

# Observations sur la microflore du bois de chêne (*Quercus sp.*) au cours de son séchage naturel

Par N. VIVAS (1, 3), Y. GLORIES (3), B. DONECHE (3) et E. GUEHO (2)

(1) *Chargé de recherches de la tonnellerie DEMPTOS.*

(2) *Laboratoire de Mycologie, Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75274 Paris, France.*

(3) *Institut d'œnologie, Université de Bordeaux II, 351, cours de la Libération, 33405 Talence, France.*

## Observations on the oak wood microflora (*Quercus sp.*) during its natural air drying

### SUMMARY

With scanning electronic microscopy, then with microbiology classical technics, we showed up the existence of fungus which seem characteristics with natural drying.

Both principal strains carried are the following : *Aureobasidium pullulans* and *Trichoderma sp.*. These latest have some

exocellular enzymes able to hydrolyse many wood heterosides (ellagitannins, coumarines and polysaccharides).

The fungus florea of *Quercus sp.* improve a wood finin before its use for making of barrels.

### RÉSUMÉ

Par microscopie électronique à balayage, puis par les techniques classiques de la microbiologie, nous avons mis en évidence l'existence de champignons qui semblent caractéristiques du séchage naturel.

Les deux principales espèces retenues sont *Aureobasidium pullulans* et *Trichoderma sp.* Ces dernières possèdent des

enzymes exocellulaires capables d'hydrolyser de nombreux hétérosides du bois (ellagitannins, coumarines et polysaccharides).

La flore fongique de *Quercus sp.* permet alors un affinage du bois avant son utilisation pour la fabrication des barriques.

### INTRODUCTION

Les facteurs impliqués dans le séchage naturel du bois de chêne sont nombreux (PONTALLIER *et al.*, 1982) : les pluies, les vents, les variations de température, l'ensoleillement et les micro-organismes. Ils assurent un affinage du bois caractérisé par une diminution de la teneur en composés phénoliques et par l'élimination, ou la transformation, plus ou moins complète, des substances astringentes et amères (P. PONTALLIER, 1981).

En reprenant l'hypothèse de certains auteurs (E. JOSEPH *et al.* (1975) ; M. MARCHE, E. JOSEPH (1975) ; B. MONTIES (1992) ; N. VIVAS *et al.* (1991) concernant la transformation des composés du bois de chêne par des micro-organismes, nous avons étudié le séchage naturel sous son aspect microbiologique.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Extraction, purification et dosage des composés phénoliques du bois

Les principaux tanins ellagiques (vescalagine, castalagine) sont isolés à partir d'un extrait à l'eau de châtaignier. La séparation est réalisée par HPTLC, sur plaque de silice C18 avec le mélange eau :89/ac. acétique : 10/alcool méthylique : 1 (v/v/v). Les gallotanins et en particulier le pentagalloyl-glucose ont été isolés à partir d'acide tannique du commerce et de tanins d'*Hamamélis* selon le même protocole.

Le dosage des tanins du bois est réalisé également en HPTLC dans les conditions précédemment décrites. Les résultats sont exprimés sous la forme du logarithme décimal de la surface du pic correspondant (log Sp).

Les coumarines contenues dans 20 ml d'extrait aqueux du bois sont extraites par 3 X 20 ml d'éther diéthylique. Les phases organiques sont rassemblées et évaporées à sec, puis, reprises dans 10 ml d'alcool méthylique et chromatographiées dans les conditions décrites par CHAUVET *et al.* (1992) en fluorimétrie. L'étalonnage est réalisé par injection de solutions de coumarines en quantités connues.

Les aldéhydes-phenols sont extraits de 10 ml d'extrait aqueux de bois centrifugé (20000 X g, pendant 20 min), ajusté à pH = 7 (soude normale) et épuisé par 10, puis 5 ml d'éther diéthylique. Les phases organiques sont rassemblées en ampoule à décanter, puis évaporées à sec ; le résidu est repris par 1 ml d'alcool méthylique. L'extrait est chromatographié dans les conditions décrites par SALAGOITY *et al.* (1987). La vani-

line et la syringaldehyde sont quantifiées à partir de solutions standard injectée dans les mêmes conditions.

