

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE D'ALGER



DEPARTEMENT DE GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

LABORATOIRE DES BIOTECHNOLOGIES
ET GENIE DES PROCES (BIOGEP)



THESE DE DOCTORAT

En Génie de l'Environnement

Présentée par

ARBIA Wassila éps Khatraoui

Magister en Génie de l'Environnement

THEME

**ETUDE DE L'OPTIMISATION DE LA RECUPERATION DE LA CHITINE PAR
FERMENTATION DE DECHETS MARINS**

Président du jury :	N. MAMERI	Professeur	E. N. P
Directeurs de mémoire :	L. DJABRI ADOUR	Professeur	U. M. M, TO
Examineurs:	B. DJEGHRI-HOCINE	Professeur	I. S. M. A. L
	H. BENYOUSSEF	Professeur	E. N. P
	M.A. AZIZA	Directeur de recherche	C. D. E.R
Invités :	A. AMRANE	Professeur	U. de Rennes, France
	H. LOUNICI	Professeur	Université de Bouira

2014

Remerciements

Tout d'abord, mes remerciements sincères à Monsieur le Professeur *MAMERI N.*, qui m'a donné l'opportunité de faire partie de son équipe de recherche au sein du Laboratoire des Biotechnologies et Génie des Procédés à l'Ecole Nationale Polytechnique. Je le remercie également, pour m'avoir proposé ce sujet intéressant et d'actualité ainsi que pour ses précieuses suggestions prodiguées tout au long de la réalisation de ce travail. Je le remercie également d'avoir accepté d'être le président du jury.

Un grand merci à ma promotrice Madame *DJABRI- ADOUR L.*, Professeur à l'U.M.M, TO, d'avoir accepté d'encadrer ce travail avec dynamisme. Je la remercie également pour ses encouragements, ses conseils pendant mes travaux de recherches et surtout pour sa gentillesse et sa compréhension.

Je remercie vivement Monsieur *LOUNICI H.*, Professeur à l'Université de Bouira, pour sa disponibilité, ses conseils et surtout pour sa patience. Qu'il trouve ici mes meilleurs remerciements et l'expression de mon profond respect.

J'exprime également mes profonds remerciements à Monsieur *AMRANE A.*, Professeur à l'Université de Rennes, France, pour son aide précieuse, sa patience et ses conseils.

Je tiens à remercier vivement Madame *DJEGHRI-HOCINE B.*, Professeur à l'I. S. M. A. L., qui, malgré ses occupations, m'a fait l'honneur d'examiner mon travail.

Mes remerciements s'adressent également à Madame *AZIZA M.A.*, Directeur de recherche C .D.E.R ., pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail en acceptant de l'examiner.

A Monsieur *BENYOUSSEF H.*, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique, qu'il trouve ici le témoignage de mes vifs remerciements pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'apporter son jugement sur ce travail.

J'aimerais également remercier mes collègues du laboratoire, Hassiba, Souhila, Leila..., et du Laboratoire du Génie de l'Environnement pour l'ensemble des discussions et interactions que nous avons entretenues.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur DJILI K., pour m'avoir aidé énormément en acceptant d'effectuer des analyses au sein du laboratoire d'analyse du département pédologie à l'I.N.S.A.

Je tiens à remercier également, HAMIDA, Secrétaire du département Génie de l'Environnement, pour sa gentillesse et son aide.

Finalement, je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance, mes meilleurs remerciements et l'expression de mon profond respect.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents, à vous que je ne pourrais assez exprimer mon éternel amour, respect et gratitude. Pour votre amour, vos sacrifices, patience et tendresse.

Que dieu vous garde pour nous.

Mon très cher mari Kichem pour son soutien moral, ses encouragements et son aide précieuse.

À mon petit prince Abderrahmane et ma petite princesse Kanane

Mes chers frères : Rachid, Sidali et Mohamed.

Mes chères sœurs : Rachida, Leila et Amina pour leur gentillesse, leur compréhension et leur soutien moral.

Mes belles sœurs, Mahdia, Zineb et Zinouba

Mes beaux frères : Ismail et Adel

Mes beaux parents,

À ma belle famille, surtout à Dalila, Razika, Mouna, Kana et Chahra.

Sans oublier les poussins de la famille : Idriss, Chanez, Adnane, Ibrahim, Slyes, Malik, Youcef, Sara, Rania et Marwa que dieu les garde inchaallah.

Mes amies Hassina, Zahra et Nora.

Qu'ils me pardonnent mon manque de disponibilité et mes absences. Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers vous.

La réalisation de ce mémoire n'aurait pas été possible sans la gentillesse et la bonne humeur de l'ensemble des personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de travailler, particulièrement : Hassiba, Souhila, Lyess, et Hassina, Mourad et toute l'équipe de biotechnologie et Environnement.

Introduction	1
I. Définitions, caractéristiques et propriétés de la chitine et ses dérivés	
I.1. Historique.....	5
I. 2. Caractéristiques et propriétés de la chitine.....	5
I. 2.1. Définition structurale de la chitine.....	5
I.2. 2. Caractéristiques.....	9
1. 2. 2. 1. Le degré de désacétylation.....	10
1. 2. 2. 2. Le poids moléculaire.....	11
1. 2. 3. Les propriétés.....	11
1. 2. 3. 1. La cristallinité.....	11
I.2.3.2. La solubilité.....	14
I.2.3.3. Electrolytes.....	14
I.2.3.4. Biologiques.....	14
I.2.3.5. Autres propriétés physiques et chimiques.....	15
I. 3. Les sources de la chitine.....	15
II. Les méthodes d'extraction	
II. 1. Introduction.....	18
II. 2. La méthode chimique.....	18
II. 3. La méthode biologique.....	20
II.2. 3. 1. Fermentation lactique.....	22
II. 3. 2. Fermentation Non- lactique.....	26
II. 3. 3. Co-fermentation.....	30
II. 4. Les facteurs clés de la récupération biologique de la chitine.....	33
III. Les applications de la chitine et ses dérivés	
III. 1. Introduction.....	35
III. 2. Les applications dans le traitement des eaux usées.....	35
III.3. Les applications agroalimentaires.....	39
III.4. Les applications biomédicales.....	39
III. 5. Applications agricoles.....	40
IV. Modélisation par les plans d'expériences	
IV. 1. Historique.....	41
IV. 2. Introduction.....	42
IV. 3. Les domaines d'application des plans d'expériences.....	43

IV. 4. Contexte d'utilisation des plans d'expériences.....	43
IV. 5. Avantages de la méthode des plans d'expériences.....	44
IV. 6. Terminologie.....	44
IV. 6. 1. Facteurs.....	44
IV. 6. 2. Réponses.....	46
IV. 6. 3. Expériences.....	46
IV. 6. 4. Matrice d'expériences.....	47
IV. 6. 5. Le modèle.....	48
IV. 6. 6. Notion d'interaction.....	48
IV. 6. 6. 1. Système sans interaction.....	48
IV. 6. 6. 1. Système avec interaction.....	49
IV. 7. Efficacité des plans d'expériences.....	50
IV. 7. 1. Stratégie traditionnelle : « un seul facteur à la fois ».....	50
IV. 7. 2. Stratégie du plan factoriel complet.....	51
IV. 7. 3. Stratégie du plan fractionnaire orthogonal.....	51
IV. 8. Modélisation en surfaces de réponse.....	51
IV.8. 1. Les plans composites centrés.....	52
IV.8. 1.1. Première séquence.....	52
IV. 8. 1. 2. Deuxième séquence.....	52
IV.8.1.3. Troisième séquence.....	53
IV. 9. Construction du plan d'expérience.....	54
IV. 9. 1. Choix de la stratégie expérimentale.....	54
IV. 9. 2. Analyse statistique des résultats.....	55
IV. 9. 2. 1. Qualité descriptive.....	55
IV. 9. 2. 2. Analyse de la variance.....	56
IV. 9. 2. 2. 1. Tableau d'analyse de la variance.....	56
IV. 10. Analyse des surfaces de réponse.....	59
IV. 11. Optimum multicritère : fonction de désirabilité.....	60
 V. Matériels et Méthodes	
V. 1. Matériels.....	63
V. 2. Procédure expérimentale.....	63
V. 2. 1. Préparation de la poudre de carapace.....	63
V. 2. 2. Préparation du jus de dattes.....	63

V. 3. Méthodes analytiques.....	63
V. 3. 1. Analyses physico-chimiques de la carapace.....	63
V.3. 2. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	68
V.3. 3. Analyse par fluorescence aux rayons X.....	68
V.3. 4. Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)	68
V. 4. La fermentation.....	68
V. 5. Optimisation de la fermentation par la méthode des plans d'expériences.....	69
V. 5. 1. La fermentation par culture pure <i>Lb. helveticus</i>	69
V. 5. 1. 1. Plan « un facteur à la fois ».....	69
V. 5. 1. 2. Par plan composite centré.....	70
V. 5. 2. La co-fermentation par un mélange de bactéries lactiques <i>Lb. helveticus</i> et <i>Lb. Plantarum</i>	70
VI. Résultats et discussion	
VI. 1. Caractérisation de la carapace des crevettes et du jus de dattes.....	73
VI. 2. Etude des effets des facteurs physico-chimiques sur la biodéminéralisation et la biodéprotéinisation par la méthode d'« un facteur à la fois » en utilisant une souche pure <i>Lactobacillus helvetius</i>	74
VI. 2. 1. Effet de la concentration initiale en glucose.....	74
VI. 2. 2. Effet de la température d'incubation.....	76
VI. 2. 3. Effet de la nature de la source de carbone.....	80
VI. 2. 4. Caractérisation de la carapace fermentée avec le glucose et le jus de dattes.....	83
A- Spectroscopie Infra rouge à transformée de Fourier.....	83
B- Diffraction aux rayons X.....	87
C- Fluorescence aux rayons X.....	88
VI. 3. Etude des effets des différents facteurs physico-chimiques sur la déminéralisation et la déprotéinisation par la méthode des surfaces de réponse.....	89
VI. 3. 1. Comparaison des réponses prédites et expérimentales de DM et DP.....	89
VI. 3. 2. La fluorescence des rayons X et les examens microscopiques.....	91
VI. 3. 3. Les modèles mathématiques décrivant les taux de déminéralisation et de déprotéinisation.....	97
VI. 3. 3. 1. Déminéralisation.....	98
VI. 3. 3. 2. Déprotéinisation.....	99
VI. 3. 4. Analyse de la variance.....	99

VI. 3. 5. Analyse des surfaces de réponse	102
VI. 3. 5. 1. Déminéralisation.....	102
VI. 3. 5. 2. Déprotéinisation.....	104
VI. 3. 6. La désirabilité.....	105
VI. 4. Etude des effets des différents facteurs physico-chimiques sur la déminéralisation et la déprotéinisation par la méthode des surfaces de réponse	107
VI. 4. 1. Comparaison des réponses prédites et expérimentales de DM et DP utilisant une co-culture de bactéries lactiques : <i>Lb. plantarum</i> et <i>Lb. helveticus</i>	107
VI. 4. 2. Les modèles mathématiques décrivant les taux de déminéralisation et de déprotéinisation.....	110
VI. 4. 2. 1. La déminéralisation.....	109
VI. 4. 2. 2. La déprotéinisation.....	109
VI.4. 3 Etude des effets des différents facteurs et leurs interactions.....	111
VI. 4. 4. Analyse de variance.....	113
VI. 4. 5. Le pourcentage de contribution.....	115
VI. 4. 6. Corrélation entre les valeurs prédites et expérimentales de la déprotéinisation et de la déminéralisation.....	116
VI. 4. 7. Analyse de la surface de réponse.....	116
VI. 4. 6. 1. Pour la déminéralisation.....	116
VI. 4. 6. 2. Pour la déprotéinisation.....	117
VI. 4. 10. La désirabilité.....	118
VI.4. 9. Caractérisation de la carapace fermentée avec la co-culture sur le jus de dattes.....	121
Conclusion.....	125
Références bibliographiques.....	128

Figure I. 1 : Structures de a) chitine, b) chitosane et c) cellulose.....	6
Figure I. 2 : Présentation de l'encastrement des fibrilles de chitine dans la matrice protéique.....	8
Figure I. 3 : Structure moléculaire et représentation conventionnelle des trois formes de la chitine.....	11
Figure I. 4 : Structure du (a) α - chitine et (b) β - chitine.....	13
Figure II. 1 : Les différentes étapes d'extraction de la chitine.....	19
Figure IV. 1 : Description d'un phénomène de type boîte noire.....	44
Figure IV. 2 : Notation de YATE sur la variable A.....	45
Figure IV. 3 : Centrage et réduction des variables ou facteurs.....	46
Figure IV. 4. Système sans interaction.....	49
Figure IV. 5. Système avec interaction.....	50
Figure IV. 6. Courbe de réponse à 2 niveaux	52
Figure IV.7 : Configuration d'un plan composite centré complet dans le cas de deux facteurs.....	53
Figure IV. 8 : Variation de la fonction de désirabilité en fonction des réponses.....	60
Figure IV. 9 : Recherche du niveau des facteurs pour une fonction de désirabilité globale et maximale	62
Figure VI. 1 : Evolution du pH, de la biomasse et de la concentration en glucose en fonction du temps à différentes concentrations initiales en glucose (a) 80g/l et (b) 300g/l (Volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m, température d'incubation 30°C, pH libre).....	75
Figure VI. 2 : Evolution des taux de DM et DP en fonction de la concentration initiale en glucose.....	76
Figure VI. 3 : Evolution du pH, de la concentration en glucose et de la biomasse avec 80g/l glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m., pH libre).....	77
Figure VI.4 : Taux de DM et DP à différentes températures avec 300g/l en glucose.....	78
Figure VI. 5: Evolution du pH, de la concentration en glucose, de la biomasse en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 35°C (a) et 42°C (b) (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m, pH libre).....	79
Figure VI. 6: Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 35°C (a) et 42°C (b) (Volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m., pH libre).....	80

Figure VI. 7 : Taux de DM et DP à différentes concentrations initiales en sucres réducteurs (40-250g/l).....	81
Figure VI. 8 : Taux de production finale d'acide lactique à différentes concentration initiales en sucres réducteurs (40- 250 g/l).....	82
Figure VI. 9: Evolution du pH, de la concentration en sucres réducteurs, de la concentration en acide lactique et de la biomasse en fonction du temps avec 200g/l en sucres réducteurs à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace 10, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m).....	83
Figure VI. 10 : Les spectres FTIR (a) de la carapace brute, (b et c) chitine fermentée avec le glucose (DM 61%, DP 42,14%) (c) de la chitine fermentée avec le jus de dattes (DM=61% et DP=83%) et (d) de la chitine commerciale.....	85
Fig. VI.11 : Spectres de diffraction aux rayons X de (a) la carapace brute, (b) chitine I, (c) chitine II.....	87
Figure VI. 12a : Micrographie de la carapace brute.....	93
Figure VI. 12b : Micrographie de la chitine commerciale (structure en feuillet de la chitine).....	94
Figure VI. 12c : Micrographie de la chitine purifiée (essai N°1) (79% DM, 55% DP)	95
Figure VI. 12d : Micrographie de la chitine purifiée (essai N°4) (98% DM, 32% DP).....	95
Figure VI. 12e : Micrographie de la chitine purifiée (essai N°15) (96% DM, 53% DP).....	95
Figure VI. 12f : Micrographie de la chitine purifiée (test supplémentaire) (89% DM, 16% DP).....	95
Figure VI. 12. Micrographies obtenues par microscope électronique à balayage.....	95
Figure VI. 13 : Micrographie des cristaux formés au cours de l'essai N°13.....	96
Figure VI. 14 : Le diagramme de Pareto des effets des variables indépendantes sur les taux de (a) DM et (b) DP.....	98
Figure VI. 15 : Réponses prédites en fonction des réponses observées (a) déminéralisation (b) déprotéinisation.....	101
Figure VI. 16 : Surfaces de réponse (DM) montrant l'interaction entre le temps de fermentation et (a) la concentration en sucres réducteurs (b) le volume du milieu de culture.....	103
Figure VI. 17 : Surfaces de réponse (DP) montrant l'interaction entre (a) la concentration en sucres réducteurs et la température d'incubation, (b) l'interaction entre le traitement thermique et la température d'incubation.....	104
Figure VI. 18 : Profils de désirabilité pour l'optimisation de la déminéralisation (DM) et de la déprotéinisation (DP).....	106

Figure VI. 19 : Diagramme Pareto montrant l'effet standard des variables indépendantes et leurs interactions sur les rendements (a) DM et (b) DP.....	112
Fig. VI. 20 : pourcentage de contribution des différents facteurs sur (a) la déminéralisation et (b) la déprotéinisation.....	116
Figure VI. 21 : Surfaces de réponse (DM) montrant l'interaction entre la concentration en sucres réducteurs, et la température d'incubation (a) et entre le traitement thermique (b) et interaction entre le traitement thermique et la température d'incubation.....	117
Figure VI. 22: Surface de réponse (DP) montrant l'interaction entre la concentration en sucres réducteurs et la température d'incubation.....	118
Figure VI. 23 : Profils de désirabilité pour l'optimisation de la déminéralisation (DM) et de la déprotéinisation (DP).....	120
Figure VI. 24. Les spectres FTIR de (a) la chitine purifiée utilisant les conditions optimales (3répétitions) (b) la chitine commerciale.....	121
Fig. VI. 25. Micrographies obtenues par microscope électronique à balayage (a,b,c) carapace brute aux grossissements, 200, 5000 et 10000, respectivement.....	123
Fig. VI. 26. Micrographies obtenues par microscope électronique à balayage (a) chitine extraite par voie biologique au grossissement 5000 (b) chitine commerciale (fluka).....	124

Tableau I.1 : Relation entre les propriétés biologiques de la chitine et du chitosane et leurs caractéristiques.....	9
Tableau I.2 : Le pourcentage de chitine chez les différents organismes.....	16
Tableau II.1 : Comparaison entre la méthode chimique et la méthode biologique.....	21
Tableau II.2 : Revues bibliographiques sur les méthodes biologiques de récupération de la chitine par fermentation lactique.....	25
Tableau II.3 : Revues bibliographiques sur les méthodes biologiques de récupération de la chitine par fermentation non lactique.....	29
Tableau II.4 : Revues bibliographiques sur les méthodes biologiques de récupération de la chitine par co-fermentation.....	32
Tableau III.1. Les applications de la chitine et du chitosane.....	36
Tableau IV.1 : Matrice d'expériences d'un plan factoriel à 3 facteurs et valeurs des niveaux correspondants aux facteurs.....	47
Tableau IV.2 : Matrice d'expériences et vecteur des effets.....	48
Tableau IV.3 : Analyse de la variance.....	57
Tableau V.1 : Les niveaux des différents facteurs du plan d'expérience utilisant une souche pure <i>Lb. helveticus</i>	70
Tableau V.2 : Les niveaux des différents facteurs du plan d'expérience utilisant <i>Lb. helveticus</i> et <i>Lb. Plantarum</i>	71
Tableau V.3 : La matrice d'expérience pour les deux cultures.....	72
Tableau VI.1. Propriétés physico-chimiques des carapaces de crevettes.....	73
Tableau VI.2 : La composition de jus de dattes.....	74
Tableau VI.3 : Les pics caractéristiques des échantillons chitine pure, carapace brute, carapace fermentée.....	86
Tableau VI.4 : Valeurs des I_{CR} de différents échantillons de chitine.....	88
Tableau VI.5 : La composition chimique de la carapace brute et les carapaces fermentées.....	89
Tableau VI.6 : Les rendements de déminéralisation et déprotéinisation obtenus avec la culture pure <i>Lb. helveticus</i>	90
Tableau VI.7 : La composition chimique des carapaces brute et fermentée et de la chitine commerciale (des crabes).....	91
Tableau VI.8 : Les coefficients de l'équation de régression pour les deux réponses.....	97
Tableau VI.9 : Analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle de la déminéralisation et de déprotéinisation.....	100

Tableau VI.10 : Les valeurs prédites de DM et DP durant l'expérience de validation du modèle obtenu (test de validation).....	105
Tableau VI.11 : Les facteurs optimisés donnant les meilleurs rendements de DM et DP.....	107
Tableau VI. 12. Les rendements de déminéralisation et déprotéinisation obtenu avec la co-culture <i>Lb. helveticus</i> et <i>Lb.plantarum</i>	108
Tableau VI.13 : Equation de régression des coefficients pour les réponses.....	110
Tableau VI.14. Analyse de variance (ANOVA).....	114
Tableau VI.15. Les facteurs optimisés conduisant à la plus haute DM et DP.....	121

Introduction générale

Les polysaccharides forment une vaste classe de polymères naturels, parmi lesquels certains sont très importants dans l'industrie. Ils pourraient être les matériaux de demain qui seront pleinement utilisés quand les ressources en pétrole commenceront à se tarir. Ces polymères sont, en effet, des substances uniques dans le sens où elles sont naturelles, abondantes, issues de ressources renouvelables et exploitables dans de nombreux pays et elles présentent de nombreuses propriétés, à la fois physico-chimiques et biologiques. Ces ressources sont de nature biodégradable puisqu'elles sont d'origine naturelle.

Parmi les polysaccharides d'intérêt pour l'homme, la chitine et son principal dérivé, le chitosane, occupent une place de plus en plus importante, où pratiquement tous les domaines d'applications industrielles, de la pharmacie à l'agroalimentaire, en passant par l'environnement, l'agriculture, le textile, la papeterie et les cosmétiques, sont concernés. Parmi ces domaines, la diététique et le biomédical sont, en plein essor (Crini et al., 2009).

Sa production annuelle par biosynthèse a été estimée à environ 10^{11} tonnes par an (Gooday et al., 1999 ; Nair et al., 2003), ce qui fait de la chitine, l'un des composés naturels les plus abondants sur terre (Kurita, 2006). Elle est le principal constituant de la cuticule d'insectes ainsi que des parois cellulaires des champignons, des levures et des algues vertes (Sato et al., 1998 ; Einbu et Vårum, 2008; Yoshihiro et al., 2008). Les champignons fournissent la plus grande quantité de chitine dans le sol (6-12% de la biomasse en chitine, qui correspond à 500 à 5000 kg/ha) (Shahidi et Abuzaytoun, 2005). La chitine existe, également, dans les carapaces de crabes et de crevettes (Wang et Xing, 2007).

De nos jours, la principale source commerciale de la chitine provient des déchets des industries de transformation des pêches situées en bordure des côtes générant chaque année plusieurs millions de tonnes de carapaces d'invertébrés marins riches en chitine principalement les crustacés tels que les crevettes, les crabes et le krill (Chang et Tsai, 1997 ; Mojarrad et al., 2007 ; Xu et al., 2008), comme à Taiwan (Chang et Tsai, 1997) ou l'Indonésie (Handayani et al., 2008) et seulement 22 616 tonnes en Allemagne (Xu et al., 2008).

Ces résidus chitineux sont considérés comme déchets dangereux à cause de leur grande putréfaction et leur pouvoir pollueur car ces carapaces sont biodégradées lentement (Crini et al., 2009). Dans la mer, les déchets chitineux conduisent à une eutrophisation qui exerce une forte demande biochimique en oxygène (DBO_5). Tandis que sur terre, ces déchets sont rapidement colonisés par les germes pathogènes causant ainsi de grands problèmes pour l'environnement et la santé humaine. Donc, cette valorisation des déchets a été non seulement proposée pour la sauvegarde de l'environnement dans les régions où les crustacés constituent

l'approvisionnement principal de diverses conserveries, mais une alternative de traitement de ces derniers (Wang et al., 2010).

Les principaux producteurs actuels de chitine et de chitosane sont les Etats-Unis, le Canada, l'Inde et le Japon. Le Japon reste le leader tant en termes de production, que de commercialisation et de consommation (Crini et al., 2009). La production mondiale de la chitine est estimée entre 2000 et 3000 tonnes par an, dont 60-70% sert à produire du chitosane (Crini et al., 2009). Le prix de vente du chitosane varie entre 20 et 10 000 euros le kg, en fonction de ses caractéristiques.

A l'état naturel, la chitine provenant des carapaces des crustacés se présente sous forme de complexes protéiques enchevêtrés dans un réseau de sels minéraux, principalement, constitué de carbonate de calcium. Les analyses biochimiques de la matrice protéique montre la présence de protéines acides et des glycoprotéines (Hirotohi et al., 2004). Certains auteurs suggèrent que ces glycoprotéines sont impliquées dans le processus de minéralisation des carapaces (Compère et al., 2002).

Les protéines sont liées à la chitine par différents modes de complexation : forces de vander waals (~2%), liaisons ioniques (~3%), agglomérations stériques (~15%), liaisons hydrogènes (~25%) et liaisons covalentes (~55%).

L'extraction de la chitine passe par deux étapes : la déminéralisation et la déprotéinisation. Cette isolation peut se faire par deux méthodes : chimique et biologique. La méthode chimique, représente la méthode traditionnelle d'extraction de la chitine, elle nécessite l'utilisation des acides (4% HCl) pour la déminéralisation et des bases (4% NaOH) pour la déprotéinisation. Cependant, cette méthode est coûteuse et polluante (Khanafari et al., 2008). Alors que la méthode biologique fait appel à des bactéries lactiques qui ont la capacité de produire l'acide lactique conduisant ainsi à la déminéralisation et d'excréter des enzymes protéolytiques conduisant à la déprotéinisation des carapaces de crustacés. Malgré que cette méthode ne soit pas encore utilisée à l'échelle industrielle, elle offre de nouvelles perspectives pour la production du chitosane de haute viscosité, avec des applications potentielles en biomédecine et en pharmacie (Handayani et al., 2008). L'utilisation d'acides organiques pour la déminéralisation est une idée prometteuse, puisque ces acides peuvent être produits *in-situ* avec un faible coût par les bactéries. En outre, la méthode biologique ne présente aucun danger pour l'environnement et peut préserver les caractéristiques de la chitine.

Il est à noter que la majorité des études réalisées (Rao et al., 2000 ; Shirai et al., 2001), n'ont pas mis en œuvre des méthodes mathématiques, spécialement, les méthodes statistiques pour l'optimisation du processus de fermentation. Traditionnellement, les essais sont effectués

de manière séquentielle en faisant varier les facteurs d'entrée du système étudié, l'un après l'autre, sans planification préalable des essais à réaliser, une telle procédure empirique nécessite un grand nombre d'expériences, et ne tient pas compte des interactions entre les différents facteurs. Il en résulte une connaissance très relative des influences des facteurs et par suite des conclusions peu fiables et non généralisables. Ces limitations peuvent être évitées par l'application de la méthode de surface de réponse qui implique un plan statistique d'expérience dans lequel tous les facteurs varient en même temps. Les plans d'expériences servent à optimiser l'organisation des essais. Cette organisation permet d'obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Ils permettent en effet, de modéliser au mieux un phénomène aléatoire, le plus souvent complexe, à l'aide d'un minimum d'essais.

La méthodologie des surfaces de réponse (MSR) basée sur un ensemble de technique mathématique et statistique conduit à un modèle traduisant l'effet de plusieurs facteurs qui influencent la réponse en les faisant varier simultanément avec un minimum d'expériences (Popov et al., 2010) et même en présence des interactions complexes (Khayet et al., 2011). Cette méthode est, également appliquée pour comprendre l'interaction entre les différentes variables et pour déterminer les conditions optimales de la meilleure réponse (De Lima et al., 2010).

L'efficacité de la modélisation de l'extraction de la chitine utilisant la méthode de surface de réponse (MSR) a été récemment démontrée (Bhaskar et al., 2007; Pacheco et al., 2009).

L'objectif, de ce présent travail, vise à optimiser les conditions d'extraction de la chitine. Pour cela différents paramètres sont analysés :

a) Les paramètres physico-chimiques pouvant influencer la croissance des bactéries lactiques à savoir :

- La composition du milieu de culture en faisant varier la concentration des composants suivants : la source de carbone, la source d'azote, la source de calcium ainsi que le volume de tween 80 ;

- La température d'incubation.

b) Les paramètres pouvant influencer le bioprocédé

- Le volume du milieu de culture (jus de dattes) ;

- Le volume de l'inoculum (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus helveticus*/ *Lactobacillus plantarum*) ;

- La quantité de la poudre de carapace traitée ;

Cette étude était réalisée en trois principales étapes.

Dans la première, étape on a procédé par :

- Un plan « un facteur à la fois ». Au cours de cette étape, on a jugé nécessaire d'identifier quels sont les facteurs pouvant influencer l'extraction de la chitine des carapaces de crevettes avec les trois facteurs choisis, à savoir la concentration et la nature de la source de carbone et la température d'incubation, on s'est intéressé à la détermination de leurs valeurs limites, qui peuvent être optimales pour les rendements voulus.

Dans la seconde étape, on a procédé par :

- Un plan composé central pour l'optimisation de la composition du milieu de fermentation de *Lactobacillus helveticus*. On s'est intéressé à la détermination des facteurs pouvant influencer la déminéralisation et la déprotéinisation, avec établissement d'un modèle mathématique qui permettra de déterminer les conditions optimales des deux réponses.

Dans la troisième étape, la méthode de surface de réponse est réalisée pour l'extraction de la chitine en utilisant deux bactéries lactiques *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus plantarum*. Lors de ces expériences, on a étudié l'influence d'autres facteurs sur l'efficacité de ce bioprocédé.

Cette thèse s'organise en deux parties :

A) Une partie théorique qui regroupe des généralités sur la chitine, sa définition, ses caractéristiques et propriétés (chapitre I), les méthodes d'extraction (chapitre II), ainsi que les applications de la chitine et ses dérivés (chapitre III). Enfin, une synthèse bibliographique sur la modélisation par les plans d'expériences (chapitre IV).

B) Une partie expérimentale qui comporte deux chapitres : le premier (chapitre V) dans lequel nous avons présenté le matériel utilisé, les conditions expérimentales de notre étude ainsi que les différentes méthodes d'analyse. Dans le second (chapitre VI), nous avons présenté, interprété et discuté les résultats obtenus au cours de notre travail.

La thèse est finalisée par une conclusion générale suivie de quelques perspectives à envisager pour la poursuite de cette recherche.

Chapitre I
Définition, caractéristiques
et propriétés de la chitine et ses
dérivés

I. 1. Historique

Isolée à partir des champignons, en 1811 par Pr. Henry Braconnot (1780- 1855), la chitine était le premier polysaccharide azoté identifié par l'homme, il précède la cellulose d'environ 30 ans. Il appela cette substance «fungine». En 1823, Odier a extrait un composé similaire, à partir de la cuticule de coléoptère (insecte) en utilisant la potasse à chaud. Il a obtenu un produit insoluble dans les solutions aqueuses qu'il nomma « chitine » (mot grec qui signifie tunique ou enveloppe). Odier fut intrigué par le fait que les insectes et les champignons possédaient le même composant structural (Crini et al., 2009). En 1859, Pr. Rouget a remarqué que le produit obtenu en traitant la chitine avec de la soude à chaud est soluble dans des solutions acides aqueuses. Le terme « chitosane » a été donné à la chitine désacétylée pour la première fois en 1894 par Hoppe-Seiler. Bien que la chitine et le chitosane soient connus depuis le 18^{ème} siècle, la chitine est restée comme une ressource naturelle inutilisable pendant une longue période (Brück et al., 2011).

La production de chitine a débuté en 1920, mais la structure de ces biopolymères n'a été identifiée que 50 ans plus tard à travers la cristallographie et la spectroscopie Infra Rouge. L'intérêt pour ce biopolymère et ses dérivés comme le chitosane et les chitooligosaccharides a augmenté ces dernières années à cause de leurs propriétés biologiques et physico-chimiques (Vårum et al., 1991 ; Kurita, 2006). Les recherches ont réellement commencé à partir des années 1930. Cependant, celles-ci ont véritablement démarré après la seconde guerre mondiale (dés 1950) pour s'amplifier à partir des années 1970. Ainsi, la chitine et le chitosane ont commencé à susciter un réel intérêt en raison notamment des grandes quantités de déchets que produisaient les conserveries de crustacés (Crini et al., 2009).

I. 2. Caractéristiques et propriétés de la chitine

I.2.1. Définition structurale de la chitine

La chitine est un des plus abondants biopolymères dans la nature (Einbu et Vårum, 2008), c'est le constituant majeur des exosquelettes d'arthropodes (tels que les crustacés et les insectes) et des parois cellulaires de certains champignons (tels que les basidiomycètes) (Al Sagheer et al., 2009).

C'est un polysaccharide linéaire composé d'unités α -(1-4)-2 -acétamido- 2-désoxy-D-glucose qui peuvent être désacétylées (Sorlier et al., 2010). C'est un polysaccharide de structure similaire à la cellulose (Fig. I. 1).

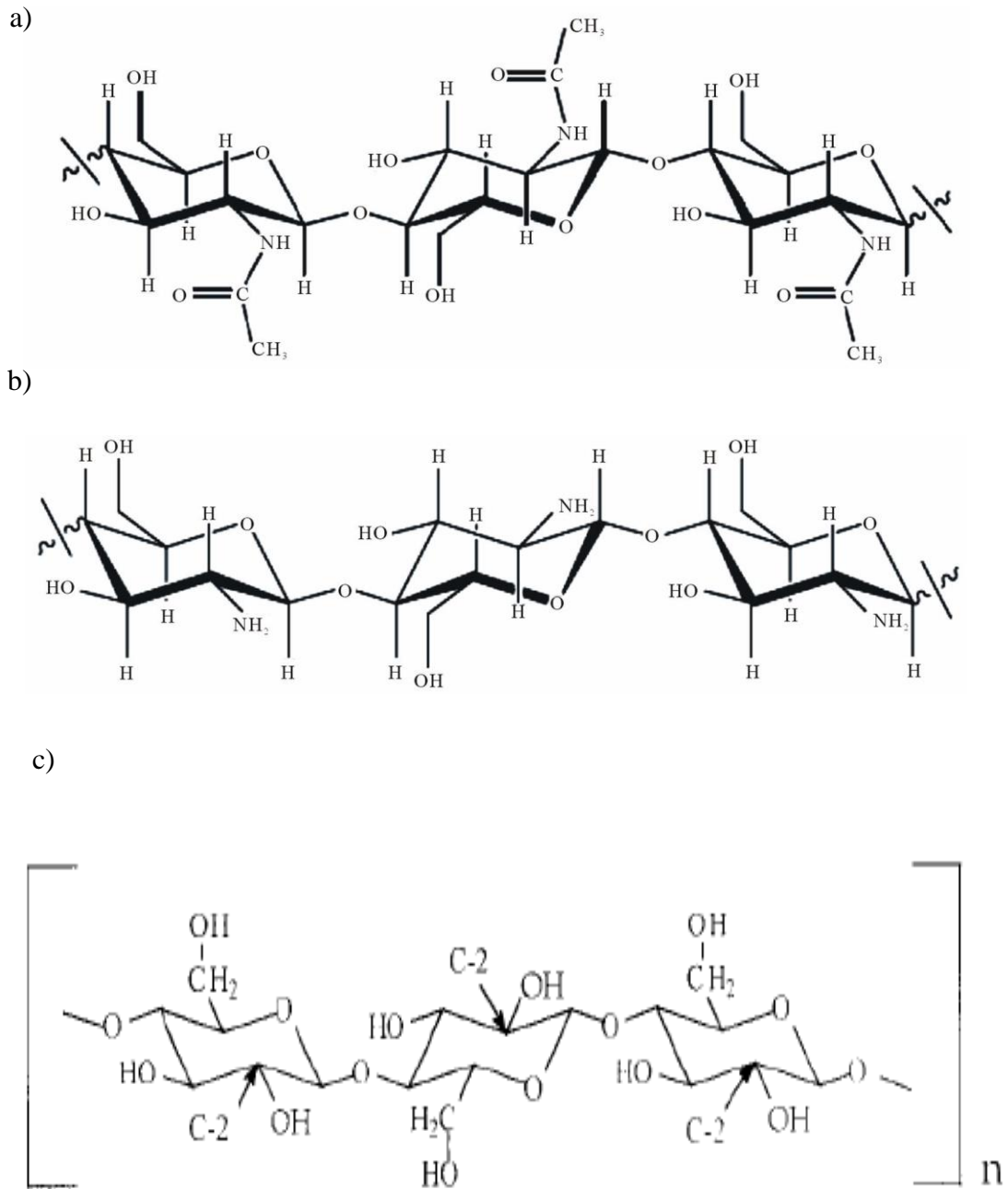


Figure I. 1. Structures de a) chitine, b) chitosane et c) cellulose (Andrade et al., 2012)

La chitine est une molécule hélicoïdale de structure micro-fibrillaire encastrée dans la matrice protéique de la carapace (No et al., 2011). Elle est fermement liée aux protéines, minéraux, lipides et pigments (Suzuki et al., 2000).

La carapace des crustacés décapodes est une nano-composite biologique multiphase, constituée d'une matrice organique (chitine et protéines) et de biominéraux (calcite et phosphate). La chitine est associée à des composés protidiques variés qui lui donnent une consistance rigide, molle ou élastique (Grassé, 1979). Traditionnellement, la chitine est liée aux protéines de la cuticule par des liaisons hydrogène à travers des résidus histidine pour former des complexes glycoprotéiques complexes (Muzzarelli, 2011). Elle est, également, liée au catéchol-amine et histidine/aspartique par des liaisons covalentes (Gupta et al., 2011).

Comme présenté dans la figure I. 2a, les plus petites sous unités de la structure de la cuticule de *Homarus americanus* (homard) sont les macromolécules de la chitine. L'alignement antiparallèle de ces molécules donne naissance à α chitine. L'arrangement de 18 à 25 chaînes de chitine forme de longues unités cristallines entourées par une gaine protéique protectrice (6 hélices) (Kramer et al., 1985), et produit une nano-fibrille de 2-5 nm de diamètre et de 300 nm de longueur. Les nano-fibrilles se regroupent pour former de longues fibres de chitine-protéine de 50-350 nm de diamètre (Raabe et al., 2006). Ces fibres chitinoprotéiques, toujours disposées horizontalement, mais qui seraient regroupés en faisceaux parallèles entre eux et tourneraient régulièrement d'un niveau au suivant (rotation de 180°), pour former des plans horizontaux empilés d'une manière hélicoïdale en créant une structure « en contreplaqué torsadé » (Bouligand, 1988) (Fig. I. 2a). Les fibres de chitine sont disposées autour des cavités du système pore tubulaire (Fig. I. 2b) résultant en une structure de type "nid d'abeilles" (Raabe et al., 2006 ; Fabritius et al., 2011).

Le complexe chitine-protéine forme un tube dont la partie axiale claire, correspondrait à la chitine et la périphérie dense aux protéines. Ces sous unités s'alignent dans la cuticule en ménageant certains espaces accessibles à la minéralisation (Giraud-Guille et al., 2004 ; Raabe et al., 2006).

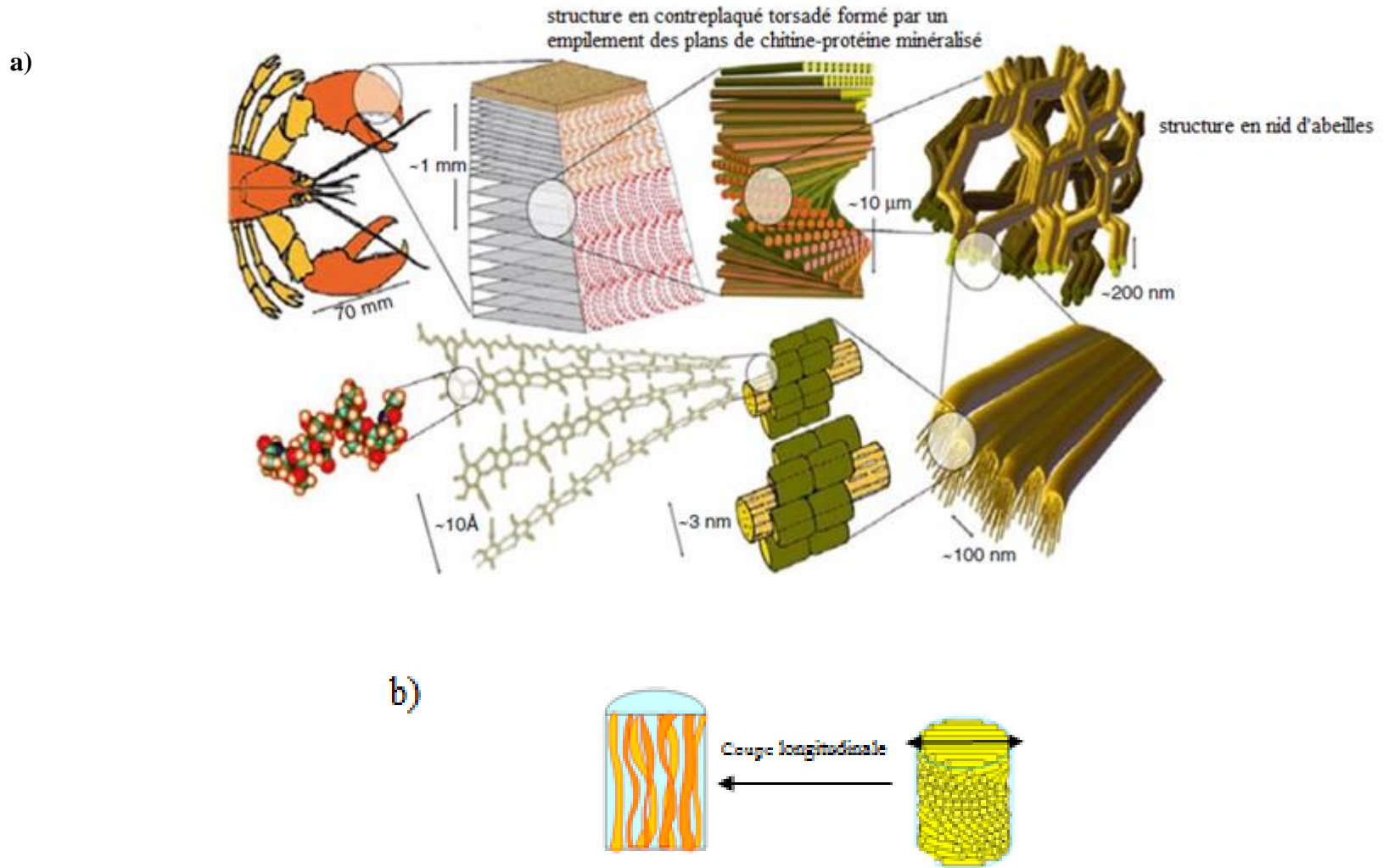


Figure I. 2. Présentation de l'encastrement des fibrilles de chitine dans la matrice protéique (homard : *Homarus americanus*) (Muzzarelli, 2011)

Les structures caractéristiques des fibres de chitine-protéine ne sont pas encore entièrement élucidées et la nature de l'interface entre les composants organiques et inorganiques dans les cuticules minéralisée est encore inconnue. En outre, la répartition de la phase inorganique et son impact sur les fonctions spécifiques doit être clarifiée (Fabritus et al., 2001).

I. 2. 2. Caractéristiques

Plusieurs études ont, clairement, montré que les caractéristiques physico-chimiques spécifiques de la chitine et son dérivé (chitosane), sont principalement, le poids moléculaire et le degré d'acétylation ($DA = 100 - DD$) de la chitine et le degré de désacétylation (DD) du chitosane qui varient en fonction des conditions d'extraction (Crini et al., 2009). Ces caractéristiques physico-chimiques de la chitine et son dérivé (chitosane) influencent leurs propriétés fonctionnelles telles que la solubilité, la réactivité chimique et les activités biologiques (Tolaimate et al., 2000) à savoir la biodégradabilité (Sato et al., 1998 ; Zhang et al., 2005), qui diffère en fonction de la source de la chitine et sa méthode de préparation (Crini et coll., 2009) (Tableau 1).

Tableau I. 1: Relation entre les propriétés biologiques de la chitine et de son dérivé (chitosane) et leurs caractéristiques (Aranaz et al., 2009)

Propriétés	Caractéristiques
Biodégradabilité	DD, distribution des groupements acétyle, PM
Biocompatibilité	DD
Mucoadhésion	DD, PM
Hémostatique	DD, PM
Analgésique	DD
Augmentation de l'adsorption	DD (chitosane seulement)
Antimicrobien	PM
Anti- cholestérolémique	DD, PM, Viscosité
Antioxydant	DD, PM

Des études récentes sur la chitine et son dérivé (chitosane) ont, également, révélé une remarquable variation dans l'activité antibactérienne (No et al., 2003), la biodégradabilité et les activités immunitaires (Suzuki et al., 2000 ; Tolaimate et al., 2009), ainsi que dans les capacités de fixation des colorants, de l'humidité et des lipides sur différentes chitines, chitosanes et de leurs dérivés préparés au laboratoire à partir des déchets de carapace de crustacés (Cho et No, 1998).

Kofuji et ses collaborateurs (2005), ont constaté que le dérivé de la chitine (chitosane) avec une faible DD a tendance à se dégrader plus rapidement. Toutefois, d'autres auteurs ont

rapporté que les différences de dégradation sont dues à des variations dans la distribution des groupements acétamide dans la molécule du chitosane (Aiba et al., 1992 ; Shigemasa et al., 1994). Ceci est dû à des différences dans les conditions de désacétylation qui influence la viscosité de la solution du chitosane en modifiant les forces de répulsion inter- ou intramoléculaires (Sashiwa et al., 1991). Par conséquent, on peut conclure qu'il est impossible d'estimer le taux de biodégradation à partir du DD seul. La cinétique de dégradation semble être inversement liée au degré de cristallinité qui est, principalement, contrôlé par le degré de désacétylation. En outre, la distribution des groupements acétyl affecte, également, la biodégradabilité car l'absence des groupements acétyl, ou leur répartition homogène conduit à résultats de faibles taux de dégradation enzymatique (Aiba et al., 1992 ; Francis et al., 2000). Enfin, plusieurs études ont rapporté que la longueur des chaînes (PM) affecte, également, la vitesse de dégradation (Huang et al., 2004; Tomihata et al., 1997; Zhang et al., 2001). Plus la longueur est importante, plus la dégradation est faible.

I.2. 2. 1. Le degré de désacétylation (DD)

Il est défini comme la fraction molaire des unités désacétylées dans la chaîne polymorphe (Sorlier et al., 2001), c'est un des facteurs les plus importants pouvant influencer les propriétés de la chitine et du chitosane (No et al., 2003; Hobel, 2004 ; Zhang et al., 2005), tels que :

- 1) La solubilité du biopolymère ;
- 2) La flexibilité des chaînes macromoléculaires ;
- 3) La conformation du biopolymère ;
- 4) La viscosité des solutions.

Le degré d'acétylation (DA), exprimé généralement en pourcentage, peut être utilisé pour différencier la chitine du chitosane. Il est appelé chitine quand le DA est supérieur à 50% et l'échantillon n'est pas soluble dans les solutions acides aqueuses; autrement, il est appelé chitosane (Kasaai, 2009). Un grand nombre de méthodes a été rapporté pour déterminer le DD de la chitine (Sato et al., 1998).

Le DD peut être déterminé par analyse élémentaire (analyse du pourcentage d'azote) (Einbu et Vårum, 2008), par titrage potentiométrique (Novikov, 2004 ; Kadouche, 2013), par spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (Shigemasa et al., 1996) et spectroscopie UV (Brugnerotto et al., 2001), ou encore par résonance magnétique nucléaire liquide ou solide (Gupta et al., 2011). La technique infrarouge est la plus adaptée pour une caractérisation rapide et simple de la chitine et du chitosane (Crini et al., 2009).

I.2.2.2. Le poids moléculaire (PM)

Le poids moléculaire nous renseigne sur la viscosité et le taux de dégradation des biopolymères. Il peut être déterminé par des mesures viscosimétriques (Einbu et al., 2004) ou par chromatographie par perméation de gel (chromatographie d'exclusion stérique) couplée à des techniques de détection comme la mesure du plan de polarisation de la lumière ou de la diffraction de la lumière (Khor., 2001).

I.2.3. Propriétés

I.2.3.1. Cristallinité

La chitine rencontrée dans le milieu naturel se diffère, non seulement, par leur poids moléculaire (PM) et leur degré de désacétylation (DD) mais également par leur état cristallin (Crini et al., 2009). La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles (Kurita, 2006). Elle est, en général, déterminée par des mesures de diffraction aux rayons X (Waldemar, 2001).

Les chaînes du polymère peuvent être agencées de différentes manières, selon l'origine du matériau (Rinaudo, 2006). A l'état solide, les chaînes de la chitine se présentent sous forme d'hélice avec une unité de répétition d'environ 1,03 nm, et chaque unité est constituée de 2 résidus. En conséquence des divers arrangements des macromolécules, trois formes différentes ont été mises en évidence : α -, β -, et γ -chitines (Zhang et al., 2005 ; Dahiya et al., 2006) (Fig. I. 3).

L' α -chitine, présente un agencement antiparallèle des chaînes, c'est la forme de la chitine la plus abondante dans la nature (les crevettes et les crabes).

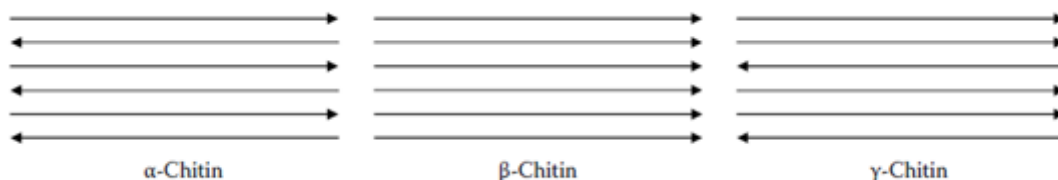


Figure I. 3. Structure moléculaire et représentation conventionnelle des trois formes de la chitine (Aranaz et al., 2009)

La β -chitine présente des chaînes parallèles, elle est rencontrée dans les plumes de calamar (Yasutomo et al., 2003 ; Rinaudo, 2006 ; Xu et al., 2008), et l'endosquelette de la seiche. Tandis que la γ -chitine présente le mélange de α - et β -chitines (Dahiya et al., 2006), elle est rencontrée dans les cuticules de brachiopodes et les cocons des insectes (Hobel, 2004). Les liaisons hydrogène inter- et intra-moléculaires jouent un rôle clé dans les propriétés physiques de la chitine (Kurita, 2006 ; Liu et al., 2009) à savoir la solubilité (Kurita, 2006 ; Rinaudo, 2006), l'élasticité (rigidité structurale), ou sa remarquable résistance (Fabritus et al., 2011).

Les chaînes de chitine sont organisées dans des feuillets où elles sont fermement liées par un certain nombre de liaisons hydrogène intra-moléculaire (O3-H...O5). Ce réseau serré, dominé par des liaisons hydrogène C-O ... NH (C7=O7...H-N), qui maintiennent les chaînes à une distance d'environ 0.469 nm le long de l'axe a (distance interchaînes) de l'unité cellulaire dont l'unité est constituée de deux chaînes de polymère dans une orientation anti-parallèle, portant une seule unité pyranose (Mogilevskaya et al., 2006 ; Muzzarelli, 2011), à une distance de 1.043 nm le long de l'axe c (Mogilevskaya et al., 2006).

Il est important de noter que dans α -chitine il existe également un certain nombre de liaisons intermoléculaires le long de l'axe $b=1.913$ nm de la cellule unitaire, impliquant les groupements hydroxyméthyle (CH₂OH) de la chaîne adjacente (Fig. I. 4). Cette particularité n'est pas retrouvée dans la structure de β -chitine (Rinaudo 2006).

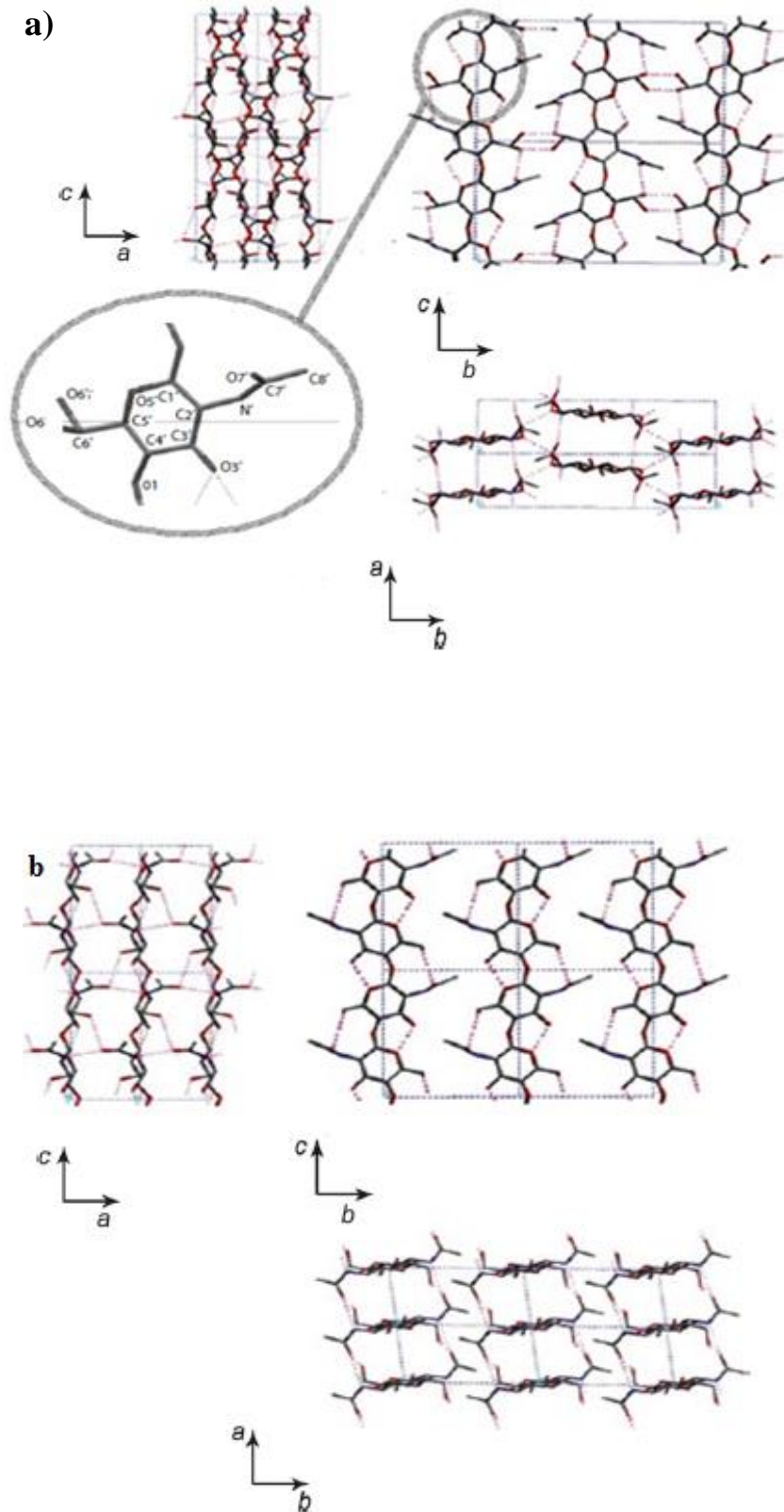


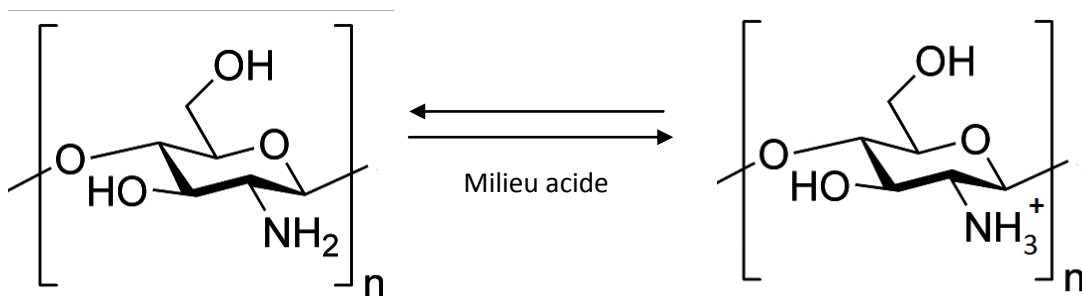
Figure I. 4. Structure de (a) α - chitine et (b) β - chitine (Rinaudo, 2006)

I.2.3.2. Solubilité

La chitine est une substance inerte, comme la cellulose, insoluble dans l'eau et également dans la plupart des solvants aqueux dilués et les solvants organiques, les acides concentrés la dégradent. Par chauffage, la chitine se décompose vers 250°C sans fondre. En revanche, sa désacétylation partielle en milieu basique permet d'obtenir le chitosane qui, lui, est soluble en milieu aqueux acide grâce à la protonation de ses fonctions amine (Crini et al., 2009).

I.2.3.3. Electrolytes

En milieu acide, le chitosane est l'un des rares poly-électrolytes naturels cationiques, capable de former des complexes électrostatiques dans un milieu acide (Rinaudo, 2006). C'est l'unique polysaccharide qui a un caractère cationique (Kasaai, 2010) dont l'état d'ionisation est décrit par l'équilibre suivant :



Le chitosane est une base faible de pKa voisin de 6.3- 6.7 (valeurs moyennes des échantillons commerciaux). Lorsque le pH de la solution devient inférieur au pKa, le chitosane devient cationique et par conséquent soluble (Crini et al., 2009).

I.2.3.4. Biologiques

De part sa structure chimique, le chitosane constitue un substitut des milieux biologiques. En effet, la liaison glycosidique et les résidus N-acétyl-glucosamine que l'on retrouve dans les macromolécules du chitosane sont également présents dans la structure de la matrice extracellulaire de la plupart des tissus vivants, alors que le résidu glucosamine y est absent (Crini et al., 2009).

I.2.3.5. Autres propriétés physiques et chimiques

Le chitosane est un matériau très stable en phase solide (par exemple, chez la sèche) et il a une conservation quasi infinie. En solution, il est relativement fragile et dégradable. Le chitosane montre, de plus, des propriétés d'adhésion à des surfaces chargées négativement.

