APPROCHE EXPÉRIMENTALE DU RÔLE DES MICRO-ORGANISMES DANS LE PROCESSUS DE MATURATION DES BOIS DE TONNELLERIE

EXPERIMENTAL APPROACH OF MICRO-ORGANISM EFFECT DURING COOPERAGE WOOD DRYING

Claudie ROULLAND, G. SNAKKERS et R. CANTAGREL

Station Viticole du Bureau National Interprofessionnel du Cognac
69 rue de Bellefonds, BP 18, 16100 Cognac (France)

Résumé : L'étude écologique de la microflore menée sur les parcs à bois de cinq tonnelleries charentaises a permis d'isoler quatre champignons généralement présents dans les couches internes des merrains (*Candida sp.*, *Paecilomyces variotii*, *Phialemonium sp1* et la Souche E). L'impact des champignons sur la composition analytique du bois est net, par contre d'un point de vue sensoriel les différences par rapport au témoin non inoculé ne sont pas flagrantes. Dans les conditions de la pratique, où la biomasse fongique est beaucoup plus faible que celle obtenue sur les copeaux, la contribution des champignons aux qualités sensorielles finales du bois est donc *a fortiori* très vraisemblablement négligeable.

Abstract : The ecological study of flora carried out in five cooperages in the Charentes has enabled the isolation of four fungi generally found in the internal layers of staves (*Candida sp., Paecilomyces variotii*, *Phialemonium sp.*, and strain E). Several experiments were performed to establish how these four species affected the analytical and qualitative characteristics of the wood.
Their wood degradation ability is quantified by observing the mass loss of inoculated stick of wood. The mass loss is very small.
Next we measured the ability of these moulds to degrade cellulose, xylan and aesculin. In a synthetic liquid medium the four fungal species degrade aesculin and xylan, only *Phalemonium sp.* shows a measurable growth rate for the cellulose medium.
Afterwards, the effect of the moulds on the composition and sensorial qualities of the wood is studied by direct inoculation of wood shavings. After three months of incubation, shavings, eventually after heating, are soaking in white spirit of Cognac under standard conditions ; this enables, the production of extracts which may be analysed and tasted. When extracts are prepared from unheated shavings, development of the moulds results in a diminution of most of the dosed compounds : dry extract, ellagitanins, ellagic acid, sugars and volatile phenols. The action of heat erases differences previously observed in the sugars, volatile phenols and ellagic acid. However, we still notice a reduction, related to fungi action of the amounts of dry extract, ellagitanins, gallic acid and eugenol. The amounts of aromatic aldehydes including vanillin are not affected by the development of micro-organisms.
A few shavings are studied separately, under the transmission electron microscope. These observations do not show any enzymatic degradation of the wood's cell walls.
Sensorial analysis of the extracts does not reveal any important differences between extracts coming from wood shavings and the blank.
Under practical conditions, where fungi biomass is much less than that obtained from shavings, the fungi's contribution towards final sensorial qualities of the wood, is therefore most probably negligible.

Mots clés : tonnellerie, séchage, merrains, champignons, extractibles

Key-words : cooperage, seasoning, staves, fungi, extractives

INTRODUCTION

Les merrains, pièces de bois de chêne qui servent à fabriquer les fûts, subissent un séchage qui peut durer plus de trois ans. Durant cette période, l'humidité diminue. Cette perte d'humidité est primordiale pour la fabrication de fûts étanches. La composition du bois évolue également (MARCHE et JOSEPH, 1975 ; SWAN *et al.*, 1992 ; CHATONNET *et al.*, 1994a ; CHATONNET *et al.*, 1994b), ainsi le terme de maturation est-il préféré à celui de séchage.

L'objectif de ce travail est de déterminer le rôle joué par les micro-organismes lors de la maturation des merrains. Les principaux travaux réalisés sur ce thème aboutissent à des conclusions divergentes quant au rôle des micro-organismes.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

VIVAS et GLORIES (1996) attribuent un rôle essentiel aux micro-organismes (*Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma koningii*) lors de la maturation des merrains, avec la dégradation de tanins ellagiques, de la scopoline et de divers hétérosides.

Pour tous les champignons testés (*Penicillium roqueforti*, *Trichoderma viride*, *Aureobasidium pullulans* et *Trichoderma koningii*), CHATONNET *et al.* (1994b) observent au laboratoire une dégradation de petites molécules possédant un impact sensoriel favorable (méthyl-octalactones, eugénol et vanilline). D'après cet auteur, la diminution des teneurs en tanins ellagiques observées au cœur des merrains au cours de la maturation s'explique préférentiellement par des phénomènes physiques. La microflore n'est pas assez développée à l'intérieur des bois. Par contre, à la superficie des merrains, une dégradation plus marquée du bois correspond vraisemblablement à un développement plus important des micro-organismes.

Les champignons isolés par les auteurs précédemment cités ne se sont pas révélés capables de dégrader la lignine.

La microflore présente sur les merrains de cinq tonnelleries des Charentes a été analysée (LARIGNON *et al.*, 1994). Cette analyse a montré que la flore est comparable entre tonnelleries. Par contre, d'un point de vue quantitatif, on observe une plus forte présence de micro-organismes au centre des merrains pour les tonnelleries qui pratiquent un arrosage. Au niveau du merrain, les micro-organismes sont moins présents dans les couches internes du bois que dans les couches externes. La nature de la flore varie entre extérieur et intérieur des merrains. Ainsi, seuls quatre micro-organismes sont le plus souvent isolés à l'intérieur des bois : *Candida sp.*, *Paecilomyces variotii*, *Phialemonium sp1* et la Souche E qui pourrait correspondre à une autre espèce de *Phialemonium*.

Nous avons étudié le rôle potentiel dans la maturation des merrains de ces quatre espèces.

La dégradation du bois liée à l'action fongique (pouvoir lignivore) est mesurée par la perte de poids de bûchettes ensemencées. Puis, les capacités de ces souches à dégrader plusieurs substrats carbonés présents dans le bois sont définies par ensemencement sur des milieux synthétiques liquides.

Enfin, l'impact de ces champignons sur la composition et sur les qualités sensorielles du bois est étudié par ensemencement direct de copeaux. Après macération de ces copeaux (préalablement chauffés ou non) dans une eau-de-vie nouvelle, on obtient des extraits qui peuvent être analysés et dégustés.

Les copeaux colonisés sont également observés en microscopie électronique à transmission pour étudier l'action fongique vis-à-vis des parois des cellules du bois.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - CAPACITÉ DE DÉGRADATION DU BOIS DE CHÊNE - ESTIMATION DU POUVOIR LIGNIVORE

La perte de masse de bûchettes (2.5 cm x 0.7 cm x 0.5 cm), prélevées au cœur d'un merrain et ensemencées en conditions stériles, est suivie pendant quatre mois en comparaison avec des témoins non ensemencés. Les bûchettes sont stérilisées (autoclave, 104°C, 30 minutes) et disposées en conditions stériles à l'intérieur de tubes de gélose en pente. L'ensemencement est réalisé avec une solution de spores (10^6 sp/ml) à raison de 1 ml par bûchette. Les pesées sont réalisées en condition standard après lavage à l'eau et séchage par incubation à l'étuve à 105°C pendant 24 heures.

