

## Une méthode de dosage en ligne du diacétyle et de l'acétaldéhyde dans les yaourts, laits fermentés, beurres et margarines

Gilles Stien, Fabrice Blanchard, Emmanuel Rondags, Ivan Marc\*

Laboratoire des sciences du génie chimique, CNRS, UPR 6811,  
13, rue du Bois de la Champelle, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

(Reçu le 5 mars 1998 ; accepté le 22 juin 1999)

**Abstract** — An on-line method for the measurement of diacetyl and acetaldehyde in yoghurt, fermented milk, butter and margarine. A new method for the measurement of diacetyl and acetaldehyde in fats, fermented dairy products and batch-cultures of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* is proposed. A gas membrane sensor connected to a gas chromatograph is used for direct analysis. At 35 °C, the lowest limits of detection are 0.005 mg·L<sup>-1</sup> for diacetyl and 0.01 mg·L<sup>-1</sup> for acetaldehyde. At this temperature, linearity is observed from 0.005 to 50 mg·L<sup>-1</sup> for diacetyl and from 0.01 to 80 mg·L<sup>-1</sup> for acetaldehyde. As variations in response were noted when this method was applied to commercial samples containing fats, it is recommended to perform calibration in the tested product or in the fermentation media. In this study, the gas membrane sensor was shown to be a valuable tool for diacetyl and acetaldehyde determination in commercial products and for on-line measurement of various volatile compounds during lactic acid bacteria cultures. © Inra/Elsevier, Paris.

**diacetyl / acetaldehyde / margarine / fermented dairy product / measurement**

**Résumé** — Une nouvelle méthode de dosage du diacétyle et de l'acétaldéhyde contenus dans des produits laitiers fermentés, des matières grasses ou formés au cours de cultures de l'espèce *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* est décrite. Un échantillonneur à membrane couplé à un système chromatographique en phase gazeuse est utilisé pour le dosage. À 35 °C, les limites inférieures de détection de la méthode sont de 0,005 mg·L<sup>-1</sup> pour le diacétyle et de 0,01 mg·L<sup>-1</sup> pour l'acétaldéhyde. Dans ces conditions la linéarité est vérifiée entre 0,005 et 50 mg·L<sup>-1</sup> pour le diacétyle et entre 0,01 et 80 mg·L<sup>-1</sup> pour l'acétaldéhyde. Des variations ont été observées au niveau de la réponse de l'échantillonneur lors d'essais réalisés avec de la matière grasse. Aussi, il est recommandé de réaliser directement la calibration sur les échantillons de produits testés et les milieux de culture. L'étude a montré que l'utilisation d'un échantillonneur à membrane est bien adaptée à la mesure du diacétyle et de l'acétaldéhyde contenus dans certains produits commerciaux et au suivi en ligne de la formation de molécules volatiles au cours de fermentations lactiques. © Inra/Elsevier, Paris.

**diacétyle / acétaldéhyde / margarine / produit laitier fermenté / mesure**

\* Correspondance et tirés à part. imarc@ensic.u-nancy.fr

## 1. INTRODUCTION

Le diacétyle (2,3-butanedione) et l'acétaldéhyde (éthanal) sont deux composés qui participent à l'arôme de très nombreux produits laitiers. La présence de ces composés carbonylés dans le beurre, les laits et les crèmes fermentés, dans certains fromages et, pour le diacétyle, dans les margarines est désirable et même indispensable à la saveur caractéristique de ces produits [5, 7, 17, 18]. Les concentrations de ces composés peuvent être très variables d'un produit à l'autre. Dans les beurres, les margarines et les crèmes fermentées, le diacétyle joue un rôle déterminant dans l'équilibre aromatique. Les quantités de diacétyle retrouvées sont importantes et se situent entre 1,5 et 5 mg·kg<sup>-1</sup>. Dans les fromages et les yaourts, où l'acétaldéhyde et l'éthanol ont davantage d'importance, les quantités de diacétyle retrouvées sont plus faibles (0,5 à 2 mg·kg<sup>-1</sup>) mais restent indispensables à l'arôme final de ces produits [12, 15, 28, 29].

Hormis le cas des margarines, dans lesquelles du diacétyle produit par voie chimique peut être ajouté, ces molécules volatiles sont issues du métabolisme de bactéries lactiques. Au cours de cette étape de transformation de la matière première laitière, des cultures mixtes de bactéries lactiques sont généralement employées. Une bactérie acidifiante, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ou *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, est alors associée à une bactérie aromatisante, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* ou *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* [9, 17, 18].

