

naturellement alors que les olives noires "façon grecque" ne sont que très légèrement traitées à l'hydroxyde de sodium, salées, puis stockées dans une solution saline à 12-15%. La maturation plus longue des olives noires est donc partiellement compensée par une préparation beaucoup plus légère du produit fini.

La composition aromatique des olives marocaines de table, élaborées selon ces deux méthodes, a récemment été publiée [1,2]. Les molécules odorantes des olives noires « façon grecque » se distinguent nettement de celles des olives vertes élaborées selon la « méthode espagnole ». Plusieurs lactones, le 2-méthyl-3-furanethiol et le 3-méthylbutanoate d'éthyle, tous absents dans les olives vertes, ressortent, avec le méthional et le guaïacol, comme les composés les plus odorants de l'olive noire. Cette richesse en lactones s'est avérée encore plus marquée dans le seul échantillon qui avait été traité au sorbate [2].

L'objectif du présent travail était de préciser l'impact du conservateur. Des expériences ont été répétées sur des olives vertes et des olives noires, toutes traitées cette fois au sorbate de potassium.

Des stilbènes ont par ailleurs été recherchés pour la première fois dans cette matrice reconnue très riche en polyphénols.

2. Matériel et méthode

2.1. Extraction Likens-Nickerson et analyse des arômes

Environ 10 g d'olives saines dénoyauées sont hachés et transférés dans un ballon A avec 30 mL d'eau Milli-Q. 5 mL de dichlorométhane bidistillé sont versés dans un ballon B tandis que 2 mL de dichlorométhane bidistillé et 2 mL d'eau Milli-Q sont introduits au centre du dispositif Likens-Nickerson (C) [2].

Lactones et resvératrol dans les olives noires de table

Sonia Collin¹, Sabrina Nizet, Marie Delcroix,
Didier Demaegd & Vesna Jerkovic

Université catholique de Louvain, Unité de Brosserie et des Industries Alimentaires,
Croix du Sud 2/Bte 7, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique
sonia.collin@uclouvain.be

RESUME. Le 2-méthyl-3-furanethiol et le 3-méthylbutanoate d'éthyle, absents dans les olives vertes, ressortent, avec le méthional et le guaïacol, parmi les composés les plus odorants de l'olive noire. Une autre particularité des olives noires est leur richesse exceptionnelle en gamma-lactones (delta-calcalone, ...), issues des activités de bactéries lactiques et de levures sur les acides oléique et palmitoléique. L'ajout de sorbate induit une augmentation significative des teneurs en lactones alors que le même traitement appliqué aux olives vertes a relativement peu d'effet. En terme d'originalité polyphénolique, aussi bien les olives vertes que les olives noires contiennent du trans-resvératrol et son glucoside, le trans-piceïde. Ces deux stilbènes, associés dans le cas du vin au fameux « French paradox », n'avaient jamais été identifiés précédemment dans l'olive.

ABSTRACT. 2-Methyl-3-furanethiol and ethyl-3-methylbutanoate, absent in green olives, emerged, with methional and guaïacol among the strongest odor in black olives. To be also emphasized is the high level of gamma-lactones (delta-calcalone, ...) coming from lactic bacteria and yeast activity on oleic and palmitoleic acids. Only in black olives, the addition of potassium sorbate as a preservative strongly increases lactone concentrations. Black and green olives proved to contain trans-resveratrol and its glucoside, trans-piceid. These stilbenes, linked to the "French paradox" in wine, had never been identified in olives before.

KEYWORDS: olive; arômes; lactones; polyphénols; resvératrol; stilbènes
KEYWORDS: olive; aroma; lactones; polyphenols; resveratrol; stilbenes

1. Introduction

Les olives vertes élaborées selon «la méthode espagnole» sont désamérisées avec une solution d'hydroxyde de sodium, puis lavées à l'eau et fermentées

Pour régulariser l'ébullition, quelques grains de carborundum sont ajoutés dans les ballons A et B. Afin d'éviter toute oxydation des arômes, le montage est préalablement purgé et sera maintenu sous flux d'azote (2 mL/min) tout au long de l'extraction. Le ballon A est plongé dans un bain de paraffine à $150 \pm 5^\circ\text{C}$; le ballon B dans un bain d'eau à $75 \pm 5^\circ\text{C}$. Les vapeurs de dichlorométhane chargées d'arômes et la vapeur d'eau se condensent au centre du dispositif surmonté d'un réfrigérant à -15°C .

