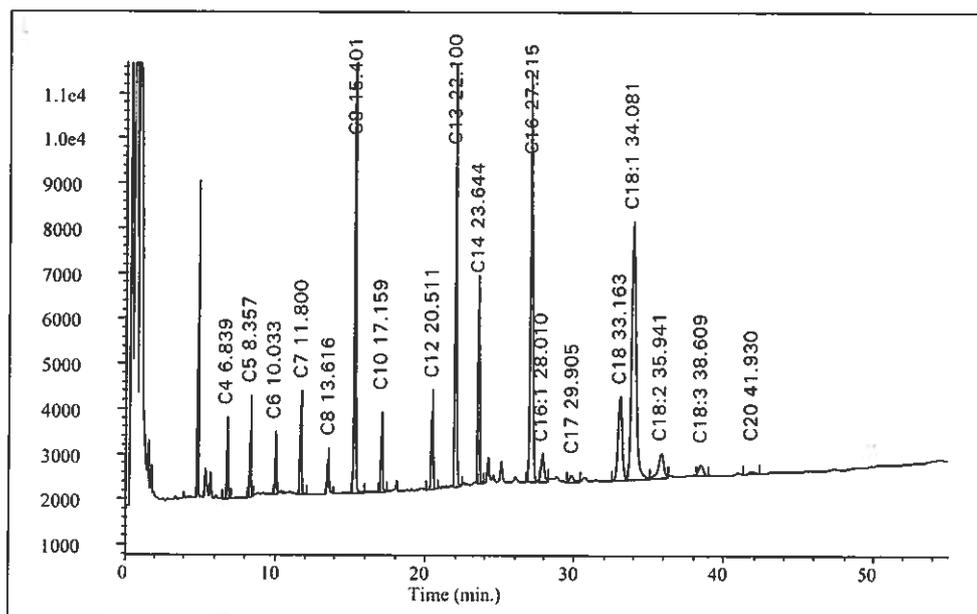


## Revue des méthodes de dosage des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers

M. Collomb et M. Spahni



Compo acides gras libres du lait selon de Jong et Badings (99)



## Review Article

# Revue des Méthodes de Dosage des Acides Gras Libres dans le Lait et les Produits Laitiers

M. Collomb et Monika Spahni

Station fédérale de recherches laitières, CH-3097 Liebefeld-Berne (Suisse)

(Received October 7, 1994; accepted December 12, 1994)

*Le présent travail passe en revue les méthodes de dosage global des acides gras libres et des acides gras libres individuels de la lipolyse dans le lait et les produits laitiers. Il présente sous forme de tableaux et de commentaires les principes de base des méthodes, leurs précisions (répétabilité et/ou domaines de répétabilité), les taux de récupération des différents acides gras libres, les corrélations entre différentes méthodes ainsi que les seuils de perception organoleptiques pour différents produits laitiers. Il présente également les principaux inhibiteurs de la lipolyse à l'usage des laboratoires.*

### Review of the Methods used for the Determination of Free Fatty Acids in Milk and Dairy Products

*Methods for the global and individual determination of free fatty acids from lipolysis in milk and dairy products are reviewed. They are presented as tables and commentaries on the principles of each method, their precision (repeatability and/or domains of repeatability), levels of recovery of the different free fatty acids, correlations between the different methods as well as the organoleptic perception threshold for different dairy products. The most important inhibitors of lipolysis used in the laboratory are also listed.*

©1995 Academic Press Limited

### Introduction

Dans le lait, la matière grasse (MG) se trouve sous forme de globules gras constitués de lipides entourés d'une membrane protectrice faite principalement de phospholipides et de protéines. Cette membrane constitue une barrière naturelle contre l'accès de la lipase naturelle du lait ou d'enzymes étrangères telles que les enzymes extracellulaires thermorésistantes produites par des bactéries psychotrophes qui croissent lors de la réfrigération du lait. En cas d'endommagement des membranes des globules gras, ces diverses enzymes réagissent avec les lipides en produisant des acides gras libres (AGL) et des glycérides partiels. Ce processus, connu sous le nom de lipolyse, peut se développer dans tous les produits laitiers et provoquer l'apparition du défaut de rancidité dû à une concentration trop élevée en AGL à courtes chaînes C<sub>4</sub> - C<sub>12</sub>. Il peut également modifier les propriétés moussantes du lait, provoquer une perte accrue de MG qui se retrouve dans le lait maigre et un léger retard de la croissance des bactéries lactiques dans les produits laitiers fermentés (1-3).

Les méthodes de dosage des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers peuvent être subdivisées entre celles permettant uniquement le dosage global des AGL et celles permettant en plus un dosage des AGL individuels (1, 3-5). Les méthodes de dosage global des AGL font appel à des déterminations rapides avec des techniques titrimétriques, photométriques ou enzymatiques et permettent de quantifier le degré de

lipolyse. En revanche, ces dosages ne sont pas toujours à même de caractériser le défaut de rancidité car on ne détermine pas spécifiquement les acides à courtes chaînes responsables de ce défaut organoleptique. Quant aux méthodes de dosage des AGL individuels, elles font appel à des techniques chromatographiques qui permettent une détermination directe du degré de lipolyse (somme des concentrations des acides gras C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub>) et de celui de la rancidité (concentration de chaque acide gras de C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>) (7). Cependant, ces méthodes ne permettent pas d'obtenir des résultats correspondant à l'instant du prélèvement des échantillons si on ne stabilise pas ces échantillons contre une lipolyse additionnelle qui peut se produire durant le transport et l'entreposage avant l'analyse. Dans ce but, on a à disposition différents modes d'inactivation des lipases (1-4, 6).

Le présent travail consiste à passer en revue les principaux inhibiteurs de la lipolyse à l'usage des laboratoires ainsi que les méthodes de dosage global des AGL et des AGL individuels dans le lait et les produits laitiers. Il présente aussi quelques corrélations entre les teneurs en AGL et la rancidité.

### Acides Impliqués

Dans les produits laitiers, on trouve essentiellement des acides résultant de la lipolyse de la MG, de processus de fermentation et de la dégradation des acides aminés.

Les AGL provenant de la lipolyse sont essentiellement des monoacides aliphatiques saturés et insaturés à chaîne linéaire ou ramifiée ayant un nombre pair et impair d'atomes de carbone. Ceux provenant de fermentations telles que les fermentations acétique, propionique, butyrique ou de la dégradation des acides aminés comme celle de la phénylalanine en acides phénylacétique ou phénylpropionique sont surtout présents dans les fromages (2, 3).

### Inhibiteurs de la Lipolyse

Pour la stabilisation des échantillons avant l'analyse, les lipases peuvent être inactivées par des moyens chimiques et physicochimiques.

### Inactivation chimique

Le **Tableau 1** présente les principaux agents chimiques d'inhibition des lipases. Certains inhibiteurs (7-9) sont déjà couramment employés dans les laboratoires; les autres mériteraient d'être testés quant à cet usage.

On constate que la réduction de l'activité lipolytique par un agent chimique est dépendante de sa concentration dans le produit, du produit lui-même et du taux d'endommagement (9) des membranes des globules gras au moment de l'addition. L'effet inhibiteur des métaux lourds est connu depuis longtemps (1). Jamotte (7) a confirmé l'efficacité du bichromate de potassium. Les concentrations nécessaires pour inhiber les lipases sont bien supérieures à celles utilisées pour éviter une contamination bactérienne en vue du dosage de la MG et des protéines (env. 1 g/L). Cet auteur a également établi l'inefficacité de l'azoture de sodium

**Tableau 1** Agents chimiques d'inhibition de l'activité lipolytique dans le lait et de la crème suivant divers auteurs

| Agents d'inhibition  | Produits   | Concentration optimale                       | Inhibition (%)      | Références                |
|--|--|--|---------------------|---------------------------|
| $K_2Cr_2O_7$   | Lait   | 2.0 g/L                                      | n.d.                | Jamotte (7)               |
| $K_2Cr_2O_7$   | Crème  | 1.5 g /L                                     | n.d.                | Jamotte (7)               |
| $H_2O_2$   | Lait   | 0.2 g/L                                      | n.d.                | Jellema (8)               |
| $\lambda$ -carraghénane  | Lait cru (activé thermiquement) <sup>a</sup>                                       | 0.25 g/L                                     | 60-100 <sup>c</sup> | Shipe <i>et al.</i> (9)   |
|  | Lait cru (activé mécaniquement) <sup>b</sup>                                       | 0.5 g/L                                      | 85 <sup>d</sup>     |                           |
|  | Lait past. et homogénéisé (activé par addition de lait maigre)                     | 0.5 g/L                                      | 90-100              |                           |
|  | Lait cru (activé par homogénéisation)  | 0.5 g/L                                      | 53                  |                           |
| $\lambda$ -carraghénane  | Lait pasteurisé et homogénéisé   | 0.3 g/kg                                     | 93.7                | Stern <i>et al.</i> (10)  |
| $\iota$ -carraghénane  |  | 0.3 g/kg                                     | 81.2                |                           |
| $\kappa$ -carraghénane   |  | 0.3 g/kg                                     | 62.1                |                           |
| Alginate de sodium   |  | 3.0 g/kg                                     | 50.6                |                           |
| Furcellarane   |  | 0.3 g/kg                                     | 46.8                |                           |
| 1-ascorbyl 6-palmitate (AP)  | Cultures mixtes brutes de <i>Pseudomonas</i> incubés dans du lait maigre dégraissé | 20 g/L                                       | 100                 | Harris et Cuppett (11)    |
| d- $\alpha$ -tocophérol (AT)   |  | 20 g/L                                       | 80                  |                           |
| Oléate de sodium   | Cultures mixtes brutes de <i>Pseudomonas</i> incubés dans du lait maigre dégraissé | ≥ 20 g/L                                     | 100                 | Harris et Cuppett (12)    |
| Stéarate de sodium   |  |  |                     |                           |
| Stéaroyl-2-lactylate de sodium   |  |  |                     |                           |
| Stéaroyl-2-lactylate de calcium  |  |  |                     |                           |
| Histidine + $MgCl_2$ + Chauffage à 65 °C durant 20 min à pH 6,1  | Bouillon peptoné de cultures de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 27                  | n.i.   | 100                 | Christen et Marshall (14) |
|  | Bouillon de cultures dialysé + $MgCl_2$ + histidine                                | $MgCl_2$ : 0.5 mmol/L<br>Histidine: 5 mmol/L | 100                 |                           |
| Isothiazolon (Subst. active: Kathon DP: 10g/kg) 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (Bronopol) Chloramphenicol | Laits et crèmes activés mécaniquement et thermiquement                             | 170-200 mg/kg                                | << 100 <sup>e</sup> | Imhof et Bosset (13)      |
|  |  | 3.3 mg/kg                                    | << 100 <sup>e</sup> |                           |
|  |  | 25 mg/kg                                     | ~ 100               |                           |

n.d. = non déterminé; n.i. = non indiqué.

<sup>a</sup> Chauffé à 30 °C et refroidi à 5 °C.

<sup>b</sup> Waring Blendor, 15 s à haute vitesse.

<sup>c</sup> Ajout du carraghénane avant chauffage = 100% d'inhibition. Ajout après refroidissement = 60% d'inhibition.

<sup>d</sup> Valable pour un temps d'activation de 15 s.

<sup>e</sup> Décroissante en fonction du temps d'entreposage.

comme agent conservateur. Jellema (8) recommande une addition d'eau oxygénée suivi d'un refroidissement du lait. Shipe *et al.* (9) ont déterminé l'influence du  $\lambda$ -carraghénane sur des laits dont la lipolyse est activée thermiquement (chauffage à 30 °C durant 5 min et refroidissement à 5 °C), mécaniquement ('Waring Blendor' 15 et 30 s à 5 °C et à haute vitesse), par addition de lait maigre cru (Addition de 20 ml/L de lait maigre cru dans du lait pasteurisé et homogénéisé) et par homogénéisation. Le taux de lipolyse est déterminé par dosage des AGL après un entreposage à 5 °C durant 24 ou 48 h suivant les variantes de l'essai. Pour des concentrations en  $\lambda$ -carraghénane de 0.1, 0.25 et 0.5 g/L, les taux d'inhibition lipolytique dans les laits dont la lipolyse est activée thermiquement sont respectivement de 93, 100 et 100% si le  $\lambda$ -carraghénane est ajouté avant le chauffage à 30 °C et de 60, 60 et 56 % si l'addition est effectuée après le refroidissement à 5 °C. Pour les laits dont la lipolyse est activée mécaniquement pendant 15 s, les taux d'inhibition sont respectivement de 55, 75 et 85 % et de 36, 53 et 73 % pour 30 s d'activation. Pour des laits homogénéisés, le  $\lambda$ -carraghénane inhibe respectivement 41, 45 et 53 % de l'activité lipolytique. L'addition de  $\lambda$ -carraghénane à une concentration de 0.5 g/L réduit d'au moins 90 % l'activité lipolytique produite par addition de 20ml/L de lait maigre cru à du lait pasteurisé et homogénéisé. Stern *et al.* (10) ont mesuré l'effet inhibiteur de divers polysaccharides, le  $\lambda$ -carraghénane, le  $\kappa$ -carraghénane, le  $\kappa$ -carraghénane, l'alginate de sodium et le furcellarane sur l'activité de la lipase du lait et celui du  $\lambda$ -carraghénane sur l'activité de la lipase extracellulaire de *Pseudomonas fluorescens* M 50. Après addition des lipases à un mélange constitué de lait et des polysaccharides, le taux d'hydrolyse a été déterminé après entreposage des laits durant 48 h à 4 °C. Le  $\lambda$ -carraghénane inhibe en moyenne le 87 % de l'activité des lipases microbiennes additionnées au lait et a donc aussi bien un effet inhibiteur sur l'activité de la lipase naturelle du lait que sur celle des lipases microbiennes. Selon ces auteurs, la réduction de l'activité des lipases semble être associée à une interaction électrostatique entre la lipase du lait et les polysaccharides chargés négativement. Harris et Cuppett (11) ont étudié l'effet inhibiteur de divers antioxydants, le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), le tert. Butylhydroxyquinone (TBHQ), le tenox 4 (20g/100 g de BHA, 20 g/100 g de BHT et 60 g/100 g d'huile de céréales), le tenox 8 (20 g/100 g de BHT et 80 g/100 g d'huile de céréales), le 1-ascorbyl 6-palmitate (AP) et le d- $\alpha$ -tocophérol (AT)) sur l'activité lipolytique de cultures mixtes brutes de *Pseudomonas* isolées du lait. Les antioxydants et les cultures mixtes brutes ont été incubés à 25 et 40 °C pendant 30 min. Le taux d'inhibition de l'activité des lipases diminue à mesure que la température d'incubation augmente. A 25 °C, tous les antioxydants testés inhibent plus ou moins fortement l'activité des lipases extracellulaires. Les antioxydants AP et AT sont les meilleurs inhibiteurs. A 40 °C, les taux d'inhibition produits par le AT et le AP diminuent respectivement de 80 à 62 % et de 100 à

89 %. Ces mêmes auteurs (12) ont déterminé l'effet inhibiteur de quatre émulsifiants, l'oléate de sodium, le stéarate de sodium et le stéaroyl-2-lactylate de sodium et de calcium sur les mêmes bactéries psychotrophes incubées dans du lait maigre dégraissé. Chaque émulsifiant a été testé à des concentrations de 5, 10 et 20 g/L. L'effet inhibiteur croît à mesure que la concentration en émulsifiants augmente. A 20 g/L, l'effet inhibiteur est de 100 % pour les quatre produits testés. A une concentration de 10 g/L, le stéaroyl-2-lactylate de sodium réduit l'activité lipasique de 21 à 25 % alors que le sel de calcium correspondant ne la réduit que de 7 à 10 %. Imhof et Bosset (13) ont testé toute une série d'agents de conservation destinés à stabiliser les échantillons pendant leur transport et leur entreposage avant l'extraction des AGL. Seuls l'isothiazolon (substance active du Kathon DP™), le bronopol et le chloramphénicol (un antibiotique) entrent en ligne de compte puisqu'ils ne gênent ni n'interfèrent lors du titrage des AGL. L'isothiazolon et le bronopol ne sont néanmoins pas à même d'empêcher une certaine lipolyse d'échantillons fortement endommagés thermiquement et mécaniquement, d'où leur abandon pour la pratique. Quant à l'antibiotique testé, s'il donne satisfaction sur le plan technique, les dangers liés à son emploi ne permettent pas de l'utiliser en routine. Christen et Marshall (14) ont mesuré la stabilité thermique des lipases de *Pseudomonas fluorescens* 27 dans des bouillons peptonés d'extraits de levures. Ces auteurs ont constaté que la lipase était inactivée à pH 6 à la température de 65 °C. Dans le bouillon de cultures dialysé, l'inactivation de la lipase n'est totale qu'après adjonction d'histidine et de chlorure de magnésium. Comme l'inactivation des lipases est dépendante du pH, ces auteurs concluent que le groupe imidazole de l'histidine devrait être le centre actif du processus d'inhibition. Dring et Fox (6) ont constaté que l'éthylènediaminetétracétate (EDTA) pouvait aussi être un inhibiteur des lipases microbiennes. Les essais ont été effectués sur les lipases *Pseudomonas fluorescens* AFT 27. Quant à l'activité de la lipoprotéine lipase du lait, elle peut également être réduite par addition au lait d'extraits de protéines des membranes des globules gras (15) et de fractions de protéines (protéoses peptones) du lactosérum (16-18).

#### *Inactivation physicochimique*

L'inactivation thermique de la lipase naturelle du lait est connue depuis longtemps (1-3). O'Halloran (19) propose d'immerger les laits dans un bain-marie à ébullition et de les retirer 15 s après que la température ait atteint 72 °C. Driessen et Stadhouders (20) maintiennent une température de 85 °C durant 5 min. Driessen (21) a démontré que l'activité de l'enzyme peut être réduite de 90 % par chauffage du lait à 65 °C durant 74 s ou à 72 °C durant 11.8 s. Dans des laits non homogénéisés pasteurisés durant 15 s à 72 °C, on constate parfois encore une activité résiduelle de la lipoprotéine lipase alors qu'aucune activité n'a été

mesuré dans des laits chauffés durant 10 s à 78 °C (1). Imhof et Bosset (13) ont obtenu d'excellents résultats avec un traitement thermique d'env. deux Minutes dans un bain-marie à ébullition. Des échantillons même fortement endommagés peuvent alors être conservés au moins 24 h à température ambiante.

