Problèmes d'extraction et d'analyse de certains composés aromatiques des produits laitiers

II. — METHODES DE DOSAGE

par

J. L. LACRAMPE*, M. DHERBOMEZ*,
F. WEBER**

II. — METHODES DE DOSAGE DES COMPOSES LES PLUS VOLATILS (diacétyle, acétoïne, acétaldéhyde)

A. — Dosages par les méthodes colorimétriques

1) DIACÉTYLE

Depuis que Van Niel et *al.* [62] ont mis en évidence le rôle du diacétyle dans l'arôme des levains de boulangerie, de nombreuses études ont été entreprises sur ce composé [1, 2, 6, 8, 13, 14, 17, 18, 25, 26, 27, 28, 46, 49].

Il s'est avéré très bénéfique pour un certain nombre de produits laitiers et notamment les crèmes, laits fermentés et beurres alors que dans d'autres produits alimentaires (bière et jus de fruits), il est à l'origine de mauvais goûts. C'est donc pour des raisons très différentes que les chercheurs se sont intéressés au dosage de ce corps par différentes techniques colorimétriques ou chromatographiques [3, 4, 9, 16, 34, 38, 47, 48, 50, 51, 52, 57, 58, 59, 64, 65, 69].

a) *Méthodes colorimétriques ou gravimétriques basées sur la transformation en diméthylglyoxime*

— Méthode gravimétrique de Kunze [37]

En présence d'ions Ni^{2+} , la diméthylglyoxime donne quantitativement en milieu faiblement alcalin, un précipité rose insoluble évalué par gravimétrie ou colorimétrie après dissolution dans la

* Université de Poitiers, Laboratoire de Biologie et Biochimie, I.U.T. de La Rochelle, B.M. 536.

** Ecole de Laiterie de Nancy (I.N.P.).

pyridine ou le chloroforme. Cette méthode n'est utilisable que pour des quantités relativement importantes de diacétyle ; pour de faibles quantités les méthodes colorimétriques ou chromatographiques sont préférables.

● Méthodes colorimétriques

Testoni et Cinsa [61] ont les premiers, en 1931, oxydé la nickel-diméthylglyoxime et obtenu un complexe rouge soluble, dans lequel le nickel est tétravalent. Cependant cette technique est longue et délicate.

Prill et Hammer [52] en 1938 utilisèrent la diméthylglyoxime de fer. En présence d'ions Fe^{2+} , la diméthylglyoxime donne une coloration rouge en milieu ammoniacal. Depuis, cette technique a été modifiée à plusieurs reprises.

Owades et Jakovac [47] l'ont appliquée à la bière en 1963 puis Pack et *al.* [48] ont cherché, en 1964, à l'adapter au dosage du diacétyle dans les levains lactiques et les souches pures de *Str. lactis*, *Str. cremoris* et *Str. diacetylactis*. Cette dernière technique dérive directement de celle de Prill et Hammer [52]. Il existe cependant une différence fondamentale entre les deux procédés : celui de Pack et *al.* [48] utilise un courant d'azote et non de vapeur d'eau pour entraîner le diacétyle. La méthode comme nous l'avons vu, dérive d'un dosage du fer par complexation et, dans les conditions de la méthode de Pack et *al.* [48], il se forme une diméthylglyoxime ferreuse ammoniacale. Dans cette méthode, on utilise des quantités à peu près équimoléculaires de chlorhydrate d'hydroxylamine et d'acétate de sodium. L'excès d'hydroxylamine est ensuite fixé par addition d'acétone et converti en acétoxime qui n'interfère pas dans le dosage. Il faut, d'autre part, éviter la précipitation de l'excès de fer en hydroxyde quand on ajoute le sulfate ferreux et l'ammoniaque. Le tartrate double de sodium et de potassium s'est montré très efficace à ce point de vue. Il est nécessaire d'employer une quantité relativement grande de tartrate de façon à éviter la formation d'un tartrate soluble d'hydroxyde ferreux et ferrique qui donne une coloration bleue intense. On ajoute le sulfate ferreux en dernier lieu et en faible quantité pour éviter la formation d'autres complexes.

L'appareillage utilisé permet l'installation d'une batterie de distillateurs. Cette batterie est alimentée par une bouteille d'azote dont le débit est réglé par un système de détente placé à la sortie. Ce dispositif permet de réaliser de six à douze distillations simultanément. Chaque unité de distillation-fixation de diacétyle se compose :

- d'un tube contenant l'échantillon à doser (20 ml de levains par exemple) ;

- d'un tube de récupération contenant 1 ml d'hydroxylamine tamponnée.

