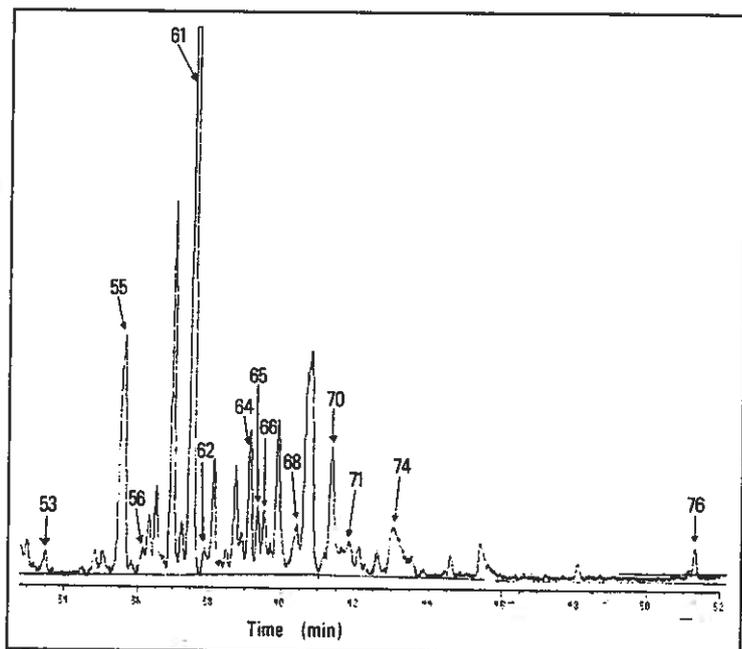




Mai 1994 / 285 W

Station de recherches laitières
CH-3097 Liebefeld-Berne

Caractérisation de fromages d'alpages subalpins suisses: mise en évidence par GC-MS de terpènes et d'hydrocarbures aliphatiques lors de l'analyse par "Purge and Trap" des arômes volatils de ces fromages



J.O. Bosset, U. Bütikofer,
R. Gauch, R. Sieber

Caractérisation de fromages d'alpages subalpins suisses: mise en évidence par GC-MS de terpènes et d'hydrocarbures aliphatiques lors de l'analyse par „Purge and Trap“ des arômes volatils de ces fromages

J.O. BOSSET, U. BÜTIKOFER, R. GAUCH, R. SIEBER
Station fédérale de recherches laitières, 3097 Liebefeld-Berne, Suisse

(Reçu le 4 mars 1994)

La présente étude préliminaire effectuée avec 14 fromages d'alpages subalpins et 20 fromages de plaine, tous de type „Gruyère suisse“, a permis de vérifier l'observation - déjà faite en France par Dumont et al. avec le (Gruyère de) Comté - de l'influence de l'altitude, c.-à-d. des compositions chimiques et botaniques des herbages, sur la composition chimique du fromage. L'analyse de la composition en arômes volatils des fromages a été effectuée par chromatographie capillaire en phase gazeuse après un piégeage dynamique d'effluves et une détection par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus ont été traités par analyse statistique discriminante. Cette étude préliminaire a permis de mettre en évidence quelques terpènes et hydrocarbures aliphatiques caractéristiques, voire spécifiques des fromages d'alpages subalpins.

1. Introduction

Le présent travail s'inscrit dans le cadre toujours plus actuel des études tant nationales qu'internationales des particularismes et des particularités régionaux (1, 2, 14, 19). A l'instar des producteurs et des éleveurs de vin, les fabricants et les affineurs de fromages de renom, en particulier ceux de Gruyère Switzerland et de fromages de l'Étivaz, tendent à protéger et à faire reconnaître la spécificité de leur production par le label d'appellation d'origine contrôlée (A.O.C.) ou celui de marque déposée (3, 6). Sans aller jusqu'à démontrer une possible spécificité du „goût du terroir“, très publicitaire mais probablement très difficile à mettre objectivement en évidence par voies sensorielle ou/et instrumentale, le but de la présente étude préliminaire était de vérifier, à l'aide de méthodes d'analyses chimico-physique et statistique performantes, le bien-fondé de l'observation déjà faite par Dumont et Adda (4) et Dumont et al. (5) que la composition des fromages - des (Gruyère de) Comté en l'occurrence - dépend notamment de l'altitude de production, donc des compositions botaniques et chimiques des herbages des régions concernées.

