Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1994, **28**, N°4, 359-380

ÉVOLUTION DE CERTAINS COMPOSÉS VOLATILS DU BOIS DE CHÊNE AU COURS DE SON SÉCHAGE PREMIERS RÉSULTATS

P. CHATONNET*, J.-N. BOIDRON, D. DUBOURDIEU
et Monique PONS

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II,
351, cours de la Libération, 33405 Talence cedex (France)

Résumé : *Pendant le séchage des merrains sur parc à l'air libre, on assiste à une profonde modification de la composition chimique et du profil aromatique du bois de chêne. La teneur en eugénol, en aldéhydes phénols et en ß-méthyl-γ-octalactone augmente régulièrement pendant le vieillissement du bois. Principalement sous forme trans au début du séchage, la ß-méthyl-γ-octalactone s'accumule finalement sous la forme cis plus aromatique. Dans le même temps, on observe également une accumulation importante du précurseur inodore de ß-méthyl-γ-octalactone. L'intervention des micro-organismes fréquemment isolés sur le bois en cours de séchage naturel sur la formation de composés aromatiques a été étudiée. La culture de diverses moisissures isolées de bois en cours de séchage naturel sur extraits de bois et directement sur sciure de chêne aboutit dans tous les cas à une forte diminution des teneurs en aldéhydes phénols, notamment de la vanilline. En effet, tous les micro-organismes étudiés (Penicilium sp., Trichoderma sp., Aureobasidium sp.) sont incapables de dégrader la lignine car ils ne possèdent pas d'activité ligninase. En revanche, ces champignons possèdent une forte activité oxydo-réductase capable de réduire la vanilline en alcool vanillique inodore. En conséquence, les aldéhydes phénols apparaissant au cours du séchage naturel du merrain ne dérivent pas d'une attaque enzymatique mais plus vraisemblablement de l'acidolyse et de l'oxydation chimique de la lignine du bois. Le stockage du bois à l'air libre en présence d'eau et d'oxygène doit permettre une évolution favorable de son potentiel aromatique tant que la vanilline et la cis ß-méthyl-γ-octalactone s'accumulent.*

INTRODUCTION

Le bois de chêne destiné au vieillissement des eaux-de-vie et à l'élevage des vins fins peut modifier l'arôme et le goût des produits conservés à son contact en libérant diverses substances volatiles et odorantes. En effet, en plus des composés formés sous l'effet de la chaleur pendant la fabrication des barriques, le bois de chêne recèle naturellement diverses substances odorantes susceptibles d'influencer l'arôme des vins. Le potentiel aromatique du bois est notablement influencé par l'origine botanique du chêne, par sa provenance géographique mais également par son mode de séchage (CHATONNET, 1992).

*chercheur pour la tonnellerie SEGUIN-MOREAU 16103 Cognac (France), détaché à l'Institut d'Œnologie

Dans un précédent travail (CHATONNET et *al.*, 1994a) nous avons présenté l'évolution des composés non volatils du bois de chêne sessile (*Quercus petrae*), au cours de son séchage à l'air libre. Nous étudions ici l'évolution de différents composés volatils et odorants et de certains de leurs précurseurs, au cours du séchage des mêmes échantillons de bois analysés précédemment.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — PRÉLEVEMENT DES ÉCHANTILLONS DE BOIS

Nous nous sommes volontairement limités à une provenance de chêne (forêt de Châteauroux) régulièrement exploitée par la tonnellerie. Le bois étudié correspond à du chêne sessile (*Quercus petrae*) à grain fin et régulier. Les merrains (3) sont prélevés à différentes hauteurs sur les piles (haut, milieu et bas) après 0, 3, 5 et 10 ans de séchage naturel sans aucun autre traitement. On recueille de la sciure de bois à différents niveaux à l'aide d'un foret pénétrant à la profondeur désirée (de 0 à 22 mm par pas de 1 mm en surface et de 5 mm en profondeur), en prenant soin de repérer la face supérieure (face au ciel) et inférieure (face au sol) de la pièce de bois. Les points de prélèvement sont multipliés (100) afin de couvrir l'intégralité de la surface ; les prélèvements correspondant à une profondeur donnée sur différents merrains sont mélangés afin d'obtenir un échantillon unique représentatif. Les merrains, issus d'une origine similaire mais prélevés à différents stades de vieillissement, ne sont pas exactement identiques car ils ne sont pas issus de la même pièce de bois. En conséquence, seules les variations relatives et les profils d'évolution doivent donc être comparés.

II — EXTRACTION DES ÉCHANTILLONS DE BOIS

Les échantillons de sciure de bois (20 g/l) sont extraits par macération dans une solution hydro-alcoolique (éthanol 10 p. cent vol., acide tartrique 5 g/l, NaOH N qsp pH 3,5) pendant 8 jours à 20°C avec agitation quotidienne. Les macérations sont filtrées sur coton de verre avant d'être analysées.

III — DOSAGE DES COMPOSÉS VOLATILS EXTRACTIBLES

50 ml du liquide de macération sont additionnés de 25 g de sulfate d'ammonium et de 1 ml d'octanol-3 à 50 mg/l (étalon interne). On extrait successivement par 10, 5 et 5 ml d'éther-pentane (1:1) sous agitation magnétique (5 minutes à 600 rpm). Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre et concentrées à 0,5 ml sous flux d'azote dans un tube à concentrer gradué. On injecte 1 µl d'extrait (mode splitless, temps de fermeture des vannes : 30s, rapport de division : 1/25, température 250°C) dans un chromatographe PERKIN-ELMER équipé d'une colonne du type BP-10™ (25 m x à,25 mm, 0,25 µ, SGE, Melbourne) programmée de 50 à 260°C à raison de 3°C/min avec un isotherme final de 15 min. Les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur FID ; la quantification des différentes molécules est réalisée par rapport à une gamme de produits purs préparée et analysée dans les mêmes conditions.

IV — DOSAGE DU PRÉCURSEUR DE LA ß-MÉTHYL-γ-OCTALACTONE

Le précurseur de la ß-méthyl-γ-octalactone est hydrolysé en lactone par chauffage en milieu acide concentré selon le principe décrit par OTSUKA et *al.* (1980).

Le bois est réduit à l'état de sciure, 2 g de sciure homogénéisée sont extraits par 50 ml du mélange méthanol-chloroforme (6:4) sous agitation magnétique (350 rpm) pendant 12 h. L'extrait obtenu est filtré sur coton de verre et ajusté précisément à 50 ml avec le solvant d'extraction. On prélève 20 ml que l'on évapore à sec sous vide à l'évaporateur rotatif. Le concentrat est repris par 2 ml de méthanol auquel on ajoute 20 ml d'HCL 8N avec agitation dans un bain à ultra-sons pendant quelques secondes. On prélève alors 10 ml de solution qui sont chauffées sous reflux pendant 4 h ; 10 ml du même extrait sont conservés et non chauffés pour servir de témoin.

Après refroidissement, on ajoute 1 ml d'octanol-3 dans chaque échantillon et on extrait à l'aide de 10, 5 et 5 ml d'éther diéthylique comme précédemment décrit. L'extrait obtenu est séché et neutralisé sur bicarbonate de sodium anhydre, puis concentré à 0,5 ml sous flux d'azote. On analyse dans les mêmes conditions chromatographiques que plus haut ; la concentration en précurseur de ß-méthyl-γ-octalactone est déduite de la quantité de lactone dosée dans l'échantillon chauffé, soustraction faite de la quantité de lactone libre déterminée dans le témoin non chauffé. Un étalonnage est réalisé par rapport à une solution de référence pour chaque conditions de dosage.

V — CULTURES DE MICRO-ORGANISMES EN PRÉSENCE DE BOIS DE CHÊNE

Différentes moisissures isolées de bois de chêne après 36 mois de séchage à l'air libre (CHATONNET et *al.*, 1994a) ont été cultivées stérilement sur un milieu Czapek-Dox supplémenté avec de la sciure de bois de chêne (20 g/l), ou avec un extrait de bois de chêne (méthanol-chloroforme 6:4) équivalent à 20 g/l de bois, après évaporation sous vide des solvants.

Les cultures sont réalisées à 27°C, en aérobiose et à l'obscurité. Les surnageants de culture sont filtrés sur coton de verre et centrifugés (5000 rpm, 15 min) avant d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse comme décrit plus haut.

VI — RECHERCHE D'ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

L'activité ligninase, ou lignine péroxydase, est mesurée par l'oxydation de l'alcool diméthoxy-3,4-benzylique (alcool vératrique) en aldéhyde diméthoxy-3,4-benzylique en présence de péroxyde d'hydrogène selon la méthode décrite par KIRK et *al.* (1986). Au lieu d'être analysés par spectrophotométrie UV, les produits de la réaction sont dosés par HPLC après injection directe (20 µl) du milieu d'incubation filtré sur membrane (0,45 µ) sur une colonne de silice greffée C_{18} (Interchrom™ , 150x4,6 mm, 5 µ). On programme un gradient eau-méthanol contenant une proportion stable d'acide formique (2 p. cent) de 0 à 100 p. cent en 30 min, à débit constant (1 ml/min) sur une pompe VARIAN 9010. On détecte les produits à 278 nm et 313 nm sur un détecteur à barette de diodes VARIAN 9065.