II - CAPACITÉ DE DÉGRADATION DE SUBSTRATS CARBONÉS PRÉSENTS DANS LE BOIS DE CHÊNE

Les champignons sont ensemencés dans des milieux de culture d'Eriksson et de Patersson additionnés d'une solution des sels minéraux ($CaCl_2$, $2H_2O$: 7.4 g ; $ZnSO_4$, 7 H_2O : 0.66 g ; Mn SO_4, 4 H_2O : 0.5 g ; $CoCl_2$, 6 H_2O : 0.1 g ; acide citrique : 0.6 g ; chlorure de fer à 27 p. cent : 0.15 ml ; thiamine : 0.1 g ; eau distillée : qsq 1000 ml) et de :

- carboxy méthyl cellulose (10 g/l), milieu cellulose,
- xylane (10 g/l), milieu xylane,
- aesculine (5 g/l), milieu aesculine.

Différentes déterminations sont réalisées en cours ou en fin de culture :

- absence de contamination : elle est vérifiée par la technique d'isolement en stries sur milieu malt réalisée à l'aide d'une anse de platine.

- poids sec de biomasse produite : La biomasse est récupérée par centrifugation à 5 000 tours/minutes pendant 30 minutes. Le culot de centrifugation est rincé trois fois avec de l'eau stérile, puis il est disposé à l'étuve à 60 °C jusqu'à poids constant.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

- composés glucidiques totaux présents (méthode au phénol sulfurique),

- dosage de l'aesculine et de l'aesculétine par chromatographie liquide hautes performances (CLHP) pour le milieu aesculine,

- pourcentage de consommation des substrats carbonés,

- activités enzymatiques libérées dans le milieu.

1) Activités cellulase et xylanase : méthode de Somogyi-Nelson

Les activités cellulase et xylanase sont testées respectivement vis-à-vis de la carboxy-méthyl-cellulose et du xylane. Le mélange réactionnel constitué de 50 µl de filtrat et de 2 ml de substrat (2.5 mg/ml) est incubé à 37°C pendant 24 h pour l'activité cellulase et 1 h 30 pour l'activité xylanase. À la fin du temps de réaction, on mesure l'augmentation du pouvoir réducteur, liée à la libération de glucide, par la méthode colorimétrique de Somogyi-Nelson dont la réponse est une différence de densité optique à 590 nm.

2) Activités β-D glucosidase et β-D xylosidase : méthode de Norkrans

Les activités β-D glucosidase et β-D xylosidase sont dosées par la méthode de Norkrans respectivement par le p-nitrophényl β-D glucopyranoside et le p-nitrophényl β-D xylopyranoside. On mesure la quantité de p-nitrophénol libéré par la densité optique à 400 nm.

3) Activités enzymatiques mesurées

Le tableau I récapitule les activités enzymatiques mesurées dans les différents milieux de culture.

III - IMPACT DES MICRO-ORGANISMES SUR LA COMPOSITION DU BOIS

Les milieux de culture sont constitués de 45 g de copeaux issus de merrains verts (prélevés sur un parc de tonnellerie) placés dans des flacons. Les copeaux sont préalablement homogénéisés et autoclavés (104°C, 30 minutes). L'inoculation est faite par addition de 10 ml d'une suspension de spores titrant 10^6 spores/ml.

Cinq modalités sont réalisées :

- ensemencement *Phialemonium sp.*,
- ensemencement *Paecilomyces sp.*,
- ensemencement mélange *Candida sp.* + Souche E + *Phialemonium sp.*,
- témoin eau, non ensemencé,
- témoin sans eau, non ensemencé.

Les souches de *Paecilomyces sp.* et de *Phialemonium sp.* sont inoculées en culture pure car d'après un essai préalable, leur impact sur les qualités sensorielles du bois semble plus marqué que celui obtenu avec les autres espèces. Par ailleurs, il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet d'un mélange des espèces fongiques. Compte tenu de sa croissance beaucoup plus rapide, *Paecilomyces sp.* n'a pas été introduit dans le mélange.

Chacune des modalités fait l'objet de trois répétitions. Les flacons sont incubés à 25 °C pendant une durée de 4 mois. Excepté le témoin sans eau, le contenu des flacons est bien humidifié par ajout d'eau déminéralisée. Après incubation, chaque échantillon est divisé en 2 sous-groupes : l'un va subir un chauffage dans une rôtissoire (20 minutes, 194°C), l'autre non. Les extraits sont ensuite préparés par macération pendant 48 heures d'environ 30 g (pesés exactement) de copeaux secs par litre dans une même eau-de-vie nouvelle de Cognac (70 p. cent vol.). Ces extraits font l'objet d'analyses chimique et sensorielle.

IV - ANALYSE CHIMIQUE

Les extraits secs sont déterminés par la perte de poids de 10 ml d'extrait mis à l'étuve à 103°C pendant 24 heures. Avant la pesée, les coupelles métalliques utilisées sont mises à refroidir dans un dessicateur. La balance utilisée a une précision de 0,1 mg.

Les phénols totaux sont déterminés, sur 0,5 ml d'extrait suivant la méthode Folin-Ciocalteu (BLOUIN, 1972).

TABLEAU I
Activités enzymatiques déterminées dans le cadre de cette étude
Table I - Enzymatic activities measured in this study

Milieu	Cellulase	Xylanase	β-D glucosidase	β-D xylosidase
Cellulose	X		X	
Xylane		X		X

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

Les tanins catéchiques sont dosés grâce à leur réaction spécifique avec la vanilline sulfurique (RIBÉREAU-GAYON, 1964). À 1 ml d'extrait, on ajoute 2 ml de vanilline sulfurique (1 g pour 100 ml d'acide sulfurique à 70 p. cent), une couleur rouge se développe rapidement. On mesure l'absorption à 500 nm après 15 min de réaction. Les résultats sont exprimés en équivalents catéchine en faisant une droite d'étalonnage à partir de (+) catéchine dihydratée (Fluka).

Les tanins ellagiques sont dosés par hydrolyse acide (PENG *et al.*, 1991 ; VIRIOT, 1995). La chauffe est réalisée non dans un bain d'huile mais dans un four de chromatographe en phase gazeuse. Les résultats sont exprimés en acide ellagique formé.

Les acides phénols, les aldéhydes aromatiques, les dérivés furaniques, l'aesculine, l'aeculétine et la scopolétine sont déterminés par chromatographie liquide hautes performances (CANTAGREL *et al.*, 1991).

Les sucres sont dosés par silylation selon le principe décrit par GLENN *et al.* (1989). Après transformation des sucres en oximes par l'hydroxylamine hydrochloride, les acides, les polyols et les sucres sont dosés par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés silylés. L'analyse quantitative est réalisée par calibrage avec une solution de référence avec ajout de standards internes.

