

P R I X C H Ê N E L I È G E 1 9 9 6

Guillem ROIG I JOSA
Héctor RIU SAVALL
Josep SANCHO I VALLS

TRAITEMENT
des résidus
de l'industrie
du liège
par la culture
des champignons.

ACADÉMIE  MORIM

PRÉFACE

Le Groupe Amorim, né du liège en 1870 au Portugal, a fondé les bases de son développement sur cette extraordinaire matière première, à travers la production de cet humble mais inséparable compagnon du Vin : le bouchon de liège. Notre volonté de servir la cause du vin s'est toujours exprimée dans la recherche technologique sur la filière liège, base de notre activité.

En 1992, nous avons souhaité aller plus loin et nous engager davantage aux côtés des chercheurs en œnologie en créant l'Académie Amorim, un lieu de rencontre et d'échange entre œnologues, ingénieurs, professeurs, sommeliers, auteurs, artistes... tous animés d'une même passion du Vin.

Chaque année, notre Académie encourage et soutient la recherche en œnologie par la remise d'un Prix à un chercheur ou à une équipe de chercheurs ayant fait paraître des travaux significatifs qui concourent à la défense et à la promotion de la qualité du Vin. Que soient ici saluées les personnalités, membres de cette Académie, qui contribuent si généreusement à cette mission. Je formule le vœux que cette collection, dédiée aux Lauréats du Grand Prix de l'Académie, devienne, au fil des ans, une référence et la mémoire vivante des efforts et des travaux engagés dans le monde entier pour servir la noble cause du Vin.

Americo Ferreira de AMORIM

Président du Groupe Amorim

LAURÉATS DE L'ACADÉMIE AMORIM

Grand Prix 1992

Pascal CHATONNET
Institut d'Œnologie de Bordeaux
"Incidences du bois de chêne
sur la composition chimique
et les qualités organoleptiques des vins,
applications technologiques".

Grand Prix 1993

Pierre-Louis TEISSEBRE
Centre de Formation et de Recherche
en Œnologie de Montpellier.
"Le plomb, du raisin au vin".

Grand Prix 1994

Ziya GÜNATA
INRA Institut des Produits
de la Vigne de Montpellier
"Etude et exploitation par voie enzymatique
des précurseurs d'arôme du raisin,
de nature glycosidique".

Grand Prix 1995

Samuel LUBBERS
Institut de la Vigne et du Vin Jules GUYOT,
Université de Bourgogne
"Etude des interactions entre les macromolécules d'origine levurienne du vin et les composés d'arôme".

Mention d'Honneur du Jury 1995

P.L. TEISSEBRE - A.L. WATERHOUSE
R.L. WALZEM - J.-B. GERMAN
E.N. FRANKEL - A.J. CLIFFORD
Université de Californie, Davis
"Composés phénoliques
du raisin et du vin et santé".

Grand Prix 1996

Sylvie BIAU
Faculté d'Œnologie
Université Victor SEGALEN de Bordeaux 2
"Etude de la matière colorante
des vins blancs de Bordeaux".

Prix Chêne-Liège 1996

Guillem ROIG I JOSA - Héctor RIU SAVALL
Josep SANCHO I VALLS
Département d'Industries Agro-Alimentaires
Escola Superior d'Agricultura de Barcelona
Universitat Politècnica de Catalunya
"Traitement des résidus de l'industrie du liège"

L'Académie AMORIM a cinq ans.

Chaque année, elle a rempli sa mission et récompensé les travaux de jeunes chercheurs dédiés à l'amélioration de l'expression du vin et de son bon usage.

Cette année, elle s'y attache doublement :
outre le Grand Prix décerné à un ouvrage consacré à l'œnologie, les membres du jury ont souhaité récompenser une étude traitant du liège, matière naturelle intervenant dans les pratiques viticoles.

Guillem ROIG I JOSA, Héctor RIU SAVALL et Josep SANCHO I VALLS sont donc les premiers lauréats de l'Académie AMORIM à se voir attribuer le Prix Chêne-Liège. Espagnols, ces ingénieurs se sont attachés à étudier le traitement de cette matière première dont la production est l'une des richesses du bassin méditerranéen. Leur étude, si elle ne concerne pas directement l'évolution du vin, nous a néanmoins paru très documentée et, remarquable par son caractère d'actualité. Elle propose une solution écologique utilisable pour l'alimentation qui ouvre d'intéressantes perspectives de développement économique. Elle débouche sur une application pratique et concrète.

Pour toutes ces raisons, cette étude mérite d'être portée à la connaissance du plus grand nombre et notre souhait est d'y contribuer en la publiant dans cette collection.

Merci aux candidats pour la qualité des travaux qu'ils nous soumettent et merci aux membres du jury, dont les observations toujours pertinentes permettent de mettre en lumière des études originales et novatrices comme celle-ci.

Jacques PUISAIS
Président de l'Académie Amorim

TRAITEMENT
des résidus de l'industrie
du liège par la culture
des champignons

*Département d'Industries Agro-alimentaires
Escola Superior d'Agricultura de Barcelona
Universitat Politècnica de Catalunya*

Guillem ROIG I JOSA
Héctor RIU SAVALL
Josep SANCHO I VALLS

Le liège est le tissu parenchymateux qui constitue l'écorce du chêne liège, *Quercus suber*.

Le liège est le tissu parenchymateux qui constitue l'écorce du chêne liège, *Quercus suber*. Par sa structure moléculaire particulière, décrite pour la première fois par Robert Hooke (1665) (3) et sa composition chimique complexe, il a une série de propriétés qui le rendent approprié à un grand nombre d'applications industrielles. Parmi celles-ci une des plus importantes se trouve sur le terrain de l'œnologie où il est devenu, depuis Dom Pérignon (1638-1715), le matériau de bouchage par excellence. On parle de vin, verre et liège comme d'un trinôme indissoluble, que ce soit pour l'efficacité du bouchage, pour l'image de qualité qu'il donne aux grands vins ou pour les problèmes qu'il peut occasionner au cours de sa conservation. Comme toute activité industrielle, la manufacture du liège, quelles que soient ses applications, génère des résidus qu'il convient de traiter pour qu'ils provoquent un minimum de pollution, surtout en ces temps où les écosystèmes commencent à ressentir l'activité industrielle de l'homme.

1.1 PRODUCTION DE BOUCHONS AGGLOMÉRÉS POUR VINS MOUSSEUX. PROBLEME DES RÉSIDUS.

Parmi les applications œnologiques, c'est l'élaboration de bouchons

agglomérés pour vins mousseux ou tranquilles qui produit la plus grande quantité de résidus. Le bouchon aggloméré est composé d'une pièce d'aggloméré de liège, formée par extrusion, et par deux ou trois disques de liège naturel. Pour la fabrication de l'aggloméré on emploie les lièges non utilisables pour la fabrication de produits de liège naturel et les restes de perforation de bouchons de liège naturel. La matière première est triturée. A ce stade se produit la première fraction de résidu, appelée « poussière de trituration ». On fait une sélection granulométrique du trituré et on rejette ce qui sera la seconde fraction du résidu, les « morceaux grossiers ». L'étape suivante est l'extrusion dont on obtient une baguette d'aggloméré qui sera coupée pour obtenir les morceaux qui formeront le bouchon. A la découpe apparaît la troisième fraction de résidu : la « poussière de détubage ». Finalement, les pièces d'aggloméré sont unies en deux ou trois disques de liège naturel pour former le bouchon. Les bouchons sont coupés en biseau et polis à l'émeri, en donnant la dernière fraction du résidu, la « poussière d'émeri ». Dans une usine moderne et optimisée ce procédé productif a un rendement de 40 %, c'est-à-dire que 60 % du liège traité sort sous forme de résidu. Une

usine de dimension moyenne produit, par an, autour de 1 000 tonnes de poussière de liège. Rien qu'en Espagne, second pays mondial pour la production et la manufacture du liège, l'industrie qui produit des bouchons agglomérés produit plus de 18 000 tonnes/an de ce type de résidu.

De tous les résidus, le seul à avoir une valeur économique est la « poussière de trituration », utilisée par l'industrie de la chaussure pour faire des semelles et des talons. Les trois autres résidus étaient employés, il y a quelques années encore, comme combustible dans des tuileries mais les difficultés de manipulation et les inconvénients par rapport à d'autres combustibles ont progressivement entraîné une baisse de la demande et donc des prix. Devenu peu rentable, on ne peut compter que sur une faible et irrégulière absorption d'une petite part des résidus par ce biais. La difficulté de la dégradation du liège fait qu'on ne peut en déposer, de façon libre, dans les décharges publiques car il peut provoquer de graves déséquilibres dans les écosystèmes par imperméabilisation du sol. C'est la raison pour laquelle, la plupart des entreprises ont opté pour l'incinération de cette poussière, que se soit dans des fours spéciaux ou dans des aires de traitement des déchets. Dans la plupart des cas, la combustion de ces résidus provoque des fumées qui dépassent les limites de pollution autorisées. On peut voir un exemple au tableau 1.1.