Les méthodes analytiques développées jusqu'à présent pour le dosage du diacétyle et de l'acétaldéhyde dans les cultures lactiques et dans certains produits laitiers fermentés sont variées. Les méthodes colorimétriques sont les plus anciennes et les plus nombreuses des méthodes utilisées. Ainsi, la méthode officielle de dosage du diacétyle dans le lait et les produits laitiers fait inter-

venir la conversion du diacétyle en diméthyl glyoxime sous l'action d'hydroxylamine en solution tamponnée. Cette molécule réagit ensuite avec le sulfate ferreux pour donner un composé rose dont l'intensité de coloration est mesurée au spectrophotomètre à 530 nm [4, 21, 32]. De même, l'acétaldéhyde peut être dosé après réaction avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine ou le 3-méthyl-2-benzothiazolone hydrazone [8, 14, 21]. Ces techniques restent très employées, même si parfois leur précision et leur sensibilité sont faibles en raison des nombreuses étapes de préparation des échantillons (chauffage, distillation, entraînement par un gaz, acidification, modification chimique). Les méthodes chromatographiques, plus récentes, ont permis de réaliser des progrès significatifs en permettant notamment de réaliser simultanément le dosage de plusieurs composés et en augmentant la sensibilité de la mesure. La chromatographie en phase gazeuse, associée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) [11, 20, 27] ou à un détecteur à capture d'électron (ECD) [6, 19, 24] est la plus utilisée mais d'autres méthodes faisant appel à la chromatographie liquide haute performance ont également été employées [1, 2]. En effet, les températures de séparation en chromatographie liquide sont moins élevées qu'en chromatographie en phase gazeuse, d'où une moindre transformation d' $\alpha$ -acétolactate éventuellement présent dans l'échantillon en diacétyle, et donc une meilleure sélectivité. Une autre technique basée sur la résonance magnétique nucléaire du <sup>13</sup>C a été décrite [23, 30] mais, son coût prohibitif, les conditions délicates de sa mise en œuvre et sa trop faible sensibilité la rendent peu adaptée au suivi cinétique précis de la production de diacétyle de cultures de bactéries aromatisantes ou au dosage de produits de consommation.

L'analyse directe de milieux de culture, de produits laitiers ou de matières grasses au moyen de ces différentes méthodes est irréalisable dans la grande majorité des cas. Une séparation préalable des molécules

volatiles (dont l'acétaldéhyde et le diacétyle) de la fraction non volatile des échantillons étudiés doit donc être réalisée. Différentes techniques, telles la distillation [10, 31, 32] ou des techniques en headspace [11, 19, 20], sont employées à cet effet. Ces techniques de séparation sont efficaces mais présentent néanmoins certains inconvénients qui peuvent perturber les dosages réalisés. Ainsi, la distillation d'échantillons de cultures ou de produits fermentés peut être à l'origine d'une production considérable de diacétyle, formé par oxydation directe de l' $\alpha$ -acétolactate qu'ils contiennent [10, 31]. De plus, la période d'incubation de l'échantillon peut être à l'origine de la modification du contenu de l'échantillon par réaction chimique et biochimique [20].

Pour éviter ces perturbations, certains auteurs ont choisi de procéder à un échantillonnage des molécules volatiles directement au niveau des cultures en réalisant un suivi en ligne des cinétiques de production de différents composés au moyen d'un capteur à membrane. Différentes géométries de capteur et différents types de membrane ont été utilisés [16]. Associées à la chromatographie en phase gazeuse ces méthodes d'échantillonnage de molécules à l'état de vapeur ont ainsi été employées lors de travaux concernant la production de levure, la fermentation acétono-butylque et la fermentation de moût de brasserie pour le suivi en ligne de l'évolution de gaz dissous et de

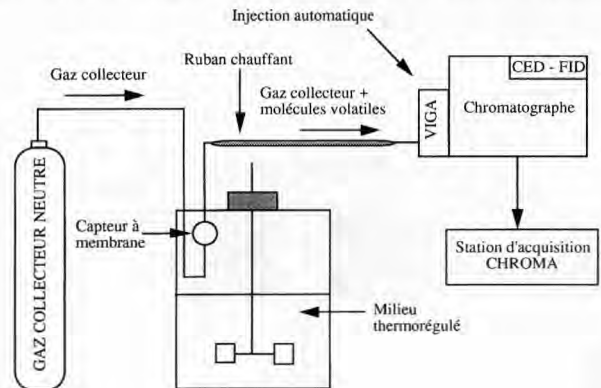
composés volatils. Récemment, nous avons pu tester et utiliser avec succès une méthode de ce type lors de cultures de bactéries lactiques aromatisantes [26]. Cette méthode a été adaptée pour réaliser simultanément le dosage du diacétyle et de l'acétaldéhyde contenu dans différents produits laitiers fermentés et pour permettre le suivi des cinétiques de production de molécules volatiles aromatisantes de cultures lactiques.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