2. Matériel et Méthodes

Echantillonnage

La présente étude a été effectuée sur la base d'un échantillonnage de 14 fromages de type „Gruyère suisse“ (pâte cuite

pressée sans fermentation propionique, fabriquée à partir de lait cru) provenant d'alpages subalpins situés entre 1400 et 1850 m et de 20 fromages provenant de la plaine, soit de régions situées à moins de 1000 m (Tableau 1).

Tableau 1. Origine (lieu et altitude) des fromages étudiés

E = Étivaz®; G = Gruyère Switzerland® d'alpages;
P = Gruyère Switzerland® de plaine

No de l'échantillon		Nom de la fromagerie	Altitude (m)	Date de fabrication
1	G	En Culan	1630	Août 1991
2	G	Parc es Fayes	1551	Août 1991
3	G	Les Audèches	1491	Août 1991
4	G	Jeu de Quilles	1466	Août 1991
5	G	Branleires	1625	Août 1991
6	E	Seron	1813	Juillet 1991
7	E	Sazième	1823	Juillet 1991
8	E	Dorne	1819	Juillet 1991
9	E	Toumalay	1762	Juillet 1991
10	E	La Schuantze	1749	Juillet 1991
11	E	Chaude	1580	Juillet 1991
12	E	Chenaux	1700	Juillet 1991
13	G	Gros-Plané	1500	Juillet 1991
14	G	La Vathiaz	1400	Juillet 1991
15	P	inconnue	inconnue	Juillet 1991
16	P	Montagny-la-Ville	571	Juillet 1991
17	P	Prez-vers-Siviriez	768	Juillet 1991
18	P	Villaz-St-Pierre	706	Août 1991
19	P	Blessens	757	Août 1991
20	P	La Roche (FR)	750	Août 1991
21	P	Sâles/Gruyère	836	Août 1991
22	P	Cottens (FR)	712	Août 1991
23	P	Onnens (FR)	719	Juillet 1991
24	P	Cormerod	604	Juillet 1991
25	P	Schmitten (FR)	607	Juillet 1991
26	P	Chesalle/Oron	791	Juillet 1991
27	P	Grancy	588	Juillet 1991
28	P	Ballens	713	Juillet 1991
29	P	Cottens (VD)	582	Juillet 1991
30	P	Pampigny	628	Juillet 1991
31	P	Penthéréaz	622	Juillet 1991
32	P	Essertines/Yverdon	602	Juillet 1991
33	P	Giez	525	Juillet 1991
34	P	Ballaigues	870	Juillet 1991

Préparation et traitement de l'échantillon

Après leur avoir enlevé env. 1 cm de la zone extérieure non comestible (croûte et morge comprises), les échantillons ont été congelés puis stockés à -18 °C jusqu'au moment de l'analyse. Ils ont alors été râpés, toujours à l'état surgelé, puis finement dispersés pendant env. 1 min dans de l'eau à l'aide d'un ultraturax (Polytron type PT 20 00) sur position 3, à raison de 25 g de fromage dans 50 mL d'eau additionnée de 0,6 mL d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 5 mol/L fraîche (Merck pA, art. no 6498). L'eau utilisée était de qualité Milli-Q fraîche, portée à ébullition pendant 10 min puis refroidie dans un récipient fermé afin d'éliminer tout contaminant volatil. Le pH de cette suspension a finalement été ajusté à la valeur de 7,5 avec cette solution d'hydroxyde de sodium pour prévenir l'entraînement des acides gras libres, quantitativement dominants, lors de l'extraction des composés volatils par „Purge and Trap“.

