

Nach dem Beladen mit Reagenzgläsern wird die Klemmplatte (Pos. 12) auf die vier Gewindestangen (Pos. 7) aufgesteckt und mit vier Flügelmuttern (Pos. 9) befestigt. Die auf der Klemmplatte (Pos. 12) aufgeklebten Schaumstoffstreifen (Pos. 13) kompensieren die Längendifferenz der eingesetzten Reagenzgläser. Der

Rotor (b) wird kraftschlüssig über beide Zahnriemenscheiben (Pos. 3) auf den Stator (a) aufgesetzt. Der Rotationsmischer ist somit betriebsbereit.

Der elektrische Antrieb erfolgt durch einen Einfach-Schneckengetriebemotor (Pos. 4 und 5). Die Rotationsgeschwindigkeit beträgt ca. 30 UpM¹.

Resultate und Diskussion

Optimierung und Standardisierung des Extraktionsverfahrens der freien Fettsäuren

Extraktionsdauer mit dem Rotationsmischer

Bei der visuellen Titration nach *Deeth* et al. (12), modifiziert nach *Miller* (5) sowie bei der potentiometrischen Titration nach *Bosset* et al. (9) wurden die Proben bisher nach *Dole* (14) extrahiert, d. h. mit 10,0 ml Extraktionsgemisch, 6,0 ml Petrolether und 4,0 ml Wasser während mindestens 60 s von Hand «geschüttelt» und 5 min lang zentrifugiert.

Nach der Einführung des Rotationsmischers wurde diese Extraktionsstufe anhand der Versuche mit Milch, Rahm und Kaffeerahm optimiert und standardisiert. Die Umdrehgeschwindigkeit wurde auf ca. 30 UpM eingestellt, um einen genügenden Wirkungsgrad ohne Ausschleudereffekt zu gewährleisten. Eine Extraktionsdauer von 15 min genügt vollständig, um das Extraktionsgleichgewicht zu erreichen (Tabelle 1). Es besteht keine Gefahr, dass eine weitere Fettschädigung

Tabelle 1. Einfluss der Extraktionsdauer auf die Extraktionsausbeute der FFA (mmol/kg Fett) bei 30 UpM

Probenart	Fettgehalt (g/kg)	Extraktionsdauer (min)								
		0,25	0,5	1	3	5	10	15	20	30
Milch-Drink	27,2	34	36	37	39	41	45	45	44	nb
Rohmilch	40,3	17	19	18	21	21	21	21	20	21
Kaffeerahm	152	11	12	12	12	12	14	13	13	12
Halbrahm	251	14	14	15	15	16	15	15	14	15
Rohrahm	445	9	8	9	9	9	9	9	9	9
Rohrahm geschädigt	445	21	21	21	22	22	22	23	23	22

nb = nicht bestimmt

☐ die schraffierten Zonen entsprechen dem Extraktionsgleichgewicht

¹ Weitere technische Angaben sind bei den Autoren erhältlich.

während dieser Stufe stattfindet, weil die Lipasen sowie die Bakterien in diesem Extraktionsmedium vollständig denaturiert und inaktiviert sind (siehe Lagerbarkeit der Extrakte).

Zentrifugationsdauer

Nach der Extraktion ist eine Zentrifugation notwendig, um die zwei unmischbaren Phasen schneller und besser zu trennen. Tabelle 2 zeigt, dass eine 5minütige Zentrifugation bei 1000 UpM ausreichend ist.

Tabelle 2. Einfluss der Zentrifugationsdauer auf den FFA-Gehalt (mmol/kg Fett) von extrahierter Rohmilch (Fettgehalt: 39 g/kg; Extraktionsdauer: 15 min)

Zentrifugationsdauer (min)	Bestimmung				$\bar{x} \pm s_x$
	1.	2.	3.	4.	
3	22	21	22	21	$22 \pm 0,6$
5	23	22	22	22	$22 \pm 0,5$
20	21	21	22	22	$21 \pm 0,6$
40	22	21	20	–	$21 \pm 1,0$
60	22	20	21	20	$21 \pm 1,0$

$\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert

s_x = Standardabweichung

Lagerbarkeit der Extrakte

In dicht verschlossenen Reagenzgläsern waren die extrahierten Proben bei 5–10 °C mindestens 6 Tage haltbar (Tabelle 3), so dass die Titration der Extrakte FFA/sofort und FFA/24 h (oder FFA/48 h) innerhalb derselben Serie durchgeführt werden können. Diese Arbeitsweise ermöglicht, sämtliche Titrationen unter denselben Bedingungen auszuführen. Die Extrakte sind ca. 1 Stunde vor der Titration bei Raumtemperatur aufzubewahren.

Untersuchung der Stabilität der Proben vor der Extraktion

Einfluss der Lagerungstemperatur und -dauer vor der Extraktion

Bei ungeschädigten Rohmilchproben (Abb. 3) war nur eine geringe Erhöhung des FFA/Sofortgehaltes im Laufe der ersten 24 Stunden erkennbar. Bei stark geschädigten Rohmilchproben war die Zunahme schon in der ersten Stunde nach der Beschädigung deutlich feststellbar. In den nächsten 4 Stunden stieg der FFA/Sofortgehalt immer noch an, aber etwas langsamer (Abb. 3).

Tabelle 3. Einfluss der Lagerung der extrahierten Proben auf den FFA-Gehalt (mmol/kg Fett)

Rohmilchproben Nr.	Fettgehalt (g/kg)	Lagerungsdauer (Tage) bei ca. 6 °C						
		0	1	2	3	5	6	Bereich
1	36,0	33	32	33	32	33	33	32 – 33
2	38,5	38	38	38	38	38	38	38 – 38
3	36,5	32	32	32	32	32	32	32 – 32
4	37,2	35	36	36	36	35	35	35 – 36
5	35,6	34	34	33	34	33	33	33 – 34
6	36,2	37	37	37	37	37	37	37 – 37
7	37,5	31	32	32	32	32	32	31 – 32
8	36,4	28	29	29	28	29	28	28 – 29

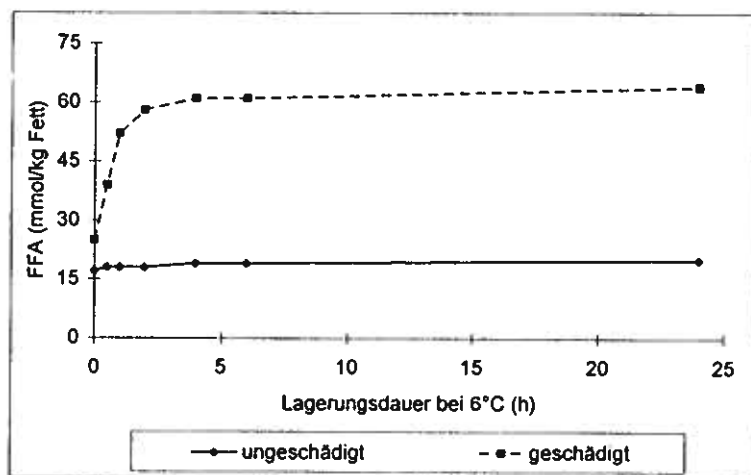


Abb. 3. FFA/Sofortgehalt ungeschädigter und stark geschädigter Rohmilchproben während der ersten 24 h nach der Probenahme bzw. nach der Schädigung des Milchfettes

Die Versuche bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (Tabelle 4) zeigten, dass die Temperatur bei ungeschädigten Proben in den ersten 6 Stunden keinen wesentlichen Einfluss auf den FFA/Sofortgehalt hatte. Dies galt jedoch nicht mehr für stark geschädigte Proben, deren FFA/Sofortgehalt sich bereits nach 1 Stunde Lagerung verdoppelte.