Comme la plupart des polysaccharides, le chitosane, en raison de la liaison glycosidique β -(1-4), est un polymère semi-rigide et, à ce titre, est un bon agent épaississant c'est-à-dire qu'il augmente fortement la viscosité de la solution. En plus de ces interactions, la nature des liaisons glycosidique confère également à la chitine et au chitosane d'excellentes propriétés filmogènes (Crini et al., 2009).

II. Les sources de la chitine

La chitine est produite par les insectes (blattes, coléoptères, fourmis), les arachnides (scorpions, araignées), les animaux marins (crabes, crevettes, homards, langoustines, calamars) et les champignons (basidiomycètes...) (Di Mario et al., 2007). Dans le règne animal, la chitine est un élément de soutien des téguments de certains invertébrés (insectes, crustacés, mollusques et nématodes). On la retrouve, en particulier, dans la composition de leur cuticule, et à un degré moindre au niveau de la paroi intestinale, du tube digestif, des trachées, des tendons musculaires et du squelette interne (Nwe et al., 2011). Cette cuticule contient, également, des protéines, des lipides et du carbonate de calcium. En réalité, les structures chitineuses ne sont jamais constituées de chitine seule ; elle est généralement complexée à des protéines sous la forme de glycoprotéines, ce qui confère des propriétés de rigidité (ou de souplesse) aux cuticules. La chitine est, également, un constituant majeur des endosquelettes de céphalopodes comme les sèches et les calamars et des parois de certaines levures. Le tableau I. 2 donne les principales sources de chitine.

Tableau I. 2. Le pourcentage de chitine chez les différents organismes (Hobel, 2004; Kurita, 2006 ; Crini et al., 2009; Jo et al., 2011)

Organismes	% de chitine	Organismes	% de chitine
<u>Crustacés :</u>		<u>Insectes :</u>	
<i>Euphausia</i> sp. And	20- 30	<i>Periplaneta</i> (cafard)	2,0 ^b
<i>Meganyctiphanes</i> sp. (krill)		<i>Blatella</i> (cafard)	18,4 ^a
<i>Chionoecetes</i> sp., <i>Cancer</i> sp., <i>Carcinus</i> sp. (crabe)	15- 30	<i>Cleoptera</i> (coccinelle)	27- 35 ^a
<i>Carcinus</i> (crabe)		<i>Diptera</i>	54,8 ^a
<i>Paralithodes</i> sp. (crabe royale)	35	<i>Pieris</i> (papillon)	64,0 ^a
<i>Callinectes</i> sp. (crabe bleu)	14	<i>Bombyx</i> (ver à soie)	44,2 ^a
<i>Crangon</i> and <i>Pandalus</i> sp. (crevettes)	17- 40	<i>Calleria</i> (ver de cire)	33,7 ^a
<i>Penaeus</i> sp. (crevette)	40	<u>Mollusques :</u>	6,1
Crevettes d' Alaska	69,8 ^a	Pallourde	3,6
<i>Nephros</i> sp. And <i>Homarus</i> sp. (homard)	60- 75	Coquilles des huitres	41,0
<i>Lepas</i> sp.	59	Plumes de calamar	40,2
		Krill, carapace déprotéinisée	
		<u>Champignons</u>	
		<i>Aspergillus niger</i>	42,0 ^c
		<i>Penicillium notatum</i>	18,5 ^c
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	20,1 ^c
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,9 ^c
		<i>Mucor rouxii</i>	44,5
		<i>Lactarius vellereus</i>	19,0

a: basé sur la masse organique de la carapace; b: compare à la masse totale du cuticule; c: relative au poids sec de la paroi cellulaire.

Chez les insectes, la chitine constitue environ 1,5% de la masse fraîche de l'animal, ce qui explique que son exploitation commerciale ne soit pas envisagée (Kiefer, 1999). Chez les micro-organismes, le pourcentage de chitine peut atteindre plus de 20% de la masse fraîche de la cellule (Wu et al., 2004). Toutefois, l'extraction à partir de micro-organismes n'a, jusqu'ici, été effectuée qu'à titre expérimental. Le meilleur rendement d'extraction de la chitine est, actuellement, observé chez les crustacés qui en constituent donc la principale source au niveau industriel.

Chapitre I Définitions, caractéristiques et propriétés de la chitine et du chitosane

Environ 70% des pêches de capture marines sont utilisées pour la transformation et une quantité considérable de la capture traitée est éliminée sous forme de déchets. Les rejets dépassent 20 millions de tonnes par an, ce qui est l'équivalent de 25% de la production annuelle (Jo et al., 2011). Chez la crevette, seulement 35% de la masse de l'animal est consommé tandis que cette proportion est d'environ 45% pour les crabes et les homards. Les déchets de crustacés sont constitués, principalement, de 30- 40% de protéines, 30- 50% de carbonate de calcium et de 20- 30% de chitine (Hobel, 2004; Kurita, 2006 ; Crini et al., 2009; Jo et al., 2011) (Tableau I. 2) avec d'autres composants tels que les lipides, les pigments (caroténoïdes et astaxanthine) et d'autres sels minéraux qui peuvent également être valorisés. La proportion de chitine dans les déchets de crustacés justifie donc son utilisation commerciale comme matière première pour obtenir la chitine et le chitosane.

Chapitre II

Les méthodes d'extraction

II. 1. Introduction

La chitine présente d'intéressantes caractéristiques, elles sont qui influencées par le choix des méthodes d'extraction.

II. 2. La méthode chimique

La méthode, la plus courante, pour la préparation commerciale de la chitine à partir des carapaces de crustacés consiste en trois principales étapes (Fig. II. 1) :

- 1- Isolation des protéines : déprotéinisation par un traitement alcalin ;
- 2- Isolation des carbonates de calcium (et phosphates de calcium) : déminéralisation en milieu acide;
- 3- Suivi par une décoloration avec des substances chimiques (exemple : l'acétone) pour obtenir un produit incolore (No et al., 1998 ; Bautista et al., 2001 ; Choorit et al., 2008) ou le mélange chloroforme/méthanol/eau (Kjartansson et al., 2006).

La déminéralisation est, généralement, réalisée avec des acides tels que HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH et HCOOH. Cependant, HCl est le plus utilisé (No et al., 1998 ; Percot et al., 2003).

La déprotéinisation est, habituellement, réalisée avec des bases telles que NaOH, KOH...etc (Percot et al., 2003). Il a été montré que l'ordre des deux étapes peut être inversé (Kjartansson et al., 2006).

La préoccupation majeure dans la production de la chitine est la qualité du produit final, qui est fonction du poids moléculaire et le degré d'acétylation (DA). Percot et ses collaborateurs (2003) ont rapporté que l'utilisation des acides tels que HCl pour la déminéralisation de la chitine, entraîne des effets néfastes sur le poids moléculaire et le degré d'acétylation qui affectent négativement sur les propriétés intrinsèques de la chitine purifiée (Tableau II. 1). De même, selon Crini et ses collaborateurs (2009), la méthode permet l'enlèvement presque complet des sels minéraux, mais en même temps, des réactions de désacétylation et de dépolymérisation peuvent se produire (Tableau II. 1). En comparant les différentes chitines, des variations dans les caractéristiques du polymère obtenu (DA, poids moléculaire, activité optique) ont été observé en fonction de l'acide utilisé pour la déminéralisation (Crini et al., 2009).

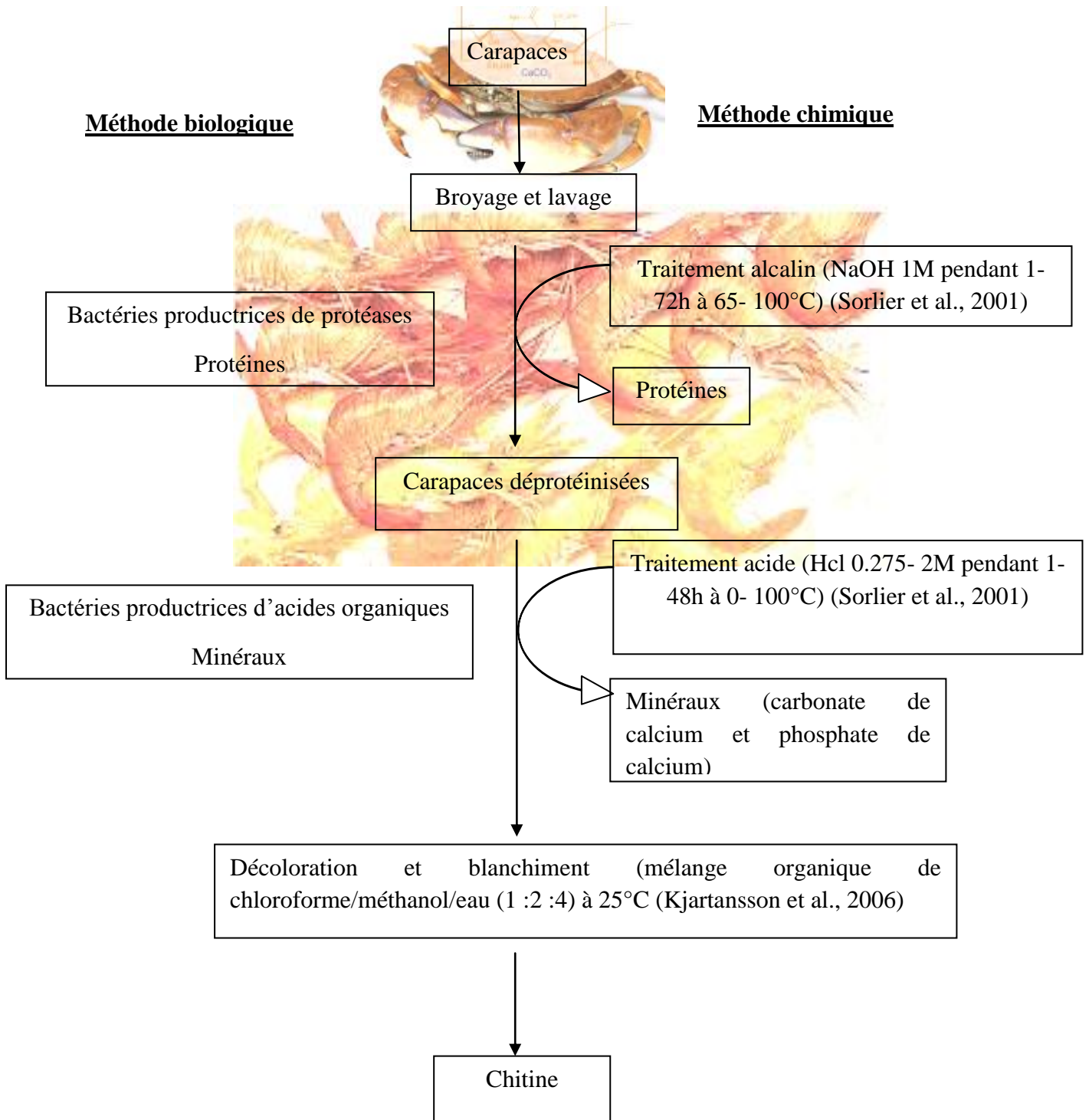


Figure II. 1. Les différentes étapes d'extraction de la chitine

En outre, la purification chimique de la chitine est consommatrice d'énergie et néfaste pour l'environnement à cause de grandes quantités d'acides et de bases utilisées (Healy et al., 2001). La méthode chimique, génère des quantités élevées des effluents (acides et basiques) et dont un traitement est nécessaire (Wang et Chio, 1998).

II. 3. La méthode biologique

Une méthode alternative pour résoudre les problèmes d'extraction chimique de la chitine consiste en utilisation de la méthode biologique (Tableau II.1). L'utilisation des protéases pour la déprotéinisation permettait d'éviter un traitement alcalin. En plus, de l'utilisation des exoenzymes, les bactéries protéolytiques ont été utilisées pour la déprotéinisation des carapaces déminéralisées (Jung et al., 2007) sans provoquer l'hydrolyse ou la désacétylation de la chitine. Cette approche biotechnologique, conduit à la formation d'une fraction liquide riche en protéines, en sels minéraux et en pigments et une fraction solide riche en chitine. La fraction liquide peut être utilisée comme supplément protéines-minéraux pour la consommation humaine ou pour l'alimentation des animaux (Rao et al., 2000).

Tableau II. 1. Comparaison entre la méthode chimique et la méthode biologique

		La méthode chimique	La méthode biologique
Récupération de la Chitine		Deux étapes différentes	<i>in situ</i>
	Déminéralisation	Solubilisation des minéraux par un traitement acide utilisant: HCl, HNO ₃ , H ₂ SO ₄ , CH ₃ COOH et HCOOH	Réalisée par une bactérie productrice d'acide lactique suite à la conversion d'une source de carbone.
	Déprotéinisation	Solubilisation des protéines par un traitement alcalin (NaOH, KOH)	Réalisée par des protéases secrétées dans le milieu de fermentation En plus, la déprotéinisation peut se faire par l'ajout des exo-protéases et/ou de bactérie protéolytique
		Augmentation du prix de revient de la chitine à cause du traitement des effluents acides et alcalins (les eaux de lavage) et récupération des minéraux et protéines.	Le coût d'extraction de la chitine par la méthode biologique peut être réduit en utilisant des sources de carbone bon marché. Les protéines et les minéraux solubilisés peuvent être utilisés pour l'alimentation humaine et animale.
Qualité de la chitine	Poids moléculaire (PM) et le degré d'acétylation (DA) désirés.	Une large gamme de produit final, car l'utilisation de l'acide chlorhydrique à différentes concentration et à de forte température conduit à la production de chitines de différents DD et différents PM (Khor et al., 2001).	Produit final présente une bonne homogénéité et une très bonne qualité.

Les études de déprotéinisation biologiques réalisées, ont été portées principalement, sur l'extraction de la chitine à partir des crevettes utilisant des méthodes mécaniques (Jung et al., 2007), des méthodes enzymatiques (Synowiecki et Al Khateeb, 2000 ; Valdez-Peña et al., 2010) et des méthodes microbiologiques impliquant différentes espèces à savoir *Lactobacillus plantarum* (Rao et al., 2000), *Pseudomonas aeruginosa* K-187 (Oh et al., 2000) et *Bacillus subtilis* (Yang et al., 2000). La déminéralisation biologique a été, également, étudiée pour l'extraction de la chitine à partir des carapaces de crustacés par l'utilisation des enzymes telles que l'alcalase (Synowiecki et Al Khateeb, 2000) ou par procédé microbiologique utilisant des espèces telles que *Lactobacillus pentosus* 4023 (Bautista et al., 2001) ou les probiotiques naturelles (lait caillé) (Kandra et al., 2010). Dans ces procédés biologiques, la biodéminéralisation et la biodéprotéinisation peuvent se réaliser simultanément mais de façon incomplète (Jung et al., 2007). Un résumé de différentes études microbiologiques citées dans la littérature est donné dans le tableau II. 2.

Depuis de nombreuses années, la fermentation a été utilisée pour la conservation des poissons, elle représente une technologie simple (artisanale) et accessible (bon marché et non consommatrice d'énergie) (Fagbenro, 1996). Aujourd'hui, elle est utilisée pour l'extraction de la chitine. Elle consiste en ensilage des carapaces de crustacés *in-situ* par la production d'acide lactique à faible coût à partir des sous-produits tels que : le lactosérum, la lignocellulose et l'amidon. La production d'acide lactique par les bactéries lactiques induit la liquéfaction des déchets semi-solides et conduit à un abaissement du pH et à l'augmentation de l'activité des protéases (Shirai et al., 2001). Cette méthode pourrait offrir une voie commerciale pour la récupération de la chitine (Bautista et al., 2001).

II.3. 1. Fermentation lactique

Les procédés biologiques pour la production de chitine réalisés actuellement, utilisent des bactéries productrices des acides organiques et des enzymes pour la déminéralisation et la déprotéinisation des carapaces de crustacés, respectivement. Différentes sources de chitine et différents substrats ont été testés.

La déminéralisation biologique des carapaces de crevette fait intervenir l'acide lactique produit, par hydrolyse de la source de carbone présente dans le milieu de fermentation par la bactérie lactique. Cette acidification a pour effet d'éviter les contaminations et de déminéraliser les carapaces par solubilisation des minéraux. La réaction de l'acide lactique avec le carbonate de calcium conduit à la formation du lactate de calcium qui peut être éliminé par un simple lavage (Rao et al., 2000). La déprotéinisation de ces déchets

biologiques et la liquéfaction simultanée des protéines des crevettes se font, essentiellement, par des enzymes protéolytiques produites par le lactobacille additionné, les bactéries présentes dans le système digestif des crevettes ou par les protéases présentes dans les déchets (Rao et al., 2000). Il en résulte une fraction riche en peptides solubles et en acides aminés libres (Fagbenro, 1996).

La fermentation lactique des déchets de la crevette *Penaeus monodon* a été étudiée en utilisant différentes sources de carbone comme le lactose et l'extrait de manioc (Jung et al., 2005a). Les têtes de la crevette de rivière africaine *Macrobrachium vollehovienii* ont été fermentées avec *Lactobacillus plantarum* utilisant la mélasse de canne comme source de carbone (Fagbenro, 1996). La déminéralisation des déchets de crevettes (Shirai et al., 2001), d'écrevisses (Bautista et al., 2001) et des déchets de langoustine (Zakaria et al., 1998) a aussi été étudiée.

La fermentation lactique combinée au traitement chimique a été étudiée comme une méthode alternative à l'extraction chimique de la chitine, dans le but de réduire les quantités d'acide et de base utilisées (Luis et al., 2002). Ces auteurs considèrent la fermentation lactique comme un prétraitement des déchets de crevettes, suivi par une déminéralisation et une déprotéinisation utilisant de faibles concentrations en HCl (0.5 M) et en NaOH (0.4 M).

La production de la chitine à partir des carapaces de la crevette rose *Nephrops norvegicus* par fermentation a été étudiée par Healy et ses collaborateurs (1994). Dans cette étude, des carapaces, préalablement déminéralisées, ont été incubées pour la déprotéinisation, avec un inoculum bactérien commercial (Stabisil) en présence du lactose (Nutrimink) comme source de carbone en aérobiose et en anaérobiose pendant 7 jours (Tableau II. 2). Stabisil est utilisé, principalement pour l'ensilage des déchets de poissons et se compose de cultures bactériennes actives (*Streptococcus faecium* M74, *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici*). En général, un abaissement du taux des protéines d'environ 40% est atteint, indépendamment des conditions considérées (aérobiose ou anaérobiose).

La fermentation anaérobique des carapaces de la crevette rose *Nephrops norvegicus* utilisant des bactéries lactiques en combinaison avec un inoculum spécial Sil-A1 4x 4TM (Tableau II. 2), contenant un mélange de bactéries protéolytiques sélectionnées (*L. plantarum*, *L. salivarius*, *S. faecium* et *P. acidilactici*) a été réalisée comme une méthode efficace pour la récupération et la valorisation des composants contenus dans les carapaces. Les résultats obtenus lors de cette étude sont satisfaisants. Le taux de déminéralisation était de 90.99 %.

L'analyse élémentaire, pour le calcul du taux de DP, a montré que la quantité d'azote résiduelle correspondait au taux théorique de l'azote de la chitine (6,69%) rapporté par la littérature (Healy et al., 2003 ; Crini et al., 2009).

Le traitement biologique des déchets de langoustine *Nephrops norvegicus*, utilisant *Lactobacillus paracasei* souche A3 fermenté avec le glucose comme source de carbone a été réalisée par Jung et ses collaborateurs (2005a). Après 5 jours de culture discontinue à 30°C, une liqueur riche en protéines a été produite comme résultat de la protéolyse, avec une solubilisation de 77.5% et 61% de protéines et de calcium, respectivement, tandis que la fraction solide contient 17.5% de chitine (par rapport au poids sec) (Jung et al., 2005a) (Tableau II. 2).

Une autre étude de fermentation des déchets de crevette par *Lactobacillus plantarum* 541 avec et sans contrôle du pH a été réalisée par Rao et ses collaborateurs (2000). Parmi les quatre acides testés (acide acétique glacial, acide citrique, acide chlorhydrique et acide lactique) pour contrôler le pH au début et durant la fermentation, l'acide acétique et l'acide citrique étaient les plus efficaces. En présence d'une source de carbone supplémentaire, telle que le glucose, des taux de 75% de déprotéinisation et 86% de déminéralisation des déchets ont été obtenus avec un pH maintenu constant à 6 avec de l'acide acétique. Tandis qu'à pH libre des taux de 68.1% et 64.1 % de déprotéinisation et de déminéralisation ont été obtenus, respectivement.

Les déchets d'écrevisse *Procambarus clarkia* ont été, également, utilisés pour la récupération de la chitine par Luis et ses collaborateurs (2002). Le matériau a été fractionné par sédimentation-flottation en deux fractions: une fraction protéique et une fraction chitineuse. Les taux de déprotéinisation et de déminéralisation dans la dernière fraction après fermentation avec *L. paracasei* cultivé dans le dextrose sont 94.0% et 97.2 %, respectivement.

La déminéralisation de la fraction chitineuse de l'écrevisse *Procambarus clarkia* a été également, étudiée en fermentation discontinue alimentée (*fed-batch fermentation*) en utilisant des cellules immobilisées de *Lactobacillus pentosus*-4023 (Wang et al., 1998).

Tableau II. 2. Revues bibliographiques sur les méthodes biologiques de récupération de la chitine par fermentation lactique

	Souches et/ou enzymes protéolytiques	Source de carbone	Durée (h)	Taux (%)		Références
				DP	DM	
Fermentation lactique						
<i>Penaeus</i> sp.	<i>Lactobacillus</i> spp. B2	Sucrose	6	85	87.6	Luis et al., 2002))
<i>Nephrops norvegicus</i> déminéralisé	Stabilil : <i>Streptococcus faecium</i> M74, <i>L. plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>	Lactose	7	40	ND	(Healy et al., 1994)
<i>Nephrops norvegicus</i>	Sil-A1 4X4 TM : <i>L. plantarum</i> , <i>L.salivarius</i> , <i>S.faecium</i> , <i>P.acidilactici</i>	Glucose	7	ND	90.99	(Healy et al., 2003))
<i>Nephrops norvegicus</i>	<i>L. paracasei</i> A3	Glucose	5	77.5	61	(Zakaria et al., 1997))
<i>Crevette fermenté en une seule étape</i>	<i>L. plantarum</i> 541	Glucose	–	75	86	(Rao et al., 2000))
<i>Procambarus clarkia</i> pré-traité (écrevisse)	<i>L. paracasei</i> A3	Dextrose	3	94	97.2	(Cremades et al., 2001))
<i>Procambarus clarkii</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i> 4023 immobilisé	Lactosérum	2.1	81.5	90.1	(Bautista et al., 2001))
<i>Chionoectes japonicus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>Tolerans</i> KCTC-3074	Glucose	1	54.7	55.2	(Jung et al., 2005a)

Jung et ses coll. (2005b) ont étudié la déminéralisation des carapaces du crabe rouge *Chionoecetes japonicas* par la bactérie lactique *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074, puis une comparaison a été faite avec le traitement chimique à l'acide lactique. Ils ont remarqué que la teneur en cendres diminue avec l'augmentation de la concentration en acide : 49.1% pour 5% et 16.4 % pour 10% après 12 h. Avec l'augmentation de l'inoculum : 2.5, 5 et 10%, la teneur en cendres diminue rapidement le premier jour à 55.2, 40.9 et 44.7 %, respectivement. La teneur en protéines, après déminéralisation chimique varie de 51.3 à 54.7 % et après fermentation lactique, elle diminue jusqu'à 32.3%. Ces résultats suggèrent que la fermentation lactique peut être une méthode alternative pour la déminéralisation des carapaces de crabe, même si les taux de déminéralisation étaient inférieurs à ceux obtenus lors du traitement chimique (Jung et al., 2005b).

Ces auteurs ont, également, montré que la croissance microbienne a été principalement affectée par la concentration de la source de carbone, comme le glucose, plutôt que l'inoculum. Environ, 80% des cendres ont été éliminés au bout de 5 jours dans les conditions optimales (10% de l'inoculum, 10% de glucose et 10% de carapaces de crabe rouge à 30°C). Ces résultats ont aussi confirmé que la fermentation lactique pourrait être une alternative au traitement chimique même si ça nécessite un traitement acide plus doux (HCl 0,5M) (Jung et al., 2007).

II. 3. 2. Fermentation Non- lactique

Des bactéries non lactiques ont été, également, utilisées pour la récupération de la chitine. La fermentation des carapaces de crevettes *Metapenaeopsis dobsoni* dans un bouillon de jiggery (sucre brut) utilisant *Bacillus subtilis* pour la production de la chitine a montré que la quantité d'acide lactique produit ainsi que l'activité protéolytique de *B. subtilis* ont permis la déminéralisation et la déprotéinisation (Sini et al., 2007). Environ 84 % de protéines et 72 % de minéraux ont été éliminés de la carapace après fermentation (Tableau II. 3).

Une souche de *Pseudomonas aeruginosa* K-187 a été isolée à partir du sol dans le nord de Taiwan. C'est une souche productrice de protéases et de chitinase/lysozyme quand elle est cultivée dans un milieu de culture contenant des carapaces de crevettes et de crabes comme sources d'azote (Wang et Chio, 1998). Il a été montré que *P. aeruginosa* K-187 est capable de déprotéiniser les carapaces par fermentation. Le taux le plus élevé de déprotéinisation est de l'ordre de 82% après 5 jours, montrant que *P. aeruginosa* K-187 est plus efficace que la bactérie protéolytique *P. maltophilia* qui est connue par sa grande capacité dans la déprotéinisation des déchets de crevettes. L'utilisation de protéases produites par *P.*

aeruginosa K-187 est prometteuse pour la déprotéinisation des déchets de crustacés (Wang et Chio, 1998).

L'utilisation des enzymes protéolytiques dans la déprotéinisation des déchets de crustacés a été étudiée par Oh et ses coll. (2000). Cette équipe a montré que l'utilisation des protéases de *P. aeruginosa* K-187 a conduit, sous les conditions optimales de culture, à un taux de 72% de déprotéinisation de la poudre de carapaces de crevettes et de crabes après 7 jours d'incubation. Tandis que la déprotéinisation de la poudre de carapace crevette brute et de la poudre de crevette traitée par l'acide, en utilisant des protéases de *P. aeruginosa* immobilisée, était de 78 et 45%, respectivement. Dans le cas des enzymes immobilisées, un taux de 67 % de déprotéinisation des de la poudre de carapaces de crevettes et de crabes a été obtenue (Tableau II. 3).

Après 7 jours d'incubation à température de 30°C, 92% de déminéralisation et 63 % de déprotéinisation ont été obtenus sur des échantillons de carapaces de crabe inoculés avec une nouvelle souche de *P. aeruginosa* F722 (Oh et al., 2007).

La déprotéinisation et la déminéralisation des déchets de crabe *Chionoecetes opilio* ont été réalisées par Jo et coll. (2008) utilisant *Serratia marcescens* FS-3 isolée à partir des échantillons de l'environnement (les sols de bord de mer dans la région sud-ouest de la Corée) qui présentait une forte activité protéolytique. La déminéralisation et la déprotéinisation des déchets de crabe avec 10 % d'inoculum de *Serratia marcescens* FS-3 était de 84 et 47 %, respectivement, après 7 jours de fermentation. Quand les déchets de carapace sont traités avec 1% Delvolase[®], comme témoin, le taux de déprotéinisation était de 90%. La combinaison de 10% du surnageant provenant de la culture de *Serratia marcescens* FS-3 avec 1% de Delvolase[®], le taux de déprotéinisation obtenu était de 85%, tandis que ce taux était de 81% avec le surnageant de la culture de *Serratia marcescens* FS-3 à 10 % (Tableau II. 3).

Deux bactéries *Bacillus cereus* et *Exiguobacterium acetylicum* ont été isolées et testées pour la fermentation des déchets de crevette (Sorokulova et al., 2009). La fermentation de 3% de carapace à 37°C conduit à 97.1 et 92.8 % de déprotéinisation et 95 et 92 % de déminéralisation avec *B. cereus* et *E. acetylicum*, respectivement. Le taux de protéines a diminué de 18.7 à 5.3% avec *B. cereus* et à 7.3% avec *E. acetylicum*. Une forte activité des souches isolées à partir des déchets de crevette en décomposition suggère un vaste potentiel pour l'application de ces bactéries dans l'extraction biologique de la chitine à partir des déchets riches en chitine (Sorokulova et al., 2009).

Dans la préparation de β - chitine, la déprotéinisation de stylo de calamar a été réalisée par des isolats de bactéries productrices de protéases identifiées comme *Bacillus* sp. TKU004

(Wang et al., 2006). Sous les conditions optimales, la production de protéases par *Bacillus* sp. TKU004 a donné un taux de 73% de déprotéinisation (Tableau II. 3).

Mahmoud et ses coll. (2007) ont proposé l'utilisation des acides organiques (acide lactique et acide acétique) produits par fermentation du lactosérum pour déminéraliser les carapaces de la crevette rose *Pandalus borealis* et la déprotéinisation biologique réalisée par le champignon *Aspergillus niger* ATCC 16513. Cette étude a montré que l'efficacité de l'acide lactique ou l'acide acétique pour la déminéralisation des carapaces de crevette est similaire à celle de l'acide chlorhydrique.

Tableau II. 3. Revues bibliographiques sur les méthodes biologiques de récupération de la chitine par fermentation non lactique

	Souches et/ou enzymes protéolytiques	Source de carbone	Durée (h)	Taux (%)		Références
				DP	DM	
Fermentation Non- lactique						
<i>Metapenaeopsis dobsoni</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Jiggery	–	84	72	(Cremades et al., 2001))
Carapaces de crevettes et de crabes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K-187	–	5	82	–	(Wang et Chio, 1998)
Poudre de carapaces de crevettes et de crabes	Protéases de <i>P. aeruginosa</i> K-187	–	7	72	–	(Oh et al., 2000)
Carapace de crevette traitée par acide	Protéases immobilisée de <i>P. aeruginosa</i>			45		
Poudre de carapaces de crevettes et de crabes				67		
Carapaces de crevettes				78		(Oh et al., 2000)
Poudre de carapaces de crabes	<i>P. aeruginosa</i> F722	–	7	63	92	(Oh et al., 2007)
<i>Chionoecetes opilio</i> (Poudre de carapaces de crabes)	<i>Serratia marcescens</i> FS-3	<ul style="list-style-type: none"> • Delvolase • En combinaison • Surnageant de culture de <i>Serratia marcescens</i> FS-3 	7	47	84	(Jo et al., .., 2008)
				90		
				85		
				81		
Déchets de carapace de crevettes	<i>Bacillus cereus</i>		–	97.1	95	(Srokulova et al., 2009)
Plumes de calamar	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>			92.8	92	
	<i>Bacillus</i> sp. TKU 004			73	ND	(Wang et al., 2006))
<i>Penaeus monodon</i>	<i>Pediococcus acidolactici</i> CFR2182			97.9 ± 0.3	72.5 ± 1.5	(Bhaskar et al., 2007)
Carapaces de crevettes	<i>Pediococcus</i> sp. L1/2	sucrose	36h	ND	83	(Choorit et al., 2008)

II. 3. 3. Co-fermentation

La purification de la chitine à partir des carapaces des crevettes *Penaeus monodon* et *Crangon crangon* a été, également, testée dans le processus de fermentation en deux étapes impliquant une première étape une déprotéinisation anaérobie au moyen de la flore autochtone issue des carapaces de la crevette indonésienne et/ou une bactérie protéolytique suivies par une fermentation homolactique utilisant *L. casei* MRS1 dans la deuxième étape (Xu et al., 2008). Après déprotéinisation et décalcification des carapaces de *Penaeus monodon* et *Crangon crangon*, le taux de protéines était de 5.8 et 6.7 %, respectivement, et le contenu de calcium était 0.3 et 0.4 %, respectivement.

Différentes stratégies ont été appliquées pour extraire la chitine à partir des déchets de crevette utilisant la bactérie lactique *L. lactis* et la bactérie marine *Teredinobacter turnirae* productrice de protéase (Aytekin et al., 2009). Les deux bactéries ont été cultivées séparément dans une première étape et co-cultivées dans la deuxième étape. *L. lactis* élimine efficacement les protéines et les minéraux (66.5% de déprotéinisation, 78.8% de déminéralisation et un rendement du procédé de 52.2 %), tandis que *T. turnirae* était plus efficace pour la déprotéinisation (77.8%) avec 23.3% pour la déminéralisation et un rendement du procédé de 49.2 %) (Tableau II. 4). Cependant, un rendement de 95.5% a été obtenu durant la co-fermentation des deux bactéries. Bien que l'extraction biologique de la chitine fût incomplète par rapport à la méthode chimique, le traitement biologique utilisé pourrait encore être considéré comme une méthode alternative qui préserve l'environnement (Aytekin et al., 2009).

Une co-fermentation de *L. paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 et *Serratia marcescens* FS-3, a été testée dans le but d'extraire la chitine à partir des déchets de crabe rouge en une seule étape (Jung et al., 2007). La co-fermentation conduit à un haut niveau de déminéralisation (97.2 %), mais le niveau de déprotéinisation était seulement de 52.6% après 7 jours (Tableau II. 4). Ces résultats montrent l'efficacité de la co-fermentation et sa faisabilité pour l'extraction en une seule étape de la chitine à partir des carapaces de crabe rouge, puisque une élimination simultanée des cendres et des protéines a eu lieu. Cependant, la déprotéinisation reste à améliorer (Jung et al., 2007). Ces auteurs ont, également, testé l'extraction biologique de la chitine à partir des carapaces de crabe rouge en deux étapes successives impliquant *L. paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 et *Serratia marcescens* FS-3. La fermentation successive avec la combinaison de *Serratia marcescens* FS-3 et *L. paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 a donné le meilleur résultat de la co-élimination de CaCO_3 et des protéines à partir des carapaces de crabe. Dans cette combinaison, les taux

finaux de la déminéralisation et de la déprotéinisation étaient 94.3 et 68.9 %, respectivement (Jung et al., 2007).

Des cultures microbiennes, ne présentant pas d'activité chitinolytique, ont été isolées à partir des déchets de carapaces de crevette puis caractérisées. L'isolat le plus efficace était une culture mixte de deux souches de *Bacillus licheniformis*. La fermentation a été réalisée à 42, 50 ou 55°C, à 500 r.p.m avec 2 volumes d'air par volume de liquide et par minute. Après 48 h, les carapaces de crevette ont été récupérées, lavées puis séchées. Le produit final de fermentation était déminéralisé avec 0.9% d'acide lactique pendant 3 h. Les résultats ont montré que plus de 99% de déprotéinisation et 98.8 % de déminéralisation ont été atteints (Waldeck et al., 2006) (Tableau II. 4).

Tableau II. 4. Revues bibliographiques sur les méthodes biologiques de récupération de la chitine par co-fermentation

	Souches et/ou enzymes protéolytiques	Source de carbone	Durée (h)	Taux (%)		Références
				DP	DM	
Co-fermentation						
Deux étapes de fermentation de <i>Penaeus monodon</i> and <i>Crangon crangon</i>	<ul style="list-style-type: none"> 1^{ère} étape: déprotéinisation anaérobie par la flore autochtone de crevette de l'Indonésie et/ou bactérie protéolytique 2^{ème} étape : <i>L. casei</i> MRS1 			97.4	99.6	(Xu et al., 2008)
Déchet de crevette	<i>Lactobacillus lactis</i>			66.5	78.8	(Aytekin et al., 2009)
	<i>Teredinobacter turnirae</i>			77.8	23.3	
	Co-fermentation des deux espèces			95	95	
Déchets de crabes rouges	<ul style="list-style-type: none"> Une étape de fermentation: <i>L. paracasei</i> subsp. <i>Tolerans</i> KCTC-3074 and <i>S. marcescens</i> FS-3 Deux étapes successives de fermentation 		7 jours	52.6	97.2	(Jung et al., 2007)
	Deux souches de <i>Bacillus licheniformis</i> avec un traitement par l'acide acétique (0.9%) du produit final.		48 h	99	98.8	(Waldeck et al., 2006)

II. 4. Les facteurs clés de la récupération biologique de la chitine

Plusieurs facteurs, tels que le volume de l'inoculum, pH initial, la concentration et la nature de la source de carbone et le rapport carbone/azote ont été rapporté comme facteur influant le procédé de fermentation et par conséquent l'efficacité de la déminéralisation (Shirai et al., 2001 ; Healy et al., 2003).

La fermentation des déchets de la crevette *Penaeus monodon* a été conduite utilisant différentes bactéries lactiques (LAB) pour sélectionner la culture la plus efficace en se basant sur la production d'acide. *Pediococcus acidolactici* CFR2182 a été déterminée comme étant la plus efficace parmi les cinq cultures testées. Les conditions de fermentation : le volume d'inoculum, la quantité de sucre et le temps d'incubation ont été optimisées en utilisant la méthode de surface de réponse. Les résultats ont conduit à un pH optimal de 4.3 ± 0.1 , un inoculum de 5 % (v/w), le glucose de 15 % (w/w) et un temps d'incubation de 72 h à température $37 \pm 1^\circ\text{C}$, des taux de $97.9 \pm 0.3\%$ de déprotéinisation et $72.5 \pm 1.5\%$ de déminéralisation ont été obtenus (Bhaskar et al., 2007).

- La nature de la source de carbone a été étudiée par Luis et ses coll. (2002). Les déchets de la crevette *Penaeus* spp. ont été fermentés avec *Lactobacillus* B2 à différentes teneurs en inoculum 0, 5 et 10 % (volume/masse) et à différentes sources de carbone (lactose, sucrose et lactosérum) à une concentration de 10 ou 20 % (masse/masse). Le sucrose a été sélectionné comme la meilleure source de carbone qui a permis de produire la plus grande quantité d'acide comparant à celui du lactose et du lactosérum. Il en résulte 56.8 et 63.5% de déminéralisation et de déprotéinisation, respectivement.

- Différentes concentrations en sucrose ont été testées pour la déminéralisation des carapaces de crevette. Choorit et ses coll. (2008) ont montré que 5 % de carapaces de crevette prétraitées, avec une solution de chlore, dans un bouillon de *Pediococcus* sp. L1/2 contenant 50 g L^{-1} de sucrose conduit à 83% de déminéralisation pendant 36 h. Plusieurs études indiquent que la granulométrie de carapaces n'affecte pas la déminéralisation (Choorit et al., 2008).

- L'effet de la concentration initiale en glucose et la quantité de l'inoculum *L. casei* souche A3 et *Lactobacillus* sp. Souche B2 dans la fermentation de la crevette *Penaeus* spp. ont été étudié par Shirai et ses coll. (2001). Ils ont montré qu'une forte concentration initiale

en glucose 10% (masse/masse) et un inoculum de 5% (masse/masse) réduisent le temps de fermentation et augmentent la quantité d'acide lactique produite (Shirai et al., 2001).

- Cependant, à l'échelle commerciale, l'utilisation des sources de carbone bon marché peuvent être utiles. Dans ce but, la farine de manioc en combinaison avec des bactéries lactiques amylolytiques a été testée (Rao et al., 2006). La fermentation des déchets de crevette a été conduite avec deux souches de *L. plantarum* sous différentes concentrations en sel. La souche non-amylolytique *L. plantarum* 541 et la souche amylolytique *L. plantarum* A6 ont montré une croissance moyenne en présence de 6% de sel (Rao et al., 2006). Une efficacité élevée de la déprotéinisation et de la déminéralisation a été obtenue avec la souche 541, elle est de l'ordre de 81.4 et 59.8%, respectivement. En présence d'une concentration de 2% en sel, la souche A6 conduit à 65.5 et 52.2 % de déminéralisation et de déprotéinisation, respectivement (Rao et al., 2006).

- L'effet de la température dans la récupération de la chitine à partir d'un mélange de céphalothoraxes des espèces de crevettes *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylosstris* et *Litopenaeus setiferus* utilisant *L. plantarum* a été examiné (Pacheco et al., 2009). La fermentation était conduite à une température qui varie de 15 à 45°C. La méthode de surface de réponse a montré que le taux le plus élevé de déminéralisation et de déprotéinisation a été obtenu avec des températures qui varient de 27 à 36°C et de 30 à 40°C, respectivement.

L'effet de la granulométrie de la poudre de carapace de crabe sur la bio-déminéralisation par *L. paracasei* subsp. *Tolerans* KCTC-3074 a été également étudiée (Bhatangar et al., 2009). La déminéralisation est effectuée avec quatre échantillons de différentes granulométries (0.84-3.35, 3.35-10, 10-20, et 20-35 mm) avec 10% d'inoculum, et 5% de carapace et 10% de glucose à 30°C et 180 r.p.m pendant 7 jours. La granulométrie de la carapace avait un effet mineur sur l'efficacité de déminéralisation (Bhatangar et al., 2009).

Chapitre III
Les applications de la chitine
et ses dérivés

III. 1. Introduction

La chitine et le chitosane sont des biopolymères naturels non toxiques. Aujourd'hui, ils sont largement produits à partir des carapaces de crevettes et de crabes (Randriamahatody, 2011). Durant la dernière décennie, la chitine et le chitosane ont suscité beaucoup d'intérêt en vue d'une large gamme de nouvelles applications proposées (Cho et al., 1998). Leur propriété unique : la biodégradabilité, la biocompatibilité et la non toxicité, les rendent utiles pour un large champ d'applications (Synowiecki et Al-Khateeb, 2000 ; Wang et al., 2010) (Tableau III. 1).

La chitine est utilisée comme la principale matière première pour produire le chitosane, les oligosaccharides de chitine et de chitosane et la glucosamine (Einbu et Vårum, 2008). Il y a, maintenant, plus de 2 000 applications concrètes et le domaine de la nutrition est le plus grand utilisateur de chitosane avec 1000 tonnes consommées en l'an 2000. La production industrielle dans le monde entier de ces dérivés (en l'an 2000) est estimée à plus de 10 000 tonnes (Kurita, 2006).

III. 2. Applications dans le traitement des eaux usées

Les propriétés polyélectrolytes, chélatantes et complexantes du chitosane, dérivé de la chitine, en font un bon candidat pour des applications environnementales.

La chitine et le chitosane peuvent être utilisés pour l'adsorption et la fixation des métaux lourds (Bhatangar et al., 2009) et les colorants (Longhinotti et al., 1998) (Tableau III. 1).

Le chitosane est un polymère polycationique efficace dans la coagulation, la floculation et la déshydratation des boues activées et donc utilisé dans le traitement des eaux usées (Kurita, 2006 ; Crini et al., 2009).

Une autre application est l'immobilisation des microorganismes ou des boues dans la matrice du polymère à base de chitosane pour le traitement des eaux usées, permettant son utilisation dans des conditions environnementales extrêmes (pH extrême, présence de solvants organiques), la réutilisation des cellules et donc son implantation dans les procédés continus.

Tableau III. 1. les applications de la chitine et du chitosane

Application	Utilisation spécifique	References
Traitement des eaux usées	Elimination/recuperation des ions métalliques : cuivre (Cu ²⁺), chrome (Cr ⁺⁶), cadmium, plomb (pb ²⁺), Nickel (Ni ²⁺), mercure, fer, argent, zinc, cobalt, et l'arsenic	(Schmuhl et al., 2001 ; Zhou et al., 2005 ; Baran et al., 2007 ; Camci-Unal et Pohl, 2009)
	Elimination et fixation des colorants	(No et al., 1996 ; Longhinotti et al., 1998 ; Crini et Badot, 2009).
	Traitement et déshydratation des boues	Kurita, 2006
	Dénitrification biologique	Rabea et al., 2003 ; Robinson-Laura et Brennan, 2009.
Agroalimentaire	Alimentation et nutrition	Mahmoud et al., 2007.
	Bioconversion pour la production des additives alimentaires	Shahidi et al., 1999.
	Préservation des aliments	Rabea et al., 2003.
	Propriétés filmogènes	Chatterjee et al., 2004.
	Filtration et clarification des jus de fruits	Chatterjee et al., 2004.
	Agent Hypolipidémique et hypocholesterolimique (minceur)	Kanauchi et al., 1994 ; Chen et al., 2005.
	Antioxydant	Yen et al., 2009.
Adsorption des composés phénoliques	Spagna et al., 1996.	
Hydrogels de chitosane pour l'immobilisation cellulaire (production d'acide lactique) et pour l'encapsulation des pigments (astaxanthine) utilisés en aquaculture pour donner la couleur typique des salmonidés	Kurita, 2006.	
Extraction du fer (pour éviter les mauvaises odeurs dans la viande cuite)	Kurita, 2006.	

Biomédicale	Biomédecine, brûlure et cicatrisation	Percot et al., 2003 ; Waldeck et al., 2006.
	Activité antitumorale	Koide, 1998.
	Vecteur de médicament et de gène	Nagahama et al., 2008 ; Özbas-Turan et al. 2003 ; Suresh et al., 1998.
	Peau artificielle, pharmacie	Franca et al., 2008.
	Propriétés immunostimulantes chez les mammifères et les plantes.	Otterlei et al., 1994 ; Gogev et al., 2003 ; Cuesta et al., 2003.
	Activités antivirales et anti- <i>Candida albicans</i> .	Morfin et al., 2002.
	Propriétés adjuvant (augmentation de l'immunité spécifique) et stimule la production de cytokine	
	En ophtalmologie comme collyre	
	Regénération des nerfs	Muzzarelli et al., 2004.
	Agent thérapeutique pour les tumeurs (chitine et chitosane se conjugue avec 5-fluoro uracil)	Felse et al., 1999 ; Dhanikula et al., 2004.
Agriculture	Encapsulation grâce à la capacité du chitosane à former des gels en présence de certains cations divalent comme le calcium, le barium et le strontium	Han et al., 2008.
	Regénération tissulaire	Dahiya et al., 2006.
	Spermicide	Felse et al., 1999.
	Eliciteur des Plantes	Ait et al., 2004.
	Stimulation de la production des chitinases et glucanases (augmentation de la réponse aux pathogènes)	Ait et al., 2004.
	Stimulation de l'activité des chitinases dans les compostes	Poulsen et al., 2008.
	Agent antimicrobien (antifongique) et biopesticide	Wang et al., 2005 ; San- Lang et al., 2002.
	Augmentation de la vitalité des plantes et la capacité des plantes à dégrader la paroi des champignons	Bell et al., 1998 ; Hallmann et al., 1999.
	Agent fertilisant	Shahidi et Abuzaytoun, 2005 ; Vivekananthana et al., 2004.
	Augmentation de l'efficacité de biocontrôle par l'addition aux plantes	Bharathi et al., 2004 ; Ge et al., 2010 ; Yu et al., 2008.
Textile et papier	Fibres pour textile	Pacheco et al., 2009.
	Production de papier (additif)	Felse et al., 1999.

<p>Biotechnologies</p>	<p>Chromatographie d'affinité à base de chitine pour adsorption selective des chitinases à partir d'un milieu de fermentation Immobilisation d'enzymes et de cellules</p> <p>Production de N-acétyl chitobiose par l'hydrolyse de la chitine utilisant des enzymes commerciales Production de chitinases et chitosanases à partir de <i>L. paracasei</i>, <i>Pseudomonas</i> et <i>Streptomyces</i></p> <p>Immobilisation des microorganismes pour la bioremédiation des eaux de mers polluées Bioséparation</p>	<p>Kao et al., 2009.</p> <p>Yasutomo et al., 2003 ; Krajewska et al., 2004.</p> <p>Ilankovan et al., 2006.</p> <p>Wang et al., 2008a ; Wang et al., 2008b ; Kim et al., 2003 ; Schrempf et al., 2001.</p> <p>Gentili et al., 2006.</p> <p>Chatterjee et al., 2004 ; Longhinotti et al., 1998.</p>
<p>Cosmétologie</p>	<p>Ingrédients pour les cheveux et peau (agent hydratant)</p>	<p>Felse et al., 1999.</p>

III.3. Applications agroalimentaires

Seulement peu d'attention a été accordée à l'application alimentaire de ces biopolymères polyvalents (Shahidi et al., 1999). Ils offrent un large champ d'applications uniques, qui peuvent être résumés dans le tableau III. 1.

L'utilisation du chitosane dans l'industrie agroalimentaire est en relation avec ses propriétés fonctionnelles et nutritionnelles ainsi que ses activités physiologiques. Le chitosane présente une capacité de fixation d'eau (humidité), de graisses et de colorants, ainsi que des propriétés émulsifiantes (Rodriguez et al., 2002); il a été montré qu'il est utile dans la préparation des émulsions stables avec et sans d'autres surfactants (Speiciene et al., 2007).

Dans les pays asiatiques, il a été utilisé comme un supplément alimentaire à cause de ses propriétés intéressantes (Tableau III. 1). Au Japon, par exemple, on peut trouver de nombreux produits alimentaires enrichis en chitosane (nouilles, pâtes de soja). Aux Etats-Unis, le chitosane est utilisé comme ingrédient dans certaines applications et comme film comestible pour protéger les aliments. Ces deux biopolymères (chitine et chitosane) sont, en effet, utilisés dans l'industrie des boissons afin d'éliminer des liquides alimentaires une partie des composés indésirables (particules organiques, flore microbienne indigène, colloïdes entraînant des propriétés organoleptiques de mauvaise qualité, métaux lourds, pesticides résiduels, mycotoxines, endotoxines) qui sont notamment les causes d'instabilité et de risques alimentaires.

III.4. Les applications biomédicales

La chitine et le chitosane montrent d'excellentes propriétés biologiques telles que :

- la non toxicité (Ravi Kumar et al., 2000 ; Morimoto et al., 2002), qui est exprimée par une dose limite (DL_{50}) de $17\text{g kg}^{-1}\text{ jour}^{-1}$ (Crini et al., 2009) et la biodégradation dans le corps humain (Patil et al., 2000 ; Sashiwa et al., 2003 ; Yang et al., 2004).
- la biocompatibilité (Bal et al., 2006 ; Majtán et al., 2007), qui se traduit par son hémocompatibilité et sa faible antigénicité. L'hémocompatibilité du chitosane se manifeste par son caractère anti-thrombogène. Il trouve de ce fait des applications en tant que revêtement d'objets mis en contact avec le sang comme les prothèses vasculaires ou les valves cardiaques.
- les activités immunologiques, antibactériennes et cicatrisantes (Koide et al., 1998 ; Khor et al., 2002 ; Muzzarelli et al., 2004) en favorisant une réduction de collagène indésirable, une augmentation du nombre d'histiocytes, une stimulation des fibroblastes qui produisent une quantité abondante de collagène-3, indispensable dans

les phénomènes de cicatrisation et hémostatique (Vongchan et al., 2003 ; Jayakumar et al., 2007).

Ils sont, également, utilisés dans la culture cellulaire, l'ingénierie tissulaire (Sashiwa et Aiba, 2004 ; Maeda et al., 2008 ; Nagahama et al., 2008) et le relargage de médicament (Yang, 2011 ; Mi et al., 2002), ainsi il offre une excellente biocompatibilité et un profil de biodégradation dans l'environnement physiologique (Nsereko et Amiji, 2002). La chitine est également utilisée, en médecine classique, comme un excipient et transporteur (vecteur) de médicaments sous forme de film, de gel ou de poudre pour les applications impliquant une mucoadhésivité, et en médecine régénératrice (chirurgie reconstructrice par exemple). Il faut noter que le chitosane ultrapur utilisé dans ces domaines possède un coût très élevé.

III. 5. Les applications agricoles

L'amendement en chitine et en chitosane peut réduire effectivement les maladies transmises par le sol. En plus, l'addition de la chitine présente plusieurs fonctions, y compris la rétention des éléments nutritifs dans le sol et contribue au cycle de l'azote (Shahidi et Abuzaytoun, 2005). La chitine et le chitosane ont un potentiel d'application polyvalent dans l'industrie agro-alimentaire (Harish et Tharanathan, 2007). En effet, la chitine, en particulier, pourrait devenir l'engrais naturel et le pesticide du futur. L'emploi de «bio-pesticide» est en augmentation et représente une alternative prometteuse.

En agronomie, l'enrobage de semences des céréales avec des oligosaccharides de chitosane leur permet de résister aux attaques de champignons et de bactéries pathogènes. Cette activité antifongique se manifeste également pendant la vie de la plante de façon directe ou par stimulation de certains processus de défense (Yang et al., 2010).

Chapitre IV
Modélisation par les plans
d'expériences

IV. 1. Historique

La méthode des plans d'expériences est à la fois nouvelle et ancienne. Nouvelle pour l'ingénierie mécanique et électronique qui, traditionnellement, est portée vers les sciences exactes. Ce n'est que depuis quelques années qu'une approche statistique donnant la part aussi belle à l'incertain suscite un tel regain d'intérêt chez les esprits scientifiques, toutes formations confondues (Schimmerling et al., 1998 ; Karam, 2004).

La méthode des plans d'expériences permet aux chercheurs de structurer leurs démarches expérimentales, de confronter et de valider leurs propres hypothèses, pour mieux comprendre les phénomènes étudiés et solutionner leurs problèmes.

La méthode des plans d'expériences permet de tirer d'un nombre d'essais donné un maximum d'informations crédibles concernant l'influence des facteurs. Elle permet notamment de maximiser le ratio informations recueillies/nombre d'essais réalisés. Elle offre ainsi la possibilité de quantifier et de hiérarchiser les effets d'un grand nombre de facteurs du système étudié, et cela avec un nombre d'essais relativement faible, c'est-à-dire dans le minimum de temps et de coûts (Schimmerling et al., 1998).

L'intérêt pour le développement technologique étant reconnu, la méthode des plans d'expériences pénètre des secteurs d'activité comme l'industrie mécanique, l'automobile, l'électronique, le spatial, etc., restés longtemps à l'écart de ce type d'approche.

La méthode est cependant ancienne. Depuis longtemps, les agronomes et les chimistes l'utilisent pour concevoir et analyser leurs expérimentations (Droesbek et al., 1997).

C'est en s'intéressant à la recherche agronomique que le statisticien anglais Sir R.A. Fisher établit, au début des années 30, les fondements des plans d'expériences. Il est à l'origine des principaux raffinements utilisés pour l'expérimentation en agronomie (carrés latins, blocs, aléarisation, etc.) avec l'analyse de la variance dont le test l'a rendu célèbre. Furent ainsi jetées les bases de l'expérimentation moderne. Après 1945, les plans d'expériences suscitent de nombreuses publications et recherches dans le monde anglo-saxon (Schimmerling et al., 1998).

Des statisticiens comme Yates, Youden, Cochran, Plackett et Burman, et bien d'autres, enrichissent et divulguent la méthode. Box et Hunter, s'appuyant notamment sur les travaux de Yates, développent des méthodes particulières de construction de plans fractionnaires à deux niveaux. Ils s'intéressent à l'étude des facteurs quantitatifs et introduisent dans les années 60 les modèles de surface de réponse associés à des plans tels que les plans composites-centrés. Certains travaux, adaptés à l'étude de nombreux facteurs quantitatifs, séduisent l'industrie chimique.

Cependant, la méthode, encore très théorique, demeurait l'apanage des statisticiens. En d'autres termes, seuls des spécialistes pouvaient la mettre en œuvre.

A partir des années 50, en s'attaquant à l'amélioration de la qualité, le Japon imprime un nouveau souffle. Taguchi et Masuyama élaborent des tables permettant de construire des plans d'expériences orthogonaux adaptés à la majorité des problèmes industriels. Ces tables ont été publiées en 1959 et 1961. Par la suite, les méthodes initiées par Taguchi se sont répandues aux Etats-Unis puis en Europe, en réponse notamment aux besoins de l'industrie automobile. Le mérite de Taguchi est d'avoir contribué à une méthodologie facile à appliquer, qualifiée de «*user friendly*» par les Américains. L'aspect novateur est d'avoir mis les plans d'expériences au service de la qualité, en apportant des idées nouvelles dans ce domaine.

Initialement difficile d'accès, la méthode des plans d'expériences se laisse apprivoiser, adapter et vulgariser pour conquérir un cercle d'utilisateurs de plus en plus large. La méthode trouve une nouvelle jeunesse comme outil de la qualité, en encourageant le travail de groupe, la mise en commun et la synergie des savoirs et du savoir-faire, et la réflexion préalable à l'action.

Les applications des plans d'expériences ont tendance à se diversifier. La méthode suscite, depuis quelques années, un engouement et des recherches aboutissant à l'émergence de nouvelles variantes de plans. Sa diffusion à grande échelle dans les entreprises, et son enseignement n'en sont qu'à leurs débuts. L'effort de simplification, d'adaptation aux problèmes de terrain, amorcé par Taguchi, Shainin, et d'autres, est appelé à poursuivre.

IV. 2. Introduction

Le terme «plan d'expériences» vient de l'anglais *Design experiments* qui se traduit par «conception des expériences». En fait, la méthode englobe aussi bien la définition de la séquence d'essais à réaliser pour étudier un problème donné que l'analyse, algébrique et statistique, des résultats de ces essais.

Les plans d'expérience constituent essentiellement une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique. La méthodologie des plans d'expériences se base sur le fait qu'une expérience convenablement organisé, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats (Karam, 2004).

Selon la définition donnée par Fisher, les plans d'expériences constituent «un essai technologique d'utilisation maximale des données». L'efficacité d'un plan d'expériences en

termes d'informations acquises et de fiabilité de ces informations est supérieure à celle de toute autre séquence d'essais non structurée de même volume.

L'une des différences majeures entre les méthodes classiques de réalisation d'essais et la méthode des plans d'expériences réside dans le fait que dans la première, la recherche de l'effet des différents facteurs se fait de manière séquentielle et souvent non planifiée- en changeant la valeur ou le niveau, d'un seul facteur à la fois, d'un essai à un autre- alors que dans la seconde méthode, plusieurs facteurs à la fois changent de niveau. L'interprétation ne se fait plus résultat d'essai par résultat d'essai, mais à partir de l'ensemble des résultats.