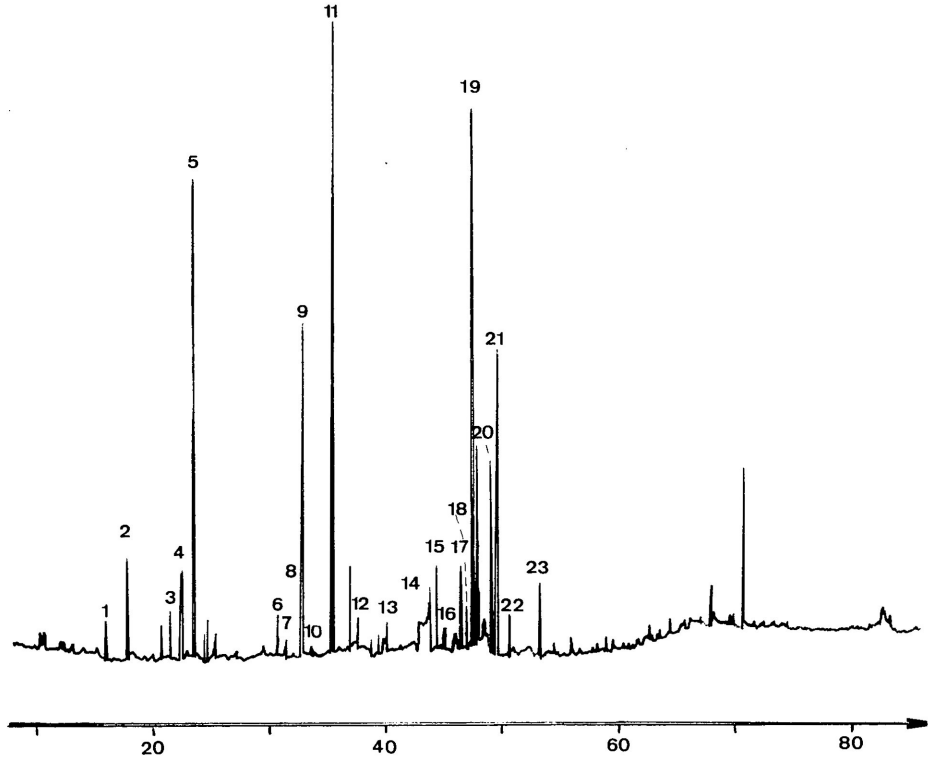


Fig. 1 — Chromatogramme d'un extrait aromatique de bois de chêne après séchage naturel (36 mois)

1 : octène-3-one-1, 2 : hexanol-1, 3 : nonanal, 4 : décanal, 5 : éthyl-2-hexanol-1, 6 : *trans* ß-méthyl-γ-octalactone, 7 : eugénol, 8 : méthyl-isobornéol, 9 : *cis* ß-méthyl-γ-octalactone, 10 : syringol, 11 : di-tert-butyl-p-crésol (étalon interne), 12 : iso-eugénol, 13 : vanilline, 14 : dihydroactinidiolide, 15 : époxy-5,6-ß-ionone, 16 : hydroxy-9-mégastigma-ène-3-one-1, 17 : hydroxy-9-mégasigma-triène-4,6,7-3-one, 18 : oxo-3-α-ionol, 19 : syringaldéhyde, 20 : oxo-4-ß-ionol, 21 : blumenol C, 22 : coniféraldéhyde, 23 : sinapaldéhyde

L'activité laccase (EC 1.10.3.2) est appréciée par l'oxydation spécifique de la syringaldazine selon la méthode de GRASSIN et DUBOURDIEU (1989). Après élimination des polyphénols solubles des milieux par adsorption sur une colonne de polyvinylpolypirrolidone, on mesure la densité optique du milieu réactionnel à 530 nm après 5 et 60 min de réaction.

VII — ÉTUDE DE LA DÉGRADATION CHIMIQUE OU BIOCHIMIQUE *IN VITRO* DE CERTAINS COMPOSÉS AROMATIQUES

L'étude des produits de dégradation de différents substrats phénoliques par des cultures de différentes moisissures sur milieu Czapek-Dox est effectuée de la façon suivante : 10 ml de suspension mycélienne sont prélevés après quatre semaines de culture et incubées en présence de 10 mg/l de substrat (100 µl d'une solution à 1,0 g/l dans l'éthanol absolu), en présence et en absence de péroxyde d'hydrogène (2 mM/ml). Après 12 et 48 h d'incubation à 25°C à l'obscurité, les produits de transformation sont analysés par HPLC dans les mêmes conditions que précédemment, par rapport à des échantillons témoins incubés en absence de suspension mycélienne. Les pics chromatographiques obtenus sont identifiés par co-injection avec des produits purs de référence et d'après les spectres UV enregistrés entre 220 et 380 nm par un détecteur à barette de diodes VARIAN 9065.

RÉSULTATS

I — COMPOSÉS VOLATILS IDENTIFIABLES DANS UN EXTRAIT DE BOIS DE CHÊNE APRÈS SÉCHAGE

L'analyse par le couplage CPG/SM (figure 1) permet d'identifier les principaux composés volatils extractibles du bois de chêne *Quercus petrae* après séchage mais sans aucun chauffage. En plus des composés classiquement identifiés dans les bois de chêne (lactones, phénols, aldéhydes phénols...) (MASUDA et NISHIMURA, 1971, NABETA et *al.*, 1986, CHATONNET, 1991), on retrouve la majorité des dérivés nor-isoprénoïques en C_{13} signalés par SEFTON et *al.* (1990). L'odorité (ou puissance aromatique) de ces derniers est encore mal connue mais vraisemblablement assez faible. En plus des composés à arôme agréable et caractéristique du chêne, on identifie également plusieurs substances (alcools, aldéhydes et cétones) dérivés des lipides et à odeurs désagréables. La présence d'octène-3-one-1 dans certains extraits se traduit par un arôme "champignonné" à caractère "moisi" et poussiéreux assez intense. De même, la présence de méthyl-isobornéol peut conférer un arôme "fongique" à nuance "camphrée" particulièrement désagréable. La présence de géosmine (*trans*, *trans*-diméthyl-décalol), composé fréquemment rencontré en compagnie des deux précédents, n'a pas été détectée dans nos conditions d'extractions.

Parmi les principaux composés volatils extractibles du bois de chêne formellement identifiés, seuls l'eugénol, la vanilline et les isomères *cis* et *trans* de la ß-méthyl-γ-octalactone possèdent un pouvoir odorant important et bien connu (BOIDRON et *al.*, 1988). Nous nous sommes attachés à l'étude de la variation de ces composés au cours du séchage du bois.

II — ÉVOLUTION DE LA TENEUR DU BOIS EN EUGÉNOL

Le bois de chêne avant séchage contient relativement peu d'eugénol (moins de 20 µg/g). Au cours de son séchage et de son vieillissement naturel (figure 2), on assiste à une augmentation assez faible de la concentration en eugénol du bois qui demeure faible (moins de 100 µg/g). Cette teneur semble passer par un maximum entre 5 et 10 ans de vieillissement pour diminuer au delà. Les couches superficielles du merrain sont toujours moins riches en eugénol que les plus profondes.

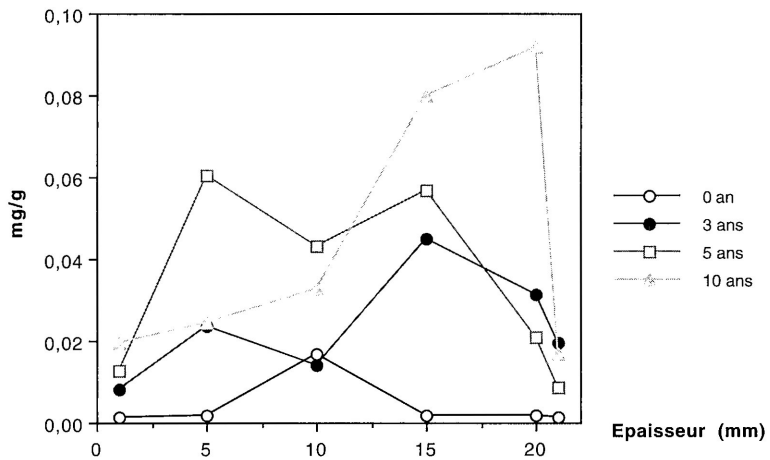


Fig. 2 — Evolution de la teneur du bois en eugénol

III — ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN ALDÉHYDES PHÉNOLS

Compte tenu de la relative instabilité des aldéhydes cinnamiques qui ont tendance à s'oxyder naturellement en aldéhydes benzoïques et en acides phénols correspondants, nous ne nous sommes intéressés qu'à l'évolution des teneurs en vanilline et en syringaldéhyde (figures 3 et 4).