Les phénols volatils sont convertis en 2,4-dinitrophényl éthers à l'aide de 2,4-dinitro 1-fluorobenzène selon le principe décrit par LEHTONEN (1980). Après extraction, les dérivés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse avec détection par capture d'électrons.

V - ANALYSE SENSORIELLE

Les extraits obtenus par macération des copeaux dans l'eau-de-vie nouvelle sont ajustés à environ 300 mg/l de polyphénols totaux (indice de Folin Ciocalteu exprimé en acide gallique). Ces extraits sont envoyés à 8 maisons de négoce de Cognac. Chaque maison constitue son propre jury de dégustateurs.

Chaque dégustateur doit analyser 4 séries indépendantes de 4 extraits :

4 x 2 x 2 = 16 échantillons
modalités répétitions copeaux chauffés ou non chauffés

La fiche de dégustation présentée figure 1 correspond à une série de 4 extraits. Sur cette fiche apparaissent :

- une liste de critères pour lesquels les échantillons doivent être classés sur une échelle de 0 à 10,

- un tableau regroupant les principaux descripteurs sensoriels susceptibles d'être utilisés pour qualifier les extraits,

- un tableau pour l'attribution d'une note générale à l'extrait dégusté.

VI - MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION

La préparation et l'observation des coupes ont été réalisées au C.R.E.M.E.M (Centre de ressources en microscopie électronique et microanalyses).

Les échantillons (copeaux) sont fixés dans du glutaradéhyde à 6.25 p. cent dans du tampon cacodylate 0.1 M pendant deux heures. La pénétration du fixateur est favorisée par une pompe à vide. Les échantillons

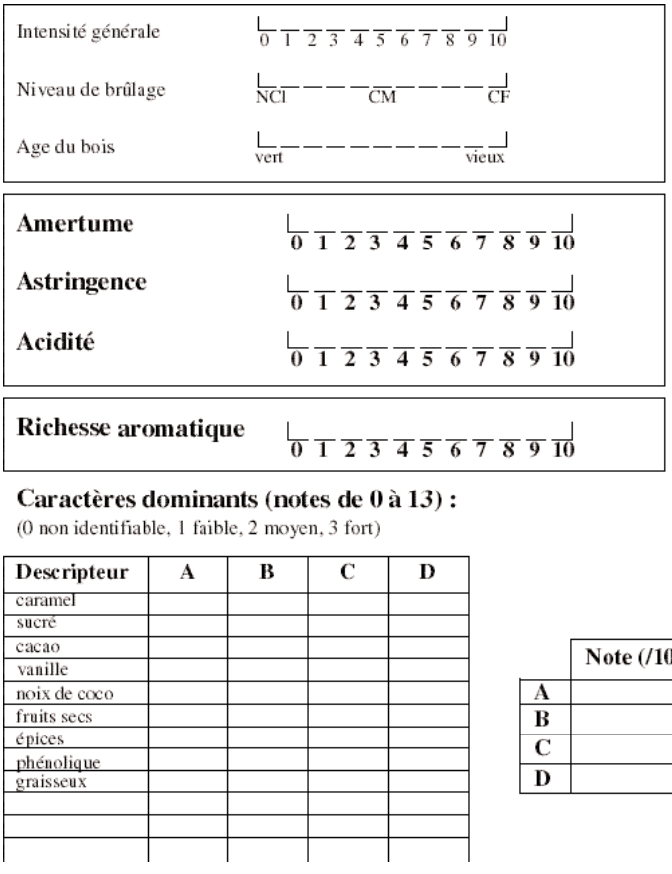


Fig. 1 - Fiche de dégustation des extraits

Fig. 1 - Tasting sheet

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

sont ensuite rincés par du cacodylate 0.1 M pendant au moins 30 mn. Puis, ils sont postfixés dans du tétroxyde d'osmium à 1 p. cent, dans du cacodylate 0.1 M pendant 1 heure. Enfin, ils sont rincés pendant 30 minutes dans du cacodylate à 0.1 M.

Les échantillons sont inclus dans une résine de type Epon selon LUFT (1961). Ils sont déshydratés par des solutions alcooliques de concentrations croissantes. Puis, l'alcool est remplacé par de l'oxyde de propylène. Les temps d'incubation se répartissent comme suit :

- alcool 30 p. cent : une fois 10 mn,
- alcool 50 p. cent : une fois 10 mn,
- alcool 70 p. cent: une fois 10 mn,
- alcool 100 p. cent : deux fois 10 mn,
- oxyde de propylène : 3 fois 20 mn,
- 1/2 oxyde de propylène + 1/2 Epon : une fois pendant environ 12 heures,
- Epon 100 p. cent : une fois pendant 1 heure.

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un couteau en diamant sur un ultramicrotome (type Reichert). Les coupes, d'épaisseur de 30 à 60 nm, sont recueillies sur des grilles (300 mesh, diamètre : 3.05 mm) en cuivre. Les grilles contenant les coupes sont déposées sur une goutte d'acétate d'uranyle pendant 30 mn, puis rincées à l'eau distillée. Après essorage sur papier filtre, elles sont mises sur une goutte de citrate de plomb préparé selon la méthode de REYNOLD (1963) pendant 5 mn. Elles subissent ensuite plusieurs lavages à l'eau distillée.

RÉSULTATS

I - ESTIMATION DU POUVOIR LIGNIVORE DES CHAMPIGNONS

Le tableau II récapitule les pertes de masse mesurées sur les bûchettes de bois après ensemencement. Les résultats obtenus sont relativement homogènes, ils indiquent une faible dégradation du bois quelle que soit l'espèce de champignon considérée. Les parois des cellules ne sont donc vraisemblablement pas ou peu dégradées.

TABLEAU II
Perte de masse (p. cent) des bûchettes selon la modalité d'ensemencement

Table II - Sticks of wood mass loss (p. cent)

Ensemencement	1 mois	2 mois	4 mois
Témoin (non ensemencé)	1.72	2.52	2.57
Paecilomyces sp.	2.77	3.38	3.38
Phialemonium sp.	3.33	4.18	5.65
Candida sp.	3.43	5.10	5.61
Souche E	2.56	3.91	4.49

II - CROISSANCE ET ACTIVITÉS ENZYMATIQUES MESURÉES SUR DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE LIQUIDES

1) Production de biomasse et consommation des substrats carbonés

Toutes les espèces testées se sont bien développées sur le milieu aesculine et ont utilisé de façon très significative le xylane (tableau III). Sur milieu cellulose, seul *Phialemonium sp.* présente une croissance mesurable bien que réduite.

2) Libération d'activités enzymatiques dans le milieu de culture

a) Milieu xylane

Seul *Paecilomyces sp.* libère une activité xylanase importante dans le milieu xylane (tableau IV). Les trois autres espèces se sont également bien développées sur ce milieu (tableau III), ainsi ces champignons dégradent le xylane mais n'ont pas libéré d'activité enzymatique. De même, la libération de β-D xylosidase dans le milieu est importante pour la souche de *Paecilomyces sp.* (tableau V). La libération de l'activité enzymatique apparaît plutôt en fin de culture, au-delà du 19^{e} jour.

