

## Culture des champignons comestibles et médicinaux sur un coproduit oléicole solide pour le développement durable du secteur oléicole au Maroc

Hicham Lakhtar<sup>1,2</sup>, M. Ismaili-Alaoui<sup>2</sup>, S. Roussos<sup>1</sup>

### Résumé

L'industrie oléicole, une activité concentrée dans la région méditerranéenne, connaît actuellement une évolution à tous les niveaux. Cette industrie cause, en absence de traitement de ses rejets, d'énormes problèmes environnementaux. Les perspectives actuelles s'orientent vers la valorisation de la biomasse totale de l'olivier pour assurer un développement durable du secteur oléicole au Maroc. Notre étude vise à la détermination d'une formule originale de préparation des différents composants des coproduits de l'industrie oléicole (bois d'olivier, feuilles d'olive, grignons d'olive et des margines d'olives) pour la culture des champignons comestibles et médicinaux sur un Substrat Oléicole Solide (SOS) en fermentation en milieu solide. Cette culture a pour but d'assurer à la fois la production de la biomasse fongique pour l'alimentation humaine et la détoxification des coproduits (meule) pour servir à l'alimentation animale. La saisonnalité de substrats d'oliviers (les grignons d'olives et les margines) a été remédiée par le séchage solaire sous serre, une étude qui sera présentée en détaille dans une autre présentation. Un test de criblage des souches de *Lentinula edodes* (champignons comestible et médicinal, connu sous le nom de Shiitake) a été effectué afin d'obtenir une souche efficace et capable de dégrader les polyphénols dans les margines. La préparation d'inoculum de la souche sélectionnée a été optimisée par l'induction du mycélium à la production des laccases. Les conditions de culture du champignon ont été optimisées par le développement des modèles mathématiques. La cinétique de croissance de shiitake sur le mélange ainsi que la transformation de la matière organique ont été étudiées. L'activité laccase, qui a été observée dominante pendant la croissance des champignons sur le SOS a été purifiée pour des applications biotechnologiques ultérieures.

**Mots clés :** Substrat Oléicole Solide (SOS), *Lentinula edodes*, Fermentation en Milieu Solide (FMS), Polyphénols, Enzymes, Laccases.

### Edible and medicinal mushroom cultivation on solid olive substrate (SOS) for sustainable olive field in Morocco

#### Abstract

The olive industry, an activity concentrated in the Mediterranean area, is nowadays under development at all levels. This industry has, until now, lack of processing of their discharges, resulting in major environmental issue. The current research is directed towards a recovery of the total biomass of trees for a sustainable industry. Our present study aims to broaden the horizon of recovery of the so-called discharges by culturing edible and medicinal mushrooms on olive SOS biomass (olive tree wood, olive leafs, olive pomace and olive mill wastewater OMWW) to produce biomass for both food and feed, and also for the detoxification of OMWW, the main determinant of environmental pollution in the olive industry. Seasonality substrates olive (olive cake and OMWW) has been remedied by drying solar in greenhouse, a study which will be detailed in another presentation. A screening of strains of *Lentinula edodes* (edible and medicinal mushroom, known as Shiitake) was carried out to obtain an efficient strain capable of degrading the polyphenols in olive waste. The preparation of the spawn has been optimized by the induction of mycelium. Experimental plans have been developed to optimize the cultivation of shiitake by mixing of the entire biomass SOS. The kinetics of growth of shiitake was studied. The enzymes used in the detoxification of olive oil have been listed. The laccase activity which dominated during the growth of fungi on the SOS has been purified to use for further application.

**Keywords:** Solid Olive Substrate (SOS), *Lentinula edodes*, Solid State Fermentation, polyphenols, enzymes, Laccases.

<sup>1</sup>Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléocologie IMEP ; UMR CNRS/IRD-193 Case 441; FST Saint Jérôme; Université Paul Cézanne; 13397 Marseille cedex 20; France ;

<sup>2</sup>IAV –Hassan II, Laboratoire des Bioconversions ; BP. 6202-Instituts, 10101 Rabat, Maroc  
E-mail. : [h.lakhtar@univ-cezanne.fr](mailto:h.lakhtar@univ-cezanne.fr)

## 1. Introduction

L'oléiculture représente une des plus anciennes activités agricoles dans le bassin méditerranéen. Toutefois, elle présente l'inconvénient de générer d'énormes quantités de déchets liquides dont la fraction organique complexe leur confère un pouvoir fortement polluant (Sayadi et al., 2000). A côté des margines, l'industrie oléicole produit deux coproduits solides, les grignons d'olive et le bois de taille.

De nombreuses études ont été menées en vue de trouver des solutions pour le traitement des déchets oléicoles, en particulier la réduction de la charge phénolique des margines par la culture de champignons (Zervakis et al., 1996, Kalmis et Sargin, 2009, Lakhtar et al., 2010a). Les perspectives de ces études ont mis l'accent sur la valorisation des déchets de l'oléiculture par la culture des basidiomycètes en fermentation en milieu solide (FMS). Les basidiomycètes de pourriture blanche, en particulier *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, sont capables de se développer en présence de la lignine, et leur développement est associé à la production des enzymes phénoloxydases non spécifiques (Mata et Savoie, 1998). Ainsi, les basidiomycètes ont été considérés comme de bons candidats pour permettre à la fois une valorisation des coproduits oléicoles lignocellulosiques et la réduction des polyphénols des margines (Zervakis et al., 1996, Kalmis et Sargin, 2009).