### Isolement et culture de moisissures prélevées sur le bois au cours du séchage naturel

Deux méthodes d'isolement ont été retenues :

– Soit à partir de sciure (60 mesh) représentant les premiers millimètres du bois de surface des merrains, par sonication de 1 g de sciure dans 10 ml d'eau stérile durant 10 secondes.

– Soit par l'écouvillonnage de la surface d'un merrain à l'aide d'un coton hydrophile, et après agitation du coton dans 10 ml d'eau stérile.

La première technique permet d'évaluer la diversité de la biomasse fongique totale (mycéliums et spores), alors que la seconde se limite aux spores déposées sur le bois. Toutes les cultures sont réalisées sur milieu MAG (extrait de malt gélosé, agar et glucose) à 25°C.

L'identification des genres et des espèces est réalisée à partir de la description morphologique du mycélium et de ses organes reproducteurs, complétée par l'étude des profils d'assimilation et de fermentation.

Les activités enzymatiques des souches sont ensuite étudiées dans un tampon NaAc 0,2 M, pH = 5,0 ; supplémenté en fractions phénoliques purifiées.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### MODES D'IMPLANTATION DES MOISSURES SUR LES MERRAINS

Des fragments de bois sont prélevés dans des piles, sur le parc à bois. Les différents échantillons correspondent à des durées de séchage de 0 à 24 mois. Ils sont déposés dans des poches stériles, puis analysés par microscopie électronique à balayage, après déshydratation et métallisation.

Dès les premiers mois de séchage, les merrains constituant les piles de bois reçoivent de nombreuses spores (*fig. 1*), dont certaines germent et forment un mycélium. Le développement des mycéliums peut se faire à la surface du bois, entre les fibres (*fig. 2*) ou à l'intérieur d'une fissure. La flore fongique n'est donc pas seulement en surface, elle atteint également les premières couches de bois.

Au début de sa croissance, le mycélium apparaît, en microscopie électronique, fin, grêle et translucide ; mais, au cours du temps, il libère dans le milieu de grandes quantités de polysaccharides neutres, formant une enveloppe protectrice.

### ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES ESPÈCES FONGIQUES CARACTÉRISTIQUES DU SÉCHAGE NATUREL DANS LE BORDELAIS

Après purification par repiquages successifs de chaque colonie morphologiquement différente, l'identification n'a concerné que les champignons rencontrés dans tous les échantillons et donc caractéristiques du séchage naturel du bois de chêne. Cinq espèces sont retenues ; il s'agit d'*Aureobasidium pullulans*, de *Trichoderma harzianum*, de *Trichoderma koningii*, de *Rhizopus stolonifer* et d'une espèce non identifiée codée ECLR2-91. *Aureobasidium pullulans* représente plus de 90 % de la population totale. *Trichoderma sp.* 10 à 20 % et les deux autres espèces moins de 10 %.

Les sources d'inoculation sont diverses (*tableau II*) puisqu'à l'exception de ECLR l'ensemble des espèces se rencontre avec plus ou moins d'importance dans tout l'environnement. Ainsi, au cours du séchage, les spores et les conidies se déposeront à la surface du bois et seules les mieux adaptées pourront s'implanter et devenir majoritaires.

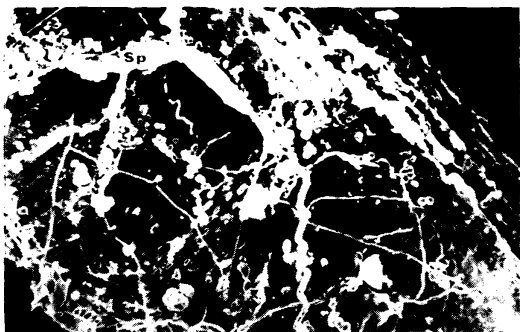


FIG 1. – (X 263) Observation de la surface d'une douelle après quelques mois de séchage naturel. m : mycélium ; sp : spores ; mp : mycélium pénétrant dans une microfissure.