La méthode consiste à placer dans le ciel d'un réacteur ou d'une cuve en verre ou en inox un capteur à membrane plane hydrophobe dont la face externe est en contact avec le milieu gazeux du réacteur, alors que la face interne est balayée en permanence par un gaz collecteur (*figure 1*). Les molécules à l'état de vapeur, de par leurs propriétés diffusionnelles, traversent la membrane et sont véhiculées jusqu'au chromatographe par le gaz collecteur, où elles sont séparées puis détectées. Cette méthode présente de nombreux intérêts : mesure in situ, facilité d'emploi, automatisation, asepsie, sensibilité et bonne répétabilité. Pour pallier le problème de la non spécificité des détecteurs, les composés volatils, avant détection, sont séparés à l'aide d'une colonne chromatographique.

### 2.1. Échantillonneur

Le système d'échantillonnage en continu se compose d'une chambre en acier inox intercalée dans l'une des branches d'un tube en U, dans



**Figure 1.** Dispositif expérimental.  
**Figure 1.** Experimental setup.

lequel circule un gaz collecteur de molécules volatiles. La membrane plane est disposée sur une grille métallique destinée à limiter les contraintes physiques en cas de variations trop importantes de la pression extérieure. L'étanchéité du système est assurée par un joint torique (figure 2). La membrane utilisée est une membrane microporeuse hydrophobe en polytétrafluoroéthylène pur (SM 11807-025N, Sartorius, Palaiseau, France). Son épaisseur est de 65  $\mu\text{m}$  et le diamètre moyen des pores de 0,2  $\mu\text{m}$ . Le côté interne de la membrane est balayé par de l'azote de qualité « U » de l'Air liquide (Paris, France). Le débit de gaz collecteur fixé à 30  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  est contrôlé par un débitmètre massique et une vanne de régulation (Air liquide). Les molécules volatiles « captées » sont entraînées vers le chromatographe dans une tubulure métallique inoxydable chauffée à 60 °C de manière à éviter la condensation de molécules dans la tubulure.

## 2.2. Analyse chromatographique

Le système de séparation et de détection est constitué d'un chromatographe en phase gazeuse Intersmat IGC 121 DFL, (Chelles-les-Coudreaux, France) équipé d'une colonne Chrompack (Les Ulis, France) en acier inoxydable (4 m, 1/8, 2 mm) remplie de Chromosorb W 80/100 mesh (AW-DMCS) à 15 % de PEG 20  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , d'un détecteur à capture d'électron Delsi EC4 (Stang, Les Pavillons-sous-bois, France) et d'un détecteur à ionisation de flamme placés en série à la sortie de la colonne, d'un coffret d'automatisme et d'une vanne d'injection automatique de gaz VIGA calorifugée à 60 °C. Le détecteur à capture d'électrons utilisé pour la détection de très faibles concentrations de diacétyle est logiquement placé en amont du détecteur à ionisation de flamme, d'usage plus général mais moins sensible, qui entraîne la destruction des molécules en sortie de colonne. Les signaux des deux détecteurs sont

reçus par une station d'acquisition et de traitement des données équipée du logiciel Chroma (Biosystèmes, Dijon, France). Le volume de la boucle d'injection, balayée en permanence par le gaz collecteur, est de 2 mL. Lors des analyses, le contenu de la boucle d'injection est orienté vers la colonne par basculement de la vanne d'injection automatique et entraînement par le gaz vecteur du chromatographe. La durée de balayage de la boucle par le gaz vecteur lors d'une injection a été fixée à 15 s. Le gaz vecteur est de l'azote de qualité U (Air liquide) filtré sur cartouche Oxysorb (Interchim, Montluçon, France). Les températures utilisées au cours de la méthode chromatographique sont de 110 °C pour le four, de 160 °C pour le détecteur ECD et de 200 °C pour le détecteur FID. Les débits de gaz sont de 30  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pour le gaz vecteur, de 30  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pour l'hydrogène et de 350  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pour l'air nécessaire à la flamme du FID.

## 2.3. RÉACTEUR

Le réacteur utilisé au cours de toutes nos études est un réacteur de 3 L en verre à double enveloppe Applikon (Schiedam, Pays-Bas) équipé, lors des cultures lactiques, d'une sonde pH Ingold (Paris, France), d'une sonde à oxygène Ingold et d'un module de contrôle ADI 1030.

