

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DE BIOLOGIE  
APPLIQUEE A LA NUTRITION ET A L'ALIMENTATION**

**THESE**

Présentée pour obtenir le titre de  
**Docteur de l'Université de Bourgogne**  
Sciences de l'Alimentation  
Option Biotechnologie

Par

**Wafâa KABBAJ**

**PHYSIOLOGIE DE LA CROISSANCE ET PRODUCTION D'AROME  
PAR DES CULTURES MYCELIENNES DE *PLEUROTUS*  
ET DE *MORCHELLA* SUR MILIEU SOLIDE**

Soutenue le 17 juillet 1997, devant le jury composé de :

<b>A. VOILLEY</b>	<b>Président</b>
<b>M. BENSOUSSAN</b>	<b>Directeur de Thèse</b>
<b>J. M. OLIVIER</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>B. OLLIVIER</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>S. ROUSSOS</b>	<b>Directeur de Thèse</b>
<b>T. TALOU</b>	<b>Examineur</b>
<b>J. VALLADE</b>	<b>Examineur</b>

*à mon père, à ma mère  
à Asmâa, à Hassan  
à Sidi Mohammed  
et à toute ma famille*

## **Remerciements**

*Je tiens tout d'abord à remercier Mr S. Roussos, Directeur de Recherches à l'ORSTOM pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour son appui scientifique et ses conseils qui m'ont permis de mener à bien cette thèse.*

*Je remercie les membres du jury pour le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à lire et à juger ce travail : Mr J. M. Olivier, Directeur de Recherches à l'INRA-Bordeaux, Mr B. Ollivier, Chargé de Recherches à L'ORSTOM-Marseille, Mme A. Voilley, Professeur à l'ENSBANA, Dijon, Mr J. Vallade, Professeur à l'Université de Bourgogne, Mr T. Talou, Ingénieur de Recherches à l'INP, Toulouse.*

*Que Mr M. Bensoussan, Maître de Conférence à l'ENSBANA soit assuré de ma profonde gratitude pour l'intérêt qu'il a su porter à cette thèse.*

*Je remercie tous les partenaires du projet "Aliment Demain" en particulier S. Breheret et J. Guimberteau pour leur disponibilité et pour leur efficacité. J'adresse également mes plus vifs remerciements à Mr B. Marty pour avoir été à l'origine du financement du projet.*

*L'occasion m'est offerte pour remercier chaleureusement Mr D. Montet, Mr M. Nicole, Mr B. Marin, Mme C. Larre-Larrouy et Mr G. Rocquelin pour m'avoir apporté leur soutien au moment où j'en avais le plus besoin.*

*Un grand merci à chacune des personnes que j'ai cotoyées tout le long de mon stage au laboratoire de Biotechnologie : N. Pujet, L. Hannibal, J. Morlon-Guyot, M. Raimbault, E. Perraud, I. Gaim-Perraud, E. Giraud, S. Denis, V. Sarhy-Bagnon et A. Torres. Mention spéciale pour J. P. Guyot directeur du laboratoire de Biotechnologie pour m'avoir permis de finir mon stage dans de bonnes conditions.*

*Je remercie de tout coeur Alvaro, Françoise, Fathi, Valérie, José, Jesus, John, Youssef, Isabelle, Sylvie et Philippe pour leurs encouragements et leurs conseils.*

*Je suis très reconnaissante à l'administration ORSTOM pour m'avoir attribué une allocation ce qui m'a grandement facilité la vie. Un grand merci également à tout le personnel ORSTOM Montpellier.*

**Physiologie de la croissance et production d'arôme par les cultures mycéliennes de  
*Pleurotus* et de *Morchella* sur milieu solide**

**Sommaire**

<b>1. Introduction</b>	<b>6</b>
<b>2. Etude bibliographique</b>	<b>9</b>
2.1. Les arômes	10
2.1.1. Définition	10
2.1.2. Législation sur les arômes	10
2.1.3. Nature chimique des corps odorants	12
2.1.4. Voies de production de composés d'arômes	12
2.1.5. Biosynthèse de composés d'arômes par les micro-organismes	13
2.1.6. Composés d'arôme produits par les champignons supérieurs	15
2.2. Les champignons	34
2.2.1. Définition	34
2.2.2. Les Morilles	35
2.2.3. Les Pleurotes	39
2.3. Fermentation en milieu solide	41
2.3.1. Définition	41
2.3.2. Utilisations	41
2.3.3. Avantages et inconvénients de la FMS	42
2.3.4. Les micro-organismes	43
2.3.5. Les substrats et les supports	43
2.3.6. Activité de l'eau et humidité	43
2.3.7. Aération et échanges gazeux	44
2.3.8. Contrôle de la température	46
2.3.9. Contrôle du pH	46
2.3.10. Dispositifs utilisés pour la mise en œuvre des FMS	46
2.3.12. Respiration et respirométrie	48
<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>50</b>
3.1. Souches	51
3.2. Milieux de culture	51
3.2.1. Milieu de conservation	51
3.2.2. Milieux de base	51
3.2.3. Support	51

3.2.4. Dispositifs de fermentation sur support solide	52
3.2.5. Méthodes physico-chimiques	54
3.2.6. Suivi de la croissance	55
3.2.7. Analyses de la composition de l'arôme	57
3.2.8. Analyses chromatographiques	60
3.3. Dosage des activités Peroxydases	63
3.3.1. Dosage de l'activité Lignine Peroxydase	63
3.3.2. Dosage de l'activité Mn Peroxydase	63
3.4. Observations au microscope électronique à transmission	64
3.5. Echantillonnage et traitement des échantillons	64
<b>Résultats et Discussion</b>	<b>66</b>
<b>4. Sélection des souches sur support solide</b>	<b>67</b>
4.1. Présélection des souches	67
4.2. Critères de sélection des souches sur support solide	68
4.2.1. Croissance apicale	68
4.2.2. Description du mycélium des différentes souches étudiées	69
4.2.3. Evaluation sensorielle de la qualité de l'arôme	69
4.2.4. Analyse des effluves	70
4.3. Arôme produit par les carpophores de Pleurotes	73
4.3.1. Evaluation olfactive de l'arôme	73
4.3.2. Composition en produits volatils des carpophores de Pleurotes	75
4.4. Discussion	77
4.5. Conclusion	80
<b>5. Optimisation de la croissance de <i>P. ostreatus</i> sur support solide</b>	<b>81</b>
5.1. Effet de la source d'azote sur la croissance et sur la production d'arôme	82
5.1.1. Effet sur les paramètres de culture	82
5.1.2. Effet sur la production des molécules en C8	83
5.1.3. Effet sur la composition des effluves produites	84
5.1.4. Comparaison entre arôme mycélium et arôme carpophore	85
5.2. Effet de la source de carbone	86
5.3. Effet du rapport Carbone/azote	88
5.3.1. Effet du rapport C/N sur les paramètres de culture	88
5.3.2. Effet du rapport C/N sur la formation des molécules en C8	89
5.4. Cinétique de croissance de <i>P. ostreatus</i>	90
5.4.1. Evolution des paramètres physiques	91
5.4.2. Evolution de la quantité et de la qualité des molécules	91
5.5. Discussion	92
<b>6. Physiologie de croissance de <i>P. ostreatus</i> cultivé en FMS sur support</b>	<b>94</b>

6.1. Influence de l'inoculum	95
6.1.1. Effet de l'origine de l'inoculum	96
6.1.2. Effet du taux d'inoculation sur le démarrage de la FMS	98
6.1.3. Effet de l'âge de l'inoculum	99
6.1.4. Conclusion	101
6.2. Effet des paramètres physiques	102
6.2.1. Effet sur la croissance	103
6.2.2. Effet sur la concentration d'anisaldéhyde	104
6.2.3. Effet sur les effluves produites	104
6.3. Cinétique de la croissance et de production d'arôme	107
6.3.1. Croissance de <i>P. ostreatus</i>	107
6.3.2. Teneur en molécules majoritaires (extrait au solvant)	109
6.3.3. Evolution du profil aromatique au cours du temps	109
6.3.4. Discussion	110
6.4. Cinétique de croissance de <i>P. ostreatus</i> en cultures non aérées	120
6.5. Conclusion	122
<b>7. Culture de <i>M. crassipes</i> en FMS</b>	<b>125</b>
7.1. Effet de la source d'azote sur la croissance et sur la production d'arôme	127
7.2. Effet de la source de carbone	129
7.3. Effet du rapport C/N	130
7.4. Cinétique de croissance de <i>M. crassipes</i>	132
7.5. Effet de l'origine de l'inoculum	135
7.6. Effet du pourcentage d'inoculation sur le démarrage de la FMS	136
7.7. Effet de l'âge de l'inoculum	137
7.8. Effet des paramètres physiques	139
7.9. Cinétique de la croissance <i>M. crassipes</i>	143
7.10. Effet du rajout d'huiles sur la production de l'arôme	145
7.11. Discussion	146
7.12. Conclusion	147
<b>8. Conclusion Générale</b>	<b>149</b>
<b>9. Références Bibliographiques</b>	<b>153</b>

## ***Introduction***

## 1. Introduction

Les odeurs dégagées par les carpophores des champignons sont très variées. Des descriptifs surprenants leur sont attribués (sucré, terreux, fleuri, fruité, fétide, anisé, ...). Cependant, différentes études (Pyysalo et Suihko, 1976 ; Maga, 1981 ; Kinderler, 1989 ; Bushbauer *et al.*, 1993) ont montré que malgré cette diversité d'odeurs, les composés à 8 atomes de carbone sont majoritairement responsables, de l'arôme de plusieurs champignons comestibles tels que les Pleurotes, les Morilles, les Lactaires, le champignon de Paris ou les Bolets.

Les proportions variables de ces molécules à 8 atomes de carbone, peuvent expliquer les différences d'odeurs entre les champignons. En effet, ces molécules saturées ou insaturées, présentent une grande diversité de structures puisqu'il peut s'agir de cétones, d'alcools, ou d'aldéhydes. Certaines de ces molécules (oct-1-én-3-ol, et oct-1-én-3-one) sont responsables d'odeurs fongiques ou terreuses, alors que d'autres comme l'octanal, l'octanol et l'oct-2-énal sont responsables d'odeurs plus particulières ; zestées à fruitées. Ces molécules se distinguent également par leur seuil de perception, qui peut varier d'un facteur 10 ou 100 d'une molécule à l'autre.

L'oct-1-én-3-ol dont plusieurs auteurs, ont noté la dominance dans l'arôme de différents champignons, possède deux énantiomères R et S, peut être obtenu selon deux voies de synthèse chimique :

- par la réaction de Grignard entre  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$  et  $\text{C}_3\text{H}_7\text{Mg}$ . Le rendement de cette réaction est compris entre 65 et 85%.

- par la réduction sélective de l'oct-1-én-3-one, le rendement de la réaction peut alors atteindre 90%.

Mais la synthèse chimique qui conduit à un mélange racémique reste inappropriée, pour l'obtention d'un arôme qui soit identique à celui produit par les carpophores. En effet, dans une étude récente, d'authentification de l'arôme champignon, il a été démontré qu'en ce qui concerne les champignons surgelés ou secs, l'isomère R de l'oct-1-én-3-ol (exclusivement responsable de la note fongique et fruitée des champignons), est largement majoritaire par rapport à l'isomère S. Les champignons présentent un excès énantiomérique moyen de 50%. En revanche, l'analyse des aromatisants dits naturels a montré que seuls 3 sur 9 présentent des excès énantiomériques similaires aux champignons analysés, les 6 autres étant voisins de 0% (Talou *et al.*, 1995). Il en résulte que les concentrés d'arôme champignon commercialement disponibles ne soient pas satisfaisants. Par ailleurs, une étude réalisée sur 12 concentrés d'arôme champignon provenant de 7 producteurs européens montre que les constituants volatils qui disparaissent au cours des traitements, sont remplacés par des mélanges de composés, qui confèrent aux différents concentrés une note aromatique uniforme "champignon-levure" (Hanssen et Klingenberg, 1983).

La bioproduction des composés à 8 atomes de carbone, par les cultures mycéliennes de champignons supérieurs serait une bonne alternative pour l'obtention de l'oct-1-én-3-ol ou d'une plus large gamme de molécules à 8 atomes de carbone. L'incorporation de ces molécules à des concentrés d'arôme fongique permettrait de renforcer leur note champignon. Ces concentrés bénéficieraient en plus du label naturel conformément à la directive européenne du 22 juin 1988.

Nous avons porté notre intérêt sur deux genres de champignons supérieurs : les Morilles et les Pleurotes. En effet, lors de leur développement mycélien, ces champignons dégagent des arômes qui reproduiraient les caractéristiques aromatiques des carpophores correspondants. Il semble donc, que la maîtrise des conditions culturales du mycélium puisse permettre, d'envisager la bioproduction, à moindre coût, de différentes composantes de l'arôme fongique.

Le but de notre étude, est donc de trouver les conditions requises au bon développement du mycélium et, parallèlement, à l'induction des caractéristiques aromatiques des cultures sur support solide. L'utilisation de la fermentation en milieu solide, constitue une approche originale pour la production d'arôme, étant donné que la plupart des études réalisées jusqu'ici ont concerné essentiellement les cultures submergées.

Ce travail est réalisé dans le cadre d'un programme de recherche Aliment Demain (MRT 94.G.0086) qui associe des laboratoires de centres universitaires (ENS. C, Toulouse ; ENS. BANA, Dijon) et d'instituts de recherche (INRA et ORSTOM) et un industriel, la société MICROLITHE ; partenaires réunis en fonction de leurs complémentarités : sélection de souches de champignons supérieurs, production de mycélium et optimisation de cultures sur milieu solide ou submergé, caractérisation des substances volatiles, encapsulation des arômes produits.

Cette dernière phase du programme a été menée au sein de la société MICROLITHE spécialisée dans la microencapsulation. Les produits finaux pourraient se présenter sous la forme d'une gamme d'arômes fongiques labélisés naturels. Ceux ci seraient utilisés dans le domaine agroalimentaire, notamment en tant qu'additifs à certains produits lyophilisés (potages, veloutés, ...).

Nous nous proposons, dans un premier temps d'étudier la physiologie (croissance et nutrition, ...) et les caractéristiques aromatiques (mise au point des techniques d'extraction, d'identification et de dosage des arômes) sur un Pleurote, à croissance rapide et à fort potentiel aromatique, cultivé sur support solide. L'optimisation des conditions de culture sera menée de façon à privilégier la meilleure adéquation entre l'arôme produit par le carpophore et celui produit par les cultures mycéliennes. Des études seront ensuite conduites pour analyser puis optimiser la production d'arôme par le mycélium d'une Morille.

## ***Etude Bibliographique***

## **2. Etude bibliographique**

Cette étude bibliographique comporte trois parties. Une première partie présente les généralités sur les arômes, particulièrement ceux produits par les champignons. La deuxième partie concerne la biologie des Morilles et des Pleurotes. Enfin, la troisième partie est consacrée aux fermentations en milieu solide.

### **2.1. Les arômes**

#### **2.1.1. Définition**

L'arôme est une perception olfacto-gustative, constituant la saveur, terme qui regroupe le goût, l'astringence, la pseudo-chaueur et l'arôme d'un aliment. On peut définir l'arôme d'un aliment (Jaubert, 1983) comme l'ensemble des substances qui sont présentes au moment de la consommation et qui peuvent passer dans le torrent gazeux pour créer des sensations olfactives;

- \* le terme arôme est réservé à l'usage alimentaire;
- \* les substances ainsi nommées ont une nature chimique;
- \* l'arôme est le plus souvent le résultat d'un mélange de nombreuses molécules qui doivent avoir pour caractéristique :
  - \* de changer d'état en passant d'un milieu le plus souvent aqueux à une phase gaz;
  - \* de pouvoir atteindre l'organe olfactif à travers le mucus nasal;
  - \* de réagir avec les membranes réceptrices de l'organe sensoriel.

#### **2.1.2. Législation sur les arômes**

Le but principal de toute législation alimentaire est de protéger le consommateur de risques pour sa santé et de pratiques frauduleuses. La protection de la santé s'appuie sur des normes et des réglementations restrictives. La protection contre la fraude est assurée par un étiquetage véridique. Dans le cas précis de la législation portant sur les arômes, celle-ci est dictée par les opinions et les superstitions des consommateurs, par la demande des industries alimentaires et du savoir-faire technique de l'industrie des arômes (Lecchini, 1994 ; Hartmann, 1995 ; Hariel, 1989).

### **2.1.2.1. Directive communautaire sur les arômes**

D'après la directive du 22 juin 1988 (N° 88-388), relative au rapprochement des législations des états membres dans le domaine des arômes alimentaires, on entend par arôme :

- \* les substances aromatisantes naturelles;
- \* les substances aromatisantes identiques aux substances aromatisantes naturelles;
- \* les substances aromatisantes artificielles;
- \* les préparations aromatisantes;
- \* les arômes de transformation;
- \* les arômes de fumée ou leurs mélanges.

**Substance aromatisante** : c'est une substance chimiquement définie ayant des propriétés aromatisantes. Elle peut être obtenue:

\* par des traitements physiques appropriés (incluant la distillation et l'extraction au solvant) de matière première d'origine végétale ou animale, soit brute soit transformée par des procédés traditionnels de préparations alimentaires (comme le séchage, la torréfaction et la fermentation) ou par action enzymatique ou microbiologique (biosynthèse ou conversion) (arômes naturels).

\* par synthèse chimique ou isolée par des procédés chimiques et identiques chimiquement à une substance présente dans une matière d'origine végétale ou animale (arômes identiques).

\* par synthèse chimique, mais non identique chimiquement à une substance présente naturellement dans une matière d'origine végétale ou animale (arômes artificiels).

**Préparation aromatisante** : produit autre que les substances aromatisantes, concentré ou non, et obtenu par les procédés déjà décrits.

**Arôme de transformation** : produit obtenu par chauffage à une température inférieure ou égale à 180°C pendant moins de 15 minutes, d'un mélange d'ingrédients qui ont ou non des propriétés aromatisantes et dont au moins l'un d'entre eux, contient de l'azote et un autre, un sucre réducteur.

**Arôme de fumée** : extrait de fumée utilisé dans les procédés traditionnels de fumaison des denrées alimentaires.

### **2.1.2.2. Directive américaine**

La réglementation américaine des arômes incombe à la Federal Drug Administration (FDA), qui prend ses décisions au fur et à mesure du progrès technique et repose sur le concept "GRAS" ou "Generally Recognized As Safe". Cependant, le terme arôme naturel ou aromatisant naturel désigne une huile essentielle, une oléorésine, une essence ou un extrait, un hydrolysate de protéine, un distillat

ou tout autre produit obtenu par cuisson, chauffage ou lyse enzymatique. Ces produits contiennent les constituants aromatiques issus d'une épice, de fruit ou jus de fruit, de légume ou jus de légume, de ferment alimentaire, d'herbe, d'écorce, de bourgeon, de racine, de feuille, ou de matière première végétale analogue, de viande, de produit de la mer, de volaille, d'oeufs, de produits laitiers ou de fermentation, dont l'utilisation est à but aromatique plutôt que nutritionnel.

Tout ce que cette définition ne recouvre pas est étiqueté "artificiel".

### **2.1.3. Nature chimique des corps odorants**

Les composés odorants ou arômes, sont des molécules organiques de faible poids moléculaire ( $M < 400$  Daltons) dont la tension de vapeur sous pression atmosphérique est suffisamment élevée, pour qu'elles se trouvent en partie à l'état vapeur dans l'atmosphère et puissent au contact de la muqueuse olfactive provoquer un stimulus. Ces constituants appartiennent à différentes classes de la chimie organique : hydrocarbures (généralement de nature terpénique), alcools, ether-oxydes, aldéhydes, cétones, esters, amines, amides et divers hétérocycles.

Un arôme naturel représente pondéralement une partie minime du produit alimentaire dans lequel il se trouve (Jaubert, 1983). Selon Richard (1992), la note aromatique d'un produit alimentaire est parfois due à un seul composé tel que le menthol de la menthe, le cuminaldéhyde du cumin, et l'oct-1-én-3-ol des champignons.

Plusieurs molécules peuvent être nécessaires pour donner l'illusion de l'arôme d'un aliment; un petit nombre de molécules suffit parfois : le mélange de 2-éthyl-butyrate de méthyle, d'hexanal et de *trans*-2-hexenal pour la note pomme. Dans d'autres cas, un plus grand nombre de composés interviennent. Parfois, aucun des composés chimiques volatils identifiés dans l'aliment ne semble participer à l'arôme, c'est le cas du poivre.

Certaines molécules odorantes comme le maltol, l'éthylmaltol (arôme artificiel) et le furanéol, sont des exhausteurs de saveurs sucrées ou de perceptions olfactives.

### **2.1.4. Voies de production de composés d'arômes**

Dans leur majorité (84 %) les composés d'arômes sont produits par voie chimique (Janssens et al., 1992), ce qui aboutit à la formation d'un mélange racémique des différents isomères. Or, la grande majorité des molécules ayant un impact olfactif présentent un ou deux carbones asymétriques, dont les propriétés olfactives peuvent différer selon la nature de l'énantiomère considéré. Par ailleurs, la synthèse chimique stéréospécifique est une technique très coûteuse et qui montre ses limites au delà de 2 ou 3 sites optiquement actifs. De plus la chimiophobie exprimée par le consommateur à l'égard des arômes artificiels ou synthétiques incite à développer d'autres voies de productions des arômes.

Une alternative est offerte par l'adoption de méthodes biotechnologiques en utilisant les micro-organismes (Cheetham, 1993 ; Degorce-Dumas et *al.*, 1984 ; Gatfield, 1988 ; Tyrrell, 1995). En effet, selon la législation européenne, les arômes obtenus par cette voie bénéficient du label naturel. Les micro-organismes peuvent donc être employés soit dans :

- \* les bioconversions : méthodes par lesquelles des micro-organismes ou des enzymes spécifiques produisent des molécules difficiles à synthétiser chimiquement. Il est à noter que l'emploi de l'enzyme est toujours préféré à celui du micro-organisme qui peut être à l'origine de réactions non désirées.

- \* la biosynthèse de composés d'arôme : biosynthèse de métabolites, à partir de substrats élémentaires carbonés et azotés.

- \* la production de préparations aromatiques : il s'agit de préparations aromatisantes contenant un mélange de molécules odorantes. Malheureusement l'optimisation de ce procédé reste difficile.

Cependant, l'extrapolation de ces productions à un stade industriel pose un certain nombre de problèmes de coûts posés par la biosynthèse, par la bioconversion ou par l'extraction. En effet, dans le cas de la biosynthèse, les facteurs de coût sont liés d'une part à la stérilité du matériel et à la durée du procédé, d'autre part à la teneur du produit final en molécules recherchées. Par contre, dans le cas des bioconversions, les coûts des agents de bioconversions (enzymes) peuvent être élevés. En ce qui concerne l'extraction, on se trouve souvent en présence de milieux très dilués et complexes d'où il faut extraire la molécule recherchée et elle seule (Delset, 1992).

### 2.1.5. Biosynthèse de composés d'arômes par les micro-organismes

Certains micro-organismes (bactéries, champignons) synthétisent des molécules d'arômes complexes au cours de leur métabolisme. D'ailleurs l'arôme a longtemps constitué un moyen utile pour la discrimination des différentes espèces de champignon. A cet effet, Omeliansky (1923) et Badcock (1939) ont répertorié différents organismes producteurs d'arôme, ainsi que leur caractéristiques olfactives. Plus récemment, Janssens et *al.*, (1992) ont réalisé une compilation des différents travaux ayant trait à la production des molécules aromatiques par les bactéries, les levures et les champignons, en spécifiant la composition chimique de l'arôme ainsi que les conditions culturales requises pour obtenir un rendement maximal. Il est apparu que 80% des organismes producteurs d'arôme ou de ceux impliqués dans les procédés de bioconversion sont des champignons, les 20% restants sont des bactéries.

Dans cette étude bibliographique, nous citerons de manière non exhaustive la production d'arôme par les bactéries, les levures et les champignons inférieurs. Nous nous attarderons particulièrement sur le cas des champignons supérieurs.

Les bactéries productrices de molécules aromatiques appartiennent aux genres *Pseudomonas*, produisant essentiellement des esters tels que l'éthylbutyrate, l'éthylisovalériate, éthyl hexanoate,

éthyl-2-hexenoate, éthyl crotonate, éthyl-2-méthylhexanoate (Cormier et al., 1991, Raymond et al., 1991).

Les espèces du genre *Streptomyces* par contre, produisent essentiellement des terpènes : production de géosmine par *S. odorifer* (Collins et al., 1971). Des pyrazines sont produites par *Corynebacterium glutamicum* (Armstrong et al., 1989) et par *Pseudomonas peorolens* et *P. taetrolens* (Kempler, 1983 ; Mc Iver et Reineccius, 1986).

En ce qui concerne les levures, différents genres sont producteurs d'arômes ; *Candida*, *Dipodascus*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Hansenula* et *Rhodotorula* avec production de terpènes, lactones, esters, alcools et aldéhydes (Tahara et al., 1972, 1973). Les rendements sont toutefois moins importants que ceux obtenus par la culture de champignons (Janssens et al., 1992).

Les champignons, producteurs des molécules aromatiques, peuvent être aussi bien des Micromycètes : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum* et *Trichoderma*, également intégrés dans les procédés de bioconversion que des Macromycètes, plus particulièrement les champignons ligninolytiques, qui produisent une grande profusion de molécules aromatiques, pouvant se substituer à celles extraites à partir des plantes (Krings et al., 1995).

Marc (1995) a répertorié 16 genres différents de champignons producteurs de composés d'arômes ainsi que leurs conditions de cultures et les protocoles d'extraction et d'analyses employés. Plus de 70 références sont évoquées dont 10 brevets. Différentes espèces appartenant à un même genre produisent des molécules similaires, paradoxalement certaines espèces sont capables de produire des composés d'arôme différents en fonction des conditions de culture et notamment, de la nature de la source d'azote et ou de carbone.

Collins et Halim (1972) signalent que le champignon *Trichoderma viride* produit la 6 pentyl- $\alpha$ -pyrone dont l'odeur rappelle celle de la noix de coco. Des études plus récentes sont réalisées sur la production de cette molécule tant d'un point de vue purement fondamental que d'un point de vue à visée appliquée (Serrano-Carreón, 1992 ; Sarhy-Bagnon et al., 1997).

Différentes espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont citées dans la littérature pour la production de molécules aromatiques notamment l'oct-1-én-3-ol par *Aspergillus oryzae* (Scharpf et al., 1986) ou d'autres molécules telles que l'éthanol, le butanol, le 3-méthylbutanol et l'octan-3-one par *Aspergillus terreus*, *Penicillium pusillum* et *P. cyclopium* (Schindler et Schmid, 1982).

Par ailleurs, Seifert et King (1982) ont identifié dans les cultures d'*Aspergillus clavatus* une grande diversité de molécules odorantes, parmi lesquelles, on peut citer la production de 4-méthylbenzaldéhyde, de phénylacétaldéhyde, d'oct-1-én-3-ol et de méthylphénol. D'autres composés sont également présents à des proportions faibles en particulier le *p*-éthylphénol, le phényléthanol et le benzothiazol.

Les espèces du genre *Geotrichum* produisent essentiellement des terpènes qui confèrent des odeurs fruitées aux cultures, (isobutyrate d'éthyle, propionate d'éthyle, butylacétate, 2-phénylacétate, 2-phényléthanol) (Degorce-Dumas et al., 1984 ; Latrasse et al., 1988 ; Shin et al., 1988) Par ailleurs

Janssens et al., (1988) ont montré qu'en additionnant différents composés (isoleucine, isopentanol, propanol, acide isovalérique et acide-2-méthylbutyrique) à un milieu de référence, la quantité et la qualité des molécules produites variaient de manière importante.

*Fusarium solani* isolé sur de la noix de coco mûre en cours de déperissement, incubé sur des alcano- $\gamma$ -lactones obtenus à partir de noix de coco desséchées, produit principalement de la déc-2-éno- $\gamma$ -lactone (masso-ialactone) (Nago et al., 1993 a, b).

Parmi les Ascomycètes, c'est le genre *Ceratocystis* qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études, en raison de la grande diversité des terpènes produits principalement par les espèces *C. moniliformis*, *C. variopora* et *C. virescens* (citronellol, géraniol, géraniol, néral, linalol, géranyl-acétate, nérol,  $\alpha$ -terpinéol, citronellyl acétate). Ces composés apparaissent à des temps différents au cours de la culture et font suite à l'épuisement de l'azote dans le milieu (Lanza et Palmer, 1977). La quantité et la qualité de ces molécules dépendent fortement de la nature de la source de carbone et d'azote. Huball et Collins (1978) ont étudié des changements d'odeur des cultures de *Ceratocystis* en fonction de plusieurs combinaisons sucre-acide. Les combinaisons glucose, fructose ou arabinose et acide acétique ont respectivement provoqué la formation d'odeurs de banane, de fraise et de citron. La nature de la source de carbone assimilable détermine aussi la qualité de l'odeur dégagée. Les cultures de *C. moniliformis* développent une odeur de type pêche de conserve (présence de lactones) ou de type agrume (présence de terpènes) selon que la croissance s'effectue dans un milieu contenant du glycérol ou du galactose (Latrasse et al., 1984). Une remarque analogue s'applique à la nature de la source d'azote. Les cultures du même champignon dégagent une odeur de banane, de pomme ou d'agrumes selon que le milieu contient de la leucine, de la méthionine ou de la glycine (Lanza et al., 1976).

*Ceratocystis piceae* produit majoritairement du protoilludène dont la quantité varie en fonction de la nature de la source d'azote. Des quantités importantes sont produites en présence de phénylalanine (Hanssen et al., 1986 a).

### 2.1.6. Composés d'arôme produits par les champignons supérieurs

Avant de commencer cette étude, il convient de noter que l'arôme champignon supérieur a été abordé de deux manières bien distinctes. D'une part, des études ont été réalisées afin de dégager la composition de l'arôme de carpophores de différentes espèces comestibles et que nous qualifierons d'arôme primaire. Ce sont essentiellement des molécules à 8 atomes de carbone, alcools, aldéhydes ou cétones. D'autre part, des études ont été consacrées à la biosynthèse par les cultures mycéliennes de molécules complexes telles que les terpènes, les lactones et les composés à noyaux benzéniques, en faisant varier les conditions culturales. Ces études concernent essentiellement le mycélium des Basidiomycètes ligninolytiques.

### 2.1.6.1. Arôme des carpophores

La flaveur des champignons est un domaine complexe dans lequel des composés volatils et non volatils entrent en jeu. La fraction volatile revêt une importance certaine comme le souligne Maga (1981). On admet généralement que c'est la série des composés à 8 atomes de carbone qui est responsable de la flaveur primaire des champignons. Cette classe de composés inclut, l'oct-2-éno, l'octanol, l'octan-3-ol, l'oct-1-én-3-ol, et l'oct-1-én-3-one. Ces composés représentent avec d'autres molécules : alcool benzylique, benzaldéhyde, hexanol et 3-méthylbutanol, 90% de la fraction aromatique extraite à partir de différentes espèces de champignons comestibles (Tableau 2.1.). La formation de ces composés apparaît comme un principe commun aux Basidiomycètes.

Les composés en C8 constituent de ce fait une importante base pour la production de l'arôme champignon. En mélangeant ces différentes molécules en des proportions adéquates, les notes dégagés sont particulièrement similaires à celles de *Lactarius spp*, *Boletus edulis* et *Agaricus bisporus* (Pyysalo et Suihko, 1976). Par ailleurs, les différences entre espèces peuvent être attribuées dans une large mesure à des différences de proportions entre les composés constituant l'arôme (Tableau 2.1.).

Dijkstra (1976) a pu mettre en évidence des différences importantes dans la teneur en oct-1-én-3-ol de différentes espèces de champignons comestibles. La concentration en cette molécule varie entre 0,02 µl/l pour *Boletus edulis* à 190 µl/l pour *Clavatia gigantea*. Des teneurs élevées en oct-1-én-3-ol, 5 à 7 fois plus fortes que pour *Agaricus bisporus* ont été observées pour *Agaricus bitorquis*, *Pleurotus ostreatus* et *Pholiata squarosa*.

En revanche, des composés autres que les C8 participent activement à l'arôme d'espèces comestibles qui, en se superposant à la note primaire, apportent des caractéristiques odorantes spécifiques à chacun des champignons (Tableau 2.1.). L'arôme d'*Agaricus subrufescens* connu pour son odeur d'amande amère, est due à la présence de 85% de composés à noyau aromatique dont l'alcool benzylique, les composés à 8 atomes de carbone ne représentent alors que 2% de l'ensemble de la fraction volatile extraite (Chen et Wu, 1984 a).

La fraction volatile de *Marasmius alliaceus* comporte plusieurs composés soufrés : 2,4,5,7-tetrathiooctane, 2,3,4,6-tetrathioheptane et 2,3,4,6,8-pentathiononane (Rapior et al., 1997). D'autres composés soufrés semblent impliqués dans l'arôme de *Tuber melanosporum* (Truffe noire) et *Tuber magnatum*, respectivement du diméthyl disulfure et du 2,4-ditiapentane (Talou et al., 1987; Bellesia et al., 1996). Par ailleurs, l'arôme d'*Hydnellum suavolens* est principalement dû à la présence de 30% de coumarine et de méthoxycoumarine, la présence du *p*-méthoxycinnamate a été également mise en évidence dans ce carpophore (Wood et al., 1988).

Tableau 2.1. Composés chimiques identifiés dans différents carpophores de champignons.

Organismes	Composés identifiés et pourcentages relatifs des molécules majoritaires	Auteurs
<i>Agaricus augustus</i>	benzaldéhyde, alcool benzylique, 4-hydroxybenzaldéhyde	Wood et al., 1990
<i>Agaricus bisporus</i> ( <i>Psalliota bispora</i> )	oct-1-én-3-ol (33%) <sup>1</sup> (64,7%) <sup>3</sup> , oct-1-én-3-one, ( <i>E</i> )-oct-2-énol (6%), ( <i>E</i> )-oct-2-énal, octan-3-ol, octan-3-one, octanol, oct-1-én-3-yl-acétate, oct-1-én-3-yl-propionate, nonanol, alcool benzylique (22,8%) <sup>2</sup> (14,2%) <sup>3</sup> , 3-méthylbutanol, benzaldéhyde	Pyysalo et Suihko, (1976) <sup>1</sup> ; Buchbauer et al., (1993) <sup>2</sup> ; Fisher et Grosch, (1987) <sup>3</sup> ; Mau et al., (1992)
<i>Agaricus campestris</i>	oct-1-én-3-ol (70%), oct-1-én-3-one, ( <i>E</i> )-oct-2-énol, ( <i>E</i> )-oct-2-énal, octan-3-ol, octan-3-one, octanol, nonanol, alcool benzylique (16,4%), anisaldéhyde (traces), benzaldéhyde, 1,3,5-cycloheptatriène	Tressl et al., (1982); Buchbauer et al., (1993)
<i>Agaricus subrufescens</i>	30 composés identifiés, alcool benzylique, benzaldéhyde, benzonitrile et benzoate de méthyle représentent plus de 85% des composés identifiés. 2% composés en C8	Chen et Wu, (1984 a)
<i>Boletus edulis</i>	oct-1-én-3-ol (49%) <sup>1</sup> , (86,7%) <sup>2</sup> (64,7%) <sup>3</sup> , oct-1-én-3-one (8%), ( <i>E</i> )-oct-2-énol, ( <i>E</i> )-oct-2-énal (11%), oct-1-én-3-yl-propionate, octan-3-ol, octan-3-one, octanol, nonanol, benzaldéhyde <sup>2</sup>	Pyysalo et Suihko, (1976) <sup>1</sup> ; Buchbauer et al., (1993) <sup>2</sup> ; Thomas (1973)
<i>B. edulis</i> (séché)	70 constituants incluant 9 pyrazines et 7 formylpyrrols	
<i>Cantharellus cibarius</i>	oct-1-én-3-ol (60%) <sup>1</sup> (76,4%) <sup>2</sup> , oct-1-én-3-one, ( <i>E</i> )-oct-2-énol, ( <i>E</i> )-oct-2-énal, octan-3-ol, octan-3-one, octanol, oct-1-én-3-yl-acétate, oct-1-én-3-yl-propionate, nonanol, heptanol	Pyysalo et Suihko, (1976) <sup>1</sup> ; Buchbauer et al., (1993) <sup>2</sup>
<i>Clitocybe nebularis</i>	oct-1-én-3-ol, octanol 3, oct-1-én-2-ol, éthyl-2-hexanol, linalol, octan-3-one, oxyde de linalol	Audoin et al., (1989)
<i>Coprinus comatus</i>	octan-3-ol, oct-1-én-3-ol, octanol, 2-méthyl-2-penten-4-olide	Dijkstra et Wikén (1976 b)
<i>Gyromitra esculenta</i>	oct-1-én-3-ol (72%), oct-1-én-3-one, ( <i>E</i> )-oct-2-énol, ( <i>E</i> )-oct-2-énal, octan-3-ol, octan-3-one, octanol, oct-1-én-3-yl-acétate, nonanol, N-méthyl-N-formylhydrazone <sup>2</sup>	Pyysalo et Suihko, (1976); Pyysalo et Niskanen, (1977) <sup>2</sup>
<i>Hebeloma sacchariolens</i>	2-aminobenzaldéhyde	Wood et al., (1992)
<i>Hydnellum suävols</i>	coumarine, méthoxy-7-coumarine, anisaldéhyde, méthyl- <i>p</i> -méthoxycinnamate	Wood et al., (1988)
<i>Hygrophoropsis auriantiaca</i> (déshydraté)	oct-1-én-3-ol, ( <i>E</i> ) octène-2-ol, heptan-2-one, hexanal	Audoin et al., (1989)
<i>Lactarius rufus</i>	oct-1-én-3-ol (72%), oct-1-én-3-one, ( <i>E</i> )-oct-2-én-1-ol, ( <i>E</i> )-2-octénal, octan-3-ol, octan-3-one, octanol, nonanol	Pyysalo et Suihko, (1976)
<i>Lactarius torminosus</i>	oct-1-én-3-ol (90%), oct-1-én-3-one, ( <i>E</i> )-oct-2-énol, ( <i>E</i> )-2-octénal, octan-3-ol, octan-3-one, octanol	Pyysalo et Suihko, (1976)
<i>Lactarius trivialis</i>	oct-1-én-3-ol (70%), oct-1-én-3-one, ( <i>E</i> )-oct-2-énol, ( <i>E</i> )-2-octénal (24%), octan-3-ol, octan-3-one, octanol, oct-1-én-3-yl-acétate	Pyysalo et Suihko, (1976)
<i>Lentinus edodes</i>	lenthionine (C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> S <sub>2</sub> ), 1,2,4-trithiolane, 1,2,4,5-tetrathiane, C8 (pH acides)	Chen et al., (1984)

Tableau 2.1. Composés chimiques identifiés dans différents carpophores de champignons (suite).

<i>Lepiota porcera</i>	oct-1-én-3-ol (8,3%), oct-1-én-3-one, (E)-oct-2-énol, (E)-oct-2-énal, octan-3-ol, octan-3-one, octanol, nonanol, décane, butylacétate, hexanol, dodécane, tétradécane, et plusieurs autres composés	Buchbauer et al., (1993)
<i>Lepista nuda</i>	oct-1-én-3-ol, octan-3-one, oct-1-én-3-one	Noël-Suberville et al., (1996)
<i>Lepista nuda</i> (déshydraté)	hexanol, oct-1-én-3-ol, (E)-oct-2-énol, terpinéol, cis néroldiol, oct-1-én-3-one, hexanal, pentanal, trans non-2-énal, diméthyl (2,5) pyrazine, oxyde de linalol	Audoin et al., (1989)
<i>Marasmius oreades</i>	oct-1-én-3-ol, octanol, propionate d'éthyle 150 constituants identifiés pour le mousseron séché	Vidal et al., (1986)
<i>Marasmius alliaceus</i>	plusieurs composés soufrés dont 2,4,5,7-tetrathiooctane, 2,3,4,6 tetrathioheptane, 2,3,4,6,8-pentathionane	Rapier et al., (1997)
<i>Morchella conica</i> (séché)	terpinène, nonanol, linalol, thymol, éthyl-4-guaïcol, heptan-2-one, hexanal, heptanal, octanal	Audoin et al., (1989)
<i>Morchella sp.</i>	oct-1-én-3-ol, acétophénone, linalol	Bensoussan et al., (1995)
<i>Nolanea fructifragans</i>	anisole, 1,3-diméthoxybenzène	Largent et al., (1990)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	oct-1-én-3-ol (67%) <sup>1</sup> (45%) <sup>2</sup> , octan-3-one (5,38%), octan-3-ol (4%), octanol, (Z)-oct-2-énol, benzaldéhyde, déca-2,4-diéнал	Hong et al., (1986) <sup>1</sup> ; Jung et Hong (1991) <sup>2</sup>
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	oct-1-én-3-ol (34,39%), hexanol, octan-3-one, octan-3-ol, 1,5-octadiène-3-one	Jung et Hong (1991)
<i>Pleurotus florida ostreatus ostreatus</i>	oct-1-én-3-ol (41,62%), hexanol, octan-3-one, octan-3-ol, phénol	Jung et Hong (1991)
<i>Pleurotus ostretus</i> (Ae-Neutari)	oct-1-én-3-ol (26,14%), hexanol, pentanal, pentanol, octan-3-one, octan-3-ol, (1,5)-octadiène-3-one	Jung et Hong (1991)
<i>Tuber melanosporum</i>	éthanol (40%), 2-méthylpropanol (17%), 2-méthylbutanol (20%), anisole (0,1), acétone (5-10%), diméthyl disulfure	Talou et al., (1987)
<i>Tuber magnatum</i>	(2,4)-dithiapentane (88,95%), n-heptanal	Bellesia et al., (1996)

De même, *Lentinus edodes* ou Shii-take, champignon très apprécié en Asie, produit majoritairement un composé cyclique soufré, le 1,2,3,5,6 pentathiépane ou "lenthionine". La biosynthèse de cette molécule à partir de l'acide lentinique ou  $\gamma$ -glutamyl sulfoxyde met en jeu deux enzymes :  $\gamma$ -glutamyl transférase et C-S lyase (Yasumoto et al., 1974). Des composés soufrés à structure linéaire sont également identifiés : 1,2,4,5-tétrathiane, 1,2,3,5-tétrathiane et 1,2,4-trithiolane. Des molécules à 8 atomes de carbone, le phénylacétaldéhyde, le furfural, l'hexanol, le 3-méthylbutanol, et le 3-méthylbutanal sont également retrouvées dans l'arôme du carpophore de ce champignon (Chen et al., 1984 ; Chen et Ho, 1986).

De plus, plusieurs auteurs font état des changements quantitatifs et qualitatifs qui peuvent se produire lors du séchage et de la cuisson des carpophores. En effet, les champignons comportent différentes molécules susceptibles d'être réactives durant les procédés conventionnels (séchage, appertisation et cuisson) pouvant aboutir à des changements significatifs dans la composition de l'arôme. Lors d'essais de séchage sur *Agaricus bisporus*, Sulkowska et Kaminski (1977) ont montré d'importantes modifications semi quantitatives et qualitatives de l'arôme. L'étude montre que le séchage s'accompagne de fortes pertes en oct-1-én-3-ol, en revanche la proportion du benzaldéhyde dans le carpophore séché passe de 27 à 67%.

Par ailleurs, le séchage peut entraîner outre ces variations semi quantitatives, l'apparition de nouvelles molécules notamment des pyrazines. En effet, sur des carpophores séchés de *Boletus edulis*, Thomas (1973) a identifié 70 constituants incluant 9 pyrazines. Sur le même champignon frais, seules 14 molécules ont été identifiées essentiellement des molécules à 8 atomes de carbone. C'est le cas aussi pour *Marasmius oreades* pour lequel, l'analyse de la fraction volatile montre la présence de 13 composés à l'état frais contre 103 composés à l'état sec. La proportion de l'oct-1-én-3-ol passe de 86% (état frais) à 1,3% (état sec) (Vidal et al., 1986).

Au cours de la cuisson, l'oct-1-én-3-ol peut être oxydé en oct-1-én-3-one (Picardi et Issenberg, 1973). Mac-Leod et Panchasara (1983) ont montré que la cuisson pouvait également induire la cyclisation de l'oct-1-én-3-ol en cyclo-octanol.

Dans le cas de *Gyromitra esculenta*, Pyysalo et Niskanen (1977) ont montré que les N-méthyl-N-formylhydrazones responsables de la toxicité de ce champignon à l'état cru, disparaissaient au cours de la cuisson ou du séchage.

L'influence des méthodes d'extraction sur le profil aromatique des espèces étudiées est également un fait bien établi : à deux méthodes d'extraction correspondent deux images d'un arôme. La comparaison des résultats obtenus sur le champignon de couche *Agaricus bisporus* par Wasowicz, 1974 ; Pyysalo et Suihko, 1976 ; Fisher et Grosch, 1987 et Bushbauer et al., 1993, montre des différences semi quantitatives et qualitatives de l'arôme qui ne peuvent être attribuées qu'aux différentes techniques d'extraction utilisées.

## Caractéristiques des molécules à huit atomes de carbone

Les molécules à huit atomes de carbone se distinguent les unes des autres d'une part par leur impact olfactif, d'autre part par leur seuil de détection. Les différences sont très importantes d'une molécule à l'autre et peuvent être d'un facteur 10 ou 100. Oct-1-én-3-one et (Z)-oct-2-énol possèdent les seuils de détection les plus faibles. En revanche, l'octanol possède le seuil le plus élevé (Tableau 2.2.).

Tableau 2.2. Valeurs de perception seuils des différentes molécules conférant l'arôme champignon frais (sept espèces de champignons comestibles) (Pyysalo et Suihko, 1976).

Composé chimique	Valeur seuil (mg/kg)	Note aromatique
oct-1-én-3-ol	0,010	champignon
oct-1-én-3-one	<b>0,004</b>	champignon séché, métallique à concentration élevée.
(E)-oct-2-énol	0,040	médicamenteuse ou grasse
(Z)-oct-2-énol	<b>0,003</b>	sucrée; phénolique à concentration élevée
octan-3-ol	0,018	huile de foie de morue
octan-3-one	0,050	sucrée, fruitée, moisie
octanol	<b>0,48</b>	sucrée, détergent, soupe
oct-1-én-3-yl -acétate	0,09	champignon
oct-1-én-3-yl -propionate	0,22	nuancée, sucrée, herbacée, fruitée, champignon

Il est important de souligner que les seuils de détection et les impacts olfactifs évalués pour une molécule donnée peuvent varier d'un auteur à l'autre.

Ainsi, Freytag et Ney (1968) ont étudié les propriétés sensorielles d'une série d'alcool ayant une structure générale R-CH(OH)CH=CH, le radical R étant un méthyle ou un pentyle. Ils ont montré que la note champignon dépend fortement de la présence de la double liaison et de la configuration du groupement hydroxyle au niveau de l'atome C3. Seuls l'oct-1-én-3-ol et l'hept-1-én-3-ol présentent la note champignon.

En revanche, Fischer et Grosch (1987), ont montré le rôle non négligeable voire prépondérant de l'oct-1-én-3-one dans la note champignon d'*Agaricus bisporus*. En effet, bien que l'oct-1-én-3-ol soit présent au pourcentage le plus élevé, c'est la cétone correspondante qui présente l'impact olfactif le plus important. Ces deux molécules possèdent une odeur fongique, mais se distinguent par leur seuil olfactif qui pour la cétone est inférieur à celui de l'alcool (Tableau 2.2.).

De plus, Dijkstra et Wikén (1976 a) ont montré que la forme lévogyre du composé oct-1-én-3-ol dégage un arôme plus soutenu que la forme dextrogyre avec un seuil de perception dans l'eau de 0,43 µl/l. De même, Mosandl et al., (1986), par des tests sensoriels sur les énantiomères synthétisés de façon préparative ont prouvé que la forme R-(-)-oct-1-én-ol-3 était exclusivement responsable de l'arôme fruité et de champignon dégagé.

Par ailleurs, dans une étude récente réalisée dans le but d'authentifier l'arôme champignon, étude qui a englobé des champignons surgelés et secs, des aromatisants naturels et identiques à la nature, il a été démontré qu'en ce qui concerne les champignons surgelés ou secs, l'isomère R est largement majoritaire présentant un excès énantiomérique moyen de 50%. En revanche, l'analyse de 9 aromatisants dits naturels a montré que seuls 3 d'entre eux présentent des excès énantiomériques similaires aux champignons analysés (Talou *et al.*, 1995).

### Biosynthèse des molécules conférant l'arôme *champignon*

La fraction lipidique des champignons semble jouer un rôle prépondérant dans le développement typique des arômes. Ainsi, divers précurseurs d'arômes dérivent du métabolisme des acides gras, plus particulièrement des acides gras polyinsaturés (Crouzet, 1992).

Chez les champignons, Tressl *et al.*, (1982) ont montré que l'acide linoléique est converti principalement en oct-1-én-3-ol et en acide 10-hydroxydécanoïque. D'autres composés à 8 atomes de carbone ont été identifiés : octanol, octan-3-one, octan-3-ol, (Z)-oct-2-éнал. La formation des composés comportant deux doubles liaisons, (Z)-octa-(1,5)-diène-3-ol, (Z,Z)-octa-(2,5)-diéнал, (Z,Z)-octa-(2,5)-diéanol, est par contre attribuée à l'oxydation de l'acide linoléique.

Par ailleurs, Wurzenberger et Grosch (1982, 1984 a, b) ont montré que l'acide linoléique est clivé par l'extrait enzymatique d'*Agaricus bisporus* en oct-1-én-3-ol et en acide 10-oxo-trans-8-décénoïque (Fig. 2.1.). Ces auteurs, présentent le 10 hydroperoxyde comme étant le seul intermédiaire de la réaction. En effet, en incubant un extrait enzymatique obtenu à partir d'*Agaricus bisporus* sur différents hydroperoxydes isomères C9, C10, C12 et C13 obtenus par photo-oxydation de l'acide linoléique, ces auteurs ont montré que seul l'isomère C10 est substrat. L'oxygène au niveau de l'oct-1-én-3-ol semble dériver de la phase gazeuse. L'oxygène du groupement carbonyle de l'oxo-acide provient également de l'oxygène gazeux puis est secondairement échangé avec l'oxygène de l'eau. Une explication de la stéréochimie de catalyse a été proposée en supposant que l'enzyme possède une poche hydrophobe dans laquelle l'hydroperoxyde en position C10 serait fixé. L'oxygénation de l'acide linoléique par l'O<sub>2</sub> moléculaire impliquerait une activité lipoxygénase.

D'autre part, ces auteurs soulignent que les plus forts pourcentages d'acide hydroxydécanoïque (85%) retrouvés par Tressl *et al.*, (1982) par rapport à l'acide 10-oxo-trans-8-décénoïque (5%) sont probablement dus à une conversion de ce dernier en acide 10-hydroxydécanoïque par réduction du groupement aldéhyde et hydrogénation de la double liaison.

Plus récemment, Assaf *et al.*, (1995) ont montré que la formation de l'hydroperoxyde en C13 dépend de la concentration initiale en acide linoléique. Le 13-hydroperoxyde est absent à des concentrations en acide linoléique inférieures à 1mM, mais devient le composé non volatil majoritairement accumulé pour des concentrations en acide linoléique supérieures à 1mM.

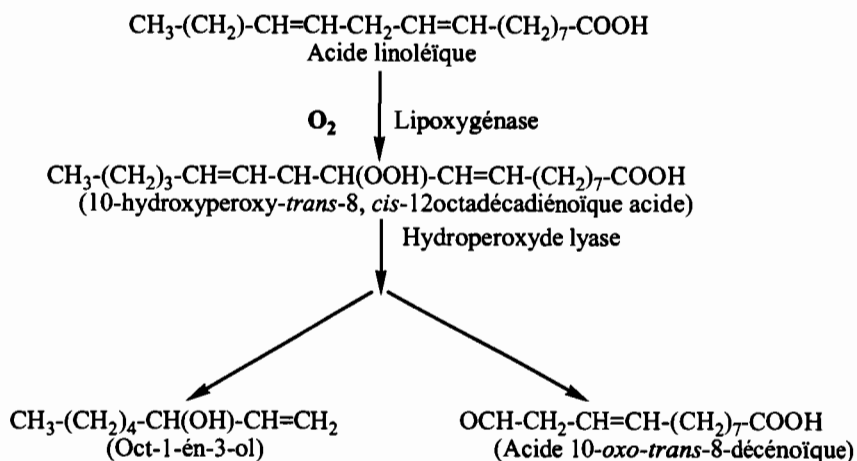


Fig. 2.1. Voie hypothétique de la formation de l'oct-1-én-3-ol à partir de la dégradation enzymatique de l'acide linoléique selon Wurzenberger et Grosch (1983).