Analyse GC-MS dynamique des effluves

L'analyse des composés volatils a été effectuée à l'aide d'une technique d'extraction, d'enrichissement par adsorption sur piège inerte, de désorption thermique, de cryoconcentration et d'injection de type „Purge and Trap“ („dynamic headspace analysis“) à l'aide d'un système automatique LSC 2000 de Tekmar (Cincinnati, Ohio, U.S.A.). Une partie aliquote de 8 g de la suspension précédemment décrite, additionnée d'une goutte d'un antimoissant désodorisé (Bosset et Gauch, en préparation), et 5 g de perles de verre (Ø 5 mm) ont été introduits dans un tube en U adéquat („needle sparger“ de Tekmar également) de 25 mL de contenance et purgés dans les conditions suivantes: gaz de purge: azote ultra pur; débit de purge: 30 mL/min; pré-purge: 1 min; durée et temp. de purge: 20 min à 45 °C (bain-marie); purge de séchage: 20 min; „cap cool-down“: -125 °C; préchauffage de désorption: 210 °C; désorption: 4 min à 220 °C; injection: en moins d'une min, de -125 à +200 °C; valve: 150 °C; ligne: 150 °C; „capillary union“: 150°C; nettoyage du piège par chauffage: 5 min à 260 °C. Le piège utilisé, en acier inoxydable, contenait un mélange de Carbosieve SIII (0,05 g) et de Carboxpack B, 60-80 mesh (0,20 g) également fourni par Tekmar (modèle no 8).

La séparation chromatographique a été opérée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (GC) modèle 5890 de Hewlett-Packard, dans les conditions suivantes: gaz porteur: hélium; flux du gaz porteur: 1,20 mL/min (à 80 °C); températures de l'injecteur: 200 °C, de la ligne de transfert au MS: 250 °C; interface: type „open split“; programme de

temp.: 13 min à 45 °C; rampe de temp.: 5 °C/min jusqu'à 240 °C, 5 min à 240 °C. Colonne capillaire utilisée: SPB1 en silice fondue (30 m x 0,32 mm x 4 µm) de Supelco (CH-1196 Gland).

L'identification des composés et leur semi-quantification (par la mesure comparative de la hauteur des pics chromatographiques) ont été effectuées par spectrométrie de masse à l'aide d'un détecteur de type MSD 5970 de Hewlett-Packard dans les conditions suivantes: ionisation électronique à 70 eV et 0,8 mA, effectuée en balayage („total ion chromatography“) de 19 à 250 daltons (amu); calibrage par „autotuning“. La saisie et l'exploitation des données brutes ont été effectuées à l'aide de la „ChemStation“ de Hewlett-Packard sur la base de la librairie des spectres de masses NBS & Wiley usuelle de McLafferty et Stauffer (12) et de Ten Noever de Brauw et al. (18).

Analyse statistique des résultats

Une analyse statistique discriminante a été effectuée à l'aide du logiciel Systat pour Windows version 5.0 (17). Vu le nombre de composés volatils à traiter (77 pics), cette analyse a dû être effectuée en 3 fois, par „batches“ successifs. Une première fois, les pics chromatographiques ont été traités en 4 groupes: 1 à 19, 20 à 39, 40 à 59 et 60 à 77 (numéros des pics).

Les meilleurs régresseurs obtenus ont été rétraités une deuxième fois en 2 groupes de taille semblable, puis (après sélection à nouveau des meilleurs régresseurs) une troisième fois en un seul et dernier groupe. Les paramètres de cette analyse discriminante répétitive ont été choisis, en mode rétroactif („backwards“), comme suit:

α (ENTER) = 0,05 et (REMOVE) = 0,05 (pour les 1ère et 2ème fois)

α (ENTER) = 0,01 et (REMOVE) = 0,01 (pour la 3ème fois).

