



21 MAI 1997

ATTI del CONGRESSO a cura della RIVISTA ITALIANA EPPOS

15^{èmes} Journées Internationales
Huiles Essentielles

5,6 & 7 SEPTEMBRE 1996

PRODUCTION ET ETUDE
DES MATIERES VEGETALES
AROMATIQUES

COMITE SCIENTIFIQUE

Président: Dr Louis PEYRON (Grasse)
Pr DERBESY (E.S.C.M. Marseille)
Dr FLAMENT (Firmenich - Genève)
M. KOSSIAKOFF
Dr MARION (Nestec - Vevey)
M. PELLERIN (CAL - Grasse)
Dr PICKENHAGEN (U.S.A.)
Dr RICHARD (INSIA - Massy)
Dr TOUCHE (C.E.A.M.S. - Avignon)
M. ZOLA (Adrian - Marseille)

COMITE APPAM

Président: Yves COMTE
M. ALLARI
M. BONEBEAU
M. BOYER
M. CARTERON
M. FERAUD
Mme ROSI

SECRETARIAT:

Mme FRISON Marylou
Chambre d'Agriculture
66 Bd Gassendi - B.P. 117
F. 04004 - DIGNE LES BAINS Cédex
Tél: 92.32.03.83
Télécopie: 92.32.10.12

913076

Les champignons supérieurs (Basidiomycetes): nouvelle source de production de monoterpènes pour l'industrie aromatique?

Sophie Breheret,^{*} Thierry Talou,^{*} Sylvie Rapior,[†] and Jean-Marie Bessière[§]

^{*} Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, Institut National Polytechnique de Toulouse, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, 118 route de Narbonne, F-31077 Toulouse cedex.

[†] Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier I, 15 av. C. Flahault, F-34060 Montpellier cedex 1.

[§] Laboratoire de Chimie appliquée, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, 8 rue de l'Ecole Normale, F-34053 Montpellier.

INTRODUCTION

Les industries de la parfumerie et de l'aromatique sont en perpétuelle recherche de nouvelles sources de molécules odorantes "naturelles". Les champignons supérieurs, qui possèdent des odeurs très variées, semblent être une voie prometteuse de bioproduction de substances odorantes (Abraham et Berger, 1994).

L'odeur caractéristique fongique de nombreux champignons est attribuée à la série des composés oxygénés à 8 atomes de carbones. L'oct-1-én-3-ol est le plus important d'entre eux (Cronin et Ward, 1971; Pyysalo, 1976; Maga, 1981; Tressl *et al.*, 1982; Mau *et al.*, 1994).

Toutefois de nombreuses autres espèces possèdent un arôme très particulier et très typé du à des composés chimiques différents: sulfure de méthyle, benzaldehyde, alcool benzylique, *trans*-non-2-énal, lactones (Talou *et al.*, 1987; Audouin *et al.*, 1989; Gross et Asther, 1989; Wood *et al.*, 1990; Buchbauer *et al.*, 1993; Wood *et al.*, 1994). Très peu d'études ont été

réalisées sur la production de monoterpènes par les champignons supérieurs (Basidiomycetes). Alors que les cultures mycéliennes en milieux liquide et solide sont connues pour produire des quantités importantes de monoterpènes, souvent responsables d'odeurs intenses et agréables (Collins et Halim, 1970; Halim et Collins, 1971; Sastry *et al.*, 1980; Drawert *et al.*, 1983; Berger *et al.*, 1986a, b; Hanssen, 1986; Hanssen et Abraham, 1986; Hanssen *et al.*, 1986; Gallois *et al.*, 1990; Abraham *et al.*, 1993; Abraham et Berger, 1994; Abraham *et al.*, 1994; Bensoussan *et al.*, 1995; Krings *et al.*, 1995), et pour convertir aisément certains monoterpènes (Busmann et Berger, 1994a, b, c), des quantités minimales ont été détectées parmi les composés volatils produits par les carpophores d'espèces sauvages de champignons supérieurs (Pyysalo, 1976; Vidal *et al.*, 1986; Audouin *et al.*, 1989; Buchbauer *et al.*, 1993; Rapior *et al.*, 1996a,b).

Dans le cadre d'une étude sur la chémotaxonomie des champignons basée sur leurs arômes, la caractérisation des composés volatils produits par les carpophores frais de 80 espèces de champignons sauvages a été réalisée par analyse directe des effluves au travers de concentration cryogénique directe sur piège TENAX et par extraction au dichlorométhane, l'identification chimique des composés volatils étant effectuée par GC/MS.