Einfluss der Temperaturschwankungen vor der Extraktion

Bei Produzenten, die ihre Milch nur alle zwei Tage liefern, wird die Morgenmilch mit der Abendproduktion in denselben gekühlten und gerührten Hofkühlanlagen gemischt. Die ca. 37 °C warme Morgenmilch wird während dem Melkvorgang die schon auf ca. 5 °C gekühlte Abendmilch bis auf ca. 12 °C erwärmen. Anschliessend

Tabelle 4. Einfluss der Lagerungstemperatur und -dauer ungeschädigter und stark geschädigter Rohmilch auf den FFA-Sofortgehalt (mmol/kg Fett)

Rohmilch	Lagerungstemperatur (°C)	Lagerungsdauer (h)					
		0	1	2	4	5	6
ungeschädigt	5	17	18	18	18	18	18
	10	17	18	19	19	19	19
	15	17	18	18	19	19	20
	20	17	17	18	19	19	20
stark geschädigt	5	25	50	59	59	58	62
	10	25	52	58	61	61	64
	15	25	54	58	63	63	65
	20	25	51	57	59	60	63

wird diese Milch wieder auf ca. 5 °C abgekühlt. Mischmilchproben aus einer solchen Hofkühlanlage wurden ohne und mit zusätzlicher Beschädigung im Laboratorium untersucht. Die ungeschädigten Proben zeigten keine signifikante Anreicherung der FFA/Sofortwerte innerhalb 24 Stunden (Tabelle 5a). Bei einem Gemisch von stark geschädigten Proben war hingegen die Zunahme des FFA/Sofortgehalts schon nach 30 min bei 20 °C ersichtlich (Tabelle 5b). Die Instabilität der geschädigten Proben vor der Extraktion ist nicht nur anhand der FFA/48-h-Werte, sondern auch anhand der Differenz Δ feststellbar (Tabellen 5a und 5b).

Tabelle 5a. FFA-Sofort- und FFA/48-h-Gehalt (mmol/kg Fett) eines Gemisches von ungeschädigter Abend- und Morgenmilch in Funktion der Lagerungsdauer und -temperatur

Lagerungsdauer (h)	Lagerungstemperatur ca. 5 °C			Lagerungstemperatur ca. 20 °C		
	FFA/sofort	FFA/48 h	Δ^*	FFA/sofort	FFA/48 h	Δ^*
0	17	45	28	17	27	10
0,5	17	44	27	16	26	10
1	15	41	26	15	25	10
2	15	36	21	15	25	10
4	16	36	20	16	23	7
6	16	35	19	16	21	5
8	17	34	17	17	20	3
10	17	34	17	16	21	5
24	19	34	15	17	22	5

* Δ = FFA/48 h – FFA/sofort

Tabelle 5b. FFA-Sofort- und FFA/48-h-Gehalt (mmol/kg Fett) eines Gemisches von stark geschädigter Abend- und Morgenmilch in Funktion der Lagerungsdauer und -temperatur

Lagerungsdauer (h)	Lagerungstemperatur ca. 5 °C			Lagerungstemperatur ca. 20 °C		
	FFA/sofort	FFA/48 h	Δ^*	FFA/sofort	FFA/48 h	Δ^*
0	44	139	95	49	132	83
0,5	45	145	100	52	137	85
1	44	137	93	55	134	79
2	44	137	93	58	131	73
4	48	135	87	62	115	53
6	50	129	79	66	94	28
8	50	126	76	66	91	25
10	55	124	69	67	90	23
24	60	107	47	72	68	-4

* Δ = FFA/48 h – FFA/sofort

Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit schlägt ein optimiertes und überprüftes Extraktionsverfahren der freien Fettsäuren aus Milch- und Rahmproben vor. Dieses Verfahren benötigt einen neu entwickelten und hergestellten Rotationsmischer, der eine kontrollierte und reproduzierbare Extraktion gewährleistet. Zur besseren und schnelleren Phasentrennung werden die Extrakte zentrifugiert. Die so erhaltenen organischen FFA-Extrakte sind mindestens sechs Tage in dichtgeschlossenen Reagenzgläsern bei 5 bis 7 °C lagerfähig. Die gute Lagerfähigkeit solcher Extrakte ermöglicht die Titration der «FFA/Sofort» und der FFA/24 h (für Rahm) oder 48 h (für Milch) unter denselben Bedingungen. Einzelne Titrationsen können gruppenweise ausgeführt werden, was einer Zeit- und Arbeitsersparnis entspricht.

Diese Arbeit zeigt ebenfalls die ausgeprägte temperatur- und zeitabhängige Instabilität geschädigter Rohmilchproben (ähnliche, nicht hier in Detail angegebene Resultate wurden im Rohrahm erhalten) zwischen der eigentlichen Probenahme und der Extraktion der freien Fettsäuren im Laboratorium. Die ausgeführten Modellversuche beweisen eindeutig, dass sich der FFA-Probezustand geschädigter Proben zwischen der Probenahme und der FFA-Extraktion ändert, und erklären die oft nicht aussagekräftigen Resultate zahlreicher Versuche aus der Praxis (diese Feststellung ist nicht nur für eine visuelle oder potentiometrische Bestimmung, sondern auch für sämtliche FFA-Bestimmungen, wie z. B. mit der BDI-, Kupferseifen- oder Lindqvist-Methode gültig).

Bei ungeschädigten Proben waren die FFA/Sofortwerte sowie die FFA/48-h-Werte relativ unabhängig der Lagerungsdauer (bis 24 h) und -temperatur zwischen 5–20 °C. Die beobachteten Schwankungen liegen im Bereich der Messunsicherheit der Methode (1 mmol FFA/kg Fett).

Bei geschädigten Proben waren hingegen die FFA/Sofort- sowie die FFA/48-h-Werte stark zeit- und temperaturabhängig. In Funktion der Lagerungsdauer nahmen die FFA/Sofortwerte systematisch zu. Die FFA/48-h-Werte zeigten meistens zuerst eine leichte Zunahme (z. B. Maximum nach ca. 30 min) und anschliessend eine signifikante Abnahme in Funktion der Lagerungsdauer. Als direkte Konsequenz nahm während der Lagerungsdauer auch die Differenz Δ (FFA/48-h – FFA/Sofort) zuerst leicht zu (z. B. Maximum erreicht nach ca. 30 min) und anschliessend ständig ab, was bedeutete, dass der Unterschied zwischen dem lipolysierten Fett (FFA/Sofort) und dem lipolysierbaren Fett (FFA/48 h – FFA/Sofort) weniger ausgeprägt war.