## 2.4. Cultures et micro-organisme

Deux cultures discontinues de l'espèce *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* ont été réalisées. Le pH du milieu a été régulé par ajout de soude 4  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et l'anaérobiose stricte a été assurée au cours des cultures. L'agitation était de 250  $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$  et le milieu utilisé contenait 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactose, 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'acide citrique monohydraté, 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'extrait de levure, 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

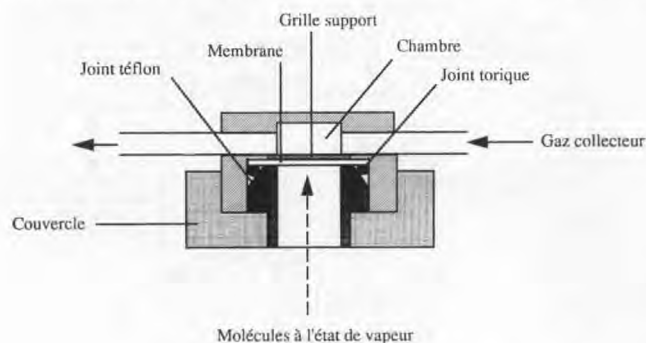


Figure 2. Vue en coupe de la chambre de l'échantillonneur.

Figure 2. Cross-section of the chamber of the sampler.

de peptone de caséine et 0,1 g·L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>. La souche SD933 utilisée est commercialisée par les laboratoires Visby (Tonder, Danemark) sous forme lyophilisée pure dans la gamme Visbyvac série 50.

## 2.5. Milieux de dosage et échantillons de produits commerciaux

Trois beurres (A, B, C), deux beurres allégés (60 %, 41 %), une crème fermentée, un yaourt nature, un lait fermenté au bifidus, une margarine et une margarine allégée ont été analysés. Ces produits proviennent du commerce. Les mesures ont été réalisées 20 j avant la date limite de consommation sauf en ce qui concerne la crème fermentée pour laquelle la mesure a été effectuée 10 j avant la date limite de consommation. D'autres études ont été réalisées sur des beurres récupérés en sortie de ligne de production et soumis à différents modes de conservation. Pour la mise au point de la méthode analytique, nous avons également utilisé le milieu de culture décrit précédemment et deux types de lait reconstitués à partir de lait écrémé en poudre à raison de 70 g·L<sup>-1</sup> et de 150 g·L<sup>-1</sup> de matière sèche.

## 2.6. Produits chimiques

L'acétaldéhyde et le diacétyle utilisés pour les études préliminaires et la calibration de la méthode analytique proviennent de chez Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France). Le lactose, l'acide citrique, la peptone de caséine, l'extrait de levure et le sulfate de magnésium utilisés pour la préparation de milieu de culture ont été obtenus chez Merck (Nogent-sur-Marne, France). L'eau utilisée provient d'un système MilliQ (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

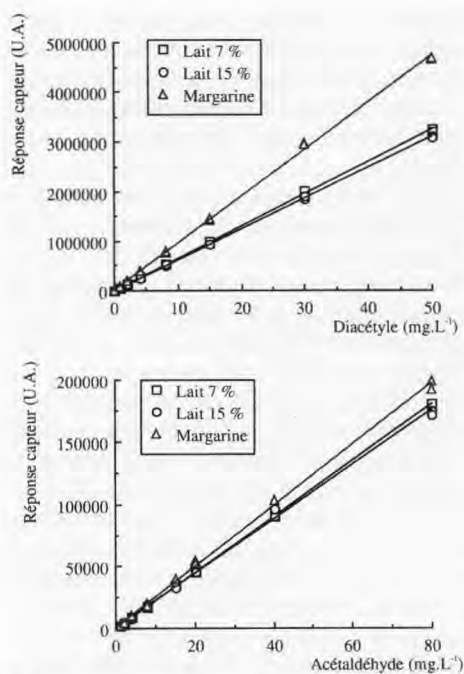
# 3. RÉSULTATS

## 3.1. Études préliminaires – linéarité

L'utilisation d'un échantillonneur à membrane pour le dosage simultané du diacétyle et de l'acétaldéhyde contenu dans une culture lactique ou dans un produit laitier ou non destiné à la consommation semble très prometteuse à première vue. Cependant, cette technique nécessite de bien maîtriser et

de bien contrôler un certain nombre de paramètres susceptibles d'influencer le comportement du capteur et de perturber la mesure effectuée. Ces paramètres influents sont de deux types : les paramètres techniques liés au capteur (nature du gaz collecteur, débit, géométrie et nature chimique de la membrane) et les paramètres liés au fonctionnement même du procédé (agitation, température, pression, pH, nature et propriété physique du milieu d'étude). Dans le cadre de cette étude, la valeur de ces différents paramètres a été choisie en fonction de certaines nécessités techniques (espace disponible dans le ciel du réacteur ou de la cuve d'analyse, température suffisante pour obtenir la fonte et une bonne homogénéisation de la matière grasse). Une fois fixés, ces paramètres ont été contrôlés précisément au cours des cultures et des dosages effectués. Seule, l'influence de la composition du milieu de culture ou de l'échantillon analysé sur les mesures effectuées a nécessité des essais préalables.

