

**IDENTIFICATION ET DOSAGE
DES ACIDES GRAS LIBRES DU FROMAGE
A L'AIDE DE LA CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE-LIQUIDE**

par

S. SANDEV et M. BALTADJIEVA

*(Institut supérieur de technologie des Industries alimentaires,
Plovdiv, Bulgarie)*

L'arôme et les qualités gustatives du fromage sont dus essentiellement à la présence d'acides gras à chaîne courte dont la teneur dépend des processus de fermentation qui ont lieu au cours de la maturation du fromage (Day et Libbey, 1964).

Dans le présent travail nous décrivons une méthode d'identification et de dosage des acides gras libres du fromage. Cette méthode est appliquée à l'étude des acides gras libres du fromage « Kephlotiri ». Ce fromage à pâte dure est fabriqué avec du lait de brebis. Sa consistance et son goût rappellent ceux du fromage italien « Pecorino ». La composition de la matière grasse de ce dernier fromage a d'ailleurs fait l'objet d'une étude récente (Del Bianco, 1963).

I. — Méthode expérimentale

Les acides gras libres à chaîne courte ont été isolés par chromatographie liquide-liquide sur colonne de silicagel et dosés par titrimétrie.

A. — Appareillage.

L'appareillage utilisé est présenté sur la figure 1. Il est identique à celui décrit par Tchobanov (1961). La colonne, comme le vase de titration, sont isolés de l'air extérieur par une solution alcaline faible ; le réservoir, la colonne, ainsi d'ailleurs que l'ampoule à décantation servant à la préparation du mélange des solvants, sont munis de manchons de circulation d'eau.

B. — Mode opératoire.

a) *Systèmes de solvants utilisés.*

Trois systèmes de solvants ont été utilisés pour effectuer la chromatographie liquide-liquide.

Chaque système de solvants est préparé dans une ampoule à décantation munie d'une enveloppe à circulation d'eau (20° C).

Après agitation énergique et saturation mutuelle des deux couches, le mélange de solvants est laissé au repos jusqu'à nette séparation des phases. Le volume de la phase inférieure (utilisée comme phase stationnaire) peut être évalué à l'aide d'une éprouvette graduée.

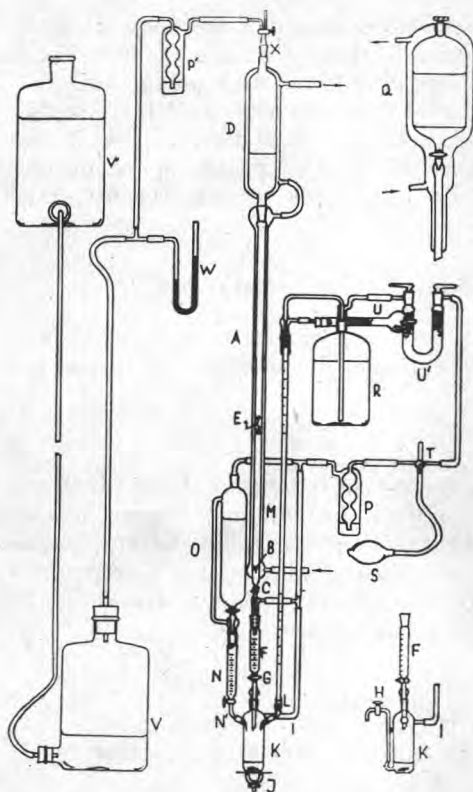
Système 1 : éther de pétrole, acétone, eau : 75/15/10

Système 2 : (utilisé antérieurement par Tchobanov et Popov)
isooctane, acétone, eau : 70/25/5.

Système 3 : isooctane, acétone, eau : 41/52/7.

b) *Remplissage de la colonne.*

Lors de l'utilisation du système 1 — qui convient pour l'identification des acides de C_2 à $C_6 + C_8$ —, on incorpore 8 g de silicagel à 9,8 ml de phase stationnaire.



A. Colonne : 40 cm de long, 1 cm de diamètre intérieur. — B. Coton ou verre fritté. — D. Réservoir contenant la phase mobile. — E. Rondelles ou fibres de cellulose. — F. Collecteur de fractions. — H. Système d'évacuation du liquide titré. — I. Tube assurant la transmission de la pression. — J. Agitateur magnétique. — K. Vase de titration. — L. Microburette. — NN'. Solution d'indicateur coloré. — O. Réserve d'indicateur. — PP'. Régulateur de pression. — Q. Ampoule à décantation munie d'un manchon de circulation d'eau. — R. Réserve de solution de titrage. — S. Poire de caoutchouc créant une pression dans le vase de titration. — T. Robinet à 4 voies. — U. Tubes contenant des fixateurs d'humidité et de CO_2 . — VV'. Système assurant une pression en D. — W. Niveau de mercure. — X. Communication avec l'extérieur.

Fig. 1.

Vue d'ensemble de l'appareillage utilisé.