PROCEDURES EXPERIMENTALES

Matériel. Un total de 80 espèces de champignons sauvages ont été collectés en automne 1994 et 1995 en France. Les champignons ont été identifiés par l'un d'entre nous (SR) et sur la base de la classification de Courtecuisse et Duhem (1994).

Espèces étudiées seulement par analyse directe des effluves:

Agaricus silvicola (Vitt.) Peck, *Boletus aestivalis* (Paulet) Fr., *Cortinarius cinnamomeus* (L.: Fr.) Fr., *Cystoderma carcharias* (Pers.: Fr.) Fayod, *Laccaria amethystina* (Huds.) Cooke, *Lactarius salmonicolor* Heim & Leclair, *Mycena rosea* (Bull.) Gramberg.

Espèces étudiées par extraction au dichlorométhane:

Agaricus campestris L.: Fr., *Albatrellus ovinus* (Sch.: Fr.) Kotl. & Pouz., *Aleuria aurantia* (Pers.: Fr.) Fuckel, *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Pers., *Amanita gemmata* (Paulet) Bertillon, *Amanita pantherina* (De Cand.: Fr.) Krombholz, *Amanita phalloides* (Vaill.: Fr.) Link, *Amanita proxima* Dumée, *Amanita rubescens* (Pers.: Fr.) S.F. Gray, *Amanita spissa* (Fr.) Kummer, *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer, *Boletus aereus* Bull.: Fr., *Boletus calopus* Pers.: Fr., *Boletus edulis* Bull.: Fr., *Boletus luridus* Sch.: Fr., *Boletus radicans* Pers.: Fr., *Cantharellus lutescens* Pers.: Fr., *Cantharellus tubiformis* Fr.: Fr., *Chroogomphus rutilus* (Sch.: Fr.) O. K. Miller, *Clathrus ruber* [Mich.] ex Pers.: Pers., *Clavariadelphus pistillaris* (L.: Fr.) Donk, *Clitocybe geotropa* (Bull.: Fr.) Quélet, *Cortinarius cotoneus* Fr., *Cortinarius orellanus* Fr., *Ganoderma lucidum* (Leyss.: Fr.) Karsten, *Hebeloma sinapizans* (Paulet) Gillet, *Helvella crispa* (Scop.: Fr.) Fr., *Hygrophorus russula* (Sch.: Fr.) Quélet, *Leccinum aurantiacum* (Bull.) S.F. Gray, *Leccinum lepidum* (Bouchet ex Essette) Quadraccia, *Leccinum pulchrum* Lannoy & Estades, *Leccinum quercinum* Pilat & Dermek, *Leccinum versipelle* (Fr.) Snell, *Lentinellus cochleatus* (Hoffin.: Fr.) Karsten, *Clitocybe graminicola* Bon, *Lepista inversa* (Scop.) Patouillard, *Oligoporus caesius* (Schrad.: Fr.) Gilberston & Ryvarden, *Paxillus atrotomentosus* (Batsch: Fr.) Fr., *Paxillus involutus* (Batsch: Fr.) Fr., *Paxillus panuoides* (Fr.: Fr.) Fr., *Pisolithus arrhizus* (Scop.) S. Rauschert, *Russula amoenicolor* Romagnesi, *Suillus bovinus* (L.: Fr.) O. Kuntze, *Suillus collinitus* (Fr.) O. Kuntze, *Suillus granulatus* (L.: Fr.) Roussel, *Suillus grevillei* (Klotzsch) Singer, *Suillus variegatus* (Sw.: Fr.) O. Kuntze, *Suillus viscidus* (L.) Roussel, *Tricholoma columbetta* (Fr.: Fr.) Kummer,

Tricholoma equestre (L.: Fr.) Kummer, *Tricholoma saponaceum* (Fr.: Fr.) Kummer, *Xerocomus badius* (Fr.: Fr.) Gilbert, *Xerocomus pruinatus* (Fr.) Quélet, *Xerocomus subtomentosus* (L.: Fr.) Quélet.