Solche experimentellen Beobachtungen könnten wie folgt erklärt werden. Die Lipaseaktivität (enzymatische Spaltung des frei vorliegenden MilCHFettes durch Lipasen) ist zeit- und temperaturabhängig. In einer frisch gemolkene Milch bei ca. 38 °C ist nach *Anderson* (15) und *Schwartz* (16) eine Lipaseaktivität von ca. 2 $\mu\text{mol FFA min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ messbar. Der Gehalt an freien Fettsäuren nimmt deshalb im Laufe der Lagerung (17) zu. *Anderson* (18) stellte zudem noch fest, dass sich die Lipaseaktivität einer frischen Rohmilch bei einer 24stündigen Lagerung bei 4 °C um 35% bzw. bei 20 °C um etwa 80% verringert, was u. a. auf die milchsäurebedingte pH-Erniedrigung des Milieus zurückgeführt werden könnte. Es spielen noch weitere Faktoren eine Rolle, die jedoch nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit behandelt werden konnten. Die reversible grenzflächige Anreicherung der freien Fettsäuren auf den Fettkügelchenmembranen könnte auch die (scheinbare) Erniedrigung der Lipaseaktivität nach der mechanischen und/oder thermischen Beschädigung dieser Fettkügelchen (örtliche Gleichgewichtsverschiebung der Lipolyse) erklären.

Folglich müssen die Proben für die Bestimmung der FFA/Sofortwerte einer geeigneten chemischen oder physikalischen (z. B. thermischer) Behandlung unterworfen werden, um eine genügende Stabilität der Proben bis zur Extraktion ihrer freien Fettsäuren zu gewährleisten. Die Fortsetzung dieser Arbeit (siehe Teil V.) wird über die Vor- und Nachteile solcher Behandlungen Aufschluss geben.

Dank

Die Autoren danken ihren Kollegen *Ueli Bütikofer*, *Marius Collomb*, *Marc Dalla Torre*, *Raoul Daniel*, *Hans Eyer*, *Ingrid Knecht*, *Raoul Mariaca* und *Robert Sieber* für ihre wertvolle Begutachtung des Manuskripts.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Extraktion der freien Fettsäuren von Milch- und Rahmproben mit Hilfe eines neu entwickelten Rotationsmischers optimiert und standardisiert. Anhand von Modellversuchen wurde zudem die ausgeprägte temperatur- und zeitabhängige Instabilität geschädigter Rohmilch- und Rohrahmproben zwischen dem Zeitpunkt der eigentlichen Probenahme und demjenigen der Extraktion der freien Fettsäuren im Laboratorium gezeigt, was zu nicht aussagekräftigen Resultate führen kann.

Résumé

Ce travail décrit et standardise l'étape de l'extraction des acides gras libres du lait et de la crème en recourant à un mélangeur rotatif récemment développé par les auteurs. Sur la base d'essais modèles, ce travail met ensuite en évidence la labilité – en fonction de la température et de la durée de stockage – des échantillons de laits selon leur degré d'endommagement. Leur teneur en acides gras libres peut donc varier entre le moment du prélèvement de l'échantillon et celui de l'extraction proprement dite des AGL, ce qui permet d'expliquer les difficultés d'interprétation rencontrées parfois avec certains essais de la pratique.

Summary

This work describes and standardises the extraction of free fatty acids from milk and cream by using a new rotating extractor developed by the authors. Several assays simulating some common mechanical, and thermal damaging treatment of milk fat clearly demonstrated that samples can become spoiled between the sampling and the extraction of the free fatty acids, which could explain many unreliable and unassessable results of the daily practice.

Literatur

1. Hough, G., Martinez, E. and Barbieri, T.: Sensory thresholds of flavor defects in reconstituted whole milk powder. *J. Dairy Sci.* 75, 2370–2374 (1992).
2. Kirst, E. und Jost, B.: Einfluss von freien Fettsäuren in der Rohmilch auf die Qualität von Butter. *Lebensmittelchemie* 48, 137–138 (1994).
3. Woo, A.H. and Lindsay, R.C.: Statistical correlation of quantitative flavor intensity assessments and individual free fatty acids measurements for routine detection and prediction of hydrolytic rancidity off-flavors in butter. *J. Food Sci.* 48, 1761–1766 (1983).
4. Jamotte, P.: Rapport d'activité du groupe de travail pour l'étude de la qualité du lait cru et de la crème. Ministère de l'agriculture, Station laitière de Gembloux (1971).
5. Miller, B.: Lipolysierbares Fett als Folge der Fettschädigung bei der Rohmilchgewinnung und -behandlung. Diss. ETH, Nr. 7844 1985.
6. FIL-IDF: Determination of free fatty acids in milk and milk products. Bull. 265 (1991).
7. FIL-IDF: Proceedings of the lipolysis symposium. Bull. 86 (1975).
8. Collomb, M. et Spahni, M.: Revue des méthodes de dosage des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. *Lebensm. Wiss. -Technol.* (en préparation).
9. Bosset, J.O., Imhof, M. und Steiger, G.: Die Bestimmung von freien Fettsäuren in Milch und Rahm. I. Entwicklung einer automatisierten potentiometrischen Titrationsmethode

- in nichtwässrigem Milieu und Vergleich mit der visuellen Titration nach Deeth. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 81, 296–318 (1990).
10. Bosset, J.O., Imhof, M. und Bütikofer, U.: Die Bestimmung von freien Fettsäuren in Milch und Rahm. II. Auswertung eines Ringversuches mit der visuellen und der potentiometrischen Titrationsmethode. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 81, 510–521 (1990).
 11. Imhof, M. und Bosset, J.O.: Die Bestimmung von freien Fettsäuren in Milch und Rahm. III. Eine vereinfachte potentiometrische Titrationsmethode mit Hilfe eines neuen Titriergerätes. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 84, 687–699 (1993).
 12. Deeth, H.C., Fitz-Gerald, C.H. and Wood, A.F.: A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk. Austr. J. Dairy Technol. 30, 109–111 (1975).
 13. Shipe, W.F., Senyk, G.F. and Book, K.J.: Inhibition of milk lipolysis by lambda carrageenan. J. Dairy Sci. 65, 24–27 (1982).
 14. Dole, V.P.: A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. J. Clinical. Invest. 35, 150–155 (1955).
 15. Anderson, M.: Milk lipase and off-flavour development. J. Soc. Dairy Technol. 36, 3–7 (1983).
 16. Schwartz, D.P.: Lipolysis and rancidity. In: Webb, B.H., Johnson, A.M. and Alford, J.A. Fundamentals of dairy chemistry, 2nd ed. AVI Publishing Compagny, Inc., Westport, Connecticut 1974.
 17. Markwalder, H.U. und Daehler, M.: Bildung von freiem Fett bzw. freien Fettsäuren bei der Behandlung von Milch und Rahm. Jahresbericht Bernische Molkereischule Rütli-Zollikofen 97, 16–22 (1984).
 18. Anderson, M.: Stability of lipoprotein lipase activity in bovine milk. J. Dairy Res. 49, 231–237 (1982).
 19. Eyer, H., Bosset, J.O., Collomb, M. und Imhof, Miroslava: Freie Fettsäuren sicher bestimmen. Milchzeitung 121 (9), 3 (1995).