L'objectif de l'étude est d'évaluer la transformation de la composition chimique et la réduction en polyphénols du mélange de coproduits de l'olivier solide (COS) constitués de bois de taille, grignons d'olive et margines durant la croissance du mycélium de *L. edodes* Le119. Une attention particulière a été consacrée à l'évaluation de la production de CO<sub>2</sub> durant la croissance mycélienne de la souche Le119. Le changement de l'abondance relative des fractions de carbone, à la fois simples et complexes analysés par la technique de la CPMAS RMN 13C soutenue par les analyses biochimiques a été étudié pour relier l'activité métabolique du champignon à la transformation des résidus oléicoles.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Origine des échantillons

Les échantillons des grignons et margines d'olive ont été prélevés dans une unité de trituration triphasique avec le système de presse. Les standards phénoliques ont été fournis par Extrasynthese. Tous les solvants utilisés pour l'extraction étaient de qualité HPLC (Sigma, France).

### 2.2. Microorganisme et préparation du spawn

La souche de *L. edodes* Le119 a été préalablement sélectionnée pour sa capacité de dégradation des polyphénols de margines (Lakhtar et al., 2010a). La souche a été régulièrement repiquée sur un milieu de PDA contenant 10% des margines. L'inoculum (spawn) a été préparé sur les gains de blé contenant 10% de margines (Lakhtar et al., 2010b). La préparation du spawn a été effectuée dans les colonnes de « Raimbault » (De Araujo et al., 1997) et l'incubation a été faite à 25°C pendant 10 jours.

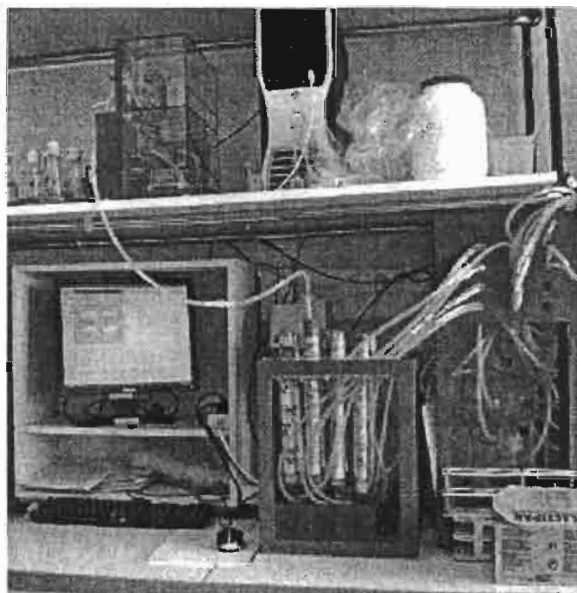


Figure 1: Dispositif de FMS connecté au Système de Respirometrie PNEO.

### 2.3. Préparation des substrats COS

Le bois de taille a été broyé et tamisé pour récupérer des particules comprises entre 2 mm et 0,8 mm. Les particules, ayant avec une taille inférieure à 0,8 mm, ont aussi été utilisées dans la composition du substrat représentant 30% du poids total du bois de taille. Le mélange du COS optimal est composé de 20% de bois de taille, 30% de grignons d'olive et 50% de margines. Il a été stérilisé à 121°C pendant 30 minutes.

## 2.4. Inoculation du COS par le spawn de *L. edodes*

L'inoculation a été faite à raison de 10% (poids humide: poids humide), et le remplissage des colonnes a été procédé en alternant des couches de substrat et de spawn, pour assurer une croissance homogène du mycélium. Les colonnes ont été incubées dans l'étuve sans aération forcée à 25°C pendant 2 jours et par la suite ont été placées dans le dispositif de la FMS (De Araujo et al., 1997) pour une durée d'incubation d'un mois. Deux colonnes témoins non inoculées ont été préparées et incubées dans les mêmes conditions.

## 2.5. Analyse des échantillons

L'activité respiratoire a été mesurée chaque jour à l'aide du PNEO, qui permet de mesurer à la fois quatre paramètres ; le débit d'aération, l'humidité de l'air, la température de l'air et la teneur de l'air en CO<sub>2</sub> à la sortie de la colonne. Le débit de l'aération a été fixé à 20 mL.min<sup>-1</sup>. La biomasse fongique a été estimée par la quantification de l'ergostérol (Lakhtar et al., 2010b). Les sucres réducteurs et sucres totaux ont été déterminés par la méthode de Miller (1959) en utilisant le réactif de DNS et celle de DuBois et al. (2002) en utilisant de l'anthrone respectivement. L'extraction de la fraction phénolique a été réalisée dans la solution eau-méthanol (40-60) ; à un gramme du substrat fermenté lyophilisé et finement broyé, on ajoute 10 ml de la solution organique. Le mélange a été homogénéisé et incubé pendant 1h à 4°C. L'extraction a été répétée trois fois. La quantification des phénols totaux a été faite suivant la méthode de Folin Ciocalteu (Bärlochar et Garça, 2005) en utilisant l'acide cafféique comme standard.