Espèces étudiées par analyse directe des effluves et par extraction au dichlorométhane:

Agrocybe aegerita (Brig.) Fayod, *Amanita citrina* (Sch.: Fr.), *Amanita ovoidea* (Bull.: Fr.) Link, *Cantharellus cibarius* (Fr.: Fr.) Fr., *Clitocybe nebularis* (Batsch: Fr.) Kummer, *Clitocybe odora* (Bull.: Fr.) Kummer, *Cystoderma amianthinum* (Scop.) Fayod, *Gomphidius glutinosus* (Sch.: Fr.) Fr., *Hydnum repandum* L.:Fr., *Hygrophoropsis aurantiaca* Wulf.: Fr., *Hygrophorus agathosmus* (Fr.) Fr., *Lepista nuda* (Bull.: Fr.) Cooke, *Marasmius alliaceus* (Jacq.: Fr.) Fr., *Mycena pura* (Pers.: Fr.) Kummer, *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) Karst., *Suillus luteus* (L.: Fr.) Roussel, *Tricholoma caligatum* (Viv.) Ricken, *Tricholoma portentosum* (Fr.) Quélet, *Tricholoma sulfureum* (Bull.: Fr.) Kummer.

Analyse directe des effluves. Entre 4 et 88 g de champignons frais coupés en cubes, sont placés dans une cellule en verre (0.25 L), directement connectée à un système concentrateur des effluves (CHISA device-SGE). Les produits volatils sont concentrés sur un piège en TENAX avec un gaz de balayage (Hélium) de 30 mL/min pendant 20 min à température ambiante.

Extraction au dichlorométhane. Entre 50 to 250 g de carpophores frais, coupés en cubes sont utilisés pour l'extraction. Les composés volatils sont extraits au Soxhlet à l'aide de dichlorométhane pendant 5h.

Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse. Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (5890-Hewlett-Packard) couplé à un détecteur de masse (5971-Hewlett-Packard) (70 eV, ionisation à impact électronique).

L'analyse directe des effluves est réalisée à l'aide d'un injecteur headspace (CHISA device-SGE). Les composés volatils sont séparés sur une colonne capillaire BP1 (50 m x 0.22 mm x 1 µm diméthylpolysiloxane). La pression du gaz vecteur (Hélium) est fixée à 1,8 bars. Les températures respectives de l'injecteur et du détecteur sont 210°C et 250°C. La programmation de température utilisée est de 50°C à 220°C, à 3°C/min.

Les analyses des extraits solvant sont réalisées sur une colonne capillaire DB1 (25 m x 0.25 mm x 0.13 µm diméthylpolysiloxane). La pression du gaz vecteur (Hélium) est 0.9 mL/min. Les températures respectives de l'injecteur et du détecteur sont 200°C et 220°C. La programmation de température utilisée est de 60°C (2 min) à 200°C à 4°C/min.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les analyses directes des effluves révèlent la présence de monoterpènes chez 20 espèces parmi les 28 étudiées par cette technique. L'extraction au solvant révèle la présence de monoterpènes chez 19 espèces parmi les 73 étudiées. Les tableaux 1 et 2 indiquent les pourcentages de production de monoterpènes les plus élevés, pour chacune des deux méthodes. De nombreux monoterpènes ont été détectés à l'état de traces.

Les 28 monoterpènes identifiés sont: α -thujène, α -pinène, α -fenchène, camphène, sabinène, β -pinène, myrcène, p-mentha-2,8-diène, p-mentha-3,8-diène, α -phellandrène, α -terpinène, p-cymène, β -phellandrène, limonène, γ -terpinène, *trans*-hydrate de sabinène, fenchone, linalol, terpinolène, *cis*-hydrate de sabinène, fenchol, hydrate de camphène, pipéritol, 1,8-cinéole, *cis*-oxyde de linalol (furane), *trans*-oxyde de linalol (furane), oxyde de linalol (pyrane), pipéritone.

Cette étude montre une grande diversité de monoterpènes produits par les carpophores: composés en C₁₀H₁₆ et C₁₀H₁₈O, linéaires, cycliques et bicycliques.

Tableau 1: Monoterpènes majoritaires identifiés chez quelques champignons supérieurs par analyse directe des effluves.

MONOTERPENE	ESPECE	% relatif
β -phellandrène	<i>Amanita ovoidea</i>	28%
limonène	<i>Amanita ovoidea</i>	28%
	<i>Tricholoma caligatum</i>	26%
β -pinène	<i>Gomphidius glutinosus</i>	20%
α -pinène	<i>Tricholoma caligatum</i>	17%
	<i>Gomphidius glutinosus</i>	16%

Tableau 2: Monoterpènes majoritaires identifiés chez quelques champignons supérieurs par extraction au dichlorométhane.