Dans les échantillons de lait et de crème à analyser, l'activité lipolytique des lipases peut être inhibée par un mélange de solvants acidifié. La réduction du pH dans l'étape initiale de l'extraction des AGL et le milieu organique permettent de prévenir une progression de la lipolyse. Pour le lait et la crème, Lindqvist *et al.* (56) séparent rapidement la phase organique de la phase aqueuse après l'extraction des AGL. Ces auteurs ont démontré que les teneurs en AGL dans les extraits ainsi séparés ne progressent que d'environ 2 % durant une semaine d'entreposage à température ambiante. Imhof et Bosset (13) recommandent également cette technique pour stabiliser les échantillons avant l'extraction selon Deeth. Ils ne constatent pas d'effets de lipolyse pendant au moins 6 jours à 5 °C. Dans la méthode BDI (Bureau of Dairy Industry) (1, 28), l'étape initiale consiste à chauffer le lait ou la crème en présence d'une solution détergente durant 15 min dans un bain-marie bouillant. Selon Doody *et al.* (22), la procédure peut être interrompue. La MG peut être transférée dans un tube et conservée au réfrigérateur en attendant la préparation d'autres échantillons.

### Dosage Global des Acides Gras Libres

#### *Principes de base des méthodes de dosage global des AGL*

Le **Tableau 2** présente les principes de base des plus importantes méthodes de dosage des AGL dans les produits laitiers.

Parmi les méthodes de dosage global des AGL, on peut distinguer les méthodes de dosage indirectes par mesure de la tension superficielle, les dosages dans la matière grasse isolée et les dosages sur un extrait obtenu à l'aide de solvants.

#### *Dosage indirect des AGL par mesure de la tension superficielle*

La présence d'AGL dans le lait diminue sa tension superficielle. Par conséquent, divers auteurs (23, 24) ont utilisé cette propriété pour évaluer l'intensité de la lipolyse dans le lait. La mesure est effectuée à l'aide d'un tensiomètre adapté. Ce paramètre n'est cependant pas très sensible pour l'évaluation de la lipolyse et est de plus dépendant de facteurs tels que la teneur en MG et en protéines, le degré d'homogénéisation et les températures de traitements des laits. Buchanan (25) a proposé un mode opératoire basé sur la détermination de la tension superficielle appelé le 'steam frothing test'. Ce test, très sensible, permet de mesurer l'aptitude du lait à former une mousse ferme sous l'effet

d'une injection de vapeur. On mesure la quantité de mousse formée qui est inversement proportionnelle à la teneur en AGL des laits. Selon Deeth et Fitz-Gerald (26), ce test est valable en tant que test de présélection de laits rances pour autant qu'il soit exécuté dans des conditions standardisées et qu'un calibrage par rapport à une méthode de dosage des AGL plus précise soit effectué. Selon Kuzdzal-Savoie (3), les valeurs obtenues permettent d'apprécier la présence d'AGL avant toute détection organoleptique de la rancidité.

#### *Dosage des AGL dans la matière grasse Isolée*

Ces méthodes comportent une étape d'isolation de la matière grasse suivie de sa dissolution dans un mélange de solvants organiques et d'un titrage des AGL. Le principal problème à résoudre consiste à éviter une coextraction de l'acide lactique. Le titrage des AGL est par contre théoriquement simple car ces acides ont des valeurs pK très voisines permettant de les titrer globalement.

Le **Tableau 3** présente les pK de différents acides dans l'eau.

*Méthodes procédant à l'extraction de la MG à l'aide d'un détergent; méthode BDI et ses variantes.* Le processus analytique de la méthode BDI (Bureau of Dairy Industry) (1, 28) a été décrit par Thomas *et al.* (27). C'est l'une des méthodes les plus connues et des plus employées (1-3). Elle est applicable au lait, à la crème et même au fromage (26). La MG est séparée des produits laitiers dans un tube adapté (p. ex. tube 'Moned' ou butyromètre) à l'aide d'une solution détergente et par l'action conjuguée de la chaleur, de l'agitation et d'une centrifugation. Le titrage est effectué dans des conditions variables. Dans la variante de Driessen (28), une partie aliquote de MG est dissoute dans un mélange d'éthanol/éther diéthylique 1+1 (V/V) et les AGL sont titrés par une solution de KOH dans l'isopropanol en présence de bleu de thymol comme indicateur ou par voie potentiométrique. La composition de la solution détergente varie suivant les modifications de la méthode et peut influencer les résultats d'analyse. Jamotte (29) emploie une solution contenant du Triton X-100, du métaphosphate de sodium, de l'urée et de l'isopropanol. La modification selon Driessen (28), la plus répandue, propose l'utilisation d'un mélange de Triton X-100, de tétraphosphate de sodium ajusté au pH 6,6 avec de l'acide phosphorique. Hänni et Rychener (30) proposent d'ajuster le pH de la solution proposée par Driessen entre 5.0 et 5.5. Ces derniers auteurs ont démontré que les résultats de l'acidité de la matière grasse déterminée dans la crème sont augmentés de 2.3 à 8.5 % si le pH est ajusté à 4.5 au lieu de 6.5. La méthode BDI, bien qu'assez longue, a le mérite de conduire à des résultats reproductibles et qui correspondent à ceux de l'appréciation organoleptique (3, 31). Une version standardisée de ce mode opératoire a été décrite en 1991 dans un document officiel de la FIL (1).

**Tableau 2** Principes de base des principales méthodes de dosage global des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers

| Méthodes                                    | Produits               | Techniques d'extraction   | Déterminations        | Références  |
|---|------------------------|---|-----------------------|---|
| Tensiométrique                              | Lait                   | –   | Tension superficielle | Dunkley (23)<br>Tarassuk et Frankel (24)<br>Buchanan (25)<br>Deeth et Fitz-Gerald (26)                            |
| BDI   | Lait, crème et fromage | Extraction des AGL par la MG séparée à l'aide d'une solution détergente.  | Titrimétrique         | FIL-IDF (1)<br>Thomas et al. (27)<br>Driessen et al. (28)<br>Deeth et Fitz-Gerald (26)                            |
| Par barattage                               | Lait et crème          | Extraction des AGL par la MG séparée par barattage de la crème  | Titrimétrique         | Johnson et Gould (45)<br>Herrington et Krukowsky (32)<br>MSDA (33)  |
| FIL-IDF<br>MSDA                             | Beurre                 | Extraction des AGL par la MG séparée par filtration ou centrifugation et filtration du beurre fondu   | Titrimétrique         | Norme FIL-IDF (35)<br>MSDA (42)<br>Collomb et Spahni (36)   |
| Par pressage                                | Fromage                | Extraction des AGL par la MG obtenue par pressage   | Titrimétrique         | Cité selon Kuzdzal-Savoie (3)   |
| Selon Johnson et Gould (sans acidification) | Lait et crème          | Addition d'éthanol et extraction avec un mélange d'éther diéthylique et d'éther de pétrole 30–60 °C 10+8+12 (V/V/V)   | Titrimétrique         | Johnson et Gould (45)   |
| Selon Johnson et Gould (avec acidification) | Lait et crème          | Ajustage du pH à 2.0 avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , addition d'éthanol et extraction avec un mélange d'éther diéthylique et d'éther de pétrole 30–60 °C 10+8+12 (V/V/V)  | Titrimétrique         | Johnson et Gould (46)   |
| Selon Frankel et Tarassuk                   | Lait et crème          | Addition d'éthanol et extraction avec un mélange d'éther diéthylique et d'éther de pétrole 35–60 °C 10+6+9 (V/V/V)  | Titrimétrique         | Frankel et Tarassuk (49)  |
| Selon Harper <i>et al.</i>                  | Lait et crème          | Ajustage du pH à 2.0 avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> et addition d'acide silicique. Elution des AGL sur colonne d'acide silicique au moyen de chloroforme contenant 50 ml/L de n-butanol ou de chloroforme pur  | Titrimétrique         | Harper <i>et al.</i> (50)<br>Bachmann (51)  |
| Selon Salih <i>et al.</i>                   | Lait                   | Extraction avec un mélange refroidi d'éther diéthylique et d'acide chlorhydrique. Addition d'acide silicique sur l'extrait éthéré   | Titrimétrique         | Salih <i>et al.</i> (75)  |
| A flux continu                              | Lait et crème          | Extraction avec un mélange d'isopropanol, d'heptane et de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 mol/L 25+25+2 (V/V/V)  | Colorimétrique        | FIL-IDF (1)<br>Lindqvist <i>et al.</i> (56)<br>Suhren <i>et al.</i> (57)<br>Heeschen <i>et al.</i> (cité selon 1) |
| Selon Deeth <i>et al.</i>                   | Lait et crème          | Extraction avec un mélange d'isopropanol, d'éther de pétrole 40–60 °C et de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 mol/L 40+10+1 (V/V/V). Addition d'éther de pétrole 40–60 °C puis d'eau   | Titrimétrique         | Deeth <i>et al.</i> (60)<br>Bosset et Imhof (61)<br>Imhof et Bosset (63)  |
| Selon Christen <i>et al.</i>                | Lait                   | Extraction avec un mélange d'isopropanol, d'hexane et de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.05 mol/L 40+10+1 (V/V/V). Addition d'hexane puis d'eau  | Titrimétrique         | Christen <i>et al.</i> (72)<br>Christen et Shen (73)  |
| BLM – Pedia                                 | Lait                   | Extraction avec 2 réactifs de composition tenue secrète à ajouter l'un après l'autre contenant le premier de l'isopropanol, du 2-butanol, de l'éther de pétrole et du H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> et le deuxième du pentane, de l'hexane et de l'heptane | Titrimétrique         | Mouillet <i>et al.</i> (65)<br>Thomasow (64)<br>Biallas (66)  |
| Lipo R                                      | Lait                   | Extraction avec un mélange d'isopropanol, d'éther de pétrole 40–60 °C, de 2-butanol et de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 mol/L 39.2+39.8+8.9+1 (V/V/V/V)  | Titrimétrique         | Mahieu (59)   |
| Des savons de cuivre (MSC)                  | Lait et fromage        | Extraction en milieu acide (HCl) avec un mélange de chloroforme, d'heptane et de méthanol 49+49+2 (V/V/V)   | Colorimétrique        | FIL-IDF (1)<br>Koops et Klomp (67)<br>Shipe <i>et al.</i> (68)<br>Bynum <i>et al.</i> (69)                        |
| Enzymatique (ENZ)                           | Lait                   | Dissolution du lait par des solutions d'enzymes et d'une solution de clarification contenant du Triton X, de l'éthanol et du complexon III (pH 8)   | Colorimétrique        | Koops <i>et al.</i> (70)  |
| Microbienne                                 | Lait                   | A l'aide d'une membrane de dialyse  | Polarographique       | Ukeda <i>et al.</i> (74)  |

**Tableau 3** Liste des  $pK_a$  de quelques acides dans l'eau (61)

| Acides            | $pK_a$ | Remarque, origine   |
|-------------------|--------|---|
| Acide formique    | 3.75   | Produits essentiellement lors de processus de fermentation.   |
| Acide acétique    | 4.75   |   |
| Acide propionique | 4.87   |   |
| Acide butyrique   | 4.82   | Produit lors de la lipolyse de la MG. Acides responsables du goût de rance.   |
| Acide caproïque   | 4.84   |   |
| Acide caprylique  | 4.85   |   |
| Acide caprique    | 5.00   |   |
| Acide lactique    | 3.08   | Présent dans les produits laitiers fermentés.   |
| Acide citrique    |        | Produit lors de processus de maturation.<br>Traces dans le lait et la crème.  |
| $pK_a$ 1          | 3.08   |   |
| $pK_a$ 2          | 4.74   |   |
| $pK_a$ 3          | 5.40   |   |
| Acide carbonique  |        | Présent dans les produits laitiers sous différentes formes suivant le pH.<br>Provient aussi de la dissolution du gaz carbonique de l'air. |
| $pK_a$ 1          | 6.52   |   |
| $pK_a$ 1          | 10.40  |   |

*Méthodes procédant à l'extraction de la MG dans le lait et la crème par barattage de la crème.* Dans le lait cru, Herrington et Krukowsky (32) barattent des laits enrichis en matière grasse par décantation d'une partie du petit lait. La MG isolée est mélangée avec de l'éthanol, chauffée et titrée par une solution de NaOH dissous dans un mélange d'éthanol/eau 1+1 (V/V) en présence de phénolphtaléine comme indicateur. Le manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA) (33, 34) propose également pour la crème une technique d'isolation par barattage à l'aide de l'appareil de Mohr et Baur. La MG est filtrée sur filtre papier contenant du sulfate de sodium, dissoute dans un mélange d'éthanol/éther diéthylique 1+1 (V/V) et titrée par une solution de NaOH ou de KOH dans l'éthanol en présence de phénolphtaléine comme indicateur. Selon la FIL (1), la phénolphtaléine ne constitue pas le meilleur indicateur. Le changement de couleur n'apparaît que lorsque le point d'équivalence est dépassé et on a constaté des valeurs trop élevées pour la répétabilité et la reproductibilité. Le bleu de thymol est souvent préféré (1, 4, 28, 35, 43). Dans les graisses obtenues par barattage, Tarassuk et Frankel (48) et Frankel et Tarassuk (49) ont confirmé la perte d'AGL à courtes chaînes qui se produit lors du barattage de la crème et ont démontré que cette perte touchait également les AGL à longues chaînes. Johnson et Gould (44, 45) ont déterminé l'interférence de l'acide lactique formé lors de processus de fermentation sur les résultats d'analyse. Ces auteurs ont mesuré qu'une addition de 2-3 g d'acide lactique par kg de crème provoque une augmentation de 27 % du taux d'acidité.

*Méthodes procédant à l'extraction de la MG dans le beurre.* Dans le beurre, la matière grasse peut être isolée selon la norme FIL 6 B (35) par centrifugation du beurre fondu suivie d'une filtration sur papier filtre. La MG est dissoute dans un mélange d'isopropanol/éther de pétrole point d'ébullition 60-80 °C 1+4 (V/V) et

titrée par une solution d'hydroxyde de tétra-n-butylammonium dissous dans un mélange de 2-propanol/méthanol 3+1 (V/V) en présence de bleu de thymol comme indicateur. L'étape de filtration est nécessaire car elle permet d'éliminer des traces résiduelles d'acide lactique (1). Les solvants proposés pour dissoudre la MG sont moins volatils et moins inflammables que ceux employés dans la plupart des autres modes opératoires. On obtient ainsi une meilleure stabilité du point d'équivalence en raison de la faible évaporation des solvants lors du titrage (1) et on contribue à accroître la sécurité de personnel de laboratoire. L'agent de titrage proposé permet de doser les AGL dans des solvants polaires et de retarder ainsi l'apparition d'un précipité en fin de titrage pouvant se produire spécialement lors de dosages d'échantillons ayant de hautes valeurs d'acidité (1) ou lors de l'emploi du même mélange de solvants pour plusieurs échantillons (43). L'ancienne norme FIL 6A (41) proposait une dissolution de la MG dans un mélange d'éthanol/éther diéthylique 1+1 (V/V) et un titrage avec une solution de KOH dans le méthanol ou l'éthanol. Selon la FIL (1), un flacon laveur rempli d'éther diéthylique, placé entre l'arrivée d'azote et la verrerie de titrage, est alors recommandé pour stabiliser le point de titrage final (1). Collomb et Spahni (36) proposent un dosage potentiométrique de la méthode officielle du MSDA (42). La MG est isolée par filtration directe du beurre sur papier hydrophobe dans une étuve chauffée à env. 50 °C et dissoute dans un mélange d'éthanol/éther diéthylique 1+1 (V/V). Le titrage des AGL est effectué à l'aide d'un titrateur muni d'un amplificateur différentiel relié à une paire d'électrodes symétriques et blindées ainsi qu'à une électrode auxiliaire. Un tel système permet d'éliminer en grande partie les interférences électromagnétiques et électrostatiques dues aux solutions de faible conductivité.

*Méthodes procédant à l'extraction de la MG dans le*

*fromage.* Dans le fromage, la matière grasse peut être extraite par pressage suivie d'une purification par fusion et centrifugation du mélange eau/graisse exsudé (3) ou à l'aide de solvants d'extraction (37). Driessen et Stadhouders (39) utilise une méthode qui comporte l'addition au fromage d'une solution de thiocyanate d'ammonium (1.7 fois le poids du fromage). La MG est peu à peu isolée après agitation, chauffage et centrifugation. Bejambes *et al.* (40) proposent une addition d'un poids de sulfate de sodium égal au double du poids du fromage et d'un poids de sable égal à cinq fois le poids du fromage pour obtenir un mélange pulvérulent qui est ensuite soumis à une extraction avec de l'éther de pétrole. Après évaporation du solvant, la MG est recueillie et les AGL peuvent être titrés selon des conditions variables.

#### *Dosage des AGL sur un extrait obtenu à l'aide de solvants*

L'extraction des AGL dans les produits laitiers est le plus généralement effectuée par un solvant ou un mélange de solvants organiques en milieu acide (déplacement des équilibres acides-bases des AGL vers leurs formes non dissociées plus solubles en milieu organique). Selon la FIL (1), l'extraction complète et simultanée des acides à courtes (C4-C8), moyennes (C10-C14) et longues (C16-C20) chaînes constitue le problème le plus difficile à résoudre. Une polarité appropriée des solvants d'extraction permet d'éviter de trop grandes pertes des acides à courtes chaînes dans la phase aqueuse ainsi que de réduire une coextraction d'acides ne provenant pas de la lipolyse tels que l'acide lactique, l'acide citrique, les phospholipides.

*Méthodes dérivées de celle de Johnson et Gould.* La méthode de base a été préconisée par Johnson et Gould (45) dans le but d'améliorer le taux d'extraction des AGL à courtes chaînes de la crème obtenu avec la méthode de barattage. Elle est applicable au lait et à la crème. Le titrage est effectué dans des conditions variables, habituellement par une solution de KOH dans l'éthanol en présence de phénolphtaléine comme indicateur (3, 45-47). Une variante développée par ces mêmes auteurs (46) prévoit en plus l'acidification du produit à pH 2.0 afin d'améliorer l'extraction des AGL à courtes chaînes. L'addition d'acide lactique à la crème (44, 45) ne provoque, en comparaison avec la méthode de barattage, qu'une faible augmentation de taux d'acidité (+ 4 % pour une adjonction de 2-3 g d'acide lactique par kg de produit). Frankel et Tarassuk (49) ont développé une méthode très similaire. Selon Stadhouders *et al.* (31) et Kuzdzal-Savoie (3), ces méthodes ne conviennent pas comme méthodes de contrôle dans la pratique industrielle car elles permettent difficilement de différencier les laits peu rances de ceux qui ne le sont pas.