IV. 3. Les domaines d'application des plans d'expériences

Les plans d'expériences sont habituellement appliqués dans la recherche et le développement de nouveaux produits ou procédés. Les secteurs d'activités concernés peuvent être aussi différents que l'agronomie, la chimie, l'électronique, la mécanique ou le marketing. Ce qui est nouveau, c'est leur application à la qualité. Les Japonais en ont fait un outil privilégié d'obtention de la qualité.

Pour le domaine industriel, les plans d'expériences peuvent s'appliquer à tous les stades de la vie d'un produit, que ce soit pour optimiser les performances du produit ou du procédé de fabrication, ou pour résoudre des problèmes de fabrication.

IV. 4. Contexte d'utilisation des plans d'expériences

Le contexte d'utilisation des plans d'expériences recouvre des phénomènes de type «boite noire», que l'on cherche à "éclaircir" pour mieux en comprendre le fonctionnement et en optimiser les performances. La démarche est expérimentale : l'information sur le phénomène observé est acquise à partir d'essais.

Cela impose une connaissance minimale sur le phénomène étudié avant d'entreprendre les essais.

On doit être en mesure de lister les paramètres susceptibles d'agir sur le fonctionnement de la «boite noire». Ces paramètres sont les «entrées» de la «boite noire», appelés par la suite facteurs ou actions (Fig. IV.1). Ce sont des variables devant, pour la plupart, être maîtrisées, car pour un essai ou pour le fonctionnement réel, il faut pouvoir fixer leur valeur à un niveau donné.



Figure IV. 1. Description d'un phénomène de type «boîte noire»

Les performances observées sur le phénomène étudié sont elles-mêmes à identifier avant les essais. Ce sont les «sorties» de la «boîte noire», appelées par la suite réponses. Avant de lancer les essais, on doit s'assurer de pouvoir les mesurer (Benoist et al., 1994).

IV. 5. Avantages de la méthode des plans d'expériences

La différence capitale avec la méthode classique tient au fait que l'on fait varier les niveaux de tous les facteurs à la fois à chaque expérience, mais de manière programmée et raisonnée.

Parmi les avantages (Goupy, 2001) :

- diminution du nombre des essais ;
- nombre de facteurs étudiés très grand ;
- détection des interactions entre facteurs ;
- modélisation des résultats.
- détection des optimaux ;
- meilleure précision sur les résultats ;

La méthode des plans d'expériences permet une interprétation rapide et sans équivoque en fournissant un modèle expérimental précis du système étudié (Gillon, 1997).

IV. 6. Terminologie

IV. 6. 1. Facteurs

Les variables que l'on désire étudier sont appelées facteurs ou actions (Benoist et al., 1994 ; Goupy, 1999). Les facteurs sont les causes, supposées ou certaines, qui provoquent le phénomène (Droesbeke et al., 1997).

Un facteur peut être qualitatif ou quantitatif, continu (exemple : la température) ou discontinu (discret exemple : des personnes ou des méthodes de mesure), contrôlable ou non contrôlable (Droesbeke et al., 1997).

La notation de Yates permet une représentation simple des combinaisons des niveaux et permet un calcul aisé des effets et des interactions. Les niveaux sont représentés par les signes + et – symbolisant la borne inférieure et la borne supérieure. Dans le langage des plans d'expériences, on dit que le facteur varie entre le niveau bas (que l'on note le plus souvent par (-1)) et le niveau haut (que l'on note le plus souvent par (+1)). L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur ou plus simplement le domaine du facteur (Goupy, 1999).

Grâce à cette modélisation, les différentes variables se transforment en variables centrées réduites, ce qui permet de comparer des variables de grandeurs totalement différentes. La formule qui permet le passage des variables courantes aux variables centrées réduites est la suivante :

$$a = \frac{A - \bar{A}}{pas} \dots\dots\dots(1)$$

a : variable centrée réduite

A : variable courante

\bar{A} : valeur moyenne des variables courantes

pas : variation entre la position moyenne de la variable et une extrémité du domaine.

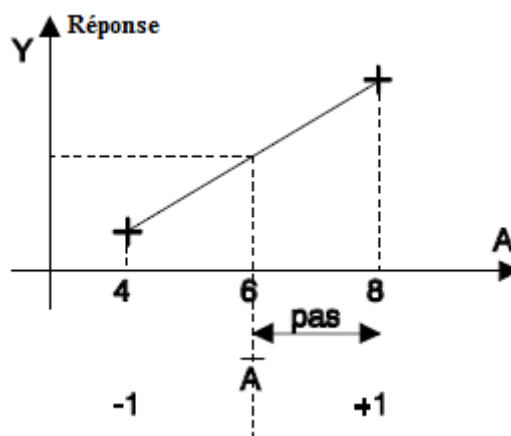


Figure IV. 2. Notation de Yates sur la variable A (Gillon, 1997)

Pourquoi centrage et réduction des données brutes ?

En présence de grandeurs exprimées dans des unités différentes ou bien présentant des étendues différentes, il peut être délicat d'établir des similitudes à la fois entre variables et entre individus. Les résultats d'une analyse de données sont parfois influencés par l'ordre de

grandeur des variables, aussi pour y remédier, il est recommandé de donner la même importance (le même « poids ») aux différentes variables en les réduisant et en centrant. Ainsi, aucune variable ne pourra dominer une autre variable à cause de ces valeurs numériques. On peut voir sur la figure présentée ci-dessous, de façon plus implicite que coder des données revient à « étirer » ou à « compresser » les variables autour d'une même moyenne (Goupy, 1999 ; Karam, 2004).

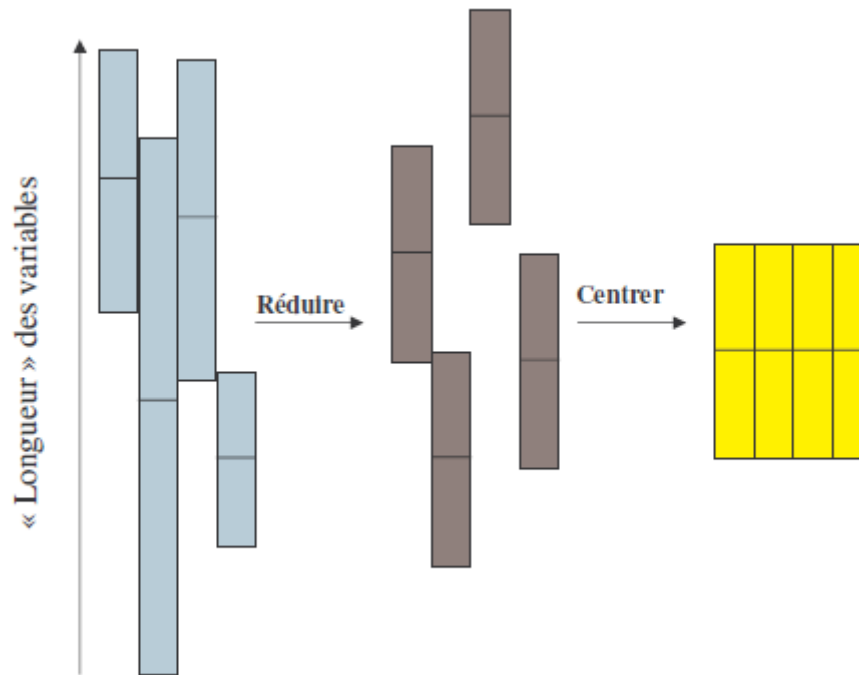


Figure IV. 3. Centrage et réduction des variables ou facteurs

IV. 6. 2. Réponses

Une réponse expérimentale (parfois appelée variable dépendante) est une manifestation mesurable que l'on observe lorsque l'on fait varier les facteurs étudiés.

Toutes sortes de réponses sont envisageables, comme un rendement ou une pureté en chimie, une croissance pondérale en biologie, une quantité gustative en viticulture,....

IV. 6. 3. Expériences

Une expérience (ou point expérimental) est définie par un ensemble de conditions opératoires. Les facteurs, susceptibles d'avoir de l'influence sur le phénomène et dont la variation n'est pas étudiée, doivent être fixés à une valeur constante durant la totalité de l'expérimentation.

IV. 6. 4. Matrice d'expériences

Une matrice d'expériences est un objet mathématique qui représente, sous forme codée ou normée, l'ensemble des expériences à réaliser. C'est un tableau constitué de N lignes, correspondant aux N expériences et de K colonnes, correspondant aux K variables étudiées.

Les plans factoriels à 2 niveaux sont les plus simples, ils permettent de bien comprendre le principe de la méthode. Le nombre d'expériences à réaliser se calcule par :

$$\text{Le nombre d'expériences} = 2^k$$

Il est maintenant possible d'introduire la matrice d'expériences qui permet de déterminer les essais ou les simulations à réaliser. Le tableau IV. 1 présente une matrice d'expériences pour 3 facteurs à 2 niveaux.

Tableau IV. 1. Matrice d'expériences d'un plan factoriel à 3 facteurs et valeurs des niveaux correspondants aux facteurs

	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	
N° d'expérience	A	B	C	Réponse
1	-	-	-	Y ₁
2	+	-	-	Y ₂
3	-	+	-	Y ₃
4	+	+	-	Y ₄
5	-	-	+	Y ₅
6	+	-	+	Y ₆
7	-	+	+	Y ₇
8	+	+	+	Y ₈
niveau (-)	4	Petit	1000	
niveau (+)	10	Grand	100000	

Il est très facile d'estimer les paramètres à partir de la matrice d'expériences, il suffit de construire le tableau suivant :

Tableau IV. 2. Matrice d'expériences et vecteur des effets

N°	Moyenne	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Réponse
1	+	-	-	-	+	+	+	-	Y ₁
2	+	+	-	-	-	-	+	+	Y ₂
3	+	-	+	-	-	+	-	+	Y ₃
4	+	+	+	-	+	-	-	-	Y ₄
5	+	-	-	+	+	-	-	+	Y ₅
6	+	+	-	+	-	+	-	-	Y ₆
7	+	-	+	+	-	-	+	-	Y ₇
8	+	+	+	+	+	+	+	+	Y ₈
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8	
Effets	I	E _A	E _B	E _C	I _{AB}	I _{AC}	I _{BC}	I _{ABC}	

On reporte, d'abord, le signe des facteurs dans la matrice d'expériences, ensuite la colonne I est remplie de signes « + », puis les colonnes des interactions (AB, AC, BC et ABC) par la règle des signes de produit.

Donc l'effet de A (E_A) se calcule comme suit :

$$E_A = \frac{1}{8} [-Y_1 + Y_2 - Y_3 + Y_4 - Y_5 + Y_6 - Y_7 + Y_8] \dots\dots\dots (2)$$

L'interaction entre les facteurs A, B est égale:

$$I_{AB} = \frac{1}{8} [+Y_1 - Y_2 - Y_3 + Y_4 + Y_5 - Y_6 - Y_7 + Y_8] \dots\dots\dots (3)$$

IV. 6. 5. Le modèle

Un avantage primordial de la méthode des plans d'expériences est qu'un modèle mathématique apparaît spontanément à partir des effets (E) et des interactions (I).

IV. 6. 6. Notion d'interaction

Une interaction est une combinaison de facteurs n'agissant pas de façon indépendante (Benoist et al., 1994).

IV. 6. 6. 1. Système sans interaction :

Comme nous étudions des plans factoriels à 2 niveaux, la réponse obtenue par le modèle mathématique évolue linéairement par rapport à chaque variable (Gillon, 1997).

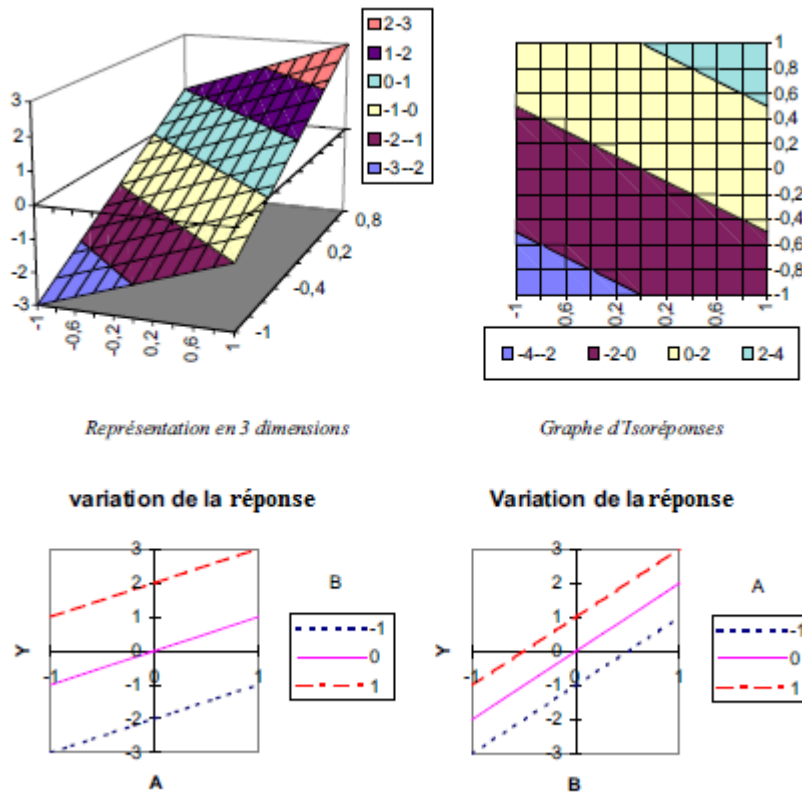


Figure IV. 4. Système sans interaction

Sans interaction, toutes les droites sont parallèles. La variation d'un paramètre n'a aucun effet sur l'autre. Par exemple, pour B passant de -1 à +1 la variation totale de la réponse est 4 quelque soit le niveau de A (-1, 0, +1). Les variables A et B sont indépendantes.

IV. 6. 6. 1. Système avec interaction :

Afin d'apprécier la modification qu'apporte une interaction, nous allons construire un modèle avec une forte interaction des deux facteurs (Gillon, 1997).

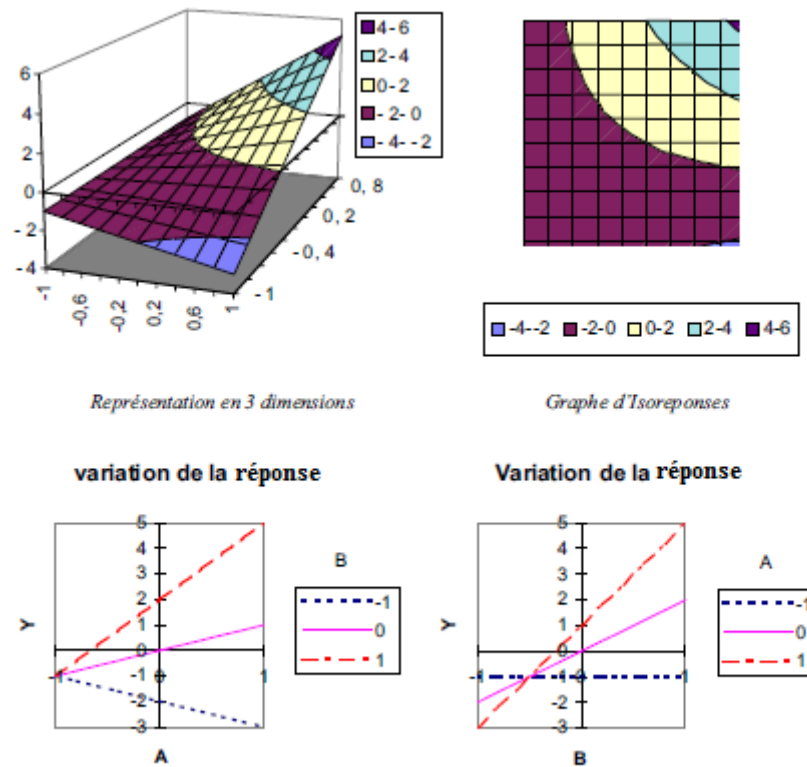


Figure IV. 5. Système avec interaction

Le même plan factoriel, que précédemment, est réalisé mais en ajoutant une interaction entre les variables A et B. La figure IV. 5 représente ce plan, il est déformé par rapport au précédent. Les droites ne sont plus parallèles, elles se croisent. L'interaction apparaît comme une distorsion du plan (Cojocar et al., 2009).

IV. 7. Efficacité des plans d'expériences

La méthodologie des plans d'expériences semble être une méthode d'expérimentation avantageuse par rapport aux différentes méthodes d'expérimentation utilisées.

IV. 7. 1. Stratégie traditionnelle : « un seul facteur à la fois »

Elle consiste à faire varier successivement chacun des facteurs à chaque expérience, tous les autres étant maintenus constants. Avec cette méthode, l'effet de chacun des facteurs est calculé pour une combinaison particulière des autres facteurs et rien ne permet de dire si cet effet est également valable dans les autres cas (problème d'interaction entre facteurs) (Karam, 2004).

Cependant, ce type de plan peut se révéler très utile lorsqu'il y a beaucoup de facteurs et que le phénomène est compliqué. On n'obtient aucune interaction seuls les effets principaux sont connus (Goupy, 1999)

L'inconvénient majeur de cette méthode est le nombre réduit de facteurs étudiés et le nombre important des expériences à réaliser.

IV. 7. 2. Stratégie du plan factoriel complet

Il combine toutes les combinaisons possibles des variables avec un nombre de facteurs finis. Mais le principal défaut réside bien sûr dans le nombre très élevé d'expériences que ce plan nécessite, défaut que l'on essaiera de contourner grâce à des plans d'expériences plus adaptés. Ce plan ne peut donc être envisagé que pour des études comportant un petit nombre de facteurs avec peu de niveaux.

IV. 7. 3. Stratégie du plan fractionnaire orthogonal

Le plan fractionnaire orthogonal est une fraction judicieusement choisie du plan factoriel complet qui permet de tester un grand nombre de facteurs avec un minimum d'expériences et d'en déduire l'effet moyen de chaque facteur avec une assez bonne précision.

IV. 8. Modélisation en surfaces de réponse

Ces plans s'utilisent dans le cadre d'une stratégie orientée vers l'optimisation ou la prévision des réponses. Ils permettent de décrire l'évolution de la réponse pour un nombre limité de facteurs. Les facteurs doivent être tous quantitatifs et continus. Leur influence est généralement non linéaire. Le comportement de la réponse sera représenté par une surface de réponse (Fig. IV. 6).

Selon le problème étudié, le modèle peut servir simplement à faire de la «cartographie». Dans ce cas, on se contentera de visualiser la surface de réponse, avec des courbes d'isoréponses ou avec une représentation tridimensionnelle en perspective pour décrire les influences. Les courbes d'isovaleurs permettent de délimiter des zones admissibles pour les facteurs pour lesquels la réponse sera stable, ou cantonné dans une plage de valeurs données. La visualisation des courbes d'isovaleurs et des surfaces de réponses est un des principaux résultats de l'analyse.

Pour modéliser les surfaces des réponses, on pourra recourir notamment aux plans composites centrés.

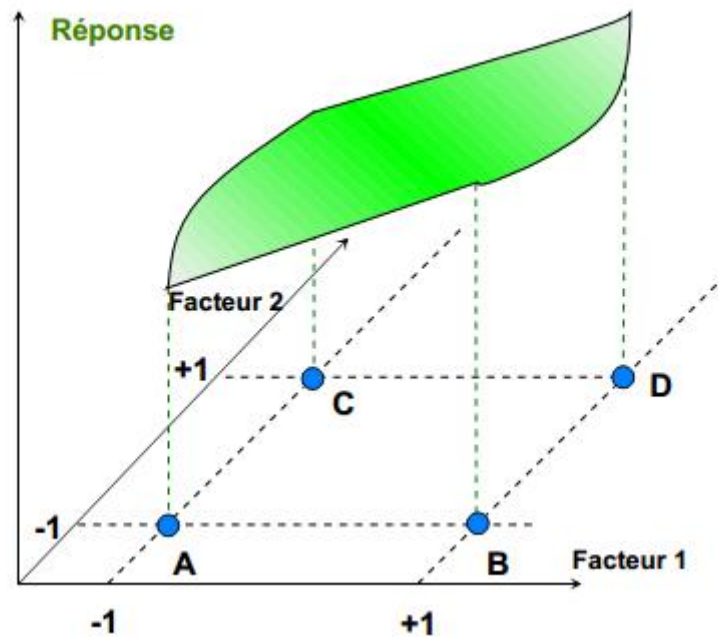


Figure IV. 6. Courbe de réponse à 2 niveaux

IV.8. 1. Les plans composites centrés

Les plans composites sont des plans souvent utilisés car ils se prêtent bien au déroulement séquentiel d'une étude. Ils sont développés, en particulier, dans la méthodologie des surfaces de réponses (Benoist et al., 1994). Ces plans sont conçus précisément pour être conduits en plusieurs séquences (Fig. IV. 7). Généralement les deux premières séquences servent à estimer la partie linéaire du modèle, et la dernière les effets quadratiques.

IV.8. 1.1. Première séquence

Il s'agit de réaliser un essai répété au centre du domaine expérimental. Cet essai permet d'estimer la variance de la variabilité naturelle. Pour cela, il est conseillé de réaliser au minimum 4 à 6 répétitions.

IV. 8. 1. 2. Deuxième séquence

Il s'agit de réaliser un plan factoriel complet ou un plan fractionnaire. Cette séquence permet d'estimer les effets linéaires des facteurs et leurs interactions.

Toutefois, avant d'engager la troisième séquence, il est recommandé d'analyser d'abord les résultats des deux premières séquences, pour notamment s'assurer que cette troisième séquence se justifie.

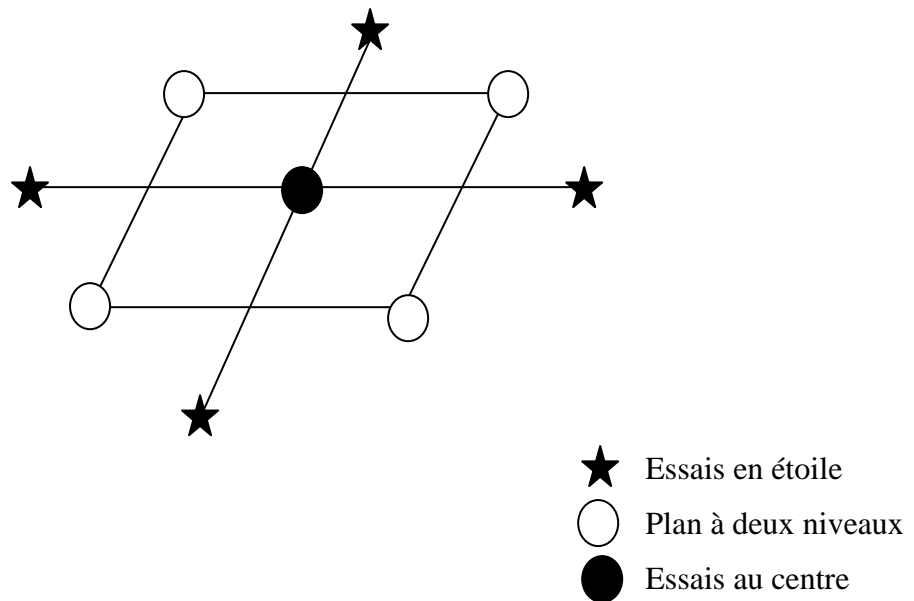


Figure IV. 7. Configuration d'un plan composite centré complet dans le cas de deux facteurs

L'analyse de la deuxième séquence permet d'estimer les effets des facteurs et des interactions, et de vérifier si l'influence quadratique est importante. Si les effets sont négligeables, ou si les résultats fournissent déjà une solution au problème, il sera alors inutile de continuer le plan.

Pour vérifier l'influence quadratique, on effectue une prévision au centre à partir des résultats du plan à deux niveaux et on examine la différence entre cette prévision et la réponse moyenne observée lors des répétitions au centre. Le modèle sera présumé non linéaire si cette différence est supérieure à une différence critique.

IV.8.1.3. Troisième séquence

Dans cette séquence, il s'agit de compléter les essais déjà réalisés lors des deux premières séquences. Pour cela, les nouvelles combinaisons à tester dessinent une étoile dans l'espace des facteurs. Le plan, ainsi obtenu, est appelé plan en étoile. Les niveaux extrêmes pris par chaque facteur se situent aux extrémités d'une branche de l'étoile, les autres facteurs étant fixés à une valeur centrale.

Ces points centraux sont importants et ils ont plusieurs rôles :

- Ils servent à tester la validité du modèle du premier degré ;
- Ils servent à s'assurer qu'il n'y a pas de glissement (stabilité) entre les deux séries d'essais ;
- Ils permettent d'obtenir une estimation de l'erreur expérimentale ;
- Ils diminuent l'erreur de prédiction près du point central.

Cette séquence permet de tester l'effet quadratique des facteurs. Si pour un facteur l'effet quadratique n'est pas à tester, il suffit d'omettre les deux essais en étoile concernés.

L'intérêt des plans composites réside dans le fait qu'ils prennent facilement la suite d'un premier plan factoriel dont les résultats sont inexplicables par un modèle du premier degré. En effet, ils se prêtent bien au déroulement séquentiel de l'étude du modèle mathématique. On effectue une première étude qui est basée sur une approximation de premier degré de la réponse, en utilisant un plan factoriel complet 2^k . Par des points au centre du domaine on teste la validité du modèle mathématique. Si les tests sont positifs, c'est à dire les réponses mesurées au centre sont très proches de celles calculées, l'étude s'achève. Mais s'ils sont négatifs, on entreprend des essais supplémentaires pour établir un modèle du second degré. Les essais supplémentaires constituent la seconde étape du déroulement de l'étude. Il suffit d'effectuer les expériences correspondant aux points en étoile et de faire les calculs sur l'ensemble de toutes les expériences. Les plans composites sont parfaitement adaptés à l'acquisition progressive des résultats. Le nombre de niveaux d'un plan composite est de cinq par facteur: le point central, les deux niveaux du plan factoriel et les deux niveaux des points en étoile (Bahloul, 2005).

IV. 9. Construction du plan d'expérience

IV. 9. 1. Choix de la stratégie expérimentale

Les plans d'expériences ont pour but d'apporter le maximum d'informations avec un minimum d'expériences. La méthodologie des plans d'expériences consiste à fabriquer un modèle approximatif qui apportera des éléments d'informations à l'expérimentateur.

Pour cela, le choix du plan d'expériences à mettre en œuvre dépend du problème posé. Dans le cas de notre travail, on a choisi de travailler avec un plan d'expérience composite central. Le modèle mathématique postulé est un modèle polynomial du second degré avec interaction :

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

où :

Y_i est la réponse prévue,

x_i et x_j sont les variables indépendantes (facteurs) qui influencent la variable de réponse Y ;

β_0 est l'ordonnée à l'origine ou la moyenne;

β_i est le coefficient $i^{\text{ème}}$ linéaire;

β_{ii} est le coefficient quadratique $i^{\text{ème}}$

β_{ij} est le coefficient d'interaction.

IV. 9. 2. Analyse statistique des résultats

Toutes les hypothèses faites en amont d'un plan d'expérimentation doivent être vérifiées pour pouvoir valider ensuite les conclusions. C'est à cette étape que le recours aux outils statistiques intervient.

Dans tout les cas, l'utilisateur des tests statistiques est étroitement lié à la connaissance de l'écart type expérimental, estimé par des essais de répétabilité.

Les valeurs expérimentales introduites dans le modèle sont entachées d'erreurs qui se transmettent aux coefficients du modèle (descriptive et prédictive) puis aux valeurs calculées. Des tests statistiques permettent d'évaluer la qualité du modèle, sa validation (analyse de la variance) et la significativité des coefficients (test de Student).

La mise en œuvre de tests statistiques doit permettre aux opérateurs de porter un jugement sur les résultats obtenus à savoir :

- Un modèle décrivant la variation de la réponse dans le domaine expérimental ;
- Des estimations des coefficients associés aux différents monômes du modèle ;
- Des résidus traduisant les écarts entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées.

IV. 9. 2. 1. Qualité descriptive

On peut aussi chercher à savoir si le modèle explique bien l'ensemble des résultats en calculant le coefficient de détermination R^2 tel que :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2} \dots\dots\dots(3)$$

\hat{y}_i la réponse prédite (théorique)
 \bar{y} la moyenne des réponses
 y_i la réponse observée (expérimentale)
 N nombre d'essai

Ce coefficient mesure la proportion de variation totale de la réponse qui est expliquée par sa relation avec des variables (Quinn and Keough, 2002). Plus R^2 sera grand, meilleur sera le modèle (les réponses calculées seront fortement corrélées avec les réponses expérimentales). Cependant, si le nombre d'expériences est égal au nombre d'inconnues du système, le coefficient R^2 sera toujours égal à 1. C'est pour éviter cela que le coefficient de détermination ajusté (R^2_a) a été introduit. Le R^2_a ajusté est défini comme la différence à 1 du rapport entre le carré moyen des écarts des résidus et le carré moyen des écarts expérimentaux, il s'écrit :

$$R^2_a = 1 - \frac{N-1}{N-L} (1 - R^2) \dots\dots\dots(2)$$

N : nombre d'essai et **L** : nombre de coefficients indépendants pour $N \neq L$.

Dans le cas où $N=L$, on dit que le modèle est descriptif.

De même que pour R^2 , le meilleur modèle à L variable sera obtenu pour R_a^2 maximum.

Ce critère permet d'apprécier la qualité descriptive du modèle et permet de comparer des modèles qui n'ont pas le même nombre de termes. Il ne nous indique pas si le modèle représente bien le phénomène.

IV. 9. 2. 2. Analyse de la variance

Cette analyse constitue un test statistique (test de Fisher-Snedecor). Dans le contexte des plans d'expériences, l'objectif de l'analyse de variance (ANOVA **A**Nalysis **O**f **V**ariance) est de détecter et de hiérarchiser les influences des actions (facteurs) du modèle (Benoist et al., 1994) et à rechercher les sources de variation des réponses (Goupy et Creighton, 2006).

Pour chaque action, on se pose la question suivante : l'action influe-t-elle sur la réponse ; est-elle significative ? Ce qui revient à se demander si les variations de la réponse sont causées par les variations de l'action entre ses différents niveaux, ou par les fluctuations aléatoires dues à la dispersion de la réponse (Benoist et al., 1994).

C'est le test de signification globale de la régression que nous appellerons le test de validation.

IV. 9. 2. 2. 1. Tableau d'analyse de la variance

Le test de Fisher-Snedecor va nous informer si l'équation établit bien une relation entre la variation des facteurs et de la réponse, ou si c'est dû à un changement, une fluctuation aléatoire de la réponse dans le domaine expérimental. La présentation classique des résultats de l'analyse de variance se fait au moyen d'un tableau de synthèse appelé tableau d'analyse de variance.

On ne s'intéressera plus, seulement, à un seul facteur, mais on considérera successivement toutes les actions du modèle.

Les facteurs peuvent être classés par ordre de probabilité croissante (les facteurs les plus significatifs sont en début de tableau) ou par ordre d'introduction dans le modèle (Benoist et al., 1994).

Les principales informations fournies par le tableau de l'analyse de la variance sont présentées dans le tableau IV. 3 (Schimmerling et al., 1998).

Tableau IV. 3. Analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté (ddl)	Variances	Moyenne des carrés	F	PC %	Remarque
Modèle	$SCE(y) = \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2$	p-1	$\sigma^2_{n-1}(y)$	$\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}{p-1}$	$\frac{\sum_{i=1}^N \frac{(y_i - \bar{y})^2}{p-1}}{SCE(\epsilon)}$	100%	
Facteur A	$SCE(A) = \frac{n}{n_A} \sum_{1 \leq k \leq n_A} a^2_k$	$n_A - 1$	$V_A = \frac{SCE(A)}{n_A - 1}$			$\frac{SCE(A)}{SCE(y)}$	
Facteur B	$SCE(B) = \frac{n}{n_B} \sum_{1 \leq k \leq n_B} b^2_k$	$n_B - 1$	$V_B = \frac{SCE(B)}{n_B - 1}$			$\frac{SCE(B)}{SCE(y)}$	
Facteur AB	$SCE(AB) = \frac{n}{n_A n_B} \sum_{1 \leq k \leq n_A} \sum_{1 \leq l \leq n_B} r(A_k, B_l) (ab)_{kl}^2$	$(n_A - 1)(n_B - 1)$	$V_{AB} = \frac{SCE(AB)}{(n_A - 1)(n_B - 1)}$			$\frac{SCE(AB)}{SCE(y)}$	
Résiduelle	$SCE(\epsilon) = \sum_{1 \leq i \leq n} \epsilon_i^2$	n - p	$V(\epsilon) = \frac{\sum_{1 \leq i \leq n} \epsilon_i^2}{n - p}$			$\frac{SCE(\epsilon)}{SCE(y)}$	
Totale	$SCT = SCE(y) + SCE(\epsilon)$	n-1					

n : nombre de résultats du plan d'expériences, répétitions comprises ; p : nombre de coefficients indépendants dans le modèle, n_A : nombre de niveaux du facteur A ; a_k : estimation du coefficient du facteur A correspondant au niveau k dans le modèle ; $r(A_k)$: nombre de résultats dans le plan pour lesquels A prend le niveau k, répétitions comprises ; $(ab)_{kl}$: estimation du coefficient de l'interaction AB correspondant au niveau k de A, et au niveau l de B, dans le modèle ; $r(A_k, B_l)$: nombre de résultats dans le plan pour lesquels A prend le niveau k, et B le niveau l, répétitions comprises

a) Moyenne ou ordonnée à l'origine

Par définition, la moyenne arithmétique d'un ensemble de valeurs est la somme de toutes les valeurs divisées par le nombre de valeurs. C'est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude.

$$\beta_0 = \frac{\sum y_i}{n} \dots\dots\dots(4)$$

b) Écart-type

La définition de l'écart-type est un peu moins simple que celle de la moyenne. Nous allons décrire son calcul pas à pas :

1. On commence par calculer les écarts à la moyenne, c'est-à-dire la différence entre chaque valeur et la moyenne. Il faut noter que la somme de ces écarts à la moyenne est égale à zéro. On démontre, d'ailleurs, que c'est toujours le cas. On ne peut donc pas prendre la somme des écarts comme mesure de la dispersion. C'est pourquoi on fait disparaître le signe négatif en prenant les carrés des écarts.
2. Ces écarts à la moyenne sont donc élevés au carré et additionnés. On obtient ainsi la somme des carrés.
3. Cette somme des carrés est divisée par les ddl pour obtenir les variances. C'est une grandeur fondamentale de la science statistique. On la retrouve partout et il en sera fait un grand usage.
4. Enfin l'écart-type est obtenu en prenant la racine carrée de la variance (Goupy et al, 1999).

c) La valeur de F de Fisher qui est le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus. Il indique la significativité de chacune des actions du modèle, compte tenu du niveau de confiance choisi. La significativité du modèle (valeur F) est une mesure de la variation des données autour de la moyenne. La valeur F indique également l'adéquation du modèle considéré pour prédire les résultats expérimentaux.

- Lorsqu'une action se révèle non significative, elle est éliminée du modèle, et on intègre la variance des actions non significatives dans la variance résiduelle.

d) Le t de Student : pour évaluer l'importance d'un coefficient, la théorie des statistiques compare ce coefficient à son écart-type en faisant le rapport (coefficient/écart type). Ce rapport est appelé le *t de Student*. À partir du *t de Student*, on peut évaluer la probabilité que le coefficient soit nul ou, autrement dit, sans importance ou peu significatif. Cette probabilité est la *p-value*.

e) La valeur-p est utilisée comme un outil pour déterminer l'importance et la significativité de chaque coefficient, plus la *p-value* est faible, plus le coefficient correspondant est important

(Schimmerling et al., 1998 ; Noret al., 2010). C'est le risque maximal de se tromper en affirmant que l'action est influente. p est à comparer à α :

Si $p \leq \alpha$, on en conclut que l'action est influente.

Si $p \geq \alpha$, on en conclut que l'action n'est pas influente.

Une grande valeur de t et une faible valeur de p indiquent que l'effet du paramètre correspondant est important. L'effet du paramètre est estimé en tant que double de la valeur du coefficient de régression pour ce paramètre.

f) Le pourcentage de contribution (PC%) permet de hiérarchiser l'importance des effets significatifs. C'est un indicateur pratique important. Il arrive fréquemment qu'une interaction soit déclarée significative par le test d'analyse de variance, alors qu'un de ses composants quantitatifs ne l'est pas. Cela peut avoir des causes très différentes :

- Soit l'interaction est confondue avec une action (facteur) non prise en compte dans le modèle et qui agit vraiment ;
- Soit le facteur composant l'interaction agit, mais il manque un niveau pour le mettre en évidence ;
- Soit le facteur composant l'interaction agit, mais dans un autre intervalle de variation que celui pris en compte dans le plan. Il peut alors être intéressant de décaler le domaine du facteur en programmant des essais complémentaires.

Après exécution de l'analyse de la variance, les coefficients des actions non significatives sont généralement remplacés par zéro dans le modèle, les coefficients des actions significatives restant inchangés.

IV. 10. Analyse des surfaces de réponse

Les graphes tridimensionnels des surfaces de réponse est une représentation graphique de l'équation de régression. Ils servent à comprendre l'interaction entre les variables et à localiser le niveau optimal de chaque variable pour une réponse maximale (De Lima et al., 2010).

Les coefficients des termes au carré indiquent la nature de la surface de réponse (maximum, minimum ou minimax) et le type des courbes isoréponses (ellipses ou hyperboles). Les valeurs de ces coefficients indiquent la vitesse de variation de la réponse le long des axes de la conique. La variation est rapide si le coefficient est fort, elle est lente si le coefficient est faible (Goupy, 1999).

IV. 11. Optimum multicritère : fonction de désirabilité

La fonction de désirabilité est très utile quand il faut trouver le meilleur compromis entre plusieurs réponses. Cette fonction a été proposée par Derringer et Suich et elle figure dans de nombreux logiciels de plans d'expériences (Goupy et Ceighton, 2006).

L'utilisation du modèle pour la recherche d'une solution nécessite une transformation des réponses afin de les rendre comparables. On utilise ici les fonctions de désirabilité qui facilitent, grâce à des représentations graphiques simples, l'interprétation de ces transformations mathématiques.

La recherche d'un optimum multi-critères avec la fonction désirabilité se fait en trois phases :

- La première phase : consiste à transformer chacune des réponses en une fonction de désirabilité individuelle dont la nature dépend des objectifs de l'étude : la recherche d'un minimum, la recherche d'un maximum ou encore la recherche d'une valeur particulière (valeur cible). Cette transformation donne lieu à une représentation graphique (Fig. IV. 8)

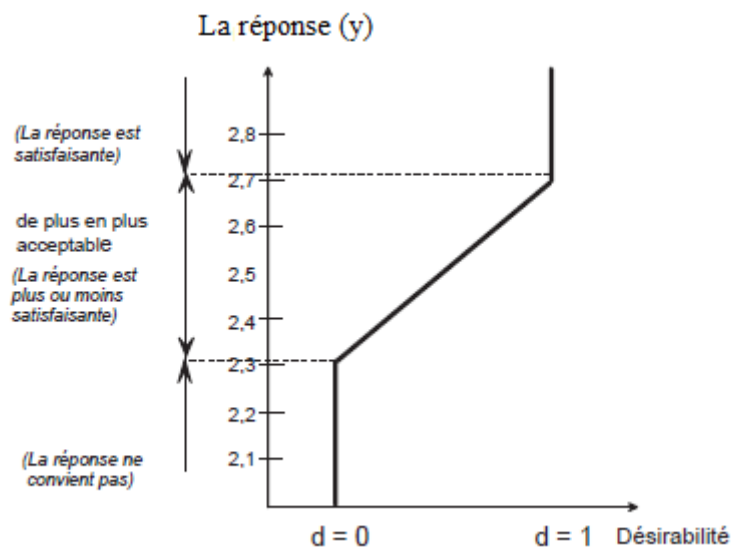


Figure IV. 8. Variation de la fonction de désirabilité en fonction des réponses

Les réponses modélisées ont donc été transformées en fonction de désirabilité variant de 0 à 100%. La désirabilité représente le degré de satisfaction des expérimentateurs en fonction de la valeur obtenue de la réponse modélisée dont on souhaitait les fortes valeurs, après lui avoir donné une valeur cible à atteindre.

On attribue un indice de satisfaction égal à 100% lorsque l'objectif est atteint. Cet indice est égal à zéro si la valeur de la réponse modélisée se situe à l'extérieur de l'intervalle de tolérance qu'on lui a associé.

- La deuxième phase : consiste à définir une fonction de désirabilité globale à partir de la moyenne géométrique des fonctions de désirabilité individuelle (Popov et al., 2010). On peut pondérer les fonctions de désirabilité individuelle dans le calcul de la désirabilité globale pour tenir compte de l'importance relative des réponses :

$$D = \sqrt[n]{d_1 \cdot d_2 \cdot d_3 \cdot \dots \cdot d_n}$$

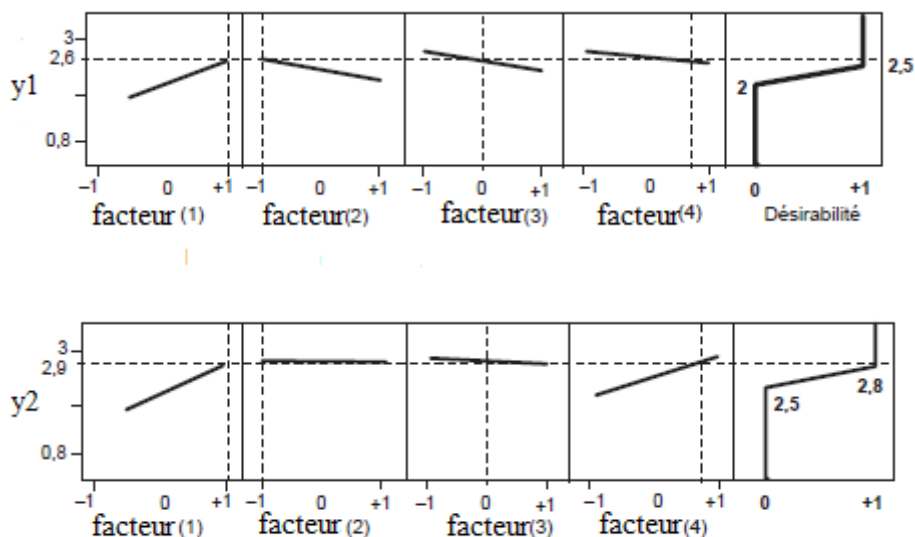
- La troisième phase : consiste à rechercher le niveau des facteurs qui permet d'atteindre le maximum de la fonction de désirabilité globale. Toute valeur strictement positive de la fonction de désirabilité globale traduit un réglage particulier des facteurs permettant d'atteindre, à partir des modèles empiriques, des valeurs des réponses à l'intérieur des intervalles de tolérance. Cette recherche se fait de manière itérative dans les logiciels.

Le meilleur compromis est obtenu pour la plus forte désirabilité globale. Les calculs d'optimisation nécessitent un logiciel programmé pour les réaliser.

La figure IV. 9, illustre la notion de désirabilité globale pour deux réponses différentes (y_1 , y_2). Elle montre que la désirabilité dy_1 dépend des niveaux des 4 facteurs d'étude. Cette courbe vaut (Goupy, 1999) :

- 0 jusqu'à 2 ; passe de 0 à 1 de 2 à 2,5 et vaut 1 au dessus de 2,5 :

$$dy_1 = f(X_1, X_2, X_3, X_4)$$



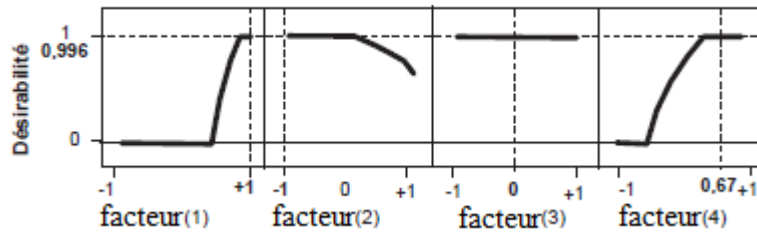


Figure IV. 9. Recherche du niveau des facteurs pour une fonction de désirabilité globale maximale

Il en est de même de la réponse y_2 (Fig. IV.9), mais la fonction de désirabilité est différente de celle de la réponse y_1 : elle vaut 0 jusqu'à 2,5, passe de 0 à 1 de 2,5 à 2,8 et vaut 1 au-dessus de 2,8 :

$$dy_2 = f'(X_1, X_2, X_3, X_4)$$

Le logiciel calcule la valeur de la fonction désirabilité D à partir des fonctions dy_1 et dy_2 . Il obtient une fonction qui dépend des niveaux des quatre facteurs et des fonctions désirabilité choisies pour chaque réponse. Le logiciel calcule la fonction de désirabilité D pour chaque point du domaine d'étude. Par exemple la figure IV. 9, indique que la fonction de désirabilité D vaut 0,996 pour le point en unités codées $X_1=+1$, $X_2=-1$, $X_3=0$, $X_4=0,67$. On obtient ainsi les niveaux des facteurs donnant la désirabilité la plus forte (Karam, 2004).

Chapitre V

Matériels et méthodes

V. 1. Matériels

Trois types de matériau biologique ont été utilisés :

a) Les bactéries lactiques : la première bactérie est homofermentaire *Lactobacillus helveticus* souche *milano* fournie par le Dr. A. Fur (Even Ltd, Ploudaniel, France). Pour sa conservation, elle est cultivée (à 42°C pendant 24h) sur lait écrémé reconstitué à 10% (masse/volume) puis placée à -18°C. La seconde est hétérolactique *Lactobacillus plantarum* DSM 20205 fournie par l'institut Leibniz DSMZ-Allemagne (collection des microorganismes et cultures cellulaire).

b) Les déchets de crevette : ce sont les carapaces, y compris têtes et thorax, provenant des crevettes *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), identifiées au niveau du laboratoire Halieutique de la Faculté des Sciences Biologiques de l'U.S.T.H.B.

c) Les dattes : ce sont des dattes (Deglet Nour) pourries, récoltées au niveau de la wilaya d'El-Oued, destinées à la consommation de bétail.

V. 2. Procédure expérimentale

V. 2. 1. Préparation de la poudre de carapace

Avant leur utilisation, les carapaces des crevettes sont débarrassées de la chair, des antennes et des pattes. Les carapaces, sont ensuite bouillies dans de l'eau, pendant 1h, et ce pour enlever le maximum de tissus. Puis, elles sont séchées dans l'étuve à 163°C pendant 1h (Mukherjee, 2001), on laisse ensuite, refroidir.

Après séchage, les carapaces sont débarrassées d'éventuels tissus encore présents, par frottement. En dernier, les carapaces sont broyées à l'aide d'un broyeur pour obtenir une poudre de granulométrie variable d'environ 0,31 à 1 mm pour étudier l'effet de la granulométrie sur la déminéralisation et la déprotéinisation.

V. 2. 2. Préparation du jus de dattes

Les dattes sont, soigneusement, lavées et dénoyautées. L'eau est additionnée à raison de 2 litres/Kg de pulpes. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 2h. L'extrait obtenu est centrifugé à 5000 r.p.m pendant 30mn afin de séparer les débris celluloses. Le surnageant, recueilli puis dilué aux proportions voulues, est utilisé comme source de carbone et d'énergie pour la croissance bactérienne (Boudjelal et Nancib, 2001).

V. 3. Méthodes analytiques

V. 3. 1. Analyses physico-chimiques de la carapace et du milieu de fermentation

- Détermination du pH à 10% (masse/volume)

Ce paramètre nous permet d'avoir une idée sur le caractère alcalin ou acide de la carapace. Pour estimer son pH, 10 g de poudre de carapace sont mis à macérer dans 100ml d'eau

distillée pendant 1h. La valeur du pH est déterminée par une lecture directe à l'aide d'un pH mètre (METRÔHM).

- Mesure de l'humidité

La teneur en eau de la carapace est déterminée, selon RAO et ses collaborateurs (2000), après un étuvage à 105°C pendant 24h. La perte de masse est équivalente à la quantité d'eau présente dans la carapace. L'humidité H se calculera par :

$$H = \left(\frac{M_0 - M_1}{M_0} \right) \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

H : % d'humidité.

M₀ : masse de la prise d'essai (g).

M₁ : masse de la prise d'essai après étuvage (g).

- Détermination du taux de cendres

Le taux de cendres correspond au pourcentage de la matière minérale présente dans la carapace. Il nous permet ainsi, de déduire le taux ou le pourcentage de déminéralisation de la carapace après la fermentation. Le principe repose sur l'incinération d'1g de poudre de carapace à 900°C pendant 2,5h dans un four à moufle (Mirzadeh et *al.*, 2002). Le taux de minéralisation (TM) se calculera par :

$$TM = \left(\frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \right) \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

M₂ : masse du creuset avec les cendres (g).

M₀ : masse du creuset vide (g).

M₁ : masse du creuset chargé de la prise d'essai (g).

TM : taux de minéralisation avant la fermentation..

Il en déduira le pourcentage de déminéralisation noté DM:

$$DM = \left(\frac{TM_0 - TM_f}{TM_0} \right) \dots\dots\dots(3)$$

TM₀ : taux de minéralisation avant fermentation.

TM_f : taux de minéralisation après fermentation.

- Détermination de la teneur en chitine

La détermination de la teneur en chitine dans les carapaces est réalisée par dosage des résidus N-acétyl glucosamines libérés par hydrolyse acide de la chitine réalisée avec de l'acide chlorhydrique 6N pendant 6h. Le dosage des résidus N-acétyl glucosamines libérés est réalisé selon la méthode de Reissig (Loiseleur, 1963). Il s'agit de la réaction de Morgan-Elson qui, en milieu alcalin et à chaud, les N-acétylhexosamines conduisent à des chromogènes (dérivés du furane) alors qu'en milieu acide, les N-acétylhexosamines se condensent au p-diméthylaminobenzaldéhyde (réactif d'Ehrlich) conduisant à une coloration rouge violacée (Percheron *et al.*, 1981).

Cette méthode utilise deux réactifs :

- Le tetraborate de potassium (Panreac) (réactif A) : solution 0,8M dans le borate. Le pH est ajusté à 9,1 avec KOH (Prolabo).
- Réactif à la p-diméthylaminobenzaldéhyde (réactif B) : on dissout 10mg de ce réactif (Fluka) dans 100ml d'acide acétique glacial très pur (Panreac), qui contient 12,5% en volume de HCl 10N . Le réactif se conserve bien pendant un mois à +2°C. Au moment de l'usage, on le dilue avec 9 volumes d'acide acétique glacial très pur.

Préparation de la gamme étalon

On a choisi une gamme comprise entre 0 et 8mg d'acétyl glucosamine dans un volume d'un litre d'eau distillée. On répartit 0,5ml de chaque solution préparée, de concentration connue, dans une série de tubes à essai. On ajoute 0,1ml de tetraborate de potassium et on chauffe dans un bain marie (Memmert) bouillant pendant exactement trois minutes. On refroidit dans un bain d'eau froide, puis on ajoute 3ml de réactif B. On mélange et on porte immédiatement dans un bain à 36°C. On refroidit dans un bain d'eau froide (20°C) et on lit l'absorbance à 530nm au spectrophotomètre (SECOMAM, modèle Prim) après 20 minutes aussi vite que possible, l'intensité de la couleur baissant d'environ 0,5% toutes les cinq minutes après avoir atteint son maximum en 20 minutes (Loiseleur, 1963).

La teneur des carapaces en chitine (%) se calculera par :

$$Teneur\ en\ chitine = \left(\frac{\text{massed'acétylglucosamine}}{\text{massed'échantillon}} \right) \times 100 \dots\dots\dots(4)$$

La fraction d'azote dans la chitine contenue dans 100g de carapaces se calculera par :
(Cremades *et al.*, 2001)

$$N(\text{chitine}) = \frac{\text{teneur en chitine}}{14,5} \dots\dots\dots (5)$$

- Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl (AFNOR, 1982)

Le dosage de l'azote total dans la carapace, nous permet de calculer le taux de protéines et par conséquent estimer le pourcentage de déprotéinisation de la carapace après fermentation. La méthode utilisée est la celle de Kjeldahl (AFNOR,1982). Elle s'effectue en trois étapes : la minéralisation par l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur, l'alcalinisation des produits de la réaction de minéralisation, la distillation de l'ammoniac libéré et le titrage. L'azote total (N_t) se calculera par :

$$N_t = \left(\frac{0,14 \times V}{m} \right) \dots\dots\dots (6)$$

V : volume d'acide sulfurique versé à la burette lors du titrage (ml).

m : masse de la prise d'essai (g).

Dans le cas des carapaces, l'azote total comprend l'azote protéique et l'azote non protéique qui correspond à l'azote de la chitine : L'azote des protéines ($N_{\text{protéique}}$) se calculera par :

$$N_{\text{protéique}} = N_t - N(\text{chitine}) \dots\dots\dots (7)$$

La teneur en matière azotée protéique (TP) se calculera par :

$$TP = N_{\text{protéique}} \times 6,25 \dots\dots\dots (8)$$

Ce taux de protéines nous permet de calculer le taux de déprotéinisation (DP) de la carapace :

$$DP = \left(\frac{TP_0 - TP_f}{TP_0} \right) \dots\dots\dots (9)$$

TP₀ : taux de protéines avant fermentation.

TP_f : taux de protéines après fermentation.

- Dosage des sucres réducteurs par la méthode de l'acide dinitrosalicylique :

C'est une méthode basée sur la formation d'un chromophore entre le réactif DNS (voir annexes) et les terminaisons réductrices des molécules des sucres. En effet, à température élevée, en milieu basique et en présence des sucres réducteurs, le réactif DNS de couleur jaune est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (brun), et les groupements aldéhyde des sucres sont oxydés en groupements carboxyle.

Mode opératoire :

- Mettre 3ml d'échantillon convenablement dilué dans un tube à essai.
- Ajouter 3ml du réactif DNS. Agitez et plongez-le dans un bain-marie bouillant pendant 5mn.
- Ajouter, alors, 1ml de Rochelle salt (tartrate double de sodium- potassium) et laisser refroidir.
- Lire la densité optique à 575nm.

- Dosage de l'acide lactique :

L'acidité titrable exprime le nombre de grammes de l'acide lactique présent dans un litre d'échantillon. Sa détermination est basée sur le principe de titrage par l'hydroxyde de sodium.

Mode opératoire :

- Prélever 10ml d'échantillon ;
- Titrer l'échantillon jusqu'à un pH de 8,3 avec une solution d'hydroxyde de sodium 0.02M.

- Mesure de la concentration en biomasse

La mesure de l'opacification du milieu de culture est une technique très précise pour mesurer la biomasse, c'est la masse bactérienne sèche présente par unité de volume. Il est en effet possible d'utiliser une loi, analogue à celle de Beer-Lambert (**Leveau et al., 1993**).

Etalonnage : La détermination de la matière sèche cellulaire est la méthode la plus rigoureuse. La biomasse microbienne est récupérée généralement par centrifugation, lavée afin d'éliminer le milieu de culture retenu entre les cellules et séchée à 105°C jusqu'à poids constant (**Scriban, 1999 ; Leveau et al., 1993**).

Mode opératoire :

- 200ml de culture bactérienne sont centrifugées puis lavées avec de l'eau distillée 3 fois ;
- Le culot est remis en suspension dans 60ml d'eau distillée ;
- La DO est lue à 600nm ;
- 50 ml de cette suspension est séchée à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (soit m). La concentration en biomasse notée X se calcule par l'équation suivante :

$$X \text{ (mg/ml)} = \left[\frac{m}{50} \right] \times 10^6 \dots\dots\dots (10)$$

- Le reste (10ml) est utilisé pour la préparation des dilutions à différentes concentrations. Pour chaque dilution, la prise de DO est effectuée à 600nm ;
- La courbe de DO en fonction de la concentration en biomasse est ainsi établie.

V.3. 2. Analyse spectroscopique infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est utilisée pour caractériser les groupements fonctionnels présents à la surface des échantillons (carapace brute et fermentée). Les spectres FTIR ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker IFS113v (Bruker AXS SAS, Champs-sur-Marne, France), dans la région spectrale située entre 4000-500cm⁻¹ avec une résolution de 2cm⁻¹. Les échantillons ont été broyés, mélangés avec du KBr en poudre et ensuite comprimés pour former des pastilles transparentes.

V.3. 3. Analyse par fluorescence aux rayons X

Cette technique permet de déterminer les atomes et leurs proportions respectives dans l'échantillon analysé (carapace brute et fermentée), mais elle ne donne pas l'organisation ou la forme chimique des atomes. La fluorescence des rayons X est effectuée à l'aide de Magix Pro (Panalytical, Limeil-Brevannes, France), pour déterminer la composition élémentaire de la carapace avant et après fermentation lactique. Le logiciel d'analyse est dénommé SuperQ ®.

V.3. 4. Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)

L'échantillon, séché et broyé, est observé grâce à un microscope électronique à balayage ESEM XL 30. Les observations sont réalisées sous une tension allant de 10 à 25 KV et à différents grossissements allant de 1µm à 100 µm .

V. 4. La fermentation

Des cultures en batch ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250- 1000 ml, avec un volume utile de 100- 500 ml, 4- 10g de carapace ont été additionnés au milieu de fermentation et une agitation douce de 200 r.p.m est effectuée afin d'optimiser les paramètres d'extraction et étudier l'effet de leur variation sur les rendements de la biodéminéralisation et de la biodéprotéinisation.

La chaîne d'ensemencement comporte trois étapes qui précèdent l'ensemencement du fermenteur :

- Une pré-culture consiste à prélever quelques colonies, de *Lb. helveticus* ou de *Lb. plantarum* pour les ensemer dans 5ml de milieu MRS liquide puis incubée à 30°C pendant 24h.
- Cette pré-culture servira à ensemer une culture de 10 ml à raison de 5% (volume/volume). Cette culture sera également incubée à 30°C pendant 24h (Rao et al., 2000).
- La culture, ainsi, obtenue servira à ensemer le fermenteur.