FIG 2. – (X 4200). Détail d'un spore (sp) dont le mycélium (m) pénètre par une microfissure.

Le champignon ECLR peut être considéré comme une contamination car il provient exclusivement de l'écorce des arbres. *R. stolonifer* est également une souche dont la présence est accidentelle dans la mesure où elle a été isolée d'un grand nombre de substrat en décomposition, D. BOTTON *et al.* (1985) ; et n'est pas spécifique de la flore fongique liée au séchage naturel.

TABLEAU I. – Incidence de l'origine géographique et du mode de séchage du bois de chêne sur les teneurs en aldéhydes phénols totaux et en scopolétine

TABLE I. – Incidence of the geographic origin and the air-drying system of oak wood on the amount of phenol aldehydes and scopolétin

Origine du bois/mode de séchage		Aldéhydes phénols totaux (mg/l)	Scopolétine (µg/l)
Allier	Séchage naturel	2,24	88
	Séchage artificiel	1,41	46
Limousin	Séchage naturel	1,15	75
	Séchage artificiel	1,06	50
Vosges	Séchage naturel	1,84	78
	Séchage artificiel	1,14	62

#### RECHERCHE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES EXOCELLULAIRES SUSCEPTIBLES DE MODIFIER LA COMPOSITION PHÉNOLIQUE DU BOIS DE CHÊNE

Les champignons isolés des merrains ont un cycle végétatif complet (germination des spores, formation de thalles et production d'organes reproducteurs), ce qui suggère qu'ils trouvent sur le bois l'ensemble des conditions favorables à leur développement. Les sources de carbone sont nombreuses, elles comprennent les polymères glucidiques (cellulose, hemicellulose et autres polysaccharides), les polymères phénoliques (lignines) et les hétérosides phénoliques (ellagitanins, coumarines).

Les surnageants de cultures en milieu liquide CZA-PEK-DOX d'*Aureobasidium pullulans* et de *Trichoderma sp.* possèdent de fortes activités  $\beta$ -glucosidases indépendamment de la présence d'effecteurs (acide gallique, acide ellagique, ellagitanins...). Le précipité protéique au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation de ce milieu de culture, réalisé au maximum d'activité  $\beta$ -glucosidase, permet une dégradation quasi complète de nombreux hétérosides phénoliques (fig. 3). Ces champignons possèdent donc des enzymes exocellulaires solubles, capables de libérer le glucose des structures phénoliques. Cette activité permet à ces champignons de se développer dans des milieux liquides dont la seule source de carbone est un ellagitanin (vescalagine, castalagine) ou un gallotanin (pentagalloyl-glucose). L'hydrolyse de l'acide digallique constitue une voie annexe de détoxification du milieu.

Au cours du séchage naturel du bois, dans les conditions de la pratique, on observe également une augmentation de la teneur en scopolétine, provenant de son hétéroside : la scopoline, et une forte progression des aldéhydes phénols, issus de la dégradation de la lignine (tableau I).

Ces premiers résultats nous ont conduit à différencier quatre activités spécifiques, en cours d'étude : une activité **phénol hétérosidase** (substrats : ellagitanins,

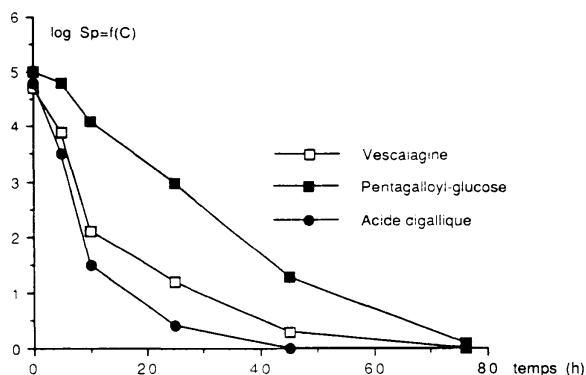


FIG 3. – Hydrolyse enzymatique de quelques composés phénoliques du bois par la fraction protéique (précipité au sulfate d'ammonium) d'une culture d'*Aureobasidium pullulans* au maximum d'activité  $\beta$ -glucosidase.