## 2.6. Analyses chromatographiques

L'extraction des monomères a été effectuée en deux étapes. La première étape consiste à l'extraction de la fraction phénolique par la solution eau-méthanol (40-60). La deuxième étape consiste en la purification des monomères phénoliques par l'extraction avec l'acétate d'éthyle et l'analyse des monomères a été réalisée par l'HPLC suivant la méthode de De Marco (2007). La plateforme HPLC est composée d'un dégazeur (1200 Series Degasser, Agilent technologies), d'une pompe quaternaire (1200 Series Quaternary Pump, Agilent technologies), d'un échantillonneur liquide automatique ou passeur (1200 Series Automatic Liquid Sampler, Agilent technologies) et d'un détecteur à barrette de diodes (1200 Series Diode-Array Detector, Agilent technologies). La séparation des composés a été opérée sur la colonne Atlantis d18 (5µm, 4,6 x 250 mm) Waters gardée à une température constante (25±2°C). La détection des composés a été effectuée sur une longueur d'onde de 280 nm. Les pics ont été identifiés par comparaison avec les standards.

## 2.7. Activités enzymatiques

### 2.7.1. Extraction d'enzymes

L'extraction des enzymes a été effectuée sur 3 gr du substrat fermenté frais décongelé mélangé avec 10 ml du tampon d'acétate (0,1M, pH 5,0) contenant 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,05% du Tween 80 et 3% du polyvinylpyrrolidone insoluble (PVPP) (Sampedro et al., 2007). Le mélange a été incubé à la température ambiante pendant 1h et l'extrait aqueux a été récupéré par centrifugation (4500 rpm pendant 10 min) suivie d'une filtration sur papier Watman N°2.

### 2.7.2. Activités enzymatiques

L'activité endoglucanase (cellulase, EC 3.2.1.4) a été déterminée selon la méthode de Mandels et al. (1976). L'activité enzymatique est exprimée en unité par g du substrat poids sec (SPS) (1U= 1 µmole de sucres réducteurs formés par minute). L'activité lipase a été déterminée suivant la technique rapportée par Goujard et al., (2009), en utilisant *p*-laurate de nitrophenyl comme substrat. L'activité tannase a été mesurée suivant la technique de Sharma et al. (2000). Les activités de Mn peroxydase, Lignine peroxydase et laccase ont été mesurées suivant la technique rapportée par Lakhtar et al. (2010a). La technique décrite par Santos et Linardi (2004) a été utilisée pour la détermination de l'activité enzymatique de catéchol-1,2-dioxygénase et protocatéchuate-3,4-dioxygénase. L'activité est exprimée en unité par g SPS (1U= 1 µmole de produit formé par minute).

## 2.8. Analyses élémentaires : C et N

Les teneurs en C et N, dans les échantillons de culture de *L. edodes*, ont été déterminées à l'aide d'un analyseur élémentaire CHN (Flash EA 1212 Elemental Analyzer, France). L'analyseur CHN a été calibré avec l'acide aspartique à différentes concentrations.

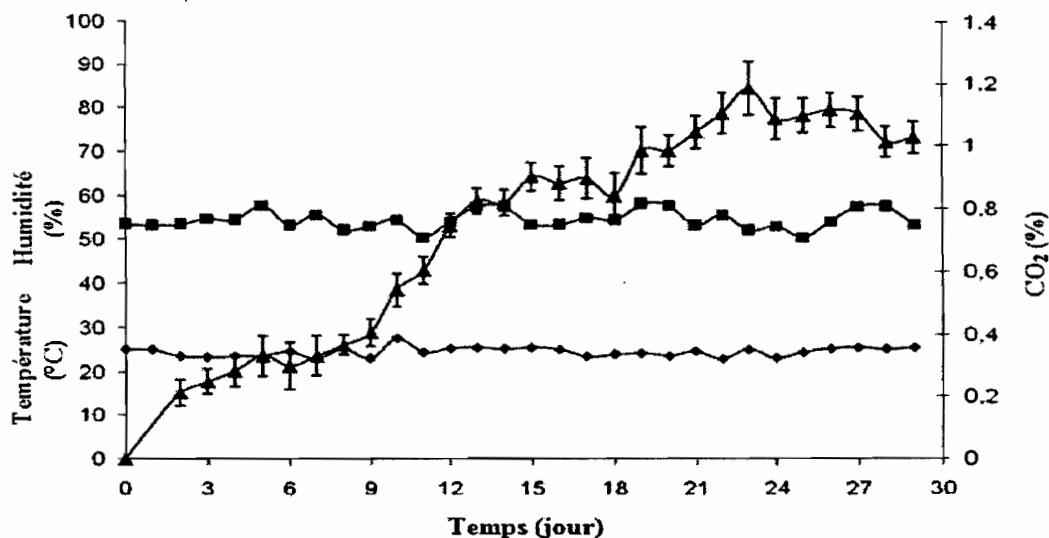
## 3. Résultats et discussions

### 3.1. Croissance de *L. edodes* sur COS

Le remplissage des colonnes de Raimbault avec le substrat COS prétraité a été alterné avec l'ajout du spawn, qui permet un envahissement homogène et uniforme du substrat par le mycélium. L'incubation des colonnes pendant deux jours dans l'étuve nous a permis d'éviter les contaminations par les moisissures. Après deux jours d'incubation, on a remarqué que tous les grains du spawn inoculés ont démarré par le développement du mycélium. L'envahissement total du substrat a été remarqué après la troisième semaine d'incubation (24 jours d'incubation). Par ailleurs, aucune contamination n'a été observée sur les deux colonnes témoins non inoculées.