V. 5. Optimisation de la fermentation par la méthode des plans d'expériences

L'optimisation de la fermentation par la méthode des plans d'expériences a été réalisée en deux parties successives : la première partie en utilisant une culture pure *Lb. helveticus*, et une deuxième partie, basée sur les résultats de la précédente, a été réalisée en utilisant une co-culture de deux bactéries lactiques *Lb. helveticus* et *Lb. plantarum*.

V. 5. 1. La fermentation par culture pure *Lb. helveticus*

V. 5. 1. 1. Plan « un facteur à la fois »

Le traitement biologique de la carapace de *Parapenaeus longirostris* par *Lactobacillus helveticus* dans le but d'extraire la chitine a été réalisé en étudiant l'influence de quelques paramètres, un à un, qui peuvent jouer un rôle important sur les performances de ce procédé.

Parmi les nombreux facteurs physico-chimiques pouvant influencer la bioextraction de la chitine, trois paramètres jugés importants sont la nature de la source de carbone (glucose et jus de dattes), concentration de la source de carbone (0- 400g/l pour le glucose et 40- 250g/l pour le jus de dattes) et la température d'incubation (30, 40 et 42°C).

Cette étude a permis la compréhension des phénomènes liés à la purification de la chitine à partir des carapaces de crevettes. A cet effet, le suivi dans le temps de fermentation du pH, de la consommation de la source carbonée (glucose ou sucres réducteurs), de la production de biomasse et de l'acide lactique dans le milieu permettra d'atteindre ou d'obtenir des informations très intéressantes.

Il est à noter que tous les essais ont été réalisés dans des erlenmeyers de 250 ml avec un volume utile de 100ml à pH libre avec 10g de poudre de carapace.

Des cinétiques de pH, de consommation de substrat (glucose ou sucres réducteurs) et de production de biomasse ont été suivies en prélevant un volume du milieu de fermentation à différents temps de fermentation. La durée de la fermentation est d'environ 15 jours.

V. 5. 1. 2. Plan composite centré

L'optimisation des paramètres (la concentration en sucres réducteurs présents dans le jus de dattes) (X1), la température d'incubation (X2), la quantité de la poudre de carapace (X3), le volume du milieu de culture (jus datte) (X4), le volume d'inoculum (X5), le traitement thermique (X6), le temps de fermentation (X7), la concentration de la source d'azote [(NH₄)₂Fe(SO₄)₂] (X8), la concentration de la source de calcium (CaCl₂) (X9) et la granulométrie de la poudre de carapace (X10)) pour la déminéralisation et la déprotéinisation des carapaces des crevettes en culture pure par *Lb. helveticus* a été faite par un plan composite central, qui a nécessité trois niveaux codés des variables: (+1), (0) et (-1) (N = 16 expériences avec dix facteurs). Le tableau V. 1 montre les différents niveaux de chaque paramètre. L'évaluation statistique des résultats du plan composé central et l'analyse des données sont réalisées par le logiciel STATISTICA (Version 8).

Tableau V. 1: les niveaux des différents facteurs du plan d'expérience utilisant une souche pure *Lb. helveticus*

	Facteur	Niveau de base	Intervalle de variation	Valeurs des facteurs		
				-1	0	+1
Sucres réducteurs (gL ⁻¹)	X ₁	150	50	100	150	200
Température (°C)	X ₂	30	10	20	30	40
Quantité de la poudre de carapace (g)	X ₃	7	3	4	7	10
Volume du milieu de culture (ml)	X ₄	300	200	100	300	500
Volume de l'inoculum (mL)	X ₅	15	5	10	15	20
Traitement thermique (°C)	X ₆	60	60	0	60	120
Temps de fermentation (h)	X ₇	162	138	24	162	300
Source d'azote (g)	X ₈	1.4	1.4	0	1.4	2.8
Source de calcium (g)	X ₉	0.65	0.65	0	0.65	1.3
Granulométrie (mm)	X ₁₀	0.655	0.655	0.31	0.655	1

V. 5. 2. La co-fermentation par un mélange de bactéries lactiques *Lb. helveticus* et *Lb. plantarum*

Dans le but d'étudier l'influence de la co-culture des deux bactéries lactiques sur le rendement de la bioextraction de la chitine, un autre plan composé centré a été réalisé en utilisant un mélange de bactéries lactiques *Lb. helveticus* et *Lb. plantarum*. En se basant sur les résultats du premier plan composé centré, des paramètres ont été éliminés à savoir (le traitement

thermique, la source d'azote $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ et la granulométrie), d'autres ont été gardés (la concentration en sucres réducteurs (X_1), la température d'incubation (X_2), la quantité de la poudre de carapace (X_3), volume du milieu de fermentation (X_4), volume de l'inoculum *Lb. helveticus* (X_{10}), le temps de fermentation (X_7), la concentration de la source d'azote (NH_4Cl) (X_8), la concentration de la source de calcium (CaCl_2) (X_9).

L'influence de nouveaux paramètres (volume de l'inoculum *Lb. plantarum* (X_5) et le Tween 80 (X_6)) a été introduit.

Le tableau V. 2 montre les différents niveaux de chaque paramètre. L'évaluation statistique des résultats du plan composé central et l'analyse des données sont réalisées par le logiciel STATISTICA (version 8).

Tableau V. 2 : Les niveaux des différents facteurs du plan d'expérience utilisant *Lb. helveticus* et *Lb. plantarum*

	Facteur	Niveau de base	Intervalle de variation	Valeurs des facteurs		
				-1	0	+1
Sucres réducteurs (gL^{-1})	X_1	200	120	80	200	320
Température ($^{\circ}\text{C}$)	X_2	30	10	20	30	40
Quantité de la poudre de carapace (g)	X_3	7	3	4	7	10
Volume de milieu de culture (ml)	X_4	300	200	100	300	500
Volume de l'inoculum (<i>Lb. plantarum</i>)(mL)	X_5	15	5	10	15	20
Tween 80 (ml)	X_6	1	1	0	1	2
Temps de fermentation (h)	X_7	162	138	24	162	300
Source d'azote (g)	X_8	1.4	1.4	0	1.4	2.8
Source de calcium (g)	X_9	0.65	0.65	0	0.65	1.3
Volume de l'inoculum (<i>Lb. helveticus</i>)(mL)	X_{10}	10	10	0	10	20

Il est à noter que le choix de la source d'azote utilisée, dans la présente étude, a porté sur une source d'azote minérale, car on a montré que l'utilisation d'une source d'azote organique complexe telle que l'extrait de levure n'a pas amélioré les rendements de déminéralisation et de déprotéinisation (Arbia et al., 2011). En outre, les ions ammonium influencent le métabolisme de certains acides aminés, chez les lactobacilles, par leur incorporation soit avec α -cétoglutarate ou du glutamate (De Lima et al., 2010). Les ions ammonium sont, d'abord,

converties en acides aminés et ensuite utilisés pour la synthèse des protéines nécessaires à la croissance et à la production d'acide lactique (De Lima et al., 2010).

La déminéralisation DM (Y1) et la déprotéinisation DP (Y2) sont les réponses (variables dépendantes) à modéliser. Le modèle conçu est ensuite validé en utilisant une combinaison aléatoire des variables indépendantes (essai supplémentaire).

Le tableau V. 3 représente la matrice du plan à 16 expériences. Dans notre travail, on a fait appel à un logiciel de la statistique spécialisé pour les plans d'expérience STATISTICA logiciel (version 8) afin d'analyser les données et construire le modèle quadratique. Les conditions optimales de fermentation pour augmenter les rendements de déminéralisation et déprotéinisation sont obtenues par la résolution de l'équation de régression et par l'analyse des graphes de surface de réponse en utilisant le même logiciel.

Tableau V. 3 : La matrice d'expérience pour les deux cultures

Essai n°	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Chapitre VI

Résultats et discussion

VI.1. Caractérisation de la carapace des crevettes et du jus de dattes

La composition physico-chimique de la carapace brute est présentée dans le tableau VI. 1. La carapace brute de *Parapenaeus longirostris* est caractérisée par un pH basique qui varie entre 8 et 9. Selon Rao et coll. (2000), les déchets de crevettes utilisés dans leur travail a, également, atteint cette gamme de pH (8.02 à 8.06). La teneur en cendres est de 25.06%, cette valeur concorde avec celles citées dans la littérature : 20.8% dans les carapaces des écrevisses (Zakaria et al., 1998) et entre 18 et 23% dans les carapaces des crevettes tropicales (Rao et al., 2000). Par contre, les crabes rouges ont montré une plus forte minéralisation d'environ 41.2% (Jung et al., 2005).

La teneur en protéines que renferme la carapace étudiée est de l'ordre de 29.23%. Ce taux est de 22.4% chez les crabes rouges (Jung et al., 2005) et entre 30 et 40% chez la crevette tropicale (Rao et al., 2000). Le taux de la chitine est de 26.98%, il est en accord avec le taux rapporté par No et al.,(1989) (14-27% chez la crevette). Un faible taux d'humidité (3.25%) est obtenu, ce qui indique une faible hydratation.

Tableau VI. 1. Propriétés physico-chimiques des carapaces de crevettes

Paramètres	Valeurs
pH	8-9
Humidité(%)	3.25
Cendres(%)	25.06
Protéines(%)	29.23
Chitine(%)	26.98

Tout procédé de fermentation est lié à la qualité du milieu de culture utilisé. Par conséquent, la détermination de la composition du jus de dattes est nécessaire. Les résultats sont résumés dans le tableau VI. 2.

L'analyse physico-chimique a montré que le jus de datte possède un pH acide allant de 4 à 5.6 et une teneur en sucres réducteurs qui est de l'ordre de 208 g/l. Le dosage d'oligoéléments a montré que le jus de dattes contient environ 75,14mg/l de calcium, 1,58 g/l de potassium, 25 mg/l de sodium et 1mg/l de zinc. Par contre, il présente une faible teneur en protéines (0.086 mg/l).

Tableau VI. 2. La composition de jus de dattes

pH	Sucres réducteurs (g/l)	Minéraux (mg/l)								
		Ca	K	Na	Zn	Fe	Cu	Cr	Cd	Pb
4- 5.6	208	75.14	1580	25	1	0.2	0.29	<0.05	<0.01	<0.01

Cette composition nous a permis d'utiliser le jus de dattes comme milieu de fermentation de la bactérie lactique pour la récupération de la chitine à cause de sa richesse en sucres réducteurs et en éléments minéraux qui sont utiles à la croissance des bactéries ainsi que co-facteurs pour les enzymes protéolytiques.

VI.2. Etude des effets des facteurs physico-chimiques sur la biodéminéralisation et la biodéprotéinisation par la méthode d'« un facteur à la fois » en utilisant une souche pure *Lactobacillus helveticus*.

Une fermentation lactique a été réalisée, à pH libre, dans un volume de fermentation de 100ml où est additionné 10g de carapace et 10% d'inoculum (*Lb. helveticus*) sous une agitation 200 r.p.m. Dans cette partie, trois facteurs ont été variés, un par un, ce sont : la concentration initiale en glucose, la température d'incubation et la nature du substrat (source de carbone). Des taux maximums de DM et de DP ont été recherchés.

VI.2.1. Effet de la concentration initiale en glucose

Différentes concentrations en glucose allant de 20 à 400g/l et une température d'incubation de 30°C, ont permis d'obtenir les résultats représentés dans la figure VI. 1.

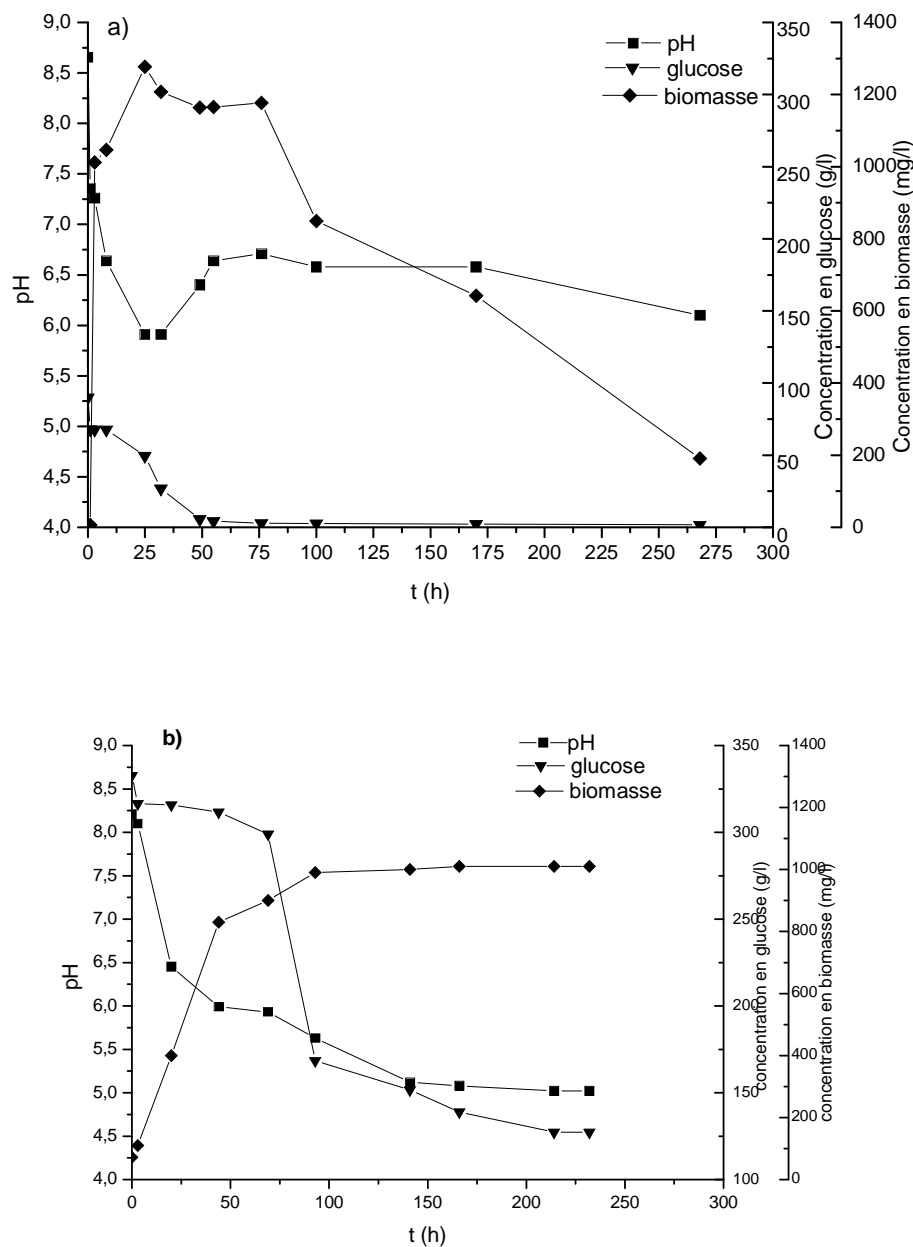


Fig. VI. 1 : Evolution du pH, de la biomasse et de la concentration en glucose en fonction du temps à différentes concentrations initiales en glucose (a) 80g/l et (b) 300g/l (Volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m, température d'incubation 30°C, pH libre)

On remarque que, plus la concentration initiale en glucose augmente plus l'acidification est importante. En effet, avec 20g/l en glucose, la mesure de pH du milieu de fermentation a montré que le pH_{min} est de l'ordre de 6,9 alors qu'avec 80g/l en glucose, il est de 6,19 (Fig. VI.1a). Ceci a conduit à obtenir des taux de déprotéinisation de 30,5% avec 20 g/l en glucose et 76% avec 80 g/l en glucose, alors que le taux de la déminéralisation est nulle

(Fig.VI.2). La très faible acidité du milieu (pH 6,19) est favorable à l'activité des protéases et insuffisante pour la solubilisation des minéraux. En augmentant la concentration en glucose au delà de 80g/l (Fig.VI.2), on note une diminution du taux de déprotéinisation et une augmentation du taux de déminéralisation. Cette dernière commence à avoir lieu à partir de 100g/l en glucose (5,35% de DM) pour atteindre à 300g/l en glucose un taux de 53%. La concentration élevée en glucose (300 g/l) produit une acidification avec un pH_{min} stable de l'ordre de 5,02. (Fig. VI.1b).

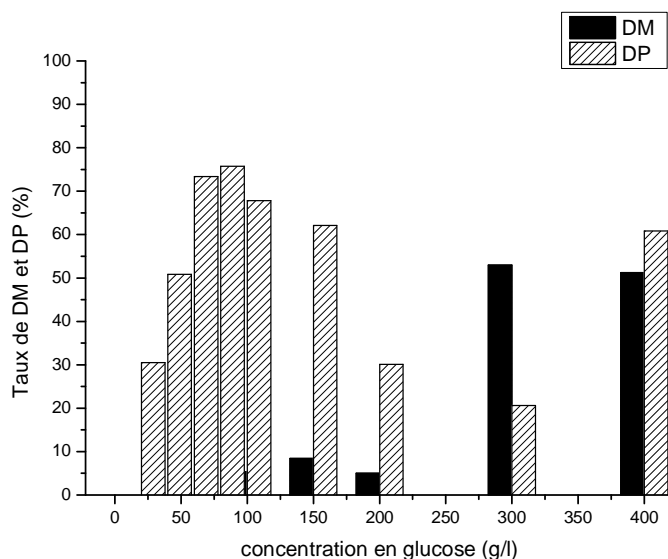


Fig. VI. 2 : Evolution des taux de DM et DP en fonction de la concentration initiale en glucose

VI.2.2. Effet de la température d'incubation

L'influence de la température d'incubation (30°C, 35°C et 42°C) a été étudiée en choisissant deux concentrations en glucose : 80g/l correspondant au meilleur taux de déprotéinisation (76%) et 300g/l correspondant au meilleur taux de déminéralisation (53%) (Fig.VI. 2).

Afin d'éviter la dégradation des enzymes protéolytiques, une seule température de 30°C a été étudiée pour améliorer la déprotéinisation. Par contre, les deux températures 35°C et 42°C ont été étudiées pour améliorer la déminéralisation. Le caractère thermophile du *Lactobacillus helveticus* et son important pouvoir acidifiant à la température optimale de croissance qui est de 42°C (Leveau et al., 1991) justifient le choix effectué.

La figure VI.3 montre qu'à température d'incubation de 35°C, le pH diminue jusqu'à atteindre la valeur de 6,2 au bout de 24h de culture puis remonte moins rapidement pour atteindre une valeur presque neutre située à 6,5 (Fig. VI.3).

Avec 80 g/l en glucose, la remontée du pH plus rapide à 30°C (Fig. VI.1a) qu'à 35°C (Fig.VI.3) montre l'existence du métabolisme oxydatif du glucose par la bactérie (Axelsson, 2004). Ceci est confirmé par l'épuisement total du glucose, initialement présent dans le milieu (80 g/l), qui se transforme en gaz carbonique et en eau. Le calcul du taux de DP, à la fin de la fermentation, a donné 76% de déprotéinisation à la température de 30°C et seulement 9% à la température de 35°C. L'absence de la déminéralisation à 35°C est due à l'insuffisance de l'acidification du milieu (Fig. VI.3). La température de 30°C est donc favorable à l'activité des protéases.

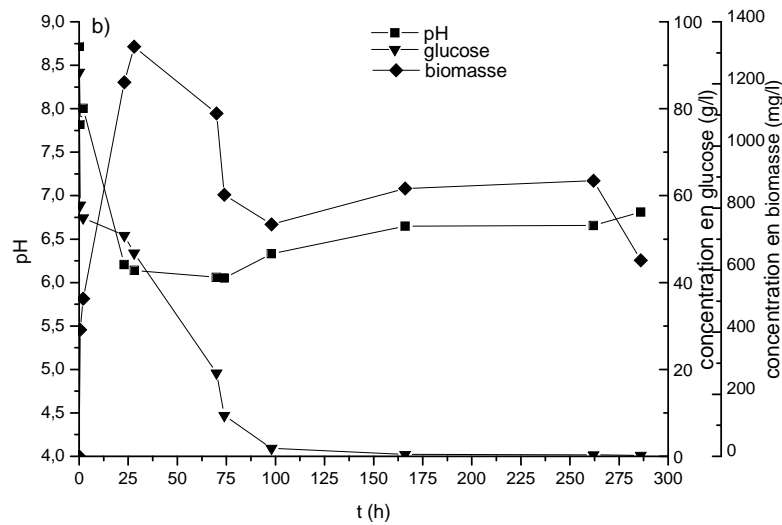


Fig. VI. 3 : Evolution du pH, des concentrations en glucose et en biomasse avec 80g/l glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m., pH libre)

Avec la concentration de 300 g/l en glucose, l'augmentation de la température de 30°C à 42°C, nous a permis d'obtenir les résultats illustrés dans la figure VI.4.

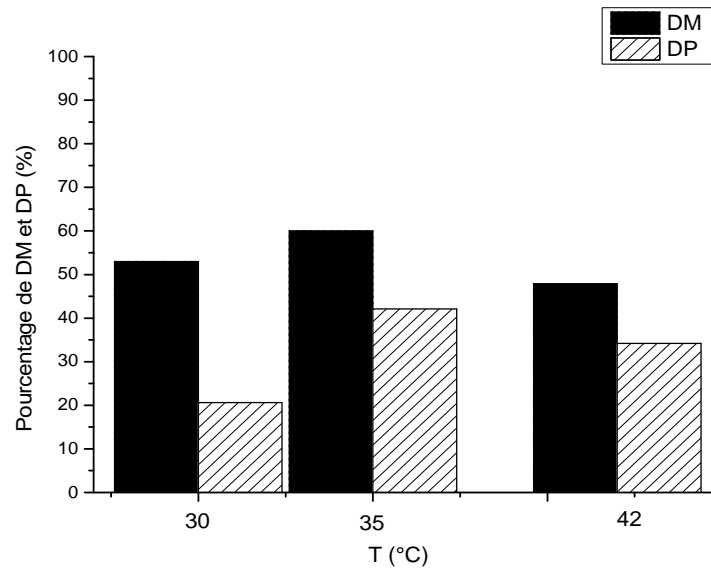


Fig. VI. 4 : Taux de DM et DP à différentes températures et avec 300g/l en glucose

Cette figure montre que la température de 35°C donne les meilleurs rendements en (DM 61% et DP de l'ordre de 42%) par rapport à 30°C (53% de DM et 20,6% de DP) ou à 42°C (48% de DM et 34% de DP).

Afin d'expliquer la différence de ces rendements obtenus, un suivi des cinétiques du pH, des concentrations en glucose et en biomasse à 35°C et à 42°C a été réalisé et les résultats sont représentés sur la figure VI.5.

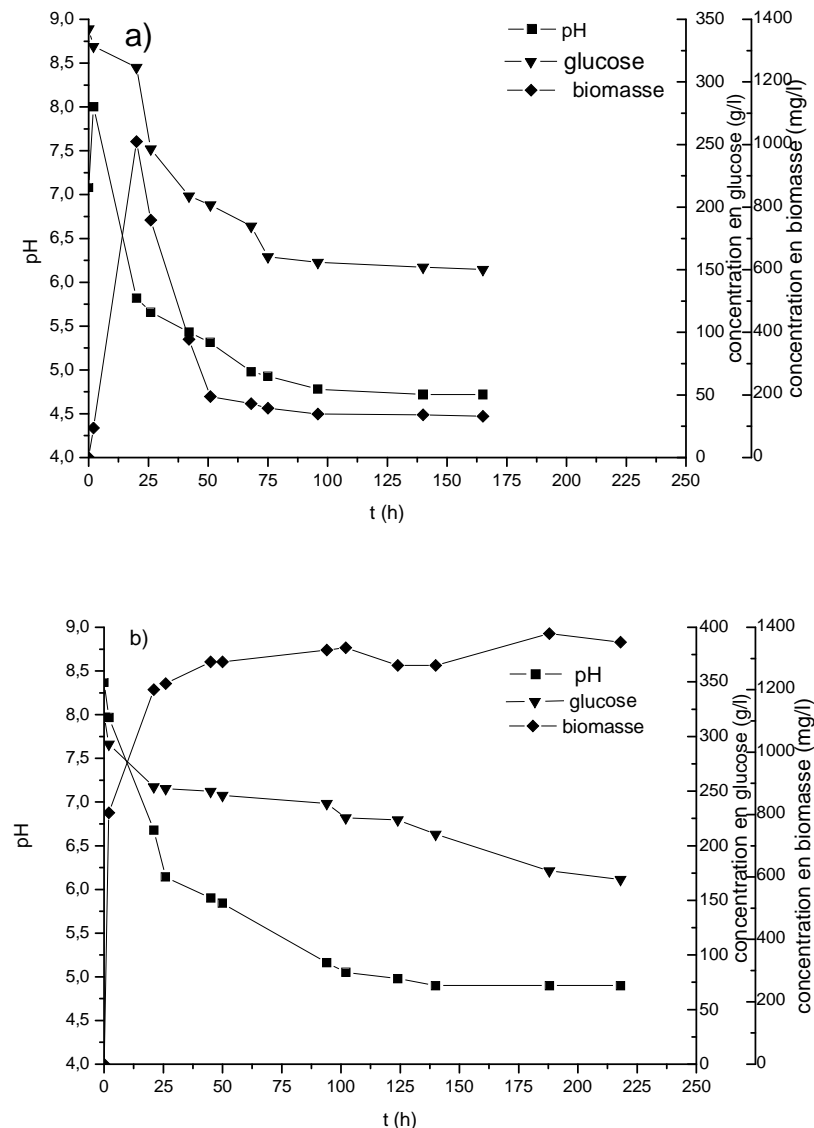


Fig. VI. 5: Evolution du pH, des concentrations en glucose et en biomasse en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 35°C (a) et 42°C (b) (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m, pH libre)

Il est à signaler que sur les courbes donnant l'évolution du pH dans le temps avec 300g/l en glucose, il y a une persistance et une stabilité de l'acidité du milieu de fermentation ($\text{pH}_{\min} = 4,72$ à 35°C et $\text{pH}_{\min} = 4,9$ à 42°C) (Fig. VI.5), contrairement avec 80g/l en glucose ($\text{pH}_{\min} = 6,19$ à 30°C et $\text{pH}_{\min} = 6,2$ à 35°C). Ce résultat s'explique par le métabolisme fermentaire du glucose par la bactérie (Mohammedi, 1993) à cause de l'anoxie créée par la forte concentration en glucose. Il se produit une libération du gaz carbonique dans le milieu, ce gaz résulte de la dissociation du carbonate de calcium (extrait de la carapace) par l'acide lactique produit par *Lactobacillus helveticus* et avec probablement formation du lactate de calcium (Rao et al., 2000).

Le dosage de l'acide lactique produit au cours des deux fermentations confirme le résultat obtenu. La figure VI.6 montre que la quantité finale produite à 35°C est supérieure à celle produite à 42°C, elle est de 7,39 g/l et 5,6 g/l, respectivement.

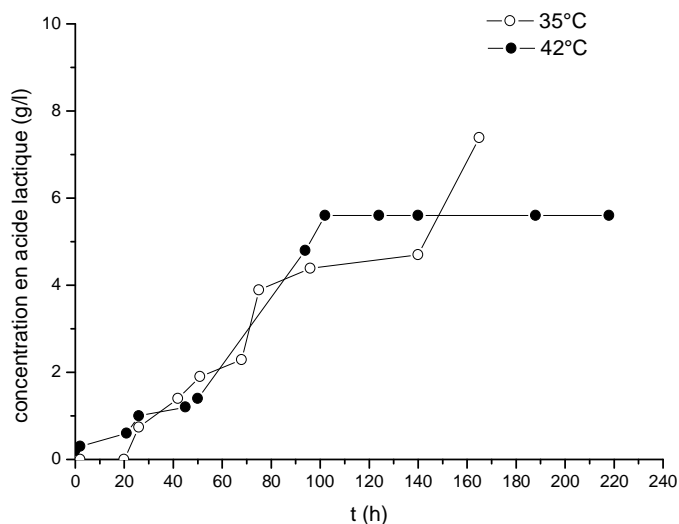


Fig. VI. 6 : Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 35°C et 42°C (Volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m., pH libre)

En conclusion, dans un milieu de fermentation contenant le glucose comme substrat simple, la déprotéinisation maximale des carapaces nécessite une faible concentration en glucose (80g/l) et une température de 30°C. Par contre, la déminéralisation maximale nécessite des conditions totalement différentes : une forte concentration, en glucose (300g/l) et une température d'incubation de 35°C. Cette étude a montré que la bioextraction avec le glucose, comme source de carbone simple, de la chitine des carapaces de crevette s'effectue en deux étapes différentes.

VI.2.3. Effet de la nature de la source de carbone

En ce qui concerne la nature de la source de carbone, plusieurs études d'extraction de la chitine ont travaillé avec différents substrats souvent complexes et naturels. On cite le lactose ou l'extrait du manioc (Jung et al., 2005), les mélasses (Fagbenro, 1996), le lactosérum (Luis et al., 2002).

Dans notre étude, on a choisi un produit alimentaire comme source de carbone car bon marché puisqu'il fait partie de la richesse nationale. Il s'agit « des déchets de dattes » riches en sucres réducteurs. Sa transformation en jus va servir de milieu de fermentation pour la croissance du *Lactobacillus helveticus* en vue de l'extraction de la chitine.

La variation de la concentration en sucres réducteurs allant de 40 à 250g/l et à température d'incubation de 30°C, nous a permis d'obtenir l'histogramme présenté dans la figure VI.7.

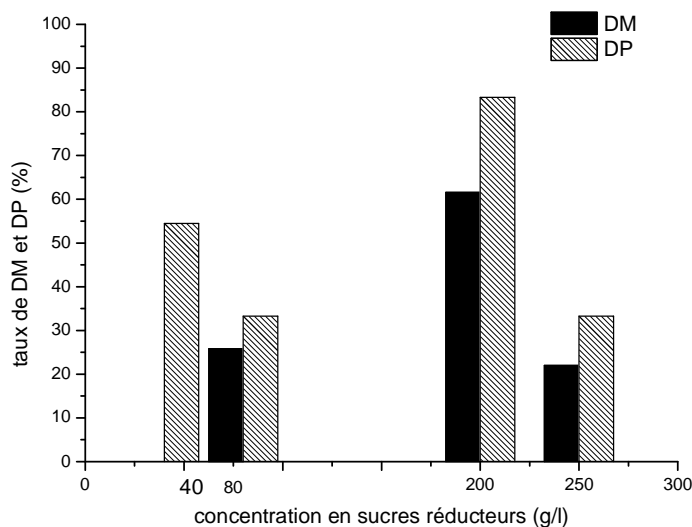


Fig. VI. 7 : Taux de DM et DP à différentes concentrations initiales en sucres réducteurs (40-250g/l)

La figure VI.7 montre qu'avec la concentration de 200g/l en sucres réducteurs, des taux maximums ont été atteints, conjointement, avec 61% de DM et 83% de DP à 30°C.

Le dosage de l'acide lactique produit par *Lactobacillus helveticus* (Fig. VI.8), à la fin de la fermentation, explique clairement ce résultat. En effet, la plus grande quantité d'acide lactique est produite avec une concentration de 200g/l en sucres réducteurs et elle est de l'ordre de 15,98g/l. Notons que cette teneur est très élevée comparativement aux teneurs obtenues avec le glucose (maximum 7,39 g/l) (Fig. VI.6).

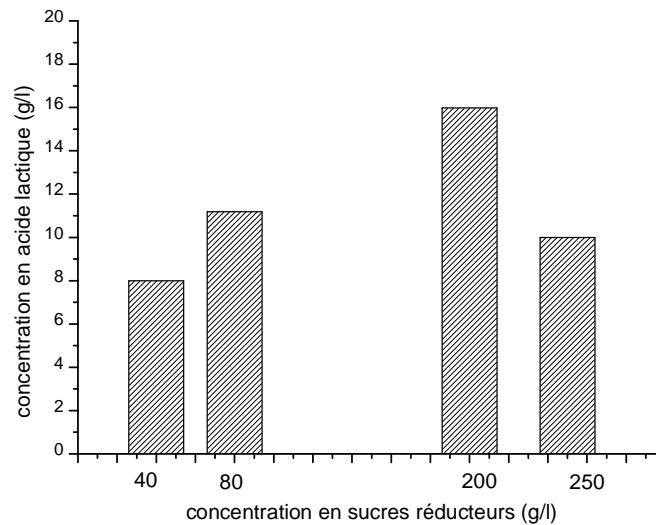


Fig. VI. 8 : Taux de production finale d'acide lactique à différentes concentration initiales en sucres réducteurs (40- 250 g/l)

Les cinétiques d'évolution de pH du milieu, de la consommation des sucres réducteurs, des concentrations en biomasse ainsi qu'en acide lactique produit par la conversion des sucres réducteurs (Fig. VI. 9), montre que la majorité de cet acide était produite entre la phase stationnaire et la phase de déclin de la courbe de croissance et que cette quantité se stabilise à 15,98g/l au pH_{min} de 4,74. Cette stabilisation provoque une déminéralisation de 61% de la carapace des crevettes. Ce taux de DM est identique avec celui obtenu avec le glucose.

Le taux important de déprotéinisation obtenu (83%) est expliqué par l'évolution de pH du milieu au cours du temps (Fig. VI.9). On remarque que le pH diminue pour se stabiliser à une valeur de 6, favorable à l'activité des protéases (Chantal et al., 1996) libérées par la bactérie, pendant une durée de 25h. Au cours de cette phase, correspondante à la phase de croissance proprement dite, nous remarquons que la quantité d'acide lactique produite (Fig. VI.9) est assez faible (environ 3g/l), la déprotéinisation se trouve favorable puis elle commence à augmenter après l'arrêt de la croissance où c'est la déminéralisation qui se trouve favorable.

En outre, la richesse du jus de dattes en oligo-éléments tels que le calcium et le magnésium (Abouzeid et al., 1991) va jouer un rôle de co-facteurs pour les protéases ainsi que d'activateurs de conversion des sucres en acide lactique. Ce résultat peut expliquer l'amélioration du taux DP et la réalisation simultanée des deux étapes avec des taux appréciables (taux de DP 83%), contrairement au milieu additionné de glucose (DM de 61%

avec 300g/l en glucose et à 35°C et DP de 76% avec 80g/l en glucose et à 30°C).

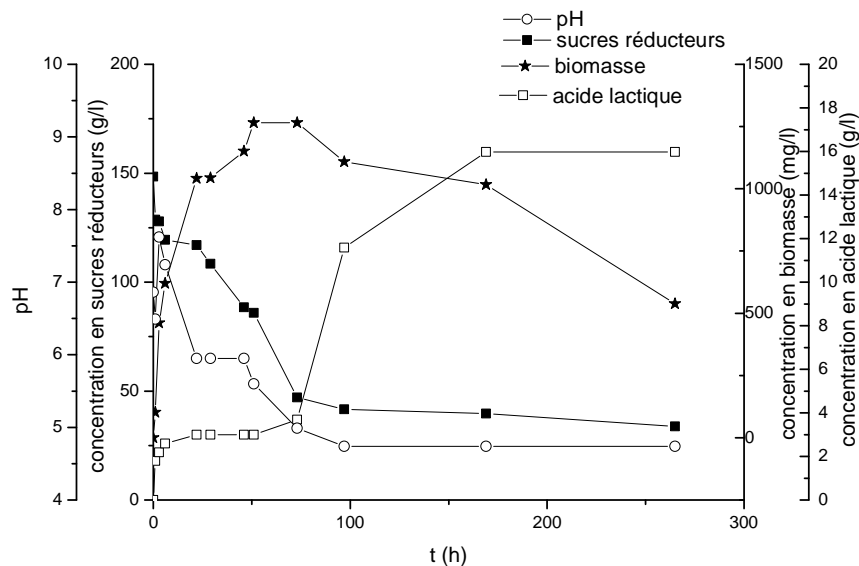


Fig. VI. 9: Evolution du pH, des concentrations en sucres réducteurs, en acide lactique et en biomasse en fonction du temps avec 200g/l en sucres réducteurs à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 rpm)

En conclusion, l'utilisation du jus de dattes comme milieu de fermentation avec une concentration en sucres réducteurs de 200g/l et à une température d'incubation de 30°C, permet conjointement une déprotéinisation et une déminéralisation de la carapace et à des taux appréciables (61% de DM et 83% de DP) contrairement au milieu à base de glucose et au traitement chimique. Ces résultats sont très intéressants du point de vue économique car le déchet de dattes pourra remplacer le milieu synthétique à base de glucose.

VI. 2.4. Caractérisation de la carapace fermentée avec le glucose et le jus de dattes

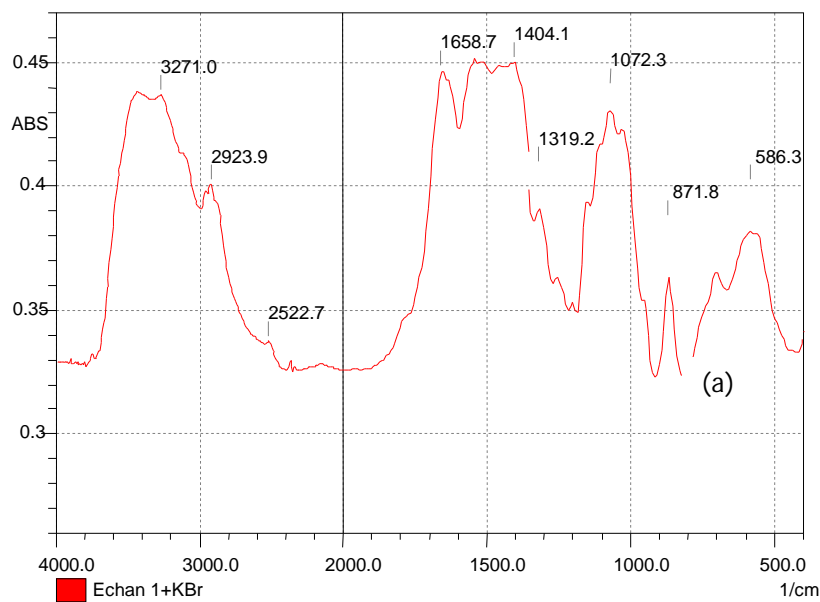
A- Spectroscopie Infra rouge à transformée de Fourier

Les spectres Infrarouge de la carapace brute, de la chitine purifiée et de la chitine commerciale sont présentés dans la figure VI.10. Le spectre de la carapace brute (figure VI.10a) montra la présence des pics caractéristiques de la calcite situés à 871.8 cm^{-1} , 1404.1 cm^{-1} et 2522.7 cm^{-1} et quelques pics de l' α -chitine à 1658.7 cm^{-1} , 1319.2 cm^{-1} , 1072.3 cm^{-1} et 586.3 cm^{-1} (Mikkelsen et al., 1997; Zhou et al., 2005 ; Griffiths et Haseths, 2007 ; Mario et al., 2007; Stawski et al., 2008) (Tableau VI. 3).

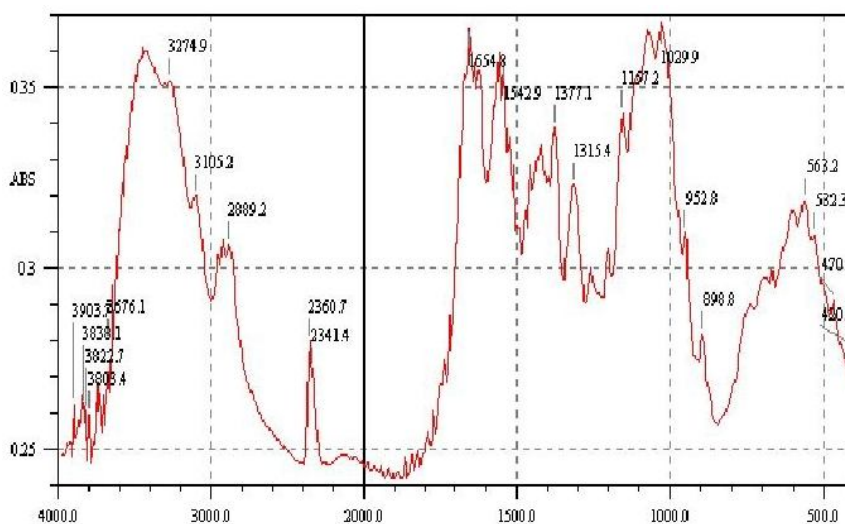
La figure VI.10b (DM 61%, DP 42,14% avec glucose) a montré la disparition des pics caractéristiques de la calcite et l'apparition des bandes intenses à 1658 cm^{-1} et 1558 cm^{-1} . Ces

deux derniers sont spécifiques des amides et correspondent aux vibrations d'élongation des groupements carbonyle, inclus dans les chitines (C=O amide, généralement, appelé amide I) et de NH (amide II), respectivement (Heredia et al., 2007). En outre, le spectre montre, d'une part, la disparition du signal à 1540 cm^{-1} , qui correspond au pic d'absorption des protéines (Goodrich et Winter, 2007) et d'autre part, l'apparition de nouveaux pics à 894.9 cm^{-1} , 1026.1 cm^{-1} , 1157.2 cm^{-1} , 1257.2 cm^{-1} , 1380.9 cm^{-1} , 1558.4 cm^{-1} et 3109.0 cm^{-1} correspondant à l' α -chitine identifiée par la chitine commerciale (Fig. VI.10d).

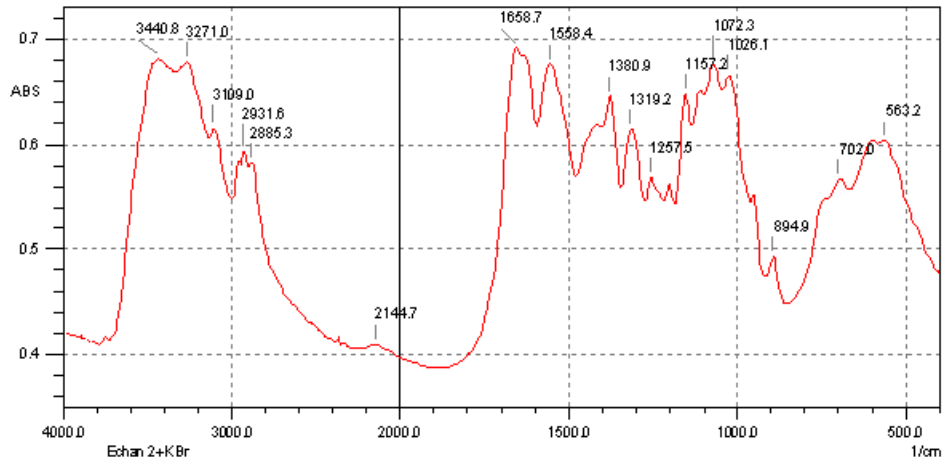
a) carapace brute



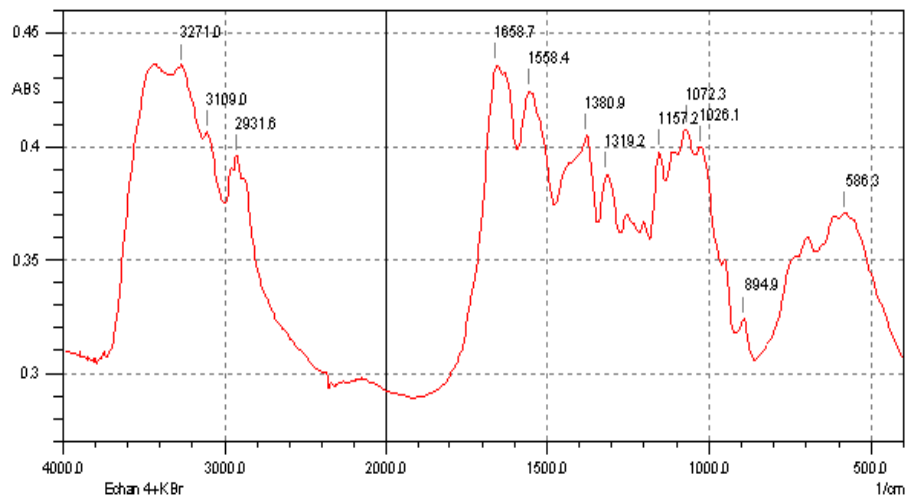
b) chitine fermentée avec du glucose à 30°C (DM 53%, DP 20,6%)



c) chitine fermentée avec du glucose à 35°C (DM 61%, DP 42%)



d) chitine fermentée avec le jus de dattes (DM 61%, DP 83%)



e) chitine commerciale (Sigma Aldriche)

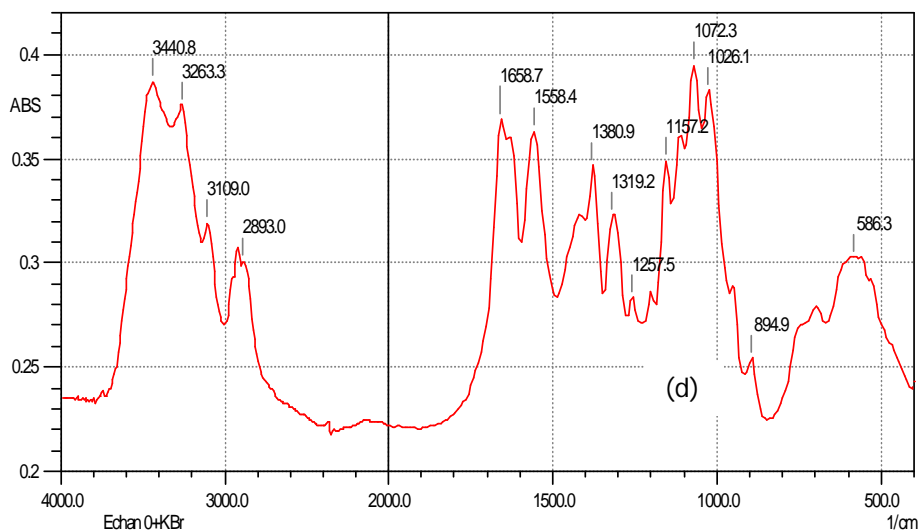


Fig. VI. 10 : Les spectres FTIR (a) de la carapace brute, (b et c) chitine fermentée avec le glucose (d) de la chitine fermentée avec le jus de dattes et (e) de la chitine commerciale

De ce qui précède, la comparaison des différents pics d'absorption et les différentes bandes caractéristiques des groupements fonctionnels, observés dans chaque échantillon, montre une similarité significative avec la chitine commerciale (Fig. VI.10e) et les carapaces fermentées en présence du glucose ou du jus de dattes. On peut donc, conclure que, les pics caractéristiques de l' α -chitine sont observés dans la carapace après fermentation par *Lactobacillus. helveticus* cultivé sur le jus de datte.

Tableau VI. 3. Les pics caractéristiques des échantillons chitine pure, carapace brute, carapace fermentée (Mikkelsen et al., 1997; Zhou et al., 2005 ; Griffiths et Haseths, 2007 ; Mario et al., 2007; Heredia et al., 2007; Stawski et al., 2008)

α -chitine pure	Carapaces fermentées		Carapace brute	Groupements chimiques
	Chitine I	Chitine II		
-	563.2	-	-	
586.3	-	586.3	586.3	
-	702.0	-	-	COC élongation
-	-	-	871.8	calcite
894.9	894.9	894.9	-	COC pont (liaison glucosidique)
1026.1	1026.1	1026.1	-	COC élongation
1072.3	1072.3	1072.3	1072.3	COC élongation
1157.2	1157.2	1157.2	-	Liaison de glucose / COC pont [asymétrique (antisymétrique) élongation]
1257.5	1257.2	-	-	CH élongation
1319.2	1319.2	1319.2	1319.2	Amide III
1380.9	1380.9	1380.9	-	CH élongation
-	-	-	1404.1	Très forte liaison CO de CaCO ₃ (Mikkelsen et al., 1997)
1558.4	1558.4	1558.4	-	Amide II
1658.7	1658.7	1658.7	1658.7	Elongation C = O-NH-CH ₃ (amide I, α -chitine)
-	-	-	2522.7	Calcite
-	2144.7	-	-	élongation CH = C + C (Bertrand, 2006)
-	2885.3	-	-	élongation CH
2893.0	-	-	-	élongation CH
-	-	-	2923.9	élongation CH
-	2931.6	2931.6	-	très forte liaison CH
3109.0	3109.0	3109.0	-	bande amide II
3263.3	-	-	-	liaison hydrogène intermoléculaire C (2 ₁) NH ... O = C (7 ₃)
-	3271.0	3217.0	3271.0	liaison NH
3440.8	3440.8	-	-	liaison hydrogen intramoléculaires OH ...3 CH ₂ OH

Chitine I : carapace fermentée avec le glucose ; Chitine II : carapace fermentée avec le jus de datte

B- Diffraction aux rayons X

Le spectre de diffraction de la carapace brute (figure VI.11), montre la présence de deux pics intenses $2\theta = 19.39^\circ$ et $2\theta = 29.53^\circ$, qui sont les deux pics caractéristiques du carbonate de calcium présent dans la carapace (Hosoda and Kato, 2001 ; Ifuku et al., 2009), ainsi que d'un faible pic à $2\theta = 9,16^\circ$. Dans le cas des carapaces de crevettes, six signaux ont été identifiés: à $2\theta = 9.2^\circ$, 12.55° , 19.15° , 20.8° , 22.95° et 26.15° (Malgorzata et al., 2003). Zhou et coll., (2005), ont montré que l' α -chitine présente des pics de diffraction à $2\theta = 9.3^\circ$, 19.4° et 26.3° . Le travail réalisé par Stawski et coll. (2008) ont montré que pour l' α -chitine, des maxima étaient situés à $2\theta = 20.5^\circ$ et $2\theta = 40.5^\circ$. Abdou et coll. (2008) ont montré que les échantillons de chitine montrent de fortes réflexions à 2θ autour de 9 à 10° et 2θ de 20 à 21° et de faibles réflexions à des valeurs élevées, à savoir à 26.4° et plus.

Les spectres de diffraction aux rayons X des deux échantillons chitine I (fermentée avec du glucose) (Fig. VI.11b) et chitine II (fermentée avec le jus de datte) (Fig. VI.11c) sont largement similaires à celui de l' α -chitine décrit dans la bibliographie.

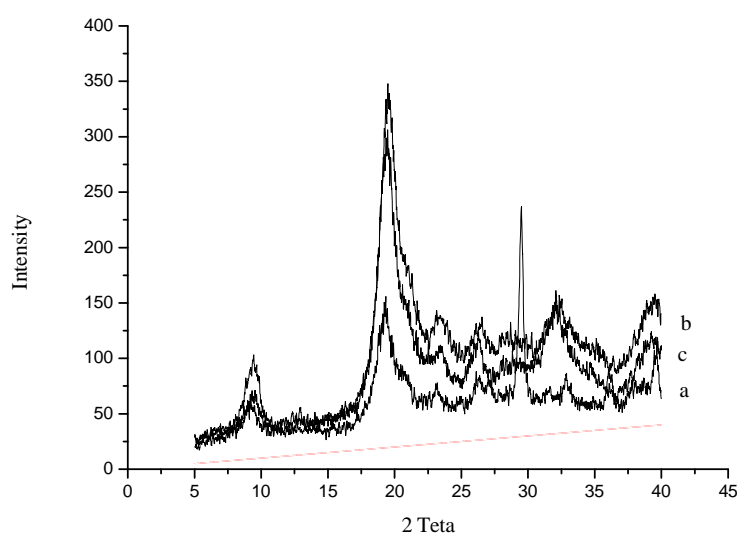


Fig. VI.11 : Spectres de diffraction aux rayons X de (a) la carapace brute, (b) chitine I, (c) chitine II

La cristallinité est un paramètre important car il contrôle un certain nombre de propriétés telles que l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou propriétés de diffusion. La cristallinité est généralement

déterminée par des mesures de diffraction aux rayons X (Crini, 2009). La chitine se trouve naturellement sous forme cristalline ou aussi complexe protéine-chitine. Cette cristallinité est basée sur la liaison de l'hydrogène à travers le groupement acétamide, un groupe hydroxyle et un groupement carbonyle (Nagahama et al., 2009). Les chaînes de polymère peuvent être organisées de différentes manières en fonction de l'origine de la matière, ce qui signifie que la cristallinité est contrôlée également par l'origine de la matière (Crini et al., 2009).

On constate que les deux échantillons ont presque la même cristallinité. Cependant, la chitine I est plus cristalline que la chitine II dont les indices de cristallinité (I_{CR}) sont 77,15% et 72,18%, respectivement (tableau VI.4). Ceci peut être expliqué par les rendements relativement faibles de déminéralisation et déprotéinisation à cause des liaisons covalentes et liaisons hydrogène entre les catechols, protéines et chitine (Wayaruth et Pattarapond, 2010).

Des travaux antérieurs ont montré que l' I_{CR} de la chitine, extraite par la méthode chimique, à partir de différentes sources telles des carapaces de crabe (Griffiths et Haseth, 2007), des carapaces de crabes rizières et *Cicada sloughs* (Wayaruth et Pattarapond, 2010), *Brown crevettes* (*Penaeus aztecus*) et la crevette rose (*Penaeus durarum*) (Abdou et al., 2008) et certains crustacés du golfe Persique (Koweit) (Al Sagheer et al., 2009) est légèrement différente de celle de la chitine retrouvée dans la présente étude.

Tableau VI.4. Valeurs des I_{CR} de différents échantillons de chitine

Échantillon	I_{CR} (%)	2θ (°)
Chitine I (à partir de la carapace fermentée avec le glucose)	77.15	9.30°, 19.45°, 23.35°, 26.42°, 32.33°, 39.41°
Chitine II (à partir de la carapace fermentée avec le jus de dattes)	72.18	9.55°, 19.49°, 23.45°, 26.25°, 32.14°, 39.39°

C- Fluorescence aux rayons X

La composition chimique de la carapace brute et les deux carapaces fermentées a été déterminée par la fluorescence aux rayons X. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI.5. Ils montrent que la majorité des minéraux, initialement, présents dans la carapace brute se retrouvent à l'état de trace dans les carapaces fermentées sauf le Calcium et le Phosphore. Les meilleurs taux de DM dans les carapaces fermentées avec le glucose (300 g/l à 35°C) et le jus de dattes (200 g/l à 30°C) atteignent une valeur de 61%. Ce faible taux

obtenu est en accord avec la présence du calcium et phosphore dans les résidus de la fermentation, confirmés par la fluorescence aux rayons X.

Table VI. 5. La composition chimique de la carapace brute et les carapaces fermentées

Composé (%)	Chitine Commerciale (%)	Carapace brute (%)	Carapaces fermentées (%)	
			Chitine I	Chitine II
Na ₂ O	1.104	1.899	0.018	0.004
MgO	0.406	1.739	0.022	0.014
Al ₂ O ₃	1.808	0.233	0.045	0.037
SiO ₂	0.165	2.202	0.171	0.04
P ₂ O ₅	0.294	5.323	<u>5.323</u>	<u>5.323</u>
CaO	1.425	21.636	<u>8.90</u>	<u>9.01</u>

VI.3. Etude des effets des différents facteurs physico-chimiques sur la déminéralisation et la déprotéinisation par la méthode des surfaces de réponse.

VI.3.1. Comparaison des réponses prédites et expérimentales de DM et DP

Il a été démontré, lors de l'étape précédente que, l'utilisation du jus de dattes est plus efficace que le glucose. En effet, la fermentation des carapaces de crevettes *Parapenaeus longirostris* en présence du *Lactobacillus helveticus* cultivé sur le jus de dattes (200 g/l à 30°C) a conduit conjointement à une diminution importante de la teneur en cendres et en protéines. Cependant, les taux obtenus (61% de DM et 83% de DP) restent insuffisants et ils peuvent être améliorés en tenant compte de la variation de plusieurs autres facteurs. L'utilisation de l'analyse statistique a fait l'objet de la suite de ce travail.

A partir des 10 facteurs choisis (la concentration en sucre réducteurs, la température d'incubation, la quantité de la poudre de carapace, le volume de milieu de culture, le volume de l'inoculum (*Lb. helveticus*), le traitement thermique, le temps de fermentation, la concentration de la source d'azote [(NH₄)₂FeSO₄], la concentration de la source de calcium (CaCl₂) et la granulométrie), la comparaison des réponses prédites et expérimentales présentée dans le tableau VI.6, a montré une bonne qualité d'ajustement du modèle. Cela est dû à l'emplacement exact des points expérimentaux (domaine d'études) retenus pour le plan d'expériences, d'où l'importance du bon choix de ces points avant de commencer l'expérimentation. En outre, le choix du modèle (CCD) doit être le plus proche possible du modèle réel régissant le phénomène étudié. Si ce modèle est mal choisi, d'importantes erreurs de prédiction peuvent être constatées (Goupy, 1999).

Tableau VI. 6. Les rendements de déminéralisation et déprotéinisation obtenu avec la culture pure *Lb. helveticus*

Essai n°	DM (%)		DP (%)	
	A	B	A'	B'
1	79	79	55.52	55.52
2	80	80	65.58	65.58
3	94	94	59.59	59.59
4	98	98	32.43	32.43
5	79	79	33.07	33.07
6	98	98	31.16	31.16
7	90	90	45.50	45.50
8	86	86	78.00	78.00
9	86	86	70.71	70.71
10	84	84	58.09	58.09
11	78	78	60.24	60.24
12	86	86	24.32	24.32
13	96	95.25	54.66	52.47
14	95	95.25	51.89	52.47
15	96	95.25	52.93	52.47
16	94	95.25	40.37	52.47

A et A' Expérimentales,

B et B' Prédites

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont utilisé avec succès cette méthode, on cite Khurana et coll. (2007), qui ont obtenu un coefficient de régression (R^2) significatif de 97.58%, justifiant un ajustement satisfaisant du modèle quadratique avec les données expérimentales obtenues lors de leur travail qui a porté sur la production de xylanase à partir de *Streptomyces violaceoruber*. Ibrahim et coll. (2005), ont travaillé sur l'optimisation du milieu de culture pour la production de β -cyclodextrineglucotransférase utilisant le plan composite central (CCD). Ils ont obtenu un modèle important avec une valeur significative du coefficient de régression (R^2) de 98.9%, ce qui indique que seulement 1,1% de la variation totale n'est pas expliquée par le modèle. Un coefficient de régression de 97.4% est obtenu dans l'étude de l'extraction des lipides réalisée par Sirisompong et coll. (2011).

