

Effets des sels minéraux sur l'activité de la lipoprotéine lipase du lait de vache *in vitro*

Y Hannan, D Le Goff, L Friloux, A Nouvelot *

IRBA, URA 609 CNRS, laboratoire de biochimie,
esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France

(Reçu le 10 juin 1988; accepté le 25 octobre 1989)

Résumé — Les effets de 4 éléments minéraux présents dans le lait (Na^+ , K^+ , Ca^{++} et Mg^{++}) ont été étudiés sur l'activité *in vitro* de la lipoprotéine lipase présente dans le lait écrémé (mLPL) et de la LPL purifiée du lait (LPL) en présence ou non d'activateur lipoprotéinique d'origine sérique (HDL), afin de mettre en évidence l'incidence de ces facteurs sur l'intensité de la lipolyse et la régulation de l'enzyme lipase. Les résultats obtenus montrent une très grande similitude de comportement de la lipoprotéine lipase du lait écrémé ou sous forme purifiée. La présence d'HDL dans le milieu d'incubation augmente de 7 fois l'activité de la mLPL et de 5 fois l'activité de la LPL purifiée. De tous les éléments minéraux étudiés, ce sont les ions divalents qui ont le plus fort pouvoir inhibiteur sur l'activité de la lipoprotéine lipase. Cet effet inhibiteur, modulé par la présence de lipoprotéines de haute densité (HDL), dépend essentiellement de la concentration et de la nature des ions ajoutés dans le milieu et non de la force ionique. A $I = 0,24$ l'inhibition de la LPL par CaCl_2 est de 75% en présence d'HDL, et de 90% en son absence. En revanche, à la même force ionique et en présence de NaCl , l'activité de la LPL n'est pas modifiée en présence ou en absence d'HDL dans le milieu d'incubation.

lipoprotéine lipase / lait de vache / lipoprotéine HDL / minéral

Summary — Effects of mineral salts on the activity of the bovine milk lipoprotein lipase *in vitro*. The effects of some milk constituents such as mineral elements (Na^+ , K^+ , Ca^{++} and Mg^{++}) have been studied *in vitro* on the mLPL (skim milk) activity and that of the purified LPL, in presence and in absence of serum lipoprotein (HDL), with a view to highlighting the incidence of these factors on the lipolysis intensity and the regulation of the enzyme lipase through these factors. The results have shown a clear similarity of the LPL behaviour of skim milk or in a purified form. The presence of HDL in the incubation medium increases seven times the mLPL activity and five times the purified LPL activity. Amongst all mineral constituents involved in this study, divalent ions undoubtedly hold the highest inhibitory power of the lipoprotein lipase activity. This inhibitory effect, which has been modulated by the presence of HDL, depends mainly upon the concentration and the nature of ions added to the medium, but by no means upon the ionic strength. With $I = 0.24$, the inhibition of the LPL by CaCl_2 is 75% in presence of HDL and 90% without HDL in the incubation medium. Contrastingly, with a similar ionic strength and in presence of NaCl , this activity is subject to any modification neither in presence nor in absence of HDL in the incubation medium.

lipoprotein lipase / bovine milk / lipoprotein HDL / mineral

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

L'intensité de la lipolyse du lait en absence d'activation mécanique ou thermique par hydrolyse enzymatique de la matière grasse présente une très grande variabilité. De nombreux facteurs ont été impliqués dans la régulation de l'activité de la lipoprotéine lipase responsable de cette dégradation. Parmi les facteurs physiologiques les plus souvent évoqués, on peut citer le stade de lactation et de gestation, le niveau de production (Ortiz *et al*, 1970; Ahrné et Björck, 1985; Chazal et Chilliard, 1987a; Sundheim, 1988), la race dont l'incidence est beaucoup controversée (Chazal et Chilliard, 1987b). On peut noter également le rôle de la distribution de la mLPL dans les différentes fractions du lait (Wang et Randolph, 1978; Sundheim et Bengtsson-Olivecrona, 1985) ainsi que l'état de la membrane des globules gras qui bloque plus ou moins l'accès de l'enzyme vers son substrat (Sundheim et Bengtsson-Olivecrona, 1987b).

