LES ACIDES GRAS MINEURS DU BEURRE

par

S. KUZDZAL-SAVOIE et W. KUZDZAL

*Station centrale de recherches laitières et de technologie
des produits animaux, C.N.R.Z., Jouy-en-Josas (Yvelines) France*

I. — Introduction

Depuis les travaux de Hilditch (1947), le nombre des acides gras identifiés dans le beurre n'a cessé d'augmenter au fur et à mesure que les méthodes analytiques utilisées se perfectionnaient. (Cf. Herb et al., 1962 ; Kuzdzal-Savoie, 1962 ; Shorland, 1963 ; Iverson et al., 1965). Actuellement le nombre des acides gras connus s'élève à 84 (sans compter les isomères stériques ou de position des acides insaturés). Quatre acides seulement se trouvent à un pourcentage supérieur à 10 p. 100 et une cinquantaine à un pourcentage inférieur à 0,1 p. 100. Une trentaine d'acides se trouvent à des taux variant de 0,1 à 4 p. 100. La présente étude est consacrée à ce dernier groupe.

Le but de cette étude est de préciser les limites de variation des proportions relatives de ces acides mineurs.

II. — Méthode expérimentale

L'expérimentation.

Nous avons étudié comparativement les acides gras du lait produit par deux troupeaux de vaches laitières vivant dans la même région de France (à Echiré, Charente). Le premier troupeau comptait soixante-quatre vaches (dont 21 de race Française Frisonne Pie Noire et 41 de race Normande) et le second quatre-vingt-treize vaches (dont 42 de race Française Frisonne Pie Noire et 47 de race Normande).

L'expérimentation s'est déroulée de février à mai 1964. De février 1964 au début avril les vaches des deux troupeaux étaient à l'étable et à partir de la mi-avril, elles vivaient au pâturage.

A l'étable les vaches du premier troupeau recevaient une alimentation composée de betteraves, de foin et de concentré, à laquelle étaient parfois ajoutés des choux et des topinambours.

Les vaches du second troupeau recevaient une alimentation comprenant de l'ensilage (ensilage de graminées ou de légumineuses coupées au stade voisin de la floraison), du foin et du concentré. Il s'y ajoutait parfois des choux et des betteraves.

Ainsi pendant la période de stabulation la différence essentielle entre le régime alimentaire des deux troupeaux était la présence ou l'absence d'ensilage dans les rations distribuées. A partir de la mi-avril, les vaches laitières vivaient au pâturage et l'herbe de prairie constituait leur seule alimentation.

Les prélèvements.

Du 29 janvier au 5 mai, treize prélèvements de lait ont été effectués. Sur chaque bidon de lait arrivant à la laiterie et provenant des fournisseurs retenus pour l'expérimentation, une mesure de lait était prélevée. Le lait de mélange ainsi obtenu était écrémé. La crème était expédiée le jour même au laboratoire où elle était transformée en beurre dans une baratte de format réduit.

Les méthodes d'analyse.

Les proportions relatives des acides majeurs et des acides mineurs retenus ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques préparés par transestérification à partir de la matière grasse du beurre (Kuzdzal-Savoie et Kuzdzal, 1962). On a utilisé un appareil Aerograph 600 à détecteur à ionisation de flamme. D'une façon générale on a employé du succinate de diéthylène glycol comme phase stationnaire. En outre, pour doser spécifiquement les acides ramifiés iso et antéiso à 15 et 17 atomes de carbone, on a employé du succinate de butanediol (polyester de Craig). Cette phase stationnaire permet une bonne séparation des acides ramifiés et des acides monoènes comptant un atome de carbone de moins (Cf. Kuzdzal-Savoie, 1965a, 1965b).

La méthode de préparation des esters méthyliques utilisée ne permet pas le dosage quantitatif des esters méthyliques des acides à 4 et 6 atomes de carbone, mais ceci ne modifie pas le sens des résultats.