Miroslava Imhof
 Paul Knecht
 Dr. Jacques Oliver Bosset
 Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
 Sektion Chemie
 CH-3097 Liebefeld-Bern

Die Bestimmung der freien Fettsäuren in Milch und Rahm

V. Chemische und thermische Stabilisierung der Proben

The Determination of Free Fatty Acids in Milk and Cream

V. Chemical and Thermal Stabilisation of the Samples

Key words: Free fatty acids, Titration, Sample stability, Heat treatment, Milk, Cream

Miroslava Imhof und Jacques Olivier Bosset
Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft,
Liebefeld-Bern

Einleitung

Die vorausgegangene Arbeit (siehe Teil IV.) (1) hat anhand von Modellversuchen eindeutig gezeigt, dass die ausgeprägte Zunahme des Gehaltes an freien Fettsäuren (FFA) den mechanisch-thermisch geschädigten Milch- und Rahmproben zuzuschreiben ist. Die in der Praxis unvermeidbare Zeitspanne zwischen Probenahme und FFA-Extraktion im Laboratorium ist bei geschädigten Rohmilch- und Rohrahmproben verantwortlich für oft unbefriedigende oder nicht interpretierbare Resultate der FFA-Bestimmungen. Der Gehalt an FFA in Milch- und Rahmproben, welche im Laboratorium extrahiert werden, zeigt ausschliesslich den Zustand des Lipolysegrads zum Zeitpunkt der Extraktion. Dazu müssen die Proben noch vor bakteriellem Verderben geschützt werden. Die gebildete Milchsäure würde sonst mittitriert. Folglich müssen die Proben für die Bestimmung der FFA/sofort einer der drei folgenden Behandlungen unterworfen werden:

- a) Extraktion der FFA an Ort und Stelle unmittelbar nach der Probenahme (2–4);
- b) Zugabe eines Konservierungsmittels (2, 4–6);
- c) Thermische Inaktivierung (2–4, 7–12).

Ziel dieser Arbeit ist, die Möglichkeiten und Grenzen sowie die Vor- und Nachteile dieser Behandlungen zu beschreiben, d. h.:

- die Auswirkung einiger chemischer Konservierungsmittel zu prüfen;

- die Auswirkung einer thermischen Behandlung (Bakterien- und Lipaseninaktivierung) zu prüfen sowie
- die Milchsäurebildung während der 24- bzw. 48stündigen Inkubation bei 37 °C zu unterdrücken, ohne die Lipasenaktivität zu hemmen.

Experimenteller Teil

Probenwahl

- Rohmilch (max. 45 g Fett/kg), Magermilch (5 g Fett/kg), Rohrahm (max. 445 g Fett/kg) aus eigener Versuchskäserei, teilweise mechanisch, thermisch und/oder bakteriell geschädigt (siehe Probenbehandlung);
- UHT-Milch, homogenisiert, aus dem Handel (36 g Fett/kg);
- Gemisch von UHT-Milch + Rohmilch (100 : 2 = Vol : Vol) (14);
- Gemisch von UHT-Milch + Magermilch (100 : 1 und 100 : 2 = Vol : Vol) (14).

Probenbehandlung (kontrollierte Schädigung)

Die Fettschädigung wurde mechanisch mit einem Homogenisator, thermisch mit Temperaturänderungen und mikrobiell mit psychrotrophen Bakterien (Impfung mit *Pseudomonas fluorescens*) in folgenden Modellversuchen untersucht:

– *Mechanische Schädigung:*

die Rohmilchproben während 30 s bei 20 000 UpM mit einem Homogenisator behandeln (13).

– *Thermische Schädigung:*

die Rohmilchproben zweimal nacheinander im Wasserbad auf 30 °C aufwärmen und dann im Eiswasserbad auf 10 °C kühlen (13).

– *Mikrobielle Schädigung:*

die Rohmilch- und Rohrahmpuben mit *Pseudomonas fluorescens* FAM-Stamm Nr. 1795 (Endkonzentration: 10^6 Keime/ml) impfen und 2 Stunden bei 20 °C inkubieren (14, 15).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Schädigungsgrade simuliert:

- eine «leichte» Schädigung nur mit thermischer Einwirkung auf die Proben;
- eine «starke» Schädigung mit thermischer und mechanischer Einwirkung auf die Proben.

Analysenmethode

Die Analysenmethode wurde im Teil IV (16) ausführlich beschrieben.

Chemikalien

Verwendete Konservierungsmittel

- Perhydrol	300 g/kg, p.A., Merck 7210
- Bronopol (2-Bromo-2-Nitro-1,3-Propandiol)	> 990 g/kg, Boots Company PLC
- PSL-Microtabs (Bronopol)	Boots Company PLC
- Kathon DP (enthält 10 g/kg Isothiazolon)	Christ AG 77537
- Natriumazid	reinst, Merck 6688
- Chloramphenicol	purum, Fluka 23275
- Hyamin 1622: Quaternäre Ammoniumverbindung	Fluka 53752

Endkonzentration der wässrigen Lösungen der getesteten Konservierungsmittel

- Perhydrol	1,2 und 5 g/kg
- Bronopol	1,7 und 3,3 g/kg
- PSL-Microtabs (Bronopol)	0,2 und 0,3 g/kg
- Isothiazolon (aktiver Stoff von Kathon DP)	0,17 und 0,20 g/kg
- Natriumazid	1 g/kg
- Chloramphenicol	0,025 g/kg
- Hyamin 1622	0,025 g/kg

Geräte und Zubehör

- Polytron Homogenisator, PT 3000, Kinematika AG	20 000 UpM
- Zentrifuge für Fettbestimmung, Original Gerber	1 000 UpM
- Rotationsmischer, FAM-Entwicklung (1)	30 UpM
- Titrationsausrüstung, Metrohm AG (1)	
- CelsiStrip Art.-Nr. CS 088/110, Firma E. Spirig, CH-8640 Rapperswil (als dokumentierter Nachweis der Probenerhitzung)	

Resultate und Diskussion

Extraktion unmittelbar nach der Probenahme

Eine erste Möglichkeit, um gleichzeitig die Lipaseaktivität und die Milchsäurebildung bei der FFA/Sofortbestimmung zu hemmen, besteht darin, die freien

Fettsäuren an Ort und Stelle der Probenahme zu extrahieren. So werden sämtliche Schwankungs-, Lagerdauer- und Lagertemperatureffekte während des Transportes ausgeschlossen, was eine wichtige Voraussetzung für die Richtigkeit der Resultate ist.

