DK530944

CD_RP15338

Centre
de coopération
Internationale
en Recherche
Agronomique
pour le
Développement

Plan d'adaptation de la filière riz camarguaise

Convention d'execution ONIC/CIRAD

Compte Rendu Action 3, Axe 3

« Caractérisation et quantification de l'arôme des variétés aromatiques cultivées en Camargue »

C. MESTRES, R. BOULANGER, F. DAVRIEUX

M. LAGUERRE, J. RINGUET

CIRAD

000079034

2006

Action 3 : Caractérisation et quantification de l'arôme des variétés aromatiques cultivées en Camargue

1 Introduction

Le développement d'outils rapides et fiables d'évaluation de la qualité aromatique des riz est une condition nécessaire dans l'optique du développement de riz aromatiques typés pour la Camargue. Dans cet objectif, deux approches devaient être testées en année 1 :

- Un dosage quantitatif des principaux composés d'arôme après extraction (EDS, extraction Distillation Simultanées) puis séparation et quantification par Chromatographie Phase Gazeuse (CPG),
- Une évaluation qualitative de la qualité aromatique par empreinte globale de la phase gazeuse en Spectromètre de Masse (CPG/SM) ou de la matrice (riz entier) en utilisant la Spectrométrie Proche Infra Rouge (SPIR).

En sus de ces objectifs, une méthode semi-quantitative a été développée pour évaluer les principaux composés d'arôme et en particulier le 2-Acetyl-pyrroline (2AP).

2 Approches quantitative et semi-quantitative

2.1 Méthode de référence : EDS

2.1.1 Mise au point méthodologique

La procédure expérimentale a été finalisée (Annexe 1). Elle permet d'effectuer 3 à 4 dosages par journée. Une douzaine de composés volatils potentiellement présents dans le riz ont été injectés 6 fois chacun afin d'en déterminer, avec précision, les temps de rétention et coefficient de réponse (Tableau 1).

La plupart de ces composés sont effectivement retrouvés dans les profils chromatographiques d'un riz aromatique (Figure 1). La collidine n'a pu être utilisée comme étalon interne car un composé est systématiquement présent dans les extraits de riz avec un temps de rétention très proche (21,3 min) de celui de la collidine. Le tetradécane a donc été choisi comme étalon interne. Aucune

Tableau 1. Table de pics des principaux standards de composés volatils

composé	Coefficient de réponse	Temps de rétention (min)
pentanol	17,8	9,4
hexanal	18,3	10,8
hexanol	18,8	14,4
2-acétyl-1-pyrroline	18,9	17,2
E-hept-2-enal	18,0	19,3
octen-3-ol	21,5	20,7
collidine	22,9	21,2
trans oct-2-énal	18,0	25,1
octanol	20,7	25,9
nonanal	20,9	27,7
décanal	15,1	33,1
EE-nona-2,4-diénal	18,8	33,5
E-dec-2-énal	20,0	36,0
EE-dec-2,4-enal	19,6	38,7
Tetradécane	29,9	42,5

trace d'acétophénone (TR = 37,9 min) n'a été détectée dans nos extraits alors même que ce composé a été récemment décrit comme contributeur majeur de l'arôme des riz parfumés (Jezussek et al., 2002).

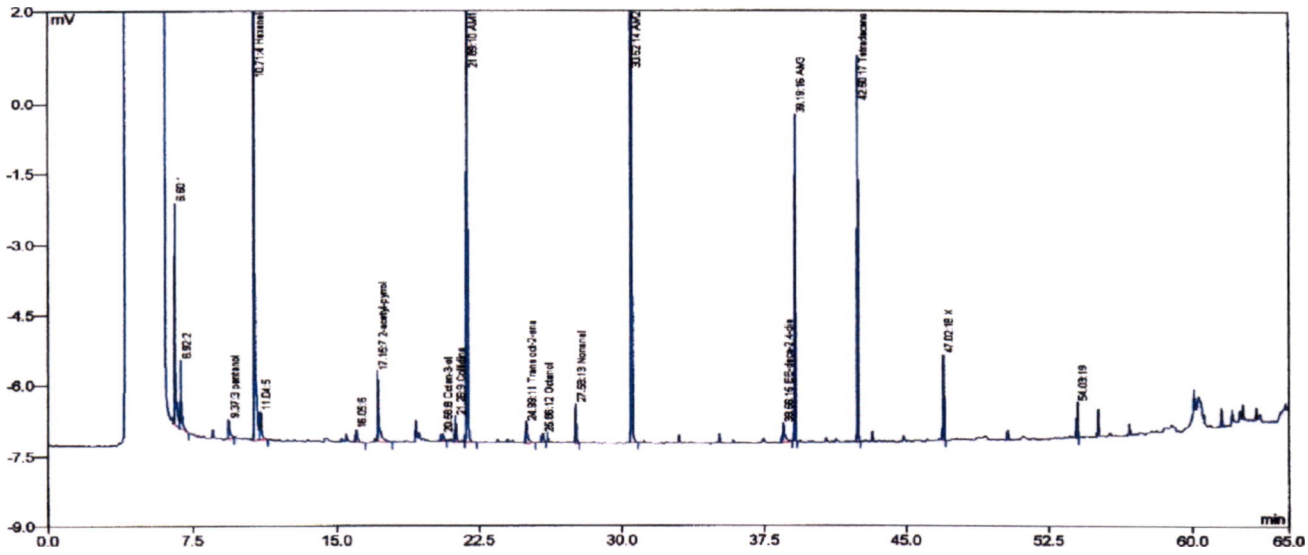

Figure 1. Chromatogramme d'un riz aromatique

2.1.2 Applications à quelques variétés de riz de Camargue

Les teneurs en composés volatils de trois variétés de riz aromatiques (Aychade, Fidji et Giano) et de trois riz non aromatiques (Thaïbonnet, Ariète et Selenio) récoltés en Camargue en 2004 et 2003 ont été analysés par EDS-CPG avec trois répétitions. Les valeurs moyennes des 3 principaux composés d'arôme sont donnés en annexe 3.

Le 2AP est uniquement détecté dans les variétés aromatiques, avec la teneur la plus élevée pour la variété Fidji (Figure 2), près de 300 µg/kg. La teneur en 2AP décroît avec le stockage des grains tandis qu'en parallèle la teneur en hexanal augmente. Les mesures restent assez peu répétables, avec un coefficient de variation de 15 à 30 %, ce qui est l'ordre de grandeur généralement observé pour des composés d'arôme.

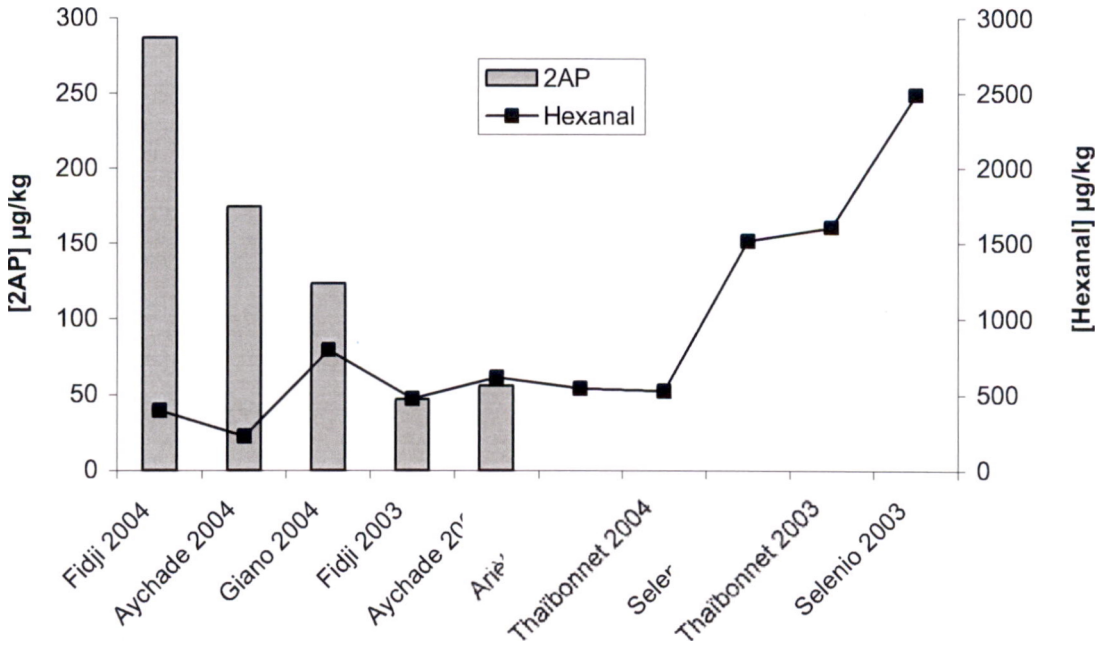

Figure 2. Teneurs en 2AP et hexanal des variétés de riz récoltées en Camargue en 2003 et 2004

La procédure a été appliquée à une quinzaine de variétés issues d'une expérimentation en sélection récurrente (cf action 2 axe 1). Les résultats moyens pour 2 répétitions (Annexe 4, Tableau 2), montrent que la moitié des lignées récurrentes apparaissent aromatiques. Parmi celles-ci, la lignée L 28 paraît la plus prometteuse avec une teneur en 2AP proche de celle de certains parents.

Tableau 2. Teneur en 2AP de lignées récurrentes et de quelques parents

Riz	[2AP] µg/kg	Groupe*
L2	20	A
L3	0	
L6	0	
L8	0	
L10	0	
L16	0	
L18	0	
L23	81	BC
L26	41	A
L28	99	C
Basmati-C621	139	D
Basmati-C621xCarinam	50	AB
HT A 301	99	C
Fidji H20	97	C

** groupes homogènes au seuil de 5 %*

L'écart-type de la résiduelle de la concentration en 2AP est de 17 µg/kg, soit un coefficient de variation de la mesure de 18 %, avec des valeurs respectives de 12 µg/kg et 13 % pour la moyenne de 2 répétitions. La précision de la mesure est donc tout à fait acceptable pour identifier les riz aromatiques, mais aussi pour les scinder en classes d'intensité aromatique.

