

UMR408 SQPOV



Analyse de la fraction volatile de truffe (*Tuber melanosporum*)
de 4 terroirs de Provence



Etude réalisé par Christian GINIES Christian.ginies@univ-amu.fr

et Romain BOTT romain.bott@avignon.inra.fr

Avril 2013

Introduction

Le but de ce travail était d'une part de caractériser les composés volatils de la truffe de provenance, d'identifier les composés clés, d'estimer la composition de la fraction volatile. Nous comparons également les différents terroirs de production de Provence sur la base de leur différence vis-à-vis de leur composition.

L'arôme de la truffe a été souvent étudié. Ainsi 10 publications recensant plus de 50 composés volatils sont identifiées dans <http://www.vcf-online>, une base de donnée dédiée aux composés volatils éditée par le TNO (centre technique néerlandais). Des études plus récentes de Culléré (ref. 2), utilisant les techniques de GC-olfactométrie, identifient 17 composés clés de l'arôme de la truffe (*Tuber melanosporum*). Les composés les plus importants sont les composés suivants : 2,3-butanedione, dimethyldisulphide (DMDS), éthyl butyrate, dimethylsulphide (DMS), 3-méthyl-1-butanol et 3-éthyl-5-méthylphénol.

Matériel et méthode :

Une truffe fraîche de chaque terroir, d'environ 50, g a été traitée comme suit :

Préparation Espace de Tête- SPME-GC/MS adapté de Diaz et al (ref 1) : les truffes ont été émincées en fines lamelles. Pour chaque terroir, trois prélèvements de 2 g ont été introduits chacun dans un flacon de 20 mL scellé, puis congelés à -80°C.

Les vials sont ensuite décongelés, placés dans une enceinte thermostatée à 54°C, pendant 6 min. Une fibre SPME (carboxen/PDMS 75µm) est alors placée dans l'espace de tête du flacon pendant 30 min pour extraire les composés volatils de la truffe. Les molécules volatiles sont ensuite désorbées dans l'injecteur du GC/MS pendant 3 min à 250°C.

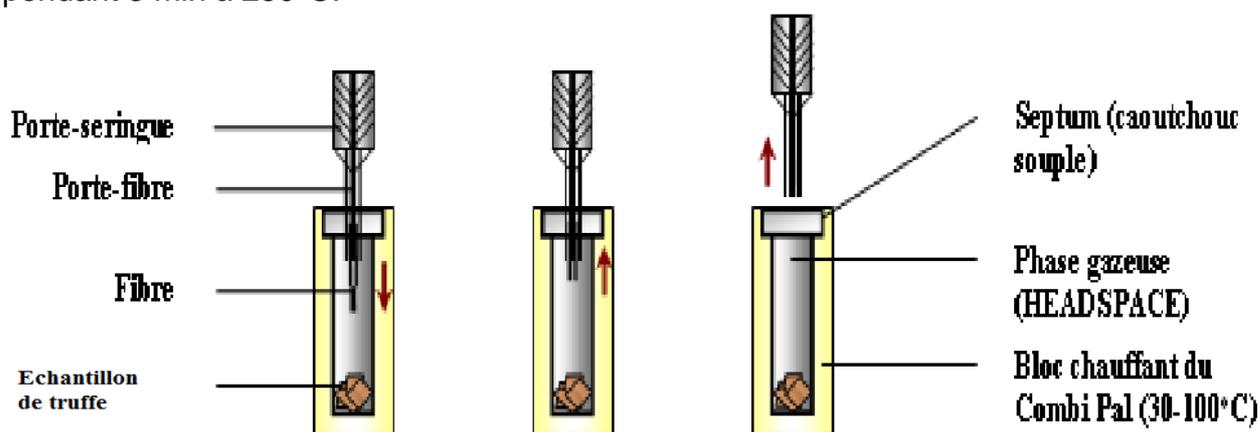


fig.1 : Schéma général d'une extraction des composés volatils par espace de tête-SPME.