Le tableau VI.6 montre qu'avec la culture pure de *Lb. helveticus* le rendement le plus élevé de déminéralisation (98%) a été obtenu lors des essais N°4 et N°6. La fermentation des carapaces de crevettes dans un milieu contenant une source de carbone et des bactéries lactiques, conduit à la formation d'acide lactique, suite à la dégradation du substrat carboné. Ce métabolite va s'accumuler dans le milieu puis va réagir avec les carbonates de calcium présents dans les carapaces de crevettes, conduisant à la formation du lactate de calcium

(Choorit et al.,2008) qui va se précipiter dans le milieu et peut être éliminé par un simple lavage (Rao et al., 2000). Le plus faible taux de déminéralisation est obtenu au cours de l'essai N°1 (79%), l'essai N°5 (79%) ainsi que l'essai N°5 (79%). Pour la déprotéinisation, le rendement le plus élevé (78%) est obtenu lors de l'essai N°8, tandis que le rendement le plus faible était de 24.3% obtenu lors de l'essai N°12.

VI.3.2. la fluorescence des rayons X et les examens microscopiques (MEB)

Le tableau VI.7 montre la composition chimique élémentaire des minéraux de la carapace brute et des carapaces fermentées. On remarque que, à la fin de la fermentation lactique, la majorité des minéraux, initialement présents dans la carapace brute, ont été éliminés et ne restent que des traces, à l'exception du fer (Fe) qui est passé de 0 à plus de 4%. Ce résultat est dû à la présence du fer dans la source d'azote minérale $[(NH_4)_2Fe(SO_4)_2]$, qui a été adsorbé par la chitine grâce à ses propriétés fixatrices des métaux lourds (Camci-Unal et Pohl, 2009).

D'autres expériences, dans les conditions de culture des essais N°4 et N°6, ont été réalisées en remplaçant la source d'azote minérale $[(NH_4)_2Fe(SO_4)_2]$ par une autre source minérale NH_4Cl ont conduit à 37.46% et 39.50% de déprotéinisation, respectivement et une déminéralisation quasi-totale confirmant l'hypothèse d'adsorption du fer.

Tableau VI. 7. La composition chimique des carapaces brute et fermentée et de la chitine commerciale (des crabes)

Composés	Carapace brute (%)	Chitine commerciale (%)	Chitine Fermentée (essai N°4) (%)	Essai de validation (%) (tableau VI.10)
Na	<u>2.086</u>	1.104	<u>0.069</u>	<u>0.069</u>
Mg	<u>1.581</u>	0.406	<u>0.171</u>	<u>0.655</u>
Al	0.153	1.808	0.036	0.048
Si	<u>2.232</u>	0.165	<u>0.172</u>	<u>0.095</u>
P	<u>5.467</u>	0.294	<u>1.605</u>	<u>2.32</u>
Mn	0.005	0.555	0.452	0.532
Ti	0.078	n.d	0.06	0.055
K	0.268	0.162	0.160	0.145
Ca	<u>13.334</u>	1.425	<u>0.906</u>	<u>3.044</u>
Fe	0.015	0.297	<u>4.825</u>	<u>4.639</u>
Cu		2.262	0.012	0.008
Pb		4.049	0.005	0.061
Zn		0.138	0.005	0.061
Br		0.479	0.018	0.051
Sr		0.427	0.012	0.034

La figure VI.12 présente les photographies au microscope électronique à balayage (MEB) de la chitine commerciale, de la carapace brute et des chitines extraites des crevettes *Parapenaeus longirostris*, produites lors des essais N°1, N°4, N°15 et de l'essai de validation (tableau VI.7).

Une coupe au niveau de la surface de la carapace de crevette montre une organisation lamellaire parallèle constitué d'un noyau de chaînes de chitine avec des couches de protéines (Fabritius et al., 2011).

La structure de la chitine apparaît comme plusieurs feuilles lâchement unies. Des résultats similaires ont été obtenus avec la chitine isolée des crustacés (Paulino et al., 2006). Ces résultats sont confirmés par la micrographie de la chitine commerciale (fig. VI.12b). En outre, Selon, Yen et coll. (2009), l'examen de la chitine au MEB montre qu'elle présente une structure microfibrillaire cristalline nettement arrangé.

Ainsi, Lavall et coll. (2007) ont constaté que l'espace entre les chaînes de chitine semble être, considérablement, réduit après l'extraction des protéines à partir de la carapace des crevettes. Mais l'apparence observée avant le traitement est préservée, ce qui suggère que la structure native du polysaccharide est également conservé (Lavall et al., 2007).

L'observation des micrographies de la carapace brute et des chitines purifiées obtenues dans la présente étude ont montré beaucoup de similitudes avec ce qui a été rapporté dans la bibliographie (Paulino et al., 2006 ; Lavall et al., 2007 ; Yen et al. 2009 ; Fabritius et al., 2011).

La photographie au MEB de la carapace de la crevette *Parapenaeus longirostris* (Fig. VI.12a) obtenue lors de cette étude corrobore avec les résultats de Fabritius et coll. (2011). Elle présente une structure lamellaire parallèle. Ainsi, les micrographies présentées dans les figures VI.12c, VI.12d, VI.12e, VI.12f, montrent bien la réduction de l'espace entre les feuilles par rapport à la carapace brute (Fig. VI.12a).

En outre, les chitines purifiées (Fig. VI.12d, VI.12e, VI.12f) présentent la même apparence que la chitine commerciale (Fig. VI.12b). On peut bien observer les feuilles parallèles avec réduction de l'espace entre ces dernières, ainsi que la disparition des cristaux de CaCO_3 initialement présents au niveau de la carapace brute.

L'observation de la figure VI. 12e montre bien la structure fibrillaire de la chitine (grossissements 200 et 400).

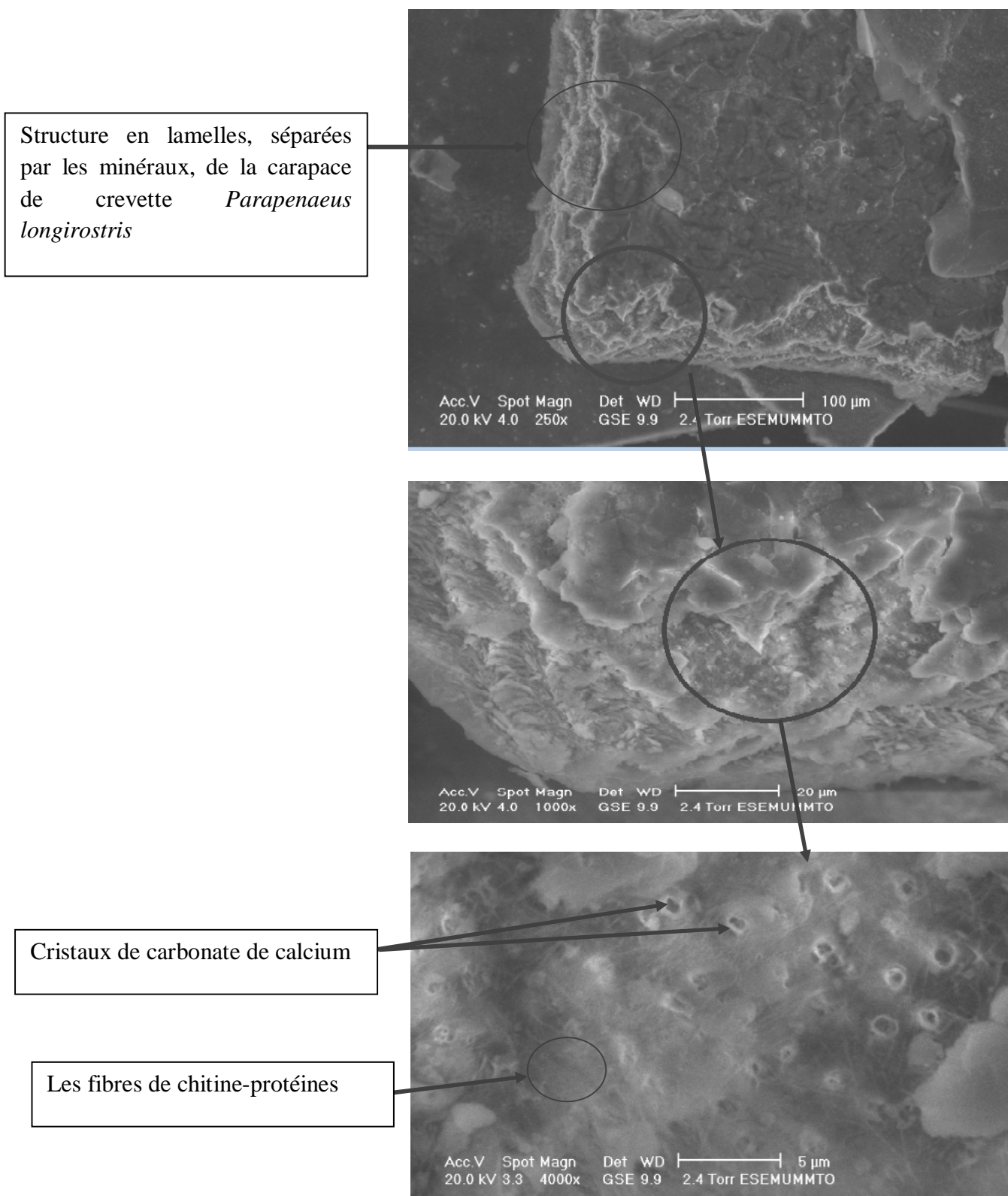


Fig. VI. 12a. Micrographies de la carapace brute aux grossissements 250, 1000 et 4000

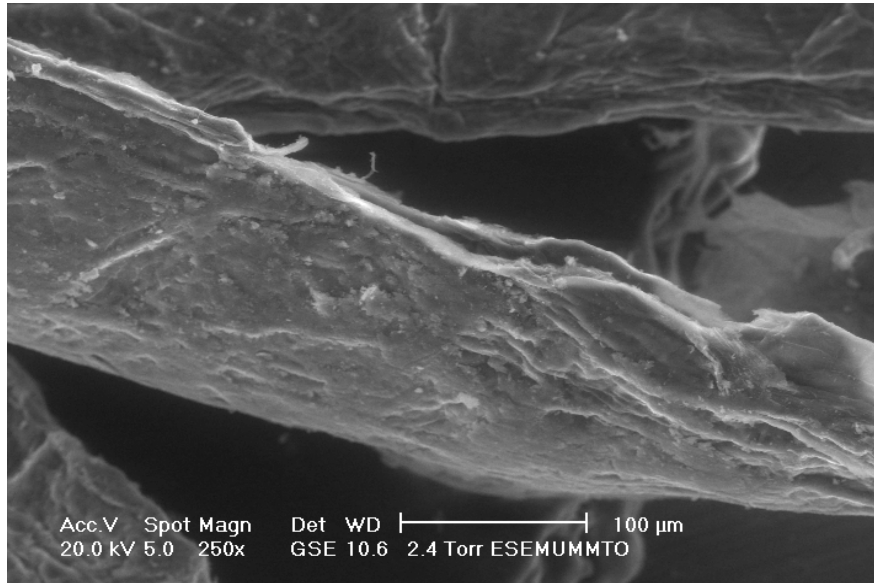


Fig. VI. 12 b. micrographie de la chitine commerciale (structure en feuillet de la chitine)

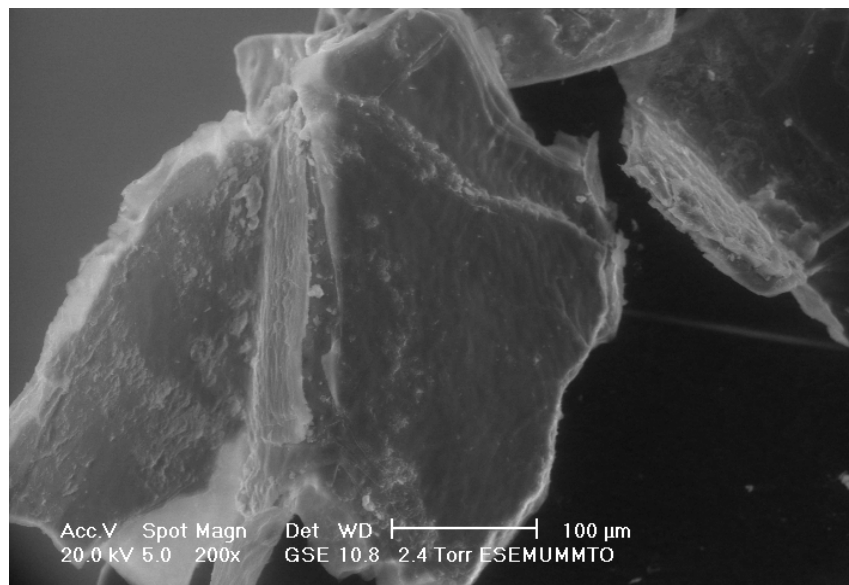


Fig. VI. 12c. micrographie de la chitine purifiée (essai N°1) (79% DM, 55% DP)

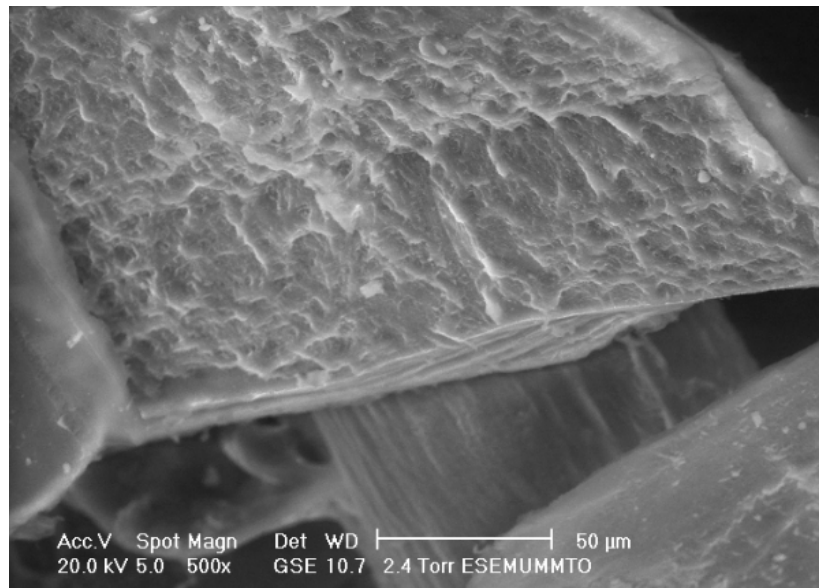


Fig. VI. 12d. chitine purifiée (essai N°4) (98% DM, 32% DP)

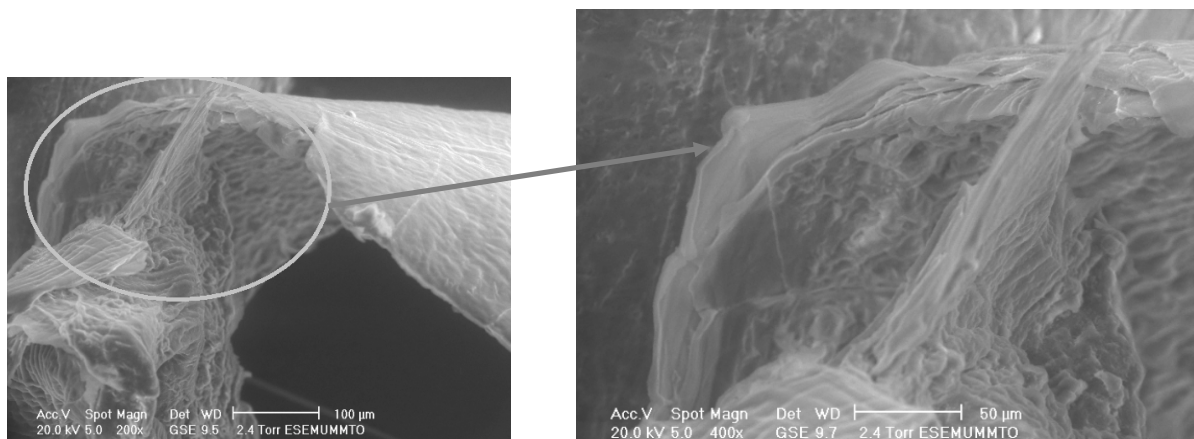


Fig. VI. 12e. chitine purifiée (essai N°15) (96% DM, 53% DP)

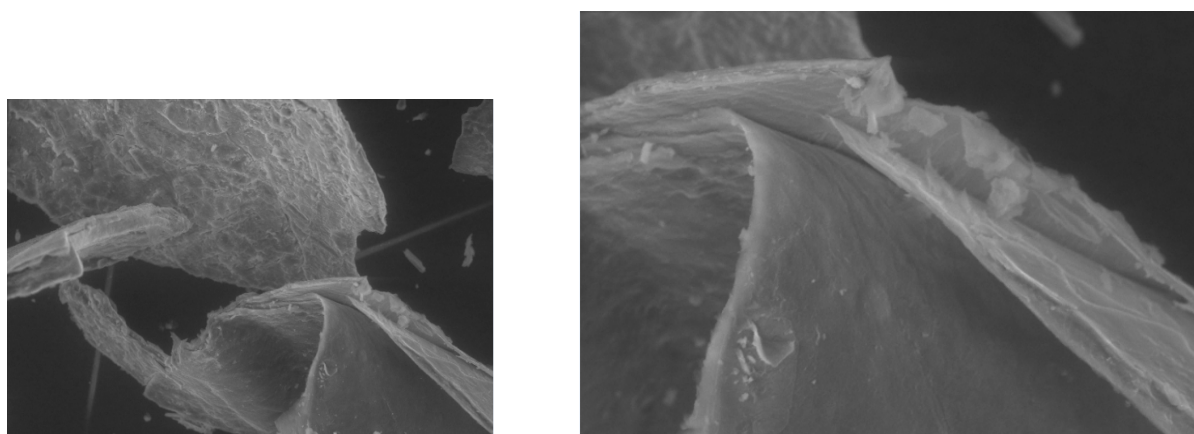


Fig. VI. 12f. chitine purifiée (essai supplémentaire) (89% DM, 16% DP)

Fig. VI. 12. Micrographies obtenues par microscope électronique à balayage

Récemment, beaucoup de progrès ont été signalés dans l'extraction de la chitine à partir des déchets de *Penaeus semisulcatus* (Khanafari et al., 2008). En comparaison avec la méthode chimique (2% de NaOH pour la déprotéinisation et 10% d'acide acétique pour la déminéralisation), le procédé microbien utilisant *Lactobacillus* spp. conduit à une meilleure extraction de la chitine, ceci montre l'efficacité de la fermentation lactique comme une alternative au traitement chimique (Andrade et al., 2003). Dans cette présente étude, ce résultat a été confirmé par différentes techniques : la spectroscopie infrarouge, la fluorescence des rayons X et le microscope électronique à balayage.

Il a été démontré dans ce travail, qu'il y a eu précipitation des cristaux de carbonate de calcium de couleur blanchâtre lors des expériences N°13-16. L'analyse par microscopie électronique à balayage a permis d'obtenir la figure VI. 13.

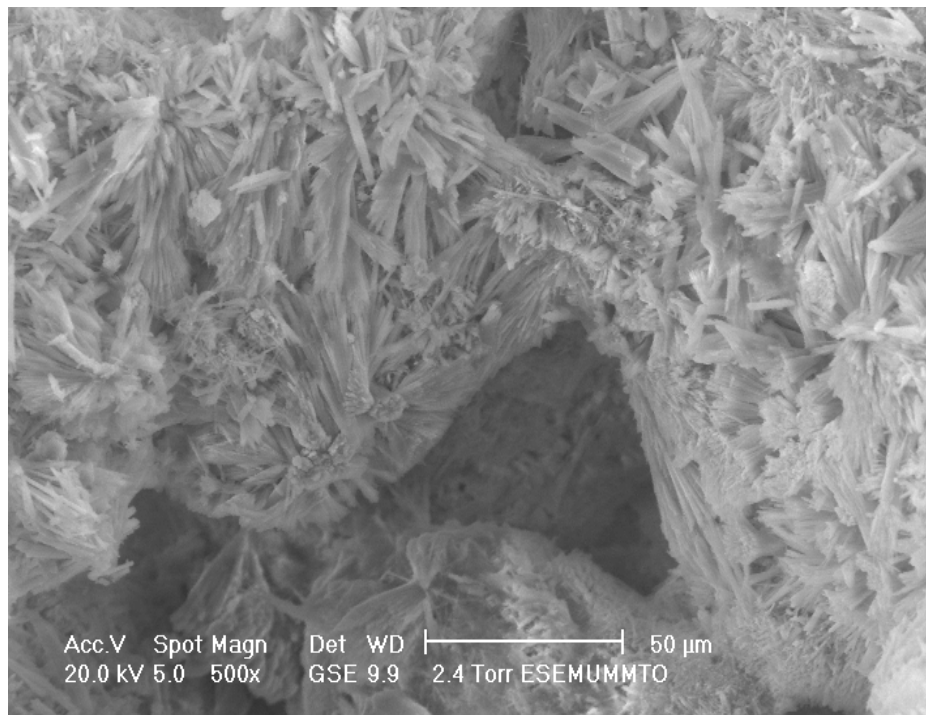


Figure VI. 13. Micrographie des cristaux formés au cours de l'essai N°13

VI.3.3. Les modèles mathématiques décrivant les taux de déminéralisation et de déprotéinisation

L'analyse statistique des résultats des essais a permis d'obtenir les coefficients de l'équation de régression pour les deux réponses (DM et DP) (tableau VI.8).

Le modèle polynomial quadratique complet est indiqué dans les équations 3 et 4 pour la déminéralisation et la déprotéinisation, respectivement:

$$DM = 95.25 - X_1 - 8.75 X_1^2 - X_2 - 2.5 X_3 + 2.5 X_4 - 2 X_5 - X_6 + 5 X_7 + 2.5 X_8 + 0.5 X_9 - X_{10} + 1.5 X_1 X_2 \dots \dots \dots (3)$$

$$DP = 52.47 + 10.41 X_1 - 1.28 X_1^2 + 8.87 X_2 + 1.45 X_3 - 6.92 X_4 - 7.7 X_5 + 7.88 X_6 - 5.6 X_7 - 5.31 X_8 + 4.99 X_9 + 3.06 X_{10} - 15.73 X_1 X_2 \dots \dots \dots (4)$$

Tableau VI. 8. Les coefficients de l'équation de régression pour les deux réponses

Facteurs	Déminéralisation				Déprotéinisation			
	Coefficient	Erreur Standard	<i>t</i>	<i>p</i>	Coefficient <i>t</i>	Erreur standard	<i>t</i>	<i>p</i>
Ordonnée à l'origine	95.25	0.478714	198.9708	0.000000	52.4700	0.895777	58.5748	0.000011
Concentration (X ₁) (L)	-1.00000	0.276385	13.0909	0.036295	10.4092	1.034354	20.1269	0.000268
Concentration (Q)	-8.75000	0.552771	250.5682	0.000548	-1.2858	2.068709	-1.2431	0.302122
Température (L)	-1.00000	0.276385	13.0909	0.036295	8.8708	1.034354	17.1524	0.000432
Quantité de la poudre de carapace (L)	-2.50000	0.390868	40.9091	0.007741	1.4517	1.462798	1.9848	0.141399
Volume du milieu (L)	2.50000	0.390868	40.9091	0.007741	-6.9233	1.462798	-9.4659	0.002499
Volume de l'inoculum (L)	-2.00000	0.390868	26.1818	0.0144446	-7.7050	1.462798	-10.5346	0.001827
Traitement thermique (L)	-1.00000	0.390868	6.5455	0.083330	7.8800	1.462798	10.7739	0.001710
Temps de fermentation (L)	5.00000	0.390868	163.6364	0.001031	-5.6000	1.462798	-7.6566	0.004627
Source d'azote (L)	2.50000	0.390868	40.9091	0.007741	-5.3150	1.462798	-7.2669	0.005378
Source de calcium (L)	0.50000	0.390868	1.6364	0.290795	4.9950	1.462798	6.8294	0.006424
Granulométrie (L)	-1.00000	0.390868	6.5455	0.0833330	3.0683	1.462798	4.1952	0.024707
X ₁ (L)*X ₂ (L)	1.50000	0.829156	3.2727	0.168147	-15.7325	3.103063	-10.1400	0.002043

Le *t* de Student et la *p*-value correspondante ainsi que les coefficients du modèle obtenus sont présentés dans le tableau VI. 8. La *p*-valeur est utilisée comme un outil pour déterminer l'importance de chaque coefficient, plus la *p*-value est faible, plus le coefficient correspondant est important (Noret al., 2010). Le diagramme de Pareto des effets est utilisé pour montrer l'effet de toutes les variables (Pal and Khanum, 2011) sur le taux de la déminéralisation (Fig. VI.14a) et le taux de la déprotéinisation (Fig. VI.14b).

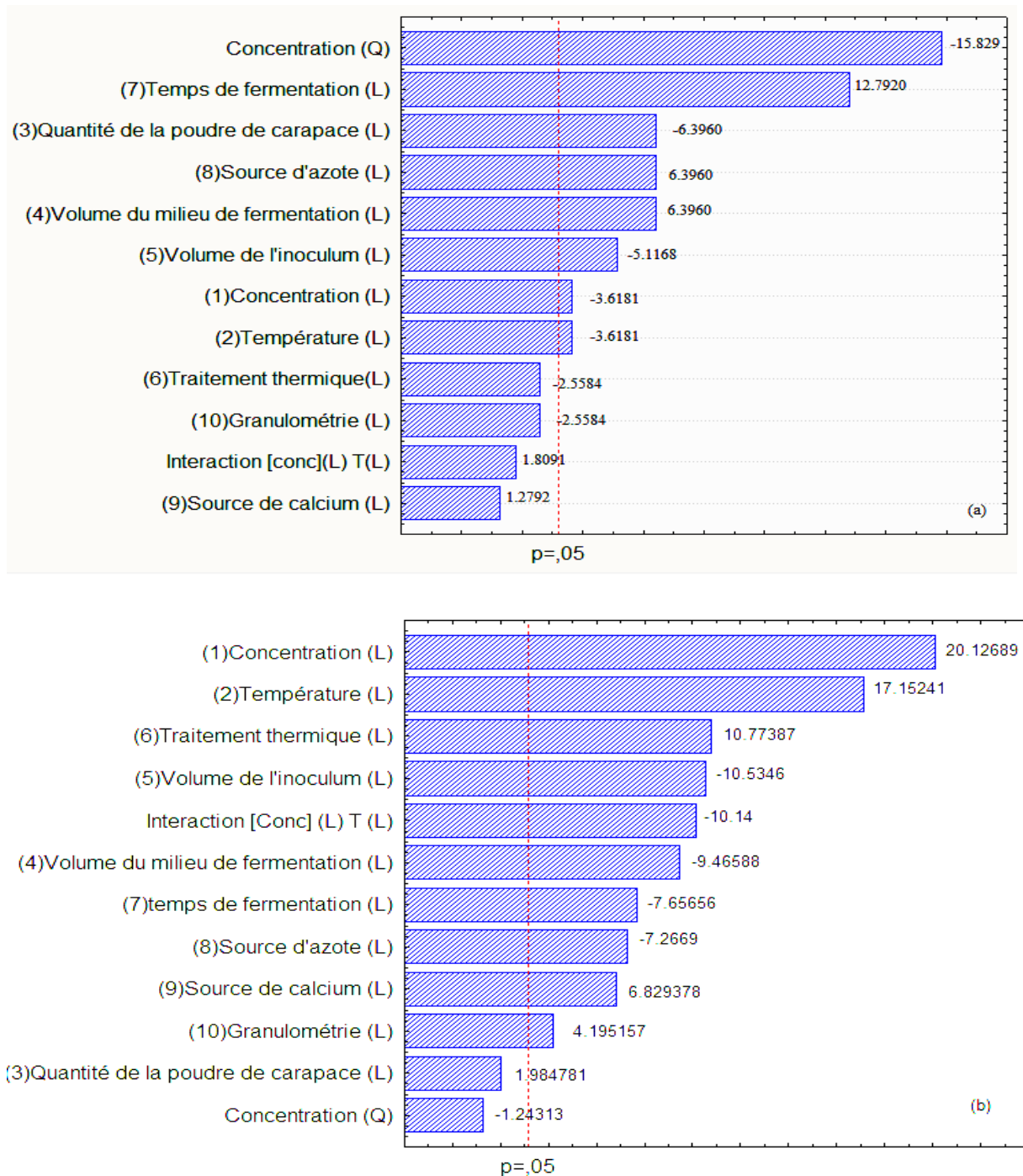


Fig. VI. 14. Le diagramme de Pareto des effets des variables indépendantes sur les taux de (a) DM et (b) DP

VI. 3.3. 1. Déminéralisation

En ce qui concerne la significativité des coefficients polynomiaux, leurs *p*-value faibles indiquent que les principaux facteurs influençant le taux de déminéralisation sont le temps de fermentation et la concentration en sucres réducteurs. La quantité de la poudre de

carapace, le volume du milieu de culture et la concentration de la source d'azote, ces trois facteurs présentent la même p -value et par conséquent ils ont les mêmes effets.

Les résultats ont aussi montré que le temps de fermentation présente un effet le plus important avec un coefficient positif (tableau VI.8), et par conséquent une augmentation de la durée de fermentation conduit à l'augmentation des rendements de déminéralisation. Les mêmes observations ont été obtenues avec le volume du milieu de culture et la concentration de la source d'azote. On note l'absence d'interaction entre les facteurs concentration en sucres réducteurs et température d'incubation ($p = 0.168147$).

Certaines variables indépendantes linéaires à savoir la concentration en sucres réducteurs (X_1), la quantité de la poudre de carapace (X_3) et le carré de la concentration en sucres réducteurs (X_1^2) présentent des signes négatifs, ce qui provoque une diminution du rendement de la déminéralisation lorsque leur concentration ou leur quantité augmente.

VI. 3.3. 2. Déprotéinisation

Pour la déprotéinisation, les facteurs les plus importants sont la concentration en sucres réducteurs, la température, le traitement thermique, la concentration de la source de calcium et la granulométrie de la poudre de carapace avec des coefficients positifs, tandis que les coefficients négatifs sont observés pour le volume du milieu de culture, le volume de l'inoculum, le temps de fermentation et la concentration de la source d'azote. On note l'existence d'une importante interaction négative entre la concentration en sucres réducteurs et la température ($p=0.002043$).

On note, également, que le facteur quadratique présente une valeur élevée de $p= 0.30$, c'est-à-dire pas significatif ce qui nous pousse à conclure que le modèle mathématique qui régit la déprotéinisation est du 1^{er} degré.

V. 3.4.. Analyse de la variance

L'analyse de variance (ANOVA) consiste à rechercher les sources de variation des réponses. Elle est utilisée pour vérifier l'adéquation du modèle. Les résultats de l'ANOVA pour les réponses modélisées sont résumés dans le tableau VI.9. Il en ressort, que le modèle est très significatif ($F 72.42614$, p -value 0.002342) pour la déminéralisation et ($F 87.40538$, p -value 0.001771) pour la déprotéinisation. La significativité du modèle (valeur F) est une mesure de la variation des données autour de la moyenne. La valeur F indique également l'adéquation du modèle considéré pour prédire les résultats expérimentaux. Le tableau VI.8 montre que certains des termes du modèle (traitement thermique, concentration de la source de calcium,

granulométrie de la poudre de carapace et l'interaction de la concentration en sucres réducteurs avec la température), pour la déminéralisation, et (le terme quadratique de la concentration en sucres réducteurs, et la quantité de la poudre de carapace), pour la déprotéinisation ont la p -value (>0.05), et peuvent donc être retirés du modèle, ce qui simplifie les équations du modèle du second degré pour décrire la déminéralisation et du premier degré pour décrire la déprotéinisation. Les nouvelles équations sont donc représentées en (5) et (6) :

$$DM = 95.25 - X_1 - 8.75 X_1^2 - X_2 - 2.5 X_3 + 2.5 X_4 - 2 X_5 + 5 X_7 + 2.5 X_8 - X_{10} \dots \dots \dots (5)$$

$$DP = 52,47 + 10.41 X_1 + 8.87 X_2 - 6.92 X_4 - 7.7 X_5 + 7.88 X_6 - 5.6 X_7 - 5.31 X_8 + 4.99 X_9 + 3.06 X_{10} - 15.73 X_1 X_2 \dots \dots \dots (6)$$

Tableau VI. 9. Analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle de la déminéralisation et de déprotéinisation

Source	Déminéralisation					Déprotéinisation				
	Somme carrées	dl	Moyenne carrées	F	p -value	Somme carrées	dl	Moyenne carrées	F	p -value
Modèle	796.688	12	66.3906	72.42614	0.002342	3366.506	12	280.5421	87.40538	0.001771
Résiduelle	2.750000	3	0.916667			9.629000	3	3.209667		
SC totale	799.4375	15				3376.135	15			

Les graphiques de la figure VI.15 (a) la déminéralisation et (b) la déprotéinisation, représentent la réponse estimée (prédite) en fonction de la réponse observée. Ils peuvent faire apparaître les résultats suspects et les défauts d'adéquation du modèle (Schimmerling et al., 1998). Elle montre un bon ajustement aux données expérimentales. Par conséquent, le modèle peut être considéré comme adéquat pour les prévisions et l'optimisation.

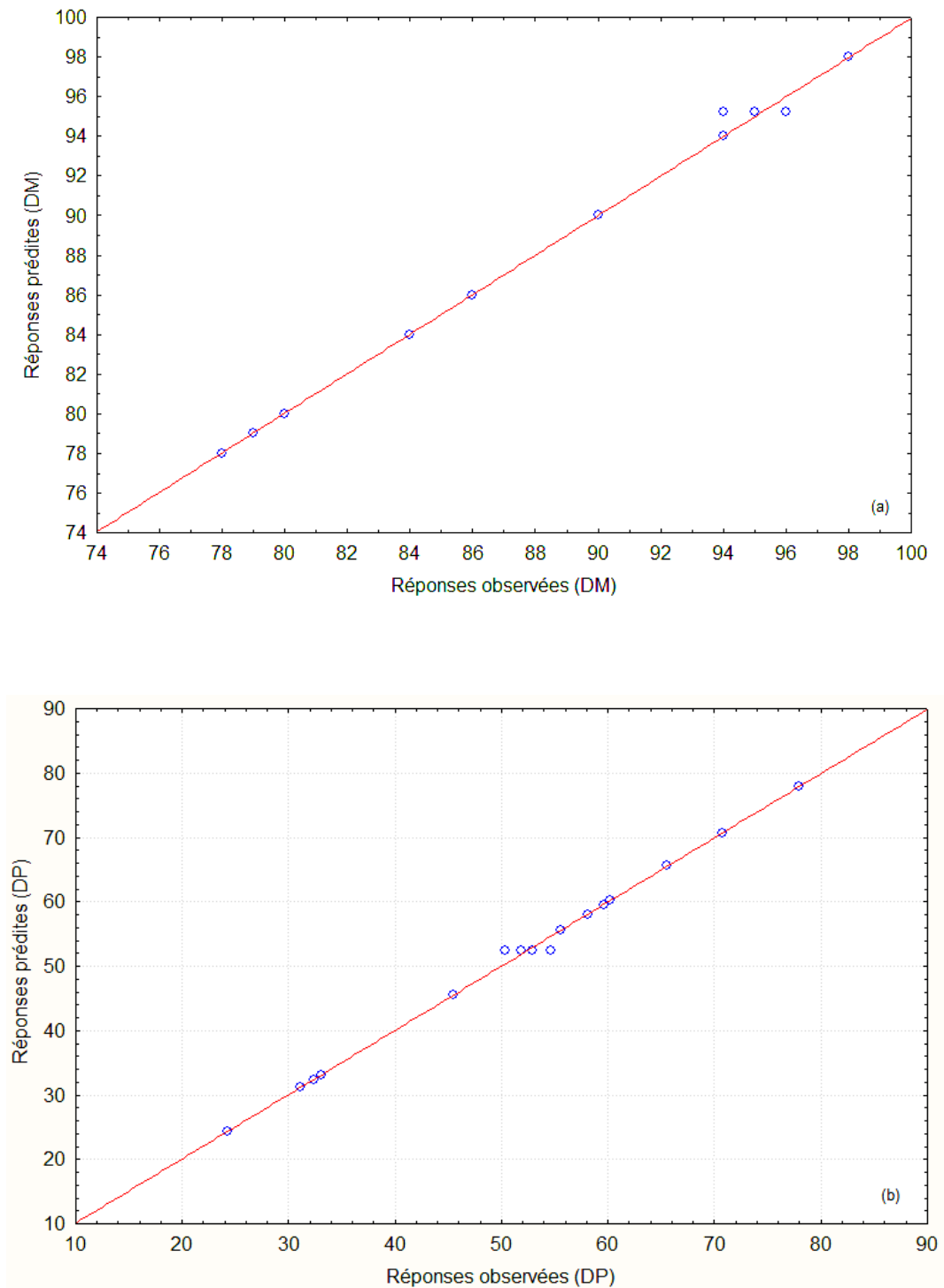


Fig. VI. 15. Réponses prédites en fonction des réponses observées (a) déminéralisation (b) déprotéinisation.

La bonté du modèle peut être vérifiée par la détermination du coefficient R^2 (0.9965 pour la déminéralisation et 0.9971 pour la déprotéinisation), ce qui indique que 99.65% et 99.71% de la variabilité de la déminéralisation et de la déprotéinisation, respectivement,

pourraient être expliquées par le modèle. Les coefficients de détermination R^2 ajusté (0.9828 pour la déminéralisation et 0.9857 pour la déprotéinisation) sont également satisfaisants pour confirmer l'importance du modèle (équations 5 et 6).

VI. 3.5. Analyse des surfaces de réponse

Chaque surface de réponse tracée pour des rendements de déminéralisation et/ou de déprotéinisation, représente les différentes combinaisons de deux variables simultanément tout en maintenant l'autre variable au niveau zéro (De Lima et al., 2010).

VI. 3.5.1. Déminéralisation

La représentation graphique de l'interaction mutuelle entre le temps de fermentation, la concentration en sucres réducteurs et le volume du milieu de culture sur la déminéralisation est illustrée sur la figure VI.16.

Pour la déminéralisation, on remarque que le terme quadratique du facteur concentration en sucres réducteurs (X_1^2) est hautement significatif ($p=0.000548$) par rapport au terme du premier ordre (X_1) ($p=0.036295$) (tableau IV.9), donc il est possible de se rendre compte facilement de la courbure de la surface de réponse qui est sous forme hyperbole et présente un maximum puisque plus on se rapproche de 0 plus la réponse (DM) augmente et plus on s'éloigne de 0 la réponse (DM) diminue (Fig. VI.16a).

La figure VI.16a montre les effets combinés de la concentration en sucres réducteurs et le temps de fermentation sur le rendement de la déminéralisation. On remarque qu'il n'y a pas d'interaction entre ces deux facteurs, chaque facteur agit indépendamment de l'autre. C'est à dire qu'une faible concentration en sucres réducteurs donne un taux de 80% de DM et plus on se rapproche du centre d'étude (150g/l en sucres réducteurs), on obtient 100% de DM quelque soit le temps de fermentation. Et plus le temps de fermentation augmente plus le taux de déminéralisation augmente.

De même, un long temps de fermentation, un volume de milieu de culture élevé (Fig. VI.16b) conduit à 100% de déminéralisation, indépendamment l'un de l'autre.

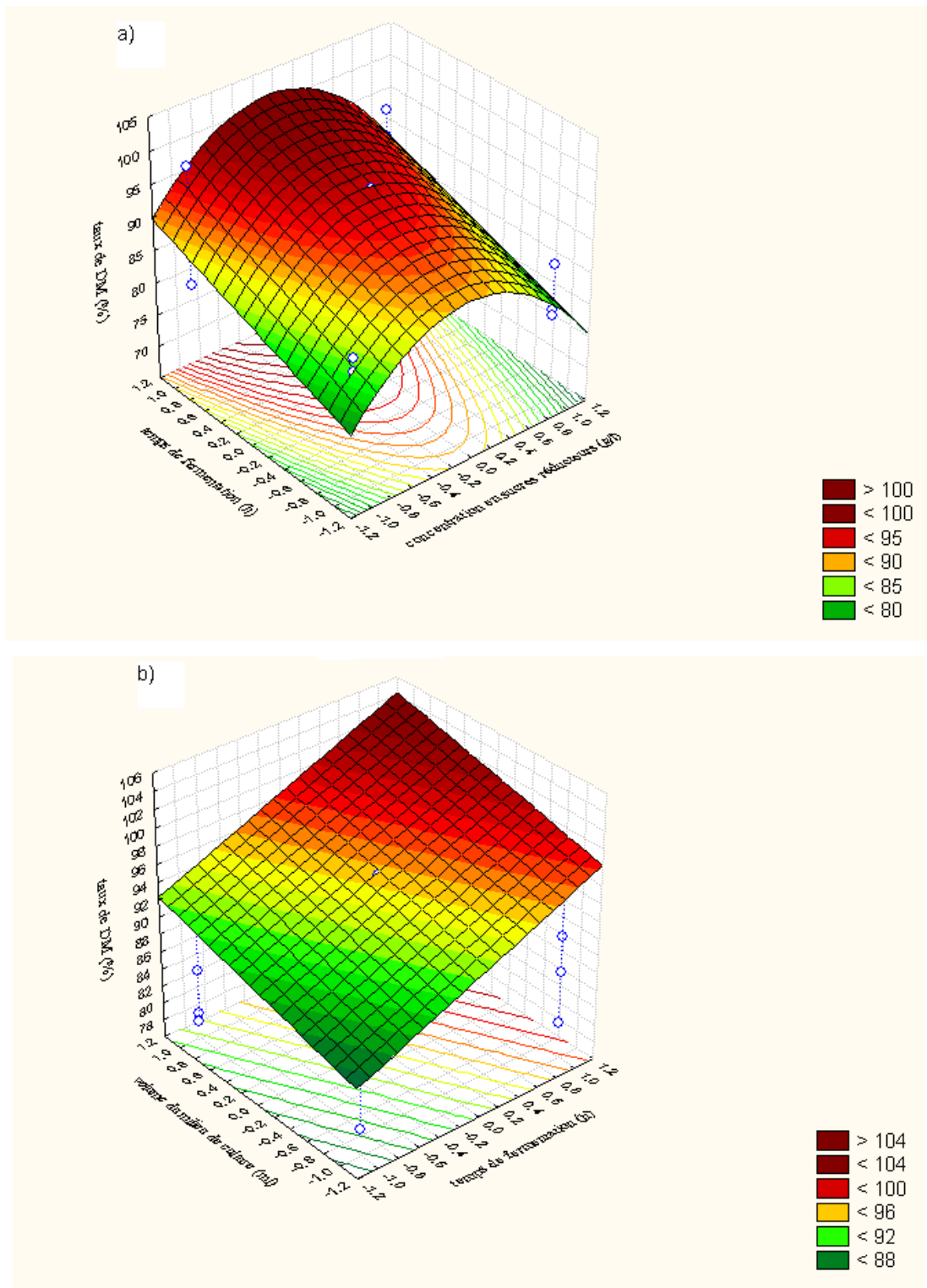


Fig.VI. 16. surfaces de réponse (DM) montrant l'interaction entre le temps de fermentation et (a) la concentration en sucres réducteurs (b) le volume du milieu de culture.

VI. 3.5.2. Déprotéinisation

La figure VI.17a montre une forte interaction négative entre la concentration en sucres réducteurs et la température d'incubation. En effet, l'influence de la concentration en sucres réducteurs est plus importante à des faibles valeurs de température, tandis que l'influence de la température d'incubation est plus prononcée pour des températures d'incubation plus élevées. La figure VI.17b, montre également l'absence d'interactions entre la température d'incubation et le traitement thermique.

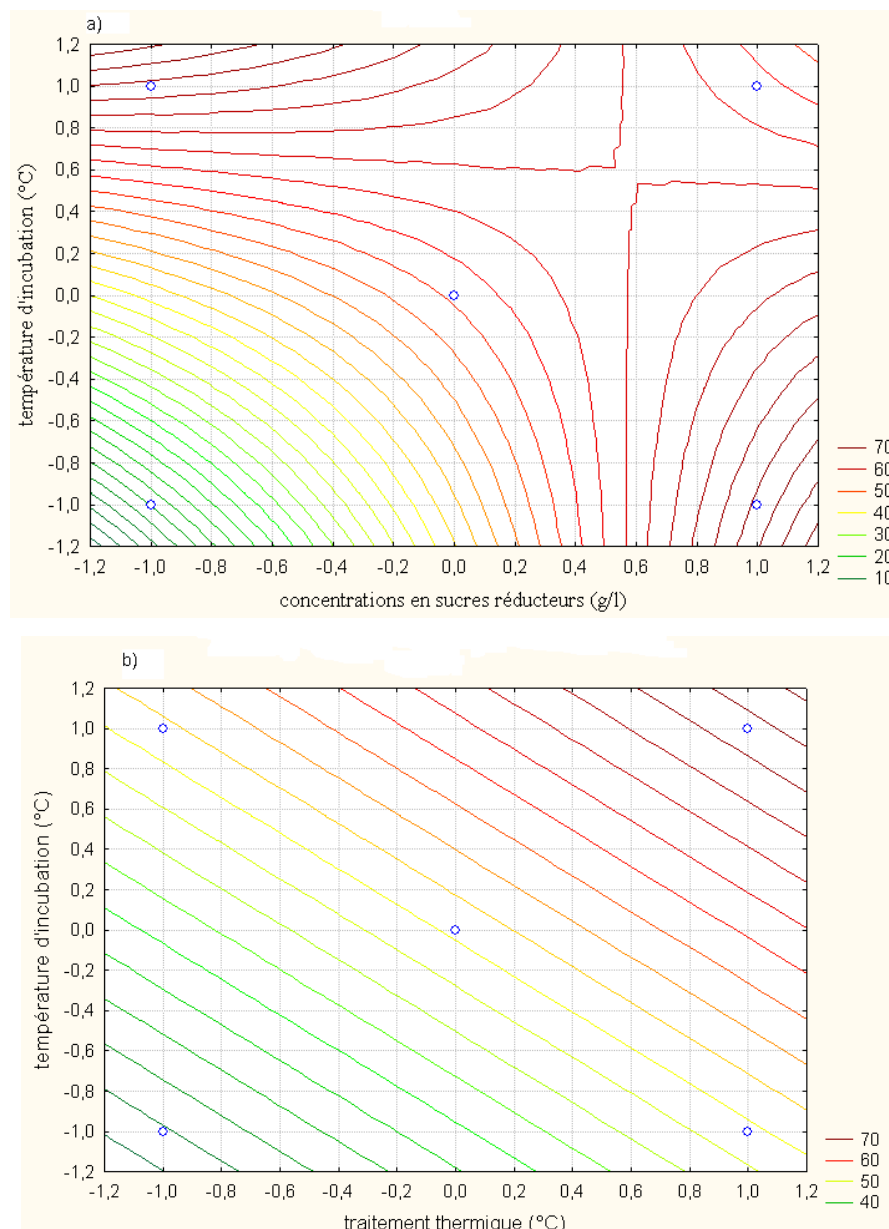


Fig. VI. 17. Surfaces de réponse (DP) montrant l'interaction entre (a) la concentration en sucres réducteurs et la température d'incubation, (b) l'interaction entre le traitement thermique et la température d'incubation.

Le modèle est validé en utilisant une combinaison aléatoire, autres que ceux utilisés pour l'optimisation (Tableau VI.10), des variables indépendantes. Ces valeurs confirment la validité du modèle.

Tableau VI. 10. Les valeurs prédites de DM et DP durant l'expérience de validation du modèle obtenu (essai de validation)

Facteurs	Facteurs Codés	Valeurs facteurs	DM (%)		DP (%)	
			A	B	A'	B'
Concentration (L)	-1	100 g L ⁻¹				
Température (L)	-1	20 °C				
Quantité de la poudre de carapace (L)	-1	4 g				
Volume du milieu (L)	+1	500 mL	89%	95%	16.32%	10%
Volume de l'inoculum (L)	+1	20 mL				
Traitement thermique (L)	+1	0 °C				
Temps de fermentation (L)	-1	24 h				
Source d'azote (L)	+1	2.8 g				
Source de calcium (L)	+1	1.3 g				
Granulométrie (L)	+1	1 mm				

A, A' expérimentales

B, B' prédites

VI. 3.6. La désirabilité

Les résultats de l'optimisation par la fonction de désirabilité pour la maximisation de DM et DP sont donnés dans la figure VI.18.

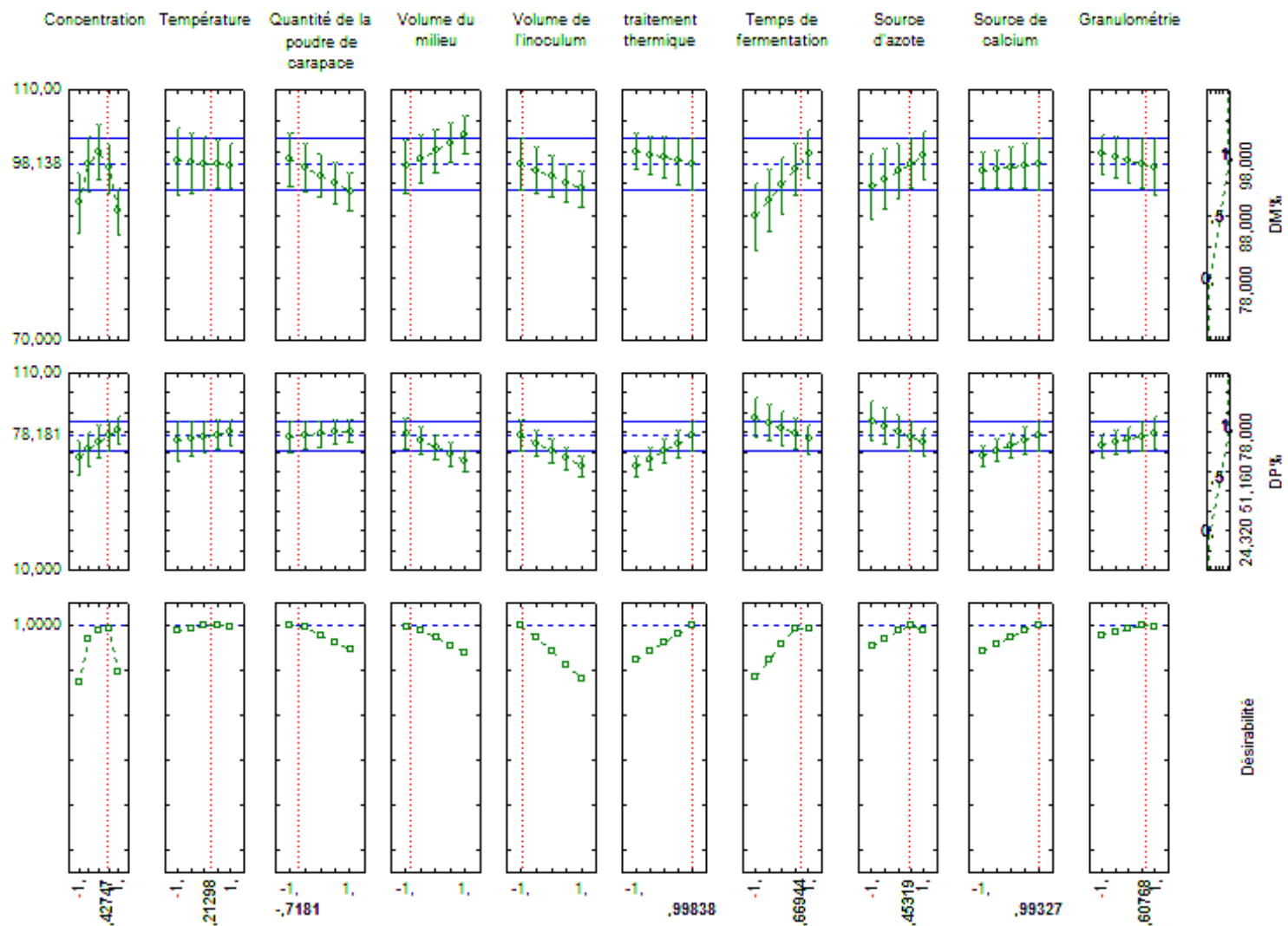


Fig. VI. 18. Profils de désirabilité pour l'optimisation de la déminéralisation (DM) et de la déprotéinisation (DP)

Les niveaux des variables donnant la plus grande désirabilité sont choisis comme niveaux optimum. Les niveaux optimisés des variables (X1, X2,, X10) sont déterminées en utilisant les profils présentés dans la figure VI.18, pour des valeurs prédites de DM et DP. Les facteurs optimisés donnant les rendements les plus élevés de DM et DP, 98% et 78%, respectivement, sont rassemblés dans le tableau VI. 11.

Tableau VI.11. Les facteurs optimisés donnant les meilleurs rendements de DM et DP

Facteurs	Facteurs Codés	Valeurs des Facteurs	DM (%)		DP (%)	
			A	B	A'	B'
Concentration en sucres réducteurs (L)	0.42747	171.37 g L ⁻¹	98	98	78	76
Température (L)	0.21298	32.13 °C				
Quantité de la poudre de carapace (L)	-0.7181	4.84 g				
Volume de milieu de culture (L)	-1	100 mL				
Volume de l'inoculum (L)	-1	10 mL				
Traitement thermique (L)	0.99838	119.9 °C				
Temps de fermentation (L)	0.66944	254.38 h (10 jours)				
Source d'azote (L)	0.45319	2.03 g				
Source de calcium (L)	0.99327	1.29 g				
Granulométrie (L)	0.60768	1.053 mm				

VI.4. Etude des effets des différents facteurs physico-chimiques sur la déminéralisation et la déprotéinisation par la méthode des surfaces de réponse.

VI.4.1. Comparaison des réponses prédites et expérimentales de DM et DP utilisant une co-culture de bactéries lactiques : *Lb. plantarum* et *Lb. helveticus*

L'objectif de cette étude est la mise en évidence de l'effet de la co-culture de deux bactéries lactiques, l'une hétérofermentaire *Lb. plantarum* et l'autre homofermentaire *Lb. helveticus* pour la récupération de la chitine à partir de carapace de la crevette *Parapenaeus longirostris* en utilisant un modèle composé central avec toutes les combinaisons des facteurs suivants : concentration en sucres réducteurs (X₁), température (X₂), quantité de carapace dans le milieu (X₃), volume du milieu de culture (X₄), volume de l'inoculum *Lb. plantarum* (X₅), Tween 80 (X₆), temps de fermentation (X₇), concentration de la source d'azote (NH₄Cl) (X₈), concentration de la source de calcium (X₉) et volume de l'inoculum *Lb. helveticus* (X₁₀).

Tableau VI. 12. Les rendements de déminéralisation et déprotéinisation obtenu avec la co-culture *Lb. helveticus* et *Lb.plantarum*

Essai n°	DM (%)		DP (%)	
	A	B	A'	B'
1	95	95	0	0
2	67	67	6.08	6.08
3	<u>100</u>	100	63.63	63.63
4	73	73	8.4	8.4
5	70	70	80.12	80.12
6	<u>100</u>	100	4.74	4.74
7	72	72	26.61	26.61
8	85	85	85.5	85.5
9	67	67	75.43	75.43
10	84	84	72.1	72.1
11	30	30	46.12	46.12
12	77	77	66.32	66.32
13	95	92.5	55.68	53.54
14	95	92.5	56.89	53.54
15	90	92.5	50.86	53.54
16	90	95.5	50.75	53.54

A et A' Expérimentales,

B et B' Prédites

Le tableau VI.12 montre que le taux le plus élevé de la déminéralisation (100%) a été obtenu durant les expériences N°3 et N° 6. Le plus faible taux de déminéralisation (67%) a été obtenu avec les expériences N° 2 et 9 (tableau VI.12). Pour la déprotéinisation, le taux le plus élevé (85 %) a été obtenu durant l'expérience N°8; alors que le taux le plus faible (0%) est obtenu durant l'expérience N°1 (tableau VI.12). La comparaison des réponses prédites et expérimentales présentées dans le tableau VI.12, a montré une bonne qualité d'ajustement du modèle.

Cette méthode est avantageuse par rapport aux méthodes conventionnelles disponibles et nécessite un nombre faible d'expérimentation. Elle est adaptée à de multiples facteurs expérimentaux et à la recherche de relation commune entre les différents facteurs en vue de trouver les conditions les plus appropriées pour les procédés étudiés (Rajasimman and Karthic, 2010).

VI. 4. 2. Les modèles mathématiques décrivant les taux de déminéralisation et de déprotéinisation

L'importance des variables indépendantes et de leurs interactions a été testée au moyen de l'ANOVA.

Les résultats de l'analyse statistique sont présentés dans le tableau VI.13. Le modèle obtenu est représenté dans les équations (6) et (7) pour la déminéralisation et déprotéinisation, respectivement :

$$DM = 92.5 - 1.83X_1 - 15.83 X_1^2 + 1.83X_2 - 3.33X_3 + 7.33X_4 - 5.17X_5 + 5.83X_6 + 6.83X_7 + 7.67X_8 - 9.5X_9 + X_{10} + 11X_1X_2 \dots \dots \dots (6)$$

$$DP = 53.54 + 4.96X_1 - 8.957 X_1^2 - 3.33 X_2 + 17.05X_3 - 7.69X_4 - 12.3X_5 - 8.97X_6 - 9.37X_7 + 15.86X_8 + 1.06X_9 - 5.81X_{10} + 13.18X_1 \dots \dots \dots (7)$$

VI. 4. 2. 1. La déminéralisation

En ce qui concerne l'importance des coefficients des polynômes, les valeurs p correspondantes, suggèrent que les principaux facteurs qui influencent le rendement de déminéralisation sont la source d'azote, le volume du milieu de culture, temps de fermentation et le tween 80. Le tableau VI.13 montre également que le volume de l'inoculum *Lb. plantarum* et la concentration de la source de calcium et le carré de la concentration des sucres réducteurs présentent un effet négatif sur le rendement de la déminéralisation lorsque leur concentration ou leur quantité augmente. D'après ce tableau, on observe une forte interaction positive entre la concentration des sucres réducteurs et la température d'incubation.

