



iberolab

VII CONGRESO VIRTUAL IBEROAMERICANO
SOBRE GESTIÓN DE CALIDAD
EN LABORATORIOS



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE



VII Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios

COMUNICACIONES

www.iberolab.org
febrero a noviembre 2014

Coordinación:

Ana Isabel Cabañero Ortiz
Feliciano Martínez García
M^a de Guía Gómez Romero

Organización:

- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
- Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya
- Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía
- Instituto Tecnológico Agrario de la Junta de Castilla y León

Edita: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente



Aviso Legal: los contenidos de esta publicación podrán ser utilizados, citando la fuente y la fecha, en su caso, de la última actualización



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACION Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Distribución y venta:

Paseo de la Infanta Isabel, 1
28014 Madrid
Teléfono: 91 347 55 41
Fax: 91 347 57 22

Impresión y encuadernación:

Taller del Centro de Publicaciones del MAGRAMA

NIPO: 280-14-186-4 (Papel)
Depósito Legal: M-30525-2014
NIPO: 280-14-185-9 (línea)
NIPO: 280-14-187-X (CD)
Depósito Legal: M-30524-2014

Tienda virtual: www.magrama.es
centropublicaciones@magrama.es

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

Datos técnicos: Formato: 21x29,7 cm. Caja de texto: 15x23,3 cm. Composición: Una columna. Tipografía: Times New Roman a cuerpo 10.
Encuadernación: Fresado. Papel: Igloo de 90 gramos. Cubierta cartulina gráfica mate de 250 gramos. Tintas: 4.

En esta publicación se ha utilizado papel libre de cloro de acuerdo con los criterios medioambientales de la contratación pública.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN QUESO CON AUTOMATIZACIÓN DE LA ETAPA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

O. Estrada¹, A. Ariño² y T. Juan¹

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España. E-mail: olaiaestrada@yahoo.es

² Facultad de Veterinaria de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, España.

ÁREA TEMÁTICA. REQUISITOS TÉCNICOS

RESUMEN. En la lipólisis que tiene lugar durante la maduración del queso, los triglicéridos, principales lípidos de la leche, son hidrolizados por enzimas lipolíticas (lipasas y esterases), dando lugar a ácidos grasos libres (AGL), mono- y diglicéridos. Los AGL se consideran indicadores de la maduración y su liberación y acumulación tiene gran importancia en el desarrollo del flavor de los quesos.

En este trabajo se presentan los resultados de validación de una metodología para la determinación de ácidos grasos libres en queso por cromatografía gaseosa y detección de ionización en llama. Se estudiaron la especificidad, linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión como criterios de funcionamiento de la metodología tras incorporar al procedimiento descrito por Chávarri et al. (1997) la automatización de la etapa de purificación de los AGL mediante un extractor en fase sólida, permitiendo la simplificación y optimización del tiempo de análisis.

PALABRAS CLAVE. queso, lipólisis, ácidos grasos libres, extracción en fase sólida (SPE), validación.

1.- Introducción

La lipólisis es un importante cambio bioquímico durante la maduración del queso y tiene una gran importancia en el desarrollo del flavor del mismo. Se trata de un proceso muy complejo que difiere de unas variedades de queso a otras (Atasoy y Tuerkoglu, 2008) y que consiste en la degradación de la materia grasa de la leche mediante reacciones de hidrólisis. Los triglicéridos (TG), que representan hasta un 98% del total de los lípidos de la leche (Christie, 1983 Jensen et al., 1991), son hidrolizados por enzimas lipolíticas (lipasas y esterases) durante la maduración del queso, produciéndose una liberación de sus ácidos grasos constituyentes. La acumulación de ácidos grasos libres (AGL) tiene una gran repercusión organoléptica pese a encontrarse en muy baja concentración respecto a la cantidad de grasa total (<0,5%). Clásicamente los AGL se han determinado directamente por cromatografía gaseosa tras la extracción de la fracción lipídica y posterior derivatización por ésteres metílicos. De