Parmi les facteurs physico-chimiques impliqués dans cette régulation, on peut citer le changement de température (Sundheim et Bengtsson-Olivecrona, 1987a), l'agitation mécanique (Needs *et al*, 1985), le taux de protéose peptone dans le lait (Anderson, 1981; Cartier et Chilliard, 1986), l'état d'association de l'enzyme avec la caséine ou de dissociation par l'héparine (Anderson, 1982), la quantité d'activateurs de la LPL telles les lipoprotéines HDL (Anderson, 1979; Sundheim *et al*, 1983) et enfin la concentration en éléments minéraux (Shahani et Chandan, 1965). Ces derniers ont fait l'objet de nombreux travaux quant à leur incidence sur l'activité de la LPL purifiée, notamment en ce qui concerne le sodium (Egelrud et Olivecrona, 1973; Driessen et Stadhouders, 1974; Bengtsson et Olivecrona, 1982). En

revanche, les études portant sur l'incidence d'autres éléments minéraux du lait sur l'activité de la LPL sont moins bien documentées.

L'objet de ce travail porte sur les effets spécifiques des 4 principaux éléments minéraux du lait, 2 monovalents (Na^+ et K^+) et 2 divalents (Mg^{++} et Ca^{++}), sur l'activité *in vitro* de la lipoprotéine lipase présente dans le lait écrémé (mLPL) et de la lipoprotéine lipase purifiée (LPL) en présence ou en absence d'HDL.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Prélèvement de lait

Le lait utilisé est constitué par un prélèvement de 2 l d'un mélange provenant de la traite du soir de 10 vaches de race normande. Aussitôt après la prise d'échantillon, le lait est centrifugé à 3 000 g à 4 °C pendant 30 min. Le lait écrémé contenant la lipoprotéine lipase (mLPL) est divisé en petites fractions de 2 ml et congelé à -20 °C.

Préparation de la LPL purifiée

La LPL est purifiée à partir du lait écrémé par préparation de poudre acétone-diéthyl éther après adsorption de l'enzyme sur les globules gras de l'Intralipid (Vitrum, Stockholm, Suède), selon la technique décrite par Posner *et al* (1983). Quinze mg de poudre sont dissous dans 4 ml d'un tampon 50 mM $\text{NH}_4\text{OH-HCl}$, pH 8,5 contenant 0,1 % de Triton X-100 (v/v) (Sigma). La solution est centrifugée pendant 4 min à faible vitesse (1 500 g). La LPL contenue dans le surnageant est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de sépharose-héparine 4B préparée selon la technique décrite par Iverius (1971). Compte tenu de la très grande instabilité de l'enzyme purifiée, la préparation obtenue est immédiatement utilisée pour les différentes études cinétiques.

Conditions expérimentales des études enzymatiques

Le substrat utilisé est constitué par 250 mg de trioléoylglycérol purifié par CCM (Sigma) et de 10 μCi de Tri [^{14}C] oléoylglycérol (51 mCi/mmol - Amersham) dans 20 ml de tampon Tris-HCl 0,2 M à pH 8,5 contenant 6% de sérum albumine bovine (*free fatty acid fraction*, Sigma) et 0,1% (v/v) de Triton X-100 (Sigma). Le mélange est ensuite émulsionné par ultrasons pendant 10 min dans un bain de glace.