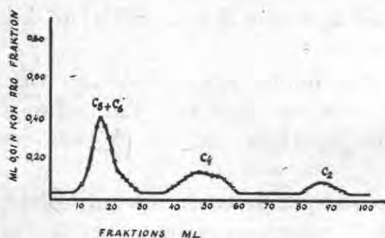


Fig. 2. — Chromatogramme de l'éluat obtenu avec le système solvant 1, à partir des acides libres du fromage « Képhalotiri »

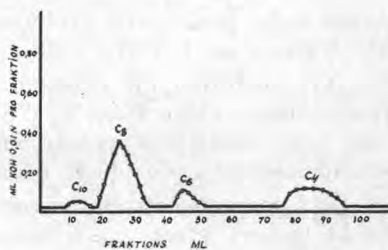


Fig. 3. — Chromatogramme de l'éluat obtenu avec les systèmes solvants 2 et 3, à partir des acides libres du fromage « Képhalotiri »

Lorsqu'on utilise le système 2 (pour l'identification des acides de C_4 à C_{12} par exemple) on incorpore 7 g de silicagel pour 3,5 ml de phase stationnaire, et on ajoute rapidement 0,33 ml d'une solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium au 1/4.

La préparation du gel et le remplissage de la colonne sont effectués selon la méthode décrite par Zbinowsky (1955).

La hauteur de la colonne de silicagel est voisine de 30 cm. Le débit de l'éluat est de 30 à 40 gouttes par minute.

c) *Préparation de l'échantillon de fromage et dépôt sur la colonne.*

Un échantillon homogène de fromage est mêlé à un poids égal de sulfate de sodium. A 1 g du mélange obtenu on ajoute 0,4 ml d'acétone et environ 2 ml de phase mobile. Le tout est mis à la glacière et périodiquement agité. L'ensemble est ensuite versé sur la colonne. Le dépôt de l'échantillon est ainsi effectué de la même façon qu'indiqué ailleurs par Sandev et al. (1963).

d) *Titrage des acides.*

On recueille l'éluat par fractions de 1 ml.

Le titrage est effectué dans un vase isolé de l'air extérieur et sous agitation constante du liquide. Les conditions opératoires sont indiquées sur la figure 1. On utilise une solution N/10 d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol, en présence de phénolphthaléine comme indicateur (0,3 p. 1 000, p/v).

II. — Résultats

On a pu établir que la reproductibilité de la méthode variait entre 1 à 4 p. 100.

Sur les figures 2 et 3 sont portés les résultats obtenus lors de l'analyse des acides gras libres du fromage « Képhalotiri ».

Le système solvant 1 a été utilisé pour l'obtention de la figure 2 ; les systèmes solvants 2 et 3 ont été utilisés pour l'obtention de la

figure 3. Le passage du système 2 au système 3 s'est effectué à la 40^e fraction de 1 ml recueillie.

On constate qu'il existe dans les acides gras libres un taux relativement élevé d'acide à 8 atomes de carbone. Par ailleurs, dans les conditions expérimentales décrites, on ne décèle pas d'acides libres à plus de 10 atomes de carbone.

Ceci pourrait s'expliquer soit par la spécificité de décomposition de la matière grasse au cours de la fermentation, soit par le fait que les acides libres comptant plus de 10 atomes de carbone se trouvent, dans le fromage « Kephaltiri », dans un « état » tel qu'ils ne sont pas élués au cours de la chromatographie.

Résumé

Une méthode d'identification et de dosage des acides gras libres à bas poids moléculaire est décrite. Cette méthode utilise la chromatographie liquide-liquide sur colonne de silicagel. Elle est appliquée à l'étude des acides gras libres du fromage « Kephaltiri ».

Summary

A method for identification and dosage of low molecular free fatty acids has been described. This method is based on liquid-liquid chromatography on silica gel column and has been applied to the study of the free fatty acids of « Kephaltiri » cheese.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DAY (E. A.), LIBBEY (L. M.) 1964. Cheddar cheese flavor : Gas chromatographic and mass spectral analyses of the neutral components of the aroma fraction. *J. Food Sci.*, **29**, 583.
- DEL BIANCO (F. M.), 1963. Studio sulla sostanza grassa del formaggio pecorino. *Riv. ital. sost. grass.*, **40**, 524.
- GORDON (A. H.), MARTIN (A. J. P.), SYNGE (R. L. M.), 1943. *Biochem. J.*, **37**, 79.
- SANDEV (S.), TCHOBANOV (D.), DARDJONOV (T.), 1963. Simplified chromatographic determination of steam-volatile fatty acids in rumen fluid. *Comptes rendus de l'Acad. bulg. des Sci.*, **16**, 1.
- TCHOBANOV (D.), 1961. Liquid-liquid chromatography of dicarboxylic acids in presence of pelargonic acid and « azelaic » glycerids. *Comptes rendus de l'Acad. bulg. des Sci.*, **14**, 155.
- TCHOBANOV (D.) et POPOV (A.). Communication personnelle.
- ZBINOWSKI (V.), 1955. New solvent system for separating monocarboxylic acids (C₂ to C₁₆) and dicarboxylic acids (C₂ to C₁₂). *Anal. Chem.*, **27**, 764.