2.2 Méthode semi-quantitative

2.2.1 Mise au point méthodologique

Le protocole finalisé est explicité en Annexe 2 ; il dérive des essais méthodologiques réalisés pour la mise au point de l'extraction de la méthode qualitative SPME/SM (cf § 3.1.3). Nous avons toutefois apporté quelques modifications à la méthode d'extraction pour la méthode qualitative en :

- diminuant la quantité de riz et d'eau ajoutée (une proportion de 133 µl/g de riz est conservée),
- ajoutant un étalon interne (la collidine) ; l'eau d'imbibition est remplacée par une solution dans l'eau de collidine, préparée extemporanément par dilution d'une solution mère préparée dans du méthanol et conservée au congélateur à –20°C,
- réalisant un contrôle périodique de la fibre (toutes les 10 injections environ), par mise en contact avec l'espace de tête constitué par la solution d'étalon interne seule,
- réalisant l'extraction sous agitation magnétique, ce qui permet une meilleure homogénéisation de l'espace de tête,
- raccourcissant le cycle de température de la CPG, ce qui permet de réaliser un dosage en 40 minutes environ, temps d'extraction compris : on peut alors réaliser 8 à 10 dosages par jour.

Le tetradécane n'a pu être utilisé comme étalon interne, car on observe une pollution importante de l'espace de tête qui se sur-ajoute à l'étalon. Cette pollution pourrait être liée aux conditions expérimentales : bouchon, septum et/ou fibre (cf § 3.1.3.). La collidine a donc été utilisée comme étalon interne. On note alors que le taux de recouvrement de l'étalon interne (pourcentage d'étalon extrait par SPME et dosé par CPG/quantité ajoutée) est en moyenne de l'ordre de 20 %. Il varie toutefois énormément d'un échantillon de riz à un autre : de 9 à 25 %. Cette variation n'est pas aléatoire, mais au contraire répétable : elle reflète donc un comportement différent des riz dont certains fixent plus la collidine que d'autres. On ne peut à l'heure actuelle savoir si ce comportement est général pour l'ensemble des composés volatils. Leur teneur ne peut donc être calculée à l'aide de l'étalon interne (comme cela a été

le cas pour l'EDS). Les teneurs seront calculées directement sans correction à l'aide de la formule :

$$[\text{Composé}]\mu g/kg = \frac{1000 \times \text{Aire Composé}}{CR_{Composé} \times \text{Masse riz}}$$

Où : Aire Composé = aire du composé sur le chromatogramme (mV x min)

$CR_{Composé}$ = coefficient de réponse du composé (mV x min/µg)

Masse du riz = masse de riz extraite (en g)

Le comportement varié des riz vis à vis de la collidine ajoutée reflète peut-être aussi une propension des riz à « relâcher » plus ou moins facilement les composés volatils, en particulier aromatiques. Ceci pourrait être mis en relation avec le caractère aromatique marqué dans la vapeur de cuisson de certains riz qui apparaissent malgré tout peut aromatiques en fin de cuisson.

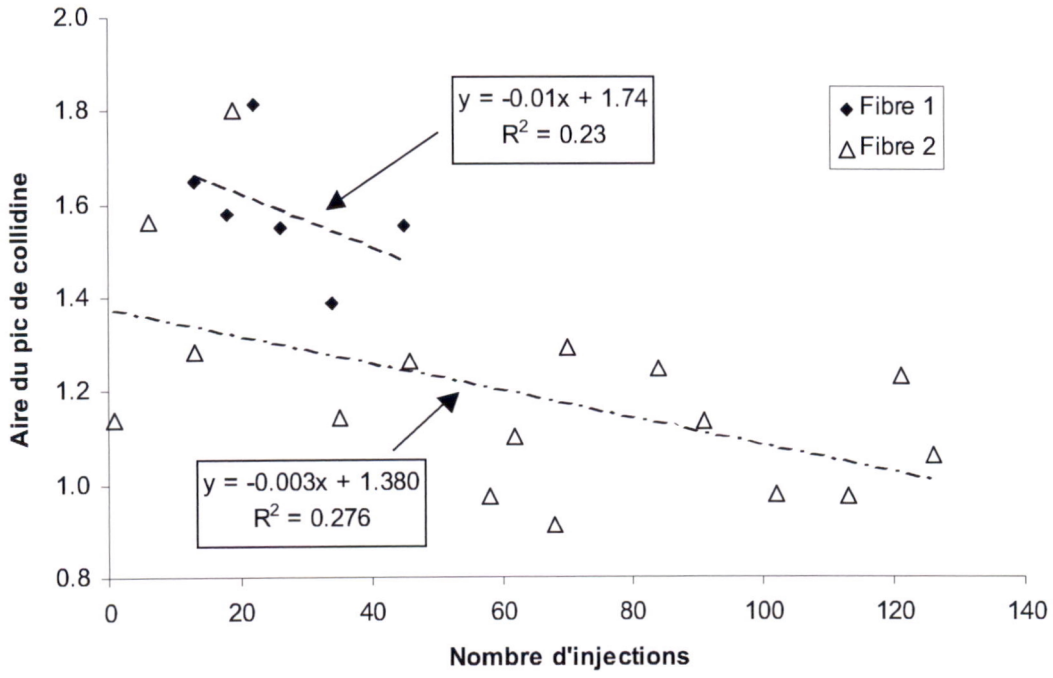

Figure 3. Suivi du contrôle des deux fibres SPME

Deux fibres ont été utilisées lors des différents essais. Leur réponse est comparée à l'aide des essais de contrôle réalisés périodiquement (essai avec une solution de collidine seule). Un faible effet fibre est mis en évidence, la fibre 1 ayant une réponse supérieure de 10 % environ (Figure 3). La réponse décroît par ailleurs légèrement avec le nombre d'utilisations. Aucune

correction des données n'a toutefois été réalisée car ces corrections sont faibles et seraient entachées d'une erreur importante. Un suivi prolongé permettra de préciser la correction nécessaire.

2.2.2 Application sur riz blanchi

La technique SPME a été appliquée sur 6 riz de Camargue issus de la vitrine CFR récoltés en 2004 (3 aromatiques, 3 non aromatiques) et sur les 15 riz issus de l'expérimentation « lignées récurrentes ». Les essais ont été réalisés en double et les valeurs moyennes données en annexe 5.

Le 2AP est détecté dans l'ensemble des riz aromatiques, mais est absent des riz non aromatiques ; la fraction extractible par SPME donne un taux de 2AP variant de 1,1 µg/kg à 9,7 µg/kg (Tableau 3) pour les riz aromatiques, ce qui représente environ 3 à 4 % de la teneur mesurée après extraction par EDS.

Tableau 3. Teneurs en principaux composés volatils après SPME

	2AP	Hexanal	Nonanal
Min-Max (µg/kg)	1,1 - 9,7	15 - 66	6 - 55
Ecart-type (µg/kg)	0,6	4,0	2,0
Coefficient de variation (%)	19	8	21

Rappelons que la part extractible par SPME de l'étalon interne était en moyenne de 20 %. On observe néanmoins une bonne corrélation entre les teneurs mesurées après SPME et EDS (Figure 4). Un seul échantillon (Basmati-C621) s'écarte de la droite de régression entre les deux mesures. L'équation de la droite permet de recalculer la teneur en 2AP d'un échantillon à partir de la mesure en SPME :

$$[2AP\text{-}EDS]_{\mu g/kg} = [2AP\text{-}SPME]_{\mu g/kg} \times 27{,}8$$

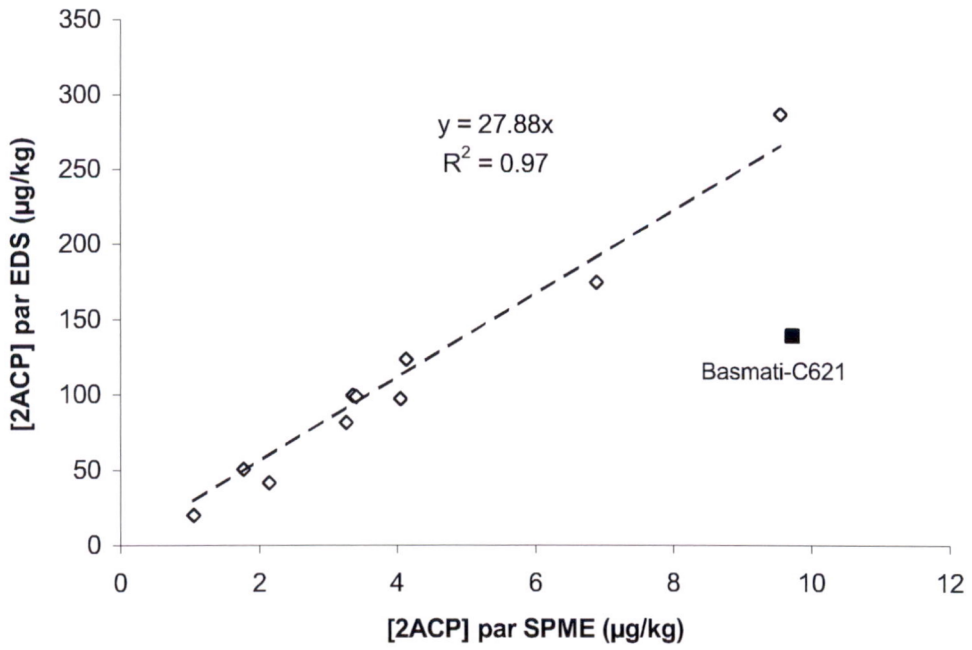

Figure 4. Corrélation entre teneur en 2AP mesurée après EDS ou SPME

Les coefficients de régression des mesures après SPME (Tableau 3) sont du même ordre de grandeur de ceux observés après EDS (cf 2.1.2). L'extraction réalisée par SPME est donc validée pour le dosage du 2AP.

2.2.3 Application sur riz cargo

Le dosage a ensuite été réalisé sur riz cargo pour l'expérimentation « lignées récurrentes » ; les essais ont été réalisés en simple (Annexe 6). On observe une assez bonne corrélation entre les valeurs obtenues par SPME sur cargo et blanchi (Figure 5a) ; les données sont du même ordre de grandeur. La corrélation entre dosage SPME-cargo et EDS-blanchi est aussi relativement satisfaisante (Figure 5b). Cette « calibration » de la méthode SPME-cargo sera poursuivie en année 2 du projet afin de préciser l'équation de prédiction de la teneur en 2AP du riz blanchi à partir d'une mesure rapide effectuée par SPME sur riz cargo.