Le milieu d'incubation préparé selon le protocole décrit par Nilsson-Ehle et Schotz (1976) contient le substrat à la concentration de 5,6 mM et la source d'enzyme provenant soit de lait écrémé (24 $\mu\text{l/ml}$), soit de la LPL purifiée (0,3 $\mu\text{g/ml}$). A ce milieu standard sont ajoutés, selon les cinétiques étudiées, l'une ou l'autre des solutions salines (KCl, NaCl, MgCl_2 ou CaCl_2) et l'activateur lipoprotéinique (HDL) à raison de 750 μg de protéine/ml. Les concentrations en sels des différentes solutions ajoutées au milieu standard sont établies de façon à ce que l'augmentation de force ionique du milieu soit la même pour chaque élément minéral utilisé. Dans les études sur la LPL purifiée, seuls les sels de sodium et de calcium ont été testés.

Après incubation pendant 30 min à 37 °C en présence d'HDL ou 120 min à 37 °C en absence d'HDL, la réaction est stoppée par addition de 3,25 ml d'un mélange CHCl_3 , C_7H_{16} , CH_3OH (5:4:5,6, v/v/v) (Belfrage et Vaughan, 1969) et 1 ml de NaOH 0,2 M (Wang *et al*, 1985). Le mélange est agité au vortex pendant 30 s puis centrifugé à 3 000 g pendant 15 min. La radioactivité est mesurée sur 1 ml de la phase supérieure mélangée à 4 ml de liquide de scintillation (Pico-fluor-Packard).

L'activité spécifique est exprimée en μmoles d'acide oléique libérées par min et par mg de protéine. La concentration protéique est déterminée selon la méthode de Lowry *et al* (1951).

La force ionique est calculée par l'équation :

$$I = 1/2 \sum M_i Z_i^2$$

M_i étant la molarité des ions et Z_i la charge des ions (Segel, 1976).

Préparation des HDL

Les HDL sont préparées à partir du sérum de vache par ultracentrifugation séquentielle selon la méthode décrite par Socorro et Camejo (1979). Les limites de densité retenues pour isoler les HDL bovines sont comprises entre 1,05 et 1,1 g/ml (Quincey *et al*, 1987). La fraction HDL est ensuite dialysée pendant 72 h contre une solution à 0,01% de NaN_3 (Sigma) et 0,04% de Na_2EDTA (Merck) à 4 °C, puis stockée à -30 °C.

RÉSULTATS

Action des lipoprotéines de haute densité (HDL) sur la lipoprotéine lipase

La relation entre le temps d'incubation et l'activité de l'enzyme lipase a été étudiée pendant 30 min en présence d'activateur HDL et 120 min en son absence. Dans nos conditions expérimentales, quelle que soit la source de lipoprotéine lipase (mLPL ou LPL purifiée), la relation est linéaire jusqu'à 35 min en présence d'HDL et 140 min en absence d'HDL. La présence d'HDL dans le milieu d'incubation augmente l'activité spécifique de la mLPL : 9 nmol/min/mg de protéines en absence d'HDL contre 62 nmol/min/mg de protéines en présence d'HDL. Le même phénomène a été observé avec la LPL purifiée, l'activité spécifique passant de 39,5 $\mu\text{mol/min/mg}$ de protéines en absence d'HDL à 200 $\mu\text{mol/min/mg}$ de protéines en présence d'HDL.

Effet du sodium et du potassium sur l'activité de la mLPL

Les variations de l'activité de la mLPL en fonction des concentrations en NaCl et KCl

sont reportées sur la figure 1. En présence d'HDL, on observe une inhibition de l'activité de la mLPL similaire pour les ions sodium et potassium. Cette inhibition atteint 38% lorsque ces 2 sels sont ajoutés à une concentration de 600 mM dans le milieu. En absence d'HDL, cette inhibition n'est constatée qu'à partir d'une concentration en sel de sodium de 240 mM et atteint 32% à 600 mM. L'absence de l'activateur ne modifie pas l'allure de la courbe d'inhibition mais diminue la sensibilité de l'enzyme. Pour les 2 sels étudiés, on obtient une courbe d'inhibition biphasique avec un point d'inflexion correspondant à des concentrations en sels comprises entre 240 et 360 mM.