L'analyse de discriminance a été arrêtée lors de l'obtention des 8 pics considérés comme les plus significatifs, donnant un coefficient de détermination $r^2 = 0,939$.

3. Résultats et Discussion

La figure 1 montre un chromatogramme typique d'échantillons de fromage d'alpage. La figure 2 en présente les pics les plus caractéristiques sur un agrandissement (env. 33 - 52 min).

Le tableau 2 établit la liste des régresseurs (pics chromatographiques) et de leurs combinaisons linéaires qui permettent le mieux de distinguer les fabrications subalpines de celles de plaine à

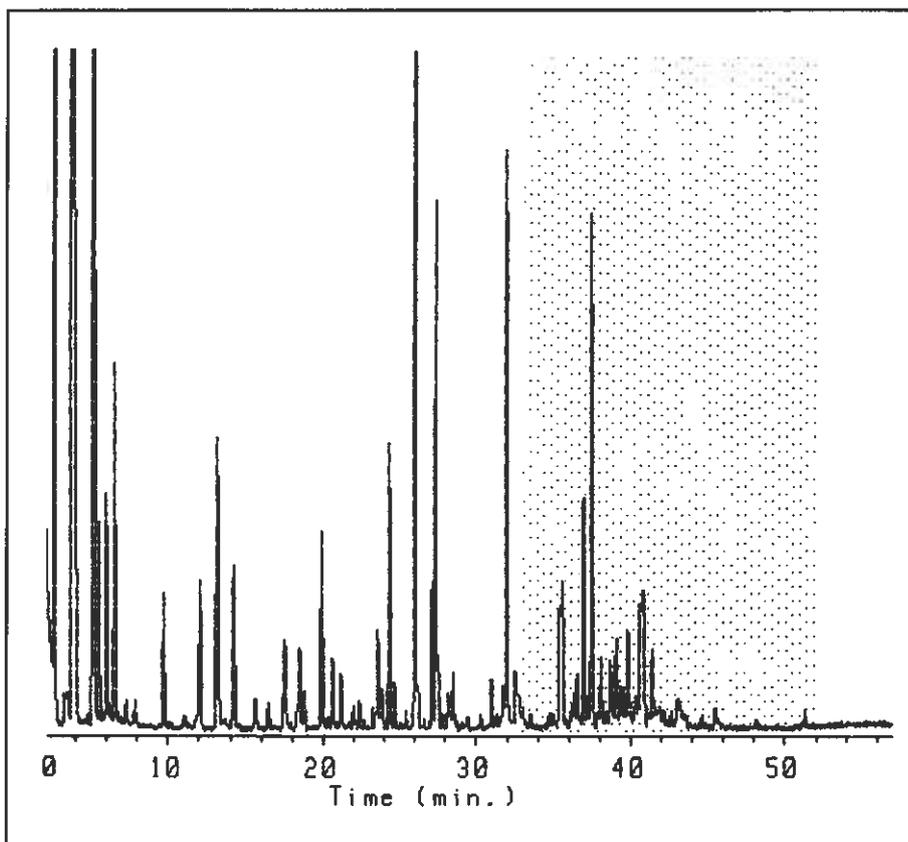


Figure 1: Chromatogramme GC-MS capillaire typique des arômes volatils d'un fromage d'alpage subalpin de type Gruyère (Switzerland) et Étivaz (cf. agrandissement de la zone ombrée sur la figure 2)

l'aide d'une analyse discriminante. Les coefficients de détermination (r^2) sont compris entre 0,46 pour un seul pic (le no 55: nérol) à 0,85 pour une combinaison de 7 pics.