Incubation à 25°C dans un tampon NaAc 0.2M : pH = 5 en présence de 10  $\mu$ M/10 ml de substrat et 1 % du précipité protéique..

FIG 3. – Enzymatic hydrolysis of a few wood phenols heterosides with a proteic fraction of *Aureobasidium's* culture.

TABLEAU II. – Localisation des différentes sources de contamination sur le parc à bois  
Isolement à partir : d'eaux de ruissellement (a), d'écouvillonnage de la surface du bois (b), de macération de terre fine (c), de stabulation de gélose à l'air (d)

TABLE II. – Localisation of the differents sources of contamination in air-stock wood  
Isolement : water (a), wood surface (b), soil maceration (c), atmospher environment (d)

	Eaux	Écorce des billes de bois	Sol	Atmosphère
Isolement	a	b	c	d
Genres/espèces				
Rhizopus stol.	-	+	+++	-
Aureobasidium pull.	++	+	-	-
Trichoderma harz.	+++	-	+	+
Trichoderma kon.	++	-	+	+
« ECLR2-92 »	0	+++	0	0

0 = absent ; - : rare (< 1 souche/10) ; + : présent (1/10) ; ++ : fréquent (2 à 8/10) ; +++ : espèces dominantes (> 7/10).

gallotanins), une activité **depsidase** (substrat : acide digallique), une activité **étherase** (substrats : couma-

rines glucosides) et une activité **aldéhyde-phénol synthétase** (substrat : lignine).

## CONCLUSION

Les spores déposées sur les merrains de chênes, durant le séchage naturel, donnent naissance à de nombreuses thalles couvrant le bois. *Aureobasidium pullulans* est la principale espèce rencontrée. Les champignons répartis à la surface, mais aussi dans les premiers millimètres du bois, libèrent dans le milieu des enzymes. Pour l'essentiel ce sont des hétérosidases. Ces activités permettent une hydrolyse des hétérosides

phénoliques du bois, procurant une source d'énergie éliminant en même temps les substances toxiques présentes dans le milieu.

Les transformations d'origine microbiologique associées aux facteurs climatiques, améliorent sensiblement la qualité des bois destinés à la fabrication de barriques et donc celle des vins qui y seront élevés.

## RÉFÉRENCES

PONTALLIER P., SALAGOITY M.H., RIBEREAU-GAYON P., 1982. – Connaissance vigne et vin. **16**, 45-61.  
PONTALLIER P., 1981. – Thèse docteur-ingénieur, Université Bordeaux II.

JOSEPH E., MARCHE M., GOIZET A., AUDEBERT J., 1975. – *Rev. Fr. Œnol.*, **57**, 1-17.  
MARCHE M., JOSEPH E., 1975. – *Rev. Fr. Œnol.*, **57**, 1-106.

MONTIES B., 1992. – in « *Le bois et la qualité des vins et des eaux de vie* », Vigne et vin publications internationales éd., Bordeaux.

VIVAS N., GLORIES Y., FRANCOIS F., 1991. – *Rev. Œnologues*, **62**, 17-21.

CHAUVET S., VIVAS N., GLORIES Y., SUDRAUD P. – *Rev. Œnologues*, **64**, 8-10.

SALAGOITY M.H., TRICARD C., SUDRAUD P., 1987. – *J. Chromatogr.*, **392**, 379-387.

BOTTON B., BRETON M., LEVRE M., GUY Ph., LARPENT P., VEAU P., 1985. – *Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle*, Masson éd., Paris.

---