

ÉTUDE COMPARÉE DES ACIDES GRAS RAMIFIÉS DES ALIMENTS ET DU LAIT CHEZ LA VACHE (1)

par

S. KUZDZAL-SAVOIE

*Station centrale de Recherches laitières
et de Technologie des Produits animaux,
Centre national de Recherches zootechniques
Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)*

Sommaire

L'expérience a porté sur un troupeau expérimental de 7 vaches laitières.

Les acides ramifiés des lipides alimentaires et du lait ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse. On a ensuite calculé les quantités d'acides gras ramifiés ingérés et sécrétés au cours d'une période de 24 heures.

Il n'existe qu'une faible proportion d'acides gras ramifiés dans les lipides des aliments distribués aux vaches laitières (inférieure à 1 p. 100 des acides gras totaux).

Par contre, les acides ramifiés représentent une fraction toujours notable des acides gras du lait, voisine de 2 à 3 p. 100 des acides totaux. Les acides ramifiés à 15 et 17 atomes de carbone sont prépondérants.

Ceci appuie l'hypothèse de l'origine microbienne, d'une partie au moins, des acides gras ramifiés du lait.

I. — Introduction

Les acides gras ramifiés se distinguent des acides à chaîne droite par la présence d'un groupe méthyle fixé sur le pénultième ou l'antépénultième carbone ou par la présence de plusieurs groupes méthyle répartis le long de la chaîne.

Ces acides sont toujours présents dans la matière grasse du lait (Shorland, 1963 ; Magidman et *al.*, 1962 ; Herb et *al.*, 1962). Certains ont été isolés et identifiés : ce sont dans la série *iso*, les acides à 13, 14, 15, 16, 17 et 18 atomes de carbone, et dans la série *anteiso* les acides à 13, 15 et 17 atomes de carbone. Citons encore les acides à 19 et 20 atomes de carbone, multiramifiés (Shorland et Hansen, 1957 ; Sonneveld et *al.*, 1962 ; Hansen, 1964).

(1) *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 1964, IV (3), pp. 287-295.

D'autres ont été seulement signalés. Ainsi, en 1956, James et *al.* indiquent la présence des acides à 9, 10, 11 et 12 atomes de carbone et Ast et Van der Wal (1961) considèrent comme probable l'existence à l'état de traces d'un acide ramifié à 5 atomes de carbone.

Cependant les auteurs de publications récentes sur les acides gras du beurre (Shorland, 1963 ; Herb et *al.*, 1962) ne citent pas d'acides ramifiés dont le nombre d'atomes de carbone soit inférieur à 13. Nous ne les avons d'ailleurs pas décelés nous-mêmes, mais cela peut être dû à une sensibilité insuffisante de la méthode d'analyse utilisée.

Le total des acides ramifiés présents dans le beurre représente selon Herb et *al.* (1962), 1,55 p. 100 du total des acides gras. En fait le pourcentage des acides ramifiés varie d'un échantillon de beurre à l'autre. En général il apparaît que le taux de ces acides est plus élevé si le taux d'acide palmitique est aussi plus élevé (Hawke, 1963).

D'après nos propres résultats, les acides ramifiés constituent le plus souvent 2 ou 3 p. 100 des acides totaux du beurre.

On trouve également des acides ramifiés dans la matière grasse du lait d'autres espèces animales, mais en quantités toujours nettement inférieures aux quantités trouvées dans le cas des ruminants (Kuzdzal-Savoie et Kuzdzal, 1963 ; Shorland, 1963).

L'origine des acides gras ramifiés du lait, n'est pas définitivement établie.

Depuis la découverte de certains acides ramifiés dans les lipides de fourrages tels que le ray-grass (Shorland, 1961), l'origine alimentaire des acides ramifiés du lait a été évoquée (Allison et *al.*, 1962).