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon

CS 40509, Domaine St Paul, 84914 Avignon cedex 09, France

Dr. C. Renard Tel : +33 (0)4.32.72.25.28, Email : catherine.renard@avignon.inra.fr



Conditions chromatographiques :

L'extrait est injecté avec un split ratio de 10. Le gaz vecteur est l'hélium à une vitesse de 35 cm/s. La colonne est une dB5de 30 m X 0,25 mm X 0,25 µm. La programmation du four est la suivante : température initiale 35°C durant 1 min, puis la température du four monte jusqu'à 230°C à 5°C/min.

Les spectres de masse sont enregistrés de la masse 29 à 300 à 2 scans/s. L'identification des composés est réalisée par comparaison des spectres de masse à ceux contenus dans 3 bases de données (Wiley8, NIST8 et INRAMASS). La confirmation de l'identification est basée sur la comparaison des indices de rétention des composés à ceux collationnés dans une base de donnée d'indice (Pherobase).

Résultats :

Analyse par HS-SPME-GC/MS :

Le profil chromatographique (Fig2) présente des composés très volatils en forte proportion pouvant être associés à des notes de tête. Nous identifions également des composés de points d'ébullition plus élevés montrant que la méthode d'extraction est appropriée pour détecter un large panel des composés constituant la fraction volatile de la truffe. La plupart des molécules identifiées comme clefs de l'arôme de la truffe sont détectées par notre méthode d'analyse (ref 2). Par exemple, on retrouve le diméthyl sulfure (très volatile) et le 5-methyl-2-propyl-phénol (peu volatile), principales molécules clefs de l'arôme de la truffe.

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon

CS 40509, Domaine St Paul, 84914 Avignon cedex 09, France

Dr. C. Renard Tel : +33 (0)4.32.72.25.28, Email : catherine.renard@avignon.inra.fr



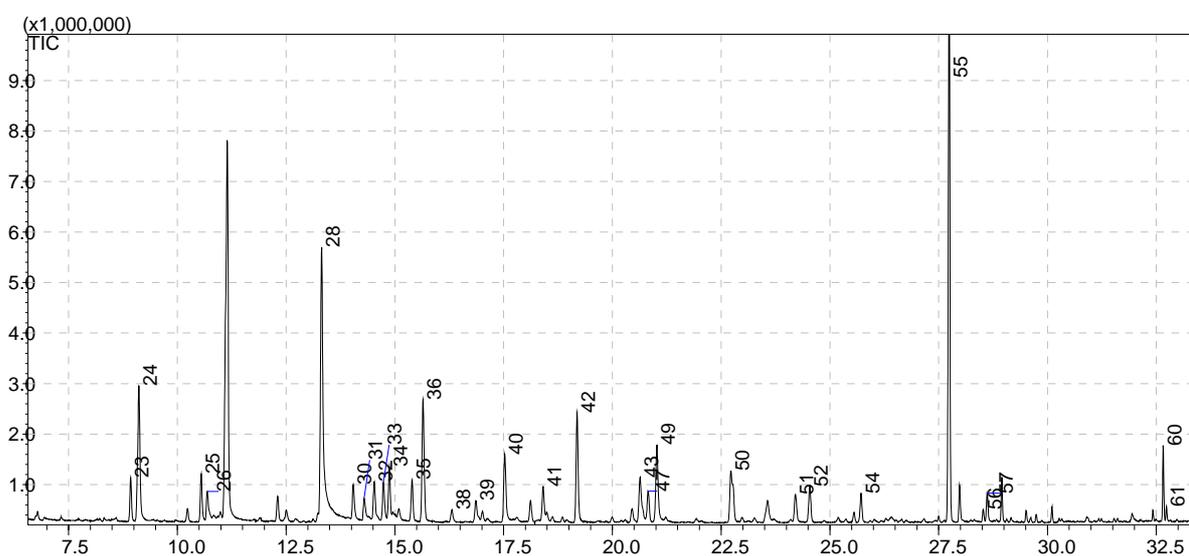
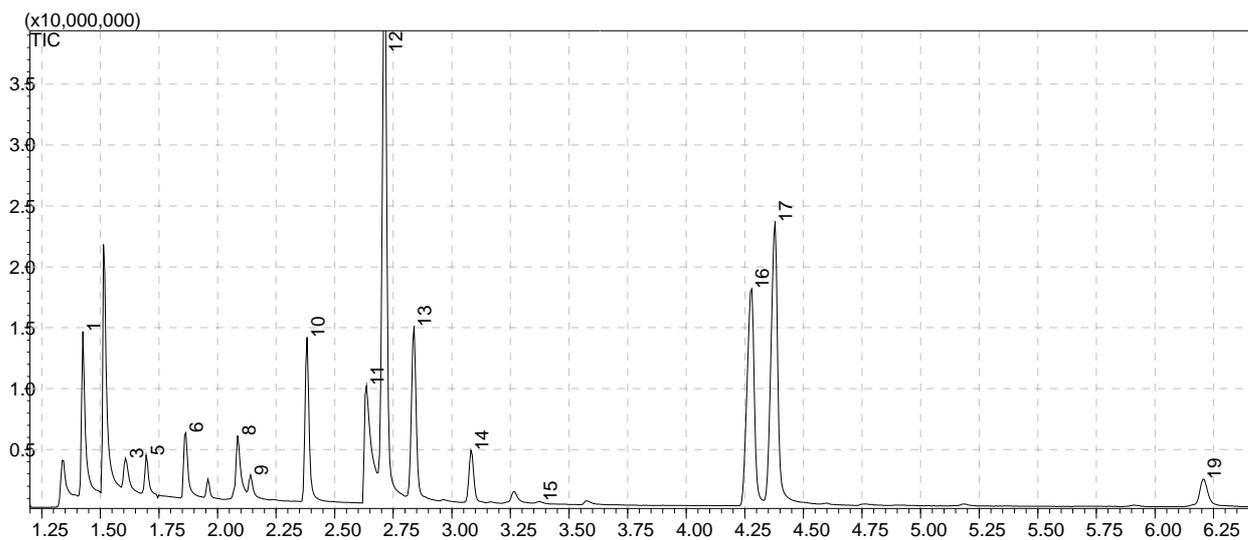