MONOTERPENE	ESPECE	% relatif
limonène	<i>Amanita phalloides</i>	45%
	<i>Gomphidius glutinosus</i>	27%
<i>cis</i> -oxyde de linalol (furane)	<i>Lepista nuda</i>	45%
	<i>Clitocybe nebularis</i>	12%
<i>cis</i> -hydrate de sabinène	<i>Amanita ovoidea</i>	10%

Tous les monoterpènes ont été identifiés d'après leurs données spectrales en comparaison avec celles de la banque de données NBS (Hewlett-Packard), les données bibliographiques (Jennings *et al.*, 1980; Stenhagen *et al.*, 1976) et les indices de Kovats (Davies, 1990).

Les monoterpènes les plus fréquemment identifiés par l'analyse directe des effluves sont l' α -pinène, le camphène, le β -phellandrène, le limonène et le linalol; et ceux les plus fréquemment identifiés par l'extraction au solvant sont le limonène et le linalol.

La diversité des monoterpènes identifiés dans cette étude et leurs teneurs élevées, jusqu'à 45% dans les extraits, confirme le potentiel de biosynthèse des champignons supérieurs à produire de telles molécules.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham B.G.; Berger R.G. Higher Fungi for Generating Aroma Components Through Novel Biotechnologies. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2344-2348.
- Abraham B.G.; Krings U.; Berger R.G. Dynamic Extraction, an Efficient Screening Procedure for Aroma Producing Basidiomycetes. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1993**, *15*, 178-181.
- Abraham B.G.; Krings U.; Berger R.G. Biotechnological Production of Compounds by Basidiomycetes. *GIT Fachz. Lab.* **1994**, *38*, 372-375.
- Audouin P.; Vidal J.P.; Richard H. Volatile Compounds from Aroma of some Edible Mushrooms: Morel (*Morchella conica*), Wood Blewitt (*Lepista nuda*), Clouded Agaric (*Clitocybe nebularis*), and False Chanterelle (*Hygrophoropsis aurantiaca*). *Sci. Aliments* **1989**, *9*, 185-193.
- Bensoussan M.; Tisserand E.; Kabbaj W.; Roussos S. Partial Characterization of Aroma Produced by Submerged Culture of Morel Mushroom Mycelium. *Cryptogamie, Mycol.* **1995**, *16*, 65-75.

- Berger R.G.; Neuhäuser K.; Drawert F. Characterization of the Odour Principles of Some Basidiomycetes: *Bjerkandera adusta*, *Poria aurea*, *Tyromyces sambuceus*. *Flavour Fragr. J.* **1986a**, *1*, 181-185.
- Berger R.G.; Neuhäuser K.; Drawert F. Biosynthesis of flavor Compounds by Microorganisms. 6. Odorous Constituents of *Polyporus durus* (Basidiomycetes). *Z. Naturforsch.* **1986b**, *41c*, 963-970.
- Buchbauer G.; Jirovezt L.; Wasicky M.; Nikiforov A. The Aroma of Edible Mushrooms. Headspace Analysis Using GC/FID and GC/FTIR/MS. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1993**, *197*, 429-433.
- Busmann D.; Berger R.G. Bioconversion of Terpenoid Hydrocarbons by Basidiomycetes. In *Trends in Flavour Research*; Maarse H.; Van Der Heij D.G.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, **1994a**.
- Busmann D.; Berger R. G. Conversion of Myrcene by Submerged Cultured Basidiomycetes. *J. Biotechnol.* **1994b**, *37*, 39-43.
- Busmann D.; Berger R.G. Oxyfunctionalization of α - and β -Pinene by Selected Basidiomycetes. *Z. Naturforsch.* **1994c**, *49c*; 545-552.
- Collins R.P.; Halim A.F. Production of Monoterpenes by the Filamentous Fungus *Ceratocystis variospora*. *Lloydia* **1970**, *33*, 481-482.
- Courtecuisse R.; Duhem B. *Guide des Champignons de France et d'Europe*; Delachaux and Niestlé: Lausanne-Paris, France, **1994**.
- Cronin D.A.; Ward M.K. The Characterisation of Some Mushroom Volatiles. *J. Sci. Food Agric.* **1971**, *22*, 477-479.
- Davies N.W. Gas Chromatographic retention Indices of Monoterpenes and Sesquiterpenes on Methyl Silicone and Carbowax 20 M Phases. *J. Chromatogr.* **1990**, *503*, 1-24.