Für die extern ausgeführte Extraktion sollen die bereits mit Extraktionsgemisch, Petrolether und Wasser gefüllten Reagenzgläser sowie eine Präzisionskolbenpipette an den Ort der Probenahme gesandt werden. Nach der Probenahme sollen die Reagenzgläser mindestens 1 min von Hand (mit wiederholten Umkippbewegungen) oder sogar mit Hilfe eines zur Verfügung stehenden Rotationsmischers (1) gut vermischt werden. Durch die Einwirkung der vorhandenen organischen Lösungsmittel werden die lipolytische sowie die mikrobielle Aktivität unterdrückt (siehe Teil IV.) (1).

Als Nachteile sind zu nennen:

- Dichtigkeitsprobleme und Bruchgefahr von gefüllten Reagenzgläsern beim Versand;
- Aufbewahrung der Extrakte bei ca. 6 °C bis zur Phasentrennung;
- eine unsachgemässe Behandlung der Kolbenpipette führt leicht zu grossen Pipettierfehlern;
- Verwechslungen der vorbereiteten Reagenzgläser (1 ml Probe + 4 ml Wasser für Rahm statt 5 ml Probe für Milch) sind nicht ausgeschlossen.

Die Erfahrung hat gezeigt, dass diese Behandlung nicht praxistauglich ist.

Zugabe eines Konservierungsmittels bei der Probenahme

Die wichtigsten Kriterien (Tabelle 1) zur Wahl eines geeigneten Konservierungsmittels sind:

- eine bakterizide oder mindestens bakteriostatische Wirkung;
- eine hemmende Wirkung auf Lipase;
- keine Beeinträchtigung der Resultate (keine Interferenz bei der Titration);
- eine einfache und sichere Anwendung (geringe Toxizität des Konservierungsmittels).

Experimentell wurden die möglichen Interferenzen der in Tabelle 1 angegebenen Konservierungsmittel wie folgt überprüft: jedes Konservierungsmittel wurde einer ungeschädigten Milchprobe zugemischt, extrahiert und titriert. Die FFA/So-fortwerte wurden dann mit Kontrollproben (ohne Konservierungsmittel) verglichen.

Natriumazid und Hyamin (QAV) wurden mittitriert, d.h. sind unbrauchbar. Bronopol- PSL-Microtabs wurden auch teilweise mittitriert (Farbindikator). Auch infolge ihrer langsamen Auflösung (ohne Schütteln) in den Milchproben kommen sie nicht in Frage. Das Antibiotikum Chloramphenicol wurde nicht mittitriert, ist gegen *Pseudomonas* wirksam, hemmt die Lipase, ist aber für den täglichen Gebrauch ungeeignet, da es sehr giftig ist (Giftklasse 2). Perhydrol wurde nicht mittitriert, hemmt bei hohen Konzentrationen die Lipasen, ist aber katalasepositiv (17), d.h. z. B. gegen *Pseudomonas* nur bei hohen Konzentrationen wirksam. Nur Bronopol und Kathon DP erfüllen sämtliche gestellten Anforderungen.

Tabelle 1. Wahlkriterien einiger Konservierungsmittel für die FFA/Sofortbestimmung

Konservierungsmittel	Endkonz. (g/kg)	Titrierbarkeit (mmol/kg Fett)	bakterien- hemmend	lipase- hemmend	Giftklasse
ohne (Kontrolle Nr. 1)	–	26	---	---	---
Perhydrol	1,2 – 5	26	+/-	+	3
Bronopol	1,7 – 3,3	27	+	+	3
Kathon DP	17 – 20	27	+	+	5
Natriumazid	1	40	+	–	2
Chloramphenicol	0,025	25	+	+	2
Hyamin	0,025	89	+	–	2
ohne (Kontrolle Nr. 2)	–	15	---	---	---
Bronopol	0,2	15	+	+	3
PSL-Microtabs*	0,2	17**	+	+	unbekannt
	0,3	19**	+	+	unbekannt

* Wirkstoff: Bronopol; Endkonzentration: 0,2 g/kg = 2 Stück/100 ml; 0,3 g/kg = 3 Stück/100 ml.

** Die «Mikrotabs» enthalten ein Farbindikator.

Nach *Ardö* (18) zeigt Bronopol gute Konservierungseigenschaften und hemmt die Lipolyse in den Milchproben bei einer Endkonzentration von 0,2 g/kg. Bei der vorliegenden Untersuchung wurde es im Überschuss bis zu einer Konzentration von 3,3 g/kg Probe verwendet.

Kathon DP enthält 10 g Aktivstoff «Isothiazolon» pro Liter. Die empfohlene Konzentration, damit die Milchprodukte konserviert und die Lipasen gehemmt werden, liegt bei 1–2 g Kathon DP/kg Probe, was 10–20 mg Isothiazolon/kg Probe entspricht. Um einen Überschuss zu gewährleisten, wurde die Kathon-DP-Konzentration auf 17–20 g/kg Probe erhöht, was 170–200 mg Isothiazolon/kg Probe entspricht.

Um den Wirkungsgrad dieser beiden Konservierungsmittel zu prüfen, wurden Rohmilch- und Rohrahmproben leicht geschädigt. Die Wirkung der beiden Konservierungsmittel ist vergleichbar (Tabelle 2). Diese Konservierungsmittel hemmen die Lipaseaktivität während einiger Stunden bei den leicht geschädigten Rohmilch- bzw. bei Rohrahmproben (ungeschützte Probe galt als Kontrollprobe, thermisch behandelte Probe galt als Referenzprobe: siehe auch § *thermische Behandlung*).

Die nächsten Versuche wurden ausschliesslich mit Bronopol ausgeführt. Aus Abbildung 1 ist eine signifikante, jedoch ungenügende Hemmung der Lipaseaktivität bei der Lagerung leicht beschädigter Milch- und Rahmproben bei 6 °C erkennbar. Mit stärker beschädigten Milchproben bestätigt die Abbildung 2 diese Aussage bei den verschiedenen getesteten Lagerungsbedingungen und Bronopolkonzentrationen. Zur Überprüfung, ob dieses Konservierungsmittel auch noch

Tabelle 2. FFA/Sofortgehalt (mmol/kg Fett) leicht geschädigter Milch- und Rahmproben nach chemischer (Konservierungsmittel) und thermischer Behandlung

Probe	Lagerung (h)	Kontrollprobe	mit Bronopol ¹	mit Kathon DP ²	therm. behandelt ³
Milch	0	24	25	24	23
	4	24	24	24	23
	20	25	24	26	22
	26	27	27	25	23
Rahm	0	12	12	13	12
	4	15	13	15	12
	20	18	13	15	11
	26	17	12	15	11