Par ailleurs, ces auteurs ont montré que l'accumulation de l'hydroperoxyde en C13 et la formation du précurseur de l'oct-1-én-3-ol avaient lieu simultanément et selon deux voies différentes. L'une catalysant la formation du 13-hydroperoxyde et présentant une faible affinité pour le substrat, l'autre ayant une grande affinité pour le précurseur de l'oct-1-én-3-ol. Selon ces auteurs, l'implication de l'isomère en C10 reste à démontrer.

#### **Autres produits de l'oxydation des acides gras**

On peut distinguer les produits d'oxydation enzymatique de ceux formés par auto-oxydation. Ainsi l'hexanal, le *trans*, *trans*-déca-(2,4)-diénal, le *cis*, *trans*-déca-(2,4)-diénal sont les produits de clivage, des hydroperoxydes en position 9 et 13 de l'acide linoléique et résultent de l'action enzymatique d'une lipoxygénase. Le nonanal, le déc-2-énal, l'undéc-2-énal sont formés par auto-oxydation de l'acide oléique alors que l'heptanal provient de celle de l'acide linoléique (Chalier, 1991).

#### **Enrichissement en arôme " primaire " champignon**

Les substrats de la lipoxygénase (acides linoléique et linoléique) sont des constituants membranaires, mais ne sont véritablement oxydés que s'ils sont sous forme libre, de même leur susceptibilité vis à vis de l'auto-oxydation est beaucoup moins importante quand ils sont liés à la membrane. Au cours des processus de vieillissement, les parois cellulaires deviennent plus perméables de telle sorte que les enzymes et leurs substrats peuvent entrer en contact, permettant le développement d'arôme (Crouzet, 1992).

L'incubation de tissus de champignons dans de l'acide linoléique suivie d'une homogénéisation à l'Ultra-Turrax permet une augmentation instantanée de la production du composé oct-1-én-3-ol (Tressl *et al.*, 1982 ; Wurzenberger et Grosch, 1982) (Tableau 2.3.).

L'étude de l'effet du milieu sur la production de l'oct-1-én-3-ol par le mycélium de *Pleurotus pulmonarius* réalisée par Belinky *et al.*, (1994) a révélé que l'enrichissement en cette molécule peut se faire en 2 étapes, en stimulant la croissance mycélienne et en induisant l'activité lipoxygénase par addition de farine de soja *in vivo*, puis par macération *in vitro* du mycélium dans de l'acide linoléique avec ou sans flash d'oxygène ; ce protocole conduit à des teneurs élevées en oct-1-én-3-ol.

Tableau 2.3. Formation des composés à huit atomes de Carbone à pH 6,8 chez *Agaricus campestris* (Tressl et al., 1982).

Composé	Concentration (ppm)		
	Homogénéisation uniquement	Macération dans de l'acide linoléique et Homogénéisation	Macération dans de l'acide linoléique et Homogénéisation
octan-3-one	8,65	7,8	5,5
octan-3-ol	1,5	2,0	1,25
oct-1-én-3-one	0,7	2,2	1,1
<b>oct-1-én-3-ol</b>	<b>30,1</b>	<b>61,0</b>	<b>25,1</b>
oct-2-énal	1,8	7,5	1,9
oct-2-énol	4,8	17,4	5
octa-1,5-diène-3-one	+	+	0,33
<b>octa-1,5-diène-3-ol</b>	+	+	<b>27,5</b>
<b>octa-2,5-diéno</b>	+	+	<b>17,9</b>

Il est important de souligner que par addition de l'acide linoléique il y a enrichissement simultané de toute la fraction volatile présente.

#### 2.1.6.2. Molécules produites par la culture du mycélium des Macromycètes

Les cultures mycéliennes de champignons supérieurs, notamment des Basidiomycètes, sont des sources potentielles de substances aromatiques. Ces métabolites volatils appartiennent à de nombreuses classes chimiques et résultent de plusieurs voies métaboliques.

Parmi les molécules identifiées, certaines présentent un intérêt alimentaire (Gross et Asther, 1989 ; Krings et al., 1995). Pour déboucher sur une application industrielle, un travail d'amélioration des conditions de production et de récupération des composés aromatisants est indispensable. En effet, les études montrent généralement que les durées de culture s'étendent sur plusieurs dizaines de jours et que, de plus, les concentrations obtenues n'excèdent qu'exceptionnellement 1mg/l (Tableau 2.4.).

#### Molécules à 8 atomes de carbone

Les composés à 8 atomes de carbone sont présents dans différentes cultures mycéliennes, mais apparaissent à des pourcentages très faibles. Cependant, certains auteurs (Belinky et al., 1994 ; Schindler et Seipenbusch, 1990 ; Bensoussan et al., 1995) se sont intéressés spécifiquement à la production de l'oct-1-én-3-ol par les cultures mycéliennes de champignons supérieurs cultivés en milieu liquide, c'est le cas de *Pleurotus pulmonarius* et de différentes espèces de Morilles. Grove (1981) a noté la prévalence des molécules à 8 atomes de carbone dans les cultures mycéliennes d'*Agaricus bisporus*.

Tableau 2.4. Composés chimiques identifiés dans les cultures mycéliennes de différents macromycètes.

Organismes	Composés identifiés	Auteurs
<i>Agaricus bisporus</i>	non-2,4-diéнал, déca-2,4-diéнал, acétate d'éthyle et diverses C8	Grove (1981)
<i>Bjerkandera adusta</i>	alcool 3,4-diméthoxybenzylique, 3,4 diméthoxybenzaldéhyde, 4-méthoxybenzaldéhyde, hexan-5-olide, nombreuses lactones saturées	Berger et al., (1986 b) ; Gross et Asther, (1989)
<i>Gloeophyllum odoratum</i> , syn. <i>Trametes odorata</i> , syn. <i>Osmoporus odoratus</i>	oct-1-én-3-ol, (acide diméthyl-(3,7)-hydroxyl-3 octène-6-oïque méthyl ester) méthyl-phénylacétate, driménol, nérol, citronellol, anisaldéhyde, limonène, géraniol, <i>p</i> -méthoxyphénylacétate, linalol	Hanssen et Abraham, (1987) ; Hanssen et al., (1986) ; Halim et Collins, (1971) ; Sastry et al., (1980)
<i>Ischnoderma benzoïnum</i>	linalol, butan-4-olide, pentan-4-olide, hexan-4-olide, 2-hexen-4-olide, heptan-4-olide, 2-hepten-4-olide octan-4-olide, 2-octén-4-olide, benzaldéhyde, $\alpha$ -muurolène, thiopropanol de méthyle, 3-méthylbutanol, méthyl-2-phénylacétate	Berger et al., (1987 b) ; Krings et al., (1995) Fabre et al., (1996)
<i>Lentinellus cochleatus</i>	<i>trans</i> -néroldiol, fokiéanol, (2,2)-diméthyl-6-formylchromène	Hanssen et Abraham, (1987)
<i>Lentinus edodes</i>	oct-1-én-3-ol, oct-2-én-1-ol, 1,2,4-trithiolane, lenthionine, 1,2,3,5-tetrathiane, 1,2,4-trithiolane méthyl-2-propanol, 2-butoxyéthanol, 2-phényléthanol, 4-méthyl-3-penten-2-one, benzaldéhyde, méthyl-benzoate, méthyl-3,6-dichloro-2-méthylbenzoate, 3,5 diméthoxyphénol, ( <i>E</i> ) et ( <i>Z</i> )-furanoxyde de linalol ( <i>E</i> ) et ( <i>Z</i> )-pyran oxyde de linalol	Abraham et Berger, (1994)
<i>Lentinus lepideus</i>	cinnamate de méthyle, et autres dérivés de l'acide cinnamique, sesquiterpènes, ( $\delta$ , $\tau$ , $\alpha$ )-cadinol, $\tau$ -muurolols, cubénols, farnésol, driménol (105 jours)	Hanssen, (1985) ; Abraham (1988) ; Abraham et al., (1988) ; Birkinshaw et Findlay, (1940)
<i>Lepista irina</i>	lepistirone	Abraham et al., (1991)
<i>Morchella sp.</i>	oct-1-én-3-ol	Schindler et Fritz, (1989) ; Bensoussan et al., (1995)
<i>Mycocacia uda</i>	<i>p</i> -tolualdéhyde, <i>p</i> -acétophène de méthyle	Collins, (1976)
<i>Pleurotus euosmus</i>	linalol, coumarine, <i>cis</i> et <i>trans</i> oxyde de linalol	Drawert et al., (1983)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	oct-1-én-3-ol, octan-3-ol, octanol, octan-3-one, oct-2-éнал, déca-2,4-diéнал, méthylpropanol, 4-diméthoxyphénylpropanol, bisabolol, éthylacétate, $\beta$ -bisabolène	Abraham et Berger, (1994) ; Gallois et al., (1990)
<i>Pleurotus sajor caju</i>	acétoïne	Abraham et Berger, (1994)
<i>Pleurotus sapidus</i>	octan-3-ol, oct-1-én-3-ol, 3-méthylbutanol, oct-1-én-3-one, benzaldéhyde, méthyl-2-méthoxybenzoate, méthyl-4-méthoxybenzoate, butan-4-olide, 2-méthoxyphénol, 4-méthoxyphénol, hexan-4-olide, méthyl-4-méthoxybenzoate, méthyl-4-hydroxybenzoate, acide 3-méthylbutanoïque	Abraham et Berger, (1994)

Tableau 2.4. Composés chimiques identifiés dans les cultures mycéliennes de différents macromycètes (suite).

<i>Pleurotus cornucopiae</i>	2-méthylphénol, méthoxyphénol, furanméthanol, phénylméthanol, phényléthanol, 3-hydroxyphénylméthanol, 4-hydroxyphénylméthanol, 3,4-hydroxyphénylméthanol, benzaldéhyde, 4-méthoxybenzaldéhyde, 2-phénylacétaldéhyde, acétoïne, octan-3-one, plusieurs esters, "concentrations inférieures à 1mg/l"	Krings et al., (1995)
<i>Pleurotus sp.</i>	oct-1-én-3-ol, anisaldéhyde, benzaldéhyde, alcool anisique, alcool benzylique, acide anisique	Gutiérrez et al., (1994)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	oct-1-én-3-ol	Belinky et al., (1994)
<i>Polyporus benzoïnus</i>	anisaldéhyde, 2,4-dinitrophénylhydrazone	Birkinshaw et al., (1952)
<i>Polyporus durus</i>	octan-3-ol, 3-méthylbutanol, hexanol, butan-4-olide, pentan-4-olide, hexan-4-olide, 2-hexen-4-olide, 5-hexen-4-olide, hexan-5-olide, 2-hepten-4-olide, heptan-4-olide, octan-4-olide, oct-2-olide-4, oct-6-én-4-olide, non-2-én-4-olide, dec-2-én-4-olide, 4-décanolide	Berger et al., (1986 a)
<i>Polyporus tuberaster</i>	55 composés retrouvés, benzaldéhyde (60,88%)	Kawabe et Morita, (1993, 1994)
<i>Poria aurea</i>	oct-2-én-4-olide	Berger et al., (1986 b)
<i>Trametes suaveolens</i>	anisate de méthyle, anisaldéhyde	Birkinshaw et al., (1944)
<i>Tyromyces sambuceus</i>	décan-4-olide (475mg/l en présence d'huile de ricin)	Berger et al., (1986 b) ; Kapfer et al., (1989)

### Composés à noyaux benzéniques

Il s'agit essentiellement d'anisaldéhyde, d'alcool benzylique, de benzaldéhyde, de 2-phényléthanol et de 3-phénylpropanol. L'anisaldéhyde a été identifié comme le principal métabolite volatil de mycélium odorant de *Polyporus benzoïnus* (Birkinshaw et al., 1952). Cette molécule est également produite par différentes espèces du genre *Pleurotus* dont *P. pulmonarius* qui produit en plus, de l'alcool anisique, acide anisique et acide benzoïque (Gutiérrez et al., 1994). D'autres espèces produisent de l'anisaldéhyde à des quantités faibles. On peut citer *Pleurotus sapidus*, *Mycena pura* et *Pisolybe cubensis*, *Dichomitus squalens*, *Hirchioporus pergamenus*, et *Armillaria lutea* (Abraham et Berger, 1994 ; Krings et al., 1995 ; Gallois et al., 1990).

Différentes souches d'*Ischnoderma benzoïnum* produisent de grandes quantités d'anisaldéhyde ou de benzaldéhyde en présence respectivement de tyrosine ou de phénylalanine (Berger et al., 1987 a; Fabre et al., 1996). Des concentrations élevées en phényléthanol (365 mg/l) ont été obtenues au cours d'une culture d'*Ischnoderma benzoïnum* (Fabre et al., 1996). *Polyporus tuberaster* produit principalement du benzaldéhyde et de l'alcool benzylique (Kawabe et Morita, 1993, 1994).

### Dérivés coumariniques

La coumarine a été identifiée dans les cultures de *Pleurotus euosmus*. Après 48 jours de culture, elle est présente à une concentration de 2,6 mg/l. *Lentinula edodes* produit la 4-méthoxyacétophénone et 3-méthyl-8-hydroxy-3,4-dihydro (1H) 2-benzopyran-2-one. La 4-hydroxy-3-méthyl-2-phényl-2-cyclopenten-1-one, un dérivé de la coumarine, est produite par *Fomes anosus* (Gallois et al., 1990). La *p*-méthylacétophénone est produite par *Mycocacia uda* (Collins, 1976).

### Dérivés cinnamiques

Plusieurs dérivés de l'acide cinnamique ont pu être identifiés dans des cultures mycéliennes. Le mycélium de *Lentinus lepideus* produit du cinnamate de méthyle et son dérivé méthoxylé (Birkinshaw et Findlay, 1940). Le méthyl-cinnamate est retrouvé dans les cultures de *Lenzite trabea*, d'*Hyrchioporus pergamenus* de *Poria subacida* et de *P. subvermispora*, cette dernière espèce produit également de l'alcool cinnamique (Gallois et al., 1990).

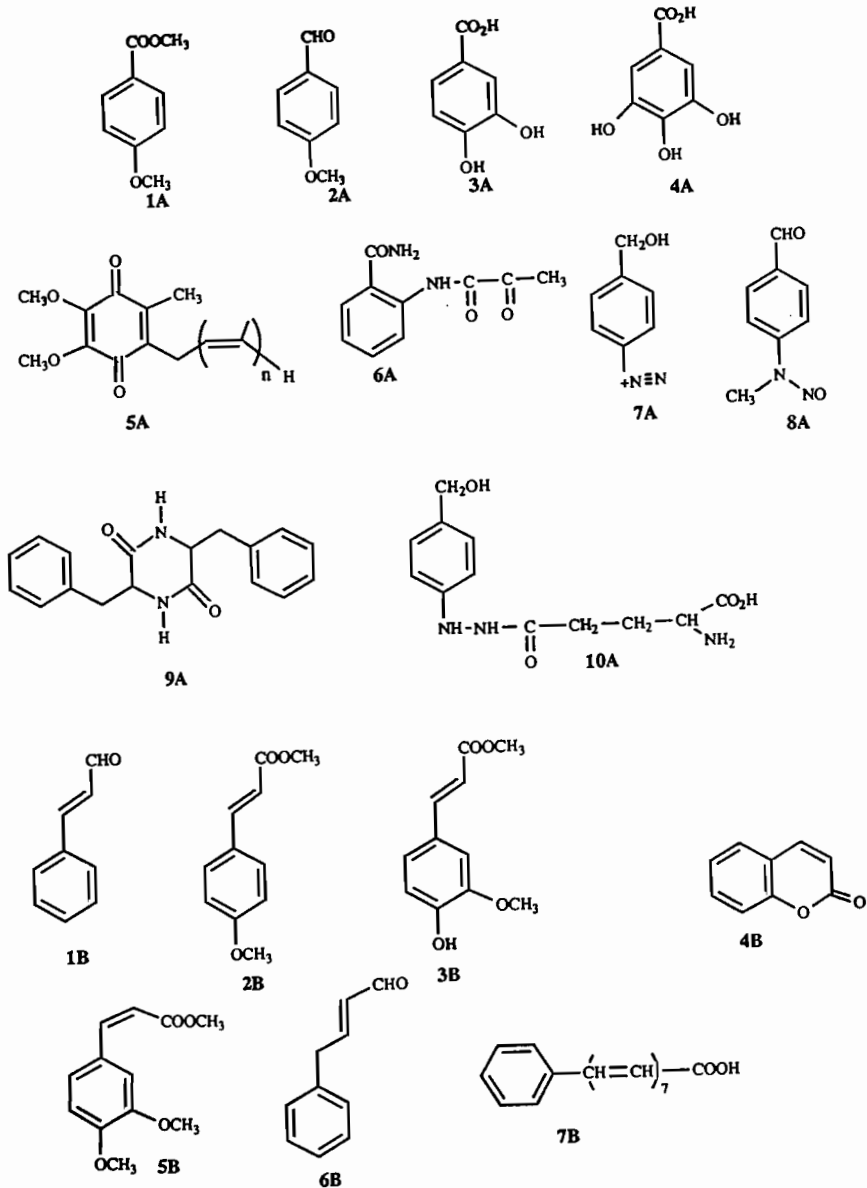


Fig.2.2. A - Métabolites formés à partir de la voie de l'acide shikimique et chorismique. (1A) Méthylanisate, (2A) Anisaldéhyde, (3A) Acide Protocatechuique, (4A) Acide Gallique, (5A) Ubiquinone, (6 A) N-Pyruvyl Anthranilamide, (7A) *p*-Hydroxyméthyl diazonium, (8A) N-Méthyl nitrosoaminobenzaldéhyde, (A9) L-Phénylalanine anhydride, (10A) Agaritine.

B- Dérivés de l'acide cinnamique retrouvés chez les Basidiomycètes. (1B) Cinnamaldehyde, (2B) Acide Méthyl *p*-Méthoxycinnamique, (3B) Acide Férulique, (4B) Coumarine, (5B) Acide Méthyl 3,4-diméthoxy *cis*-cinnamique, (6B) Phénylcrotonaldéhyde, (7B) Cortisalin.

## Esters aromatiques

Le méthyl benzoate est présent dans le mycélium de *Polyporus betulimis*, *Polyporus frondosus*, *Poria submevispora* et *Vararia effuscata* (Gallois et al., 1990). Il apparaît également dans les cultures de *Polyporus sp* et *Sarcodontia setosa* (Abraham et Berger, 1994).

## Autres composés benzéniques

Le phénylacétaldéhyde a été identifié dans une culture de mycélium de *Phallus impudicus* (Sprecher et Hanssen, 1985) et dans le mycélium de *Poria subvermispora* (Gallois et al., 1990). Il est également identifié dans les cultures de *Gloephyllum odoratum*, *Piptoporus betulinus*, *Pleurotus cornucopiae* et *Serpula lacrymans* (Krings et al., 1995). Les cultures de *Mycoacia uda* dégagent une odeur d'amande amère liée essentiellement à la présence de *p*-tolualdéhyde (Collins, 1976).

Ces métabolites benzéniques sont synthétisés selon la voie de l'acide shikimique et chorismique (Towers, 1976) (Fig. 2.2.). On peut distinguer les composés obtenus tôt dans la voie de synthèse et ceux apparaissant plus tardivement, à la suite de la synthèse de certains acides aminés.

Dans la première catégorie, il y a des acides *p*-hydroxybenzoïque, salicylique, anthranilique, *p*-aminobenzoïque et leurs dérivés qui peuvent être issus directement de l'acide chorismique. L'anisate de méthyle et l'ansaldéhyde découlent de l'acide *p*-hydroxybenzoïque.

Dans la seconde catégorie, on trouve les molécules biosynthétisées à partir de la phénylalanine et de la tyrosine. C'est le cas de l'acide cinnamique et de ses dérivés produits par désamination non oxydative de la L-phénylalanine.

Ces métabolites sont liés entre eux par divers systèmes enzymatiques permettant des réductions, des oxydations, des hydroxylations et des méthoxylations des noyaux benzéniques. Comme chez les végétaux supérieurs et chez les animaux, la méthoxylation des composés phénoliques, composés souvent toxiques pour l'organisme, pourrait correspondre à un processus de détoxification du milieu de culture. Effectivement, il a été démontré que de nombreuses molécules sont des antifongiques puissants. De plus, ce métabolisme des composés benzéniques et particulièrement des composés phénoliques, est lié aux propriétés ligninolytiques de la majorité des Basidiomycètes (Gross et Asther, 1989).

## Lactones

Les lactones (esters cycliques) sont souvent responsables des odeurs fruitées de cultures mycéliennes de Basidiomycètes, elles peuvent être cyclisées en position gamma ou delta, saturées ou insaturées. Les gamma-lactones sont préférentiellement synthétisées par rapport aux delta-lactones.

L'insaturation est souvent située en position C2. Différentes lactones ont pu être identifiées. Cependant, la formation des lactones par une réaction de cyclisation pure reste rare car elle nécessite une forte diminution du pH (entre 2 et 3) (Abraham et Berger, 1994).

La biosynthèse de lactones est fortement influencée par l'apport de substrats lipidiques dans le milieu de culture. L'addition de miglyol 810, triglycéride de synthèse d'acides octanoïque et décanoïque dans le milieu de culture de *Polyporus durus* permet de multiplier par 10 la production de  $\gamma$ -décylactone et  $\gamma$ -hexylactone. La présence de miglyol provoque par ailleurs des modifications de structure des protéines qui pourraient entraîner des altérations du métabolisme cellulaire (Chalier, 1991).

*Bjerkandera adusta* produit en 24 heures, sur milieu synthétique de nombreuses lactones saturées : butan-4-olide, hexan-4-olide, heptan-4-olide, octan-4-olide et décan-4-olide (Gross et Asther, 1989). La 2,4-diméthyl-butanolide est également identifiée (Berger et al., 1986 b). Les octan-4-olide et décan-4-olide sont produits à une concentration inférieure à 5 mg/l par *Ischnoderma benzoinum* (Krings et al., 1995).

### Composés terpéniques

Le mycélium des Basidiomycètes synthétise une grande variété de terpénoïdes, notamment des sesquiterpènes. Ces molécules souvent bicycliques sont connues pour leurs propriétés antifongiques et antibactériennes, et leurs propriétés d'allélopathie sur des germinations de semences (Hutchinson, 1971).

*Lentinus lepideus* produit plusieurs sesquiterpènes, notamment  $\alpha$ -copaène,  $\alpha$ -élémane, trans  $\beta$ -farnésène, cadina-1,4-diène,  $\gamma$ -muurolène,  $\delta$ -cadinène et calacorène (Hanssen, 1985; Hanssen et al., 1988; Abraham, 1988, Birkinshaw et Findlay, 1940).

Le driménol, un alcool sesquiterpénique, représente 58% de l'extrait volatil d'une culture de *Gloeophyllum odoratum* (Collins, 1976; Hanssen et Abraham, 1987), l'acide 3-hydroxy-3,7-diméthyl-oct-6-énoate de méthyle en représente 22,5%. *Lentinellus cochleatus* produit, après 85 jours de culture, l' $\alpha$ -copaène, le calacorène, et le trans-nérolol qui représente le composé majeur de l'extrait (41,4%), fokiéniol, cubéniol et épïcubéniol ont été également identifiés (Hanssen et Abraham, 1987).

*Polyporus durus* synthétise différents sesquiterpènes bicycliques et leurs dérivés oxygénés parmi lesquels certains ont pu être identifiés :  $\beta$ -farnésène;  $\beta$ -bisabolène,  $\gamma$ -muurolène,  $\delta$ -cadinène et farnésol (Berger et al., 1986 a).

Différentes souches de *Trametes odorata* synthétisent en culture statique du géraniol, du nérol, du citronellol, du linalol, et de l'oxyde de linalol (Halim et Collins, 1971; Sastry et al., 1980; Hanssen et Abraham, 1987).

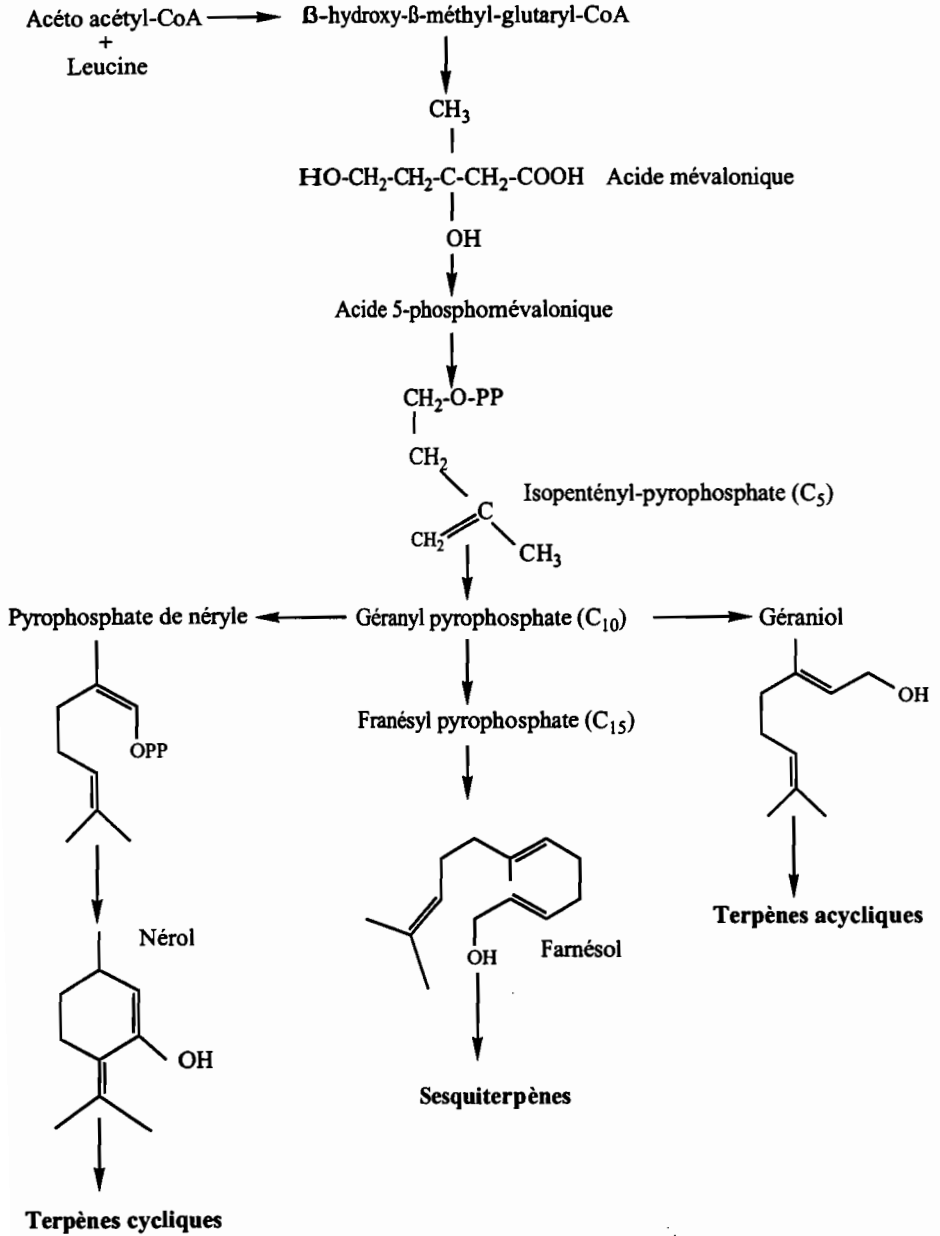


Fig. 2.3. Voie de formation des composés terpéniques et sesquiterpéniques via l'acide mévalonique.

L'étude de l'odeur fleurie de *Pleurotus euosmus* a permis de mettre en évidence la présence de linalol, de l' $\alpha$ -terpinéol, et les oxydes *cis* et *trans* du linalol. En 35 jours de culture, une concentration maximale de linalol est atteinte (900  $\mu\text{g/L}$ ) (Drawert et al., 1983).

Abraham et Berger (1994) ont mis en évidence la présence des oxydes *cis* et *trans* de linalol (*Kuehneromyces mutabilis*), du linalol (*Lentinus edodes*), du néroldiol, du farnésol et du 7- $\beta$ -hydroxydihydrodrimenine (*Polyporus sp.*), de l' $\alpha$ -copaène et du  $\delta$  cadinène (*Pholiota populnea*) et du farnésol (*Nigroporus durus*). L'accumulation de ces terpènes est stimulée en présence de différents acides aminés isoleucine, phénylalanine et méthionine.

La formation des composés terpéniques par les micro-organismes a été étudiée. Ils sont synthétisés selon la voie de l'acide mévalonique à partir d'une chaîne isoprénique produite à partir de l'acétyl coenzyme A. Le géraniol et le nérol formés par la condensation de deux chaînes isopréniques donnent naissance respectivement aux terpènes acycliques et cycliques (Fig. 2.3.).

### Alcools secondaires

La production d'aldéhydes, puis d'alcools à partir d'acides aminés conduit à la formation d'alcools secondaires. Ces molécules sont retrouvées dans les cultures liquides de différents champignons et sont formées par désamination de la leucine, de l'isoleucine et de la valine. Ces alcools sont des molécules ubiquistes (Gallois et al., 1990 ; Abraham et Berger, 1994 ; Krings et al., 1995). Le 3-méthylbutanol représente par exemple 26% de la fraction volatile de *Polyporus tuberaster* (Kawabe et Morita, 1993).

### Effet des additifs sur la production des composés d'arômes

Il existe un certain nombre d'exemples d'orientation des métabolismes grâce à l'apport de molécules intermédiaires de la voie de synthèse considérée. Par exemple des acides aminés à noyau aromatique permettent d'obtenir préférentiellement des composés odorants à noyaux benzéniques (Berger, 1995 ; Hanssen et al., 1986 ; Fabre et al., 1996).

Hanssen et Sprecher (1981) ont étudié l'effet de différents acides aminés, comme seules sources d'azote sur la production de dérivés cinnamiques et des sesquiterpènes odorants, par *Lentinus lepideus*. Sur un milieu standard, ce basidiomycète synthétise des composés cinnamiques (odeur cannelle-anis). En remplaçant l'asparagine par de la phénylalanine, une accumulation de composés cinnamiques et de sesquiterpènes à noyau cadinane qui confèrent au milieu une odeur plutôt fruitée, a été constatée.

L'addition d'huile de ricin aux cultures de *Tyromyces sambuceus*, permet d'augmenter la concentration en décan-4-olide (Kapfer et al., 1989). L'adjonction de miglyol favorise la synthèse de  $\gamma$  et  $\delta$  lactone par *Bjerkandera adusta*, *Ischnoderma benzoinum* et *Polyporus durus* (Berger et al., 1986 a,b, 1987 a,b).

### Facteurs physiques affectant l'accumulation de composés d'arôme

Mis à part l'enrichissement en un composé donné par adjonction de précurseurs appropriés, les caractéristiques physiques du milieu de culture, peuvent influencer l'accumulation des composés constituant l'arôme. La production ou l'excrétion d'arôme peuvent être modifiées par l'activité de l'eau ou la pression osmotique du milieu (Gervais et Battut, 1989 ; Gervais et Sarette, 1990). La production extra-cellulaire de  $\gamma$ -décylactone par *Sporobolomyces odorus* est maximale pour une activité de l'eau de 0,99. Pour des valeurs de 0,99 à 0,97 un phénomène d'accumulation intracellulaire est observé qui pourrait être dû essentiellement à des variations de la perméabilité cellulaire sous l'influence de l'activité de l'eau. Au delà de ces valeurs la diminution de la production pourrait s'expliquer par l'inhibition des enzymes.

L'augmentation de la pression osmotique ou la diminution de l'activité de l'eau du milieu de culture provoquent une sortie passive et très rapide d'eau hors de la cellule. Cette sortie est tout de suite compensée par l'entrée des solutés ou la biosynthèse des métabolites intracellulaires. Les composés synthétisés peuvent interférer avec des systèmes enzymatiques et modifier la perméabilité de la membrane ou agir sur la pression osmotique de la cellule.

Par ailleurs, chez les micro-organismes, il n'existe pas de dispositifs permettant l'accumulation de composés, ceux-ci peuvent avoir un effet inhibiteur sur la croissance et sur la production de métabolites. Il est alors impératif de lever cette inhibition en agissant au niveau du procédé par l'élimination des composés au fur et à mesure de leur formation, tels que l'addition d'adsorbants hydrophobes ou par pervaporation. Berger et al., (1987 a) ont ajouté soit du miglyol, soit un adsorbant de type chromosorb dans une culture de *Poria cocos*. Pour les composés volatils considérés (benzaldéhyde, aldéhyde anthranilique et linalol), le taux de récupération est globalement amélioré. Le chromosorb 102 donne cependant de meilleurs résultats : on multiplie par 17 les quantités de linalol et de benzaldéhyde recueillies et par 150 celle de l'aldéhyde anthranilique. L'utilisation du miglyol est moins efficace, notamment pour le benzaldéhyde.

La récupération des composés aromatiques par la technique de pervaporation a été appliquée dans le cas de *Bjerkandera adusta*, où une bonne sélectivité vis à vis du benzaldéhyde a été atteinte. La concentration du benzaldéhyde dans le pervaporat par rapport au réacteur a été multipliée par un facteur 200 (Souchon et al., 1995).

## 2.2. Les champignons

### 2.2.1. Définition

Les champignons sont définis comme des organismes eucaryotes sporogènes non chlorophylliens, se reproduisant par voie sexuée et ou asexuée. Ils jouent un rôle important dans l'écologie terrestre par leur caractère ubiquiste, participant largement à la biodégradation de matières organiques. Mais ils peuvent aussi présenter un caractère pathogène pour l'homme, les animaux et les plantes. Ils sont à la base de nombreux procédés biotechnologiques, allant de la production d'aliments fermentés tels que les fromages à celle des molécules à haute valeur ajoutée comme les vitamines, les antibiotiques ou les enzymes (Alexopoulos et Nims, 1979 ; Smith et Berry, 1975).

Le développement des champignons se fait par croissance apicale, élongation des filaments à partir de leurs extrémités, dans toutes les directions et de façon identique. Ce mode de croissance se traduit par la mise en place de colonies circulaires caractéristiques des champignons sur milieu gélosé.

Les champignons Macromycètes par opposition aux moisissures présentent la particularité d'avoir un cycle de développement comportant principalement deux phases :

Une phase de **développement haploïde** conduisant à une structure végétative constituée de filaments très fins : les hyphes formant le mycélium destiné à coloniser le substrat environnant. Cette phase de développement présente de grandes similitudes avec la croissance des champignons filamenteux. En effet mis à part la taille, rien ne différencie les hyphes issues des spores de moisissures des hyphes provenant des spores d'un champignon supérieur.

Une **phase dicaryotique** issue de la fructification conduisant à la formation d'un organe sexuel, le carpophore, appelé plus communément champignon. Le passage de l'état végétatif à l'état reproductif sexué ou non, est régulé par un ensemble de stimuli exogènes qui peuvent être aussi bien de nature trophiques que physico-chimiques. La maîtrise complète du cycle de quelques champignons comestibles a permis de montrer que les combinaisons de facteurs qui déclenchent, contrôlent ou inhibent la fructification parfaite des champignons sont complexes et variables en fonction des espèces (Dehorter et Lacoste, 1980). Dans le cas des Macromycètes pour lesquels la fructification parfaite se décompose en plusieurs phases (initiation, maturation, sporulation) chacune dépendante d'une combinaison spécifique de facteurs exogènes, cette complexité est d'autant plus accrue (Manachère, 1974). Dès lors, il est tout à fait concevable que la culture en conditions contrôlées de la plupart des champignons comestibles ne soit pas du tout reproductible (Buscot, 1987).

## 2.2.2. Les Morilles

### 2.2.2.1. Position systématique

Les Morilles sont des Discomycètes operculés de grande taille, facilement reconnaissables à leur hyménium alvéolé. Si le genre est aisé à définir, il n'en est pas de même pour les différentes espèces qui le composent. En effet, au sein des Morchelaceae, la forme des asques des paraphyses est remarquablement homogène. La classification systématique disponible est essentiellement basée sur des critères macromorphologiques et écologiques. Cependant, les progrès récents en biologie moléculaire seraient peut être un outil intéressant pour la discrimination des espèces.

La position systématique des Morilles proposée par Chadeaud (1960) est basée sur les critères suivants :

Spores méiotiques formées dans des asques	Embranchement des Ascomycètes
Surface fertile discoïde à hyménium vrai	Classe des Discomycètes
Asques annelées et operculées	Ordre des Pézizales
Apothécie stitipitées, spores lisses	Groupe des Pézizales
Spores elliptiques à guttules externes	Famille des Morchelaceae

### 2.2.2.2. Importance gastronomique et économique des Morilles

Les Morilles sont parmi les champignons les plus estimés, et leur relative rareté les rend onéreuses. Pour faire face à leur demande intérieure, les pays industrialisés ont recours à des importations en provenance des pays en voie de développement (Turquie, Afghanistan, pays de l'Europe de l'est, etc.). Par ailleurs, des études visant à domestiquer le genre se sont longtemps révélées décevantes. Cet échec a incité les pays d'Amérique du nord à entreprendre la production industrielle du mycélium, celui-ci possédant des qualités organoleptiques proches de celles du carpophore. A ce sujet 3 brevets Américains ont été déposés (Szuets, 1956, 1958 ; Schindler et Fritz, 1989).

Par ailleurs, un brevet a été déposé concernant la production de carpophores de Morilles (Ower et al., 1986). L'étape clé étant la production de sclérotés et l'utilisation d'un choc hydrique pour induire la fructification.

### 2.2.2.3. Ecologie des Morilles

En dépit de l'intérêt fondamental et appliqué que présentent les espèces de Morilles seul un nombre restreint de travaux leur a été consacré. Les connaissances sur l'écologie des Morilles sont de ce fait fragmentaires et générales (Buscot, 1987).

Les Morilles ne sont pas des champignons exclusivement forestiers à l'image d'autres Macromycètes. Des fructifications épisodiques mais massives ont lieu dans des milieux insolites (éruption volcanique, incendie, apport massif d'herbicides). La comparaison de sols typiquement favorables aux Morilles et de ceux qui le deviennent suite à des incendies a permis de souligner l'importance du pH (les Morilles ne s'accroissent que des pH alcalins) et des taux élevés de calcium.

#### 2.2.2.4. Biologie des Morilles

A l'issue de la méiose, les cellules associées comportent quatre noyaux haploïdes qui se divisent encore chacun une fois avant l'individualisation des parois sporales. Dans la nature, la sporulation a lieu pendant plusieurs jours. A l'issue de la dernière sporulation, les ascocarpes subissent une autolyse rapide et deviennent impropres à toute utilisation (Buscot, 1987).

La germination des spores a lieu selon toute vraisemblance dès la première pluie qui suit la sporulation (Buscot, 1987). Le mycélium issu de cette germination est d'abord blanchâtre, mais il se colore rapidement et suivant le contexte écologique, il devient beige ou brun (Molliard, 1905).

La taille remarquable atteinte par les fructifications de Morilles et leur relative complexité morphologique résultent d'élongations et d'épaississements du primordium. Chez les Morilles, il n'existe ni spermatie ni ascogone, ce sont les hyphes banales de l'hypothécium qui donnent directement les cellules ascogènes (Chadefaud, 1960). La sexualité se produit en fin d'élongation du stipe, certaines espèces de Morille comme *M. conica* connaissent encore une somatogamie, alors que chez d'autres espèces comme *M. elata*, la fécondation se produit par simple autogamie (Greis, 1940, (Référence reprise de Buscot, 1987).

De par leur morphologie et leur ascocarpe et la dégradation de leur sexualité, les Morilles témoignent d'un haut degré d'évolution au sein des Discomycètes.

#### 2.2.2.5. Mycélium des Morilles

Les spores ellipsoïdales de couleur ochracée, assez régulières quant à leur taille, possèdent des parois lisses sur lesquelles adhèrent des plaques de mucilage. La germination s'effectue par un ou deux pores. Les hyphes formés qualifiés de primaires se développent rapidement, ils sont cloisonnés en cellules à nombreux noyaux avec des membranes transversales munies de nombreuses ponctuations, ils se ramifient et s'anastomosent abondamment. Les hyphes secondaires beaucoup plus épais, sont formés par l'accolement de filaments primaires. Ces hyphes secondaires ont une croissance rapide et lorsqu'ils ont atteint une certaine longueur, ils se ramifient fortement en hyphes fins et tortueux : les hyphes tertiaires. En vieillissant, les hyphes secondaires brunissent fortement et diffusent dans le milieu un pigment brun. Les hyphes tertiaires recouvrent les hyphes secondaires d'un fin duvet incolore.

Les hyphes des Morilles, cloisonnés et ramifiés ont une section variable comprise entre 5 et 25  $\mu\text{m}$ . La croissance du mycélium représente la phase végétative du cycle de développement (Willam et al., 1956).

Parvenu à un stade de développement convenable et dans des conditions de milieu appropriées, le champignon entre dans sa phase de reproduction sexuelle, qui voit le développement des carpophores.

#### **2.2.2.6. Eléments requis pour la croissance du mycélium de Morilles**

Les travaux concernant la croissance du mycélium de Morilles en culture liquide se sont essentiellement focalisés sur la production de biomasse, ceci a d'ailleurs abouti à la mise en place de procédés industriels.

**Nutrition carbonée** : Fron (1905) et Brock (1951) ont montré que le mycélium de Morille est capable d'utiliser une large panoplie de sources carbonées, cependant les oses sont mieux assimilés que leurs correspondants méthylés ou hydroxylés, les hexoses que les pentoses, les isomères naturels que les isomères artificiels, les liaisons  $\alpha$  1,4 que les liaisons  $\beta$  1,4.

**Nutrition azotée** : Deux auteurs Brock (1951) et Kaul (1977) ont testé selon des conditions comparables l'effet d'une trentaine de source d'azote sur la production de biomasse de cultures de mycélium de Morille. Les résultats de ces travaux permettent de classer les sources d'azote en trois catégories :

Celles qui conviennent à toutes les espèces (asparagine, urée, peptone, acide glutamique, sels d'ammonium, nitrites et nitrates)

Celles qui ne conviennent à aucune des espèces (hydroxylamines, HCl- et 2 HCl -hydrazines)

Celles qui conviennent à certaines espèces seulement (valine, phénylalanine, leucine, isoleucine et cystéine).

**Rapport C/N** : Selon Litchfield et al., (1963), un rapport C/N de 10 permet une bonne croissance du mycélium de Morille. D'autre part les travaux d'Allian et El Wakail (1982) sur une souche *M. deliciosa* indiquent une croissance optimale pour un rapport C/N de 6 et pour une concentration initiale en glucose de 7%. Par ailleurs, les Morilles s'accoutument dans la nature d'un rapport C/N relativement élevé de l'ordre de 13 (Delmas, 1974).

**Les macroéléments** : Fron (1905) a montré que le développement du mycélium de Morille ne nécessite qu'un faible apport en sels de potassium et de fer. Ce résultat est confirmé par Brock en 1951.

**Les microéléments** : L'apport des microéléments a parfois été jugé comme non indispensable aux cultures pures de mycélium de Morilles (Brock, 1951). Cette constatation néglige l'apport des microéléments sous forme d'impuretés. Un apport supplémentaire de microéléments est globalement positif, par ailleurs, aux doses respectives de 0,04 et 0,2 millimoles par litre de milieu, le manganèse et le calcium exercent une action synergique pour pallier à des pH de l'ordre de 2.

**Les vitamines** : Plusieurs études ont montré que le mycélium de Morille est autotrophe vis à vis de la vitamine B6, de l'acide pantothénique et de la biotine (Willam et al., 1956). Le cas de la thiamine est plus complexe. En effet *M. conica* est autotrophe pour cette vitamine alors que *M. esculenta* ne l'est pas (Impens, 1972).

**Le pH** : Dans la nature, les Morilles sont inféodées à des pH neutres ou alcalins (Delmas et Bunel, 1975). Selon Litchfield (1967), le pH optimal des Morilles se situe entre 5,5 et 6,5. Pour Brock (1951), la courbe d'augmentation de biomasse est bimodale, les deux maxima étant situés à 6,7 et 8,3.

**La température** : La température optimale de croissance est de 25°C. Une dépression de la croissance est notée pour des températures supérieures à 30°C. Cependant le mycélium de Morille peut se développer à des températures très faibles même de l'ordre de 4°C. Selon Litchfield, (1967), cette aptitude peut constituer un avantage pour parer à des contaminations.

**Aération du milieu** : Dans la nature, la présence des Morilles est inféodée à des substrats aérés et de ce fait, en culture *in vitro*, les meilleurs rendements sont obtenus avec des milieux liquides aérés. Pour les milieux liquides agités par bullage, les meilleurs rendements sont obtenus pour une aération de 0,08 à 0,15 mM O<sub>2</sub>/l/min (Litchfield, 1967).

#### **2.2.2.7. Facteurs affectant l'arôme du mycélium de Morille en milieu liquide**

La production d'un arôme Morille par la culture du mycélium a fait l'objet de nombreuses études qui par ailleurs ont abouti à la mise en place de procédés industriels. De ces différentes études, on peut retenir un certain nombre de points qui semblent influencer la production d'arôme par les cultures du mycélium :

non seulement le génome de l'espèce mais également la souche de champignon sélectionnée pour la propagation.

le maintien des cultures de manière adéquate est important pour préserver les lignées ayant de bons arômes sur une longue période.

le milieu de culture doit comporter une source complexe d'azote. Les cultures réalisées sur milieu synthétique tendraient à restreindre la production d'arôme caractéristique.

une quantité suffisante doit être transférée pour minimiser la sélection de variants, en outre l'inoculum pour culture liquide doit être développée sur agar.

l'intensité de la croissance mycélienne peut être modifiée par un changement de milieu. Mais la saveur semble être contrôlée génétiquement chez le genre *Morchella*.

L'objectif de l'étude de Gilbert (1960) était la production de mycélium de Morille en tant qu'aliment. Il a soumis à un jury de dégustation des carpophores et du mycélium frits dans du beurre. Le jury n'a pas préféré le carpophore au mycélium. Le mycélium réduit en poudre a été conservé pendant plus de deux ans sans perte de saveur. Ce produit a été approuvé par la Pure Food and Drug Administration.

Le mycélium de Morille peut être utilisé frais ou congelé, desséché ou en poudre et peut servir à préparer des concentrés d'arôme. En 1956, Szuets a déposé un brevet concernant ce type de poudre alimentaire à incorporer dans les soupes par exemple.

### **2.2.3. Les Pleurotes**

#### **2.2.3.1. Position systématique**

Les Pleurotes sont des Basidiomycètes, famille des Agaricacées, genre <i>Pleurotus</i> .	
Spores méiotiques formées dans des basides	Embranchement des Basidiomycètes
Basides unicellulaires non cloisonnées et entières	S. Classe des HomoBasidiomycètes
Basidiomycètes macroscopiques à chapeaux	Ordre des Hyménomycétales
Champignons lignicoles à chair non ferme subéreuse	Famille des Polyporeaceae

#### **Genre *Pleurotus***

Quatre espèces ont fait l'objet d'études approfondies : *P. ostreatus*, *P. florida*, *P. eryngii*, et *P. cornucopiae*.

#### **2.2.3.2. Intérêt économique des Pleurotes**

Le Pleurote est un champignon saprophyte comestible très apprécié par le consommateur, dont la culture date d'une vingtaine d'années. Ce champignon occupe la seconde place en Europe et la quatrième dans le monde. Les recherches menées sur ce champignon ont permis de mieux connaître ses exigences nutritionnelles, l'influence des paramètres de l'environnement et des traitements phytosanitaires.

La culture des Pleurotes peut être réalisée selon deux cycles; un cycle long et un cycle court, le rendement obtenu est compris entre 10 à 18 %. Des progrès décisifs sont réalisés avec le concours de généticiens qui fabriquent des hybrides plus performants que les souches sauvages (Olivier et *al.*, 1991).

### 2.2.3.3. Etude morphologique du mycélium

Le chapeau porte des basides à 4 spores. Le Pleurote est tétraspore. Les spores sont blanches ou gris lilas. Elles sont émises lorsque le chapeau est mûr, les spores germent et donnent un mycélium blanc et lisse.

### 2.2.3.4. Eléments requis pour la croissance des Pleurotes

Les travaux ayant trait aux Pleurotes portent aussi bien sur la production de carpophores ou culture des Pleurotes que sur celle du mycélium, que cela soit en milieu liquide ou en milieu solide.

**Substrats lignocellulosiques :** L'utilisation de divers substrats lignocellulosiques pour la culture de Pleurotes en conditions contrôlées a fait l'objet de nombreuses études : Zadrazil et Brunnert, 1980 ; Zadrazil, 1980 ; Chang *et al.*, 1981 ; Martinez-Carrera *et al.*, 1986 ; Martinez *et al.*, 1985 ; Nicolini *et al.*, 1987 ; Rolz *et al.*, 1987 ; Calzada et Rolz, 1990 ; Galli *et al.*, 1991. Différents substrats ont ainsi été utilisés : bagasse de canne à sucre, résidus de l'industrie des agrumes, pulpe de café, son et paille de blé, résidus de coton, paille de maïs, marc de raisin et taille de platane.

**Nutrition carbonée :** Dans le cas du mycélium de 4 espèces du genre *Pleurotus* (*P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. sapidus*, *P. ostreatus*) Khanna et Garcha (1985 a) ont montré que la source de carbone influait sur le développement mycélien et sur la quantité de protéines. Il est apparu que les monosaccharides sont plus efficaces que les disaccharides et que les alcools.

**Nutrition azotée :** Khanna et Garcha (1985 b) ont aussi étudié selon les mêmes critères, l'effet de 14 différentes sources azotées sur les mêmes espèces. Ils ont montré que les nitrates et l'asparagine conviennent le mieux aux 4 espèces, alors que le phosphate d'ammonium, le tartrate d'ammonium et l'acide glutamique ne conviennent à aucune des espèces étudiées.

**Effet de la température :** Laborde et Delmas (1974) ont évoqué que différentes espèces de Pleurotes n'ont pas la même sensibilité vis à vis de la température. D'une manière générale la croissance mycélienne est très rapide à 25°C, nulle à 35°C et encore assez rapide à 20°C. D'un autre côté, les Pleurotes ont la facilité à se développer sur une gamme de température qui varie entre 20°C et 35°C.

**Effet de la lumière :** La lumière n'est pas nécessaire à la croissance du mycélium ou à la germination des spores, par contre, elle est indispensable à l'initiation fructifère (Olivier *et al.*, 1991).

**Effet de l'humidité et de l'environnement gazeux :** Le mycélium a besoin d'un taux d'humidité élevé. D'autre part, une teneur élevée en CO<sub>2</sub> représente un effet positif sur la croissance du mycélium de différentes espèces avec un optimum situé entre 16 et 22%. A 36%, un effet inhibiteur est constaté (Zadrazil, 1975).

### **2.3. Fermentation en milieu solide**

#### **2.3.1. Définition**

La fermentation en milieu solide (FMS), traduction de l'anglais "Solid State Cultivation", "Solid Substrate Fermentation" ou "Solid State Fermentation" est désignée par Hesseltine comme "une fermentation dans laquelle le substrat n'est pas liquide". Par la suite, différents auteurs la décrivent comme étant la croissance et le métabolisme des organismes sur des matériaux solides avec une structure organisée en l'absence de tout liquide sous forme libre (Raimbault, 1980 ; Moo-Young et *al.*, 1983). Pour Aidoo et *al.*, (1982), la fermentation en milieu solide englobe toute fermentation qui a lieu sur un substrat solide ou sur un support nutritionnellement inerte.

Selon certains auteurs (Lonsane et *al.*, 1985 ; Oriol 1987 ; Saucedo-Castañeda 1991 et Trejo-Hernandez, 1992), la FMS est une culture microbienne qui se développe en surface et à l'intérieur d'une matrice et en absence de tout écoulement liquide. La matrice poreuse peut être constituée d'un substrat humide ou d'un support inerte capable d'absorber les nutriments qui se trouvent à l'état dissous dans une solution.

En fonction de la nature du support, on peut distinguer deux types de fermentations en milieu solide (Saucedo-Castañeda, 1991):

1- Culture solide sur une phase substrat-support, la phase solide est constituée à partir d'un matériel assurant à la fois la fonction de support et de source de nutriments.

2- Culture solide avec une phase support imprégné d'un milieu liquide. Dans ce type de fermentation, la phase solide est considérée comme un support inerte, qui ne constitue pas une source de nutriments pour les micro-organismes, mais sert de réservoir d'une solution nutritive, celle-ci étant absorbée sur la matrice solide. Dans la FMS, la capacité d'absorption est un facteur important à contrôler. Les matériaux utilisés sont divers, et la plupart ont une forte capacité de rétention d'eau (exemples : bagasse de canne à sucre, écorce de bois, éponge, polyuréthane, vermiculite ...).