Les tubes contenant les échantillons auxquels on ajoute quelques gouttes d'un produit anti-mousse sont placés au bain-marie à 65° C alors que les tubes contenant la solution d'absorption restent à température ambiante. Après réglage du débit gazeux entre 100 et 150 ml/mn, la distillation se poursuit pendant 1 h 30. Cette phase est suivie d'un deuxième traitement thermique de 10 mn à 75° C pour réaliser la transformation de tout le diacétyl en diméthylglyoxime. On ajoute alors 0,5 ml d'acétone-phosphate pour fixer l'excès d'hydroxylamine et on poursuit la réalisation de la réaction colorée en ajoutant 1,5 ml de tartrate alcalin et 0,1 ml de sulfate ferreux. Après agitation, on ramène à 5 ml à l'aide de la solution de phosphate tamponnée.

On procède 15 mn plus tard à la lecture de la D.O. de la solution à 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Plus récemment, en 1972, Cogan [16] puis Walsh et Cogan [65, 66], en 1974, ont cherché à modifier et à améliorer les techniques de Prill et Hammer [52] et d'Owades et Jakovac [47]. Dans son étude en 1972, Cogan utilise l'entraînement à la vapeur qu'il juge plus efficace et plus rapide pour doser le diacétyl. L'appareillage utilisé pour la distillation (Vapodest-100 Büchi) est en effet plus simple que le dispositif d'Owades et Jakovac [47] et de ce fait permet de limiter les fuites au niveau des joints ainsi que les pertes de charge d'un échantillon au suivant. Les modifications ont porté en outre sur le protocole d'analyse et une étude a été faite concernant l'influence de la température et du temps de chauffage lors de la distillation. Le maximum de rendement (86,5 p.100) a été atteint pour 85° C appliqués pendant 90 mn, alors que des traitements à 45° C, 75° C et 85° C pendant 1 h 40 mn ont donné de 68 p.100 à 74 p.100 de diméthylglyoxime. La réaction est complète après 1 h à 75° C. Cependant l'auteur a constaté que la sensibilité est plus élevée à 80° C.

En 1974, Walsh et Cogan [64] ont poursuivi l'étude du dosage du diacétyl par la méthode de Pack et *al.* [48] en modifiant la technique par suppression du phosphate dipotassique et de l'acétate de sodium. Les résultats ont montré que la concentration optimale en hydroxylamine est comprise entre 0,5 M et 0,75 M. Ces deux études prouvent que le pH du milieu fixateur importe peu et que le temps de distillation peut être réduit de 20 mn à 30 mn à 75° C.

b) *Autres méthodes colorimétriques*

● Méthode de Pien et *al.* [50]

Cette technique, qui date de 1937, consiste à faire réagir le diacétyl avec certains dérivés de l'O-diaminobenzène et utilise les teintes jaunes résultant de l'action de la quinoxaline en présence d'acide fort comme gamme de comparaison. La diaminobenzidine donne une teinte jaune plus intense, cependant Pack et *al.* [48] ont montré que le complexe diacétyl-diaminobenzidine a une absorption

notable à 350 nm (longueur d'onde utilisée dans ce cas en spectrophotométrie U.V.).

● Méthode de Voges-Proskauer

Elle constitue la plus ancienne méthode d'identification du diacétyle. Cette réaction a été étudiée par de nombreux chercheurs dont Barritt [4] en 1936. Bien que très sensible, elle n'est pas applicable pour des déterminations quantitatives de diacétyle car la coloration développée n'est pas proportionnelle à la concentration ; de plus, l'acétoïne réagit également. Il est en effet important de distinguer entre acétoïne et diacétyle dans les dosages car, comme l'ont montré Speckman et Collins [59], leur voie de formation est différente. En 1948, King [34] a proposé une modification de la technique pour doser l'ensemble diacétyle-acétoïne dans les levains de boulangerie.