Il nous a semblé intéressant de préciser ce point et de comparer l'importance de l'origine alimentaire vis-à-vis des autres origines possibles déjà établies, que nous exposerons ci-après.

II. — Matériel et méthodes

A. — Déroulement de l'expérimentation.

En février et mars 1963, une expérience d'alimentation était poursuivie au Centre national de Recherches zootechniques, sur un groupe de vaches laitières.

La quantité des différents aliments consommés, la quantité de lait produite et le taux butyreux étaient contrôlés.

Il nous a été possible d'utiliser quelques vaches de ce troupeau expérimental en vue de comparer les acides gras consommés et les acides gras sécrétés dans le lait. L'ensemble de l'expérience est rapporté dans une publication récente (Kuzdzal-Savoie, 1964). La présente étude ne concerne que les acides ramifiés.

Au cours d'études antérieurs (Kuzdzal-Savoie et Kuzdzal,

1961), nous avons montré que la variation de composition de la matière grasse du lait provoquée par une modification au niveau du régime alimentaire apparaissait très rapidement (dès la traite suivante) et atteignait 48 heures après la modification du régime, une amplitude voisine de l'amplitude maximale.

Nous avons donc comparé les acides ramifiés des aliments consommés les jours J avec les acides ramifiés du lait produit le soir du jour J + 1 et le matin du jour J + 2.

La même expérience a été effectuée à deux reprises (jours J : 18 février et 28 mars) sur quatre, puis sur trois vaches.

La ration journalière des vaches laitières du troupeau expérimental se composait de quantités variables de betteraves (15 à 20 kg), d'ensilage (15 à 20 kg), de foin (aggloméré, 8 à 15 kg ou normal, 1 à 3 kg) et de concentré à base de céréales (0 à 5 kg).

B. — Déterminations analytiques.

1° *Extraction des lipides et préparation des esters méthyliques.*

a) *A partir des aliments.*

Les lipides ont été extraits des différents aliments, soit directement après broyage (concentré, foin), soit après lyophilisation et broyage (betterave, ensilage).

L'extraction a été poursuivie pendant 16 heures dans un appareil d'extraction continue (B.B.S.) par un mélange d'éther de pétrole et d'alcool éthylique (90 : 10, en vol.), précédemment utilisé par Shorland (1961).

Les extraits éthers provenant des aliments ont été saponifiés. L'insaponifiable a été extrait, les acides gras ont été ensuite libérés par acidification et extraits à l'éther de pétrole. Après évaporation du solvant, les acides gras ont été estérifiés par l'alcool méthylique en présence d'acide sulfurique.

b) *A partir du lait.*

Les échantillons de lait ont été écrémés et la crème a été transformée en beurre. L'analyse porte sur la matière grasse obtenue après fusion et centrifugation du beurre.

A partir de l'huile de beurre les esters méthyliques ont été préparés par *trans*-estérifications en présence d'hydroxyde de potassium.

2° *Dosage des acides ramifiés.*

Le dosage des acides ramifiés a été effectué par chromatographie en phase gazeuse effectuée sur les mélanges d'esters méthyliques. Un tel dosage est rendu possible par l'existence d'une différence entre les temps de rétention de l'acide ramifié et de l'acide à chaîne droite, à même nombre d'atomes de carbone. Ainsi sur colonne de polyester de Craig (succinate de butane-diol), les acides ramifiés précèdent les acides à chaîne droite (Hawke et al., 1959).

Conditions de l'analyse : appareil utilisé : Aérogaph (modèle 110 C-Wilkens, Walnut, Californie). Colonne : longueur 3,048 m, diamètre 0,635 cm, chargée à 15 p. 100 de polyester de Craig sur brique (60-80 mesh). Température 210° C environ. Gaz vecteur : hélium. Débit : 50 ml/mn environ.

Les acides sont désignés par un rapport dans lequel le premier chiffre indique le nombre d'atomes de carbone et le deuxième chiffre le nombre de doubles liaisons. La lettre *i* caractérise les acides ramifiés.