III. — Résultats

Les résultats se rapportant à quatre échantillons provenant du premier troupeau et à cinq échantillons provenant du deuxième troupeau sont présentés dans le tableau I. Les échantillons numérotés 4, 5 et 8 correspondent à la période de stabulation, les échantillons 12 et 13 à la période de pâturage.

Les acides gras majeurs.

Le passage du régime de stabulation au régime de pâturage entraîne, — comme cela a déjà été montré à diverses reprises —,

une diminution des acides saturés à 16 et moins atomes de carbone compensée par une augmentation des acides à 18 atomes de carbone.

Les modifications observées sont cependant beaucoup plus atténuées lorsque les vaches laitières reçoivent de l'ensilage, pendant la période de stabulation (deuxième troupeau). Les échantillons de beurre présentent alors une composition en acides gras, intermédiaire entre la composition d'un beurre d'hiver et celle d'un beurre de printemps caractéristiques (Cf. les échantillons de la série « sans ensilage »).

Les acides gras mineurs.

Acides saturés normaux à nombre impair d'atomes de carbone.

Les variations observées restent faibles. Les proportions respectives des acides saturés à 13, 15 et 17 atomes de carbone diminuent lors du passage du régime de stabulation au régime de pâturage.

Acides ramifiés.

Le passage du régime de stabulation au régime de pâturage entraîne une augmentation sensible de la proportion globale d'acide ramifié à 15 atomes de carbone. Ceci est visible sur les échantillons de beurre correspondant aux deux troupeaux, qu'il y ait eu ou non de l'ensilage dans la ration d'hiver. Les proportions respectives des autres acides ramifiés restent pratiquement constantes.

Acides monoènes mineurs.

Les acides monoènes à 14 et 16 atomes de carbone diminuent sensiblement lors du passage du régime de stabulation au régime de pâturage. Cette diminution est plus prononcée dans le cas du premier troupeau et s'aligne approximativement sur la diminution atteignant les acides saturés correspondant.

Du fait de la diminution de l'acide monoène à 14 atomes de carbone et de l'augmentation simultanée de l'acide ramifié à 15 atomes de carbone, le rapport $\frac{14 : 1}{\text{iso } 15 : 0}$ diminue nettement. La figure 1 illustre cette observation.

Les acides gras à temps de rétention élevé.

Généralement, lorsque le succinate de diéthylène glycol est utilisé comme phase stationnaire, on observe en première approximation deux pics relativement importants situés après l'acide oléique. Le premier est le plus souvent dénommé « 18 : 2 » et le second « 18 : 3 ». Ces pics correspondent, en fait, chacun, à plusieurs acides et lorsque la résolution est améliorée, on observe une mul-

Fig. 1. — Variation du rapport $\frac{14:1}{\text{iso } 15:0}$ dans les échantillons de beurre, selon les conditions du régime alimentaire.

Conditions de l'analyse — Aerograph HyFi-600 C à détecteur à ionisation de flamme. Colonne : 3,048 m (10 pieds) de long et 3,17 mm (1/8^e pouce) de diamètre, chargée à 10 p. 100 de Craig Polyester (succinate de butanediol) sur brique à feu lavée (60-80 mesh). Température : 200° C environ. Gaz vecteur : azote ; débit : 25 ml/minute.

tiplication des pics à ce niveau. En fonction des variations du régime alimentaire, les surfaces relatives des plus importants de ces pics varient. La figure 2 illustre cette observation. On voit ainsi que l'introduction d'herbe dans la ration des vaches laitières accroît la surface d'un pic qui précède le pic de l'acide linoléique et la surface d'un autre pic qui se situe aussitôt après le pic de l'acide linoléique. Ces modifications apparaissent dans le tableau I (Cf. 18 : 2 et 18 : 3). Parmi les autres pics à temps de rétention élevé, signalons un pic mineur situé hors du cadre de la figure 2 et dont le temps de rétention correspond à l'acide monoène à 20 atomes de carbone.