Figure 2 : chromatogramme du terroir St Restitut. Analyse par Espace de tête-SPME-GC/MS.

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon

CS 40509, Domaine St Paul, 84914 Avignon cedex 09, France

Dr. C. Renard Tel : +33 (0)4.32.72.25.28, Email : catherine.renard@avignon.inra.fr



Description qualitative :

60 composés volatils sont détectés dans les 4 terroirs (tableau 1). Nous retrouvons la plupart des composés clefs de l'arôme de la truffe. Nous détectons 12 composés (en gras) sur 18 composés reconnus comme ayant un impact sur son arôme (réf 2).

Notre méthode d'extraction est différente de celles rapportées dans la littérature scientifique. Cela a des conséquences sur les composés détectés. Il serait intéressant d'étudier cet extrait par des méthodes olfactométriques (GC-O) ou au moins de connaître les descripteurs et seuil de détection d'odeur des molécules détectées dans nos extraits.

N pic	Composé	tr	RI mesuré	RI lit	descripteur
1	Acetaldehyde	1.426			
2	Ethanol	1.515			
3	Acetone	1.604			
4	Propanal	1.687			
5	Dimethylsulfide	1.696			truffe
6	2methylpropanal	1.863			
7	2,3-Butanedione	2.051			beurre, creme
8	2-Butanone	2.087			
9	2-Butanol	2.141			
10	1-Propanol, 2-methyl-	2.382			
11	2-Butenal	2.635			
12	Butanal, 3-methyl-	2.712		650	
13	Butanal, 2-methyl-	2.838		650	
14	Formicacid, 1-methylpropyl ester	3.082			
15	2,3-Pentanedione	3.373		700	
16	1-Butanol, 3-methyl	4.277			fromage, truffe
17	1-Butanol, 2-methyl	4.378		755	
18	Dimethyldisulfide	4.394		785	Truffe
19	Hexanal	6.207	799	797	
20	2-Pentenal, 2-methyl-	7.341	825		
21	ethyl 2-methylbutanoate	8.213	846		Fruité
22	ethyl 3-methylbutanoate	8.426	851	849	Fruité
24	1-Hexanol	9.117	867	865	
25	Heptanal	10.548	901	900	
26	Methional	10.686	903	903	Pomme de terre cuite
27	Anisole	11.102	911	917	
28	Benzaldehyde	13.315	956	961	
29	dimethyl trisulfure	13.568	960	961	
30	1-Heptanol	14.043	970		