Le bois avant séchage ne contient que des traces d'aldéhydes phénols. Au cours du séchage des merrains, on assiste à une évolution régulière et continue de la teneur en syringaldéhyde ; cette évolution est relativement importante entre 0 et 3 ans est plus limitée au delà. La teneur en vanilline du bois est toujours plus faible que celle en syringaldéhyde (en moyenne 3 à 4 fois moins). On assiste de la même façon à une augmentation de sa concentration au cours du séchage, mais après 3 ans les variations mesurées ne sont plus significatives.

Entre 0 et 5 ans, les teneurs en aldéhydes phénols des couches superficielles du merrain restent faibles et évoluent très peu par rapport aux couches plus profondes. Dans le bois le plus âgé (10 ans), on constate une accumulation d'aldéhydes phénols, y compris dans la couche superficielle (0-1 mm).

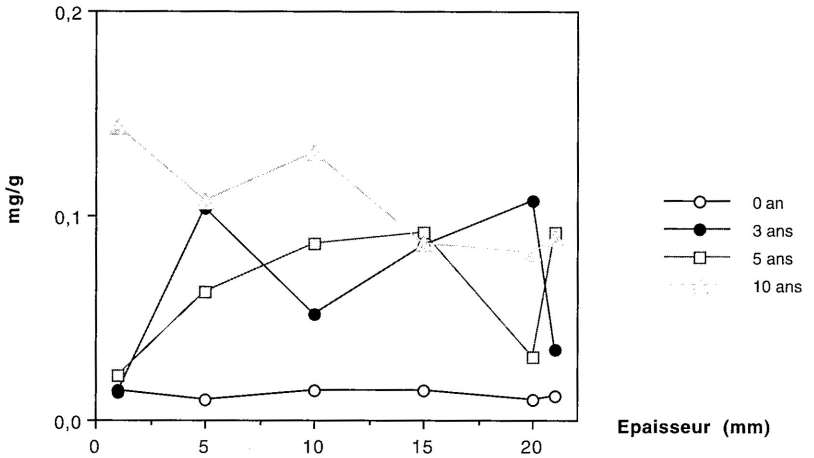


Fig. 3 — Evolution de la teneur du bois en vanilline

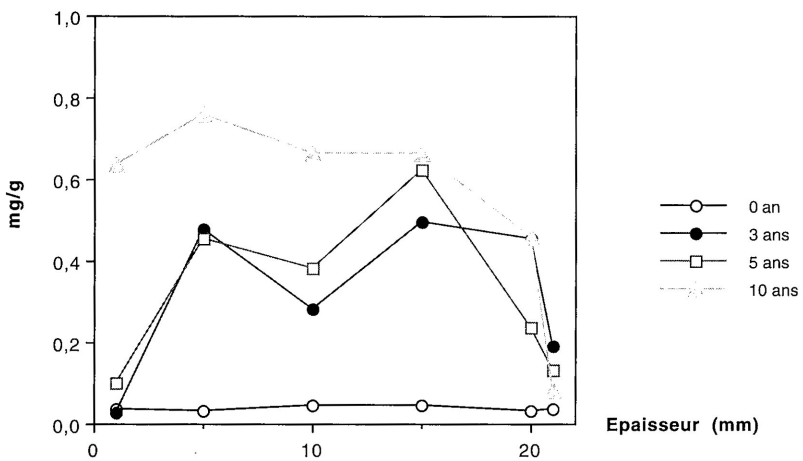


Fig. 4 — Evolution de la teneur du bois en syringaldéhyde

IV — ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN ISOMÈRES DE LA ß-MÉTHYL-γ-OCTALACTONE (MOL)

Le bois vert ne contient que des traces de *trans* MOL. Au cours du séchage naturel du bois de chêne, il se produit une forte augmentation de la teneur en MOL (figures 5 et 6). On assiste d'abord à une rapide augmentation de la *trans* MOL entre 0 et 3 ans de séchage. Au delà, la *trans* MOL ne s'accumule plus et à même tendance à diminuer. Dans le même temps, la teneur en *cis* MOL augmente régulièrement avec le vieillissement du bois. L'augmentation est forte entre 0 et 5 ans et plus limitée entre 5 et 10 ans.

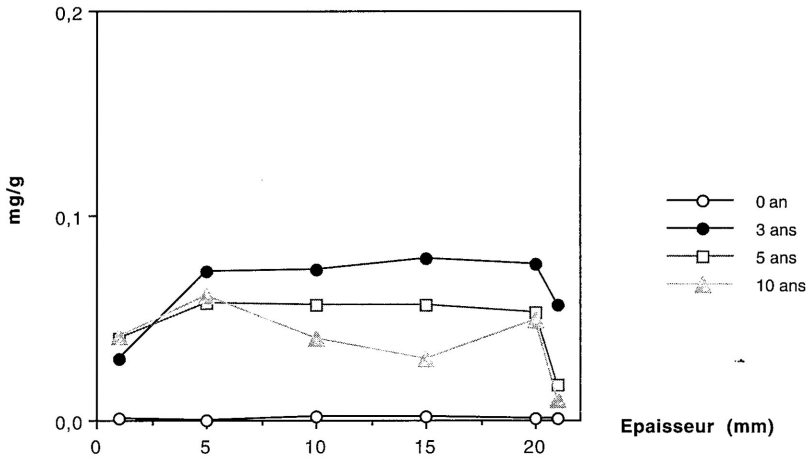


Fig. 5 — Evolution de la teneur du bois en *trans* ß-méthyl-γ-octalactone

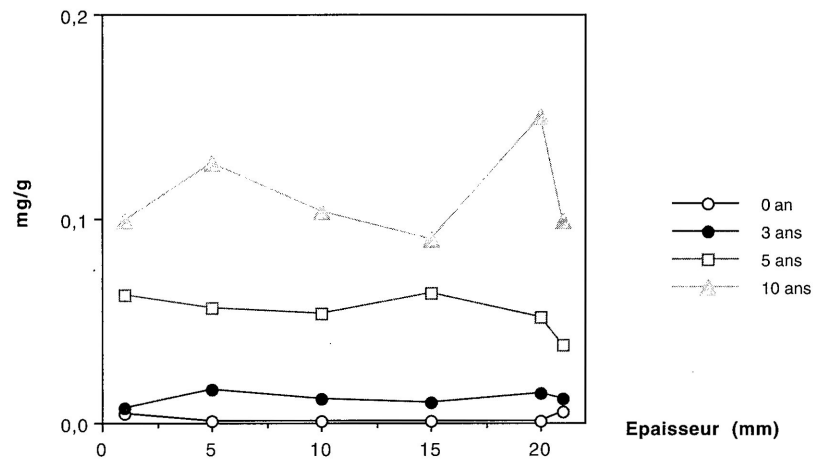


Fig. 6 — Evolution de la teneur du bois en *cis* ß-méthyl-γ-octalactone

V — ÉVOLUTION DU PRÉCURSEUR DE LA ß-MÉTHYL-γ-OCTALACTONE (PMOL)

Nous avons étudié l'évolution des formes *cis* et *trans* d'un précurseur non volatil et inodore de la ß-méthyl-γ-octalactone révélable par chauffage en milieu acide concentré (OTSUKA et *al.*, 1980, CHATONNET, 1991).

Le bois vert contient peu voire pas de PMOL (traces de *trans* PMOL). Pendant le séchage, on assiste tout d'abord à une accumulation de *cis* PMOL entre 0 et 3 ans puis à une diminution. A l'inverse, le *trans* PMOL s'accumule régulièrement dans le bois tout au long de son vieillissement (figure 7 et 8).