● Méthode de Siest et Landry [57]

Au cours d'études consacrées aux réactions colorées des dérivés carbamidés avec les alpha-dicétones, ces chercheurs ont vérifié qu'une forte concentration en urée permet de déceler de faibles quantités de diacétyle, comme à l'inverse un excès important de réactif dicétonique est nécessaire pour le dosage de faibles quantités d'urée. Les auteurs ont étudié l'influence des réactifs acides oxydants pour définir les conditions optima du dosage des dérivés carbamidés. Les principales améliorations ont été appliquées au dosage du diacétyle :

— réactifs acides : H_3PO_4 et H_2SO_4 ;

— composés oxydants : sels ferriques en milieu phosphorique et acide arsénique en milieu sulfurique jouent un grand rôle vis-à-vis de la cinétique des réactions colorées ;

— adjuvants : la phénazone a été retenue (d'autres chercheurs ont proposé la sémidine ou N-phényl-p-phénylènediamine, pour améliorer le dosage de l'urée par la diméthylglyoxime).

A concentration égale, l'acétoïne donne des colorations dix fois moins intenses que le diacétyle avec le réactif arsénicosulfurique.

Il faut noter qu'en milieu phosphoferrique, l'acétoïne est oxydée complètement en diacétyle et que la méthode permet donc de doser la somme diacétyle + acétoïne. Ces résultats peuvent être évités en supprimant le chlorure ferrique. En effet, en milieu phosphorique et en présence de phénazone comme seule substance intensifiante, l'acétoïne n'interfère pas dans le dosage du diacétyle.

2) ACÉTOÏNE

L'acétoïne et le diacétyle ont longtemps été dosés simultanément grâce à la méthode de Westerfeld [68] ou des variantes de cette méthode [7, 34], appliquées à l'industrie citronnière [45] ou aux produits laitiers [34].

Dans l'industrie laitière, la méthode colorimétrique de dosage du diacétyl est, comme nous l'avons vu, la technique de Prill et Hammer [52] ou une méthode dérivée, alors que l'acétoïne est tout d'abord oxydée en diacétyl à l'aide de chlorure ferrique [33] avant d'être dosée.

Le problème de la séparation et du dosage de l'acétoïne et du diacétyl a été étudié par Walsh et Cogan [64]. Les auteurs ont mis au point deux méthodes d'analyse dans lesquelles l'acétoïne est mesurée par la technique de Westerfeld.

La D.O. est lue à 540 nm, 1 h après addition au distillat de 1 ml de créatine (0,5 p. 100 p/vol.) et de 1 ml d'une solution fraîchement préparée d' α -naphтол à 5 p. 100 dans la soude 2,5 M.

Dans la première méthode, l'acétoïne est dosée dans le résidu subsistant après distillation à la vapeur d'eau ainsi que dans les 10 premiers ml de distillat. Les résultats ont montré que la totalité de l'acétoïne est ainsi dosée.

3) ACÉTALDÉHYDE

L'acétaldéhyde est un composé important que l'on trouve dans certaines cultures lactiques ou produits laitiers. Si de faibles concentrations en acétaldéhyde sont quelquefois souhaitables dans les cultures de levains [40] et les yoghourts, des quantités trop importantes sont au contraire néfastes et provoquent l'apparition de goûts d'amertume [3, 40]. L'acétaldéhyde participe aussi au défaut du « goût de malt » de certaines cultures [63].

On peut mettre l'acétaldéhyde en évidence dans les cultures pour yoghourts grâce à la technique proposée par Schulz et Hingst [56]. La présence d'acétaldéhyde est prouvée par la couleur bleue qui apparaît dans du sérum neutralisé après addition de nitroprussiate de sodium et pipéridine (ou d'hexaméthylènimine).

Harvey [31] a décrit en 1960 une méthode spectrophotométrique pour doser les aldéhydes et les cétones dans les levains. Cette technique utilise la distillation à la vapeur d'eau des cultures puis fait réagir le distillat obtenu avec de la 2,4-dinitrophénylhydrazine. Cette opération est suivie d'une séparation des 2,4-dinitrophénylhydrazones formées. Chaque constituant est ensuite élué et dosé par spectrophotométrie.

Une méthode spectrophotométrique assez sensible de dosage des aldéhydes aliphatiques solubles dans l'eau a été décrite en 1961 par Sawicki et *al.* [55]. Cette méthode est basée sur la réaction des aldéhydes avec la 3-méthyl-2-benzothiazolone hydrazone pour donner un groupement cationique bleu à forte absorption moléculaire en milieu aqueux acide. Cette technique a été ensuite reprise en 1965 par Lindsay et *al.* [41] qui ont utilisé le système de récupération mis au point par Pack et *al.* [48] pour doser l'acétaldéhyde [39]. La lecture des résultats se fait au spectrophotomètre à 666 nm dans les

30 mn qui suivent le début de la réaction. Ce type de technique est intéressant dans la mesure où les résultats sont d'une bonne précision et permettent d'étudier avec le même appareillage deux corps aussi importants que l'acétaldéhyde et le diacétyle par exemple.

