



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
DEPARTEMENT DE GENIE DE L'ENVIRONNEMENT
Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés
(BIOGEP)

MEMOIRE DE MAGISTER

Pour l'obtention du grade de
Magister en Génie de l'environnement
Option : Biotechnologie et Environnement

Thème :

*Contribution à l'étude de la déminéralisation et la déprotéinisation
de la carapace de la crevette par voie fermentaire*

Etudié par :

M^{elle} ARBIA Leila

Président du jury : N. MAMERI Professeur E. N. P

Directeurs de mémoire :

L. ADOUR ep. DJABRI Maître de conférences U. M. M, TO

Examineurs: H. LOUNICI Professeur U. M. M, TO
H. GRIB Maître de conférences E. N. P
N. ABDI Maître de conférences E. N. P

Invité :

M. BENAMAR ep. MANSOUR Chargé de cours, Chargé de recherche U. M. M, TO

Année Universitaire 2009– 2010ENP-
10 avenue Hacén Badi – El Harrach - ALGER

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents, qui m'ont donné la vie, qui m'ont éduqué et qui m'ont beaucoup soutenu tout au long de mes études, mon cher papa pour tout les conseils et les sacrifices qu'il a prodigué pour sa fille et ma très chère maman, qui, quoi que je puisse faire pour elle, je ne saurai guère lui rendre tout l'amour, toute tendresse, la patience et le meilleur d'elle-même qu'elle me donnait.

Que dieu vous garde pour nous.

Leila

Remerciements

Je tiens à remercier :

Mr le Professeur *LOUNICI H.*, *Directeur* du Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des procédés à l'Ecole Nationale Supérieure Polytechnique (E.N.S.P), pour la confiance qui m'a accordé à faire partie de son équipe de recherche. Je le remercie vivement pour sa disponibilité, ses conseils et sa patience et d'avoir accepté d'être un examinateur de mon travail.

Mme *DJABRI- ADOUR L.*, Maître de conférences à l'U.M.M, TO, promotrice de ce travail, pour son soutien, ses conseils et ses encouragements tout au long de la réalisation de ce projet.

Mr le Professeur *MAMERI N.*, d'avoir accepté de présider le jury et je le remercie également pour l'aide qu'il n'a pas hésité à m'apporter au cours de mon travail.

Mr *GRIB H.*, Maître de conférences à l'E.N.P., et Mme *ABDI N.*, Maître de conférences à l'E.N.P., d'accepter d'examiner ce travail.

Mm *MANSOUR M.*, Chargé de cours à l'U.M.M, TO, d'accepter d'être notre invité d'honneur.

Mr *DJILI K.*, Chef de département de Pédologie de l'I.N.A, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour faire des dosages.

Merci à Mme *ARBIA W.*, Doctorante à l'E.N.S.P., qui m'a aidé énormément au cours de mon travail de recherche.

Mes sincères remerciements s'adressent à Mr *KERCHICHE Y.*, Mme *MEZAGUER M.*, Mme *CHEMLAL R.*, Mme *LARIBI H.* et Mme *BENAMER S.*

Je remercie également :

HAMIDA, secrétaire du département Génie de l'Environnement de l'E.N.P.

MINA et *FATMA EL ZOHRA*, Ingénieurs de laboratoire de Technologie Alimentaire

REDOUANE, Technicien de laboratoire de Pédologie

Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet

Merci

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre 1

Chitine et ses applications

I.1. Historique.....	3
I.2. Définition.....	3
I.3. Structure de la chitine.....	3
I.4. Les propriétés de la chitine	8
I.4.1. Les propriétés physicochimiques.....	9
a) Degré de N-acétylation.....	9
b) La solubilité.....	9
c) Le poids moléculaire.....	9
I.4.2. Les propriétés biologiques.....	10
a) Biocompatibilité.....	10
b) Biodégradabilité.....	10
I.5. Les applications de la chitine.....	10
I.5.1. En agriculture.....	10
I.5.2. En traitement des eaux usées.....	11
I.5.3. En médecine.....	11
I.5.4. Autres applications.....	11
I.6. L'extraction de la chitine.....	12

Chapitre II

Les bactéries lactiques

II.1. Leur utilisation dans l'extraction des biopolymères « la chitine ».....	14
II. 2. Origine.....	14
II. 3. Isolement.....	14
II. 4. Pouvoir pathogène.....	15
II. 5. Rôles des bactéries lactiques.....	15

Chapitre III

La croissance bactérienne

III.1. Introduction.....	19
III.2. Les besoins nutritifs.....	19

III.3. Influence des facteurs extérieurs sur la croissance microbienne.....	19
III.3.1. Le pH.....	19
III.3.2. La température.....	20
III.3.3. L'agitation.....	20
III. 4. La courbe de croissance dans un milieu non renouvelé.....	20
III. 4. 1. La phase de latence.....	21
III. 4. 2. La phase d'accélération.....	21
III. 4. 3. La phase exponentielle.....	21
III. 4. 4. La phase de ralentissement.....	21
III. 4. 5. La phase stationnaire.....	22
III. 4. 6. La phase de déclin.....	22
III. 5. Le métabolisme du glucose chez les bactéries lactiques.....	22