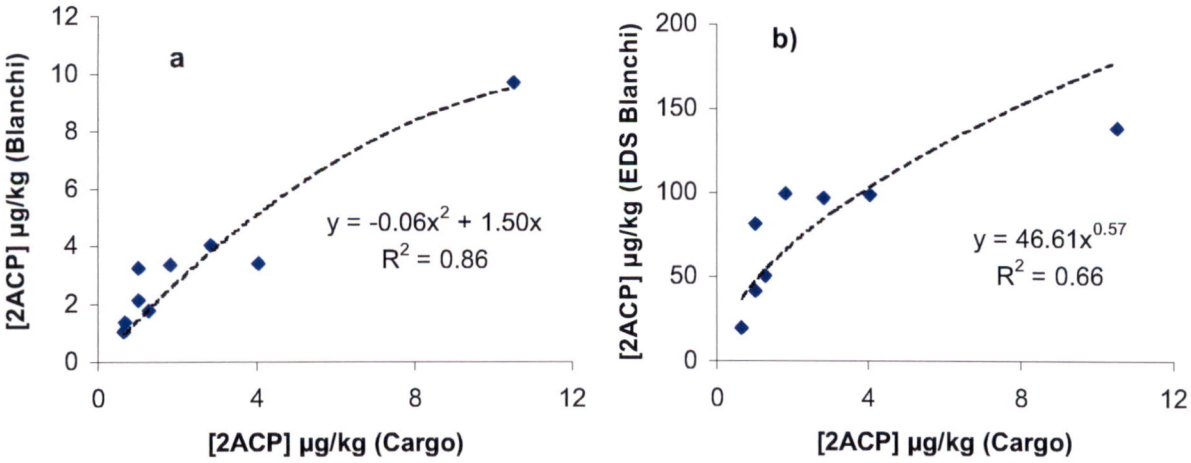

Figure 5. Corrélations entre teneurs en 2AP mesurées par SPME cargo et blanchi (a) ou EDS sur riz blanchi (b)

Cette technique a aussi été appliquée sur 3 riz aromatiques (Giano, Fidji et Aychade) cultivés dans différents sites en Camargue ; les extractions ont été effectuées en simple (Annexe 7). Une analyse de variance permet de montrer que les effets variétés et lieux sont significatifs.

Tableau 4. Comparaison des teneurs en 2AP en fonction de la variété (a) et du lieu de culture (b)

a)	Test LSD ; variable 2ACP Groupes Homogènes, alpha = .05000			
	Variété	2ACP Moyenne	1	2
1	Giano	5.4	****	
2	Fidji	6.3	****	****
3	Aychade	7.0		****

b)	Test LSD ; variable 2ACP Groupes Homogènes, alpha = .05000			
	Lieu	2ACP Moyenne	1	2
3	Les Plaines	4.6	****	
4	Yvan	4.8	****	
5	Sonnaillet	6.2	****	****
6	Tourelles	6.2	****	****
2	Pradeau	7.6		****
1	Vigne	8.7		****

Giano est la variété la moins riche en 2AP, et Aychade la plus riche (Tableau 4). Les lieux « Pradeau » et « Vigne » semblent les plus favorables au développement de l'arôme tandis que les lieux « Les plaines » et « Yvan » seraient les moins favorables. Ces classements devront toutefois être confirmés car les dosages ont été réalisés en simple, sur une expérimentation non équilibrée (les 3 variétés n'ont pas été récoltées sur les 6 lieux) , et pour une seule année de culture. Ceci démontre néanmoins les potentialités d'utilisation de la méthode semi-quantitative rapide pour l'évaluation du potentiel aromatique des riz.

3 Méthodes qualitatives

3.1 Spectrométrie de Masse (SM)

3.1.1 Matériel végétal

61 riz de Camargue ont été utilisés : les 15 échantillons issus de l'essai « lignées récurrentes » (cf § 2.1.2.), 26 échantillons récoltés dans la vitrine CFR (cf Action 4) ainsi que les essais des 3 variétés aromatiques sur différents lieux de culture (cf § 2.2.3). Nous avons ainsi disposé de 29 variétés parfumées et 32 non parfumées. Les riz réceptionnés sous forme paddy et sous emballage papier, ont été conditionnés en bocaux en verre après décorticage.

3.1.2 Méthode expérimentale

3.1.2.1 Extraction

Une fibre DiVinylBenzène/Carboxen/PolyDiMéthylSiloxane (Supelco) spécifique des composés d'arôme a été utilisée. Dès réception, la fibre est conditionnée 1 heure à 270°C, dans un injecteur CPG sous un flux d'Helium de 1,4 l/minute pour limiter l'oxydation de la fibre.

Plusieurs modes d'extraction ont été réalisés. Par commodité, seule la procédure générale sera détaillée ici, les autres traitements étant explicités dans les parties afférentes. Avant chaque série d'analyses, les vials sont rincés avec de l'acétone puis de l'éthanol durant 5 minutes. Les septa sont seulement rincés à l'éthanol. Les vials et septa sont ensuite chauffés 2 heures à 150°C, puis stockés dans un dessiccateur en verre sans graisse et sous léger vide. Enfin, avant chaque extraction, la fibre est mise à désorber 10 minutes dans un injecteur SPME chauffé à 250 °C.

L'échantillon est disposé dans un vial en verre de 10 ml serti d'un bouchon septum en PolyTétraFluoroÉthylène/Silicone (PTFE/Si), en Butyl/Téflon ou en Viton. Ce vial est chauffé à 80°C durant 5 minutes dans une étuve Memert (mise à l'équilibre). La fibre est ensuite mise en contact à 80°C avec l'espace gazeux du vial durant 15 minutes (phase d'adsorption).

3.1.2.2. Acquisition CPG-SM

Une colonne capillaire polaire DB-WAX, de 60 m de long, de 0,32 mm de diamètre interne et de 0,25 µm d'épaisseur de phase est disposée dans un CPG (Agilent, série 6890). Les composés adsorbés sur la fibre sont désorbés dans un injecteur SPME chauffé à 250 °C, durant 4 minutes, en mode split/pulsed splitless. Dans ce mode, une contre-pression de 180 kPa est exercée au niveau de l'injecteur durant 1 minute, afin de concentrer les composés

volatils vers la colonne. Après 4 minutes, la vanne de split est ouverte. Deux programmations de température ont été utilisées :

- Pour l'approche globale, la colonne est maintenue à 220 °C (mode isotherme),
- Pour l'approche séparative, la colonne est chauffée selon le programme suivant : 40°C durant 0 minute suivi d'une rampe de montée en température jusqu'à 250°C (6°C/min), puis d'un palier de température à 250 °C pendant 5 minutes. Ceci conduit à une durée d'analyse de 40 minutes.

En sortie de colonne, une interface CPG-SM chauffée à 260°C assure le trasnfert des composés dans la source d'ionisation du spectromètre de masse (Agilent, série 5973 N). L'ionisation par Impact Electronique est réalisée à 70 eV.

Pour la technique d'empreinte globale, le spectromètre de masse effectue 8,17 spectres de masse par seconde durant 15 minutes. Le programme Pirouette 3.11 (Infometrix Inc., Bothell) somme ensuite l'abondance relative (Ab_t) de chaque fragment entre 2,8 et 8 minutes. Soit pour le fragment de 40 uma :

$$Ab_{40\ uma}^{tot} = \sum_{t=2,8'}^{t=8'} Ab_{t\ 40\ uma} \qquad \text{Avec } Ab_{40\ uma}^{tot}$$

Le fragment suivant de 41 uma est traité de la même manière et ainsi de suite jusqu'au fragment de 200 uma. La plage de masse étudiée en empreinte globale s'échelonne donc de 40 à 200 uma avec un intervalle de 1 uma. L'abondance relative totale en fonction des fragments, constitue l'empreinte globale.

Dans le cas de la méthode séparative, le spectromètre de masse effectue 2,89 spectres de masse par seconde durant 40 minutes. Le signal chromatographique instantané est obtenu en sommant l'abondance relative de chaque ion de 40 à 550 uma, avec un intervalle de 1 uma, pour chaque unité de temps.

$$\text{Signal} = \sum_{i=40\ uma}^{i=550\ uma} Ab_i$$

Les molécules sont ensuite identifiées par comparaison de leur spectre avec la base WILEY.

3.1.2.3. Traitement statistique des données

Les tableaux d'empreinte globale seront traités à l'aide d'une méthode de classification supervisée, la méthode SIMCA (« Soft Independent Modeling of Class Analogy »,

modélisation douce et indépendante des analogies de classes). Ce traitement est réalisé à l'aide du logiciel Pirouette (Infometrix).

La méthode SIMCA réalise une Analyse en Composante Principale (ACP) sur chaque groupe d'échantillons, ou classe. Chaque classe, dans notre cas « aromatique » ou « non aromatique », est ainsi décrit par un modèle d'ACP indépendant. La distance de Mahalannobis (H) caractérise la distance de chaque spectre au centroïde (spectre moyen) de chaque classe. On calcule alors, pour tout nouvel échantillon, sa probabilité d'appartenance (degré de ressemblance au spectre moyen) à chaque classe, par l'intermédiaire d'un test de Fisher sur les valeurs de H.

3.1.3 Mise au point méthodologique

L'extraction de la phase volatile par SPME requiert une attention particulière dans le cas d'une méthode d'empreinte globale car tout composé parasite viendra biaiser la base de matrices spectrales. Or, les données disponibles montrent que la qualité des extraits peut être altérée par le dispositif d'extraction (Bhattacharjee et al., 2003) et le conditionnement de l'échantillon (Sanders et al., 2005).