B. — Dosages par des méthodes chromatographiques

1) CHROMATOGRAPHIE DE « RELARGAGE » (application à la séparation et au dosage du diacétyle, de l'acétoïne et du 2,3-butylèneglycol).

En 1968, Speckman et Collins [59] ont appliqué avec succès une méthode chromatographique de « relargage » pour séparer des micro-quantités de diacétyle, acétoïne et 2,3-butylèneglycol à la température ambiante. Un ml d'une solution contenant de 25 μ g à 100 μ g de chaque composé devant être séparé est envoyé en haut d'une colonne Dowex 1-X8 (résine échangeuse d'anions). Les composés sont élués et séparés dans une colonne de $27 \times 1,9$ cm à l'aide de sulfate d'ammonium 0,5 M au débit de 0,5 ml/mn ou dans une colonne de $54 \times 3,5$ cm à l'aide de sulfate de sodium 0,5 M au débit de 1,5 ml/mn. Les composés sortent de la colonne quantitativement dans l'ordre des polarités décroissantes : 2,3-butylèneglycol, acétoïne et diacétyle. Le 2,3-butylèneglycol séparé est oxydé en acétoïne avec de l'eau de brome. La méthode de Westerfeld [68] est ensuite utilisée pour compléter les dosages.

Il faut cependant mettre l'accent sur le fait que cette technique est fastidieuse et inapplicable à des analyses de routine sur de nombreux échantillons.

2) CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE ET SPECTROMÉTRIE DE MASSE (diacétyle, acétoïne, acétaldéhyde, acétone, éthanol...).

Dès 1954, Ray [53] utilise cette technique pour séparer et analyser les composés volatils. Dès lors de nombreux chercheurs l'appliquent aux produits laitiers [11, 20, 35, 36]. Coffman et *al.* [15] ont analysé en 1960 les fromages de type « Bleu » par chromatographie en phase gazeuse. En 1965, Bassette et Claydon [5] ont cherché à relier les fractions volatiles à différents types de bactéries productrices d'arôme. La même année Lindsay et *al.* [41] ont publié une étude de l'arôme des levains. Le mélange de composés aromatiques est isolé à partir de distillats aqueux par extraction liquide - liquide à l'aide d'éther éthylique pur. Après élimination de l'excès d'éther, les composants de l'arôme sont séparés par chromatographie en colonne capillaire et programmation de température. L'effluent de la colonne capillaire est analysé par un spectromètre de masse. La technique de Morgan et Day [44] dont nous avons parlé précédemment, permet de doser le diacétyle et l'acétaldéhyde, avec une bonne reproductibilité, dans les solutions aqueuses.

En 1973, Dumont et Adda [21] ont appliqué et adapté cette technique au dosage de la fraction très volatile de l'arôme des

yoghourts. L'analyse est effectuée par chromatographie en phase gazeuse. L'appareillage utilisé se compose essentiellement :

— d'un barboteur en verre dans lequel circule un courant d'azote entraînant les composés aromatiques ;

— d'un piège au niveau duquel ces corps sont fixés.

La solution à doser est placée dans le barboteur, lequel est connecté au piège. L'azote est envoyé dans le barboteur alors que le piège est immergé dans l'azote liquide (la vanne du piège ayant été préalablement fermée).

Après équilibrage des pressions, la vanne du piège est ouverte et le barbotage se poursuit pendant 1 h avec un débit d'azote de 25-30 ml/mn.

Les résultats montrent que les récupérations de l'acétaldéhyde et du diacétyl sont bonnes alors que l'acétone et surtout l'éthanol sont moins bien analysés.

A la suite de cette étude, les mêmes auteurs ont réalisé plusieurs applications combinant chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse [22, 23, 24].

DISCUSSION

Parmi les différentes techniques d'extraction et de dosage que nous venons d'exposer, le choix doit s'opérer en fonction de facteurs différents et quelquefois contradictoires, à savoir : efficacité de la technique et précision des résultats d'une part, rapidité et prix de revient peu élevé d'autre part. La chromatographie en phase gazeuse est une méthode séduisante par plusieurs aspects :

— elle fait appel à un échantillon de taille réduite ;

— le pouvoir de séparation est très bon ;

— le temps d'analyse est court.