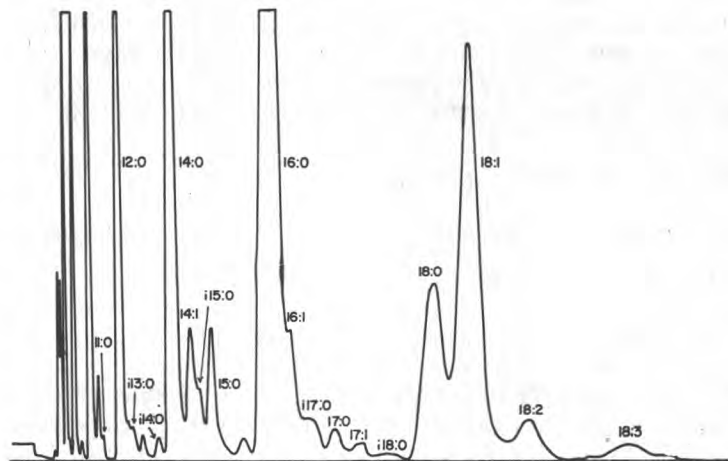


Fig. 1. — Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras du beurre.

Un exemple d'analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras du beurre, est donné sur la figure 1. On distingue nettement les pics correspondant aux acides ramifiés à 14, 15, 16 et 17 atomes de carbone.

La résolution des pics correspondant d'une part à l'acide monoène à chaîne droite à n atomes de carbone et d'autre part à l'acide ramifié à $n + 1$ atome de carbone est imparfaite. Cependant une évaluation approximative de la surface respective des pics correspondant à ces deux types d'acide est possible. Par ailleurs, le pourcentage de l'acide monoène à 15 atomes de carbone est nettement inférieur au pourcentage de l'acide ramifié à 16 atomes de carbone (Herb et al., 1962) ce qui favorise l'identification du pic correspondant à ce dernier acide. Enfin, l'acide monoène à 13 atomes de carbone n'ayant pas été signalé dans le beurre aucun acide ne risque d'interférer avec l'acide ramifié à 14 atomes de carbone.

Nous ne différencions pas, par cette méthode, les divers types d'acides ramifiés (*iso*, *antéiso* ou *multiramifié*).

III. Résultats

Le seul aliment dans lequel nous avons décelé des acides ramifiés en quantité notable est l'ensilage. Une analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras de l'ensilage est présentée sur la figure 2. On distingue les acides ramifiés à 12, 13, 14, 15 et 16 atomes de carbone, identifiés par la valeur du logarithme du temps de rétention à débit constant. Dans l'herbe,

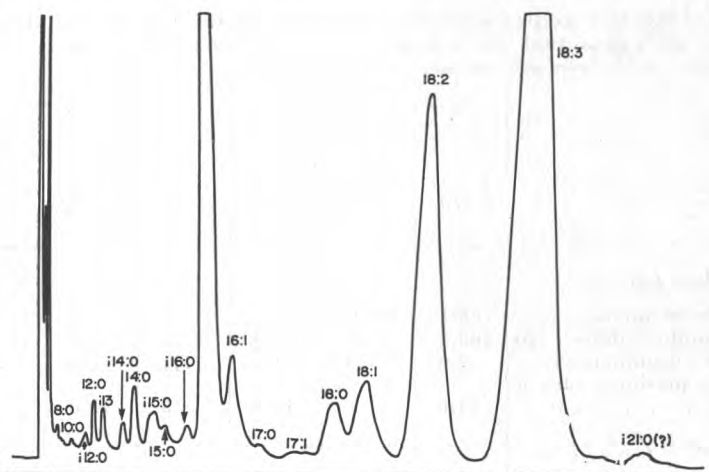


Fig. 2. — Analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides gras de l'ensilage. Conditions de l'analyse : voisines de celles indiquées sous figure 1.

certains de ces acides ramifiés sont présents, mais seulement à l'état de traces (c'est-à-dire à un taux inférieur à 0,1 p. 100).