3.1.3.1. Pollutions liées au dispositif d'extraction

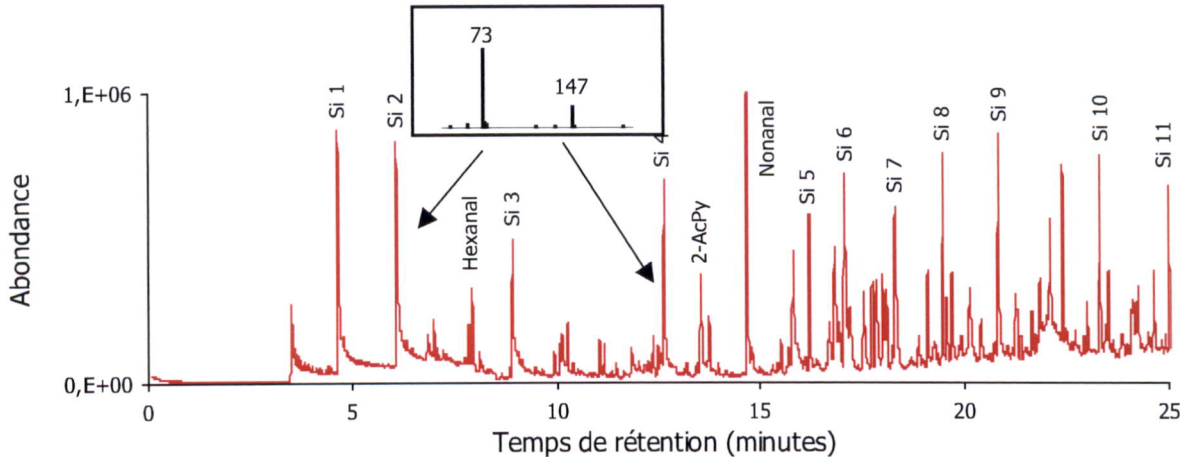

Figure 6. Chromatogramme d'un riz parfumé blanchi (Aychade) après SPME dans un vial serti d'un septum en PTFE/Si

Une analyse chromatographique du riz parfumé blanchi Aychade (Figure 6) révèle la présence de 2 composés d'arôme majeurs du riz parfumé : l'hexanal et la 2-AP. Figurent également des composés plus nombreux et plus abondants présentant les ions 73 et 147 uma, caractéristiques des dérivés silyls (encadré, Figure 6). Ces composés identifiés pour la première fois dans le

riz, appartiennent à la famille des alkyl cyclosiloxanes (Si *x*). Leur présence suggère 3 hypothèses : ces molécules peuvent provenir du support de la colonne en silice, de la fibre en polydiméthylsiloxane ou du septum en silicone. Pour tester la première hypothèse, une analyse chromatographique à blanc (colonne seule) a été réalisée, ne révélant aucun composé. Pour tester la seconde hypothèse, une analyse de la fibre nettoyée 10 minutes à 250°C puis directement injectée ne montre la présence d'aucun composé (Figure 7). Mais quand la fibre, nettoyée dans les mêmes conditions que précédemment, est conditionnée dans un vial vide serti d'un septum en PTFE/Si, deux types de pollutions apparaissent alors : les composés Si *x* précédemment observés et d'autres molécules (notés P *x*) qui apparaissent après 15 minutes (Figure 7).

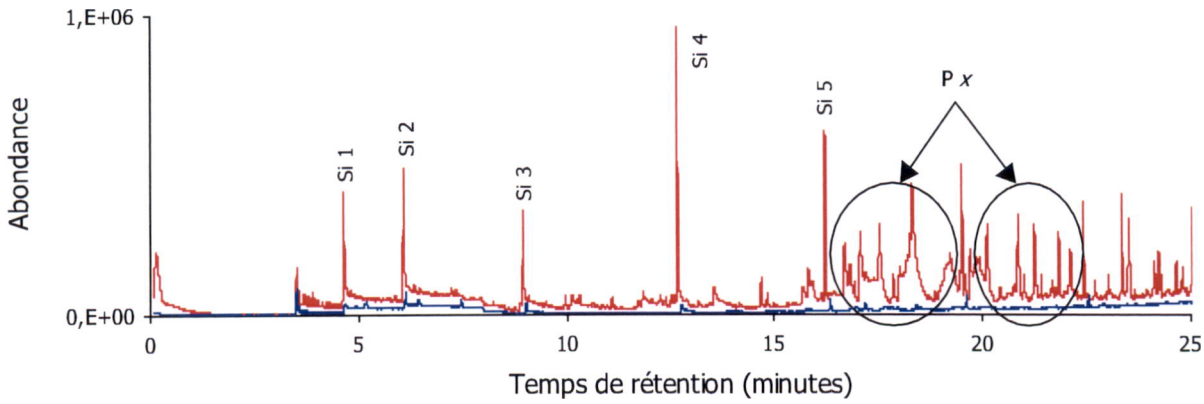

Figure 7. Chromatogrammes d'une fibre nettoyée 10 minutes à 250°C sous flux d'Helium (bleu), et de la même fibre après extraction dans un vial vide serti d'un septum en PTFE/Si (rouge)

A l'inverse des composés Si *x*, les composés P *x* présentent un mode de fragmentation diffus qui couvre la gamme de masse étudiée. Ces pollutions sont toutefois éliminées quand vial et septum sont préalablement lavés à l'éthanol et à l'acétone puis chauffés 2 heures à 150°C (Figure 8).

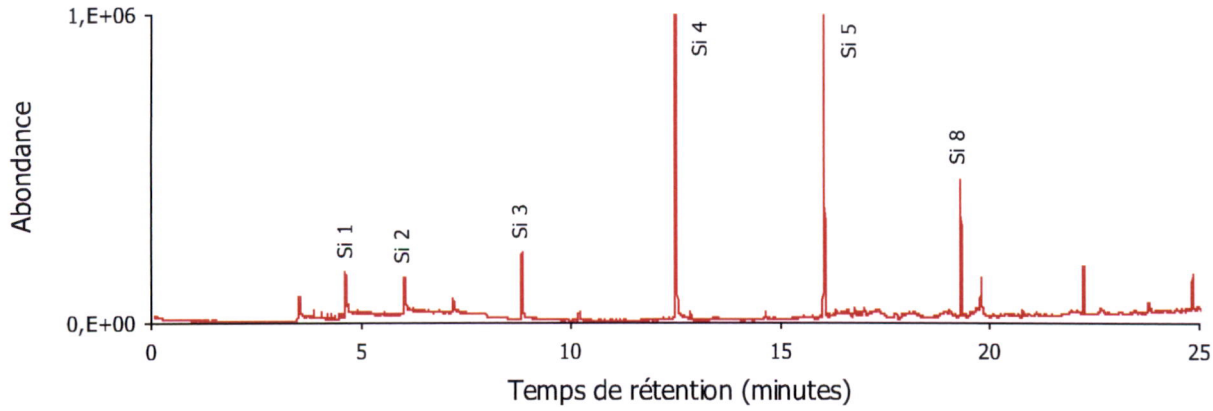

Figure 8. Chromatogramme après extraction à blanc dans un vial vide serti d'un septum en PTFE/Si lavés et chauffés

En revanche, ce traitement n'a pas d'effet sur les composés Si *x*. Ceci nous a amené à tester d'autres septa en Butyl/Téflon et en Viton qui génèrent toutefois le même type de composés Si *x*, mais également, de nouvelles pollutions en quantités importantes, telles que le butylhydroxytoluène. Nous avons donc gardé les septa en PTFE/Si pour la suite de l'étude.

Ces différents résultats suggèrent que les composés Si *x* sont liés à la fibre qui se dégraderait légèrement durant la phase d'équilibre et d'adsorption à 80°C, relarguant ainsi des alkyl cyclosiloxanes qui se fixeraient sur les sites actifs de la fibre.

3.1.3.2. Pollutions liées au conditionnement du riz

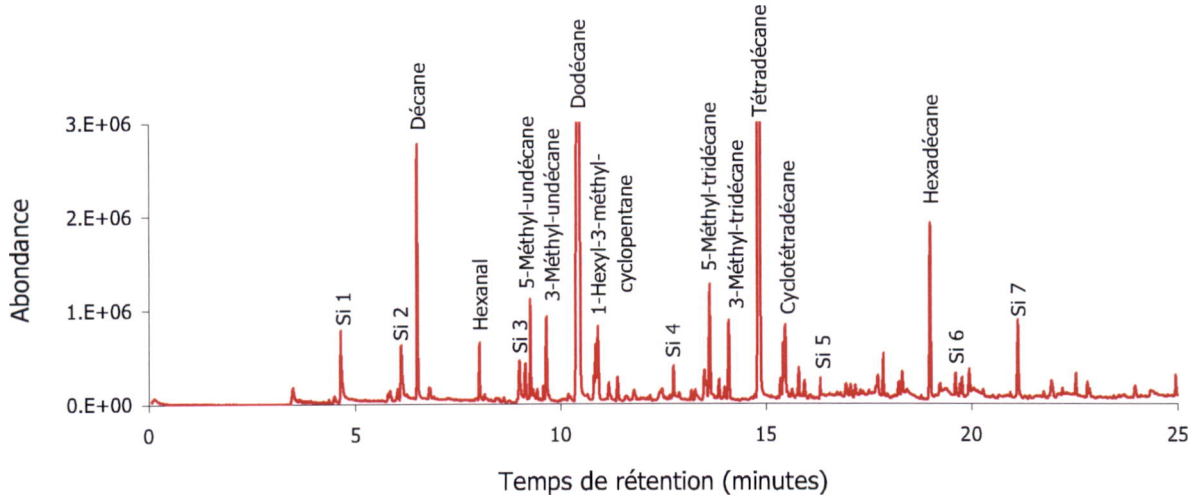

Figure 9. Chromatogramme d'un riz parfumé blanchi (Aychade) conditionné sous emballage plastique durant 6 mois

Un chromatogramme obtenu à partir d'un riz parfumé stocké dans un emballage en PE-HD présente de nombreux composés parasites en forte concentration (Figure 9). Globalement, ces composés appartiennent à la famille des alcanes aliphatiques linéaires (décane, dodécane...) et présentent un mode de fragmentation qui couvre la gamme de masse étudiée. Ces hydrocarbures (absents avec d'autre type d'emballage, comme le papier) pourraient provenir de la migration de monomères du PE-HD vers le riz. Il apparaît aussi que ces pollutions sont plus importantes que celles issues du dispositif d'extraction.

Pour pallier ce problème, nous avons stocké les riz sous forme paddy dans des bocaux en verre munis de bouchons en polypropylène. Ils seront décortiqués juste avant utilisation. Ceci permettra de préserver la 2-AP, de diminuer l'oxydation des lipides et de limiter les pollutions qui seront en grande partie éliminées lors du décorticage.