Effet du calcium et du magnésium sur l'activité de la mLPL

L'addition de concentrations croissantes en calcium et magnésium induit une très nette inhibition de l'activité de la mLPL (fig 2). On peut constater d'une part que l'inhibition est plus marquée avec le calcium et d'autre part que lorsque les deux sels sont ajoutés à une concentration supérieure à 120 mM, l'activité résiduelle de la mLPL est nulle. Contrairement à ce que nous avons observé avec le sodium, l'absence d'HDL ne fait qu'accentuer l'intensité de l'inhibition. Ainsi, l'addition de calcium à 80 mM inhibe à 95% l'activité de la mLPL alors que l'addition de la même concentration d'ions Na^+ provoque une légère stimulation de la mLPL.

Effet du calcium et du sodium sur la LPL purifiée

L'activité résiduelle de l'enzyme lipase en fonction de la concentration de CaCl_2 est présentée fig 3 en présence d'HDL et fig 4

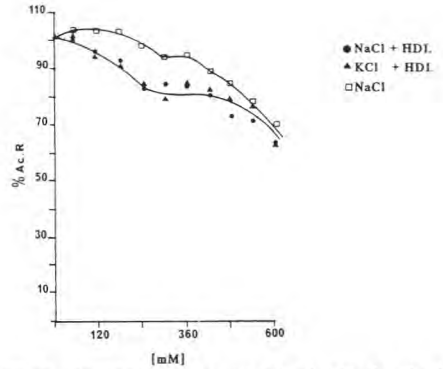


Fig 1. Pourcentage d'activité résiduelle de la mLPL en fonction de différentes concentrations de sels monovalents. NaCl + 750 $\mu\text{g/ml}$ HDL (●); KCl + 750 $\mu\text{g/ml}$ HDL (▲); NaCl sans HDL (□).

Percentage of residual activity of mLPL at different monovalent salt concentrations. NaCl + 750 $\mu\text{g/ml}$ HDL (●); KCl + 750 $\mu\text{g/ml}$ (▲); NaCl without HDL (□).

en absence d'HDL. L'addition de quantités croissantes de sels de calcium induit une très nette inhibition de l'activité de la LPL purifiée. En présence d'HDL, une inhibition

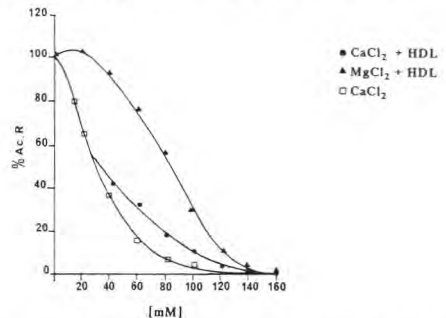


Fig 2. Pourcentage d'activité résiduelle de la mLPL en fonction de différentes concentrations de sels divalents. CaCl_2 + 750 $\mu\text{g/ml}$ HDL (●); MgCl_2 + 750 $\mu\text{g/ml}$ HDL (▲); CaCl_2 sans HDL (□).

Percentage of residual activity of mLPL at different divalent salt concentrations. CaCl_2 + 750 $\mu\text{g/ml}$ (●); MgCl_2 + 750 $\mu\text{g/ml}$ (▲); CaCl_2 without HDL (□).

complète est obtenue pour des concentrations en CaCl_2 supérieures à 160 mM (fig 3). En absence d'HDL, l'inhibition de la LPL par les ions calcium est accentuée. En effet, l'addition de CaCl_2 à 80 mM inhibe à 95% l'activité de la LPL (fig 4).

L'activité résiduelle de la LPL purifiée en fonction du taux de sodium ajouté au milieu d'incubation est présentée dans les figures 3 et 4. On constate un comportement très spécifique de la LPL vis-à-vis du chlorure de sodium. En effet, à faible concentration, on note une stimulation de l'activité en présence ou non d'HDL, alors qu'à forte concentration (NaCl 360 mM), on observe une diminution de l'activité. L'inhibition par le NaCl reste toutefois partielle, puisqu'elle n'atteint que 40% en présence d'HDL et 50% en leur absence.

