

Haloanisoles et barriques neuves : mise en évidence du rôle des moisissures

>>> L'élevage du vin en barrique de chêne connaît un regain d'intérêt avec l'avènement de l'œnologie moderne et la mise en évidence de son importance dans l'expression des plus grands vins. Avec une contenance standard de 225 L, soit potentiellement 300 bouteilles de 75 cL, tout incident impliquant la barrique peut se révéler très préjudiciable pour le producteur. C'est pour cela, que prévenir la présence accidentelle de 2,4,6-TriChloroAnisole (TCA) dans les barriques est depuis plusieurs années un enjeu technique et économique majeur pour le secteur de la tonnellerie. <<<

Très impliqué dans cette filière, le laboratoire LEC propose depuis 2012 un dispositif de contrôle des haloanisoles pour les barriques neuves basé sur le principe d'échantillonnage dynamique des Composés Organiques Volatils (COV)¹. En 2015, aux États-Unis, un vin élevé dans une barrique française présentait une concentration de 11 ng/L de TCA (2,4,6-trichloroanisole) alors que celle-ci avait été contrôlée négative en sortant de la production. Le vin contenait également 82 ng/L de TCP (2,4,6-trichlorophénol), précurseur du TCA. Cette concentration très inhabituelle suggérait une possible conversion naturelle du TCP vers le TCA soit en cours de vinification soit pendant le transport en container. Des essais de fermentation malolactique en présence des halophénols n'ont pas confirmé leur transformation en leurs haloanisoles respectifs pendant la fermentation. L'existence de moisissures susceptibles de se développer à l'intérieur des barriques neuves a été envisagée. Ce phénomène a été bien documenté dans les locaux comportant des éléments de charpente traités avec des préparations à base de pentachlorophénol qui au fil du temps et sous l'action des moisissures, finissent par contaminer l'atmosphère avec des haloanisoles^{2, 3, 4, 5}.

But de l'étude

Évaluer la capacité des moisissures communes à transformer les halophénols en haloanisoles à l'intérieur des barriques neuves. Les observations ont amené le laboratoire LEC à faire évoluer son système de contrôle des barriques pour rechercher la présence de l'ensemble de ces composés.

■ Première phase de l'expérimentation

Un mélange 20 % de granulats de bois de chêne non chauffé et 80 % chauffe moyenne ont été contaminés par macération dans une solution d'éthanol contenant les principaux halophénols (TeCP, TCP, PCP, TBP). La macération a duré 24 h dans une solution qui contenait 5 µg/L de chaque composé avec un ratio de 100 g de bois par litre de solution.



Après 12 heures de séchage, 10 g de copeaux ainsi contaminés sont placés dans des flacons de 100 mL suivant les trois modalités :

- N°1 : Témoin.
- N°2 : Ajout de 10 mL d'eau ultra-pure pour maintenir un milieu propice au développement des microorganismes.
- N°3 : Ajout de 10 mL d'eau ultra-pure et 100 mg de farine de blé : cet auxiliaire alimentaire est utilisé en tonnellerie pour réaliser une pâte étanche pour joindre les fonds.

Chaque modalité a été répétée trois fois. Les flacons ont été fermés hermétiquement et placés dans une enceinte thermo-régulée à 20 °C et ensuite analysés par un système de thermodesorption pour la concentration et l'injection des COVs, un chromatographe en phase gazeuse équipé d'une colonne adaptée à leur séparation et un système de détection universel, le détecteur à ionisation de Flamme (FID) et un Spectromètre de Masse (MS).

■ Résultats de la première phase

Après trois semaines, le bois des trois répétitions de chaque modalité a été récupéré, séché pendant une nuit à l'air libre puis analysé suivant une méthode interne

Tableau 1. Résultats des analyses des bois exprimées en µg/kg. *N.D. : Non détecté, soit inférieur à la limite de détection de la méthode.

	Modalité N°1			Modalité N°2			Modalité N°3		
	Essai 1/3	Essai 2/3	Essai 3/3	Essai 1/3	Essai 2/3	Essai 3/3	Essai 1/3	Essai 2/3	Essai 3/3
TeCA	N.D*	N.D	N.D	0,8	0,9	0,6	2,2	1,7	2,2
TeCP	17,9	18,5	17,1	13,1	12,8	13,5	9,7	7,7	8,2
TCA	N.D	N.D	N.D	2,2	2,6	1,8	3,7	2,6	1,8
TCP	10,2	10,5	9,5	5,7	4,6	6,5	2,7	2,5	3,2
PCA	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	<0,3	<0,3
PCP	15,9	16,5	15,6	11,7	11,8	12,8	11,0	10,0	9,6
TBA	N.D	N.D	N.D	1,8	2,3	1,4	4,3	3,3	2,9
TBP	14,5	14,6	13,9	10,4	9,8	10,9	6,1	5,1	6,2

accréditée COFRAC. Les résultats obtenus sont synthétisés dans le Tableau 1.

On observe une diminution significative des concentrations en halophénols dans les bois humidifiés par rapport au témoin, ces bois présentent également des concentrations substantielles en haloanisoles, ces observations sont d'autant plus amplifiées en présence de la farine.

Des moisissures communes bien connues détectées

L'identification des microorganismes présents sur les bois humidifiés par un laboratoire expert a permis de déceler la présence d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus oryzae*, des moisissures communes bien connues de l'industrie agroalimentaire (Figure 2)⁶. Il est apparu pertinent de vérifier si ce phénomène pouvait se dérouler également dans des barriques en condition export.