3.1.3.3. Choix de la quantité d'eau

L'effet de l'eau a été étudié en comparant les quantités de 2-AcPy et d'hexanal extraites à partir de 3,5 grammes de riz parfumé blanchi Aychade additionnés, ou non, de 500 µl d'eau (Figure 10). Trois répétitions ont été réalisées. Un test de comparaison de moyenne montre que l'ajout de 500 µl d'eau (préconisation de Grimm et al., 2001) favorise l'extraction de la 2-AP et de l'hexanal. Globalement, d'autres composés polaires, comme l'oct-1-èn-3-ol, le 2-pentylfurane et le *(E)*-hept-2-ènal sont extraits plus facilement à partir du riz aqueux, tandis que les composés moins polaires, comme le stéarate de butyle, suivent une tendance inverse.

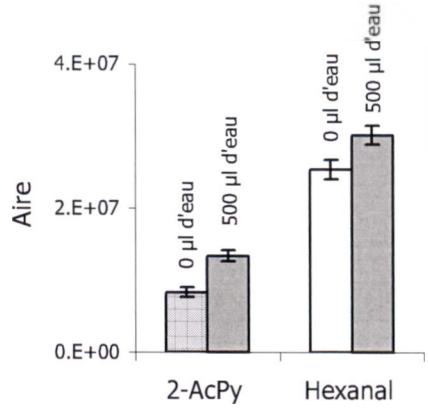

Figure 10. Effet de l'addition d'eau sur l'extraction du 2AP et de l'hexanal

Nous avons donc choisi d'utiliser 3,5 grammes de riz additionnés de 500 µl d'eau pour créer les bases de données spectrales en SPME-SM.

3.1.4 Classification par SM

61 riz de Camargue ont été utilisés dans cette expérimentation. La présence de 2AP a été évaluée pour l'ensemble de ces variétés par la méthode semi-quantitative. 32 ne présentent pas de 2AP et sont notées non aromatiques, tandis que 29, présentant un taux plus ou moins élevé en 2AP sont classées comme aromatiques (Annexe 8).

Les empreintes globales de chacun des riz ont été réalisées sous forme cargo en double (à l'aide de deux fibres) en randomisation totale. Nous disposons ainsi de 122 empreintes : 58 empreintes (29 riz x 2 répétitions) de riz parfumés etr 64 empreintes (32 riz x 2 répétitions de riz non parfumés, Tableau 5). Chaque empreinte est une série de 160 données d'abondance (une donnée pour chaque unité de masse atomique, uma). Afin de limiter le biais lié aux pollutions, les ions caractéristiques des composés Si *x* (73, 147 uma) sont éliminés. D'autre part, les ions s'échelonnant de 40 à 50 uma ne sont pas spécifiques des composés d'arôme, mais peuvent engendrer un bruit de fond ; ils seront donc aussi éliminés.

Tableau 5. Répartition des populations pour le test d'empreinte globale SM

	Population initiale	Population modèle	Jeu de validation
Riz parfumés	29 riz *58 empreintes*	26 riz *52 empreintes*	3 riz *6 empreintes*
Riz non parfumés	32 riz *64 empreintes*	29 riz *58 empreintes*	3 riz *6 empreintes*
Total	61 riz *122 empreintes*	55 riz *110 empreintes*	6 riz *12 empreintes*

Nous avons tenté de classer les riz en fonction de la présence ou de l'absence de 2-AP en utilisant la méthode SIMCA. Pour tester la validité de la méthode, un jeu d'échantillons de validation est extrait par tirage au hasard de 6 variétés parmi les 61 : on met ainsi de côté 12 empreintes (les deux répétitions pour chacune des 6 variétés) qui ne serviront pas à bâtir le modèle de discrimination, mais à en tester la validité. Deux modèles d'ACP ont été construits à partir de la matrice des données centrées des empreintes globales du jeu de calibration : un pour la classe des riz parfumés, un pour la classe des riz non parfumés. Nous avons choisi pour chaque modèle, celui nécessitant un nombre limité de Composantes Principales (CPs), gage d'une meilleure robustesse. Le modèle comporte 23 CPs pour la classe des riz aromatiques, contre 22 pour celle des non aromatiques. La distance H interclasse est de 1,95. Ce résultat est correct, mais perfectible, dans la mesure où une distance H de 3 est requise pour séparer parfaitement les classes. Un test de prédiction de l'ensemble des échantillons du modèle montre que les 110 empreintes sont correctement classées par le modèle de discrimination. Les variétés non aromatiques se regroupent bien en un nuage condensé (en rouge sur la Figure 11. Les variétés aromatiques (en bleu sur le graphique) forment un nuage un peu plus étalé. On remarque par ailleurs que les deux répétitions (la répétition 2 porte le suffixe « _2 » sur le graphique) de chacune des variétés sont proches, même si elles n'ont pas été réalisées avec la même fibre SPME.

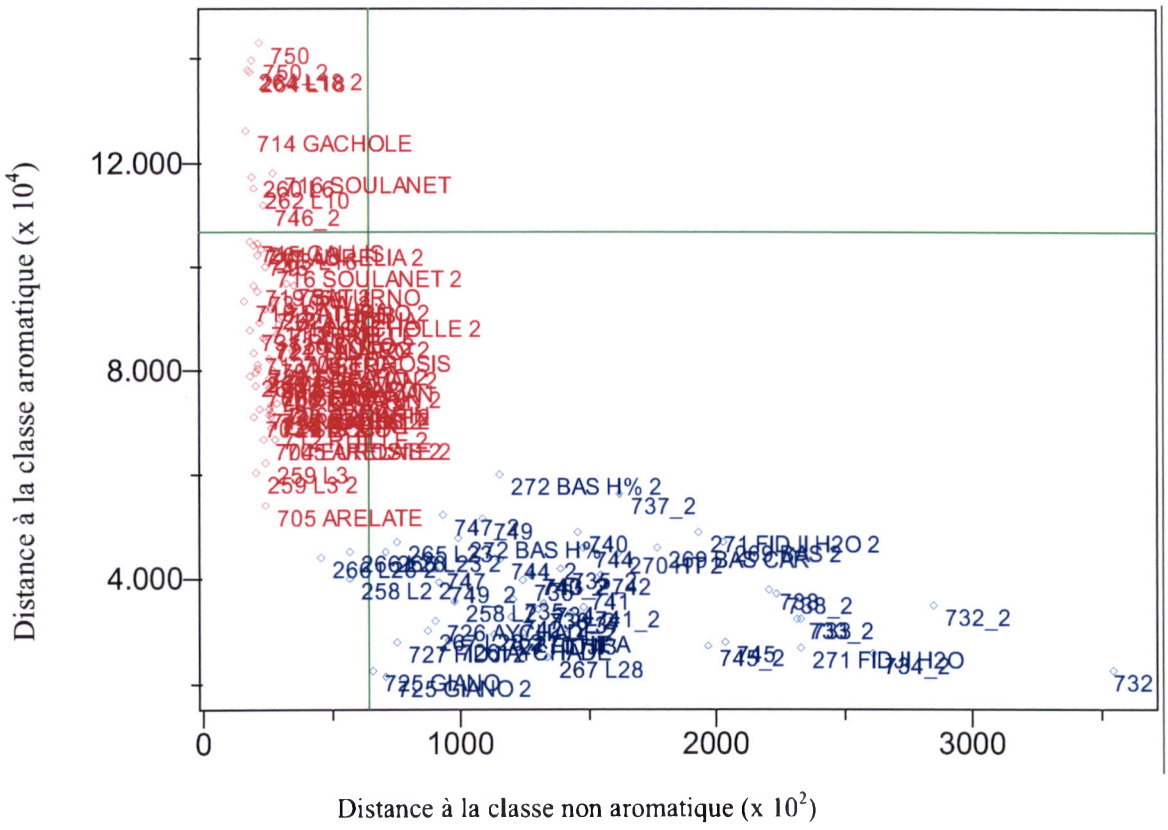

Figure 11. Distances des échantillons (aromatiques ou non aromatiques) par rapport au centroïde des classes aromatique et non aromatique

Un test de prédiction a ensuite été réalisé sur les 12 empreintes du jeu de validation. Les trois variétés non aromatiques sont bien reconnues comme telles par le modèle (Tableau 6), tandis que deux variétés aromatiques sont bien reconnues. Une variété aromatique (268/05) ne peut être affectée par le modèle ni à la classe aromatique, ni à la classe non aromatique. Il faut noter par ailleurs que les deux répétitions d'une même variété sont toujours classées dans la même catégorie.

Tableau 6. Classification des 12 empreintes du jeu de validation

			Classes prédites		
		Effectif	Absence de 2AP	Présence de 2AP	Non classé
Classes réelles	Absence de 2AP	6	6 (708, 709, 718/05)	0	0
	Présence de 2AP	6	0	4 (739, 748/05	2 (268/05)

Le taux de reconnaissance du modèle est donc de 83 %, ce qui est très prometteur. D'autant plus, que la non reconnaissance entraîne une non classification de l'échantillon et non une erreur de classification.

3.1.5 Base moléculaire de la discrimination

La méthode SIMCA permet par ailleurs de calculer le pouvoir discriminant de chaque variable (abondance pour chaque unité de masse). Celui-ci représente, sur une échelle relative, la contribution de chaque variable dans la séparation entre les classes « présence et absence d'arôme ».