Jong y Badings (1990) propusieron una metodología para la determinación de AGL que no precisaba de la derivatización de los analitos y que incorporaba la separación de los AGL y los TG mediante columnas de aminopropilo. Chávarri et al. (1997) en un estudio comparativo de los dos tipos de metodologías demostraron que la derivatización de la mezcla conjunta de los AGL y los TG puede conducir a una sobrestimación de ciertos ácidos grasos, especialmente los ácidos grasos libres de cadena corta. El medio alcalino en el que se realiza la extracción lipídica puede hidrolizar químicamente algunos ácidos grasos constituyentes de los TG, impidiendo diferenciarlos de los AGL que se liberan como consecuencia del fenómeno de lipólisis enzimática del queso. Por este motivo cuando los AGL se encuentran en muy baja proporción respecto a los TG se hace necesaria su separación mediante extracción en fase sólida antes de su determinación cromatográfica. Esta metodología requiere de un mayor número de etapas y resulta más laboriosa cuando se desea analizar un gran número de muestras, por ello la automatización de la etapa de extracción en fase sólida puede permitir reducir el tiempo de análisis.

El objetivo de este trabajo consistió en la validación de la metodología analítica para la determinación de ácidos grasos libres en queso mediante cromatografía gaseosa con detección de ionización en llama tras incorporar, a la metodología descrita por Chávarri et al. (1997), la automatización de la etapa de extracción en fase sólida.

2.-Material y métodos

2.1 Reactivos

Se utilizaron un total de 15 patrones comerciales suministrados por Sigma-Aldrich correspondientes al ácido butírico (C4:0), ácido pentanoico (C5:0), ácido caproico (C6:0), ácido caprílico (C8:0), ácido nonanoico (C9:0), ácido cáprico (C10:0), ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido margárico (C17:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido linoléico (C18:3).

Los reactivos utilizados para la etapa de extracción y purificación de AGL en queso fueron: ácido fórmico (CH_2O_2) (Prolabo), ácido sulfúrico (H_2SO_4) 96% (Merck), cloroformo (Cl_3CH) (Merck), éter dietílico ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$) (Merck), heptano (C_7H_{16}) (Merck), isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) (Merck), metanol (CH_4O) (Merck) y sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) (Panreac), siendo todos los solventes utilizados de calidad cromatográfica.

2.2 Metodología para la determinación de ácidos grasos libres en queso

La extracción de la fracción lipídica del queso, purificación de los AGL y cuantificación se realizaron según el método propuesto por De Jong y Badings (1990), tal y como describen Chávarri et al. (1997) incorporando la automatización de la etapa de la extracción en fase sólida (SPE) como se detalla a continuación.

2.2.1 Extracción de la fracción lipídica

La etapa de extracción de la fracción lipídica consistió en:

- Pesar 1,00 gramo de queso, previamente acondicionado, triturado y homogeneizado.

- Añadir 100 μL de la mezcla de patrones internos (C5:0, C9:0 y C17:0) a 1,0 mg/mL en éter dietílico:heptano (1:1).

- Añadir 3,0 gramos de Na_2SO_4 anhidro y 300 μL de H_2SO_4 2,5 M.

- Agitar en vórtex y añadir 3 mL de éter dietílico:heptano (1:1).

- Centrifugar (4.500 rpm, 4°C, 5 minutos) y recoger el sobrenadante.

- Repetir dos veces más la operación de adición de 3 mL de éter dietílico:heptano (1:1) y centrifugación y juntar todos los sobrenadantes.

2.2.2 Purificación de los AGL

Los ácidos grasos libres se separaron de los triglicéridos mediante un extractor en fase sólida automático Gilson GX-271 utilizando columnas de intercambio aniónico de aminopropilo (Sep-Pack Vac 3 mL (500 mg), Waters). La etapa de purificación consistió en:

- Acondicionar las columnas de intercambio aniónico con 10 mL de heptano.

- Cargar el extracto lipídico de la muestra procedente de las centrifugaciones.

- Eluir los lípidos neutros (triglicéridos principalmente) con 10 mL de cloroformo:isopropanol (2:1) y secar la columna.

- Eluir los AGL con 5 mL de éter dietílico acidificado con ácido fórmico (2%).

- Agitar el extracto purificado, recoger 1 mL en un vial e inyectar en el cromatógrafo de gases.

2.2.3 Condiciones cromatográficas

La determinación y cuantificación de los AGL se realizó

en un equipo de cromatografía gaseosa GC Hewlett-Packard 6890 HP Series equipado con inyector automático y detector de ionización en llama (FID). Se utilizó una columna capilar de polietilenglicol entrecruzado HP-Innowax (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) (Agilent Technologies). La adquisición y el tratamiento de los datos se realizó con el software GC ChemStation de Agilent Technologies.