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon

CS 40509, Domaine St Paul, 84914 Avignon cédex 09, France

Dr. C. Renard Tel : +33 (0)4.32.72.25.28, Email : catherine.renard@avignon.inra.fr



31	1-Propanol, 3-(methylthio)-	14.292	975	978	
32	1-Octen-3-ol	14.525	979	978	Champignon
33	3-Octanone	14.736	984		
35	3-Octanol	15.394	997		
36	Octanal	15.647	1002	1001	
37	isobutyl 3-methylButanoate	15.897	1007	1004	
38	Methylanisole	16.312	1015	1002	
39	1,3-Hexadiene, 3-ethyl-2-methyl *	16.859	1025	nc	
40	Phenylethanal	17.524	1038	1049	
41	2-Octenal, (E)-	18.405	1056	1056	
42	1-Octanol	19.187	1071	1072	
43	2methyl mercaptomethylbutenal*	20.634	1099		
45	Isodihydrolavandulylaldehyde	20.695	1100	1106	
46	2-Methylbutyl 2-methylbutanoate	20.820	1102	1104	
47	Nonanal	20.819	1103	1103	
48	3-ethyl-5-methylphenol	20.895	1104		phénolique
49	Benzeneethanol	21.022	1107	1110	Rose
50	VERATROLE	22.723	1142	1147	
51	1-Nonanol	24.205	1173	1154	
52	2 phenylbutanal*	24.536	1179		
53	5-methyl-2propyl-phenol	25.299	1195		phénolique
54	Decanal.	25.715	1205	1204	
55	2-phenyl-2-butenal	27.742	1268	1242	
56	2-Undecanone	28.524	1292	1296	
57	2-phenyl-2-butenal isomere	28.612	1295		
58	2,4-DECADIENAL	29.161	1317	1314	huile friture
59	Inconnu	29.743	1342		
60	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	32.661	1484	1485	

Tableau 1 : identification des composés volatils détectés dans la fraction volatile des truffes par espace de tête-SPME-GC/MS. * tentative d'identification ; **composés en gras** : identifiés comme composés clefs de l'arôme de la truffe (ref. 2). RI : retention index. descripteur d'après réf 2.

Description semi quantitative : Tableau 2

Nous avons exprimé le % d'aire des composés détectés. Cela permet d'estimer la proportion d'un composé dans l'espace de tête. Ces valeurs comportent des biais car nous ne connaissons pas les coefficients de réponse de nos composés vis-à-vis du détecteur, ni l'affinité des composés pour la fibre choisie. Les données sont néanmoins comparables entre les différents terroirs. On remarque que les 2- et 3-méthylbutanol correspondent à près de 20% de l'espace de tête. Ces composés provenant d'acides aminés sont quasi-ubiquitaires dans la fraction volatile chez les végétaux, pourtant ils sont connus pour avoir un faible impact sur l'arôme de l'extrait.

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon

CS 40509, Domaine St Paul, 84914 Avignon cedex 09, France

Dr. C. Renard Tel : +33 (0)4.32.72.25.28, Email : catherine.renard@avignon.inra.fr



Les composés soufrés ont par contre une certaine spécificité vis-à-vis de l'espace de tête et présentent des seuils de perception olfactive très bas. Leur impact, bien qu'ils soient présents en faible concentration, est par conséquent très important dans l'arôme de la truffe (composé 5, 18, 26, 29, 31). Le 1-octen-3-ol (composé 32) est associé aux notes de champignon. Sa concentration est plus élevée dans le terroir Lurs, il serait intéressant de comparer les évaluations sensorielles si des profils quantitatifs ont été établis.