Le degré d'inhibition est indépendant de l'augmentation de force ionique du milieu.

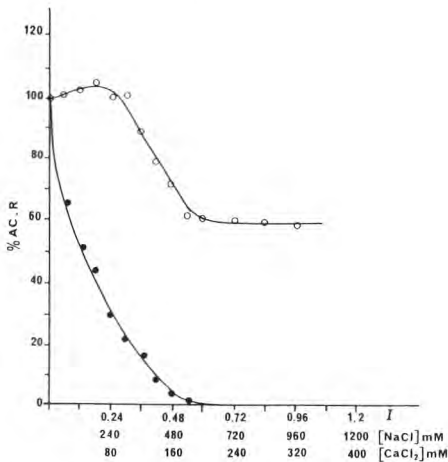


Fig 3. Pourcentage d'activité résiduelle de la LPL purifiée en fonction de la force ionique et des différentes concentrations en CaCl_2 (●) ou NaCl (○) en présence de 750 µg/ml de HDL.

Percentage of residual activity of purified LPL in function of ionic strength and different concentrations of CaCl_2 (●) or NaCl (○) in presence of HDL 750 µg/ml.

En effet pour une même élévation de force ionique ($I = 0,24$), on note une perte d'activité de 90% avec CaCl_2 alors que l'activité n'est pas modifiée avec NaCl .

DISCUSSION

L'augmentation du taux d'acides gras libres dans le lait par addition d'HDL est un phénomène bien connu (Clegg, 1980; Sundheim *et al*, 1983). Le taux d'HDL mais également leur répartition dans les différentes fractions du lait présenterait une très grande variabilité individuelle (Anderson, 1979). Selon cet auteur, la concentration en activateur d'un lait représente un facteur important de l'intensité de la lipolyse *in vivo*. Dans nos conditions *in vitro*, l'addition d'un taux saturant d'HDL augmente d'environ 7 fois le pouvoir catalyti-

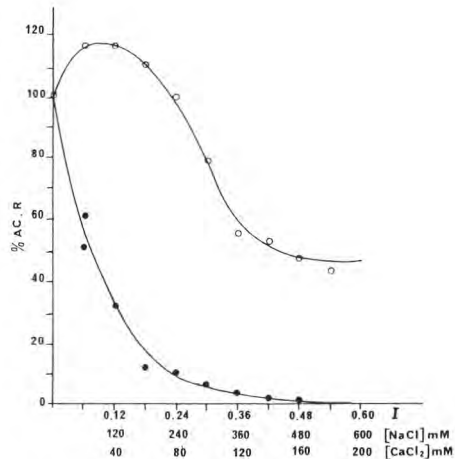


Fig. 4. Pourcentage d'activité résiduelle de la LPL purifiée en fonction de la force ionique et des différentes concentrations en CaCl_2 (●) ou NaCl (○) en absence de HDL.

Percentage of residual activity of purified LPL according to ionic strength and different concentrations of CaCl_2 (●) or NaCl (○) in absence of HDL.

que de l'enzyme mLPL et d'environ 5 fois celui de l'enzyme LPL purifiée. Ainsi, nous avons pu confirmer une grande similitude de comportement de la mLPL et LPL purifiée. Toutefois, on peut noter que la stimulation de l'activité de la LPL par l'apoC-II vis-à-vis d'un substrat triglycéride est très variable suivant les auteurs et varie d'un facteur 2 à 30 (Posner, 1982).

