

# Identification et caractérisation des composés à l'arôme malté/chocolaté et leurs mécanismes de formation dans les fromages à pâte mi-dure



Y. H. Meng, M. Piccand, A. Baumeyer, M. Tena Stern, P. Lüdin, U. von Ah, P. Fuchsmann

Agroscope, Schwarzenburgstrasse 161, 3003 Berne, Suisse

Contact: yihelene.meng@agroscope.admin.ch



## Introduction

Des notes aromatiques de malt ou de chocolat à intensité variables peuvent parfois être perçues dans les fromages de Raclette suisse. Certaines souches d'Agroscope exhibent cet arôme souvent négativement perçu. Selon la littérature, ces arômes sont dus à la présence de 2- et 3-méthylbutanal<sup>(1)(2)(3)</sup>. Cette odeur peut varier selon l'équilibre de ces composés en cause. Un mécanisme de formation probable suggère que les acides aminés leucine et isoleucine sont dégradés par des enzymes intracellulaires<sup>(4)(5)</sup>.

2, 3-méthylbutanal, 2- et 3-méthylbutanol ont été identifiés dans le cadre de ce projet comme étant responsables de cet arôme malté par gaz-chromatographie mass-spectrométrie olfactométrie (GC-MS-O). Des études cinétiques ont été réalisées dans des mini-fromages et deux milieux de cultures afin de comprendre les mécanismes de formation de ces composés.

## Méthodes

Des souches d'Agroscope ont été cultivées dans un fromage produit en interne et deux milieux: lait fermenté (FM) et bouillon stérile filtré De Man, Rogosa et Sharpe (MRS). Les méthodes et conditions suivantes ont été utilisées pour analyser les composés aromatiques :

**Echantillonnage headspace solid phase microextraction (HS-SPME)**<sup>(6)(7)</sup> :

- T = 60 °C, t<sub>extraction</sub> = 60 min, fibre: DVB/CAR/PDMS 50/30 µm 2 cm

**Echantillonnage headspace in-tube extraction (HS-ITEX)**<sup>(8)</sup> :

- T = 55°C, t<sub>incubation</sub> = 5 min, t<sub>extraction</sub> = 10 min, trap: Tenax TA/Carbosieve S III

**Echantillons analysés par LC-MS/MS:**

- Colonne: Poroshell 120 EC C18, 2.1x100mm, 2.7µm
- Eluant A: H<sub>2</sub>O, 0.1% acide formique; Eluant B: MeOH, 0.1% acide formique, gradient

## Résultats

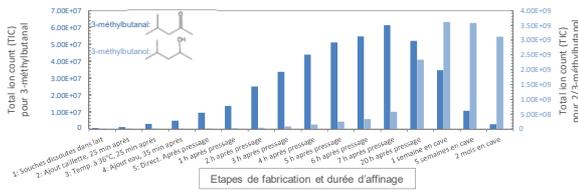


Fig. 1 Cinétiques de 3-méthylbutanal et 2/3-méthylbutanol dans un mini-fromage pendant sa fabrication et sa maturation par GC-MS TIC (total ion count).

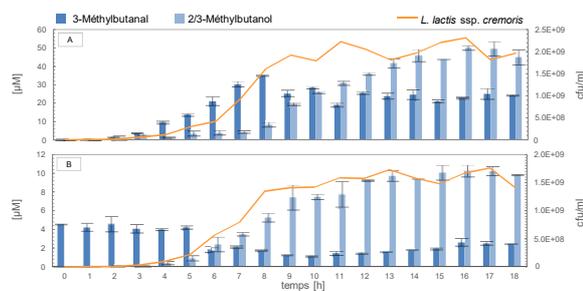


Fig. 2 Cinétiques de 3-méthylbutanal, 2/3-méthylbutanol (en µM) and formation de colonie d'un *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (en cfu/ml) cultivé dans du FM (A) et du MRS (B) pendant 18 heures à 30°C.

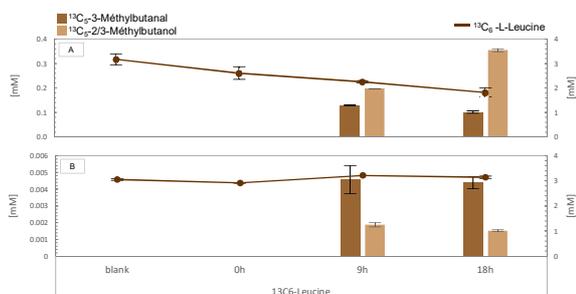


Fig. 3 Concentrations de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-3-méthylbutanal, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-2/3-méthylbutanol et <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-L-leucine d'un *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* cultivé à 30°C dans du FM (A) et du MRS (B) à 0h, 9h and 18h (en mM).

Les cinétiques de trois composés identifiés comme co-responsables pour l'arôme malté/chocolaté ont été tracés dans le but de savoir quand ils étaient formés et si leur concentration demeurerait constante à partir de la culture des souches jusqu'à la maturation du fromage. Une mixture de souches pour Raclette a été utilisée pour les analyses cinétiques dans le mini-fromage (Fig. 1). Un *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, principal responsable pour le fort arôme de malt, a été utilisé pour celles dans le lait fermenté (FM) et notre milieu modèle stérile filtré MRS (Fig. 2).