- Drawert F.; Berger R.G.; Neuhäuser K. Biosynthesis of Flavor Compounds by Microorganisms. 4. Characterization of the Major Principles of the Odor of *Pleurotus euosmus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1983**, *18*, 124-127.
- Gallois A.; Gross B.; Langlois D.; Spinnler H.E.; Brunerie P. Influence of Culture Conditions on Production of Flavour Compounds by 29 Ligninolytic Basidiomycetes. *Mycol. Res.* **1990**, *94*, 494-504.
- Gross B.; Asther M. Aromas from Basidiomycetes: Characteristics, Analysis and Productions. *Sci. Aliments* **1989**, *9*, 427-454.
- Halim A.F.; Collins R.P. An Analysis of the Odorous Constituents of *Trametes odorata*. *Lloydia* **1971**, *38*, 451-452.
- Hanssen H.P. Volatile Terpenes from Sapwood Staining Fungi. In *Progress in Terpene Chemistry*; Joulain D.; Editions Frontieres: Gif-sur-Yvette, France, **1986**.
- Hanssen H.P.; Abraham W.R. Volatiles from Liquid Cultures of *Lentinellus cochleatus* (Basidiomycotina). *Z. Naturforsch.* **1986**, *41c*, 959-962.
- Hanssen H.P.; Sinnwell V.; Abraham W.R. Volatile Fragrance Compounds From the Fungus *Gloeophyllum odoratum* (Basidiomycotina). *Z. Naturforsch.* **1986**, *41c*, 825-829.
- Jennings W.; Shibamoto T. *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillar Gas Chromatography*. Academic Press: New-York, USA, **1980**.
- Krings U.; Abraham B.G.; Berger R.G. Plant Impact Volatiles from Higher Fungi: A Biotechnological Perspective. *Perfum. Flavour* **1995**, *20*, 79-86.
- Maga J.A. Mushroom Flavor. *J. Agric Food Chem.* **1981**, *29*, 1-4.
- Mau J.; Beelman R.B.; Ziegler G.R. Aroma and Flavor Components of Cultivated Mushrooms. In *Spices, Herbs and Edible Fungi*; Charalambous G.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **1994**.

- Pyysalo H. Identification of Volatile Compounds in Seven Edible Fresh Mushrooms. *Acta Chem. Scand.* **1976**, B 30, 235-244.
- Rapier S.; Cavalié S.; Croze P.; Andary C.; Péliissier Y.; Bessière J.M. Volatile Components of ten Frozen Mushrooms (Basidiomycetes). *J. Essent. Oil Res.* **1996a**, 8, 63-66.
- Rapier S.; Cavalié S.; Andary C.; Péliissier Y.; Marion C.; Bessière J.M. Investigation of Some Volatile Components of Seven Fresh Wild Mushrooms (Basidiomycetes). *J. Essent. Oil Res.* **1996b**, 8, 199-201.
- Sastry K.S.M.; Agrawal S.; Manavalan R.; Singh P.; Atal C.K. Studies on *Osmoporos odorata* (Wulfex Fr.) rose like aroma produced by fermentation. *Indian J. Exp. Biol.* **1980**, 18, 1471-1473.
- Stenhagen E.; Abrahamsson S.; Mc Lafferty F. W. *Registry of Mass Spectral Data*; Wiley J. & Sons: New-York, USA, **1976**.
- Talou T.; Delmas M.; Gaset A. Principal constituents of Black Truffle (*Tuber melanosporum*) aroma. *J. Agric Food Chem.* **1987**, 35, 774-777.
- Tressl R.; Barhi D.; Engel K.H. Formation of Eight-Carbon and Ten-Carbon Components in Mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 89-93.
- Vidal J.P.; Toulemonde B.; Richard H. Constituants Volatils de l'Arôme d'un Champignon Comestible: le Mousseron (*Marasmius oreades*). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1986**, 19, 353-359.
- Wood W.F.; Brandes M.L.; Watson R.L.; Jones R.L.; Largent D.L. *Trans*-2-nonenal, the Cucumber Odor of Mushrooms. *Mycologia* **1994**, 86, 561-563.
- Wood W.F.; Watson R.L.; Largent D.L. The Odor of *Agaricus augustus*. *Mycologia* **1990**, 82, 276-278.