Les ions monovalents (Na^+ , K^+) induisent une perte d'activité de la mLPL tout à fait identique en présence d'HDL pour toutes les concentrations testées. L'activité de la mLPL ou sous forme purifiée en fonction de la concentration en sels monovalents évolue suivant une courbe biphasique. Aux concentrations inférieures à 0,25 M, on constate une légère stimulation de l'activité de la mLPL en absence d'HDL et en revanche, une perte de 15% d'activité de la mLPL en présence d'HDL. Aux concentrations supérieures à 0,25 M, on constate une forte inhibition de l'activité mLPL en présence ou en absence d'activateurs HDL. Fielding et Fielding (1976) ont montré que les sels de Na 1,0 M entraînent une inhibition de 70% de la LPL purifiée en présence de substrat trioléine et d'activateur VLDL. Dans nos conditions expérimentales (même substrat trioléine mais activateur HDL), l'inhibition de la LPL purifiée atteint 40% pour une concentration de NaCl 1 M. Cette différence peut être expliquée, en partie, par la nature différente de l'agent stabilisant (Riley et Robinson, 1974). L'effet NaCl sur l'activité de la LPL dépendrait non seulement de la concentration en sels mais également de la nature physique du substrat triacylglycérol. Ainsi, Rapp et Olivecrona (1978) décrivent une stimulation de la LPL purifiée en présence de substrat tributyrine et de sels de Na 0,5 M. Plusieurs hypothèses ont été formulées quant au mode d'action du sodium sur la LPL purifiée. Les ions Na^+ pourraient intervenir au niveau du com-

plexe enzyme-activateur (Fielding et Fielding, 1976), mais également au niveau du complexe enzyme-substrat (Posner et Morrisson, 1979). Nos résultats nous permettent de rejoindre cette dernière hypothèse selon laquelle le NaCl, à faible concentration, augmente la liaison de l'enzyme avec le substrat et, à forte concentration, diminue l'interaction enzyme-substrat sans toutefois bloquer totalement son activité.

Pour toutes les concentrations testées, les ions divalents (Ca^{++} , Mg^{++}) exercent un effet inhibiteur sur la lipoprotéine lipase. Aux faibles concentrations, l'effet inhibiteur du calcium est beaucoup plus important que celui du magnésium. Cet effet inhibiteur, induit par les ions Ca^{++} se manifeste dès les plus faibles concentrations en CaCl_2 dans le milieu d'incubation mettant en évidence une grande sensibilité de la lipoprotéine lipase aux ions calcium. Cette très grande sensibilité est aussi observée sur la LPL purifiée. Les résultats obtenus par différents auteurs sur l'influence du calcium sur la LPL montrent une grande hétérogénéité. Korn et Quingley (1955) ont constaté qu'une forte concentration de Ca^{++} inhibe l'activité de la LPL tissulaire mais qu'une faible concentration (10 à 20 mM) augmente son activité, l'optimum de l'activité étant obtenu pour une concentration de Ca^{++} 10 mM. D'autres auteurs ont montré que le Ca^{++} 50 mM stimule l'activité de la LPL posthéparine (Doizaki et Zieve, 1966; Posner et Morales, 1972). La sensibilité de l'enzyme dépendrait également de la nature des sels de calcium utilisés; ainsi, Shahani et Chandan (1965) ont montré que le pourcentage d'inhibition de la LPL purifiée était de 16% avec CaCl_2 et de 45% avec $\text{Ca}(\text{OH})_2$ et ce pour des concentrations équivalentes en sels (5 mM). Dans nos conditions, 50 mM de Ca^{++} produit une forte inhibition de la mLPL ou de la LPL purifiée et peut atteindre respec-

tivement 62% et 75% en présence ou en absence d'HDL. Thomas *et al* (1971) considèrent que le Ca^{++} agirait comme cofacteur de la LPL avec un optimum d'activité réalisé à la concentration physiologique de 1,25 à 2,5 mM. Au-delà de cette concentration, le Ca^{++} inhiberait l'activité de la LPL tissulaire. L'hétérogénéité de ces résultats pourrait s'expliquer par les variations du taux de citrate dans la sérum albumine bovine présente dans le milieu d'incubation (Thomas *et al*, 1971) ou du type de détergent utilisé comme agent émulsifiant (Posner et Morales, 1972). Selon Thomas *et al* (1971), le Mg^{++} jusqu'à 12 mM agit peu sur l'activité de la LPL tissulaire. Nos résultats, obtenus sur la mLPL, sont en accord avec ceux de ces derniers auteurs.