La grande quantité de ces résidus et la

difficulté de leur dégradation nous a amené à commencer la recherche d'une alternative possible à son traitement qui présenterait un moindre impact pour le milieu et un certain profit économique.

1.2 COMPOSITION DU LIEGE

Le liège est un tissu parenchymateux de cellules mortes qui forme l'écorce du chêne liège, *Quercus suber*. Il n'est pratiquement constitué que de deux membranes cellulaires subéreuses (2, 3, 5). Sa fonction est de protéger les tissus vivants de la plante, des attaques d'agents externes, insectes, micro-organismes, feu, déshydratation,... etc. Les propriétés qui lui confèrent la capacité pour remplir cette fonction de protection sont : légèreté, élasticité, compressibilité, imperméabilité, isolation thermique, résistance à l'usure, haute capacité de frottement, résistant au feu, endurance. Ces propriétés, il les doit à sa structure cellulaire, à sa composition et à sa structure chimique complexes. Le tableau 1.2 nous montre cette composition d'après les dernières analyses.

Son composant caractéristique et majoritaire est la subérine. C'est une substance polymérique, insoluble, formé d'une fraction aliphatique et d'une fraction de composants phénoliques (9, 10, 11). La composition des monomères aliphatiques est connue, les composants les plus habituels sont les acides gras, les alcools gras, les

Tableau 1.1 : Niveaux de concentration de polluants dans les effluents gazeux versés dans l'atmosphère.

	Concentration limite (d'après la législation)	Fumées de combustion du liège
Particules solides (g/nm ³)	150	506
Monoxyde de carbone (ppm)	500	2 170
Opacité (échelle Bacharach)	2	6

Tableau 1.2 : Composition chimique du liège d'après les dernières analyses % en poids sec.

Acides gras et résines	45 %
Acides solubles dans l'eau	20 %
Substances ligneuses	27 %
Tanins, matières colorantes et sels minéraux	7 %

Source : Vieira J. 1991 (2)

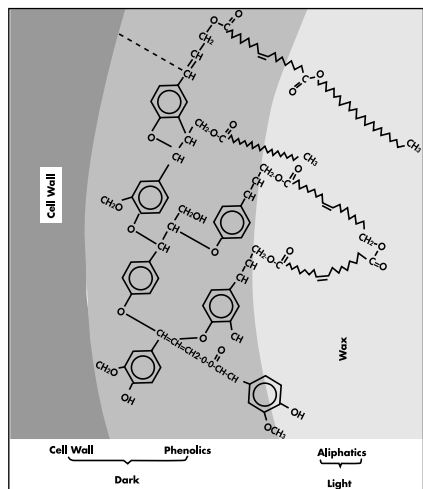
acides omega-hydroxygras et les acides dicarboxyliques. Dans les fractions d'acides gras, sont caractéristiques, d'habitude, les chaînes longues de C20 et C30. Dans les fractions d'acides omega-hydroxygras et d'acides dicarboxyliques, les composants majoritaires sont des chaînes de C₁₈ monoénoïques et/ou des chaînes saturées de C16 ; il arrive, dans Δ^9 certains cas, que les composants majoritaires soient des chaînes saturées de C22. Les composants minoritaires de la fraction aliphatique sont, d'habitude, mais pas toujours, des acides polaires avec des fonctions epoxy, dihydroxi et trihydroxi semblables à ceux qui se trouvent dans la cutine. La composition des composants phénoliques de la subérine reste obscure. On sait qu'elle présente la complexité de la lignine mais on ne connaît pas l'identité du composé dont ils proviennent. Leur biosynthèse suit, probablement, la même voie que celle établie pour la lignification (9, 10, 11).

Il est difficile de déterminer la structure de la subérine sans connaître toute la composition du polymère. Kolattukudy (1977) proposa, se basant sur le peu d'évidences disponibles, la structure représentée sur le schéma 1.1. D'après cette proposition, une matrice phénolique semblable à la lignine serait unie à des hydrates de carbone de la cloison cellulaire et à des composants aliphatiques par des liaisons covalentes. Les acides omega-hydroxi et les acides dicarboxyliques s'entrelaieraient

avec la matrice aromatique, pouvant former aussi des omega-hydroxiacides et des polyesters linéaires. Dans les cas où les acides polaires, du type cutinique, sont davantage que des composants minoritaires, on pourrait délimiter des régions de polyesters cutiniques. Les chaînes longues d'acides gras et alcools seraient estérifiées dans les positions terminales. Les champs aliphatiques seraient les responsables de l'hydrophobicité par interaction avec les cères (9, 10, 11). Nous constatons donc, d'après cette hypothèse, que la subérine est un biopolymère d'une grande complexité chimique et structurale, ce qui représente le facteur principal qui rend difficile sa dégradation biologique.

En fait, des études récentes nous conduisent à admettre que de considérables portions de carbone organique dans la matière organique des sols forestiers est de nature aliphatique. Les 30 % de carbones alkil détectés par des méthodes spectroscopiques en sols forestiers semblent le confirmer. Il a été démontré, aussi, que la plupart des signaux aliphatiques détectés dans le spectre de ¹³C NMR peuvent être attribués à de la cutine et éventuellement à de la subérine. Ces trouvailles ne sont pas en accord avec l'idée conventionnelle de sub-

Schéma 1.1 : Structure de la subérine.



Source : Kilattukudy (1977) (9, 10, 11)

stances humiques en tant que grandes macromolécules phénoliques aromatiques. En concordance avec la haute nature lipophylique de ces biopolymères lipidiques, ceux-ci pourraient avoir un rapport avec l'absorption et la rétention, au sol, de composants organiques apolaires, du genre polluant et pesticide (20). Nous n'avons pas trouvé d'études de ce type pour les bois de chêne liège. Ce que nous savons, c'est que les champignons de la classe Basidiomycètes ont un rôle principal dans la décomposition des restes de *Quercus suber*. Nous en avons trouvé une vingtaine d'espèces sur des arbres vivants mais débilités et sur des restes de chênes lièges morts (8, 21).

Les autres principaux composants du liège sont la lignine, avec des valeurs comprises entre 12 et 32 %, la cellulose, autour de 6 % et l'hémicellulose en moindre quantité (3). On sait que la dégradation biologique de ces polymères se fait par des champignons lysotrophiques et des bactéries hétérotrophes au moyen de mécanismes de digestion externe (8, 15, 22).

1.3 LES CHAMPIGNONS DE POURRI- TURE BLANCHE

Les champignons jouent un rôle très important lors du premier stade de minéralisation du carbone organique qui fait partie des molécules complexes.

Leur efficacité est due à une grande activité enzymatique, à la vitesse à laquelle ils mobilisent leurs propres réserves d'aliments et à la capacité d'utiliser des sources d'azote difficilement utilisables par d'autres micro-organismes (15). Ceci leur permet de croître dans des milieux limités en azote et, même s'ils ne sont pas trop importants dans le cycle de l'azote, certains peuvent présenter une activité de fixation de cet aliment au sol (25, 26).

Parmi tous les champignons, ceux de pourriture blanche sont ceux qui présentent les meilleures caractéristiques de dégradation. Il s'agit, principalement, d'Homobasidiomycètes du groupe des Hyménomycète phylophorés, qui se trouvent, comme on pouvait s'y attendre, dans les bois de chêne liège catalans (21). Ils possèdent une puissante équipe enzymatique composée de : manganèse peroxydase (MnP) et lignine peroxydase (LP), capables de dépolymériser la lignine *in vitro* (29, 30) ; enzymes générateurs de H₂O₂ comme le glioxal oxydase (GLO) et l'aryl-alcool oxydase. Nous avons aussi découvert d'autres peroxydases, telles que les peroxydases manganèse-indépendante (MIP) ou la laccase (LAC), dans les champignons de pourriture blanche bien que le rôle qu'elles jouent ne soit pas encore tout à fait clair (28, 29, 30, 31). Les autres enzymes présents dans les champignons sont les cellulase, les hémicellulase, les phosphatases acides

***Lentinus edodes* croissant sur des résidus du liège.**



Ganoderma lucidum pendant sa phase de croissance.



et les protéinases acides (15).

Lentinus edodes et *Ganoderma lucidum* sont deux champignons de pourriture blanche, dont la capacité lignocellulolitique est reconnue, qui poussent de façon naturelle sur *Quercus* sp. (8, 29, 31, 34, 35, 36, 37). Chez *Lentinus edodes* nous avons décelé une grande activité lignocellulitique pendant la croissance végétative, semblable à celle de *Pleurotus* sp. (39). La présence d'azote pendant la phase de croissance et une source de carbone facilement assimilable, stimulent cette activité (34, 38). Pour *Ganoderma lucidum* nous avons découvert deux types de dégradation lignocellulolitique, autant pour les bois des espèces du genre *Quercus* que sur d'autres espèces (36, 37). Une dégradation simultanée caractérisée par un changement uniforme de tous les composants du bois et une dégradation sélective, de préférence sur la lignine et l'hémicellulose. Lors des croissances *in vitro* de *Ganoderma lucidum* avec des morceaux de bois du genre *Quercus*, coupés à 3 mm d'épaisseur, dans un milieu non limitant et avec une incubation de 20 semaines à 27°C, nous avons décelé des pertes de poids entre 20 et 45 % (36, 37).