VI. 4. 2. 2. La déprotéinisation

A partir du tableau VI.13, il est évident que tous les termes linéaires (sauf source de calcium) et le carré de la concentration en sucres réducteurs sont statistiquement significatifs ($p < 0.05$). Les facteurs les plus importants sont la quantité de la carapace, la concentration de la source d'azote avec des coefficients positifs, tandis que les coefficients négatifs ont été observés pour le volume de *Lb. plantarum*, le temps de fermentation, le tween 80, le volume du milieu de culture, volume du *Lb. helveticus*, la concentration en sucres réducteurs et la température d'incubation. Parmi les termes interactifs, seule l'interaction de la concentration des sucres réducteurs et la température d'incubation est statistiquement significative.

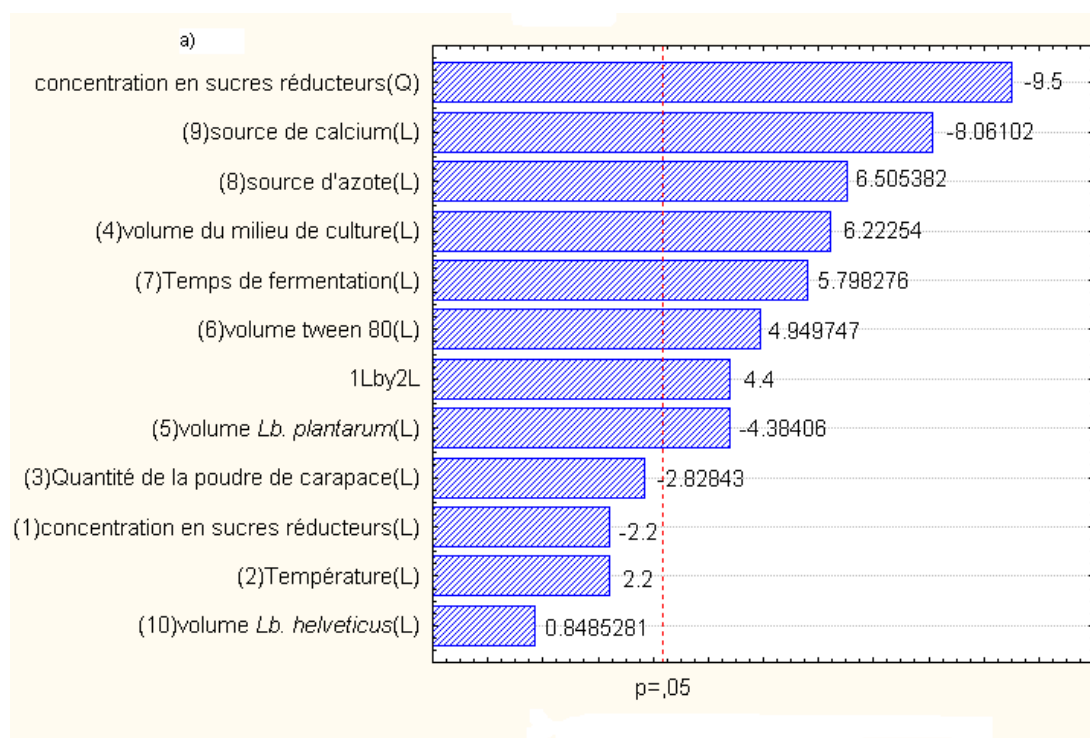
Tableau VI. 13. Equation de régression des coefficients pour les réponses

Facteurs	Déméralisation					Déprotéinisation				
	coefficients	Effets	Erreur standard	<i>t</i>	<i>p</i>	Coefficients	Effets	Erreur Standard	<i>t</i>	<i>p</i>
Ordonnée à l'origine	92.5	92.5	1.443376	64.08588	0.000008	53.5450	53.5450	1.601263	33.43924	0.000059
Concentration (L)	-1.8333	-3.6667	0.833333	-2.20000	0.115172	4.9608	9.9217	0.924489	5.36603	0.012668
Concentration (Q)	-15.8333	-31.6667	1.666667	-9.50000	0.002473	-8.9575	-17.9150	1.848979	-4.84457	0.016780
Température (L)	1.8333	3.6667	0.833333	2.20000	0.115172	-3.3358	-6.6717	0.924489	-3.60830	0.036547
Quantité de la carapace (L)	3.3333	-6.6667	1.178511	-2.82843	0.066276	17.0550	34.1100	1.307425	13.04472	0.000973
Vol du milieu (L)	7.3333	14.6667	1.178511	6.22254	0.008367	-7.6933	-15.3867	1.307425	-5.88434	0.009794
Vol (<i>Lb. plantarum</i>) (L)	-5.1667	-10.3333	1.178511	-4.38406	0.021975	-12.3033	-24.6067	1.307425	-9.41035	0.002543
Tween 80 (L)	-5.8333	11.6667	1.178511	4.94975	0.015824	-8.9717	-17.9433	1.307425	-6.86209	0.006337
Temps de fermentation (L)	6.8333	13.6667	1.178511	5.79828	0.010208	-9.3767	-18.7533	.307425	-7.17186	0.005585
Source d'azote (L)	7.6667	15.3333	1.178511	6.50538	0.007377	15.8683	31.7367	1.307425	12.13709	0.001204
Source de calcium (L)	-9.5000	-19.0000	1.178511	-8.06102	0.003988	1.0683	2.1367	1.307425	0.81713	0.473711
volume (<i>Lb. helveticus</i>) (L)	1.0000	2.0000	1.178511	0.84853	0.458483	-5.8167	-11.6333	1.307425	-4.44895	0.021128
1L * 2L	11.0000	22.0000	2.500000	4.40000	0.021763	13.1875	26.3750	2.773468	4.75488	0.017656

VI.4. 3. Etude des effets des différents facteurs et leurs interactions

Les effets standardisés des variables indépendantes et de leurs interactions sur les variables dépendantes (DM et DP) ont été étudiés par le tracé du diagramme de Pareto (Fig. VI.19). La longueur de chaque barre du graphique indique l'effet standardisé de ce facteur sur la réponse (Yetilmezsoy et al., 2009).

La figure 19 montre que les barres des facteurs : quantité de carapace (X3), concentration des sucres réducteurs (X1), température d'incubation (X2) et volume de *Lb. helveticus* (X10) pour la déminéralisation et la barre du facteur concentration de la source de calcium pour la déprotéinisation sont restées à l'intérieur de la ligne de référence (Fig. VI.19), cela veut dire qu'ils ont les plus petits coefficients par rapport aux autres termes du modèle, indiquant ainsi que ces facteurs ont la moindre contribution dans la prévision des rendements de la déminéralisation et la déprotéinisation, respectivement.



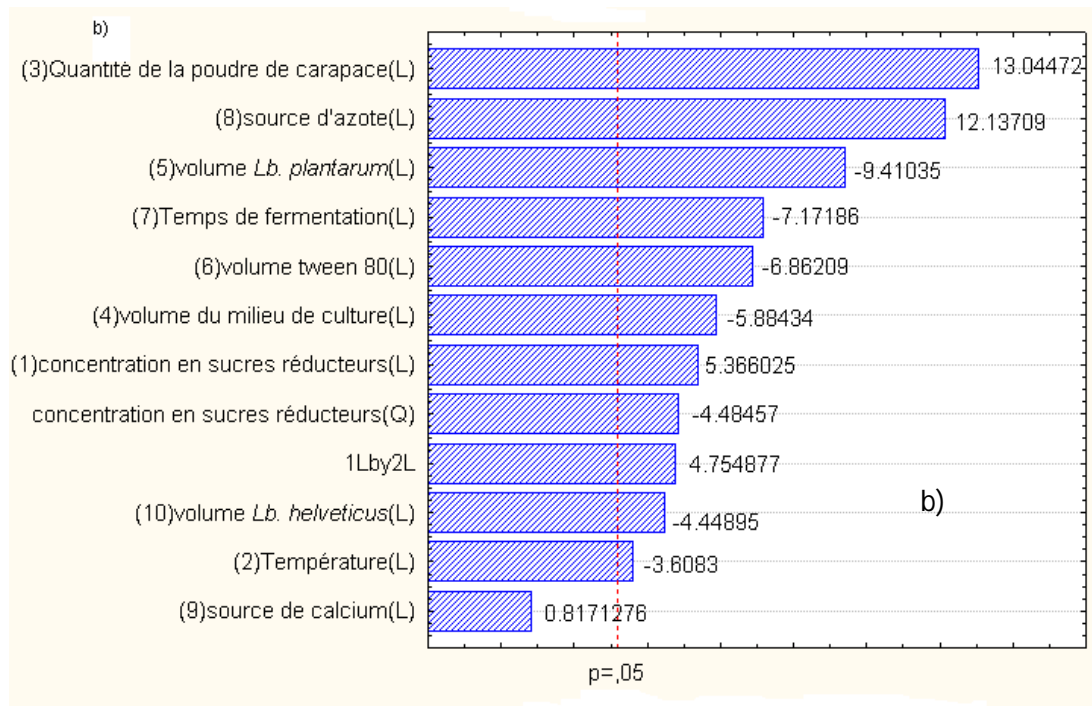


Fig. VI. 19. Diagramme Pareto montrant l'effet standard des variables indépendantes et leurs interactions sur les rendements (a) DM et (b) DP.

Les coefficients négatifs des composants du modèle (X^2_1 , X_5 , X_9) pour DM et (X^2_1 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_{10}) pour la DP indiquent un effet défavorable ou un effet d'antagonisme sur le rendement de la DM et la DP, tandis que les coefficients positifs des composants du modèle (X_4 , X_6 , X_7 , X_8 , X_1X_2) et (X_1 , X_3 , X_8 , X_1X_2) ont montré un effet favorable ou synergique sur le rendement de la déminéralisation et sur la déprotéinisation, respectivement. (Yetilmesoy et al., 2009). Ghorbel-Bellaaj et coll. (2011), ont montré que pour la déprotéinisation des carapaces de crevettes en utilisant *Pseudomonas aeruginosa* A2, le temps d'incubation était le facteur le plus influant. Pour la déminéralisation, les mêmes auteurs ont constaté que le volume de l'inoculum est le facteur le plus influant, suivi par la concentration en glucose et la quantité de la carapace (Ghorbel-Bellaaj et al., 2011). Choirit et coll. (2008), ont étudié les effets de trois variables : concentration de saccharose, pH initial et temps de fermentation sur l'efficacité de déminéralisation des carapaces de crevettes par *Pediococcus* L1/2. Ils ont montré que l'effet de la concentration en glucose et le temps d'incubation sont plus importants.

L'effet de la granulométrie de la poudre de carapace sur la bio-déminéralisation par l'intermédiaire de *L. paracasei* subsp. *Tolerans* KCTC -3074 a été également étudiée (Oh et al., 2008). La déminéralisation a été réalisée en utilisant quatre échantillons de poudre de carapace de taille différentes (0,84 - 3,3, 3,35- 10, 10-20, et 20-35 mm). Cette étude a,

également, montré que la taille de la poudre de carapace n'a aucun effet sur l'efficacité de déminéralisation (Oh et al., 2008). Ce résultat a été confirmé par les travaux de Choorit et coll. (2008).

Bhaskar et coll. (2007), ont étudié trois autres variables : le volume de l'inoculum, la concentration en source de carbone et le temps d'incubation en utilisant *Pediococcus acidolactici* CFR2182. Ils ont constaté que le temps d'incubation et la concentration en glucose ont un effet significatif par rapport au volume de l'inoculum.

Les effets de la température et de l'acidité titrable totale sur la déminéralisation pour la récupération de la chitine à partir de déchets de crevettes en utilisant des bactéries lactiques ont été étudiés par Pacheco et coll. (2009). Ils ont conclu que la température d'incubation présente un effet important sur les rendements de déminéralisation et de déprotéinisation des carapace des crevettes (Pacheco et al., 2009).

Cependant, à ce jour, l'étude des effets de : mélange de bactéries lactiques, le Tween 80, l'azote et le calcium, utilisant la méthodologie de surface de réponse, sur l'efficacité de la biodéminéralisation et de la biodéprotéinisation de carapace des crevettes pour l'extraction de la chitine.

VI. 4. 4. Analyse de variance

Le tableau VI.14 montre l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle de la déminéralisation et de la déprotéinisation des carapaces de crevettes en utilisant un mélange de deux espèces de lactobacilles. L'ANOVA est nécessaire pour tester l'importance et la pertinence du modèle.

L'analyse de la variance du modèle de régression montre que les modèles obtenus sont hautement significatifs, dont la valeur de F est 47.44 avec une faible valeur de p (0.004382) pour la déminéralisation et F 87.40538 avec une faible p (0.001771) pour la déprotéinisation (tableau VI. 14).

Le tableau VI. 14 montre que certains des coefficients du modèle de la déminéralisation (coefficients linéaires de la concentration en sucres réducteurs X_1 , de la température d'incubation X_2 , de la quantité de la poudre de carapace X_3 et le volume de *Lactobacillus helveticus* X_{10} pour la déminéralisation et seulement la concentration de la source de calcium X_9 pour la déprotéinisation, qui ont des valeurs $p > 0.05$. Donc, ils sont éliminés du modèle, conduisant à des équations simplifiées pour décrire la déminéralisation et la déprotéinisation :

$$DM = 92.5 - 15.83 X_1^2 + 7.33 X_4 - 5.17 X_5 + 5.83 X_6 + 6.83 X_7 + 7.67 X_8 - 9.5 X_9 + 11 X_1 X_2 \dots \dots \dots (8)$$

$$DP = 53.54 + 4.96 X_1 - 8.957 X_1^2 - 3.33 X_2 + 17.05 X_3 - 7.69 X_4 - 12.3 X_5 - 8.97 X_6 - 9.37 X_7 + 15.86 X_8 - 5.81 X_{10} + 13.18 X_1 X_2 \dots \dots \dots (9)$$

Tableau VI. 14. Analyse de variance (ANOVA)

Source	Déméralisation							Déproténisation						
	Somme des carrées	dl	Moyenne carrées	F	Valeur-p		PC %	Somme des carrées	dl	Moyenne carrées	F	Valeur- p	Remarques	PC %
Modèle	4744.75	12	395.396	47.4475	0.004382	Significatif		12413.99	12	1034.499	100.866	0.001431	Significatif	
Concentration (X ₁) (L)	40.333	1	40.3333	4.84000	0.115172		1.37	295.32	1	295.318	28.7942	0.012668	Significatif	4.44
Concentration (Q)	752.083	1	752.0833	90.25000	0.002473	Significatif	25.68	240.71	1	240.710	23.4698	0.016780	Significatif	3.62
Température (L)	40.333	1	40.3333	4.84000	0.115172		1.37	133.53	1	133.533	13.0198	0.036547	Significatif	2.01
Quantité de la carapace (L)	66.667	1	66.6667	8.00000	0.066276		2.27	1745.24	1	1745.238	170.164	0.000973	Significatif	26.28
Vol du milieu (L)	322.667	1	322.6667	38.72000	0.008367	Significatif	11.02	355.12	1	355.124	34.6254	0.009794	Significatif	5.35
Vol (<i>Lb. plantarum</i>) (L)	160.167	1	160.1667	19.22000	0.021975	Significatif	5.47	908.23	1	908.232	88.5547	0.002543	Significatif	13.67
Tween 80 (L)	204.167	1	204.1667	24.50000	0.015824	Significatif	6.97	482.94	1	482.945	47.0882	0.006337	Significatif	7.27
Temps de fermentation (L)	280.167	1	280.1667	33.62000	0.010208	Significatif	9.56	527.53	1	527.531	51.4355	0.005585	Significatif	7.94
Source de l'azote (L)	352.667	1	352.6667	42.32000	0.007377	Significatif	12.04	1510.82	1	1510.824	147.308	0.001204	Significatif	22.75
Source de calcium (L)	541.500	1	541.5000	64.98000	0.003988	Significatif	18.49	6.85	1	6.848	0.6677	0.473711		0.1
volume (<i>Lb. helveticus</i>) (L)	6.000	1	6.0000	0.72000	0.458483		0.2	203.00	1	203.002	19.7931	0.021128	Significatif	3.05
1L * 2L	161.333	1	161.3333	19.36000	0.021763	Significatif	5.51	231.88	1	231.880	22.6089	0.017656	Significatif	3.49
Residuelle	25.000	3	8.3333					30.77	3	10.256				
Totale	4769.750	15						12444.76	15					

VI. 4. 5. Le pourcentage de contribution

Le pourcentage de contribution (PC%) individuel de chaque terme dans le modèle final a été calculé (tableau VI. 14). C'est le rapport de la somme des carrés (SC) d'un terme particulier à celle de la somme des carrés de la somme de tous les termes (Yetilmezsoy et al., 2009), en tant que:

$$PC(\%) = \frac{SC}{\sum SC} \times 100 \dots\dots\dots(10)$$

Le tableau VI. 14, montre que la concentration de la source de calcium, le volume du milieu et la concentration de la source d'azote, ont les plus hauts niveaux de signification avec une contribution de 18,49%, 11,02% et 12,04% (Fig. VI. 20a) sur la déminéralisation, respectivement. Le pourcentage de contribution totale (PCT) des termes du premier ordre montre un plus haut niveau d'importance avec une contribution totale de 68,76%, suivie par le PCT des termes quadratiques avec une contribution totale de 25,68%. Enfin, le PCT des termes d'interaction présente le plus faible niveau d'importance avec un apport total de 5,51%, ce qui indique que les composants d'interaction ne montrent pas un grand effet dans la prédiction du rendement de la déminéralisation.

Pour la déprotéinisation, les variables : quantité de la carapace de crevette, la concentration de la source d'azote et le volume de l'inoculum (*Lb. plantarum*) montrent les plus hauts niveaux de signification avec une contribution de 26,28 %, 22,75% et 13,67 %, respectivement (Fig. 20b).

Le Pourcentage de Contribution (PCT) des termes du premier ordre a montré le plus haut niveau d'importance avec une contribution totale de 92,86 % par rapport aux autres valeurs de PCT. Suivi par le PCT de termes quadratiques avec une contribution totale de 3,62%. Les valeurs du PCT calculées montrent que les termes d'interaction ont le niveau le plus bas d'importance avec une contribution totale de 3,49%, ce qui indique que les composants d'interaction et des termes du second degré n'ont pas un effet important dans la prédiction du rendement de déprotéinisation.

On peut conclure que les variables indépendantes de premier ordre ont une relation directe sur le rendement de la déminéralisation et de la déprotéinisation.

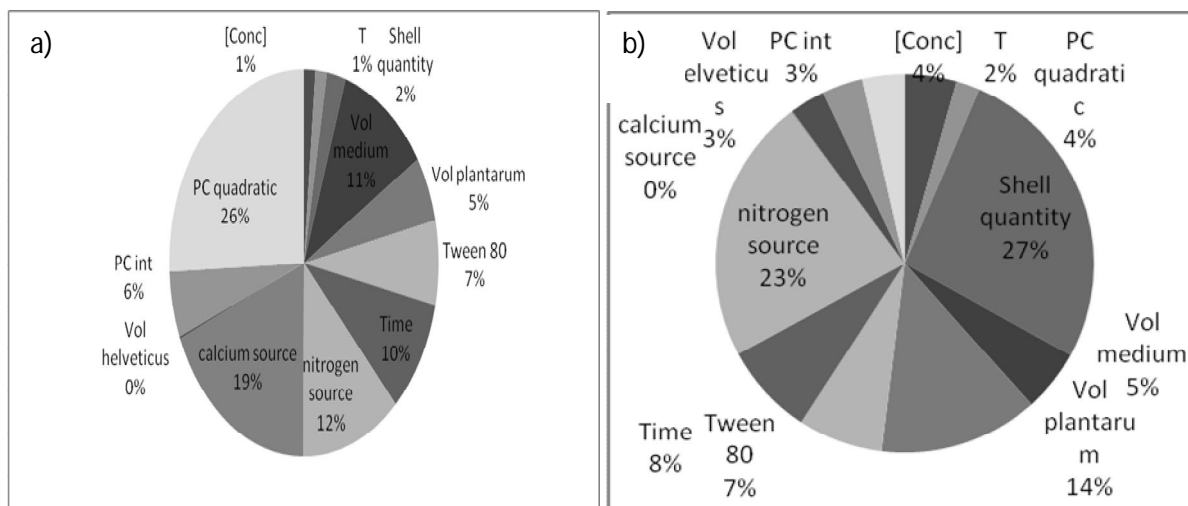


Fig. VI. 20 : pourcentage de contribution des différents facteurs sur (a) la déminéralisation et (b) la déprotéinisation

VI. 4. 6. Corrélation entre les valeurs prédites et expérimentales de la déprotéinisation et de la déminéralisation

Les valeurs du coefficient de régression 0,99876 et 0,99738 pour DP et DM, respectivement, sont proches de 1 ce qui indique que la corrélation est le mieux adapté à la prédiction des valeurs de DP et DM.

La valeur R^2 fournit une mesure de la variabilité dans les valeurs de réponse observées, ce qui pourrait s'expliquer par les facteurs expérimentaux et de leurs interactions. La bonté du modèle peut être vérifiée par la détermination du coefficient R^2 (99,476% pour DM et 99,753% pour les DP). La valeur de R^2 ajusté (97,379% et 98,764% pour DM et DP, respectivement) pour l'équation 8 et 9, respectivement, ce qui suggère que la variation totale de 99,476% pour la déminéralisation et 99,753% pour la déprotéinisation, peut être attribuée aux variables indépendantes; et seulement (moins de 9%) 8,33% pour la déminéralisation et (moins de 11%) 10,25% pour la déprotéinisation de la variation totale ne peuvent pas être expliqués par le modèle.

VI. 4. 7. Analyse de la surface de réponse

Les graphes tridimensionnels des surfaces de réponse ont été tracés pour étudier l'interaction entre les différents facteurs et de déterminer les conditions optimales pour l'obtention d'une déminéralisation et d'une déprotéinisation maximales.

VI. 4. 7. 1. Pour la déminéralisation

La figure VI. 21, montre qu'il y a une importante interaction positive entre la température et la concentration en sucres réducteurs sur le rendement de la déminéralisation.

Pour la déminéralisation, la concentration de la source d'azote présente le principal effet, suivi par le volume du milieu de culture, le temps de fermentation et le volume de Tween 80. Les autres facteurs à savoir la concentration en sucres réducteurs, le volume de *Lb. plantarum*, et la concentration de la source de calcium ont un effet négatif.

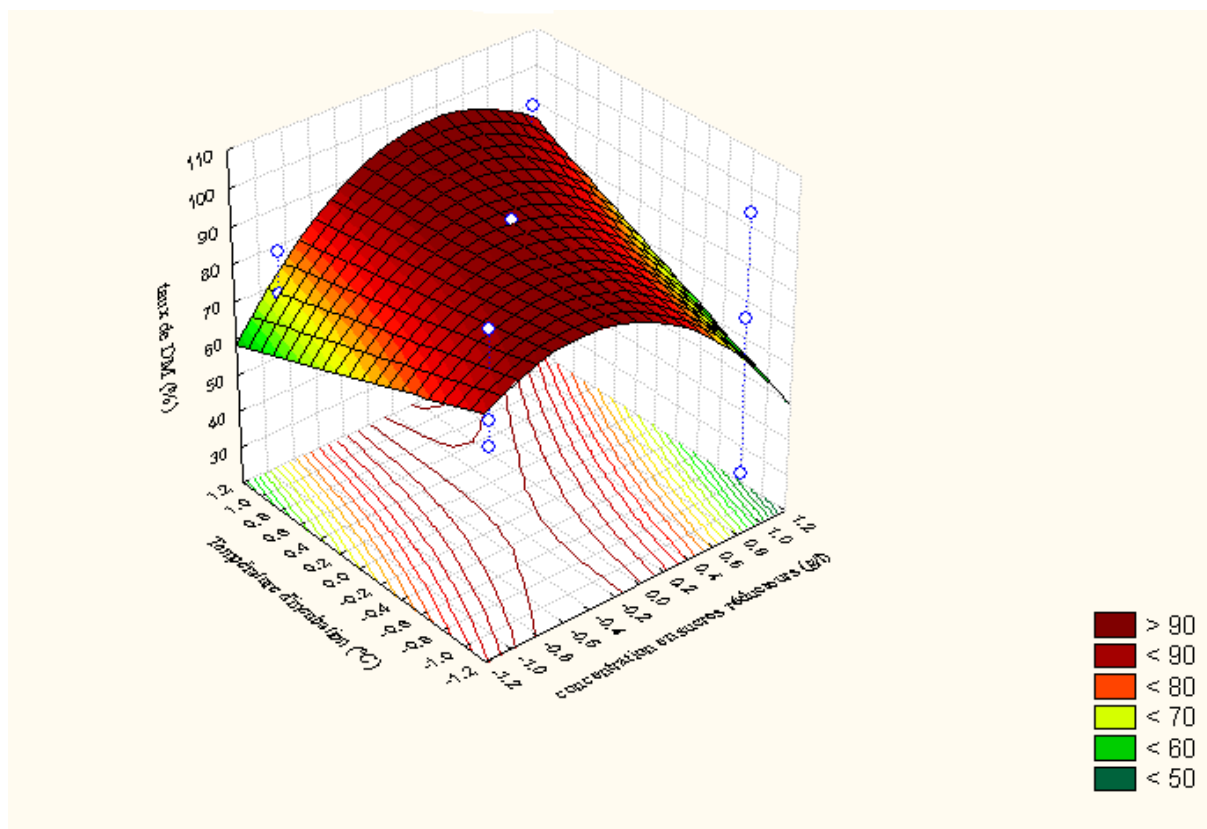


Figure VI. 21. Surfaces de réponse (DM) montrant l'interaction entre la concentration en sucres réducteurs, et la température d'incubation

Le tableau VI.13, montre que l'effet de la température seule n'est pas significatif sur le taux de déminéralisation. L'effet de la température sur la DM n'est prononcé qu'avec l'augmentation de la concentration en sucres réducteurs pour atteindre son maximum (90%) avec une température de (40°C) et (environ 200g/l en sucres réducteurs) ensuite elle commence à diminuer avec l'augmentation de la concentration en sucres réducteurs pour atteindre son minimum (50%) avec forte concentrations en sucres réducteurs (300g/l) et faible température (20°C) (Fig. VI. 21).

VI. 4. 7. 2. Pour la déprotéinisation

Dans le cas de la déprotéinisation, le tableau VI.13 montre que le facteur, quantité de carapace, présente le principal effet suivi par la concentration de la source d'azote. La température et la concentration en sucres réducteurs ont une importante interaction positive.

Les autres facteurs, à savoir le volume de *Lb. plantarum*, le temps de fermentation, le volume du tween 80, la concentration en sucres réducteurs (terme carré) et le volume de *Lb. helveticus* ont un effet négatif.

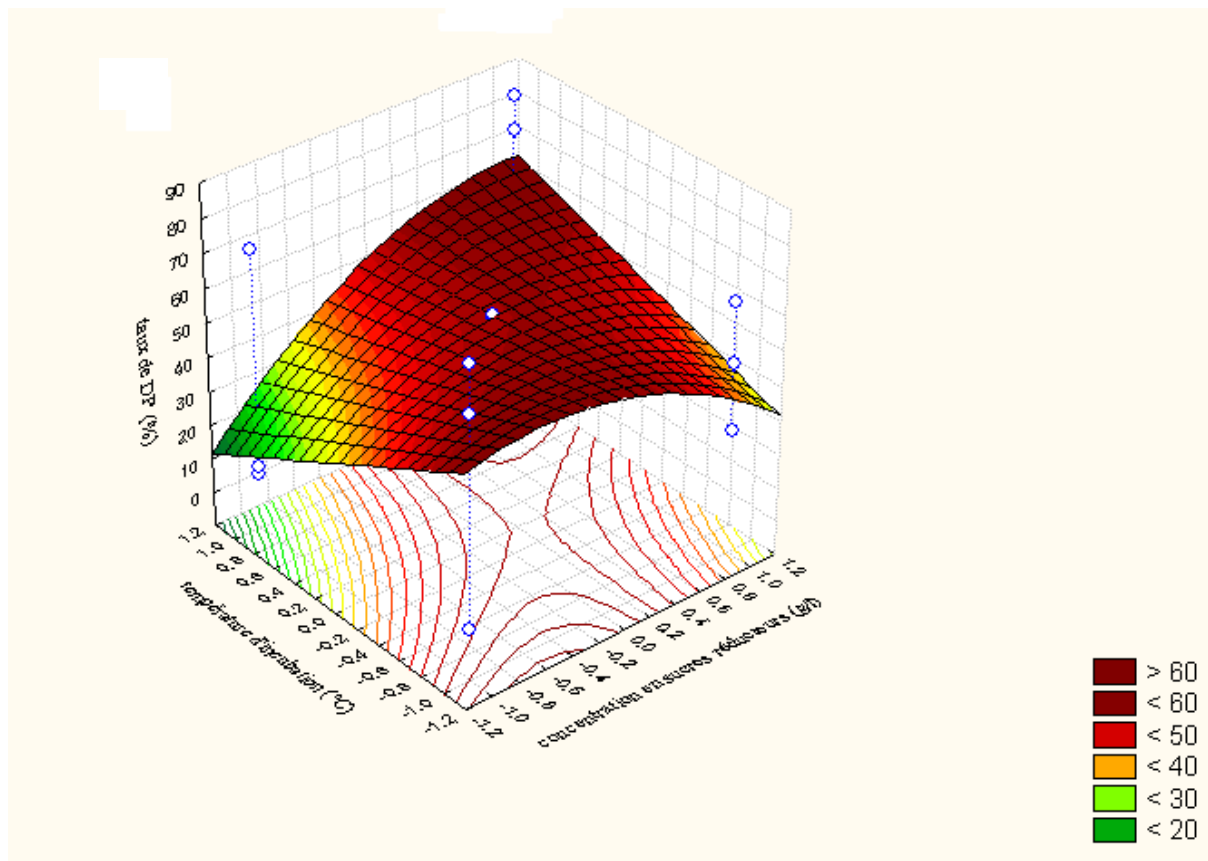


Fig. VI. 22: Surface de réponse (DP) montrant l'interaction entre la concentration en sucres réducteurs et la température d'incubation

Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que la concentration en sucres réducteurs (X_1) n'a pas d'effet sur la DP (40%) (Fig.VI.22) et que la température d'incubation n'a pas d'effet sur la DP (20%) (Fig. VI.22). Par contre l'interaction entre la concentration en sucres réducteurs et la température d'incubation, qui est importante et positive (tableau VI.13), présente un effet synergique. L'augmentation de la température avec l'augmentation de la concentration en sucres réducteurs conduit à l'augmentation du taux de déprotéinisation au-delà de 60%. Pour les autres facteurs, on note l'absence d'interaction (tableau VI.13).

VI. 4. 8. La désirabilité

Les niveaux optimisés des variables (X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10}) ont été déterminés en utilisant les profils pour les valeurs prédites du DM et DP et fonction de

désirabilité (Fig. VI. 23). Les facteurs optimisés donnant la plus haute DM et DP, à savoir 100 % et 85 %, respectivement, sont rassemblés dans le tableau VI.15.

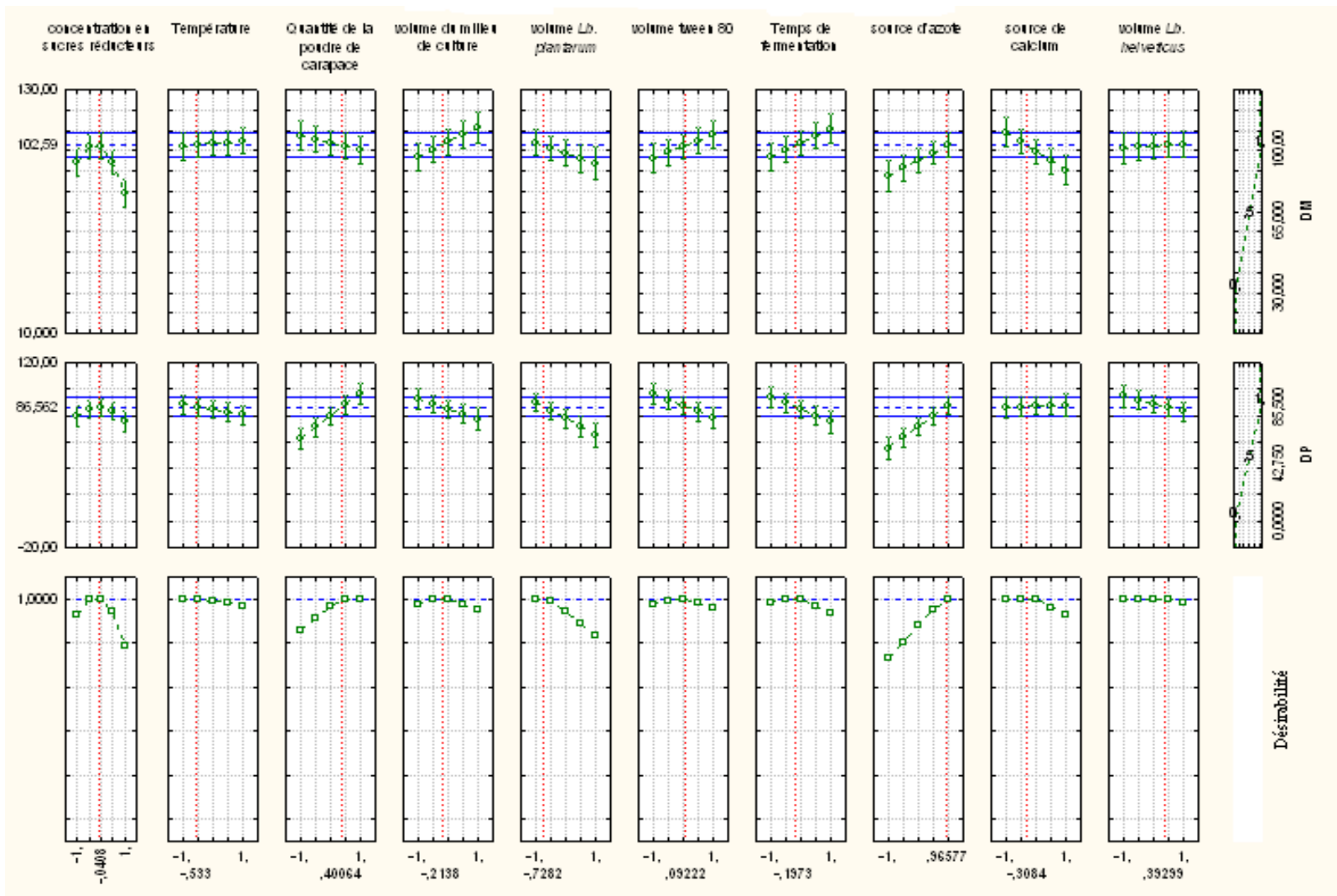


Fig. VI. 23. Profils de désirabilité pour l'optimisation de la déminéralisation (DM) et de la déprotéinisation (DP)

Tableau VI. 15. Les facteurs optimisés conduisant à la plus haute DM et DP

Facteurs	Facteurs codés	Valeurs des Facteurs	DM (%)	DP (%)
Concentration en sucres réducteurs (L)	-0.0408	195.104 g l ⁻¹	100	85
Température (L)	-0.533	24.67 °C		
Quantité de la poudre de carapace (L)	0.40064	8.2 g		
Volume du milieu de culture (L)	-0.2138	257.24 ml		
Volume <i>Lb. plantarum</i> (L)	-0.7282	11.35 ml		
tween 80 (L)	0.09222	1.09 ml		
Temps de fermentation (L)	-0.1973	134.77 h (5jours)		
Source d'azote (L)	0.96577	2.75 g		
Source de calcium (L)	-0.3084	0.45 g		
Volume <i>Lb. helveticus</i> (L)	0.39299	13,92 ml		

VI.4. 9. Caractérisation de la carapace fermentée avec la co-culture sur le jus de dattes

A- Spectroscopie Infra rouge à transformée de Fourier

La figure VI.24 montre le spectre infrarouge de la chitine extraite par voie biologique en utilisant les conditions optimales obtenues par la culture mixte. Le spectre montre que la structure de la chitine purifiée par la méthode biologique présente une structure similaire à celle de la chitine commerciale.

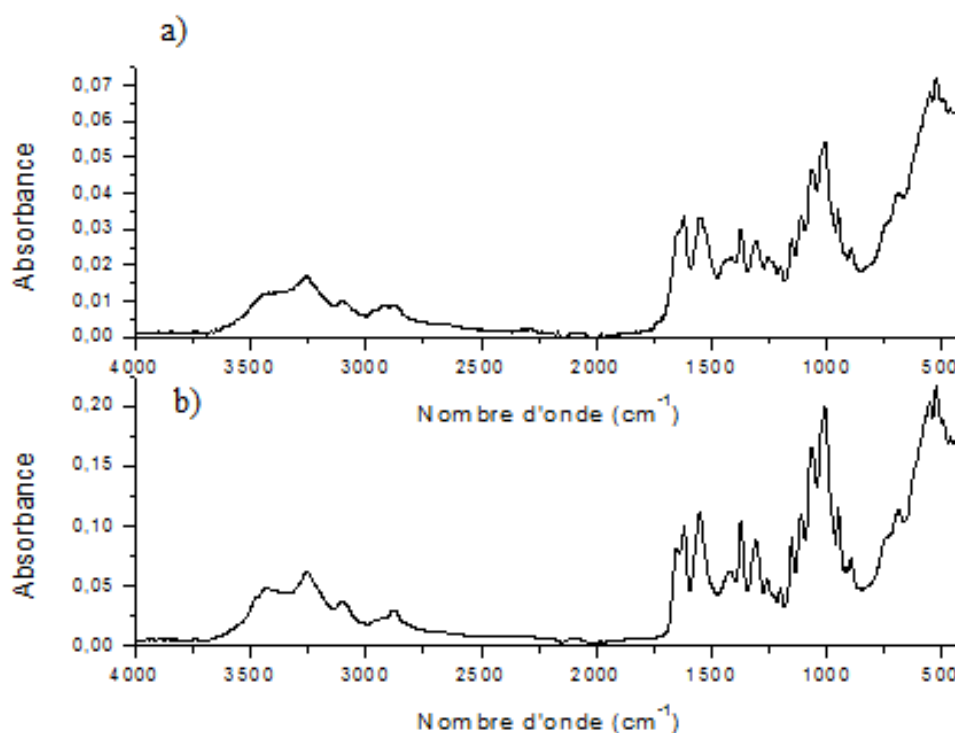


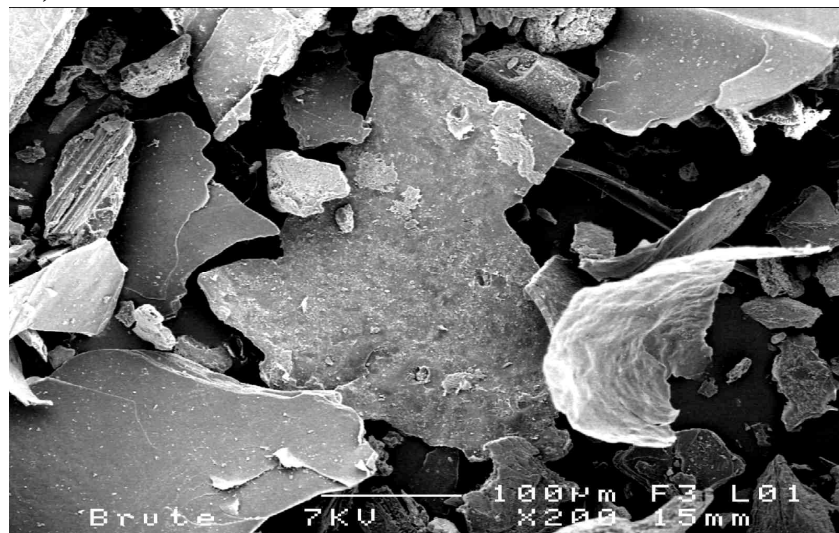
Fig. VI. 24. Les spectres FTIR de (a) la chitine purifiée utilisant les conditions optimales (3répétitions) (b) la chitine commerciale

B- Les examens microscopiques MEB

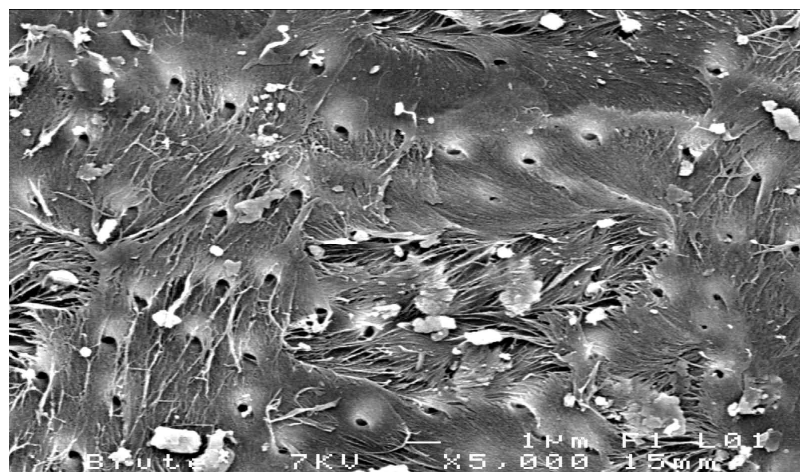
L'analyse par microscopie électronique à balayage a été faite sur la carapace brute (fig. VI.25) et de la chitine extraite à partir des carapaces de crevette par culture mixte de lactobacilles en utilisant les conditions optimales (fig. VI.26) et à différents grossissements.

La figure 25 montre qu'au grossissement 200, on remarque une surface rugueuse (fig. VI.25a). Au grossissement 5000, on remarque l'apparition de nombreuses fibres rassemblées, serrées entre elles (fig. VI.25b). Et au grossissement 10 000, on observe bien une phase minérale (claire) représentée généralement par les cristaux du carbonate de calcium et une phase organique sombre. On note bserve aussi des pores. On remarque, également, que les fibres de chitine-protéine présentent une structure hélicoïdale et arrangée autour de la cavité des pores (fig. VI.25) qui selon la bibliographie font une rotation de 180° (Chen et al., 2008 ; Ehlich et al., 2009).

a)



b)



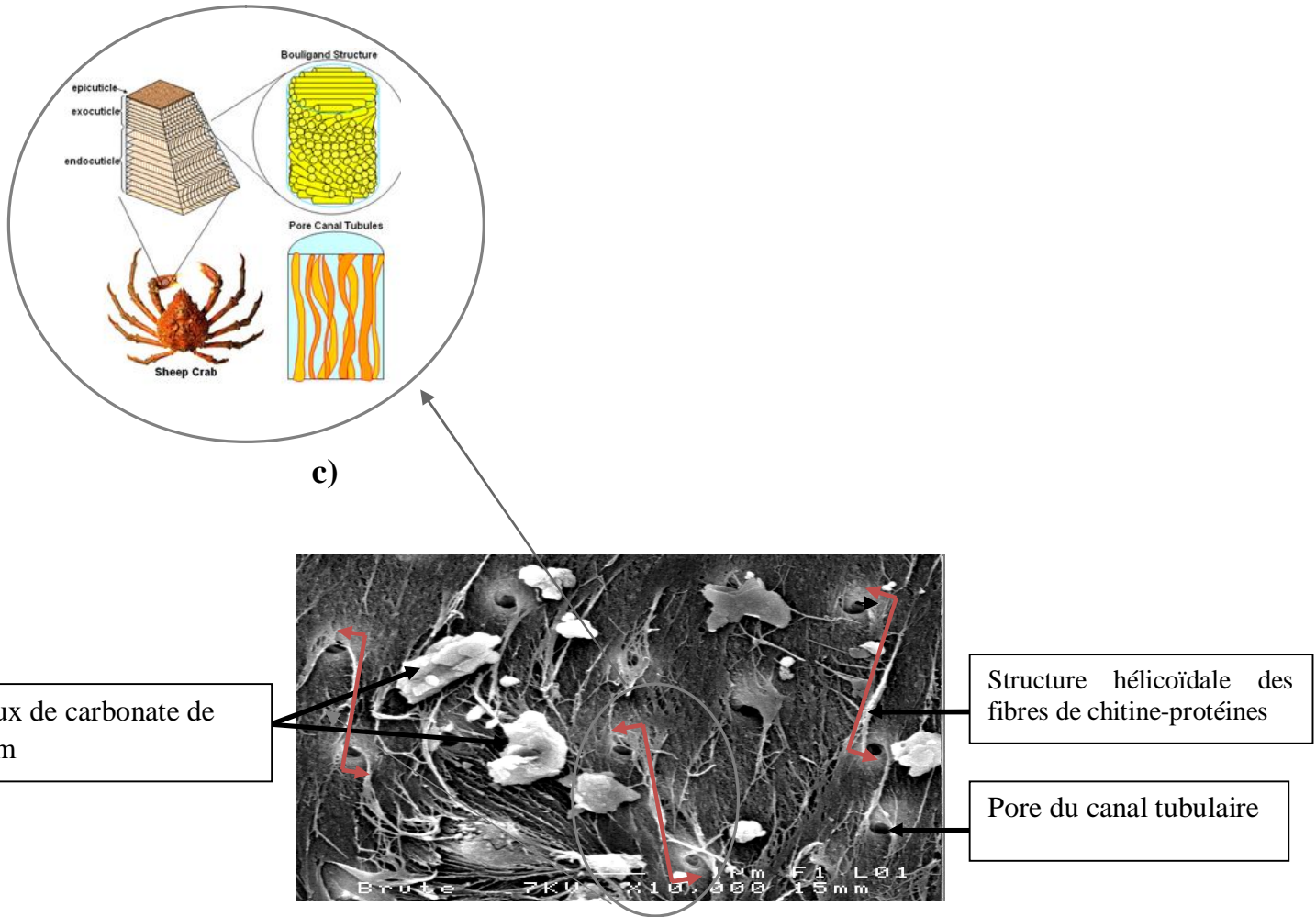
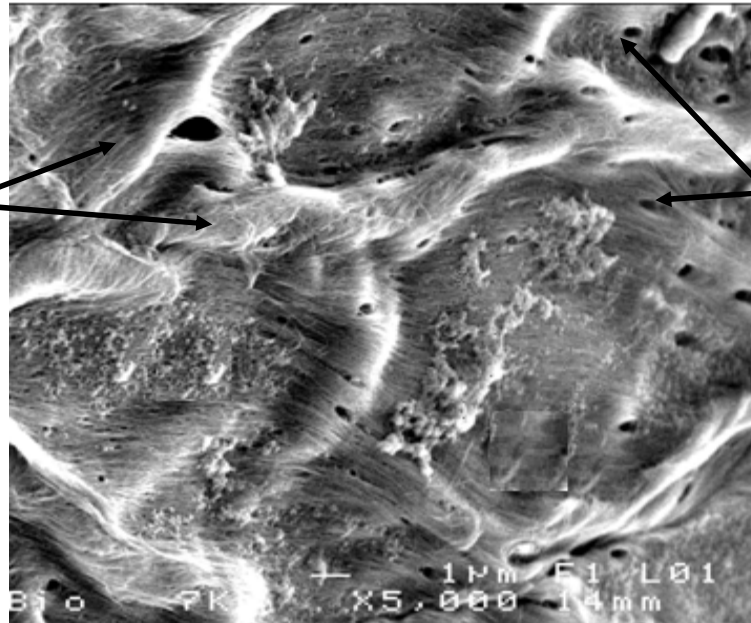


Fig. VI. 25. Micrographies obtenues par microscope électronique à balayage (a,b,c) carapace brute aux grossissements, 200, 5000 et 10000, respectivement.

Avec la chitine purifiée dans les conditions optimales (tableau VI. 15), au grossissement 50000, on remarque l'absence totale des cristaux de carbonate expliquée par le rendement de la déminéralisation (100%). En comparant cette micrographie avec celle de la carapace brute (Fig. VI. 25) au même grossissement, on remarque qu'on peut voir clairement les fibres de chitine (fig. VI.26a).

a)



Fibres de chitine

Pore du canal tubulaire

b)

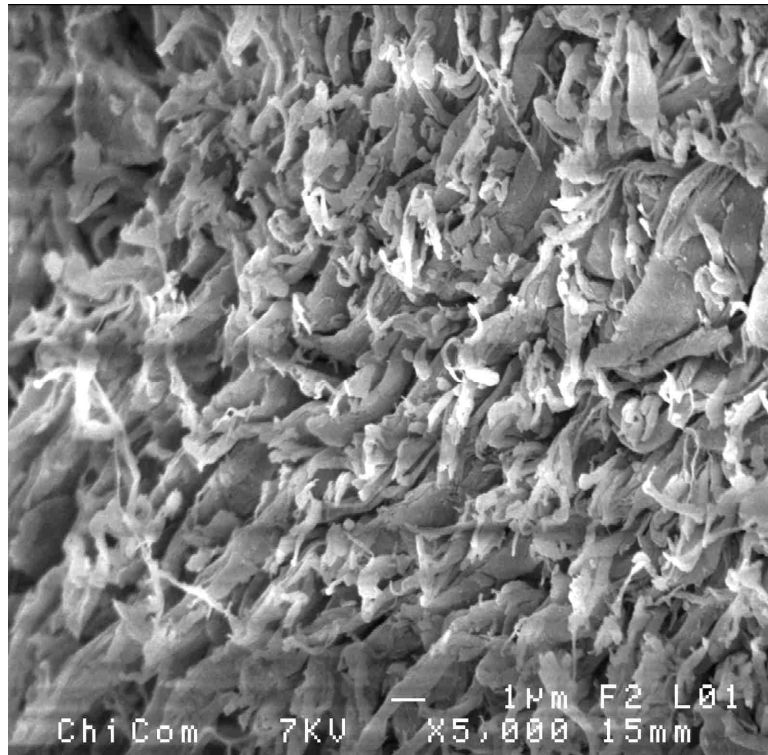


Fig. VI. 26. Micrographies obtenues par microscope électronique à balayage (a) chitine extraite par voie biologique au grossissement 5000 (b) chitine commerciale (fluka)

Conclusion générale

Le procédé d'extraction de la chitine par voie biologique est régi par plusieurs paramètres physico-chimiques qui influent sur le développement et la croissance des bactéries utilisées et par conséquent sur les rendements de la déminéralisation et la déprotéinisation.

Afin d'extraire la chitine et d'étudier l'influence des paramètres physicochimiques sur le bioprocédé d'extraction de la chitine, on a suivi la stratégie des plans d'expériences. Ce travail était réalisé en deux parties : la première partie en utilisant une culture pure *Lb. helveticus* (plan un facteur à la fois et un plan composé centré), et en se basant sur les résultats obtenus, une deuxième partie a été réalisée en utilisant une co-culture de deux bactéries lactiques *Lb. helveticus* et *Lb. plantarum* (plan composé centré).

A- La première partie : optimisation par plan d'expériences utilisant une souche pure *Lactobacillus helveticus*

- Plan « un facteur à la fois »

Parmi les nombreux facteurs physico-chimiques pouvant influencer la bioextraction de la chitine, trois paramètres jugés importants sont la nature de la source de carbone (glucose et jus de dattes), concentration de la source de carbone (0- 400g/l pour le glucose et 40- 250g/l pour le jus de dattes), et la température d'incubation (30, 40 et 42°C).

- 1- En utilisant le glucose comme source de carbone, la déminéralisation et la déprotéinisation nécessitent des conditions totalement différentes. Les conditions optimales de la meilleure DM (61%) sont 300g/l en glucose à une température d'incubation de 35°C. Par contre celles de la DP (76%) sont obtenues avec une concentration de 80g/l en glucose avec une température d'incubation de 30°C.
- 2- L'utilisation de jus de dattes comme milieu de fermentation riche en sucres fermentescibles et oligoéléments, nous a permis d'améliorer les rendements et les conditions de la DM et la DP. Une concentration en jus de dattes de 200g/l en sucres réducteurs et une température de 30°C ont permis la réalisation simultanée de la DM et la DP avec des taux de 61% et 83%, respectivement.

L'analyse des chitines obtenues à la fin des fermentations (par le glucose et le jus de dattes) par spectroscopie FTIR, montre la présence des mêmes pics d'absorption caractéristiques de la chitine commerciale et sont largement similaires à celui de l' α -chitine décrit dans la bibliographie. Par diffraction aux rayons X, elles présentent un degré de cristallinité (I_{CR}) de 77,15% (en utilisant le glucose) et 72,18% (en utilisant le jus de dattes).

Les résultats, obtenus par la fluorescence aux rayons X, montrent que la majorité des minéraux, initialement, présents dans la carapace brute se retrouvent à l'état de trace dans les carapaces fermentées sauf le calcium et le phosphore.

- Plan composite centré

Le modèle qui en résulte conduit à des conditions optimales de déminéralisation et de déprotéinisation des carapaces de *Parapenaeus longirostris*. Une concentration de 171,37 g/l en sucres réducteurs, une température d'incubation de 32,13°C, un volume du milieu de fermentation de 100 ml et un volume d'inoculum de 10 ml pendant un temps d'incubation de 254,38 h (10 jours) avec 2,03 g/100 ml d'azote minéral et de 1,29 g/100 ml de calcium conduit à des taux de 98% et 78% de déminéralisation et de déprotéinisation, respectivement par fermentation de 4,84 g de la poudre de carapace dont la granulométrie est de 1,53mm.

A la fin de la fermentation lactique, la majorité des minéraux, initialement présents dans la carapace brute, ont été éliminés et ne restent que des traces comparables à ceux retrouvés dans la chitine commerciale sauf le fer. Cependant, la substitution de la source d'azote minérale (contenant le fer) par NH₄Cl nous a permis d'obtenir 100% de DM au lieu de 98% ce qui nous a poussé à conclure que le fer provient de la source d'azote est que la DM est presque complète. La microscopie électronique nous a permis d'observer l'élimination des carbonates et l'obtention des feuillettes bien claires caractéristiques de la chitine.

B- La deuxième partie : optimisation par plan centré composite en utilisant une co-culture de deux bactéries lactiques *Lb. helveticus* et *Lb. plantarum*

L'utilisation de ce mélange de bactéries lactiques nous a permis d'améliorer les performances de ce bioprocédé par l'augmentation des rendements d'extraction (100% de DM et 85% de DP par fermentation de 8.2 g de la poudre de carapace) et surtout la réduction du temps de fermentation à 5 jours, avec une concentration de 195.104 g/l en sucres réducteurs, une température d'incubation de 24.67°C, un volume du milieu de fermentation de 254.24 ml et 11.35 ml de *Lb. plantarum* et 13.92 ml de *Lb. helveticus* avec 2.75g ml d'azote minéral et 0.45g de calcium.

L'analyse par microscopie électronique à balayage, au grossissement 50000, de la carapace brute et de la chitine extraite à partir des carapaces de crevette par culture mixte de lactobacilles en utilisant les conditions optimales nous a permis de constater l'absence totale des cristaux de carbonate expliquée par le rendement de la déminéralisation (100%). En comparant cette micrographie avec celle de la carapace brute au même grossissement, on remarque qu'on peut voir clairement les fibres de chitine.

Finalement, le spectre infrarouge de la chitine extraite par voie biologique montre une similarité structurale entre la chitine purifiée par la méthode biologique et la chitine commerciale.

En perspective on propose de produire un chitosane pure par désacétylation enzymatique à partir de la chitine extraite par fermentation lactique en co-culture et l'appliquer dans le domaine agro-alimentaire comme conservateur ou médical dans l'ingénierie tissulaire.

Références bibliographiques

-A-

- Adour L., W. Arbia, A. Amrane, N. Mameri (2008) Combined use of waste materials – recovery of chitin from shrimp shells by lactic acid fermentation supplemented with date juice waste or glucose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 1664–1669.
- Abou-Zeid A., Abdelrahman A. and Baghlaif A.O. (1991) The formation of oxytetracycline in date-coat medium. *Bioresource Technology*, 37, 179–184.
- AFNOR, 1982 (NA 1158- 1990, ISO 1871).
- Aiba S. (1992) Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14, 225-8.
- Ait B.E., P. Eullaffroy, C. Clément, G. Vernet (2004) Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera L.* against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, 22, 608–614.
- Akkaya G., I. Uzun, F. Güzel (2009) Adsorption of some highly toxic dyestuffs from aqueous solution by chitin and its synthesized derivatives. *Desalination*, 249, 1115–1123
- Akkaya G., I. Uzun, F. Güzel (2007) Kinetics of the adsorption of reactive dyes by chitin. *Dyes Pigment*, 73, 168–177.
- Al Sagheer F. A., M.A. Al-Sughayer, S. Muslim, M. Elsabee (2009) Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymer*, 77, 410-419.
- Amuda O., A. Giwa, I. Bello (2007) Removal of heavy metal from industrial wastewater using modified activated coconut shell carbon. *Biochemical Engineering Journal*, 36, 174–181.
- Andrade, V.S., Neto, B.D.B., Fukushima, K. and Campos-Takaki, G.M. (2003) Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570)- A factorial study. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 20, 149- 153.
- Arbia, w., Arbia, L., Adour, L., Amrane, A. and Lounici, H. (2011) Improvement of the demineralization of white shrimp shells (*Parapenaeus longirostris*) by lactic acid fermentation. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, Numéro 101, ISSN 1775-335X - ISBN 2-910239-75-6, Ed. SFGP, Paris, France.
- Axelsson L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria*. Sepposalminen; Attevonwright and Ouwehand A. Marceldekker, Inc, New York. Basel.

Aytekin O. and M. Elibol (2009) Cocultivation of *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae* for biological chitin extraction from prawn waste. *Bioprocess Biosystem Engineering*. DOI 10.1007/s00449-009-0337-6.