L'étude réalisée avec deux laits différents, reconstitués à 7 % p/v et à 15 % p/v, et avec un mélange 50/50 eau/margarine a permis de mettre en évidence l'incidence de ce paramètre sur les dosages des deux molécules et d'établir les courbes de calibration pour le diacétyle et l'acétaldéhyde avec ces différents milieux. En effet, il apparaît que la réponse de l'échantillonneur est nettement influencée par la nature physique et la composition chimique de l'échantillon testé. Ainsi, dans des conditions analytiques identiques, avec la même membrane, la réponse obtenue en présence de matière grasse (mélange eau/margarine) est supérieure à celle obtenue avec du lait (*figure 3*). Cela tient au fait qu'à concentration identique en diacétyle, molécule hydrophile, un produit contenant une forte proportion de matière grasse aura une concentration en diacétyle plus importante dans la phase aqueuse qu'un produit à faible teneur en matière grasse. En conséquence, avec le produit à forte teneur en matière grasse, la concentration en diacétyle dans la phase



**Figure 3.** Courbes de calibration obtenues à 35 °C sur différents milieux.

**Figure 3.** Calibration curves obtained at 35 °C in different media.

gazeuse, en équilibre avec la phase aqueuse, est plus importante qu'avec le produit à faible teneur en matière grasse. Ce phénomène, responsable de la meilleure réponse de l'échantillonneur avec des produits à forte teneur en matière grasse, a aussi été observé avec les méthodes de dosage headspace statique du diacétyle, et est à l'origine des meilleurs seuils de perception sensorielle du diacétyle dans les beurres et margarines par rapport aux produits à forte teneur en eau [6, 13].

Les courbes de calibration obtenues à 35 °C (figure 3) montrent que la réponse du capteur est parfaitement linéaire dans les conditions de l'étude de 0 à 50 mg·L<sup>-1</sup> pour le diacétyle et de 0 à 80 mg·L<sup>-1</sup> pour l'acétaldéhyde. Dans d'autres conditions d'études (lait et milieu de culture, température de 25 °C), des résultats similaires ont été obtenus.

À 35 °C, la limite basse de détection de la méthode est excellente, tant pour le diacétyle que l'acétaldéhyde, et l'erreur maximale sur la mesure est largement inférieure à 5 % pour ces deux molécules sur la base de dix mesures réalisées (tableau I). À 25 °C, la limite basse de détection est moins importante (0,2 mg·L<sup>-1</sup> pour l'acétaldéhyde et 0,1 mg·L<sup>-1</sup> pour le diacétyle), mais il est possible de l'améliorer facilement en modifiant le débit de gaz collecteur, en augmentant la taille du capteur (et donc la surface d'échange de la membrane) ou encore, en modifiant le réglage d'intensité électrique du détecteur à capture d'électron.

Enfin, en ce qui concerne la séparation des deux molécules au niveau de la colonne chromatographique, les temps de rétention sont de 110 s pour l'acétaldéhyde et de 200 s pour le diacétyle. Ainsi, en mode automatique et en l'absence de molécules perturbant le dosage, une injection peut être réalisée toutes les 5 min. Une telle fréquence d'échantillonnage et de mesure permet de réaliser avec une grande précision le suivi cinétique des cultures lactiques.

### 3.2. Application au dosage de produits commerciaux

Les premiers essais de dosage ont été réalisés avec un éventail de dix produits commerciaux. Pour des raisons techniques (fonte et homogénéisation de certains échantillons de matière grasse) et pour nous placer dans des conditions de désorption proches de celles retrouvées lors de l'évaluation des produits par un jury de dégustation, nous avons réalisé l'ensemble de nos mesures à la température de 35 °C.

Le dosage a été réalisé dans le réacteur Applikon. L'échantillon de beurre, de margarine, de crème ou de lait fermenté (500 g) est rapidement placé dans la cuve du réacteur. Après ajout de 500 mL d'eau osmosée, le réacteur est hermétiquement clos. L'ensemble, parfaitement agité par rotation de deux turbines Rushton à 250 tr·min<sup>-1</sup> est

**Tableau I.** Étude de répétabilité sur dix mesures à 35 °C.**Table I.** Repeatability study on ten measurements at 35 °C.