### 3.2. Analyses des effluents gazeux par PNEO

A la sortie des colonnes de Raimbault, les effluents gazeux ont été collectés afin de suivre l'évolution de quatre paramètres (débit d'air, humidité relative, température et la production de CO<sub>2</sub>) en fonction du temps (Fig. 1). L'humidité relative et la température de l'air à la sortie des colonnes fluctuent entre deux valeurs (50 et 58 %) pour la l'humidité et (23 et 27°C) pour la température de l'air. Avant la mesure de CO<sub>2</sub> à la sortie de la colonne, le débit de l'air traversant la colonne, a été ajusté à 20 ml/min.

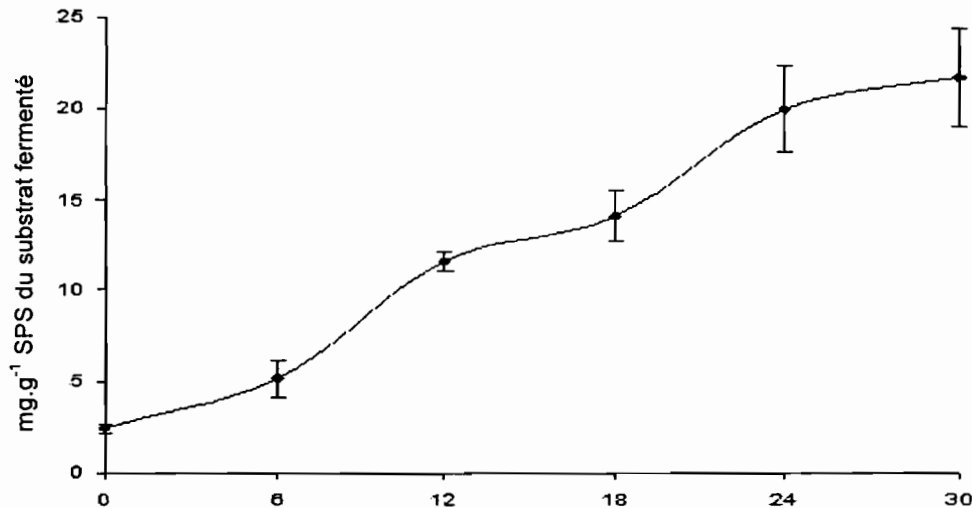


**Figure 1:** Evolution de trois paramètres; (▲) CO<sub>2</sub> produit, (◆) température de l'air, (■) humidité relative de l'air, au cours de 30 jours de culture de *L. edodes* sur COS à 25°C.

Sur la Figure 1, on remarque que l'évolution de CO<sub>2</sub> s'effectue selon quatre étapes alternées. Tout d'abord, durant les 6 premiers jours d'incubation sur le dispositif FMS, une augmentation continue de CO<sub>2</sub> a été remarquée passant de 0 à 0,23%. Ensuite, entre le 6<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jour d'incubation, un premier plateau de stabilisation du CO<sub>2</sub> située à 0,23% de CO<sub>2</sub> produit. Par contre, entre le 8<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour d'incubation, une augmentation importante de la respiration du mycélium de Le119 a été remarquée allant de 0,23 à 0,7. Un deuxième plateau de stabilisation de CO<sub>2</sub> a été observé entre le 14<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> jour de FMS. Enfin, un plateau haut de respiration a été obtenu à partir du 23<sup>ème</sup> jour de FMS et reste constant pendant une semaine avec un taux élevé de CO<sub>2</sub> obtenu (1,18%).

### 3.3. Evolution de la biomasse de *L. edodes* sur COS:

L'estimation de la biomasse a été déterminée indirectement par la quantification de l'ergostérol contenu dans le substrat fermenté par la souche Le119 de *L. edodes*. Le coefficient de conversion de l'ergostérol en biomasse de *L. edodes* a été évalué à 3.80 mg de l'ergostérol pour 1 g de biomasse pure. L'évolution de la biomasse au cours de la FMS (Fig.2) suit relativement l'allure de production de CO<sub>2</sub> mesuré dans les effluents gazeux (Fig.1).