-B-

Bajaj M., J. Winter, C. Gallert (2011) Effect of deproteiniation and decalcification conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from *Crangon crangon*. *Biochemistry Engineering Journal*, 56, 51-62.

Bal Y., K.E. Bal, O. Laarabi-Bouamrane, A. Lallam (2006) Copper (II) uptake by *Pleurotus mutilus* biomass, chitin and chitosan. *Mineral Engineering*, 19, 1456–1458.

Baran A., E. Biçak, Ş.H. Baysal, S. Önal (2007) Comparative studies on the adsorption of Cr(VI) ions on to various sorbents. *Bioresource Technology*, 98, 661–665.

Bautista J., M. Jover, J.F. Gutierrez, R. Corpas, O. Cremades, E. Fontiveros, F. Iglesias, J. Vega (2001) Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production. *Process Biochemistry*, 37, 229-234.

Bell A. A., J.C. Hubbard, L. Liu, R.M. Davis, K.V. (1998) Subbarao, Effects of Chitin and Chitosan on the Incidence and Severity of *Fusarium* Yellows of Celery. *Plant Diseases*, 82, 322–328.

Benaissa H. and B. Benguella (2004) Effect of anions and cations on cadmium sorption kinetics from aqueous solutions by chitin: experimental studies and modeling. *Environement Pollution*, 130, 157–163.

Bharathi R., R. Vivekananthan, S. Harish, A. Ramanathan, R. Samiyappan (2004) Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protection*, 23, 835–843.

Bhaskar N., P.V. Suresh, P.Z. Sakhar, N.M. Sachindra (2007) Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteinization/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme Microbial and Technology*, 40, 1427–1434.

Bhatnagar A. and M. Sillanpää (2009) Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater — A short review. *Advance Colloid Interface Sciences*, 152, 26–38.

Boudjelal, A. and Nancib, N. (2001) Production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu à base de jus de dattes. *Revue des Energies Renouvelable Production et valorisation- Biomasse*, 41- 46.

Bouligand Y. (1988) Problème de morphogenese cuticulaire chez les crustacés. Aspects récents de la biologie des crustacés, actes de colloques-6-IFREMER, 13- 32.

Brugnerotto J., J. Lizardi, F.M. Goycoole, W. ArguÈelles-Monal, J. DesbrieÁres,. M. Rinaudo (2001) An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, Polymer, 42, 3569-3580.

-C-

Camci-Unal, G. and Pohl, N.L.B. (2009) Quantitative Determination of Heavy Metal Contaminant Complexation by the Carbohydrate Polymer Chitin. Journal of Chemical Engineering Data, A–D.

Chang K. L. B. and G. Tsai (1997) Response Surface Optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste. Journal of agricultural Food Chemistry, 45, 1900-1904.

Chantal Matar, Jean Amiot, Laurent Savoie and Jacques Goulet (1996) The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* of the release of peptides during In Vitro digestion. J. Dairy Sci. 79 ; 971- 979.

Chatterjee S., S. Chatterjee, B.P. Chatterjee, A.K. Guha (2004) Clarification of fruit juice with chitosan. Process Biochemistry, 39, 2229–2232.

Chen A.S., T. Taguchi, K. Sakai, Y. Matahira, M.W. Wang, I. Miwa (2005) Effects of chitobiose and chitotriose on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. Biology and Pharmacology Bulletin, 28, 1971–1973.

Cho Y. I., H.K. No, S.P. Meyers (1998) Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. Journal of agricultural Food Chemistry, 46, 3839-3843.

Choorit, W., Patthanamane, W. and Manurakchinakorn, S. (2008) Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells. Bioresource Technology, 99, 6168-6173.

Cira. A.L., S. Huerta, G.M. Hall, K. Shirai (2002) Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Process Biochemistry, 37, 1359–1366.

Compère Ph., Jaspard-Versali M. F. and Goffinet G. (2002) Glycoproteins from the cuticle of the Atlantic shore crab *Carcinus maenas* : I. Electrophoresis and western-blot analysis by use of lectins. Biol. Bull., 202, 61- 73.

Cremades, O., Ponce, E., Corpas, R., Gutierrez, J.F., Jover, M., Alvarez- Ossorio, M.C., Parrado, J. and Bautista J. (2001) Processing of crawfish (*Procambarus Clakii*) for the

preparation of caretenoproteins and chitin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 5468-5472.

Crini G., E. Guibal, M. Morcellet, G. Torri, P.M. Badot (2009) Chitine et chitosane. Préparation, propriétés et principales applications. In: *chitine et chitosane. Du biopolymère à l'application*, 1st Ed., Presses universitaires de Franche-Comté, France, pp. 19-54.

Crini G. and P.M. Badot (2008) Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Progress in Polymer Sciences*, 33, 399–447.

Cuesta A., A.M. Esteban, J. Meseguer (2003) In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata L.*). *Fish Shellfish Immunology*, 15, 1–11.

-D-

Dahiya, R. Tewari, G.S. Hoondal (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 773- 782.

Das S. and E.G. Anand Ganesh (2010) Extraction of chitin from trash crabs (*Podophthalmus vigil*) by an eccentric method. *Current Research Journal of Biological Science*, 2, 72-75.

Dash M., F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini (2011) A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer science*, doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001.

De Andrade Sânia M. B., Rasiyah Ladchumananandasivam, Brismak G. da Rocha, Débora D. Belarmino, Alcione O. Galvão (2012) The Use of Exoskeletons of Shrimp (*Litopenaeus vanammei*) and Crab (*Ucides cordatus*) for the Extraction of Chitosan and Production of Nanomembrane, *Materials Sciences and Applications*, 3, 495-508.

De Lima, C.J.B., Coelho. F., L. and Contiero, J. (2010) The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium supplementation, temperature and pH control. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 175- 181.

Dhanikula A. and R. Panchagnula (2004) Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. *AAPS J*, 6, article 27.

-E-

Ehlich, H., Koutsoukos, P.G., Demadis, K.D. and Pokrovsky, O.S. (2009) Principles of demineralization: modern strategies for the isolation of organic frameworks Part II. *Decalcification Micron*, 40, 169- 193.

Einbu A. and K.M. Vårum (2008) Characterization of chitin and its Hydrolysis to GlcNAc and GlcN. *Biomacromolecules*, 9, 1870-1875.

Einbu A., S.N. Naess, A. Elgsaeter, K.M. Vårum (2004) Solution properties of chitin in alkali. *Biomacromolecules*, 5, 2048-2054.

Evans J., W.G. Davids, J.D. MacRae (2002) Kinetics of cadmium uptake by chitosan-based crab shells. *Water Research*, 36, 3219–3226.

-F-

Fabritius, H., Sachs, C., Raabe, D., Nikolov, S., Friák, M. and Neugebauer, J. (2011) Chitin in the Exoskeletons of Arthropoda: From Ancient Design to Novel Materials Science In Gupta, N.S. (Eds.), *Chitin Formation and Diagenesis* (pp. 35- 60). Dordrecht Heidelberg, London, New York.

Fagbenro O. (1996) Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads. *Food Research International*, 29, 595–599.

Felse P.A. and T. Panda (1999) Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 20, 505–512.

Franca E.F., R.D. Lins, L.C. Freitas, T.P. Straatsma (2008) Characterization of Chitin and Chitosan Molecular Structure in Aqueous Solution. *Journal of Chemical Theory Computer*, 4, 2141–2149.

Francis S, Matthew JK, Howard WT. (2000) Application of chitosan based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21, 24, 2589-98.

-G-

Galli E. et Abdelbasset L. (2009) Extraction et caractérisation de la chitine et du chitosane obtenus à partir de biomasses In : Crini et al., 2009. Chapitre 2 pp 56- 64.

Ge L., H. Zhang, K. Chen, L. Ma, Z. Xu (2010) Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodotorula glutinis* against *Botrytis cinerea* in strawberries and the possible mechanisms involved. *Food Chemistry*, 120, 490–495.

Gentili A.R., M.A. Cubitto, M. Ferrero, M.S. Rodríguez (2006) Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57, 222–228.

Gillon F. (1997) Modélisation et optimisation par plans d'expériences d'un moteur a communications électriques. Thèse de doctorat. Université des sciences et technologies de Lille.

- Gimeno M., J.Y. Ramirez-Hernandez, C. Martínez-Ibarra, N. Pacheco, R. Garcia-Arrazola, E. Barzana, K. Shirai (2007) One- solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. *Journal of agricultural Food Chemistry*, 55, 10345- 10350.
- Gogev S., M.F. Versali, E. Thiry (2003) Les chitosanes- nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux. *Annales de Medecine Vétérinaire*, 147, 343–350.
- Gonzalez-Davila M., J.M. Santana-Casiano, F.J. Millero (1990) The Adsorption of Cd(II) and Pb(II) to Chitin in Seawater. *Journal of Colloid Interface Science*, 137, 102–110.
- Gooday G. W., J.I. Prosser, K. Hillman, M.G. (1991) Cross, Mineralization of chitin in an estuarine sediment: the Importance of the chitosan pathway. *Biochemistry System Ecology*, 19, 395-400.
- Goodrich J. D. and T.W. Winter (2007) β -Chitin Nanocrystals Prepared from shrimp shells and their specific surface area measurement. *Biomacromolecules*, 8, 252-257.
- Goupy J. et Ceighton L. (2006) Introduction aux plans d'expérience. Edition Dunod.
- Goupy J. (1999) Plan d'expérience pour surface de réponse. Edition Dunod.
- Griffiths, P.R. and Haseetha, J.A. (2007) Fourier transform infrared spectrometry. Wiley Interscience, John Wiley and sons Inc Publications, Hoboken, New-Jersey.
- Gupta Neal S. and George D. Cody (2011) Identification and Characterization of Chitin in Organisms IN: Chitin formation and diagenesis, edition Springer.

-H-

- Hallmann J., R. Rodríguez-Kábana, J.W. Kloepper (1999) Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 551–560.
- Han J., A.S. Guenier, S. Salmieri, M. Lacroix (2008) Alginate and Chitosan Functionalization for Micronutrient Encapsulation. *Journal of agricultural Food Chemistry*, 56, 2528–2535.
- Handayani A. D., I. Sutrisno Nani, I. Suryadi (2008) Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Panaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: Studies of extraction kinetics and thermodynamic. *Bioresource Technology*, 99, 4414–4419.
- Harish P.K.V. and R.N. Tharanathan (2007) Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential- an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 117–131.
- Healy M., A. Green, A. Healy (2003) Bioprocessing of marine crustacean shell waste. *Acta Biotechnology*, 23, 151-160.

Healy M.G., C.R. Romo, R. Bustos (1994) Bioconversion of marine crustacean shell waste. *Resour. Conserv. Recy.*, 11, 139–147.

Heredia, A., Aguilar-Franco, M., Magaña, C., Flores, C., Piña, C., Velázquez, R., Schäffer, T.E., Bucio, L. and Basiuk, V.A. (2007) Structure and interactions of calcite spherulites with α -chitin in the brown shrimp (*Penaeus aztecus*) shell. *Materials Science and Engineering*, C27, 8–13.

Hirotoishi E., Yasuaki T., Noriaki O., Toshihiro K. and Toshiki W. (2004) A crustacean Ca^{2+} - binding protein with a glutamate- rich sequence promotes CaCO_3 crystalization. *Biochem. J.*, 384, 159-167.

Hobel C. F. V. (2004) Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods, PhD thesis, University of Iceland.

Hosoda, N., Kato, T. (2001). Thin- film formation of calcium carbonate crystals: Effects of functional groups of matrix polymers. *Chemical Materials*, 13, 688–693.

Huang M, Khor E, Lim L. (2004) Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation, *Pharm. Res.*, 21(2): 344-53.

-I-

Ibrahim, H.M., Wan Mohtar, W.V., Aidil, A., Rosli, Md. I., Othmane, H. and Othmane, O. (2005) Optimization of medium for the production of β -cyclodextrin glucotransferase using central composite design (CCD). *Process Biochemistry*, 40, 753- 758.

Ifuku S., M. Nogi, K. Abe, M. Yoshioka, M. Morimoto, H. Saimoto, H. Yano (2009) Preparation of chitin nanofibers with a uniform width as α -chitin from crab shells. *Biomacromolecules*, 10, 1584–1588.

Ilankovan P., S. Hein, C.H. Ng, T.S. Trung, W.F. Stevens (2006) Production of N-acetyl chitobiose from various chitin substrates using commercial enzymes. *Carbohydrate Polymer*, 63, 245–250.

Inmaculada Aranaz, Marian Mengíbar, Ruth Harris, Inés Paños, Beatriz Miralles, Niuris Acosta, Gemma Galed and Ángeles Heras (2009) Functional Characterization of Chitin and Chitosan *Current Chemical Biology*, 3, 203-230.

-J-

Jayakumar R., N. New, S. Tokura, H. Tamura (2007) Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 175–181.

Jo G. H., R.D. Park, W.J. Jung (2011) Enzymatic production of chitin from crustacean shell waste IN *chitin chitosan, oligosaccharides and their Derivatives*, Se-Kwon Kim, CRC Press Taylor & Francis Group; pp. 37-43.

Jo G.H., W.J. Jung, J.H. Kuk, K.T. Oh, Y.J. Kim, R.D. Park (2008) Screening of protease-producing *Serratia marcescens* FS-3 and its application to deproteinization of crab shell waste for chitin extraction. *Carbohydrate Polymer*, 74, 504–508.

Jung W.J., G.H. Jo, J.H. Kuk, K.Y. Kim, R.D. Park (2005b) Demineralization of crab shells by chemical and biological treatments. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10, 67–72.

Jung W.J., G.H. Jo, J.H. Kuk, Y.J. Kim, K.T. Oh, R.D. Park (2007) Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Carbohydrate Polymer*, 68, 746–750.

Jung W.J., J.H. Kuk, K.Y. Kim, R.D. Park (2005a) Demineralization of red crab shell waste by lactic acid Fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 851–854.

Jung, W.J., Jo, G.H., Kuk, J.H., Kim, K.Y. and Park, R.D. (2005) Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 234–237.

-K-

Kanauchi O., K. Deuchi, Y. Imasato, E. Kobayashi (1994) Increasing effect of a chitosan and ascorbic acid mixture on fecal dietary fat excretion. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 58, 1617–1620.

Kandra P., Ch.M. Mohan, P.V. Smitha, K.P.J. Hemalatha (2010) Bioremediation of shrimp biowaste by using natural probiotic for chitin and carotenoid production an alternative method to hazardous chemical method. *International Journal of Applied Pharmacology and Technology*, I, 903-910.

Kao P. M., C.I. Chen, S.C. Huang, K.M. Lin, Y.C. Chang, Y.C. Liu (2009) Preparation of fermentation-processed chitin and its application in chitinase affinity adsorption. *Process Biochemistry*, 44, 343–348.

Karam S. (2004) Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt. Thèse de doctorat. Universités de Limoges.

Kartal S.N., Y. Imamura (2005) Removal of copper, chromium, and arsenic from CCA-treated wood onto chitin and chitosan. *Bioresource Technology*, 96, 389–392.

- Kasaai M. R. (2009) Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: A review. *Journal of agricultural Food Chemistry*, 57, 1667-1676.
- Kasaai M. R. (2010) Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. *Carbohydrate Polymer*, 79, 801-810.
- Kasaai M.R. (2011) The Use of Various Types of NMR and IR Spectroscopy for Structural Characterization of Chitin and Chitosan In chitin formation and diagenesis, edition Springer.
- Khanafari, A., Marandi, R., and Santei, Sh. (2008) Recovery of chitin and chitosane from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iran Journal of Environment and Health Science Engineering*, 5, 19- 24.
- Khayet, M., Zahrim, A.Y. and Hilal, N. (2011) Modelling and optimization of coagulation of highly concentrated industrial grade leather dye by response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, 167, 77- 83.
- Khor E. (2001) Chitin: Fulfilling a biomaterials promise. Singapore, Elsevier Science, pp. 148.
- Khor E. (2002) Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opin. Solid State Mat. Sci.*, 6, 313–317.
- Khurana, S., Kapoor, M., Gupta, S and Kuhad, R.C. (2007) Statistical optimization of alkaline xylanase production from *Streptomyces violaceoruber* under submerged fermentation using response surface methodology. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 144- 152.
- Kim K. J., Y.J. Yang, K.G. Kim (2003) Purification and Characterization of Chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *Journal of Biochemical and Molecular Biology*, 36, 185–189.
- Kjartansson G. T., S. Zivanovic, K. Kristberg, J. Weiss (2006) Sonication-assisted extraction of chitin from north atlantic shrimps (*Pandalus borealis*). *Journal of agricultural Food Chemistry*, 54, 5894-5902.
- Kofuji K, Qian CJ, Nishimura M, Sugiyama I, Murata Y, Kawashima S. (2005) Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *European Polymer Journal*; 41(11): 2784-91.
- Koide S.S. (1998) Chitin- chitosan: properties, benefits and risks. *Nutrition Research*, 18, 1091–1101.
- Kong C.S., J.A. Kim, B. Ahn, H.G. Byun, S.K. Kim (2010) Carboxymethylations of chitosan and chitin inhibit MMP expression and ROS scavenging in human fibrosarcoma cells. *Process Biochemistry*, 45, 179–186.
- Krajewska B. (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microbial Technology*, 35, 126–139.

Kurita K. (2006) Chitin and Chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8, 203- 226.

-L-

Lavall, R.L., Odilio, B.G.A. and Campana-Filho, S.P. (2007) β -chitin from the pens of *Loloigo* sp.: Extraction and characterization. *Biouresource Technology*, 98, 2465- 2472.

Leveau J. Y. et Bouix M. (1980) *Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel*. 612. Lavoisier Tec & Doc Apria, Paris.

Leveau J. Y., Bouix M. et De Roissart H. (1991) La flore lactique In : Bourgeois C. M., Leveau J. Y. *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Le contrôle micro biologique*. 2^{ème} édition. Lavoisier- Tec & Doc, Paris. 3. 449.

Liu T. G., B. Li, W. Huang, B. Lv, J. Chen, J.X. Zhang, L.P. Zhu (2009) Effects and kinetics of a novel temperature cycling treatment on the N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Polymer*, 77, 110-117.

Loiseleur.J. (1963) *Techniques de laboratoire : Chimie physique, chimie biologique*. Tome 1, 3^{ème} édition, Masson, Paris.

Longhinotti E., F. Pozza, L. Furlan, M.N.M.Sanchez, S.M. Klug, M.C.M. Laranjeira, V.T. Fávere (1998) Adsorption of Anionic Dyes on the Biopolymer Chitin. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 9, 435–440.

Luis C. A., S. Huerta, G.M. Hall, K. Shirai (2002) Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37, 1359–1366.

-M-

Maeda Y., R. Jayakumar, T.F. Nagahama, H. Tamura, Synthesis (2008) Characterization and bioactivity studies of novel β -chitin scaffolds for tissue-engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecule*, 42, 463–467.

Mahmoud N.S., A.E. Ghaly and F. Arab (2007) Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 3, 1–9.

Majtán J., K. Bíliková, O. Markovič, J. Gróf, G. Kogan, J. Šimúth (2007) Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *International Journal of Biological Macromolecule*, 40, 237–241.

- Malgorzata, J., Kensuke, S., Gaudon, P., Guibal, E. (2003). Influence of chitosane characteristics on polymer properties. I: crystallographic properties. *Polymer International*, 52, 198–205.
- Mario, Di F., Rapana, P., Tomati, U. and Galli, E. (2007) Chitin and chitosane from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 8- 12.
- Mi F.L., Y.M. Lin, Y.B. Wu, S.S. Shyu, Y.H. Tsai (2002) Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: phase-separation, degradation and release behavior. *Biomaterials*, 23, 3257–3267.
- Mikkelsen, A., Engelsen, S.B., Hansen, H.C.B., Larsen, O. and Skibsted, L.H. (1997) Calcium carbonate crystallization in the α -chitin matrix of the shell of pink shrimp, *Pandalus borealis*, during frozen storage. *Journal of Crystals Growth*, 177, 125- 134.
- Mirzadeh, H., Nakisa, Y., Saeed, A., Hossein, A., Mohagheghi, A.M. and Farzin, H. (2002) Preparation of chitosan derived from shrimp's shell of Persian Gulf as a blood hemostasis agent. *Iranian Polymer Journal*, 1, 63-68.
- Mohammedi S. (1993) Contribution à l'étude de *Bacillus thuringiensis* ; pouvoir entomocide et croissance sur deux substrats carbonés de quelques souches isolées localement, mémoire de magister, (USTHB).
- Mojarrad J. S., N. Nemat, H. Valizadeh, M. Ansarin, S. Bourbour (2007) Preparation of glucosamine from exoskeleton of shrimp and predicting production yield by response surface methodology. *Journal of agricultural Food Chemistry*, 55, 2246-2250.
- Morfin I., P. Hazot, F. Guillot, C. Soler, C. Korwin-Zmijowska, K. Tahiri, X. Chevalier, M. Corvol, A. Domard (2002) Percolating hydrogels for tissue engineering. *European Cells Materials*, 4, 55–56.
- Morimoto M., H. Saimoto and S. Yoshihiro (2002) Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 14, 205–222.
- Mukherjee D. P. (2001) Method for producing chitin or chitosan. United States Patents, 6, 310, 188.
- Muzzarelli C., O. Francescangeli, G. Tosi, R.A.A. Muzzarelli (2004) Susceptibility of dibutyl chitin and regenerated chitin fibres to deacylation and depolymerization by lipases. *Carbohydrate Polymer*, 56, 137–146.
- Muzzarelli R.A.A. and C. Muzzarelli (2004) Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. *Advance in Polymer Science*, 186, 151–209.

- Nagahama H., N. New, R. Jayakumar, S. Koiwa, T. Furuike, H. Tamura (2008) Novel biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymer*, 73, 295–302.
- Nagahama H., T. Kashiki, N. New, R. Jayakumar, T. Furuike, H. Tamura, Preparation of biodegradable chitin/gelatin membranes with GlcNAc for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymer*, 73, 456–463.
- Nair K. G. and A. Dufresne (2003) Crab shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites. Processing and swelling behavior. *Biomacromolecules*, 4, 657-665.
- Nitar Nwe, Tetsuya Furuike, and Hiroshi Tamura (2011) Chitin and Chitosan from Terrestrial Organisms In: chitine, chitosane, oligosaccharides and their derivatives, CRC Press, Taylor and Francis Group.
- No H. K., S.H. Lee, N.Y. Park, S.P. Meyers (2003) Comparison of physicochemical, binding, and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process. *Journal of agricultural Food Chemistry*, 51, 7659-7663.
- No H.K., Y.I. Cho, S.P. Meyers (1996) Dye binding capacity of commercial chitin products. *Journal of agricultural Food Chemistry*, 44, 1939–1942.
- No, E.Y. Hur (1998) Control of Foam Formation by Antifoam during Demineralization of Crustacean Shell in Preparation of Chitin. *Journal of agricultural Food Chemistry*, 46, 3844-3846.
- No, H.K., Meyers, S.P. and Lee, K.S. (1989) Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 37, 575–579.
- Nor, M.N., Rosfarizan, M., Hooi, L.F. and Raha, A. (2010) Improvement of folate biosynthesis by lactic acid bacteria using response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 243- 250.
- Novikov V. Y. (2004) Acid hydrolysis of chitin and chitosan, *Russian journal of applied chemistry*, vol 77, N°3, pp. 484- 487.
- Nsereko S. and M. Amiji (2002) Localized delivery of paclitaxel in solid tumors from biodegradable chitin microparticle formulations. *Biomaterials*, 23, 2723- 2731.

-O-

Oh K.T., Y.J. Kim, N.V. Nguyen, W.J. Jung, R.D. Park (2008) Effect of Crab Shell Size on Bio-demineralization with Lactic Acid-Producing Bacterium, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13, 566–570.

Oh K.T., Y.J. Kim, V.N. Nguyen, W.J. Jung, R.D. Park (2007) Demineralization of crab shell waste by *Pseudomonas aeruginosa* F722. *Process Biochemistry*, 42, 1069–1074.

Oh Y.S., I.L. Shih, Y.M. Tzeng, S.L. Wang (2000) Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme Microbial and Technology*, 27, 3-10.

Otterlei M., K.M. Varum, L. Ryan, T. Espevik (1994) Characterization of binding and TNF-alpha inducing ability of chitosans on monocyts: the involvement of CD 14. *Vaccine*, 12, 825–832.

Özbas-Turan S., C. Aral, L. Kabasakal, M. Keyer-Uysal, J. Akbuga (2003) Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non-viral gene delivery vehicle. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 6, 27–32.

-P-

Pacheco N., M. Garnika-Gonzalez, J.Y. Ramírez, B. Flores-Albino, M. Gimeno, E. Bárzana, K. Shirai (2009) Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 100, 2849–2854.

Pal, A. and Khanum, F. (2011) Identification and optimization of critical medium components using statistical experimental designs for enhanced production of xylanase from *Aspegillus flavus* DFR-6. *Food Technology and Biotechnology*, 49, 228- 236.

Patil R.S., V. Ghormade, M.V. Deshpand (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microbial and Technology*, 26, 473–483

Paulino, A.T., Minasse, F.A., Guilherme, M.R., Reis, A.V., Muniz, E.C. and Nozaki, J. (2006) Novel adsorbent based on silkworm chrysalids for removal of heavy metals from wastewaters. *Journal of Colloid Interface Science*, 301, 479–487.

Percot A., C. Viton, A. Domard (2003) Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules*, 4, 12-18.

Popov, S., Rankovik, J., Dodić, J., Dodić, S. and Jokić, A. (2010) Bioethanol production from raw juice as intermediate of sugar beet processing: a response surface methodology approach. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 376- 383.

Poulsen P.H.B., J. Møller, J. Magid (2008) Determination of a relationship between chitinase activity and microbial diversity in chitin amended compost. *Bioresource Technology*, 99, 4355–4359.

-Q-

Quinn G.P. and Keough M.J. (2002) *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press.

-R-

Rabea E.I., E.T.B. Mohamed, C.V. Stevens, G. Smagghe, W. Steurbaut (2003) Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*, 4, 1457–1465.

Randriamahatody Zo (2011) *Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette : utilisation de la proteolyse enzymatique pour des applications avicoles a madagascar*. thèse de doctorat en sciences de la vie. Université d'Antananarivo, Madagascar.

Rao M. S., J. Muñoz, W.F. Stevens (2000) Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 808-813.

Rao M.S. and W.F. Stevens (2006) Fermentation of Shrimp Biowaste under Different Salt Concentrations with Amylolytic and Non-Amylolytic *Lactobacillus* Strains for Chitin production. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 83–87.

Ravi Kumar M.N.V. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React. Func. Polym.* 46 (2000) 1–27.

Rezaei F., T.L. Richard, B.E. Logan (2009) Analysis of chitin particle size on maximum power generation, power longevity, and Coulombic efficiency in solid–substrate microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 192, 304–309.

Rinaudo M. (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress Polymer Science*, 31, 603–632.

Robinson-Lora M.A. and R.A. Brennan (2009) The use of crab-shell chitin for biological denitrification: Batch and column tests. *Bioresource Technology*, 100, 534–541

Rodríguez M.S., L.A. Albertengo, E. Agulló (2002) Emulsification capacity of chitosan. *Carbohydrate Polymer*, 48, 271–276.

-S-

Sachindra N. M., N. Bhaskar, G. S. Siddegowda, A.D. Sathisha, P.V. Suresh (2007) Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. *Bioresource Technology*, 98, 1642–1646.

Sajomsang, W. and Pattarapond, G. (2010) Preparation and characterization of α -chitin from Cicada sloughs. *Material Science Engineering C30*.

Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y, Ogawa R, Tokura S. (1991) Distribution of the acetamide group in partially deacetylated chitins, *Carbohydrate Polymer*; 16(3): 291-6.

- Sashiwa H., H. Yajima, S.I. Aiba (2003) Synthesis of a Chitosan-Dendrimer Hybrid and Its Biodegradation. *Biomacromolecules*, 4, 1244–1249.
- Sashiwa H., S.I. Aiba (2004) Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 29, 887–908.
- Sato H., S.I. Mizutani, S. Tsuge, K. Aoi, A. Takasu, M. Okada, S. Kobayashi, T. Kiyosada, S.I. Shoda (1998) Determination of the degree of acetylation of chitin/chitosan by pyrolysis-gas chromatography in the presence of oxalic acid. *Anal. Chem.* 70, 7-12.
- Schmuhl R., H.M. Krieg, K. Keizer (2001) Adsorption of Cu(II) and Cr(VI) ions by chitosan: Kinetics and equilibrium studies. *Water SA*, 27, 1–7.
- Schrempf H. (2001) Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 285–289.
- Shahidi F., R. Abuzaytoun (2005) Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res.* 49, 93- 35.
- Shahidi, F. J.K.V. Arachchi, Y.J. Jeon (1999) Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science Technology*, 10, 37–51.
- Shigemasa Y, Matsuura H, Sashiwa H, Saimoto H. (1996) Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *Int J Biol Macromol.*, 18, 237.
- Shigemasa Y, Saito K, Sashiwa H, Saimoto H. (1994) Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16, (1): 43-9.
- Shirai K., I. Guerrero, S. Huerta, G. Saucedo, A. Casillo, G.R. Obdulia, M.G. Hall (2001) Effect of initial glucose and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme Microbial Technology*, 28, 446-452.
- Sini T.K., S. Santhosh, P.T. Mathew (2007) Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydrate Research*, 42, 2423–2429.
- Sirisompong, W., Jirapakkul, W. and Klinkesorn, U. (2011) Reponse surface optimization and characteristics of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) kernel fat by hexane extraction. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1946- 1951.
- Sorlier P., A. Denuzière, C. Viton, A. Domard (2001) Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, 2, 765-772.

- Sorokulova I., A. Krumnow, L. Globa, V. Vodyanoy (2009) Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1123–1126.
- Spagna G., P.G. Pifferi, C. Rangoni, F. Mattivi, G. Nicolini, R. Palmonari (1996) The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Research International*, 29, 241–248.
- Speiciene V., F. Guilmineau, U. Kulozik, D. Leskauskaite (2007) The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins. *Food Chemistry*, 102, 1048–1054. Statistica Release 7, STA862D175437Q.
- Stawski, D., Rabiej, S., Herczynka, L. and Draczynski, Z. (2008) Thermogravimetric analysis of chitins of different origin. *Journal of thermal Analysis and calorimetry*, 93, 489- 494.
- Suresh P.V. and M. Chandrasekaran (1998) Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 655–660.
- Suzuki Y., Y. Okamoto, M. Morimoto, H. Sashiwa, H. Saimoto, S.I. Tanioka, Y. Shigemasa, S. Minami (2000) Influence of physico-chemical properties of chitin and chitosan on complement activation. *Carbohydrate Polymer*, 42, 307–310.
- Synowiecki J. and N.A.A.Q. Al-Khateeb (2000) The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry*, 68, 147-152.

-T-

- Tolaimate A., J. Desbières, M. Rhazi, A. Alagui, M. Vincendon, P. Vottero (2000) On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*, 41, 2463–2469.
- Tomihata K, Ikada Y. (1997) In vitro and in vivo degradation of films of chitins and its deacetylated derivatives, *Biomaterials*; 18: 567-75.
- Trimukhe K.D. and A.J. Varma (2008) Complexation of heavy metals by crosslinked chitin and its deacetylated derivatives. *Carbohydrate Polymer*, 71, 66–73.

-V-

- Valdez-Peña A.U., J.D. Espinoza-Perez, G.C. Sandoval-Fabian, N. Balagurusamy, A. Hernandez-Rivera, De-la-Garza-Rodriguez, J.C. Contreras-Esquivel (2010) Screening of

industrial enzymes for deproteinization of shrimp head for chitin recovery. *Food Science and Biotechnology*, 19, 553-557.

Varum, K.M., Anthonsen, M.W., Grasdalen, H., and Smidsrød, O. (1991) Determination of the degree of *N*-acetylation and the distribution of *N*-acetyl groups in partially *N*-deacetylated chitins (chitosans) by high-field NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*; 211:17–23

Vivekananthana R., M. Ravi, D. Saravanakumar, N. Kumar, V. Prakasama, R. Samiyappana (2004) Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. *Crop Protection*, 23, 1061–1067.

Vongchan P., W. Sajomsang, W. Kasinrerak, D. Subyen, P. Kongtawelert (2003) Anticoagulant activities of the chitosan polysulfate synthesized from marine crab shell by semi- heterogenous conditions. *Science Asia*, 29, 115–120.

-W-

Waldeck J., G. Daum, B. Bisping, F. Meinhardt (2006) Isolation and molecular characterization of chitinase-deficient *Bacillus licheniformis* strains capable of deproteinization of shrimp shell waste to obtain highly viscous chitin. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 7879–7885.

Waldemar Maniukiewicz (2011) X-Ray, Diffraction Studies of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives In: chitine, chitosane, oligosaccharides and their derivatives, CRC Press, Taylor and Francis Group.

Wang S. L., S.J. Chen, C.L. Wang (2008) Purification and characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as a substrate. *Carbohydr. Res.* 343, 1171–1179.

Wang S.L., I.L. Shih, C.H. Wang, K.C. Tseng, W.T. Chang, Y.K. Twu, J.J. Ro, C.L. Wang (2002) Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microbial Technology*, 31, 321–328.

Wang S. L., T.J. Chang, T.W. Liang (2010) Conversion and degradation of shellfish wastes by *Serratia* sp. TKU016 fermentation for the production of enzymes and bioactive materials. *Biodegradation*, DOI 10.1007/s10532-009-9303-x.

Wang S. L., T.Y. Huang, C.Y. Wang, T.W. Liang, Y.H. Yen, Y. Sakata (2008) Bioconversion of squid pen by *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* TKU010 for the production of proteases and lettuce growth enhancing biofertilizers. *Bioresource Technology*, 99, 5436–5443.

Wang S.L. and S.H. Chio (1998) Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Enzyme Microbial and Technology*, 22, 629-633.

Wang S.L., T.Y. Kao, C.L. Wang, Y.H. Yen, M.K. Chern, Y.H. Chen (2006) A solvent stable metalloprotease produced by *Bacillus* sp. TKU004 and its application in the deproteinization of squid pen for β -chitin preparation. *Enzyme Microbial and Technology*, 39, 724–731.

Wang S.L., Y.H. Yen, G.C. Tzeng, H. Chienyan (2005) Production of antifungal materials by bioconversion of shellfish chitin wastes fermented by *Pseudomonas fluorescens* K-188. *Enzyme Microbial and Technology*, 36, 49–56.

Wang X. and B. Xing (2007) Importance of structural makeup of biopolymers for organic contaminant sorption. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3559-3565.

Wu T., Svetlana Zivanovic, F. Ann Draughon, Carl E. Sams (2004) Chitin and chitosan-value-added products from mushroom waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 7905- 7910.

-X-

Xu Y., C. Gallert, J. Winter (2008) Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 687–697.

-Y-

Yang J.K., I.L. Shih, Y.M. Tzeng, S.L. Wang (2000) Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme Microbial and Technology*, 26, 406–413.

Yang L., A. Zhang, X. Zheng (2009) Shrimp Shell Catalyst for Biodiesel Production. *Energy Fuels*, 23, 3859–3865.

Yang M-H, Kuo C-H, Hsieh W-C and Ku K-L. (2010) Investigation of microbial elicitation of *trans*-resveratrol and *trans*-piceatannol in peanut callus led to the application of chitin as a potential elicitor. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58, 9537- 9541.

Yang T.L. (2011) Chitin based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ. *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 1936-1963.

Yang Y.P., X.H. Xu, H.F. Chen (2004) Treatment of chitin- producing wastewater by micro-electrolysis- contact oxidization. *Journal of Zhejiang University Science*, 5, 436–440.

Yasutomo N., T. Hiroko, N. Yoshiharu, W. Masahisa, O. Shigeru, K. Shigenori (2003) Alkali-Induced Conversion of α -Chitin to β -Chitin. *Biomacromolecules*, 4, 896-899.

Yen, M.T., Yang, J.H. and Mau, J.L. (2009) Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 75, 15–21.

Yoshihiro K., T. Hideo, S. Hajime, H. Tomohiro, H. Hirohiko, K. Masatoshi, I. Tadayuki, T. Takeshi (2008) Interaction force of chitin-binding domains onto chitin surface, *Biomacromolecules*, 9, 2126–2131.

Yoshihiro K., T. Hideo, S. Hajime, H. Tomohiro, H. Hirohiko, K. Masatoshi, I. Tadayuki, T. Takeshi (2008) Interaction force of chitin-binding domains onto chitin surface. *Biomacromolecules*, 9, 2126–2131.

Yu T., L. Wang, Y. Yin, Y. Wang, X. Zheng (2008) Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 44–48.

-Z-

Zakaria Z., G.M. Hall, G. Shama (1997) Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 33, 1–6.

Zhai X., S.J. Hawkins (2002) Interactions of aquaculture and waste disposal in the coastal zone. *J. Ocean Univ. Qingdao* 1, 8-12.

Zhang H, Neau SH. (2001) In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation, *Biomaterials*; 22(12): 1653-8.

Zhang Y., C. Xue, Y. Xue, R. Gao, X. Zhang (2005) Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research*, 340, 1914–1917.

Zhou, D., Zhang, L. and Guo, S. (2005) Mechanisms of lead biosorption on cellulose/chitin beads. *Water Research*, 39, 3755- 3762.

Annexe

1- Préparation des réactifs pour les dosages

1- 1- Glucose :

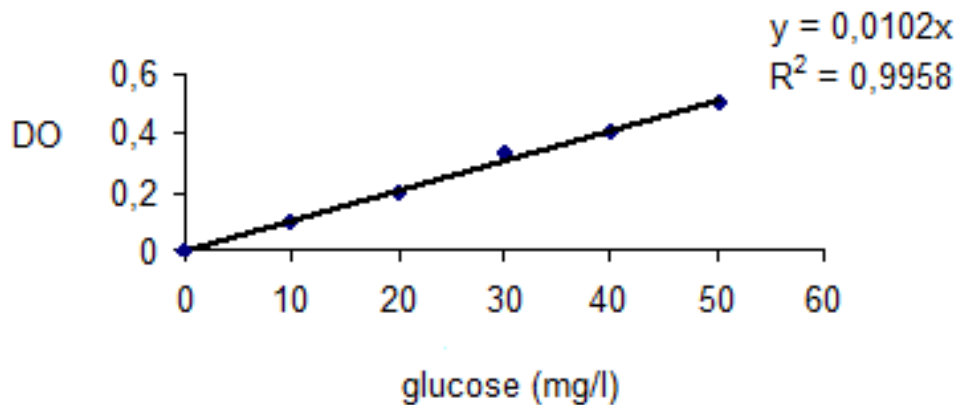
- Préparation du réactif DNS

Acide dinitrosalicylique	1%
Phénol	0,2%
Sulfite de sodium	0,05%
NaOH	1%
Rochelle salt (tartrate double de sodium et potassium)	40%

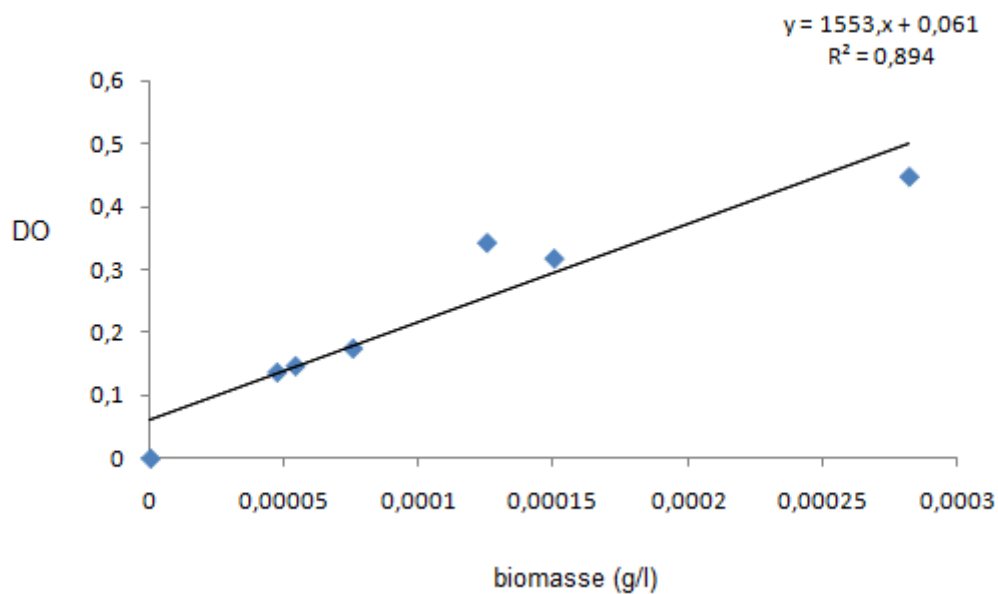
Etalon glucose (solution de 1g/l)

Les réactifs doivent être mélangés dans l'ordre indiqué ci-dessus à l'exception du Rochelle salt qui doit être préparé seul et ajouté aux échantillons après ébullition.

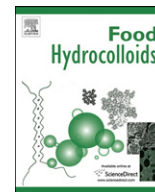
2- Les courbes d'étalonnage



Courbe d'étalonnage du glucose



Courbe d'étalonnage de la biomasse



Optimization of medium composition for enhanced chitin extraction from *Parapenaeus longirostris* by *Lactobacillus helveticus* using response surface methodology

W. Arbia^{a,*}, L. Adour^a, A. Amrane^b, H. Lounici^a

^a Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés BIOGEP, Ecole Nationale Polytechnique, B.P. 182-16200, El Harrach, Algiers, Algeria

^b Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, Université Rennes 1, CNRS, UMR 6226, Avenue du Général Leclerc, CS 50837, 35708 Rennes Cedex 7, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2012

Accepted 24 October 2012

Keywords:

Chitin extraction

Central composite design

Response surface methodology

Optimization

Demineralization

Deproteinization

ABSTRACT

Chitin extraction by biological way, using the lactobacilli *Lactobacillus helveticus*, is a non-polluting method and offers the opportunity to preserve the exceptional qualities of chitin and its derivatives. However, the major disadvantage of the fermentative way is the low efficiency of demineralization and deproteinization. The aim of our study is to improve the yield of extraction.

Many factors, such as the initial concentration of carbon source, fermentation time, incubation temperature, inoculum size, shell size, volume and medium composition have been reported to influence the fermentation process and consequently demineralization and deproteinization efficiency. Based on the use of central composite design and response surface methodology ten factors with three levels each were examined to determine the optimal operational conditions of demineralization and deproteinization.

The analysis of the obtained results showed that the optimal conditions of 98% of demineralization and 78% of deproteinisation are 171.4 g L⁻¹ of reducing sugars, 2.03 g of nitrogen source [(NH₄)₂Fe(SO₄)₂] and 1.29 g of calcium source (CaCl₂), used to ferment 4.84 g of shells, of 1.053 mm size heat treated at 120 °C, with 10 mL of inoculum (*L. helveticus*) incubated at 32.1 °C in 100 mL of juice date for 254.38 h (15 days).

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chitin is the second most abundant structural biopolymer found in nature (Ji, Wolf, Rodriguez, & Bowlin, 2012; Khuoshab, Jaruseranee, Tanthanuch, & Yamabhai, 2012). It occurs in a multitude of organisms from bacteria and fungi to molluscs and others, but is certainly most prominent in the largest and most diverse group of the animal kingdom particularly, arthropod group (Fabritius et al., 2011).

In arthropods, chitin is used together with various proteins and inorganic salts such as calcium carbonate, to form the exoskeleton. The actual chitin content varies depending on physiological stage of the organism (Benhabiles et al., 2012), harvesting season (Nitar, Tetsuya, & Hiroshi, 2011), health of the animals and geographical location (Kjartansson, Zivanovic, Kristberg, & Weiss, 2006). To date,

the major source of industrial chitin comes from wastes of marine food production mainly crustacean shells, e.g. shrimp and crab shells or krill (Jayakumar et al., 2010; Mojarrad, Nemati, Valizadeh, Ansarin, & Bourbour, 2007; Xia, Liu, Zhang, & Chen, 2010; Xu, Gallert, & Winter, 2008).

The traditional processes of chitin production consist of the use of strong acids and bases under high temperature for demineralization and deproteinization, respectively. These processes, however, may cause pollution (Zakaria, Hall, & Shama, 1998) and significantly lower intrinsic viscosities of chitin (Rødde, Einbu, & Vårum, 2008). An alternative way to solve these problems is the use of biotechnological methods. The calcium and the protein in the shell waste were dissolved mainly by organic acids and proteases produced by microorganisms, respectively. Many factors, such as inoculum level (Shirai et al., 2001), shell content in medium, shell size (Oh, Kim, Nguyen, Jung, & Park, 2008), carbon source such as glucose (Rao, Muñoz, & Stevens, 2000; Shirai et al., 2001), sucrose (Choorit, Patthanamane, & Manurakchinakorn, 2008), cassava flour (Rao and Stevens, 2006), molasses (Seda, Sebnam, Yekta, & Ali Fazil Yenidunya, 2004) and date juice (Adour, Arbia, Amrane, & Mameri, 2008), initial pH and its evolution during fermentation

* Corresponding author. Tel.: +213 551 484 142; fax: +213 219 278 02.

E-mail addresses: arbia.wassila@yahoo.fr (W. Arbia), lyadour@yahoo.fr (L. Adour), abdeltif.amrane@univ-rennes1.fr (A. Amrane), hakim_lounici@yahoo.com (H. Lounici).

(Rao et al., 2000), temperature (Pacheco et al., 2009), carbon concentration and carbon on nitrogen ratio, have been reported to influence the fermentation process and consequently the demineralization efficiency (Choorit et al., 2008; Jo, Park, & Jung, 2011; Shirai et al., 2001).

It is to be noted that the major part of the reported studies (Adour et al., 2008; Rao et al., 2000) did not implement mathematical and especially statistical methods for process optimization, and hence only involve a separate optimization of each considered parameter with all others kept unchanged. Such empirical procedure needs several experimental runs, and hence is time-consuming, ignores interaction effects between the operating parameters and leads to low optimization efficiency. These limitations can be avoided by applying the response surface methodology that involves statistical design of experimentation in which all factors are varied together over a set of experimental runs. In fact, Response Surface Methodology is a collection of mathematical and statistical techniques useful for developing, improving and optimizing processes, and can be used to evaluate the relative significance of several affecting factors even in the presence of complex interactions (Khayet, Zahrim, & Hilal, 2011).

The effectiveness of modeling chitin extraction using Response Surface Methodology was recently shown (Bhaskar, Suresh, Sakhar, & Sachindra, 2007; Pacheco et al., 2009). Chitin recovery from a mixture of cephalothoraxes of shrimp species *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylosstris* and *Litopenaeus setiferus* using *Lactobacillus plantarum* showed the highest demineralization and deproteinization yields in the range 27–36 °C and 30–40 °C respectively, using Response Surface Methodology (Pacheco et al., 2009). Culture conditions were also previously optimized by means of Response Surface Methodology, leading to the following optimal conditions, pH 4.3 ± 0.1, 5% (v/w) inoculum, 15% (w/w) glucose and 72 h fermentation time at 37 ± 1 °C, resulting in 97.9 ± 0.3% deproteinization and 72.5 ± 1.5% demineralization yields of shrimp bio-waste using *Pediococcus acidolactici* (Bhaskar et al., 2007).

In the present study, attempts were made to improve demineralization and deproteinization obtained in our previous study by fermenting shrimp shell waste of *Parapenaeus longirostris* using *Lactobacillus helveticus*. Culture medium and conditions were optimized by means of Response Surface Methodology, namely the concentrations of carbon, nitrogen and calcium sources, the temperature, the inoculum level, the medium volume (date juice), shell size and its amount and the heat treatment.

2. Methodology

2.1. Materials

All chemicals used in this study were analytical grade and purchased from Sigma Chemical Co. (St. LouisMo). Shrimp shells were obtained from a seafood restaurant. It was confirmed that all shells were from a single species of shrimp *P. longirostris*. *L. helveticus* strain *milano* was supplied by Dr A. Fur (Even Ltd, Ploudaniel, France). Stock cultures were maintained at –18 °C in skimmed milk.

2.2. Preparation of the shells

Before use, the flesh, antennas and legs were removed from the shrimp shells. They were then boiled in water for 1 h to remove the maximum amount of flesh. Thereafter, they were dried at 163 °C for 1 h in a drying oven (Prolabo, model Volca MC18, French). After cooling, the shells were subjected to a thermal shock and facilitate crushing. Using a standard grinder (Model KU-2, PredomMesko, Skarzyskokam., Poland), the shells were ground into a particle grain

size ranging between 0.31 and 1 mm for studying the effect of shell size on demineralization and deproteinization.

2.3. Date juice preparation

Dates were carefully washed, then pitted and 2 L of water per kilogram of pulp added, and the solution heated at 80 °C for 2 h. The extract obtained was then centrifuged for 30 min at 5000 rpm to remove any remaining cellulosic material (Boudjelal & Nancib, 2001). The supernatant was then used to prepare solutions of date juice at different concentrations of reducing sugars (100 g L⁻¹, 150 g L⁻¹ and 200 g L⁻¹) as a carbon and energy source for lactic acid fermentation.

2.4. Cultures

Stock cultures of *L. helveticus* were reactivated on Man Rogosa Sharp (MRS) agar medium incubated for 24 h at 30 °C. Two successive pre-cultures on liquid MRS medium incubated for 24 h at 30 °C were carried out, and then culture Erlenmeyer flasks were inoculated with the final pre-culture. Batch cultures were carried in Erlenmeyer flasks, whose the volume varies with experiments conditions. The agitation speed was 200 rpm, the initial pH was fixed at 8.5 and the temperature was maintained constant at specified values in the range 20–40 °C. Culture media and all other materials used for this study were sterilized (20 min at 121 °C).

2.5. Optimization of fermentation conditions: experimental design and statistical analysis

In statistics-based approaches, response surface methodology has been extensively used in fermentation medium optimization. Response Surface Methodology is a useful model for studying the effect of several factors influencing the response by varying them simultaneously leading to a limited number of experiments (Popov, Rankovik, Dodić, Dodić, & Jokić, 2010). In addition, RSM was applied to understand the interaction of various variables and then used to find the optimal conditions that affect the response (De Lima, Coelho, & Contiero, 2010).

Optimization of the parameters (reducing sugars, nitrogen and calcium source concentrations, temperature and fermentation time) for demineralization and deproteinization of shrimp shell was done by a central composite design (CCD), which required three levels coded as (+1) (0) and (–1) ($N = 16$ experiments and ten factors at three levels). Table 1 shows the different levels of each parameter. The basic points (reducing sugars, nitrogen and calcium source concentrations, temperature and fermentation time) for the design were selected from a preliminary study (Adour et al., 2008).

Table 1
Design of experiment-levels of the various process parameters.

	Factor	Basic level	Variation interval	Factor value (–)	0	+
Reducing sugars (g L ⁻¹)	X ₁	150	50	100	150	200
Temperature (°C)	X ₂	30	10	20	30	40
Weight of shell powder (g)	X ₃	7	3	4	7	10
Volume of culture medium (mL)	X ₄	300	200	100	300	500
Inoculum volume (mL)	X ₅	15	5	10	15	20
Heat treatment (°C)	X ₆	60	60	0	60	120
Fermentation time (h)	X ₇	162	138	24	162	300
Nitrogen source (g)	X ₈	1.4	1.4	0	1.4	2.8
Calcium source (g)	X ₉	0.65	0.65	0	0.65	1.3
Shrimp shell size (mm)	X ₁₀	0.655	0.655	0.31	0.655	1

The results of the central composite design were statistically evaluated and the data were analyzed by STATISTICA software (V8).

In order to correlate to the independent variables, the response variables were fitted by a second-degree polynomial model:

$$y_i = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Where y_i was the predicted response, x_i and x_j were input variables which influence the response variable Y ; β_0 was the intercept; β_i was the i th linear coefficient; β_{ii} the i th quadratic coefficient and β_{ij} was the ij th interaction coefficient.

The independent factors considered for optimization included the reducing sugars level (X_1), the temperature (X_2), the weight of shell powder (X_3), the volume of culture medium (date juice) (X_4), the inoculum volume (X_5), the heat treatment (X_6), the fermentation time (X_7), the nitrogen source $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ (X_8), the calcium source (CaCl_2) (X_9), the shrimp shell size (X_{10}). The independent variables of the experiments were coded according to the equation:

$$X = \frac{X - \left(\frac{X_{\max} + X_{\min}}{2}\right)}{\left(\frac{X_{\max} - X_{\min}}{2}\right)} \quad (2)$$

It is to be noted that a mineral nitrogen source was used in this study, since it was previously observed that demineralization and deproteinization yields were not improved by the use of a complex nitrogen substrate such as yeast extract (Arbia, Arbia, Adour, Amrane, & Lounici, 2011). In addition, ammonium ions influence the metabolism of some amino acids in lactobacilli by their incorporation with either α -ketoglutarate or glutamate (De Lima et al., 2010). The ammonium ions were first converted to amino acids and then used for the synthesis of proteins needed for growth and lactic acid production (De Lima et al., 2010).

Demineralization DM (Y_1) and deproteinization DP (Y_2) were recorded as the responses (dependent variables). The designed model was further validated using random combinations of the independent variables. All the results were analyzed by means of STATISTICA software to determine the optimal conditions for fermentation.

Table 2 represents the design matrix of 16 trial experiments. STATISTICA software (version 8) was used for experimental design, data analysis and quadratic model building. The optimal fermentation conditions for enhanced yield of demineralization and

deproteinization were obtained by solving the regression equation and also by analyzing the response surface contour plots using the same software.

2.6. Analytical methods

At the end of the fermentation, each sample was filtered using a sieve and the residue was washed three times with distilled water. Ashes were determined by incineration of a 1 g sample in a muffle furnace at 900 °C for 2.5 h (Mirzadeh et al., 2002). The calculation of ashes allowed the determination of the final yield of shell demineralization (Rao et al., 2000). Total proteins in the solid fraction were determined according to the Kjeldahl procedure (AOAC, 1990). The final yield of shell deproteinization was then deduced (Rao et al., 2000).

The determination of the chitin content in the shell is carried out by determination of residues N-acetyl glucosamine released by acid hydrolysis of chitin carried out with 6 N chlorhydric acid for 6 h. The determination of residues N-acetyl glucosamines released is performed by the method of Reissig (Loiseleur, 1963). The content of chitin in shells is calculated by:

$$\text{chitin content} = \left(\frac{\text{acetyl glucosamine weight}}{\text{sample weight}} \right) \times 100 \quad (3)$$

The fraction of nitrogen in chitin contained in 100 g of shells is calculated by Cremades et al. (2001).

$$N(\text{chitin}) = \frac{\text{chitin content}}{14.5} \quad (4)$$

2.6.1. Infrared spectra (IR)

To spectroscopically characterize the biopolymer contained in the samples, FTIR measurements were performed and the IR spectra were recorded on a Bruker IFS113v FTIR-spectrometer (Bruker AXS S.A.S., Champs-sur-Marne, France), in the 4000–500 cm^{-1} spectral region at a 2 cm^{-1} resolution. The samples were ground, mixed with KBr powder and then compressed into pellets.

2.6.2. X-ray fluorescence

This technique allows determining the atoms and their respective proportions in the analyzed sample, but it does not give the organization or the chemical form of atoms. X-ray fluorescence

Table 2
The actual design of experiments and response of demineralization and deproteinization.

Experiment n°	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	DM (%)		DP (%)	
											Experimental	Predicted	Experimental	Predicted
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	79	79	55.52	55.52
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	80	80	65.58	65.58
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	94	94	59.59	59.59
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	98	98	32.43	32.43
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	79	79	33.07	33.07
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	98	98	31.16	31.16
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	90	90	45.50	45.50
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	86	86	78.00	78.00
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	86	86	70.71	70.71
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	84	84	58.09	58.09
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	78	78	60.24	60.24
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	86	86	24.32	24.32
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	96	95.25	54.66	52.47
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95	95.25	51.89	52.47
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	96	95.25	52.93	52.47
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94	95.25	40.37	52.47

was carried out using Magix Pro (PANalytical, Limeil-Brévannes, France), to determine the elemental composition of crude and fermented products before and after lactic acid fermentation. Samples were placed on the sample holder and analyzed by X-ray fluorescence, using a fluorescence spectrometer dispersive AXIOS apparatus (PANalytical); the analysis software was SuperQ®.

2.6.3. Scanning electron microscopy

The dried sample was ground and then coated with gold (20 μm) under vacuum using a sputter coater and its surface was observed in a scanning electron microscope Series XL 30 (U_{max}) ESEM (Env. Scan. Electron Micros) with tungsten filament, using a 20 kV accelerating voltage.

3. Results and discussion

3.1. Shrimp shell characterization

The physico-chemical composition of the crude shell powder is given in Table 3. The shell of *P. longirostris* was characterized by a basic pH which varied between 8 and 9. According to Rao et al. (2000) shrimp scraps fermented by *L. plantarum* 541 also reached this range of pH, 8.2–8.6. Ash content was 25.06% (Table 3) which concord with those cited in previous reports in the literature, 20.8% in crawfish (Zakaria et al., 1998) and between 18 and 23% in tropical shrimp (Rao et al., 2000). Contrarily, red crabs showed greater mineralization, about 41.2% (Jung, Jo, Kuk, Kim, & Park, 2005). The protein content 29.23% (Table 3) was in the range of values reported in the literature, namely 22.4% for red crabs (Jung et al., 2005) and between 30 and 40% for tropical shrimps (Rao et al., 2000). The chitin content 26.98% (Table 3) was in agreement with values previously reported, between 14 and 27% for shrimp (No, Meyers, & Lee, 1989). The low moisture content (3.25%) indicated low hydration.

Infrared spectrum of raw shell, purified chitin and commercial chitin are presented in Fig. 1. The infrared spectrum of raw shell showed the presence of characteristics peaks of calcite at (871.8 cm^{-1} , 1404.1 cm^{-1} , 2522.7 cm^{-1}), and α -chitin at (1658.7 cm^{-1} , 1319.2 cm^{-1} , 1072.3 cm^{-1} , 586.3 cm^{-1}) (Griffiths & Haseeth, 2007; Mario, Rapana, Tomati, & Galli, 2007; Mikkelsen, Engelsen, Hansen, Larsen, & Skibsted, 1997; Stawski, Rabiej, Herczynska, & Draczynski, 2008; Zhou, Zhang, & Guo, 2005) (Fig. 1a).