*Méthodes utilisant de l'acide silicique.* L'acide silicique est utilisée sous formes de colonnes ou d'additions sur

l'extrait organique des AGL. Les colonnes d'acide silicique permettent, d'une part, de porter la totalité du produit sur la colonne assurant ainsi une extraction relativement quantitative des AGL et d'autre part, de réduire l'extraction d'acides ne provenant pas de la lipolyse. Harper *et al.* (50) ont proposé un mode opératoire applicable au lait et à la crème. Les AGL sont élués au moyen de chloroforme contenant 50 mL/L de n-butanol. Le titrage est habituellement effectué par une solution de NaOH ou de KOH dans l'éthanol en présence de rouge de phénol comme indicateur. Bachmann (51) propose un solvant d'éluion moins polaire (chloroforme pur). Il estime que la mesure de la lipolyse n'est correcte que si l'on détermine les teneurs des AGL ne provenant que de la lipolyse c'est à dire si on ne tient pas compte de l'acide butyrique qui peut aussi provenir d'autres types de fermentations. Il tire parti du fait que l'éluion de cet acide sur la colonne est nettement décalée par rapport à celle des autres AGL qui sont élués groupés. Cet auteur a mis en évidence la corrélation entre la teneur en AGL et la rancidité organoleptique dans le fromage. Salih *et al.* (75) propose une méthode qui s'applique au lait. Les AGL sont extraits par l'éther diéthylique en présence d'acide chlorhydrique mais sans alcool. L'addition d'acide silicique sur l'extrait étheré permet d'éliminer totalement l'interférence des phospholipides et partiellement celle de l'acide lactique. Selon ces auteurs, le taux d'extraction de l'acide lactique peut aussi être réduit en diminuant la polarité de l'éther par addition d'hexane lors du processus d'extraction. Les AGL sont titrés sous azote au moyen d'une solution de KOH dans l'éthanol en présence d' $\alpha$ -naphtholphtaléine. Cette méthode a l'avantage d'extraire la totalité de l'acide butyrique libre et la réduction du taux d'extraction de l'acide lactique améliore sa justesse et sa répétabilité. Cependant, cette méthode a le désavantage d'être longue et n'est par conséquent que peu utilisée.

*Méthodes basées sur le mode d'extraction selon Dole.* Il s'agit d'une extraction des AGL par un mélange d'heptane, d'isopropanol et d'acide sulfurique dilué suivie d'une addition, au moment de l'analyse, d'eau et d'heptane provoquant un système à 2 phases (38). Mosinger (54) utilise ce mode d'extraction pour le sérum humain. L'extrait organique est introduit dans une solution de diéthylbarbiturate de sodium et de rouge de phénol dissous dans un mélange d'heptane/éthanol. Les AGL libèrent l'acide diéthylbarbiturique qui convertit le rouge de phénol de la forme alcaline rouge à la forme acide jaune. Kashket (55) propose une méthode automatisée pour le dosage des AGL dans les milieux biologiques. La principale différence par rapport au mélange d'extraction selon Dole concerne l'utilisation d'un mélange unique à deux phases. Linqvist *et al.* (56) ont utilisé cette méthode automatisée en Suède pour le contrôle systématique du degré de lipolyse des laits livrés aux laiteries. Ce mode opératoire, apparemment simple, est très délicat. Le gaz carbonique de l'air modifie de manière importante les conditions de mesure et doit être éliminé par une

insufflation d'azote d'une durée définie et d'un débit constant afin d'obtenir des conditions répétables. L'éta-lonnage avec des solutions d'acide palmitique doit être refait chaque jour et il convient de surveiller constamment les réactifs afin d'assurer la constance des conditions de dosage. Une version standardisée de ce mode opératoire a été décrite en 1991 dans un document officiel de la FIL (1). D'autres auteurs ont proposé des variantes du mode opératoire de Dole. Deeth *et al.* (60) ont remplacé l'heptane par de l'éther de pétrole et le titrage des AGL est effectué par une solution méthanolique de KOH en présence d' $\alpha$ -naph-tolphtaléine ou de phénolphtaléine. Cette méthode peut coextraire de faibles quantités d'acides hydro-solubles tels que les acides lactique ou citrique. Christen *et al.* (72, 73) ont remplacé l'éther de pétrole par de l'hexane et utilisent une solution d'acide sulfurique moins concentrée. Le titrage est effectué potentiomé-triquement par une solution de KOH dans l'éthanol. Miller (71) utilise la méthode de Deeth pour la détermination du taux d'endommagement des mem-branes des globules gras du lait et de la crème. Les AGL sont dosés avant et après incubation à 37 °C jusqu'à hydrolyse totale de la MG libérée par endommagement des membranes. Bosset *et al.* (61) proposent un dosage potentiométrique automatisé de la méthode de Deeth moyennant l'emploi d'un passeur d'échantillon et d'un titrateur équipé d'un amplificateur différentiel ainsi que d'une paire d'électrodes (mesure et référence) symétriques et blindées. Ces auteurs recourent à la technique des ajouts (acide myristique) pour améliorer la répétabilité des dosages. Imhof et Bosset (63) ont publié une version simplifiée d'un dosage automatisé des AGL selon Deeth. Ces auteurs recourent à un titrateur plus petit et moins onéreux, renoncent à la technique des ajouts d'acide myristique et proposent une addition de chlorure de lithium en milieu méthano-lique comme électrolyte indifférent pour le titrage potentiométrique. La maison PEDIA (Produits, Equipement et Dérivés pour l'Industrie et l'Agric-ulture) a mis au point des réactifs standards pour le dosage des AGL dans le lait selon le procédé d'extraction de Dole. La composition relative de ces standards est tenue secrète. Le standard A contient de l'isopropan-ol, du 2-butanol, de l'éther de pétrole et de l'acide sulfurique. Le standard B contient du pentane, de l'hexane et de l'heptane. Ces deux réactifs sont ajoutés au lait et on titre une partie aliquote du surnageant. Cette méthode appelée BLM-PEDIA (BLM: Bovine Lipolyse Methode) a été testée par J. Thomasow (64), Mouillet *et al.* (65) et Biallas (66). Selon Mouillet *et al.* (65), l'interférence de l'acide citrique et du gaz carbo-nique sur le degré d'acidité sont négligeables et celle de l'acide lactique ne doit être corrigée que pour des teneurs très élevées. Cette méthode permet de traiter entre 40 et 50 échantillons à l'heure. Deux variaantes de cette méthode, les méthodes Lipo R (RS et RL) ont été publiées (59). La variante Lipo RL se différencie de celle appelée Lipo RS par un lavage supplémentaire de l'extrait organique avec une solution d'acide sulfurique

diluée dans le but d'éliminer l'interférence d'acides hydrosolubles ne provenant pas de la lipolyse.

*Méthodes des savons de cuivre (MSC) et de cobalt.* Koops et Klomp (67) ont adapté au lait une méthode fréquemment utilisée en chimie clinique. Les AGL sont extraits à l'aide d'un mélange de solvants contenant du complexon III. Après adjonction d'un réactif contenant du cuivre, les savons de cuivre passent dans la phase organique dans laquelle ils sont dosés photométrique-ment après réaction avec du diéthylthiocarbamate de sodium. La coloration des carotènes peut interférer sur les mesures (3). Cependant, les faibles teneurs en carotènes du lait rendent cette interférence négligeable. Ces auteurs n'ont pas constaté d'interférence de l'acide lactique. Par contre, celle des phospholipides (env. 0.4 mmol/L de lait) qui forment des complexes colorés avec le cuivre n'est pas négligeable. Le taux d'extraction des phospholipides a donc été abaissé en réduisant la concentration en méthanol dans le mélange d'extraction. Une version standardisée de ce mode opératoire a été décrite en 1991 dans un document officiel de la FIL (1). Shipe *et al.* (68) ont proposé une modification automatisée de ce mode opératoire (élimination du complexon III, changement de l'ordonnance d'addition des solvants). A l'aide d'un spectromètre muni d'une cellule à flux continu et d'un passeur d'échantillons, ils ont mis au point un système semi-automatique per-mettant de mesurer env. 200 échantillons à l'heure. Bynum *et al.* (69) ont adapté cette méthode à la détermination des AGL dans le fromage. Novak a développé une méthode de dosage des AGL dans les milieux biologiques. Les AGL sont extraits par le mélange d'extraction selon Dole (38). Après adjonction d'un réactif contenant du cobalt, les savons de cobalt passent dans la phase organique dans laquelle ils sont dosés photométriquement après réaction avec du  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol. Selon Kuzdzal-Savoie (3), la méthode selon Novák permettrait probablement d'ob-tenir des résultats plus justes pour des produits laitiers plus riches en carotènes que les laits (les crèmes par exemple).

*Méthode enzymatique selon Koops et al. (ENZ).* Koops *et al.* (70) ont adapté au lait une méthode enzymatique rapide utilisé pour le dosage des AGL dans le sang. Cette méthode est basée sur l'acylation du Coenzyme A par les AGL en présence de l'acyl-CoA-synthétase. L'acyl-CoA produit est oxydé par l'acyl-CoA-oxydase additionné et l'eau oxygénée libérée sert à la condensa-tion oxydative du 3-méthyl-N-éthyl-N-( $\beta$ -hydroxyé-thyl) aniline avec du 4-aminoantipyrine. Cette con-densation forme un colorant pourpre avec un maxima d'absorption à 550 nm. Cette méthode a été automa-tisée avec un procédé à flux continu et permet de mesurer 100 échantillons à l'heure. Les auteurs n'ont pas constaté d'interférences des acides acétique, cit-rique, lactique, oxalique, propionique, pyruvique et urique et les influences des phospholipides peuvent être considérées comme négligeables.

*Autres méthodes.* Ukeda *et al.* (74) proposent un dosage des AGL à courtes chaînes à l'aide d'une électrode microbienne constituée d'une électrode à oxygène dont la tête de mesure est entourée d'une couche gélatinée de microorganismes *Arthrobacter nicotiana* entourée elle-même par une membrane de dialyse. Le principe de cette méthode repose sur la production par ces microorganismes d'acyl-CoA oxydase à haute spécificité pour les AGL à courtes chaînes C4-C12. La réaction des acyl-CoA des différents AGL avec cette oxydase produit de l'oxygène qui est mesuré par l'électrode. Ce mode opératoire a été automatisé pour le lait par un système à flux continu. Les résultats sont comparables à ceux obtenus par chromatographie gaz-liquide (99) pour les AGL C4-C12. D'autres méthodes, de moindre importance, sont signalées par Kuzdzal-Savoie dans un bulletin de la FIL (3).

#### Taux de récupération

Le **Tableau 4** présente les taux de récupération des AGL selon différentes méthodes de dosage global. On constate des différences très prononcées des taux de récupération suivant les méthodes et les produits laitiers. Les méthodes faisant appel à la MG comme solvant d'extraction telles que les méthodes BDI (1, 28) et de barattage (32, 33, 45) donnent les plus faibles taux de récupération des AGL à courtes chaînes en raison de leur dissolution préférentielle dans la phase aqueuse lors de l'extraction. La perte de ces AGL est également

importante avec des modes opératoires qui ne procèdent pas à une acidification du produit avant l'extraction comme c'est le cas pour les méthodes selon Johnson et Gould (45) ou Frankel et Tarassuk (49). La méthode selon Harper *et al.* (50) donne des taux de récupération d'environ 100% pour tous les AGL. Selon Kuzdzal-Savoie (3), la bonne récupération de l'acide butyrique est due à l'utilisation d'un solvant d'éluion polaire (50 mL/L de butanol dans le chloroforme). Le lait porté entièrement sur la colonne de silice devrait aussi favoriser le rendement en AGL dans l'éluat. La méthode selon Salih *et al.* (75) permet également une extraction complète de l'acide butyrique, probablement en raison de la polarité élevée du solvant utilisé pour l'extraction. Les taux de récupération déterminés par Christen *et al.* (72) avec la méthode MSC (1, 67) doivent être considérés de manière critique en raison de l'extraction incomplète des AGL dans des laits homogénéisés. Les autres méthodes, mise à part celle proposée par Christen *et al.* (72) pour les AGL C10 et C12, permettent d'obtenir des taux de récupération relativement semblables en raison probablement de l'utilisation de mélanges d'extraction peu différents (mélanges selon Dole (38)).

#### Précision des dosages

Le **Tableau 5** présente la répétabilité et les domaines de répétabilité des principales méthodes de dosage des AGL dans le lait et les produits laitiers. On constate

**Tableau 4** Taux de récupération (% rel.) des acides gras libres selon différentes méthodes de dosage global dans différents produits laitiers

| Méthodes                                 | Produits                   | C4  | C6   | C8   | C10  | C12  | C14  | C16  | C18  | C18:1 | Références  |
|--|----------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|-------|---|
| BDI (1, 28)                              | Lait                       | 2   | 4    | 14   | 42   | 71   | 78   | 80   | 81   | 77    | Deeth <i>et al.</i> (60)                                |
| De barattage (32, 33, 45)                | Crème<br>(MG: 300 g/kg)    | 1   | 12   | 85   | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 82    | Johnson et<br>Gould (45)                                |
| Selon Johnson et Gould <sup>a</sup> (45) | Crème<br>(MG: 300 g/kg)    | 7   | 28   | n.d. | 76   | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 87    | Johnson et<br>Gould (46)                                |
| Selon Johnson et Gould <sup>a</sup> (46) | Lait dilué<br>(1+10) (V/V) | 9   | 42   | n.d. | 84   | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 90    | Johnson et<br>Gould (46)                                |
| Selon Johnson et Gould <sup>b</sup> (46) | Lait dilué<br>(1+10) (V/V) | 31  | 72   | n.d. | 102  | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 103   | Johnson et<br>Gould (46)                                |
| Selon Frankel et Tarassuk (49)           | Lait                       | 29  | 38   | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 96   | 100  | 97    | Frankel et<br>Tarassuk (49)                             |
| Selon Harper <i>et al.</i> (50)          | Lait                       | 99  | 100  | 93   | 94   | n.d. | n.d. | 90   | n.d. | 96    | Harper <i>et al.</i> (50)                               |
| Selon Deeth <i>et al.</i> (60)           | Lait                       | 34  | 57   | 73   | 85   | 90   | 90   | 99   | 102  | 97    | Deeth <i>et al.</i> (60)                                |
| A flux continu (1, 56, 57)               | Lait                       | 60  | 65   | 72   | 77   | 82   | 94   | 98   | 101  | n.d.  | Heeschen<br>(selon 1)                                   |
| BLM - Pedia (64, 65, 66)                 | Lait                       | 35  | 61   | 72   | 92   | 90   | 92   | 95   | 98   | 96    | Mouillet <i>et al.</i> (65)                             |
| Selon Christen <i>et al.</i> (72)        | Lait <sup>c</sup>          | 50  | 64   | 86   | 46   | 43   | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.  | Christen <i>et al.</i> (72)<br>Christen et<br>Shen (73) |
| Lipo R (RS et RL) (59)                   | Lait                       | 38  | 72   | 74   | 92   | 90   | 92   | 95   | 98   | 96    | Mahieu (59)   |
| Savons de cuivre (MSC) (1, 67)           | Lait <sup>c</sup>          | 0   | 1    | 53   | 120  | 108  | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.  | Christen <i>et al.</i> (72)                             |
| Selon Salih <i>et al.</i> (75)           | Lait <sup>d</sup>          | 100 | n.d. | n.d. | 105  | n.d. | n.d. | n.d. | 101  | 105   | Salih <i>et al.</i> (75)                                |

n.d. = non déterminé.

<sup>a</sup> Méthode sans acidification préliminaire du produit.

<sup>b</sup> Méthode avec acidification préliminaire du produit.

<sup>c</sup> Lait homogénéisé.

<sup>d</sup> Taux de récupération du C4 dans le lait et des autres acides dans un mélange de MG et de caséinate de sodium.

**Tableau 5** Répétabilité et domaines de répétabilité de différentes méthodes de dosage global des acides gras libres dans différents produits laitiers

| Méthodes   | Produits      | <i>n</i> <sup>a</sup> | <i>n'</i> <sup>b</sup> | Répétabilités (CV % moyen) | Domaines de répétabilité (CV %) | Références                  |
|--|---------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| BDI (1, 28)  | Lait          | 5                     | 10                     | 2.6                        | n.d.                            | Shipe <i>et al.</i> (68)    |
| Acidité de la MG selon FIL-IDF (35)  | Beurre        | 35                    | 3                      | 1.1                        | n.d.                            | Collomb et Spahni (36)      |
| Acidité de la MG selon MSDA (42), modif. Collomb et Spahni (36)              | Beurre        | 35                    | 3                      | 0.8                        | n.d.                            | Collomb et Spahni (36)      |
| Selon Frankel et Tarassuk (49)   | Lait          | 3                     | 24                     | 2.1                        | n.d.                            | Frankel et Tarassuk (49)    |
| Selon Deeth <i>et al.</i> (60) modif. Bosset <i>et al.</i> <sup>c</sup> (61) | Lait et Crème | 130                   | 2                      | n.d.                       | 2 – 5                           | Bosset <i>et al.</i> (61)   |
| Selon Deeth <i>et al.</i> , modif. Imhof et Bosset <sup>d</sup> (63)         | Lait et Crème | 75                    | 2                      | n.d.                       | 3 – 7                           | Imhof et Bosset (63)        |
| A flux continu (1, 56, 57)   | Lait          | 359                   | 2                      | 4.4                        | 3.1 – 6.4                       | Suhren <i>et al.</i> (57)   |
| BLM-Pedia (64, 65, 66)   | Lait          | 1                     | 50                     | 3.4                        | n.d.                            | Mouillet <i>et al.</i> (65) |
| Selon Harper <i>et al.</i> (50)  | Lait          | 6                     | 5                      | 4.1                        | 1.5 – 5.9                       | Harper <i>et al.</i> (50)   |
| Des savons de cuivre (MSC) (1, 67)   | Lait          | 5                     | 10                     | 4.2                        | n.d.                            | Shipe <i>et al.</i> (68)    |
| Enzymatique (ENZ) (70)   | Lait          | 67                    | 2                      | 2.7                        | n.d.                            | Koops <i>et al.</i> (70)    |

n.d. = non déterminé.