- Gas portador: Helio (flujo de 2 mL/min)

- Volumen de inyección: 1 μL

- Tª del inyector: 200 °C

- Modo de inyección: "Split" (con partición)

- Relación "Split Ratio": 5:1

- Horno: Se programó una rampa de temperaturas del horno desde 65 °C hasta 240 °C con un gradiente de 10 °C/min, manteniéndose a temperatura máxima durante 20 minutos.

- Tª del detector: 275 °C

2.3 Validación del método analítico para la cuantificación de ácidos grasos libres en queso

Una vez adaptada la metodología de Chávarri et al. (1997) a las condiciones de nuestro laboratorio, y debido a la incorporación de la automatización de la etapa de purificación mediante un extractor en fase sólida (SPE), se procedió a la validación de la metodología analítica modificada, considerando la especificidad, linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud del método.

2.3.1 Especificidad

Se determinó la capacidad del método para diferenciar los AGL en una muestra de queso de otras interferencias presentes en el extracto. Se inyectaron en el cromatógrafo de gases mezclas de todos los patrones de AGL, de extractos de queso y blancos obtenidos bajo las condiciones descritas en la metodología.

2.3.2 Linealidad

Para poder cuantificar el contenido de cada AGL en muestras de queso se realizó la calibración externa del método y se comprobó en qué rango de concentraciones de cada AGL estudiado el método era lineal.

Se prepararon mezclas de todos los AGL, a 8 niveles de concentración diferentes (10, 20, 50, 100, 200, 400, 600 y 800 mg/L).

Un mililitro de cada concentración, junto con 100 μL de la mezcla de patrones internos, fue sometido al proceso de extracción y purificación por extracción en fase sólida (SPE). El extracto obtenido se analizó por cromatografía gaseosa bajo las condiciones descritas anteriormente.

Las ecuaciones de las rectas de calibrado se obtuvieron realizando el análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, representando el cociente entre la señal obtenida para cada AGL y la señal obtenida para el patrón interno que mejor factor de respuesta presentó frente al cociente de la concentración de cada AGL y el patrón interno.

2.3.3 Sensibilidad

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) fueron determinados según lo propuesto por la “International Conference on Harmonisation” (ICH, 1996):

$$LD = 3,3 \left(\frac{S_{R}^{bc}}{b} \right) \quad LQ = 10 \left(\frac{S_{R}^{bc}}{b} \right) \quad (1)$$

donde:

S_{R}^{bc} = desviación estándar de los residuos de la zona de bajas concentraciones de la recta de calibrado del analito estudiado

b = pendiente de cada una de las rectas.

2.3.4 Exactitud

La exactitud del método se determinó como porcentaje del error relativo (ER). A partir de 6 muestras de patrones de concentración conocida de todos los AGL, se interpoló el área relativa obtenida en la recta de calibrado correspondiente a cada AGL y se calculó el error relativo según la fórmula:

$$ER (\%) = \frac{Conc_{calculada} - Conc_{teórica}}{Conc_{teórica}} \cdot 100 \quad (2)$$

2.3.5 Precisión

La precisión del método fue evaluada en términos de precisión de la inyección, repetibilidad y reproducibilidad, expresada como desviación estándar relativa (DSR, %) de las áreas relativas de cada analito estudiado, a partir de una muestra de queso.

Para conocer la precisión de la inyección del sistema cromatográfico, en una sesión de trabajo, se inyectó un mismo extracto de queso 6 veces.

Para el estudio de la repetibilidad a partir de una muestra de queso se realizaron 6 extracciones independientes en la misma sesión de trabajo y la reproducibilidad se estudió preparando 6 extractos a lo largo de sesiones de trabajo diferentes. Los extractos purificados obtenidos se inyectaron en el cromatógrafo de gases el mismo día de su preparación.

En todos los casos, los resultados se obtuvieron calculando la desviación estándar relativa (DSR, %) de las áreas de cada AGL relativas su patrón interno.

3.- Resultados y discusión

3.1 Especificidad

La identificación cromatográfica de cada analito se realizó comparando los tiempos de retención de los patrones de cada AGL estudiado con los obtenidos en las muestras.