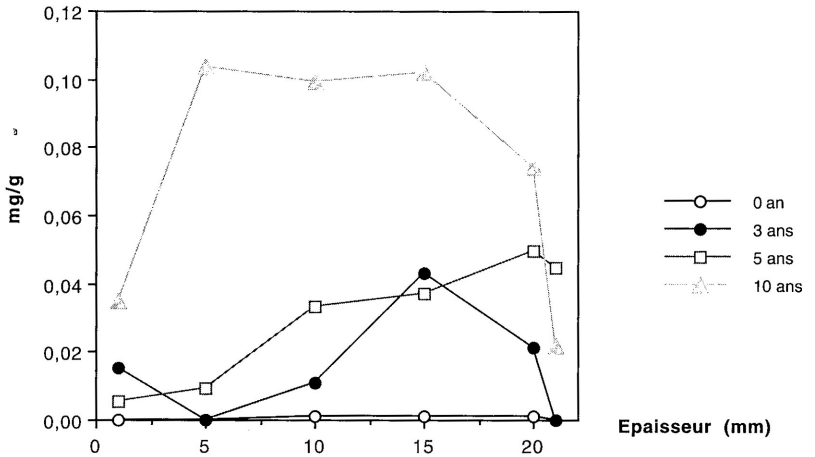


Fig. 7 — Evolution de la teneur du bois en précurseur de *trans* ß-méthyl-γ-octalactone

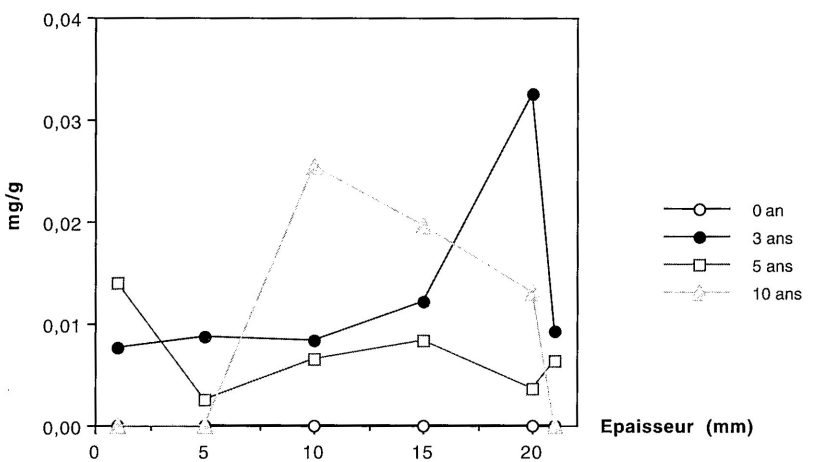


Fig. 8 — Evolution de la teneur du bois en précurseur de *cis* ß-méthyl-γ-octalactone

VI — RÔLE DES MOISISSURES ISOLÉES DE MERRAINS EN COURS DE SÉCHAGE SUR LES COMPOSÉS AROMATIQUES DU BOIS DE CHÊNE

Après deux semaines de culture sur un milieu supplémenté avec un extrait de bois de chêne, on constate que *Penicilium roqueforti* et *Trichoderma viride* ont modifié significativement la composition des milieux (tableau I). En effet, après analyse par chromatographie en phase gazeuse, on remarque que certains composés subissent peu de variations (méthyl-octalactones, eugénol...), d'autres diminuent très fortement (aldéhydes phénols, dérivés C_{13} nor-isoprénoïques) mais aucun n'augmente significativement.

TABLEAU I

Evolution de la composition d'un milieu modèle supplémenté avec un extrait de bois de chêne lors du développement de différentes moisissures isolées de merrain en cours de séchage naturel.

(Evolution relative par rapport à un témoin (base 100) non ensemencé)

Composés analysés	Témoin	*Penicillium roqueforti*	*Trichoderma viride*
Lactones			
Trans méthyl-octalactone	100	89	100
Cis méthyl-octalactone	100	97	95
Σ méthyl-octalactones	100	93	98
Phénol volatil			
Eugénol	100	85	114
Aldéhydes phénols			
Vanilline	100	3	4
Syringaldéhyde	100	45	58
Coniféraldéhyde	100	40	30
Sinapaldéhyde	100	45	59
Σ aldéhydes phénols	100	35	29
C13 nor-isoprénoïdes			
3-oxo-ß-ionone	100	32	20
3-oxo-a-ionol	100	79	79
4-oxo-ß-ionol	100	73	75
Blumenol C	100	105	111

3 semaines de culture sur milieu Czapek-Dox à 20°C à l'obscurité

La culture réalisée directement sur bois de chêne autoclavé aboutit à des résultats similaires (tableau II). Les aldéhydes phénols et l'eugénol subissent une diminution très importante avec tous les micro-organismes testés. La culture de *Penicilium roqueforti* affecte assez peu les isomères de la ß-méthyl-γ-octalactone tandis que *Aureobasidium pullulans* et *Trichoderma koningii* réduisent notablement la teneur en γ-lactones des milieux.

Aucun des champignons identifiés fréquemment sur le merrain au cours de son séchage naturel et cultivés en présence de bois ne possèdent d'activités ligninase ou laccase (tableau III, figure 9). L'étude de la dégradation *in vitro* de la vanilline permet de montrer que ces mêmes micro-organismes plusieurs activités oxydo-réductases capables d'agir séquentiellement sur le groupement -CHO des aldéhydes phénols pour former l'alcool correspondant, puis sur le groupement -CHOH de ces alcools pour former l'acide carboxylique correspondant (figure 10). L'acide vanillique s'accumule transitoirement dans le milieu. Il pourrait être partiellement oxydé en méthoxy-hydroquinone pour être ensuite dégradé par la voie du ß-céto-adipate après déméthylation.

TABLEAU II

Evolution de la composition d'un milieu modèle supplémenté avec de la sciure de bois de chêne autoclavée lors du développement de différentes moisissures isolées de merrains en cours de séchage naturel

(Evolution relative par rapport à un témoin (base 100) non ensemencé)

Composés analysés	Témoin	*Aureobasidium pullulans*	*Trichoderma koningii*	*Penicillium roqueforti*
Lactones				
Trans méthyl-octalactone	100	46	46	46
Cis méthyl-octalactone	100	38	57	103
Σ méthyl-octalactones	100	39	56	98
Phénol volatil				
Eugénol	100	19	24	22
Aldéhydes phénols				
Vanilline	100	64	53	14
Syringaldéhyde	100	12	42	19
Σ aldéhydes phénols	100	38	48	17

2 semaines de culture, milieu Czapek-Dox + 20 g/l de bois stérile, 27°C à l'obscurité

TABLEAU III

Recherche d'activités enzymatiques impliquées dans la dégradation biochimique de la lignine chez différents micro-organismes isolés de bois de chêne

Micro-organismes	Activité laccase*	Activité ligninase**
Deutéromycètes		
Penicillium roqueforti	—	—
Penicillium glabrum	—	—
Aureobasisium pullulans	—	—
Trichoderma koningii	—	—
Trichoderma viride	—	—
Epicoccum nigrum	—	—
Epicoccum purpurens	—	—
Ascomycètes		
Hormonema sp.	—	—
Candida sp.	—	—
Basidiomycète		
Champignon de pourriture blanche	++++	++