Fig. 2. — Variations des surfaces relatives des pics correspondant aux acides à temps de rétention élevé.

Conditions de l'analyse — Aerograph HyFi-600 C à détecteur à ionisation de flamme. Colonne : 3,048 m (10 pieds) de long et 3,17 mm (1/8^e pouce) de diamètre, chargée à 10 p. 100 de succinate de diéthylène glycol sur chromosorb W (80-100 mesh) lavé aux acides. Température : 180° C environ. Gaz vecteur : azote ; débit : 25 ml/minute.

IV. — Discussion

Les proportions relatives des acides mineurs.

Il existe peu d'études dans lesquelles les taux respectifs d'un grand nombre d'acides mineurs sont présentés.

En 1962, nous avons rassemblé (Kuzdzal-Savoie, 1962) les données existant à cette époque. Les travaux de Shorland et de ses collaborateurs occupaient une large place et les proportions relatives d'une soixantaine d'acides gras étaient présentées. Trois mois après le dépôt de notre manuscrit, Magidman et al. (1962) et Herb et al. (1962) publièrent une très belle étude¹ gras totaux du beurre et donnèrent les pourcentages

TABLEAU I

ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ESTERS MÉTHyliQUES DES ÉCHANTILLONS DE BEURRE
(Résultats exprimés en p. 100 de la surface du chromatogramme)

Désignation des acides	Sans ensilage				Avec ensilage				
	N ₅ * (25-2-64)	N ₈ * (17-3-64)	N ₁₂ ** (28-4-64)	N ₁₃ ** (5-5-64)	E ₄ * (18-2-64)	E ₅ * (25-2-64)	E ₈ * (17-3-64)	E ₁₂ ** (28-4-64)	E ₁₃ ** (5-5-64)
4 : 0	0,2	0,1	0,4	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2	0,7
6 : 0	0,6	0,7	1,2	1,2	0,9	0,8	0,8	1,1	1,4
7 : 0	tr.	tr.	0,1	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
8 : 0	1,1	1,1	1,3	1,3	1,1	1,1	1,2	1,2	1,3
9 : 0	tr.	tr.	0,1	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
10 : 0	3,9	3,4	3,2	3,0	2,9	2,1	3,0	3,1	3,2
10 : 1 ou 11 : 0	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
11 : 0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr.	tr.
12 : 0	5,3	4,5	4,0	4,0	3,6	3,8	3,8	3,8	3,9
12 : 1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
i 13 : 0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2
13 : 0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1
i 14 : 0	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
14 : 0	14,5	13,5	11,5	12,0	12,5	12,2	12,3	11,2	11,6
14 : 1	1,5	1,3	1,1	1,1	1,1	1,2	1,1	0,9	0,9

i 15 : 0	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,6	0,5
ai 15 : 0	0,6	0,7	0,9	0,9	0,8	0,7	0,7	0,8	0,8
15 : 0	1,8	1,8	1,5	1,7	1,8	1,7	1,7	1,6	1,5
15 : 1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
i 16 : 0	0,3	0,3	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3
16 : 0	37,5	36,4	27,0	26,5	31,5	32,5	32,5	25,4	25,2
16 : 1	2,6	2,6	2,3	2,3	2,1	2,1	2,0	2,0	1,9
i 17 : 0	0,8	0,7	0,9	0,8	0,6	0,7	0,7	0,6	0,7
ai 17 : 0	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,5	0,6	0,5
17 : 0	1,0	1,0	0,9	0,7	0,9	1,1	0,8	0,7	0,7
17 : 1	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6	0,4	0,4	0,3
i 18 : 0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
18 : 0	6,1	7,0	10,3	10,3	9,8	10,5	10,6	13,0	12,6
18 : 1	16,2	19,0	25,1	25,2	23,1	21,3	22,4	26,9	26,9
18 : 2 }	0,2	0,2	2,9	2,7	2,2	0,5	0,5	0,7	0,6
	1,7	1,8				2,4	1,7	2,2	1,7
18 : 3 }	0,5	0,6	1,9	0,8	0,7	0,8	0,6	0,5	0,6
	0,2	0,3				0,5	0,4	0,9	0,9

*: période de stabulation.