#### **2.3.2. Utilisations**

Les fermentations solides ont été pratiquées depuis très longtemps de façon artisanale en alimentation humaine traditionnelle, et concernent essentiellement les transformations de produits

agricoles par les champignons inférieurs. En occident, elles sont utilisées pour la fabrication d'aliments fermentés tel que le fromage à partir des protéines animales du lait, et constituent alors une technique de conservation de ces protéines. Dans les pays asiatiques par contre, ces fermentations concernent essentiellement des produits à base de protéines végétales comme le soja. Le but de ces fermentations est de remanier ces protéines végétales peu digestes, en protéines fongiques ou de les hydrolyser en peptides ou acides aminés mieux assimilés par l'homme (Raimbault, 1978).

Il existe aussi un grand nombre de procédés traditionnels qui ont été largement étudiés et répertoriés par Hesseltine. Le principe de base de ces différentes techniques consiste à cuire les graines de céréales comme le soja ou le riz, et à les inoculer avec une ou plusieurs moisissures du genre *Rhizopus*, à laisser reposer le produit quelques jours pour permettre au champignon de se développer et d'agir, puis à cuire le produit avant de le consommer.

Au Japon quelques procédés, dérivés de ces fermentations traditionnelles, ont été adaptés pour la fabrication industrielle de produits alimentaires (miso) ou d'enzymes telle que l'amylase par le procédé Koji. Par ailleurs, Raimbault, (1980) et Roussos, (1985), ont mis au point un procédé de FMS permettant un enrichissement direct de produits amylacés en protéines en vue de leur utilisation en alimentation animale. Par la suite d'autres applications ont pu être envisagées telle que la production d'alcool par des cultures de levure (Saucedo Castañeda, 1990) production de pénicilline (Barrios-Gonzalez et al., 1988), production d'acide giberillique (Kumar et Lonsane, 1987), production d'acide citrique par des cultures d'*Aspergillus niger* (Cordova, 1994); production d'alcaloïdes par les cultures de *Claviceps* (Trejo-Hernandez, 1992) ou la détoxification de la pulpe de café (Perraud-Gaime, 1995), production d'arômes (Christen et al., 1994 ; Feron et al., 1996 ; Sarhy-Bagnon et al., 1997 ; Kabbaj et al., 1997).

### **2.3.3. Avantages et inconvénients de FMS**

La comparaison de la FMS et des fermentations submergées (Fsm) a été souvent évoquée (Mudgett, 1986 ; Hesseltine, 1987 ; Lonsane et al., 1985).

#### **Avantages de la FMS**

Simplicité des milieux de culture

Diminution des effluents liquides à traiter

Diminution des contaminations résultant de la faible humidité du support

Difficultés minimales pour une conduite des procédés en continu ou en semi continu

Conditions de culture proches de celles des milieux naturels

Pour les fermentations traditionnelles, la microflore du support sert d'inoculum

Aération facile due à la porosité du matériel

Utilisation directe des solides fermentés

Volume du fermenteur plus petit que dans la culture liquide, à quantité égale de substrat.

### **Inconvénients de la FMS**

Risque d'une élévation excessive de la température

Régulation difficile des paramètres de culture

Pré-traitements des supports (humidification, homogénéisation, dispersion, traitement thermique, attaque enzymatique,....)

Problèmes de perte d'humidité pour les fermentations de longue durée

Inoculation très importante lorsqu'on n'utilise pas de microflore naturelle

Estimation précise de la biomasse fongique

### **2.3.4. Les micro-organismes**

Les champignons filamenteux, contrairement aux organismes unicellulaires, sont les mieux adaptés à la FMS en raison de leur capacité à coloniser les substrats solides, la colonisation s'opère par allongement apical et ramification permettant une exploration rapide de leur environnement. A l'inverse, les levures et les bactéries ne peuvent se développer qu'à la surface et à l'intérieur des cavités de la matrice (Raimbault, 1980 ; Saucedo-Castañeda, 1991).

### **2.3.5. Les substrats et les supports**

Dans la nature, les champignons se développent sur des matériaux solides. Ils sont capables d'envahir la surface et de pénétrer dans les espaces intercellulaires et intracellulaires pour se procurer les nutriments nécessaires à leur développement. En FMS, les substrats utilisés peuvent être de type amylicé ou lignocellulosique. Dans le premier cas il peut s'agir de graines de céréales, sources de sucres directement accessibles et facilement dégradables par les micro-organismes. Dans le cas des matériaux lignocellulosiques, les substrats sont plus complexes et plus difficiles à dégrader. Ils sont composés de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. La présence de la lignine limite l'action des enzymes microbiennes. Cependant, la cellulose et l'hémicellulose peuvent être dégradées par les micro-organismes lorsque la lignine est dépolymérisée, solubilisée ou éliminée par des traitements chimiques ou biologiques.

### **2.3.6. Activité de l'eau et humidité**

En FMS, la quantité de l'eau présente dans le milieu est fonction de la capacité de rétention de la phase solide. Toutefois cette quantité de liquide doit être nécessaire à la croissance des micro-organismes sans détruire la structure solide ou réduire la porosité du substrat ou du support (Oriol, 1987).

De plus, la faculté de développement des champignons sur des matériaux solides dépend de l'activité de l'eau. L'activité de l'eau est définie comme l'humidité relative de la phase gazeuse en équilibre avec le substrat et traduit la quantité d'eau disponible pour le développement des organismes.

Ceci est généralement représenté par des courbes de sorption qui établissent une relation entre le pourcentage d'eau ou humidité et l'activité de l'eau. Ces courbes présentent une forme sigmoïdale où trois zones distinctes sont définies : a) une zone où la disponibilité en eau est quasi nulle  $0,0 \leq Aw \leq 0,2$ , b) une zone intermédiaire  $0,2 \leq Aw \leq 0,6$ , c) une zone où la proportion d'eau libre est importante  $0,6 \leq Aw \leq 0,9$ .

Généralement, les bactéries se développent à des activités de l'eau élevées ( $0,85 \leq Aw \leq 0,99$ ). Par contre, pour les levures, l'activité optimale se situe entre 0,75 et 0,9, et pour les champignons entre 0,6 et 0,9.

L'eau en FMS a différents rôles : elle intervient dans la constitution des micro-organismes, et sert à véhiculer enzymes, nutriments et métabolites. Elle intervient dans la solubilisation de l'O<sub>2</sub> gazeux (Oriol, 1987). Cependant, une humidité élevée dans le substrat entraîne une diminution de la porosité de la matrice solide, une faible diffusion de l'O<sub>2</sub>, une réduction du volume des échanges gazeux, ainsi que des risques de contaminations bactériennes. Par contre, une faible humidité aboutit à une croissance limitée et diminue l'accessibilité du substrat (Misra, 1991). Par ailleurs, des changements s'opèrent au cours de la fermentation et sont dus à l'évaporation et à la libération d'eau issue du métabolisme des micro-organismes (Lonsane et al., 1985).

De nombreux auteurs ont mis en évidence l'importance de l'eau sur le métabolisme des micro-organismes (Raimbault, 1980, Gervais et al., 1988, Oriol et al., 1988). Dans la plupart des cas, l'augmentation de l'humidité du substrat provoque une augmentation du taux spécifique de croissance, de la biomasse et de la synthèse d'enzymes (Nishio et al., 1979; Narahara et al., 1982; Sato et al., 1983). Par ailleurs, Gervais et al., (1988) ont étudié l'influence de l'activité de l'eau sur la production de l'heptanone par *Penicillium roqueforti*, ils ont observé que la meilleure production était obtenue pour  $Aw = 0,98$ .

### 2.3.7. Aération et échanges gazeux

En FMS, l'aération est généralement forcée, son débit est fonction de la nature du micro-organisme étudié, de la quantité d'O<sub>2</sub> ou de CO<sub>2</sub> nécessaire au procédé, de la quantité de chaleur métabolique, et de métabolites qui doivent être dissipés (Lonsane et al., 1985).

En FMS, le contrôle de l'environnement gazeux est un facteur important pour le développement des micro-organismes. En effet, l'O<sub>2</sub> doit être suffisant pour ne pas limiter la croissance. Celle ci

dépend de la vitesse du flux gazeux dans la masse du produit, de la vitesse de transport de l'O<sub>2</sub> dans le milieu et de la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> par les micro-organismes (Raimbault, 1980).

Pour Moo-Young et al., (1983), les transferts de gaz peuvent être effectués par différents mécanismes :

Le transfert interparticules qui concerne les échanges de masse par convection entre la phase gazeuse et l'interphase gaz-solide. La porosité interparticulaire est définie comme l'espace vide occupé par l'air au sein de la matrice solide. Cette porosité, est fonction aussi bien de la nature du matériel utilisé que de la quantité d'humidité présente et du débit d'air dans le fermenteur.

Le transfert intraparticulaire qui concerne la diffusion d'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> entre interphase solide-gaz et l'intérieur de la matrice solide.

En FMS, l'aération est un facteur très important qui assure différentes fonctions :

- a- l'approvisionnement en O<sub>2</sub> pour la croissance aérobie et le métabolisme
- b- la régulation de la température
- c- l'élimination de la vapeur d'eau, du CO<sub>2</sub> et de certains métabolites volatils.

Dans le cas des matériaux fibreux, il existe des espaces disponibles favorisant la diffusion de l'O<sub>2</sub>. Par contre, dans le cas des substrats amylacés, les espaces sont réduits, la diffusion de l'air est plus difficile et limite la croissance. Afin d'éviter ce type de problème, il est indispensable de réaliser des prétraitements qui permettent l'obtention de substrats ayant une granulométrie homogène.

De nombreux auteurs ont mis en évidence l'effet de la composition en CO<sub>2</sub> et en O<sub>2</sub> sur le métabolisme des micro-organismes cultivés en FMS. Ainsi, lors de la production d'enzymes par *Aspergillus oryzae*, sur riz, des effets positifs de la pression partielle de l'O<sub>2</sub> ont été observés sur le rendement en amylases (Bajracharya et Mudgett, 1980). De même Narahara et al., 1982 ont obtenu des rendements supérieurs en amylases et en protéases, quand la pression partielle en CO<sub>2</sub> est comprise entre 2 et 5% au cours de la phase exponentielle de croissance et en protéases pour une pression partielle de 5% durant la phase stationnaire.

Ainsi, il apparaît que le contrôle de l'environnement gazeux est nécessaire afin de contrôler le métabolisme des micro-organismes. En raison de l'importance du contrôle de l'environnement gazeux et de son effet sur le métabolisme, un système d'analyse automatique des gaz a été mis au point afin d'étudier leurs effets sur le déroulement de la FMS. Il permet de suivre en temps réel l'évolution des activités respiratoires au cours d'une fermentation (Saucedo-Castañeda et al., 1993).

### 2.3.8. Contrôle de la température

En FMS, le dégagement de la chaleur produite au cours des activités métaboliques des micro-organismes, provoque une élévation de la température au sein du fermenteur, ce qui pose un réel problème (Hesseltine, 1987). D'une part, l'hétérogénéité du matériel solide entraîne la formation de gradients de température dus à la forte activité microbienne. D'autre part la faible activité de l'eau, l'absence d'agitation lors de l'utilisation de fermenteurs statiques, la faible conductivité thermique des matériaux biologiques nuisent au développement des micro-organismes (Moo-Yong et al., 1983 ; Barstow et al., 1988 ; Grajek, 1988 ; Gonzales -Blanco et al., 1990 ; Saucedo-Castañeda et al., 1990).

L'influence de la température sur le métabolisme des micro-organismes a été le sujet de nombreuses recherches (Raimbault, 1980 ; Rathbun et Shuler, 1983 ; Huerta-Ochoa, 1984 ; Lonsane et al., 1985 ; Gonzales -Blanco et al., 1990 ; Saucedo-Castañeda et al., 1990).

### 2.3.9. Contrôle du pH

Le pH initial d'une culture est ajusté à l'optimum par la solution nutritive qui imprègne le support. Le maintien du pH en cours de fermentation est très délicat (Durand et Chereau, 1988).

Afin d'éviter de fortes variations de pH, Raimbault, (1980) a préconisé l'utilisation de sels minéraux qui confèrent au milieu de culture un pouvoir tampon. Ainsi, un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée en proportions adéquates a permis de maintenir le pH à des valeurs favorables à la croissance d'*Aspergillus niger*. Cette technique a été empruntée par la suite par différents auteurs (Huerta-Ochoa, 1984 ; Roussos, 1985 ; Oriol, 1987 ; Dufour, 1990 ; Saucedo-Castañeda, 1991 ; Trejo-Hernandez, 1992 ; Perraud-Gaime, 1995).

### 2.3.10. Dispositifs utilisés pour la mise en œuvre des fermentations en milieu solide

#### 2.3.10.1. Au laboratoire

Dispositifs statiques : La majorité des auteurs ont étudié les fermentations en milieu solide grâce à un dispositif statique (Erlenmeyers ou fioles de Roux) sans agitation. La méthode la plus simple, consiste à introduire le substrat brut ou additionné de nutriments, dans des flacons, et d'inoculer ceux ci après autoclavage. C'est la méthode la plus rudimentaire, mais elle est préliminaire à toute étude de fermentation en milieu solide (Dufour, 1990).

D'autres auteurs (Raimbault, 1980 ; Saucedo-Castañeda, 1991 ; Trejo-Hernandez, 1992) utilisent des colonnes de verre immergées dans un bain marie thermostaté. Le milieu est parcouru par un courant d'air humidifié limitant la déshydratation et favorisant l'élimination des calories et du dioxyde de carbone produit par la fermentation. Cette aération permet un apport en continu d'oxygène nécessaire à la croissance des micro-organismes.

Durand *et al.*, (1988) utilisent un dispositif identique mais pouvant contenir 2 Kg de matière sèche.

**Dispositifs dynamiques :** Des chercheurs ont travaillé sur des fermenteurs agités pour l'étude de l'effet de l'agitation en continu ou en discontinu sur la croissance et sur la production de métabolites (Nishio *et al.*, 1979 ; Silman, 1980).

### **2.3.10.2. Niveau Pilote ou Usine**

**Procédés statiques :** Le procédé Koji est le plus important en terme de production annuelle d'aliments fermentés. Traditionnellement, le substrat inoculé est disposé dans des paniers de bambou tressés disposés sur plusieurs étages espacés de 10 cm pour permettre l'aération.

Dans le domaine industriel, différents dispositifs ont été mis au point. Le substrat est disposé dans des plateaux perforés dans des chambres à humidité contrôlée sous aération constante. Dans le cas du système à plateaux rotatifs, l'appareil est constitué de deux chambres de stockage. Chaque chambre contient un grand plateau tournant dans lequel est ajouté le son de blé inoculé. Lorsque les champignons se sont bien développés, le contenu du premier plateau est déversé dans le second plateau (Dufour, 1990).

**Procédés dynamiques :** Certains industriels ont développé des systèmes où l'agitation est discontinue. Les premiers dispositifs sont des tours de fermentation à plateaux. Le milieu est acheminé à travers la tour avec un temps de résidence égal au temps de fermentation désiré.

L'homogénéisation est effectuée grâce au transfert du milieu d'un plateau à l'autre (Matteau et Bone, 1984).

Pour les micro-organismes les plus demandeurs en O<sub>2</sub>, de l'air humidifié est insufflé à la base des tours.

L'ORSTOM en coopération avec l'IRCHA a mis au point un fermenteur de type pétrin de capacité 200 Kg de matière sèche. L'homogénéisation est assurée par le système d'agitation : la cuve tourne dans le sens horizontal, le bras du pétrin est fixe et tourne sur lui même. Un système de capteurs permet de réguler l'agitation, le pH et l'aspersion du milieu en fonction des caractéristiques physico-chimiques du milieu de culture (Raimbault, 1980).

Un dispositif du même type, mais utilisant une agitation par vis sans fin au moyen d'un chariot se déplaçant latéralement a été développé à l'INRA-Dijon (Durand *et al.*, 1988).

### 2.3.11. Intérêt des FMS pour la production d'arôme

Le rôle que peuvent jouer les fermentations en milieu solide pour la production d'arôme reste à établir. Toutefois, la grande majorité des références ayant trait à la production d'arôme impliquent des champignons filamenteux qui se prêteraient bien aux cultures sur support solide.

Selon Feron et *al.*, (1996) l'utilisation des fermentations en milieu solide pour la production d'arôme peut représenter un intérêt certain pour les raisons suivantes :

- dans certains cas, les supports solides peuvent être utilisés directement sans prétraitement
- les conditions de fermentation sont bien adaptées pour les cultures de champignon. En effet les problèmes de formation de pelotes et par là même, les problèmes liés au transfert de matière et d'O<sub>2</sub> n'ont pas lieu en cours de culture
- les phénomènes d'inhibition observés en culture liquide peuvent être levés à l'instar de ce qui a été observé dans le cas d'autres métabolites. Cette remarque a été vérifiée particulièrement pour la production de la 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone sur support solide par les cultures de *Trichoderma harzianum* (Sarhy Bagnon et *al.*, 1997).
- les produits obtenus sont plus concentrés, ce qui constitue un avantage certain pour leur récupération.

### 2.3.12. Respiration et respirométrie

L'évolution du CO<sub>2</sub> libéré et de l'O<sub>2</sub> consommé retrace la dégradation oxydative des substrats dans les cellules tels que l'amidon, les sucres simples et les acides organiques, en molécules telles que le dioxyde de carbone avec la production simultanée d'énergie. La fonction principale de la respiration est de fournir, par l'intermédiaire de l'ATP, l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire et donc au développement et à la maturation de l'organisme vivant.

La respiration aérobie se déroule en trois voies métaboliques principales dans lesquelles interviennent des enzymes spécifiques :

- 1- La glycolyse qui permet la dégradation du glucose en acide pyruvique suivie du cycle des acides tricarboxyliques (TCA) qui est la transformation de l'acide pyruvique en CO<sub>2</sub>
- 2- La lipolyse
- 3- Le système de transport d'électrons, dans lequel l'énergie le NAD est réduit en NADH<sub>2</sub> à forte énergie.

De nombreux auteurs ont utilisé la respirométrie ou le suivi en continu des gaz (CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>) pour l'évaluation de la croissance des différents micro-organismes sur support solide étant donné que l'estimation de la biomasse y est très délicate. Ceci en raison de la nature du matériel et de la capacité

des micro-organismes à pénétrer dans les espaces intracellulaires et extracellulaires de la matrice solide.

Ce suivi de l'activité respiratoire des organismes a permis d'observer des corrélations étroites entre certaines activités métaboliques et la croissance. Perraud-Gaime (1995) a ainsi observé une relation forte entre la dégradation de la caféine et l'évolution du CO<sub>2</sub> produit par *Penicillium* cultivé sur pulpe de café. Par l'utilisation de la respirométrie, il a été également possible d'établir des conditions de culture les plus favorables aux levures en FMS (Saucedo-Castañeda, 1991 ; Trejo-Hernandez, 1992).

Par ailleurs, le quotient respiratoire (QR) est défini comme étant le rapport entre le CO<sub>2</sub> produit et l'O<sub>2</sub> consommé. Il permet de définir le type de substrat utilisé (Tableau 2.5.).

Tableau 2.5. Détermination du Q.R. théorique en fonction du métabolite utilisé.

Composé	Oxydation	QR
Acide Malique	$C_4H_6O_5 + 3O_2 \rightarrow 4CO_2 + 3H_2O$	QR = $4/3 = 1,33$
Acide Citrique	$C_6H_8O_7 + 9/2 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 4 H_2O$	QR = $6/4,5 = 1,33$
Acide Tartrique	$C_4H_6O_6 + 5/2 O_2 \rightarrow 4CO_2 + 3 H_2O$	QR = $4/2,5 = 1,6$
Acides Gras :	$C_{18}H_{36}O_2 + 26 O_2 \rightarrow 18 CO_2 + 18 H_2O$	QR = $18/26 = 0,7$
Glucose :	$C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6H_2O$	QR = $6/6 = 1$
Coefficient fermentaire	$2 CO_2 + 2 C_2H_5OH$	QR tend vers l'infini

Le QR est une valeur moyenne globale plutôt qu'une valeur bien précise ou constante dans le temps. Cela est dû à la déviation des intermédiaires qui ne sont pas encore décarboxylés ou encore réduits par le NAD.

## ***Matériel et Méthodes***

### 3. Matériel et Méthodes

#### 3.1. Souches

Au cours de cette étude, nous avons utilisé des souches de champignons du genre *Morchella* et du genre *Pleurotus*. Ces souches nous ont été fournies par la station de l'INRA Bordeaux (Tableau 3.1.).

Tableau 3.1. Liste des différentes souches de champignons étudiées.

Nom de l'espèce	Code	Origine
<i>Morchella crassipes</i>	MCR 92.24	Mycothèque de Barn (CBS 289-63)
<i>Morchella esculenta</i>	MES 91.9	Danemark 1990
<i>Morchella hortensis</i>	Mh 88-7	Provence
<i>Pleurotus ostreatus</i>	JMO 95	Bretagne
<i>Pleurotus cornucopiae</i> 19	PC 19	Corrèze
<i>Pleurotus cornucopiae</i> 32	PC 32	Gers
<i>Pleurotus cornucopiae</i> 33	PC 33	Gironde

#### 3.2. Milieux de culture

##### 3.2.1. Milieu de conservation

Les souches sont repiquées régulièrement et conservées sur milieu PDA (Difco). Après incubation à l'étuve, les cultures sont conservées à 4°C pendant 3 mois.

##### 3.2.2. Milieux de base

Le milieu de base est constitué sauf spécification particulière, en g/l de : Glucose, 30 ; Extrait de levure, 6 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 ; MgSO<sub>4</sub>, 2 ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 1,6. La source d'azote est soit l'urée (2,68) pour *Pleurotus*, soit le nitrate de sodium (7,75) pour *Morchella*.

##### 3.2.3. Support

###### Bagasse de canne à sucre

La bagasse, résidu lignocellulosique de la canne à sucre est recueillie après extraction du saccharose. En moyenne, elle comporte 38% de cellulose, 34% d'hémicellulose, 11% de lignine.

La bagasse provient de la sucrerie "Emiliano Zapata" de Zacatepec, au Mexique. Après tamisage, de la bagasse, deux fractions sont récupérées:

- des fibres longues utilisées dans la fabrication du papier
- des fibres courtes ou "bagacillo" constituées essentiellement de moelle, utilisées pour la préparation d'aliments pour animaux. C'est cette fraction qui est utilisée comme support de fermentation (Roussos, 1985).

La bagasse est très hygroscopique, ceci est principalement dû à la présence de moelle qui présente une structure alvéolaire. Le milieu de culture s'adsorbe à l'intérieur des alvéoles de cellulose pour les remplir complètement. Par contre, les particules lignocellulosiques absorbent peu d'eau du fait de la compacité de la structure fibreuse. Néanmoins, par capillarité l'eau s'adsorbe à ces fibres (Dufour, 1990).

La bagasse est considérée dans notre étude comme support de culture solide, nous l'imbibons avec le milieu de base.

### **3.2.4. Dispositifs de fermentation sur support solide**

#### **3.2.4.1. Culture en flacons**

Des flacons de capacité 250 ml sont remplis de 35g de bagasse de canne à sucre imprégnée du milieu de base (dont le pH a été ajusté à 7,0) de manière à atteindre 78% d'humidité initiale. Les flacons sont autoclavés pendant 20 min à 121°C. L'inoculum correspond à 3 morceaux de 1cm<sup>2</sup> d'une culture entretenue sur PDA. Les 3 morceaux sont disposés à équidistance dans le milieu solide.

#### **3.2.4.2. Culture en colonnes**

Les cultures en FMS ont été réalisées en utilisant les colonnes décrites par Raimbault et Alazard (1980). Ce réacteur est constitué de colonnes de verre de 20 cm de hauteur et de 4 cm de diamètre, dont le volume utile est de 250 ml. Après autoclavage des colonnes vides et du support solide imprégné à 121°C pendant 20 min, les colonnes sont remplies avec le support inoculé, puis sont montées sur des humidificateurs et introduites dans un bain.

L'aération dans les fermenteurs est réalisée à l'aide d'une canalisation à haute pression dont le débit d'air est réglé à 0,2 bar par un manodétendeur. Avant son passage, l'air est humidifié deux fois à température ambiante à l'aide de bulleurs en verre fritté plongeant dans de l'eau distillée, puis distribué en passant par un ballon à fond rond muni d'une entrée et de plusieurs sorties (Fig. 3.1.).

Le contrôle du flux d'air saturé en eau s'effectue par l'intermédiaire de microvannes à pointeaux. Afin de s'assurer de la saturation, un petit bulleur est disposé sous chaque colonne, le

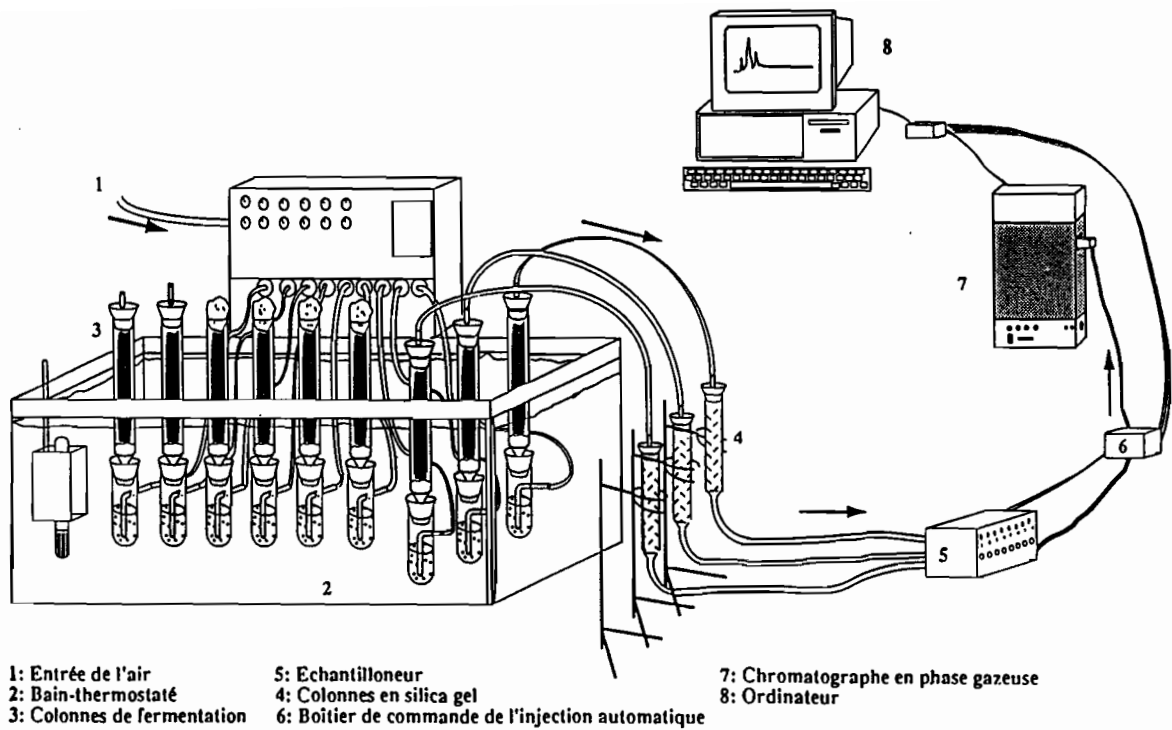


Fig.3.1. Dispositif des fermentations en milieu solide

débit d'air est réglé à la sortie de chaque colonne. Ce dispositif permet le suivi en continu de la fermentation.

### **3.2.5. Méthodes physico-chimiques**

#### **3.2.5.1. Matière sèche**

En fermentation solide, il est indispensable de suivre l'évolution de la matière sèche du milieu de culture. En effet, l'eau produite lors de la dégradation des substrats carbonés, de même que la perte de poids sec due à la respiration, ainsi que le transfert de l'eau par le flux de l'air conduisent à des variations d'humidité au cours de la fermentation. Cette mesure de l'humidité permet d'exprimer la quantité de métabolites produits par rapport au substrat carboné initial ou par rapport à la matière sèche.

Le poids sec est évalué par différence de pesée. Environ 5 à 7g d'échantillon matière fraîche sont pesés à l'aide d'une balance de précision (Matière fraîche), l'échantillon est mis à sécher pendant 24h à 105°C (Sato *et al.*, 1983). Une fois sec, il est refroidi dans une atmosphère sèche (dessiccateur contenant du silicagel). Puis, il est à nouveau pesé sur la même balance.

La perte d'eau de l'échantillon ainsi calculée permet d'évaluer la matière sèche ou la teneur en eau initiale. Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche ou en pourcentage d'humidité.

#### **3.2.5.2. Mesure du pH**

La détermination du pH est effectuée directement sur la suspension obtenue avec l'échantillon de fermentation solide dans de l'eau distillée (2g/ 10ml). La mesure est réalisée à l'aide d'un pH-mètre digital Knick muni d'une électrode combinée. L'étalonnage de l'appareil est réalisé au moyen de solutions tampon (Schott-Geräte).

#### **3.2.5.3. Dosage des sucres réducteurs**

Les sucres réducteurs sont dosés par la méthode de Miller (1959). Les sucres réduisent l'acide 2,3-dinitrosalicylique (DNS) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique, à chaud et en milieu basique. Le produit de la réaction présente une coloration jaune orangée présentant un maximum d'absorption à 575 nm.

La composition du réactif DNS est la suivante (g/l) : acide 3,5-dinitrosalicylique 10,0 ; hydroxyde de sodium 0,5 ; phénol 2,0.

L'échantillon à doser est dilué convenablement de façon à obtenir une concentration en sucres réducteurs voisine de 1g/l. A 1 ml de cette dilution, on ajoute 1 ml de réactif au DNS. Le mélange est porté à ébullition pendant 5 min et refroidi rapidement. Après addition de 8 ml d'eau distillée, le contenu des tubes est homogénéisé au vortex, et la densité optique est lue à 575 nm, une courbe étalon de glucose est réalisée de 0 à 1g/l.

#### **3.2.5.4. Dosage des nitrates par Chromatographie liquide Haute Performance**

Le dosage de nitrates a été réalisé au laboratoire commun des analyses de l'ORSTOM.

Les échantillons de fermentation sont convenablement dilués de manière à atteindre des concentrations en nitrates comprises entre 0,5 et 5 mg/l puis sont filtrés sur un filtre de 0,2 µm. Les analyses sont réalisées sur un DIONEX 4500. Les conditions opératoires sont les suivantes :

Détecteurs :	Par conductimétrie
Colonne :	OMNIPAC PAX 100
Eluant :	NaHCO <sub>3</sub> 3mM/ Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 3,1 mM/ 5% CH <sub>3</sub> OH
Débit :	1 ml/min

#### **3.2.6. Suivi de la croissance**

##### **3.2.6.1. Mesure de la croissance apicale**

La croissance apicale correspond à l'élongation du mycélium cultivé sur une surface solide. Cette élongation est mesurée régulièrement à l'aide d'une règle graduée. La croissance apicale est exprimée en millimètres rapportés au temps.

##### **3.2.6.2. Analyse de l'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> par CPG**

Pour éviter les difficultés de dosage et d'échantillonnage dues à l'hétérogénéité des milieux solides, on a recours à l'analyse des effluents gazeux. Cette technique permet d'étudier la respiration et le métabolisme des champignons. Ces analyses de gaz permettent de suivre les différentes étapes de procédé de fermentation, *in situ*, en continu et de façon non destructive.

Le chromatographe est un IGC 11 de DELSI équipé d'un détecteur à catharomètre, et d'un four permettant de régler la température de façon isothermique. Cet appareil est utilisé avec un injecteur automatique.

La colonne utilisée pour séparer les composants est une colonne concentrique de type "Alltech" CRT I. Sa partie extérieure est remplie d'un support assurant un tamis moléculaire de 5

À, tandis que sa partie centrale est remplie de Porapak, polymère poreux ne retenant pas les gaz. Les conditions opératoires de la CPG sont les suivantes :

Détecteur : Conductivité thermique  
 Température : 30°C isothermique  
 Phase mobile : Hélium  
 Débit de l'éluant : 55 ml/min  
 Tension du catharomètre : 160 mA  
 volume injecté : 0,3 ml

Chaque gaz présente une conductibilité thermique différente, il est donc nécessaire d'étalonner le détecteur avant de procéder à l'analyse des gaz à mesurer (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>). Pour cela, des mélanges étalons sont utilisés et des courbes de calibration sont établies pour chaque gaz. La colonne permet de séparer les composés dont la liste est donnée dans le tableau suivant :

Tableau 3.2. Liste des composants séparés par la colonne CTR1.

Composants	Séparation	Temps de rétention (min)
Air	Colonne porapak	0,38
Méthane	Colonne porapak	-
Dioxyde de carbone	Colonne porapak	0,6
Oxygène	Colonne tamis moléculaire	1,5
Azote	Colonne tamis moléculaire	2,2
Méthane	Colonne tamis moléculaire	-
Monoxyde de carbone	Colonne tamis moléculaire	-

Après intégration et calcul des pourcentages des différents gaz dans l'échantillon, on trace les cinétiques de production de CO<sub>2</sub> rapportées aux débits d'air traversant les colonnes de fermentation ainsi qu'au poids sec.

### 3.2.6.3. La respirométrie en FMS

Les résultats de la respirométrie (mesures de l'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub>) sont exprimés par rapport à la matière sèche initiale. Les analyses permettent de mesurer directement la vitesse instantanée (dérivée) de l'évolution des gaz ou de déterminer leur production globale (intégrale).

La mesure directe de la vitesse instantanée de la production ou de la consommation des gaz est réalisée par l'échantillonnage d'un courant d'air provenant de la fermentation. Les résultats sont exprimés par rapport à la matière sèche initiale selon l'équation suivante :

$$\frac{(\text{CO}_2 \text{ ou O}_2) * \text{Débit} * 60}{\text{Poids initial} * \% \text{MSI}} = \text{ml de gaz/ (h gMSI)}$$

où CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> sont les teneurs des gaz dans l'air, exprimés en pourcentage, le débit de l'air est exprimé en ml/min, le poids du contenu de la colonne est exprimé en gramme et la teneur en matière sèche initiale est exprimée en pourcentage (%MSI).

L'accumulation ou la consommation totale des gaz peut être calculée en intégrant les données de la vitesse par la règle de trapèze selon la relation suivante :

$$\Delta t * C_i + (C_{i+1} - C_i) * \Delta t * 0,5.$$

où  $\Delta t$  est l'intervalle de temps entre deux analyses,  $i$ , et  $i+1$ ,  $C_i$  est la valeur de la concentration du gaz au début de l'intervalle de temps, et  $C_{i+1}$  est la valeur du gaz à la fin du même intervalle.

par ailleurs, le quotient respiratoire est donné par la relation :

$$\text{QR} = \frac{\text{Quantité de CO}_2 \text{ produit}}{\text{Quantité d'O}_2 \text{ consommé}}$$

### 3.2.7. Analyses de la composition de l'arôme

#### 3.2.7.1. Méthode sensorielle

L'évaluation olfactive d'une culture par un "jury" permet de caractériser rapidement l'odeur émise, d'estimer son intensité et de comparer plusieurs échantillons.

Après rupture des cultures et homogénéisation, celles-ci sont présentées à un jury de 2 ou 3 personnes qui évaluent l'odeur perçue en la classant en odeur agréable et désagréable et de la caractériser de façon globale.

#### 3.2.7.2. Extraction par le Likens-Nickerson modifié par Godefroot

L'appareil Likens-Nickerson modifié par Godefroot et *al.*, (1981) utilise le principe de l'extraction distillation simultanées, c'est à dire l'extraction à la vapeur et l'extraction par solvant simultanées (Fig. 3.2.). Le rendement de l'extraction est généralement bon pour des molécules à

plus de 5 atomes de carbone, ce rendement dépasse 95% pour des durées de fonctionnement inférieures à une heure.

10 g de culture sur support solide sont énergiquement homogénéisés à la spatule. Après addition de 40 ml d'eau distillée, l'ensemble est soumis aux ultrasons pendant 20 min. Ces prétraitements permettent de casser la membrane cellulaire et de libérer les arômes.

L'échantillon est introduit dans le ballon A avec un agitateur magnétique. 9,5 ml d'hexane sont introduits dans le ballon B. Afin que l'eau soit portée à ébullition dans le ballon A, celui-ci est chauffé par un bain marie d'huile de silicone à 135°C. On chauffe alors le ballon B grâce à un bain marie d'eau. Les vapeurs se condensent sur le réfrigérant maintenu à -4°C et tombent dans la partie C de l'appareil. Le solvant et l'eau étant non miscibles, un échange de solutés se produit à l'interface. L'appareil est construit de telle manière que le liquide le moins dense (hexane) retourne dans le ballon B et que le liquide le plus dense (eau) retourne dans la partie C. Au bout d'une heure d'extraction, on concentre l'arôme dans l'hexane (ballon B) en continuant à chauffer seulement le ballon B pendant 20 min.

### **3.2.7.3. Extraction solide-liquide**

A 5g d'échantillon on rajoute 15 ml d'hexane, le mélange est homogénéisé pendant 1 heure sur un shaker. 1 ml d'une solution de  $\lambda$ -undécanolactone à 1g/l est rajouté comme étalon interne (Bensoussan et *al.*, 1995). Après homogénéisation 2 ml sont prélevés et concentrés lentement sous courant d'azote jusqu'à 0,5 ml environ. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide. En effet, plusieurs échantillons sont extraits simultanément.

### **3.2.7.4. Extraction en headspace**

La technique de headspace ou espace de tête en dynamique consiste à balayer un échantillon liquide, solide ou gazeux à l'aide d'un gaz inerte dirigé vers un piège de polymère adsorbant, afin de concentrer les composés volatils produits par l'échantillon.

La particularité du système headspace est l'utilisation de l'échantillon en l'état, sans extraction au préalable et sans chauffage. Dans ce cas, l'échantillon est enfermé pendant la durée de balayage dans une cellule en verre hermétique de 250 ml.

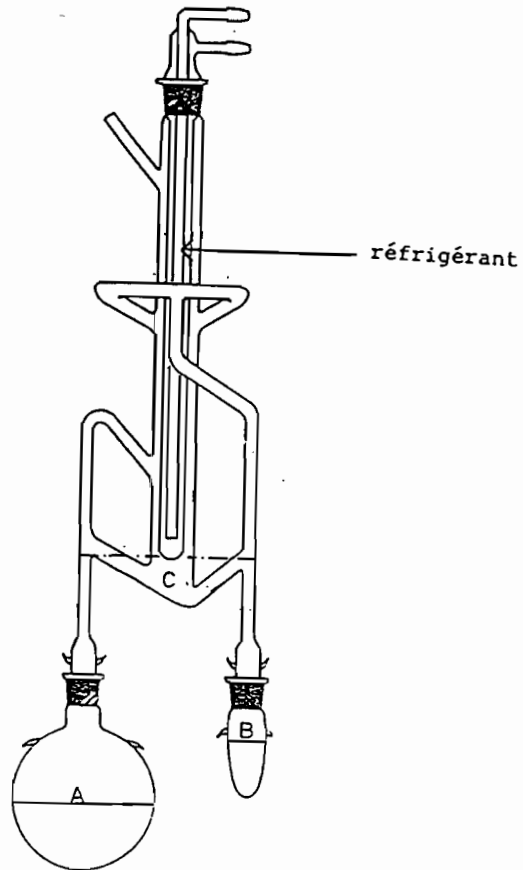


Fig. 3.2. Appareil d'extraction des arômes Likens-Nickerson modifié par Godefroot.

### 3.2.8. Analyses chromatographiques

#### 3.2.8.1. Evaluation quantitative

Une évaluation quantitative des molécules majoritaires est réalisée par étalonnage interne. Le coefficient de réponse entre l'étalon interne et la molécule à doser est calculé.

Le coefficient de réponse  $K_i$  d'un composé  $i$  par rapport à un étalon interne est défini par le rapport :

$$K_i = \frac{M_i * A_{ei}}{M_{ei} A_i}$$

avec : $M_i$	masse du composé $i$
$M_{ei}$	masse de l'étalon interne
$A_{ei}$	aire du pic de l'étalon interne $e_i$
$A_i$	aire du pic du composé $i$

$K_i$  est déterminé en injectant plusieurs solutions de produit et d'étalon interne en quantités  $M_i$  et  $M_{ei}$  connues.

$K_i$  calculée, on peut, à partir du rapport des aires du produit, de l'étalon interne et de la masse d'étalon interne introduite, quantifier la masse du composé contenu dans l'extrait analysé.

$$M_i = K_i M_{ei} \frac{A_i}{A_{ei}}$$

#### 3.2.8.2. Chromatographie en phase gazeuse/ Dosage

Le dosage quantitatif des composés d'arôme est réalisé à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type Delsi-Nermag DN 200. Les composés volatils sont séparés sur une colonne DB5 (30m de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,25 $\mu$ m d'épaisseur du film).

La programmation de température s'étend de 45°C à 220°C à raison de 5°C/min, les températures de l'injecteur et du détecteur sont de 230°C. L'injection se fait en mode splitless (sans division), par cette technique 70 à 90% de l'échantillon sont introduits dans la colonne alors qu'en mode Split, seuls 0,5 à 5% sont analysés.

### 3.2.8.3. Chromatographie en phase gazeuse/ Sniffing

L'analyse chromatographique est réalisée à l'aide d'un appareil DELSI 30, directement connecté à la platine DCI (Fig. 3.3.). Les composés volatils sont séparés sur une colonne SPB-1 (60m de longueur, 0,32 mm de diamètre, 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur). La pression du gaz vecteur est de 1bar. La programmation de température utilisée est de 40 à 220°C à raison de 3°C/min. La température du détecteur FID est 230°C

Ce chromatographe est équipé d'un système de détection olfactive SGE, en sortie de colonne, à l'aide d'un système diviseur (30% FID- 70% Sniffing). La pression d'air humidifiée est de 1bar. La description olfactive des composés, en sortie de colonne, est réalisée par un opérateur familiarisé avec les différentes notes aromatiques. Le descriptif olfactif est basé sur le référentiel "Le champ des odeurs" de Jaubert et *al.*, (1987).

### 3.2.8.4. Chromatographie en phase gazeuse/ Spectrométrie de masse

Un chromatographe en phase gazeuse (Hewlett Packard 5890) couplé à un spectromètre de masse (Hewlett Packard 5971, 70 eV, impact électronique), équipé du concentrateur headspace CHISA est utilisé. Les composés volatils sont séparés sur une colonne BP-1 (50m de longueur, 0,22 mm de diamètre, 1 $\mu\text{m}$  d'épaisseur). La pression du gaz vecteur est de 1,8 bar. La programmation de température utilisée est de 40 à 220°C à 3°C/min. La température du détecteur de masse est de 250°C.

L'interprétation et l'identification des spectres de fragmentation sont basées sur la banque des données NBS (Hewlett Packard), la littérature publiée dans ce domaine et par comparaison des indices de Kovats (Jennings et Shibamoto, 1980 ; Mc Lafferty et Stauffer, 1989).

### 3.2.8.5. Quantification des composés volatils en headspace

La technique headspace en dynamique ne permet pas de quantifier facilement les composés. En effet, la seule technique qui pourrait être utilisée est un étalonnage interne, en répétant successivement les étapes de balayage de l'échantillon et de désorption du piège afin d'appauvrir complètement l'échantillon et de s'assurer que la totalité de l'échantillon soit désorbé.

Il est très difficile de réaliser ces opérations pour les nombreux composés identifiés (afin de déterminer le coefficient de réponse de chaque composé). De plus les champignons supérieurs et leurs cultures mycéliennes sont des systèmes très humides (70% à 80%). Ce sont donc des échantillons qui évoluent au cours du temps et les composés volatils peuvent difficilement être extraits en totalité.

Néanmoins, une quantification relative peut être fournie en donnant les pourcentages relatifs des composés sur les aires intégrées des pics obtenus en GC/FID ou GC/SM. Etant donné

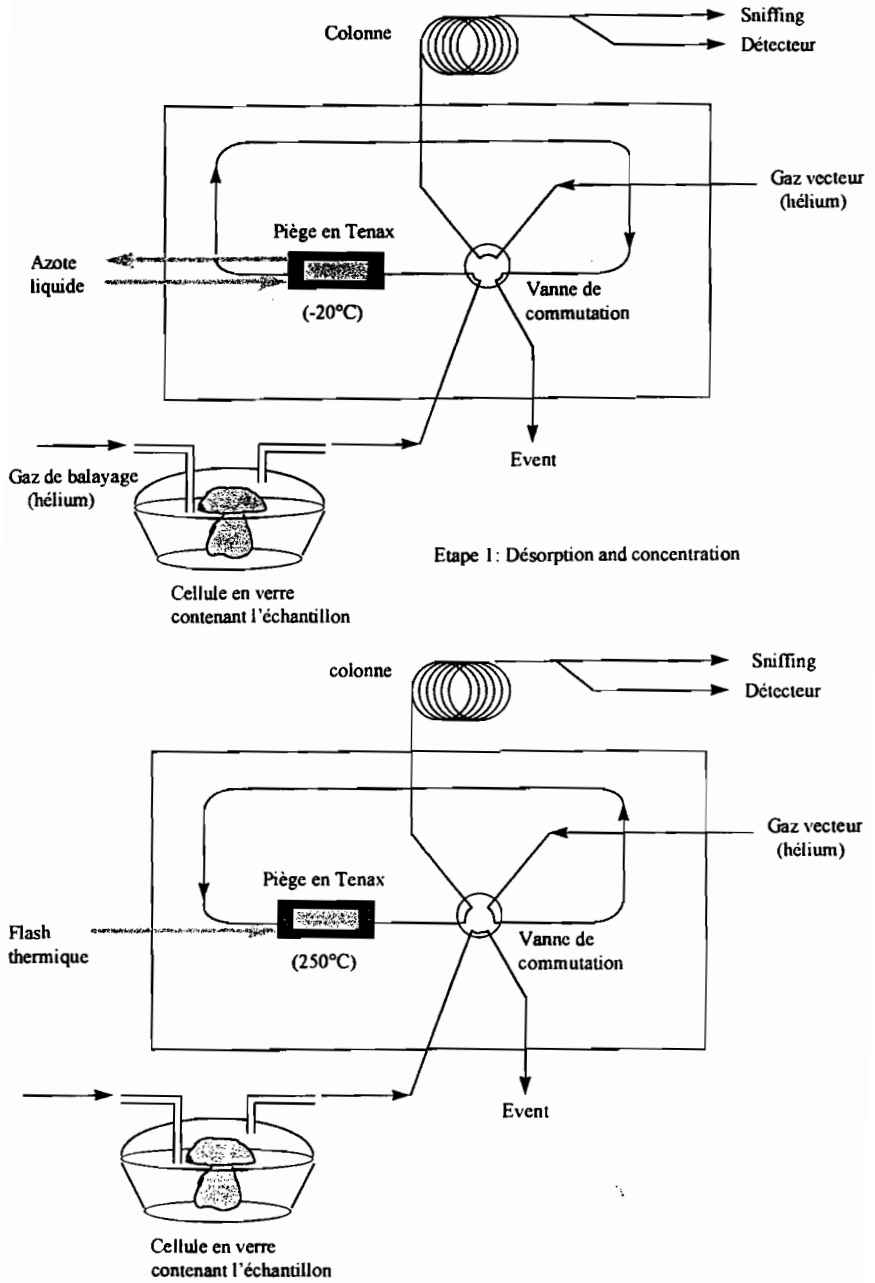


Fig. 3.3. Schéma de fonctionnement de la platine DCI.

que les conditions analytiques sont rigoureusement identiques pour tous les échantillons, une seconde notion quantitative peut être fournie en indiquant l'aire intégrée totale du chromatogramme obtenu par le détecteur FID ou le spectromètre de masse. Des comparaisons sont donc possibles entre chromatogrammes en terme de production de composés volatils.

### **3.3. Dosage des activités Peroxydases**

#### **3.3.1. Dosage de l'activité Lignine Peroxydase**

La méthode de dosage de l'activité Lignine Peroxydase est celle utilisée par Tien et Kirk (1984) utilisant l'alcool veratrylique comme substrat.

A 2 g d'échantillons sont rajoutés 4 ml de tampon tartrate de sodium 100 mM pH 3, après homogénéisation l'ensemble est centrifugé à 5000 rpm pendant 10 min. 400 µl du surnageant sont rajoutés à 740 µl de tampon et à 40 µl d'alcool vératrylique (2mM). La réaction enzymatique débute après rajout de 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le suivi de l'augmentation de la DO pendant 1 min permet d'évaluer l'activité de l'enzyme.

La vitesse de réaction V, exprimée en nKat./ ml correspond à

$$V = \frac{322,58 (DO_t - DO_{t_0})}{t}$$

t : temps de réaction en seconde

DO t<sub>0</sub> : densité optique initiale à 310 nm

DO t : densité optique après le temps de réaction

Coefficient d'extinction = 9300

nKat = nmol/s

1 U = 16,6 nKat

UI = (µmol/ min)/ ml

#### **3.3.2. Dosage de l'activité Mn Peroxydase**

Le suivi de l'activité Mn Peroxydase a été réalisé selon la méthode de Paszczynski et al., (1985).

A 2 g d'échantillons sont rajoutés 4 ml de tampon tartrate pH 5, après homogénéisation l'ensemble est centrifugé à 5000 rpm pendant 10 min. 100 µl du surnageant sont rajoutés à 655 µl, d'eau, à 200 µl de tampon (0,1 M) et à 20 µl de MnSO<sub>4</sub> (0,1mM), 20 µl de substrat : vanillyl acétone (0,1 mM) sont ensuite rajoutés.

La réaction enzymatique débute après rajout de 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le suivi de la diminution de la DO pendant 1 min permet d'évaluer l'activité de l'enzyme.

La vitesse de réaction V, exprimée en nKat./ ml correspond à

$$V = \frac{-16,6(DO_t - DO_0)}{18,3 t}$$

t : temps de réaction en minutes

DO 0 : densité optique initiale à 334 nm

DO t : densité optique après le temps de réaction

Coefficient d'extinction = 18300

### **3.4. Observations au microscope électronique à transmission**

La double fixation des échantillons est préconisée pour les observations ultrastructurales conventionnelles. La première fixation de 3h, sous agitation, est effectuée dans une solution de 2,5% de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,2 ; elle est suivie de trois lavages dans le même tampon. Les échantillons sont ensuite postfixés dans le tétraoxyde d'osmium (OsO<sub>4</sub>) en solution aqueuse (1%) puis lavés à l'eau distillée avant déshydratation progressive dans un gradient d'éthanol de 10 à 100% (1 h chaque).

Avant d'être inclus dans la résine pure Epon 812 (TAAB, France), les échantillons sont incubés dans les solutions suivantes : oxyde de propylène pur (op), 1 h ; op/Epon, 2 h (2/1 puis 1/2, v/v) ; Epon pur, une nuit.

La polymérisation de la résine est obtenue après une nuit d'incubation à 58°C. Les coupes ultrafines, réalisées à l'ultramicrotome Reichert OM2, sont contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb avant d'être examinées sur un microscope JEOL 10EX. Les analyses ont été réalisées par M. Nicole du laboratoire de Phytopathologie à l'ORSTOM.

### **3.5. Echantillonnage et traitement des échantillons**

L'échantillonnage et le traitement des échantillons provenant des cultures sur support sont schématisés dans la figure 3.4.

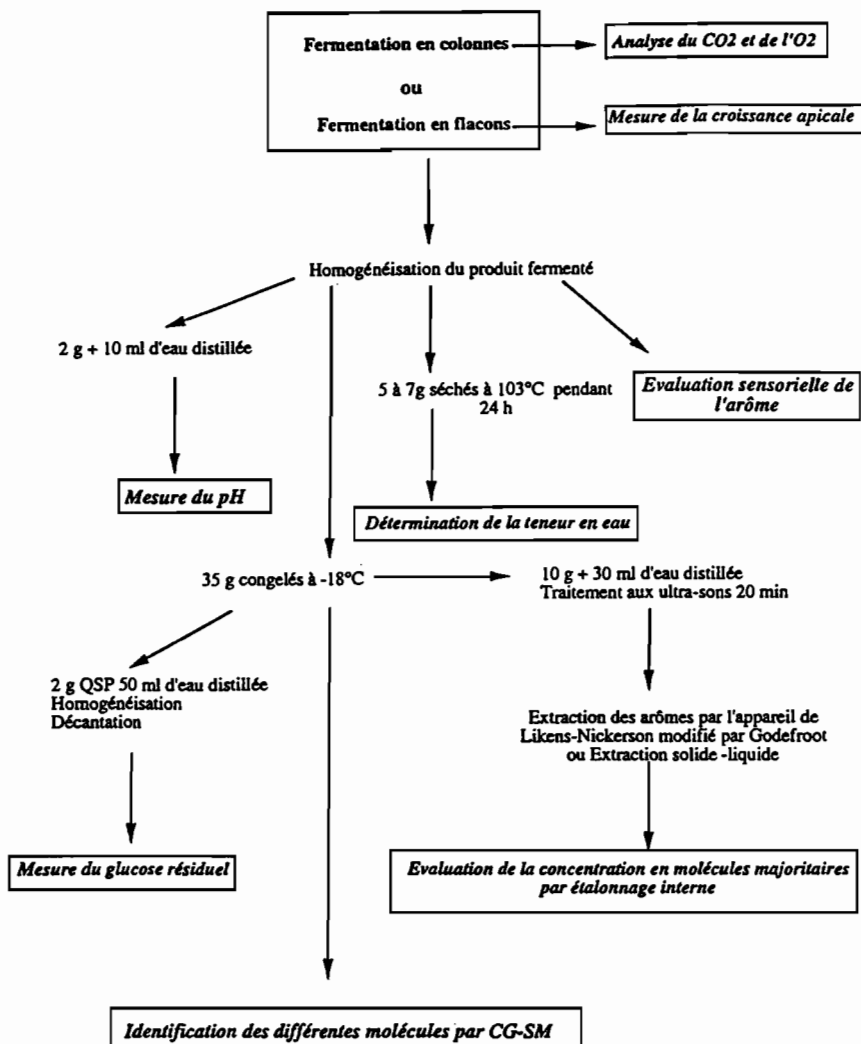


Fig. 3.4. Schéma d'échantillonnage et de traitement des échantillons provenant des FMS.