Pour faire cette expérience nous avons choisi ces deux champignons pour leur grande capacité de dégradation lignocellulolitique et parce que les deux espèces sont en train de s'intro-

duire, en force, sur les marchés occidentaux. Ils se commercialisent comme champignons frais, secs ou en conserve, et comme produit diététique.

Lentinus edodes, appelé aussi Shiitake ou champignon chinois, est originaire du Japon (47) et se cultive depuis l'antiquité dans les pays orientaux sur les troncs de différentes espèces. Sa formidable capacité à se développer sur une grande variété de matériaux lignocellulosiques et les améliorations des méthodes de culture ont favorisé le développement de celle-ci sur d'autres substrats tels que : sciures et autres résidus de l'industrie du bois, pailles, résidus de taille urbaine (15). Sa culture et sa consommation ont augmenté notablement : il a été le deuxième champignon cultivé dans le monde (44), il est actuellement le troisième. Il possède des qualités organoleptiques exceptionnelles (60) et une très bonne aptitude pour la conservation (46). D'autre part on y a identifié de nombreuses molécules aux activités carcinostatique, antitumorale, réductrices du taux de cholestérol, antitrombotique. Ainsi, indépendamment de sa consommation en tant qu'aliment (champignon frais, sec ou en vinaigre) il se commercialise actuellement en tant que produit diététique sous forme de capsules d'extrait de Shiitake obtenu à partir du mycélium cultivé en milieu liquide. Il

se présente seul ou combiné avec de l'extrait du Reishi (*Ganoderma lucidum*) et il est conseillé comme complément diététique, améliorant du système immunitaire, réducteur du taux de cholestérol, revitalisant, et élément bénéfique contre les problèmes rénaux et cardio-vasculaires.

Ganoderma lucidum ou « Reishi » (« champignon de la jeunesse éternelle », en japonais) est d'origine cosmopolite : on le trouve sous une forme naturelle en Amérique, en Europe et en Asie. Bien qu'il ne soit pas comestible, à cause de sa dureté, il a été cultivé en Chine et au Japon ou il était utilisé à des fins thérapeutiques depuis l'antiquité. Les premières références écrites datent de l'an 300 avant J.-C. (46). Durant les dernières décennies il a été entrepris, en Chine et au Japon, une importante recherche, qui, avec le progrès des techniques d'analyse, spécialement en chromatographie des gaz et HPLC, a permis d'identifier de nombreux polysaccharides (69, 73, 83), stéroïdes (74, 75) et terpénoïdes (70, 76, 77, 78, 79) dans *Ganoderma lucidum* qui présentent une activité thérapeutique antitumorale, stimula-

trice du système immunitaire, cardiotonique et réductrice du cholestérol. Ces propriétés et la connaissance de ses composants ont favorisé l'introduction du Reishi dans le monde occidental en tant que produit diététique à qui est attribué plusieurs propriétés : potentiation du système immunitaire, action sédatrice sur le système nerveux central, protection du système cardio-vasculaire, action anti-virale et bactériostatique, action carcino-statique, améliorant les traitements anti-hépatite, potentiateur de l'activité intellectuelle et aphrodisiaque (69). Il se commercialise sous forme de capsules, comprimés et fioles, ou de préparations à base d'extraits hydroalcooliques de mycélium ou de carpophores. Certaines préparations se font directement avec de la poudre de champignons secs. Il se présente souvent combiné avec un extrait de *Lentinus edodes*, car on attribue à cette combinaison des effets synergiques.

Objectifs

L'objet de ce travail est d'initialiser la recherche d'une possible alternative à la gestion des résidus de l'industrie du liège, principalement celle qui élabore les bouchons de champagne, du cava et autres vins mousseux, pour laquelle la quantité de liège résiduelle est considérable. Pour cela nous nous sommes fixés trois objectifs :

1. Étudier la viabilité de la culture de *Lentinus edodes* et *Ganoderma lucidum* sur les résidus de liège indiqués pour déterminer si les deux

champignons sont capables d'y finir leur cycle biologique.

2. Faire le suivi de la conduite de chaque espèce à travers l'observation de leur développement mycellaire et de leur fructification.

3. Constater s'il s'est produit une dégradation du résidu de liège et valoriser cette dégradation en déterminant la perte de matière sèche et l'évolution des principaux paramètres physiques et chimiques.

Matériels et méthodes

3.1 MATÉRIELS

Substrat de culture

Le substrat de culture était un mélange de résidus produits dans l'élaboration de l'aggloméré de liège et dans le montage des bouchons pour les vins mousseux. Le mélange de ces résidus a été fait dans les mêmes proportions que celles produites dans les usines qui développent cette activité.

- Poussière de trituration : composée de dos de liège qui se détache lors de la trituration, et qui contient beaucoup de lignine (25 %).
- Fragments grossiers (toscas zarandas) : fraction du résultat de la trituration qui par granulométrie ou par densité n'est pas valable pour la fabrication de l'aggloméré (50 %).
- Poussière produite lors de la coupe des tiges : qui s'obtient en coupant les morceaux d'aggloméré qui formeront les bouchons avec un ou deux disques de liège naturel (5 %).
- Poussière d'émeri : obtenue en polissant et biseautant les bouchons (20 %).

Matériel biologique

Nous avons utilisé la souche ABM-1 de *Lentinus edodes* et la souche ABM-2 de *Ganoderma lucidum*. Les deux souches sont utilisées commercialement pour la culture de champignons sur des troncs de diverses espèces.

L'inoculum employé pour l'expérience a été obtenu à partir de carpophores (champignons) jeunes et frais, de chaque espèce. Nous avons extrait une portion de mycélium, qui a été repiqué sur de l'Agar de Malte, et, par la suite reproduit sur la sciure de chêne vert (*Quercus ilex*) enrichie avec du son de blé.

Containers de culture

Comme récipient de culture nous avons utilisé des pots en verre avec fermeture twist-off, de 400 cc pour la pré-

paration de l'inoculum, et de 750 cc pour la phase de colonisation. Pour les phases d'homogénéisation et fructification nous avons employé des carafes en plastique, de 5 litres de capacité et 16 cm de diamètre, coupées dans leur partie supérieure à 23 cm de la base.

Chambres de culture

Nous avons utilisé des étuves de laboratoire pour la préparation de l'inoculum et pendant la phase de colonisation, et des chambres avec régulateur de température et d'humidité relative pour les phases d'homogénéisation et fructification, nous avons installé un dispositif de tubes fluorescents à lumière blanche et des temporisateurs pour pouvoir établir une photopériode déterminée.

3.2 MÉTHODES

3.2.1 Culture

L'expérience a été établie avec 4 traitements qui testaient les deux espèces de champignons sur deux substrats différents. Ces deux substrats étaient : S, composé d'un mélange de résidus de liège dans la même proportion que celle qui se produit dans l'industrie ; et SE, composé par 70 % de S, enrichi par 30 % de son de blé. D'après (34, 38) la présence d'azote pendant la phase de croissance, stimule l'activité lignocellulolitique ; étant donné que le liège est un matériau pauvre en azote nous avons voulu tester le résidu enrichi jusqu'à obtenir une teneur de 1 % d'azote total. Ainsi, les quatre traitements furent : LS et GS, *Lentinus edodes* et *Ganoderma lucidum* respectivement sur le substrat de résidu de liège ; et LSE et GSE, *Lentinus edodes* et *Ganoderma lucidum* respectivement sur le substrat de résidu de liège enrichi. Nous avons renouvelé 10 fois chaque

traitement.

Les substrats étaient stérilisés à l'autoclave, pendant 120 minutes à 120° C, parce que des essais préalables à l'expérience, ont démontré qu'un traitement de stérilisation est nécessaire, pour développer la culture de champignons. La culture se réalisait en trois phases :

- Phase de colonisation : le champignon était inoculé dans les substrats et son mycélium colonisait tout le substrat. L'inoculation a été faite dans des conditions d'asepsie, en chambre de flux laminaire. Cette phase s'est développée dans des pots en verre de 750 cc de capacité qui ont permis un suivi oculaire du développement micellaire pour répondre à l'objectif n° 2 de cette expérience. Nous avons observé le pourcentage de surface colonisée par les hyphes du champignon et l'intensité de cette colonisation. Les conditions du milieu pour cette phase étaient : humidité relative, 65 % ; absence de lumière, température de 25°C pour *Lentinus edodes* et de 30°C pour *Ganoderma lucidum*.
- Phase d'homogénéisation : Une fois le substrat colonisé, nous avons vidé le contenu de 6 pots dans une carafe en plastique de 5 l de capacité de façon à former un bloc de culture plus grand, mieux adapté à la fructification. Le transvasement du substrat colonisé a été fait de façon aseptique. Les conditions d'ambiance de cette phase furent les mêmes que pendant la phase de colonisation.
- Phase de fructification : ayant formé un bloc compacte, nous avons induit la fructification par une variation des conditions de l'environnement. Les nouvelles conditions sont : humidité relative 95 %, photopériode de 10 heures de lumière et 14 d'obscurité, températures de 18°C pour *Lentinus edodes* et de 25°C pour *Ganoderma lucidum*. Le *Lentinus edodes* est un champignon qui fructifie quelque soit l'endroit dans le bloc de culture et pour éviter les freins

physiques nous avons enlevé les carafes dans les traitements LS et LSE. *Ganoderma lucidum* fructifie seulement sur la surface supérieure des blocs. Une fois la première fructification obtenue, pour les traitements avec *Lentinus edodes* nous avons essayé une méthode d'induction à la fructification qui consiste à augmenter l'humidité interne des blocs par injection d'eau. Dans les cultures commerciales de *Lentinus edodes* on pratique une méthode qui consiste à submerger les blocs dans de l'eau ; cette méthode est efficace mais présente certains inconvénients : il y a un gaspillage d'eau, on perd des substances nutritives par lavage et on facilite la contamination des blocs de culture.