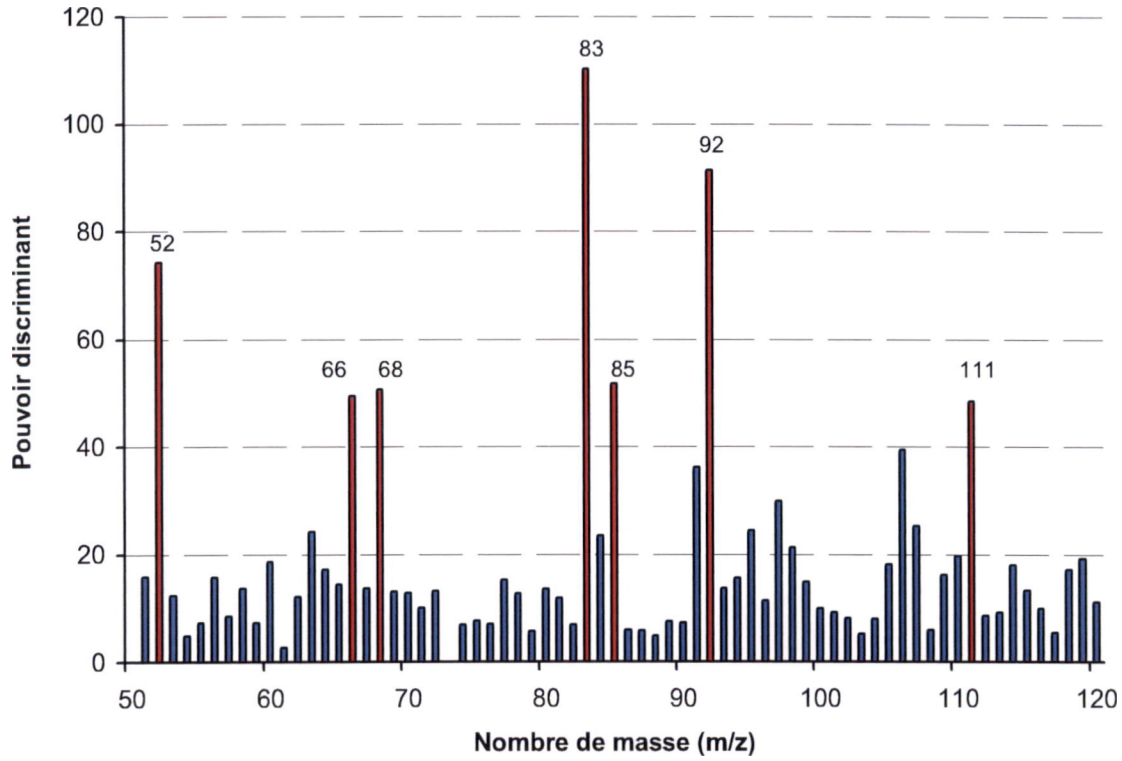

Figure 12. Pouvoir discriminant des ions constituant l'empreinte globale

Parmi les variables possédant un pouvoir discriminant supérieur à 40 (en rouge, Figure 12), figurent les ions 68, 83 et 111 uma, caractéristiques du spectre de massede la 2AP (Figure 13). Ceci démontre *a posteriori* que la discrimination n'est pas fortuite, mais qu'elle est bien basée sur le caractère parfumé des riz.

L'ion 52 uma apporte par ailleurs une contribution importante dans la discrimination entre classe aromatique et non aromatique. Il pourrait révéler le caractère discriminant de la pyridine, détectée dans certains riz parfumés mais absent de riz non parfumés, et qui présente une forte abondance en cet ion dans son spectre de masse. De nouveaux tests seront toutefois nécessaires pour confirmer, ou infirmer, cette hypothèse.

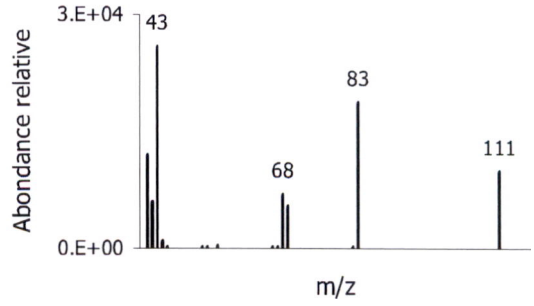

Figure 13. Spectre de masse du 2AP

En conclusion, ces différents résultats montrent que l'empreinte globale SM est d'ores et déjà capable avec un taux de réussite satisfaisant de discriminer les riz de Camargue en fonction de la présence ou de l'absence de 2AP. L'accumulation de données et l'élargissement de la base de référence permettra d'améliorer le pouvoir discriminant (on pourra à terme discriminer entre différentes intensité aromatiques) et la robustesse de la méthode. D'autre part, nous souhaitons à moyen terme, établir une discrimination en fonction du type d'arôme et non seulement en fonction de la présence du 2AP.

3.2 Spectrométrie Proche Infra-Rouge (SPIR)

3.2.1 Matériel végétal

Pour cette étude, nous avons disposé de 117 riz récoltés en Camargue et au Vietnam (Tableau 7). Les riz de Camargue sont ceux ayant servi à l'étude précédente. Les riz du Vietnam ont été ajoutés à cette expérimentation afin d'en augmenter la base de référence, pour gagner en discrimination et robustesse. Il s'agit de trois variétés potentiellement aromatiques, mais cultivées dans différentes conditions agro-climatiques : elles ne sont donc pas toutes aromatiques. Leur teneur en 2AP a été évaluée par la méthode semi-quantitative et les échantillons ont été classés en « aromatique » ou « non aromatique ».

Tableau 7. Répartition des populations pour le test d'empreinte globale SPIR

	Camargue	Vietnam	Total	Modèle	Validation
Riz parfumés	23	42	**65**	53	12
Riz non parfumés	42	10	**52**	44	8
Total	**65**	**52**	**117**	**97**	**20**

Ces 117 riz ont été conditionnés à 20°C et à 65% d'humidité, durant le temps nécessaire pour se stabiliser leur teneur en eau comprise entre 12 et 13%, puis décortiqués et immédiatement conditionnés en bocaux en verre munis de bouchons en polypropylène.

3.2.2 Méthode expérimentale

L'acquisition des spectres est réalisée par un appareil Foss-Perstorp 6500 en mode réflectance, à l'aide d'un module tournant dans lequel est disposée une cellule en quartz de 4 cm de diamètre et 1cm de profondeur. Cette cellule contient approximativement 6 grammes de riz cargo. Les spectres sont acquis en réflexion diffuse de 400 à 2 456 nm (visible et proche infrarouge), avec un pas de 2 nm. Chaque échantillon a été analysé en double avec deux cellules différentes. L'erreur quadratique moyenne (RMS) entre deux échantillons a été calculée. Si elles est inférieure à 300 µabs, le programme ne garde que la moyenne des 2 spectres. Si elle est supérieure à 300 µabs, une troisième répétition est réalisée et la moyenne des 2 spectres présentant la plus faible RMS est calculée. Un pré-traitement des spectres est effectué afin de corriger la dérive de la ligne de base et d'améliorer la résolution des pics. Il consiste à appliquer une correction de dispersion de la lumière de type SNVD (Standard Normal Variate and Detrend) et à calculer la dérivée seconde des spectres. Ceci est réalisé à l'aide du logiciel NIRS 2 version 4.11 (InfraSoft, cf compte rendu Action 5).

3.2.3 Classification par SPIR

Comme précédemment, la méthode SIMCA a été utilisée en extrayant par tirage aléatoire une sous population (jeu de validation : 20 échantillons, Tableau 7) et en définissant le modèle de discrimination sur la population résiduelle (97 échantillons). Une première analyse nous a montré que 3 échantillons (2 dans la population du modèle et 1 dans le jeu de validation) présentait des distances importantes par rapport à la population globale. Ces 3 échantillons ont donc été éliminés. Le modèle de la classe aromatique comporte alors 13 Composantes Principales et celui-ci de la classe non aromatiques, 12. La distance interclasse est relativement faible (0,83), mais l'ensemble de la population d'apprentissage est classé correctement par le modèle (Figure 14).

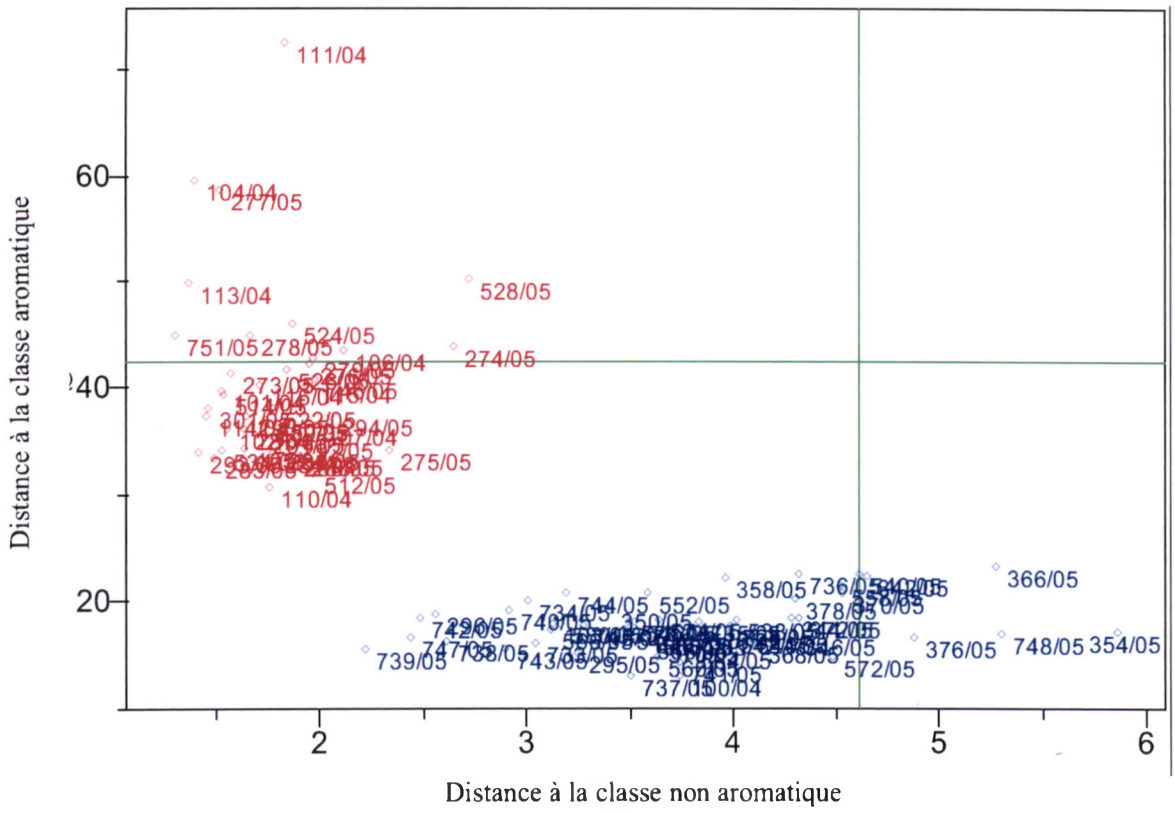

Figure 14. Distances des échantillons (aromatiques ou non aromatiques) du modèle par rapport au centroïde des classes aromatique et non aromatique

Un test de prédiction a ensuite été réalisé sur les 19 échantillons du jeu de validation. Les 7 variétés non aromatiques sont bien reconnues comme telles par le modèle. Sur les 12 variétés aromatiques, 9 sont bien reconnues (Figure 15), mais 1 est classée non aromatique par le modèle (516/05) et 2 ne sont pas classées (362/05 et 732/05). Le taux de reconnaissance est donc de 84 %, ce qui est particulièrement intéressant pour une méthode aussi rapide et aisée à mettre en œuvre.