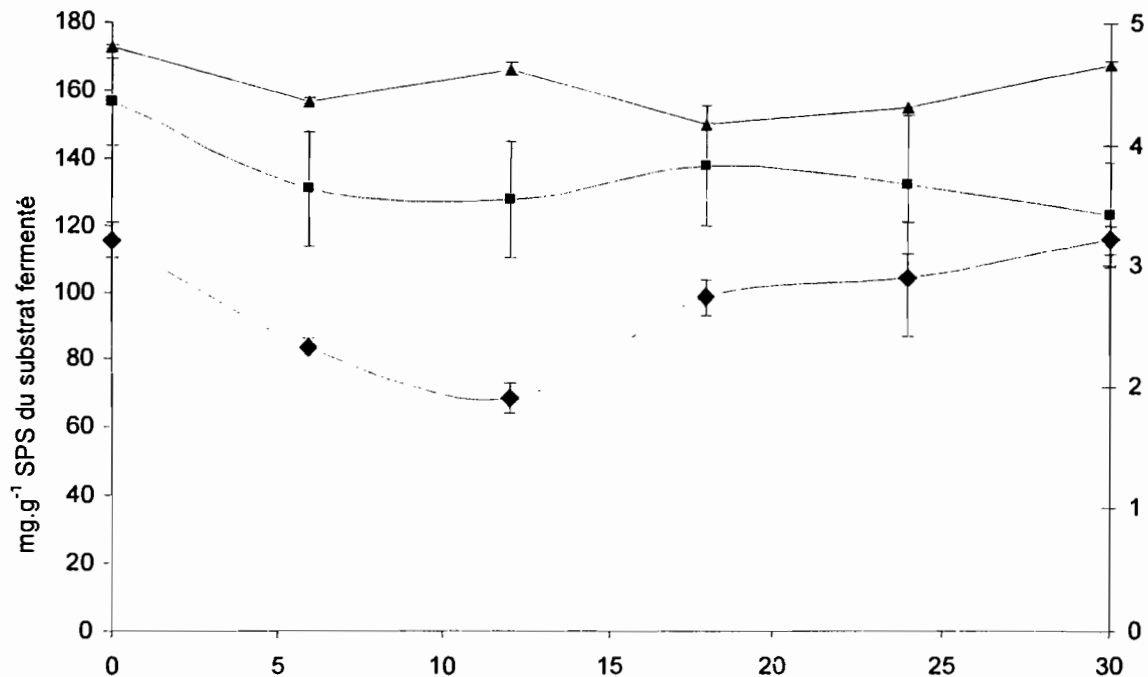


**Figure 2:** Evolution de la biomasse de la souche Le119 produite au cours de 30 jours d'incubation sur COS à 25°C.

L'évolution de la biomasse au cours de la FMS passe par trois phases de croissance rapide alternées par deux phases de croissance relativement lente. La biomasse évolue de 2.47 à 5 mg/g SPS du COS pendant les 6 premiers jours d'incubation. Ensuite entre le 6<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour d'incubation une augmentation importante de la biomasse produite a été remarquée, allant de 5 à 11,4 mg.g<sup>-1</sup> SPS du COS. Par contre entre le 12 et 18<sup>ème</sup> jour d'incubation, la biomasse passe de 11,4 à 14,5 mg.g<sup>-1</sup> SPS, et cette évolution de biomasse correspond au deuxième plateau de CO<sub>2</sub> produit durant le développement du mycélium (Fig.1). Entre 18 et 24 jours d'incubation une augmentation importante a été de nouveau observée, allant de 14,5 à 20,5 mg.g<sup>-1</sup> SPS du COS. Cette augmentation correspond également à l'augmentation de CO<sub>2</sub> observé dans la Figure 1. Enfin, un plateau de biomasse a été obtenu à partir de 24 jours de FMS pour arriver à une biomasse de 21,61 mg.g<sup>-1</sup> après 30 jours d'incubation. Après un mois d'incubation, la biomasse estimée dans notre étude dépasse 2,5 fois la biomasse du *Pleurotus ostreatus* produite sur les coques de café avec le même taux d'inoculation (10%) (Sobal, 2002).

### 3.4. Evolution des sucres réducteurs, sucres totaux, pH du substrat fermenté

L'évolution de sucres réducteurs, des sucres totaux et du pH du substrat inoculé avec la souche Le119 de *L. edodes* est présentée dans la Figure 3.

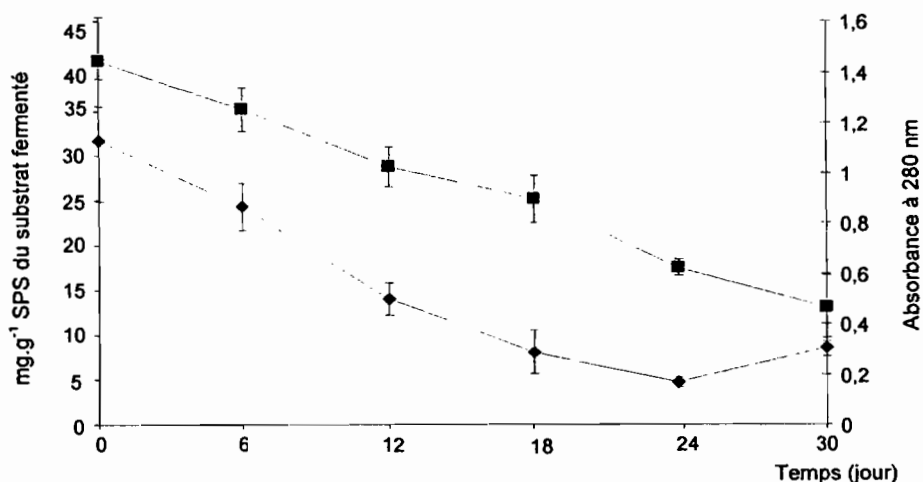


**Figure 3:** Evolution des (◆) sucres réducteurs, (■) sucres totaux et du (▲) pH du substrat fermenté au cours de 30 jours de culture de la souche Le119 sur COS à 25°C.

On remarque une diminution de la teneur en sucres réducteurs et totaux dans le milieu après 12 jours d'incubation, suivie d'une augmentation graduelle pour arriver à 108 et 120 mg.g<sup>-1</sup> SPS du SOS respectivement. Accompagné de cette évolution, on remarque que les valeurs du pH du substrat fermenté restent très stables tout au long de la FMS de la souche de *L. edodes* sur COS et fluctuent de 4,5 à 5.