Composés	Limite de détection mg·kg <sup>-1</sup>	Moyenne 10 mesures UA	Coefficient de variation %
Diacétyle	0,005	18753488	1,47
Acétaldéhyde	0,01	44884	3,26

amené progressivement à 35 °C. Après une heure de stabilisation, le balayage de l'échantillonneur par le gaz collecteur est mis en route et l'on procède à six mesures successives. L'étalonnage est ensuite effectué par la méthode des ajouts dosés en injectant directement dans le milieu liquide ou fondu des quantités connues de diacétyle et d'acétaldéhyde sous forme de solutions aqueuses concentrées, les quantités ajoutées devant être compatibles avec les zones de linéarité de réponse des capteurs. Après chaque ajout et stabilisation (30 min), six nouvelles mesures sont réalisées. Pour l'ensemble des produits évalués, l'erreur standard sur six analyses est toujours inférieure à 2 % pour le dosage du diacétyle et à 4 % pour l'acétaldéhyde. Le coefficient de corrélation des droites-étalon est alors supérieur ou égal à 0,997. En réalisant la calibration avec un ajout de diacétyle et un

ajout d'acétaldéhyde, la durée totale du dosage est de 3 h.

Les résultats obtenus avec les différents produits (moyenne de trois essais pour chaque produit avec six mesures pour le dosage et pour la calibration) sont présentés dans le *tableau II*. Les teneurs en diacétyle des beurres étudiés sont très différentes. On distingue des beurres pauvres en diacétyle (A et B) et un produit riche en diacétyle (beurre C). Ces différences peuvent être dues à des variantes du procédé NIZO, dans lequel la production d'arômes est découplée de la maturation physique de la crème [28, 29], ou à une évolution différente des produits au cours de la chaîne du froid. Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par une analyse sensorielle. En ce qui concerne les autres produits, on notera l'importance de la quantité d'acétaldéhyde retrouvée dans

**Tableau II.** Dosage du contenu en composés aromatisants de dix produits commerciaux.**Table II.** Measurement of the flavour content of ten commercial products.

Produits analysés	Diacétyle	Acétaldéhyde
Beurre A (mg·kg <sup>-1</sup> )	0,40	0,08
Beurre B (mg·kg <sup>-1</sup> )	0,27	0,02
Beurre C (mg·kg <sup>-1</sup> )	4,55	0,09
Beurre allégé 60 % (mg·kg <sup>-1</sup> )	3,55	0,08
Beurre allégé 41 % (mg·kg <sup>-1</sup> )	4,95	0,10
Crème fraîche fermentée 60 % (mg·L <sup>-1</sup> )	7,25	2,60
Margarine (mg·kg <sup>-1</sup> )	1,90	0,00
Margarine allégée (mg·kg <sup>-1</sup> )	2,46	0,82
Yaourt nature (mg·kg <sup>-1</sup> )	1,16	42,10
Lait fermenté au bifidus (mg·kg <sup>-1</sup> )	5,08	8,62

le lait fermenté qui a droit à l'appellation yaourt. Cette quantité est conforme à celle recommandée pour obtenir une saveur optimale au niveau de ce type de produit [17]. Au contraire, on notera au niveau de l'autre lait fermenté enrichi au bifidus, l'importance de la concentration de diacétyle. Cette quantité importante de diacétyle a sans aucun doute pour effet d'atténuer la note « yaourt » de ce produit et de lui greffer une note aromatique de type « beurre ».

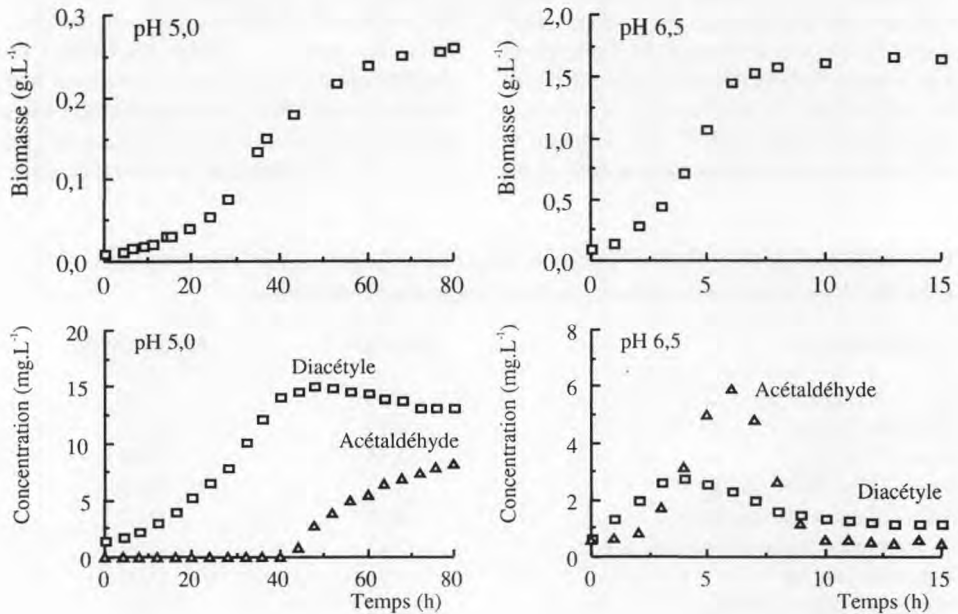
### 3.3. Application au suivi de culture et de procédés de production de produits laitiers fermentés