La liste des substances les plus caractéristiques figure dans le tableau 3 qui donne également le nombre (p et q) de fromages contenant ces substances, la médiane, la moyenne et le coefficient de variation (cv) de la hauteur (unité arbitraire) des pics correspondants dans les fromages d'alpages et de plaine ainsi que le quotient des médianes. Bien que la méthode d'analyse ne soit pas strictement quantitative, il est néanmoins possible de calculer ce quotient puisque tous les échantillons ont été analysés de manière comparable (analyses relatives, mais standardisées). Ces composés ne sont donc pas spécifiques des fromages d'alpages, mais présents en concentrations significativement plus importantes dans ces derniers que dans les fromages produits en plaine.

Le tableau 4 donne enfin la liste des substances spécifiques des fromages d'alpages („traceurs“), c.-à-d. non identifiées dans les fromages de plaine. Il indique le nombre (n) de fromages dans lesquels ont été identifiés ces composés ainsi que la médiane, la moyenne et le coefficient de variation (cv) de la hauteur (unité arbitraire) des pics correspondants.

Ce travail confirme donc le bien-fondé de l'observation faite en France par Dumont et Adda (4) et Dumont et al. (5) sur les (Gruyère de) Comté: la composition chimique des fromages, notamment celle de certains de leurs arômes volatils, dépend entre autres de l'altitude de la production. Les mêmes classes de constituants chimiques que celles citées par ces auteurs - soit des terpènes et des hydrocarbures aliphatiques, substances particulièrement odoriférantes - permettent de différencier les productions d'alpages subalpins (en l'occurrence les Gruyères suisses et les fromages de l'Étivaz) et celles de plaine. Ces variations proviennent probablement de différences dans les compositions chimiques et botaniques des herbages des régions concernées (11), notamment de leur teneur en dicotylédones (15, 16). On peut donc considérer ces substances comme caractéristiques voire spécifiques des fromages d'alpages. On ne peut en revanche en tirer aucune conclusion quant à la qualité proprement dite des productions correspondantes. Plusieurs sesquiterpènes ont déjà été identifiés dans d'autres fromages tels que (Gruyère de) Comté (9), bleus français (8), fromages espagnols (7) et Parmigiano Reggiano (13).