### 3.5. Evolution des phénols totaux

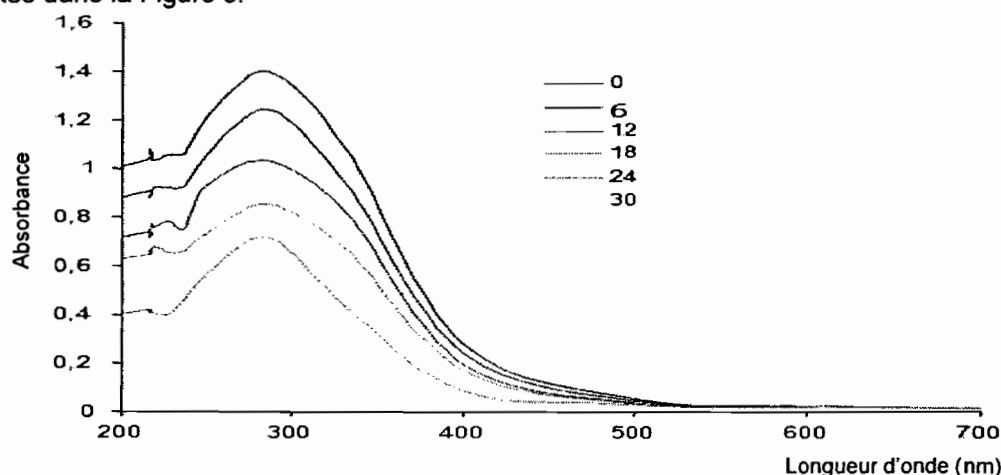
Les phénols totaux ont été déterminés par la méthode standard de Folin Ciocalteu pour pouvoir comparer nos résultats aux ceux de la littérature. La décoloration de l'extrait organique des phénols totaux a été déterminée à 280 nm. Selon Chin et al., (1994), l'absorbance à 280 nm est une mesure approximative du degré d'aromaticité des matières organiques dissoutes. Une forte corrélation entre la dégradation des phénols et la décoloration du substrat a été observée. Le développement du champignon a permis une dégradation de 80% des phénols totaux et 85% de décoloration du substrat (Fig. 4).



**Figure 4:** Evolution de (■) la décoloration de l'extrait phénolique et (◆) des phénols totaux du substrat fermenté au cours de 30 jours de culture de la souche Le119 sur COS à 25°C.

Les résultats confirment ceux obtenus à partir de la décoloration et montrent l'apparition des molécules absorbant aux alentours de 500 nm. Ces molécules peuvent être responsables de l'augmentation légère des phénols totaux observée après 24 jours d'incubation. Sampedro et al. (2007) ont mesuré de semblables chutes de teneurs en phénol totaux des grignons humides, issues du système de trituration à deux phases, par la culture de *Paecilomyces farinosus* après 20 semaines d'incubation. Selon Aloui et al. (2007), l'ajout de la bagasse de canne de sucre aux grignons humides favorise la dégradation des phénols totaux. En effet une réduction des phénols totaux de 60% a été observée après l'ajout de 30% de la bagasse de canne à sucre pour la culture de *Phanerochaete chrysosporium* après 6 jours d'incubation.

Les spectres UV-vis des extraits d'échantillons prélevés durant la croissance du champignon sont présentés dans la Figure 5.



**Figure 5:** Spectres UV-visible de la fraction phénolique extraite des échantillons du substrat fermenté au cours de 30 jours de culture de la souche Le119 sur COS à 25°C.

### 3.6. Les monomères phénoliques

La disparition des monomères phénoliques est présentée dans le Tableau 1. Six monomères ont été identifiés dans l'extrait éthylique obtenu à partir du substrat fermenté. Leur quantification, déterminée par l'HPLC, a montré que l'Oleuropéine est le composé le plus abondant dans le COS avant la fermentation ( $6,54 \mu\text{mole.g}^{-1}$  SPS du SOS), suivie par l'acide *p*-coumarique et l'hydroxytyrosol ( $4,51$  et  $4,32 \mu\text{mole.g}^{-1}$  SPS du SOS respectivement). Après un mois de culture de la souche Le119, à l'exception de l'acide *trans*-cinnamique qui présente une faible diminution de sa teneur (15 %), tous les composés analysés, ont subi une réduction de leur teneur avec des rendements variables (92 et 26 % de réduction pour l'hydroxytyrosol et l'acide *p*-coumarique respectivement). Dans le COS témoin, non inoculé et incubé dans les mêmes conditions que celles de la culture, on a remarqué une réduction partielle de tous les composés analysés, après 30 jours d'incubation avec un débit d'aération de  $20 \text{ mL.min}^{-1}$ . Leur réduction peut être expliquée par l'oxydation non enzymatique qui pourrait être causée par le passage forcé de l'air dans le substrat durant son incubation dans le dispositif de la FMS. El Hajjouji et al. (2008) ont reporté qu'une augmentation de réduction des composés phénoliques est favorisée avec l'application d'une aération forcée sur les margines.

**Tableau 1:** Concentration des monomères phénoliques ( $\mu\text{mole.g}^{-1}$  SPS du COS) durant la culture de *L. edodes* pendant 1 mois d'incubation à 25°C.

Temps (jours)	Oleuropéine	Hydroxytyrosol	Acide caféique	Tyrosol	Acide <i>trans</i> -cinnamique	Acide <i>p</i> -coumarique
0	6,54	4,32	3,22	2,32	2,32	4,51
6	4,21	2,35	3,21	2,12	2,23	3,54
12	3,21	3,21	3,15	1,63	2,35	4,16
18	2,54	2,32	2,36	1,33	2,16	5,54
24	1,02	0,32	1,06	1,03	2,03	3,21
30	0,95	0,32	1,01	0,03	1,97	3,32
Témoin	5,98	4,45	3,11	2,22	2,25	4,02

L'écart type a été estimé à 5%.