**: période de pâturage

tr : traces (moins de 0,1 p. 100).

i : iso.

ai : anteiso.

de 64 acides. Plus récemment Iverson et al. (1965) présentèrent les pourcentages respectifs de 84 acides gras.

Notre étude est beaucoup plus modeste, puisqu'elle donne les pourcentages d'une trentaine seulement d'acides gras. Mais ces pourcentages sont déterminés sur plusieurs échantillons de beurre, assez représentatifs du beurre français, au cours de l'année.

La concordance est assez bonne entre les résultats que nous présentons et ceux obtenus par Magidman et al. (1962) et Iverson et al. (1965). Il semble cependant que les pourcentages des acides mineurs soient, dans nos résultats, d'une façon générale, légèrement plus élevés que les pourcentages trouvés par les auteurs cités. Mais l'ensemble reste très similaire. On retrouve par exemple dans les trois études les pourcentages inversés des acides iso et antéiso à 15 et 17 atomes de carbone.

Le taux d'acide ramifié à 15 atomes de carbone que nous trouvons est identique, pour les échantillons de beurre d'hiver au taux indiqué par Keeney (1962) qui a consacré à cet acide une étude particulière et est très voisin du taux indiqué antérieurement par Hansen et al. (1954) et Shorland et al. (1955).

Interprétation des variations observées en fonction d'une modification du régime alimentaire.

Variation du taux des acides ramifiés à 15 et 17 atomes de carbone.

Le taux de l'acide ramifié à 15 atomes de carbone est identique dans les échantillons provenant des deux troupeaux, pendant la période de stabulation et s'accroît légèrement lors de l'introduction d'herbe fraîche. Le taux de l'acide ramifié à 17 atomes de carbone est tout au long de l'expérimentation plus faible pour le troupeau recevant de l'ensilage.

On peut donc considérer que le fait de distribuer de l'ensilage aux vaches laitières, — aliment qui contient un faible pourcentage d'acides ramifiés (Kuzdzal-Savoie, 1964) —, n'est pas un des facteurs principaux qui déterminent le taux des acides ramifiés dans le beurre. L'origine alimentaire de ces acides ramifiés à 15 et à 17 atomes de carbone est pratiquement exclue.

Par contre l'introduction d'herbe fraîche est un facteur à considérer. Cette introduction d'herbe s'accompagne d'une modification des fermentations au niveau du rumen. Ceci peut entraîner, une modification des proportions relatives des acides volatils résultant des fermentations (Cf. van Adrichem, 1962) et également une modification de la flore digestive. Or l'étude de Keeney et al. (1962) a montré le rôle joué par les lipides des bactéries du rumen dans l'origine des acides ramifiés du beurre, plus particulièrement de l'acide ramifié à 15 atomes de carbone. Cet acide serait synthétisé à partir d'acide isovalérique ou 2-méthyl butyrique, deux acides

volatils mineurs présents parmi les acides formés par fermentation dans le rumen.

Dans une expérience récente au cours de laquelle une quantité importante d'huile de lin avait été incorporée à l'alimentation des vaches laitières (Cf. Kuzdzal-Savoie et al., 1966), on a enregistré une diminution des acides ramifiés alors que les variations atteignant les acides majeurs étaient parallèles à celles que nous avons constatées au cours de la présente étude. Dans l'expérimentation citée, les fermentations au niveau du rumen avaient sans doute, été plus réduites qu'accrues.

Une preuve supplémentaire de l'origine bactérienne de certains acides gras du beurre, pourrait être obtenue par l'étude comparée des lipides d'animaux normaux et d'animaux axéniques. Un exemple d'étude de cette nature peut être tiré du travail poursuivi en 1962 par Hoet et al. L'observation des chromatogrammes présentés par les auteurs permet de penser que précisément, les acides ramifiés à 15 et 17 atomes de carbone seraient absents dans les lipides des fèces des animaux axéniques. Par ailleurs, on sait que l'acide ramifié à 15 atomes de carbone est un constituant normal des lipides des fèces de mouton par exemple (Ward et al., 1964).