***Sélection des Souches sur support solide***

#### 4. Sélection des souches sur support solide

L'objectif de cette étude, a été de sélectionner parmi les souches de Morilles et de Pleurotes dont nous disposons, une souche de Morille et une souche de Pleurote en fonction de leur aptitude à coloniser rapidement le support solide et à produire des composés d'arôme. Afin d'atteindre cet objectif, un criblage a été réalisé en considérant la croissance apicale du mycélium (vitesse de croissance, colonisation du support solide) et la richesse de l'arôme produit (analyse des effluves par CG-SM).

Par ailleurs, nous avons comparé les substances volatiles produites par le mycélium des différentes espèces cultivées sur support solide à celles obtenues en culture liquide. De même, la production des carpophores de trois espèces de Pleurotes nous a permis de comparer les profils aromatiques des carpophores à ceux des mycéliums correspondants.

##### 4.1. Présélection des souches

Le criblage initial des souches a été réalisé à l'INRA Bordeaux à partir de leur collection de champignons supérieurs. Ces différentes souches ont été retenues pour leurs qualités organoleptiques qui se rapprochent de celles du carpophore "genre *Pleurotus*" et ou de la maîtrise de leur croissance mycélienne à défaut de l'obtention d'un cycle reproductif complet, "genre *Morchella*" (J. Guimberteau, communication personnelle). Les caractéristiques culturales des différentes espèces étudiées sont résumées dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1. Souches de champignons sélectionnées pour leurs caractéristiques culturales et aromatiques.

Espèces	Caractéristiques culturales
<i>Pleurotus cornucopiae</i> PC 33, PC 32, PC 19	Forte croissance mycélienne, aptitude à fructifier, bonne note olfactive typée aussi bien sur le mycélium que sur le carpophore.
<i>Pleurotus ostreatus</i> JMO-95	Bonne vigueur mycélienne, forte note aromatique perçue au niveau du mycélium, fructification en conditions contrôlées.
<i>Morchella crassipes</i> <i>Morchella hortensis</i> <i>Morchella esculenta</i>	Forte croissance mycélienne, espèces dont le mycélium est décrit comme ayant un potentiel aromatique identique à celui du carpophore, absence totale de fructification en conditions contrôlées.

## 4.2. Critères de sélection des souches sur support solide

Cette étude réalisée sur support solide nous a permis de sélectionner à partir des quatre souches du genre *Pleurotus* : *P. cornucopiae* 19, *P. cornucopiae* 32, *P. cornucopiae* 33 et *P. ostreatus* JMO-95 et des trois souches du genre *Morchella* : *M. crassipes*, *M. hortensis* et *M. esculenta*, uniquement les deux meilleures souches (un Pleurote et une Morille) en fonction de leurs performances de croissance (vitesse de croissance) et des caractéristiques organoleptiques (qualité et quantité des arômes produits).

### 4.2.1. Croissance apicale

La croissance apicale est une caractéristique propre à chaque champignon cultivé dans des conditions de culture données (Smith et Berry, 1975). Toutefois, la croissance apicale n'est pas forcément en corrélation avec le taux de croissance du microorganisme et avec la production de biomasse, mais elle représente un bon indicateur d'envahissement superficiel d'un milieu solide par les champignons filamenteux (Roussos et Raimbault, 1982).

En culture sur support, le mycélium ne se développe pas uniquement en surface mais tend à envahir l'ensemble de l'espace disponible selon une extension semi-sphérique qui assure la colonisation de la totalité du support. La mesure de la croissance apicale en fonction du temps d'incubation à 25°C, nous a permis de définir pour chaque souche, la vitesse d'élongation du mycélium sur le support solide.

Le tableau 4.2. regroupe les caractéristiques de la croissance apicale du mycélium des sept souches de champignons supérieurs, cultivé en flacons, sur de la bagasse imprégnée d'une solution nutritive contenant du glucose et un mélange urée et sulfate d'ammonium. L'inoculum consiste en 3 morceaux de gélose envahis de mycélium prélevés sur une culture entretenue sur PDA. Ces morceaux sont disposés à équidistance.

Tableau 4.2. Caractéristiques de la croissance apicale à 25°C de différentes espèces de Pleurotes et de Morilles cultivées sur support imprégné du milieu nutritif.

Souche	<i>P. ostreatus</i> JMO-95	<i>P.C. 33</i>	<i>P. C. 32</i>	<i>P. C. 19</i>	<i>M.</i> <i>crassipes</i>	<i>M.</i> <i>hortensis</i>	<i>M.</i> <i>esculenta</i>
Temps de latence (h)	0	48	24	48	0	0	0
Croissance apicale (mm/h)	0,2	0,154	0,2	0,132	0,215	0,254	0,236

On peut noter que les croissances apicales varient en fonction de la souche. Ainsi, la croissance apicale la plus faible a été observée pour *P. cornucopiae* 19 avec 0,132 mm/h. En revanche *P. ostreatus* JMO-95 et *P. cornucopiae* 32 présentent les croissances apicales les plus élevées. *M. hortensis* se distingue parmi les 3 espèces de Morilles par sa vitesse de croissance apicale la plus importante (0,254 mm/h).

On note également que les temps de latence diffèrent pour les trois souches de *Pleurotus*. Ce temps de latence est de 48 heures pour deux souches *P. cornucopiae* 33 et *P. cornucopiae* 19. Il est de 24 heures pour *P. cornucopiae* 32. Par contre pour *P. ostreatus* JMO-95 ainsi que pour les différentes espèces de Morilles, le temps de latence est très bref, la croissance apicale du mycélium débute immédiatement après la mise en culture.

En conclusion, les performances de croissance apicale du mycélium des différentes espèces étudiées sont variables en fonction des souches. Ce sont les espèces *M. hortensis* et *P. ostreatus* JMO-95 qui se distinguent par leur vitesse d'élongation mycélienne relativement élevée. Toutefois, il est à noter que ces croissances apicales sont en moyenne 5 fois plus faibles que celles observées pour des souches de *Trichoderma* (1mm/h) et d'autres champignons filamenteux (Roussos, 1985).

#### **4.2.2. Description du mycélium des différentes souches étudiées**

Le mycélium des différentes espèces du genre *Pleurotus* est de couleur blanche avec un aspect cotonneux. Par contre, le mycélium de Morille est brun et se confond facilement avec la bagasse de canne à sucre. Au bout de 15 jours de culture, le support est entièrement envahi aussi bien en surface qu'à l'intérieur de la matrice solide. Par ailleurs, au cours de la culture de *M. esculenta*, on a noté la formation de sclérotés qui représentent des formes de résistance (Amir *et al.*, 1993). Ceci a été décrit comme une étape clé dans la fructification des Morilles (Ower *et al.*, 1986).

#### **4.2.3. Evaluation sensorielle de la qualité de l'arôme**

L'évaluation sensorielle de la qualité et de l'intensité de l'odeur émise par les cultures constitue un excellent moyen pour décrire l'odeur dans sa globalité. Nous avons procédé de la manière suivante, tout d'abord, les cultures âgées de 15 jours sont homogénéisées. Ensuite, l'appréciation de l'odeur de ces cultures a été réalisée par évaluation olfactive. Ceci a révélé que chaque souche étudiée présentait des caractéristiques aromatiques différentes. Une forte dominante fongique, fruitée est notée pour les espèces du genre *Pleurotus*. Alors que pour les espèces du genre *Morchella*, on note la prévalence de la note champignon.

Parmi les espèces de Morilles, *M. crassipes* présente la note olfactive la plus agréable et la plus intense.

Afin de dégager les spécificités propres à chaque culture, l'analyse de la composition chimique de l'arôme a été réalisée par CG-SM.

#### **4.2.4. Analyse des effluves**

La technique de concentration des effluves a été utilisée comme technique d'extraction des arômes. Les analyses chimiques ont été complétées par une étude sensorielle à l'aide de la technique de détection olfactive en sortie de colonne. La description des odeurs est basée sur le référentiel olfactif : *Le Champ des Odeurs* (Jaubert et *al.*, 1987).

Cette étude a permis d'évaluer les potentialités de chacune des espèces étudiées et de déterminer les composés clés responsables des odeurs dégagées par les différentes cultures.

Dans les tableaux 4.3 à 4.9. sont présentés les résultats relatifs à la composition chimique des arômes produits par les souches étudiées cultivées sur support solide, pendant 15 jours à 25°C. Dans ces tableaux sont recensés les différentes molécules, les temps de rétention (TR), les indices de Kovats (IK), l'aire intégrée (Aire) pour chaque composé ainsi que le pourcentage de différentes molécules par rapport à l'aire intégrée totale.

L'identification des différentes molécules contribuant à l'arôme champignon des espèces étudiées a révélé des différences remarquables, qualitatives et semi quantitatives, entre les deux genres étudiés. On observe également que les composés identifiés appartiennent essentiellement à la famille des composés à 8 atomes de carbone.

Dans le cas des Pleurotes, l'octan-3-one est majoritaire dans les effluves, en revanche, l'arôme du mycélium de Morille cultivé sur support solide est essentiellement dû à la présence de l'oct-1-én-3-ol. D'un autre côté, les profils aromatiques des différents Pleurotes obtenus par cette technique headspace semblent plus riches et plus complexes que ceux obtenus pour les espèces de Morilles.

Tableau 4.3. Composés volatils du mycélium de *P. ostreatus* JMO-95 cultivé à 25°C pendant 15 jours sur milieu solide en flacons.

Composé chimique	TR	IK	Aire	%
3-méthylbutanal	11,42	633	1844391	1,4
3-méthylbutanol	15,117	717	59561	0,05
pentanol	16,858	749	traces	
hexanal	18,43	777	1168180	0,9
octène	18,98	787	1197127	0,9
[E]-octa-1,3-diène	20,7	817	traces	
[Z]-octa- 1,3-diène	20,9	820	traces	
non identifié		849		0,3
non identifié		866		0,2
non identifié		915		0,1
oct-1-én-3-one	29,185	957	1039933	8
oct-1-én-3-ol	29,57	964	20312301	15,4
<b>octan-3-one</b>	<b>29,83</b>	<b>968</b>	<b>87854910</b>	<b>67</b>
octan-3-ol	30,59	980	14561794	11,1
non identifié		999		0,2
oct-2-énol	34,703	1050	327169	0,25
non identifié		1241		0,1

Tableau 4.4. Composés volatils du mycélium de *P. cornucopiae* 32 cultivé à 25°C pendant 15 jours sur milieu solide en flacons.

Composé chimique	TR	IK	Aire	%
3-méthylbutanal	11,23	633	1914138	4,2
2-méthylbutanal	11,67	639	443437	0,97
non identifié		866		0,3
pentanol	16,69	749	92434	0,2
hexanal	18,4	777	235896	0,52
oct-1-én-3-one	29,1	957	traces	
oct-1-én-3-ol	29,49	964	226379	0,49
<b>octan-3-one</b>	<b>29,75</b>	<b>968</b>	<b>40145423</b>	<b>88,26</b>
octan-3-ol	30,5	980	1503951	3,3
non identifié		999		0,4

Tableau 4.5. Composés volatils du mycélium de *P. cornucopiare* 19 cultivé à 25°C pendant 15 jours sur milieu solide en flacons.

Composé chimique	TR	IK	Aire	%
benzaldéhyde	28,094	939	230961	0,6
oct-1-én-3-one	29,165	957	91188	0,24
oct-1-én-3-ol	29,5	964	440548	1,2
<b>octan-3-one</b>	<b>29,76</b>	<b>968</b>	<b>32302788</b>	<b>87,52</b>
octan-3-ol	30,56	980	1752390	4,74
non identifié		1476		1,2
non identifié		1491		3,4

Tableau 4.6. Composés volatils du mycélium de *P. cornucopiare* 33 cultivé à 25°C pendant 15 jours sur milieu solide en flacons.

Composé chimique	TR	IK	Aire	%
hexanal	18,3	777	1144481	2,52
octène	18,83	787	288099	0,63
non identifié		849		0,6
non identifié		866		0,4
oct-1-én-3-one	29,108	957	735329	1,62
oct-1-én-3-ol	29,455	969	7367869	16,2
<b>octan-3-one</b>	<b>29,71</b>	<b>968</b>	<b>32790428</b>	<b>72,2</b>
octan-3-ol	30,51	980	1855068	4,1
non identifié		1025		0,2
limonène	33,52	1030	112313	0,25
non identifié		1476	traces	

Tableau 4.7. Composés volatils du mycélium de *M. crassipes* cultivé à 25°C pendant 15 jours sur milieu solide en flacons.

Composé chimique	TR	IK	Aire	%
$\alpha$ -pinène	11,62	660	153955	3,4
<b>oct-1-én-3-ol</b>	<b>29,43</b>	<b>964</b>	<b>2424117</b>	<b>56,4</b>
octan-3-one	29,69	968	409378	9,54
myrcène	30,51	982	262656	6,12
limonène	33,5	1030	683848	15,9

Tableau 4.8. Composés volatils du mycélium de *M. esculenta* cultivé à 25°C pendant 15 jours sur milieu solide en flacons.

Composé chimique	TR	IK	Aire	%
<b>oct-1-én-3-ol</b>	<b>29,47</b>	<b>964</b>	<b>2192007</b>	<b>83,6</b>
propionate de pentyle	30,87	984	405520	15,3

Tableau 4.9. Composés volatils du mycélium de *M. hortensis* cultivé à 25°C pendant 15 jours sur milieu solide en flacons.

Composé chimique	TR	IK	Aire	%
3-méthylbutanal	11,42	963	traces	
oct-1-én-3-ol	29,45	964	20439769	98,5
octan-3-one	29,8	968		0,5

Dans le cas de Pleurotes, hormis l'octan-3-one qui est la molécule majoritaire, d'autres molécules à huit atomes de carbone : oct-1-én-3-one, oct-1-én-3-ol, octan-3-ol et octène sont communes aux différentes souches de Pleurotes. Toutefois, les proportions de ces molécules diffèrent. Dans la cas de *P. ostreatus* JMO-95 et de *P. cornucopiae* 33, oct-1-én-3-ol et octan-3-ol sont présentes à des pourcentages relativement importants. En revanche, ces deux molécules sont à des proportions beaucoup plus faibles pour *P. cornucopiae* 32 et *P. cornucopiae* 19.

Par ailleurs, on retrouve de l'hexanal, dans les cultures de *P. ostreatus* JMO-95, *P. cornucopiae* 33 et *P. cornucopiae* 32. Les cultures de *P. cornucopiae* 19 produisent du benzaldéhyde. Par contre, les 3-méthylbutanal, 3-méthylbutanol et pentanol sont produits uniquement par *P. ostreatus* JMO-95 et *P. cornucopiae* 32.

Pour les espèces du genre *Morchella*, l'oct-1-én-3-ol est majoritaire, cette molécule représente 98,5% de la fraction aromatique totale pour *M. hortensis*, 83,6% pour *M. esculenta* et 56,4% pour *M. crassipes*. On note que *M. crassipes* présente le profil aromatique le plus diversifié ceci par la présence de limonène (15,9%), de myrcène et d' $\alpha$ -pinène.

Les composés présents à l'état de traces, n'ont pu être identifiés du fait de l'impossibilité d'interprétation des spectres de fragmentation ou de l'absence de ces structures dans les banques de spectres.

### 4.3. Arôme produit par les carpophores de Pleurotes

Les substances volatiles émises par le mycélium de Pleurotes cultivé sur support solide sont comparées à celles des carpophores correspondants (*P. ostreatus* JMO-95, *P. cornucopiae* 33 et *P. cornucopiae* 32), produits à l'INRA de Bordeaux.

#### 4.3.1. Evaluation olfactive de l'arôme

Une évaluation olfactive comparative de la qualité de l'arôme des 3 carpophores et des cultures mycéliennes sur support solide correspondantes a été réalisée. Cinq descripteurs odorants (note fongique, anisée, terreuse, fruitée et florale) ont été sélectionnés pour cette évaluation, en leur attribuant à chacun un chiffre de 1 à 3 selon les critères d'intensité de l'odeur.

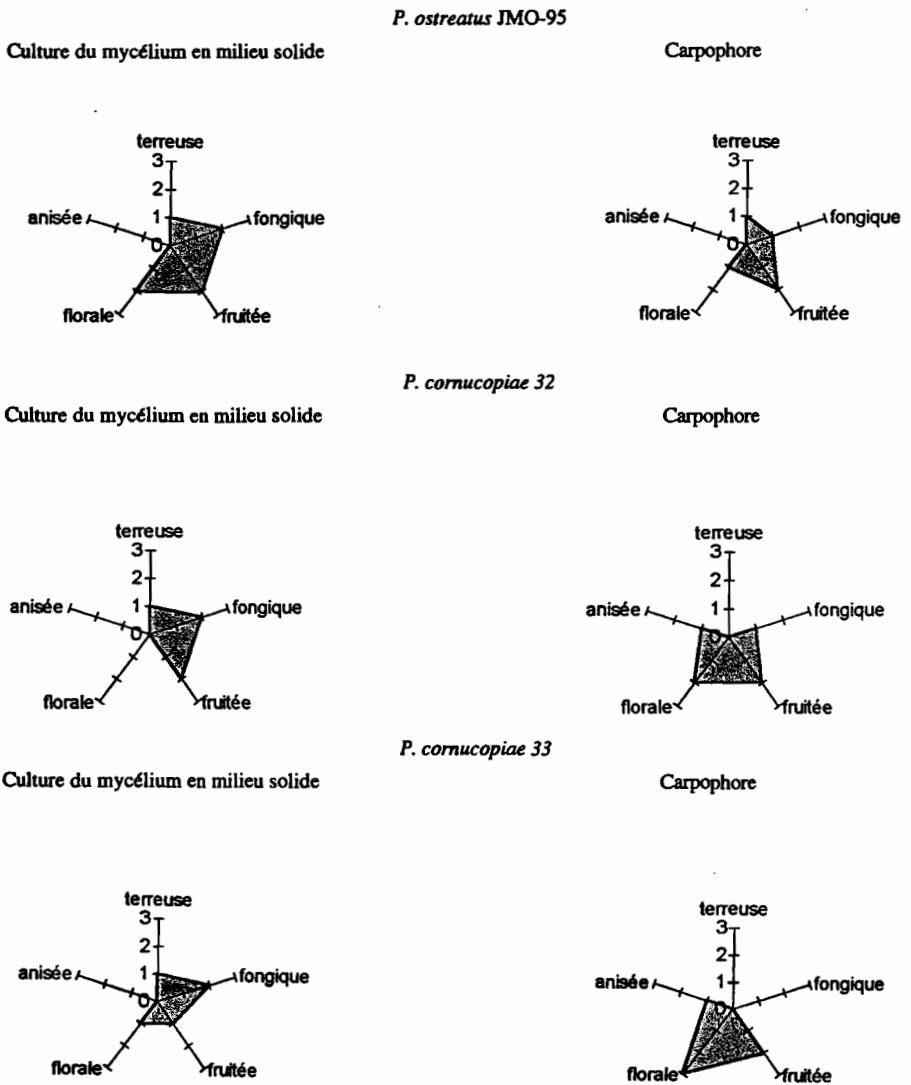


Fig. 4.1. Evaluation olfactive comparative des cultures mycéliennes et des carpophores correspondants de trois souches de *Pleurotus* 0: non odorant, 1: peu odorant, 2: moyennement odorant, 3: très odorant.

Il est apparu que l'arôme du carpophore de *P. ostreatus* JMO-95 présente une dominante fruitée, légèrement fleurie, terreuse et fongique. *P. cornucopiae* 33 présente en revanche une dominante fleurie, fruitée légèrement anisée avec cependant absence de la note fongique. Pour *P. cornucopiae* 32, les notes fleurie et fruitée dominent, les notes anisée et fongique sont plus légères. Parmi ces trois souches, seul le carpophore de *P. ostreatus* JMO-95 et le mycélium correspondant cultivé sur support solide présentent des odeurs similaires (Fig. 4.1.).

#### 4.3.2. Composition en produits volatils des carpophores de Pleurotes

Les résultats relatifs à la composition de l'arôme des trois carpophores sont présentés dans le tableau 4.10.

Pour *P. ostreatus* JMO-95, l'identification des molécules a été réalisée à deux stades différents : carpophore jeune et carpophore mature, ceci afin d'évaluer l'effet de l'âge du carpophore et de cerner au mieux sa composition en composés volatils. Pour les deux autres espèces, *P. cornucopiae* 32 et *P. cornucopiae* 33, l'identification des composés d'arôme a été réalisée uniquement au stade de carpophore mature.

On peut constater, que les compositions de l'arôme des carpophores de ces trois souches sont différentes. En effet, dans le cas de *P. ostreatus* JMO-95, ce sont les molécules à 8 atomes de carbone qui dominent, alors que pour *P. cornucopiae* 32 et *P. cornucopiae* 33, des molécules à structure terpénique sont majoritaires.

Pour *P. ostreatus* JMO-95, 8 molécules ont été identifiées. Aussi bien à l'état jeune qu'à l'état mature, l'octan-3-one a été la molécule majoritaire. Elle représente 80% de l'aire intégrée totale. L'octan-3-ol représente en moyenne 14,3%, alors que la proportion de l'oct-1-én-3-ol est très faible. Par ailleurs, la maturation du carpophore de *P. ostreatus* JMO-95, s'accompagne de légères modifications dans la composition de l'arôme, ceci par l'apparition de traces d'acide benzylique et d' $\alpha$ -pinène.

En comparant la composition de l'arôme produit par le carpophore de *P. ostreatus* JMO-95 à celle du mycélium correspondant (Tableaux 4.3. et 4.10.), on constate un rapprochement entre les deux, aussi bien par la qualité des molécules présentes que par leur proportion relative.

L'arôme du carpophore de *P. cornucopiae* 32 est dû à la présence d'au moins 13 composés terpéniques qui représentent plus de 75% de la fraction volatile. Les plus importants sont le sabinène, le  $\beta$ -pinène, le limonène, le cymène, le limonène et l' $\alpha$ -pinène. On peut noter également la présence de méthylanisole (11%) et d'autres composés non identifiés. Parmi la série des molécules à 8 atomes de carbone seuls l'oct-1-én-3-ol et l'octan-3-one sont retrouvés et représentent moins de 3% de la fraction volatile. Par ailleurs, l'arôme du carpophore de *P. cornucopiae* 33 est dû principalement à la présence de l' $\alpha$ -pinène (63,7%). En revanche, les

molécules en C8 présentes à des pourcentages très faibles, représentent moins de 8% de l'aire intégrée totale.

Tableau 4.10. Analyse comparative des principaux produits volatils des carpophores de Pleurotes en pourcentage.

Composés	IK	<i>P. ostreatus</i> JMO-95 jeune	<i>P. ostreatus</i> JMO-95 mature	<i>P. cornucopiae</i> 32	<i>P. cornucopiae</i> 33
2-méthylbutanal	639	0,18	-	-	-
2-méthylbutanol	721	4	1,6	-	-
octène	785	0,85	0,8	-	-
composé non identifié	788	-	-	-	2,5
composé non identifié	811	-	-	-	10,9
composé non identifié	818	-	-	-	1,5
$\alpha$ -thujène	928	-	-	1	-
$\alpha$ -pinène	<b>938</b>	-	tr	<b>11</b>	1,6
composé non identifié	942	-	-	-	0,5
monoterpène	960	-	-	0,6	-
monoterpène	965	-	-	0,3	-
oct-1-én-3-ol	965	0,6	1,6	0,3	-
<b>octan-3-one</b>	<b>966</b>	<b>78,7</b>	<b>80,2</b>	2,8	6,2
sabinène	972	-	-	23	1
$\beta$ -pinène	<b>979</b>	-	-	<b>18</b>	<b>63,7</b>
octan-3-ol	980	14,6	13,8	-	1,1
composé non identifié	999	-	-	-	5
<b>4-méthylanisole</b>	<b>1004</b>	-	-	<b>11</b>	0,2
$\alpha$ -terpinène	1013	-	-	0,2	-
p-cymène	1016	-	-	0,35	-
<b>limonène</b>	<b>1028</b>	-	-	<b>8,3</b>	4,4
$\beta$ -phellandrène	1028	-	-	2,35	tr
acide benzylique	1049	tr	0,6	-	-
$\gamma$ -terpinène	1053	-	-	2,6	-
composé non identifié	1081	-	-	-	0,8
linalol	1084	-	-	-	0,3
monoterpène	1124	-	-	4,9	-
composé non identifié	1138	-	-	9,6	-
monoterpène	1157	-	-	2,9	-

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : composé absent.

#### 4.4. Discussion

L'ensemble des résultats présentés ci dessus montrent que le mycélium des différentes souches de Morilles et de Pleurotes est non seulement capable de coloniser le support solide mais également de produire les molécules impliquées dans l'arôme champignon. Pyysalo et Suihko (1976) ont étudié la composition aromatique du carpophore de 7 espèces de champignons comestibles. Ils ont montré que des molécules à 8 atomes de carbone sont principalement responsables de l'arôme champignon. Les proportions entre ces molécules peuvent à elles seules expliquer les différences d'arômes entre espèces. Ces mêmes auteurs ont également montré que le seul fait de mélanger les molécules en C8 en proportions adéquates permettait de recréer artificiellement l'arôme de *Boletus edulis*, d'*Agaricus bisporus* et de *Lactarius*.

L'octan-3-one et l'oct-1-én-3-ol ont des caractéristiques olfactives distinctes ce qui expliquerait les différences olfactives perçues entre les deux genres étudiés. Par contre les disparités qualitatives et semi quantitatives dans la distribution des molécules minoritaires ayant un potentiel odorant, peuvent apporter des caractéristiques olfactives différentes pour l'arôme produit par les souches du même genre.

En effet, l'octan-3-one se révèle être la molécule majoritairement présente dans la fraction volatile des différentes souches du genre *Pleurotus*. L'odeur de cette molécule a été décrite comme étant sucrée (Cronin et Ward, 1971), fruitée à concentration faible ou moisie à concentration élevée (Pyysalo et Suihko, 1976).

L'oct-1-én-3-ol est le composé le plus important associé à l'arôme " champignon frais ". Cette molécule est généralement présente à des proportions importantes par rapport aux autres molécules C8. Cet alcool présente un carbone asymétrique. De ce fait, l'oct-1-én-3-ol existe sous deux formes énantiomériques (R et S) qui présentent des notes aromatiques différentes : note herbeuse, verte, moisie et moins intense pour l'isomère S, forte odeur de champignon, fruité et suave pour l'isomère R (Mosandl et al., 1986 ; Talou et al., 1995). Seule la forme R a été identifiée par Tressl et Engel (1982) aussi bien dans le mycélium que dans les fructifications de différents champignons.

Par ailleurs, les molécules en C8, présentes dans des proportions plus ou moins importantes dans les différentes cultures ont des impacts olfactifs très intéressants. Ces molécules peuvent apporter des spécificités aromatiques aux cultures dans lesquelles elles apparaissent. Ainsi, l'odeur de l'oct-1-én-3-one évoque le champignon, l'octan-3-ol apporte une note douce herbacée et de noisette, l'octanal présente une odeur orangée miellée.

L'octa-1,3-diène présent à l'état de traces dans les cas de *P. ostreatus* JMO-95 est un composé rarement rencontré parmi les molécules qui constituent les arômes des champignons supérieurs.

Des molécules autres que les C8 ont été également identifiées. On note en particulier la présence de limonène, d' $\alpha$ -pinène et de myrcène dans les cultures de *M. crassipes*. Ces composés terpéniques sont caractéristiques des huiles essentielles. Le limonène a une odeur plaisante citronnée, le myrcène est caractéristique de la fraction volatile du houblon. Toutefois, ces hydrocarbures apportent une faible contribution à l'arôme due à leur pouvoir odorant peu important. D'après Maarse (1991), les seuils de détection de ces terpènes, déterminés dans l'eau à 20°C et exprimés en  $\mu\text{g/l}$  sont élevés par rapport aux molécules à 8 atomes de carbone : 1000 pour l' $\alpha$ -pinène, 210 pour le limonène, et 42 pour le myrcène. Alors que pour l'oct-1-én-3-ol le seuil de détection est compris entre 1,4-10  $\mu\text{g/l}$ .

L'hexanal, fréquemment rencontré dans les cultures de mycélium et dans les carpophores, dérive de la dégradation enzymatique de l'acide linoléique via l'hydroperoxyde en C13. Ce composé apporte une odeur verte, d'herbe coupée, légèrement fruitée.

Le mycélium des différentes souches de Pleurotes a été cultivé également en milieu liquide (J. Guimberteau, communication personnelle). Les résultats ont montré que la composition de l'arôme diffère de celle obtenue sur support solide. En fonction des espèces, 3 molécules sont présentes à des pourcentages importants : oct-1-én-3-one, octan-3-one et oct-1-én-3-ol.

Dans le cas de *P. cornucopiae* 19, deux molécules sont majoritaires : oct-1-én-3-one (23,3%) et octan-3-one (22%).

Pour *P. cornucopiae* 32, oct-1-én-3-one et oct-1-én-3-ol sont majoritaires. L'octan-3-one ne représente que 8% de la fraction volatile.

Pour *P. ostreatus* JMO-95, l'octan-3-one représente 38,5% alors que l'oct-1-én-3-ol représente 36,2% de l'aire intégrée totale.

De plus cette étude, a montré que *P. cornucopiae* 32 et *P. cornucopiae* 33 sont les deux souches les plus performantes en terme de production d'arômes, l'odeur dégagée par les cultures est suave. Par contre, la souche *P. ostreatus* JMO-95 cultivée en milieu liquide ne produit presque pas de composés volatils. En revanche, l'analyse de la composition de l'arôme de cette souche sur milieu gélosé met en évidence la présence d'anisaldéhyde. De ce fait, elle offre un potentiel aromatique intéressant à exploiter.

En ce qui concerne les trois souches de Morilles cultivées en surface, la comparaison des intensités aromatiques par évaluation sensorielle au cours du temps, a permis de classer *M. crassipes* comme étant la souche la plus aromatique, *M. hortensis* a été classée en second et enfin *M. esculenta* (Bensoussan et al., 1995). Le mycélium de *M. crassipes* retenu pour ses qualités organoleptiques a été cultivé en milieu liquide. Les résultats ont montré que la composition du milieu de culture pouvait avoir une incidence sur la composition de l'arôme.

Dans le cas des Pleurotes, bien que le mycélium des différentes espèces cultivé sur support solide, présente une grande uniformité dans la nature des composés odorants, des différences importantes sont observées par rapport à la composition des extraits aromatiques des carpophores.

Pour *P. cornucopiae* 33, la molécule majoritaire est le  $\beta$ -pinène. Pour *P. cornucopiae* 32, divers terpènes sont présents à des pourcentages conséquents. Ces molécules sont retrouvées dans les fructifications de diverses espèces, 17% de  $\beta$ -pinène et 13% d' $\alpha$ -pinène dans l'arôme de *Gomphidius glutinosus* et 11,2% de l'arôme de *Tricholoma caligatum* (Breheret et al., 1997). L'oxyde de linalyl est considéré comme le composé clé de l'arôme des carpophores de *Lepista nuda* et *Clitocybe nebularis* (Audoin et al., 1989).

La fraction volatile de carpophores de Pleurotes a été étudiée par plusieurs auteurs (Hong et al., 1986 ; Jung et Hong, 1991 ; Bano et Rajarathman, 1988). Des différences interspécifiques et intraspécifiques sont observées :

Pour *P. ostreatus*, l'oct-1-én-3-ol est majoritaire : cette molécule représente 67% de l'arôme du carpophore d'une souche de *P. ostreatus* (Hong et al., 1986), en revanche, Jung et Hong, (1991) observent pour d'autres souches de *P. ostreatus*, des proportions en oct-1-én-3-ol plus faibles respectivement 45% pour *P. ostreatus*, 41,5% pour *P. florida ostreatus ostreatus* et 26% pour *P. ostreatus* (Ae-Neutari). D'autre part, Bano et Rajarathman (1988) soulignent l'importance de la pentan-2-one, de la pentan-3-one, du butanoate de méthyle et des esters méthyliques, dans la fraction volatile de *P. flabellatus*. Les molécules à 8 atomes de carbone sont présentes à l'état de traces. Pour *P. sajor-caju*, oct-1-én-3-ol, octan-3-ol et octan-3-one représentent 71% de la fraction volatile.

La prédominance de l'octan-3-one dans notre étude est probablement due au procédé extractif utilisé. En effet, Fisher et Grosch (1987), en étudiant l'arôme du champignon de couche extrait par différentes techniques, notent que seule la technique headspace appliquée au carpophore montre que l'octan-3-one est majoritaire, alors que toutes les autres techniques d'extraction font apparaître que l'oct-1-én-3-ol est majoritaire. La concentration des effluves présente l'avantage de n'entraîner aucune modification chimique, tant au niveau de la préparation des échantillons que de l'étape de l'extraction. La composition de l'arôme obtenue serait donc plus proche de la composition réelle de l'arôme carpophore.

Enfin, la comparaison des profils aromatiques du mycélium et du carpophore de *P. ostreatus* JMO-95 a révélé de grandes similitudes au niveau qualitatif. Le mycélium présente, en outre, un profil plus élaboré que celui du carpophore, de même l'évaluation semi quantitative de l'arôme par la technique des effluves montre que l'aire intégrée totale est nettement supérieure à celle du carpophore étudié. Le cycle nécessaire à la fructification durant en moyenne 72 jours, avec un rendement de 8%, il est difficile d'envisager la production de carpophore, pour la production d'arôme. En revanche, la culture du mycélium, constituerait un excellent moyen pour la production de l'arôme Pleurote.

En ce qui concerne les trois souches de Morilles, il ne nous a pas été possible de disposer des carpophores étant donné que ces espèces échappent pour le moment à toute tentative de fructification contrôlée.

#### 4.5. Conclusion

Le mycélium des 4 espèces de Pleurote et des 3 Morilles cultivé sur support présente un excellent potentiel pour la production des composés de l'arôme champignon. Le mycélium de *P. ostreatus* JMO-95, produit une grande diversité de molécules en C8 selon des proportions qui se rapprochent de celles du carpophore correspondant.

Les différences observées dans la qualité de l'arôme produit par les cultures de mycélium des espèces étudiées du genre *Pleurotus* sont imputables à des différences dans la nature et la proportion des molécules à 8 atomes de carbone plutôt qu'à la présence de molécules autres que les C8. Par contre, au niveau carpophore, les différences sont attribuables à la nature des composés odorants : pour *P. ostreatus* JMO-95 ce sont les molécules à 8 atomes de carbone qui dominent alors que pour *P. cornucopiae* 32 et 33, les composés de nature terpéniques sont majoritaires.

Dans le cas des Pleurotes, notre hypothèse selon laquelle la production d'un arôme proche de celui du carpophore peut être réalisée à partir de la culture du mycélium est vérifiée en partie et uniquement pour la souche *P. ostreatus* JMO-95. En effet, pour cette souche, de nombreux composés aromatiques obtenus par culture mycélienne en FMS sont identiques à ceux présents dans le carpophore correspondant.

Les trois espèces de Morilles étudiées présentent des profils aromatiques pauvres en C8 où la molécule d'oct-1-én-3-ol est majoritaire et représente la quasi totalité de la fraction volatile.

De ces sept espèces de champignons nous retiendrons, uniquement le mycélium de *P. ostreatus* JMO-95 et celui de *M. crassipes* pour étudier la bioproduction d'arôme champignon par fermentation en milieu solide. Nous prendrons comme référence, la composition de l'arôme du carpophore de *P. ostreatus* JMO-95 (désigné par la suite *P. ostreatus*). Pour *M. crassipes* nous nous appuierons sur la qualité de l'arôme tant du point de vue quantitatif que qualitatif. Les expériences seront menées d'abord pour *P. ostreatus* puis elles seront appliquées à *M. crassipes*.

***Optimisation de la croissance de *P. ostreatus* sur support solide***

## 5. Optimisation de la croissance mycélienne de *P. ostreatus* sur support solide

Dans ce chapitre, l'effet de la source d'azote, de la source de carbone et du rapport massique carbone sur azote (C/N) sur la croissance et sur la production des composés de l'arôme par le mycélium de *P. ostreatus* sont étudiés. Ces paramètres ont déjà été rapportés dans la littérature pour leur influence sur la croissance et sur le développement typique des arômes (Gallois et al., 1990 ; Serrano-Carréon, 1992 ; Bensoussan et al., 1995 ; Belinky et al., 1994).

En tenant compte des résultats obtenus sur l'influence des différents facteurs, une étude cinétique a été entreprise pour évaluer le comportement du mycélium de *P. ostreatus* cultivé en FMS, sur support imprégné, en utilisant des cultures statiques en flacons. Cette étude nous a permis d'avoir une approche globale du mode de croissance, de la nature des molécules majoritaires principalement des C8, responsables de l'arôme carpophore, et de leur évolution dans le temps.

### 5.1. Effet de la source d'azote sur la croissance et sur la production d'arôme

La nature de la source d'azote, peut jouer un rôle important dans la croissance du mycélium (Roussos et al., 1997). Elle peut également affecter quantitativement les composés d'arôme formés, de même que leur nature, comme ceci a été observé pour *Lentinus lepideus* (Sprecher et Hanssen, 1985) et pour *Hypomyces chrysospermus* (Maignial, 1988).

Le choix de la source d'azote, a été influencé par des études bibliographiques relatives à la croissance des champignons en milieu liquide (Khanna et Garsha, 1990 ; Litchfield, 1967). Ainsi, cinq sources d'azote (urée, sulfate d'ammonium, asparagine, nitrate de sodium et peptone) ont été utilisées afin de sélectionner la mieux adaptée pour la culture de *P. ostreatus*.

Le mycélium de *P. ostreatus* a été cultivé sur bagasse de canne à sucre imbibée d'une solution nutritive contenant du glucose (30g/l), et une source azotée selon un rapport C/N constant de 10. Les cultures ont été incubées dans une étuve à l'obscurité et à 25°C pendant 8 et 14 jours.

#### 5.1.1. Effet sur les paramètres de culture

Les résultats relatifs à l'évolution du pH et à la consommation des sucres en cours de culture sont consignés dans le tableau 5.1.

Après 8 jours de culture, les valeurs de pH (tableau 5.1.) s'échelonnent entre 5,1 et 5,9 respectivement en présence du mélange urée sulfate d'ammonium et d'urée.

Roussos et al., (1997) ont mis l'accent sur l'influence de la source d'azote sur l'évolution du pH. Afin de palier à une acidification rapide du milieu de culture qui cause un arrêt précoce de la croissance mycélienne, ces auteurs préconisent une régulation endogène du pH, par l'utilisation d'un mélange urée, sulfate d'ammonium selon un rapport 50/50. Pour nos expériences, bien que nous ayons utilisé ce mélange, les valeurs de pH sont les plus faibles. En revanche en présence d'urée, le pH est le plus élevé.

Le dosage des nitrates a montré que leur assimilation par le mycélium de *P. ostreatus* est lente. Après 8 jours de culture seuls, 20% des nitrates initialement présents sont consommés.

L'utilisation du glucose est rapide et importante. Après 8 jours de culture, en moyenne 80% de glucose est consommé par le mycélium de *P. ostreatus* cultivé en présence d'urée, urée + sulfate d'ammonium, asparagine et peptone. Par contre, pour le milieu comportant le nitrate de sodium, la consommation du glucose après 8 jours de culture est faible.

Tableau 5.1. Effet de la source d'azote sur les paramètres étudiés à 8 et 14 jours de culture du mycélium de *P. ostreatus* sur support solide imprégné d'une solution nutritive contenant du glucose et différentes sources d'azote.

Source azotée	pH final		Glucose résiduel en g/l		Cumul des molécules en C8 (µg/gMSI)	
	8 j	14j	8 j	14j	8 j	14j
<b>Urée+Ammonium</b>	5,1	4,7	5,7	3,0	90,4	110
<b>Urée</b>	<b>5,8</b>	<b>5,4</b>	<b>5,8</b>	<b>4,0</b>	<b>127,0</b>	<b>116,43</b>
<b>Nitrate de sodium</b>	5,9	5,0	17,0	3,0	30,0	70,31
<b>Peptone</b>	5,7	5,5	6,9	3,8	121,2	137,4
<b>Asparagine</b>	5,5	5,4	5,8	5,4	84,6	191,7

### 5.1.2. Effet sur la production des molécules en C8

L'analyse des différents chromatogrammes obtenus à partir des extraits à l'hexane après 8 et 14 jours de culture de *P. ostreatus* en milieu solide sur support imprégné, montre que 3 molécules sont majoritairement présentes : oct-1-én-3-ol, octan-3-one et octan-3-ol. En additionnant ces différentes molécules C8 produites, on peut noter que leur concentration varie entre 30 et 127 µg/gMSI en fonction de la nature de la source d'azote (Tableau 5.1.). Des rendements similaires ont été obtenus pour le mélange urée-sulfate d'ammonium et pour l'asparagine. Les meilleures productions sont obtenues en présence d'urée et de peptone. Par contre en présence de nitrate, la production des molécules en C8 est faible. Par ailleurs, les concentrations des composés volatils obtenues à 14 jours de culture diffèrent de celles obtenues en 8 jours. La quantité des C8 produites augmente en présence des différentes sources d'azote à l'exception de l'urée. A 14 jours de culture, le meilleur rendement est obtenu en présence

d'asparagine (191,7 µg/gMSI). Ceci suggère que la durée d'incubation correspondant au maximum de production d'arôme est variable avec la nature de la source d'azote.

### 5.1.3. Effet sur la composition des effluves produites

La composition obtenue par analyse headspace de l'arôme produit par les cultures mycéliennes de *P. ostreatus* en présence des différentes sources azotées est présentée dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2. Effet de la source d'azote sur la composition de l'arôme de *P. ostreatus* cultivé sur support solide imprégné d'une solution minérale contenant du glucose et différentes sources d'azote pendant 14 jours.

Composé	Urée + Ammonium	Urée	Nitrate	Peptone	Asparagine	carphore mature
3-méthylbutanal	3,1	-	-	-	-	-
2-méthylbutanal	0,6	-	-	-	-	-
heptène	0,8	<b>0,06</b>	0,07	0,3	0,2	-
? Ik= 714	0,03	<b>0,06</b>		0,2	-	-
3-méthylbutanol	0,1	-	-	-	-	-
2-méthylbutanol	1,7	-	-	-	-	-
pentanol	-	-	traces	0,04	-	-
hexanal	-	<b>2</b>	4,4	4,6	2,9	<b>0,8</b>
octène	10,2	<b>3,9</b>	6,6	7,9	4,5	-
? Ik= 714	0,02	<b>0,02</b>	-	-	-	-
(Z)-octa-1,3-diène	0,8	<b>0,7</b>	0,5	0,7	0,3	-
(E)-octa-1,3-diène	0,9	<b>0,7</b>	0,3	0,6	0,2	-
Ik= 848	0,4	<b>0,7</b>	-	0,3	0,6	-
Ik= 863	0,02	<b>0,04</b>	-	0,1	tr	-
Ik= 865	0,02	<b>0,2</b>	-	0,04	-	-
α-pinène	-	<b>0,01</b>	traces	0,01	-	<b>traces</b>
oct-1-én-3-one	5,2	<b>3,9</b>	3	6,5	4,8	
<b>oct-1-én-3-ol</b>	<b>29,9</b>	<b>0,3</b>	<b>34,8</b>	<b>32,9</b>	<b>22,6</b>	<b>1,22</b>
<b>octan-3-one</b>	<b>36,5</b>	<b>72,5</b>	<b>42,8</b>	<b>28,6</b>	<b>49,9</b>	<b>72,5</b>
octan-3-ol	6,5	<b>11,3</b>	4,1	6,7	10,5	<b>12,6</b>
octanal	0;1	<b>0,04</b>	0,4	0,6	0,2	-
Ik= 1025	0,2	<b>0,2</b>	0,06	6,8	0,2	-

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale. - : composé absent.

En présence d'urée, l'octan-3-one est nettement majoritaire, et représente 72% de l'aire intégrée totale. Par contre, en présence de nitrate et du mélange urée+ammonium, deux molécules sont dominantes; octan-3-one et oct-1-én-3-ol, le rapport entre ces deux molécules est de 1,22. En présence d'asparagine, ce rapport est de 2,2. Par contre sur milieu peptone, la

proportion de l'octan-3-one est légèrement inférieure à celle de l'oct-1-én-3-ol. Le pourcentage de l'octan-3-ol est également variable en fonction de la nature de la source d'azote et s'échelonne entre 4,1% en présence de nitrate et 11,3% sur milieu urée.

D'autres molécules à 8 atomes de carbone oct-1-én-3-one, octanal, octène et *cis* et *trans*-octa-1,3-diène sont présentes à des pourcentages relativement faibles et sont diversement réparties en fonction de la source d'azote. L'octène représente 10% de l'aire intégrée totale sur urée-sulfate d'ammonium et 7,9% sur peptone. L'oct-1-én-3-one représente en moyenne 4,5% de l'aire intégrée totale. Les différences entre milieux sont toutefois peu importantes.

Des différences dans la composition de l'arôme sont également notées par rapport à d'autres molécules que celles en C8. En présence de sulfate d'ammonium, on peut noter une plus grande diversification de la composition de l'arôme notamment par la formation de molécules méthylées à 4 atomes de carbone. Toutefois, l'hexanal n'apparaît pas, alors qu'il est présent dans chacune des autres expériences.

Quelque soit la nature de la source d'azote, l'analyse headspace des effluves montre une prévalence des molécules à huit atomes de carbone. Cependant les proportions entre ces différentes molécules changent de manière significative suivant la nature de la source d'azote du milieu de culture.

#### **5.1.4. Comparaison entre arôme mycélium et arôme carpophore**

La composition de l'arôme change en fonction de la source d'azote. Les principaux composants de l'arôme présents dans le carpophore sont également produits par le mycélium à des proportions similaires quand celui-ci est cultivé en présence d'urée. En effet, en présence d'urée, et dans ce cas seulement, la proportion de l'octan-3-one est largement majoritaire, par rapport à l'ensemble de la fraction volatile obtenue par analyse headspace : les proportions de l'octan-3-ol et de l'oct-1-én-3-ol se rapprochent de celles détectées dans le carpophore. Par ailleurs, le mycélium cultivé sur support solide produit diverses molécules qui ne sont pas détectées au niveau du carpophore, mais qui contribuent à renforcer agréablement l'arôme produit.

On peut retenir que la source d'azote affecte aussi bien la quantité des molécules à 8 atomes de carbone que leurs proportions relatives.

Le temps de rendement maximal est variable en fonction de la source d'azote. Au bout de 8 jours de culture, le meilleur rendement est obtenu en présence d'urée (127 µg/gMSI), par contre à 14 jours de culture, la concentration en C8 atteint 190 µg/gMSI en présence d'asparagine.

La composition de l'arôme produit par le mycélium se rapproche de celle du carpophore, quand celui-ci est cultivé en présence d'urée qui constitue de ce fait la source

d'azote la mieux appropriée, pour la production d'arôme carpophore, dans le cadre de cette étude.

Les concentrations en C8 obtenues en 8 jours de culture, sont du même ordre de grandeur que celles obtenues après 14 jours. Nous nous efforcerons donc, de réduire par la suite le temps de fermentation à 8 jours, tout en étudiant l'effet de la source de carbone et du rapport C/N sur la production des composés aromatiques.

## 5.2. Effet de la source de carbone

L'influence de la source de carbone sur la production d'arôme a été étudiée sous l'aspect qualitatif et quantitatif chez deux espèces du genre *Ceratocystis* (Sanchez-Font et al., 1985). Un arôme fruité a été obtenu en utilisant comme source de carbone : du glucose, fructose, mannitol et saccharose. Il nous a paru donc intéressant de considérer l'effet de différentes sources de carbone sur la production des molécules à 8 atomes de carbone par le mycélium de *P. ostreatus* cultivé sur support solide. Afin d'étudier l'effet de la source de carbone sur la production de l'arôme de *P. ostreatus*, nous avons évalué quantitativement et qualitativement les productions en composés d'arôme en présence de six sources carbonées (glucose, fructose, maltose, mannitol, glycérol et saccharose) en utilisant l'urée comme unique source d'azote. La concentration initiale en sucre est de 30 g/l. Les résultats relatifs au pH et à la production des molécules en C8 sont reportés dans le tableau 5.3.

Tableau 5.3. Effet de la source de carbone sur les paramètres étudiés en cours de culture de *P. ostreatus* à 25°C pendant 8 jours cultivé sur support solide imprégné d'une solution nutritive contenant de l'urée.

Source de Carbone	pH	C8 (µg/gMSI)
<b>Glucose</b>	<b>5,8</b>	<b>115</b>
Fructose	5,7	90,6
Maltose	5,7	70,1
<b>Mannitol</b>	<b>6,1</b>	<b>118</b>
Glycérol	5,9	51
Saccharose	5,5	28,9

Le pH au bout de 8 jours de culture varie entre 5,5 dans le cas du saccharose et 6,1 pour le mannitol. La source de carbone affecte la quantité des molécules à 8 atomes de carbone. La concentration la plus élevée est obtenue en présence de glucose et de mannitol. En revanche en présence de saccharose le rendement en C8 est le plus faible. Par ailleurs, on peut observer que les meilleurs rendements en C8 sont notés pour des valeurs de pH élevées.

De plus, l'identification des composés d'arôme révèle une diversification moindre des composés par rapport aux cultures maintenues pendant 14 jours. Les molécules en C8

représentent 94% de la fraction volatile. Oct-1-én-3-ol et octan-3-one représentent en moyenne 85% de l'aire intégrée totale. Le rapport entre ces deux molécules varie entre 1,37 pour le glucose et le glycérol à 2,9 en présence de fructose. L'octan-3-ol représente 3,8% (glycérol) et 8,9% (fructose).

Tableau 5.4. Effet de la source de carbone sur la composition de l'arôme de *P. ostreatus* cultivé sur support solide imprégné d'une solution nutritive contenant de l'urée et différentes sources de carbone.

Composé	Glucose	Fructose	Maltose	Mannitol	Glycérol	Saccharose
3-méthylbutanal	1,2	2,5	2,2	0,5	2,3	1,1
2-méthylbutanal	0,4	0,7	0,5	0,08	0,5	0,2
3-méthylbutanol	-	-	0,07	-	-	-
2-méthylbutanol	-	-	0,05	-	-	-
hexanal	0,4	0,6	1	1,6	0,07	0,5
octène	-	-	0,4	0,4	0,45	-
? IK = 823	-	-	0,15	1,4	2,5	-
? IK = 834	-	-	0,1	0,1	0,1	-
oct-1-én-3-one	3,2	2,5	4,8	2,4	0,3	3,5
<b>oct-1-én-3-ol</b>	<b>36,2</b>	<b>21,4</b>	<b>26</b>	<b>27,9</b>	<b>35,9</b>	<b>33,4</b>
<b>octan-3-one</b>	<b>50</b>	<b>62,1</b>	<b>55,6</b>	<b>57,7</b>	<b>49,6</b>	<b>53,7</b>
<b>octan-3-ol</b>	<b>6,2</b>	<b>8,9</b>	<b>6,7</b>	<b>6,5</b>	<b>3,8</b>	<b>5,7</b>
oct-2-én-1-ol	0,9	-	0,2	0,2	0,45	-
octanal	-	-	0,1	tr	-	-

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : composé absent.

Les proportions des molécules obtenues en présence de ces sources de carbone sont différentes de celles du carpophore (1%, 70% et 15% respectivement pour l'oct-1-én-3-ol, l'octan-3-one et octan-3-ol). Ce résultat est non conforme à notre but. Il apparaît que 8 jours de culture selon nos conditions soient insuffisants pour reproduire l'arôme *P. ostreatus* par la culture du mycélium sur support solide. Cependant ceci dénote de l'aptitude de *P. ostreatus* à biosynthétiser une large gamme de molécules à 8 atomes de carbone dont les proportions varient en fonction des conditions de culture.