Dans nos conditions expérimentales, l'intensité de l'inhibition observée *in vitro* sur la lipoprotéine lipase présente dans le lait écrémé ou sous forme purifiée dépend essentiellement de la nature des sels incorporés dans le milieu et non de la force ionique. On peut noter, cependant, que Fielding (1968) a rapporté que le taux d'inactivation de la LPL tissulaire était dépendant de la force ionique et non de la concentration des ions présents dans le milieu d'incubation.

Les résultats obtenus *in vitro* montrent une parfaite similitude de l'interdépendance de la lipoprotéine lipase du lait écrémé ou sous forme purifiée vis-à-vis des sels minéraux et d'HDL. Sans être directement extrapolables au comportement de la lipoprotéine lipase dans son milieu naturel, les résultats obtenus nous permettent de penser que la variabilité des concentrations en calcium et en lipoprotéines (HDL) dans le lait pourrait jouer un rôle dans les variations individuelles observées au niveau de la lipolyse du lait de vache.

REMERCIEMENTS

Nous remercions MC Dubourg pour la dactylographie du manuscrit. Cette étude a été réalisée grâce au concours financier du Conseil régional de Basse-Normandie.

RÉFÉRENCES

- Ahrné L, Björck L (1985) Lipolysis and distribution of lipase activity in bovine milk in relation to stage of lactation and time of milking. *J Dairy Res* 52, 55-64
- Anderson M (1979) Enzyme immunoassay for measuring lipoprotein lipase activator in milk. *J Dairy Sci* 62, 1380-1383
- Anderson M (1981) Inhibition of lipolysis in bovine milk by proteose peptone. *J Dairy Res* 48, 247-252
- Anderson M (1982) Factors affecting the distribution of lipoprotein lipase activity between serum and casein micelles in bovine milk. *J Dairy Res* 49, 51-59
- Belfrage P, Vaughan M (1969) Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J Lipid Res* 10, 341-344
- Bengtsson G, Olivecrona T (1982) The effects of pH and salt on the lipid binding and enzyme activity of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 751, 254-259
- Cartier P, Chilliard Y (1986) Effects of different skim milk fractions on activity of cow milk purified lipoprotein lipase. *J Dairy Sci* 69, 951-955
- Chazal MP, Chilliard Y (1987a) Les variations individuelles de la lipolyse spontanée du lait de vache : effet du numéro de lactation et répétabilité au cours de deux lactations successives. *Lait* 67, 437-450
- Chazal MP, Chilliard Y (1987b) Effect of breed of cow (Friesian and Montbéliarde) on spontaneous and induced lipolysis in milk. *J Dairy Res* 54, 7-11
- Clegg RA (1980) Activation of milk lipase by serum proteins: possible role in the occur-