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon

CS 40509, Domaine St Paul, 84914 Avignon cedex 09, France

Dr. C. Renard Tel : +33 (0)4.32.72.25.28, Email : catherine.renard@avignon.inra.fr



N pic	Composés	LURS	St Restitut	Var	Ventoux
1	Acetaldehyde	1,81%	2,34%	2,85%	1,73%
2	Ethanol	4,15%	6,17%	5,21%	5,38%
3	Acetone	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
4	Propanal	0,99%	0,58%	0,83%	1,01%
5	Dimethylsulfide	2,45%	2,77%	0,66%	3,05%
6	2methylpropanal	3,31%	2,39%	2,49%	3,69%
7	2,3-Butanedione	0,47%	0,35%	0,49%	0,61%
8	2-Butanone	2,96%	2,19%	0,83%	2,97%
9	2-Butanol	0,48%	0,59%	0,23%	0,54%
10	1-Propanol, 2-methyl-	5,44%	4,20%	5,50%	7,16%
11	2-Butenal	0,71%	2,27%	2,62%	0,57%
12	Butanal, 3-methyl-	14,46%	14,69%	13,41%	14,54%
13	Butanal, 2-methyl-	3,76%	4,41%	4,12%	4,45%
14	Formicacid, 1-methylpropyl ester	1,62%	1,53%	0,64%	2,60%
15	2,3-Pentanedione	0,15%	0,13%	0,10%	0,21%
16	1-Butanol, 3-methyl	4,07%	4,09%	4,92%	3,06%
17	1-Butanol, 2-methyl	15,83%	11,85%	17,38%	18,20%
18	Dimethyldisulfide	0,06%	0,03%	0,05%	0,06%
19	Hexanal	2,93%	3,78%	1,24%	3,87%
20	2-Pentenal, 2-methyl-	0,66%	0,24%	0,24%	0,18%
21	ethyl 2-methylbutanoate	0,07%	0,02%	0,02%	0,04%
22	ethyl 3-methylbutanoate	0,03%	0,01%	0,01%	0,02%
24	1-Hexanol	1,49%	1,96%	2,08%	1,56%
25	Heptanal	0,78%	0,80%	0,45%	0,90%
26	Methional	0,40%	0,66%	0,73%	0,97%
27	Anisole	2,61%	2,28%	1,53%	2,34%
28	Benzaldehyde	5,11%	2,99%	6,55%	2,73%
29	dimethyl trisulfure	0,01%	0,01%	0,03%	0,02%
30	1-Heptanol	0,25%	0,29%	0,33%	0,25%
31	1-Propanol, 3-(methylthio)-	0,25%	0,25%	0,16%	0,20%
32	1-Octen-3-ol	2,08%	1,23%	0,28%	0,55%
33	3-Octanone	3,08%	0,65%	1,08%	0,70%
	Inconnu	1,73%	1,45%	1,75%	0,89%
35	3-Octanol	1,45%	0,24%	0,48%	0,55%
36	Octanal	1,32%	1,63%	1,29%	1,19%
37	isobutyl 3-methylButanoate	0,01%	0,00%	0,01%	0,01%
38	Methylanisole	0,13%	0,29%	0,22%	0,29%
39	1,3-Hexadiene, 3-ethyl-2-methyl *	0,83%	0,76%	0,35%	0,71%
40	Phenylethanal	2,36%	1,68%	1,62%	4,03%
41	2-Octenal, (E)-	1,57%	1,27%	0,51%	0,85%
42	1-Octanol	0,35%	1,11%	1,06%	0,45%

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon

CS 40509, Domaine St Paul, 84914 Avignon cédex 09, France

Dr. C. Renard Tel : +33 (0)4.32.72.25.28, Email : catherine.renard@avignon.inra.fr



43	2methyl mercaptomethylbutenal*	0,16%	1,02%	0,94%	0,21%
45	Isodihydrolavandulylaldehyde	0,10%	0,10%	0,12%	0,04%
46	2-Methylbutyl methylbutanoate 2-	0,50%	1,12%	1,00%	0,43%
47	Nonanal	0,30%	0,31%	0,22%	0,17%
48	3-ethyl-5-methylphenol	0,01%	0,03%	0,01%	0,01%
49	Benzeneethanol	1,42%	1,70%	1,33%	1,74%
50	VERATROLE	1,18%	0,73%	1,20%	1,18%
51	1-Nonanol	0,14%	0,26%	0,28%	0,14%
52	2 phenylbutanal*	0,22%	0,20%	0,23%	0,03%
53	5-methyl-2propyl-phenol	0,02%	0,02%	0,03%	0,03%
54	Decanal	0,24%	0,26%	0,24%	0,20%
55	2-phenyl-2-butenal *	1,82%	7,92%	7,69%	1,65%
56	2-Undecanone	0,14%	0,15%	0,09%	0,08%
57	2-phenyl-2-butenal isomere	0,11%	0,33%	0,33%	0,07%
58	2,4-DECADIENAL	0,06%	0,06%	0,03%	0,03%
59	Inconnu	0,11%	0,24%	0,24%	0,11%
60	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	0,43%	1,01%	1,15%	0,27%