* : test sur syringaldazine - ** : test sur alcool vératrique + H_2O_2

— : abscence - ++++ : présence forte

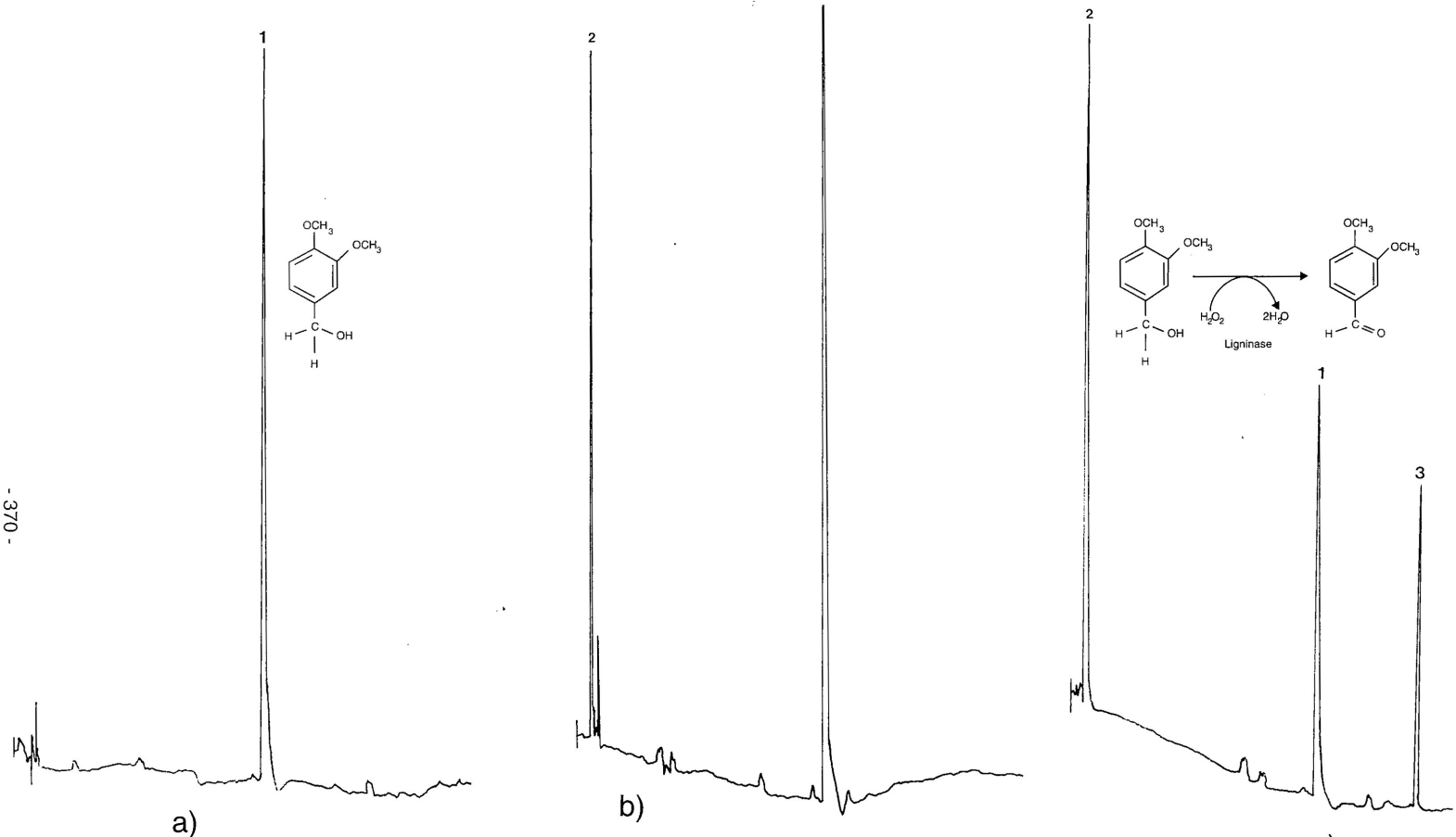


Fig. 9 — Recherche d'activité ligninase (lignine péroxydase) par mesure de la dégradation de l'alcool vératrique
a) alcool vératrique + H_2O_2 (Témoin) - b) suspension de *Trichoderma koningii*, activité ligninase : (-),
c) suspension de champignon de pourriture blanche du bois, activité ligninase : (+)
1: alcool vératrique (diméthoxy-3,4-benzylique), 2: hydropéroxyde d'hydrogène, 3: aldéhyde vératrique (diméthoxy-3,4-benzaldéhyde)

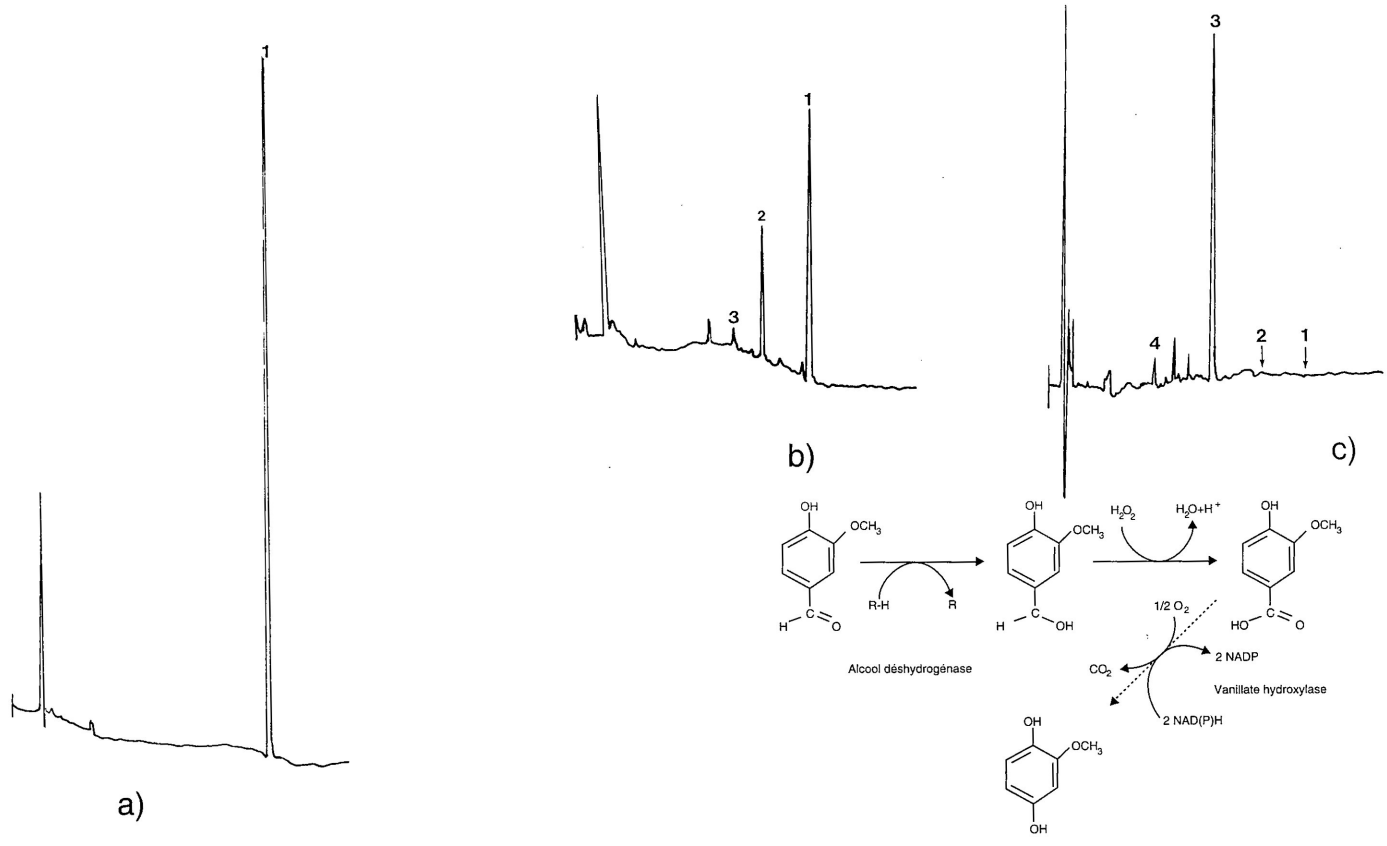


Fig. 10 — Etude de la dégradation de la vanilline par des champignons Deutéromycètes (*Aureobasidium pullulans*) isolés de bois de chêne en cours de séchage naturel

a) Vanilline t = 0, b) Vanilline t = 12 h, c) Vanilline t = 48 h
1: vanilline, 2: alcool vanillique, 3: acide vanillique, 4: méthoxyhydroxquinone

En condition oxydante, les dérivés diméthoxylés s'avèrent plus stables que les monométhoxylés (figure 11). La vanilline n'est que faiblement oxydable directement. Dans les mêmes conditions, l'alcool vanillique (hydroxy-4-méthoxy-3-benzylique) est rapidement oxydé en acide vanillique alors que, en absence d'acivité ligninase, l'alcool vératrique (diméthoxy-3,4-benzylique) est très stable.

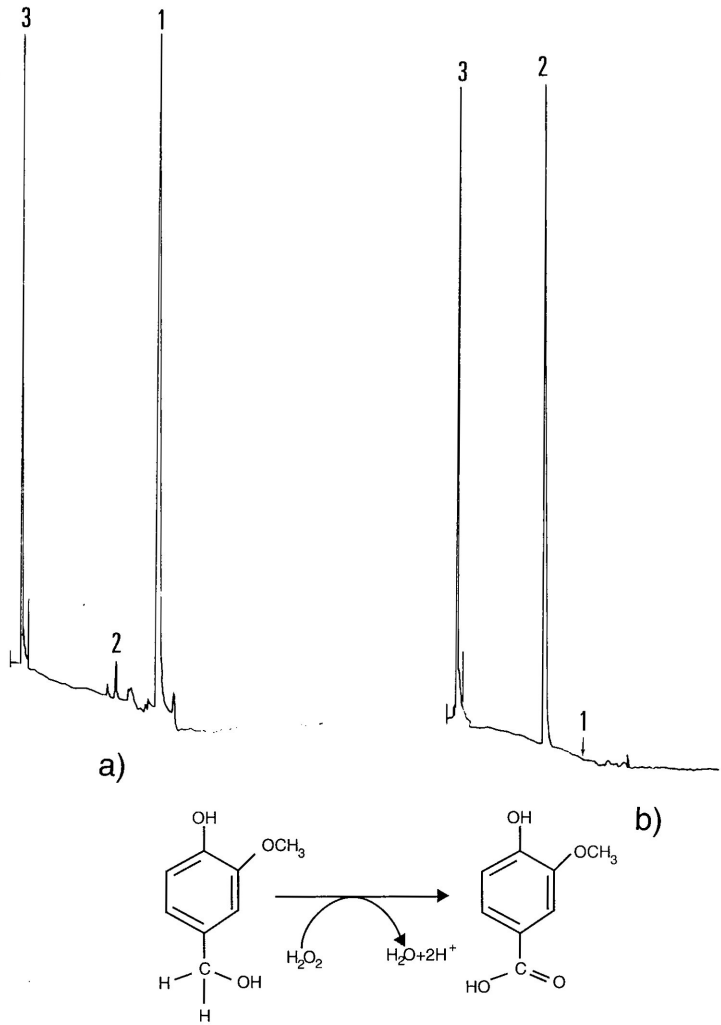


Fig. 11 — Evolution de la vanilline et de ses dérivés en conditions oxydantes (substrat 0,065 mM/ml+ H_2O_2 5 mM/ml)

a = Vanilline + H_2O_2 (12 h)
1 : vanilline, 2 : acide vanillique ; 3 : hydropéroxyde d'hydrogène

b = Alcool vanillique + H_2O_2 (12 h)
1 : alcool vanillique, 2 : acide vanillique, 3 : hydropéroxyde d'hydrogène