TABLEAU III
Poids sec de biomasse produite (mg/l) et pourcentage de consommation des substrats carbonés (p. cent), après 37 jours de culture

Table III - Dry weight biomass (mg/l) and consumption percentage of carbon source (p. cent) after 37 days

Milieu	*Paecilomyces sp.*	*Phialemonium sp.*	*Candida sp.*	Souche E
Xylane	441 (88.6 %)	158 (53.6 %)	(*)	565 (56.9 %)
Cellulose	ε (ε)	25 (ε)	ε (ε)	ε (ε)
Aesculine	428 (97.6 %)	377 (94.7 %)	437 (95.9 %)	450 (97.0 %)

(*) Contaminé en fin de culture ; (ε) Quantité négligeable
(*) Contaminated at the end of the essay ; (ε) Unquantifiable amount

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

b) Milieu cellulose

Dans le milieu cellulose, *Phialemonium sp.* (seul champignon croissant sur ce milieu) libère des activités cellulase et β-D glucosidase (tableaux VI et VII).

3) Dégradation de l'aesculine

Le schéma de dégradation de l'aesculine est le même pour les quatre champignons. Dans un premier temps, on assiste à une hydrolyse rapide de l'aesculine avec libération de glucose et d'aesculétine.

TABLEAU IV
Activités xylanases libérées dans le milieu xylane
(ΔD.O. 590 nm en 90 minutes)

Table IV - Xylanase activities in xylan medium
(ΔD.O. 590 nm after 90 minutes)

Nombre de jours	*Paecilomyces sp.*	*Phialemonium sp.*	*Candida sp.*	Souche E
3	0.040	0.010	0.000	0.015
7	0.075	0.005	0.020	0.000
9	0.102	0.055	0.015	0.000
15	0.180	0.000	0.000	0.000
24	0.260	0.000	0.000	0.000
28	0.210	0.000	0.005	0.000
36	0.125	0.000	0.006	0.010

TABLEAU V
Activités β-D xylosidases libérées dans le milieu xylane
(ΔD.O. 400 nm en 30 minutes)

Table V - β-D xylosidase activities in xylan medium
(ΔD.O. 400 nm after 30 minutes)

Nombre de jours	*Paecilomyces sp.*	*Phialemonium sp.*	*Candida sp.*	Souche E
1	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.100	0.120	0.110	0.070
7	0.000	0.000	0.000	0.000
8	0.020	0.000	0.010	0.010
13	0.060	0.065	0.110	0.050
15	0.055	0.010	0.020	0.010
19	0.350	0.150	0.050	0.015
22	0.310	0.010	0.050	0.010
26	0.650	0.080	0.085	0.050
35	0.450	0.190	0.020	0.030

TABLEAU VI
Activités cellulases libérées dans le milieu cellulose
(ΔD.O. 590 nm en 24 heures)

Table VI - Cellulase activities in cellulose medium
(ΔD.O. 590 nm after 24 hours)

Nombre de jours	*Paecilomyces sp.*	*Phialemonium sp.*	*Candida sp.*	Souche E
3	0.010	0.020	0.030	0.020
7	0.010	0.025	0.010	0.005
9	0.070	0.090	0.005	0.010
15	0.000	0.150	0.000	0.000
17	0.023	0.026	0.021	0.005
21	0.005	0.410	0.000	0.000
24	0.010	0.320	0.000	0.000
28	0.000	0.410	0.000	0.000
36	0.000	0.490	0.000	0.000

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

TABLEAU VII
Activités β-D glucosidase libérées dans le milieu cellulose
(ΔD.O. 590 nm en 90 minutes)

Table VII - β-D glucosidase activities in cellulose medium
(ΔD.O. 590 nm after 90 minutes)

Nombre de jours	*Paecilomyces sp.*	*Phialemonium sp.*	*Candida sp.*	Souche E
2	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.039	0.048	0.030	0.010
15	0.022	0.120	0.020	0.013
17	0.008	0.120	0.010	0.025
21	0.015	0.125	0.013	0.007
24	0.000	0.200	0.000	0.000
27	0.000	0.070	0.000	0.000
36	0.000	0.135	0.000	0.000

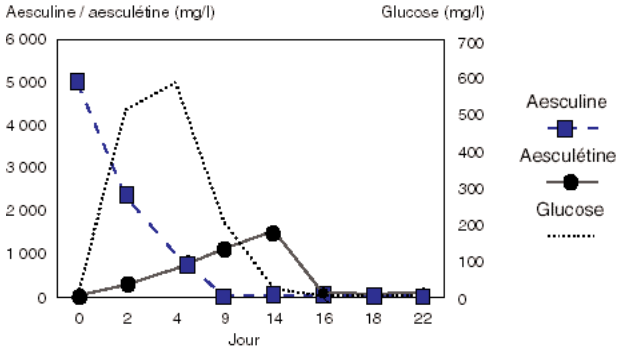


Fig. 2 - Cinétique de dégradation de l'aesculine par *Paecilomyces sp.*

Fig. 2 - Consumption kinetic of esculin by *Paecilomyces sp.*

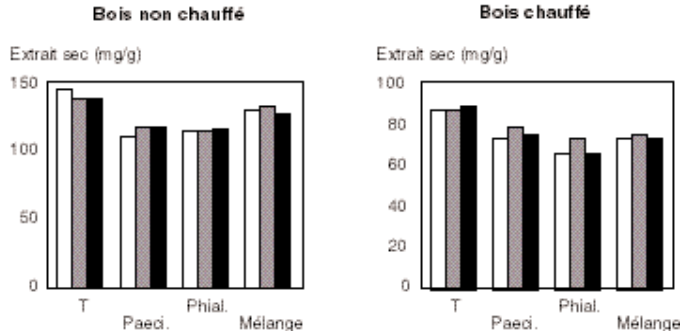


Fig. 3 - Extrait sec mesuré dans les extraits

Fig. 3 - Dry extract

Dans un deuxième temps, le glucose est consommé puis l'aesculétine. Seules les vitesses de dégradation diffèrent entre souches. La figure 2 illustre la dégradation de l'aesculine dans le cas de *Paecilomyces sp.*

III - IMPACT DES MICRO-ORGANISMES SUR LA COMPOSITION DU BOIS

1) Composition globale des extraits : extraits secs et teneur en polyphénols

L'effet champignon sur les teneurs en polyphénols totaux et les extraits secs avant et après chauffage est très net (tableau VIII).

D'une manière générale, la croissance des champignons sur les copeaux entraîne une diminution de l'extrait sec (figure 3).

La teneur en polyphénols totaux ne diminue en revanche de façon significative que pour les extraits préparés à partir des copeaux ensemencés avec *Phialemonium sp*, la densité optique à 280 mm (DO280) correspondante est également plus faible. Cependant, ces dosages font intervenir des mesures colorimétriques et sont à interpréter avec précaution. En effet, *Paecilomyces sp.* et *Phialemonium sp.* libèrent des pigments susceptibles d'interférer sur ces mesures.