On peut imaginer par ailleurs que cette technique sera transposable pour être utilisée en routine sur un SPIR de type application. Osborne et al. (1993) ont ainsi proposé d'utiliser ce type de matériel pour authentifier des riz Basmati. Ce type d'appareil n'utilise pourtant que le très proche infra rouge (850-1048 nm), ce qui limite *a priori* son pouvoir discriminant.

Ces études seront donc poursuivies en année 2, en testant par ailleurs leur transférabilité sur un SPIR de type application.

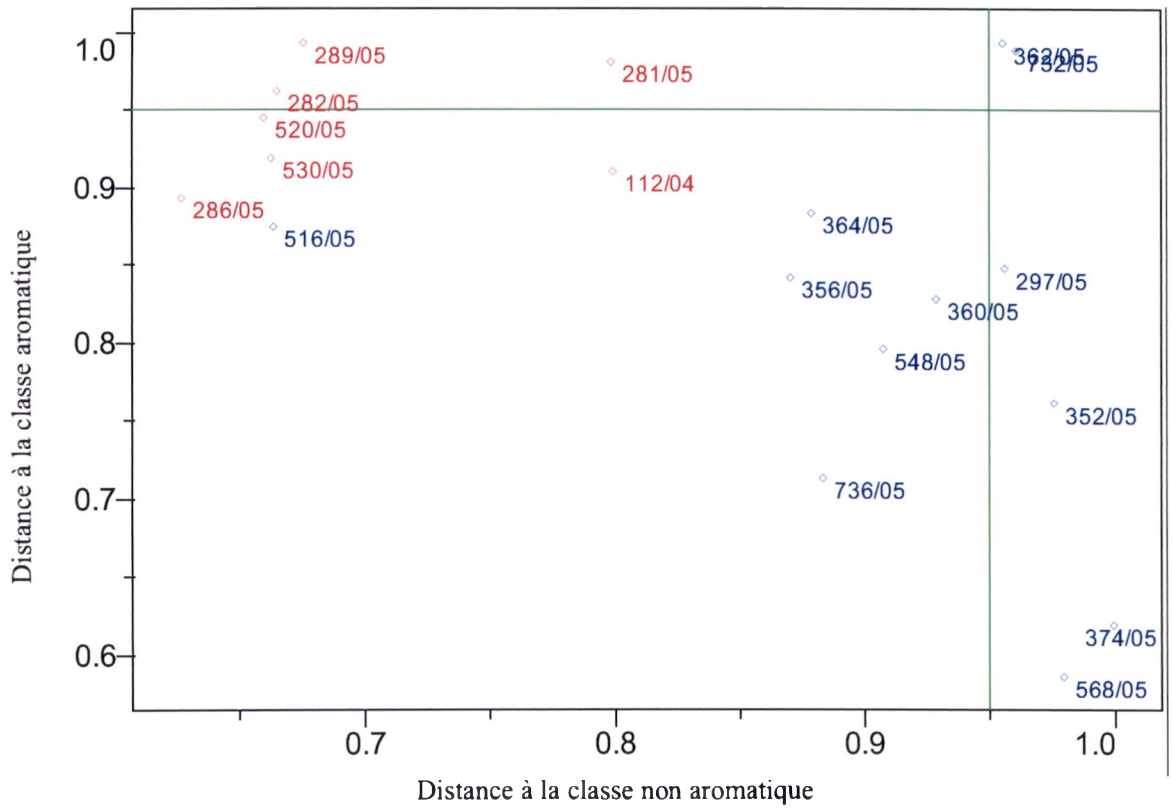

Figure 15. Distances des échantillons (aromatiques ou non aromatiques) du jeu de validation par rapport au centroïde des classes aromatique et non aromatique)

4 Conclusion

Les réalisations peuvent être comparées aux critères de suivi prévus pour cette première année (Tableau 8) du projet.

Tableau 8. Liste indicative des critères de suivi prévus pour la réalisation du projet

Action	Indicateurs de moyen	Indicateurs de résultats
Optimisation des méthodes de dosage quantitatives directes par (CPG)	Tests sur une dizaine de variétés Validation sur riz de Camargue	Méthodologie décrite et opérationnelle Dosage des composés volatils des riz de Camargue
Etalonnage de la méthode CPG	Tests sensoriels et/ou sniffing réalisés	Identification et caractérisation des composés aromatiques majeurs Publication scientifique
Emprunte globale SM et SPIR	100 à 200 échantillons testés	Bases de données construites Publication scientifique

L'optimisation de la méthode quantitative a été réalisée, puis appliquée à plusieurs séries de riz de Camargue (Annexes 3 et 4). Une méthode semi-quantitative a par ailleurs été développée par SPME et extraction directe sur riz blanchi (Annexe 5) puis cargo (Annexes 6

et 7). Celle-ci a été calibrée par rapport à la méthode quantitative directe, puis appliquée à plusieurs séries de riz de Camargue.

Une douzaine de composés volatils ont été identifiés et sont quantifiables par CPG. Nous n'avons toutefois pas réalisé de sniffing ni de tests sensoriels. Nous avons préféré nous focaliser, durant cette première année de projet, sur les tests instrumentaux (méthodes quantitatives, semi-quantitatives et qualitatives) qui sont des conditions nécessaires à la suite du projet et dont les résultats étaient attendus par les partenaires du projet de relance du riz en Camargue (cf Action 2, axe 1).

Les deux méthodes d'empreintes globales (SM et SPIR) ont été développées. Des difficultés techniques majeures ont été rencontrées dans la réalisation du travail sur SM dues aux problèmes de pollution. Ils ont pu être résolu de manière satisfaisante par une conduite expérimentale spécifique (choix des septums, nettoyage et élimination de certaines variables). Les deux méthodes d'empreintes globales présentent d'ores et déjà des taux de reconnaissance élevées (83 et 84 %). Un poster sera présenté en Janvier 2006 sur ce sujet au congrès Agrostat 2006 (http://www.pharma.univ-montp1.fr/agrostat), et une publication scientifique est en cours de rédaction.

Bibliographie

Bhattacharjee, P., Ranganathan, T. V., Singhal, R. S., and Kulkarni, P. R. (2003). Comparative aroma profiles using supercritical carbon dioxide and likens-nickerson extraction from a commercial brand of aroma rice. *J. Sci. Food Agric.* 83, 880-883.

Grimm, C. C., Bergman, C., Delgado, J. T., and Bryant, R. (2001). Screening for 2-acetyl-1-pyrroline in the headspace of rice using SPME/GC-MS. *J Agric Food Chem* 49 (1), 245-9.

Jezussek, M., Juliano, B. O., and Schieberle, P. (2002). Comparison of key aroma compounds in cooked brown rice varieties based on aroma extract dilution analyses. *J Agric Food Chem* 50 (5), 1101-1105.

Sanders R. A., Zyzak D. V., Morsch T. R., Zimmerman S. P., Searles P. M., Strothers M. A., Eberhart B. L., Woo A. K., (2005) Identification of 8-Nonenal as an important contributor to "plastic" off-odor in Polyethylene Packaging. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1713-1716

Osborne, B. G., Mertens, B., Thompson, M., and Fearn, T. (1993). The autentication of Basmati rice using near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectroscopy* 1, 77-83.

ANNEXE 1

Méthode quantitative EDS-CPG

Extraction :

L'extraction et la distillation simultanées sont réalisées à l'aide d'un appareil de type Lickens- Nickerson (Figure 1). 4 ml d'une solution d'étalon interne de tétradécane à 100 µg/ml sont réparties dans le siphon et le ballon de droite. 20 g de riz sont placés dans le ballon à distiller auxquels sont ajoutés 300 ml d'eau en ébullition et 100 µl d'antimoussant (« Anti foam B emulsion », Sigma n° A5757) préalablement dilué au demi. L'extraction dure 30 minutes.

A l'issue des 30 minutes, le solvant organique est récupéré, desséché par 40 mg de sulfate de sodium puis congelé. Il est ensuite concentré sous un jet d'azote jusqu'à 0,3 ml.

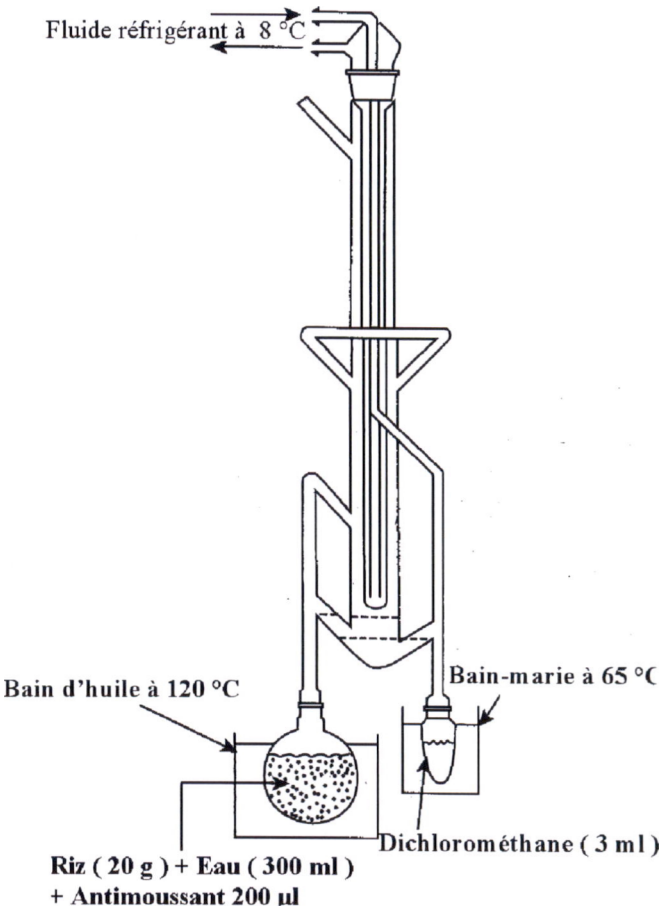

Figure 1. Appareil Lickens- Nickerson

CPG :

Matériel :

CPG Hewlet Packard 5890 série II

Colonne capillaire J&W SCIENTIFIC DB-5, longueur 60 mètres.