<sup>a</sup> *n* = Nombre d'échantillons différents.

<sup>b</sup> *n'* = Nombre de mesures par échantillon.

<sup>c</sup> Dosage potentiométrique automatisé avec ajouts d'acide myristique.

<sup>d</sup> Dosage potentiométrique automatisé sans ajouts d'acide myristique.

que les coefficients de variation moyens des méthodes mentionnées se situent entre 0.8 et 4.4 %. Les méthodes de titrage des AGL dans la MG comme les méthodes BDI (1, 28), de la FIL (35) ou du MSDA (42) ont en général une meilleure répétabilité que les autres méthodes qui font appel à l'extraction des AGL à l'aide de solvants. La méthode BDI (1, 28) a un coefficient de variation moyen d'environ 2.5 %. Selon Koops (70), le 97 % des teneurs en AGL du lait obtenues avec cette méthode se situent entre 2 et 10 mmol/kg de MG. Bosset *et al.* (61) ont démontré que la répétabilité du dosage potentiométrique selon Deeth (60) peut être améliorée en recourant à des ajouts d'acide myristique. Le domaine de répétabilité passe alors de 3-7 % pour leur mode opératoire sans ajouts à 2-5 % pour celui avec ajouts. Certains auteurs ont déterminé les coefficients de variatin en fonction des teneurs en AGL dans les produits laitiers. Avec leur méthode rapide sans ajouts, Imhof et Bosset (63) ont déterminé un coefficient de variation >7.5 % pour des concentration en AGL < 20 mmol/kg de MG, de 4-6 % pour des valeurs entre 21 et 30 mmol/kg de MG, de 3-4 % entre 31 et 40 mmol/kg de MG et < 3 % pour des valeurs > 41 mmol/kg de MG. Avec la méthode à flux continu, Suhren *et al.* (57) ont obtenu un coefficient de variation de 6.4 % pour des concentrations en AGL ≤ 0.4 mmol/L de lait et de 3.1 % pour des concentrations > 1.0 mmol/L de

lait. Entre 0.5 et 0.6 mmol/L de lait, le coefficient de variation est de 4.6 %.

#### Corrélations entre méthodes

Le **Tableau 6** présente les corrélations entre les principales méthodes de dosage des AGL dans les produits laitiers. On constate d'une manière générale que les corrélations entre les méthodes sont bonnes. Les coefficients de corrélations se situent entre 0.88 et 0.987. Quant aux équations de régression, il est surprenant de constater que celles entre les méthodes MSC/BDI (68) sont très différentes suivant qu'elles ont été déterminées avec des laits homogénéisés ou non homogénéisés. Comme les résultats obtenus avec méthode BDI ne sont pas dépendants de l'homogénéisation (1), la FIL (1) émet l'hypothèse que la méthode MSC ne permet pas une extraction complète des AGL dissous dans la MG des laits homogénéisés. Pour le dosage des AGL dans des laits crus, on constate que l'équation de régression établie entre les méthodes MSC et BDI par Koops et Klomp (67) démontre une faible différence entre ces deux méthodes. Comme les valeurs moyennes des laits analysés étaient de 6 mmol/kg de MG avec la méthode BDI et 6.5 mmol/kg de MG avec la méthode MSC, ces auteurs ont conclu que la

**Tableau 6** Corrélations entre différentes méthodes de dosage global des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers

| Méthodes  | Produits                                 | Unités                                       | n   | Equations de régression   | Coeff. de corrél. (r) | Références                   |
|---|--|--|-----|---|-----------------------|------------------------------|
| Acidité de la MG (MSDA (42)/ FIL-IDF (35))                          | Beurre                                   | mmol / kg de MG                              | 35  | $y$ (FIL) = 1.03<br>$x$ (MSDA) + 0.69                           | 0.965                 | Collomb et Spahni (36)       |
| Acidité de la MG (MSDA modif. Collomb et Spahni (36)/ FIL-IDF (35)) | Beurre                                   | mmol / kg de MG                              | 35  | $y$ (FIL) = 0.97<br>$x$ (MSDA pot.) + 0.41                      | 0.991                 | Collomb et Spahni (36)       |
| BLM - Pedia (64, 65, 66)/ BDI (1, 28)                               | Lait                                     | mmol / L lait                                | 40  | n.d.  | 0.97                  | Mouillet <i>et al.</i> (65)  |
| Frankel et Tarassuk (FT) (49) / BDI                                 | Lait                                     | mmol / 100 g MG                              | 135 | $y$ (FT) = 1.8245<br>$x$ (BDI) + 0.64065                        | 0.96                  | Pillay <i>et al.</i> (109)   |
| BDI / MSC (1, 67)   | Lait cru                                 | mmol / 100 g MG                              | 81  | $y$ (BDI) = 0.9689<br>$x$ (MSC) - 0.0346                        | n.d.                  | Koops et Klomp (67)          |
| MSC / BDI   | Lait non homogénéisé                     | MSC: mmol / L lait<br>BDI: mmol / 100 g MG   | 124 | $y$ (MSC) = 0.398<br>$x$ (BDI) + 0.002                          | 0.90                  | Shipe <i>et al.</i> (68)     |
| MSC / BDI   | Lait homogénéisé                         | MSC: mmol / L lait<br>BDI: mmol / 100 g MG   | 109 | $y$ (MSC) = 0.207<br>$x$ (BDI) + 0.046                          | 0.88                  | Shipe <i>et al.</i> (68)     |
| Deeth (60) / BDI  | Laits activés à diff. degrés de lipolyse | Deeth: mmol / L lait<br>BDI: mmol / 100 g MG | 71  | $y$ (Deeth) = 0.62<br>$x$ (BDI) + 0.07                          | 0.97                  | Deeth <i>et al.</i> (60)     |
| Deeth/Deeth modif. Bosset et Imhof (61)                             | Lait et crème                            | mmol / kg MG                                 | 130 | $y$ (Deeth) = 0.90 $x$<br>(Deeth modif. Bosset et Imhof) + 0.62 | 0.980                 | Bosset <i>et al.</i> (61)    |
| A flux continu (1, 56, 57) / BDI                                    | Lait cru                                 | mmol / L de lait                             | 21  | $y$ (A flux continu) = 1.08<br>$x$ (BDI) + 0.216                | 0.975                 | Lindqvist <i>et al.</i> (56) |
| ENZ (70) / BDI  | Lait cru                                 | mmol / 100 g MG                              | 67  | $y$ (ENZ) = 1.72<br>$x$ (BDI) - 0.02                            | n.d.                  | Koops <i>et al.</i> (70)     |

n.d. = non déterminé.

différence constatée provenait probablement de l'interférence des phospholipides (0.5 mmol/kg de MG) à corriger pour que les deux méthodes donnent des résultats identiques. La méthode BDI a été également comparée par Lindqvist *et al.* (56) à la méthode à flux continu (1, 56, 57). Selon ces auteurs, les valeurs plus élevées obtenues avec la méthode à flux continu ne peuvent qu'être attribuées à la dissolution de gaz carbonique de l'air car les interférences de l'acide lactique et des phospholipides sont négligeables.

#### Seuils de perception sensoriels

Certains auteurs ont déterminé des relations entre les teneurs en AGL obtenues selon divers modes opératoires et l'intensité de la rancidité (Ir) déterminée par un groupe de dégustateurs. Le **Tableau 7** présente quelques relations entre les teneurs en AGL et les seuils de perception sensoriels. On constate parfois une bonne concordance mais aussi des différences pronon-

cées des seuils de perception sensoriels suivant les modes opératoires. Dunkley (23) a déterminé le seuil de détection sensoriel de la rancidité en tenant compte de l'influence de différentes races de vaches, de l'affouragement et de la teneur en MG des laits mais la tension superficielle est considérée comme un paramètre peu sensible pour l'évaluation de la rancidité (3). Mahieu (59) et Mouillet *et al.* (65) ont déterminé des seuils de perception sur la base de notes d'Ir allant de 0 à 3, la note 0 étant attribuée à aucune rancidité et la note 3 à une rancidité très forte. Les notes intermédiaires correspondent à des produits faiblement (seuils de détection sensoriels (65)) et vraiment rances (seuils d'intolérance sensoriels (65)). Les coefficients de corrélation déterminés par Mahieu (59) pour différentes méthodes sont relativement peu élevés. Les seuils de perception déterminés par ce même auteur avec la méthode de Deeth (60) semblent être beaucoup trop élevés. Shipe *et al.* (68) ont choisi des notes d'Ir allant de 0 à 4 (non rance, faiblement, modérément, fortement et très fortement rance). Ces auteurs ont en

autre déterminé des équations de régression entre les Ir et les teneurs en AGL déterminées selon les méthodes BDI (1, 28) et MSC (1, 67) pour des laits homogénéisés et non homogénéisés (Laits non homogénéisés:  $Ir = 0.97 \times (BDI) - 0.43$  et  $Ir = 2.19 \times (MSC) - 0.27$ ; Laits homogénéisés:  $Ir = 0.82 \times (BDI) - 0.30$  et  $Ir = 3.89 \times (MSC) - 0.37$ ). Ces équations permettent de calculer les teneurs en AGL d'une méthode à l'autre pour des Ir définis: Pour une Ir de 1 (lait faiblement lipolysé = seuil de détection sensoriel), les teneurs en AGL dans des laits non homogénéisés devraient être de 14.7 mmol/kg de MG (= 0.58 mmol/L si on suppose une teneur en MG de 40 g/L) avec la méthode BDI et de 0.58 mmol/L avec celle des savons de cuivre. Pour les laits homogénéisés, les seuils de perception sensoriels sont plus bas pour la méthode MSC que pour la méthode BDI, probablement en raison de l'extraction incomplète des AGL déjà mentionnée. Dans leur revue de littérature sur la lipolyse, Deeth et Fitz-Gerald (26) mentionnent des valeurs expérimentales des teneurs en AGL obtenues avec la méthodes BDI pour la recon-

naissance des anomalies de flaveur dans différents produits laitiers. Pour le lait et la crème, quelques dégustateurs seulement reconnaissent des anomalies de flaveur lorsque les valeurs BDI se situent entre 15 et 20 mmol d'AGL par kg de MG. En dessus de 20 mmol par kg de MG, la plupart des dégustateurs détectent une flaveur inacceptable. Pour le beurre, des valeurs se situant entre 15 et 20 mmol par kg de MG indiquent un produit de qualité altérée. Pour le Cheddar, des valeurs en dessus de 30 mmol par kg de MG sont liées à un goût impur ou à une rancidité. Selon la FIL (123), les valeurs normales pour le lait et les poudres de laits se situent entre 3–10 mmol/kg de MG, pour la crème et les crèmes glacées entre 5–12 mmol/kg de MG et pour le beurre entre 5 et 10 mmol/kg de MG. Les teneurs en AGL pouvant provoquer des défauts organoleptiques sont de 15–20 mmol/kg de MG pour le lait et les poudres de lait, de 17–21 mmol/kg de MG pour les crèmes et les crèmes glacées et de 20 mmol/kg de MG pour le beurre. Pillay *et al.* (109) ont récemment déterminé des seuils de perception pour la méthode BDI dans le lait. Leurs

**Tableau 7** Corrélations entre les teneurs en acides gras libres et les seuils de perception sensoriels dans le lait

| Méthodes                   | Produits             | n <sup>a</sup> | n' <sup>b</sup> | Unités        | Seuils de détection sensoriel | Seuils d'intolérance sensoriel | Seuils de rejet sensoriel | Coefficient de corrélation sensoriel | Références                  |
|----------------------------|----------------------|----------------|-----------------|---------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| Tension superficielle (23) | Lait                 | n. i.          | c               | dynes/cm      | 45–46                         | n. d.                          | n. d.                     | n. d.                                | Dunkley (23)                |
| BDI (1, 28)                | Lait                 | 19             | 44 <sup>d</sup> | mmol/100 g MG | 1.05                          | n. d.                          | 1.7                       | 0.42                                 | Mahieu (59)                 |
| BDI                        | Lait homogénéisé     | 6              | 35              | mmol/100 g MG | 1.59                          | 2.80 <sup>e</sup>              | 4.02 <sup>f</sup>         | 0.78                                 | Shipe <i>et al.</i> (68)    |
| BDI                        | Lait non homogénéisé | 6              | 35              | mmol/100 g MG | 1.47                          | 2.52 <sup>e</sup>              | 3.53 <sup>f</sup>         | 0.67                                 | Shipe <i>et al.</i> (68)    |
| MSC (1, 67)                | Lait homogénéisé     | 6              | 35              | mmol/L        | 0.35                          | 0.61 <sup>e</sup>              | 0.86 <sup>f</sup>         | 0.82                                 | Shipe <i>et al.</i> (68)    |
| MSC                        | Lait non homogénéisé | 6              | 35              | mmol/L        | 0.58                          | 1.04 <sup>e</sup>              | 1.49 <sup>f</sup>         | 0.83                                 | Shipe <i>et al.</i> (68)    |
| Frankel et Tarassuk (49)   | Lait                 | 10             | 9               | mmol/100 g MG | 4.1–4.5                       | n. d.                          | n. d.                     | n. d.                                | Pillay <i>et al.</i> (109)  |
| Deeth (60)                 | Lait                 | 19             | 44 <sup>d</sup> | mmol/L        | 3.6                           | n. d.                          | 5.4                       | 0.44                                 | Mahieu (59)                 |
| BLM-Pedia (64, 65, 66)     | Lait                 | 30             | 8               | mmol/L        | 1.8                           | 2.3                            | 3.2                       | n. d.                                | Mouillet <i>et al.</i> (65) |
| BLM-Pedia                  | Lait                 | 19             | 44 <sup>d</sup> | mmol/L        | 1.8                           | n. d.                          | 3.2                       | 0.63                                 | Mahieu (59)                 |
| Lipo RL (59)               | Lait                 | 19             | 44 <sup>d</sup> | mmol/L        | 1.0                           | n. d.                          | 2.1                       | 0.51                                 | Mahieu (59)                 |
| Lipo RS (59)               | Lait                 | 19             | 44 <sup>d</sup> | mmol/L        | 4.1                           | n. d.                          | 6.5                       | 0.65                                 | Mahieu (59)                 |

n. i. = non indiqué; n. d. = non déterminé.

<sup>a</sup> n = nombre de dégustateurs.

<sup>b</sup> n' = nombre de produits.

<sup>c</sup> Laits de 12–15 vaches de trois races différentes prélevés chaque semaine durant 1 an.

<sup>d</sup> Seuils sensoriels calculés avec 44 séries de données.

<sup>e</sup> Calculé selon l'équation de régression de Shipe pour une note d'Ir de 2 (Laits modérément rances).

<sup>f</sup> Calculé selon l'équation de régression de Shipe pour une note d'Ir de 3 (Laits fortement rances).

valeurs, qui se situent entre 18.5 et 20.5 mmol/kg de MG, confirment les valeurs données par d'autres auteurs (1, 3, 26, 123).

### Dosage des Acides Gras Libres Individuels

#### Principes de base des méthodes de dosage des AGL individuels

Une extraction simultanée et complète des acides à courtes, moyennes et longues chaînes et une séparation des AGL de la matière grasse coextraite sans saponification des glycérides constituent les deux principaux problèmes à résoudre pour l'obtention d'une méthode précise et fiable. La séparation des AGL de la matière grasse coextraite est généralement effectuée à l'aide de résines, d'oxyde d'aluminium, de gel de silice ou par conversion des AGL sous forme de sels suivie d'une séparation de la MG par extraction à l'aide de solvants. Les AGL ainsi isolés sont le plus souvent estérifiés et dosés essentiellement à l'aide de techniques chroma-

tographiques gas/liquide (GLC) et plus rarement avec des techniques liquide/liquide (LC) ou sur couche mince (DC).