Se determinó la capacidad del método para diferenciar los AGL en una muestra de queso de otras interferencias presentes en el extracto.

En la Figura 1 se presenta un cromatograma de una mezcla de todos los patrones de los AGL estudiados y de los patrones internos (ácido pentanoico C5:0, nonanoico C9:0 y margárico C17:0). En la Figura 2 se presenta el cromatograma de un blanco de proceso y en la Figura 3 un cromatograma de un extracto de queso.

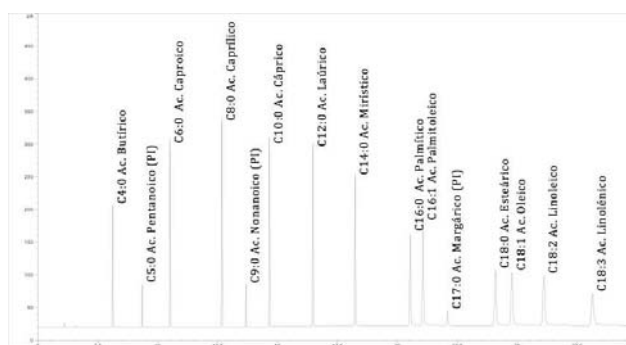


Fig. 1. Cromatograma de una mezcla de patrones de ácidos grasos libres (AGL) y los patrones internos (C5:0, C9:0 y C17:0)

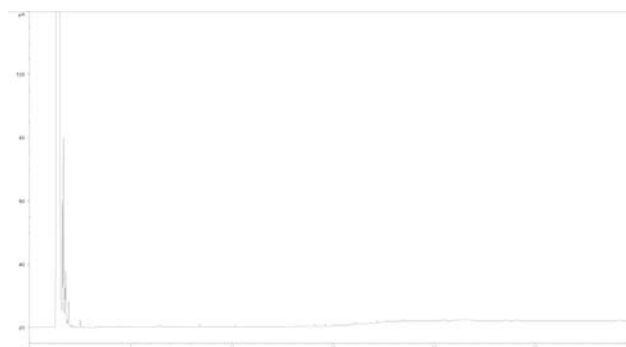


Fig. 2. Cromatograma de un blanco de proceso

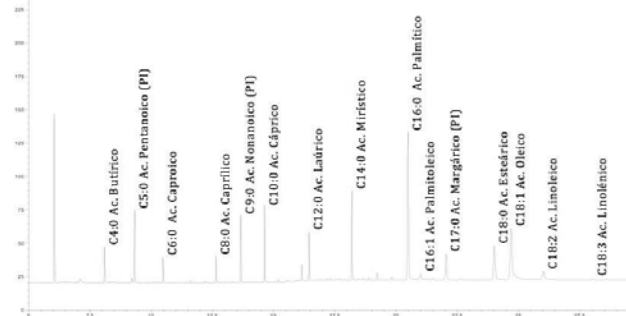


Fig. 3. Cromatograma de un extracto de queso y los patrones internos (C5:0, C9:0 y C17:0)

El método fue específico para la determinación de los AGL estudiados.

No hubo ningún efecto interferente procedente de los blancos, ni de los extractos de muestras de queso en las regiones del cromatograma donde cabe esperar a los AGL estudiados y hubo una clara diferenciación y resolución de cada uno de los doce AGL estudiados.

Todos los cromatogramas obtenidos a partir de extractos de queso presentaron un pico cromatográfico no identificado al tiempo de retención de 6 minutos. Por la literatura científica consultada y la región temprana de cromatograma donde aparece deducimos que se trata de ácido acético (C2:0), que normalmente no se incluye como AGL en los estudios sobre la lipólisis de los quesos, debido a que su presencia en los mismos tiene un origen biosintético totalmente diferente al del resto de los AGL. El C2:0 no es de origen lipolítico sino que se produce como consecuencia de la fermentación de la lactosa por acción bacteriana (glucólisis acética), y del proceso de descarboxilación y deaminación oxidativa de los aminoácidos (Yilmaz et al., 2005; Ferrandini et al., 2012).

3.2 Linealidad y sensibilidad

En la Tabla 1 se muestran las rectas de calibrado, los intervalos de concentración en los que la respuesta fue lineal (rango lineal) y los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) para cada uno de los AGL estudiados. El rango lineal se expresó como el intervalo comprendido entre el límite de cuantificación y la máxima concentración estudiada de cada AGL, considerando un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0,995 como criterio para determinar la linealidad del método.