3.2.2 Caractérisation du substrat

Pour identifier et évaluer les principaux changements éprouvés par le résidu de liège pendant et après la culture des champignons *Lentinus edodes* et *Ganoderma lucidum* nous avons caractérisé le liège, du point de vue physique et chimique, avant la culture, à la fin de la phase de colonisation et à la fin de la culture. Les échantillons de substrat, avant la culture ont été appelés du même nom que les substrats S et SE ; les échantillons extraits à la fin de la phase de colonisation reçoivent le nom du traitement suivi d'un H : LSH, GSH, LSEH et GSEH ; les échantillons des substrats, à la fin de la culture, sont appelés du même nom que leur traitement respectif : LS, GS, LSE et GSE.

Pour la caractérisation physique nous avons fait une analyse granulométrique avec une série de tamis avec des lumières entre 0.125 et 5 mm, et la détermination de la courbe de rétention d'eau suivant la méthode de De Boodt M. et al. (1973) modifiée par Martinez et al. (1990).

Pour la caractérisation chimique nous avons déterminé les paramètres suivants : humidité, cendres (calcination, 3 heures à 560°C), matière organique totale, carbone oxydable (oxydation

avec K₂Cr₂O₇ 1N en moyen acide), azote total (Kjeldahl), azote nitrique total (méthode de l'électrode sélectif), extrait aqueux 1/5, 1/1 avec la solution Orion), azote ammoniacal total (méthode de l'électrode sélectif, extraction 1/5 avec KCl 2N). Nous avons déterminé aussi le pH et le C.E. (extrait aqueux 1/5). Nous avons déterminé les fibres suivant les méthodologies de la F.N.D. (fibre neutre détergente) et F.A.D. (fibre acide détergente) décrite par Van Soest et Goering (1970) et de la L.A.D. (lignine acide détergent) décrite par Van Soest (1963).

Finalement, considérant les paramètres les plus caractéristiques du liège, nous avons fait la détermination de la subérine et des céroïdes, suivant la méthode de Zetzsche et de ses collaborateurs modifiée par Père Pla (1976) (3). Pour sa quantification il est nécessaire d'extraire du liège, les flobafènes, tanins, albuminoïdes, sucres et une partie de ses produits organiques en le portant à ébullition avec du sulfate de soude à 4 % ; le traiter avec de l'alcool pour en extraire la fraction céroïdique, formée par les alcools-ceres, cerine et friedeline, esters, cétones et autres substances de nature semblable. On obtient, ainsi, le Reincork, ou liège purifié. Dans le Reincork nous trouvons, avec d'autres produits proprement lignocellulosiques, la macromolécule de subérine qui se saponifie avec de la potasse caustique alcoolique. Les savons obtenus s'acidulent et les acides s'extraient avec de l'éther. Ce mélange d'acides gras oxygénés, avec un poids moléculaire élevé, saturés et insaturés, font partie d'un produit hautement polymérisé, Zetzsche l'appelle subérine. Dans le résidu restant, nous trouvons surtout des composés phénoliques parmi lesquels se trouvent des tanins, de la lignine et des polysaccharides structuels.

3.2.3 Dégradation du résidu de liège

Compte tenu des objectifs de ce travail, la possibilité de quantifier la dégradation du substrat, à la fin de la phase de colonisation et à la fin de la culture, nous donne une information très importante sur la capacité de *Lentinus edodes* et *Ganoderma lucidum* à dégrader le liège. Le paramètre principal pour mesurer cette dégradation est la perte de matière sèche (P.M.S.), appelée aussi dégradation de matière sèche. $(P_i - P_f) \times 100/P_i = \% \text{ P.M.S.}$

Nous avons calculé aussi la dégradation des paramètres suivants (Y) : carbone oxydable, matière organique totale, cendres, F.N.D., L.A.D., F.N.D.-L.A.D., subérine et céroïdes, à la fin de la phase de colonisation et à la fin de la culture. Le calcul de la dégradation a été fait en partant de la formule : $[100 \times Y_i - (100 - \% \text{ P.M.S.}) \times Y_f]/Y_i = \% \text{ Dégradation de Y}$

Y = paramètre analysé

Y_i = % en poids de Y du substrat initial

Y_f = % en poids de Y du substrat à la fin de la phase de colonisation ou à la fin de la culture.

Nous avons fait un traitement statistique qui compare les modèles d'un facteur (de Dégradation de Y) et 8 niveaux (LSH, LS, GSH, GS, LSEH, LSE, GSEH i GSE), avec 3 observations par niveau. Ce traitement statistique a consisté en un test préalable d'homogénéité des variances (Test de Bartlett), une analyse de la variance (Anova) et une séparation de moyennes par la méthode Newman-Keuls, avec un niveau de confiance de 95 %. Cette séparation des moyennes sera répartie sur les tableaux de résultats par une lettre à côté de la moyenne de la valeur du facteur, à chaque niveau.

Résultats et discussion

4.1 CULTURE

La phase de colonisation s'est développée avec normalité, sans contamination de champignons pathogènes, ce qui montre l'efficacité du traitement de stérilisation. *Lentinus edodes* et *Ganoderma lucidum* se sont comportés de façon semblable, marquant une tendance bien différenciée entre les traitements sur liège et ceux faits sur liège enrichi. Sur les premiers on observait que le mycélium, avec peu d'intensité de couleur, avançait rapidement sur la surface visible du substrat, probablement à la recherche d'aliments facilement assimilables. En revanche, dans les traitements enrichis, l'intensité de la couleur du mycélium était plus élevée et l'avance sur la surface plus lente, probablement dû au fait que l'enrichissement avec du son de blé offrait des aliments plus facilement assimilables. En conséquence cette phase a été un peu plus longue pour les traitements non-enrichis (tableau 4.1). Tous les traitements sont parvenus, cependant, à un niveau de colonisation satisfaisant.

Dans la phase d'homogénéisation, 7 répétitions du traitement GSE ont été contaminées, 4 ont été éliminées et 3 ont été maintenues jusqu'à la fin de la culture. Le reste des traitements s'est développé en toute normalité, dans les délais indiqués au tableau 4.1.

Une fois soumis aux conditions de fructification, les traitements LSE et LS ont commencé à fructifier respectivement

aux jours 6 et 13. La première récolte a été échelonnée dans le temps et peu homogène pour les dimensions des carpophores (champignons). Après la première récolte et une période sans production nous avons induit une seconde fructification au moyen d'injection d'eau distillée dans les blocs de culture. Le traitement LS a répondu, produisant une deuxième récolte de champignons, plus petits et plus homogènes que les antérieurs, aussi bien en dimension qu'en temps de croissance. Les répétitions du traitement LSE ont subi de nombreuses contaminations dès la fin de la première récolte, et n'ont plus répondu à l'induction d'une seconde fructification. Les analyses organoléptiques des champignons ont montré les attributs caractéristiques de l'espèce cultivée, sans trouver, dans aucun des tests ni goût étrange, ni goût de bouchon. La production a atteint des niveaux commercialement acceptables.

Ganoderma lucidum a fructifié en même temps dans les deux traitements. Les premiers primordiums sont sortis après 14 jours de mode de fructification. Les carpophores poussaient avec des formes allongées qui n'étaient pas caractéristiques de l'espèce, se dirigeant vers la lumière. Ceci nous fait penser qu'il pouvait y avoir quelque carence dans le spectre lumineux. Le traitement GS n'a subi aucune contamination tandis que dans le GSE les répétitions ont fini par être contaminées. La production de champignons *Ganoderma lucidum* a été très faible. Il faut tenir compte, cepen-

Tableau 4.1 : Durée des phases de la culture (jours).

	Phase de colonisation	Phase d'homogénéisation	Phase de fructification	Temps total de la culture
L.S	67	30	60	157
G.S	60	45	60	165
L.S.E	34	20	50	104
G.S.E	30	55	60	145

Tableau 4.2 : Production de champignons.