Le fait que ces acides ramifiés soient relativement abondants (2 p. 100 environ des acides gras totaux) dans l'ensilage illustre les modifications que les fermentations microbiennes peuvent apporter au niveau des acides gras.

La comparaison entre les acides ramifiés des aliments et les acides ramifiés du lait est présentée dans le tableau 1.

Les quantités totales d'acides ramifiés ont été calculées. Ces résultats sont parfois approximatifs mais la présence de sept bilans concordants, donne à l'ensemble une réelle solidité.

Ajoutons également que les quantités d'acides gras ramifiés présentées dans le tableau 1, s'alignent sur les résultats récents publiés par divers auteurs (Herb et *al.*, 1962 ; Hawke, 1963 ; Kaufmann et Mankel, 1963).

L'étude du tableau 1 nous permet de faire plusieurs observations.

Tout d'abord la quantité d'acides gras ramifiés sécrétée dans le lait est nettement supérieure à la quantité ingérée.

Ensuite, on observe une certaine proportionnalité entre les quantités respectives d'acides gras ramifiés et d'acides gras totaux sécrétés dans le lait ; le rapport des deux quantités varie seulement de 2,2 à 3,2 pour les différentes vaches du troupeau expérimental alors que les taux extrêmes d'acides ramifiés varient du simple à plus du double.

TABLEAU 1

ÉTUDE COMPARÉE DES ACIDES GRAS RAMIFIÉS CONSOMMÉS PAR LA VACHE LAITIÈRE
ET DES ACIDES GRAS RAMIFIÉS PRODUITS DANS LE LAIT

	Série 1 (18-2-63)			Série 7 (28-3-63)			
	Vache n° 103	Vache n° 9028	Vache n° 158	Vache n° 103	Vache n° 9028	Vache n° 158	Vache n° 9019
<i>Etude globale (en g)</i>							
Ac. gras totaux consommés	168,1	231,9	279,0	212,0	257,1	175,1	220,5
Ac. gras totaux produits dans le lait	463,3	709,3	517,9	386,3	563,2	495,4	646,0
Ac. gras ramifiés consommés (1) . .	2,0	1,9	1,9	2,1	2,4	2,4	2,7
Ac. gras ramifiés produits dans le lait (1)	14,6	18,1	16,6	8,5	18,0	15,9	17,5
<i>Etude détaillée (en g) (2)</i>							
<i>i</i> 12 : 0							
consommé	0,2	0	0,1	0,2	0	0,2	0,2
produit	0	0	0	0	0	0	0
<i>i</i> 13 : 0							
consommé	0,5	0,5	0,4	0,5	0,6	0,6	0,7
produit	0,9	1,4	1,0	0,6	1,7	1,5	1,9
<i>i</i> 14 : 0							
consommé	0,3	0,3	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4
produit	1,4	2,1	1,6	0,8	1,1	1,5	1,3
<i>i</i> 15 : 0							
consommé	0,4	0,4	0,4	0,5	0,6	0,6	0,7
produit	3,5	4,5	4,2	1,5	3,4	4,0	3,2
<i>i</i> 16 : 0							
consommé	0,5	0,5	0,4	0,5	0,6	0,6	0,7
produit	2,3	2,8	3,1	1,3	1,7	1,5	1,4
<i>i</i> 17 : 0							
consommé	0	0	0	0	0	0	0
produit	5,1	5,7	5,2	3,9	7,3	5,9	7,8
<i>i</i> 18 : 0							
consommé	0,1	0,2	0,4	0	0,2	0	0
produit	1,4	1,6	1,5	0,4	2,8	1,5	1,9

(1) Total approximatif.