### 3.7. Evolution de la composition élémentaire du substrat fermenté :

L'évolution de cinq paramètres conventionnels (humidité du substrat, C, N, C/N, Perte en matière) a été effectuée à partir des prélèvements du substrat fermenté au cours de 30 jours d'incubation à 25°C. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.

**Tableau 2:** Evolution de différents paramètres chimiques mesurés des échantillons du substrat fermenté au cours de 30 jours de culture de *L. edodes* sur COS à 25°C.

Temps (jours)	C (%)	N (%)	C/N	Humidité (%)	Perte en Matière (%)
0	48.52±1,3	0,95±0,10	51,07	44.30±0.49	-
6	46.17±0,7	0.95±0,06	48,60	45.14±2.61	1.87±0.67
12	43.89±1,4	0,96±0,04	45,72	45.94±1.14	4.99±1.01
18	42.89±1,7	1,09±0,07	39,35	46.47±0.92	6.73±1.80
24	41.32±1,2	1,31±0,08	31,54	48.39±0.37	9.48±1.59
30	40.32±0,6	1,52±0,1	26,53	46.41±1.07	12.18±1.39

Un test d'analyse de variance a été effectué pour l'ensemble des paramètres étudiés. Les résultats montrent une différence significative entre les prélèvements ( $p=0.05$ ). Le passage de l'air humidifié à travers les colonnes (volume utile de 200 mL) avec le débit de 20 mL.min<sup>-1</sup> a permis de maintenir une humidité de 46±2 %. Les résultats des analyses élémentaires, montrent que le carbone diminue en passant de 48.52 à 40,32 % pendant la durée d'incubation, alors que l'azote présente une augmentation de 0.95 à 1.52% de la matière sèche. La diminution de carbone est caractéristique de la dégradation des matières organiques. En effet, de semblables profils de diminution de carbone ont été rapportés pour la dégradation des matières organiques (Mena et al., 2003, Huang et al., 2004). Le ralentissement de la diminution du carbone peut être expliqué par la nature lignocellulosique du substrat qui est dégradé beaucoup plus lentement. Par ailleurs, l'augmentation d'azote est due à sa concentration engendrée par la dégradation des composés carbonés réduisant la masse totale du substrat durant la culture. De ce fait, le rapport C/N diminue au cours de la culture compris entre 51,07 et 26.53. Cette diminution reflète le développement du champignon accompagné d'une part avec un dégagement de CO<sub>2</sub> et d'autre part de la décomposition de la matière organique, ainsi que l'enrichissement du substrat en matières azotées.

### 3.8. Activités enzymatiques

Les activités enzymatiques mesurées durant la croissance du champignon sur le COS sont présentées dans le Tableau 5. Parmi les activités enzymatiques impliquées dans la décomposition de la matière organique, l'activité des cellulases a été mesurée. Il y a apparition de cette activité après 6 jours d'incubation et elle atteint sa valeur maximale après 18 jours (1,13 U.g<sup>-1</sup> SPS). L'activité lipase présente une augmentation au début de la culture (de 0,01 à 0,02 U.g<sup>-1</sup> SPS), et diminue après 18<sup>ème</sup> jours de culture pour disparaître vers la fin de l'incubation. Les activités peroxydases, Mn peroxydase et Lignine peroxydase, présentent une augmentation pour arriver à sa valeur maximale (0,231 et 0,321 UI.g<sup>-1</sup> SPS du SOS après 18 et 24 jours d'incubation respectivement). Ensuite, les activités peroxydase diminuent.

Les activités laccases suivent relativement la même allure avec une augmentation de 1,52 à 8,5 UI.g<sup>-1</sup> SPS après 18 jours d'incubation, puis une diminution pour arriver à une valeur de 4,63 UI.g<sup>-1</sup> SPS. D'après les résultats, on a remarqué que l'activité laccase est l'activité majeure parmi les activités enzymatiques impliquées dans la transformation des polyphénols. A partir de l'ensemble des résultats, on a également remarqué que les activités cellulases et les deux activités phénoloxydase présentent des tendances similaires avec une augmentation au début de la culture pour atteindre un maximum puis une diminution et stabilisation jusqu'à la fin d'incubation. Cette tendance peut être expliquée par une complémentarité entre ces activités pour aboutir à la dégradation du complexe lignocellulosique. Par ailleurs, les activités catéchol-1,2-dioxygénase et protocatéchuate-3,4-dioxygénase n'ont été pas détectées dans les conditions de culture.



**Tableau 5:** Mesure des activités (UI.g<sup>-1</sup> SPS) cellulase, lipase, laccase, Mn peroxydase, lignine peroxydase et tannase de *L. edodes* Le119 durant un mois d'incubation à 25°C.