¹ Endkonzentration: 3,3 g Bronopol/kg Probe

² Endkonzentration: 20 g Kathon DP/kg Probe

³ 2 min in kochendem Wasserbad

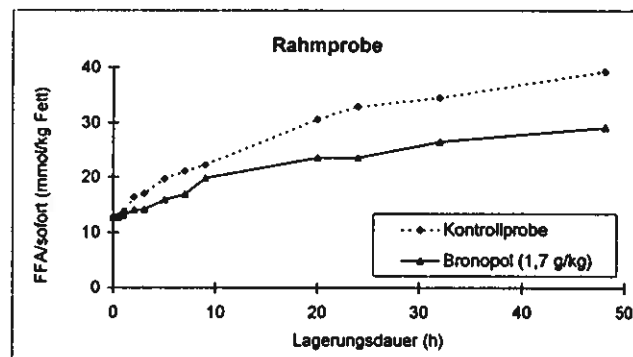
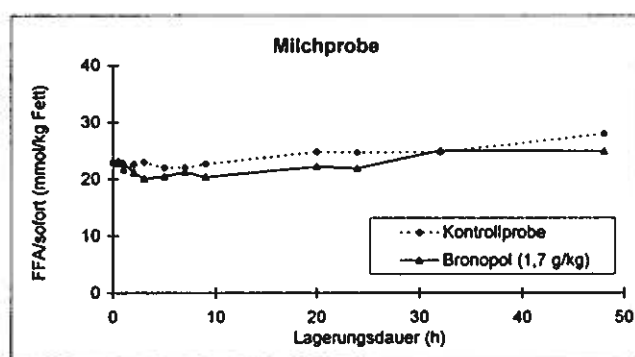


Abb. 1. FFA/Sofortgehalt leicht geschädigter Milch- und Rahmproben in Funktion der Lagerungszeit bei 6 °C

eine erhöhte Lipaseaktivität hemmt, wurden noch Mischungen von UHT-Milch mit Magermilch und von UHT-Milch mit Rohmilch als Substrat (13) getestet (Abb. 3). Zusammenfassend zeigen alle diese Abbildungen eine deutliche, jedoch für die Praxis ungenügende Wirkung von Bronopol als Konservierungsmittel bei mittel bis stark geschädigten Proben.

Der Hauptvorteil der Probenbehandlung mit Konservierungsmitteln ist die Einfachheit der Ausführung am Ort der Probenahme. Die ganze Arbeit, wie z. B. die Vorbereitung der Flaschen mit dem Konservierungsmittel für die Probenahme, die Pipettierung und die FFA-Extraktion, wird im Laboratorium stattfinden.

Als Nachteile sind zu nennen:

- die nötige Konzentration der Bronopol-Stammlösung (200 g/l; Zugabe: 2 ml) liegt knapp an der oberen Grenze der Löslichkeit, d.h. das Produkt kristallisiert bei tieferen Temperaturen aus;

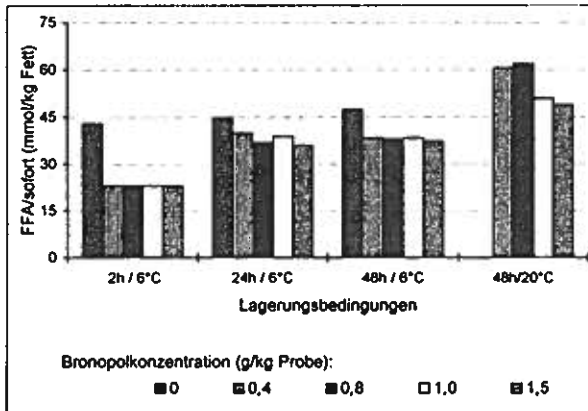


Abb. 2. FFA/Sofortgehalt stark geschädigter Milchproben in Funktion der Lagerungsbedingungen bei verschiedenen Bronopolkonzentrationen

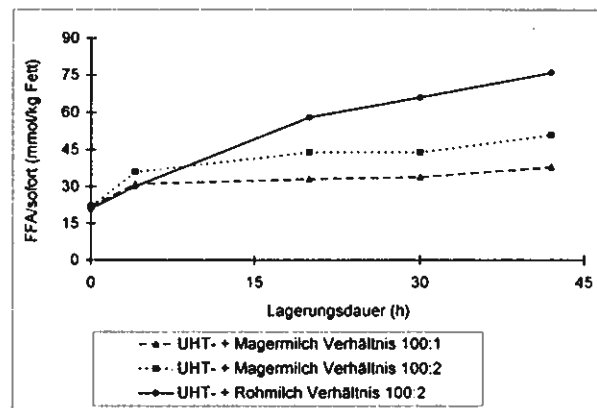


Abb. 3. FFA/Sofortgehalt extrem geschädigter Milchproben konserviert mit Bronopol (3,3 g/kg) in Funktion der Lagerung bei 6 °C

- die 100-ml-Flaschen für die Probenahme müssen immer senkrecht transportiert und aufbewahrt werden, damit die kleine Menge des Konservierungsmittels am Flaschenboden bleibt;
- bei Rahm muss der Fettgehalt für die FFA/Sofortbestimmung mit einem Verdünnungsfaktor umgerechnet werden oder es muss eine separate Fettbestimmung durchgeführt werden;
- die Proben müssen unbedingt innerhalb von 5–6 Stunden im Laboratorium eintreffen;
- bei starker Beschädigung kann die hemmende Wirkung der Konservierungsmittel sogar ungenügend sein.

Aus diesen Gründen kann kein chemisches Konservierungsmittel empfohlen werden.

Thermische Behandlung unmittelbar nach der Probenahme

Die sicherste Möglichkeit, um gleichzeitig die Lipaseaktivität und die mikrobielle Aktivität bei der FFA/Sofortbestimmung zu hemmen, ist eine sofortige Erwärmung nach der Probenahme (Abb. 4).

Die Probe für die FFA/Sofortbestimmung wird in ein Reagenzglas mit Schraubverschluss bis ca. 2 cm unter den oberen Rand eingeführt. Das verschlossene Reagenzglas wird unmittelbar nach der Probenahme während ca. 2 min in ein kochendes Wasserbad gestellt. Die Temperatur der Probe steigt auf mindestens 75 °C. Vor dem anschließenden Abkühlen wird die Probe durch zweimaliges Kippen durchgemischt. Das Niveau des heißen Wassers und der Probe im Reagenzglas muss gleich sein. Ein mitgelieferter Teststreifen (CelsiStrip) ermöglicht eine schnelle Kontrolle der Pasteurisierung der behandelten Probe.