*Méthodes procédant à l'isolation des AGL sur résines échangeuses d'ions.* Le **Tableau 8** présente les principes de base de ces méthodes. Needs *et al.* (76) procèdent à l'extraction des AGL par un mélange refroidi d'éther diéthylique/HCl selon Salih *et al.* (75). L'extrait étheré, additionné de méthanol, est porté sur la résine et la MG est éluée par un mélange d'éther diéthylique/méthanol 2+1 (V/V). La méthylation est effectuée par un mélange de méthanol/HCl selon Edwards-Webb (94) sur la résine séchée. Ces auteurs signalent l'avantage de l'Amberlyste 26 par rapport à l'Amberlite IRA 400 et le Dowex 3 en raison de sa structure poreuse permettant une meilleure adsorption des AGL en milieu organique. Ils mentionnent une saponification négligeable des glycérides par la résine si on maintient une concentration suffisante en méthanol dans l'extrait étheré. Mc Neill *et al.* (93) et Mc Neill et Connolly (95) ont respectivement adapté cette méthode au dosage

**Tableau 8** Principes de base des méthodes procédant à l'isolation des acides gras libres sur résines échangeuses d'ions

| Produits               | Modes d'extraction des AGL et de la MG  | Modes de séparations des AGL de la MG | Estérifications (Composés analysés)              | Standards internes | Déterminations (Phases stationnaires) | Références                 |
|------------------------|---|---------------------------------------|--|--------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Lait et crème          | Ether diéthylique/HCL   | Amberlyste A-26                       | CH <sub>3</sub> OH/HCL (Esters méthyl. C4-C18:2) | C5 et C13          | GLC (20% EGA)                         | Needs <i>et al.</i> (76)   |
| Beurre                 | Ether diéthylique/HCL. Addition d'acide silicique sur l'extrait étheré  | Amberlyste A-26                       | CH <sub>3</sub> OH/HCL (Esters méthyl. C4-C18:3) | C13                | GLC (10% EGA)                         | McNeill <i>et al.</i> (93) |
| Fromage                | Extraction d'une pâte <sup>a</sup> par l'éther diéthylique/HCL. Addition d'acide silicique sur l'extrait étheré | Amberlyste A-26                       | CH <sub>3</sub> OH/HCL (Esters méthyl. C4-C18:3) | C13                | GLC (10% EGA)                         | McNeill et Connolly (95)   |
| Huile de beurre        | Ether diéthylique   | Amberlite IRA-410                     | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> I (n. i.)          | n. i.              | GLC (PEGA)                            | Hulstkamp (78)             |
| Huile de beurre        | Hexane  | Amberlite IRA-400                     | CH <sub>3</sub> OH/HCL (Esters méthyl. C4-C18:3) | C7 et C17          | GLC (20% DEGS)                        | Bills <i>et al.</i> (90)   |
| Fromage                | Extraction des AGL par la MG. Dissolution de la MG isolée dans l'hexane   | Amberlite IRA-400                     | CH <sub>3</sub> OH/HCL (Esters méthyl. C2-C18:3) | C7 et C17          | GLC (20% DEGS)                        | Bills et Day (89)          |
| Lait et poudre de lait | Extraction par l'éther diéthylique (sohxlet) d'un mélange acidifié de lait lyophilisé et d'acide silicique      | Amberlite IRA-400                     | CH <sub>3</sub> OH/HCL (Esters méthyl. C4-C18:2) | C7 et C17          | GLC (20% DEGS)                        | Kintner et Day (107)       |
| Lait                   | Adjonction d'éthanol et extraction par un mélange d'éther diéthylique/heptane 1+1 V/V en milieu acide           | Résine aminopropyle                   | s. e. (AGL C2-C20)                               | C5, C7, C13 et C17 | GLC (FFAP)                            | De Jong et Badings (99)    |
| Fromage                | Extraction d'une pâte <sup>b</sup> acidifiée par un mélange d'éther diéthylique/heptane 1+1 V/V                 |                                       |  |                    |                                       |                            |

<sup>a</sup> Pâte composée de fromage et de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Abréviations: n. i. = non indiqué; s. e. = sans estérification; FFAP = Free fatty acids phase; GLC = Gas-liquid chromatography; PEGA = Polyethylene glycol adipate; EGA = Ethylene glycol adipate; DEGS = Diethylene glycol succinate.

des AGL dans le beurre et le fromage. Ces auteurs proposent une addition d'acide silicique sur l'extrait étheré dans le but d'éliminer les phospholipides qui peuvent interférer avec l'adsorption des AGL par la résine. La méthode de Needs, choisie comme méthode officielle par la FIL (1), est donc adaptable à différents produits laitiers. Hulstkamp (78) propose pour le beurre une extraction des AGL par la MG elle-même. Le beurre est fondu en présence d'acide chlorhydrique et le dosage des AGL est effectué sur l'huile de beurre isolée. Après adjonction de la résine sur l'huile de beurre dissoute dans l'éther diéthylique et agitation du mélange, la résine est filtrée et la MG est séparée par lavage avec de l'éther diéthylique. Les AGL sont estérifiés par une solution d'iodure d'éthyle dans l'acétone sur la résine séchée. Cet auteur signale l'inutilité de l'élimination des traces d'eau dans le mélange porté sur l'échangeur d'ions en raison de la faible vitesse de saponification des glycérides à température ambiante. Par contre, l'absence d'éthanol est importante car ce solvant provoque immédiatement l'apparition de l'odeur de rancidité. Bills *et al.* (90) utilisent une résine semblable pour le dosage des AGL dans l'huile de beurre. Ces auteurs n'ont pas constaté d'hydrolyse significative des glycérides sur la résine mais signalent l'importance de l'emploi de facteurs de correction pour corriger les pertes des AGL restés adsorbés sur la résine. Kintner et Day (107) ont adapté la méthode de Bills *et al.* au dosage des AGL dans le lait en effectuant l'extraction sur un produit lyophilisé. Ces auteurs n'ont pas constaté de pertes significatives d'AGL durant le processus de lyophilisation. Bills et Day (89) proposent pour le fromage un titrage de 3 fractions d'AGL (C2, C4 et C6-C18:3) séparées sur colonnes de célite et d'acide silicique. Le pourcentage relatif des AGL C6-C18:3 est déterminé par GC sur la MG isolée par chauffage et centrifugation du fromage acidifié. De Jong et Badings (99) ont développé une méthode applicable au lait et au fromage. Pour le lait, ces auteurs procèdent à l'extraction après adjonction

d'éthanol au lait acidifié afin d'obtenir un meilleur taux d'extraction des lipides libérés de leurs membranes. Les lipides des extraits du lait et du fromage sont élués par un mélange de chloroforme/2-propanol 2 + 1 (V + V) et les AGL sont désorbés par une solution d'éther diéthylique contenant 2mL/100mL d'acide formique. Cette résine faiblement basique ne provoque pas d'hydrolyse des glycérides. Ces auteurs n'ont pas constaté d'interférences de l'acide lactique sur les chromatogrammes et l'adsorption éventuelle des AGL à longues chaînes sur la phase stationnaire de la colonne capillaire peut être éliminée en utilisant un film plus épais (1 µm). De Jong *et al.* (124) ont récemment publié une variante de cette méthode applicable aux produits laitiers fermentés.

*Méthodes procédant à l'isolation des AGL sur oxyde d'aluminium.* Le **Tableau 9** présente les principes de base de ces méthodes. Deeth *et al.* (77) mentionnent l'intérêt des colonnes d'oxyde d'aluminium en raison de leur affinité pour les AGL et de leur simplicité d'utilisation. Cependant, l'oxyde d'aluminium doit être désactivé avec 40-60 g d'eau par kg de support pour rendre négligeable l'hydrolyse des glycérides coextraits avec les AGL. De Jong et Badings (99) ont mesuré le taux de récupération des AGL C4-C18: 1 avec une telle colonne. Ce taux se situe entre 82 et 89 % pour tous les AGL. Ces auteurs mentionnent un taux de récupération supérieure (> 90 %) et une meilleure répétabilité si le processus de désorption est répété trois fois. La méthode selon Deeth *et al.* (77) est utilisable pour différents produits laitiers. L'extraction dans le lait est effectuée avec le mélange proposé par Salih *et al.* (75) suivie d'une addition de sulfate de sodium et d'hexane sur l'extrait étheré. Ces additions supplémentaires permettent d'obtenir une solution anhydre de polarité appropriée pour la séparation des AGL de la MG sur la colonne d'oxyde d'aluminium. La MG est éluee par une solution d'éther diéthylique/hexane 1 + 1 (V/V) et les AGL sont désorbés par une solution de 60g/L d'acide

**Tableau 9** Principes de base des méthodes procédant à l'isolation des acides gras libres sur oxyde d'aluminium

| Produits                 | Modes d'extraction des AGL de la MG  | Estérifications (Composés analysés)               | Standards internes       | Déterminations (Phases stationnaires) | Références               |
|--------------------------|--|---|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Lait                     | Ether diéthylique / HCL. Addition d'hexane sur une partie aliquote de l'extrait étheré               |   |                          |                                       |                          |
| Beurre et poudre de lait | Ether diéthylique / hexane 1 + 1 (V/V) en milieu acide   | s. e. (AGL C4-C18:1)                              | C5 et C17                | GLC (10% SP 216-PS)                   | Deeth <i>et al.</i> (77) |
| Fromage                  | Extraction d'une pâte <sup>a</sup> acidifiée par un mélange d'éther diéthylique / hexane 1 + 1 (V/V) |   |                          |                                       |                          |
| Fromage et beurre        | Ether diéthylique / hexane 1 + 1 (V/V) en milieu acide   | BF <sub>3</sub> / n-butanol (Esters butyl. < C12) | Acide 2-éthyl-nonanoïque | GLC (Supelcowax-10)                   | Kim Ha et Lindsay (82)   |

<sup>a</sup>Pâte composée de fromage et de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
s. e. = sans estérification.

formique dans l'éther diisopropylique. Ces auteurs n'ont pas détecté d'interférence de l'acide lactique sur les chromatogrammes. Kim Ha et Lindsay (82) proposent une méthode de dosage des AGL volatils ramifiés et linéaires à courtes chaînes (< C12) dans le fromage et le beurre selon le mode opératoire de Deeth. Les AGL volatils sont séparés des AGL à longues chaînes par un procédé de distillation-extraction simultané. L'importance des AGL ramifiés, dont les concentrations se situent généralement dans le domaine du mg par tonne de produit, provient du fait que leurs seuils de détection organoleptiques se situent à des niveaux beaucoup plus bas que ceux des AGL linéaires.

*Méthodes procédant à l'isolation des AGL sur acide silicique-KOH.* Le **Tableau 10** présente les principes de base de ces méthodes. La colonne d'acide silicique-KOH (Acide silicique imprégnée d'hydroxyde de potassium) a été développée par Mc Carthy et Duthie (52) pour l'isolation des AGL dans des mélanges d'AGL/MG. Les AGL, retenus provisoirement sur la colonne pendant l'élution des glycérides par l'éther diéthylique, sont élués ultérieurement par une solution éthérée d'acide formique (52, 79, 80, 81) ou d'acide phosphorique (88, 101). Les phospholipides restent adsorbés sur la colonne. Ce type de colonne a été utilisé par Kuzdzal-Savoie et Petit (53) pour le fractionnement des produits de la lipolyse dans le fromage (monoglycérides, diglycérides, triglycérides et AGL). Stark *et al.* (87) ont utilisé cette colonne pour la purification de l'extrait d'AGL C4-C12 contaminé par des glycérides obtenu par 'cold-finger molecular distillation' (86) de l'huile de beurre. Ces auteurs ont critiqué ce support en raison de l'hydrolyse de la MG qu'il produit. Woo et Lindsay (79, 80, 81) ont modifié la composition de cette colonne en y incorporant de la célite et en réduisant la concentration en KOH dans le but de minimiser l'hydrolyse des glycérides. Ces auteurs proposent des modes opératoires pour le beurre, le crème et le fromage. Pour le fromage, une élimination de l'acide lactique à l'aide d'une précolonne d'acide silicique composée d'un mélange d'éthylèneglycol et d'éthanol a été rendue nécessaire en raison de l'interférence du pic de l'acide lactique avec ceux des AGL à courtes chaînes sur les chromatogrammes. Cette méthode a été utilisée pour l'analyse des AGL dans de nombreuses variétés de fromages européens (83, 84).

*Méthodes procédant à l'isolation des AGL par leur conversion sous forme de sels.* Le **Tableau 11** présente les principes de base de ces méthodes. Gray (96) propose pour le beurre et le fromage une extraction à l'aide de solvants organiques suivie d'un titrage des AGL par une solution de KOH dans le méthanol puis d'une extraction de la MG par de l'hexane. Les sels de potassium des AGL sont directement injectés sur la colonne GC sur laquelle ils sont convertis en AGL par de l'acide formique transporté par le gaz porteur. Cette technique d'injection présente les avantages de réduire l'élargissement des pics (tailing), de supprimer l'adsorption d'AGL sur la colonne et, par rapport à des

injections classiques d'AGL non estérifiés, d'obtenir une meilleure résolution du pic du C2 par rapport au pic du solvant. Contarini *et al.* (100) proposent pour le fromage une extraction à l'aide de solvants organiques suivie d'un titrage de l'extrait éthéré par de l'hydroxyde de sodium dans l'éthanol puis d'une extraction des sels des AGL par de l'eau distillée. Les AGL sont ensuite libérés par addition d'acide phosphorique dans un mélange d'éther diéthylique/acétone 1+1 (V/V) et injectés sans estérification. Martin-Hernández *et al.* (91) ont développé une méthode permettant de doser simultanément les AGL et la composition des acides gras des triglycérides. L'extrait éthéré contenant les AGL et la MG est traité par une solution d'hydroxyde de tétraméthylammonium dans le méthanol. La phase supérieure contient les esters méthyliques des acides gras des glycérides et la phase inférieure les sels de tétraméthylammonium des AGL. Les sels de tétraméthylammonium sont injectés directement et transformés en esters méthyliques par pyrolyse dans l'injecteur. L'acide lactique apparaît sur le chromatogramme, mais n'interfère pas avec les AGL à doser. Par contre, il se forme de la triméthylamine lors de la pyrolyse qui apparaît sur le chromatogramme sous la forme d'un large pic. Lors de l'emploi d'une colonne à remplissage, la répétabilité du dosage des AGL à courtes chaînes et spécialement de l'acide caprylique est diminuée. Lors de l'emploi d'une colonne capillaire, l'interférence est négligeable mais la triméthylamine entraîne vers le point de fuite une partie importante des AGL à courtes chaînes. Juárez *et al.* (92) ont testé cette méthode en employant un injecteur PTV chauffé à 300 °C. Dans ces conditions, la triméthylamine n'a pas été détectée sur le chromatogramme et son entraînement au point de fuite n'a pas diminué la répétabilité du dosage des AGL à courtes chaînes.

*Méthodes procédant à l'isolation des AGL selon d'autres modes opératoires.* Le **Tableau 12** présente les principes de base de ces méthodes. Stark *et al.* (86) proposent une technique d'extraction des AGL par distillation. Cette technique ne permet évidemment pas d'extraire tous les AGL de la lipolyse. Spangelo *et al.* (97) procèdent à une évaporation à sec du filtrat basique (pH 8.8) d'une émulsion composée de lait acidifié, d'acétonitrile et de sulfate de sodium. La méthylation des sels de sodium des AGL est effectuée en présence des lipides par du iodure de méthyle et est catalysée par du Dowex 1X2. Selon ces auteurs, ce catalyseur permet une méthylation sélective des AGL sans transestérification des glycérides. Selon Kuzdzal-Savoie (85), une estérification des AGL dans un mélange AGL/MG conduit toujours à l'estérification d'une fraction faible mais notable des acides gras des triglycérides. Reed *et al.* (98) proposent une méthode par chromatographie liquide/liquide (LC). L'estérification des AGL en esters p-bromophénacyliques est catalysée par du 18-crown-6. Ces auteurs signalent que la technique LC permet d'éviter l'utilisation de résines basiques pouvant provoquer une hydrolyse de la MG durant le processus

**Tableau 10** Principes de base des méthodes procédant à l'isolation des acides gras libres sur acide silicique

| Produits        | Modes d'extraction des AGL et de la MG   | Modes de séparations des AGL de la MG    | Estérifications (Composés analysés)                             | Standards internes | Déterminations (Phases stationnaires) | Références               |
|-----------------|--|--|---|--------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Huile de beurre | Extraction dans l'éther diéthylique du distillat obtenu par 'Cold-finger molecular distillation'   | Acide silicique-KOH                      | s. e. (AGL C2-C12)  | n. i.              | GLC (5% Carbowax 20 M)                | Stark <i>et al.</i> (87) |
| Huile de beurre | Ether de pétrole   | Acide silicique-KOH                      | Butanol/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Esters butyl. C4-C18:3) | C7 et C17          | GLC (15% DEGS)                        | Iyer <i>et al.</i> (88)  |
| Fromage         | Elution sur colonne de célite d'une pâte <sup>a</sup> acidifiée par un mélange de n-butanol/ether de pétrole 1 + 99 (V/V)  | Acide silicique-KOH                      | Butanol/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Esters butyl. C4-C18:3) | C7 et C17          | GLC (15% DEGS)                        | Iyer <i>et al.</i> (88)  |
| Fromage         | Extraction de la MG d'une pâte <sup>a</sup> sur colonne d'acide silicique-KOH par de l'éther diéthylique.  | Acide silicique-KOH par s. e. AGL C2-C18 | s. e. AGL C2-C18  | C7 et C17          | GLC (5% Carbowax 20 M)                | Nieuwenhof et Hup (101)  |
| Beurre et crème | Elution de la MG d'une pâte <sup>b</sup> acidifiée portée dir. sur colonne d'acide silicique-KOH par un mélange d'ether de pétrole/ether diéthylique 1 + 4 (V/V) puis par un mélange d'acétonitrile/ether diéthylique 1 + 9 (V/V)  | Acide silicique-KOH                      | s. e. (AGL C4-C18:3)  | C7                 | GLC (10% NPGA)                        | Woo et Lindsay (79, 80)  |
| Fromage         | Elution d'une pâte <sup>b</sup> acidifiée sur colonne d'acide silicique/éthylèneglycol par un mélange de n-butanol/ether de pétrole 1 + 99 (V/V). Elution de la MG de l'éluat sous forme de pâte <sup>b</sup> sur colonne d'acide silicique-KOH par un mélange d'ether de pétrole/ether diéthylique 1 + 4 (V/V) puis par un mélange d'acétonitrile/ether diéthylique 1 + 9 (V/V) | Acide silicique                          | s. e. (AGL C4-C18:3)  | C7                 | GLC (5% DEGS-PS)                      | Woo et Lindsay (81)      |
| Fromage         | Extraction d'une pâte <sup>a</sup> acidifiée par du chloroforme suivie par des mélanges de n-butanol/chloroforme 1 + 19 (V/V) et 1 + 4 (V/V)   | Acide silicique                          | s. e. (AGL C2-C18:1)  | C9 et C17          | GLC (7% DEGS)                         | Gray (96)                |

<sup>a</sup>Pâte composée de fromage et d'acide silicique.

<sup>b</sup>Pâte composée du produit laitier, d'acide silicique, de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et de célite.

Abréviations: DEGS - PS = Diethylene glycol succinate - Phosphoric acid stabilized; NPGA = Neopentyl glycol adipate; s. e. = sans estérification; n. i. = non indiqué.

**Tableau 11** Principes de base des méthodes procédant à la séparation du mélange acides gras libres et matière grasse par conversion des acides gras libres en sels

| Produits        | Modes d'extraction des AGL et de la MG  | Modes de séparations des AGL de la MG             | Estérifications (Composés analysés) | Standards internes | Déterminations (Phases stationnaires) | Références                          |
|-----------------|---|---|-------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Huile de beurre | Ether diéthylique / éthanol 1+1 (V/V) en milieu acide   | Conversion des AGL en sels de potassium           | s. e. (AGL C4-C18:1)                | C9 et C17          | GLC (7% DEGS)                         | Gray (96)                           |
| Fromage         | Extraction d'une émulsion composé d'une pâte <sup>a</sup> additionné d'éthanol et de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> par un mélange d'éther diéthylique/éther de pétrole 1+1 (V+V) | Conversion des AGL en sels de sodium              | s. e. (AGL C2-C18:1)                | C7 et C13          | GLC (5% FFAP)                         | Contarini <i>et al.</i> (100)       |
| Fromage         | Ether diéthylique/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Addition de sulfate de sodium sur l'extrait étheré   | Conversion des AGL en sels de tétraméthylammonium | s. e. (Esters méthyl. C4-C18:1)     | C9                 | GLC (4% DEGA ou CP-SIL-88)            | Martin-Hernández <i>et al.</i> (91) |
| Fromage         | Ether diéthylique/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Addition de sulfate de sodium sur l'extrait étheré   | Conversion des AGL en sels de tétraméthylammonium | s. e. (Esters méthyl. C4-C18:1)     | C9 et C17          | GLC (PTV) (Silar 5CP)                 | Juárez <i>et al.</i> (92)           |

<sup>a</sup> Pâte composée de fromage et de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Abréviations: PTV = Programmed temperature vaporizing; DEGS-PS = Diethylene glycol succinate - Phosphoric acid stabilized; FFAP = Free fatty acids phase; DEGA = Diethylene glycol adipate; CP-SIL-88 = Cyanosilicone; Silar 5 CP = Silicone, 50% phenyl, 50% cyanopropyl; s. e. = sans estérification.

analytique. Cependant, deux séquences d'éluion chromatographique sont nécessaires pour la séparation des AGL C4-C18. L'éluion des esters par un gradient d'acétonitrile dans l'eau (600-1000 mL/L) permet une bonne résolution des AGL à courtes chaînes C4-C10 mais une séparation insuffisante des AGL C14 et C18:2 (pic double) et aucune séparation entre les AGL C16 et C18:1 (un seul pic). L'éluion isocratique avec un mélange de méthanol / acétonitrile / eau 82+9+9 (V/V/V) permet une bonne résolution et quantification des esters des AGL C12-C18 mais les acides C16 et C18:1 restent non séparés et les AGL < C10 apparaissent trop près du pic du solvant pour être quantifiables.