	Nombre de champignons/ bloc de culture	Poids frais moyen/bloc g	Production % p.f. de champignons/ p.s. de substrat
LS	3* 7**	91.4* 65.6**	24.78
LSE	4	54.92	8
GS	2	0.8	0.14
GSE	1	1.39	0.2

* 1e récolte ** 2e récolte p.f. poids frais p.s. poids sec

dant, du fait que les carpophores de cette espèce ont une teneur en eau très basse, de l'ordre de 10 %.

4.2 CARACTÉRISATION DU SUBSTRAT

La caractérisation du substrat avant, pendant et après la culture a donné les chiffres qui figurent dans les tableaux 4.3 et 4.4.

Caractérisation chimique

Tous les traitements présentent une acidification du substrat comme conséquence du métabolisme des champignons. Dans les traitements enrichis, cette acidification est moindre. *Ganoderma lucidum* acidifie moins que *Lentinus edodes*.

La conductivité électrique augmente dans tous les traitements. Cette augmentation est en relation avec celle des ions NH_4^+ et NO_3^- qui apparaissent dans les substrats de tous les traitements, aussi bien à la fin de la phase de colonisation qu'à la fin de la culture ; ces ions augmentent en fonction du résultat de la solubilisation de leurs sels organiques et à cause du métabolisme des champignons. La teneur en azote total a augmenté légèrement dans tous les traitements.

Le substrat a expérimenté une minéralisation dans tous les traitements, qui se manifeste par l'augmentation du pourcentage de cendres et par la diminution de la matière organique totale. Dans les traitements enrichis cette minéralisation est supérieure. *Lentinus edodes* minéralise davantage que *Ganoderma*

lucidum. Autant la minéralisation que l'augmentation du carbone assimilable dans tous les traitements représentent une amélioration dans la phase de décomposition du substrat.

Pour la détermination de la subérine dans le liège, les valeurs obtenues sont proches de celles données par Zetzsche (35-44 %). Dans tous les substrats nous avons observé une diminution de la teneur en subérine par rapport au substrat initial, aussi bien pendant qu'après la culture. Cette diminution est plus importante pour *Ganoderma lucidum* que pour *Lentinus edodes*. Dans les deux espèces, la teneur en subérine est plus élevée à la fin de la culture qu'à la fin de la phase de colonisation, ce qui est le cas aussi pour la teneur en céroïdes ; cela peut s'expliquer compte tenu de la diminution de matière sèche dans le substrat.

Dans les déterminations des fibres des substrats de culture (liège et liège enrichi) nous avons détecté des interférences de certaines substances différentes de celles qui composent, d'après Van Soest (1963) dans la description de sa méthode, la F.N.D. (fibre neutre détergente), la F.A.D. (fibre acide détergente), la L.A.D. (lignine acide détergente) et la F.N.D.-L.A.D. Ces interférences se constatent en comparant nos résultats analytiques de fibres dans le résidu de liège avec les données des analyses des substances qui composent les fibres d'après la méthode de Van Soest (hemicellulose, cellulose et lignine)

fournies par d'autres auteurs pour des analyses de liège. Ces données, bien que différentes entre elles, sont plus basses que celles que nous avons obtenues dans nos analyses du F.N.D., F.A.D. et L.A.D. sur le substrat de liège. On pense que la complexité que présente la structure chimique du liège et son composant caractéristique, la subérine serait la cause de ces interférences puisque si nous additionnons, par exemple, la valeur de la F.N.D. et celle de la subérine, la valeur obtenue dépasse 100 %. Devant ce fait nous ne pouvons pas indiquer les teneurs en hemicellulose, cellulose et lignine qui s'obtiennent, d'habitude de l'analyse des fibres.

Caractérisation physique

Des données obtenues dans la courbe de rétention d'eau (tableau 4.4) on peut déduire que le traitement de ce résidu par la culture de champignons augmente le volume utile. Ceci devient évident par la diminution de la densité apparente. Cette augmentation du volume utile se traduit par une augmentation de l'espace poreux total, occupé par de l'air. La capacité d'air est sensi-

ble utile se traduit par une augmentation de l'espace poreux total, occupé par de l'air. La capacité d'air est sensiblement supérieure dans les substrats traités, par rapport à celui non traité ; la capacité de rétention d'eau diminue considérablement puisque diminuent les valeurs d'eau facilement assimilable (AFA), d'eau de réserve (AR) et d'eau difficilement assimilable (ADA). Cette diminution de la capacité de rétention de l'eau peut être due à : la dégradation des fibres dont souffre le substrat pendant son traitement par des champignons lignocellulolitiques et à la rétraction dont peuvent avoir souffert les fibres pendant le procédé de séchage qui a eu lieu après la culture pour déterminer la perte de matière sèche.

Les études sur l'utilisation des résidus de l'industrie du liège comme substrat pour la germination, enracinement et croissance végétale en container ont montré leur potentiel comme milieu de croissance (80, 81). Nous avons constaté, aussi, dans d'autres études, une certaine action dépressive du liège sur les plantes développées (81), causée principalement par la richesse en tanins et d'autres composants phénoliques de ce matériel

Tableau 4.3 : Composition chimique des substrats.

	S	S.E	L.S.H.	L.S.	G.S.H.	G.S.	L.S.E.H	L.S.E.	GSEH	G.S.E
pH	5.06	5.53	3.87	3.91	4.24	4.36	3.96	4.82	4.23	5.15
CE (mV)	104	80	168	164	147	141	163	117	148	100
Cendres*	2.88	3.78	3.94	5.23	4.25	4.50	4.53	6.89	4.70	6.43
MOT*	97.12	96.22	96.06	94.77	95.75	95.50	95.47	93.11	95.30	93.57
C. ox*	50.04	50.77	54.55	52.82	51.98	57.19	50.91	54.16	53.40	52.38
F.N.D*	80.44	68.12	74.62	68.54	75.95	78.37	65.92	63.24	77.99	70.81
F.A.D*	72.73	54.07	71.58	69.28	67.40	74.90	61.85	60.00	63.49	67.06
L.A.D*	45.85	36.15	41.24	44.61	40.83	49.70	35.22	40.82	42.91	44
FND-LAD*	34.59	31.97	33.38	24.28	35.19	28.67	30.70	22.42	35.08	26.81
Subérine*	40.97	28.68	32.80	36.61	18.06	22.35	20.84	30.29	18.46	24.22
Ceroïdes*	4.94	3.33	4.09	5.01	4.81	5.94	2.69	3.67	3.48	4.78
N-NH4 +**	30	194	40	111	50	46	288	1106	176	1023
N-NO3-**	0	0	119	609	394	426	205	3472	280	1910
N. Total*	0.51	1.02	0.64	0.69	0.56	0.53	1.10	1.18	1.07	1.30
Protéine Crue*	3.19	6.38	4.00	4.31	3.50	3.31	6.88	7.38	6.69	8.13

* % poids sec ; ** ppm poids sec

Tableau 4.4 : Courbe de rétention d'eau des substrats de culture.

	S	S.E	L.S.	G.S.	L.S.E.	G.S.E
D. A	0.17	0.16	0.13	0.12	0.14	0.13
D. R	1.52	1.52	1.53	1.53	1.55	1.54
E.P.T	90	90.65	91.7	92.22	91.16	91.69
C. A	48.87	49.05	74.89	66.59	71.36	70.33
A.F.A	13.95	18.60	2.77	7.63	2.74	2.86
A. R	3.85	2.07	0.49	1.025	0.64	0.63
A.D.A	23.32	20.91	13.56	16.98	16.39	17.87

D.A. Densité apparente (g/cm³)

D.R. Densité réelle

E.P.T. Espace poreux total

C.A. Capacité d'air

A.F.A. Eau facilement assimilable

A.R. Eau de réserve

A.D.A. Eau difficilement assimilable

(82). Ce type de substances s'est métabolisé et modifié par les champignons ; nous pensons donc qu'il serait positif de faire des études comme celles décrites ci-dessus avec le liège traité par des champignons lignocellulolitiques.

4.3 DÉGRADATION DU SUBSTRAT

Pour la discussion des résultats de la dégradation nous distinguerons deux périodes dans la culture. Ces périodes sont déterminées en fonction du moment où, pendant la culture, nous avons fait les déterminations analytiques ; ainsi, la première période va du début de la culture jusqu'à la fin de la phase de colonisation ; et la seconde période de la fin de la phase de colonisation jusqu'à la fin de la culture, et comprend les phases d'homogénéisation et de fructification.

La perte de matière sèche (P.M.S.) ou la dégradation de la matière sèche à la fin de la culture fut assez élevée dans tous les traitements ; plus grande dans *Lentinus edodes* que dans *Ganoderma lucidum*, aussi bien dans les traitements avec du liège enrichi que dans ceux non enrichis. Si nous effectuons une distinction entre les périodes indiquées, on observe que dans le traitement de *Lentinus edodes* non enrichi, la perte de matière sèche est supérieure pendant la phase de colonisation bien qu'elle soit considérable pendant la période qui comprend les phases d'homogénéisa-

tion et fructification, ce qui ne se produit pas dans le reste des traitements. Il faut indiquer que dans le traitement de *Ganoderma* non enrichi, la différence entre les deux périodes est très petite.