Cependant de nombreux paramètres doivent être considérés si l'on veut en tirer pleinement parti, les deux points les plus importants nous paraissant être l'étroitesse des pics et la sélectivité. La colonne joue un grand rôle à ce niveau, et un mauvais remplissage ainsi que des diffusions longitudinales du gaz peuvent grandement influencer sur l'étroitesse des pics obtenus. La température de la colonne doit être parfaitement connue et maintenue constante. L'étude de Buttery et *al.* [12] réalisée en 1967, compare les performances de colonnes de différents types et montre que les colonnes capillaires permettent les meilleures séparations. Quoiqu'il en soit, il est difficile de se baser sur les seuls temps de rétention pour identifier les composants de l'arôme d'un produit donné et dans de nombreux cas, on fait appel à la spectrométrie de masse. Cette technique

est la méthode physique la plus sensible ; elle se combine assez facilement à la chromatographie en phase gazeuse. L'analyse en continu des effluents provenant du chromatographe à l'aide d'un spectromètre de masse élimine les manipulations, donc les pertes et les contaminations ou décompositions.

De nombreux travaux ont été réalisés sur la combinaison analytique chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse depuis les travaux de Gohlke de 1962 [10, 20, 29, 30, 32, 42, 43, 54, 60, 66, 67].

L'association de ces deux techniques est utilisée pour analyser des mélanges complexes correspondant à de très faibles fractions aromatiques et pour les produits laitiers par Dumont et *al.* en particulier [22, 23, 24].

Cependant, il faut signaler que la corrélation du spectre de masse aux pics de chromatogramme est une opération difficile. Il n'en reste pas moins que l'application de cette association de techniques constitue un progrès considérable en analyse de composés aromatiques ; cependant, l'emploi de la spectrométrie de masse reste limité à la recherche en raison du coût très élevé de l'appareillage.

Si l'on ne prétend pas faire une analyse exhaustive des composants de l'arôme d'un produit donné, le problème se présente sous un aspect différent. L'étude de l'arôme peut se limiter dans ce cas à une fraction bien définie et choisie en fonction de son importance dans le produit étudié (diacétyl dans le beurre, acétaldéhyde dans les yaourts, etc.).

Dans ce cas, les impératifs industriels, à savoir : commodité, précision, facilité d'exécution, prix de revient peu élevé, conduiront à adopter une méthode analytique fiable, basée sur un appareillage aussi peu coûteux et aussi simple que possible.

Dans cette optique, les méthodes d'extraction par entraînement à l'azote (sous pression réduite ou normale) et piégeage ainsi que les dosages chromatographiques en phase gazeuse ou spectrophotométriques nous paraissent satisfaisants.

Reçu pour publication en juillet 1975.

Summary

The various processes of extraction and titration of some important components of the flavour of dairy products have been reviewed. The industrial requisites, i.e., convenience, accuracy, easy operation, low cost, lead to using a reliable analytical process carried out with simple cheap equipment.

Bearing this in mind we can say that extraction by nitrogen and fixation, and spectrophotometric or gas phase chromatographic processes have proved satisfactory if one does not aim at making an exhaustive analysis of the components of the flavour of a given produce.