Gaz :

Hélium : Pureté 4,6, B 50, Pression détendeur ~ 3 b

Hydrogène : Pureté 4,5, B 20, Pression détendeur = 1,8 b

Air : classe 2, B 50, Pression détendeur = 2,7 b

Conditions opératoires :

Injecteur à 220°C, Split Off au temps initial et durant 2 minutes.

Programmation du four :

- Température initiale de 40°C,
- Pallier de 5 minutes à 40°C,
- Chauffage à 3°C/min jusqu'à une température finale de 220°C,
- Maintien à cette température durant 5 minutes

Détecteur FID à 250°C

ANNEXE 2

Méthode semi-quantitative SPME-CPG

Extraction

Les vials (10 ml) sont préalablement nettoyés avec de l'éthanol et de l'acétone, et les bouchons/septums (PolyTétraFluoroÉthylène/Silicone) avec de l'éthanol. Ils sont ensuite séchés à 150 °C pendant deux heures, puis conservés dans une enceinte sous vide.
On pèse 1,5 g de riz cargo dans un vial auxquels on ajoute 200 µl d'une solution de collidine diluée dans de l'eau à 1 µg/ml et un barreau magnétique. Le vial est scellé puis placé dans un bloc chauffant conditionné à 80°C avec une agitation de 220 rpm. Après équilibre durant 5 minutes, la fibre SPME (DiVinylBenzène/Carboxen/PolyDiMéthylSiloxane, Supelco) est mise en contact avec l'espace de tête durant 15 minutes.

CPG

Les conditions sont voisines de celles décrites en annexe 1, excepté :

- le détecteur est à 250°C, en Split Off durant 5 minutes,
- la montée en température du four se fait en deux étapes : 3°C/minutes jusqu'à 115°C, puis 30°C/min jusqu'à 220°C.

ANNEXE 3

Dosages EDS-CPG sur riz blanchi : Teneur en composés d'arôme de quelques riz de Camargue

Nom	Récolte	n° code	Hexanal (µg/kg)	Nonanal (µg/kg)	2AP (µg/kg)
Aychade	2003	100/04	614	92	56
Fidji	2003	103/04	474	66	47
Thaïbonnet	2003	104/04	1606	249	0
Selenio	2003	118/04	2490	169	0
Ariete	2004	279/05	542	69	0
Thaïbonnet	2004	281/05	525	106	0
Giano	2004	295/05	794	82	123
Aychade	2004	296/05	225	122	175
Fidji	2004	297/05	394	317	287
Selenio	2004	300/05	1514	284	0

ANNEXE 4

Dosages EDS-CPG sur riz blanchi : Teneur en composés d'arôme des variétés récurrentes et de quelques parents

Nom	n° code	Hexanal (µg/kg)	Nonanal (µg/kg)	2AP (µg/kg)
Recurrente L2	258/05	420	83	20
Recurrente L3	259/05	625	89	0
Recurrente L6	260/05	719	66	0
Recurrente L8	261/05	532	75	0
Recurrente L10	262/05	714	74	0
Recurrente L16	263/05	622	44	0
Recurrente L18	264/05	666	68	0
Recurrente L23	265/05	386	47	81
Recurrente L26	266/05	588	77	41
Recurrente L28	267/05	597	43	99
Basmati-C621-V 368-6 plantes	268/05	560	118	139
HT A 301 H%	270/05	1044	79	50
Fidji H2O	271/05	662	118	99
L203/Basmati C621-R2-1 H%	272/05	611	56	97

ANNEXE 5

Dosages SPME-CPG sur riz blanchi :

Teneur en composés d'arôme de quelques riz de Camargue

Nom	n° code	Hexanal (µg/kg)	Nonanal (µg/kg)	2AP (µg/kg)
aychade	296/05	23	22	6.9
fidji	297/05	14	55	9.6
giano	295/05	67	19	4.1
selenio	300/05	54	36	0.0
thaïbonnet	281/05	49	24	0.0
ariete	279/05	38	15	0.0

Teneur en composés d'arôme des variétés récurrentes et de quelques parents

Nom	n° code	Hexanal (µg/kg)	Nonanal (µg/kg)	2AP (µg/kg)
Recurrente L2	258/05	25.4	8	1.1
Recurrente L3	259/05	51.7	6	0.0
Recurrente L6	260/05	50.7	7	0.0
Recurrente L8	261/05	40.6	9	0.0
Recurrente L10	262/05	40.2	11	0.0
Recurrente L16	263/05	51.8	9	0.0
Recurrente L18	264/05	40.1	7	0.0
Recurrente L23	265/05	23.6	6	3.3
Recurrente L26	266/05	40.2	6	2.0
Recurrente L28	267/05	59.5	9	3.4
Basmati-C621-V 368-6 plantes	268/05	40.0	11	9.7
Basmati-C621*Carinam B1-4 IV678	269/05	88.4	26	1.4
HT A 301 H%	270/05	83.7	9	1.8
Fidji H2O	271/05	44.6	11	3.4
L203/Basmati C621-R2-1 H%	272/05	50.3	8	4.0

ANNEXE 6

Dosages SPME-CPG sur riz cargo :

Teneur en composés d'arôme des variétés récurrentes et de quelques parents

Nom	n° code	Hexanal (µg/kg)	Nonanal (µg/kg)	2AP (µg/kg)
Recurrente L2	258/05	46	40	0.7
Recurrente L3	259/05	65	41	0.0
Recurrente L6	260/05	39	31	0.0
Recurrente L8	261/05	45	37	0.0
Recurrente L10	262/05	68	42	0.0
Recurrente L16	263/05	48	47	0.0
Recurrente L18	264/05	50	47	0.0
Recurrente L23	265/05	37	28	1.0
Recurrente L26	266/05	35	27	1.0
Recurrente L28	267/05	33	32	1.8
Basmati-C621-V 368-6 plantes	268/05	37	40	10.5
Basmati-C621*Carinam B1-4 IV678	269/05	76	52	0.7
HT A 301 H%	270/05	83	49	1.3
Fidji H2O	271/05	41	33	4.0
L203/Basmati C621-R2-1 H%	272/05	33	25	2.8

ANNEXE 7

Dosages SPME-CPG sur riz cargo :

Teneur en composés d'arôme de 3 variétés parfumés cultivés sur différents lieux et de quelques croisements

Nom	n° code	Lieu	Hexanal (µg/kg)	Nonanal (µg/kg)	2AP (µg/kg)
Giano	732/05	Vigne	27	38	8.7
	733/05	Pradeau	11	25	6.1
	734/05	Les Plaines	34	40	3.2
	735/05	Yvan	19	32	4.3
	736/05	Sonnaillet	14	52	5.0
	737/05	Tourelles	8	31	4.9
Fidji	738/05	Pradeau	12	37	9.0
	739/05	Tourelles	6	30	5.3
	740/05	Yvan	11	42	4.5
Aychade	741/05	Sonnaillet	11	46	7.4
	742/05	Pradeau	12	31	7.7
	743/05	Les Plaines	15	36	6.1
	744/05	Tourelles	8	42	8.5
	745/05	Yvan	21	32	5.5
R1 101 A1 Fidji/Basmati	746/05		18	28	0.0
HT A 301	747/05		29	28	3.1
RW 114 R 21 L203 / Basmati	748/05		8	25	3.1
RB 138 H1 Basmati/Aychade	749/05		16	30	5.9
R1 110 J M14/Jasmine	750/05		18	42	0.0
RB 138 AD Basmati/Aychade	751/05		12	21	0.0

ANNEXE 8

Teneur en 2AP de variétés de Camargue dosés par SPME sur riz cargo et classes attribuées *(1=non parfumé, 2=parfumé)*

Nom	n° code	2AP (µg/kg)	Classe
L2	258/05	1.1	2
L3	259/05	0.0	1
L6	260/05	0.0	1
L8	261/05	0.0	1
L10	262/05	0.0	1
L16	263/05	0.0	1
L18	264/05	0.0	1
L23	265/05	3.3	2
L26	266/05	2.1	2
L28	267/05	3.4	2
6 PLANTES	268/05	9.7	2
BAS CAR	269/05	1.4	2
HT 2	270/05	1.8	2
FIDJI H2O	271/05	3.4	2
BAS H% 2	272/05	4.0	2
SIS	703/05	0.0	1
EUROSIS	704/05	0.0	1
ARELATE	705/05	0.0	1
TAMARIN	706/05	0.0	1
BRAVO	707/05	0.0	1
AUGUSTO	708/05	0.0	1
ARIETE	709/05	0.0	1
FARAMAN	710/05	0.0	1
THAÏB	711/05	0.0	1
RUILLE	712/05	0.0	1
MISTRAL	713/05	0.0	1
GACHOLLE 2	714/05	0.0	1
GALLIS	715/05	0.0	1
SOULANET	716/05	0.0	1
AURELIA	717/05	0.0	1
GLADIO	718/05	0.0	1
SATURNO	719/05	0.0	1
EOLO	720/05	0.0	1
TANARO	721/05	0.0	1
SILLARO 2	722/05	0.0	1
SPRINT	723/05	0.0	1
RF	724/05	0.0	1
GIANO	725/05	4.1	2
AYCHADE	726/05	6.9	2
FIDJI	727/05	9.6	2
RW	731/05	0.0	1

ANNEXE 8
(Suite)

Nom	Code	2AP (µg/kg)	Classe
Giano	732/05	8.8	2
Giano	733/05	7.1	2
Giano	734/05	4.2	2
Giano	735/05	5.4	2
Giano	736/05	6.1	2
Giano	737/05	6.0	2
Fidji	738/05	8.9	2
Fidji	739/05	6.3	2
Fidji	740/05	5.6	2
Aychade	741/05	8.0	2
Aychade	742/05	8.2	2
Aychade	743/05	7.0	2
Aychade	744/05	8.7	2
Aychade	745/05	6.5	2
R1 101 A1 Fidji/Basmati	746/05	0.0	1
HT A 301	747/05	3.1	2
RW 114 R 21 L203 / Basmati	748/05	3.1	2
RB 138 H1 Basmati/Aychade	749/05	5.9	2
R1 110 J M14/Jasmine	750/05	0.0	1
RB 138 AD Basmati/Aychade	751/05	0.0	1