2) Tanins catéchiques

Les tanins catéchiques, tanins stables et minoritaires dans le bois, ne sont pas affectés par la croissance des champignons.

3) Tanins ellagiques et acide ellagique

La figure 4 montre une diminution très importante des tanins ellagiques pour toutes les modalités inoculées. Cette diminution est légèrement accentuée pour les copeaux incubés en présence de l'espèce *Phialemonium sp.* Après chauffage, l'effet champignon est moins marqué mais reste sensible et cohérent avec les résultats obtenus avant chauffage (moindres teneurs avec *Phialemonium sp.*).

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

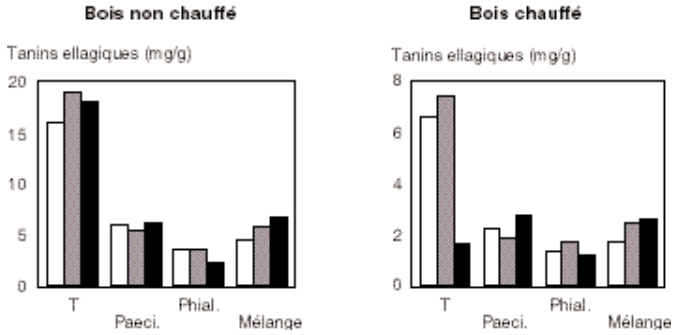


Fig. 4 - Tanins ellagiques mesurés dans les extraits

Fig. 4 - Ellagitannins

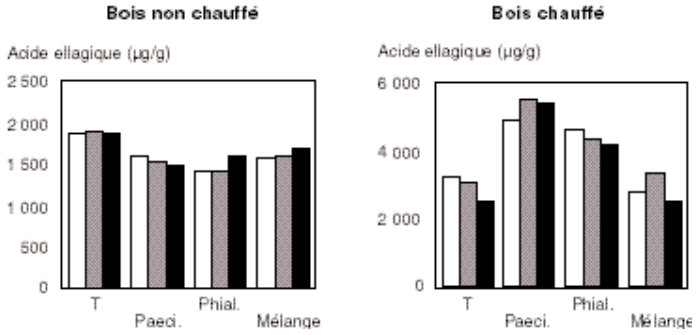


Fig. 5 - Acide ellagique mesuré dans les extraits

Fig. 5 - Ellagic acid

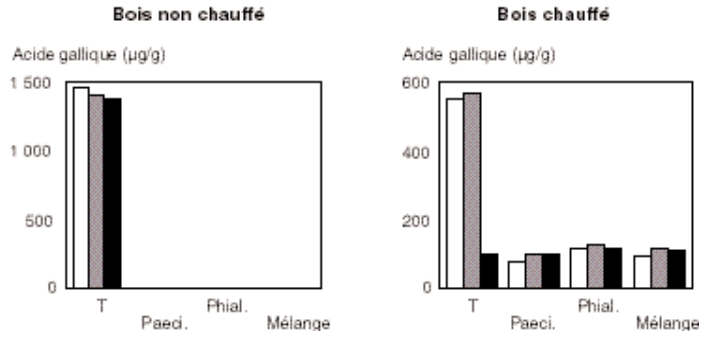


Fig. 6 - Acide gallique mesuré dans les extraits

Fig. 6 - Gallic acid

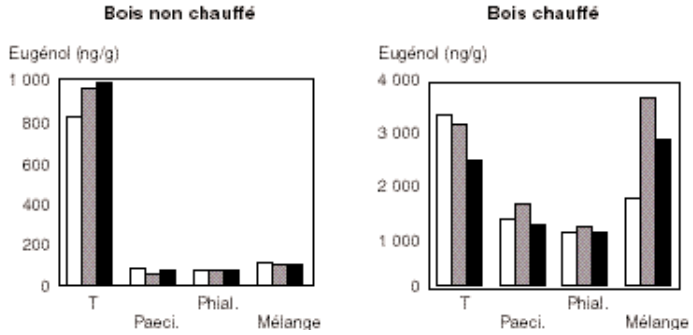


Fig. 7 - Eugénol mesuré dans les extraits

Fig. 7 - Eugenol

L'acide ellagique diminue faiblement en présence des champignons. En revanche sa production lors du chauffage est accentuée pour les copeaux inoculés avec *Phialemonium sp.* et *Paecilomyces sp.* (figure 5). Ce résultat semble paradoxal car les modalités inoculées contiennent avant chauffage moins de tanins ellagiques donc moins d'acide ellagique potentiel.

Une partie de l'acide ellagique formé peut provenir de tanins ellagiques non extractibles et par conséquent non pris en compte lors du dosage sur les extraits non chauffés. Ce résultat suggère que les champignons auraient une action sur ces tanins non extractibles générant une formation accrue d'acide ellagique lors de la chauffe.

4) Acide gallique

Les champignons métabolisent l'acide gallique (figure 6).

La chaleur induit simultanément une légère formation d'acide gallique par dégradation de molécules plus complexes (observée dans les échantillons inoculés) et la destruction de la plus grosse partie d'acide gallique libre déjà formée avant chauffage. Malgré ces actions conjuguées, l'effet champignon reste significatif après chauffage.

5) Dérivés de la lignine

Le dosage des aldéhydes phénols ne fournit que des informations partielles car les champignons produisent des composés qui viennent interférer sur les résultats de la chromatographie. On note cependant que généralement, les champignons induisent la diminution des aldéhydes phénols dosés (vanilline, coniféraldéhyde, sinapaldéhyde). Cet effet champignon disparaît complètement après le chauffage des copeaux ; la thermolyse du bois multiplie en effet par un facteur d'environ 50, les teneurs globales en aldéhydes phénols.

6) Phénols volatils

L'eugénol voit sa teneur fortement diminuer dans toutes les modalités inoculées. L'apport du chauffage, très important pour les teneurs en eugénol (environ 3 fois plus d'eugénol dans les extraits chauffés) ne suffit pas à gommer cet effet champignon (figure 7).