Tabla 1. Rectas de calibrado, rango lineal y sensibilidad del método analítico para cada ácido graso libre

	S	O.O.	Rango lineal	N	R^2	LD	LQ
			mg/L			mg/L	mg/L
C4:0	7,16	-0,024	37,14-800	8	0,996	12,25	37,14
C6:0	8,95	0,021	48,82-800	8	0,996	16,11	48,82
C8:0	10,24	0,038	48,83-800	8	0,995	16,11	48,83
C10:0	10,99	0,047	37,40-800	8	0,996	12,34	37,4
C12:0	11,33	0,03	38,76-800	8	0,996	12,79	38,76
C14:0	11,42	0,024	41,95-800	8	0,997	13,84	41,95
C16:0	11,22	0,101	50,89-800	8	0,995	16,79	50,89
C16:1	13,76	-0,008	39,76-600	7	0,997	13,12	39,76
C18:0	10,83	0,043	35,55-800	8	0,996	11,73	35,55
C18:1	11,27	-0,102	30,69-600	7	0,996	10,12	30,69
C18:2	10,86	-0,122	26,93-600	7	0,995	8,88	26,93
C18:3	10,17	-0,115	37,33-800	8	0,998	12,32	37,33

S: Pendiente de la recta de calibrado; O.O.: Ordenada en el origen; N: Número de puntos utilizados para realizar la recta de calibrado. LD: Límite de detección; LQ: Límite de cuantificación.

El comportamiento fue satisfactorio para todos los AGL. El método fue lineal en el rango de concentraciones descrito, suficiente para cubrir las concentraciones de AGL de muestras de queso y presentó buena sensibilidad, considerando los LD y LQ.

3.3 Exactitud

Los resultados del estudio de la exactitud (n=6) del método se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Exactitud del método expresada como porcentaje del error relativo

	Conc. teórica (mg/mL)	Conc. calculada (mg/mL)	Error absoluto	Error relativo (%)
C4:0	0,221	0,190	0,031	-14,03
C6:0	0,233	0,185	0,048	-20,74
C8:0	0,202	0,221	-0,019	9,39
C10:0	0,202	0,197	0,005	-2,35
C12:0	0,203	0,204	-0,001	0,64
C14:0	0,205	0,204	0,001	-0,32
C16:0	0,202	0,200	0,002	-1,07
C16:1	0,248	0,306	-0,059	23,70
C18:0	0,202	0,190	0,012	-5,99
C18:1	0,224	0,214	0,01	-4,52
C18:2	0,246	0,224	0,022	-8,77
C18:3	0,204	0,182	0,021	-10,37

La mayoría de los ácidos grasos libres analizados presentaron porcentajes del error relativo inferiores al 10%. Sin embargo, los ácidos butírico y caproico ofrecieron porcentajes superiores, del 14,03 y 20,74% respectivamente. Este hecho podría estar relacionado con la mayor volatilidad de estos compuestos respecto al resto de AGL estudiados. La menor exactitud del ácido palmitoleico (23,70%) podría estar relacionada con la dificultad para la integración de este pico cromatográfico debido a la baja simetría que presenta la señal de este compuesto en los cromatogramas obtenidos a partir de extractos de queso y a la baja concentración en la que estuvo presente.

3.4 Estudio de precisión

3.4.1 Precisión de la inyección

En la Tabla 3 se muestra la desviación estándar relativa obtenida para las áreas relativas a los patrones internos de cada uno de los AGL estudiados inyectando en el cromatógrafo 6 veces consecutivas 1 μ L de un extracto de queso.

Tabla 3. Precisión de la inyección expresada como desviación estándar (DS) y desviación estándar relativa (DSR) de las áreas relativas al patrón interno de cada AGL (n=6)

	Área relativa		
	Media	DS	DSR (%)
C4:0	1,44	0	0,32
C6:0	0,72	0	0,36
C8:0	0,66	0	0,33
C10:0	1,71	0,01	0,59
C12:0	1,15	0	0,42
C14:0	2,88	0,01	0,46
C16:0	7,5	0,07	0,88
C16:1	0,5	0,01	1,5
C18:0	1,8	0,01	0,33
C18:1	6,49	0,04	0,63
C18:2	1,07	0,03	2,87
C18:3	0,24	0,01	2,21