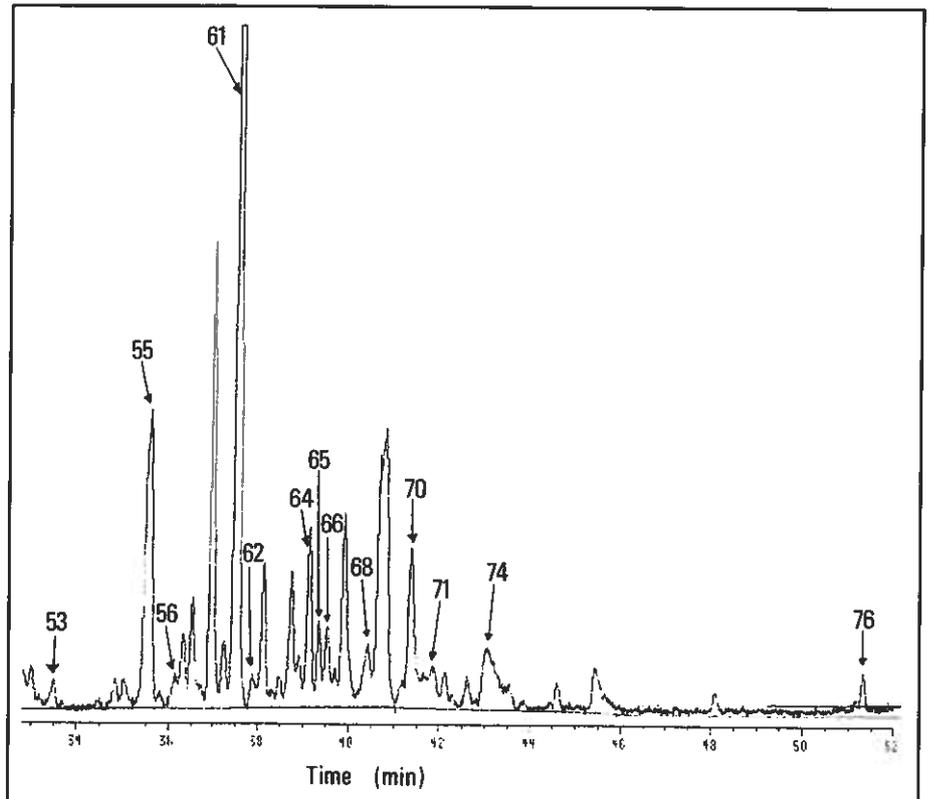


Figure 2: Agrandissement d'une partie du chromatogramme présenté sur la Fig 1 (env. 33 - 52 min) (cf. listes des composés dans tableau 3 et 4)

Tableau 2. Régresseurs les plus significatifs obtenus lors de l'analyse discriminante et coefficients de détermination correspondants (le nom des composés est indiqué dans le tableau 3)

Régresseurs de l'analyse discriminante (= no du pic)							Coefficient de détermination (r^2)
55							0,464
55	70						0,605
55	70	61					0,703
55	70	61	74				0,742
55	70	61	74	62			0,783
55	70	61	74	62	65		0,822
55	70	61	74	62	65	76	0,851

4. Conclusions

La présente communication ne peut ni ne doit être considérée comme définitive, puisque l'on ne dispose actuellement d'aucune donnée concernant l'origine des composés volatils mis en évidence dans les fromages d'alpages subalpins. Les seuls paramètres connus avec exactitude sont la date et l'altitude des productions considérées. Les compositions botaniques et chimiques des herbages utilisés n'ont pas encore été établies.

Aussi a-t-il été prévu de poursuivre et d'approfondir ce travail préliminaire par un vaste projet interdisciplinaire (1993-1996) commun aux Stations fédérales de recherches laitières (FAM) de Liebefeld-Berne et de recherches agronomiques (RAC) de Changins/Nyon. On y étudiera notamment toutes les substances volatiles communes aux herbages, aux crèmes de lait (en raison du caractère lipophile des substances mises en évidence) et aux fromages des régions considérées, en recourant à des dosages basés sur la

Tableau 3: Composés présents dans les fromages d'alpages et de plaine (analyse discriminante)

No du pic	Classe du composé	Composé	Fromages d'alpages (n=14)			Fromages de plaine (n=20)			Alpages / Plaine Quotient des médianes		
			p**	\bar{x} (u.a.)	\bar{x} (u.a.)	cv (%)	q**	\bar{x} (u.a.)		\bar{x} (u.a.)	cv (%)
55	Terpène	Nérol (T)	14	1,30	1,99	72	11	0,33	0,37	53	4,12
61	Terpène	Pinène (T)	7	0,44	2,63	207					
62	Alcane	Décane*	4	0,20	0,28	48					
65	Terpène	Limonène (T)	8	0,60	0,75	91	4	0,20	0,31	77	2,98
66	Alcane	n.i.	6	0,20	0,51	79					
70	Alcane	Undécane *	14	1,63	1,61	34	19	0,73	0,86	62	2,23
74	Azoté	n.i.	9	0,39	0,44	55	15	0,59	0,54	48	0,66
76	Cétone	2-Dodécane*	7	0,34	0,47	70	8	0,20	0,40	72	1,72

\bar{x} = médiane; \bar{x} = moyenne; cv = coefficient de variation; n.i. = non identifié; u.a. = unité arbitraire

*) Confirmé par substance de référence

***) p, q = nombre d'échantillons positifs (> seuil de détection du GC-MS)

(T) = Identification provisoire, à confirmer lors de la poursuite du travail

méthode dite des ajouts standardisés, récemment proposée par Imhof et Bosset (10).