Après 45 minutes, l'extraction est interrompue et la phase dichlorométhane du ballon B est transférée quantitativement dans un ballon portant une colonne Snyder-Kuderna. Un standard externe (EST, 10 μL d'une solution de chloroheptane 2078 mg/L préparée dans du dichlorométhane) y est ajouté ainsi que quelques grains de carborundum (régularisation de l'ébullition). Le ballon est plongé dans un bain thermostatisé à 45°C jusqu'à l'obtention d'un volume de 0,5 mL. La concentration finale de l'EST est donc de 41,56 mg/L. La verrerie est alors refroidie sous eau froide. L'extrait est transféré dans une fiole d'injection chromatographique stockée à -80°C avant analyse.

Conditions chromatographiques :

Injecteur : splitless (ouverture du split après 1 minute), température : 250°C , quantité injectée : 1 μL
 Pression du gaz vecteur (He) : 100 kPa (GC-MS), 50 kPa (GC-O)
 Colonne capillaire Wall Coated Open Tubular (WCOT) (50 m x 0,32 mm ID), CP-Sil5-CB (CP) low bleed MS, épaisseur du film = 1,2 μm

Programmation de température du four :

Température initiale : 36°C
 Pente 1 : $20^\circ\text{C}/\text{min}$ jusqu'à 85°C
 Pente 2 : $1^\circ\text{C}/\text{min}$ jusqu'à 145°C
 Pente 3 : $3^\circ\text{C}/\text{min}$ jusqu'à 250°C
 Température finale : 250°C durant 30 minutes
 Détecteurs (spectromètre de masse et olfactomètre) :

GC-MS : quadrupôle, ionisation par impact électronique à 70 eV, analyse de 40-400 amu (mode full scan), température de la source : 200°C

GC-O : port de sniffing alimenté d'air humidifié à 20 mL/min, méthode AEDA avec dilutions de 2 en 2 - FD = 2^{n-1} , n étant le nombre de fois que la dilution a été appliquée pour faire disparaître l'odeur.

2.2. Extraction et analyse des stibènes

Le protocole d'extraction (lavages successifs au toluène et au cyclohexane, extraction avec éthanol/eau, 80/20, v/v à 60°C) et d'analyse (HPLC/MS/MS) des stibènes des olives est identique à celui décrit par Callemien *et al.* (2005) pour l'analyse des stibènes du houblon [3].

3. Résultats et discussion

3.1. Comparaison de la composition aromatique d'olives noires et d'olive vertes traitées au sorbate de potassium

A l'instar des expériences antérieures [1,2], plusieurs lactones et le 2-méthyl-3-furaméthiol (FD = 8192) ressortent, avec le méthional (FD = 2048) et le guaiacol (FD = 512), parmi les composés les plus odorants de l'olive noire (Tableau 1). Les spectres de masse des gamma et delta lactones permettent aisément de les distinguer (Figure 1) : le fragment $m/z = 85$ caractérise les premières d'entre elles (perte de la chaîne latérale sous forme de radical) alors que l'ion majeur des delta lactones possède un carbone de plus dans le cycle ($m/z = 99$). Comme attendu, les gamma-lactones sont majoritaires dans l'olive noire. Les facteurs de dilution de la γ -dodécylactone (FD = 32768, 5,80 ppm EST_{eq}, odeur caractéristique d'olive), et de la γ -décylactone (FD = 128, fruité, 0,27 ppm EST_{eq}) confirment par ailleurs le rôle du conservateur (mêmes valeurs de FD que celles décrites précédemment

dans [2] pour l'échantillon traité). Celles-ci ne se retrouvent qu'à l'état de traces dans l'olive verte.

Tableau 1. Composés soufrés, phénol et lactones distinguant nettement les olives noires des olives vertes (échantillons traités au sorbate de potassium). FD des références [1] et [2] entre parenthèses.

Indice de rétention (CP-Sil-5-C18)	Nom	Odeur	FD	
			Noires	Vertes
838	2-méthyl-5-furaméthiol	oso, fumé, sauté	8192 (4996-8193)	-
870	méthional	moût, pomme de terre	7648 (512-1034)	256 (129)
1064	guaiacol	phénolique, fumé	515 (612-3148)	287 (129)
1230	γ-octalactone	fruit pourri	0-32)	8 (1)
1428	γ-décalactone	fruité	128 (8-128)	-
1456	δ-décalactone	noisette	16 (16-512)	6 (1)
1655	γ-dodécylactone	olive, fruité, pêche	32768 (512-32768)	64 (1)

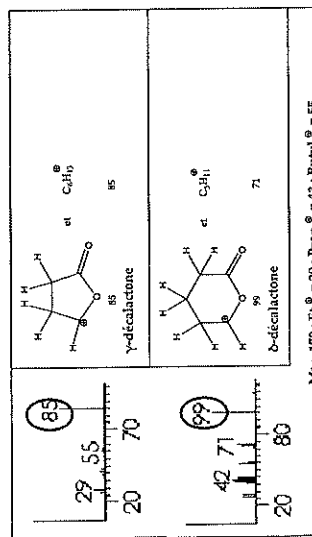


Figure 1. Spectres de masse des delta et gamma lactones.