En ce qui concerne la dynamique de la dégradation des fibres on peut observer deux tendances bien différenciées : les traitements avec du liège subissent une plus forte dégradation pendant la phase de colonisation que pendant le reste de la culture, et il se passe le contraire dans les traitements avec du liège enrichi. On retrouve cette tendance pour la matière organique totale. Cela nous amène à penser, comme nous l'indiquions déjà en 4.1, que dans les cultures sur liège enrichi les champignons profitent des sources de carbone et d'azote plus facilement assimilables ; en revanche, lorsque l'on cultive uniquement sur du liège, les champignons doivent utiliser des nutriments plus complexes. Ceci correspond à la dynamique de croissance décrite en 4.1, où on observait que sur le liège enrichi le mycélium est très dense (ce qui se manifeste par l'intensité de couleur) et avance lentement dans le substrat puisqu'il n'a pas de difficultés à trouver des aliments. Nous pensons que, dans ce cas, *Ganoderma lucidum* et *Lentinus edodes* se nourrissent de l'enrichissement tant qu'il y en a et commencent, ensuite, à employer d'autres aliments. En revanche, sur du liège non enrichi le mycélium grandit

Tableau 4.5 : Perte de matière sèche des substrats de culture. % du poids.

Traitements	Phase de colonisation	Phases d'homogénéisation et de fructification	Total
L. S	21.90	16.50	38.40
G. S	16.62	17.05	33.67
L.S.E	14.45	28.29	42.74
G.S.E	17.45	22.81	40.26

avec moins d'intensité et avance très rapidement à la recherche d'aliments facilement assimilables ; étant donné qu'il ne les trouve pas, il est obligé d'utiliser des composés plus complexes (du type lignocellulosique et suberinique) dès le début de la croissance.

La dégradation de la matière organique est significativement différente pour les deux espèces et pour tous les traitements. Dans l'augmentation des cendres on peut observer que les traitements enrichis montrent des valeurs significativement supérieures aux non enrichis, exception faite du traitement enrichi de *Ganoderma lucidum* pendant la phase de colonisation.

Dans la croissance du carbone oxydable, pendant la phase de colonisation, on ne peut pas apprécier de différences significatives dans aucun des traitements. Cette croissance est supérieure, dans tous les cas, dans les phases finales de la culture. Elle est significativement inférieure dans le traitement non enrichi de *Ganoderma lucidum* par rapport aux autres non enrichis, parmi lesquels il n'existe pas de différences significatives (tableau 4.6. et annexe).

Dans le cas de la subérine et des ceroïdes, tous les traitements présentent une plus grande dégradation pendant la phase de colonisation qu'à la fin de la culture (tableau 4.6). Si nous comparons les traitements de la même espèce, la dégradation de la subérine dans *Ganoderma lucidum* est significativement supérieure sur du liège seul que sur du liège enrichi, ce qui n'est pas le cas pour *Lentinus edodes*. Si nous comparons les espèces, dans

n'est pas le cas pour *Lentinus edodes*. Si nous comparons les espèces, dans chaque type de traitement (enrichi, non enrichi) c'est *Ganoderma lucidum* qui montre d'une façon significative une plus grande dégradation de subérine à la fin de la culture (tableau 5.6.b, graphique 5.6.j). La conduite de *Ganoderma lucidum* présente une certaine logique étant donné que généralement il pousse sur des souches de *Quercus* sp, en le colonisant totalement, à l'intérieur et à l'extérieur. Quant à *Lentinus edodes*, bien qu'il pousse sur des arbres du genre *Quercus*, il ne colonise, d'habitude, que les parties les plus internes.

La dégradation des ceroïdes pendant la phase de colonisation présente des différences significatives entre les traitements. Elle est supérieure pour *Lentinus edodes* par rapport à *Ganoderma lucidum*, et pour les traitements sur du liège non enrichi par rapport à ceux enrichis, de la même espèce. A la fin de la culture la dégradation des ceroïdes est significativement plus grande dans les traitements avec *Lentinus* que dans ceux avec *Ganoderma lucidum*. Si nous comparons les traitements, dans chaque espèce, à la fin de la culture, nous n'observons pas de différences significatives pour *Lentinus edodes*. En revanche, on en trouve pour *Ganoderma lucidum*, pour lesquels la dégradation est significativement supérieure sur le substrat non enrichi que sur celui enrichi tableau 4.6.

Tableau 4.6 : Dégradation des principaux paramètres chimiques des substrats pendant la phase de colonisation (I), pendant la phase d'homogénéisation et de fructivation (II), pendant toute la culture (III) (en poids sec).

	P.M.S	Matière Organique totale	Croissance Cendres	Croissance Carbone oxydable	F.N.D	F.A.D	L.A.D	F.N.D- F.A.D	Subérine	Ceroides	
L.S	I	21.9	22.75 a	6.85 a	14.86 a	27.55 a	23.14 a	29.74 ab	24.63	37.43 a	35.34 a
	II	16.65	17.14	5.08	20.11	19.96	18.18	10.32	32.13	7.48	2.19
	III	38.45	39.89b	11.93 a b	34.97 b	47.51 b	41.32 b	40.06 C	56.76	44.91 a b	37.53 a b
GS	I	16.62	17.80 c	23.05 bc	13.38 a	21.27 c	25.91 a	25.88 a	15.17	63.25 c	18.81 c
	II	17.05	17.17	-19.72	11.04	14.30	5.99	2.430	30.02	0.67	1.67
	III	33.67	34.97 d	3.33 a	24.42 c	35.57 d	31.90 c	28.31 a b	45.19	63.82 c	20.48 d
L.S.E	I	14.45	15.12 e	34.56 c	15.59 a	17.21 e	2.15 d	16.65 d	17.85	37.84 a	30.89 e
	II	28.29	29.47	2.42	24.31	29.63	34.31	18.69	41.99	1.69	6.00
	III	42.74	44.59 f	36.98 c	39.90 b	46.84 b	36.46 e	35.34 b c	59.84	39.53 a	36.89b
G.S.E	I	17.25	18.24 g	34.81 c	14.58 a	5.49 f	3.07 d	2.01 e	9.42	46.87 a b	13.73 f
	II	22.8	23.67	-1.43	24.78	32.41	22.84	25.28	40.48	2.68	0.51
	III	40.26	41.91 h	33.38 c	39.36 b	37.90 g	25.91 f	27.29 a b	49.90	49.55 b	14.24 f

Conclusions

1. La culture de *Ganoderma lucidum* et *Lentinus edodes* sur le résidu de l'industrie du liège est viable. Les deux champignons s'y développent et parviennent à y compléter leur cycle biologique. De plus, les deux espèces dégradent considérablement le résidu de liège, ils causent une perte de matière sèche proche de 40 % dans le cas de *Lentinus edodes* et de 35 % dans le cas de *Ganoderma lucidum*. Ils provoquent également des transformations importantes dans la composition chimique et dans les caractéristiques physiques du résidu.

2. La structure complexe de la subérine est attaquée par *Lentinus edodes* et *Ganoderma lucidum*. Ce dernier est plus efficace pour cette dégradation.

3. Les carpophores produits par *Lentinus edodes* cultivés sur du résidu de liège possèdent les caractéristiques et les qualités organoléptiques typiques de l'espèce cultivée industriellement.

4. Pour la culture de champignons sur le résidu de l'industrie du liège il est néces-

saire de faire un traitement préalable de stérilisation du substrat.

5. *Ganoderma lucidum* est beaucoup plus sensible que *Lentinus edodes* aux contaminations par des champignons concurrents. Ceci nous amène à déconseiller la manipulation et le changement des blocs de culture pendant celle-ci, et à conseiller, en revanche, l'emploi d'un seul container de culture.

6. Pour d'ultérieures expériences de culture de *Ganoderma lucidum* il serait intéressant d'obtenir davantage d'information sur ses besoins lumineux : photopériode, gamme de radiations, intensité.

7. L'induction à la fructification de *Lentinus edodes* par injection d'eau provoque une réaction rapide et uniforme. Elle permet, en plus, de maintenir l'asepsie de la culture et d'économiser de l'eau.

8. L'enrichissement en azote du résidu de liège a réduit le temps de culture mais a favorisé considérablement la contamination du substrat par d'autres champignons

non désirés. Les bons résultats obtenus dans la culture de *Lentinus edodes* et *Ganoderma lucidum* sur du liège non enrichi indiquent que cet enrichissement n'est pas indispensable. Il serait intéressant, pour réduire la durée de culture de faire des essais avec différents niveaux d'enrichissement.

9. Étant donné le niveau de dégradation obtenu pour le résidu de liège il serait très intéressant de poursuivre les études pour essayer de découvrir si le résidu de liège, préalablement digéré par les champignons lignocellulolitiques, peut

s'incorporer à un processus de compostage ou bien s'employer comme amendement organique ou comme substrat horticole.