### 5.3. Effet du rapport Carbone/Azote

Le glucose et l'urée ont été retenus comme source de carbone et d'azote respectivement, trois rapports Carbone/Azote (C/N) ont été utilisés pour cette étude de la production d'arôme par *P. ostreatus*. Dans ces milieux de culture, la concentration en glucose est maintenue constante (30 g/l), seule la concentration initiale en urée varie. En effet selon Serrano-Carréon, (1992), pour une concentration de la source carbonée fixée, une diminution de la concentration en azote conduit à une augmentation du contenu total en lipides dans les cellules. De ce fait, une meilleure production des lipides est toujours associée à une faible synthèse en protéines. La synthèse des protéines est donc favorisée par des faibles rapports C/N, tandis que les rapports C/N élevés stimulent la production de lipides.

Les trois valeurs du rapport C/N étudiées ont été 10, 20 et 40. Notre objectif étant de produire l'arôme carophore en 8 jours de culture, il semblerait qu'en augmentant le rapport C/N, on stimulerait le métabolisme des lipides et par voie de conséquence, la formation des molécules issues du métabolisme des acides gras, comme cela a été démontré par Serrano-Carréon, (1992).

#### 5.3.1. Effet du rapport C/N sur les paramètres de culture

D'une manière générale, on note une augmentation progressive du pH jusqu'à 6 jours, suivie d'une diminution nette à 8 jours de culture (Fig. 5.1.A). L'augmentation de pH est en relation directe avec le rapport C/N et donc avec la quantité d'azote initiale dans le milieu. La baisse du pH en fin de fermentation peut être attribuée à la synthèse d'acides organiques.

#### 5.3.2. Effet du rapport C/N sur la formation des molécules en C8

L'analyse des chromatogrammes obtenus par extraction à l'hexane montre une évolution du profil aromatique. Des fluctuations dans les teneurs relatives de différentes molécules en C8 se produisent.

L'accumulation des molécules à 8 atomes de carbone augmente régulièrement au cours du temps. Le rapport C/N a peu d'incidence sur la vitesse d'accumulation des molécules en C8. Par contre à 8 jours de culture, les concentrations obtenues sont plus importantes pour le rapport 10 que pour 20 que pour 40. Ces différences sont cependant peu importantes (Fig. 5.1.C).

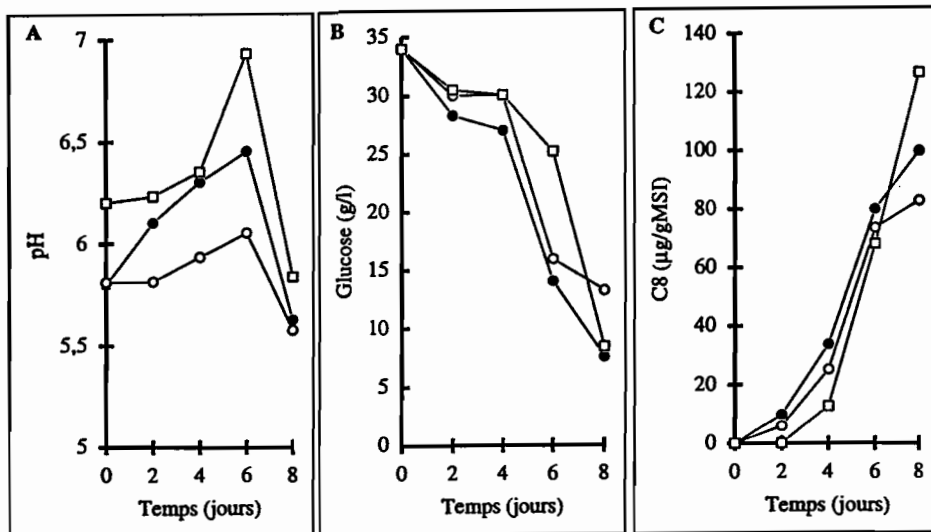


Fig. 5.1. Effet du rapport C/N sur l'évolution du pH (A), consommation du glucose (B) et formation des C8 (C) en cours de culture de *P. ostreatus* sur support solide imprégné d'une solution nutritive à base de glucose et d'urée (-○- 40, -●- 20, -□- 10).

### 5.3.3. Effet du rapport C/N sur la composition de l'arôme

L'analyse des effluves par headspace montre que la composition de l'arôme varie très peu en fonction du rapport C/N.

Tableau 5.5. Effet du rapport C/N sur la composition des effluves produites par *P. ostreatus* cultivé sur support solide imprégné d'une solution nutritive à base de glucose et d'urée.

Composé chimique	C/N 10	C/N 20	C/N 40
3-méthylbutanal	1,2	5,7	4,9
2-méthylbutanal	3,2	0,8	1
3-méthylbutanol	6,2	-	-
2-méthylbutanol	0,4	0,8	-
hexanal	-	1	6,3
octène	-	0,2	0,2
oct-1-én-3-one	-	2,2	1,5
oct-1-én-3-ol	36,2	35	37,2
octan-3-one	49,7	48,5	41,4
octan-3-ol	6,2	1,2	0,2
oct-2-én-3-ol	-	-	0,2

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : composé absent.

Les rapports octan-3-one/ oct-1-én-3-ol sont proches de 1 quelque soit le rapport C/N. Par contre, les proportions de l'octan-3-ol et celle du 3-méthylbutanol sont plus importantes pour le rapport 10. Un rapport C/N élevé n'est pas suffisant pour palier le facteur temps. En effet, l'arôme obtenu au bout de 8 jours de culture ne correspond toujours pas à celui du carpophore de *P. ostreatus*.

Il semble donc que la durée de culture est le facteur le plus important à contrôler. Dans le but de vérifier l'effet des durées de culture sur la composition de l'arôme, une étude cinétique est entreprise.

#### 5.4. Cinétique de croissance de *P. ostreatus*

Afin de mieux cerner l'évolution des paramètres de croissance et celle de la composition de l'arôme dans le temps, une étude cinétique est réalisée. Nous avons suivi la consommation du glucose, l'évolution de la teneur en eau, du pH et de la production des molécules majoritaires. Les résultats sont reportés sur la figure 5.2.

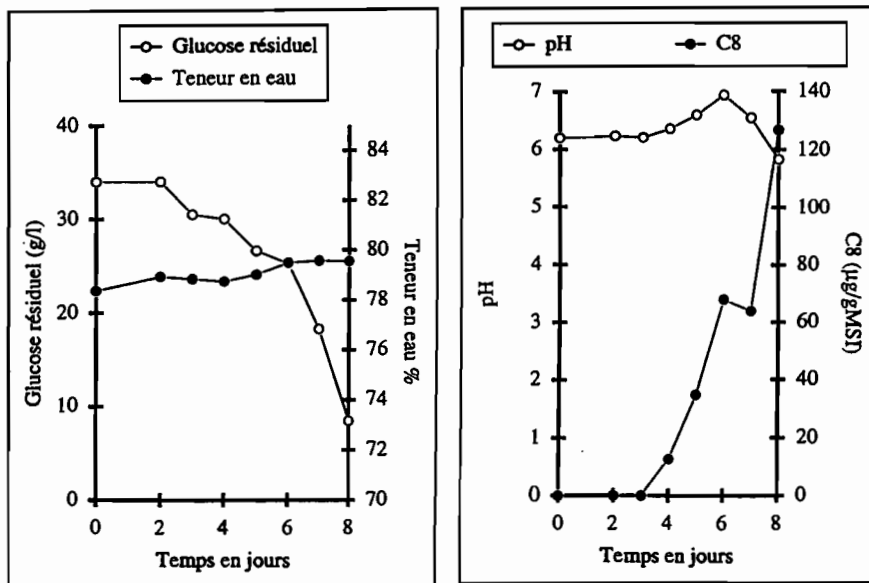


Fig. 5.2. Evolution des différents paramètres de culture au cours de la cinétique de croissance de *P. ostreatus* sur support solide imprégné d'une solution nutritive contenant du glucose et de l'urée selon un rapport C/N de 10.

#### 5.4.1. Evolution des paramètres physiques

On peut observer, que la consommation du glucose n'est importante qu'entre le 6ème et le 8ème jour de culture. Ceci coïncide avec la confluence totale des 3 colonies correspondant aux trois points d'inoculation et donc à l'envahissement complet du support.

L'humidité du support augmente de 2% environ après 8 jours de culture.

Le pH augmente de 0,8 unités pH au cours des 6 premiers jours, puis diminue brusquement d'une unité pH en fin de culture.

#### 5.4.2. Evolution de la quantité et de la qualité des molécules

La concentration des molécules à 8 atomes de carbone augmente progressivement en cours de culture jusqu'à atteindre 127 µg/gMSI après 8 jours de culture.

Des fluctuations importantes sont notées dans la composition de l'arôme au cours du temps. On peut noter en particulier l'évolution de 6 molécules : 3-méthylbutanal, 2-méthylbutanal, hexanal, benzaldéhyde, oct-1-én-3-ol et octan-3-one.

Par rapport à l'ensemble de la fraction volatile, les molécules méthylées à 4 atomes de carbone sont majoritaires durant les 5 premiers jours. Le 3-méthylbutanal représente 35 à 40% de l'aire intégrée totale, cette molécule présente une odeur herbacée, légèrement fruitée avec une odeur de noix. Le 2-méthylbutanal présente à une forte proportion le 5ème jour de culture apporte une odeur intense de cacao et de café (Marc, 1995). Le 3-méthylbutanal et le 2-méthylbutanal dérivent par transamination respectivement de la leucine et de l'isoleucine.

L'hexanal est présent à des pourcentages élevés (20%) en début de culture, sa proportion diminue au fur et à mesure du temps. En revanche le pourcentage du benzaldéhyde augmente de même que celui de l'octan-3-one.

En ce qui concerne les C8, la molécule d'oct-1-én-3-ol est initialement majoritaire, puis la proportion de l'octan-3-one augmente progressivement. Par ailleurs l'octan-3-ol n'apparaît qu'au 6ème jour de culture.

On peut constater que la maturation de l'arôme de *P. ostreatus* produit en milieu solide va dans le sens de la diminution de la proportion des molécules autres que les C8, avec une augmentation progressive de la proportion de l'octan-3-one et de l'octan-3-ol. Le vieillissement des cultures s'accompagne donc d'une plus grande contribution de l'octan-3-one à l'arôme. Des durées de culture plus longues que 8 jours semblent nécessaires pour approcher la composition de l'arôme carpophage *P. ostreatus*.

Tableau 5.6. Evolution de la composition de l'arôme en cours de culture du mycélium de *P. ostreatus* pendant 12 jours à 25°C sur support imprégné de milieu à base d'urée et de glucose selon un rapport C/N de 10.

Composés	IK	Durée d'incubation en jours								
		2	3	4	5	6	7	8	12	
3-méthylbutanal	634	-	28,1	40,1	30,8	35,5	26,8	1,2	-	
2-méthylbutanal	639	-	12,6	4,8	21,5	3,5	3,6	0,4	-	
pentanal	674	-	-	-	-	3,2	0,6	-	-	
composé non identifié	720	-	6	-	-	0,6	1,8	-	-	
composé non identifié	732	-	-	-	9	1,3	0,7	0,4	-	
hexanal	775	29,6	26,2	13,2	14,7	7,3	11,2	-	0,5	
octène	785	-	-	-	-	-	0,3	-	0,9	
composé non identifié	835	-	-	-	-	-	0,6	-	-	
benzaldéhyde	878	-	-	7	7,2	30,8	6,5	-	-	
oct-1-én-3-one	938	-	-	3,9	1,8	1,8	0,8	-	3,2	
oct-1-én-3-ol	956	69,4	7,8	23,3	10,2	13,4	5,8	36,2	33,9	
<b>octan-3-one</b>	<b>966</b>	<b>traces</b>	<b>3,8</b>	<b>6,5</b>	<b>11,6</b>	<b>1,4</b>	<b>33,9</b>	<b>49,6</b>	<b>51,2</b>	
octan-3-ol	980	-	-	-	-	-	4,3	-	7,5	
oct-2-énal	1032	-	-	-	-	-	-	-	0,3	
oct-2-énol	1049	-	-	-	-	-	-	-	1,2	

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : composé absent.

### 5.5. Discussion

Plusieurs auteurs évoquent la possibilité d'utiliser le mycélium de *Pleurotus* ou de *Morchella* pour la production d'un arôme champignon (Litchfield, 1967 ; Hadar et Dosoretz, 1991 ; Belinky et al., 1994). Cependant aucun des auteurs n'a réellement confronté la composition de l'arôme produit par le mycélium à celle du carpophore.

Pour le genre *Pleurotus*, nous avons pu constater que cette hypothèse n'est pas forcément valide pour toutes les espèces puisque le mycélium de *P. cornucopiae* 32 et celui de *P. cornucopiae* 33 cultivés sur support solide ou en milieu liquide produisent des arômes dont les compositions sont totalement différentes de celles des carpophores correspondants. Cette hypothèse a été cependant vérifiée dans le cas du mycélium de *P. ostreatus*. En effet, le mycélium de *P. ostreatus* cultivé sur support solide produit un arôme dont la composition chimique est similaire à celle du carpophore.

En fonction des sources d'azote et de carbone, les concentrations des molécules en C8 sont différentes. Des différences peuvent également être induites dans la nature des molécules chimiques responsables de l'arôme et dans leurs proportions relatives. En revanche l'augmentation du rapport C/N n'a pas eu l'effet escompté à savoir une stimulation plus rapide du métabolisme des lipides et donc un meilleur rendement en C8.

De plus, l'étude de l'évolution de la composition chimique de l'arôme a montré que celle-ci changeait de manière significative au cours du temps. Ceci se traduit par la diminution de la proportion des molécules autres que les C8, et par l'augmentation progressive des proportions de l'octan-3-one et de l'octan-3-ol. On peut rappeler que ces deux molécules sont spécifiques à l'arôme du carpophore de *P. ostreatus*.

La conformité dans les proportions des molécules à 8 atomes de carbone entre l'arôme produit par le mycélium et celui produit par le carpophore est importante pour deux raisons. La première, est que ces différentes molécules, de par leur impact olfactif, n'ont pas la même contribution à l'arôme : dominante fongique pour l'oct-1-én-3-one et l'oct-1-én-3-ol, dominantes fruitée et fleurie pour l'octan-3-one et l'octan-3-ol. La seconde raison est que ces molécules présentent des seuils de perception très différents. On peut souligner que l'octan-3-one présente un seuil de perception très élevé par rapport à ceux de l'oct-1-én-3-ol et de l'oct-1-én-3-one (Pyysalo et Suihko, 1976 ; Fischer et Grosch, 1987 ; Maarse, 1991). Des différences de proportions relatives des molécules à 8 atomes de carbone induisent certainement des variations importantes dans les qualités organoleptiques des cultures. La large prépondérance de l'octan-3-one et l'apparition de l'octan-3-ol seraient importantes pour recréer la spécificité de l'arôme carpophore de *P. ostreatus*.

De cette étude on peut retenir que les sources d'azote et de carbone influent sur la croissance et sur la production des composés volatils, par le mycélium de *P. ostreatus* sur support solide. Ceci nous a permis de sélectionner l'urée et le glucose respectivement comme source d'azote et de carbone. Par ailleurs, nous avons constaté, que pour le même milieu de culture, la composition de l'arôme change en fonction du temps.

Au cours de ce chapitre, nous avons observé que le mycélium de *P. ostreatus* cultivé sur support solide produit un arôme dont la composition se rapproche de celle du carpophore.

La concordance entre l'arôme du carpophore et celui du mycélium nécessite un temps de culture de 14 jours. Nous tenterons cette fois-ci, d'étudier l'effet du mode d'inoculation afin d'accélérer la croissance du mycélium de *P. ostreatus* cultivé sur support et la production d'un arôme dont la composition se rapproche de celle du carpophore en un temps de culture moins long.

***Physiologie de la croissance de P. ostreatus cultivé en FMS sur support***

## 6. Physiologie de croissance de *P. ostreatus* cultivé en FMS sur support

Au chapitre précédent, il a été démontré la faisabilité de production d'un arôme Pleurote par la culture du mycélium de *P. ostreatus*. Seulement, les durées de culture nécessaires à l'obtention de l'arôme carpophore sont particulièrement longues. Une durée de 14 jours de culture est nécessaire pour atteindre notre objectif.

Afin d'accélérer la croissance du champignon et l'envahissement rapide des surfaces, une inoculation appropriée du support solide doit être utilisée. De plus, la FMS est un procédé réalisé habituellement dans des conditions non stériles. De ce fait, et afin d'imposer une microflore sélectionnée, il est important de maîtriser la qualité de l'inoculum dès le début de la fermentation. En effet, les contaminants éventuels pourraient empêcher le développement du champignon, altérant aussi bien la croissance du mycélium que les qualités organoleptiques des produits fermentés.

Le suivi des fermentations, par l'analyse des effluents gazeux en sortie des fermenteurs nous permet d'établir des courbes de croissance. En effet, l'adhérence des champignons filamenteux au substrat rend difficile l'estimation de la biomasse par des méthodes classiques (Roche et *al.*, 1993). Nous utiliserons la technique de respirométrie par l'analyse et le suivi des gaz issus de la FMS pour observer l'évolution de la croissance mycélienne d'une manière indirecte. Les teneurs en dioxyde de carbone et en oxygène, effluents de la fermentation sont en effet directement liées à l'activité microbienne (Raimbault, 1980 ; Oriol, 1987 ; Saucedo-Castañeda, 1991 ; Trejo-Hernandez, 1992 ; Perraud-Gaime, 1995). Ces analyses de gaz à la sortie des fermenteurs permettent de suivre les différentes phases de fermentation *in situ*, en continu et de façon non destructive (Saucedo-Castañeda et *al.*, 1993). Le but de ce chapitre est également de vérifier l'effet de l'aération sur la croissance et sur la production d'arôme par le mycélium de *P. ostreatus* cultivé en FMS.

### 6.1. Influence de l'inoculum

Le mycélium de *P. ostreatus* présente une croissance apicale relativement faible. Celle-ci est 5 fois inférieure aux vitesses de croissance d'autres champignons filamenteux, notamment *Trichoderma spp.* qui est un antagoniste des Pleurotes (Roussos, 1985 ; Olivier et *al.*, 1991). Il est dès lors impératif d'imposer rapidement, par des conditions d'inoculation adéquates, le mycélium du champignon étudié. Les conditions d'inoculation, doivent être, par ailleurs, à la fois reproductibles et transposables à une échelle industrielle. D'autre part, la composition de l'arôme dépend de l'âge des cultures : par une inoculation appropriée, il est possible d'accélérer la croissance de *P. ostreatus* et donc l'obtention de l'arôme carpophore en un temps moins long. Dans ce chapitre l'origine, le taux et l'âge de l'inoculum sont étudiés.

### 6.1.1. Effet de l'origine de l'inoculum

L'inoculum peut être obtenu à partir de trois types de cultures : culture sur support, culture liquide ou encore culture en surface sur milieu gélosé. Etant donné qu'il nous a été difficile de déterminer la quantité de biomasse de *P. ostreatus* cultivé sur support solide, la quantité d'inoculum a été fixée arbitrairement à 10 g pour 80 g de support quelque soit le type de culture. Les trois inocula sont désignés en fonction de leur origine : CG (culture sur gélose), CS (culture sur support) et CL (culture liquide).

**Inoculum CG** : De petits morceaux de gélose envahis de mycélium sont prélevés sur une culture entretenue dans une boîte de Pétri et dispersés dans le support imprégné stérile. C'est la technique que nous avons utilisé jusque là pour les cultures en flacons.

**Inoculum CS** : L'inoculum est prélevé sur une culture préalable en FMS entretenue sur support. Il s'agit dans ce cas de bagasse "activée" totalement envahie de mycélium et mélangée au support imprégné stérile. Ce mode d'inoculation est habituellement utilisé pour la production de blancs de champignon, il a été également mis au point pour l'espèce *P. cornucopiae* (Roussos et al., 1997).

**Inoculum CL** : L'inoculum est préparé en culture liquide agitée, le mycélium est récupéré, ensuite il est broyé pendant 30 secondes à l'Ultra-turrax, puis il est dispersé dans le support imprégné stérile. Ce protocole a été utilisé par Launay (1989) pour la culture de différentes espèces de morilles en FMS.

L'effet de l'origine de l'inoculum sur la vitesse de formation et de production de CO<sub>2</sub> au cours des fermentations est présenté sur la figure 6.1.

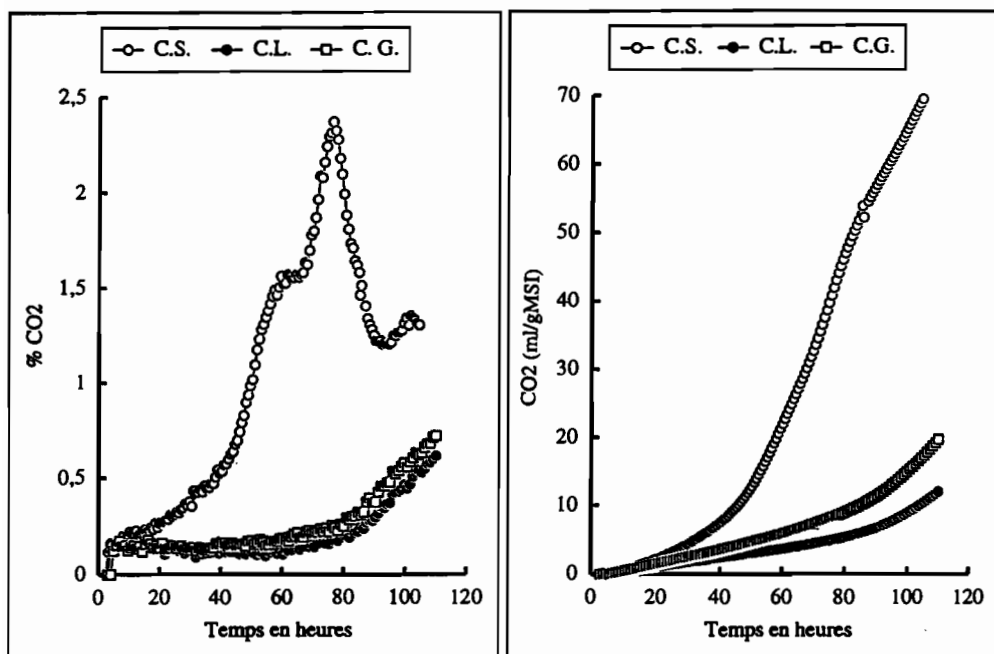


Fig. 6.1. Effet de l'origine de l'inoculum sur la production et sur l'accumulation de  $\text{CO}_2$  au cours de la culture de *P. ostreatus* en FMS pendant 110 heures à  $25^\circ\text{C}$  à une aération forcée de 600 ml/ heure/ colonne ( $\square$  C.G.,  $\circ$  C.S.,  $\bullet$  C.L.).

Tableau 6.1. Effet de l'origine de l'inoculum sur les paramètres de culture de *P. ostreatus* cultivé en FMS à  $25^\circ\text{C}$  et à une aération de 600 ml/ heure/ colonne pendant 7 jours.

Origine de l'inoculum	pH final	Glucose consommé en %	Colonisation	$\text{CO}_2$ (ml/gMSI) à 110 heures	Impression olfactive
Gélose	5,8	33	moyenne	19,8	sucrée
Solide	5,5	84	excellente	74,5	sucrée
liquide	5,9	40	moyenne	12,0	sucrée

Les profils respirométriques des trois cultures CG, CS et CL montrent que l'allure générale des courbes de croissance dépend directement de l'origine de l'inoculum. En effet, on observe que dans le cas de l'inoculum CS, le démarrage de la fermentation est immédiat. La phase exponentielle de croissance se situe entre 40 heures et 60 heures. Elle est suivie d'un palier de production de  $\text{CO}_2$  entre 60 et 63 heures puis d'une reprise de la croissance entre 63 et 90 heures. Le pic de production de  $\text{CO}_2$  se produit à 76 heures de culture.

A 90 heures, on observe un léger décrochement dans la phase descendante du pic de  $\text{CO}_2$ . Cet épaulement est probablement dû à l'utilisation de substrats carbonés autres que le glucose. A 110 heures de croissance, l'accumulation de  $\text{CO}_2$  est de l'ordre de 74,3 ml/gMSI.

Les courbes de respirométrie obtenues pour les deux inocula CG et CL se superposent. La croissance n'est amorcée qu'après 80 heures de temps de latence. Soit 6 heures après que la croissance se soit terminée pour un inoculum CS, de plus l'accumulation de CO<sub>2</sub> est très faible. Elle est de 12 ml/gMSI pour l'inoculum CL et 19,8 ml/gMSI pour l'inoculum CG.

L'inoculum obtenu à partir d'une culture sur support solide "bagasse activée" est donc le mieux approprié pour amorcer la culture du mycélium de *P. ostreatus* sur support solide. Au vu de ces résultats, il apparaît que la croissance du mycélium de *P. ostreatus* dure approximativement 3 jours si l'inoculum est de type bagasse activée.

L'appréciation sensorielle de l'arôme a montré que l'odeur dégagée est différente de celle habituellement obtenue en cultures en flacons. Une forte dominante sucrée anisée est notée.

### 6.1.2. Effet du taux d'inoculation sur le démarrage de la FMS

Le taux d'inoculation est exprimé en pourcentage du ferment (bagasse activée) par rapport au support solide imprégné stérile. Les taux d'inoculation testés sont 5%, 10%, 15% et 20%. L'effet du taux d'inoculation sur la production de CO<sub>2</sub> au cours des fermentations est présenté sur la figure 6.2.

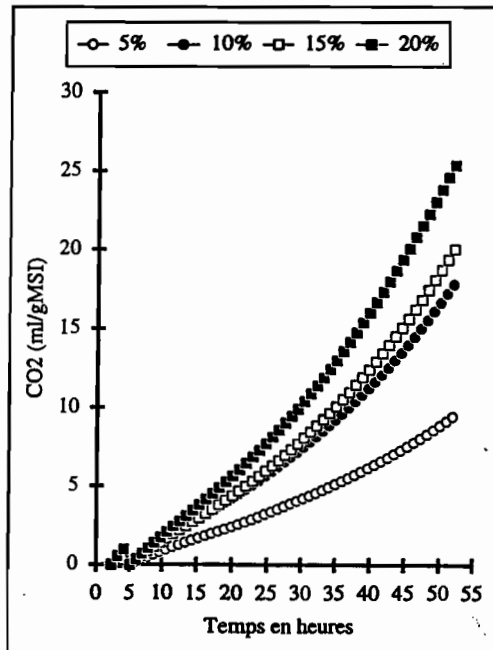


Fig. 6.2. Effet du pourcentage de l'inoculum sur le démarrage des FMS pendant les premières 55 heures de culture de *P. ostreatus* à 25°C à une aération de 600 ml/ heure/ colonne (○ 5%, ● 10%, □ 15%, ■, 20%).

Nous avons limité l'analyse respirométrique aux premières 55 heures de fermentation afin de mieux apprécier l'effet du pourcentage d'inoculation sur le démarrage des cultures. Les résultats montrent que le démarrage de la fermentation est directement lié au taux d'inoculation utilisé. En effet, une diminution progressive de la phase de latence est notée au fur et à mesure de l'augmentation du pourcentage d'inoculation.

Il en ressort donc, que l'utilisation de pourcentages élevés d'inoculum 15% et 20% permet de réaliser un ensemencement homogène du substrat solide. Ce qui assure une colonisation uniforme et une prise en masse rapide du support solide, et pourrait ainsi contribuer à empêcher le développement de contaminants.

### 6.1.3. Effet de l'âge de l'inoculum

Afin d'évaluer l'effet de l'âge de l'inoculum sur le déroulement de la FMS, des ferments d'âges différents ont été testés : 7j, 15j et 21 jours, le taux d'inoculation est de 15%. L'effet de l'âge de l'inoculum sur le déroulement des fermentations est illustré dans la figure 6.3.

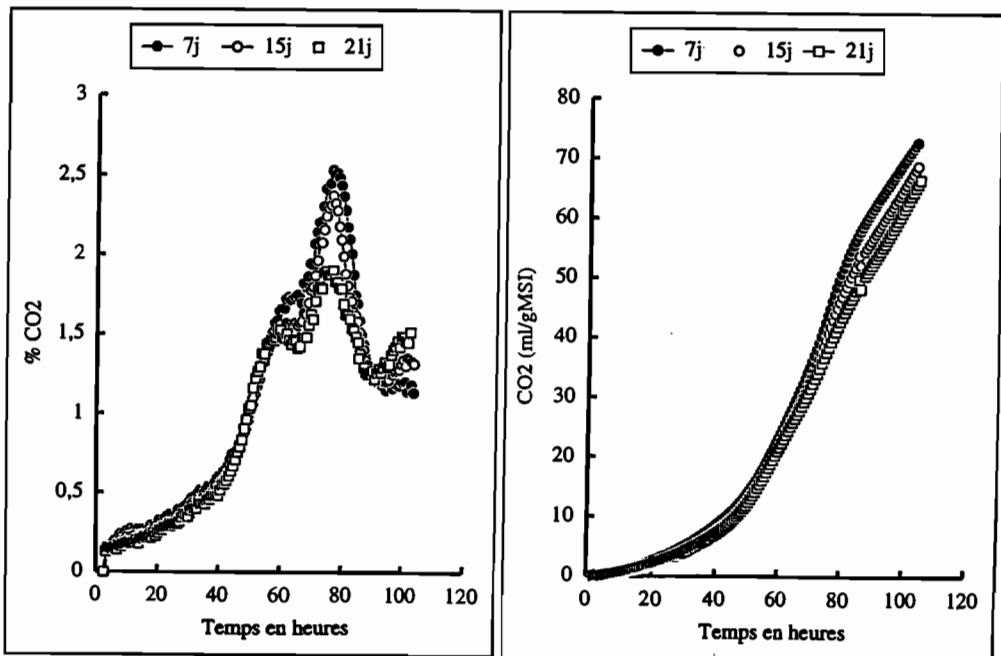


Fig. 6.3. Effet de l'âge de l'inoculum sur la production et sur l'accumulation de CO<sub>2</sub> au cours de la culture de *P. ostreatus* en FMS pendant 110 heures à 25°C et à une aération forcée de 600ml/ heure/ colonne (● 7 jours, ○ 15 jours, □ 21 jours).

Tableau 6.2. Effet de l'âge de l'inoculum sur différents paramètres après 7 jours de culture de *P. ostreatus* à 25 °C à une aération forcée de 600ml/ heure/ colonne.

Age Inoculum	Temps de latence en heures	CO <sub>2</sub> à 100 heures (ml/gMSI)	pH	C8 (µg/gMSI)	Anisaldéhyde (µg/gMSI)
7 jours	10	77,3	5,5	37	400
14 jours	10	74,2	5,2	42	527
21 jours	10	71,4	5,6	30	400

Les trois courbes de croissance se superposent, montrant ainsi que les trois ferments utilisés se comportent d'une manière identique, ceci suggère que l'âge de l'inoculum n'a aucune influence sur le déroulement de la FMS. Ce résultat particulièrement intéressant, confirme que le mycélium de *P. ostreatus* conserve sa viabilité même sur des périodes de cultures prolongées.

Il semble que le mycélium dispose d'une autre source de carbone que le glucose apporté par le milieu de culture. En effet l'espèce *P. ostreatus* est référencée comme un agent de la pourriture blanche, il est vraisemblable qu'en culture prolongée, le mycélium attaque les parois cellulaires de la bagasse de canne à sucre, ceci expliquerait le maintien de la viabilité du mycélium.

Par ailleurs, l'évaluation sensorielle de la qualité de l'arôme nous a permis de constater que celle ci est différente de celle obtenue au cours de la culture en flacons. En cultures en flacons, nous observions une dominante zestée et fongique, alors qu'en cultures aérées, la dominante est sucrée et anisée. En effet, en plus de la production des molécules en C8, on assiste à la formation d'anisaldéhyde à des concentrations très importantes qui devient de ce fait la molécule majoritaire, formée par le mycélium de *P. ostreatus* sur support solide en conditions aérées (Tableau 6.2).

L'anisaldéhyde peut être formé selon deux voies : soit à partir de la désamination de la phénylalanine ou de la tyrosine, soit à partir de la dégradation des composés phénoliques dérivant de la lignine. Compte tenu de la composition du milieu de culture et de celle de la bagasse de canne à sucre qui comporte 11% de lignine, on pourrait supposer que l'anisaldéhyde est formé suite à l'attaque des parois végétales des cellules de la bagasse de canne à sucre par le mycélium de *P. ostreatus*. En effet l'anisaldéhyde a été identifié dans les cultures mycéliennes de différents microorganismes, dont *Pleurotus sp.*, *Ischnoderma benzoinum*, *Bjerkandera adusta* et *Lentinus lepideus* (§ 2.1.6.2). Ces différents champignons sont des représentants d'espèces connues pour s'attaquer au bois en dégradant la lignine. La formation d'anisaldéhyde par *P. ostreatus* en cultures aérées serait corrélée à cette aptitude. De même le décrochement observé, dans la phase descendante de production de CO<sub>2</sub> serait également lié à la dégradation des composés lignocellulosiques des cellules végétales de la bagasse de canne à sucre.

#### 6.1.4. Conclusion

Il apparaît que pour imposer le mycélium de *P. ostreatus* cultivé sur support solide, il est important de disposer d'un inoculum qui soit homogène et reproductible. Les résultats montrent clairement que la qualité de l'inoculum intervient dans le démarrage des fermentations. Une diminution importante dans le temps de latence est observée pour un inoculum obtenu à partir d'une culture solide. Par ailleurs, ce type d'inoculum nous permet de nous affranchir des risques liés à la manipulation de l'inoculum, entre autre, la perte de viabilité des hyphes après homogénéisation à l'Ultra-turrax du mycélium provenant des cultures en milieu liquide.

Une inoculation massive avec un pourcentage d'inoculation élevé contribue à diminuer sensiblement le temps de latence. Un pourcentage d'inoculation de 15% paraît adéquat et suffisant pour imposer le mycélium de *P. ostreatus* sur support solide.

Enfin, l'utilisation de trois ferments ayant un âge différent nous a permis de démontrer que pour cette souche, l'âge de l'inoculum n'a pas d'influence sur le déroulement de la fermentation.

L'analyse de la composition de l'arôme fait apparaître un résultat très intéressant concernant la production de l'anisaldéhyde en cultures aérées.

## 6.2. Effet des paramètres physiques

Trois paramètres physiques, l'humidité, l'aération et la lumière peuvent avoir une incidence importante sur le développement du mycélium des champignons cultivé sur support solide. En effet Roussos *et al.*, (1997) ont mis l'accent sur l'effet de la lumière sur le développement du mycélium de *P. cornucopiae* et ont observé un phénomène de découplage énergétique par rapport à la présence ou à l'absence de lumière. D'autres auteurs ont démontré le rôle important que joue la teneur en eau du support solide par son influence sur le métabolisme des champignons (Zadrazil et Brunnert, 1981). De plus la composition de la phase gazeuse et le flux d'air traversant les milieux de culture influencent fortement le métabolisme (Highley *et al.*, 1983 ; Levanon-Munoz et Bone, 1985).

Afin d'étudier l'influence de ces trois paramètres, sur la croissance et sur la production d'arôme par le mycélium de *P. ostreatus* cultivé sur support solide, une série d'expérience a été mise en oeuvre.

Dans le tableau 6.3. sont représentés les niveaux codés des facteurs. Dans le tableau 6.4. sont représentées les valeurs codées et réelles des 3 facteurs étudiés. Dans les tableaux 6.5. sont regroupées les réponses mesurées pour les différentes expériences après 6 jours de fermentation. L'effet des 3 paramètres sur l'évolution du CO<sub>2</sub> est représenté dans la figure 6.4., l'effet sur la composition de l'arôme dans les tableaux 6.5 et 6.6.

Tableau 6.3. Valeurs codées des trois facteurs.

Expérience N°	Niveau des facteurs		
	F1	F2	F3
1	-1	+1	+1
2	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1
4	-1	-1	-1
5	+1	+1	+1
6	+1	+1	-1
7	+1	-1	+1
8	+1	-1	-1

Tableau 6.4. Relation entre les niveaux codés et les valeurs réelles des facteurs étudiés.

Facteurs	Niveaux réels des facteurs	
	-1	+1
F1 Lumière	Obscurité	Cycle diurne
F2 Aération, ml/min	5	15
F3 Humidité %	70	78

6.2.1. Effet sur la croissance

L'effet des différents paramètres physiques sur la croissance est présenté sur la Fig. 6.4. Globalement on constate que l'allure générale des courbes de croissance n'est pas affectée par les conditions de culture. La croissance mycélienne débute très rapidement et présente 2 pics de production de CO<sub>2</sub>.

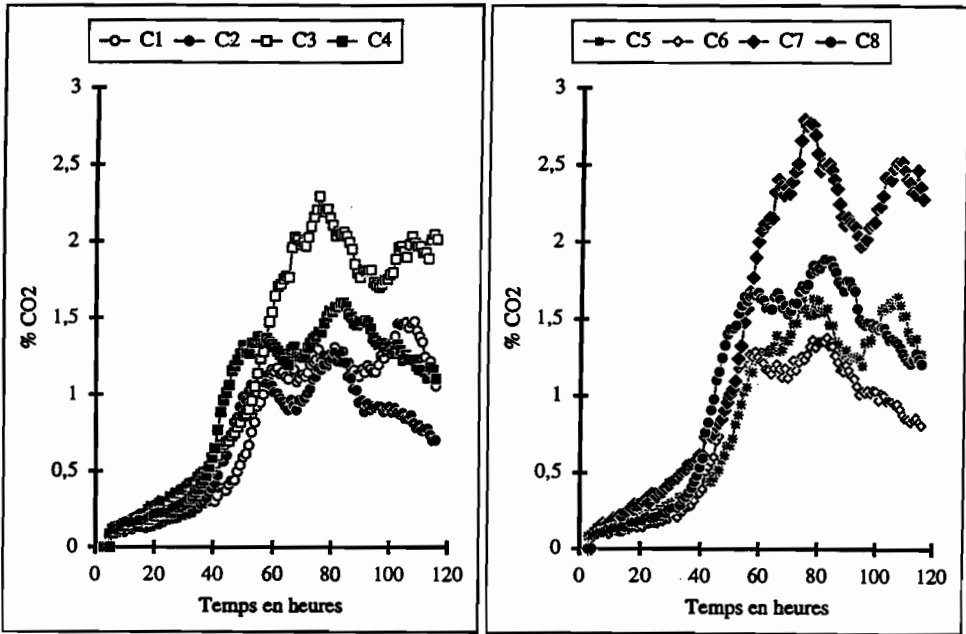


Fig. 6.4. Effet de trois paramètres physiques (aération, humidité et lumière) sur la croissance de *P. ostreatus* cultivé en FMS pendant 115 heures à 25°C. C1-C8 correspondent aux conditions expérimentales précisées dans les tableaux 6.3. et 6.4.

A 78% d'humidité, le premier pic de production de CO<sub>2</sub> apparaît après 80 heures de culture, alors qu'à 70% d'humidité initiale, celui-ci se produit à 60 heures et correspondrait à un arrêt précoce de la croissance. Les seconds pics se produisent dans les deux cas à 20 heures d'intervalle par rapport au premier pic. Les expériences C7 et C3 se distinguent nettement des autres étant donné que la respiration a été très active. En particulier, le pourcentage de CO<sub>2</sub> a atteint des valeurs deux fois supérieures à celles observées pour le reste des expériences.

La lumière naturelle semble avoir un effet bénéfique sur la croissance du mycélium de *P. ostreatus*, l'activité respiratoire en présence de lumière est légèrement plus importante qu'à l'obscurité. Pour le mycélium de *P. ostreatus* nous ne pouvons conclure à un quelconque

découplage énergétique comme ce qui a été observé pour *P.cornucopiae*. En effet pour *P.cornucopiae*, la présence de lumière conduit à une diminution de la production de CO<sub>2</sub>.

### 6.2.2. Effet sur la concentration d'anisaldéhyde

Bien que les courbes de respirométrie montrent que la croissance est pratiquement terminée au bout de 3 jours de FMS, nous avons toutefois maintenu en incubation les différentes cultures jusqu'à 6 jours. En effet, une étude préliminaire avait montré que l'intensité de l'arôme est plus importante après 6 jours de culture.

Tableau 6.5. Résultats expérimentaux des réponses déterminées pour *P. ostreatus*.

Expérience	pH final	Humidité finale %	Note olfactive	Anisaldéhyde (µg/gMSI)
1	5,4	78,62	grasse, anisée	317,3
2	5,5	71,97	grasse	48,12
3	5,7	78,72	grasse, sucrée	593,61
4	5,4	70,5	grasse, sucrée	289,34
5	5,9	77,54	grasse, sucrée	514,92
6	5,7	72,58	anisée légère	13,7
7	5,7	79,38	sucrée	400
8	5,6	71,3	anisée , faible	120,72

Il apparaît que les teneurs en anisaldéhyde sont très variables en fonction des conditions de culture. Les concentrations les plus faibles sont obtenues pour la combinaison humidité faible et aération forte des milieux de culture. En revanche des concentrations importantes en anisaldéhyde sont obtenues pour les expériences menées en présence d'une humidité importante indépendamment du débit d'air, ce qui nous amène à penser que l'humidité du support est le facteur le plus important à contrôler pour obtenir de bonnes concentrations en anisaldéhyde.

### 6.2.3. Effet sur les effluves produites

Les résultats relatifs à l'effet des conditions physiques sur la composition de l'arôme analysée par headspace à 6 jours de culture sont présentés dans le tableau 6.6. On constate que la nature et la proportion des molécules sont différentes en fonction des conditions expérimentales. On peut constater également que l'anisaldéhyde n'est détecté que dans les échantillons 3, 4, 5 et 8 à une teneur relative n'excédant pas 0,5%. Ceci dû est à la technique de concentration des effluves,

qui permet de concentrer essentiellement les composés les plus légers, ceci n'étant pas le cas de l'anisaldéhyde.

Selon que l'humidité est de 70 ou 78%, la nature des molécules majoritaires est différente. A 70% d'humidité initiale, l'acétoïne représente en moyenne 73% de l'aire intégrée totale. En revanche, à 78% d'humidité, les molécules majoritaires sont l'octan-3-one et des molécules méthylées à 4 atomes de carbone. De cette première diversité découlent des différences qualitatives et semi quantitatives des molécules présentes à de plus faibles proportions. En particulier les butan-1,2-diol et butan-2,3-diol, présentes uniquement pour les expériences réalisées à 70% d'humidité initiale dériveraient de l'acétoïne par la réduction du groupement cétone en alcool. Des réactions d'oxydo-réduction entraîneraient des changements dans la nature des molécules à 4 atomes de carbone : méthylbutanal et méthylbutanol qui représentent des différences importantes dans la composition de l'arôme obtenu pour des expériences menées à 78% d'humidité.

La voie de biosynthèse conduisant à l'acétoïne et au butan-2,3-diol a été étudiée chez les bactéries lactiques des genres *Leuconostoc* et *Lactococcus* (Schmitt, 1995). Cette voie correspond au métabolisme de l'acide citrique via l'acide pyruvique (Fig 6.5.). Des activités enzymatiques de type déshydrogénase ont été mises en évidence pour la transformation du diacétyl en acétoïne puis de l'acétoïne en butan-2,3-diol. Dans notre étude, le diacétyl n'est pas détecté, mais il est probable que cette même voie métabolique soit également impliquée dans la formation de l'acétoïne par les cultures mycéliennes de *P. ostreatus*. Cette molécule a été également identifiée dans les cultures en milieu liquide de *P. sajor caju* et *P. cornucopiae* (Krings et al., 1995)

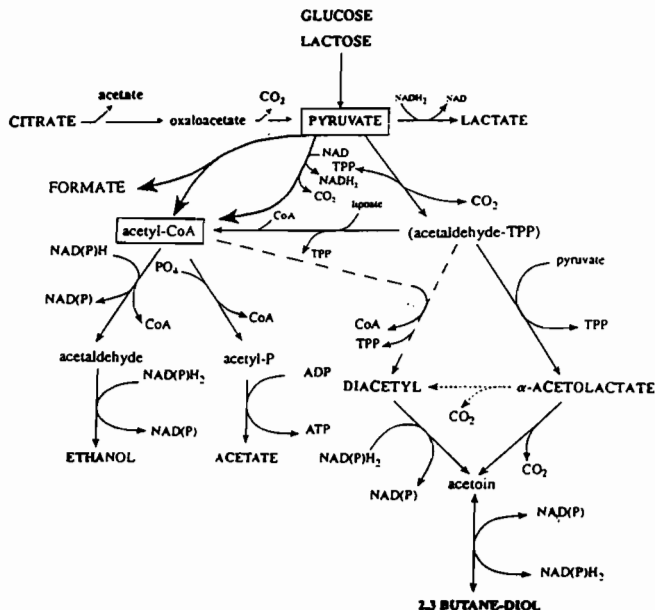


Fig. 6.5. Voie de formation de l'acétoïne adaptée de Schmitt (1995).

Tableau 6.6. Effet des conditions expérimentales sur la composition chimique de l'arôme de *P. osreatus* cultivé en FMS sur support à 25°C pendant 6 jours de culture.

Composé chimique	IK	EXPERIENCE							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<b>3-méthylbutanal</b>	<b>634</b>	<b>19,5</b>	2,8	2,8	6	<b>28,6</b>	0,03	<b>30</b>	0,03
non identifié	636	2,7	-	0,5	0,3	0,1	-	0,8	-
2-méthylbutanal	639	2,9	2,9	8,3	1,9	7,5	0,7	5,7	1
non identifié	666	5,6	0,7	-	0,3	0,2	0,2	-	0,4
non identifié	671	5,4	-	-	-	1,5	-	-	-
pentanal	674	-	0,2	0,2	0,5	2	0,5	12,9	13,1
<b>Acétoïne</b>	<b>693</b>	-	<b>71,4</b>	-	<b>63,3</b>	-	<b>78</b>	-	<b>79,8</b>
3-méthylbutanol	717	3,2	0,5	8,6	0,6	3	-	3,4	0,4
2-méthylbutanol	721	1,5	0,4	6,2	0,5	2	-	1,4	0,3
non identifié	729	-	0,3	0,2	0,3	0,6	0,3	0,2	0,2
non identifié	746	1,5	0,1	0,2	0,1	0,4	0,2	0,4	0,1
butan-1,3-diol	757	-	4,9	-	8,4	-	4,7	-	4,5
butan-2,3-diol	764	-	3,2	-	3,3	-	3,2	-	2,3
non identifié	766	0,5	-	-	-	-	-	-	-
hexanal	775	7,6	5,8	6,7	5,2	7,8	4,2	10,6	5,4
non-3-ène	838	-	0,2	0,3	0,2	0,2	-	-	0,3
non identifié	848	-	-	-	-	-	0,2	tr	-
éthylbenzène	850	-	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	tr	0,1
<i>p</i> et <i>m</i> -xylène	860	-	0,1	0,1	0,01	0,4	0,1	-	0,2
styrène	878	-	0,05	-	0,1	-	-	-	0,1
<i>o</i> -xylène	883	-	0,04	-	0,1	-	-	-	0,1
benzaldéhyde	936	5,1	0,9	7,8	0,9	5,3	0,4	3	0,8
oct-1-én-3-one	956	0,3	0,2	0,1	0,2	29,2	0,1	0,3	0,2
oct-1-én-3-ol	965	1,9	1,6	0,4	1,6	0,5	1,2	1,1	1,9
<b>octan-3-one</b>	<b>966</b>	<b>36,8</b>	<b>4,3</b>	<b>26,5</b>	<b>4</b>	<b>32,2</b>	<b>1,8</b>	<b>25,2</b>	<b>2,2</b>
octan-3-ol	980	3,7	-	4,1	0,3	5,4	0,06	2,7	0,1
octanal	981	-	0,03	-	-	-	-	-	tr
oct-3-énol	1035	-	0,1	0,1	0,1	0,01	0,05	-	0,2
anisaldéhyde	1026	-	-	0,5	0,06	0,3	-	-	0,03

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : composé absent.

D'autre part, deux molécules sont communes aux deux types de conditions "benzaldéhyde et hexanal" toutefois leurs proportions sont plus importantes à 78% qu'à 70% d'humidité initiale. D'autres molécules apparaissent spécifiquement pour des conditions données : en particulier, l'oct-1-én-3-one présente à un pourcentage élevé dans l'expérience 5. Dans le cas des expériences 7 et 8, on note la présence de pourcentages élevés de pentanal. D'autres composés présents à des

pourcentages faibles apparaissent dans l'une ou l'autre des 8 expériences : l'éthylbenzène, le *p m*-xylène, le styrène et l'*o*-xylène.

En comparant les différentes expériences C1 à C8, on ne constate aucun effet particulier de la lumière ni de l'aération sur la qualité de l'arôme.

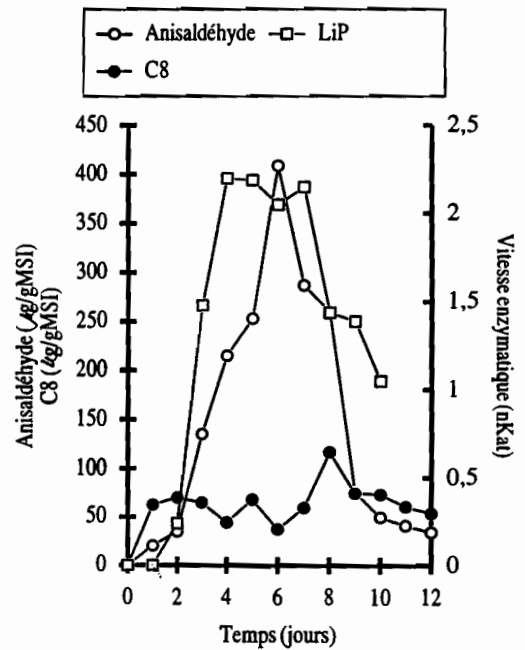
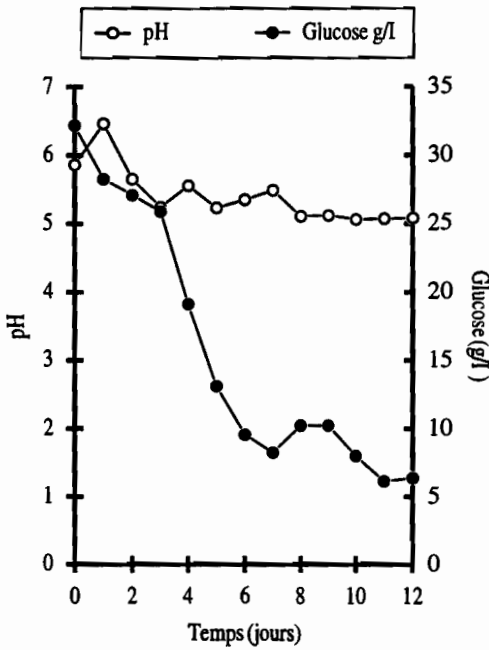
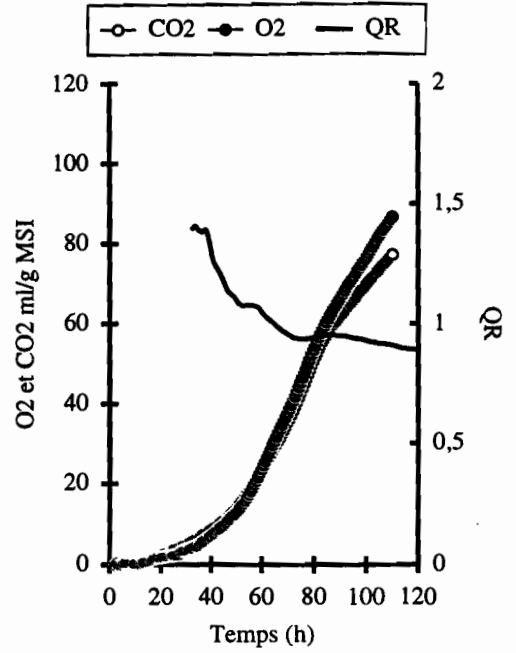
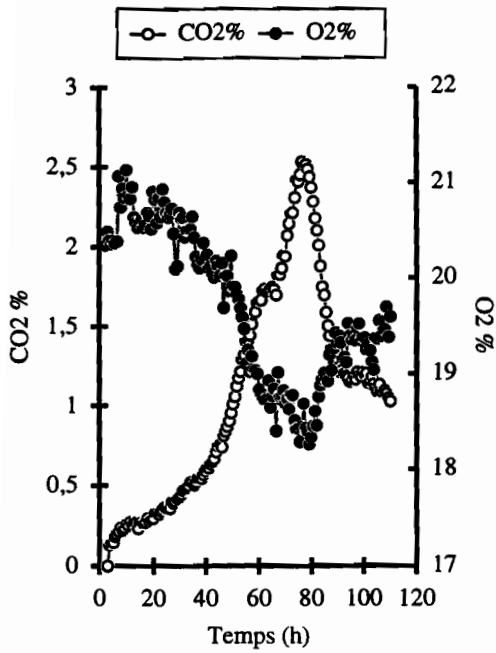
Il est important de souligner que l'anisaldéhyde est faiblement détecté par la technique de headspace et n'apparaît qu'à l'état de trace, alors que l'extraction au solvant montre que cette molécule est présente en quantités très importantes. En effet, la technique headspace concentre les molécules de faible poids moléculaire, alors que l'extraction au solvant fait mieux apparaître les molécules à haut poids moléculaire, autrement dit, des substances parmi les moins volatiles. Ceci explique la complémentarité de nos résultats et rejoint les travaux de Vidal et *al.*, (1986), qui en utilisant divers appareillages pour l'identification de l'arôme de *Marasmius oreades*, ont obtenu des résultats complémentaires avec chaque technique et ont conclu ainsi, à la nécessité d'employer diverses méthodes analytiques pour mettre en évidence tous les constituants volatils d'un arôme.