(2) *i* signifie acide ramifié. Le premier chiffre du rapport est le nombre d'atomes de carbone ; le deuxième chiffre du rapport indique le nombre de doubles liaisons (ici tous les acides sont saturés).

La vache 103 qui sécrète le moins d'acides ramifiés est aussi celle qui sécrète le moins d'acides gras totaux.

Enfin, une dernière observation découle de l'étude détaillée des différents acides ramifiés (tableau 1) qui ne se comportent pas tous de la même manière.

Ainsi l'acide ramifié en C_{12} n'est pas décelé dans le lait. La différence entre les acides ramifiés ingérés et sécrétés est moins grande pour les acides à 14, 16 et 18 atomes de carbone que pour les acides à 15 et 17 atomes de carbone (ces derniers représentent la fraction principale des acides ramifiés du lait).

Nous n'avons pas décelé par la technique d'analyse utilisée d'acide *iso*- C_{17} dans la ration. Shorland (1961) signale cependant l'existence de cet acide dans le ray-grass à raison de 0,2 p. 100 des acides totaux. Admettant ce chiffre, la quantité ingérée serait cependant loin d'atteindre la quantité sécrétée : 5 à 9 g en 24 heures.

Il apparaît ainsi, sans aucune ambiguïté, que l'origine alimentaire des acides gras ramifiés — si elle existe — ne pourrait expliquer que la présence d'une fraction minime des acides ramifiés trouvés dans le lait.

Cette assurance, qu'il nous semblait nécessaire d'acquérir en premier lieu, nous permet maintenant de discuter des autres origines possibles des acides ramifiés présents dans le lait.

IV. — Discussion

Shorland (1963) a rappelé récemment la suggestion formulée en 1952 par El Shazly, selon laquelle les acides gras volatils ramifiés (*iso*-butyrique, *iso*-valérique ou 2-méthyl butyrique) provenant de la dégradation des acides aminés et trouvés dans le rumen (Annison, 1954), pouvaient conduire, par un mécanisme de biosynthèse, aux acides gras ramifiés à haut poids moléculaire.

Une telle synthèse serait possible *in vitro* (Horning, 1961) mais *in vivo* elle ne semble pas avoir été définitivement démontrée (Verbeke et al., 1959 ; Bhalerao, 1961). Les acides ramifiés présents dans la matière grasse du lait peuvent d'ailleurs avoir une autre origine.

Rappelons que le pourcentage des acides ramifiés dans le lait des ruminants est toujours supérieur au pourcentage de ces mêmes acides dans le lait d'autres espèces animales (Shorland, 1963). Or les lipides du protoplasme des micro-organismes contiennent une quantité importante d'acides ramifiés, *iso*- C_{15} et *iso*- C_{17} en particulier (Saito, 1960 ; Allison et al., 1962 ; Keeney et al., 1962). Keeney et al. estiment qu'environ la moitié de l'acide *iso*- C_{15} du lait de vache peut avoir une origine microbienne. Les acides gras ramifiés provenant des micro-organismes du rumen sont métabolisés et suivent le système circulatoire. Les analyses de

Keeney et al (1962) montrent qu'ils existent au niveau des différents constituants lipidiques du sérum sanguin de bovin (glycérides et acides libres, esters de cholestérol et phospho-lipides).

On peut admettre que les acides ramifiés parviennent à la glande mammaire sous une forme ou une autre et qu'ils y sont libérés et constituent avec les autres acides gras, le « pool » d'acides gras qui existe vraisemblablement à ce niveau pour être ensuite réincorporés dans les glycérides et les phospholipides du lait où leur présence a été démontrée (Luick et Lucas, 1962 ; Patton et Carthy, 1963 ; Badings, 1962 ; Mattsson, 1962 ; Smith et Lowry, 1962).

Cette origine microbienne des acides gras ramifiés du lait de vache est également admise par Garton (1963) et par Kay et Hobson (1963), dans deux études récentes se rapportant à l'origine des acides gras du lait.