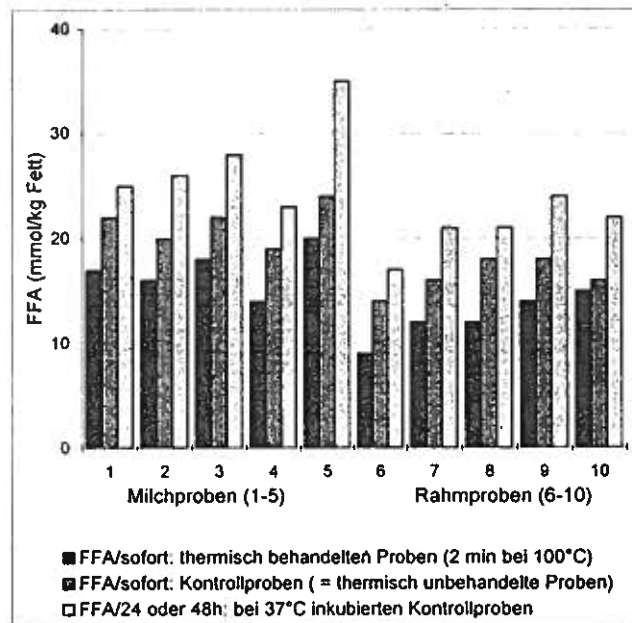


Abb. 4. FFA-Gehalt thermisch und nicht thermisch behandelter Milch- und Rahmproben

Tabelle 2 vergleicht die Resultate, die mit den zwei vorher getesteten Konservierungsmitteln und mit der thermischen Behandlung erhalten wurden. Tabelle 3 zeigt noch, dass auch stark geschädigte, thermisch behandelte Rahmproben mindestens 24 Stunden stabil bleiben.

Die thermische Behandlung bietet nur Vorteile an. Sie ist billig, einfach, risikofrei, umweltfreundlich und wirksam. Ausserdem verlangt sie weder spezielle Ausbildung noch giftige Konservierungsmittel am Ort der Probenahme. Erfahrungsgemäss sind noch keine Probleme aufgetaucht. Sie liefert sichere und vertrauenswürdige FFA/Sofortresultate.

Tabelle 3. FFA/Sofortgehalt (mmol/kg Fett) stark geschädigter Rahmproben nach thermischer Behandlung

Probenbehandlung	Lagerungsdauer (h)	Rahmprobe 1	Rahmprobe 2
thermisch unbehandelt	0	7	9
	24	25	34
thermisch behandelt*	0	7	9
	24	7	9

* 2 min in kochendem Wasserbad

Probebehandlung für die Bestimmung des FFA/24 h oder 48 h

Was die Stabilisierung der Rohmilch- bzw. der Rohrahmproben für die Bestimmung des «gesamt lipolysierbaren» Fettes nach einer 48- bzw. 24stündigen

Inkubationsdauer bei 37 °C betrifft, wurden leider keine geeigneten Verbesserungen gefunden (Tabelle 4).

Tabelle 4. FFA/48-h-Gehalt (mmol/kg Fett) geschädigter Milchproben bei verschiedener Lagerungsdauer vor der 37 °C-Inkubation in Funktion der Konzentration von 3 verschiedenen Konservierungsmitteln

Konservierungsmittel	Konzentration (mg/kg)	Lagerungsdauer vor der Inkubation (h)		
		0	3	24
Wasserstoffperoxid	100	147	140	166
	200	73	117	146
	300	55	104	142
	400	55	47	86
	500	55	44	74
	750	53	44	54
	1000	51	48	52
Bronopol	5	117	119	164
	10	53	71	71
	20	44	52	60
	30	47	51	58
	50	46	50	58
	100	44	50	57
	200	49	49	56
Kathon DP	10	161	163	181
	50	78	123	124
	75	68	81	106
	100	62	65	77
	250	57	51	61
	500	47	49	59
	1000	45	49	58

Die Konservierungsmittel, die die Lipasen schonen, sind nicht imstande, bakteriostatisch zu wirken, was schliesslich eine falsche Bestimmung der freien Fettsäuren zur Folge hätte (Übertitration infolge der gebildeten Milchsäure). Die direkte Extraktion bei der Probenahme, die Zugabe von Konservierungsmitteln im grossen Überschuss sowie die thermische Behandlung der Proben, die eine genügende bakteriostatische oder sogar eine bakterizide Einwirkung bei mittel- und

starkkontaminierten Proben gewährleisten würden, hemmen auch die Lipasen, die bei der Inkubation nicht mehr aktiv sind und deshalb zu tiefe Werte liefern. Der Ersatz der FFA-Titration (visuell oder potentiometrisch) durch eine quantitative gaschromatographische Analyse der einzelnen freien Fettsäuren, wobei die Milchsäure keine Interferenz verursacht, *könnte* eine weitere Möglichkeit darstellen, das «gesamt lipolysierbare Fett» zu bestimmen.

Allgemein sollten die FFA/24 h, bzw. FFA/48-h-Werte mit grösster Vorsicht interpretiert werden, da zahlreiche, meistens unkontrollierte (oder unkontrollierbare) Faktoren wie die pH-Erniedrigung bei der Milchsäurebildung, die mechanische, thermische und/oder chemische Aktivierung der originären und mikrobiellen Lipasen sowie die reversible grenzflächige Anreicherung der freien Fettsäuren an den Fettkügelchenmembranen die Messresultate stark beeinflussen können.

Schlussfolgerung

Die vorherige Arbeit (Teil IV.) hat die ausgeprägte temperatur- und zeitabhängige Instabilität geschädigter Rohmilch- und Rohrahmprouben zwischen der eigentlichen Probenahme und der Extraktion der freien Fettsäuren im Laboratorium gezeigt. Um die Proben für die FFA/Sofortbestimmung zu stabilisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Lösungen geprüft:

- die sofortige Extraktion an Ort und Stelle der Probenahme;
- die Zugabe verschiedener Konservierungsmittel (u. a. Bronopol und Kathon DP) bei der Probenahme;
- eine thermische Behandlung der Proben, um sowohl ihre Lipaseaktivität wie auch ihre mikrobielle Gärung zu hemmen.

Jede dieser Lösungen hat Vor- und Nachteile.

Die erste Lösung ist aufwendig und fehleranfällig. Sie verlangt, dass die Reagenzgläser mit dem Extraktionsgemisch und, wenn möglich, auch ein Rotationsmischer an Ort und Stelle der Probenahme zur Verfügung stehen, was nicht immer möglich ist. Dazu soll das Pipettieren der Proben (5,00 ml für Milch bzw. 1,00 ml für Rahm) sehr sorgfältig und genau durch Betriebs- statt Laborpersonal ausgeführt werden.

Die zweite Lösung ermöglicht eine vollständige Probenbehandlung (pipettieren, extrahieren usw.) im Laboratorium durch ausgebildetes Fachpersonal, benötigt aber den Einsatz von giftigen Konservierungsmitteln. Bei stark belasteten, d.h. geschädigten Proben genügen diese nicht immer, um eine sichere und genügend lange Hemmung der mikrobiellen Lipasen zu gewährleisten.

Die in Zukunft für die Praxis empfohlene dritte Lösung ist die thermische Behandlung der gefüllten Reagenzgläser: eine kurze Hochtemperaturpasteurisierung (z. B. ca. 2 min in einem kochenden Wasserbad). Diese Lösung ermöglicht eine vollständige Inaktivierung der Lipasen sowie der psychrotrophen Bakterien (keine Milchsäurebildung, die sonst mittitriert würde). Diese Behandlung gewährleistet eine Probenstabilität von mindestens 24 Stunden, so dass die Extraktion im

Laboratorium ausgeführt werden kann. Dazu sind keine toxischen und umweltbelastenden Konservierungsmittel notwendig. Diese einfache, billige und schnelle Vorbereitungsmethode benötigt nur ein heisses Wasserbad, z. B. eine Kochpfanne mit einem elektrischen Tauchsieder. Ein mitgelieferter Teststreifen (CelsiStrip) ermöglicht die schnelle Kontrolle der Pasteurisierung der behandelten Proben.