5. Références

- BERTOZZI, L., PANARI, G.: Cheeses with appellation d'origine contrôlée (AOC): factors that affect quality. *Int. Dairy J.* **3**, 297-312 (1993)
- BOSSET, J.O., GAUCH, R.: Comparison of the volatile flavour compounds of six European 'AOC' cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. *Int. Dairy J.* **3**, 359-377 (1993)
- COOPÉRATIVE DES PRODUCTEURS DE FROMAGES D'ALPAGES „L'ÉTIVAZ“: Règlement interne de la Coopérative des producteurs de fromages d'alpages „L'Étivaz“. Marque collective déposée le 8 juin 1988, CH-1831 L'Étivaz et publiée dans la Feuille officielle suisse du commerce no 220 du 10 novembre 1989
- DUMONT, J.P., ADDA, J.: Occurrence of sesquiterpenes in mountain cheese volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 364-367 (1978)
- DUMONT, J.P., ADDA, J., ROUSSEAU, P.: Exemple de variation de l'arôme à l'intérieur d'un

Tableau 4. Composés présents seulement dans les fromages d'alpages

No du pic	Classe du composé	Composé	Paramètres statistiques			
			p**	\bar{x} (u.a.)	\bar{x} (u.a.)	cv (%)
53	Alcane	Nonane*	4	0,20	0,26	39
56	Aromate	Benzene, 1-ethyl-4-methyl-	4	0,20	0,26	40
61	Terpène	Pinène	7	0,44	2,63	21
62	Alcane	Décane*	4	0,20	0,28	48
64	Alcane	n.i.	9	0,74	1,22	93
66	Alcane	Poids moléculaire: 170	6	0,20	0,51	79
68	Alcane	n.i.	8	0,34	0,48	68
71	Alcane	n.i.	5	0,20	0,28	48

\bar{x} = médiane; \bar{x} = moyenne; cv = coefficient de variation; n.i. = non identifié; u.a. = unité arbitraire

*) Confirmé par substance de référence

***) p = nombre d'échantillons positifs (> seuil de détection du GC-MS) parmi n = 14 fromages

- même type de fromage: Le Comté. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* **14**, 198-202 (1981)
- 6 FÉDÉRATION DES SOCIÉTÉS D'AGRICULTURE DE LA SUISSE ROMANDE: Charte du Gruyère, document signé le 2 juillet 1992. Les Faverges / CH-1813 St-Saphorin
 - 7 FRUTOS, M. de, SANZ, J., MARTINEZ-CASTRO, I.: Characterization of artisanal cheeses by GC and GC/MS analysis of their medium volatility (SDE) fraction. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 524-530 (1991)
 - 8 GALLOIS, A., LANGLOIS, D.: New results in the volatile odorous compounds of French cheeses. *Lait* **70**, 89-106 (1990)
 - 9 GUICHARD, E., BERDAGUÉ, J.L., GRAPPIN, R.: Affinage et qualité du Gruyère de Comté. V. Influence de l'affinage sur la teneur en composés volatils. *Lait* **67**, 319-338 (1987)
 - 10 IMHOF, R., BOSSET, J.: Quantitative GC-MS analysis of volatile flavour compounds in pasteurized milk and fermented milk products applying a standard addition method. *Lebensm.-Wiss.u. -Technol.* **27**, in press
 - 11 JEANGROS, B.: Prairies permanentes en montagne: I. Effets de la fréquence des coupes et de la fertilisation azotée sur la composition botanique. *Revue suisse Agric.* **25**, 345-360 (1993)
 - 12 McLAFFERTY, F., STAUFFER, D.: *Wiley Registry of Mass spectral Data*, 4. edition, Wiley and Sons, New York (1988)
 - 13 MEINHART, E., SCHREIER, P.: Study of flavour compounds from Parmigiano Reggiano cheese. *Milchwissenschaft* **41**, 689 - 691 (1986)
 - 14 ROHM, H.: Regional classification of Swiss cheese based on its chemical composition. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **194**, 527-530 (1992)
 - 15 SCEHOVIC, J.: Métabolites secondaires de quelques plantes de prairies. *Rech. agronom. Suisse* **27**, 153-165 (1988)
 - 16 SCEHOVIC, J.: Considérations sur la composition chimique dans l'évaluation de la qualité des fourrages des prairies naturelles. *Rev. suisse Agric.* **23**, 305-310 (1991)
 - 17 SYSTAT Inc.: *Systat for Windows*, version 5.01, Evanston (Illinois, USA) (1992)
 - 18 TEN NOEVER de BRAUW, M.C., BOUWMAN J., TAS, A.C., VOS, G.F.La: Compilation of mass spectra of volatile compounds in food, Central Institute for Nutrition and Food Research TNO, Zeist (NL) (1979)