The use of juice date with 171 g L^{-1} of reducing sugars at 32 °C led to simultaneous efficient DM and DP, 98 and 76% (Table 8). The obtained product was characterized by infrared spectroscopy. The obtained spectrum was presented in Fig. 1b.

(Fig. 1b) showed the disappearance of characteristic calcite peaks, and intense bands were found at 1658 and 1558 cm^{-1} . Both are typical of amides and correspond to stretching vibrations of carbonyl groups, including in chitins (C/O usually called amide I) and to NH (amide II) respectively (Heredia et al., 2007). In addition, the spectrum was lacking a signal at 1540 cm^{-1} , where proteins normally would give rise to absorption (Goodrich & Winter, 2007) and showed the appearance of new peaks (894.9, 1026.1, 1157.2, 1257.2, 1380.9, 1558.4 and 3109.0) corresponding to α -chitin (Fig. 1c).

Table 3
Physico-chemical properties of shrimp shell.

pH	8–9
Moisture %	3.25
Ashes %	25.06
Proteins %	29.23
Chitin %	26.98
Lipids and pigments %	15.48

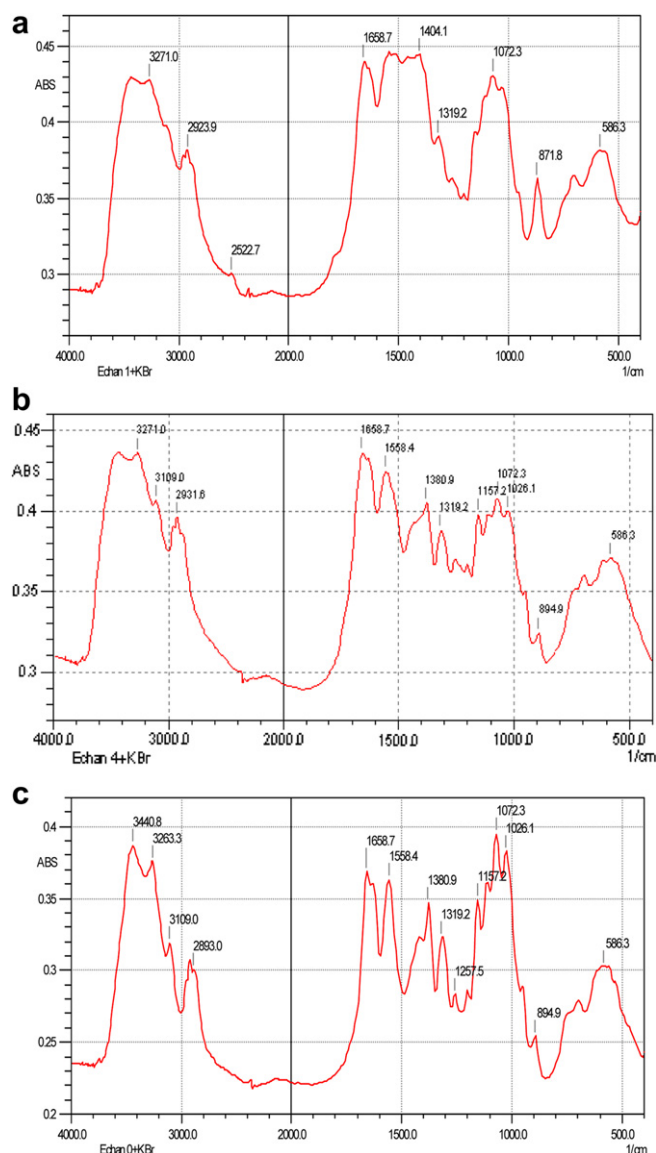


Fig. 1. Infrared spectrum (a) raw shell (b) purified chitin and (c) commercial chitin.

From the above, the comparison of the different absorption peaks and the different bands characteristics of functional groups, observed in each sample, showed a significant similarity between commercial chitin (Fig. 1c) and fermented shell (Fig. 1b). It can be therefore concluded that the characteristic peaks of α -chitin appeared close to those observed after fermentation using *L. helveticus* growing on juice date.

3.2. Study of effects of several factors

It was previously shown that the use of date juice was more efficient than glucose (Arbia, 2007). In addition, ash content decreased depending on the carbon source concentration and incubation temperature (Adour et al., 2008). Fermentation of shrimp (*P. longirostris*) shell with *L. helveticus* on date juice led to a decrease of the ash and protein content depending on several factors. The comparison of the predicted and experimental responses is shown in Table 2 against the observation order. The results reported in this table show a goodness-of-fit between interaction factorial models and the corresponding experimental

set of data. This is due to the location of the experimental points (field of study) used in the experiment design, where the importance of the choice of these points before starting the experiment. In addition, the choice of model (CCD) which has the advantage in some cases where the field of study is well defined to obtain such adjustment. Because if the model is a misnomer, large prediction errors can be detected.

Moreover, several authors have experimented successfully with this method such as Khurana, Kapoor, Gupta, and Kuhad (2007), who found a significant coefficient (R^2) of 97.58, ensuring a satisfactory adjustment of the quadratic model with the experimental data in the study of xylanase production from *Streptomyces violaceoruber* (Khurana et al., 2007). In addition, Ibrahim et al. (2005), have worked on the optimization of medium for the production of β -cyclodextrin glucotransferase using central composite design (CCD). They have obtained a significant model with high satisfactory value of R^2 of 98.9% which indicates that only 1.1% of the total variation is not explained by the model (Ibrahim et al., 2005). A coefficient of regression of 0.974 was obtained in the study of fat extraction carried out by Sirisompong, Jirapakkul, and Klinkesorn (2011).

Table 2 shows that the highest demineralization yield (98%) was obtained during run N°4. Fermentation of shrimp shells in a medium containing sugar and lactic acid bacteria, allowed sugar to be fermented into lactic acid leading to a higher lactic acid accumulation. This acid reacts with the calcium carbonate in the shrimp shells, resulting in the formation of calcium lactate (Choorit et al., 2008). The lowest rate of demineralization 79% was obtained during experiment N°1 (Table 2). For deproteinization, the highest yield (78%) was obtained in experiment N°8; while the lowest yield was 24.3% recorded during experiment N°12 (Table 2).

3.3. X-ray fluorescence and electronic microscopic examination results

Table 4 shows chemical composition of minerals in raw shells. Table 4, shows that the majority of minerals present in the raw shell were removed, since they were at trace levels in the fermented shells except iron (Fe) which increased from 0 to 4%. This result was due to the presence of iron in the mineral nitrogen source $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$, leading to adsorption of iron due to the ability of chitin to fix metal and heavy metals (Camci-Unal and Pohl, 2009). Additional experiments in the culture conditions of runs 4 and 6 except the replacement of the mineral nitrogen source $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ by NH_4Cl led to 37.46 and 39.50% deproteinization and an almost total demineralization confirming the assumption of iron adsorption.

Table 4
Chemical composition of raw and fermented shells.

Compounds (%)	Raw shell	Commercial crab chitin	Fermented chitin (N°4)	Additional assay
Na	2.086	1.104	0.069	0.069
Mg	1.581	0.406	0.171	0.655
Al	0.153	1.808	0.036	0.048
Si	2.232	0.165	0.172	0.095
P	5.467	0.294	1.605	2.32
Mn	0.005	0.555	0.452	0.532
Ti	0.078	n.d	0.06	0.055
K	0.268	0.162	0.160	0.145
Ca	13.334	1.425	0.906	3.044
Fe	0.015	0.297	4.825	4.639
Cu		2.262	0.012	0.008
Pb		4.049	0.005	0.061
Zn		0.138	0.005	0.061
Br		0.479	0.018	0.051
Sr		0.427	0.012	0.034

Fig. 2 shows the SEM photographs of commercial chitin, crude shrimp shell and extracted chitins from *P. longirostris*, product for experiments N°1, N°4, N°15 and an additional assay.

According to Yen, Yang, and Mau (2009), under electron microscopic examination, the purified chitin showed a distinctly arranged microfibrillar crystalline structure under SEM. The same result was obtained in the present study (Fig. 2d).

The chitin structure appears as several fine loosely united leaves, and similar results were obtained with chitin isolated from crustaceans (Paulino et al., 2006). These results were corroborated by the micrograph of a commercial chitin (Fig. 2b).

The structure of a cut face of ground shrimp shell is characterized by a parallel lamellar organization (Fig. 2a) consisting of a core of chitin chains with layers of proteins (Fabritius et al., 2011).

The space between the chitin chains seems to be considerably reduced after the extraction of the proteins from the shrimp shell. But the pattern observed before the treatment is preserved, suggesting that the native structure of the polysaccharide is also preserved (Lavall, Odilio, & Campana-Filho, 2007).

Ehlich, Koutsoukos, Demadis, and Pokrovsky (2009) observed that during decalcification with EDTA, the CaCO_3 was gently removed and the remaining structure was formed by chitin-protein fibers, which themselves are composed of protein-wrapped nanofibrils. The smoothness of the structure without CaCO_3 contrasted to the blocky appearance of the untreated cuticle, indicating that the biominerals were indeed located between and around the chitin-protein fibers. The absence of structural roughness caused by the removal of the minerals also showed that the chemically treated material lost the brittleness which was present in the natural state. Sajomsang and Pattarapond (2010) found that the surface morphology of the chitin purified from cicada sloughs showed rougher morphology than the crude shell. This might be due to the removal of some inorganic materials and proteins (Sajomsang & Pattarapond, 2010).

The purified chitins obtained in the present study (Fig. 2c–f) showed the reduction of space between sheets compared to the crude shells (Fig. 2a). In addition the purified chitin (Fig. 2d–f) showed same description with commercial chitin (Fig. 2b) since biodegradation and biodeproteinization provide a gentle treatment of chitin which preserve the structure and the appearance of the biopolymer. It was also reported that in lobster cuticle, proteins stabilize not only the structure but the crystalline state by binding the mineral together with the chitin polymer (Ehlich et al., 2009).

Recently, much progress has been reported in extraction of chitin and chitosan from *Panaeus semisulcatus* waste (Khanafari, Marandi, & Santei, 2008). When compared with chemical method (2% NaOH for deproteinization and 10% acetic acid for demineralization). The microbial method using *Lactobacillus* spp. resulted in a better extraction of chitin, providing the effectiveness of the lactic acid fermentation as an alternative to chemical treatment (Andrade, Neto, Fukushima, & Campos-Takaki, 2003), this is confirmed by the infrared spectroscopy, X-ray fluorescence and electronic microscopic examination carried out in the present study. Since, at the end of fermentation mass loss was about 53%, i.e. 1 g of crude shell (untreated) becomes 0.47 g (after elimination of 98% of minerals and 78% of proteins initially presents in the shell), but nevertheless it contains 27.3% of water, the process of drying bring the weight to 0.341 g with a purity of $(78.5 \pm 0.5)\%$ in chitin. While chemical method led to a mass loss about 65%, i.e. 1 g becomes 0.35 g. That it may be due to a partial deacetylation of chitin and hydrolysis of the polymer (Andrade et al., 2003; Kim & Mendis, 2006).

In the present work there was precipitation of calcium carbonate crystals in the form of whitish color (experiments N°13–16). They were analyzed by scanning electron microscopy (Fig. 3).

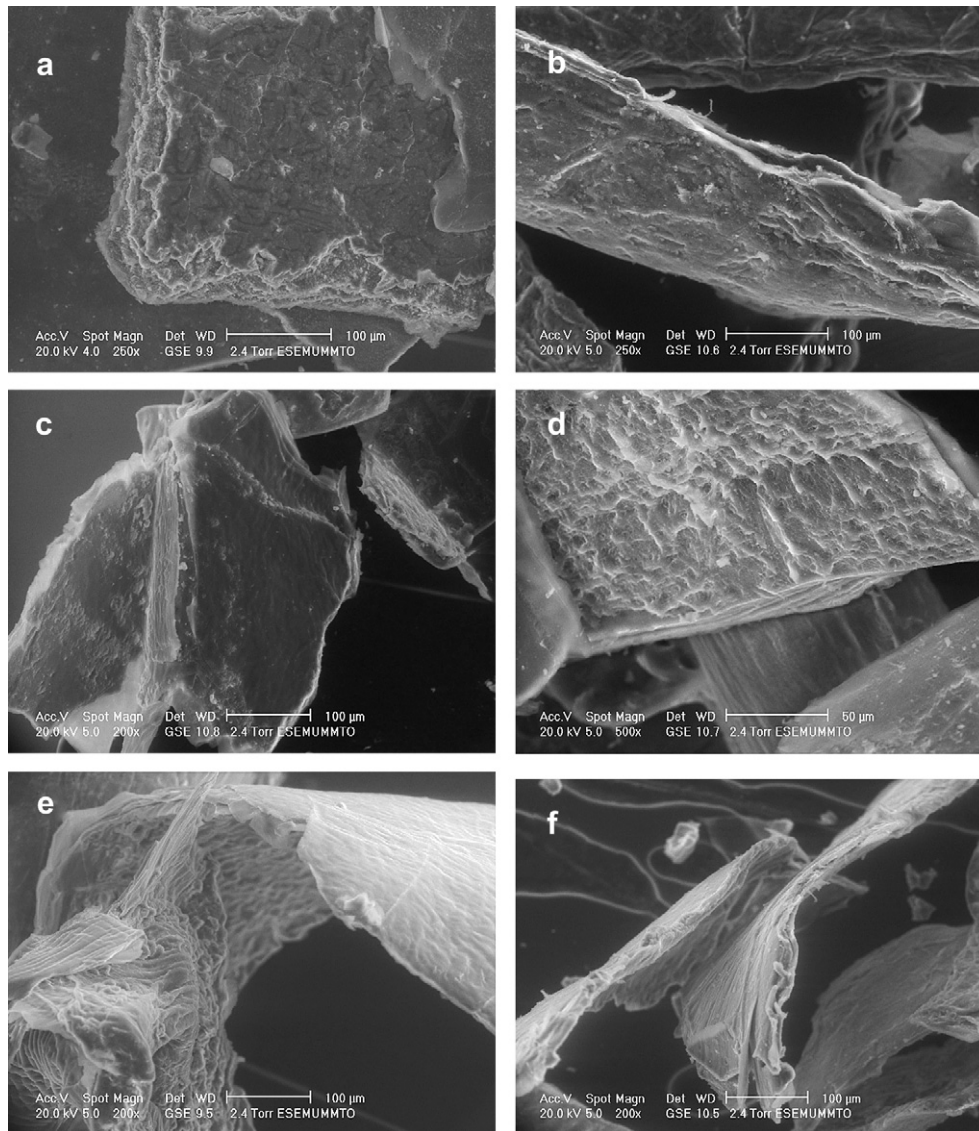


Fig. 2. SEM micrographs showing (a) crude shell (b) commercial chitin (c) chitin purified (N°1) (79% DM, 55% DP) (d) purified chitin (N°4) (98% DM, 32% DP) (e) purified chitin (N°15) (96% DM, 53% DP) (f) purified chitin (additional essay 95% DM, 10% DP).

3.4. Statistical analysis

The results of statistical analysis are presented in Table 5. The coefficients are related to actual variables. Regression analysis was performed to fit the response function with experimental data. The data obtained (Table 5) were fitted to a quadratic polynomial model and the obtained full actual model is shown in equations (5) and (6) for demineralization and deproteinization, respectively:

$$\begin{aligned} \text{DM} = & 95.25 - X_1 - 8.75X_1^2 - X_2 - 2.5X_3 + 2.5X_4 - 2X_5 - X_6 \\ & + 5X_7 + 2.5X_8 + 0.5X_9 - X_{10} + 1.5X_1X_2 \end{aligned} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \text{DP} = & 52.47 + 10.41X_1 - 1.28X_1^2 + 8.87X_2 + 1.45X_3 - 6.92X_4 \\ & - 7.7X_5 + 7.88X_6 - 5.6X_7 - 5.31X_8 + 4.99X_9 + 3.06X_{10} \\ & - 15.73X_1X_2 \end{aligned} \quad (6)$$

The *t*-distribution and the corresponding *p*-value along with the second order coefficient are shown in Table 5. *p*-Value was used as

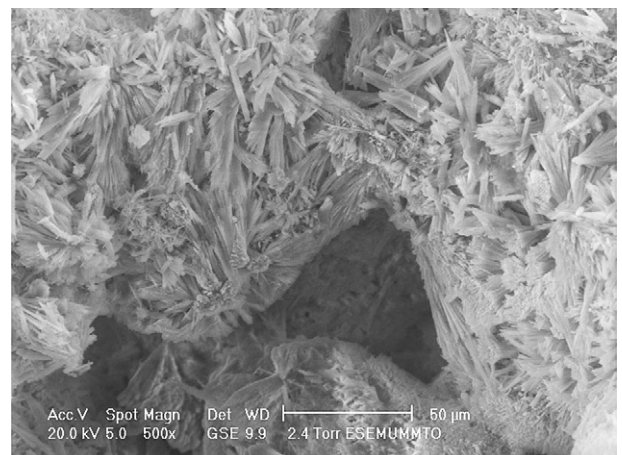


Fig. 3. Micrograph of CaCO₃ from experiments N°13, 14, 15 and 16.

Table 5
Regression equation coefficients for selected responses.

Factors	Demineralization				Deproteinization			
	Coefficient	Standard error	<i>t</i>	<i>p</i>	Coefficient	Standard error	<i>t</i>	<i>p</i>
Mean yield ^a	95.25	0.478714	198.9708	0.000000	52.4700	0.895777	58.5748	0.000011
Concentration (X ₁) (L)	-1.00000	0.276385	13.0909	0.036295	10.4092	1.034354	20.1269	0.000268
Concentration (Q)	-8.75000	0.552771	250.5682	0.000548	-1.2858	2.068709	-1.2431	0.302122
Temperature (L)	-1.00000	0.276385	13.0909	0.036295	8.8708	1.034354	17.1524	0.000432
Shell quantity (L)	-2.50000	0.390868	40.9091	0.007741	1.4517	1.462798	1.9848	0.141399
Vol medium (L)	2.50000	0.390868	40.9091	0.007741	-6.9233	1.462798	-9.4659	0.002499
Vol inoculum (L)	-2.00000	0.390868	26.1818	0.0144446	-7.7050	1.462798	-10.5346	0.001827
Heat treatment (L)	-1.00000	0.390868	6.5455	0.083330	7.8800	1.462798	10.7739	0.001710
Fermentation time (L)	5.00000	0.390868	163.6364	0.001031	-5.6000	1.462798	-7.6566	0.004627
Nitrogen source (L)	2.50000	0.390868	40.9091	0.007741	-5.3150	1.462798	-7.2669	0.005378
Calcium source (L)	0.50000	0.390868	1.6364	0.290795	4.9950	1.462798	6.8294	0.006424
Powder shell size (L)	-1.00000	0.390868	6.5455	0.0833330	3.0683	1.462798	4.1952	0.024707
X ₁ (L)*X ₂ (L)	1.50000	0.829156	3.2727	0.168147	-15.7325	3.103063	-10.1400	0.002043

^a Mean yield, which corresponded to the ordinate origin of Equations (3) and (4).

a tool to determine the significance of each coefficient and lower *p*-value indicated higher significance of corresponding coefficient (Nor, Rosfarizan, Hooi, & Raha, 2010). The Pareto graph was used to show the effect of all variables (Pal & Khanum, 2011) on demineralization (Fig. 4a) and deproteinization rates (Fig. 4b). And following:

3.4.1. Demineralization

As for significance of the polynomial coefficients, their *p*-values suggest that the main factors influencing demineralization rate are fermentation time and concentration, then shell quantity, culture medium volume and the nitrogen source with the same *p*-value and consequently the same effects.

Positive and negative values indicate that high and low concentrations of the considered variable are near optimum, respectively (Pal & Khanum, 2011).

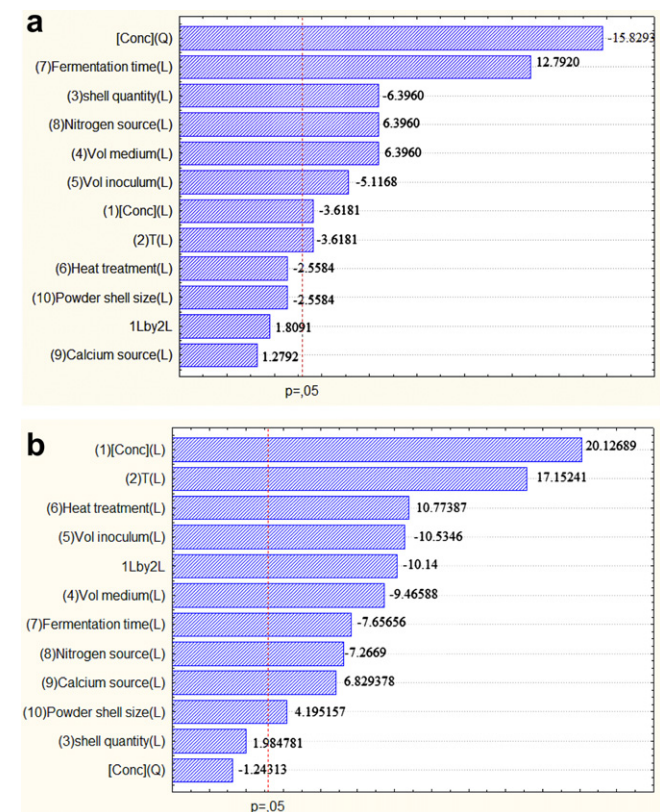


Fig. 4. Pareto graph showing the effect of independent variables on (a) DM and (b) DP rates.

The results showed that the independent variable fermentation time had a significant effect, as it had a positive coefficient (Table 5), and hence an increase of the culture duration led to increasing yields. The same was also observed for the culture medium volume and the nitrogen source. The negative signs of some independent variables, the concentration of carbon source (X₁), the shell quantity (X₃) and the square of the carbon source (X₁²) revealed a reduction in demineralization yield when their concentration or quantity was increased.

3.4.2. Deproteinization

For deproteinization, the most significant factors were the carbon source concentration, the temperature, the heat treatment, the calcium source and the shell size with positive coefficients, while negative coefficients were observed for the culture medium volume, the inoculum volume, the fermentation time and the nitrogen source.

However, regarding demineralization no interactions between factors can be highlighted based on *p*-value results. This indicates that all independent variables cannot be interacting due to the insignificant model *p*-value test. But for deproteinization there is an important negative interaction between the concentration and the temperature based on the *p*-value test.

3.4.3. Analysis of variance

The analysis of variance (ANOVA) for the response surface quadratic model was used to indicate the adequacy of the fitted model. The ANOVA results for modeled responses are summarized in Table 6.

It is evident from Table 6 that the model was highly significant, as shown from the very low probability value and *F* value (*p*-value 0.002342, *F* 72.42614) for demineralization and deproteinization (*p*-value 0.001771, *F* 87.40538). Model significance (*F* value) is a measure of the variation of data around the mean. The *F* value also indicates the relevance of the considered model to predict the experimental results. Table 5 shows that some of the model terms (heat treatment, calcium source, shell powder size and the interaction of concentration of reducing sugars with temperature) have *p*-value > 0.05, and can, therefore be removed from the model, leading to simplified quadratic model equations to describe demineralization and deproteinization:

$$DM = 95.25 - X_1 - 8.75X_1^2 - X_2 - 2.5X_3 + 2.5X_4 - 2X_5 + 5X_7 + 2.5X_8 - X_{10}$$

(7)

Table 6
Analysis of variance (ANOVA) for response quadratic model demineralization.

Source	Demineralization					Deproteinization				
	Sum of squares	Df	Mean squares	F	p-value	Sum of squares	Df	Mean squares	F	p-value
Model	796.688	12	66.3906	72.42614	0.002342	3366.506	12	280.5421	87.40538	0.001771
Residual	2.750000	3	0.916667			9.629000	3	3.209667		
Total SC	799.4375	15				3376.135	15			

$$DP = 52.47 + 10.41X_1 + 8.87X_2 - 6.92X_4 - 7.7X_5 + 7.88X_6 - 5.6X_7 - 5.31X_8 + 4.99X_9 + 3.06X_{10} - 15.73X_1X_2 \quad (8)$$

The graphs in Fig. 5(a) shows demineralization and (b) deproteinization, represents the estimated response vs. the observed response. It may show the suspected results and the defects of the model adequacy. As can be seen the response model showed good fit to experimental data. Therefore, the model can be considered relevant for predictions and optimization.

The high values of R^2 , obtained for all responses, indicated good fit of experimental data to equations (5) and (6). The goodness of the model can be checked by the determination of coefficient R^2 (0.9965 for demineralization and 0.9971 for deproteinization), indicating that 99.65% and 99.71% of the variability in the response of demineralization and deproteinization, respectively, could be explained by the model. The adjusted determination coefficient R^2 (0.9828 for demineralization and 0.9857 for deproteinization) were also satisfactory for confirming the significance of the model.

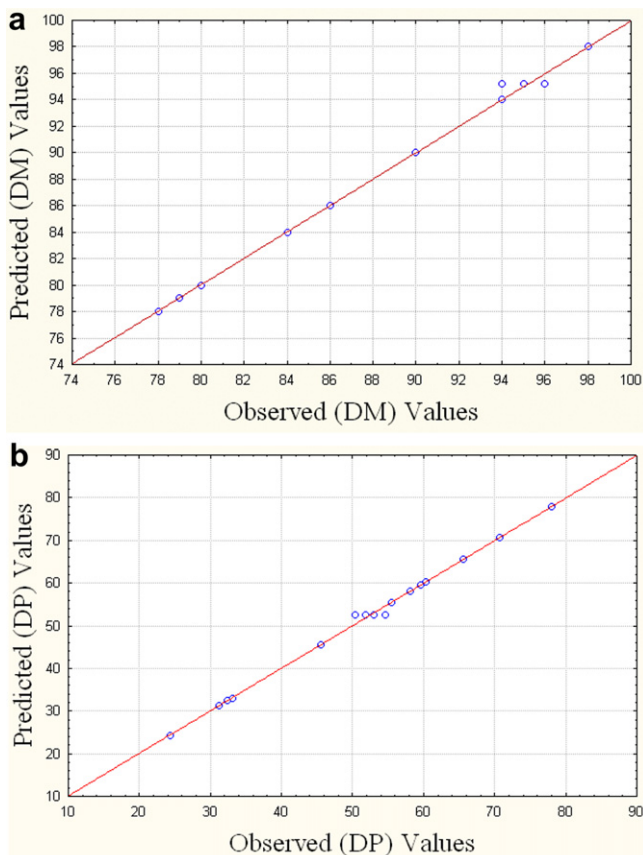


Fig. 5. Parity plot showing observed vs. predicted values for modeled responses.

3.5. Response surface plot analysis

The three dimensional response surface plot is a graphical representation of the regression equation. It is plotted to understand the interaction of the variables and locate the optimal level of each variable for maximal response. Each response surface plotted for demineralization and/or deproteinization yields represents the different combinations of two test variables simultaneously while maintaining the other variable at the zero level (De Lima et al., 2010).

3.5.1. For demineralization

The graphic representation of mutual interaction between the fermentation time, the culture medium volume, nitrogen source and the carbon source concentration for demineralization was shown in Fig. 6.

For a first-order interaction model, when the surface is plane and the corresponding contour plot contains parallel straight lines, if the interaction effect is significant then the plane becomes “twisted”. This twisting of the response surface results in curved contour lines of constant response in the plane of the designed variables. The interaction effect has then a form of curvature in the underlining factorial model corresponding to the considered experiment (Cojocar, Khayet, Zakrzewska-Trznadel, & Jaworska, 2009). Surface plots and contour plots of demineralization which are displayed in Fig. 5 showed that there was not interaction between fermentation time and reducing sugars concentration for demineralization yield and interaction between all factors were not significant, confirming the results given in Table 5.

For demineralization, fermentation time had the main effect, followed by culture medium volume and nitrogen source; while the other factors were of the same order of magnitude.

Fig. 6a show the combined effects of reducing sugars concentration and fermentation time as response to demineralization. From the analysis, the independent variables affect demineralization, but there is not interaction between concentration and fermentation time. Low concentration of reducing sugars and high fermentation time led to high demineralization yields. Similarly, high fermentation time, high medium volume (Fig. 6b) and high nitrogen concentration (Fig. 6c) led to high demineralization yields (100%).

3.5.2. For deproteinization

In the case of deproteinization, Table 5 shows that the reducing sugars concentration was the most significant factor, followed by temperature, heat treatment, calcium source and shell powder size. The (X_2X_1) temperature and the reducing sugars concentration have an important negative interaction. The other factors, namely culture medium volume (X_4), inoculum volume (X_5) and fermentation time (X_7) have also a negative effect in the same order of magnitude.

Fig. 7a show a reduced impact of the interaction between the concentration and temperature. Indeed, the influence of the reducing sugars concentration was more significant at lower values of the temperature, while the influence of the temperature was

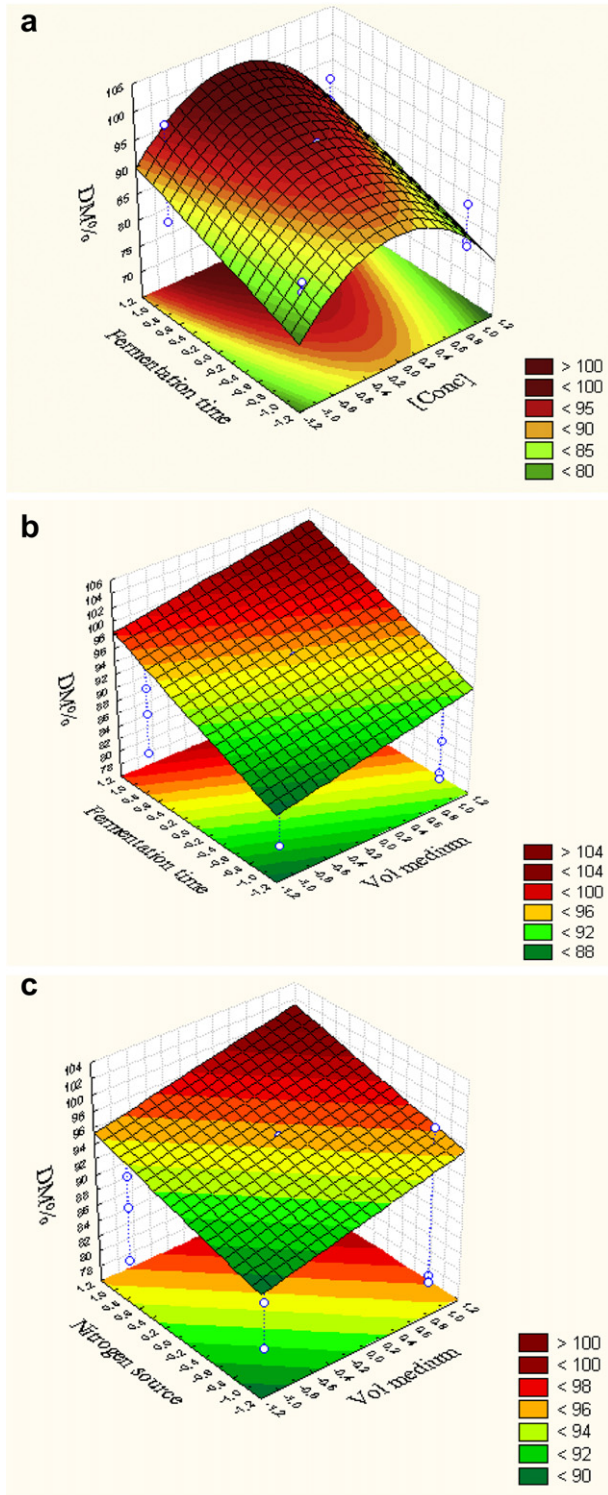


Fig. 6. Contour plot of demineralization showing interaction between the fermentation time and (a) the carbon source concentration; (b) the culture medium volume, (c) interaction between the nitrogen source and the culture medium volume.

more relevant for higher incubation temperature. Fig. 7b and c also show the absence of interactions between other factors.

The model was validated using random combination (other than those used for optimization Table 2) of the independent variables (Table 7). These values confirmed the validity of the prediction model.

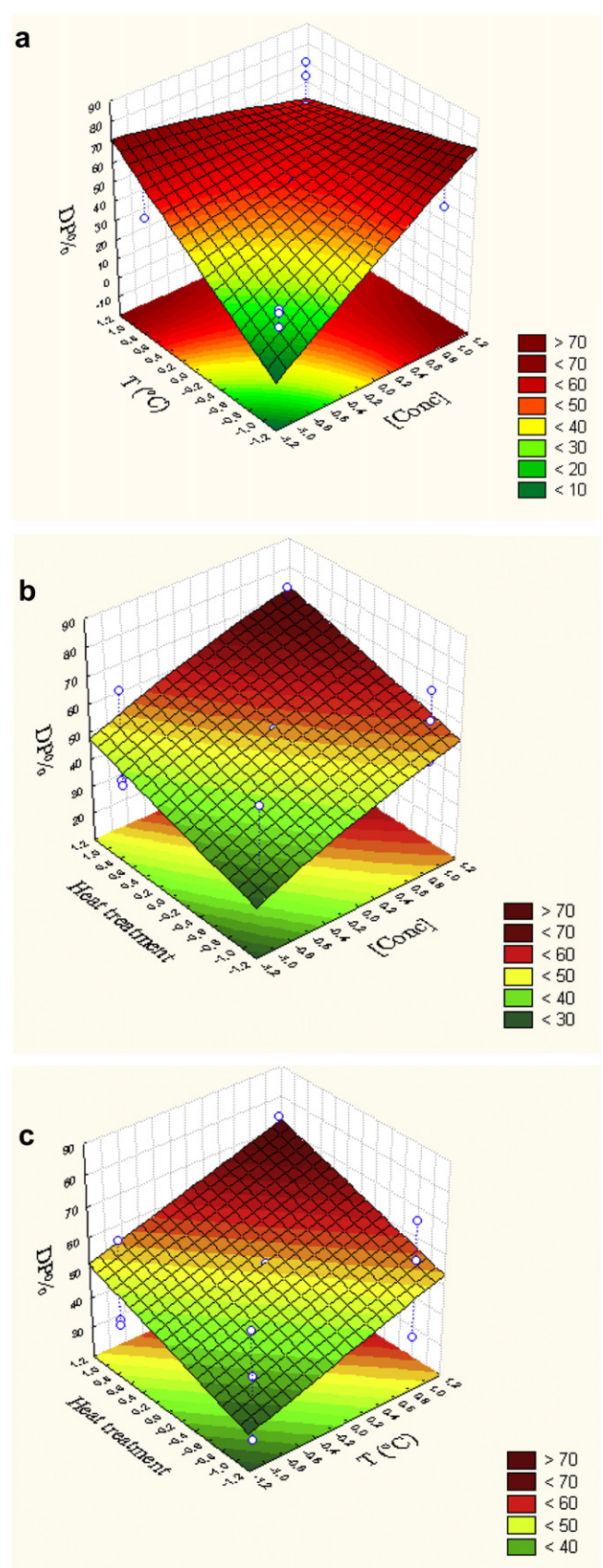


Fig. 7. Contour plot of deproteinization showing interaction between concentration of reducing sugars and (a) incubation temperature (b) heat treatment and (c) between heat treatment and incubation temperature.

Table 7

DM and DP values observed during validation experiments along with the corresponding predicted values (additional assay).

Factors name	Coded factors	Factors values	DM (%)		DP (%)	
			Pred.	Exper.	Pred.	Exper.
Concentration (L)	-1	100 g L ⁻¹	89%	95%	16.32%	10%
Temperature (L)	-1	20 °C				
Shell quantity (L)	-1	4 g				
Vol medium (L)	+1	500 mL				
Vol inoculums (L)	+1	20 mL				
Heat treatment (L)	+1	0 °C				
Fermentation time (L)	-1	24 h				
Nitrogen source (L)	+1	2.8 g				
Calcium source (L)	+1	1.3 g				
Powder shell size (L)	+1	1 mm				

Table 8

The optimized factors leading to the highest DM and DP.

Factors name	Coded factors	Factors values	DM (%)		DP (%)	
			Pred.	Exper.	Pred.	Exper.
Reducing sugars concentration (L)	0.42747	171.37 g L ⁻¹	98	98	78	76
Temperature (L)	0.21298	32.13 °C				
Shell quantity (L)	-0.7181	4.84 g				
Culture medium volume (L)	-1	100 mL				
Inoculum volume (L)	-1	10 mL				
Heat treatment (L)	0.99838	119.9 °C				
Soaking time (L)	0.66944	254.38 h				
Nitrogen source (L)	0.45319	2.03 g				
Calcium source (L)	0.99327	1.29 g				
Powder shell size (L)	0.60768	1.053 mm				

3.6. Desirability

The final goal of response surface methodology is the process optimization. Thus, the developed models can be used for simulation and optimization. To optimize the process with two or more output responses, it is helpful to use the concept of desirability function. The desirability function is one of the most widely used methods for optimization of multiple response processes in science and engineering. It combines multiple responses into one response called desirability function by choosing a value from 0 (one or more

characteristics are unacceptable) to 1 (all process characteristics are on target). Each of the estimated responses is transformed to an individual desirability value ranging from 0 to 1. The value of individual desirability increases as the desirability of the corresponding response increases. The overall desirability of the process is computed as a geometric mean of the individual desirability functions (Popov et al., 2010).

The results of optimization by desirability function approach for maximization of DM and DP are given in Fig. 8.

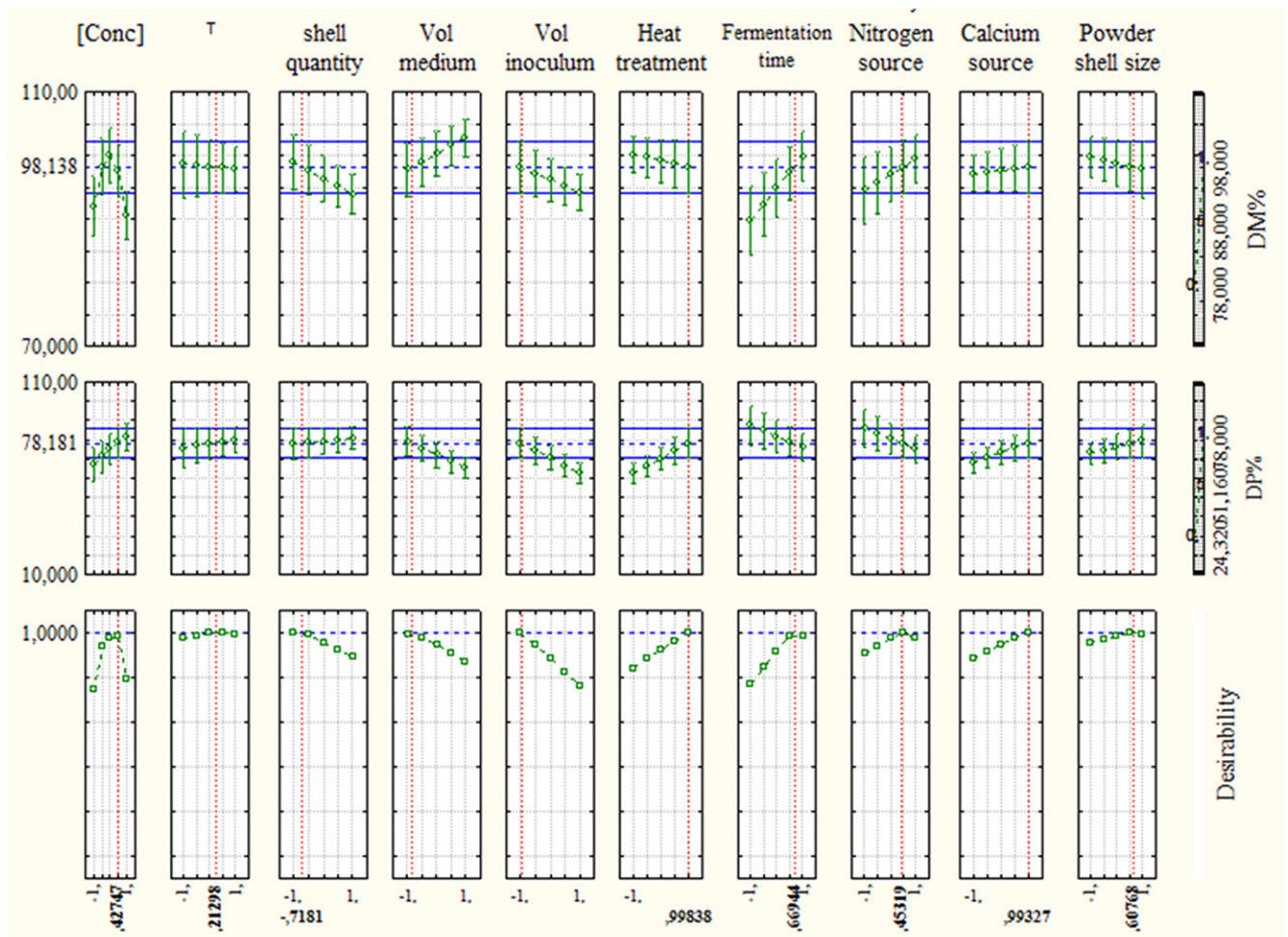


Fig. 8. Desirability profiles for optimization of demineralization (DM) and deproteinization (DP).

The desirability function to get optimum demineralization and deproteinization was fitted by the least square model. The level of variable giving the highest desirability (1.0) was selected as optimum level. The optimized levels of variables (X_1, X_2, \dots, X_{10}) were determined using the profiles (Fig. 8) for predicted values for DM and DP and desirability function. The optimized factors giving the highest DM and DP, namely 98% and 78% respectively are collected in Table 8.

4. Conclusion

The influence and effect of different factors such as the reducing sugars concentration, the temperature, the weight of shell powder, the volume of culture medium (date juice), the inoculum volume, the heat treatment, the fermentation time, the nitrogen source $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$, the calcium source (CaCl_2), the shrimp shell size, on the yield of demineralization and deproteinization were investigated.

Central composite design and response surface methodology have been realized for the determination of the optimal conditions for chitin recovery by lactic acid fermentation. The resulting model led to the optimal conditions of demineralization and deproteinization of shells of *P. longirostris* by a biological method. A concentration of 171.37 g L^{-1} of reducing sugars, an incubation temperature of $32.13 \text{ }^\circ\text{C}$, a volume of 100 mL fermentation medium and inoculum of 10 mL for 254.38 h using $2.03 \text{ g}/100 \text{ mL}$ of mineral nitrogen and $1.29 \text{ g}/100 \text{ mL}$ of calcium led to 98% and 78% demineralization and deproteinization by fermentation of 4.84 g shell of 1.53 mm size by 100 mL of fermentation medium.

References

- A.O.A.C. (1990). In E. Horwitz (Ed.), *Official methods of analysis* (15th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, method #930.15 p69, method #942.05 p70, method #962.09 p80.
- Adour, L., Arbia, W., Amrane, A., & Mameri, N. (2008). Combined use of waste materials-recovery of chitin from shrimp shells by lactic acid fermentation supplemented with date juice waste or glucose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 1664–1669.
- Andrade, V. S., Neto, B. D. B., Fukushima, K., & Campos-Takaki, G. M. (2003). Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570)—a factorial study. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20, 149–153.
- Arbia, W. (2007). *Chitin production by fermentation way from marine biomass*. Magister thesis, Polytechnic National School, Algiers, Algeria (in french).
- Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., Amrane, A., & Lounici, H. (2011). Improvement of the demineralization of white shrimp shells (*Parapenaeus longirostris*) by lactic acid fermentation. In *Récents Progrès en Génie des Procédés, Numéro 101*. Paris, France: SFGP, ISBN 2-910239-75-6, ISSN 1775-335X.
- Benhabiles, M. S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M. F. A., & Mameri, N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, 29, 48–56.
- Bhaskar, N., Suresh, P. V., Sakhar, P. Z., & Sachindra, N. M. (2007). Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteinization/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1427–1434.
- Boudjelal, A., & Nancib, N. (2001). Production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu à base de jus de dattes. *Revue des Energies Renouvelables Production et valorisation- Biomasse*, 41–46.
- Camci-Unal, G., & Pohl, N. L. B. (2009). Quantitative determination of heavy metal contaminant complexation by the carbohydrate polymer chitin. *Journal of Chemical Engineering Data*, 55, 1117–1121.
- Choorit, W., Patthanamee, W., & Manurakchinakorn, S. (2008). Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells. *Bioresource Technology*, 99, 6168–6173.
- Cojocar, C., Khayet, M., Zakrzewska-Trznadel, G., & Jaworska, A. (2009). Modeling and multi-response optimization of pervaporation of organic aqueous solutions using desirability function approach. *Journal of Hazardous Materials*, 167, 52–63.
- Cremades, O., Ponce, E., Corpas, R., Gutierrez, J. F., Jover, M., Alvarez-Ossorio, M. C., et al. (2001). Processing of crawfish (*Procambarus clarkii*) for the preparation of carotenoproteins and chitin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5468–5472.
- De Lima, C. J. B., Coelho, F. L., & Contiero, J. (2010). The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium supplementation, temperature and pH control. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 175–181.
- Ehlich, H., Koutsoukos, P. G., Demadis, K. D., & Pokrovsky, O. S. (2009). Principles of demineralization: modern strategies for the isolation of organic frameworks. Part II. Decalcification. *Micron*, 40, 169–193.
- Fabritius, H., Sachs, C., Raabe, D., Nikolov, S., Friák, M., & Neugebauer, J. (2011). Chitin in the exoskeletons of arthropoda: from ancient design to novel materials science. In N. S. Gupta (Ed.), *Chitin formation and diagenesis* (pp. 35–60). London, New York: Dordrecht Heidelberg.
- Goodrich, D. J., & Winter, W. (2007). α -chitin from shrimp shells nanocrystals prepared and their specific area measurement. *Biomacromolecules*, 8, 252–257.
- Griffiths, P. R., & Haseth, J. A. (2007). *Fourier transform infrared spectrometry*. Hoboken, New-Jersey: Wiley Interscience, Jhon Wiley and Sons Inc Publications.
- Heredia, A., Aguilar-Franco, M., Magaña, C., Flores, C., Piña, C., Velázquez, R., et al. (2007). Structure and interactions of calcite spherulites with α -chitin in the brown shrimp (*Penaeus aztecus*) shell. *Materials Science and Engineering*, C27, 8–13.
- Ibrahim, H. M., Wan Mohhtar, W. V., Aidil, A., Rosli Md, I., Othmane, H., & Othmane, O. (2005). Optimization of medium for the production of β -cyclodextrin gluco-transferase using central composite design (CCD). *Process Biochemistry*, 40, 753–758.
- Jayakumar, R., Parabaharan, M., Nair, S. V., Tokura, S., Tamura, H., & Selvamurugan, N. (2010). Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Progress in Materials Science*, 55, 675–709.
- Ji, Y. L., Wolf, P. S., Rodriguez, I. A., & Bowlin, G. L. (2012). Preparation of chitin nanofibril/polycaprolactone nanocomposite from a nonaqueous medium suspension. *Carbohydrate Polymers*, 87, 2313–2319.
- Jo, G. H., Park, R. D., & Jung, W. J. (2011). Enzymatic production of chitin from crustacean shell waste. In S. K. Kim (Ed.), *Chitin chitosan, oligosaccharides and their derivatives* (pp. 37–43). CRC Press Taylor and Francis Group.
- Jung, W. J., Jo, G. H., Kuk, J. H., Kim, K. Y., & Park, R. D. (2005). Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerans KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 234–237.
- Khanafari, A., Marandi, R., & Santei, S. (2008). Recovery of chitin and chitosane from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 5, 19–24.
- Khayet, M., Zahrin, A. Y., & Hilal, N. (2011). Modelling and optimization of coagulation of highly concentrated industrial grade leather dye by response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, 167, 77–83.
- Khuoshab, F., Jaruseranee, N., Tanthanuch, W., & Yamabhai, M. (2012). Formation of chitin-based nanomaterials using a chitin-binding peptide selected by phage-display. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 1267–1274.
- Khurana, S., Kapoor, M., Gupta, S., & Kuhad, R. C. (2007). Statistical optimization of alkaline xylanase production from *Streptomyces violaceoruber* under submerged fermentation using response surface methodology. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 144–152.
- Kim, S. K., & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing by products—a review. *Food Research International*, 39, 383–393.
- Kjartansson, G. T., Zivanovic, S., Kristberg, K., & Weiss, J. (2006). Sonication-assisted extraction of chitin from North Atlantic shrimps (*Pandalus borealis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5894–5902.
- Lavall, R. L., Odilio, B. G. A., & Campana-Filho, S. P. (2007). β -chitin from the pens of *Loloigo* sp.: extraction and characterization. *Bioresource Technology*, 98, 2465–2472.
- Loiseleur, J. (1963) (3ème édition). *Techniques de laboratoire: Chimie physique, chimie biologique, Tome 1*. Paris: Masson.
- Mario Di, F., Rapana, P., Tomati, U., & Galli, E. (2007). Chitin and chitosane from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 8–12.
- Mikkelsen, A., Engelsen, S. B., Hansen, H. C. B., Larsen, O., & Skibsted, L. H. (1997). Calcium carbonate crystallization in the α -chitin matrix of the shell of pink shrimp, *Pandalus borealis*, during frozen storage. *Journal of Crystals Growth*, 177, 125–134.
- Mirzadeh, H., Nakisa, Y., Saeed, A., Hossein, A., Mohagheghi, A. M., & Farzin, H. (2002). Preparation of chitosan derived from shrimp's shell of Persian Gulf as a blood hemostasis agent. *Iranian Polymer Journal*, 1, 63–68.
- Mojarrad, J. S., Nemati, N., Valizadeh, H., Ansarin, M., & Bourbour, S. (2007). Preparation of glucosamine from exoskeleton of shrimp and predicting production yield by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2246–2250.
- Nitar, N., Tetsuya, F., & Hiroshi, T. (2011). Chitin and chitosan from terrestrial organisms. In S. K. Kim (Ed.), *Chitin chitosan, oligosaccharides and their derivatives* (pp. 3–9). CRC Press Taylor and Francis Group.
- No, H. K., Meyers, S. P., & Lee, K. S. (1989). Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 575–579.
- Nor, M. N., Rosfarizan, M., Hooi, L. F., & Raha, A. (2010). Improvement of folate biosynthesis by lactic acid bacteria using response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 243–250.
- Oh, K. T., Kim, Y. J., Nguyen, N. V., Jung, W. J., & Park, R. D. (2008). Effect of crab shell size on bio-demineralization with lactic acid-producing bacterium, *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerans KCTC-3074. *Biotechnology and Bioengineering*, 13, 566–570.
- Pacheco, N., Garnika-Gonzalez, M., Ramirez, J. Y., Flores-Albino, B., Gimeno, M., Bárzana, E., et al. (2009). Effect of temperature on chitin and astaxanthin

- recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 100, 2849–2854.
- Pal, A., & Khanum, F. (2011). Identification and optimization of critical medium components using statistical experimental designs for enhanced production of xylanase from *Aspergillus flavus* DFR-6. *Food Technology and Biotechnology*, 49, 228–236.
- Paulino, A. T., Minasse, F. A., Guilherme, M. R., Reis, A. V., Muniz, E. C., & Nozaki, J. (2006). Novel adsorbent based on silkworm chrysalids for removal of heavy metals from wastewaters. *Journal of Colloid and Interface Science*, 301, 479–487.
- Popov, S., Rankovik, J., Dodić, J., Dodić, S., & Jokić, A. (2010). Bioethanol production from raw juice as intermediate of sugar beet processing: a response surface methodology approach. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 376–383.
- Rao, M. S., Muñoz, J., & Stevens, W. F. (2000). Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 808–813.
- Rao, M. S., & Stevens, W. F. (2006). Fermentation of shrimp biowaste under different salt concentrations with amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains for chitin production. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 83–87.
- Rødde, R. H., Einbu, A., & Vårum, K. M. (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate Polymers*, 71, 388–393.
- Sajomsang, W., & Pattaraopond, G. (2010). Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs. *Material Science Engineering C*, 30.
- Seda, A., Sebnam, H., Yekta, G., & Ali Fazil Yenidunya, A. F. (2004). Fungal chitosan production from molasses. *Biotechnology*. www.b5srl.com.
- Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Casillo, A., Obdulia, G. R., et al. (2001). Effect of initial glucose and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 446–452.
- Sirisompong, W., Jirapakkul, W., & Klinkesorn, U. (2011). Response surface optimization and characteristics of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) kernel fat by hexane extraction. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 1946–1951.
- Stawski, D., Rabiej, S., Herczynka, L., & Draczynski, Z. (2008). Thermogravimetric analysis of chitins of different origin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 93, 489–494.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2010). Biological activities of chitosan and chitoooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25, 170–179.
- Xu, Y., Gallert, C., & Winter, J. (2008). Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 687–697.
- Yen, M. T., Yang, J. H., & Mau, J. L. (2009). Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 75, 15–21.
- Zakaria, Z., Hall, G. M., & Shama, G. (1998). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 33, 1–6.
- Zhou, D., Zhang, L., & Guo, S. (2005). Mechanisms of lead biosorption on cellulose/chitin beads. *Water Research*, 39, 3755–3762.

ملخص

الهدف من هذه العمل هو تحسين شروط استخلاص الكيتين من قوقعة الجمبري *Parapenaeus longirostris* عن طريق التخمير اللبني باستعمال البكتيريا اللبنيّة *Lactobacillus helveticus*. استخلاص الكيتين يتم في مرحلتين: مرحلة نزع المعادن عن طريق تخميض الوسط بحمض اللبن و مرحلة نزع البروتينات عن طريق افراز النزييمات المهيدمة (البروتياز). النتائج المحصلة عليها باستعمال الجلوكوز هي نزع 60% من المعادن في شروط 35°C و 300 غ/ل جلوكوز و نزع 76% من البروتينات في شروط 30°C و 80 غ/ل جلوكوز. استعمال عصير التمر بتركيز 200 غ/ل مكثنا من نزع 61% من المعادن و 83% من البروتينات في شروط 30°C.

استعمال طريقة دراسة *plan composite centré* (CCD) مكثنا من الحصول على الشروط المثالية لنزع البروتينات 78% و المعادن 98% من اجل استخلاص الكيتين و هي: تركيز السكريات المرجعة 171 غ/ل. درجة الحرارة 32.13°C. كمية القشرة 4.84 غ. كمية الوسط المعيشي 100 مل. كمية المحلول البكتيري 10 مل. العلاج الحراري 119.9°C. مدة التخمير 254.38 ساعة. كمية الأزوت 2.03 غ. كمية الكالسيوم 1.29 غ. حجم جزيئات القشرة 1.053 مم.

الكلمات المفتاح: الكيتين، التخمير اللبني، البكتيريا اللبنيّة، *plan composite central*, Méthode de surface de réponse

Résumé :

L'objectif de ce travail est l'étude de l'optimisation de la récupération de la chitine à partir de déchets marins, les carapaces des crevettes *Parapenaeus longirostris*, par voie fermentaire en utilisant une bactérie lactique *Lactobacillus helveticus*. La récupération de la chitine nécessite deux étapes : La déminéralisation (DM) et la déprotéinisation (DP). En effet, la bactérie a la capacité de produire l'acide lactique pour solubiliser les minéraux et d'excréter les protéases pour hydrolyser les protéines conduisant à la DM et DP, respectivement.

La culture de lactobacille dans un milieu à base de glucose nous a permis d'obtenir 60% de DM à 35°C avec 300g/l en glucose et 76% de DP à 30°C avec 80g/l en glucose. L'utilisation de jus de dattes comme milieu de fermentation a permis d'améliorer ces résultats dont on a obtenu 61% de DM et 83% de DP avec 200g/l en sucres réducteurs à température d'incubation de 30°C.

Dans le but d'améliorer ces rendements, on a utilisé la méthode de surface de réponse et le plan composite central (CCD). L'analyse des résultats obtenus montrent que les conditions optimales pour 98% de DM et 78% de DP sont : Concentration en sucres réducteurs de 171.37 g/l, température de 32.13°C, quantité de la poudre de carapace de 4.84 g, volume de milieu de culture de 100ml, volume de l'inoculum de 10 ml, traitement thermique de 119.9 °C, temps de fermentation de 254.38 h, source d'azote de 2.03 g, source de calcium de 1.29 g, granulométrie de 1.053 mm.

Mots clés : chitine, fermentation lactique, lactobacilles, plan composite central, méthodologie des surfaces de réponse

Abstract :

The purpose of this work is the study is the optimization of chitin recovery from shrimp shell waste of *Parapenaeus longirostris* by biological method using lactic acid bacteria *Lactobacillus helveticus*. Chitin recovery occurs in two steps: demineralization (DM) and déprotéinisation (DP). The lactic acid bacteria produce lactic acid for mineral solubilization and proteases for the proteolyse.

The culture of lactobacilli in glucose was given 60% of DM at 35°C with 300g/l of glucose and 76% of DP at 30°C with 80 g/l of glucose. The uses of date juice ameliorate these rates, we have obtained 61% of DM and 83% of DP with 200g/l of reducing sugars at 30°C .

Based on the use of central composite design and response surface methodology ten factors with three levels each were examined to determine the optimal operational conditions of demineralization and deproteinization.

The analysis of the obtained results showed that the optimal conditions of 98% of demineralization and 78% of deproteinisation are 171.4 g L⁻¹ of reducing sugars, 2.03 g of nitrogen source [(NH₄)₂Fe(SO₄)₂] and 1.29 g of calcium source (CaCl₂), used to ferment 4.84 g of shells, of 1.053 mm size heat treated at 120 °C, with 10 mL of inoculum (*Lactobacillus helveticus*) incubated at 32.1 °C in 100 mL of juice date for 254.38 h (15 days).

Key words: chitin, lactic acid fermentation, lactobacilli, composite central design, response surface methodology