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Pendant le séchage et le vieillissement à l'air libre du merrain, on assiste à une profonde modification de la composition physico-chimique et du profil aromatique du bois. La concentration de nombreux composés évolue notablement. La majorité d'entre eux possèdent des arômes intéressants (phénols volatils, aldéhydes phénols, ß-méthyl-γ-octalactone), mais certaines substances à l'arôme désagréable sont néanmoins présentes et susceptibles de communiquer des goûts indésirables. Parmi les composés que nous avons identifiés (cétones et aldéhydes dérivés des lipides, sesquiterpènes), la majorité provient de la dégradation de constituants du bois par certains micro-organismes (actinomycètes divers, algues microscopiques...) (KAMINSKI et *al.*, 1974, GERBER, 1979). Lors de la fabrication des barriques, la majorité de ces produits indésirables, principalement localisés à la surface du bois, est normalement éliminée par le rabottage et le chauffage des douelles. Cependant, les bois de fonds ne sont traditionnellement que peu, voire pas, rabottés et exceptionnellement chauffés. En conséquence, la dégustation des eaux de dégorgeage en témoigne, des goûts peu agréables pourraient être communiqués au vin si les fonds n'étaient pas au préalable convenablement lavés. La pratique du dégorgeage des fûts "tête sur cul", souvent recommandée lors de la mise en œuvre des barriques neuves (BOIDRON, 1993), trouve ici sa justification.

Concernant les molécules à arôme positif et caractéristique du chêne, SEFTON et *al.* (1993) ont observé une diminution régulière de l'eugénol au cours du séchage naturel de différentes provenances géographiques et botaniques de bois. Dans nos conditions, les teneurs en eugénol du bois augmentent légèrement (20 à 60 µg/g) au cours du séchage, mais les variations restent toujours faibles en comparaison des quantités susceptibles d'être formées par le brûlage des douelles (3 à 5 fois plus, CHATONNET et *al.*, 1989).

SEFTON et *al.* (1993) n'ont observé aucun effet du temps et du lieux de séchage sur la teneur en vanilline du bois. En revanche, au cours des 18 premiers mois de séchage naturel en Ecosse, SWAN et *al.* (1993) signalent une augmentation significative des teneurs en vanilline, syringaldéhyde et sinapaldéhyde extractibles. Parallèlement, ces mêmes auteurs notent une dégradation régulière de la lignine tout au long du vieillissement du bois.

Dans nos conditions, il apparaît que le bois brut d'abattage ne contient que des traces d'aldéhydes phénols (environ 10 µg/g). En accord avec SWAN et *al.* (1993), on assiste au cours du séchage des merrains à une nette augmentation de ces composés et plus particulièrement des molécules diméthoxylées, substitution majoritairede la lignine de chêne. Mais parmi les différentes molécules identifiées, seule la vanilline possède un éventuel potentiel odorant.

Les aldéhydes phénols rencontrés proviennent de la dégradation de la lignine du bois de chêne. La dégradation chimique de ce polymère (figure 12, voie 1) aboutit à l'apparition d'aldéhydes hydroxycinnamiques (coniféraldéhyde, sinapaldéhyde) par l'élimination γ-ß d'une unité monomère terminale (KRATZ et *al.*, 1959). En présence d'oxygène, le clivage oxydatif de la double liaison α-ß aboutit, *via* la formation de α-propanones, à la formation d'aldéhydes benzoïques (vanilline, syringaldéhyde) qui s'accumulent dans un premier temps, mais qui s'oxydent ensuite en acides phénols correspondants (acide vanillique et syringique) (PUECH, 1978).

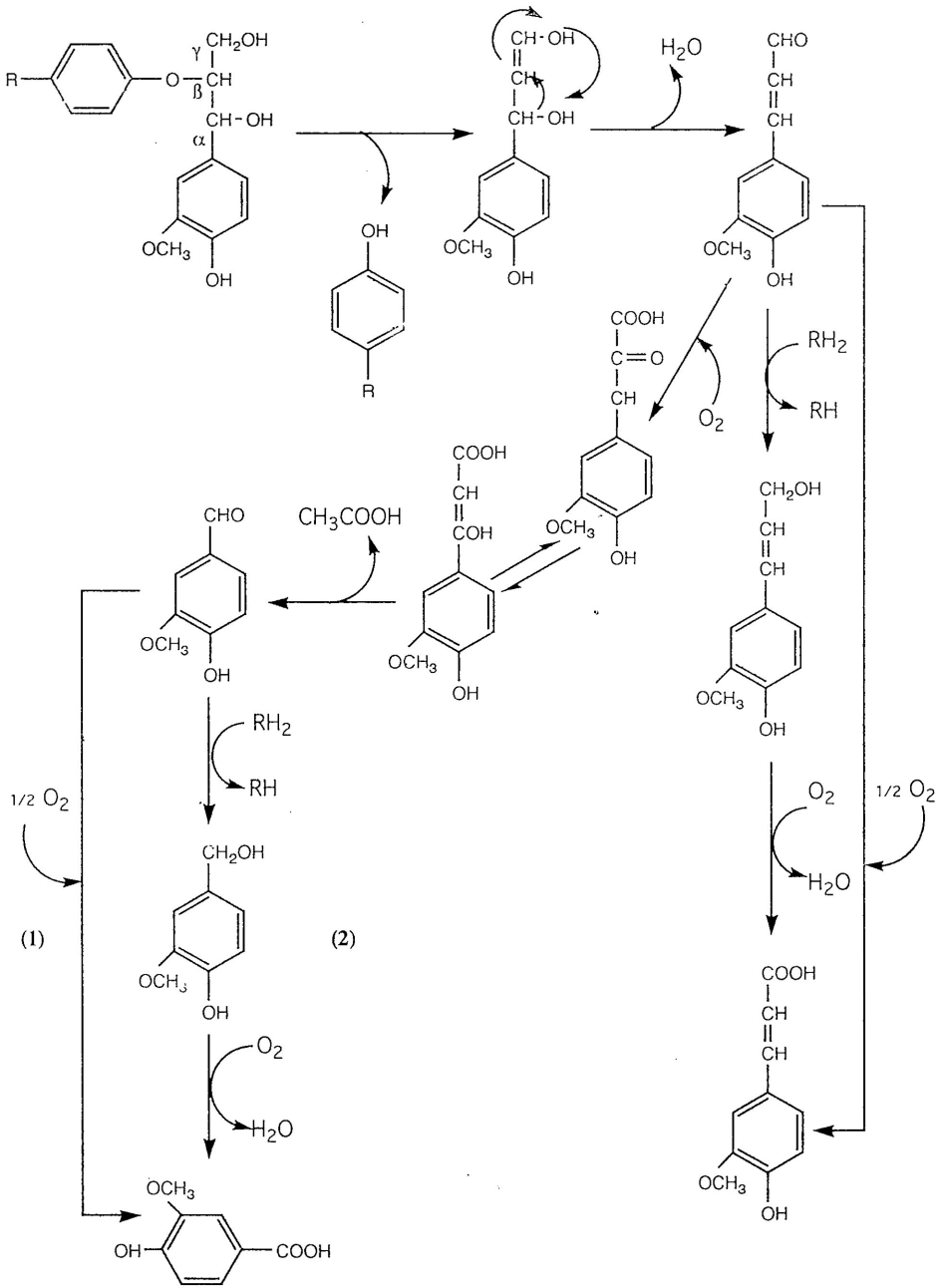


Fig. 12 — Dégradation de la lignine et des aldéhydes phénols au cours du séchage du bois . Exemple des dérivés monométhoxylés

voie (1) : dégradation par acidolyse et oxydation chimiques
voie (2) : dégradation biochimique (jusqu'aux acides phénols) après acidolyse chimique

Dans les conditions du séchage naturel du bois, on assiste donc à une dépolymérisation et à une oxydation de la lignine qui aboutit à la formation d'aldéhydes phénols, notamment de syringaldéhyde et de vanilline. La formation des dérivés diméthoxylés (en particulier le syringaldéhyde), naturellement plus abondants et plus stables, est importante au cours des 3 premières années de séchage et beaucoup plus limitée au delà. L'augmentation de la teneur en vanilline extractible est toujours plus faible pour plusieurs raisons. D'une part, la quantité de précurseurs dégradables dans le bois pendant le séchage est plus limitée, d'autre part cette molécule est plus sensible à la dégradation oxydative. En comparaison des quantités d'aldéhydes phénols libérables (150 à 350 µg/g de vanilline environ) au cours du traitement thermique des barriques (CHATONNET et *al.*, 1989), le rôle du séchage et du vieillissement du bois apparaît limité (90 à 100 µg/g après 3 ans de vieillissement) mais non négligeable

L'hypothèse d'une dégradation biochimique de la lignine a également été avancée pour expliquer l'augmentation des teneurs en aldéhydes phénols du bois (MARCHE et JOSEPH, 1975, VIVAS et *al.*, 1991). Cependant, seuls des champignons cellulolytiques ont été signalés en abondance sur le merrain en cours de séchage (VIVAS et *al.*, 1991, LARIGNON et *al.*, 1994). Les champignons lignivores ne sont présents que de manière exceptionnelle lorsque le bois a été stocké plus de 5 ans à l'air libre (CHATONNET, 1993, CHATONNET et *al.*, 1994a). Par ailleurs, les couches du merrain les plus fortement colonisées par les microorganismes ne sont pas les plus riches en aldéhydes phénols.