Afin d'observer leur influence sur la formation de 2-, 3-méthylbutanal, 2- et 3-méthylbutanol, plusieurs composés (acide α-cétoisocaproïque (aKIC), acide α-cétoglutarique (aKG), L-leucine and <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-L-leucine) ont été ajoutés au milieu de fermentation (Fig. 3 and 4).

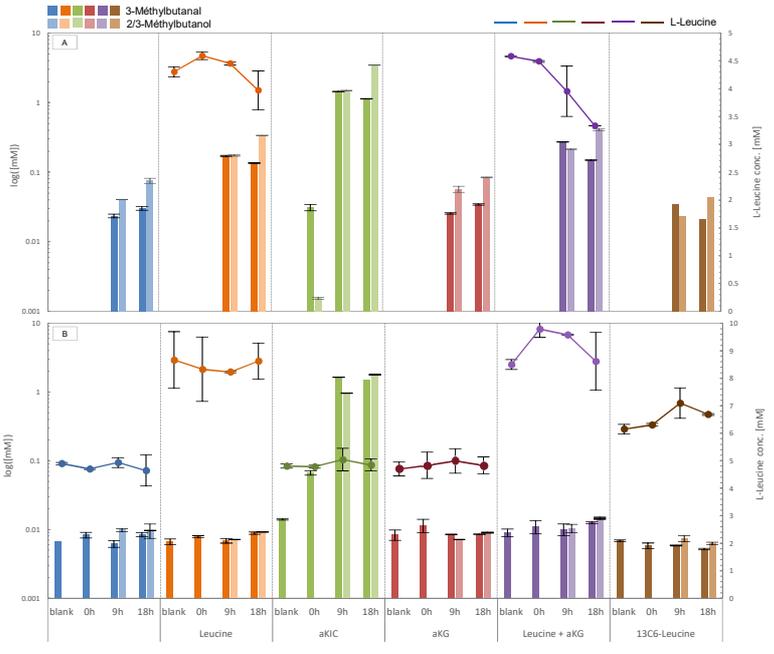


Fig. 4 Concentrations de 3-méthylbutanal, 2/3-méthylbutanol (en log([mM])) et de L-leucine (in mM) d'un *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* cultivé dans du FM (A) et du MRS (B) à 0h, 9h and 18h. L-leucine (orange), aKIC (vert), aKG (rouge), L-leucine and aKG (violet) et <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-L-leucine (brun) a été ajouté à chaque milieu.

## Conclusion

D'après les mesures cinétiques, 2- et 3-méthylbutanal sont formés au début de la fabrication du fromage et leur concentration diminue au fur et à mesure de la maturation. Au contraire, 2- et 3-méthylbutanol sont formés après l'étape de pressage et leur concentration absolue augmente pendant les premières heures en cave avant de maintenir leur concentration. La même tendance, entraînant un arôme de malt fort, a également pu être observé pendant les 18 heures de cultivation de la souche pendant 18 heures. Selon ces résultats, l'hypothèse est que 2- et 3-méthylbutanal sont respectivement réduits à 2- et 3-méthylbutanol.

L-leucine et aKIC, établi dans la littérature comme étant respectivement le précurseur et l'intermédiaire du mécanisme de formation de 3-méthylbutanal et 3-méthylbutanol, ont été validés ici par une méthode de dopage. 3-méthylbutanal et 3-méthylbutanol marqués <sup>13</sup>C ont été détectés grâce au dopage de <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-L-leucine, par conséquent validant la réduction de 3-méthylbutanal à 3-méthylbutanol et L-leucine en tant que précurseur. Le dopage avec aKIC a fortement boosté la formation de 3-méthylbutanal et 3-méthylbutanol. Cependant, l'activité de la bactérie est trop basse à 0h pour permettre le transport d'aKIC dans la cellule pour ensuite exporter 3-méthylbutanal en telle quantité et si peu de temps. Cela pourrait être expliqué par le fait que l'étape réactionnelle entre aKIC et 3-méthylbutanal se passerait, contrairement à la littérature, extracellulairement.

Les différences entre la culture microbienne dans FM et MRS montre qu'aKIC est clairement défini comme étant l'étape limitante de cette voie. Cependant, l'addition de L-leucine à MRS n'a pas démontré une influence explicite sur la formation de 3-méthylbutanal et 3-méthylbutanol comme observé avec l'addition d'aKIC. Par conséquent, un facteur présent dans FM participant à la dégradation de L-leucine à aKIC doit être manquant dans FM. Ces résultats permettront de mieux comprendre le mécanisme de formation de ces composés responsable pour cet arôme de malt négativement perçu dans le but de les contrôler pendant la fabrication du fromage.

## References

1. P. Perpiète et al., *J Agric Food Chem.*, **1999**, 47, 2374  
 2. Q. Zhou et al., *J Agric Food Chem.*, **2002**, 50, 2016  
 3. M. Afzal et al., *Int J Food Microbiol.*, **2012**, 157, 332  
 4. M. Afzal et al., *Crit Rev Food Sci Nutr.*, **2017**, 57, 399  
 5. G. Smit et al., *FEMS Microbiology Reviews*, **2005**, 29, 591  
 6. N. Moreira et al., *European Food Research and Technology*, **2016**, 242, 457  
 7. T. Bezerra et al., *Food Sci. Technol.*, **2016**, 36, 103  
 8. A. Soria et al., *Comprehensive Analytical Chemistry*, **2017**, 76, 255



Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Swiss Confederation

Federal Department of Economic Affairs,  
Education and Research EAER  
Agroscope