3.4.2 Repetibilidad y reproducibilidad

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos tras realizar el estudio de precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 4. Precisión: repetibilidad y reproducibilidad expresada como media y desviación estándar relativa (DSR%) de las áreas de cada AGL relativas al patrón interno

	Repetibilidad (n=6)		Reproducibilidad (n=6)	
	Media	DSR _r (%)	Media	DSR _R (%)
C4:0	1,16	5,96	1,31	9,69
C6:0	0,7	5,23	0,83	14,77
C8:0	0,64	5,53	0,77	18,32
C10:0	1,7	5,64	1,96	15,9
C12:0	1,14	5,03	1,31	14,72
C14:0	2,88	5,42	3,25	15,33
C16:0	7,46	4,02	8,34	12,93
C16:1	0,54	11,94	0,45	10,06
C18:0	1,8	5,24	1,99	10,16
C18:1	6,55	8,01	7,18	15,22
C18:2	1,08	6,57	1,17	12,43
C18:3	0,24	10,26	0,26	12,27

La repetibilidad del método para los diferentes AGL estudiados osciló entre 4,02% y 11,94%, mientras que la reproducibilidad presentó desviaciones más altas desde 9,69% hasta 18,32%. Estos valores están en consonancia con las desviaciones obtenidas en muestras de queso por Chávarri et al. (1997) que oscilaron desde 2,59%, en el caso de C8:0, hasta 22,4%, en el caso de C18:2.

La automatización de la etapa de extracción en fase sólida (SPE) permitió duplicar el número de muestras analizadas en una misma sesión de trabajo, respecto a la SPE realizada de manera manual, mejorando la eficiencia del método. Además, se eliminó la fuente de errores indeterminados asociados a las habilidades del analista durante la laboriosa etapa de SPE.

3.- Conclusiones

Se ha incorporado la automatización de la etapa de extracción en fase sólida al método analítico propuesto por Chávarri et al. (1997) para la determinación de ácidos grasos libres en queso, permitiendo la simplificación y optimización del tiempo de análisis. La validación de las características de funcionamiento del método fue satisfactoria, permitiendo la determinación de doce ácidos grasos libres en queso con características adecuadas de especificidad, linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido realizado bajo la financiación del Proyecto INIA PET200701-C07 "Mejora de la cabaña ganadera de ovino lechero y tipificación del queso con IGP Queso de Teruel". Los autores quieren agradecer la colaboración de la Asociación Turolense de Productores de Leche y Queso, el Grupo Consolidado de Investigación A01 y el Fondo Social Europeo.

Bibliografía

- Atasoy, A. F., Tuerkoglu, H. (2008). *Changes of composition and free fatty acid contents of Urfa cheeses (a white-brined Turkish cheese) during ripening: Effects of heat treatments and starter cultures.* *Food Chemistry.* 110(3), 598-604.
- Chavarrí, F., Virto, M., Martín, C., Najera, A. I., Santisteban, A., Barron, L. J. R., DeRenobales, M. (1997). *Determination of free fatty acids in cheese: Comparison of two analytical methods.* *Journal of Dairy Research.* 64(3), 445-452.
- Christie, W. W. (1983). *The composition and structure of milk lipids.* *Developments in Dairy Chemistry.* 2(Lipids), 1-36.
- De Jong, C., Badings, H. (1990). *Determination of free fatty-acids in milk and cheese - procedures for extraction, clean up, and capillary gas-chromatographic analysis.* *Journal of High Resolution Chromatography.* 13(2), 94-98.
- Ferrandini, E., Castillo, M., de Renobales, M., Virto, M. D., Garrido, M. D., Rovira, S., López, M. B. (2012). *Influence of lamb rennet paste on the lipolytic and sensory profile of Murcia al Vino cheese.* *Journal of Dairy Science.* 95(6), 2788-2796.
- ICH (1996) *Guidance for Industry Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology.* International Conference on Harmonisation.
- Jensen, R. G., Ferris, A. M., Lammi-Keefe, C. J. (1991). *The composition of milk fat.* *Journal of Dairy Science.* 74(9), 3228-3243.
- Yilmaz, G., Ayar, A., Akin, N. (2005). *The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese.* *Journal of Food Engineering.* 69(3), 269-274.