Tableau2 : Composition de la fraction volatile des truffes de 4 terroirs. %, des aires des composés détectés par Head-space- SPME-GC/MS. en gras les composés clefs de l'arôme de la truffe (ref. 2).

Traitement Statistique :

La variabilité entre les terroirs est relativement faible. Il serait intéressant pour mieux défendre la truffe de Provence de comparer les profils obtenus avec ceux des variétés chinoises. Comme le montre *Cullere* (réf 3), la fraction volatile est moins riche pour les souches chinoises (*Tuber indicum*).

Comparaison de l'abondance des composés volatils :

Même si les proportions calculées ne sont pas exactes, nous pouvons comparer les terroirs entre eux vis-à-vis de la somme des aires des pics détectés dans l'espace de tête.

La figure 3 montre cette comparaison. Un test de comparaison de moyenne (Kruskals and Wallis) ne montre pas d'effet significatif du terroir sur la somme des aires des composés des pics détectés. Il semble que la concentration globale des composés volatils dans les terroirs analysés ne soit pas différente.

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon

CS 40509, Domaine St Paul, 84914 Avignon cédex 09, France

Dr. C. Renard Tel : +33 (0)4.32.72.25.28, Email : catherine.renard@avignon.inra.fr



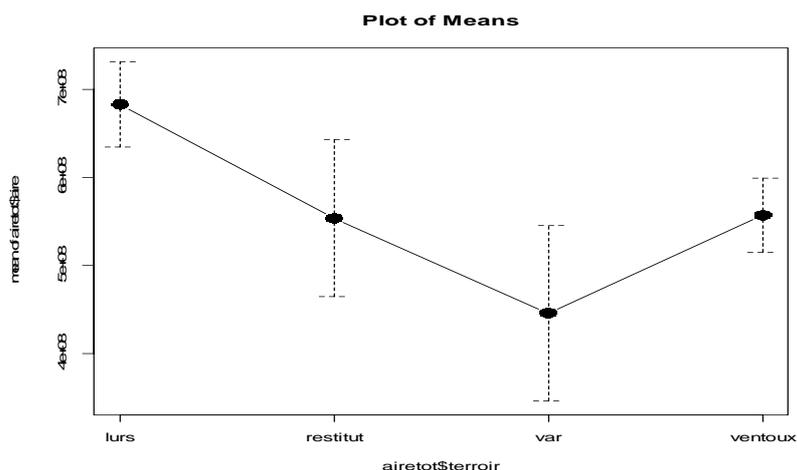


fig. 3 : Moyenne des aires des pics détectés dans la fraction volatile (espace de tête-SPME-GC/MS) des truffes de quatre terroirs.

Nous avons réalisé une analyse en composante principale (fig. 4) qui montre que les 4 terroirs se différencient sur la base de leurs composés volatils. Le terroir "Ventoux" se caractérise par de plus forte teneur en diméthyl disulfure et diméthyl trisulfure, le terroir "Var" par le diméthyl sulfure, le terroir "Lurs" par le 5-méthyl-2-propyl phénol, tandis que le terroir St Restitut se rapproche du comportement du terroir Var. Il serait intéressant d'introduire d'autres terroirs ou souches, pour mieux connaître les caractéristiques des truffes de Provence et permettre d'estimer leur variabilité en terme de profils aromatiques. L'analyse d'une truffe n'est certainement pas suffisante pour définir les composantes volatiles du terroir. Cette analyse a donc une validité limitée. Pour affirmer les tendances que nous avons observées, il serait nécessaire de reproduire ces analyses par un échantillonnage plus conséquent.

nota le cercle de corrélations associé à l'ACP représentant les vecteurs variables (composés) ne sont présentés. Il y a trop de variables pour présenter un graphe lisible.