Variation des acides à temps de rétention élevé.

Les variations concernant les acides polyinsaturés du beurre en fonction des modifications du régime alimentaire, sont bien connues (Cf. Kuzdzal-Savoie, 1964) et nous n'y reviendrons pas ici. Cependant à quels acides correspondent les deux pics (l'un précédant l'acide linoléique, l'autre suivant l'acide linoléique) dont les surfaces relatives ont été modifiées par suite de l'introduction d'herbe dans la ration des vaches laitières ?

En nous appuyant sur les résultats obtenus au cours d'une autres expérimentation (Kuzdzal-Savoie et al., 1966) il nous paraît probable de pouvoir attribuer à l'acide trans-16-octadécénoïque le premier de ces pics. La présence de cet acide dans le beurre a été démontrée à plusieurs reprises (Backderf et Brown, 1958 ; Hansen et Cooke, 1961).

En nous appuyant sur l'étude chromatographique de Herb et al. (1962) et de Litchfield et al. (1963), et sur les connaissances que l'on peut avoir tant du taux des acides conjugués du beurre (Riel, 1963) que de leur nature (Smith et Jack, 1954), il nous apparaît possible d'attribuer à l'acide diène conjugué cis-trans, le pic qui suit immédiatement le pic de l'acide linoléique. En effet, le taux d'acide saturé à 20 atomes de carbone présent dans le beurre est trop faible [0,21 p. 100 selon Hansen et al. (1959) ; 0,28 p. 100 selon Magidman et al. (1962) ; 0,02 p. 100 selon Iverson et al. (1965)], pour qu'il soit possible d'attribuer à cet acide le pic non identifié, même si les temps de rétention peuvent se trouver confondus.

Résumé

Les variations des pourcentages respectifs d'une vingtaine d'acides gras mineurs du beurre, en fonction des modifications du régime alimentaire des vaches laitières, ont été étudiées.

L'expérimentation a porté sur deux troupeaux de vaches laitières vivant dans la même région de France (Charente). Elle s'est déroulée de février à mai 1964. Pendant la période de stabulation la ration alimentaire de l'un des troupeaux contenait de l'ensilage. A partir de la mi-avril les deux troupeaux vivaient au pâturage et l'herbe de prairie constituait leur seule alimentation. Une dizaine d'échantillons de beurre préparés à partir du lait produit par chacun des deux troupeaux ont été analysés.

Les proportions relatives des acides gras majeurs et mineurs ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse à partir des esters méthyliques totaux.

En ce qui concerne les acides majeurs du beurre, les résultats confirment les modifications observées antérieurement lors du passage du régime de stabulation au régime de pâturage, (augmentation des acides stéarique et monoènes à 18 atomes de carbone, diminution des acides à 16 et 14 atomes de carbone). Ces modifications sont atténuées lorsque les vaches laitières reçoivent de l'ensilage en stabulation.

En ce qui concerne les acides mineurs, on observe une diminution des pourcentages respectifs des acides monoènes à 14 et 16 atomes de carbone, et des acides normaux à 13, 15 et 17 atomes de carbone. Les pourcentages des divers acides ramifiés ne subissent pas de changement à l'exception du pourcentage de l'acide ramifié à 15 atomes de carbone qui s'accroît nettement.

Des modifications atteignent également des acides à temps de rétention élevé autres que les acides linoléique et linoléique.

Summary

The variations of the percentage of about twenty minor fatty acids in butter have been studied in relation to different food rations given to the milk cows.

The experiment has been carried out from February till May, 1964, with two herds of milk cows living in the same region in France (Charente). During the winter feeding, the food ration of one of the herds contained silage. From mid-April the two herds lived on pasture, the grass being the only food. About ten butter samples prepared from the milk produced by the two herds have been analyzed.