Elliott *et al.* (103) ont amélioré ces séparations avec un gradient de 600 à 1000 mL/L d'acétonitrile dans l'eau en maintenant la température de la phase inversée de la colonne à 10 °C. Garcia *et al.* (104) proposent une éluion à 33 °C à l'aide d'une phase mobile constituée de méthanol, d'acétonitrile et d'eau. Ces auteurs obtiennent en une seule séquence d'éluion et en moins de 35 min une séparation bien résolue des esters p-bromophénacyliques des AGL C4-C18:3. Miwa et Yamamoto (108) proposent une transformation des AGL en 2-nitrophénylhydrazides directement sur les produits laitiers sans extraction préalable. Ces auteurs effectuent une séparation entre les acides à courtes

**Tableau 12** Principes de base des méthodes procédant à l'isolation des acides gras libres selon d'autres modes opératoires

| Produits   | Modes d'extraction des AGL et de la MG  | Estérifications (Composés analysés)                             | Standards internes            | Déterminations (Phases stationnaires) | Références   |
|--|---|---|-------------------------------|---------------------------------------|--|
| Huile de beurre  | Extraction par l'acétone du distillat obtenu par 'Cold-finger molecular distillation'                               | s. e. (AGL C2-C12)  | n. i.                         | GLC (5% Carbowax 20 M)                | Stark <i>et al.</i> (86)   |
| Lait   | Acétonitrile/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> en présence de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                          | CH <sub>3</sub> I/Dowex 1*2 (Esters méthyl. C4-C18:3)           | C13                           | GLC (10% SP2330)                      | Spangelo <i>et al.</i> (97)  |
| Lait, beurre, fromage, lait condensé, crème glacé et Joghurt | Extraction par de l'hexane (C6-C22:6) puis de l'éther diéthylique (C2-C6) des hydrazides formés sur le produit brut | 2-nitrophénylhydrazine HCL (Hydrazides C2-C6 et C8-C22:6)       | Acide 2-éthylbutyrique et C17 | LC (FA C8)                            | Miwa et Yamamoto (108)   |
| Beurre   | Chloroforme/éthanol 1+1 (V/V)   | Bromure de p-bromophénacycle/18-crown-6 (Esters phén. C4-C18:2) | C5 et C17 ou C17 ou C9 et C17 | LC (μ-Bondapak C18) (ODS-2)           | Reed <i>et al.</i> (98)<br>Elliott <i>et al.</i> (103)<br>Garcia <i>et al.</i> (104) |

Abréviations: LC = Liquid chromatography; ODS = Octadecylsilane; FA = Fatty acids; s. e. = sans estérification; n. i. = non indiqué.

chaînes (C2-C6) et à longues chaînes (C6-C24) par simple extraction à l'aide de solvants. L'éluion isocratique des AGL à courtes chaînes est effectuée par un mélange d'acétonitrile / méthanol / eau 30+20+50 (V/V/V) et celle des AGL à longues chaînes avec un mélange identique de rapport 75+11+14 (V/V/V). Junker-Buchheit et Jork (105, 106) proposent une séparation d'une solution standard d'AGL C6-C24 sur couche mince à haute performance (phase inversée C18). Les AGL sont transformés en composés dansylés fluorescents sur la couche mince même par réaction avec de la monodansylcadavérine et de la monodansylpiperazine en présence de N,N'-dicyclohexylurée comme activateur du groupe carboxylique. Les AGL peuvent être déterminés dans le domaine des picomoles. Cette méthode a été utilisée pour l'analyse des AGL dans des laits maternels et des beurres. Elle est mentionnée dans ce document en raison de son originalité, de sa limite de détection et d'un dosage probablement possible des AGL dans un mélange de MG/AGL sans interférence de la MG.

#### Taux de récupération

Le **Tableau 13** présente les taux de récupération des AGL selon différentes méthodes. On constate d'une manière générale que les taux de récupération des AGL sont voisins de 100 % pour la plupart des méthodes. De Jong et Badings (99) obtiennent des taux relativement faibles pour les acides à très courtes chaînes mais si l'on ne tient compte que des AGL provenant de la lipolyse (dès le C4), on peut considérer qu'ils sont comparables à ceux obtenus avec d'autres méthodes. Ces auteurs signalent en outre une correction possible des pertes en AGL avec des facteurs de correction appropriés. Les valeurs données par Stark *et al.* (86, 87) correspondent à ce qu'on peut attendre de procédés d'extraction des AGL par distillation. Pour les méthodes proposées par Woo et Lindsay (80, 81), les taux de récupération des isomères C18 sont relativement bas (82 et 84 %). Selon ces auteurs, cette perte provient d'une coélution du C18 avec la MG sur la colonne d'acide silicique-KOH. Cette perte est cependant relativement constante et peut être corrigée en appliquant des facteurs de correction appropriés. Mc Neill *et al.* (93) et Mc Neill et Connolly (95) obtiennent des taux de récupération très proches de 100 % avec la méthode de Needs adaptée pour le beurre et la fromage. On peut donc estimer que les taux de récupération déterminés par Needs (76) sur des solutions standards d'AGL ne devraient pas être très différents de ceux qu'on peut obtenir dans le lait. Miwa et Yamamoto (108) ont analysé 6 fois le même beurre et ont obtenu un taux de récupération des AGL se situant entre 95.2 et 104.3 %.

#### Précision des dosages

Le **Tableau 14** présente les répétabilités des méthodes

de dosage des AGL individuels dans différents produits laitiers. La répétabilité des méthodes a été déterminée en effectuant un certain nombre de dosages sur le même produit laitier ou sur chaque produit différent. Les coefficients de variation se situent entre 0.5 et 20.0 % pour toutes les méthodes proposées. Certains auteurs ont également calculé les coefficients de variation de la somme des AGL des différents dosages. On constate d'une manière générale que la répétabilité est fortement dépendante de la concentration en AGL dans les produits laitiers. Juárez *et al.* (92) obtiennent une des plus mauvaises répétabilités pour un fromage ayant une teneur en AGL de 1392 mg par kg et le meilleur coefficient de variation de la somme des AGL (0.5 %) pour une teneur de 8706 mg par kg. Pour le lait, la répétabilité de la méthode proposée par de Jong et Badings (99) est meilleure que les valeurs proposées par Needs *et al.* (76) et Deeth *et al.* (77). La méthode ayant la plus mauvaise répétabilité est celle de Spangelo *et al.* (97). Pour l'huile de beurre et le beurre, la répétabilité se situe entre 0.4 et 7.0 % pour toutes les méthodes sauf pour celles proposées par Reed *et al.* (98) et Woo et Lindsay (80, 81). Selon Reed *et al.* (98), la mauvaise répétabilité de l'acide caproïque (18 %) est due à la présence sur les chromatogrammes de pics interférents inconnus. Les coefficients de variation élevés pour les AGL C18 de la méthode proposée par Woo et Lindsay (80, 81) pourraient être attribués à des coélutions non suffisamment répétables de ces AGL avec la MG sur la colonne d'acide silicique-KOH. Pour le fromage, on remarque une tendance à une dispersion plus importante des coefficients de variation selon les méthodes que pour les autres produits laitiers. On remarquera toutefois la bonne répétabilité des modes opératoires proposés par Bills et Day (89), de Jong et Badings (99) ainsi que celle de la méthode de Needs (76) adaptée pour le fromage par Mc Neill et Connolly (95). Avec leur méthode LC, Miwa et Yamamoto (108) ont obtenu un coefficient de variation se situant entre 0.4-4.5% pour le même beurre analysé 9 fois.

#### Seuils de perception sensoriels

D'une manière générale, on admet actuellement que la rancidité provient des AGL C4-C12 (1, 3, 113, 122) et que les AGL C10 et C12 peuvent également provoquer un goût de savon (1, 3, 122). Les seuils de perception sont dépendants du pH des produits soumis aux dégustateurs. Un changement du pH provoque une augmentation de la concentration de la forme associée des AGL et par conséquent une modification du coefficient de partition des AGL entre les phases aqueuse et grasse des produits laitiers. Le **Tableau 15** donne les seuils de perception sensoriels selon différents auteurs. Une partie des données ont été reprises d'un tableau publié par la FIL (1). On constate que dans l'eau, les seuils de perception sont similaires pour les AGL C4, C6 et C8 (env. 6 mg/kg). Dans de l'eau tamponnée par un tampon citrate-phosphate, Baldwin et Cloninger (110) ont constaté une diminution des

Tableau 13 Taux de récupération (% rel.) des acides gras libres selon différentes méthodes dans différents produits laitiers

| Produits             | n <sup>a</sup> | C2    | C3    | C4  | C6    | C8    | C10   | C12   | C14   | C16   | C18   | C18:1 | C18:2 | C18:3 | Références                            |
|----------------------|----------------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------------------------|
| Lait <sup>b</sup>    | n. i.          | n. d. | n. d. | 98  | 92    | 94    | 90    | 98    | 91    | 91    | 95    | 91    | 99    | n. i. | Needs <i>et al.</i> (76)              |
| Lait                 | 10             | n. d. | n. d. | 118 | 90    | 109   | 97    | 92    | 93    | 96    | 96    | 95    | 112   | 130   | Spangelo <i>et al.</i> (97)           |
| Lait                 | 6              | 35    | 55    | 79  | 97    | 103   | 104   | 103   | 100   | 102   | 104   | 99    | n. i. | n. i. | De Jong et Badings (99)               |
| Huile de beurre      | 10             | n. d. | n. d. | 92  | 98    | 95    | 100   | 100   | 99    | 107   | 103   | 104   | n. i. | n. i. | Deeth <i>et al.</i> (77)              |
| Huile de beurre      | 3              | 90    | n. d. | 95  | 102   | 100   | 90    | 62    | n. d. | Stark <i>et al.</i> (86) <sup>c</sup> |
| Huile de beurre      | 3              | 80    | n. d. | 88  | 95    | 96    | 89    | 57    | n. d. | Stark <i>et al.</i> (87) <sup>d</sup> |
| Beurre               | n. i.          | n. d. | n. d. | 89  | 101   | 107   | 111   | 116   | 101   | 95    | 82    | 82    | 82    | 82    | Woo et Lindsay (80)                   |
| Beurre               | 10             | n. d. | n. d. | 106 | 106   | 92    | 97    | 96    | 95    | 95    | 96    | 98    | 106   | 89    | McNeill <i>et al.</i> (93)            |
| Fromage              | 1              | 96    | 105   | 100 | n. i. | n. i. | n. i. | n. i. | 91    | 87    | 96    | n. i. | n. i. | n. i. | Nieuwenhof et Hup (101)               |
| Fromage              | 12             | 84    | 90    | 94  | 96    | 98    | 99    | 100   | 100   | 99    | 100   | 102   | n. i. | n. i. | De Jong et Badings (99)               |
| Fromage              | 2              | 98    | n. d. | 91  | 89    | 99    | 101   | 103   | 101   | 96    | 94    | n. i. | n. i. | n. i. | Gray (96)                             |
| Fromage              | 10             | n. d. | n. d. | 103 | 92    | 95    | 94    | 95    | 98    | 98    | 101   | 100   | 104   | 109   | McNeill et Connolly (95)              |
| Fromage              | n. i.          | n. d. | n. d. | 104 | 112   | 113   | 96    | 106   | 92    | 100   | 84    | 84    | 84    | 84    | Woo et Lindsay (81)                   |
| Fromage              | 5              | n. d. | n. d. | 94  | 101   | 88    | 87    | 94    | 92    | 88    | 106   | n. i. | n. i. | n. i. | Martinn-Hernández <i>et al.</i> (91)  |
| Fromage              | 5              | n. d. | n. d. | 91  | 95    | 93    | 97    | 101   | 100   | 102   | 103   | n. i. | n. i. | n. i. | Juárez <i>et al.</i> (92)             |
| Fromage <sup>b</sup> | 3              | 94    | 95    | 94  | 95    | 97    | 100   | 95    | 98    | 94    | 70    | n. i. | n. i. | n. i. | Contarini <i>et al.</i> (100)         |

<sup>a</sup> n = nombre de déterminations par produit.

<sup>b</sup> Taux de récupération déterminé sur une solution standard d'AGL.

<sup>c</sup> 'Cold-finger molecular distillation' à 35 °C.

<sup>d</sup> 'Cold-finger molecular distillation' à 35 °C + purification sur gel de silice.

n. i. = non indiqué; n. d. = non déterminé.

**Tableau 14** Répétabilité (CV%) des méthodes de dosage des acides gras libres dans différents produits laitiers

| Produits        | AGL (mg/kg)       | n <sup>a</sup> | n <sup>b</sup> | C2    | C4   | C6   | C8    | C10   | C12   | C14  | C16  | C18  | C18:1 | C18:2 | C18:3 | Σ AGL | Références                          |
|-----------------|-------------------|----------------|----------------|-------|------|------|-------|-------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------------|
| Lait            | 72                | 1              | 6              | n. d. | 2.9  | 4.2  | 4.8   | 2.8   | 2.8   | 3.9  | 4.2  | 5.3  | 4.8   | 5.9   | n. i. | 3.9   | Needs <i>et al.</i> (76)            |
| Lait            | 366               | 1              | 10             | n. d. | 18.0 | 6.3  | 6.8   | 6.3   | 6.7   | 6.3  | 6.8  | 6.0  | 6.1   | 9.9   | 12.8  | n. i. | Spangelo <i>et al.</i> (97)         |
| Lait            | 124 <sup>c</sup>  | 6              | 8              | 4.0   | 1.7  | 1.7  | 2.4   | 0.8   | 1.6   | 1.5  | 0.5  | 0.7  | 1.1   | n. i. | n. i. | 0.9   | De Jong et Badings (99)             |
| Lait            | 265               | 1              | 5              | n. d. | 1.9  | 1.1  | 4.5   | 4.2   | 7.2   | 6.0  | 8.9  | 13.1 | 3.4   | n. i. | n. i. | n. i. | Deeth <i>et al.</i> (77)            |
| Poudre de lait  | 1005              | 1              | 5              | n. d. | 1.3  | 2.7  | 1.9   | 1.5   | 3.9   | 2.1  | 3.1  | 6.9  | 6.6   | n. i. | n. i. | n. i. | Deeth <i>et al.</i> (77)            |
| Huile de beurre | 2530 <sup>c</sup> | 3              | 2              | n. d. | 0.4  | 1.9  | 1.9   | 1.2   | 2.2   | 1.6  | 0.8  | 1.0  | 0.8   | 1.2   | 1.1   | n. i. | Iyer <i>et al.</i> (88)             |
| Huile de beurre | 3010 <sup>c</sup> | 6              | 2              | n. d. | 4.3  | 4.6  | 3.8   | 2.7   | 1.7   | 1.2  | 0.9  | 1.4  | 1.4   | 2.9   | 2.7   | n. i. | Bills <i>et al.</i> (90)            |
| Beurre          | 2042              | 1              | 5              | n. d. | 7.5  | 8.1  | 4.0   | 3.8   | 7.0   | 6.1  | 6.1  | 5.7  | 5.7   | n. i. | n. i. | n. i. | Deeth <i>et al.</i> (77)            |
| Beurre          | 4070              | 1              | 4              | n. d. | 5.2  | 2.9  | 1.3   | 2.6   | 2.4   | 2.3  | 2.1  | 4.0  | 0.9   | 5.4   | n. i. | 1.3   | McNeill <i>et al.</i> (93)          |
| Beurre          | n. i.             | n. i.          | n. i.          | n. d. | 4.6  | 18.0 | 11.2  | 4.4   | 3.9   | 2.6  | 2.1  | 3.2  | 1.8   | 6.5   | n. i. | 5.8   | Reed <i>et al.</i> (98)             |
| Beurre          | 4814              | 1              | 5              | n. d. | 2.4  | 5.9  | 8.3   | 7.6   | 4.1   | 3.3  | 6.5  | 12.4 | 12.4  | 12.4  | n. i. | n. i. | Woo et Lindsay (80)                 |
| Fromage         | n. i.             | 1              | 5              | 3.5   | 5.4  | 9.1  | n. i. | n. i. | n. i. | 15.4 | 3.9  | 2.4  | n. i. | n. i. | n. i. | n. i. | Nieuwenhof et Hup (101)             |
| Fromage         | 2675 <sup>c</sup> | 6              | 8              | 2.4   | 3.0  | 2.5  | 1.5   | 1.7   | 1.1   | 1.4  | 1.3  | 1.9  | 2.1   | n. i. | n. i. | 1.9   | De Jong et Badings (99)             |
| Fromage         | 2270              | 1              | 5              | n. d. | 1.9  | 6.4  | 11.8  | 3.2   | 6.2   | 1.7  | 1.6  | 4.1  | 2.1   | n. i. | n. i. | n. i. | Deeth <i>et al.</i> (77)            |
| Fromage         | 1507              | 1              | 4              | n. d. | 3.7  | 4.4  | 3.8   | 4.9   | 4.2   | 3.2  | 3.8  | 4.4  | 4.5   | 4.2   | 3.3   | 4.6   | McNeill et Connolly (95)            |
| Fromage         | 7961              | 1              | 5              | n. d. | 4.3  | 8.9  | 5.8   | 6.1   | 8.4   | 3.4  | 4.9  | 2.4  | 2.2   | 2.2   | n. i. | 2.2   | Martin-Hernández <i>et al.</i> (91) |
| Fromage         | 1392              | 1              | 5              | n. d. | 18.6 | 15.4 | 19.4  | 7.0   | 11.1  | 12.0 | 11.3 | 8.7  | 8.7   | n. i. | n. i. | 7.0   | Juárez <i>et al.</i> (92)           |
| Fromage         | 8706              | 1              | 5              | n. d. | 3.8  | 8.1  | 13.6  | 2.4   | 2.7   | 5.6  | 3.9  | 2.8  | 6.2   | n. i. | n. i. | 0.5   |                                     |
| Fromage         | 2664 <sup>c</sup> | 12             | 2              | 1.8   | 2.2  | 1.0  | 1.9   | 1.6   | 1.5   | 0.9  | 0.8  | 1.1  | 0.9   | 1.1   | 1.4   | n. i. | Bills et Day (89)                   |
| Fromage         | 1202              | 1              | 5              | n. d. | 2.6  | 7.7  | 20.0  | 12.8  | 8.7   | 7.5  | 6.2  | 6.2  | 6.2   | 6.2   | n. i. | n. i. | Woo et Lindsay (81)                 |

<sup>a</sup> nombre de produits différents.