■ Seconde phase de l'expérimentation

Trois mini barriques neuves de 28 L ont été hydratées selon le protocole suivant : 200 mL d'eau ultra-pure, en laissant reposer 1 heure sur chaque fond et 1 heure sur chaque face latérale. Les barriques ont ensuite été égouttées pendant une nuit, bonde en bas. Trois modalités ont été constituées avec les caractéristiques suivantes :

- N°1 : Eau de rinçage ultra-pure, ajout 1 g de farine après égouttage.
- N°2 : Eau de rinçage, ajout d'halophénols.
- N°3 : Eau de rinçage, ajout d'halophénols, ajout 1 g de farine après égouttage.

Les barriques ont ensuite été filmées et conservées en position debout pendant quatre semaines dans un local tempéré (10 à 15 °C, hygrométrie voisine de 40 %).

■ Résultats de la deuxième phase

Les premières observations ont été les suivantes :

→ Un suivi continu de l'intérieur de l'une des barriques a permis de déterminer que le taux d'hygrométrie restait stable autour de 90 % (dans le cas d'un suivi de 6 mois sur une barrique standard de 225 L préalablement rincée et égouttée, le taux d'hygrométrie intérieur n'est jamais descendu en dessous de 80 %).

→ Au bout de deux semaines, la présence d'haloanisoles a été observée dans l'atmosphère intérieure des barriques 2 et 3.

→ Après quatre semaines, des spots de moisissures étaient parfaitement visibles au fond de la barrique n°2 (Figure 1). Il a donc été nécessaire de démonter les barriques 2 et 3 pour observation et analyse du bois.

Dans la barrique n°3 (Figure 2), les moisissures ont totalement colonisé le fond inférieur sur lequel de la farine avait été déposée.



Figure 1. Spots de moisissures au fond de la barrique n°2.

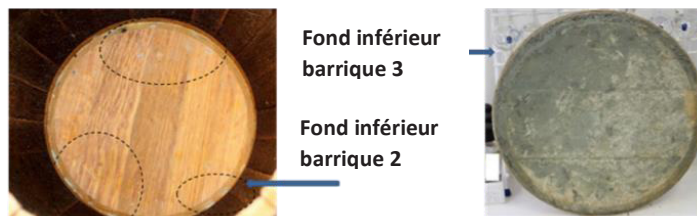


Figure 2. État des fonds des barriques 2 et 3 après démontage.

Des prélèvements de bois ont été effectués sur les fonds supérieur et inférieur ainsi que la coque, les résultats sont synthétisés dans le tableau 2.

Tableau 2. Résultats des analyses du bois des barriques exprimés en µg/kg.

	BARRIQUE n°2 (+ HALOPHENOLS)			BARRIQUE N°3 (+ HALOPHENOLS & FARINE)		
	Fond Sup.	Fond Inf.	Coque	Fond Sup.	Fond Inf.	Coque
TeCA	<0,3	0,5	0,8	1,7	26,1	2,3
TeCP	2,5	9,7	5,1	2,7	12,9	1,7
TCA	<0,3	<0,3	0,5	0,0	6,6	1,0
TCP	0,8	2,2	2,0	0,9	3,1	0,5
PCA	N.D.	0,6	<0,3	0,3	N.D.	0,6
PCP	3,3	21,7	9,4	3,4	79,6	3,4
TBA	0,5	0,8	1,4	1,9	41,0	3,1
TBP	2,9	7,9	7,7	1,9	4,7	0,7

■ Conclusions

→ Le bois de chêne humide constitue un substrat potentiel pour les moisissures communes, ayant comme facteur favorable la présence de résidus de la farine utilisée pour joindre les fonds.

→ L'appétitude de ces microorganismes à convertir en quelques jours des précurseurs halophénols en haloanisoles odorants a été démontrée par cette étude.

→ Il est donc fortement recommandé de s'assurer de l'absence de ces précurseurs dans les barriques, tout particulièrement dans celles destinées à l'export. ■

Bertrand Léauté

Laboratoire Expertises et Conseils (LEC), 130 rue Jules Brisson, Cognac, France.

1 Liste des haloanisoles/phénols analysés en routine : TCA (2,4,6-trichloroanisole), TCP (2,4,6-trichlorophénol), TBA (2,4,6-tribromoanisole), TBP (2,4,6-tribromophénol), TeCA (2,3,4,6-tétrachloroanisole), TeCP (2,3,4,6-tétrachlorophénol), PCA (Pentachloroanisole), PCP (Pentachlorophénol).

2 McAllister, K.A., Lee, H. & Trevors, J.T. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* <https://doi.org/10.1007/BF00056556>

3 Allard, A. S., Remberger, M., & Neilson, A. H. (1987). Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Applied and environmental microbiology*, 53(4), 839-845.

4 Chatonnet, P., Fleury, A., and Boutou, S. (2010). Identification of a New Source of Contamination of *Quercus* sp. Oak Wood by 2,4,6-Trichloroanisole and Its Impact on the Contamination of Barrel-Aged Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (19), pp 10528-10538. <https://doi.org/10.1021/jf102571v>

5 McNally, K.J., and Harper, D.B. (1991). Methylation of phenol by chloromethane in the fungus *Phellinus pomaceus*. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-5-1029>

6 Tindale, C. R., Whitfield, F. B., Levingston, S. D. and Nguyen, TH. (1989). Fungi isolated from packaging materials: Their role in the production of 2, 4, 6-trichloroanisole. *J. Sci. Food Agric.*, 49: 437-447. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740490406>