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon

CS 40509, Domaine St Paul, 84914 Avignon cedex 09, France

Dr. C. Renard Tel : +33 (0)4.32.72.25.28, Email : catherine.renard@avignon.inra.fr



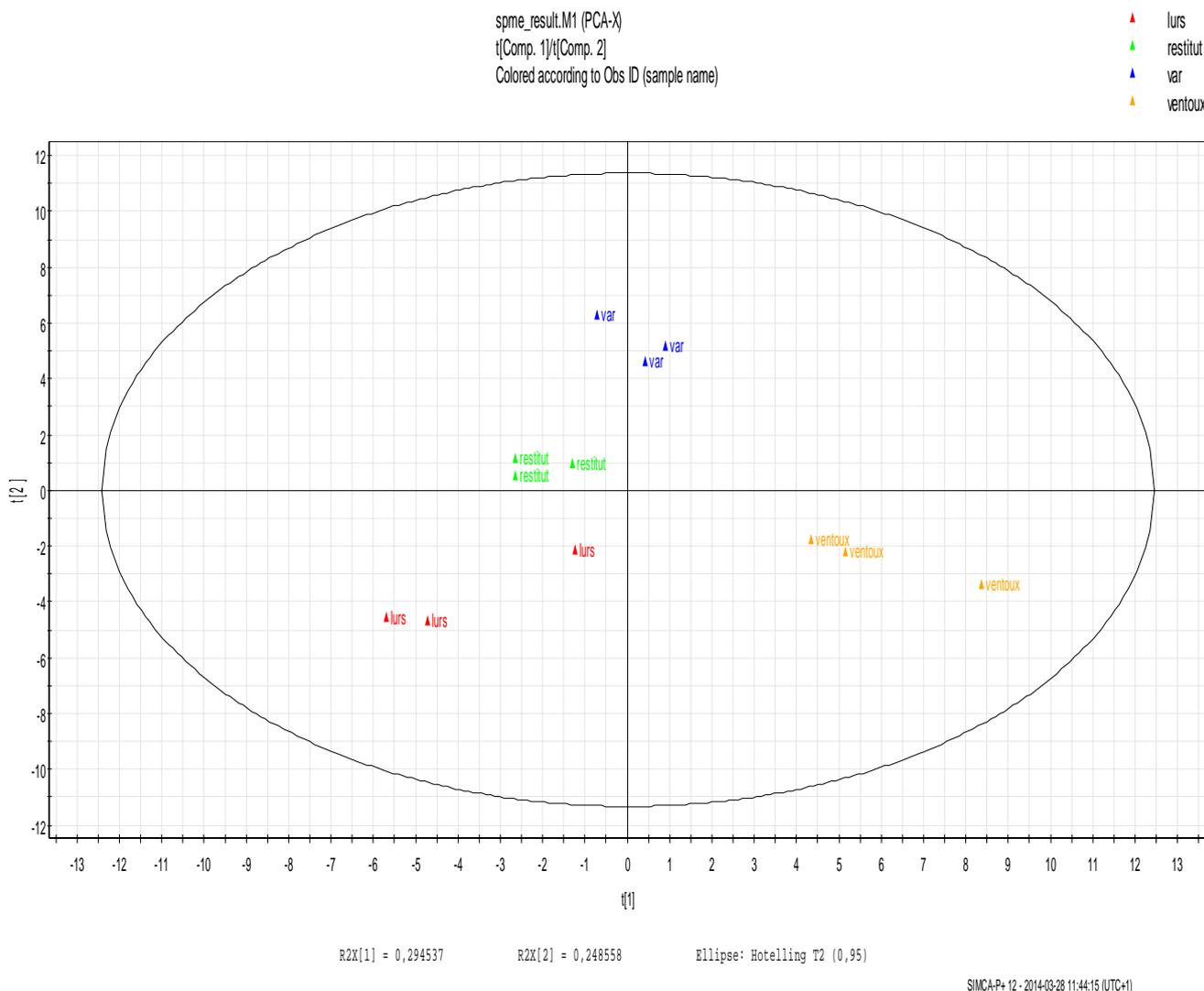


fig. 4 : Analyse en composante principale de la fraction volatile des truffes originaires de 4 terroirs.