Des différences significatives apparaissent pour d'autres composés, avec de plus fortes teneurs pour certaines modalités par rapport au témoin. Ces différences restent de faible amplitude et les composés concernés peuvent posséder des arômes peu agréables par exemple le para-éthyl-phénol.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

TABLEAU VIII
Résultats analytiques obtenus pour les différents échantillons de l'essai
(moyenne des 3 répétitions)
Table VIII - Analytical results by treatment
(mean of three individuals)

	Bois non chauffé					Bois chauffé				
	Témoin	*Paeci.*	*Phial.*	Mélange	P(Fobs)	Témoin	*Paeci.*	*Phial.*	Mélange	P(Fobs)
Tanins ellagiques (mg/g)	17.70	5.92	3.19	5.74	0.000***	5.22	2.24	1.40	2.23	0.081
Tanins catéchiques (mg/g)	1.90	1.78	1.89	1.85	0.440	1.82	2.27	1.77	1.71	0.071
Extrait sec (mg/g)	138.46	112.83	112.52	127.48	0.000***	87.78	76.67	68.89	74.44	0.000***
Polyphénols (mg/g ac. gal.)	74.36	73.62	49.15	74.57	0.001***	46.93	46.07	36.61	41.47	0.001***
Densité optique à 280 nm	84.00	84.67	74.83	80.50	0.788	58.33	57.33	46.67	48.83	0.000***
Acide gallique (µg/g)	1419.11	7.50	7.50	7.50	0.000***	407.78	96.67	123.33	107.78	0.057
Acide vanillique (µg/g)	7.50	7.50	7.50	7.50	.	140.00	INT	163.33	122.22	0.119
Acide syringique (µg/g)	38.48	7.81	14.57	62.68	0.001***	164.44	120.00	137.78	176.67	0.493
Acide ellagique (µg/g)	1898.51	1554.20	1497.33	1639.34	0.001***	2980.00	5252.22	4351.11	2935.56	0.000***
Vanilline (µg/g)	14.39	5.87	16.37	INT	0.016*	194.11	198.78	200.11	192.44	0.941
Syringaldéhyde (µg/g)	INT	INT	INT	INT		296.89	311.11	349.89	313.56	0.739
Coniféraldéhyde (µg/g)	8.56	3.00	3.57	INT	0.000***	451.44	463.78	477.67	493.00	0.380
Sinapaldéhyde (µg/g)	21.58	4.22	3.00	3.00	0.000***	908.44	1046.67	1158.56	1024.33	0.269
5-hydroxy méthyl furfural (µg/g)	36.12	3.00	3.00	3.00	0.001***	72.22	38.89	30.00	73.33	0.050*
Furfural (µg/g)	341.01	488.67	279.34	295.14	0.002**	520.00	531.11	480.00	468.89	0.453
5-méthyl furfural (µg/g)	15.40	11.86	8.42	8.42	0.004**	32.11	27.44	31.89	26.44	0.039*
Scopolétine (µg/g)	4.65	1.80	3.97	4.70	0.005**	3.81	1.79	3.76	3.88	0.000***
Acide lactique (µg/g)	337.64	362.47	375.98	373.84	0.376	393.33	421.11	431.11	402.22	0.083
Glycérol (µg/g)	163.07	52.63	48.75	75.80	0.000***	82.56	93.33	75.89	50.67	0.020*
Erythritol (µg/g)	.00	.00	.00	.00	.	.00	.00	.00	.00	.
Arabitol (µg/g)	20.63	54.80	28.22	23.53	0.002**	28.91	32.70	30.92	36.19	0.169
Xylose (µg/g)	491.82	15.00	15.00	15.00	0.000***	29.44	32.67	26.00	29.56	0.309
Arabinose (µg/g)	987.15	33.52	39.51	45.49	0.000***	63.00	60.89	69.56	49.89	0.593
Quercitol (µg/g)	2691.94	969.92	29.67	1399.92	0.000***	1097.78	486.67	17.78	786.67	0.000***
Rhamnose (µg/g)	127.13	60.00	60.00	60.00	0.000***	93.89	88.67	91.56	86.67	0.944
Fructose (µg/g)	712.49	91.79	38.42	108.00	0.000***	88.89	66.67	44.44	100.00	0.005**
Galactose (µg/g)	100.49	60.00	60.00	60.00	0.000***	121.33	132.11	130.44	132.22	0.368
Glucose (µg/g)	2156.15	70.76	219.76	98.02	0.000***	144.44	77.78	66.67	66.67	0.082
Myoinositol (µg/g)	477.13	60.00	60.00	60.00	0.000***	196.22	66.67	66.67	66.67	0.052
Saccharose (µg/g)	.00	.00	.00	.00	.	.00	.00	.00	.00	.
Butanediol-2,3 méso (µg/g)	.00	.00	.00	.00	.	.00	.00	.00	.00	.
Butanediol-2,3 lévo (µg/g)	.00	.00	.00	.00	.	.00	.00	.00	.00	.
Acide sorbique (µg/g)	.00	.00	.00	.00	.	.00	.00	.00	.00	.
Diéthylène glycol (µg/g)	.00	.00	.00	.00	.	.00	.00	.00	.00	.
Sorbitol (µg/g)	.00	.00	.00	.00	.	.00	.00	.00	.00	.
Phénol (ng/g)	241.84	188.67	190.85	277.46	0.016*	361.11	376.67	292.22	362.22	0.006**
Ortho crésol (ng/g)	15.80	31.47	26.78	30.40	0.140	65.56	88.89	128.89	125.56	0.006**
Méta crésol (ng/g)	38.86	34.82	40.11	45.11	0.114	37.78	42.22	43.33	38.89	0.744
Para crésol (ng/g)	42.67	34.82	42.92	50.00	0.014*	137.78	106.67	115.56	161.11	0.001***
Guaïacol (ng/g)	125.80	111.00	145.85	194.84	0.063	511.11	506.67	481.11	536.67	0.776
Para éthyl phénol (ng/g)	76.92	79.55	73.48	75.49	0.707	80.00	93.33	90.00	84.44	0.003**
Para éthyl guaïacol (ng/g)	618.92	559.52	555.90	612.01	0.250	941.11	1010.00	882.22	916.67	0.071
Eugénol (ng/g)	913.10	78.62	82.96	111.75	0.000***	2958.89	1373.33	1072.22	2718.89	0.006**

Paeci : *Paecilomyces sp.* ; *Phial* : *Phialemonium sp.* ; Mélange : *Candida sp.*+ souche E + *Phialemonium sp.*; P(Fobs) : Signification du F observé ;
* significatif seuil de 5 % ; ** significatif seuil de 1 % ; *** significatif seuil de 1 ‰ ; INT : Interférences pour les trois répétitions
Paeci : *Paecilomyces sp.* ; *Phial* : *Phialemonium sp.* ; Mélange : *Candida sp.*+ souche E + *Phialemonium sp.*; P(Fobs) : Observed F Significance ;
* significant, level of 5 % ; ** significant, level of 1 % ; *** significant, level of 1 ‰ ; INT : Interferences for the three individuals

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

7) Sucres et polyols

Les sucres et polyols diminuent fortement dans les extraits de copeaux ensemencés. Ces composés constituent certainement les principaux substrats énergétiques des champignons.

Les sucres simples sont presque complètement détruits lors de la chauffe des copeaux, de sorte que l'incidence des champignons après chauffage est gommée. À titre d'exemple, la figure 8 illustre les résultats obtenus pour l'arabinose.