### 6.3. Cinétique de la croissance et de production d'arôme

A partir des résultats obtenus précédemment nous avons réalisé une étude cinétique afin de mieux comprendre l'évolution de la culture au cours du temps. Nous avons travaillé à une humidité initiale de 78%; et selon une aération de 600 ml/ heure/ colonne, le taux d'inoculation est de 15%, et l'âge de l'inoculum est de 10 jours. Les résultats de respirométrie et des analyses chimiques sont rassemblés dans la figure 6.6.

#### 6.3.1. Croissance de *P. ostreatus*

Le maximum de production de CO<sub>2</sub> est atteint en 78 heures de culture soit après 3 jours de culture. En début de culture, le quotient respiratoire (QR) est supérieur à 1, il se maintient à l'unité entre 55 et 65 heures puis diminue à 0,9 pendant le reste de la fermentation. A partir de 90 heures, le décrochement observé pour la courbe de CO<sub>2</sub> peut correspondre au début de la dégradation des parois des cellules végétales. D'autre part, la teneur en glucose diminue de manière importante entre le 3ème et le 5ème jour de culture puis se stabilise.



### 6.3.2. Teneur en molécules majoritaires (extraits au solvant)

Sur la figure 6.6. sont représentées les cinétiques de production de l'anisaldéhyde et des molécules en C8.

La production d'anisaldéhyde par les cultures du mycélium de *P. ostreatus* est importante. La concentration augmente régulièrement durant les premiers jours de culture, puis diminue à partir du 8ème jour. Le maximum de production est atteint en 6 jours de culture. La quantité d'anisaldéhyde générée est de l'ordre de 400  $\mu\text{g/gMSI}$  soit 100 mg/l de milieu de culture. Par contre, la production des molécules en C8 est irrégulière au cours du temps. Le maximum de production des C8; 117  $\mu\text{g/gMSI}$  est atteint en 8 jours. De plus durant les premières 48 heures, on note une forte augmentation de la teneur en benzaldéhyde dont la concentration atteint 135  $\mu\text{g/gMSI}$ , cette molécule disparaît dès le 4ème jour de culture.

### 6.3.3. Evolution du profil aromatique au cours du temps

Le profil aromatique du mycélium de *P. ostreatus* évolue rapidement au cours du temps (Tableau 6.7.). En effet, la fraction analysée par headspace est différente pour chacun des échantillons analysés. Durant les 2 premiers jours de culture, le benzaldéhyde domine. Au cours des 3ème, 4ème et 5ème jours, l'acétoïne devient majoritaire et représente en moyenne 79% de la fraction volatile. Par contre l'octan-3-one est majoritaire aux jours 6 et 7 et représente 54% de l'arôme.

Jusqu'à la fin de la cinétique, l'octan-3-one et l'acétoïne représentent la quasi totalité de l'aire intégrée totale analysée par headspace. D'autres molécules apparaissent à des pourcentages élevés telles que le 3-méthylbutanal, le 3-méthylbutanol, le pentanal et l'hexanal.

La présence de l'acétoïne en cours de culture pour une humidité de 78% relativise l'effet de la faible humidité du support quant à la formation de cette molécule. L'absence d'acétoïne à 78% d'humidité au cours de l'expérience précédente serait davantage due à une évolution différente de la composition de l'arôme au cours du temps entre les expériences réalisées à 78 % ou à 70 % d'humidité, plutôt qu'à un effet direct de l'humidité du support.

Tableau 6.7. Evolution du profil aromatique de *P. ostreatus* cultivé sur support solide à 78% d'humidité et à une aération de 600ml/ heure/ colonne pendant 10 jours.

Composé	Ik	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j	8j	9j	10j
3-méthylbutanal	634	-	16,5	1,4	2,8	2,4	7,6	11	3,6	5,5	3,5
2-méthylbutanal	639	-	0,66	-	0,3	0,2	-	-	-	-	-
non identifié	645	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pentanal	674	11,4	1,91	-	1,2	0,9	-	-	-	-	-
non identifié	680	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>acétoïne</b>	<b>693</b>	-	-	<b>85,8</b>	<b>76,9</b>	<b>75,3</b>	<b>11,2</b>	<b>5,4</b>	<b>36,3</b>	<b>44,4</b>	<b>33,3</b>
3-méthylbutanol	717	16,5	7,8	1,5	-	-	4,2	3,7	0,7	-	-
2-méthylbutanol	721	4,24	2,21	-	-	-	2,2	1,5	1,1	-	-
non identifié	740	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hexanal	775	0,84	14,7	5	5,1	8,9	7,5	9,6	1,8	15,9	5
hexanol	845	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>benzaldéhyde</b>	<b>936</b>	<b>48,4</b>	<b>29</b>	<b>1,3</b>	<b>3,2</b>	<b>2,6</b>	<b>4,8</b>	<b>2,2</b>	<b>1,3</b>	<b>0,6</b>	<b>8,6</b>
oct-1-én-3-one	956	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
oct-1-én-3-ol	965	1,79	4	1,2	0,9	0,8	<b>2,8</b>	<b>1,2</b>	2,6	4,7	8,6
<b>octan-3-one</b>	<b>966</b>	<b>9,14</b>	<b>16,1</b>	<b>2,6</b>	<b>3,7</b>	<b>6,2</b>	<b>48,8</b>	<b>56,9</b>	42,6	20,6	43,4
octan-3-ol	980	1,05	2,2	-	0,2	0,1	<b>8,5</b>	<b>5</b>	5,4	1,3	2,8
oct-2-énal	1032	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : composé absent.

On peut souligner les faibles pourcentages auxquels certaines des molécules à 8 atomes de carbone apparaissent. En particulier les faibles proportions de l'oct-1-én-3-ol, au cours du temps. Cette molécule serait plus facilement oxydée en octan-3-one en conditions aérées. L'octan-3-ol est présent à un pourcentage élevé uniquement entre le 6ème et le 7ème jour de culture.

### 6.3.4. Discussion

La complexité du profil aromatique rend compte des différentes voies métaboliques engagées dans la formation des molécules volatiles. L'acétoïne dérive de la dégradation de l'acide pyruvique, les molécules en C8 et l'hexanal sont formées à partir de la dégradation de l'acide linoléique, le benzaldéhyde pourrait être formé par la désamination de la phénylalanine, enfin l'ansaldéhyde dérive selon toute vraisemblance de la dégradation de la lignine (Fig 6.7.).

Guittièrez et al., (1994), ont testé l'effet de la composition du milieu sur la production d'ansaldéhyde par différentes espèces du genre *Pleurotus*, ils ont constaté que cette molécule était formée non seulement en présence de lignine et en milieu supplémenté en paille, mais également en absence de composés à noyaux aromatiques. Ils ont conclu que la formation de l'ansaldéhyde était initiée par la désamination de la L-phénylalanine via l'acide *p*-coumarique et l'acide

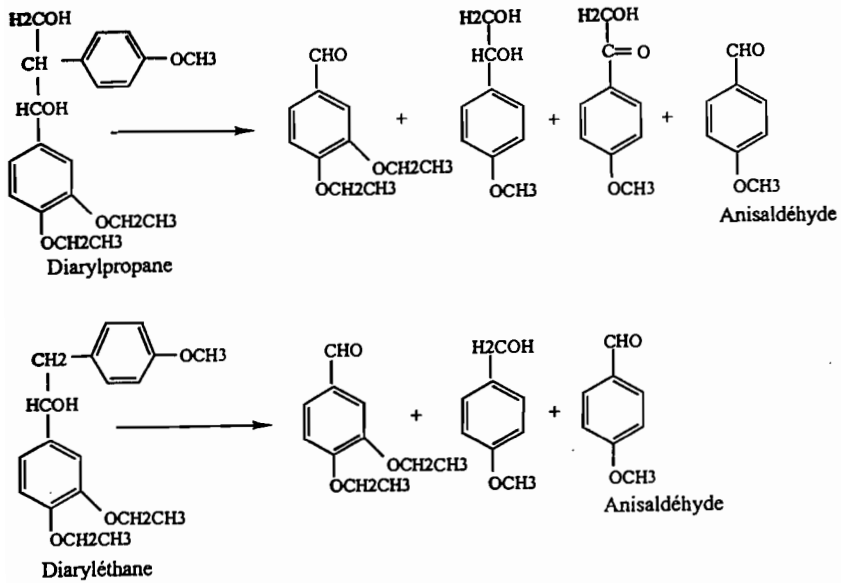


Fig.6.7. Voie hypothétique de formation de l'anisaldéhyde par l'oxydation de composés modèles de la lignine par une enzyme peroxydase adaptée de Gold *et al.*, (1984).

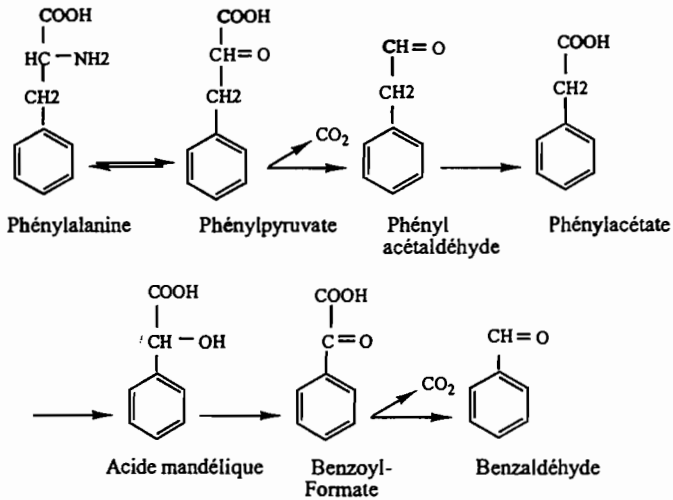


Fig.6.9. Voie de transformation de la phénylalanine en benzaldéhyde adaptée de Hagerdon et Kaphammer (1994).

méthoxycinnamique. Afin d'expliquer l'interaction entre le métabolisme de la lignine et le métabolisme secondaire de la L-phénylalanine dans des conditions de déficit en azote, les mêmes auteurs suggèrent que les champignons sont capables d'utiliser l'azote contenu dans les acides aminés tels que la phénylalanine ceci conduit à l'activation de la voie de l'acide cinnamique et à la dégradation de la lignine.

En cultures non aérées, l'anisaldéhyde n'est pas formé, son apparition semble être étroitement liée à la mise en place de l'aération, or le processus de dégradation de la lignine est oxydatif et nécessite la présence d'enzymes dépendantes de la présence d'O<sub>2</sub> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Guillén *et al.*, (1994) ont proposé un schéma hypothétique de formation extracellulaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mettant en place un système multienzymatique cyclique. Des composés cycliques alcooliques sont oxydés par une aryl alcool oxydase en leurs correspondants aldéhydes, puis acides avec réduction d'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les acides produits, sont par la suite réduits par une aryl-alcool déshydrogénase à l'intérieur des hyphes, en aldéhyde, puis en alcool (Fig. 6.8.). Ce système initialement testé pour l'alcool benzylique, le benzaldéhyde et l'acide benzoïque a été étudié pour d'autres composés tels que les composés vératryliques et anisiques. Dans ce dernier cas, Guillén et Evans, (1994) ont montré que l'anisaldéhyde était accumulé à l'équilibre entre les réactions d'oxydation et celles de réduction.

Le caractère cyclique de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> implique la formation d'une petite quantité de substrats de ces aryl alcool oxydases. Ces molécules seraient formées directement par le champignon afin d'initier la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une fois le système de dégradation des composés lignocellulosiques mis en place, ces composés aromatiques seraient formés directement par la dégradation de la lignine. Il est vraisemblable que le benzaldéhyde formé en début de culture résulte de la désamination de la phénylalanine (Fig. 6.9.). Le benzaldéhyde ainsi formé serait oxydé en acide benzoïque ce qui permettrait la réduction de l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Milieu Extracellulaire

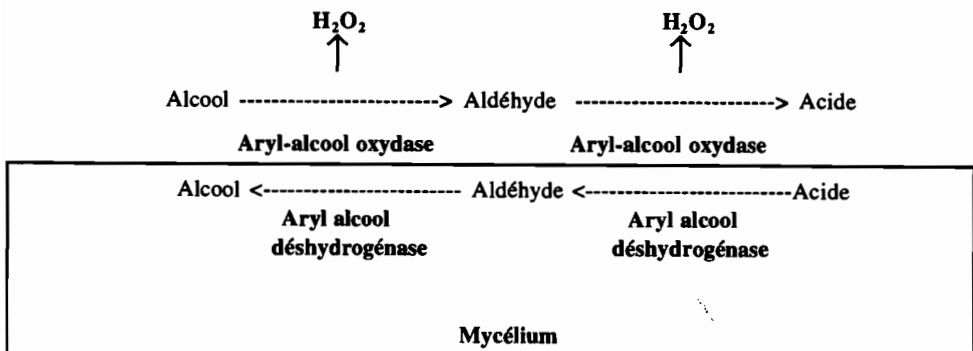


Fig. 6.8. Schéma hypothétique de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par *P. eryngii* en présence d'alcools, aldéhydes et acides aromatiques selon Guillén *et al.*, (1994).

La présence de  $H_2O_2$  permettrait l'activation des Li-Peroxydase et de la Mn-Peroxydase impliquées dans la dégradation de la lignine. Une fois ce système mis en place, survient alors la formation de l'anisaldéhyde par la dégradation des composés phénoliques constitutifs de la lignine.

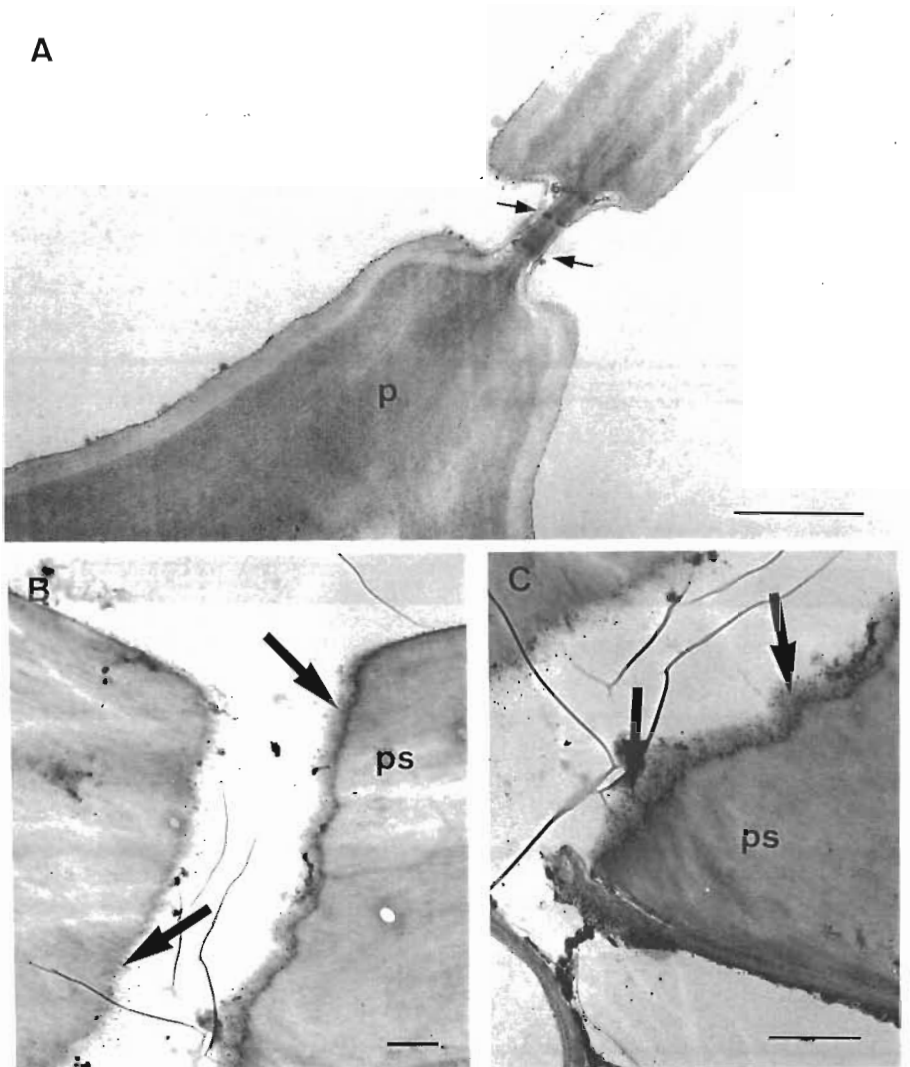
Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un suivi des activités Lignine Peroxydase (LiP) et Mn Peroxydases (MnP). Il apparaît que l'activité LiP suit une évolution parallèle à celle de la production de l'anisaldéhyde. Une activité maximale de cette enzyme est notée entre le 5ème et le 7ème jour de culture. En revanche, l'activité Mn P est faible et très irrégulière dans le temps.

Par ailleurs on peut souligner que la bagasse de canne à sucre dont nous disposons présente au temps  $T_0$  des aspects de lyse des parois végétales dus à des traitements mécaniques et ou biologiques antérieurs. Ceci facilite l'attaque parois végétales par le mycélium de *P. ostreatus* et l'induction précoce du système ligninolytique et explique l'apparition rapide de benzaldéhyde et d'anisaldéhyde (Planches 1, 2 et 3). Ces photos reflètent les différentes étapes de lyse des parois végétales de la bagasse de canne à sucre sur une durée de culture comprise entre  $T_0$  et 12 semaines.

**Planche 1 : bagasse de canne à sucre non dégradée par le champignon ; contrôle.**

**A :** constriction naturelle dans des parois (p) de cellules lignifiées. Remarquez la présence de plasmodesmes ; (échelle = 1 $\mu$ m).

**B, C :** au temps zéro, avant l'inoculation de la bagasse par le champignon, des figures de lyses (flèches) sont discernables dans les parois secondaires (ps) des vaisseaux ; (échelles = 1 $\mu$ m).

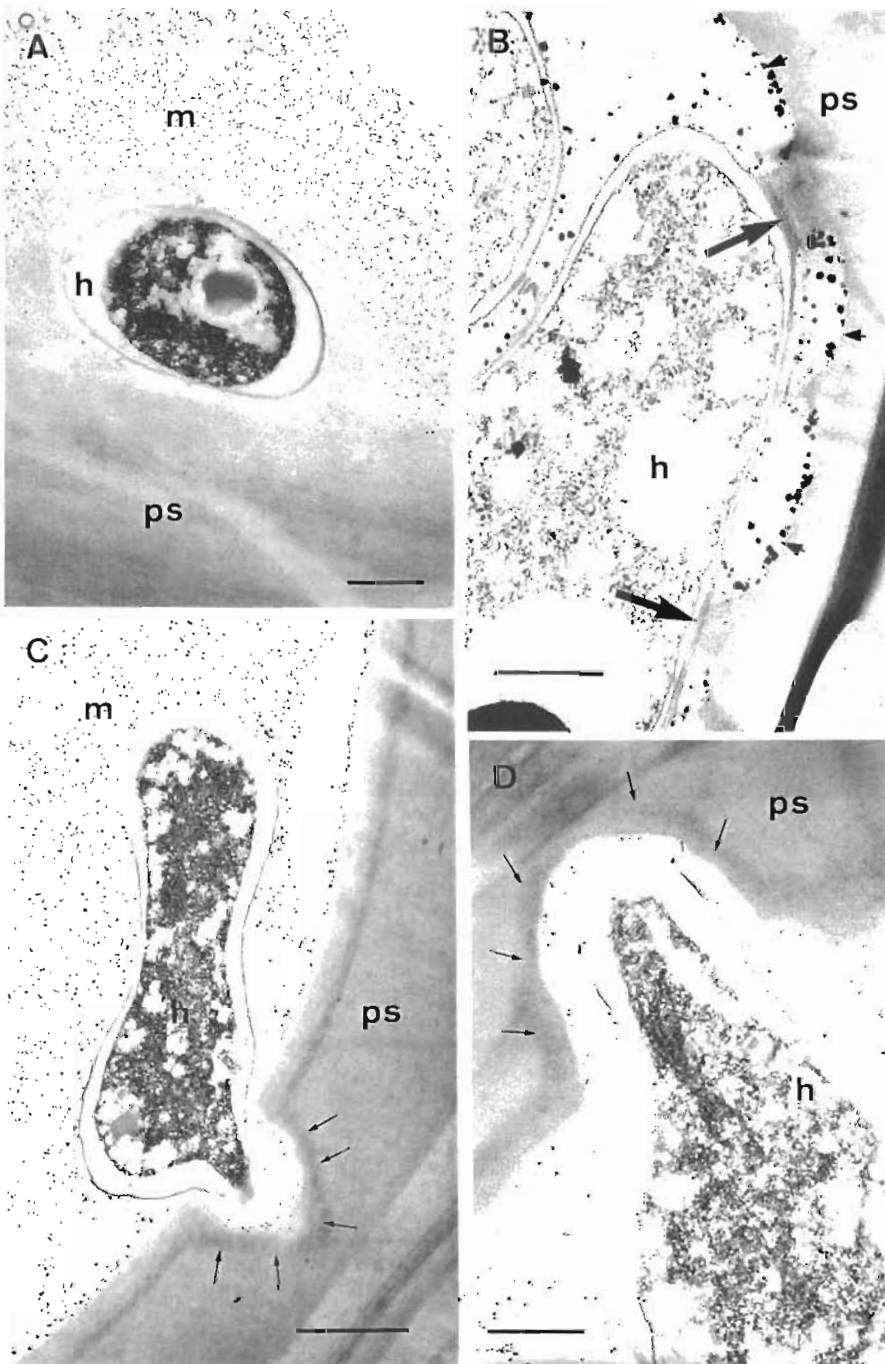


**Planche 2 : dégradation de la bagasse de canne à sucre par *P. ostreatus***

**A** : localisation intracellulaire d'un hyphe de *P. ostreatus* (h) contre la paroi secondaire d'un vaisseau (ps); notez la présence, autour du mycélium, d'une matrice granuleuse (m) renfermant des granules osmiophiles; (échelle = 1 $\mu$ m).

**B** : localisation intracellulaire d'un hyphe de *P. ostreatus* (h) contre la paroi secondaire d'un vaisseau (ps). Des zones de lyse (têtes de flèches) ainsi que des zones d'adhésion (flèches) sont visibles au contact d'un hyphe; (échelle = 0,5 $\mu$ m).

**C , D** : localisation partielle d'un hyphe de *P. ostreatus* (h) dans la paroi secondaire d'un vaisseau (ps); une modification de la texture de cette paroi est visible au voisinage de la zone de pénétration (flèches) (m : matrice extracellulaire; (échelles : C = 1 $\mu$ m; D = 0,5 $\mu$ m).

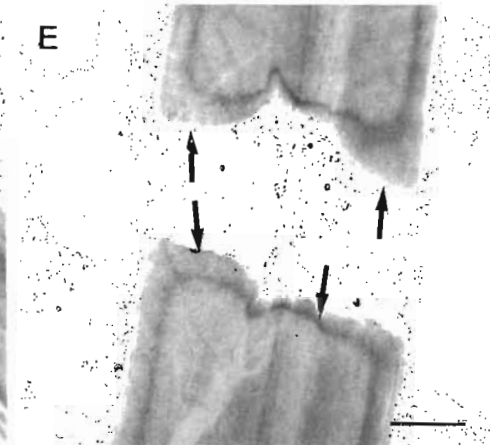
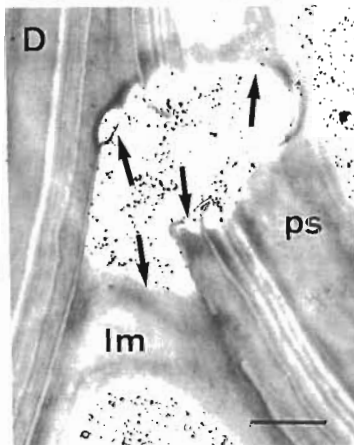
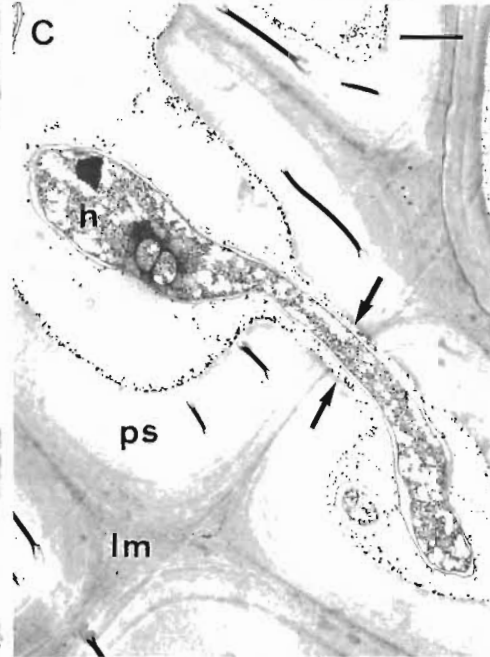
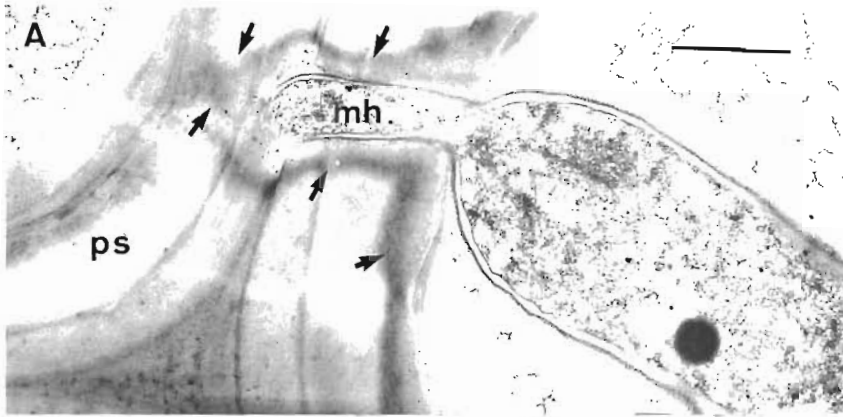


**Planche 3 : dégradation de la bagasse de canne à sucre par *P. ostreatus***

**A** : un microhyphe (mh) est présente dans la paroi secondaire (ps) d'un vaisseau et la lamelle moyenne (lm) séparant deux vaisseaux. Une zone plus osmiophile de la paroi (flèches) est associée à cette localisation; (échelle = 1 $\mu$ m).

**B, C** : hyphes (h) de *P. ostreatus* en position intracellulaire et pariétale; le diamètre du mycélium intrapariétal est inférieur dans le canal de pénétration à celui de l'hyphe intracellulaire; (lm : lamelle moyenne; ps : parois secondaire); (échelles ; B = 1 $\mu$ m; C = 1 $\mu$ m).

**D, E** : des zones de lyses (flèches) dans les parois secondaires (ps) et la lamelle moyenne (lm) sont observables (flèches) sans contact apparent avec le champignon; (échelles : D : 1 $\mu$ m ; E = 1 $\mu$ m).



#### 6.4. Cinétique de croissance de *P. ostreatus* en cultures non aérées

Afin de comparer le profil aromatique produit en conditions aérées par le mycélium de *P. ostreatus* cultivé sur bagasse de canne à sucre imprégnée, au profil produit en conditions non aérées selon le même mode d'inoculation en masse, un suivi de la production des molécules majoritaires et de l'évolution de la composition de l'arôme a été réalisé.

En cultures non aérées, la consommation du glucose est plus rapide que pour les cultures aérées, au bout de 24 heures, 40% du glucose est consommé, puis la concentration en glucose diminue progressivement jusqu'à atteindre 4,6 g/l après 8 jours de culture (Fig. 6.10).

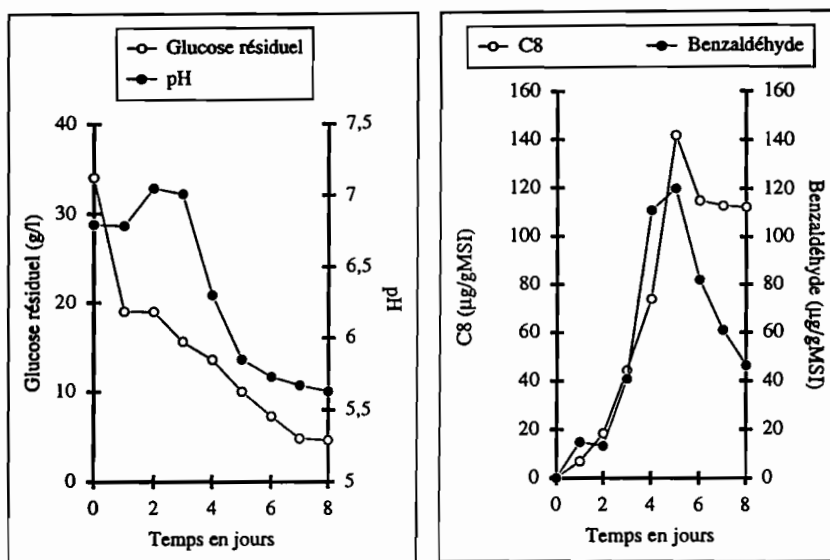


Fig. 6.10. Evolution des différents paramètres étudiés au cours de la culture de *P. ostreatus* sur support solide en conditions non aérées selon une inoculation en masse de 15%.

Les concentrations du benzaldéhyde et de l'octan-3-one sont maximales au 5ème jour de culture et sont respectivement de l'ordre de 120 µg/gMSI et 142 µg/gMSI.

Dans le tableau 6.8. sont reportés les pourcentages relatifs de ces différentes molécules au cours du temps.

Il apparaît que trois molécules peuvent être majoritaires : 3-méthylbutanal, octan-3-one et benzaldéhyde. Trois autres molécules sont présentes à des pourcentages élevés : 3-méthylbutanol, hexanal et octan-3-ol. Par contre ni l'anisaldéhyde ni l'acétoïne ne sont détectés.

Tableau 6.8. Evolution de la composition de l'arôme produit par les cultures mycéliennes de *P. ostreatus* en cultures non aérées en flacons en fonction du temps.

Composé chimique	IK	1j	3j	4j	5j	6j	7j	8j
3-méthylbutanal	634	-	10	5,9	21,7	12	4,2	1,6
3-méthylbutanol	717	10,5	5,6	5,9	14	7,7	10,5	6,8
hexanal	775	14,5	5,9	41,3	10,5	7,1	1	
benzaldéhyde	938	53	31,5	41,3	22,2	24,9	22,6	15,4
oct-1-én-3-ol	965	1,7	1,4	-	-	-	tr	-
ocatn-3-one	966	13,4	28,3	30,6	19	37,5	43,3	60,7
octan-3-ol	980	0,2	6,9	8,4	6,2	5,6	14,2	10,4

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : composé absent.

La proportion du 3-méthylbutanal diminue progressivement de même que celle du benzaldéhyde alors que celle de l'octan-3-one augmente. Au 8ème jour de culture, la proportion de l'octan-3-one est de 60,7%, celle du benzaldéhyde est de 15%. L'octan-3-ol représente 10,4% de l'arôme.

On peut constater que la composition de l'arôme produit évolue de la même manière que pour les cultures en flacons inoculées avec des morceaux de gélose (§ 5.4.). Cependant le métabolisme est plus rapide. En effet les teneurs relatives en octan-3-one et en octanol-3 augmentent rapidement. Dès le 3ème jour de culture, la proportion de l'oct-1-én-3-ol diminue. Au 8ème jour de culture l'oct-1-én-3-ol n'est plus présent.

La production de benzaldéhyde en début de culture se ferait selon le même mécanisme décrit plus haut. L'absence d'aération explique la présence de ce composé à des concentrations élevées au delà de 3 jours de culture.

Par rapport aux cultures en conditions aérées, on constate que ni l'anisaldéhyde, ni l'acétoïne ne sont formés. Ceci confirme bien que l'apparition de ces deux molécules dépend de l'application d'une aération forcée. Zadrazil et Kamra (1989) ont noté, un effet négatif de l'accumulation de CO<sub>2</sub> sur la dégradation de la lignine. Il est vraisemblable que cette accumulation ait lieu pendant les cultures en conditions non aérées. L'effet cumulé de l'absence d'O<sub>2</sub> et l'accumulation de CO<sub>2</sub> sur la dégradation de la lignine tendrait à expliquer l'absence de l'anisaldéhyde en cultures non aérées.

La culture du mycélium de *P. ostreatus* sur bagasse de canne à sucre imprégnée s'accompagne de la formation de composés à fort impact olfactif qui interfèrent fortement avec la note fongique et fruitée recherchée. La formation de ces molécules serait essentiellement due à l'utilisation de bagasse de canne à sucre en tant que support. En effet, les parois végétales de la bagasse de canne à sucre présentent des zones de lyse ce qui augmente leur susceptibilité vis à vis des dégradations par le mycélium de *P. ostreatus*. Ceci se reflète au niveau de la fraction volatile par l'apparition de deux molécules : le benzaldéhyde et l'anisaldéhyde. Bien que ces deux

molécules aient une grande valeur ajoutée, leur apparition dans les cultures de *P. ostreatus* sur support solide ne nous permet pas de reproduire la composition de l'arôme carpophage.

## 6.5. Conclusion

Au cours de cette étude sur la production d'arôme par le mycélium de *P. ostreatus* JMO-95 sur support solide, nous étions tenus de privilégier la meilleure adéquation entre la composition de l'arôme carpophage et celle produite par la culture du mycélium. Cependant le comportement versatile de cette souche en cours de culture a permis d'aller au delà de notre hypothèse et on a pu assister non seulement à la formation de différentes molécules à 8 atomes de carbone mais également à celle de composés ayant un fort impact olfactif tels que l'anisaldéhyde, le benzaldéhyde ou l'acétoïne.

En cultures non aérées sur support solide, le mycélium de *P. ostreatus* produit une grande diversité de **molécules à 8 atomes de carbone**, dont la proportion varie en fonction du temps. Cette aptitude peut être orientée soit vers la production d'un arôme de carpophage de *P. ostreatus* JMO-95 soit vers la production de mélanges de molécules à 8 atomes de carbone qui contribuent à "recréer" l'arôme de différents carpophores. En effet, Hanssen et Klingenberg (1983) ont réalisé une étude sur 12 concentrés d'arômes provenant de 7 producteurs européens. Ils ont montré que les constituants qui disparaissent au cours des traitements sont remplacés par des mélanges de composés qui confèrent aux différents concentrés une note uniforme levure champignon. L'incorporation de mélanges obtenus par les cultures *P. ostreatus* pourrait améliorer la qualité de tels concentrés. Par ailleurs, une meilleure maîtrise des mécanismes réactionnels qui régissent le passage d'une molécule en C8 à une autre, par des réactions d'oxydoréductions, pourrait aboutir à une grande palette de mélanges de molécules en C8.

D'autre part, le mycélium de *P. ostreatus* cultivé sur support solide en conditions aérées (FMS) permet de privilégier d'autres voies de biosynthèse de composés d'arôme aboutissant à l'acétoïne et à l'anisaldéhyde.

L'**acétoïne** possède une odeur beurrée lactée. Cette molécule est très utilisée dans l'industrie des produits laitiers. Elle est retrouvée dans de nombreux fromages : cheddar, camembert, elle sert également à aromatiser la margarine. La consommation annuelle de ce composé en tant que produit de synthèse est de d'environ une tonne au prix de 55 SFr/ Kg (Communication personnelle Givaudan-Roure). La consommation annuelle ainsi que le prix au kilogramme sont du même ordre ceux du diacétyl qui possède une odeur beurrée lactée typique.

L'**anisaldéhyde** possède une odeur douce anisée. Cette molécule est très utilisée dans l'industrie de la parfumerie, dans la réalisation des compositions florales ainsi que par l'industrie aromatique des boissons. L'anisaldéhyde est principalement produit par des procédés qui consistent à oxyder par des sels, des substrats comme le *p*-méthoxytoluène ou le *p*-méthylanisole.

La consommation annuelle d'anisaldéhyde de synthèse est de plusieurs tonnes. Par contre celle de l'anisaldéhyde naturel n'excède pas 500 tonnes, son prix est 24 fois supérieur à celui de l'anisaldéhyde de synthèse (Communication personnelle Givaudan-Roure).

Par ailleurs, l'anisaldéhyde représente 20% de l'extrait réalisé par extraction au solvant, sur des carpophores congelés de *Clitocybe odora* espèce réputée pour son odeur anisée. Cette molécule a été également identifiée à 30% dans l'arôme très odorant de *Hydnellum suavolens* (Wood et al., 1988).

La production d'anisaldéhyde par le mycélium de différentes espèces ligninolytiques a été déjà envisagée. Cependant, les concentrations obtenues et ou les durées de culture restent incompatibles avec une quelconque exploitation industrielle (Tableau 6.9).

Tableau 6.9. Production comparée d'anisaldéhyde par le mycélium de différentes espèces.

Espèce productrice	Concentration	Délai en jours	Auteurs
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	135 mg/l en présence de tyrosine	22 jours	Berger et al., (1986)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	25 mg/l	12	Gutiérrez et al., (1994)
<i>Ischnoderma benzoinum</i> CBS 31129	25 en présence de la L-phénylalanine	22	Fabre et al., (1996)
<i>Dichotomus squallens</i>	50 µg/l	20	Gallois et al., (1989)
<i>Bjerkandera adusta</i>	25 mg/l	-	Berger et al., (1986)
<i>Pleurotus sapidus</i>	13 mg/l	20	Abraham et Berger (1994)

Au vu de ces résultats, il semble que la production d'anisaldéhyde par les cultures de mycélium de *P. ostreatus* soit une voie prometteuse. En effet la concentration maximale atteinte après 6 jours de culture est de l'ordre de 100 mg/l.

La production de benzaldéhyde constitue une autre possibilité de valoriser les cultures mycéliennes de *P. ostreatus* sur support solide. En effet la consommation de cette molécule en tant que molécule naturelle est de plusieurs tonnes par an. Le prix de benzaldéhyde naturel s'élève à 600 SFr contre 25 SFr pour le produit synthétique. Le benzaldéhyde possède une odeur épicée d'amande amère. Il est principalement extrait des noyaux de prunes, d'abricots et de pêches (espèces du genre *Prunus*), ceci conduit à la formation d'un composé toxique indésirable : l'acide hydrocyanique (Feron et al., 1996).

L'approche actuelle concernant l'étude de production de molécules volatiles par les cultures mycéliennes de différents basidiomycètes, consiste à cribler une multitude d'espèces sur un milieu donné et en un temps donné (Krings et al., 1995 ; Abraham et al., 1994 ; Kawabe et Morita, 1993). Ceci contribue à occulter l'effet de l'âge des cultures et l'effet des conditions de croissance sur la production d'arôme. Alors que l'on a pu observer, au cours de cette étude que *P.*

*ostreatus* pouvait changer significativement son profil aromatique en fonction de l'âge et des conditions de culture.

La culture du mycélium de *P. ostreatus* sur des résidus lignocellulosiques offre des conditions de croissance et de production de métabolites proches de celles que ce champignon peut trouver dans son biotope naturel. Ceci nous a permis de produire par le mycélium un arôme identique à celui du carpophore et de mettre en valeur la capacité de *P. ostreatus* à dégrader la lignine par la production de benzaldéhyde et d'anisaldéhyde. De plus l'utilisation de deux moyens d'extraction (extraction au solvant et extraction headspace) permet de rendre compte de l'ensemble des composés de la fraction volatile, aussi bien de celles présentes dans la fraction lourde que celle légère. La combinaison de deux procédés d'extraction est indispensable pour cerner toutes les composantes de l'arôme et pour évaluer toutes les potentialités d'une souche donnée.

La dernière partie de nos travaux est consacrée à l'espèce *M. crassipes*. Le comportement de cette souche sur support solide de même que son aptitude à produire des composés aromatiques sont évalués de la même manière que pour *P. ostreatus*.

***Culture de Morchella crassipes en FMS***

## 7. Culture de *M. crassipes* en FMS

Block et al., (1953) ont posé cette question concernant les Morilles : " Fundamental questions that remain to be answered are whether the true mushroom flavor is a product of only the specialized cells of the fruiting body and cannot be produced by the mycélium, or whether precursors normally found in soil or manure, but not in the laboratory media are required for synthesis of flavouring compounds in the mycelium". A cette question Szuets (1956, 1958) a répondu en déposant deux brevets sur la production d'arôme par des cultures submergées de mycélium de champignons supérieurs, dont *M. hortensis*.

Différents auteurs (Willam et al., 1956 ; Litchfield, 1967 ; Litchfield et al., 1963 ; Gilbert, 1960 ; Le Duy et al., 1974) sont unanimes pour confirmer que le mycélium de Morille est capable d'élaborer l'arôme caractéristique du carpophore. Selon Gilbert (1960), la flaveur semble être un caractère contrôlé génétiquement et serait indépendante des conditions de culture. Litchfield (1967), souligne l'influence des conditions de culture sur le développement de l'intensité aromatique, et affirme notamment que les cultures mycéliennes réalisées sur milieu synthétique tendraient à restreindre la production d'arôme caractéristique par le mycélium. En milieu liquide, la morphologie du mycélium reste un facteur important à contrôler, car selon Launay (1989), la croissance du mycélium sous forme de pelotes renforce l'intensité aromatique.

Litchfield (1967) et Le Duy et al., (1974), ont mis l'accent sur le rôle de la fraction des acides aminés basiques, des acides nucléiques et des bases azotées dans le développement de l'arôme de Morilles en particulier l'acide 2-aminobutyrique, ces différents composés azotés contribueraient à accentuer la flaveur.

Audoin et al., (1989), ont analysé l'arôme de carpophores séchés de *M. conica*. Seuls quelques composés ont été identifiés à faible pourcentage, dont l'hexanal (3,9%), le thymol (3,2%) et l'oct-1-én-3-ol (0,2%). Une seconde étude réalisée par Bensoussan et al., (1995) a montré la présence d'oct-1-én-3-ol, d'acétophénone et de 2,5-diméthylpyrazine dans les carpophores déshydratés d'une Morille. Les mêmes auteurs ont montré que le mycélium de *M. crassipes* cultivé en milieu liquide était plus riche en oct-1-én-3-ol que le carpophore.

La production de l'oct-1-én-3-ol a constitué, une autre manière d'exploiter les cultures en milieu liquide du mycélium de Morille : un brevet a été déposé (Schindler et Fritz, 1989). En effet le prix au kilogramme de l'oct-1-én-3-ol naturel s'élève à 10.000 SFr (communication personnelle Givaudan-Roure). Dans ce brevet, une concentration de l'ordre de 28,8 mg/l d'oct-1-én-3-ol est atteinte après 3 jours de culture du mycélium de *M. esculenta*.

Dans les chapitres précédents, nous avons étudié la production d'arôme par *P. ostreatus* JMO-95. Nous avons constaté que les conditions de culture avaient une incidence importante sur la quantité et la qualité des molécules produites. De même, nous avons démontré que la qualité de l'arôme changeait de manière significative au cours du temps. L'étude du comportement du

mycélium de *M. crassipes* selon les mêmes conditions de culture sur support solide nous a permis d'apprécier les différences importantes entre *P. ostreatus* et *M. crassipes*.

### 7.1. Effet de la source d'azote sur la croissance et sur la production d'arôme

En testant l'effet de cinq sources azotées : sulfate d'ammonium+urée, urée, nitrate de sodium, asparagine et peptone, sur la croissance du mycélium de *P. ostreatus* et sur la production d'arôme, nous avons observé que la source d'azote avait une influence sur la qualité et la quantité de l'arôme produit. Ceci nous a conduit à opter pour l'urée comme source d'azote pour les cultures de *P. ostreatus*. Les mêmes sources d'azote ont été testées pour la croissance du mycélium de *M. crassipes*, afin d'évaluer leur impact sur la croissance et sur la production des composés responsables de l'arôme.

Les résultats relatifs au pH final, à la consommation des sucres et à la concentration en oct-1-én-3-ol, molécule majoritairement formée par les cultures mycéliennes de *M. crassipes* sont présentés dans le tableau 7.1. L'effet de la source d'azote sur la composition de l'arôme est présenté dans le tableau 7.2.

On observe que la source d'azote a une incidence importante sur la consommation du glucose, sur l'évolution du pH et sur la production de l'oct-1-én-3-ol. Par contre la composition de l'arôme produit analysé par headspace est très peu affectée.

Tableau 7.1. Effet de la source d'azote sur les paramètres étudiés à 8 jours de culture du mycélium de *M. crassipes* sur support solide imprégné d'une solution nutritive contenant du glucose et différentes sources d'azote.

Source azotée	pH final	Glucose résiduel en g/l	Oct-1-én-3-ol (µg/gMSI)
<b>Urée+sulfate d'Ammonium</b>	<b>5,4</b>	<b>10,81</b>	<b>24,04</b>
Urée	6,5	13,93	373,41
Nitrate de Sodium	8,8	5,24	380
Peptone	6,4	10,13	170
Asparagine	6,3	12,87	413

En milieu contenant du nitrate, la consommation du glucose est la plus importante. Par contre, elle est relativement faible dans le cas de l'urée. Le pH mesuré au bout de 8 jours, montre que sur nitrate, il y a eu une forte alcalinisation du milieu, par contre en présence des autres sources azotées, le pH final des autres milieux de culture sont légèrement acides (Tableau 7.1.).

L'évaluation de la quantité d'oct-1-én-3-ol par étalonnage interne montre qu'une production importante d'arôme est obtenue en présence de nitrate, d'urée ou d'asparagine. Cette production est moindre pour le milieu contenant de la peptone; elle est très faible dans le cas du

mélange urée-sulfate d'ammonium. La meilleure concentration en oct-1-én-3-ol (413 µg/gMSI) a été obtenue en présence d'asparagine.

Tableau 7.2. Effet de la source d'azote sur la composition de l'arôme produit à 8 jours de culture de *M. crassipes* sur support solide imprégné d'une solution nutritive contenant du glucose et différentes sources d'azote.

Composé	Urée+ Ammonium	Urée	Nitrate	Peptone	Asparagine
Ik= 709	-	-	traces	-	0,2
heptanal	-	-	-	-	0,08
non identifié	-	-	-	-	0,1
Ik=908					
benzaldéhyde	-	-	0,1	-	-
oct-1-én-3-one	-	0,09	0,3	0,1	0,2
<b>oct-1-én-3-ol</b>	<b>95,2</b>	<b>95,7</b>	<b>95,6</b>	<b>95,4</b>	<b>96,2</b>
octan-3-one	3,8	1,1	-	-	0,2
octanal	-	-	0,2	-	-
non identifié	-	1,5	2,2	0,3	1
Ik= 1025					
oct-3-énol	-	0,2	0,4	-	0,1
oct-2-én-1-ol	-	-	-	3,1	0,7
octanol	-	0,3	-	-	-

(Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : Composé absent)

<b>Aire intégrée totale</b>	<b>10.334.067</b>	<b>91.723.679</b>	<b>162.627.372</b>	<b>72.734.385</b>	<b>236.310.187</b>
-----------------------------	-------------------	-------------------	--------------------	-------------------	--------------------

L'identification des molécules contribuant à l'arôme produit, par la culture du mycélium de *M. crassipes* en présence de différentes sources d'azote, révèle que l'oct-1-én-3-ol est majoritaire quelque soit la source d'azote utilisée. Cette molécule représente en moyenne 95,6% de l'ensemble de la fraction volatile. Les profils aromatiques sont relativement plus riches dans le cas des milieux de culture contenant des nitrates ou de l'asparagine. Outre les molécules en C8, on retrouve respectivement du benzaldéhyde et de l'heptanal. Dans le cas des milieux de culture contenant de la peptone ou un mélange urée-sulfate d'ammonium, seules des molécules en C8 sont détectées. On peut souligner aussi, qu'en présence de nitrate, l'aire intégrée totale est plus importante qu'en présence d'urée.

La faible concentration en oct-1-én-3-ol obtenue en présence du mélange urée-sulfate d'ammonium serait due à l'acidification du milieu de culture. Cette acidification est incompatible, d'une part avec le développement mycélien et d'autre part avec la production d'oct-1-én-3-ol. En effet, la concentration en oct-1-én-3-ol obtenue en présence du mélange urée-sulfate

d'ammonium est inférieure environ de 16 fois à celle obtenue en présence d'asparagine, d'urée ou de nitrate de sodium.

Il semble donc, que le nitrate soit assimilé par le mycélium de *M. crassipes* en culture sur support solide. Différents auteurs, ont souligné que les nitrates étaient inutilisables par un grand nombre de champignons supérieurs. En effet, Lundeberg (1970) a observé que 12 espèces de *Marasmius* parmi 13 sont incapables de métaboliser les nitrates. Il en est de même pour 6 souches mycorrhiziennes parmi 8 étudiées par Trappe (1971). En revanche, Salsac et al., (1982) ayant testé la croissance de 17 espèces de *Tuber melanosporum* sur milieu ne comportant que des nitrates comme source d'azote ont trouvé que leurs souches se développaient normalement.

Salsac et al., (1982) ont suggéré que les champignons qui assimilent les nitrates disposent d'une nitrate reductase (NADP dépendante) qui les réduit en nitrite.

En ce qui concerne la production de l'oct-1-én-3-ol, il apparaît que la concentration obtenue en présence d'asparagine est plus importante qu'en présence d'urée ou de nitrate de sodium. Cependant l'utilisation de cet acide aminé en tant que source d'azote serait abusive dans la perspective d'une exploitation industrielle.

Sur milieu nitrate, la prise en masse du support solide a été très importante ; ceci étant reflété par une bonne consommation du glucose. Pour la poursuite de notre étude avec le mycélium de *M. crassipes* sur support, le nitrate de sodium est choisi comme source d'azote. Ceci rejoint les travaux de Willam et al., (1956) qui ont conclu que le nitrate de sodium était la meilleure source d'azote pour la culture du mycélium de Morille en milieu liquide.

## **7.2. Effet de la source de carbone**

Afin d'évaluer leur effet sur le comportement de *M. crassipes*, les différentes sources de carbone utilisées pour les cultures de *P. ostreatus* ont été également testées pour *M. crassipes*. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.3.

La mesure du pH fait apparaître une forte alcalinisation du milieu de culture quelque soit la source de carbone étudiée.

La quantité d'oct-1-én-3-ol est élevée dans le cas du glucose, du maltose et du glycérol. Elle est relativement faible dans le cas du fructose, et assez faible en présence de saccharose.

Tableau 7.3. Effet de la source de carbone sur le pH final et sur la concentration en oct-1-én-3-ol de cultures de *M. crassipes* sur support solide imprégné d'une solution nutritive contenant du nitrate et différentes sources de carbone après 8 jours de culture en flacons.

Source de Carbone	pH	Oct-1-én-3-ol (µg/gMSI)
Glucose	8,9	370
Fructose	8,9	240
Maltose	9,0	335
Mannitol	8,0	349
Glycérol	8,9	321
Saccharose	9,0	134

L'identification des composés d'arôme a révélé dans nos expériences préliminaires qu'indépendamment de la source de carbone, l'oct-1-én-3-ol représente entre 96% à 98% de la fraction totale intégrée.

### 7.3. Effet du rapport C/N

L'effet du rapport C/N sur la croissance et sur la production d'arôme par le mycélium de *M. crassipes* a été testé de la même manière que pour *P. ostreatus*.