<sup>b</sup> nombre de déterminations par produit.

<sup>c</sup> moyenne des teneurs en AGL dans les différents produits.

n. i. = non indiqué; n. d. = non déterminé.

valeurs des seuils de perception sensoriels en fonction de l'abaisssement du pH et une tendance à une augmentation en fonction des longueurs de chaîne. Il est remarquable de constater que le seuil de perception du C4 dans l'eau est env. 10 fois plus élevé que dans l'huile végétale et l'huile de beurre. Pour le lait, les seuils de perception des AGL C4 et C6 se situent entre 14 et 46 mg/kg. Pour les beurres, on remarque une plus forte dispersion des valeurs suivant les auteurs. Les seuils de perception déterminés par Urbach *et al.* (111) dans un mélange synthétique d'huile de beurre désodorisé et d'eau se différencient nettement de ceux des autres auteurs. Selon cet auteur, les seuils de perception dans le beurre devraient logiquement se situer entre ceux déterminés dans l'eau et dans l'huile de beurre.

Selon la FIL (1), les seuils de perception mesurés dans un mélange synthétique pourraient être différents de ceux mesurés dans le beurre. Il est également possible qu'une certaine confusion existe au niveau de la définition du seuil de perception. La définition utilisée par Urbach *et al.* correspond à la concentration la plus basse à laquelle le 50 % des dégustateurs différencient un échantillon sans ajout d'AGL d'un échantillon avec ajout. Les dégustateurs ne doivent pas nécessairement être capable de donner une définition qualitative de la différence. Les autres auteurs déterminent surtout des seuils de perception qui correspondent à la reconnaissance d'une faible rancidité. C'est pourquoi Hough *et al.* (120) proposent une détermination des seuils de perception absolus selon Urbach *et al.* et des seuils de

**Tableau 15** Seuils de perception (mg / kg) de la flaveur des acides gras libres selon différents auteurs

| Produits            | pH    | C2    | C4    | C6    | C8    | C10   | C12   | Références                   |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------------|
| Eau                 | n. i. | 54    | 6.8   | 5.4   | 5.8   | 3.5   | n. i. | Patton (114)                 |
| Eau                 | n. i. | 22    | 6.2   | 15    | 5.83  | n. i. | n. i. | Siek <i>et al.</i> (116)     |
| Eau tamponnée       | 3.2   | n. i. | 0.4   | 6.7   | 2.2   | 1.4   | n. i. | Baldwin et Cloninger (110)   |
|                     | 4.5   |       | 1.9   | 8.6   | 8.7   | 2.2   |       |                              |
|                     | 6.0   |       | 6.1   | 27.1  | 11.3  | 14.8  |       |                              |
| Lait                | n. i. | n. i. | 46.1  | 30.4  | n. i. | ~ 30  | ~ 30  | Scanlan (113)                |
| Lait                | n. i. | n. i. | 17.6  | n. i. | n. i. | 94.7  | n. i. | Duncan et Christen (112)     |
| Lait                | n. i. | n. i. | 25    | 14    | n. i. | n. i. | n. i. | Patton (114)                 |
| Lait maigre         | n. i. | 10    | n. i. | Forss et Patton (118)        |
| Lait maigre         | n. i. | 7.0   | 8.5   | Kinsella (117)               |
| Beurre <sup>a</sup> | n. i. | n. i. | 35    | 26    | n. i. | n. i. | n. i. | McNeill <i>et al.</i> (93)   |
| Beurre              | n. i. | n. i. | 40    | 15    | 455   | 250   | 200   | Woo et Lindsay (122)         |
| Beurre              | n. i. | n. i. | 50.5  | 93.7  | 454.6 | 363.0 | 303.4 | McDaniel <i>et al.</i> (119) |
| Beurre              | n. i. | 5     | 3     | 10    | 10    | 5     | 50    | Urbach <i>et al.</i> (111)   |
| Huile de beurre     | n. i. | 7     | 0.66  | n. i. | n. i. | n. i. | n. i. | Siek <i>et al.</i> (115)     |
| Huile végétale      | n. i. | n. i. | 0.6   | 2.5   | 350   | 200   | 700   | Feron et Govignon (121)      |

<sup>a</sup> mg par kg de MG.

n. i. = non indiqué.

reconnaissance de la rancidité. Dans le beurre, Woo et Lindsay (122) ont développé une méthode permettant de détecter et de prédire l'intensité de la rancidité (Ir). Ces auteurs ont corrélé des données sensorielles avec les teneurs en AGL en recourant à des méthodes d'analyse de régression linéaire multiple. L'équation de régression ( $Ir = 1.93163 + 0.01754 \times C4 + 0.00054 \times \Sigma C18$ ) permet de classer les beurres suivant la qualité dans trois domaines d'Ir déterminés par analyse discriminante. Pour des beurres non rances, faiblement et vraiment rances, ces auteurs ont déterminé des domaines d'Ir de 1.00–2.80, 2.81–3.80 et 3.81–7.00 mg/kg.

## Conclusion

Cette revue de bibliographie nous permet de conclure que divers modes d'inactivation des lipases sont à disposition des laboratoires pour réduire la lipolyse durant le transport et l'entreposage des échantillons avant l'analyse. Les agents chimiques, comme les métaux lourds ou le bichromate de potassium sont connus depuis longtemps et permettent de réduire aussi bien la lipolyse induite par la lipase naturelle du lait que celle d'origine microbienne. L'inhibition des lipases par les polysaccharides, les émulsifiants et l'histidine a été testée sur des cultures de bactéries psychrotrophiques. L'efficacité de ces substances à l'usage des laboratoires devrait encore être confirmée. Cependant, selon la FIL (1), les inhibiteurs chimiques ne préservent pas totalement le lait et la crème contre une augmentation temporaire de la lipolyse due à des agitations mécaniques intensives telles que le mixage ou l'homogénéisation. Les moyens d'inactivation thermiques inhibent toute lipolyse pendant au moins 24 h. Les techniques d'extraction à l'aide de solvants sont déjà largement utilisées dans les laboratoires.

Quant aux méthodes de dosage global des AGL, on peut conclure que celles faisant appel à des extractions des AGL par la MG elle-même présentent les désavantages d'extraire l'acide lactique en quantités non négligeables et de n'extraire que de faibles quantités d'AGL à courtes chaînes responsables de la rancidité. Cependant, ces méthodes sont essentiellement employées pour le dosage des AGL dans le lait et la crème et ces produits ne contiennent à l'état frais que de très faibles teneurs en acide lactique. Quant à la faible extraction des AGL à courtes chaînes, on peut estimer qu'une extraction complète ne permettrait pas d'améliorer la corrélation entre les teneurs en AGL et la rancidité en raison du taux relativement bas des AGL C4–C12 dans les glycérides de la graisse de lait (env. 10 % du total des AGL). La méthode proposée récemment par Ukeda *et al.* (74) permettrait peut-être de résoudre ce problème en raison de la sélectivité de l'électrode microbienne pour les AGL à courtes chaînes. Cependant, le manque de stabilité à longue échéance de gel microbien et la fréquence des calibrations pourraient réduire l'intérêt pour ce mode opératoire. Les méthodes de dosage global à l'aide de

solvants permettent une meilleure extraction des AGL à courtes chaînes mais présentent aussi des inconvénients. La méthode des savons de cuivre par exemple n'est pas utilisable pour les laits homogénéisés et le mélange d'extraction proposé extrait également une part importante des phospholipides du lait. Malgré tout, les nombreuses méthodes décrites dans ce travail ont une répétabilité donnée par un coefficient de variation qui se situe en général entre 2 et 5 %. Cette répétabilité est suffisante au niveau des laboratoires et devrait permettre de répondre aux besoins de la pratique à condition que les prélèvements, transports et entreposages soient effectués sans provoquer de lipolyse additionnelle. On peut donc conclure qu'en raison des nombreuses méthodes de dosage des AGL dans le lait et les produits laitiers, il n'est plus nécessaire d'en développer de nouvelles. On a en ce moment plus besoin de méthodes standardisées au niveau européen et c'est d'ailleurs la décision qu'a prise le groupe d'experts FIL/IDF E 301 (Fat) en publiant les modes opératoires de 3 méthodes dans le bulletin FIL 265 (1). Pour le dosage global des AGL, ce groupe a décidé de standardiser les méthodes BDI, des savons de cuivre et celle dite à flux continu.

Quant aux méthodes de dosage des AGL individuels, elles permettent une bonne détermination du défaut de rancidité mais elles comportent généralement plusieurs étapes et ne constituent donc pas des modes opératoires rapides. Les méthodes procédant à l'isolation des AGL à l'aide de résines échangeuses d'ions, sur oxyde d'aluminium ou sur acide silicique-KOH ont été adaptées de façon à rendre négligeable l'hydrolyse des glycérides sur ces genres de supports. On a choisi des résines échangeuses d'ions faiblement basiques, le taux de KOH a été diminué sur les colonnes d'acide silicique-KOH, l'oxyde d'aluminium a été désactivé avec 40 à 60 g d'eau par kg de support. Les taux de récupération et la répétabilité de la plupart de ces méthodes et particulièrement de celles selon Needs *et al.* (76), Deeth *et al.* (77) et de Jong et Badings (99) sont suffisantes pour résoudre les problèmes posés par la pratique. La méthode selon Needs a été choisie comme méthode officielle par la FIL. Les adaptations faites par Mc Neil pour le beurre et par Mc Neill et Connolly pour le fromage en font une méthode universelle. La méthode selon de Jong et Badings utilise un échangeur d'ions peu basique réduisant les risques d'hydrolyse. Cette méthode présente encore les avantages d'être rapide, de permettre une injection des AGL sans estérification préalable, d'employer de petites quantités d'échantillons et peu de solvants. Les méthodes LC présentent l'avantage de ne pas utiliser de supports pour la séparation des AGL de la MG. On évite ainsi une hydrolyse des glycérides durant le processus analytique. Cependant, la plupart de ces modes opératoires, en dehors de la variante du mode opératoire de Reed *et al.* proposée par Garcia *et al.*, ne permettent pas d'obtenir tous les AGL du lait en une seule étape d'éluion. Pour le dosage des AGL ramifiés en traces (teneurs de l'ordre du mg/tonne), dont les seuils de perception organoleptiques se situent à des niveaux

inférieurs à ceux des AGL linéaires, la méthode de Kim Ha et Lindsay devrait être considérée avec attention. Les corrélations entre les seuils de détection sensoriels de la rancidité et les teneurs en AGL déterminées par des méthodes de dosage global doivent être considérées de manière critique en raison du faible taux d'extraction des AGL à courtes chaînes et du faible pourcentage des AGL C4-C12 dans les glycérides. Les corrélations avec des teneurs en AGL déterminées à l'aide des méthodes de dosage des AGL individuels pourraient être plus concordantes entre les divers auteurs si on s'entend sur la définition du seuil de perception sensoriel. Il s'agit de savoir si ce seuil correspond à la concentration la plus basse à laquelle les dégustateurs différencient un échantillon sans ajout d'un échantillon avec ajout sans devoir reconnaître le goût de rance ou s'il correspond à la reconnaissance d'une faible rancidité.

### Remerciements

Les auteurs remercient Monsieur le *Dr Raoul Daniel* pour son excellente critique du manuscrit.

### References

- FIL-IDF. Determination of free fatty acids in milk and milk products. *Bulletin*, 265 (1991)
- FIL-IDF. Proceedings of the lipolysis symposium. *Bulletin Annuel*, 86 (1975)
- KUZDZAL-SAVOIE, S. Dosage des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. *Anomalies du goût du lait et des produits laitiers dues à la lipolyse. FIL-IDF Document*, 118, 56-70 (1980)
- VAN REUSEL, A. Contribution à l'étude de la détermination des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. Mémoire nos 12. *Centre de recherche agronomique de l'état, Station laitière, Chaussée de Namur 24, Gembloux* (1989)
- DE LA FUENTE, M. A. AND JUÁREZ, M. Review: Determination of free fatty acids in dairy products. *Revista Española de Ciencias y Tecnología de Alimentos*, 33, 247-269 (1993)
- DRING, R. AND FOX, P.F. Purification and characterization of a heat-stable lipase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 29. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 7, 157-171 (1983)
- 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)
- JELLEMA, A. Behandeling van monsters i.v.m. vetsplittingsonderzoek. *Zuivelzucht*, 71, 575 (1979)
- SHIPE, W. F., SENYK, G.F. AND BOOR, K. J. Inhibition of milk lipolysis by lambda carrageenan. *Journal of Dairy Science*, 65, 24-27 (1982)
- STERN, K. K., FOEGEDING, E. A. AND HANSEN, A. P. Inhibition of lipolytic activity in milk by polysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 71, 41-45 (1988)
- HARRIS, P. L. AND CUPPETT, S. L. Effect of selected antioxidants on the activity of a mixture of crude *Pseudomonas* lipases. *Journal of Food Protection*, 54, 133-135 (1991)
- HARRIS, P. L. AND CUPPETT, S. L. Inhibition of a mixture of crude *Pseudomonas* lipases by selected emulsifiers. *Journal of Food Protection*, 56, 541-542, 554 (1993)
- IMHOF, M. UND BOSSET, J. O. Die Bestimmung von freien Fettsäuren in Milch und Rahm. IV: Optimierung und Standardisierung der Probenahme und der -behandlung. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 86, in Vorbereitung (1995)
- CHRISTEN, G. L. AND MARSHALL, R. T. Effect of histidine on thermostability of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27. *Journal of Dairy Science*, 68, 594-604 (1985)
- SUNDHEIM, G. AND BENGTTSSON-OLIVECRONA, G. Hydrolysis of bovine milk fat globules by lipoprotein lipase: Inhibition by proteins extracted from milk fat globule membrane. *Journal of Dairy Science*, 70, 1815-1821 (1987)
- SUNDHEIM, G. AND BENGTTSSON-OLIVECRONA, G. Methods to assess the propensity of milk fat globules toward lipolysis and the ability of skim milk to inhibit lipolysis. *Journal of Dairy Science*, 70, 2040-2045 (1987)
- SUNDHEIM, G. AND BENGTTSSON-OLIVECRONA, G. Hydrolysis of bovine and caprine milk fat globules by lipoprotein lipase. Effect of heparin and of skim milk on lipase distribution and on lipolysis. *Journal of Dairy Science*, 70, 2467-2475 (1987)
- GIRARDET, J. M., LINDEN, G., LOYE, S., COURTHAUDON, J. L. AND LORIENT, D. Study of mechanism of lipolysis inhibition by bovine milk protease-peptone component 3. *Journal of Dairy Science*, 76, 2156-2163 (1993)
- O'HALLORAN, J.C. A study of free fatty acids content of milk as affected by production and storage techniques. *Thesis, Faculty of Dairy science, University College, Cork, Ireland* (1975)
- DRIESSEN, F. M. AND STADHOUDERS, J. The lipolytic enzymes and cofactors responsible for spontaneous rancidity in cow's milk. *Proceedings of the lipolysis symposium. FIL-IDF Document annuel*, 86, 73-79 (1975)
- DRIESSEN, F. M. Lipases and proteinases in milk. Occurrence, heat inactivation and their importance for the keeping quality of milk products. Milk lipoprotein lipase pp. 27-36 *Verslag V 236, Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek, Ede* (1983)
- DOODY, K., O'SHEA, J. AND RAFFERTY, T. F. Influence of design of milking equipment on lipolysis. *Proceedings of the lipolysis symposium. FIL-IDF Document annuel*, 86, 146-155 (1975)
- DUNKLEY, W. L. Hydrolytic rancidity in milk. I. Surface tension and fat acidity as measures of rancidity. *Journal of Dairy Science*, 34, 515-520 (1951)
- TARASSUK, N. P. AND FRANKEL, E. N. The specificity of milk lipase. IV. Partition of the lipase system in milk. *Journal of Dairy Science*, 40, 418-430 (1957)
- BUCHANAN, R. A. Lipolysis and the frothing of milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 20, 62-66 (1965)
- DEETH, H. C. AND FITZ-GERALD, C. H. Lipolysis in dairy products: a review. *Australian Journal of Dairy Technology*, 31, 53-64 (1976)
- THOMAS, E. L., NIELSEN, A. J. AND OLSON, J. C. Jr. Hydrolytic rancidity in milk. A simplified method for estimating the extent of its development. *American Milk Review*, 17, 50-58, 85 (1955)
- 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 assay. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31, 40-55 (1977)
- JAMOTTE, P. Dégradation de la matière grasse par lipolyse. *Le Lait*, 461, 25-42 (1967)
- HÄNNI, H. UND RYCHENER, M. Vergleich verschiedener Methoden für die Bestimmung der freien Fettsäuren in Milch und Milchprodukten. *Mitteilungen aus dem Gebiete*