Temps jours	Cellulase	Lipase	Laccase	Mn peroxydase	Lignine Peroxydase	Tannase
0	0.02	0.001	1,52	0,04	0.001	0.004
6	0.4	0.002	5,8375	0,124	0,121	0.121
12	0.82	0.0014	8,055	0,142	0,245	0.225
18	1.13	0.0018	8,5175	0,231	0,214	0.154
24	0.76	0.010	7,6025	0,1789	0,321	0.174
30	0.41	nd	4,63	0,1245	0,281	0.11

#### 4. Conclusion

Les résultats de l'étude ont montré une bonne croissance de *L. edodes* Le119 sur le COS en FMS. L'inoculation du COS avec un mycélium produit sur les grains de blé avec des margines à 10% (v/v) a permis d'éviter la contamination de culture par des antagonistes. Le suivi respirométrique de *L. edodes* Le119 cultivée sur le COS a mis en évidence la présence de trois phases de croissance. L'étude des paramètres de sucres réducteurs, sucres totaux, phénols totaux ainsi que les spectres RMN du <sup>13</sup>C (résultats non publiés) a montré que la première phase de croissance a été attribuée à la minéralisation des matières facilement dégradables, suivie par la phase de dégradation des polysaccharides (hémicelluloses, celluloses). La dernière phase de croissance correspondait à la dégradation légère de la lignine provenant du bois de taille. L'activité enzymatique a mis en évidence la présence d'un cocktail enzymatique qu'on pourrait utiliser pour des applications biotechnologiques.

#### Références bibliographiques

- Aloui F., Abid N., Roussos S., Sayadi S. 2007. Decolorization of semisolid olive residues of "alperujo" during the solid state fermentation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*. 35: 120-125.
- Bärlocher F., Graça M.A.S. 2005. Total phenolics. In: Graça, M.A.S., Bärlocher, F., Gessner, M.O., (Eds.), *Methods to study litter decomposition*, Springer, Berlin/NewYork, pp. 97-100.
- Chin Y.P., Alken G., O'Loughlin E. 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology*. 28: 1853-1858.
- De Araujo A.A., Lepilleur C., Delcourt S., Colavitti P., Roussos S. 1997. Laboratory scale bioreactors for study of fungal physiology and metabolism in solid state fermentation system. In Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. and Viniegra- Gonzalez, G. (Eds.), *Advances in Solid State Fermentation*, Kluwer Academy. Dordrecht, 93-111.
- De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R. 2007. Characterisation and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chem*. 104: 858-867.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chem.*, 28: 350-356.
- El Hajjouji H., Ait Baddi G., Yaacoubi A., Hamdi H., Winterton P., Revel J.C., Hafidi M. 2008. Optimisation of biodegradation conditions for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*. 99: 5505-5510.
- Goujard L., Ferre E., Gil G., Ruaudel F., Farnet A.M., 2009. A method to quantify transesterification activities of lipases in litters. *J.Microbiol. Methods*. 78: 127-130.
- Huang G.F., Wong J.W.C., Wu Q.T., Nagar, B.B. 2004. Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust. *Waste Management*. 24: 805-813.
- Kalmis E., Sargin S. 2004. Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw substrates containing olive mill waste water. *Intern. Biodeter. Biodegr.* 53 : 43-47.
- Lakhtar H., Ismaili-Alaoui M., Philippoussis A., Perraud Gaimie I., Roussos S. 2010a. Screening of *Lentinula edodes* strains cultivated on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenols biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64 : 167-172.

- Lakhtar H., Ismaili-Alaoui M., Philippoussis A., Perraud Gaime I., Roussos S. 2010b. Biomass estimation and physiological state evaluation of *Lentinula edodes* spawn by non esterified ergosterol analysis. In 4th International Congress on Bioprocesses in Food Industries, (ICBF, 2010) 5-8 october 2010 Brazil.
- Mandels M., Andreotti R, Roche C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 6: 21-33.
- Mata G., Savoie J.M. 1998. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 4: 513–519.
- Mena E., Garrido A., Hernandez T., Garcia C. 2003. Bioremediation of sewage sludge by composting. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 34: 957-971.
- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Sampedro I., Marinari S., D'Annibale A., Grego S., Ocampo J.A., Garça-Romera, I. 2007. "Organic matter evolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by white-rot fungi." *Internat. Biodeter.Biodeg.* 60(2): 116-125.
- Santos V.L., Linardi V.R. 2004. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents--identification and degradation potential. *Process Biochemistry*. 39: 1001-1006.
- Sayadi S., Allouche N., Jaoua M., Aloui, F. 2000. Detrimental effects high molecular-masse polyphenols on olive mill wastewater biotreatment, *Process Biochemistry* 35, 725–735
- Sobal M. 2002. Physiologie de la croissance mycélienne de *Pleurotus ostreatus* et dégradation des polyphénols de la pulpe et des coques de café, thèse de doctorat. Université de Provence, Aix-Marseille I, 207 pages.
- Zervakis G., Yiatras P., Balis C. 1996 Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation Olive Oil Processes and By-Products Recycling*, 38: 237-243.

Lakhtar H., Ismaili-Alaoui M., Roussos Sevastianos. (2009)

Culture des champignons comestibles et médicinaux sur un coproduit oléicole solide pour le développement durable oléicole au Maroc

In : Karray B. (ed.), Khecharem J. (ed.), Roussos Sevastianos (ed.). Pour un secteur oléicole rénové, rentable et compétitif en Méditerranée = For a renovated, profitable and competitive Mediterranean olive growing sector : proceedings Olivebioteq 2009. Sfax : Institut de l'Olivier, 313-322

Séminaire Olivebioteq 2009 : Pour un Secteur Oléicole Rénové, Rentable et Compétitif en Méditerranée = Seminar Olivebioteq 2009 : For a Renovated, Profitable and Competitive Mediterranean Olive Growing Sector, 3., Sfax (TUN), 2009/09/15-19. ISBN 978-9938-9513-0-1