Bibliographie

- [1] ANDERSEN (V. B.) (1959). — *Milchwissenschaft*, 14, 429-432.
- [2] ANDERSEN (V. B.) (1959). — *Maelkeritidende*, 72, 985.
- [3] BADINGS (H. T.) and GALESLOOT (T. E.) (1962). — Proc. 16th. Intern. Dairy Congr., vol. B, 199.
- [4] BARRITT (M. M.) (1936). — *J. Path. Bact.*, 42, 441-453.
- [5] BASSETTE (R.) and CLAYDON (T. J.) (1965). — *J. Dairy Sci.*, 48, 775.
- [6] BOTAZZI (V.) and DELLAGLIO (F.) (1967). — *J. Dairy Res.*, 34, 109.
- [7] BRANDL (E.) (1960). — *Milchwiss. Ber.*, 10, 289.
- [8] BREWER (C. R.), WERKMAN (C. H.), MICHAELIAN (M. B.) and HAMMER (B. W.) (1938). — *Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bull.*, 233, 43.
- [9] BROGIONI (M.) (1956). — *Ann. Falsif. Fraudes, Paris*, 49, 499-501.
- [10] BUTTERY (R. G.), BLACK (D. R.), KEALY (M. P.) and Mc FADDEN (W. H.) (1964). — *Nature*, 202, 701.
- [11] BUTTERY (R. G.), LING (L. G.) and GUADAGNI (D. G.) (1969). — *J. Agr. Food Chem.*, 17 (2), 385-389.
- [12] BUTTERY (R. G.), LUNDIN (R. E.) and LING (L.) (1967). — *J. Agr. Food Chem.*, 15, 58.
- [13] CHRISTENSEN (M. D.) and PEDERSON (C. S.) (1958). — *Appl. Microbiol.*, 6, 319.
- [14] CHUANG (L. F.) and COLLINS (E. B.) (1968). — *J. Bacteriol.*, 95, 2083-2089.
- [15] COFFMAN (J. R.), SMITH (D. E.) and ANDREWS (J. S.) (1960). — *Food Res.*, 25, 663.
- [16] COGAN (T. M.) (1972). — *J. Dairy Sci.*, 55, 382-384.
- [17] COLLINS (E. B.), JENNINGS (W. G.) and ANDERSON (V. B.) (1959-1961). — *Milchwissenschaft*, 14, 429 ; 16, 151.
- [18] COX (G. A.) (1945). — *J. Dairy Res.*, 14, 28-35.
- [19] COX (G. A.) and WILEY (W. J.) (1939). — *J. Council Sci. and Ind. Res. Comm. Australia*, 12, 227.
- [20] DAY (E. A.) and LIBBEY (L. M.) (1964). — *J. Food. Sci.*, 29, 583-589.
- [21] DUMONT (J. P.) et ADDA (J.) (1973). — *Le Lait*, 53, 12-22.
- [22] DUMONT (J. P.), ROGER (S.) et ADDA (J.) (1974). — *Le Lait*, 54, 31-43.
- [23] DUMONT (J. P.), ROGER (S.) et ADDA (J.) (1974). — *Le Lait*, 54, 386-396.
- [24] DUMONT (J. P.), ROGER (S.), CERF (P.) et ADDA (J.) (1974). — *Le Lait*, 54, 243-251.
- [25] EVENHUIS (N.) (1952). — *Neth. Milk Dairy J.*, 6, 137 and 331.
- [26] EVENHUIS (N.) (1954). — *Neth. Milk Dairy J.*, 8, 19-28.
- [27] EVENHUIS (N.), LERK (J.) and BROUWER (H.) (1951). — *Neth. Milk Dairy J.*, 5, 110.
- [28] FEDEROV (M. V.) and KRUGLOVA (L. A.) (1955). — *Dokl. Akad. Nank. U.S.S.R.*, 103, 161-164.
- [29] FLATH (R. A.), BLACK (D. R.), GUADAGNI (D. G.), Mc FADDEN (W. H.) and SCHULTZ (T. H.) (1967). — *J. Agr. Food Chem.*, 15, 29.
- [30] GOHLKE (R. S.) (1962). — *Anal. Chem.*, 34, 1332.
- [31] HARVEY (R. J.) (1960). — *J. Dairy Res.*, 27, 41.
- [32] HEINE (J. T.), MAARSE (H.), TEN NOEVER DE BRAUW (M. C.) and WEURMAN (C.) (1966). — *J. Gas Chromatog.*, 4, 395.
- [33] HOECKER (W. H.) and HAMMER (B. W.) (1941). — *Res. Bull. Iowa St. Agr. Exp. Station.*, 290.