- der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, **71**, 509–525 (1980)
- 31 STADHOUDERS, J., TUCKEY, S. L. AND RAADSVELD, C. W. Comparison of certain methods for the determination of fat hydrolysis in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **21**, 150–157 (1967)
- 32 HERRINGTON, B. L. AND KRUKOWSKY, V. N. Studies of lipase action. I. Lipase action in normal milk. *Journal of Dairy Science*, **22**, 127–135 (1939)
- 33 Schweizerisches Lebensmittelbuch, 2. Band, 5. Auflage, Kapitel 3A, Methoden 10 und 15. Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern (1970)
- 34 Schweizerisches Lebensmittelbuch, 2. Band, 5. Auflage, Kapitel 7, Methode 4.3. Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern (1994)
- 35 Produits à base de matière grasse laitière et beurre. Détermination de l'acidité de la matière grasse. *FIL-IDF Norme provisoire*, **6 B** (1989)
- 36 COLLOMB, M. ET SPAHNI, M. Dosage potentiométrique en milieu non aqueux de degré d'acidité grasse du beurre. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **82**, 174–186 (1991)
- 37 Schweizerisches Lebensmittelbuch, 2. Band, 5. Auflage, Kapitel 5, Methode 04. Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern (1970)
- 38 DOLE, V. P. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *The Journal of Clinical Investigation*, **35**, 150–154 (1955). Cité par Dole: Meinetz, H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **235**, 2595–2599 (1960)
- 39 DRIESSEN, F.M. AND STADHOUDERS, J. Lipolysis in hard cheese made from pasteurized milk. *FIL-IDF Document annuel*, **86**, 101–107 (1975)
- 40 Cité selon (3): BEJAMBES, M., SAVOIE, S., CLUZEL, S. *Annales Institut National de la Recherche Agronomique (D)*, **1**, 29 (1952)
- 41 Détermination de l'indice d'acide de la matière grasse du beurre. *FIL-IDF Norme*, **6A** (1969)
- 42 Schweizerisches Lebensmittelbuch, 2. Band, 5. Auflage, Kapitel 6, Methode 10. Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern (1973)
- 43 CARTIER, P., CHILLIARD, Y. ET CHAZAL, M. P. Dosage de l'activité lipasique et des acides gras libres du lait par titration automatique colorimétrique. *Le Lait*, **64**, 340–355 (1984)
- 44 JOHNSON, B. C. AND GOULD, I. A. Variations in the acid degree of milk fat as affected by churning and extraction procedures. *Journal of Dairy Science*, **29** (Abstracts), 504–505 (1946)
- 45 JOHNSON, B. C. AND GOULD, I. A. Milk lipase system. II. Comparison of solvent extraction and churning methods for obtaining fat from milk for free fatty acid measurement. *Journal of Dairy Science*, **32**, 435–446 (1949a)
- 46 JOHNSON, B. C. AND GOULD, I. A. Milk lipase system. III. Further studies of the solvent extraction procedure for obtaining fat from milk for titration. *Journal of Dairy Science*, **32**, 447–451 (1949b)
- 47 PERRIN, D. R. AND PERRIN, D. D. The determination of free fatty acids in milk. *Journal of Dairy Research*, **25**, 221–227 (1958)
- 48 TARASSUK, N. P. AND FRANKEL, E. N. Evaluation of the acid degree of fat and extraction-titration methods for the estimation of free fatty acids in rancid milk and cream. *Journal of Dairy Science*, **37** (Abstracts), 646 (1954)
- 49 FRANKEL, E. N. AND TARASSUK, N. P. An extraction-titration method for the determination of free fatty acids in rancid milk and cream. *Journal of Dairy Science*, **38**, 751–763 (1955)
- 50 HARPER, W. J., SCHWARTZ, D. P. AND EL HAGARAWY, I. S. A rapid silica gel method for measuring total free fatty acids in milk. *Journal of Dairy Science*, **38**, 46–50 (1956)
- 51 BACHMANN, M. Beitrag zur Kenntnis der lipolytischen Fettspaltung (Ranzigkeit) in Milch und Käse. *Thesis Nr. 3043 der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich* (1960)
- 52 MC CARTHY, R. D. AND DUTHIE, A. H. A rapid quantitative method for the separation of free fatty acids from other lipids. *Journal of Lipid Research*, **3**, 117–119 (1961)
- 53 KUZDZAL-SAVOIE, S. ET PETIT, J. Fractionnement chromatographique des produits de la lipolyse dans les fromages. *XVII ème Congrès International de Laiterie, Document, D:2* (fromage), 329–334 (1966)
- 54 MOSINGER, F. Photometric adaptation of Dole's microdetermination of free fatty acids. *Journal of Lipid Research*, **6**, 157–159 (1965)
- 55 KASHKET, S. An automated method for analysis of free fatty acids. *Analytical Biochemistry*, **41**, 166–172 (1971)
- 56 LINDQVIST, B., ROOS, T. AND FUJITA, H. Autoanalyzer determination of free fatty acids in farm milk. Modification of present methods to simplify transportation of the sample. *Milchwissenschaft*, **30**, 12–17 (1975)
- 57 SUHREN, G., HEESCHEN, W. UND TOLLE, A. Die automatisierte Messung freier Fettsäuren in der kontinuierlichen Durchflussanalyse. *Milchwissenschaft*, **32**, 641–643 (1977)
- 58 NOVAK, M. Colorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acids. *Journal of Lipid Research*, **6**, 431–433 (1965)
- 59 MAHIEU, H. Lipo R-Methode. Schnellbestimmung von freien Fettsäuren in Milch. *Deutsche Molkerei Zeitung*, **14**, 397–408 (1985)
- 60 DEETH, H. C., FITZ-GERALD, C. H. AND WOOD, A. F. A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, **30**, 109–111 (1975)
- 61 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. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **81**, 296–318 (1990)
- 62 BOSSET, J. O., IMHOF, M. UND STEIGER, G. Die Bestimmung von freien Fettsäuren in Milch und Rahm. II. Auswertung eines Ringversuches mit der visuellen und der potentiometrischen Titrationsmethode. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **81**, 510–521 (1990)
- 63 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. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **84**, 687–699 (1993)
- 64 THOMASOW, J. Bestimmung der freien Fettsäuren in flüssigen Milchprodukten nach der BLM-PEDIA-Methode. *Deutsche Molkerei Zeitung*, **28**, 906–909 (1981)
- 65 MOUILLET, L., LUQUET, F. M., NICOD, H., BOUDIER, J. F. ET MAHIEU, H. La lipolyse des laits. Etude d'une méthode rapide de mesure. *Le Lait*, **61**, 171–186 (1981)
- 66 BIALLAS, E. Die Bestimmung der freien Fettsäuren in wenigen Minuten und ihre milchwirtschaftliche Bedeutung. *Molkerei Zeitung Welt der Milch*, **36**, 236–238 (1982)
- 67 KOOPS, J. AND KLOMB, H. Rapid colorimetric determination of free fatty acids (lipolysis) in milk by the copper soap method. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **31**, 56–74, 554 (1977)
- 68 SHIPE, W. F., SENYK, G. F. AND FOUNTAIN, K. B. Modified copper soap solvent extraction method for measuring free fatty acids in milk. *Journal of Dairy Science*, **63**, 193–198 (1980)
- 69 BYNUM, D. G., SENYK, G. F. AND BARBANO, D. M. Determination of free fatty acid content of Cheddar

- cheese by a copper soap method. *Journal of Dairy Science*, **67**, 1521-1524 (1984)
- 70 KOOPS, J., KLOMP, H. AND VAN HEMERT, H. Rapid enzymatic assay of free fatty acids (lipolysis) in farm tank milk by a segmented continuous-flow method. Comparison of the results with those obtained by the BDI procedure. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **44**, 3-19 (1990)
- 71 MILLER, B. Lipolysierbares Fett als Folge der Fettschädigung bei der Rohmilchgewinnung und -behandlung. *Thesis Nr. 7844 der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich* 1985
- 72 CHRISTEN, G. L., SHEN, N. AND MARURI, J. L. Recovery of short chain-length fatty acids from milk by several methods. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, **13**, 707-709 (1993)
- 73 CHRISTEN, G. L. AND SHEN, N. Comparison of methods to extract free fatty acids from milk. *Journal of Dairy Science*, **74**, (Supplement) 130 (1991)
- 74 UKEDA, H., WAGNER, G., BILITEWSKI, U. AND SCHMID, R. D. Flow injection analysis of short chain fatty acids in milk based on a microbial electrode. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 2324-2327 (1992)
- 75 SALIH, M. A., ANDERSON, M. AND TUCKLEY, B. The determination of short- and long- chain free fatty acids in milk. *Journal of Dairy Research*, **44**, 601-605 (1977)
- 76 NEEDS, E. C., FORD, G. D., OWEN, A. J., TUCKLEY, B. AND ANDERSON, M. A method for the quantitative determination of individual free fatty acids in milk by ion exchange resin adsorption and gas-liquid chromatography. *Journal of Dairy Research*, **50**, 321-329 (1983)
- 77 DEETH, H. C., FITZ-GERALD, C. H. AND SNOW, A. J. A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **18**, 13-20 (1983)
- 78 HULSTKAMP, J. Über die Bestimmung verschiedener organischer Säuren durch Veresterung an einem Ionenaustauscher. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **64**, 80-90 (1973)
- 79 WOO, A. H. AND LINDSAY, R. C. Development and characterization of an improved silicic acid-KOH arrestant column for routine quantitative isolation of free fatty acids. *Journal of American Oil Chemists Society / JAOCS*, **57**, 414-416 (1980)
- 80 WOO, A. H. AND LINDSAY, R. C. Method for the routine quantitative gas chromatographic analysis of major free fatty acids in butter and cream. *Journal of Dairy Science*, **63**, 1058-1064 (1980)
- 81 WOO, A. H. AND LINDSAY, R. C. Rapid method for quantitative analysis of individual free fatty acids in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **65**, 1102-1109 (1982)
- 82 KIM HA, J. AND LINDSAY, R. C. Method for the quantitative analysis of volatile free and total branched-chain fatty acids in cheese and milk fat. *Journal of Dairy Science*, **73**, 1988-1999 (1990)
- 83 WOO, A. H., KOLLODGE, S. AND LINDSAY, R. C. Quantification of major free fatty acids in several cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, **67**, 874-878 (1984)
- 84 WOO, A. H. AND LINDSAY, R. C. Concentrations of major free fatty acids and flavor development in italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, **67**, 960-968 (1984)
- 85 KUZDZAL-SAVOIE, S. Méthylestérification sélective des acides gras libres et des acides gras des glycérides. *Annales de Technologie Agricole*, **17**, 341-354 (1968)
- 86 STARK, W., URBACH, G., HAMILTON, J. S. AND FORSS, D. A. Volatile compounds in butter oil. III. Recovery of added fatty acids and  $\delta$ -lactones from volatile-free butter oil by cold-finger molecular distillation. *Journal of Dairy Research*, **40**, 39-46 (1973)
- 87 STARK, W., URBACH, G. AND HAMILTON, J. S. Volatile compounds in butter oil. IV. Quantitative estimation of free fatty acids and free  $\delta$ -lactones in butter oil by cold-finger molecular distillation. *Journal of Dairy Research*, **43**, 469-477 (1976)
- 88 IYER, M., RICHARDSON, T., AMUNDSON, C. H. AND BOURDREAU, A. Improved technique for analysis of free fatty acids in butteroil and provolone cheese. *Journal of Dairy Science*, **50**, 285-291 (1967)
- 89 BILLS, D. D. AND DAY, E. A. Determination of the major free fatty acids in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **47**, 733-738 (1964)
- 90 BILLS, D. D., KHATRI, L. L. AND DAY, E. A. Method for the determination of the free fatty acids in milk fat. *Journal of Dairy Research*, **46**, 1342-1347 (1963)
- 91 MARTIN-HERNÁNDEZ, M. C., ALONSO, L., JUÁREZ, M. AND FONTECHA, J. Gas chromatographic method for determining free fatty acids in cheese. *Chromatographia*, **25**, 87-90 (1988)
- 92 JUAREZ, M., DE LA FUENTE, M. A. AND FONTECHA, J. Improved gas chromatographic method for the determination of the individual free fatty acids in cheese using a capillary column and a PTV injector. *Chromatographia*, **33**, 351-355 (1992)
- 93 MC NEILL, G. P., O'DONOGHUE, A. AND CONNOLLY, J. F. Quantification and Identification of flavour components leading to lypolytic rancidity in stored butter. *Irish Journal of Food Science and Technology*, **10**, 1-10 (1986)
- 94 EDWARDS-WEBB, J. D. Determination of fatty acids in digesta: an improved method for the free fatty acids from C4:0 to C18:3. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **26**, 1943-1948 (1975)
- 95 MC NEILL, G. P. AND CONNOLLY, J. F. A method for the quantification of individual free fatty acids in cheese: application to ripening of Cheddar-type cheeses. *Irish Journal of Food Science and Technology*, **13**, 119-128 (1989)
- 96 GRAY, I. K. The quantitative analysis of free fatty acids in dairy products. *New Zealand Journal of Dairy science and Technology*, **10**, 158-162 (1975)
- 97 SPANGELO, A., KARIJORD, O., SVENSEN, A. AND ABRAHAMSEN, R. K. Determination of individual free fatty acids in milk by strong anion-exchange resin and gaschromatography. *Journal of Dairy Science*, **69**, 1787-1792 (1986)
- 98 REED, A. W., DEETH, H. C. AND CLEGG, D. E. Liquid chromatographic method for quantitative determination of free fatty acids in butter. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists / JAOAC*, **67**, 718-721 (1984)
- 99 DE JONG, C. AND BADINGS, H. T. Determination of free fatty acids in milk and cheese. Procedure for extraction, clean-up and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of High Resolution Chromatography*, **13**, 94-98 (1990)
- 100 CONTARINI, G., ZUCCHETTI, S., AMELOTI, G. E Toppino, P.M. Metodiche analitiche e gascromatografiche per la valutazione della frazione acidica libera nei prodotti lattiero-caseari. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **66**, 561-567 (1989)
- 101 NIEUWENHOF, F. F. J. AND HUR, G. Gas-chromatographic determination of free fatty acids in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **25**, 175-182 (1971)
- 102 CHRISTOPHERSON, S. W. AND GLASS, R. Preparation of milk fat methylesters by alcoholysis in an essentially non-alcoholic solution. *Journal of Dairy Science*, **52**, 1289-1290 (1969)
- 103 ELLIOTT, J. M., DE HAAN, B. AND PARKIN, K. L. An improved liquid chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk products. *Journal of Dairy Science*, **72**, 2478-2482 (1989)
- 104 GARCIA, H. S., REYES, H. R., MALCATA, F. X., HILL JR, C. G. AND AMUNDSON, C. H. Determination of the major free fatty acids in milkfat using a three-component mobile phase for HPLC analysis. *Milchwissenschaft*, **45**, 757-759 (1990)

- 105 JUNKER-BUCHHEIT, A. UND JORK, H. Prächromatographische in-situ Derivatisierung von Fettsäuren im Picomol-Bereich. Teil I: HPTLC fluoreszierender Monodansylpiperazin- und -cadaverin-Derivate. *Fresenius Zeitschrift für analytische Chemie*, **331**, 387-393 (1988)
- 106 JUNKER-BUCHHEIT, A. AND JORK, H. Monodansylcadaverine as a fluorescent marker for carboxylic acids. In situ prechromatographic derivatization. *Journal of Planar Chromatography*, **2**, 65-70 (1989)
- 107 KINTNER, J. A. AND DAY, E. A. Major free fatty acids in milk. *Journal of Dairy Science*, **48**, 1575-1581 (1965)
- 108 MIWA, H. AND YAMAMOTO, M. Liquid chromatographic determination of free and total fatty acids in milk and milkproducts as their 2-nitrophenylhydrazides. *Journal of chromatography*, **523**, 235-246 (1990)
- 109 PILLAY, V. T., MYHR, A. N. AND GRAY, J. I. Lipolysis in milk. I. Determination of free fatty acids and threshold value for lipolyzed flavor detection. *Journal of Dairy Science*, **63**, 1213-1218 (1980)
- 110 BALDWIN, R. E. AND CLONINGER, M. R. Flavor thresholds for fatty acids in buffered solutions. *Journal of Food Science*, **38**, 528-530 (1973)
- 111 URBACH, G., STARK, W. AND FORSS, D. A. Volatile compounds in butter oil. II. Flavour and flavour thresholds of lactones, fatty acids, phenols, indole and skatole in deodorized synthetic butter. *Journal of Dairy Research*, **39**, 35-47 (1972)
- 112 DUNCAN, S. E. AND CHRISTEN, G. L. Sensory detection and recovery by acid degree value of fatty acids added to milk. *Journal of Dairy Science*, **74**, 2855-2859 (1991)
- 113 SCANLAN, R. A., SATHER, L. A. AND DAY, E. A. Contribution of free fatty acids to the flavor of rancid milk. *Journal of Dairy Science*, **58**, 1582-1584 (1965)
- 114 PATTON, S. Flavor thresholds of volatile fatty acids. *Journal of Food Science*, **29**, 679-680 (1964)
- 115 SIEK, T. J., ALBIN, I. A., SATHER, L. A. AND LINDSAY, R. C. Taste thresholds of butter volatiles in deodorized butter-oil medium. *Journal of Food Science*, **34**, 265-267 (1969)
- 116 SIEK, T. J., ALBIN, I. A., SATHER, L. A. AND LINDSAY, R. C. Comparison of flavor thresholds of aliphatic lactones with those of fatty acids, esters, aldehydes, alcohols and ketones. *Journal of Dairy Science*, **54**, 1-4 (1971)
- 117 KINSELLA, J. E. The flavour chemistry of milk lipids. *Chemistry and Industry (London)*, 36-42 (1969)
- 118 FORSS, D. A. AND PATTON, S. Flavor of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **49**, 89-91 (1966)
- 119 MC DANIEL, M. R., SATHER, L. A. AND LINDSAY, R. C. Influence of free fatty acids on sweet cream butter flavor. *Journal of Food Research*, **34**, 251-254 (1969)
- 120 HOUGH, G., MARTINEZ, E. AND BARBIERI, T. Sensory thresholds of flavor defects in reconstituted whole milk powder. *Journal of Dairy Science*, **75**, 2370-2374 (1992)
- 121 FERON, R. AND GOVIGNON, M. Relation entre l'acidité libre et le goût des huiles alimentaires. *Annales des Falsification et de l'Expertise Chimique*, **54**, 308-314 (1961)
- 122 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. *Journal of Food Science*, **48**, 1761-1771 (1983)
- 123 FIL-IDF. A practical guide to the control of lipolysis in the manufacture of dairy products. *Bulletin*, **264** (1991)
- 124 DE JONG, C., PALMA, K. AND NEETER, R. Sample preparation before capillary gas-chromatographic estimation of free fatty acids in fermented dairy products. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **48**, 151-156 (1994)