La culture, sur des extraits de bois ou sur de la sciure autoclavée, des principaux microorganismes identifiés pendant le séchage naturel, entraîne dans tous les cas la diminution des aldéhydes phénols et non leur apparition. En effet, contrairement à VIVAS (1993) qui classe *Aureobasidium sp.* parmi les champignons lignolytiques, aucun des micro-organismes étudiés ne possède les activités ligninase et laccase indispensables au clivage de la lignine (KIRK et FARREL, 1987 ; KERSTEN et *al.*, 1985), car il s'agit de champignons à caractère exclusivement cellulolytique. En revanche, la majorité de ces micro-organismes, notamment *Trichoderma koningii*, est capable de dégrader les substances issues du clivage oxydatif de la lignine en présence de substrats énergétiques fournis par la dégradation de la cellulose et des hémicelluloses (HALUK et METCHE, 1982).

Les champignons lignolytiques ne peuvent que difficilement se développer dans le merrain en situation normale de séchage car le taux d'humidité du bois devient rapidement insuffisant (< 30 p. cent) pour autoriser leur développement (BAUER, 1987). L'arrosage périodique des piles peut favoriser l'implantation de certaines moisissures cellulolytiques xérophyles (LARIGNON et *al.*, 1994). Cependant, l'humidification est trop faible et limitée dans le temps pour que des espèces lignolytiques puissent s'implanter significativement ; ces champignons ne sont donc rencontrés que très rarement sur des bois vieillis au-delà des nécessités normales de la tonnellerie.

Les micro-organismes qui nous intéressent pourraient indirectement attaquer la lignine par un mécanisme chimique, *via* la production de péroxyde d'hydrogène et d'acide oxalique en présence de fer, mécanisme déjà décrit pour la dégradation des celluloses et hémicelluloses par des champignons de pourriture brune sans intervention des cellulases

(KOENIG, 1974, SCHMIDT et *al.*, 1981). Cependant, avec ce type de dégradation, les aldéhydes phénols ne s'accumulent pas car ils sont également oxydés.

Par ailleurs, nous avons montré que tous ces micro-organismes possèdent une forte activité réductase (alcool déshydrogénase) exocellulaire susceptible de transformer rapidement les aldéhydes phénols en alcools correspondants. Ces derniers peuvent facilement être oxydés biochimiquement, ou chimiquement, en acides phénols qui s'accumulent transitoirement et qui sont à leur tour dégradables (figure 12, voie 2). A l 'inverse de la vanilline, les alcools et les acides hydroxycinnamiques ou benzoïques sont dénués de tout impact organoleptique compte tenu de leurs seuils de perception très élevés (SKOURIKHIN et EFIMOV, 1972).

Les champignons lignolytiques (*Phanerochaete, Trametes, Polyporus...*) sont capables de réaliser simultanément la décarboxylation oxydative des acides phénols en méthoxyhydroquinone, puis leur réduction en aldéhydes phénols et en alcools (CRAWFORD, 1981, ERIKSSON,1982). En revanche, les champignons cellulolytiques isolés du bois de chêne que nous avons étudiés en sont incapables. Ces mêmes acides phénols peuvent être décarboxylés en phénols volatils (gaïacol, syringol, vinyl-4-phénol, vinyl-4-gaïacol ou vinyl-4-syringol) par divers micro-organismes du type moisissures, levures ou bactéries telluriques (ODIER et *al.*, 1982, CLIFFORD et *al.*, 1969, BOIDRON et *al.*, 1988). Nous n'avons jamais observé une augmentation particulière de ces composés dans les échantillons de bois étudiés.

En conséquence, l'apparition d'aldéhydes phénols au cours du séchage du bois a vraisemblablement pour origine principale l'acidolyse et l'oxydation chimiques des unités terminales de lignine. Ajouté aux phénomènes de lessivage et de photodégradation qui sont intenses à la surface du merrain, la dégradation biochimique des aldéhydes pourrait expliquer pourquoi les couches superficielles, largement colonisées par divers micro-organismes capables de dégrader enzymatiquement ces molécules, ne possèdent que de très faibles teneurs en aldéhydes phénols en comparaison des couches de bois plus profondes.

Les isomères *cis* et *trans* de la ß-méthyl-γ-octalactone (MOL) et de son précurseur (PMOL) subissent l'évolution la plus spectaculaire. Alors que le bois vert n'en contient que des traces, on assiste pendant le séchage du bois à une forte augmentation de la teneur en MOL. La concentration en *trans* MOL, isomère prépondérant au départ, se stabilise en moins de 3 ans pour ne plus évoluer voire diminuer ensuite. La teneur en *cis* MOL augmente régulièrement avec le temps sur toute l'épaisseur du merrain. Nos résultats sont parfaitement en accord avec ceux de MAGA (1989) qui a signalé l'augmentation régulière de la teneur en MOL de bois de chêne américain (*Quercus alba*) stockés sous abri pendant 5 ans. Ils confirment également nos premières observations sur le sujet effectuées sur des bois de chênes européens (*Quercus petrae* et *Q. robur*) séchés naturellement ou rapidement par étuvage (CHATONNET, 1991, 1992). Par contre, nous n'obtenons pas les mêmes résultats que SEFTON et *al.* (1993) qui observent une évolution irrégulière de la MOL au cours du séchage naturel avec une tendance générale à la diminution.

Le dosage des isomères du PMOL révèle une augmentation importante au cours du séchage naturel du bois. A l'inverse de la lactone libre, la forme *trans* du PMOL s'accumule régulièrement au fur et à mesure du vieillissement ; l'isomère *cis* subit une évolution similaire mais beaucoup moins intense.

Les structures du PMOL et de ses précurseurs demandent à être confirmées afin que les mécanismes de leurs transformation soient exactement précisés. En l'état de nos connaissances, tout se passe comme si du PMOL se formait pendant le séchage du bois à partir de précurseurs plus complexes. La forme *trans*, chimiquement plus stable, pourrait s'accumuler tandis que l'isomère *cis* subirait plus facilement une hydrolyse libérant de la *cis* MOL qui s'accumule dans le bois. Si on retient la structure du PMOL proposée par OTSUKA et *al.* (1980) (figure 13), la rupture de la liaison ester suffit à produire la MOL car l'acide hydroxy-5-méthyl-3-octanoïque se transforme spontanément en MOL en milieu acide par estérification interne. Les micro-organismes étudiés dans ce travail ne se sont pas montrés capables de former de la MOL à partir de bois ou d'un extrait contenant du PMOL. En revanche, certaines moisissures (*Trichoderma sp., Aureobasidium sp.*) sont capables de dégrader en partie la MOL. Associée aux phénomènes de lessivage et de dégradation chimique, une dégradation enzymatique (activité estérase), plus intense à la surface du merrain, pourrait une fois de plus expliquer la moindre teneur en MOL des couches superficielles du bois.

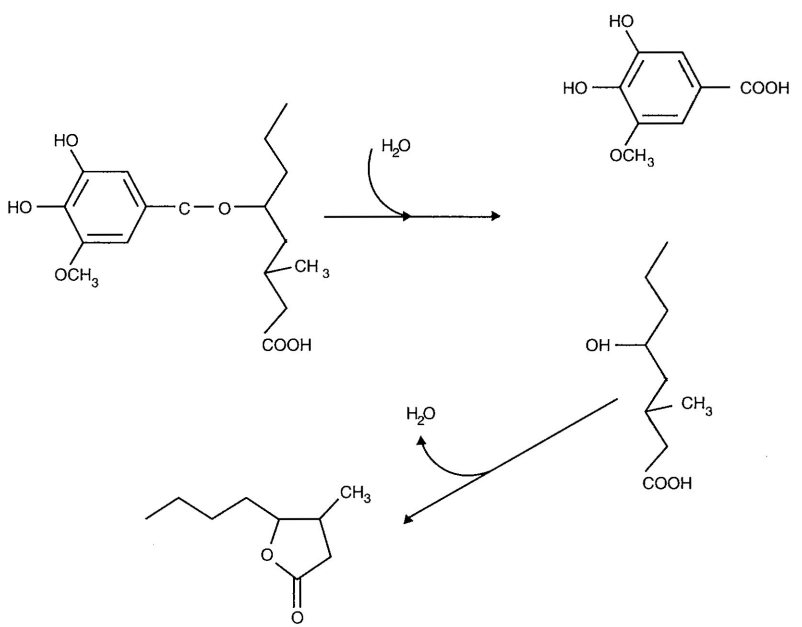


Fig. 13 — Structure hypothètique du précurseur de ß-méthyl-γ-octalactone (PMOL) selon OTSUKA et *al.* (1980) et libération de γ-lactone (MOL)

Compte tenu de la différence de seuils de perception entre isomères *cis* et *trans* de la MOL (CHATONNET, 1991) et des variations de la teneur en eugénol et en vanilline, le séchage naturel du bois se traduit par une augmentation du potentiel aromatique du bois tant que de la *cis* MOL s'accumule.