Les acides ramifiés pourraient aussi provenir des graisses de réserve. Les acides ramifiés (principalement les acides à 15 et 17 atomes de carbone) ont été étudiés et dosés récemment dans les graisses de réserves des ruminants (Szonyi, 1962 ; Shorland, 1963) et dans celles des non-ruminants où ils existent en moindre quantité (Shorland, 1963). Peut-être les graisses de réserves fournissent-elles dans la période de forte production du lait, une certaine quantité d'acides ramifiés qui pourrait contribuer à maintenir un taux relativement constant d'acides ramifiés dans le lait ?

Summary

Comparative study of branched fatty acids in the lipids of cow's milk and the feed.

Seven milking cows were in the experiment.

Gas-liquid chromatography was used for the determination of the branched fatty acids present in the lipids of both the feed and milk.

The amount of branched fatty acids ingested and secreted during twenty-four hours were then calculated.

The branched fatty acids in the feed lipids is only 1 per cent of the total fatty acids.

On the other hand, the branched fatty acids in milk form approximately two to three per cent of the total fatty acids. The major part of these branched fatty acids have fifteen and seventeen carbon atoms.

This corroborates the hypothesis that they are of microbial origin, at least in part.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- M. J. ALLISON, M. P. BRYANT, I. KATZ, M. KEENEY. Metabolic function of branched-chain volatile fatty acids, growth factors for Ruminococci. II. Biosynthesis of higher branched-chain fatty acids and aldehydes. *J. Bact.*, 1962, **83**, 1084-1093.
- E. F. ANNISON. Some observations on volatile fatty acids in the sheep's rumen. *Biochem. J.*, 1954, **57**, 400-404.
- H. J. AST, R. J. VAN DER WAL. The structural components of milk triglycerides. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1961, **38**, 67-69.
- H. T. BADINGS. Fatty acid composition of cow's milk phospholipids as determined by gas chromatography and thin-layer chromatography. *Neth. Milh Dairy J.*, 1962, **16**, 217-225.
- V. R. BHALERAO, J. ENDRES, F. A. KUMMEROW. Fatty acid composition of lipids extracted from rats fed milk fat, corn oil and lard. *J. Dairy Sci.*, 1961, **44**, 1283-1292.
- K. EL SHAZLY. Degradation of protein in the rumen of the sheep. 2. The action of rumen microorganisms on amino-acids. *Biochem. J.*, 1952, **51**, 647-656.
- G. A. GARTON. The composition and biosynthesis of milk lipids. *J. Lipid Res.*, 1963, **4**, 237-254.
- R. P. HANSEN. 2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecanoic acid, a constituent of butterfat. *Nature (Lond.)*, 1964, **201**, 192.
- J. C. HAWKE. Studies on the properties of New Zealand butterfat. VIII. The fatty acid composition of the milk fat of cows grazing on rye-grass at two stages of maturity and the composition of the rye-grass lipids. *J. Dairy Res.*, 1963, **30**, 67-75.
- J. C. HAWKE, R. P. HANSEN, F. B. SHORLAND. Gas liquid chromatography : retention volumes of the methyl esters of fatty acids with special reference to *n*-odd-numbered, *iso* and (+) *anteiso*acids. *J. Chromat.*, 1959, **2**, 547-551.
- S. F. HERB, P. MAGIDMAN, F. E. LUDDY, R. W. RIEMENSCHNEIDER. Fatty acids of cow's milk. B. Composition by gas-liquid chromatography aided by other methods of fractionation. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1962, **39**, 142-146.
- M. G. HORNING, D. B. MARTIN, A. KARMEN, J. VAGELOS. Fatty acid synthesis in adipose tissue. II. Enzymatic synthesis of branched-chain and odd-numbered fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 669-672.
- A. T. JAMES, G. PEETERS, M. LAURYSSENS. The metabolism of propionic acid. *Biochem. J.*, 1956, **64**, 726-730.
- H. P. KAUFMANN, G. MANKEL. Die Zusammensetzung des Kuhmilchfettes in Abhängigkeit von der Fütterung. *Fette Seifen Austrich.*, 1963, **65**, 295-302.
- R. N. B. KAY, P. N. HOBSON. Reviews of the progress of dairy science. Section A. Physiology. 1. Physiology of the rumen. 2. Rumen microbiology. *J. Dairy Res.*, 1963, **30**, 261-313.
- M. KEENEY, I. KATZ, M. J. ALLISON. On the probable origin of some milk fat acids in rumen microbial lipids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1962, **39**, 198-201.
- S. KUZDZAL-SAVOIE, W. KUZDZAL. Influence de la mise à l'herbe des vaches laitières sur les indices de la matière grasse du beurre et sur les teneurs en différents acides gras polyinsaturés. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 1961, **1**, 47-69.
- S. KUZDZAL-SAVOIE. Influence de la composition de la ration alimentaire sur la composition chimique du beurre de vache. *Thèse*, 1964, Faculté des Sciences, Paris, 20 avril 1964.
- S. KUZDZAL-SAVOIE, W. KUZDZAL. Contribution à l'étude des acides gras du lait de différentes espèces animales. *Le Lait*, 1963, **43**, 369-384.