- rence of lipolysis in the raw bovine milk. *J Dairy Res* 47, 61-70
- Doizaki WM, Zieve L (1966) An improved substrate preparation for postheparin plasma lipase. *Proc Soc Exp Biol Med* 122, 606-609
- Diressen FM, Stadhouders J (1974) A study of spontaneous rancidity. *Neth Milk Dairy J* 28, 130-145
- Egelrud T, Olivecrona T (1973) Purified bovine milk lipoprotein lipase: activity against lipid substrates in the absence of exogenous serum factors. *Biochim Biophys Acta* 306, 115-127
- Fielding CJ (1968) Inactivation of lipoprotein lipase in buffered saline solution. *Biochim Biophys Acta* 159, 94-102
- Fielding JC, Fielding EP (1976) Mechanism of salt-mediated inhibition of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 17, 248-256
- Iverius HP (1971) Coupling of glycosaminoglycans to agarose beads (sepharose 4B). *Biochem J* 124, 677-683
- Korn ED, Quigley TW Jr (1955) Studies on lipoprotein lipase of rat heart and adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 18, 143-145
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr LA, Randall JR (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 263-275
- Needs CE, Anderson M, Payne JS, Ridout AE (1985) Influence of processing temperature and seasonal change in diet on lipase activity and lipolysis during the mechanical separation of bovine milk. *J Dairy Res* 52, 255-266
- Nilsson-Ehle P, Schotz CM (1976) A stable radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 17, 536-541
- Ortiz MJ, Keslere M, Watrous GH Jr, Cloninger WH (1970) Effect of the cow's body condition and stage of lactation on development of milk rancidity. *J Milk Food Technol* 33, 339-342
- Posner I, Morales A (1972) Mechanisms of enzyme and substrate activation by lipoprotein lipase cofactors. *J Biol Chem* 247, 2255-2265
- Posner I, Morrisson DA (1979) The cofactor effects of serum lipoproteins on lipoprotein lipase activity and its inhibition by sodium chloride. *Acta Cient Venez* 30, 143-151
- Posner I (1982) Mechanisms of enzyme activation in the lipoprotein lipase system. *Atheroscler Rev* 9, 123-156
- Posner I, Wang CS, McConathy JW (1983) The comparative kinetics of soluble and immobilized bovine lipoprotein lipase. *Arch Biochem Biophys* 226, 306-318
- Quincey D, Le Goff D, Fresnel J, Nouvelot A (1987) Quantitative alteration of bovine serum lipoproteins with ageing. *Comp Biochem Physiol* 88B, 929-937
- Rapp D, Olivecrona T (1978) Kinetic of milk lipoprotein lipase. Studies with tributyrin. *Eur J Biochem* 91, 379-385
- Riley ES, Robinson SD (1974) Studies on the assay of clearing factor lipase (lipoprotein lipase). *Biochim Biophys Acta* 369, 371-386
- Segel HI (1976) *Biochemical Calculation*. 2nd edition. Wiley J & Sons, New York, 5
- Shahani MK, Chandan CR (1965) Activity of purified milk lipase in the presence of milk constituents. *Arch Biochem Biophys* 111, 257-263
- Socorro L, Camejo G (1979) Preparation and properties of soluble immuno-reactive Apo LDL. *J Lipid Res* 20, 631-638
- Sundheim G, Zimmer LT, Astrup NH (1983) Induction of milk lipolysis by lipoprotein components of bovine blood serum. *J Dairy Sci* 66, 400-406
- Sundheim G, Bengtsson-Olivecrona G (1985) Lipolysis in milk induced by cooling or by heparin: comparisons of amount of lipoprotein lipase in the cream fraction and degree of lipolysis. *J Dairy Sci* 68, 589-593
- Sundheim G, Bengtsson-Olivecrona G (1987a) Isolated milk fat globules as substrate for lipoprotein lipase: study of factors relevant to spontaneous lipolysis in milk. *J Dairy Sci* 70, 499-505
- Sundheim G, Bengtsson-Olivecrona G (1987b) Hydrolysis of bovine milk fat globules by lipoprotein lipase: inhibition by protein extracted

- from milk fat globule membrane. *J Dairy Sci* 70, 1 815-1 821
- Sundheim G (1988) Spontaneous lipolysis in bovine milk: combined effects of cream, skim milk, and lipoprotein lipase activity. *J Dairy Sci* 71, 620-626
- Thomas F, Whayne Jr, Felts MJ (1971) Activation of lipoprotein lipase. Evaluation of calcium, magnesium, and ammonium as cofactors. *Circ. Res.* 28, 649-654
- Wang CS, McConathy JW, Kloer UH, Alaupovic P (1985) Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. *J Clin Invest* 75, 384-390
- Wang L, Randolph EH (1978) Activation of lipolysis. I. Distribution of lipase activity in temperature activated milk. *J Dairy Sci* 61, 874-880