Le principal intérêt d'une technique analytique en ligne est la détermination de cinétiques d'évolution de la concentration d'un composé donné. Dans le cas du diacétyle et de l'acétaldéhyde, une telle technique peut être mise à profit pour le suivi de procédés de production de produits laitiers fermentés. Ainsi, cette méthode de dosage a été

appliquée à l'obtention de cinétiques de fermentation de bactéries lactiques productrices d'arômes.

Pour ces cultures discontinues de la souche SD933 réalisées en condition anaérobie stricte, nous avons procédé à deux étalonnages. Avant chaque culture, un premier étalonnage a été effectué avec du milieu de croissance non fermenté additionné de quantités connues d'acétaldéhyde et de diacétyle. Par ailleurs, en fin de culture, un étalonnage interne sur le milieu de croissance fermenté contenant des cellules a été réalisé. Les différences observées n'étaient pas significatives mais, de manière à tenir compte de tous les paramètres susceptibles de perturber la mesure, nous avons choisi de ne valider que l'étalonnage interne réalisé en fin de culture.

La *figure 4* montre les cinétiques de croissance et de production de diacétyle et d'acétaldéhyde obtenues lors de deux cultures discontinues à pH régulé de la souche SD933 réalisées en condition anaérobie



**Figure 4.** Cinétiques obtenues lors de deux cultures discontinues à pH régulé de la souche SD933. **Figure 4.** Kinetics obtained during two batch cultures with fixed pH of the SD933 strain.

stricte et à 25 °C. Comme nous pouvons l'observer, le capteur, placé dans le ciel du réacteur, est parfaitement adapté au suivi de la production de diacétyle et surtout d'acétaldéhyde dont la mesure hors ligne est toujours très délicate à réaliser en raison de la forte volatilité de ce composé. Les cinétiques de production et les quantités formées sont très différentes aux deux pH étudiés mais restent conformes, d'une manière générale, aux résultats obtenus par différents auteurs avec d'autres souches de lactocoques [3, 22, 25].