Références bibliographiques :

- 1 Diaz, P., Ibanez, E., Reglero, G., & Senorans, F. J. (2009). Optimization of summer truffle aroma analysis by SPME: Comparison of extraction with different polarity fibres. *Lwt-Food Science and Technology*, 42(7), 1253-1259.
- 2 Cullere, L., Ferreira, V., Chevret, B., Venturini, M. E., Sanchez-Gimeno, A. C., & Blanco, D. (2010). Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, 122(1), 300-306.
- 3 Cullere, L., Ferreira, V., Venturini, M. E., Marco, P., & Blanco, D. (2013). Potential aromatic compounds as markers to differentiate between *Tuber melanosporum* and *Tuber indicum* truffles. *Food Chemistry*, 141(1), 105-110.

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon

CS 40509, Domaine St Paul, 84914 Avignon cédex 09, France

Dr. C. Renard Tel : +33 (0)4.32.72.25.28, Email : catherine.renard@avignon.inra.fr



Annexe1 :

Semiquantitative GC-O study: Gas chromatographic retention data, olfactory description, chemical identity and modified frequency percentage MF(%) for each compound.

Compound number	LRI VF5-MS	LRI DBWax	Odour descriptor		Identity	Supplier ^d	Black truffles %MF	Summer truffles %MF
			GC-O's experts	Truffle's experts				
1	505	900	Truffle, sulphur	Truffle	Dimethyl sulphide ^a	1	73	30
2	914	946	Truffle, sulphur	Truffle	Dimethyl disulfide ^a	1	76	37
3	600	976	Butter, cream	Butter, cream	2,3-Butanedione ^a	1	83	11
4	801	1044	Fruity, green apple	Fruity	Ethyl butyrate ^a	1	76	16
5	853	1074	Fruity, anise	n.d.	Ethyl 3-methylbutyrate ^a	2	35	0
6	776	1098	Metallic	Dusty	1-Hexen-3-one ^{b,*}	3	35	21
7	719	1217	Cheese	Truffle	3-Methyl-1-butanol ^a	1	62	22
8	941	1302	Mushroom	Dusty	1-Octen-3-one ^c	5	16	9
9	890	1333	Onion, meaty	Meaty	2-Methyl-3-furanthiol ^{b,*}	1	22	10
10	1025	1434	Earthy, dusty	Dusty	1-Octen-3-ol ^a	1	21	8
11	972	1482	Cooked potatoes	n.d.	Methional ^b	1	0	30
12	1125	1521	Phenolic, leather	Gasoline	3-Ethyl-5-methylphenol ^c		44	0
13	1198	1600	Phenolic, gasoline	Gasoline	5-Methyl-2-propylphenol ^{c,*}		21	0
14	1131	1910	Roses	Flowery	β -Phenylethanol ^a	2	15	6
15	1096	2045	Cotton candy	Sweet	Furaneol ^{b,*}	1	33	13
16	1075	2092	Phenolic, leather	Gasoline	p-Cresol ^a	2	22	6
17	1198	2190	Leather, animal, truffle	Truffle	3-Ethylphenol ^{b,*}	2	30	19
18	1292	2251	Phenolic, leather	n.d.	3-Propylphenol ^{a,*}	3	31	0

n.d.: Not detected.

^a Identification based on coincidence of gas chromatographic retention in two different columns and mass spectrometric data with those of the pure compounds available in the laboratory.

^b As for footnote a, but these compounds did not produce any clear signal in the mass spectrometer because of its low concentration.

^c As for footnote a, but in these cases pure compounds were not available in the laboratory.

^d Suppliers: 1, Aldrich; 2, Fluka; 3, Alfa aesar; 4, PolyScience; 5, Lancaster.

* Odorants reported for the first time in truffles.

Table tirée de Culleré 2010. %MF correspond à la fréquence en % (9 juges) de détection pondéré par un coefficient lié à l'intensité d'odeur.

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon

CS 40509, Domaine St Paul, 84914 Avignon cedex 09, France

Dr. C. Renard Tel : +33 (0)4.32.72.25.28, Email : catherine.renard@avignon.inra.fr