The relative proportions of major and minor fatty acids have been determined by means of gas chromatography of the total methyl esters.

As far as the major fatty acids are concerned the results confirm the modifications observed previously when passing from winter feeding to pasture (increase of stearic acid and monoene acids with 18 carbon atoms, decrease of acids with 16 and 14 carbon atoms). The modifications are reduced when the cows receive silage during the winter feeding period.

With regard to the minor fatty acids a decrease of the percentage of monoene acids with 14 and 16 carbon atoms and of normal acids with 13, 15 and 17 carbon atoms has been established. There is no variation of the percentages of the different branched acids except the percentage of the branched acid with 15 carbon atoms which increases noticeably.

The modifications also concern some acids (not linoleic et not linolenic) having a high retention time.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADRICHEM (P. W. M. van), *Thèse*, Institut voor veevoedingsonderzoek, Hoorn, 1962.
- BACKDERF (R. H.), BROWN (J. B.). *Arch. Bioch. Biophys.*, 1958, **76**, 15.
- HANSEN (R. P.), COOKE (N. J.). *Biochem. J.*, 1961, **81**, 233.
- HANSEN (R. P.), SHORLAND (F. B.), COOKE (N. J.). *Biochem. J.*, 1954, **57**, 297.
- HANSEN (R. P.), SHORLAND (F. B.), COOKE (N. J.). *J. Dairy Res.*, 1959, **26**, 190.
- HERB (S. F.), MAGIDMAN (P.), LUDDY (F. R.), RIEMENSCHNEIDER (R. W.), *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1962, **39**, 142.
- HILDITCH (T. P.). Chapman et Hall, Londres, 1947.
- HOET (P. P.), JOOSSENS (J. V.), EVRARD (E.), EYSEN (H.), SOMER (P.), de. Intestinal bacteria and faecal fat. Dans *Biochemical problems of lipids*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1963.
- IVERSON (J. L.), EISNER (J.), FIRESTONE (D.). *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1965, **42**, 1063.
- KEENEY (M.), KATZ (I.), ALLISON (M. J.). *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1962, **39**, 198.
- KUZDZAL-SAVOIE (S.). *Ann. Technol. agric.*, 1962, **11**, 153.
- KUZDZAL-SAVOIE (S.). *Thèse* (série A, n° 4 277-5 128), Faculté des Sciences, Paris, 1964.
- KUZDZAL-SAVOIE (S.). *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 1964, **4**, 287.
- KUZDZAL-SAVOIE (S.). *Le Lait*, 1965a, **45**, 251.
- KUZDZAL-SAVOIE (S.). *Revue française des corps gras*, 1965b, **12**, 461.
- KUZDZAL-SAVOIE (S.), KUZDZAL (W.). XVI^e Cong. Intern. Lait, Copenhague, 1962, **1**, 270.
- KUZDZAL-SAVOIE (S.), RAYMOND (J.), KUZDZAL (W.), PETIT (J.). *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 1966, **6**, 351.
- LITCHFIELD (C.), REISER (R.), ISBELL (A. E.). *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1963, **40**, 302.
- MAGIDMAN (P.), HERB (S.F.), BARFORD (R. A.), RIEMENSCHNEIDER (R. W.), *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1962, **39**, 137.
- RIEL (R. R.). *J. Dairy Sci.*, 1963, **46**, 102.
- SHORLAND (F. B.). *Fette Seifen Anstrich*, 1963, **65**, 302.
- SHORLAND (F. B.), GERSON (I.), HANSEN (R. P.). *Biochem. J.*, 1955, **59**, 350.
- SMITH (L. M.), JACK (E.). *J. Dairy Sci.*, 1954, **37**, 390.
- WARD (P. P. V.), SCOTT (T. W.), DAWSON (R. M. C.). *Biochem. J.*, 1964, **92**, 60.