- 19 TSCHAGER, E., LANG E.C., KNEIFEL, W.: Einfluss von Fütterung und Haltung auf Mikronährstoffe, Vitamine und Sensorik der Milch. *Milchwirtschaftliche Berichte* **164** (116/117) (1993)

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier leurs collègues MM. J.-P. Häni, J.-L. Menoud et J.-P. Pauchard de la FAM, B. Jeangros, J. Scehovic et J. Troxler de la RAC, M. Brühlmann et J.B. Wettstein du Service vaudois de vulgarisation agricole, ainsi que MM. B. Gaudard, gérant de la Coopérative des producteurs de fromages d'alpages de „L'Étivaz“ et A. Moret, responsable des achats du centre d'achat et d'affinage des fromages de Migros à Ursy de leur précieux et bienveillant concours sous la forme de conseils, de discussions et de mise à disposition des échantillons nécessaires à cette étude.

Zusammenfassung

Vorkommen von Terpenen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen in schweizerischen Gruyère- und Étivaz-Alpkäsen mit Hilfe der dynamischen GC-MS-Dampfraumanalyse ihrer flüchtigen Aromastoffe

J.O. BOSSET, U. BÜTIKOFER, R. GAUCH, R. SIEBER
Schweiz. Milchw. Forschung **23** (2) 37-42 (1994)

In einer vorläufigen Studie wurden Gruyère- und Étivazkäse, davon 14 aus der Alp- und 20 aus der Talproduktion, auf flüchtige Aromastoffe untersucht. Die flüchtigen Aromastoffe dieser Käse wurden mit Hilfe der dynamischen Dampf-raum-Kapillar-Gaschromatographie und Massenspektrometrie qualitativ und se-

miquantitativ analysiert und die Resultate mit einer statistischen Diskriminanzanalyse ausgewertet. Es konnten einige Terpene und aliphatische Kohlenwasserstoffe als charakteristische oder sogar spezifische aromatische Bestandteile der Alpkäse nachgewiesen werden. Somit wurde die durch Dumont et al. an Comté gemachte Beobachtung bestätigt, wonach die Höhe über Meer, d.h. die chemische und botanische Zusammensetzung des Futters, auch die chemische Zusammensetzung der Käse beeinflussen kann.

Summary

Occurrence of terpenes and aliphatic hydrocarbons in Swiss Gruyère and Étivaz alpine cheese using dynamic headspace GC-MS analysis of their volatile flavour compounds.

J.O. BOSSET, U. BÜTIKOFER, R. GAUCH, R. SIEBER
Schweiz. Milchw. Forschung **23** (2) 37-42 (1994)

This preliminary study, carried out on 14 Swiss Gruyère and Étivaz cheeses produced in alpine pastures and 20 others produced in the lowlands, confirmed the observation already noted in France by Dumont et al. on the influence of altitude, i.e. the chemical and botanical composition of pastures, on the chemical composition of Comté cheese. The flavour components of the investigated cheeses were qualitatively and semi-quantitatively analysed using dynamic headspace capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. The results were submitted to statistical discriminant analysis. This preliminary study reveals the presence of terpenes and aliphatic hydrocarbons characteristic or even specific of alpine cheeses.