## RÉFÉRENCES

- [1] Bednarski W., Jedrychowski L., Hammond E.G., Nikolov Z.L., A method for the determination of alpha-dicarbonyl compounds, *J. Dairy Sci.* 72 (1989) 2474-2477.
- [2] Cepeda A., Vazquez M.L., Sargi L., Prognon P., Mahuzier G., Bisagni E., Determination of diacetyl in fats by liquid chromatography coupled with sensitized room-temperature phosphorescence, *Sci. Aliment* 10 (1990) 555-563.
- [3] Clementi F., Flavor production in ice cream mix cultured with a citrate fermenting strain of *Lactococcus lactis*, *Milchwissenschaft* 46 (1991) 696-700.
- [4] Cogan T.M., Modification of the Prill and Hammer method for determining diacetyl, *J. Dairy Sci.* 55 (1972) 382-384.
- [5] Collins E.B., Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms, *J. Dairy Sci.* 55 (1972) 1022-1028.
- [6] Coustille J.L., Prévost A., Dosage du diacétyle dans les margarines, *Rev. Fr. Corps Gras* 11-12 (1985) 447-451.
- [7] Dumont J.P., Adda J., Flavour formation in dairy products, in : Land D.G., Nursten H.E. (éd.), *Progress in flavour research*, Applied Science Publishers, Londres, 1979, pp. 245-261.
- [8] Harvey R.J., Production of acetone and acetaldehyde by lactic streptococci, *J. Dairy Res.* 27 (1960) 41-45.
- [9] Heath H.B., Reineccius G., Changes in food flavor due to processing - Flavors formed via fermentation, in : Heath H.B., Reineccius G. (éd.), *Flavor Chemistry and Technology*, Macmillan Publishers, Westport, 1986, pp. 71-111.
- [10] Jönsson H., Pettersson H.E., Studies on the citric acid fermentation in lactic starter cultures with special interest in alpha-aceto-lactic acid. 2. Metabolic studies, *Milchwissenschaft* 32 (1977) 587-594.
- [11] Kaneko T., Watanabe Y., Suzuki H., Enhancement of diacetyl production by a diacetyl-resistant mutant of citrate-positive *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 3022 and by aerobic conditions of growth, *J. Dairy Sci.* 73 (1990) 291-298.
- [12] Keen A.R., Walker N.J., Diacetyl, acetoin, 2,3-butylenglycol, 2-butanone and 2-butanol concentrations in ripening Cheddar cheese, *J. Dairy Res.* 41 (1974) 65-71.
- [13] Kinsella J.E., Butter flavor, *Food Technol.* 5 (1975) 82-98.
- [14] Lindsay R.C., Day E.A., Rapid quantitative method for determination of acetaldehyde in lactic starter cultures, *J. Dairy Sci.* 48 (1965) 665-669.
- [15] Lindsay R.C., Day E.A., Sandine W.E., Green flavor defect in lactic starter cultures, *J. Dairy Sci.* 48 (1965) 863-869.
- [16] Marc I., Couplage de bioréacteurs et d'analyseurs, in : Boudrant, J., Corrieu G., Coulet P. (éd.), *Capteurs et mesures en biotechnologie*, Technique et documentation Lavoisier, Paris, 1994, pp. 243-279.
- [17] Marshall V.M.E., Flavour development in fermented milks, in : Davies F.L., Law B.A. (éd.), *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Elsevier Science Publishers, Londres, 1984, pp. 153-186.
- [18] Marshall V.M.E., Lactic acid bacteria: starters for flavour, *FEMS Microbiol. Rev.* 46 (1987) 327-336.
- [19] Marsili R.T., Monitoring bacterial metabolites in cultured buttermilk by high performance liquid chromatography and headspace gas chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 19 (1981) 451-456.
- [20] Monnet C., Schmitt P., Divies C., Method for assaying compounds by headspace gas chromatography and application to growing starter cultures, *J. Dairy Sci.* 77 (1994) 1809-1815.
- [21] Pack M.Y., Sandine W.E., Elliker P.R., Day E.A., Lindsay R.C., Owades and Jakovac method for diacetyl determination in mixed-strain starters, *J. Dairy Sci.* 47 (1964) 981-986.
- [22] Petit C., Vilchez F., Marczak R., Formation and stabilization of diacetyl and acetoin concentration in fully grown cultures of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Biotechnol. Lett.* 11 (1989) 53-56.
- [23] Ramos A., Jordan K.N., Cogan T.M., Santos H., <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of citrate and glucose cometabolism by *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 1739-1748.
- [24] Scalan R.A., Lindsay R.C., Quantitative determination of diacetyl by electron capture, *J. Food Sci.* 33 (1968) 440-441.
- [25] Schmitt P., Couvreur C., Cavin J.F., Prévost H., Divies C., Citrate utilization by free and immobilized *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* in continuous culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29 (1988) 430-436.

- [26] Stien G., Mise en œuvre de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* en cultures pures et en co-cultures : études cinétiques et suivi en ligne de l'influence de l'acide citrique et du pH sur le comportement métabolique, thèse de docteur INPL, Nancy, 1993.
- [27] Thornhill P.J., Cogan T.M., Use of gas-liquid chromatography to determine the end products of growth of lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984) 1250–1254.
- [28] Van den Berg G., Smale E.J.W.L., Stadhouders J., Veringa H.A., Une méthode alternative de fabrication de beurre acide et aromatique à partir de crème douce, *Tech. Lait* 12 (1977) 5–12.
- [29] Van den Berg G., Smale E.J.W.L., Stadhouders J., Veringa H.A., Une méthode alternative de fabrication de beurre acide et aromatique à partir de crème douce (2), *Tech. Lait* 12 (1977) 13–19.
- [30] Verhulst W.M., Tjan F.S.B., Study of the citrate metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* by means of  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 3371–3377.
- [31] Veringa H.A., Verburg E.H., Stadhouders J., Determination of diacetyl in dairy products containing  $\alpha$ -acetolactic acid, *Neth. Milk Dairy J.* 38 (1984) 251–263.
- [32] Walsh B., Cogan T.M., Further studies on the estimation of diacetyl by the methods of Prill and Hammer and Owades and Jakovac, *J. Dairy Res.* 41 (1974) 31–35.