Was die Stabilisierung der Rohmilch- bzw. der Rahmpfropfen für die Bestimmung des «gesamt lipolysierbaren» Fettes nach einer 48- bzw. 24stündigen Inkubationsdauer bei 37 °C betrifft, wurde leider keine neue, geeignete Verbesserung gefunden.

Allgemein wurde festgestellt, dass die Rahmpfropfen deutlich mehr als die Milchproben durch die mikrobiell gebildeten Lipasen gefährdet wurden. Dementsprechend sind die Rahmpfropfen besonders sorgfältig zu behandeln.

Dank

Die Autoren danken ihrer Kollegin *Annemarie Weber* für ihre Hilfe bei den mikrobiologischen Untersuchungen sowie den anderen Kollegen *Ueli Bütikofer, Marius Collomb, Marc Dalla Torre, Raoul Daniel, Hans Eyer, Raoul Mariaca* und *Robert Sieber* für ihre wertvolle Begutachtung des Manuskripts.

Zusammenfassung

Anhand zahlreicher Modellversuche, die verschiedene mechanische, thermische und bakterielle Schädigungen des MilCHFettes simulierten, wurden anschliessend drei Stabilisierungsmöglichkeiten der Proben für die FFA/Sofortbestimmung geprüft: (i) die sofortige Extraktion der freien Fettsäuren an Ort und Stelle der Probenahme; (ii) der Zusatz verschiedener Konservierungsmittel, wie z. B. Bronopol, Kathon DP; (iii) eine thermische Behandlung der Proben ebenfalls an Ort und Stelle der Probenahme. Diese letzte Lösung bietet viele Vorteile und ist deshalb bei der FFA/Sofortbestimmung für die Praxis zu empfehlen. Keine brauchbare Verbesserung der Probenahme und -behandlung wurde hingegen für die Bestimmung des «gesamt-lipolysierbaren» Fettes gefunden.

Résumé

Sur la base de nombreux essais modèles qui simulent divers endommagements de la matière grasse dus à des effets mécaniques, thermiques et à des bactéries, trois possibilités de stabiliser les échantillons labiles du point de vue de leur teneur en acides gras libres (pour un dosage «immédiat») ont été testées: (i) une extraction «in situ» lors de la prise de l'échantillon; (ii) le recours à divers agents conservateurs tels que bronopol et kathon DP; (iii) une inactivation thermique (env. 2 min dans un bain-marie à ébullition). Cette dernière solution présentant plusieurs avantages est proposée en définitive pour la pratique. En revanche aucune amélioration n'a pu être apportée au prélèvement et au traitement des échantillons destinés au titrage de la matière grasse «lipolysable totale» après une incubation à 37 °C.

Summary

Three main preventive methods were tested to improve the conservation of the raw samples for the FFA/immediate titration: (i) an immediate extraction in situ of the free fatty acids; (ii) the addition of different preservatives such as bronopol, kathon DP; (iii) a heat treatment (approximately 2 min in a boiling bath) of the sample to inactivate the lipase activity. This third solution offers many advantages and should be recommended in the practice. No improvement was found concerning the stability of the samples used to determine the «total lipolysable» fat after a 24 h or 48 h incubation at 37 °C.

Literatur

1. Imhof, Miroslava, Knecht, P. und Bosset, J.O.: Die Bestimmung von freien Fettsäuren in Milch und Rahm. IV. Standardisierung der Extraktion von freien Fettsäuren- und Untersuchung der Probenstabilität. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 86, 157–168 (1995).
2. FIL-IDF: Determination of free fatty acids in milk and milk products. Bull. 265 (1991).
3. FIL-IDF: Proceedings of the lipolysis symposium. Bull. 86 (1975).
4. Collomb, M. et Spahni, M.: Revue des méthodes de dosage des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. Lebensm. Wiss. Technol. (en préparation).
5. Jamotte, P.: Rapport d'activité du groupe de travail pour l'étude de la qualité du lait cru et de la crème, ministère de l'agriculture. Station laitière de Gembloux, 1971.
6. Dole, V.P.: A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. J. Clinical. Invest. 35, 150–155 (1955).
7. Kuzdzal-Savoie, S.: Dosage des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. Bull. FIL-IDF 118 (1980).
8. O'Halloran, J.C.: A study of free fatty acid content of milk as affected by production and storage techniques. Thesis, Faculty of Dairy Science, University College, Cork, Irland 1975.
9. Driessen, F. and Stadhouders, J.: The lipolytic enzymes and co-factors responsible for spontaneous rancidity in cow's milk. IDF Doc 86, 73–79 (1975).
10. Driessen, F.: Lipases and proteinases in milk. Occurrence, heat inactivation and their importance for the keeping quality of milkproducts. Verslag V 236, Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek, Ede 1983.
11. Driessen, F.M., Jellema, A., van Luin, F.J.P., Stadhouders, J. and Wolbers, G.J.M.: The estimation of the fat acidity in raw milk. An adaptation of the BDI method suitable for routine assays. Neth. Milk Dairy J. 31, 40–55 (1977).
12. Doody, K., O'Shea, J. and Rafferty, T.F.: Influence of design of milking equipment on lipolysis. IDF Doc 86, 146–155 (1975).
13. Shipe, W.F., Senyk, G.F. and Book, K.J.: Inhibition of milk lipolysis by lambda carrageenan. J. Dairy Sci. 65, 24–27 (1982).
14. Stern, K.K., Foegeding, E.A. and Hansen, A.P.: Inhibition of lipolytic activity in milk by polysaccharides. J. Dairy Sci. 71, 41–45 (1988).
15. Harris, P.L. and Cuppett, S.L.: Effect of selected antioxidants on the activity of a mixture of crude pseudomonas lipases. J. Food Protect. 54, 133–135 (1991).
16. Bosset, J.O., Imhof, M. und Steiger, G.: Die Bestimmung von freien Fettsäuren in Milch und Rahm. I. Entwicklung einer automatisierten potentiometrischen Titrationsmethode

- in nichtwässrigem Milieu und Vergleich mit der visuellen Titration nach Deeth. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 81, 296–318 (1990).
17. *Buchanan, R.A. and Gibbons, N.E.*: Bergey's Manual of determinative Bacteriology, S. 217. The Williams & Wilkins Co., Baltimore 1975.
 18. *Ardö, Y.*: Bronopol as a preservative in milk samples. Milchwissenschaft 34, 14–16 (1979).

Miroslava Imhof
Dr. Jacques Oliver Bosset
Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
Sektion Chemie
CH-3097 Liebefeld-Bern