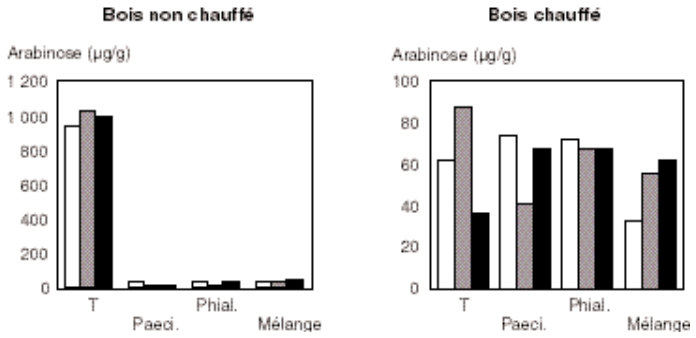


Fig. 8 - Arabinose mesuré dans les extraits

Fig. 8 - Arabinose

8) Aldéhydes furaniques

L'analyse statistique révèle également un effet champignon très significatif (avant chauffage uniquement) sur les teneurs en aldéhydes furaniques. Le 5-hydroxy-méthyl-furfural et le 5-méthyl-furfural diminuent sous l'action des champignons tandis que le furfural voit sa teneur augmenter en présence de *Paecilomyces sp.*

IV - IMPACT DES MICRO-ORGANISMES SUR LE PLAN SENSORIEL

L'analyse de variance réalisée sur la moyenne des notes et la moyenne des rangs indique que quel que soit le critère considéré les différences entre échantillons ne sont pas ou peu statistiquement significatives.

Certains critères fournissent toutefois des résultats un peu plus significatifs, c'est le cas des critères « niveau de chauffe » et « âge du bois ». Paradoxalement ces critères avaient été retenus pour mesurer l'homogénéité des échantillons et s'assurer de la bonne conduite de la chauffe des copeaux.

Les extraits préparés à partir des copeaux ensemencés avec l'espèce *Phialemonium sp.* sont généralement jugés issus d'un bois plus vieux (plus sec) et

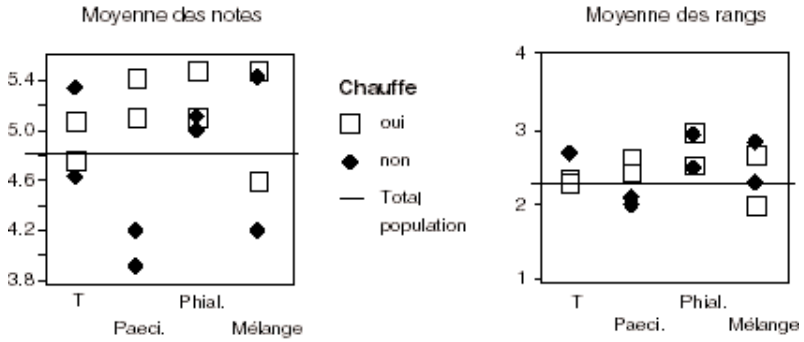


Fig. 9 - Richesse aromatique (/10)

Fig. 9 - Aromatic level (/10)

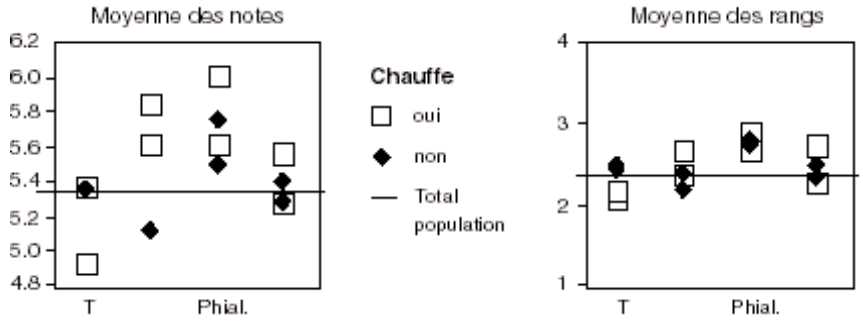


Fig. 10 - Note générale (/10)

Fig. 10 - General appreciation (/10)

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

d'un niveau de brûlage supérieur. Ils semblent légèrement plus appréciés, un peu plus de richesse aromatique (figure 9), et moindre amertume, ce qui se traduit par une note générale légèrement plus élevée (figure 10). Le qualitatif « bois sec » avait déjà été attribué à des copeaux colonisés par cette espèce de champignon lors d'essais précédents.

V - OBSERVATION DES COPEAUX EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION

Par modalité, une vingtaine de coupes issues de 2 copeaux sont observées en microscopie électronique à transmission. Les observations révèlent la présence fréquente de champignons pour les modalités inoculées. Ceux-ci sont situés sur les bords externes des préparations (à la surface des copeaux) ou encore dans les lumières cellulaires (photo 1). Aucune présence de champignon n'est détectée à l'intérieur des parois cellulaires. Par ailleurs, aucune observation n'a permis d'établir un lien entre la présence de champignon dans la lumière cellulaire et la digestion enzymatique d'une paroi.

Le passage des champignons d'une cellule à une autre s'effectue vraisemblablement par les ponctuations. Ces résultats corroborent les faibles pertes de masse obtenues après inoculation de bûchettes et l'absence de production de composés aromatiques.

DISCUSSION

Les champignons que nous avons isolés dans les merrains (*Candida sp.*, *Paecilomyces variotii*, *Phialemonium sp.*, souche E qui pourrait correspondre à une autre espèce de *Phialemonium*) présentent un pouvoir lignivore négligeable. Tous dégradent l'aesculine et plus ou moins le xylane, un seul dégrade la cellulose (*Phialemonium sp.*).

La composition chimique des extraits de bois de chêne est profondément modifiée par l'action fongique. On note principalement une diminution en tanins ellagiques, en sucres et en eugénol.

Cependant, l'influence des champignons sur la composition des extraits est atténuée par la chauffe des copeaux. L'action des champignons va finalement, après la chauffe, se traduire par une diminution de l'extrait sec, des tanins ellagiques, de l'eugénol, de l'acide gallique et par une augmentation de l'acide ellagique.

L'aptitude à dégrader les tanins ellagiques d'autres espèces fongiques isolées sur des merrains a déjà été

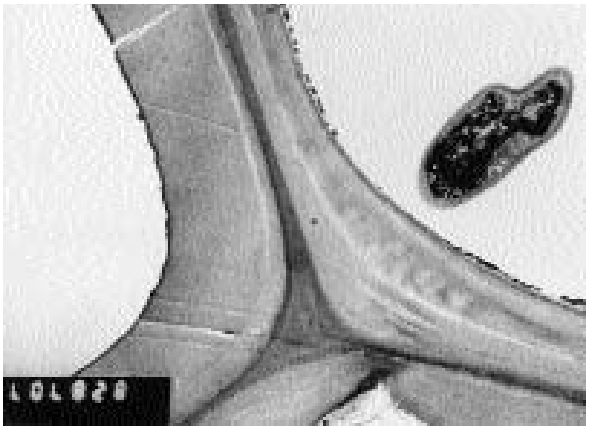


Photo 1 - Champignon observé en coupe transversale dans la lumière cellulaire
Microscopie électronique à transmission x 21 000.