- J. R. LUICK, J. M. LUCAS. Further studies on milk fat synthesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, **110**, 275-277.
- P. MAGIDMAN, S. F. HERB, R. A. BARFORD, R. W. RIEMENSCHNEIDER. Fatty acids of cow's milk. A. Techniques employed in supplementing gas liquid-chromatography for identification of fatty acids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1962, **39**, 137-142.
- S. MATTSSON. Fatty acids in milk phospholipids. *XVIIth Intern. Dairy Cong.*, 1962, A (II), 537-542.
- S. PATTON, R. D. MCCARTHY. Structure and synthesis of milk fat. IV. Role of the mammary gland with special reference to the cholesterol esters. *J. Dairy Sci.*, 1963, **46**, 396-400.
- K. SAITO. Studies on bacterial fatty acids. Structure of subtilopentadecanoic and subtiloheptadecanoic acids. *J. Biochem. (Japon)*, 1960, **47**, 710-719.
- F. B. SHORLAND. Acetone soluble lipids of grasses and other forage plants. II. General observation on the properties of the lipids with special reference to the yield of fatty acids. *J. Sci. Food Agric.*, 1961, **12**, 39-42.
- F. B. SHORLAND. The fatty acids of the depot and milk fats of Ruminants. *Fette Seifen Anstrich.*, 1963, **65**, 302-306.
- F. B. SHORLAND et R. P. HANSEN. The minor fatty acid constituents of butterfat. A review. *Dairy Sci. Abstr.*, 1957, **19**, 168-189.
- L. M. SMITH et R. R. LOWRY. Fatty acid composition of the phospholipids and other lipids in milk. *J. Dairy Sci.*, 1962, **45**, 581-588.
- W. SONNEVELD, P. HAVERKAMP BEGEMANN, C. J. VAN BEERS, R. KEUNING, J. C. M. SHOET. 3, 7, 11, 15-Tetramethylhexadecanoic acid, a constituent of butterfat. *J. Lipid Res.*, 1962, **3**, 351-353.
- C. SZONYI, J. D. CRASKE, R. S. TAIT et A. POULOS. The determination of mutton tallow in mutton/beef tallow mixtures. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1962, **39**, 185-188.
- R. VERBEKE, M. LAURYSENS, G. PEETERS, A. T. JAMES. Incorporation of DL-(1-¹⁴C). Leucine and L-(¹⁴C) iso-valeric acid into milk constituents by the perfused cow's udder. *Biochem. J.*, 1959, **73**, 24-29.