Plusieurs microorganismes sont capables de synthétiser les gamma lactones [4]. Dans les olives noires, nous suspectons une synergie entre les bactéries lactiques et les levures. Les premières additionneraient un hydroxyle en position 10 de l'acide oléique ou palmitoléique (Figure 2). Les secondes procéderaient ensuite à trois beta-oxydations successives menant respectivement à la γ-dodécylactone et la γ-décalactone. Bien qu'ayant un effet inhibiteur sur les levures, Turantas *et al.* [5] évoquent la possibilité que le sorbate de potassium favorise le développement des bactéries lactiques. Dans les olives vertes, ce traitement ne génère toutefois que des traces de gamma dodécylactone.

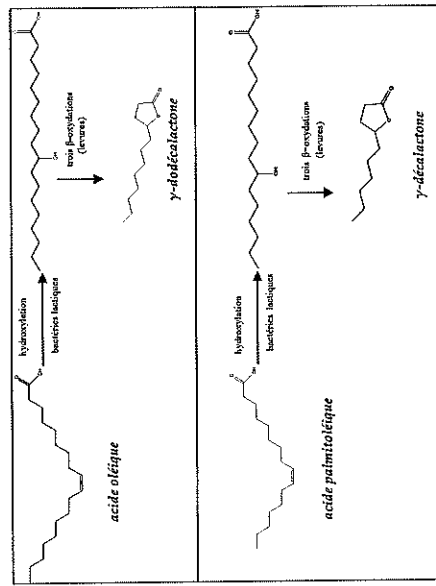


Figure 2. Formation de la γ-dodécylactone et de la γ-décalactone à partir des acides oléique et palmitoléique.

Iraji *et al.* [1] mentionnaient l'absence dans l'olive verte de 2-méthylpropanoate d'éthyle, de 2- ou 3-méthylbutanoate d'éthyle et de cyclohexylcarboxylate d'éthyle, principaux contributeurs de l'arôme fruité de l'huile d'olive [6, 7]. Excepté le cyclohexylcarboxylate d'éthyle, ces composés, ainsi que quelques autres esters et le β -damascénone, avaient par contre été retrouvés dans les extraits d'olives noires [2]. L'analyse des deux nouveaux échantillons traités au sorbate de potassium nous amène aux mêmes conclusions.

Tableau 2. Principaux composés responsables de l'arôme fruité des olives. *FD des références [1] et [2] entre parenthèses.*

Indice de rétention (CP-SIF-5-CB)	Nom	Odeur	FD	
			Noires	Vertes
717	2-méthylpropanoate d'éthyle	fruits, frais	256 (64-756)	(1)
831	3-méthylbutanoate d'éthyle + 2-méthylbutanoate d'éthyle	fruits, sucré	2048 (8-4096)	(2)
1358	β -damascénone	poivre cuit	64 (4-64)	(2)

A l'instar des olives vertes, l'olive noire contient les (*E,Z*)- et (*E,E*)-2,4-décadiénals (odeurs intenses de coriandre) et le (*Z*)-3-hexénal (odeur agréable d'olive verte) [1,2]. Comme l'indique le Tableau 3, nous retrouvons comme attendu des teneurs plus faibles en (*Z*)-3-hexénal dans l'échantillon d'olives noires. Plusieurs terpènes présents dans le fruit vert (acétate de nérol, β et γ -terpinéol, linalol, β -myrcène) sont par ailleurs absents dans les olives noires.

Tableau 3. Aldéhydes dans les olives de table traitées au sorbate de potassium. *FD des références [1] et [2] entre parenthèses.*

Indice de rétention (CP-SIF-5-CB)	Nom	Odeur	FD	
			Noires	Vertes
764	(<i>Z</i>)-3-hexenal (hexanal)	verdure, olive verte	4 (4-32)	256 (256)
1272	(<i>E,Z</i>)-2,4-décadienal	huile de paraffine, verdure	16 (16-2048)	64 (64)
1286	(<i>E,E</i>)-2,4-décadienal	huile de paraffine, coriandre	812 (128-512)	128 (128)

L'utilisation de sorbate de potassium comme conservateur explique bien sur la présence de 2,4-hexadiénoate d'éthyle et d'acide 2,4-hexadiénoïque dans nos deux échantillons (Tableau 4).