Mais bien d'autres composés, encore inconnus, possédant des arômes intéressants ou désagréables, doivent être influencés pendant le déroulement de cette période. L'étude de ces composés et des mécanismes impliqués dans leur évolution font l'objet des recherches en cours.

Remerciements :

Nous remercions Ch. VINGHES pour sa collaboration technique.

Manuscrit reçu le 5 juin 1994 accepté pour publication le 30 septembre 1994

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BAUER C., 1987. Etude des relations entre l'humidité du bois et l'attaque fongique. In "*Actes du colloque Sciences et Industries du bois*", 22-24 avril 1987, 205-212.

BOIDRON J.N., CHATONNET P. et PONS M., 1988. Incidence du bois sur certaines substances odorants des vins. *Conn. Vigne et Vin*, **22**, 275-294.

BOIDRON J.N., 1993. Préparation et entretien des barriques. *Rev. Fr. Œnol.*, **144**, 54-59.

CHATONNET P., BOIDRON J.N. et PONS M., 1989. Influence du traitement thermique du bois de chêne sur sa composition chimique. 2e partie: évolution de certains composés en fonction de l'intensité de brûlage. *Conn. Vigne Vin*, **23**, n°4, 223-250.

CHATONNET P., 1991. Incidences du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins - Applications technologiques. *Thèse de D.E.R.*, Université de Bordeaux II, n°2, 224 p.

CHATONNET P., 1992. Origines et traitements des bois en tonnellerie - Incidence de l'origine et du mode de séchage sur la composition et la qualité des bois de chênes en tonnellerie. In " *Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie*", numéro spécial de *J. Int Sci. Vigne et Vin*, 39-49.

CHATONNET P., 1993. Le séchage et la maturation des bois en tonnellerie. In "*La barrique et le vin : Maîtrise scientifique d'un savoir-faire traditionnel*". SEGUIN-MOREAU & Cie Ed., Cognac, 28-41.

CHATONNET P., BOIDRON J.N. et DUBOURDIEU D., 1994a. Nature et évolution de la microflore du bois de chêne au cours de son séchage et de son vieillissement à l'air libre. *J. Int Sci. Vigne et Vin*, **28**, n°3, 185-201.

CHATONNET P., BOIDRON J.N. et DUBOURDIEU D., 1994b. Evolution des composés phénoliques du bois de chêne au cours de son séchage et de son vieillissement. *J. Int Sci. Vigne et Vin*, **28**, n°4,

CLIFFORD D.R., FAULKNER J.K. WALKER R.L. and WOODCOCK D., 1969. Metabolism of cinnamic acid by *Aspergillus niger. Phytochem.*, **8**, 549-552.

ERIKSSON K.E., 1982. Recent adavances on biodegradation of lignin. *Bull. Liaison Groupe Polyphénols*, **11**, 177-186.

GERBER N.N., 1979. Volatile substances from actinomycetes : their role in the odor pollution of water. *CRC Critical reviews in Microbiology*, 191-214.

GRASSIN C., DUBOURDIEU D., 1989. Quantitative determination of *Botrytis Laccase* in musts and wines by the syringaldazine test. *J. Sci. Food Agric.*, **48**, 369-376.

HALUK J.P. et METCHE M., 1982. Biotransformation de la lignine ozonolysée par deux champignons : *Trametes versicolor* et *Trichoderma Köningii. Bull. Liaison Groupe polyphénols*, **11**, 205-217.

KAMINSKI E., STAWICKI S. andWASOWICZ E., 1974. Volatile flavor compounds produced by molds of *Aspergillus*, *Pennicilium* and *Fungi imperfecti. Applied Microbiology*, **27**, n°6, 1001-1004.

KERSTEN P., TIEN M., KALYANARAMAN and KIRK T.K., 1985. The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radical from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.*, **260**, 5, 2609-2612.

KIRK T.L. and FARREL R.L, 1987. Enzymatic «combustion» : The microbial degradation of lignin. *Ann Rev. Microbiol.*, **41**, 465-505.

KIRK T.K, CROAN S., TIEN M., MURTAGH K.E and FARRELL R.L., 1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium* : effect of a selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 27-32.

KOENIGS J.W., 1974. Hydrogen peroxyde and iron : a proposed system fo decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes. *Wood and Fiber Sc.*, **6**, n°1, 66-80.

KRATZL K., KISSER W., GRATZL J. und SILBERNAGEL H., 1959. Der ß-guajacyläther des guajacylglycerins, seine umwandlung in coniferaldehyde und verschiedene andere aryl-propan derivate. *Monatsch. Chem.*, **90**, 771-782.

LARIGNON Ph., ROULLAND C., VIDAL J.P. et CANTAGREL R., 1994. Etude de la maturation en Charentes des bois de tonnellerie. *Rapport d'étude de la Station Viticole du Bureau National Interprofesionnel du Cognac*, 21 p.

MAGA J.A., 1989. Formation and extraction of *cis* and *trans* ß-méthyl-γ-octalactone from *Quercus alba*. In "*Distilled beverages flavour : recent developments*". PIGOTT J.R. and PATERSON A. Ed., Chichester Ellis Hortwood Pub., 171-176.

MARCHE M. et JOSEPH E., 1975. Etude théorique sur le Cognac et son vieillissement. *Rev. Fr. Œnol.*, **57**, 1-106.

MASUDA M. and NISHIMURA K., 1971. Branched nonalactones from some *Quercus* species. *Phytochem.*, **10**, 1401-1402.

NABETA K., YONEKUBO J.and MIYAKE M., 1986. Analysis of volatile constituents of european and japanese oaks. *Mokuzai Gakkaishi*, **32**, 921-927.

ODIER E., ROLANDO C. et MONTIES B., 1982. Catabolisme d'un dimère de type lignine le guaïacylglycérol-ß-coniféril éther par *Pseudomonons cepacia* 122. *Bull. Liaison Groupe polyphénols,* **11**, 226-232.

OTSUKA K., SATO K. and YAMASHITA T., 1980. Structure of a precursor of ß-methyl-γ-octalactone, an aging flavor compound of distilled liquors. *J. Ferm. Technol.*, **58**, 395-398.

PUECH J.L., 1978. Vieillissement des eaux-de-vie en fûts de chêne. Extraction de la lignine et de ses produits de dégradation. *Thèse N°2087*, Université Paul Sabatier de Toulouse, 68 p.

SEFTON M.A. , FRANCIS I.L. and WILLIAMS P.J., 1990. Volatile norisoprenoid compounds as constituents of oakwood used in wine and spirit maturation. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 2045-2049.

SEFTON M.A, FRANCIS I.L., POCOCK K.F. and WILIAMS P.J., 1993a. The influence of natural seasoning on the concentration of eugenol, vanillin and *cis* and *trans* ß-methyl-γ-octalactone extracted from french and american oakwood. *Sci. Alim.*, **13**, n°4, 629-644.

SCHMIDT C.J., WHITTEN B.K. and NICHOLAS D.D., 1981. A proposed role for oxalic acid in non-enzymatic wood decay by brown-rot fungi. In "*Proceedings of the annual meeting of american wood preservers association*", **77**, 157-164.

SKOURIKIHIN I.M. and EFIMOV B.N., 1972 (en russe). *Aldéhydes aromatiques et alcools des alcools de Cognac. Bases Bioch. de la prod. du Cognac*, 147-156, Moscou, "Naouka" Ed.

SWAN J.S., REID K.J.G., HOWIE D. and HOWLET S.P., 1993. A study of the effects of air and kiln drying of cooperage oakwood. In " *Elaboration et connaissance des spiritueux*", CANTAGREL R. Ed., LAVOISIER Pub., Paris, 557-561.

VIVAS N. et GLORIES Y., DONECHE B. et GUEHO E., 1991, Observations sur la microflore du bois de chêne *Quercus sp.* au cours de son séchage naturel. *Ann. Sci. Nat. Bot.,* **11**, 149-153.

VIVAS N., 1993. Le séchage naturel du bois de chêne destiné à la fabrication des barriques. DEMPTOS Ed., St Caprais de Bordeaux, 95 p.