10. Les méthodes d'analyse décrites par Van Soest pour déterminer F.N.D., F.A.D. et L.A.D., appliquées sur du liège ne nous ont pas permis de distinguer l'hémicellulose, la cellulose et la lignine, car pendant l'application de ces méthodes sur le résidu de liège, des interférences avec d'autres composants se sont produites

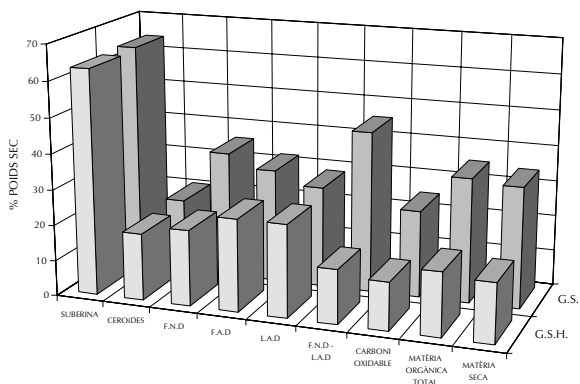
Bibliographie

1. MONTOYA OLIVER J.L. (1980) : « *Los Alcornoques* », Ed. M.A.P.A Madrid.
2. VIEIRA J. (1991) : « *Subericultura* ». Ed. M.A.P.A Madrid.
3. PLA. P (1976) : « *El suro, què és i per què serveix* » Ed. U.P.C Barcelona. 386 pp.
4. JUANOLA A. (1990) : « *El sector surer : anàlisi de la situació actual* ». L'Estoig, publicació de l'Arxiu i el Museu de Palafrugell.
5. STRASBURGER E., NOLL F., SCHENCK H., SCHIMPER A.F.W (1986) : « *Tratado de Botánica* ». Ed. Mar'n S.A. Setena edició espanyola. Barcelona.
6. MOLINAS I DE FERRER M., OLIVA I ESTANVOL M. (1990) : « *El suro i les seves classes* » L'Estoig, publicació de l'Arxiu i el Museu de Palafrugell.
7. CHATONET P., GUIMBERTEAU G., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N. (1994) : « *Nature et origin des odeurs de moisi dans les caves. Incidences sur la contamination des vins*. » Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin ». **28** (2) : 131 - 151.
8. FUNDACI- ENCICLOPEDIA CATALANA (1991) : *Història Natural dels Països Catalans*. Vol 5 : Fongs i l'quens. Vol 7 : Vegetació. Barcelona.
9. KOLATTUKUDY P.E. (1981) : « *Structure, biosynthesis, and degradation of cutin and suberin* ». Ann. Review Plant Physiology. **32** : 539-567.
10. KOLATTUKUDY P.E. (1984) : « *Biochemistry and function of cutin and suberin* ». Canadian Journal of Botany. **62** : 2918-2933.
11. KOLATTUKUDY P.E. (1980) : « *Biopolyester membrane of plants : Cutin and suberin* ». Science 208 : 990 - 1000.
12. ARNO M., SERRA M.C., SEOANE E. (1980) : « *Metanálisis de la suberina del corcho. Identificación y estimación de sus componentes ácidos, como ésteres metílicos* ». Anales de Química. **77** : 82 - 86.
13. AGULLO C., COLLAR C., SEOANE E. (1983) : « *Estudio comparativo de la hojas y de la suberina de la corteza de Quercus suber* ». Anales de Química. **80** : 20 - 24.
14. KIRK T.K., FENN P. (1982) : « *Formation and action of the lignolytic system in basidiomycetes. a : Descom-poser Basidiomycetes : their biology and ecology* ». pág. 67 - 91. (Eds. Frankland, J.-C.; Hedger, J.N.; Swift, M.J.). Simposium of the British Mycological Society (London).
15. BAS M., RUIZ M. (1993) : « *Tractament de restes de poda de Platanus x hispanica per mitjà del cultiu de fongs sapròfits comestibles* ». Treball de Final de Carrera. Escola Superior d'Agricultura de Barcelona. 1930-1993.
16. ESAU K. (1985) : « *Anatomia Vegetal* ». Ed. Omega S.A. Barcelona.
17. BARCEL- J., NICOLAS G., SABATER B., SANCHEZ R. (1990) : « *Fisiología vegetal* ». Ed. Pirámide S.A. Madrid. pág.823.
18. ASENSIO A. (1988) : « *Structural studies of a hemicellulose B fraction (B-2) from de cork of Quercus suber* ». Canadian Journal of Chemistry. **66**, 449.
19. ASENSIO A. (1988) : « *Polysaccharides from the cork of Quercus suber. II. Hemicellulose* ». Journal of Natural Products. **51**. (3) : 488-491.
20. RIEDER M., MATZKE K., ZIEGLER F., KÖGEL-KNABNER I. (1993) : « *Ocurrence, distribution and fate of the lipid plant biopolymers cutin and suberin in temperate forest soils* ». Organic Geochemistry. **20** (7) : 1063-1076.
21. VIDAL J. M (1989) : « *Fongs sapròfits de les suredes catalanes : Possibles indicadors del grau d'estrés* ». Scientia Gerundensis, **15** : 201-204.
22. SOLIVA M., SA-A J. (1987) : « *El compostatge. Procés, sistemes i aplicacions* ». (Diputació de Barcelona. Servei de Medi Ambient). Quaderns d'Ecologia Aplicada nº 11. p.96.
23. GINTEROVA A. (1973) : « *Nitrogen fixation by higher fungi* ». Biologia (Bratislava) **28** (3) : 199 - 202.
24. KURTZMAN R.H. (1978) : « *Nitrogen fixation by Pleurotus* ». Mushroom Science X (1) : 427 - 437.
25. KIRK T.K., SCHULTZ E., CONNORS W.J., LORENZ L.F., ZEIKUS J.K. (1978) : « *Lignin degradation by Phanerochaete chrysosporium* ». Archives of Microbiology **117**: 85- 277.
26. Waldner R., Leisola M.S.A., Fiechter A. (1988) : « *Comparison of lignolytic activities of selected white rot fungi* ». Applied Microbiology and Biotechnology **29** (4) : 400 - 407.
27. VYAS B.R.M., VOLC J., SASEK V. (1994) : « *Lignolytic enzymes of selected white rot fungi on wheat straw* ». Folia Microbiol. **39** (3) : 235 - 240.
28. ORTH A.B., ROYSE D.J., TIEN M. (1993) : « *Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi* ». Applied and Environmental Microbiology. **59** (12) : 4017-4023.
29. RATCLIFFE B., FLURKEY W.H., KUGLIN J., DAWLEY R. (1994) : « *Tyrosinase, laccase, and peroxidase in mushrooms (Agaricus, Crimini, Oyster, and Shiitake)* ». Journal of Food Science, **59** (4) : 824- 827.
30. LYNCH J.M. : « *Utilization of lignocellulosic wastes* ». Journal Applied Bacteriology Symposium Supplement : 71-83.
31. MOREY P. (1977) : « *Como crecen los arboles. Cuadernos de biología* ». Ed. Omega S.A. Barcelona.
32. LEATHAM G.F. (1985) : « *Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom Lentinus edodes during degradation of a lignocellulosic medium* ». Applied and Environmental Microbiology. **50** (4) : 859-867.
33. LEATHAM G.F., KIRK T.K. (1983) : « *Regulation of l'activitat lignolítica par un apport d'azote chez les basidio-mycètes de la pourriture blanche* ». FEMS Microbiology Letters **16** (1) : 65-68.
34. ADASKAVEG J.E., GILBERTSON R.L. (1986) : « *In vitro decay studies of selective delignification and simultaneous decay by the white rot fungi Ganoderma lucidum and G. tsugae* ». Canadian Journal of Botany. **64** : 1611-1619.
35. ADASKAVEG J.E., GILBERTSON R.L., BLANCHETTE R.A. (1990) : « *Comparative studies of delignification caused by Ganoderma sp.* Applied and Environmental Microbiology. **56** (6) : 1932-1943.
36. LEATHAM G.F. (1986) : « *The ligninolytic activities of Lentinus edodes and Phanerochaete chrysosporium* ». Applied Microbiology Biotechnology **24** : 51-58.
37. SINGH R.P., GARCHA H.S., KHANNA P.K. (1989) : « *Study of laccase enzyme in degradation of lignocellulose* ». Mushroom Science XII (2) : 35 - 47.
38. BLANCHETTE R.A., ABAD A.R., FARRELL R. L., LEATHERS T.D. (1989) : « *Detection of lignin peroxidase and xylanase by immunocytological labeling in wood decayed by basidiomycetes* ». Appl and Environmental Microbiology. **55** : 1457-1465.
39. CHANG S.T., MILES P.G. (1987) : « *Historical record of early cultivation of Lentinus in China* ». Mushroom Journal for the tropics **7** (1) : 31-37.
40. Poppe J. (1978) : « *Mushroom domestications, their dis-*