Photo 1 - Transversal cut of mould in the light cell
Transmission electron microscopy x 21 000.

montrée (VIVAS *et al.*, 1991 ; CHATONNET *et al.*, 1994a). Il semble donc que ces propriétés soient assez répandues parmi la flore fongique inféodée aux merrains.

Les coumarines, telles que l'aesculine ou la scopoline, sont, d'après plusieurs auteurs, des composés fortement amers (MARCHE et JOSEPH, 1975 ; VIVAS *et al.*, 1996). CHATONNET *et al.* (1994a) indiquent cependant que le fractionnement des polyphénols extractibles du bois de chêne ne permet pas d'éluer ces molécules dans les fractions jugées amères. Pour ces auteurs, une grande partie de l'amertume du bois vert est liée à la présence de tanins ellagiques moyennement polaires.

L'hypothèse selon laquelle les champignons interviendraient dans l'atténuation des sensations d'amertume lors de la maturation des merrains (VIVAS et GLORIES, 1993) peut, au vu de nos résultats, effectivement être envisagée. Il ne faut cependant pas perdre de vue que la biomasse fongique colonisant les merrains est beaucoup plus faible que celle obtenue sur les copeaux. Sur les merrains, la flore microbienne est abondante en surface et dans les 2 ou 3 premiers millimètres du bois (CHATONNET *et al.*, 1994 ; LARIGNON *et al.*, 1994).

L'eugénol est un composé phénolique volatil à odeur caractéristique de clou de girofle. Son évolution au cours de la maturation des merrains n'est pas clairement établie : augmentation (CHATONNET *et al.*, 1994b) ou baisse (SEFTON *et al.* , 1993). Ce composé semble être plus particulièrement localisé dans les couches les plus profondes du bois (CHATONNET *et al.*, 1994b). La présence de la microflore fongique dans les couches superficielles des merrains pourrait expliquer ce résultat.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

L'absence d'apparition de composés issus de la lignine en présence de champignons est cohérente avec leur faible pouvoir lignivore. Ces résultats sont également en accord avec les données issues de la microscopie électronique qui semblent indiquer l'impossibilité pour les champignons de dégrader les parois cellulaires fortement imprégnées de lignine.

D'autres espèces de champignons isolées sur des merrains (VIVAS et GLORIES, 1996 ; CHATONNET *et al.*, 1994a) ne possèdent pas non plus l'équipement enzymatique nécessaire à la dégradation de la lignine.

CONCLUSION

En tenant compte du bilan analytique établi précédemment et des résultats de l'analyse sensorielle, la recherche de l'amplification des « effets champignons » dans les conditions de la pratique (inoculation, mise en place de conditions propres à favoriser le développement fongique) ne paraît pas intéressante : diminution de l'amertume et de l'astringence limitée et risque d'un appauvrissement aromatique.

De plus, l'implantation contrôlée et spécifique (élimination des espèces concurrentes) d'une espèce particulière de champignon dans le bois ne manquerait probablement pas de poser de nombreux problèmes de mise au point et de maîtrise pour le praticien.

Remerciements : Travail réalisé avec l'aide financière de : la Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt et l'ONIVINS, le Groupement des Maîtres Tonneliers des Charentes, le Bureau National Interprofessionnel du Calvados et E.V.C. et le Bureau National Interprofessionnel de l'Armagnac.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BLOUIN J., 1972. Étude des conditions optimales pour la détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu. *Connaissance Vigne Vin*, **6**, 405-413.

CANTAGREL R., VIDAL J.P. et BOULESTEIX J.M., 1991. Le dosage des composés phénoliques dans les eaux-de-vie de Cognac vieillies en fûts de chêne par CLHP. *Feuillet vert O.I.V.*, 906.

CHATONNET P., BOIDRON J.-N., DUBOURDIEU D. et PONS M., 1994a. Évolution des composés polyphénoliques du bois de chêne au cours de son séchage. Premiers résultats. *J. Int. Sci. Vigne*, **28**, 4, 337-357.

CHATONNET P., BOIDRON J.-N., DUBOURDIEU D. et PONS M., 1994b. Évolution de certains composés volatils du bois de chêne au cours de son séchage. Premiers résultats. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **28**, 4, 359-380.

GLENN W., CHAPMAN J. et HORVAT R., 1989. The determination of non volatil acids and sugars from fruits and sweet potato extracts by capillary GLC and GLC/MS. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 947-950.

LARIGNON P., CANTAGREL R., ROULLAND C. et VIDAL J.P., 1994. Incidence des pratiques de tonnellerie en Charentes sur la microflore des merrains en fin de maturation. *Rev. Œnol.*, **74**, 9-13.

LEHTONEN M., 1980. Gas chromatographic determination of phenols as 2,4-dinitro phenyl ethers using glass capillary columns and ECD. *J. Chromatography*, **202**, 413-421.

LUFT J.H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409-414.

MARCHE M. et JOSEPH E., 1975. Étude théorique sur le Cognac, sa composition et son vieillissement en fûts de chêne. *Rev. Fr. Œnol.*, **57**, 1-106.

PENG S., SCALBERT A. et MONTIES B., 1991. Insoluble ellagitanins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochemistry*, ***30***, 3, 775-778.

REYNOLDS E.S., 1963. The use of mead citrate at high pH as an electron opaque satin in electron microscopy. *J. Cell. Bio.*, **17**, 208-212.

RIBÉREAU-GAYON P., 1964. *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris.

SEFTON M.A., FRANCIS I.L., POLOCK K.F. et WILLIAM P.J., 1993. Effet du séchage naturel sur les concentrations en eugénol, vanilline et *cis* et *trans* β-méthyl γ-octalactone extraites de bois de chênes français et américains. *Sci. Alim.*, **13**, n°4, 629-643.

SWAN J.S., REID K.J.G., DONÈCHE B. et GUEHO E., 1992. A study of the effects of air and kiln drying of cooperage oakwood. *In : Elaboration et connaissance des spiritueux*. Cantagrel R., Ed. BNIC, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 557-561.

VIRIOT C., 1995. Polyphénols et polyosides du bois de chêne. Contribution au vieillissement des Cognacs en fût. *Thèse*, Institut National Agronomique de Paris-Grignon.

VIVAS N., GLORIES Y., DONÈCHE B. et GUEHO E., 1991. Observation sur la flore fongique du bois de chêne (*Quercus sp.*) au cours de son séchage naturel. *Ann. Sc. Nat. Bot.* (Paris), **11**, 149-153.

VIVAS N. et GLORIES Y., 1993. Étude de la flore fongique du chêne (*Quercus sp.*). Caractéristique du séchage naturel des bois destinés à la tonnellerie. *Cryptogamie Mycol.*, 14, **2**, 127-148.

VIVAS N. et GLORIES Y., 1996. Étude et optimisation des phénomènes impliqués dans le séchage naturel du bois de chêne. *Rev. F. Œnol.*, **158**, 28-35.

reçu le 17 novembre 1998 ; révisé le 1er mars 1999
accepté pour publication le 10 mars 1999

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)