- [34] KING (N.) (1948). — *Dairy Ind.*, 13, 800.
- [35] KOROLCZUK (J.), MAREK (D.) and ZBIGNIEW (M.) (1974). — *J. Chromatogr.*, 88 (1), 177-182.
- [36] KRAMER (P. J. G.) and VAN DUIN (H.) (1954). — *Rec. trav. chim.*, 73, 63.
- [37] KUNZE (R.) (1936). — *Mikrochem. Molish Frestschvift.*, 279-289.
- [38] LEES (G. Y.) and JAGO (G. R.) (1970). — *J. Dairy Res.*, 37, 129.
- [39] LINDSAY (R. C.) and DAY (E. A.) (1965). — *J. Dairy Sci.*, 48, 665-669.
- [40] LINDSAY (R. C.) and DAY (E. A.) and SANDINE (W. E.) (1965). — *J. Dairy Sci.*, 48, 863-869.
- [41] LINDSAY (R. C.), DAY (E. A.) and SANDINE (W. E.) (1965). — *J. Dairy Sci.*, 48, 1566-1574.
- [42] LIPSKY (S. R.), HORVATH (C. G.) and Mc MURRAY (W. J.) (1966). — *Anal. Chem.*, 38, 1585.
- [43] Mc FADDEN (W. H.), TERANISHI (R.), BLACK (D. R.) and DAY (J. C.) (1963). — *J. Food. Sci.*, 28, 316.
- [44] MORGAN (M. E.) and DAY (E. A.) (1965). — *J. Dairy Sci.*, 48, 1382-1384.
- [45] MURDOCK (D. I.) (1967). — *Food. Techn.*, 21, 643.
- [46] NOVIKOVA (G. A.), PETROVA (E. A.), USHAKOVA (V. I.) and FOFILOVA (E. P.) (1959). — *Trudy Inst. Mikrobiol. Akad. Nank, U.S.S.R.*, 87.
- [47] OWADES (J. L.) and JAKOVAC (J. A.) (1963). — *Proc. Amer. Soc. Brew. Chemists.*, 22-25.
- [48] PACK (M. Y.), SANDINE (W. E.), ELLIKER (P. R.), DAY (E. A.) and LINDSAY (R. C.) (1964). — *J. Dairy Sci.*, 47, 981-986.
- [49] PACK (M. Y.), VEDAMUTHU (E. R.), SANDINE (W. E.), ELLIKER (P. R.) and LEESMENT (H.) (1968). — *J. Dairy Sci.* 51, 339-344.
- [50] PIEN (J.), BAISSÉ (J.) et MARTIN (R.) (1937). — *Le Lait*, 17, 675-698.
- [51] PIJANOWSKI (E.), SZNYTER (M.) et WOJCIOWICZOWA (M. B.) (1970). — *Przegl. Mlecz.*, 19 (1), 14-19.
- [52] PRILL (E. A.) and HAMMER (B. W.) (1938). — *Iowa State College. J. Sci.*, 12, 385.
- [53] RAY (N. H.) (1954). — *J. Appl. Chem.*, 4, 21.
- [54] RYHAGE (R.) (1964). — *Anal. Chem.*, 36, 759.
- [55] SAWICKI (E.), HAUSER (T. R.), STANLEY (T. W.) and ELBERT (W.) (1961). — *Anal. Chem.*, 33, 93.
- [56] SCHULZ (M. E.) and HINGST (G.) (1954). — *Milchwissenschaft*, 9, 330.
- [57] SIEST (G.) et LANDRY (Y.) (1968). — *Bull. Soc. Pharma. Nancy*, 79, 22-30.
- [58] SMITH (G. S.) (1935). — *Analyst.*, 60, 171-172.
- [59] SPECKMAN (R. A.) and COLLINS (E. B.) (1968). — *Anal. Biochem.*, 22, 154-160.
- [60] TERANISHI (R.), CORSE (J. W.), Mc FADDEN (W. H.), BLACK (D. R.) and MORGAN Jr. (A. I.) (1963). — *J. Food Sci.*
- [61] TESTONI (G.) et CINSÀ (W.) (1931). — *Ann. Chim. Applicata.*, 21, 147-150.
- [62] VAN NIEL (C. B.), KLUYVER (A. J.) und DERX (H. G.) (1929). — *Biochem. Z.*, 210, 234-251.
- [63] VIRTANEN (A. I.) and NIKKILA (O. E.) (1947). — *J. Dairy Res.*, 15, 89.
- [64] WALSH (B.) and COGAN (T. M.) (1974). — *J. Dairy Res.*, 41 (1), 25-30.
- [65] WALSH (B.) and COGAN (T. M.) (1974). — *J. Dairy Res.*, 41 (1), 31-35.
- [66] WATSON (J. T.) and BIEMANN (K.) (1964). — *Anal. Chem.*, 36, 1135.
- [67] WATSON (J. T.) and BIEMAN (K.) (1965). — *Anal. Chem.*, 37, 844.
- [68] WESTERFELD (W. W.) (1945). — *J. Biol. Chem.*, 161, 495-502.
- [69] ZALACHKO (M.) et MAKARINA (N.) (1963). — *La Technique Laitière*, 405, 12-13.