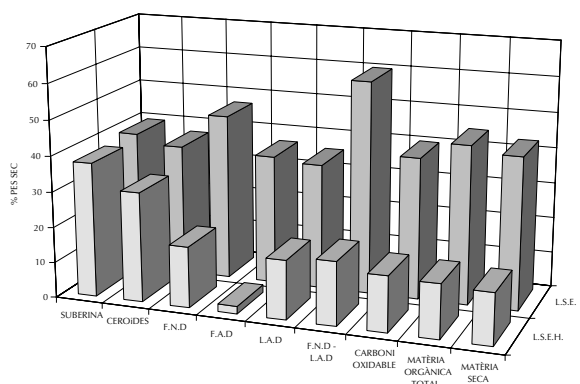
- ease-index and growth abnormalities ». *Mushroom Science* X (1) : 851 - 872.
43. ROYSE D.J., SCHISLER L.C. (1980) : « *Mushrooms. Their consumption production and culture development* ». *Interdisciplinary Science Reviews* 5 (4) : 324-332.
44. CHANG S.T. (1992) : « *Mushroom biology and mushroom production* ». Department of Biology. The Chinese University of Hong Kong Shatin, N.T., Hong Kong. (comunicaci-).
45. GARCIA M. (1991) : *Cultivo de setas y trufas. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid* pàgs 9-12.
46. DELMAS J. (1989) : « *Les Champignons et leur culture* ». Ed. La Maison Rustique. Flammarion.
47. MORI K. I YAMASHITA K. (1967) : « *Differentiation and distribution of Lentinus edodes in Japan* ». *Mushroom science* VI, 529-532.
48. SINGER R. (1964) : « *Las setas y las trufas* ». Cia. Editorial Continental S.A. Mèxico.
49. ANDO M. (1974) : « *Fruit-body formation of Lentinus edodes on the artificial media* ». *Mushroom Science* IX part I, p 423-433.
50. BATISTA J.-G. (1993) : « *Influència de alguns factors climàtics na cultura de Shiitake (Lentinus edodes) em toros de madeira* ». *Actas de Horticultura : II Congreso Ibèrico de Ciencias Hortícolas (Identificaci-n : Cultivos « in vitro » Horticultura)*. (2) : 1044-1052.
51. Leatham G.F., Stahmann M.A. (1989) : « *The effects of common nutritionally important cations on the growth of the cultivated mushroom Lentinula edodes* ». *Mushroom Science* XII (2) : 253 - 265.
52. FERRI F. (1985) : « *Produzione di più specie fungine del medesimo substrato* ». *L'informatore Agrario* 40 (39) : 73 -74.
53. TIRATANA S., TANTIKANJANA T. (1987) : « *Effects of some environmental factors on morphology and yield of Lentinus edodes* ». *Mushroom Science* XII. (2) : 279 - 291.
54. NUTALAYA S, PATARAGETVIT S. (1981) : « *Shiitake mushroom cultivation in Thailand* ». *Mushroom Science* XI, p 723,736.
55. DIEHLE D.A., ROYSE D.J. (1986) : « *Shiitake cultivation on sawdust : evaluation of selected geno-types for biological efficiency and mushroom size* ». *Mycologia* 78 (6) : 992 - 993.
56. KALBERER P. (1989) : « *The cultivation of Shiitake Lentinus edodes on supplemented sawdust* ». *Mushroom Science* XII (2) : 317 - 325.
57. ITÁVARA M. (1989) : « *Comparison of three methods to produce liquid spawn for commercial cultivation of Shiitake* ». *Mushroom Science* XII (2) : 309 - 315.
58. RAASKA L. (1989) : « *The effect of homogenization on the growth of commercially produced Shiitake* ». *Mushroom Science* XII (2) : 327 - 335.
59. VAN T., COTTER H., FLYNN T. (1987) : « *Evolution of Shiitake inoculation techniques* ». *Mushroom Science* XII (2) : 293 - 301.
60. MIZUNO T. (1995) : « *Bioactive biomolecules of mushrooms : food function and medicinal effect of mushroom fungi* ». *Food Reviews International* 11 (1) : 7 - 21.
62. KAMIYA T, SAITO Y, HASHIMOTO M, SEKI H. (1969) *Tetrahedron Letters*, 53, 4729.
66. SUZUKI H, IYAMA K, AHO T, OHKUBO A, TODA S. (1990) : *Agricultural Biology and Chemistry*, 54, 479
67. ADASKAVEG J.E., GILBERTSON R.L. (1986) : « *Infection and colonisation of graoe by Ganoderma lucidum* ». *Abstracts of the American Phytopathological Society. Pacific division*. 76 (8) : 8.
68. PETERSEN J.E. (1983) : « *Ganoderma in Northern Europe* ». Traduït i adaptat per Sasa M. de Lakporevampene i Danmark og Europa. *Svampe* 7 h 1 - 11.
69. JONES K. (1992) : « *Reishi : Longevity Herb of the Orient* ». *Townsend Letter for Doctors*. Octob.1992.
70. HIROTANI M., INO C., FURUYA T. (1993) : « *Comparative study on the strain-specific triterpenoid components of Ganoderma lucidum* ». *Phytochemistry* 33 (2) : 379 - 382.
71. ADASKAVEG J.E., GILBERTSON L.R. (1986) : « *Cultural and temperature relationship of several North American and European Ganoderma species* ». *The American Phytopatology society. Abstracts of The Annual Meeting*.
72. BON M. (1988) : « *Gu'a de Campo de los Hongos de Europa* ». p. 320. Ed. Omega. Barcelona 1988.
73. WILLARD T. (1990) : « *Reishi Mushroom : Herb of Spiritual Potency and Medical Wonder* ». Ed. Sylvan Press. Issaquah, Washington. 167 pp.1990.
74. CHIANG H-C., CHU S-C. (1991) : « *Studies on the constituents of Ganoderma lucidum* ». *Journal of the Chinese Chemical Society* 38 : 71 - 76.
75. LIN C-N., TOME W-P. (1991) : « *Novel cytotoxic components of Formosan Ganoderma lucidum* ». *Journal of Natural Products* 54 (4) : 998 - 1002.
76. O. TOTH J, LUU B, OURISSO G. (1883) : « *Les àcides ganoderiques T à Z : triterpens cytotòxiques de Ganoderma lucidum* ». *Tetrahedron Letters* 24 (10) : 1081-1084.
77. NISHITOBA T., SATO H., SAKAMURA S. (1987) : « *Triterpenoids from the fungus Ganoderma lucidum* ». *Phytochemistry* 26 (6) : 1777-1784.
78. SHIAO M-S., LIN L-J. (1987) : « *Two new triterpenes of the fungus Ganoderma lucidum* ». *Journal of Natural Products* 50 (5) : 886 - 890.
79. LIN L-J., SHIAO M-S., YEH S-F. (1988) : « *Triterpenes from Ganoderma lucidum* ». *Phytochemistry* 27 (7) : 2269-2271.
80. SUAREZ M.P. ET AL. (1993) : « *Enraizamiento de estaquillas de adelfa, olivo y geranio en sustrato de corcho* ». *Actas de Horticultura*, 10 (abril) : 1185-1190.
81. MARTORELL M (1993) : « *Caracteritzaci- de substrats hort'coles : metodologies d'anàlisi i avaluaci-agronòmica de substrats per planter* ». *Treball de Final de Carrera. Escola Superior d'Agricultura de Barcelona*.
82. ORDOVAS J. ET AL. (1992) : « *Utilizaci-n de corcho como sustrato para semilleros de tomate con seguimiento de las plantas en campo* ». *Actas de Horticultura*, 11 (sept-oct) : 155 - 157.
83. AZCON-BIETO J. ; TALON M. (1993) : « *Fisiolog'a y Bioqu'mica Vegetal* ». Ed. Interamericana McGraw-Hill. Madrid.

Annexes

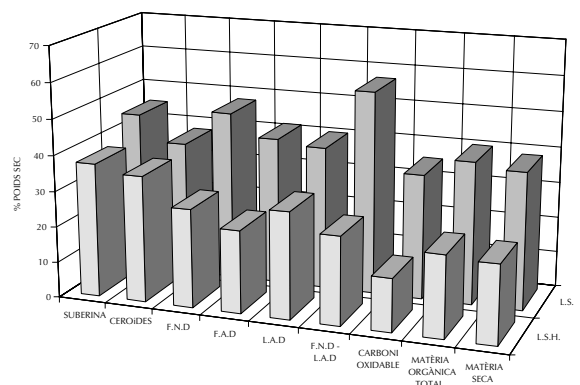
Dégradation des principaux paramètres chimiques. *Lentinus edodes* sur substrat du liège.



Dégradation des principaux paramètres chimiques. *Lentinus edodes* sur substrat du liège enrichi.



Dégradation des principaux paramètres chimiques. *Ganoderma lucidum* sur substrat du liège.



Dégradation des principaux paramètres chimiques. *Ganoderma lucidum* sur substrat du liège enrichi.