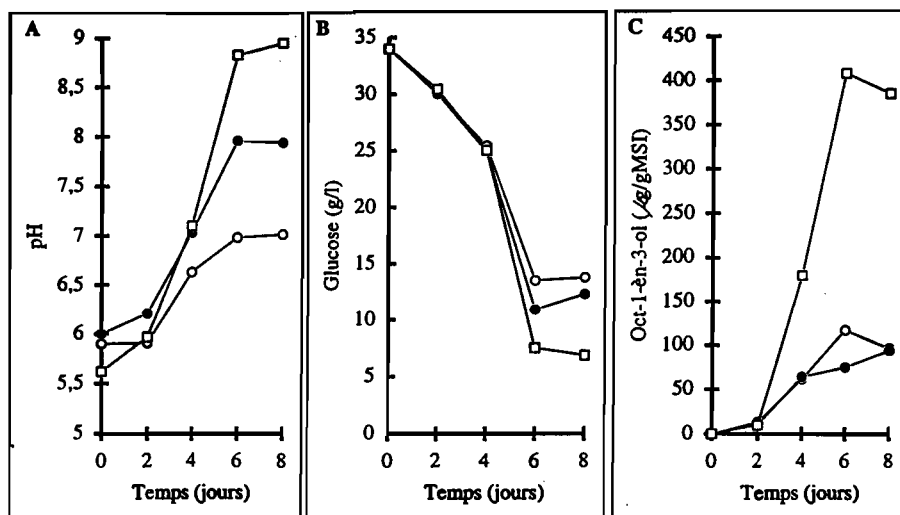


Fig. 7.1. Effet du rapport C/N sur l'évolution du pH (A), teneur en glucose (B) et formation de l'oct-1-én-3-ol (C) en cours de culture de *M. crassipes* sur support solide imprégné d'une solution nutritive à base de nitrate et de glucose (C/N: 40 ○ ; 20 ● et 10 □).

Les résultats sont présentés dans la figure 7.1. On observe que le pH augmente dans chacune des expériences. Cette augmentation est directement liée à la concentration initiale en nitrate en début de culture.

Au bout de 8 jours de culture en flacons, pour le rapport C/N=10, la consommation en glucose représente 80% de l'apport initial, alors que pour les deux autres milieux, la consommation en glucose est de 60%. On peut remarquer aussi, qu'entre le 6ème et le 8ème jour, la consommation du glucose est faible et pourrait être attribuée à un arrêt prématuré de la croissance, suite à l'épuisement du nitrate dans le milieu de culture.

L'évaluation de la concentration en oct-1-én-3-ol en cours de culture pour *M. crassipes* sur ces trois milieux montre des différences importantes en fonction du rapport C/N. La concentration en oct-1-én-3-ol augmente progressivement dans le cas des différents rapports C/N. Au bout de 8 jours de culture, la concentration atteinte pour un rapport C/N de 10 est de 385,6 µg/MSI, alors qu'elle est de 93,7 µg/gMSI et 95,7 µg/gMSI respectivement pour un rapport C/N de 20 et 40, soit des concentrations 4 fois moins importantes que pour un rapport C/N=10. Cependant aucune relation de proportionnalité entre la concentration initiale en nitrate et la concentration en oct-1-én-3-ol ne se dégage.

Tableau 7.4. Effet du rapport C/N sur la composition de l'arôme de *M. crassipes* cultivée en flacons pendant 8 jours sur support solide imprégné d'une solution nutritive contenant du nitrate et du glucose.

Composés	Ik	C/N 10	C/N 20	C/N 40
3-méthylbutanal	634	0,5	-	-
2-méthylbutanal	639	0,2	-	-
pentanal	674	0,5	-	-
o-xylène	883	0,1	0,3	-
oct-1-én-3-one	956	0,5	π	-
<b>oct-1-én-3-ol</b>	<b>965</b>	<b>93,4</b>	<b>96</b>	<b>97,2</b>
octan-3-one	966	-	-	0,2
oct-3-énol	1035	-	0,5	-
oct-2-énol	1049	-	1,2	1,2
<b>Aire intégrée totale</b>		<b>256 598 058</b>	<b>93 716 689</b>	<b>63 262 875</b>

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : Composé absent.

L'analyse des effluves montre que l'oct-1-én-3-ol est majoritaire quelque soit le rapport C/N. Peu d'autres molécules en C8 sont détectées dans les trois milieux. Toutefois, l'aire intégrée totale est plus importante dans le cas du rapport C/N fixé à 10, plutôt qu'à 20 ou à 40. Ceci refléterait les différences de concentration en oct-1-én-3-ol.

En ajustant la concentration initiale en glucose, Launay (1989) a testé l'effet de 3 rapports C/N (8, 12, 16) sur la croissance de *M. esculenta* en milieu liquide. Aucun effet significatif du

rapport C/N n'a été observé, probablement en raison du faible écart entre les valeurs fixées. Par contre, Litchfield et al., (1963) ont étudié l'effet de différents rapports C/N (30, 25, 20, 15, 10 et 5) sur la croissance du mycélium de *M. hortensis*. Ils ont constaté que le rendement en biomasse augmentait avec la diminution du rapport C/N.

On pourrait envisager que sur support solide, la formation de biomasse soit également directement liée au rapport C/N. En effet sur le milieu ayant un rapport C/N de 10, la prise en masse du support solide a été plus importante que pour les deux autres milieux de culture. Dans ce cas, la production élevée de l'oct-1-én-3-ol serait directement liée à la formation importante de biomasse. Une limitation de la croissance entraînerait une diminution de la production de l'oct-1-én-3-ol.

#### 7.4. Cinétique de croissance de *M. crassipes*

Nous avons réalisé une étude cinétique, afin d'évaluer la croissance et la production d'arôme, par le mycélium de *M. crassipes*, cultivé à 25°C pendant 8 jours, sur support solide imprégné d'une solution nutritive comportant du nitrate de sodium et du glucose selon un rapport C/N de 10. Les résultats sont reportés sur la figure 7.2.

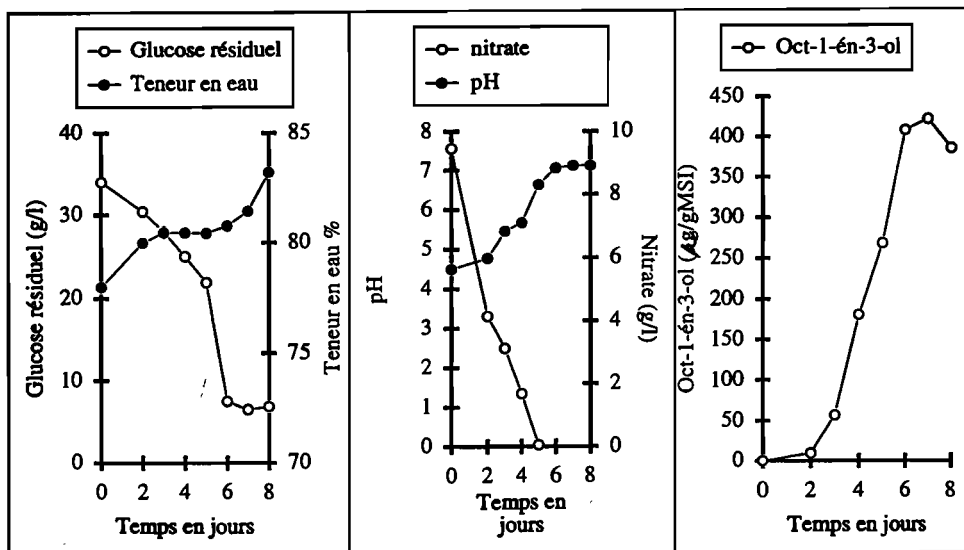


Fig. 7.2. Evolution des différents paramètres de culture au cours de la cinétique de croissance de *M. crassipes* sur support solide imprégné d'une solution nutritive comportant du glucose et du nitrate de sodium selon un rapport C/N de 10 pour des cultures en flacons réalisées à 25°C.

On peut noter que le pH augmente de trois unités en cours de culture et passe de 4,5 à 7,2. Cette augmentation du pH est particulièrement importante entre le 2ème et 5ème jour. Gilbert (1960) indique que le pH augmente de 2 à 3 unités pour les cultures liquides en milieu non tamponné. Nous avons constaté qu'il en est de même en milieu solide. Cette forte alcalinisation du milieu ne présente, à priori, aucun effet négatif sur la croissance du mycélium. On peut l'expliquer par le fait que le mycélium de *Morille* présente des croissances optimales pour deux valeurs de pH qui sont les valeurs suivantes: 6,9 et à 8,3 (Willam *et al.*, 1956).

La consommation des sucres est effective à partir du 5ème jour, et on note une diminution brusque de la concentration en glucose entre le 5ème et le 6ème jour. Au terme des 8 jours de culture en flacons, environ 80% du glucose est consommé et le nitrate de sodium est complètement épuisé dès le 5ème jour de culture à 25°C.

En ce qui concerne l'humidité du support, celle-ci augmente au cours du temps. La teneur en eau du support atteint 83,2% après 8 jours, ce qui correspond à une augmentation de l'humidité de 5%.

L'évaluation sensorielle des cultures mycéliennes de *M. crassipes* montre que l'arôme n'est franchement senti qu'après 96 h. Il s'agit d'un arôme fongique, intense et agréable. Il s'intensifie au cours de la culture pour se stabiliser au 7ème jour. Par ailleurs, la concentration en oct-1-én-3-ol augmente en cours de culture jusqu'à atteindre 422 µg/gMSI. Au 8ème jour d'incubation, une légère diminution est constatée. La production de l'oct-1-én-3-ol augmente selon une élévation parallèle au pH.

Tableau 7.5. Evolution au cours du temps de la composition de l'arôme produit par le mycélium *M. crassipes* cultivé sur support solide imprégné d'une solution à base de glucose et de nitrate de sodium après une incubation de 8 jours à 25°C et à l'obscurité.

Composé chimique	2 j	3 j	4 j	5 j	6 j	7 j	8 j
3-méthylbutanal	10,8	14	1,2	1,7	0,4	0,5	0,4
2-méthylbutanal	35,7	10	3,9	0,6	0,1	0,15	0,15
non identifié Ik=690	4,2	-	-	-	-	-	-
non identifié Ik=750	0,9	-	-	-	-	-	-
hexanal	4	0,8	2	0,7	0,8	0,7	1
diméthylbenzène	2,5	0,8	0,3	0,15	0,2	0,1	0,25
1,2-diméthylbenzène	2,5	-	0,7	0,15	0,4	0,3	0,5
styrène	1,5	-	0,3	0,1	0,2	0,15	0,15
benzaldéhyde	2	-	-	0,15	-	-	0,1
oct-1-én-3-ol	27,3	71	89,1	93,3	95	94,8	93,4
octan-3-one	4,8	-	-	-	-	-	-
oct-2-énal	-	2,3	1,3	1,5	0,9	1,7	1,8

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : Composé absent.

L'oct-1-én-3-ol ne représente que 27,3% de l'aire intégrée totale au 2ème jour de culture, puis atteint rapidement plus de 90% (Tableau 7.5.). Inversement, la proportion du 2-méthylbutanal élevée en début de culture, diminue très rapidement. A la fin de la culture, cette molécule ne représente plus que 0,15% de l'aire totale. De même, la proportion du 3-méthylbutanal diminue en cours de culture et passe de 10,8 à 0,4%, du 2ème au 8ème jour d'incubation à 25°C.

Des composés à 8 atomes de carbone sont présents à des pourcentages très faibles : l'oct-1-én-3-one n'apparaît qu'au 5ème jour de culture. L'octan-3-one et l'octan-3-ol sont détectés uniquement au 2ème jour de culture, puis disparaissent. En revanche, l'oct-2-énal, initialement absent, est présent pendant toute la durée de la fermentation.

D'autres molécules apparaissent à différents temps sans répondre à une évolution précise. C'est le cas notamment du benzaldéhyde, du pentanal, du xylène, du styrène et de l'hexanal.

Globalement, dès le 4ème jour de culture, la composition de l'arôme produit au cours du temps, se stabilise par l'augmentation de la proportion de l'oct-1-én-3-ol. L'oct-1-én-3-ol n'est ni oxydé ni réduit, ce qui expliquerait la stabilité de l'arôme et la faible contribution des autres molécules à 8 atomes de carbone à l'arôme produit en cours de culture.

#### 7.4.1. Conclusion sur les cultures en flacons

L'étude des effets des facteurs nutritionnels sur la croissance et sur la production des composés volatils par le mycélium de *M. crassipes* sur support solide, nous a permis de mettre en évidence l'influence de certaines sources d'azote et de carbone ainsi que du rapport C/N. Les meilleures sources d'azote et de carbone sont le nitrate de sodium et le glucose respectivement. Un rapport C/N de 10 semble convenir pour la production de l'oct-1-én-3-ol.

La culture du mycélium de *M. crassipes* sur support solide possède des caractéristiques aromatiques accentuées : des teneurs très élevées en oct-1-én-3-ol sont obtenues en cours de culture. La concentration en oct-1-én-3-ol obtenue en 7 jours est de l'ordre de 422 µg/gMSI. Cette concentration est équivalente 105 mg/l d'oct-1-én-3-ol. Elle est donc supérieure de près d'un facteur 4 à celle obtenue pour des cultures liquide du mycélium de *M. esculenta* (Schindler et Fritz, 1989).

L'intensité aromatique est directement liée à la teneur en oct-1-én-3-ol. En revanche la composition de l'arôme est très stable et semble indépendante des conditions de culture.

L'adaptation du mycélium de *M. crassipes* à la culture en colonne à l'instar de ce que nous avons réalisé pour *P. ostreatus*, nous permettrait dans ce cas aussi, d'accélérer la croissance, et donc l'obtention de fortes concentrations en oct-1-én-3-ol en des temps de culture moins longs.

7.5. Effet de l'origine de l'inoculum de *M.crassipes* cultivé en FMS

L'effet de l'origine de l'inoculum sur le profil respirométrique est présenté dans la figure 7.3.

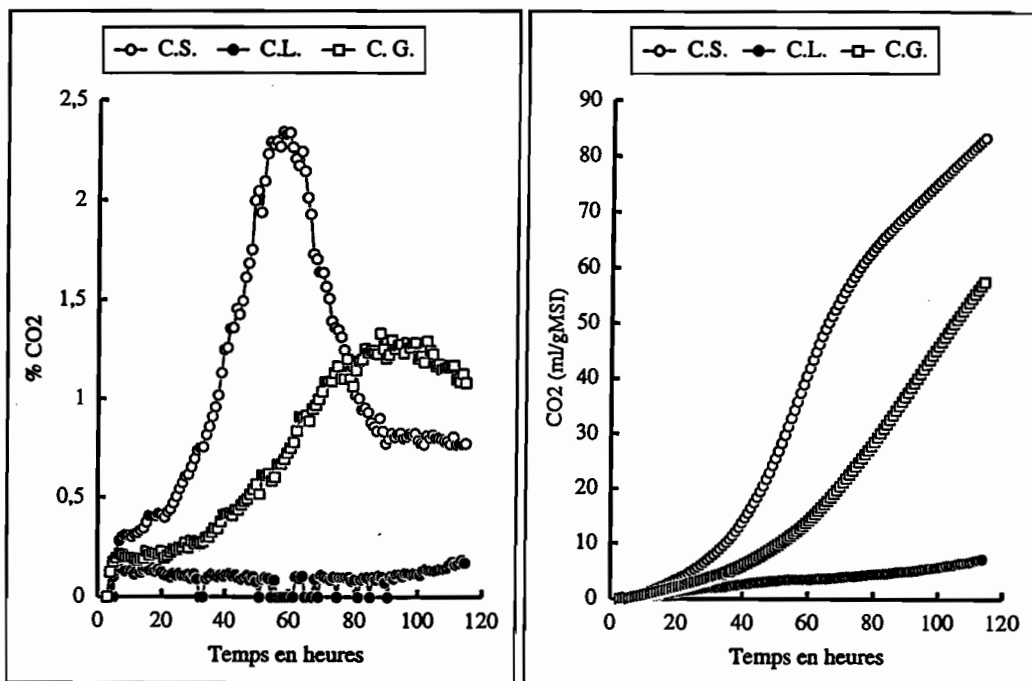


Fig. 7.3. Effet de l'origine de l'inoculum sur la production et sur l'accumulation de  $\text{CO}_2$  au cours de la culture de *M. crassipes* en FMS pendant 110 heures à  $25^\circ\text{C}$ , à une aération forcée de 600ml/ colonne/ heure ( $\square$  CG,  $\circ$  CS,  $\bullet$  CL).

Les résultats obtenus montrent que l'allure générale de la courbe de croissance dépend fortement de l'origine de l'inoculum. En effet, on observe que dans le cas d'un inoculum provenant de cultures solides (CS) "bagasse activée", le démarrage de la fermentation est immédiat; la phase de croissance rapide se situe entre 20 et 55 heures et à partir de 55 heures elle est suivie d'une rapide décroissance de production de  $\text{CO}_2$ . Au total 83,26 ml de  $\text{CO}_2/\text{gMSI}$  sont produits après 5 jours de culture.

En revanche pour l'inoculum provenant des cultures sur gélose (CG), milieu Patate Dextrose Agar, la croissance est plus lente; la phase de croissance rapide est comprise entre 20 et 90 heures. L'évolution du pourcentage de  $\text{CO}_2$  se présente sous la forme d'un pallier large s'étendant sur plus de 20 heures. La production totale de  $\text{CO}_2$  est de 57,2 ml  $\text{CO}_2/\text{gMSI}$ .

Quant à l'inoculum produit en milieu liquide (CL), la production de  $\text{CO}_2$  est quasiment nulle, le redémarrage de la culture n'a pas été assuré même après 120 heures de culture pour les

mêmes conditions expérimentales que précédemment. En fin de culture, pour les inocula CS et CG, on note une forte alcalinisation du milieu, le pH passe de 5,6 à 9,1.

Tableau 7.6. Effet de l'origine de l'inoculum sur les différents paramètres étudiés après 7 jours de culture de *M. crassipes* à 25°C et à une aération forcée de 600 ml/ heure/ colonne.

Origine de l'inoculum	pH final	Glucose résiduaire g/l	Colonisation	CO <sub>2</sub> accumulé (ml/gMSI) à 115 heures	Note
Solide	9,1	2,0	excellente	83,3	fongique
liquide	6,4	22,1	faible	7,3	-
Gélose	9,0	4,2	bonne	57,4	fongique

L'évaluation de l'intensité olfactive après 7 jours de culture montre que la note est fongique pour un inoculum CG ou CS, alors que pour l'inoculum CL aucune note ne se dégage (Tableau 7.6.). En effet Launay (1989), en utilisant exclusivement un inoculum CL pour des cultures de Morilles par fermentation en milieu solide a noté une absence totale de développement d'arôme au cours des cultures et a conclu que les fermentations en milieu solide étaient inappropriées pour la production d'arôme par le mycélium de Morille. Par ailleurs, l'utilisation d'un inoculum CL soulèverait des problèmes de stérilité, de viabilité des hyphes et d'homogénéité, et reste inadéquat même à un stade expérimental. Dans le cas d'un inoculum CG, la propagation du mycélium de proche en proche est incompatible avec une exploitation industrielle. En revanche, l'utilisation d'un inoculum CS, offrirait des facilités de manipulation particulièrement intéressantes pour une extrapolation des FMS à une échelle industrielle.

#### 7.6. Effet du pourcentage d'inoculation sur le démarrage de la FMS

Le taux d'inoculation est exprimé en pourcentage du poids de bagasse activée par rapport à la bagasse vierge. Les taux d'inoculation testés sont 5%, 10%, 15% et 20%.

L'effet du taux d'inoculation sur la production de CO<sub>2</sub> au cours des fermentations est présenté sur la figure 7.4. Nous avons limité notre étude aux premières 53 heures de fermentation afin de mieux observer l'effet du pourcentage d'inoculation sur le démarrage des cultures.

Les résultats montrent que le démarrage de la fermentation est directement lié au taux d'inoculation utilisé. En effet, une diminution progressive de la phase de latence est notée au fur et à mesure de l'augmentation du pourcentage d'inoculation. Une différence de 5% par rapport à la quantité d'inoculum entraîne un retard de 5 heures sur le déroulement de la fermentation.

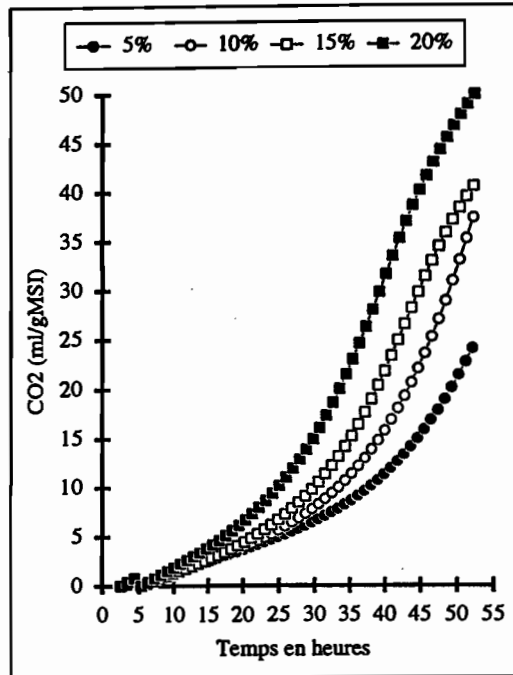


Fig.7.4. Effet du pourcentage de l'inoculum sur le démarrage des FMS pendant les premières 53 heures de culture de *M. crassipes* à 25°C à une aération de 600 ml/ heure/ colonne (● 5%, ○ 10%, □ 15%, ■, 20%).

### 7.7. Effet de l'âge de l'inoculum

Dans le but de réduire la durée de la phase de démarrage de la fermentation, des inocula d'âges différents ont été testés, le taux d'inoculation étant fixé à 15%.

Trois âges ont été testés pour *M. crassipes* : 7j, 15j et 21 jours.

L'effet de l'âge de l'inoculum sur le déroulement des fermentations est illustré sur la figure 7.5.

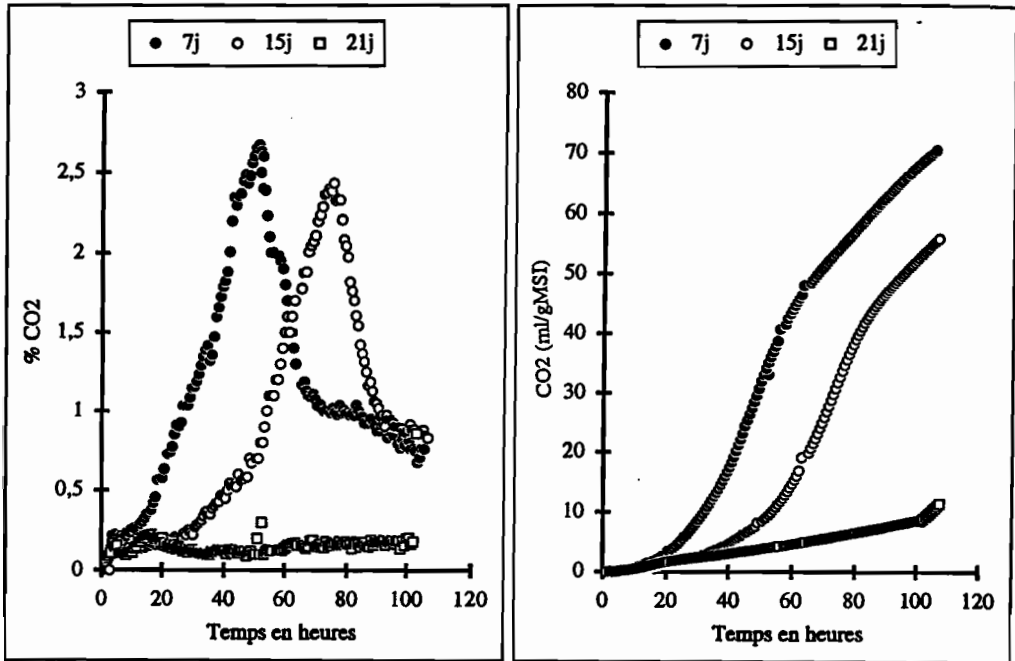


Fig. 7.5. Effet de l'âge de l'inoculum sur la production et sur l'accumulation de  $\text{CO}_2$  au cours de la culture de *M. crassipes* en FMS pendant 110 heures à  $25^\circ\text{C}$  à une aération forcée de 600 ml/ heure/ colonne (● 7 jours, ○ 15 jours, □ 21 jours).

Pour un inoculum âgé de 7 jours, la phase de latence est réduite à 9 heures, la fermentation est pratiquement finie au bout de 60 heures, alors que pour un inoculum âgé de 15 jours, le temps de latence est de 30 heures. Un inoculum vieux de 3 semaines n'a pas pu redémarrer.

A l'inverse du mycélium de *P. ostreatus*, pour lequel nous avons remarqué que l'âge de l'inoculum était sans aucun effet sur le démarrage de la fermentation, on peut remarquer que dans les cas *M. crassipes*, celui-ci constitue un paramètre important à contrôler. En effet, Buscot (1993) fait référence à la dégénérescence rapide du mycélium de Morille en culture prolongée. La perte de viabilité serait consécutive à la lyse du mycélium suite à l'épuisement des nutriments dans le milieu.

Il apparaît donc, que pour imposer le mycélium de champignons supérieurs, un inoculum solide est nécessaire pour amorcer rapidement la croissance. Des pourcentages d'inoculation adéquats contribuent à diminuer proportionnellement le temps de latence. En revanche, l'effet de l'âge de l'inoculum est un paramètre qui dépend des espèces étudiées. Il doit être exploré et défini pour chaque espèce.

Tableau 7.7. Effet de l'âge de l'inoculum sur différents paramètres suivis en FMS après 7 jours de culture de *M.crassipes* à 25°C et à une aération forcée de 600 ml/ heure/ colonne.

Paramètres Age	Temps de latence (heures)	CO <sub>2</sub> au bout de 5 jours (ml/gMSI)	Humidité %	pH	Glucose résiduaire g/l	Oct-1-én-3-ol (µg/gMSI)
7 jours	9	70	80,21	8,6	2,5	73
15 jours	30	56,2	79,76	8,3	4,5	84
21 jours	60	11,4	78,76	4,6	21	21,84

### 7.8. Effet des paramètres physiques

Dans le but d'étudier l'effet des paramètres physiques sur la croissance et sur la production d'arôme par le mycélium de *M. crassipes* cultivé en FMS, une série d'expériences identique à celle appliquée à *P. ostreatus* a été utilisée pour étudier les effets de l'humidité du support, de l'aération et de la lumière.

Tableau 7.8. Matrice d'expériences avec les valeurs codées des trois facteurs.

Expérience N°	Niveau des facteurs		
	F1	F2	F3
1	-1	+1	+1
2	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1
4	-1	-1	-1
5	+1	+1	+1
6	+1	+1	-1
7	+1	-1	+1
8	+1	-1	-1

Tableau 7.9. Relation entre les niveaux codés et les valeurs réelles des facteurs étudiés.

Facteurs	Niveaux réels des facteurs	
	-1	+1
F1 Lumière	Obscurité	Cycle diurne
F2 Aération, ml/min	5	15
F3 Humidité %	70	78

L'évolution du CO<sub>2</sub> au cours de la fermentation nous a permis de caractériser la croissance du mycélium de *M. crassipes* sur support solide.

Afin d'évaluer l'effet de l'humidité du support sur la croissance. On a comparé deux à deux différentes expériences.

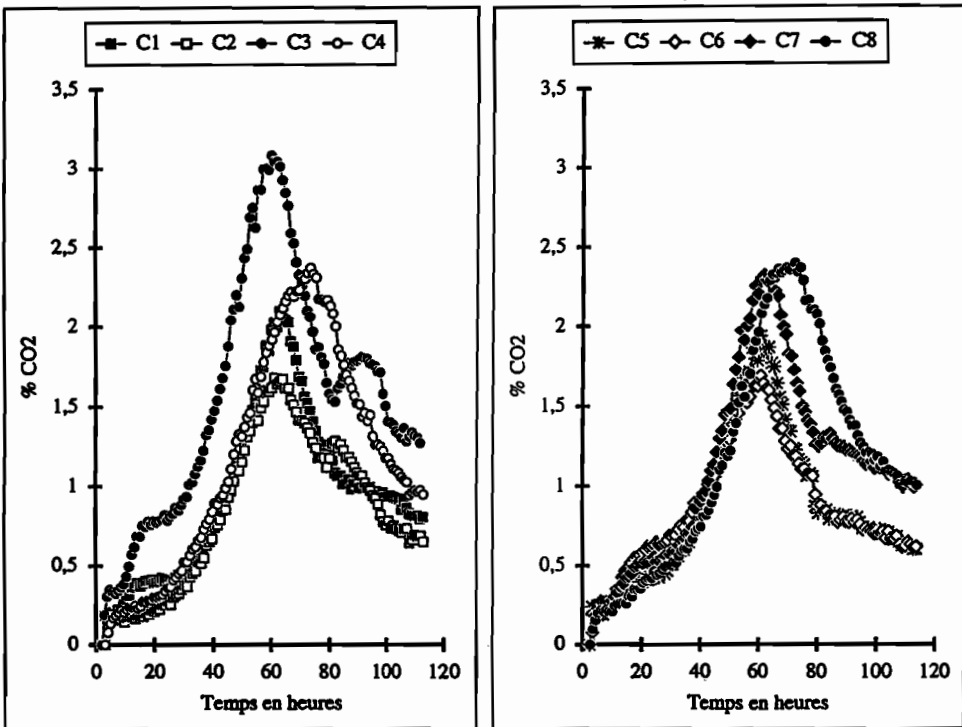


Fig. 7.6. Effet des paramètres physiques étudiés sur la croissance de *M. crassipes* cultivée en FMS pendant 115 heures à 25°C (C1-C8 correspondent aux conditions expérimentales précisées dans les tableaux 7.8. et 7.9).

On constate que la production de CO<sub>2</sub> est plus importante dans l'expérience C1 que pour C2, et pour C3 que pour C4, C5 que pour C6. Dans le cas des expériences C7 et C8, le pourcentage de CO<sub>2</sub> produit est identique. Cependant le pic de CO<sub>2</sub> pour l'expérience C8 se produit 10 heures plus tard que pour C7.

En ce qui concerne l'effet de l'aération des cultures en FMS, on observe qu'une forte aération est accompagnée d'une baisse de production de CO<sub>2</sub>, diminution qui est aussi attribuée à la dilution des effluents gazeux. Une meilleure production de CO<sub>2</sub> est observée pour C3 comparativement à C1, pour C4 comparativement à C2, pour C7 comparativement à C5 et finalement pour C8 comparativement à C6. L'effet conjugué faible aération et faible humidité (C4 et C8) entraîne un retard de 10 heures dans le déroulement de la fermentation.

Enfin, l'exposition des cultures à la lumière ne semble pas avoir un effet marqué sur la croissance sauf pour les expériences C3 et C7, pour lesquelles on peut constater une différence de production de CO<sub>2</sub>, qui peut être attribuée à un effet obscurité.

Globalement, une aération faible (débit d'air de 5ml/min) permet une meilleure croissance qu'une aération forte. Par contre, la lumière n'a que peu d'incidence sur le CO<sub>2</sub> produit. Une humidité de 78% est plus propice au développement rapide de *M. crassipes*.

Les teneurs en oct-1-én-3-ol varient entre 93,47 et 246 µg/gMSI. Les meilleurs rendements correspondent à une humidité du support élevée et à une aération faible. Par contre, c'est à la lumière, à une forte aération et à une faible humidité que le rendement en oct-1-én-3-ol est le plus faible.

Tableau 7.10. Effet des paramètres physiques étudiés sur la croissance de *M. crassipes* cultivée en FMS pendant 115 heures à 25°C (C1-C8 correspondent expérimentales précisées dans les tableaux 7.8. et 7.9).

Expérience	pH final	Humidité finale %	Note olfactive	Oct-1-én-3-ol (µg/gMSI)
1	8,7	81,2	fongique, sucrée	195
2	8,6	74,2	fongique, aigre	219
3	8,9	80,3	fongique fleurie	246
4	8,8	73,4	fongique, aigre	202,5
5	8,5	80,9	fongique léger	212,6
6	8,7	75	fongique aigre	93,5
7	8,6	79,9	fongique	239,8
8	8,8	76	aigre	159,4

Les 3 paramètres étudiés contribuent également à modifier l'arôme produit par le mycélium de *M. crassipes* cultivé sur support solide. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.11.

Tableau 7.11. Effet de la lumière de l'humidité et de l'aération des cultures sur la composition chimique de l'arôme de *M. crassipes* au bout de 8 jours de culture.

Composé chimique	Ik	Expérience N°							
		1	2	3	4	5	6	7	8
3-méthylbutanal	634	-	2,9	-	2,2	4,5	-	-	-
2-méthylbutanal	639	-	1,4	-	1,1	-	-	-	-
composé non identifié	649	-	-	-	-	3,6	-	-	-
composé non identifié	754	-	-	-	4,8	4,5	-	-	-
hexanal	775	5,2	3,2	16,2	5,9	7,2	-	5,9	9
éthylbenzène	850	-	0,8	2,5	tr	5,1	-	-	-
<i>p</i> et <i>m</i> -xylène	860	-	0,7	2,4	tr	3,5	-	-	-
styrène	878	-	1,1	3,5	1,7	4,5	-	1,4	-
<i>o</i> -xylène	883	-	-	tr	-	tr	-	-	-
benzaldéhyde	936	1,5	1,1	2,5	-	tr	-	2	-
oct-1-én-3-one	956	-	2,4	-	2	-	4,1	1,4	-
<b>oct-1-én-3-ol</b>	<b>965</b>	<b>87,1</b>	<b>78,9</b>	<b>54,3</b>	<b>75,8</b>	<b>63,8</b>	<b>94,9</b>	<b>82,4</b>	<b>87,5</b>
oct-3-énol	1035	4,5	3,7	-	4	-	-	5,8	-

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : Composé absent, tr : traces.

Tout d'abord, on constate que la proportion en oct-1-én-3-ol change en fonction des conditions de culture. En effet, dans le cas de l'expérience C3, la proportion de l'oct-1-én-3-ol représente seulement 54,3% de l'aire intégrée totale, alors que pour les expériences C6 et C8, l'oct-1-én-3-ol représente respectivement 94,9% et 87,5%. Ces forts pourcentages en oct-1-én-3-ol se traduisent également par la plus faible diversité en molécules produites : présence d'oct-1-én-3-one pour l'expérience C6 et d'hexanal pour C8. En revanche, pour l'expérience C3 différentes molécules semblent participer activement à l'arôme : l'hexanal (16,2%), un autre composé que nous n'avons pas identifié dont l'indice de Kovats est égal à 754, représente 12,4% de la fraction volatile.

Entre les expériences C2 et C4, on peut observer des similitudes dans la composition de la fraction volatile, outre l'oct-1-én-3-ol, différentes molécules sont communes à ces deux expériences : 3-méthylbutanal, 2-méthylbutanal, hexanal, oct-1-én-3-one et oct-3-énol, par contre pour l'expérience C4, on note la présence supplémentaire d'un composé non identifié (Ik=649).

De même, pour les expériences C1 et C7, les profils d'arôme sont assez proches, aussi bien par la nature des molécules présentes que par leurs proportions relatives.

Enfin, la fraction volatile pour l'expérience C5 se caractérise par la présence de différentes molécules : 3-méthylbutanal, hexanal, benzaldéhyde et deux composés non identifiés dont les indices de Kovats sont égaux à 649 et 754. Mis à part l'oct-1-én-3-ol, aucune autre molécule à 8

atomes de carbone n'est identifiée. En outre, des composés à structure benzénique (éthylbenzène, xylène, styrène) apparaissent à des pourcentages élevés 5,1%, 3,5% et 4,5% respectivement.

Il est par ailleurs difficile de corréler la composition de l'arôme à l'effet des conditions de culture étudiées. On peut en revanche constater que les concentrations en oct-1-én-3-ol sont inférieures à celles obtenues en culture en flacons. On pourrait avancer deux hypothèses : soit que l'aération des cultures entraîne des déperditions au niveau de la fraction volatile, soit encore que nous analysons la fraction volatile à un âge trop avancé. Il est dans ce cas nécessaire de réaliser une cinétique afin d'avoir la meilleure approche possible de l'effet de l'aération sur l'évolution de la teneur en oct-1-én-3-ol et sur la composition de l'arôme.

### 7.9. Cinétique de la croissance *M.crassipes* en FMS

A partir des résultats obtenus précédemment nous avons réalisé une étude cinétique afin de mieux suivre l'évolution de la production de l'oct-1-én-3-ol et de la composition de l'arôme. Nous avons travaillé à une humidité initiale de 78% et selon une aération de 10 ml/min, le taux d'inoculation étant de 15%, et l'âge de l'inoculum est de 10 jours. Les résultats sont rassemblés dans la figure 7.7.

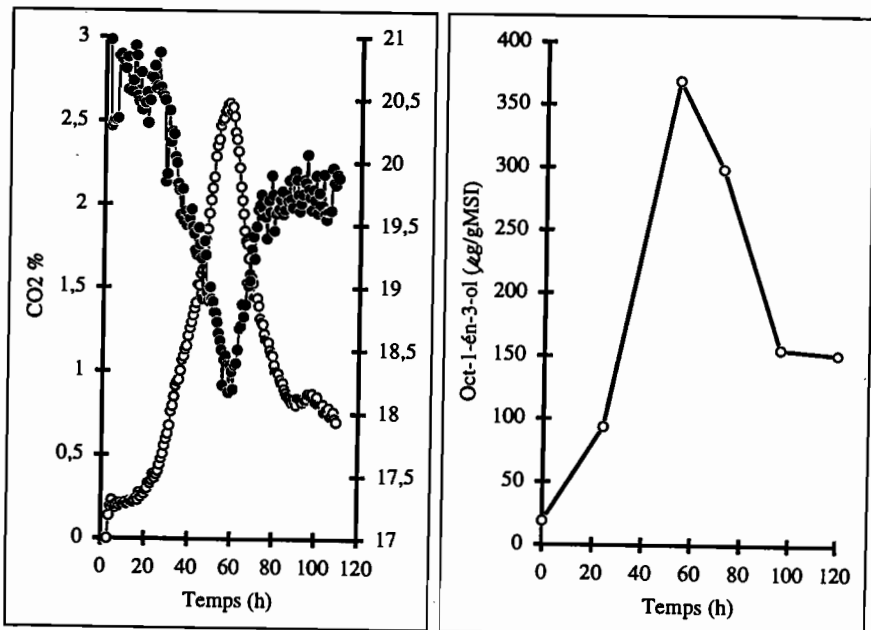


Fig. 7.7. Evolution de la production de  $\text{CO}_2$ , de l' $\text{O}_2$  et de l'oct-1-én-3-ol au cours de la croissance du mycélium de *M. crassipes* sur support solide imprégné à 78% d'humidité et sous une aération de 300 ml/ heure/ colonne.

Le suivi du métabolisme respiratoire réalisé par le dosage en continu de l'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> a permis de constater que le maximum de production de CO<sub>2</sub> et parallèlement, le maximum de consommation d'O<sub>2</sub>, sont atteints à la 58 ème heure, soit au bout de deux jours et demi de culture.

En outre, l'analyse de la teneur en glucose et en nitrate de sodium montre que ces composés sont complètement épuisés au 3ème jour de culture.

La quantité en oct-1-én-3-ol passe de 18µg/ gMSI au temps T<sub>0</sub>, à 368,34 µg/gMSI après 2 jours de culture, une diminution brusque survient par la suite. Les 18 µg/gMSI d'oct-1-én-3-ol au temps T<sub>0</sub> correspondent à la quantité initiale apportée par l'inoculum. L'évolution de la concentration en oct-1-én-3-ol suit une évolution parallèle à celle de la production de CO<sub>2</sub>.

L'identification des différentes molécules, montre une fois de plus la dominance de l'oct-1-én-3-ol. Toutefois, l'octan-3-one apparaît à des pourcentages élevés à partir du 3ème jour de culture et serait formée à partir de l'oct-1-én-3-ol par réduction de la double liaison au niveau de l'atome C<sub>3</sub> et par oxydation de la fonction alcool en fonction cétone.

Tableau 7.12. Evolution de la composition de la fraction volatile produite par le mycélium de *M. crassipes* cultivé en FMS sur support solide à 25°C sous une aération de 300 ml/ heure/ colonne.

Composé	IK	1j	2j	3j	4j	5j
non identifié	628	-	2,5	-	-	-
3-méthylbutanal	634	1,7	-	-	-	-
pentanal	674	-	15	-	-	-
hexanal	775	4,7	1,8	-	-	-
styrène	878	11	1,67	1,4	0,7	2,3
benzaldéhyde	936	3,1	0,28	-	-	-
oct-1-én-3-one	956	3	0,82	tr	0,2	0,2
oct-1-én-3-ol	965	67,8	72	69,8	63,8	70,7
octan-3-one	966	-	-	26,5	31,7	21,6
oct-2-énal	1032	5,7	4,04	tr	-	-
oct-2-énol	1049	0,4	-	-	-	-

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : Composé absent.

Chen et Wu (1984 b) ont étudié la formation de l'oct-1-én-3-ol et de l'octan-3-one à partir de l'oct-1-én-3-one à différents pH, ils ont constaté que la formation de l'oct-1-én-3-ol n'était pas affectée par le pH alors que celle de l'octan-3-one est favorisée par des pH compris entre 8 et 9. Une forte augmentation de pH combinée à un apport d'O<sub>2</sub> (par l'aération des cultures) expliquerait l'apparition de l'octan-3-one à des pourcentages élevés.

De nouvelles molécules apparaissent au cours du temps, en particulier le pentanal qui représente 15% de la fraction volatile de l'arôme à 2 jours de culture. Ce composé serait formé à partir de l'oxydation de l'acide linoléique via l'hydroperoxyde en C13, avec formation de

pentanol, lequel serait ensuite oxydé en pentanal. La présence d'air induirait une plus grande réactivité des différents hydroperoxydes obtenus à partir de l'oxydation de l'acide linoléique.

### 7.10. Effet du rajout d'huiles sur la production de l'arôme

Plusieurs auteurs ont utilisé des additifs pour rehausser l'intensité aromatique du mycélium de différentes espèces de Morilles (Launay, 1989 ; Schindler et Seipenbusch, 1990 ; Litchfield, 1967). Nous avons donc choisi d'additionner différentes huiles : huile de soja, huile de coco, huile de ricin, huile d'olive, huile de colza, à raison de 15 g/l aux cultures *in vivo* et de confronter la composition de l'arôme produit à une culture témoin.

Les cultures sont réalisées en flacons en absence d'aération forcée afin d'éviter que des oxydations dues à l'oxygène de l'air puissent se produire. L'effet de ces différentes huiles sur les caractéristiques olfactives des cultures, sur la production de l'oct-1-én-3-ol et sur la composition de l'arôme a été évalué après 4 jours de culture. Les résultats sont présentés dans les tableaux 7.13. et 7.14.

Tableau 7.13. Effet de l'ajout de différentes huiles sur les caractéristiques organoleptiques et sur la production de l'oct-1-én-3-ol par des cultures de *M. crassipes* sur support solide sans aération forcée après 96 heures de culture.

Echantillon	Note aromatique	Oct-1-én-3-ol (µg/gMSI)
<b>Témoin</b>	<b>fongique, sous bois</b>	<b>413</b>
Huile de Colza	orangée, fruitée	390
<b>Huile de Soja</b>	<b>champignon, sous bois</b>	<b>708</b>
Huile de Ricin	fruitée, phénolique	600
Huile d'Olive	fongique	601
Huile de Coco	pyrogénée, phénolique lactée,	610

Tableau 7.14. Effet de l'ajout de différentes huiles sur le effluves produites par le mycélium de *M. crassipes* sur support solide après 4 jours de culture en absence d'aération forcée.

Composé Chimique	Témoin	Colza	Soja	Ricin	Coco	olive
<b>3-méthylbutanal</b>	-	<b>37</b>	<b>23,3</b>	<b>39,5</b>	<b>36,9</b>	<b>25,1</b>
2-méthylbutanal	-	1	1,5	0,3	0,3	0,3
hexanal	1,7	2,9	0,5	1,2	1,6	1,4
benzaldéhyde	0,3	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3
oct-1-én-3-one	0,2	0,5	2	0,9	0,9	0,8
<b>oct-1-én-3-ol</b>	<b>86,7</b>	<b>44,9</b>	<b>57,7</b>	<b>46,4</b>	<b>51,8</b>	<b>61</b>
octan-3-one	3	-	-	-	-	-
octan-3-ol	2,9	5,3	1,1	1,1	-	0,4
octanal	-	-	tr	tr	1,2	tr
<b>oct-2-éanal</b>	<b>2,3</b>	<b>6</b>	<b>7,5</b>	<b>8,2</b>	<b>6</b>	<b>9,7</b>
oct-2-éno	2,2	0,3	-	0,1	-	-
Aire totale intégrée	128.756.778	943.341.598	366.976.346	745.672.597	469.244.222	339.371.931

Résultats exprimés en % de l'aire intégrée totale, - : Composé absent.

Les résultats montrent qu'un enrichissement en oct-1-én-3-ol est possible par addition de différentes huiles *in vivo*.

La concentration en oct-1-én-3-ol est multiplié par un facteur 1,7 en présence d'huile de soja (huile comportant la plus forte teneur en acide linoléique) et d'un facteur 1,47 en présence d'huile de coco, d'olive et de ricin. Ceci amène la concentration en oct-1-én-3-ol à respectivement à 177 mg/l et à 150 mg/l. Par contre, la présence d'huile de colza n'a induit aucune augmentation de la teneur en oct-1-én-3-ol. En revanche l'aire intégrée totale en présence d'huile de colza est multiplié par un facteur 7 par rapport au témoin.

L'analyse de la composition de l'arôme produit en présence des différentes huiles montre la présence de forts pourcentages en méthylbutanal. Cette molécule représente jusqu'à 40% de l'arôme produit en présence d'huile de ricin. Sa présence dans les différentes cultures explique le caractère fruité des odeurs dégagées.

### 7.11. Discussion

Launay (1989) a constaté que pour les cultures du mycélium de différentes espèces de Morille, l'intensité aromatique est corrélée à la quantité de biomasse. Litchfield (1967) suggère quant à lui que celle-ci est associée à la teneur en protéine. Par ailleurs Belinky et *al.*, (1994), ont étudié la production de l'oct-1-én-3-ol par les cultures du mycélium de *Pleurotus pulmonarius*. Ils ont constaté que l'augmentation de la teneur en oct-1-én-3-ol suivait une évolution parallèle à celle de la biomasse et de l'activité lipoxygénase. Des concentrations importantes en oct-1-én-3-ol ont été obtenues en stimulant la croissance. Un résultat analogue a été observé par Maignial (1988) sur des cultures d'*Hypomyces chrysospermus*. Cet auteur a par ailleurs noté que la concentration en oct-1-én-3-ol est liée à l'expansion de l'appareil végétatif. D'autre part, la lyse des filaments mycéliens ou l'apparition de chlamydo-spores s'accompagnent de fortes diminutions en oct-1-én-3-ol. Pour notre part, nous avons pu démontrer que la production de l'oct-1-én-3-ol suit une évolution parallèle à celle de la production de CO<sub>2</sub> et donc à la croissance du mycélium.

Il a été établi que la production d'arôme par le mycélium d'une souche de Morille est contrôlée génétiquement (Litchfield, 1967, Litchfield et *al.* 1963, Martin, 1983). Toutefois ce processus peut être influencé par des facteurs physiques tel que nous avons pu l'observer lors de la cinétique de croissance en conditions aérées.

Launay (1989), a observé que le mycélium de Morilles en culture liquide se présentait sous forme de pelotes. Il s'agit de structures globuleuses constituées d'hyphes très serrés littéralement enchevêtrés les uns aux autres. Au centre des pelotes, où le mycélium est particulièrement dense, sont observées des zones creuses d'autolyse qui pourraient apparaître par suite d'une insuffisance en O<sub>2</sub> dissous dans le milieu de culture. Ces zones de lyse seraient liées au développement de

l'arôme. Pour Berger (1995), la production des molécules en C8 peut être assimilée à un bon indicateur de la lyse cellulaire.

Par ailleurs, Schindler et Seipenbusch (1990) ont mis au point une méthode de production d'oct-1-én-3-ol à partir de cultures en milieu liquide du mycélium de différentes espèces de Morille. Le mycélium sous forme de pelotes compactes, subit un traitement mécanique qui permet la rupture des cellules et donc la mise en contact des systèmes enzymatiques du champignon avec l'acide linoléique contenu dans les différentes huiles ajoutées au milieu de culture. Des rendements en oct-1-én-3-ol compris entre 5 mg/l et 28 mg/l sont obtenus en 3 jours de culture pour différentes espèces de Morilles. Le mycélium de *M. crassipes* cultivé sur support solide permet d'atteindre 368  $\mu\text{g/gMSI}$  en 54 heures soit l'équivalent de 92 mg/l, sans rajout de précurseurs. Ce rendement élevé peut être attribué au mode de croissance du mycélium sur support solide. En effet, le mycélium se développe sous forme d'hyphes à distribution linéaire et une simple homogénéisation manuelle conduit à une augmentation instantanée de l'intensité de l'arôme dégagé. L'homogénéisation des cultures aboutit au niveau du mycélium à des dommages qui contribueraient à mettre en contact l'acide linoléique et le système enzymatique impliqué dans la formation de l'oct-1-én-3-ol. La concentration en oct-1-én-3-ol est d'autant plus importante que la quantité de biomasse et l'activité du système enzymatique lipoxigénase-hydroperoxyde lyase sont élevées.

La brusque diminution de production de l'oct-1-én-3-ol en fin de culture peut être due à la diminution de l'activité lipoxigénase-hydroperoxyde lyase suite à l'augmentation du pH, en effet Mau et al., (1992) ont montré que, pour les carpophores d'*Agaricus bisporus*, ce complexe enzymatique était actif uniquement pour des pH compris entre 6 et 7,5.

## 7.12. Conclusion

La souche *M. crassipes* présente une très bonne croissance en fermentation solide qui peut être orientée vers la production de l'oct-1-én-3-ol.

Afin d'atteindre de bonnes concentrations en cet alcool, il est important de travailler dans des conditions optimales pour la production de biomasse. La biomasse formée peut être utilisée en tant que pool enzymatique pour la conversion de l'acide linoléique en oct-1-én-3-ol. Dans ce cas il faut contrôler les paramètres suivants :

1. Le pH du milieu : un pH acide est incompatible avec la production de l'oct-1-én-3-ol.
2. Le rapport CN : un rapport C/N faible contribue à améliorer la production de l'oct-1-én-3-ol.
3. Le mode d'inoculation : par une inoculation appropriée "support activé", il est possible de réduire au minimum le temps de latence et de parer ainsi aux risques de contamination.
4. L'âge de l'inoculum : c'est l'un des facteurs les plus importants à contrôler. En effet, le mycélium de *M. crassipes* subit une dépression des croissance d'autant plus importante que les temps de cultures sont plus longs.

5. Le temps correspondant à une croissance maximale : ce temps correspond également au maximum de production de l'oct-1-én-3-ol.
6. L'adjonction de précurseurs : par la supplémentation du milieu de base en huiles riches en acide linoléique, il est possible d'accroître la production de l'oct-1-én-3-ol. Celle-ci pourrait éventuellement être améliorée par l'addition de lipases qui libéreraient graduellement les acides gras dans le milieu de culture.

Vu les forts rendements en oct-1-én-3-ol obtenus, les temps de culture très courts, et surtout étant donné le prix très élevé de l'oct-1-én-3-ol naturel (40.000 FF, communication personnelle Givaudan-Roure), l'extrapolation de ce procédé à un stade industriel peut être envisagée.

## ***Conclusion Générale***

## 8. Conclusion générale

Notre objectif principal a été d'étudier le comportement du mycélium de Pleurotes et de Morilles sur support solide en vue de la production d'arôme.

Dans le cas des Pleurotes, nous étions tenus de privilégier la meilleure adéquation entre la composition de l'arôme carpophore et celle produite par la culture du mycélium. Parmi les quatre souches de Pleurotes étudiées, seul le mycélium de *P. ostreatus* JMO-95 cultivé en FMS sur support solide présentait une composition de l'arôme qui se rapproche de celle du carpophore.

Par ailleurs, l'arôme de carpophore de *P. ostreatus* JMO-95 est essentiellement dû à la présence de molécules à 8 atomes de carbone : octan-3-one (80%) et octan-3-ol (14%). L'octan-3-one présente un caractère fruité et fongique. Elle est retrouvée dans les carpophores de différents champignons comestibles mais elle y figure à des pourcentages très faibles par rapport à l'oct-1-én-3-ol. Cette prédominance de l'octan-3-one dans nos échantillons est probablement due au procédé extractif. En effet, l'analyse headspace appliquée directement sur les échantillons n'entraîne aucune dégradation chimique, à savoir des réactions d'oxydations et ou de réductions qui auraient contribué à changer le profil aromatique.