Tableau 4. Concentrations (EST équivalents) en 2,4-hexadiénoate d'éthyle et en acide 2,4-hexadiénoïque.

Indice de rétention (CP-SIF-5-CB)	Nom	Odeur	Concentration*	
			Noires	Vertes
1056	acide 2,4-hexadiénoïque	-	1,34	1,5*
1066	2,4-hexadiénoate d'éthyle	-	7,04	7,24

* Concentration approximative en mg/L, exprimée en EST équivalents, en considérant un pourcentage de récupération de 100%.

3.2. Originalité polyphénolique des olives

L'oleuropéine est le principal polyphénol de l'olive verte; celui-ci lui confère une amertume excessive s'il n'est pas hydrolysé en hydroxytyrosol. Dans le cadre de cette recherche, nous avons recherché la présence de stilbènes. Il s'agit d'une autre famille de polyphénols à laquelle on attribue des effets « santé » exceptionnels, notamment dans le cas du vin (« French paradox »).

Nous avons ainsi découvert du *trans*-resvératrol et son glucoside, le *trans*-picéide, aussi bien dans l'olive verte que dans l'olive noire (Figure 3).

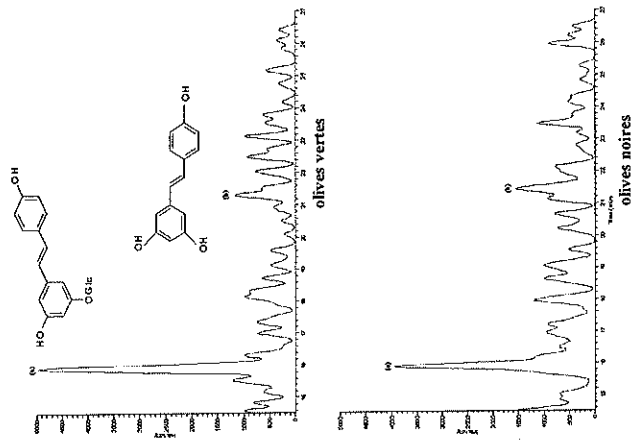


Figure 3. Chromatogrammes HPLC/MSMS d'extraits stilbéniques d'olives vertes (en haut) et d'olives noires (en bas) : (a) *trans*-picéide, (b) *trans*-resvératrol.

4. Conclusions

Les olives noires se sont révélées être des sources intéressantes de γ -lactones et de resvératrol. Les recherches sur les arômes et les composés polyphénoliques de l'olive n'en sont qu'à leurs débuts et les voies à explorer sont encore nombreuses. L'impact des procédés de désamérisation des olives vertes de table doit encore être évalué.

5. Bibliographie

- [1] Iraqi, R.; Vermeulen, C.; Benzekri, A.; Bousem, A.; Collin, S. "Screening for key odorants in Moroccan green olives by GC-olfactometry/Aroma Extract Dilution Analysis", *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2005, 1179-1184.
- [2] Collin, S.; Nizer, S.; Mills S.; Iraqi, R.; Bousem, A.; "Characterization of odor-active compounds in extracts obtained by simultaneous extraction/distillation from Moroccan black olives", *J. Agric. Food Chem.* 56, 2008, 3273-3278.
- [3] Callamien, D.; Jerkovic, V.; Rozenberg, R.; Collin S. "Hop as an interesting source of resveratrol for brewers: Optimization of the extraction and quantitative study by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2005, 424-429.
- [4] Wamikawa, A.; Hosoi, K.; Kato, T. "Conversion of unsaturated fatty acids to precursors of γ -lactones by lactic acid bacteria during the production of malt whisky", *J. Am. Soc. Brew.*, 58, 2000, 51-56.
- [5] Turantas, F.; Gökşungur, Y.; Dinçer, A.; Ünlüörk, A.; Güvenç, U.; Zorlu, N. "Effect of potassium sorbate and sodium benzoate on microbial population and fermentation of black olives", *J. Sc. Food Agric.*, 79, 2000 1197-1202.
- [6] Reiners, J.; Grosch, W. J. "Odorants of virgin olive oils with different flavour profiles", *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1998, 2754-2763.
- [7] Kiritsakis, A. K. J. "Flavor components of olive oil - A review", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 1998, 673-681.