En cultures non aérées sur support solide, le mycélium de *P. ostreatus*, produit une grande diversité de molécules à 8 atomes de carbone, dont la proportion varie en fonction du temps d'incubation. Une durée minimale de 14 jours de culture mycélienne est nécessaire pour recréer la composition de l'arôme de carpophore. L'aptitude du mycélium de *P. ostreatus* JMO-95 à produire différentes combinaisons de molécules à 8 atomes de carbone pourrait être exploitée pour la production d'une grande palette de mélanges des C8 qui servirait à recréer artificiellement l'arôme de différents carpophores.

En cultures aérées sur support solide, le mycélium de *P. ostreatus* JMO-95, produit de nouvelles molécules qui dérivent de processus oxydatifs : anisaldéhyde et acétoïne. La concentration en anisaldéhyde après 6 jours de culture est équivalente à 100 mg/l. La biosynthèse de cette molécule semble liée à l'aptitude du mycélium de *P. ostreatus* JMO-95 à dégrader la lignine, contenue dans les parois des cellules de la bagasse de canne à sucre. L'apparition de benzaldéhyde en début de culture, suite à une inoculation en masse, que cela soit en conditions aérées ou en conditions non aérées, semble être également liée à cette faculté. En effet, des observations de coupes de bagasse de canne à sucre au microscope électronique ont montré que celle-ci présentait des aspects de lyse dus à des traitements physiques et ou biologiques antérieurs. Ceci semble être la cause de l'induction précoce du système ligninolytique et explique l'apparition de benzaldéhyde et d'anisaldéhyde.

La culture mycélienne de *M. crassipes*, sélectionnée parmi trois espèces de Morilles, a été orientée essentiellement vers la production de l'oct-1-én-3-ol. Cette molécule évoque la note fongique. Elle représente la quasi totalité de l'arôme du mycélium de *M. crassipes* cultivé sur

support solide. D'autres molécules peuvent être exceptionnellement formées telles l'octan-3-one en conditions aérées et à des pH alcalins, ou encore le 3-méthylbutanal qui est formé à des pourcentages très élevés en présence de différentes huiles : les concentrations en oct-1-én-3-ol sont de l'ordre 370 µg/gMSI au bout de 58 heures de culture. Cette concentration a été améliorée par l'ajout d'huile de soja aux cultures, ce qui a permis d'atteindre une concentration de 700 µg/gMSI après 96 heures de culture.

Les seules applications brevetées, concernant la bioproduction de métabolites odorants, par les cultures de champignons comestibles, concernent la production de l'oct-1-én-3-ol par le mycélium de différentes espèces de morilles en culture liquide. Le meilleur rendement ayant été obtenu était de 28 mg/l. Les cultures mycéliennes de *M. crassipes* sur support solide permettent donc de multiplier cette concentration par un facteur supérieur à 5.

Nous avons également observé que la formation de l'oct-1-én-3-ol suivait une évolution parallèle à celle de la croissance évaluée par la technique de respirométrie. Une bonne croissance s'accompagne d'une production importante d'oct-1-én-3-ol. Paradoxalement, ceci n'est pas vérifié pour la production des molécules en C8 par le mycélium de *P. ostreatus* JMO-95 pour lequel nous n'avons pas pu observer de corrélation étroite avec la croissance.

La respirométrie a constitué un outil extrêmement utile pour évaluer l'effet des conditions de culture sur la croissance des deux espèces étudiées. Ceci nous a permis en particulier d'optimiser le mode d'inoculation, et d'imposer rapidement le mycélium des deux espèces étudiées par l'adoption d'un inoculum solide. Des durées de culture de 58 et 78 heures sont suffisantes pour assurer la colonisation du support solide respectivement par le mycélium de *M. crassipes* et par celui de *P. ostreatus* JMO-95. Par ailleurs cette stratégie d'inoculation peut être aisément transposable à plus grande échelle.

L'étude de l'effet de l'âge de l'inoculum sur le déroulement de la FMS, a montré que celui ci est sans incidence notable sur le déroulement des cultures, pour *P. ostreatus* JMO-95 alors que pour *M. crassipes*, il est impératif de contrôler ce paramètre. En effet, une dépression de la vitesse de croissance est observée pour un mycélium âgé de plus de deux semaines.

Finalement, la fermentation en milieu solide est une technique parfaitement adaptée à la culture du mycélium des champignons supérieurs. Elle offre des conditions de croissance et de production de métabolites proches de celles que les champignons peuvent trouver dans leur biotope naturel. Dans notre étude ceci est reflété :

- \* par la production par le mycélium d'un arôme proche de celui du carpophore pour *P. ostreatus* JMO-95.

- \* par la mise en valeur de la capacité de *P. ostreatus* JMO-95 à dégrader la lignine aboutissant à la production de benzaldéhyde et d'anisaldéhyde.

- \* par la production de teneurs élevées d'oct-1-én-3-ol par le mycélium de *M. crassipes*. La croissance du mycélium étant linéaire, une simple homogénéisation contribue à augmenter

instantanément la teneur en oct-1-én-3-ol d'une part par la mise en contact de l'acide linoléique cellulaire et du complexe enzymatique lipoxygénase-hydroperoxyde lyase, d'autre part, par une plus grande facilité de diffusion de l'O<sub>2</sub> au niveau des hyphes.

La culture du mycélium des champignons supérieurs, à une échelle industrielle représenterait un bon moyen, pour la production d'une grande diversité de composants aromatiques. Ceux-ci pourraient avoir un intérêt alimentaire et bénéficier du label naturel. A l'heure actuelle, les bactéries et les levures offrent des avantages considérables par rapport aux champignons (facilités technologiques, connaissances approfondies de leur métabolisme, possibilité d'interventions génétiques...), cependant les champignons présentent des potentialités de synthèse importantes qui peuvent être mises en valeur par les cultures mycéliennes sur support solide.

## ***Références bibliographiques***

## 9. Références bibliographiques

- Abraham W. R., Hanssen H. P. & Möhringer C., 1988. Novel sesquiterpene ethers from liquid cultures of the wood-rotting fungus *Lentinus lepideus*. *Z. Naturforsch.*, **43 C** : 24-28.
- Abraham W. R., Hanssen H. P. & Urbash I., 1991. Lepistrones, major volatile metabolites from liquid cultures of *Lepista irina* (Basidiomycotina). *Z. Naturforsch.*, **42 C** : 169-171.
- Abraham B. G. & Berger R. G., 1994. Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. *J. Agric. Food. Chem.*, **42**: 2344-2348.
- Abraham B. G., Krings U. & Berger R.G., 1994. Biotechnological production of volatile compounds by Basidiomycetes. *GIT Fatchz. Lab.*, **38**: 370-375.
- Aldoo K. E., Hendry R. & Wood J. B., 1982. Solid substrate fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.*, **28**: 201-208.
- Alexopoulos C. J. & Nims C. W., 1979. Introductory mycology. Third Edition., John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, p. 340-342.
- Allian A. & El Wakall F., 1982. Subcultivation of mushroom : some nutritional and environmental requirements. *Egypt. J. Food Sci.*, **10**: 127-134.
- Amir R., Levanon D., Hadar Y. & Chet I., 1993. Morphology and physiology of *Morchella esculenta* during sclerotial formation. *Mycol. Res.*, **6**: 683-689.
- Armstrong D. W., Gillies B. & Yamasaki H., 1989. Natural flavors produced by biotechnological processing. In *Flavor Chemistry : Trends and Developments*, (Ed), R. Teranishi, R. G. Buttery & F. Shahidi, American Chemical Society, Washington, DC, p. 105-120.
- Assaf S., Hadar Y. & Dosoretz C. G., 1995. Biosynthesis of 13-hydroperoxylinoleate, 10-oxo-8-decenoic acid, and 1-octen-3-ol from linoleic acid by a mycelial-pellet homogenate of *Pleurotus pulmonarius*. *J. Agric. Food. Chem.*, **43**: 2173-2178.
- Audoin P., Vidal J. P. & Richard H., 1989. Composés volatils de l'arôme de quelques champignons sauvages comestibles : La morille (*Morchella conica*), le pied bleu (*Lepista nuda*), le clitocybe nébuleux (*Clitocybe nebularis*) et le clitocybe orange (*Hygrophoropsis aurantiaca*). *Sciences des Aliments*, **9**: 185-193.
- Badcock E. G., 1939. Preliminary account of the odour of wood-destroying fungi in culture. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **23**: 188-198.
- Bajracharya R. & Mudgett R. E., 1980. Solid-substrate fermentation of alfalfa for enhanced protein recovery. *Biotechnol. Bioeng.*, **21**: 551-560.
- Bano Z. & Rajarathnan S., 1988. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition and nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **27**: 87-158.
- Barrios-Gonzalez J., Tomasini A., Viniegra-Gonzalez G. & Lopez L., 1988. Penicillin production by solid state fermentation. In *Solid state fermentation in bioconversion of agro-industrial raw materials*, M. Raimbault, (Ed), ORSTOM, Montpellier, p. 39-51.
- Barstow L. M., Dale B. E. & Tengerdy R. P., 1988. Evaporative temperature and moisture controle in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Techniques*, **2** (4): 237-242.
- Belinky P. A., Masaphy S., Levanon D., Hadar Y. & Dosoretz C. G., 1994. Effect of medium composition in submerged cultures of *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**: 629-633.
- Bellesia F., Pinetti A., Bianchi A. & Trillini B., 1996. Volatile compounds of the white truffle (*Tuber magnatum* Pico) from middle Italy. *J. Flavour & Fragrance*, **11**: 239-243.

- Bensoussan M., Tisserand E., Kabbaj W. & Roussos S., 1995. Partial characterization of aroma produced by submerged culture of morel mushroom mycelium. *Crypt. Mycol.*, **16**: 65-75.
- Berger R. G. & Drawert F., 1987. Microbien sources of flavours compounds. In *Bioflavour'87*, Schreier P. (Ed), Walter de Gruyter et Co, Berlin-New York, p. 415-434.
- Berger R. G., 1995. *Aroma biotechnology*. (Ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Berger R. G., Neuhaeuser K. & Drawert F., 1986 a. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 6. Odorous constituents of *Polyporus durus* (Basidiomycetes). *Zeit-schrift für Naturforschung*, **41 C**: 963-970.
- Berger R. G., Neuhaeuser K. & Drawert F., 1986 b. Characterization of the odour principles of some Basidiomycetes : *Bjerkandera adusta*, *Poria aurea*, *Tyromyces sambuceus*. *J.Flavour & Fragrance* **1**: 181-186.
- Berger R. G., Neuhaeuser K. & Drawert F., 1987. Biotechnological production of flavor compounds : III. High productivity fermentation of volatile flavors using a strain of *Ischnoderma benzoinum*. *Biotechnol. Bioengin.*, **30**: 987-990.
- Birkinshaw J. H. & Findlay W. P. K., 1940. Biochemistry of the woodrotting fungi. I Metabolic products of *Lentinus lepideus* Fr. *J. Biochem.*, **34**: 82-88.
- Birkinshaw J. H., Bracken A. & Findlay W. P. K. 1944. Biochemistry of the wood-rotting fungi. 4. Metabolic products of *Trametes suavis* (Linn.) Fr. *J. Biochem.*, **38**: 131-132.
- Birkinshaw J. H., Morgan E. N. & Findlay W. P. K., 1952. Biochemistry of wood-rotting fungi-Metabolic products of *Polyporus benzoinus*. *J. Biochem.*, **50**: 509-516.
- Block S. S., Stearns T. W., Stevens R. L. & Mc Candless R. F. J., 1953. Mushroom mycelium. Experiments with submerged culture. *Agr. Food Chem.*, **1**: 890-893.
- Breheret S., Talou T., Rapior S. & Bessière J. M., 1997. Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (Basidiomycetes). *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 831-836.
- Brock T.D., 1951. Studies on the nutrition of *Morchella esculenta* Fries. *Mycologia*, **43**: 402-422.
- Buscot F., 1987. Contribution à l'étude d'une espèce de morille de la forêt rhénane : *Morchella rotunda* (Pers) Boudier; perspectives de domestication. Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg,, 160 pages.
- Buscot F., 1993. Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture. *Mycol. Res.*, **97**, **2**: 136-140.
- Bushbäuer G., Jirovetz L., Wasicky M. & Nikiforov A., 1993. Zum aroma von speisepilzen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **197**: 429-433.
- Calzada J. F. & Rolz C., 1990. Estimation of the growth rate of *Pleurotus* on stacked straw. *J.Ferment. Bioengin.*, **69** (1): 70-71.
- Chadefaud M., 1960. *Traité de botanique*. Tome 1, Masson, Paris, 1118 pages.
- Chalier P., 1991. Production de composés d'arôme par *Penicillium roqueforti*. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 113 pages.
- Chang S. T., Lau O. W. & Cho K. Y., 1981. The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor caju*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **12**: 58-62.
- Cheetham P. S. J., 1993. The use of biotransformations for the production of flavours and fragrance. *Tibtech*. November, **11**: 478-488.
- Chen C. C. & Ho C. T., 1986. Identification of sulfurous compounds of Shii-take mushroom (*Lentinus edodes* Sing). *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 830-833.
- Chen C. C. & Wu C. M., 1984 a. Volatile components of mushroom (*Agaricus subrufescens*). *J. Agric. Food Sci.*, **32**: 1208-1209.
- Chen C. C. & Wu C. M., 1984 b. Studies on the enzymic reduction of 1-octen-3-one in

- mushroom (*Agaricus bisporus*). *J. Agric. Food Chem.*, **32**: 1342-1344.
- Chen C. C., Chen S. D., Chen J. J. & Wu C. M., 1984.** Effects of pH value on the formation of volatiles of Shiitake (*Lentinus edodes*), an edible mushroom. *J. Agric. Food Chem.*, **32**: 999-1001.
- Christen P., Villegas E. & Revah S., 1994.** Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in various fermentation media. *Biotech. Lett.*, **16** (1): 1183-1188.
- Collins R.P., 1976.** Terpenes and odoriferous materials from microorganisms. *Lloydia*, **39**: 20-24
- Collins R.P., 1979.** The production of volatile compounds by filamentous fungi. In *Developments in Industrial Microbiology*, (Ed), Logis Arlin, Vol. **20**: 239-245.
- Collins R. P., Knaak L. E. & Soboslai J. W., 1971.** Production of geosmin and 2-exo-hydroxy-2-methylbornane by *Streptomyces odorifer*, *Lloydia*, **33**: 199-200.
- Collins R. P. & Halim A. F., 1972.** Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. *J. Agric Food Chem.*, **20**: 437-438.
- Cordova J., 1994.** Efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento y la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* por fermentación en estado sólido. Maestria en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-Iztapalapa), Mexico.
- Cormier F., Raymond Y., Champagne C. P. & Morin A., 1991.** Analysis of odor-active volatiles from *Pseudomonas fragi* grown in milk. *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 159-161.
- Cronin D. A. & Ward M. K., 1971.** The characterization of some mushroom volatiles. *J. Sci. Food Agric.*, **22**: 477-479.
- Crouzet J., 1992.** La biogénèse des arômes. In *Les Arômes Alimentaires*, Collection Sciences & Techniques Alimentaires, J. L. Multon, (Ed), Tec & Doc Lavoisier, p. 80-97.
- Cruz C., Noël-Suberville C. & Montury M., 1997.** Fatty acid content of some flavor compound release in two strains of *Agaricus bisporus*, according to three stages of development. *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 64-67.
- Degorce-Dumas J. R., More J., Goursaud J. & Leveau J. Y., 1984.** Production d'arômes par les microorganismes : Les potentialités. *Industries Alimentaires et Agricoles*, **101**: 11-15.
- Dehorter B. & Lacoste L., 1980.** Photoinduction des périthèces du *Nectaria galligena*. Influence de la qualité de la lumière. *Can. J. Bot.*, **58**: (20): 2212-2217.
- Delmas J. & Bunel F., 1975.** Contribution à l'étude de l'écologie des morilles. *C. R. de l'Académie d'Agriculture*, Janvier: 118-123.
- Delmas J., 1974.** Les morilles : caractères, écologie, recherches en cours. *Pépinéristes, Horticulteurs, Maraîchers*, **149**: 23-30.
- Delset P. H., 1992.** Les arômes par voie biotechnologique : Promesses et réalités. Une approche globale. In *Les arômes alimentaires*, Collection Sciences & Techniques Alimentaires, J. L. Multon, (Ed), Tec & Doc Lavoisier, Paris, p. 114-130.
- Dijkstra F. Y., 1976.** Studies on mushroom flavours 3. Some flavour compounds in fresh, canned and dried mushrooms. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.*, **160**: 401-405.
- Dijkstra F. Y. & Wikén T. O., 1976 a.** Studies on mushroom flavours. 1. Organoleptic significance of constituents of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.*, **160**: 255-262.
- Dijkstra F. Y. & Wikén T. O., 1976 b.** Studies on mushroom flavours. 2. Flavours compounds in *Coprinus comatus*. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.*, **160**: 263-269.
- Drawert F., Berger R. G. & Neuhaeuser K., 1983.** Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 4. characterization of the major principles of the odor of *Pleurotus euosmus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**: 124-127.

- Dufour D., 1990. Contribution à l'étude de la physiologie de champignons pectolytiques cultivés en milieu solide, en relation avec la respiration et la synthèse de pectinases. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, 262 pages.
- Durand A. & Chereau D., 1988. A new pilot reactor for solid state fermentation : Application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnol. Bioeng.*, **31**: 476-486.
- Durand A., De La Broise D. & Blachere H., 1988. Laboratory scale bioreactor for solid processes. *J. Biotechnol.*, **8**: 59-66.
- Fabre C. E., Blanc P. J. & Goma G., 1996. Production of benzaldehyde by several strains of *Ischnoderma benzoinum*. *Sciences des Aliments*, **16**: 61-68.
- Feron G., Bonarme P. & Durand A., 1996. Prospects for the microbial production of food flavours. *Trends in Food Science and Technology*, **7**: 285-293.
- Fisher K. H. & Grosch W., 1987. Volatile compounds of importance in the aroma of mushrooms (*Psalliota bispora*). *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, **20**: 233-236.
- Freytag W. & Ney K. H., 1968. Beitrag zum vorkommen von 1-octen-3-ol. *Eur. J. Biochem.*, **4**: 315-318.
- Fron G., 1905. Sur les conditions de développement du mycélium de la morille. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, **140**: 1187-1189.
- Galli E., Tomati U., Grappelli A., Di Lena G. & Pietrosanti W., 1991. Solid state degradation of agricultural wastes by *Pleurotus* species. In *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Maher (Ed), Balkema Rotterdam, p. 705-708.
- Gallois A., Gross B., Langlois D., Spinnler H. E. & Brunerie P., 1990. Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic Basidiomycetes. *Mycol. Res.*, **94** (4): 494-504.
- Gatfield I. L., 1988. Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. *Food Technol.*, **42** (6): 110-122.
- Gervais P. & Battut G., 1989. Influence of water potential on  $\gamma$ -decalactone production by the yeast *Sporodiobolus salmonicolor*. *Appl. Env. Microbiol.*, **55**: 2939-2943.
- Gervais P. & Sarette M., 1990. Influence of age of mycelium and water activity of the medium on aroma production by *Trichoderma viride* grown on solid substrate. *J. Ferment. Bioengin.*, **69** (1): 46-50.
- Gervais P., 1990. Water activity : A fundamental parameter of aroma production by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **33**: 72-75.
- Gervais P., Bensoussan M. & Grajek W., 1988. Water activity and water content : comparative effects on the growth of *Penicillium roqueforti* on solid substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**: 389-392.
- Gilbert F. A., 1960. The submerged culture of *Morchella*. *Mycologia*, **52**: 201-209.
- Godefroot M., Sandra P. & Verzel J., 1981. New method for quantitative essential oil analysis. *Chromatogr.*, **203**: 325-335.
- Gold M. H., Kuwahara M., Chiu A. A. & Glenn J. K., 1984. Purification and characterization of an extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiring diaryl propane oxygenase from the white rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **234**: 353-362.
- Gonzales-Blanco P., Saucedo-Castañeda G. & Viniestra-Gonzalez G., 1990. Protein enrichment of sugar cane by products using solid-state cultures of *Aspergillus terreus*. *J. Ferment. Technol.*, **70**: 351-354.
- Grajek W., 1988. Cooling aspects of solid state cultures of mesophilic and thermophilic fungi. *J. Ferment. Technol.*, **66** (6): 675-679.

- Greis H., 1940.** Befruchtungsarten bei *Morchella*. *Jahr. Wiss. Bot.*, **89**: 245-253.
- Gross B. & Asther M., 1989.** Arômes des basidiomycètes: Caractéristiques, analyses et production. *Sciences des Aliments*, **9**: 427-454.
- Grove J. F., 1981.** Volatile compounds from the mycelium of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Phytochem.*, **20** (8): 2021-2022.
- Guillén F. & Evans C. S., 1994.** Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60** (8): 2811-2817.
- Guillén F., Martínez A. T., Martínez M. J. & Evans C. S., 1994.** Hydrogen-peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**: 465-470.
- Gutiérrez A., Caramelo L., Prieto A., Martínez J. M. & Martínez A. T., 1994.** Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 1783-1788.
- Hadar Y. & Dosoretz C. G., 1991.** Mushroom mycelium as a potential of food flavour. *Trends in Food and Technology*, **2**: 214-218.
- Hagerdon S. & Kaphammer B., 1994.** Microbien biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 773-800.
- Halim A. F. & Collins R. P., 1971.** An analysis of the odorous constituents of *Trametes odorata*. *Llyodia*, **38**: 451-452.
- Hanssen H. P. & Sprecher E., 1981.** Aroma producing fungi : Influence of strain specificity and culture conditions on aroma production. In *Flavour'81*, P. Schreier (Ed), Walter Publ., Berlin, p. 547-556.
- Hanssen H. P. & Klingenberg A., 1983.** Determination of some important flavour compounds in commercial mushroom concentrates. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **177**: 333-335.
- Hanssen H. P., 1985.** Sesquiterpene alcohols from *Lentinus lepideus*. *Phytochem.*, **24** (6): 1159-1160.
- Hanssen H. P., Sprecher E. & Abraham W. R., 1986 a.** 6-protoilludene, the major volatile metabolite from *Ceratocystis piceae* liquid cultures. *Phytochem.*, **25** (8): 1979-1980.
- Hanssen H. P., Sinnwell V. & Abraham W. R., 1986 b.** Volatile fragrance compounds from the fungus *Gloephyllum odoratum* (Basidiomycotina). *Z. Naturforsch.*, **41** (C): 825-829.
- Hanssen H. P. & Abraham W. R., 1987.** Odoriferous compounds from liquid cultures of *Gloephyllum odoratum* and *Lentinelleus cochleatus* (Basidiomycotina). *J. Flavour & Fragrance*, **2**: 171-174.
- Hariel J., 1989.** Panorama de l'industrie des arômes : Evolution récente et rapports avec les IAA. *IAA*, **7** (6): 367-379.
- Hartmann H., 1995.** Flavors... A business with taste. *Perfumer & Flavorist*, **20** (5): 35-42.
- Hesseltine C. W., 1987.** Solid state fermentation. An Overview. *Int. Biodeterioration*, **23**: 79-89.
- Highley T. L., Bar-Lev S. S., Kirk T. K. & Larsen M. J., 1983.** Influence of oxygen and carbon dioxide on wood decay by heartrot and saprot fungi. *Phytopathol.*, **73**: 630-633.
- Hong J. S., Lee J. Y., Kim Y. H., Kim M. K., Jung J. T. & Lee K. R., 1986.** Studies on the volatile aroma components of *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.*, **14** (1): 31-36.
- Huball J. A. & Collins R. P., 1978.** A study of factors affecting the synthesis of terpenes by *Ceratocystis variispora*. *Mycologia*, **70**: 117-129.
- Huerta-Ochoa S., 1984.** Efecto de la transferencia de masa y la acumulación del calor metabólico en la fermentación de cultivos sólidos. Tesis Maestria en Ciencias, Ingeniero Químico, Universidad Autonoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico, 147 pages.

- Hutchinson S. A., 1971. Biological activity of volatile fungal metabolites. *Trans Brit. Mycol. Soc.*, 57: 185-200.
- Impens R., 1972. Comparaison de la croissance mycélienne de deux morilles en présence de préménoïdes. *Bull. Rech. Agron. Gembloux Belg*, 7: 124-133.
- Janssens L., De Pooter H. L., Vandamme E. J. & Schamp N. M., 1988. Bio-synthesis of ester by *Geotrichum penicillatum*. In *Bioflavour '87*, (Eds) P. Schreier, Walter de Gruyter & Co, Berlin: 453-463.
- Janssens L., De Pooter H. L., Schamp N. M. & Vandamme E. J., 1992. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochem.*, 27: 195-215.
- Jaubert J. N. 1983. Les arômes alimentaires. Que sais-je ? (Ed), Les Presses Universitaires, Paris
- Jaubert J. N., Gordon G. & Doré J. C., 1987a. Une organisation du champ des odeurs, Première partie : recherche de critères objectifs. *Parfums Cosmétiques Arômes*, 77: 53-56.
- Jaubert J. N., Gordon G. & Doré J. C., 1987b. Une organisation du champ des odeurs, Deuxième partie: Modèle descriptif de l'organisation de l'espace odorant. *Parfums Cosmétiques Arômes*, 77: 71-82.
- Jennings W. & Shibamoto T., 1980. Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillar gas chromatography. Academic Press : New-York,.
- Jung S. T. & Hong J. S., 1991. Volatile components of oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.) cultivated in Korea. *Kor. J. Mycol.*, 19: 299-305.
- Kabbaj W., Bensoussan M. & Roussos S., 1997. Factors affecting physiology of mycelial growth and aroma production in solid state fermentation of mushrooms. In *Advances in Solid State Fermentation*. (Eds), Roussos S., Lonsane B. K., Raimbault M., & Viniegra-Gonzalez G., Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, p. 435-446.
- Kapfer G. F., Berger R. G. & Drawert F., 1989. Production of 4-decanolide by semicontinuous fermentation of *Tyromyces sambuceus*. *Biotech. Lett.*, 11 (8): 561-566.
- Kaul T. N., 1977. Physiological studies of *Morchella* species. II. Nitrogen utilisation. *Mushroom Journal*, 58: 328-332.
- Kawabe T. & Morita H., 1993. Volatile components in culture fluid of *Polyporus tuberaster*. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 637-640.
- Kawabe T. & Morita H., 1994. Production of benzaldehyde and benzyl alcohol by the mushroom *Polyporus tuberaster*. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2556-2560.
- Kempler G. M., 1983. Production of flavor compounds by micro-organisms. *Adv. Appl. Microbiol.*, 29: 29-51.
- Khanna P. & Garcha S., 1985 a. Physiological studies in *Pleurotus* spp. II. Carbone utilisation *Mushroom News Letter For the Tropics*, 5: (3): 9-16.
- Khanna P. & Garcha S., 1985 b. Physiological studies on *Pleurotus* spp. I. Nitrogen utilisation. *Mushroom News Letter For the Tropics*, 5 (3): 16-21.
- Kinderler J. L., 1989. Volatile metabolites of filamentous fungi and their role in food flavour. *J. Appl. Bact. Symposium Supplement*, 133S-144S.
- Krings U., Abraham B. G. & Berger R. G., 1995. Plant impact volatiles from higher fungi : A biotechnological perspective. *Perfumer & Flavorist*, 20 (5): 79-86.
- Kumar P. K. R. & Lonsane B. K., 1987. Gibberillic acid solid state fermentation : consistent and improved yields. *Biotechnol. Bioeng.*, 30: 267-271.
- Laborde J. & Delmas J., 1974. Le Pleutote : un nouveau champignon comestible cultivé. *Pont de la Maye*, 23 janvier: 39-46.
- Lanza E., KO K. H. & Palmer J. K., 1976. Aroma production by cultures of *Ceratocystis*

- moniformis*. *J. Agric. Food Chem.*, **24** (6): 1247-1250.
- Lanza E. & Palmer J. K., 1977.** Biosynthesis of monoterpenes by *Ceratocystis moniformis*. *Phytochem.*, **16**: 1555-1560.
- Largent D. L., Bradshaw D. E. & Wood W. F., 1990.** The candy-like odor of *Nolanea fructufragans*. *Mycologia*, **82** (6): 786-787.
- Latrasse A., Dameron P., Hassani M. & Staron T., 1987.** Production d'un arôme fruité par *Geotrichum candidum* (Staron). *Sciences des Aliments*, **7**: 637-645.
- Latrasse A., Dameron P., Hassani M. & Staron T., 1988.** An ester producing micro-organism : *Geotrichum candidum* (Staron). In *Bioflavour'88*. Analysis Biochemistry -Biotechnology, (Ed), P. Schreier, Walter de Gruyter, Berlin, 453-463.
- Latrasse A., Degorce-Dumas J. R. & Leveau J. Y., 1984.** Production d'arômes par les microorganismes. *Sciences des Aliments*, **5**: 1-26.
- Launay F., 1989.** Nouvelles approches de la culture en milieux solide et liquide de mycélium d'un champignon supérieur: la Morille. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, 193 pages.
- Le Duy A., Kosaric N. & Zajic E., 1974.** Morel mushroom mycelium growth in waste sulfite liquors as source of protein and flavouring. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **7** (1): 44-50.
- Lecchini S. M. A., 1994.** The flavor industry and the european challenge. *Perfumer & Flavorist*, **19** (6): 1-8.
- Levanon-Munoz E. & Bone D. H., 1985.** Effect of different gas environments on batch scale solid state fermentation of oat straw by white rot fungi. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**: 382-387.
- Litchfield J. H., 1967.** Morel mushroom mycelium as a food-flavouring material. *Biotechnol Bioeng.*, **9** (3): 289-304.
- Litchfield J. H., Overbeck R. C. & Davidson R. S., 1963.** Factors affecting the growth of morel mushroom mycelium in submerged culture. *Agric. Food Chem.*, **11** (2): 158-162.
- Lonsane B. K., Ghildyal N. P., Budiatman S. & Ramakrishna S. V., 1985.** Engineering aspects of solid state fermentation. *Enz. Microbiol. & Technol.*, **7**: 258-265.
- Lundeberg G., 1970.** Utilisation of various nitrogen sources in particular bound soil nitrogen by mycorrhizal fungi. *Stud. Forest. Sued*, **79**: 1-95.
- Maarse H., 1991.** Volatile compounds in foods and beverages. Marcel Dekker, Inc., New York, 764 pages.
- MacLeod A. J. & Panchasara S. D., 1983.** Volatile aroma components, particularly glucosinolate products of cooked edible mushroom (*Agaricus bisporus*) and cooked dried mushroom. *Phytochem.*, **22** (3): 705-709.
- Maga J., 1981.** Mushroom flavor. *J. Agric. Food Chem.*, **29** (1): 4-7.
- Maignial L., 1988.** Etude de l'arôme d'un champignon inférieur Ascomycètes *Hypomyces chrysospermus*, caractérisation et biosynthèse. Thèse Doctorat, Université P. Sabatier, Toulouse, 90 pages.
- Manachère G., 1974.** *Coprinus congregatus*, un modèle biologique pour l'étude de quelques problèmes généraux de fructification posés par la fructification des champignons supérieurs. *Mushroom Sci.*, **9**: 783-798.
- Marc M., 1995.** Substances volatiles des champignons inférieurs. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Montpellier I, 128 pages.
- Martin A. M., 1983.** Submerged production of edible mushroom mycelium. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **16** (3): 215-217.
- Martinez D., Guzman G. & Soto C., 1985.** The effect of fermentation of coffee pulp in the

- cultivation of *Pleurotus ostreatus* in Mexico. *Mush. Newsletter Tropics*, 6 (1): 21-28.
- Martinez-Carrera D., Morales P., Soto C., Murrieta E. & Guzman G., 1986. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre hojas usadas en la extracción de aceites esenciales. *Rev. Mex. Mic.*, 2: 119-124.
- Matteau P. P. & Bone D. H., 1984. Recirculation tower bioreactor for solid-state fermentation. Canada, January 1, p. 160-171.
- Mau J. L., Beelman R. B. & Ziegler G. R., 1992. 1-octen-3-ol in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J. Food Science*, 57: (3): 704-706.
- Mc Iver R. C. & Reineccius G. A., 1986. Synthesis of 2-methoxy-3-alkyl pyrazines by *Pseudomonas perolens*. In *Biogenesis of aromas*, (Ed), Parliment T. H. & Croteau R., American Chemical Society, Washington, DC, p. 266-274.
- Mc Lafferty F. W. & Stauffer D. B., 1989. *The wiley NBS Registry of Mass Spectral Data*. Eds, Wiley J. & Sons, New York, USA.
- Miller G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Misra M. C., 1991. Monitoring and control of parameters in solid state fermentation. In *short term course on solid state fermentation*. Karanth N. G. (Ed), Central Food Technological Research Institute, Mysore, p. 12.1-12.2.
- Molliard M., 1905. Production expérimentale de l'appareil ascospore de la morille. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 140: 1146-1148.
- Moo-Young M., Moreira A. R. & Tengerdy R. P., 1983. Principles of solid substrate fermentation. In *The Filamentous Fungi : Fungal Technology*. Smith J. E., Berry D. R. & Kristiansen B. (Eds), Edward Arnold Publisher, London, p. 117-144.
- Mosandl A., Heusinger G. & Gessner M., 1986. Analytical differentiation of 1-octen-3-ol enantiomers. *J. Agric. Food Chem.*, 34: 119-122.
- Mudgette R. E., 1986. Solid-State fermentation. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Demain A. L., Solomon N. A. (Eds), American Society for Microbiology, Washington, p. 66-84.
- Nago H., Noma Y. & Mizutami J., 1993. 2-deceno- $\delta$ -lactone producing fungi strains of *Fusarium solani* isolated by using a medium containing decano- $\delta$ -lactone as the sole carbon source. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (12): 2107-2110.
- Nago H., Noma Y. & Mizutami J., 1993. Degradative pathway of 2-deceno- $\delta$ -lactone by the lactone-producing fungus, *Fusarium solani*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 2111-2115.
- Narahara H., Koyama Y., Yoshida T., Pichangkura S., Ueda R. & Taguchi H., 1982. Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.*, 60 (4): 311-319.
- Nicolini L., Von Hunolstein C. & Carilli A., 1987. Solid state fermentation of orange peel and grape stalks by *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe aegerita* and *Armillariella mellea*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 95-98.
- Nishio N., Tai K. & Nagai S., 1979. Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 8: 263-270.
- Noël-Suberville C., Cruz C., Guimberteau J. & Montury M., 1996. Correlation between fatty acid content and aromatic compound release in fresh Blewit (*Lepista nuda*). *J. Agric. Food Chem.*, 44: 1180-1183.
- Olivier J. M., Laborde J., Guimberteau J., Poitou N. & Houdeau G., 1991. *La culture des champignons*, (Ed), Armand Colin, Paris: 66-92.

- Omeliansky V. L., 1923. Aroma producing organisms. *J. Bact.*, **8**: 393-419.
- Oriol E., 1987. Croissance de *Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau. Thèse de Doctorat Microbiologie, INSA, Toulouse, 115 pages.
- Oriol E., Raimbault M., Roussos S. & Viniegra-Gonzalez G., 1988. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**: 498-503.
- Ower R. D., Mills G. L. & Malachowski J. A., 1986. Cultivation of *Morchella* : US Patent 4, 594-809.
- Paszczynski A., Hunyh V. B. & Crawford R., 1985. Enzymatic activities of an extracellular manganese dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **29**: 37-41.
- Perraud-Galme I., 1995. Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 209 pages.
- Picardi S. M. & Issenberg P., 1973. Investigation of some volatile constituents of mushrooms (*Agaricus bisporus*) : Changes which occur during heating. *J. Agric. Food Chem.*, **21** (6): 959-962.
- Pyysalo H. & Suihko M., 1976. Odour characterization and threshold values of some volatile compounds in fresh mushrooms. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, **9**: 371-373.
- Pyysalo H. & Niskanen A., 1977. On the occurrence of N-methyl-N-formylhydrazones in fresh and processed false morel, *Gyromitra esculenta*. *J. Agric. Food Chem.*, **25** (3): 644-647.
- Raimbault M., 1978. Fermentation en milieu solide. In *Utilisation industrielle du carbone d'origine végétale par voie microbienne*, Colloque de la Société Française de Microbiologie, Section de Microbiologie Industrielle, Toulouse, 9-10 Mars, p. 185-191.
- Raimbault M. & Alazard D., 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **9**: 199-209.
- Raimbault M., 1980. Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. Thèse Doctorat ès Sciences, Université P. Sabatier, Toulouse, 291 pages.
- Rapior S., Breheret S., Talou T. & Bessière J. M., 1997. Volatile flavor constituents of fresh *Marasmius alliaceus* (Garlic Marasmius). *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 820-825.
- Rathbun B. L. & Shuler M. L., 1983. Heat and mass transfer effects in static substrate fermentation chambers. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**: 929-938.
- Raymond Y., Morin A., Champagne C. P., & Cormier F., 1991. Enhancement of fruity aroma production of *Pseudomonas fragi* grown in skim milk, whey and whey permeate supplemented with C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> fatty acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**: 524-527.
- Richard H., 1992. Connaissance de la nature des arômes alimentaires. In *Les arômes alimentaires*. Collection Sciences & Techniques Alimentaires, (Ed), Multon J. L., Tec & Doc Lavoisier, Paris, p. 22-37.
- Roche N., Venague A., Desgranges C. & Durand A., 1993. Use of chitin measurement to estimate fungal biomass in solid state fermentation. *Biotechnol. Adv.*, **11**: 677-683.
- Rolz C., De Leon R., De Arriola M. C. & Cabrera S., 1987. White-rot fungal growth on sugarcane lignocellulosic residue. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**: 535-541.
- Roussos S. & Raimbault M., 1982. Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. 1. "Screening" des souches cellulolytiques. *Ann. Microbiol. Institut Pasteur*, **133**: 455-464.
- Roussos S., 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation, et production de cellulases. Thèse de Doctorat ès Sci., Université

- de Provence, Marseille, 193 pages.
- Roussos S., Bresson E., Saucedo-Castañeda G., Martinez P., Olivier J.-M. & Guimberteau J., 1997.** Production of mycelial cell inoculum of *Pleurotus cornucopiae* on natural support in solid state fermentation. In *Advances in Solid State Fermentation*, (Eds), Roussos S., Lonsane B. K., Raimbault M. & Viniegra-Gonzalez G., Kluwer Acad. Publ. Dordrecht p. 481-498.
- Salsac L., Mention M., Plassard C. & Mousain D., 1982.** Données sur la nutrition azotée des champignons ectomycorrhiziens, *Colloque INRA n° 13*, INRA Paris, p. 129-140.
- Sanchez-Font L., Bensoussan M. & Belin J. M., 1985.** Aroma production by filamentous fungi. Influence of culture conditions. *Sciences des Aliments*, 5: 269-274.
- Sarhy-Bagnon V., Lozano P., Ploch D. & Roussos S., 1997.** Coconut like aroma production by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation. In *Advances in Solid State Fermentation*, (Eds), Roussos S., Lonsane B. K., Raimbault M. & Viniegra-Gonzalez G., Kluwer Acad. Publis., Dordrecht, p. 379-391.
- Sastry K. S. M., Agrawal S., Manavalan R., Singh P. & Atal C. K., 1980.** Studies on *Osmoporus odorata* (Wulf ex Fr.) and rose-like aroma produced by fermentation. *Ind. J. Experiment. Biol.*, 18: 1471-1473.
- Sato K., Nagatani M., Nakamura K. & Sato S., 1983.** Growth estimation of *Saccharomyces cerevisiae* in solid state ethanol fermentation. *J. Ferment. Technol.*, 66 (6): 667-673.
- Saucedo-Castañeda G., Gutierrez-Rojas M., Bacquet G., Raimbault M. & Viniegra-Gonzalez G., 1990.** Heat transfert simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 802-808.
- Saucedo-Castañeda G., 1991.** Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castellii* cultivé sur support solide. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, 212 pages.
- Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernandez M. R., Lonsane B.K., Navarro J.M., Roussos S., Dufour D. & Raimbault M., 1993.** On-line monitoring and control system for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations in aerobic and anaerobic solid state fermentations. *Process Biochem.* 29: 13-24.
- Scharpf L. G. Jr, Seitz E. W., Morris J. A. & Farbood M. L., 1986.** Generation of flavor and odor compounds through fermentation processes. In *Biogeneration of aromas*, (Ed), T. H. Parliment & R. Croteau. American Chemical Society, Washington, DC, ACS Symposium Series, 317: 323-346.
- Schindler J. & Schmid R. D., 1982.** Fragrance or aroma chemicals - microbial synthesis and enzymatic transformation - a review. *Process Biochem.* 17 (5): 2-8.
- Schindler & Fritz, 1989.** Method of producing a mushroom aroma in mushroom cell masses. *US. Patent 4810504*.
- Schindler F. & Seipenbusch R., 1990.** Fungal flavour by fermentation. *Food Biotechnol.*, 4: 77-85.
- Schmitt P., 1995.** Aroma compound production from citrate metabolism in lactic acid bacteria. In *Bioflavour'95*, february, 14-17, 1995 (Dijon), (Ed), Etiévant P. et Schreier P., Les Colloques INRA n° 75, Paris p.237-244.
- Seifert R. M. & King D. A., 1982.** Identification of some volatile constituents of *Aspergillus clavatus*. *J. Agric. Food Chem.*, 30 (4): 786-792.
- Serrano-Carréon L., 1992.** Etude sur le métabolisme des lipides et la production de 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone par deux espèces du genre *Trichoderma*. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne, Dijon, 138 pages.
- Shin H. K., Ahn B. H. & Kang H. S., 1986.** Volatile compounds produced by the yeast *Hansenula anomala* Sanop Misaengmul Kakhoechi, 41 (1): 63-68. Source Chemical

- Abstracts, 104, 182994 y.
- Shin H. K., Kang H. S. & Ahn B. H., 1988.** Apple aroma production by a *Geotrichum* sp. In *8th International Biotechnology Symposium, Abstract Book*. Paris 17-22 juillet 1988.
- Silman R. W., 1980.** Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotating vessels. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**: 411-420.
- Smith J. E. & Berry D. R., 1975.** The filamentous fungi. Volume 1, Edward et Arnold, London.
- Souchon I., Lamer T., Spinnler H. E. & Volley A., 1995.** Pervaporation : An efficient process for benzaldehyde recovery in fermentation broth. *Bioflavour'95*, february, 14-17, 1995 (Dijon), (Ed), Etiévant P. et Schreier P., Les Colloques INRA n° 75, Paris p. 409-414.
- Sprecher E. & Hanssen H. P., 1982.** Influence of strain specificity and culture conditions on terpene production by fungi. *Plant. Med.*, **44**: 41-43.
- Sprecher E. & Hanssen H. P., 1985.** Recents trends in the research on flavors produced by fungi. In *Topics in Flavour Research., Proc. Int. Conf.*, (Eds), Hangeham, Berger, Nitz, Schreier, Eichorn, p. 388-403.
- Stenhagen E., Abrahamson S. & McLafferty F. W. 1976.** Registry of Mass Spectral Data. Wiley J. & Sons : New York.
- Sulkowska J., & Kaminski E., 1977.** Effects of different drying methods on quality and content of aromatic volatiles in dried mushrooms *Agaricus bisporus*. *Acta Aliment. Pol.*, **3**: 409-425.
- Szuecs, 1956.** US Patent 2850841.
- Szuecs, 1958.** US Patent 2761246.
- Tahara S., Fujiwara K., Ishizaka H., Mizutani J. & Obata Y., 1972.**  $\gamma$ -déalactone. One constituent of volatile in cultured broth of *Sporobolomyces odorus*. *Agric. Biol. Chem.*, **36**: 2585-2587.
- Tahara S., Fujiwara K., Ishizaka H. & Mizutani J., 1973.** Neutral constituents of volatiles in cultured broth of *Sporobolomyces odorus*. *Agric. Biol. Chem.*, **37**: 2855-2861.
- Talou T., Delmas M. & Gaset A., 1987.** Principal constituents of Black Truffle (*Tuber melanosporum*) aroma. *J. Agric. Food Chem.*, **35**: 774-777.
- Talou T., Roule K. & Gaset A., 1995.** Arôme champignon : Authentification par analyse chirale de l'octène-3-ol. *Arômes Ingrédients Additifs*, **3**: 34-36.
- Thomas A. F., 1973.** An analysis of the flavor of the dried mushroom, *Boletus edulis*. *J. Agric. Food Chem.*, **21** (6): 955-958.
- Tien M. & Kirk T. K., 1984.** Lignin degrading enzyme from *Phanerochate chrysosporium* : purification, characterization and catalytic cycle of unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 2280-2284.
- Towers G. H. N., 1976.** Secondary metabolites derived through the shikimate-chorismate pathway. In : *The filamentous fungi*, (Eds), Smith J. E. & Berry D. R., Edward Arnold, London. vol. II, chapitre 16, p. 460-474.
- Trappe J. M., 1971.** Mycorrhizae forming Ascomycetes. *Proc. First. N. Am. Con. on Mycorr.* USDA, p. 19-37.
- Trejo-Hernandez M., 1992.** Physiologie de la croissance de souches de *Claviceps* : Production d'alcaloïdes par fermentation en milieu solide. Thèse de Doctorat, Université de Provence, Aix-Marseille I, 164 pages.
- Tressl R., Bahri D. & Engel K. H., 1982.** Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (*Agaricus campestris*). *J. Agric. Food Chem.*, **30**: 89-93.
- Tyrrell M., 1995.** Advances in natural flavors and materials. *Perfumer & Flavorist*, **20** (1): 13-21.

- Vidal J. P., Toulemonde B. & Richard H., 1986. Constituants volatils de l'arôme d'un champignon comestible : le Mousseron (*Marasmius oreades*). *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, **19**: 353-359.
- Wasowicz E., 1974. Identification of the volatile flavor compounds in mushroom *Agaricus bisporus*. *Bull. Acad. Pol. Sci. Biol.*, **22**: 143-151.
- Willam A., Trzcinski T. & Willam-Engels L., 1956. La croissance du mycélium de morille. *Mushroom Science*, **3**: 283-308.
- Wood W. F., De Shazer D. A. & Largent D. L., 1988. The identity and metabolic fate of volatiles responsible for the odor of *Hydnellum suavolens*. *Mycologia*, **80**: 252-255.
- Wood W. F., Watson R. L. & Largent D. L., 1990. The odor of *Agaricus augustus*. *Mycologia*, **82** (2): 276-278.
- Wood W. F., Brownson M. & Smudde R. A., 1992. 2-aminobenzaldehyde: The source of sweet odour of *Hebeloma sacchariolens*. *Mycologia*, **84** (6): 935-936.
- Wurzenberger M. & Grosh W., 1982. The enzymatic oxidative breakdown of linoleic acid in mushrooms (*Psalliotia bispora*). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **175**: 186-190.
- Wurzenberger M. & Grosh W., 1983. Bestimmung von 1-octen-3-ol pilzen und pilzproducten. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **176**: 16-19.
- Wurzenberger M. & Grosh W., 1984 a. Origin of the oxygen in the products of the enzymatic cleavage reaction of linoleic acid to 1-octen-3-ol and 10-oxo-trans-8-decenoic acid in mushrooms (*Psalliotia bispora*). *Biochim. Biophys. Acta*, **794**: 18-24.
- Wurzenberger M. & Grosh W., 1984 b. The formation of 1-octen-3-ol from the hydroperoxide isomer of linolenic acid by hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliotia bispora*). *Biochim. Biophys. Acta*, **794**: 25-30.
- Yasumoto K., Iwami K. & Mitsuda H., 1974. Enzymatic formation of Shii-take aroma from non-volatile precursor (s)-lenthionine from lentinic acid. Mushroom Sci. IX (Part I) *Proceedings of the Ninth International Scientific Congress on the Cultivation of Edible fungi*, p. 371-383.
- Zadrazil F., 1975. Influence of CO<sub>2</sub> concentration on the mycelium growth of three *Pleurotus* species. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **1**: 327-335.
- Zadrazil F. & Brunnert H., 1980. The influence of ammonium nitrate supplementation on degradation and *in vitro* digestibility of straw colonized by higher fungi. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **9**: 34-44.
- Zadrazil F., 1980. Conversion of different plant waste into feed by Basidiomycetes. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **9**: 243-248.
- Zadrazil F. & Brunnert H., 1981. Investigation of physical parameters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**: 37-44.
- Zadrazil F. & Kamra D. N. 1989. Influence of air and oxygen supplies on lignin degradation and its relation with *in vitro* digestibility of wheat straw fermented with *Stropharia rugosoannulata*, *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus sajor caju*. *Mush. J.*, **9**: 79-88.

## Résumé

Notre objectif principal a été d'étudier le comportement du mycélium de Pleurotes et de Morilles sur support solide, en vue de la production de molécules responsables de l'arôme champignon. Parmi quatre espèces de Pleurotes, le mycélium de *Pleurotus ostreatus* JMO-95 a été sélectionné en raison de la similitude de la composition de l'arôme carpophore et celle du mycélium cultivé sur support solide.

L'étude de la bioproduction de l'arôme carpophore de *P. ostreatus* JMO-95, par la culture du mycélium sur support solide a montré que les conditions de culture influent aussi bien sur la composition de l'arôme que sur la teneur des molécules majoritaires. En cultures non aérées, sur bagasse de canne à sucre imprégnée de milieu comportant de l'urée et du glucose, selon un rapport C/ N=10, le mycélium de *P. ostreatus* JMO-95, produit diverses molécules dont la proportion varie en fonction du temps. La composition de l'arôme carpophore est reproduite après 14 jours de culture du mycélium. En cultures aérées sur bagasse de canne à sucre, le mycélium de *P. ostreatus* JMO-95 produit majoritairement de l'acétoïne et de l'anisaldéhyde. La concentration en anisaldéhyde après 6 jours de culture est évaluée à 100 mg/l. Par ailleurs, le mycélium de *P. ostreatus* JMO-95, cultivé sur support solide produit également du benzaldéhyde à des concentrations élevées. La production d'anisaldéhyde et de benzaldéhyde serait liée à l'aptitude du mycélium de *P. ostreatus* JMO-95 à dégrader les parois des cellules végétales de la bagasse de canne à sucre.

Les cultures mycéliennes de *M. crassipes*, souche sélectionnée parmi trois espèces de morilles, ont été orientées vers la production de l'oct-1-én-3-ol. Cette molécule représente la quasi totalité de la fraction volatile produite par le mycélium de *M. crassipes* sur support solide. Une concentration de 700 µg/gMSI est atteinte après 4 jours de culture du mycélium en présence d'huile de soja.

Du point de vue analytique, la respirométrie a constitué un outil très intéressant pour évaluer l'adaptation des deux espèces à la culture en milieu solide. Cette technique nous a permis d'établir les conditions optimales d'inoculation (origine, pourcentage et âge de l'inoculum) qui permettent d'imposer rapidement le mycélium des deux espèces étudiées sur support solide.

L'analyse des effluves par CPG-SM et le dosage quantitatif des molécules majoritaires par la méthode de l'étalonnage interne ont permis de cerner l'effet des conditions de culture sur l'arôme produit par le mycélium des deux espèces étudiées sur support solide.

**Mots clés :** Arôme champignon, *Pleurotus ostreatus* JMO-95, *Morchella crassipes*, carpophore, mycélium, culture en milieu solide (FMS), octan-3-one, oct-1-én-3-ol, anisaldéhyde, acétoïne, benzaldéhyde, bagasse de canne à sucre, respirométrie, CPG-SM.

## Abstract

This work on the physiology of mycelium growth and the metabolism of *Pleurotus* and *Morchella* has been realized for optimise culture conditions of these mushrooms in solid state fermentation. The objective of this study has been the production and the characterization of the aromatic compounds produced by the mycelium which grown on a solid support embedded with a nutritive solution. The preliminary strain selection has allowed to retain *P. ostreatus* JMO-95 and *M. crassipes* for their aromatic characteristics.

The aroma of the *P. ostreatus* JMO-95 fruit body is due essentially to the presence of 3-octanone, and in a lesser extent to the presence of 3-octanol. The main aroma compounds produced by the fruit body of *P. ostreatus* JMO-95 are also produced by the mycelium in the same proportions when the mycelium is cultivated during 14 days, on solid support, in lack of forced aeration and using a nutritional solution containing urea as nitrogen source.

Effects of culture condition on aroma production by the mycelium of *P. ostreatus* JMO-95, growing on SSF shown that the forced aeration of the culture medium entails important modifications of the volatile substance due to anisaldehyde, benzaldehyde and acetoïne productions.

In case of *M. crassipes*, the study reveals that the 1-octen-3-ol is the principal molecule produced. The development of a simple technique of inoculation and the evaluation of the viability of spawn age effect allowed to obtain a maximum growth after 54 hours. Furthermore, gas analysis showed a narrow correlation between CO<sub>2</sub> production, O<sub>2</sub> consumption and 1-octen-3-ol production.

**Keywords :** aroma, *Pleurotus ostreatus*, *Morchella crassipes*, solid state fermentation, 1-octen-3-ol, 3-octanone, anisaldehyde, benzaldehyde, acetoïne.