Chapitre IV

Matériel et méthodes

IV.1. Matériel	25
IV.1.1. La souche bactérienne.....	25
IV.1.2. La carapace.....	25
IV.1.3. Jus de dattes.....	25
IV. 2. Méthodes de préparation.....	25
IV.2.1. De la poudre de carapace.....	25
IV.2.2. Du jus de dattes.....	25
IV.3. Méthodes analytiques.....	26
-Détermination du pH de la carapace à 10% (masse/volume).....	26
-Mesure de l'humidité.....	26
-Détermination du taux de cendres dans la carapace.....	26
-Dosage du carbonate de calcium	27
-Dosage de l'acide lactique :	27
-Détermination de la teneur en chitine.....	28
- Dosage des sucres réducteurs par la méthode de l'acide dinitrosalicylique.....	29
- Dosage des protéines par la méthode de Biuret.....	29
-Mesure de la biomasse bactérienne.....	30
-Analyses spectroscopiques infrarouge.....	31

-Analyses Diffraction des rayons X (DRX).....	31
-Analyse par fluorescence X.....	31
IV.4. Dispositif expérimental.....	31

Chapitre V

Résultats et Discussion

V. 1. Caractérisation physicochimique de la carapace des crevettes.....	32
V. 2. Etude de la fermentation lactique pour la récupération de la chitine.....	33
V.2.1. Etude de la fermentation lactique dans un milieu synthétique.....	33
V.2.2. Effet de l'extrait de levure et de la microaération sur le taux de la DM.....	40
V.2. 3. Etude de la fermentation lactique sur milieu complexe (jus de dattes).....	47
V.3. Analyses physico-chimiques et spectroscopiques de la carapace des crevettes.....	56
Conclusion générale et perspectives.....	66
Références bibliographiques.....	69

Liste des figures et des tableaux

Fig. 1 : Structures moléculaires : chitine (A) et cellulose (B).....	4
Fig.2 : Structure moléculaire et représentation conventionnelle de l' α - chitine.....	6
Fig. 3 : Structure moléculaire et représentation conventionnelle de la β - chitine.....	7
Fig. 4 : Représentation conventionnelle de la γ -chitine.....	8
Fig.5 : Courbe de croissance dans milieu non renouvelé.....	21
Fig.6 : Glycolyse ou voie d'Embden –Meyerhof-Paranas.....	23
Fig 7: Evolution du pH en fonction du temps à différentes températures 35°C et 42°C (300g/l en glucose, volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....	34
Fig 8: Evolution du pH, de la concentration en glucose, de la biomasse en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....	36
Fig 9: Evolution du pH, de la biomasse et de la concentration en glucose en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 42°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....	36
Fig 10: Evolution de la concentration en glucose, de la biomasse et de la concentration en acide lactique en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 42°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....	37
Fig11: Evolution de la concentration en glucose, de la biomasse et de la concentration en acide lactique en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....	37
Fig. 12 : Evolution du pH, de la concentration en glucose et de la biomasse avec 80g/l glucose à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200r.p.m.).....	38

- Fig. 13 :** Evolution du pH, de la concentration en glucose et de la biomasse avec 80g/l glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum 10%, agitation 200 r.p.m.).....39
- Fig.14 :** Evolution du pH en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levure 4, 5 et 10 g/l avec 300g/l glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, carapace 10g, inoculum 10%, agitation 200 r.p.m.).....41
- Fig.15 :** Evolution de la concentration en glucose en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levure 4, 5 et 10g/l avec 300g/l en glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....42
- Fig.16 :** Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levure 4, 5 et 10g/l avec 300g/l en glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....42
- Fig. 17 :** Evolution de la concentration en biomasse en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levure 4, 5 et 10g/l avec 300g/l en glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....43
- Fig.18:** Evolution du pH en fonction du temps avec micro aération combinée avec 2g/l d'extrait de levure et avec micro aération seule (300g/l glucose, température d'incubation 35°C, volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....44
- Fig.19 :** Evolution du pH, de la concentration en biomasse et de la concentration en glucose en fonction du temps de fermentation avec 2g/l d'extrait de levure et micro aération 0,044V/V/M (300g/l glucose, température d'incubation 35°C, volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....45
- Fig.20 :** Evolution du pH, de la concentration en biomasse et de la concentration en glucose en fonction du temps avec barbotage initial (300g/l en glucose, température d'incubation 35°C, volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....45

- Fig.21 :** Evolution de la concentration en acide lactique avec micro aération et micro aération combinée avec 2g/l d'extrait de levure (300g/l glucose, température d'incubation 35°C volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10%d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....46
- Fig.22 :** Evolution du pH en fonction du temps de fermentation à différentes concentrations en sucres réducteurs et à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....49
- Fig.23 :** Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps à différentes concentrations en sucres réducteurs et à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....49
- Fig.24 :** Taux de déminéralisation et de déprotéinisation en fonction de la concentration en sucres réducteurs et à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....51
- Fig.25:** Evolution du (a) pH, de la concentration en sucres réducteurs et de l'acide lactique 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 r.p.m.).....52
- Fig. 26:** Evolution 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.).....52
- Fig. 27 :** Evolution du pH en fonction du temps à différentes concentrations en sucres réducteurs (10-100g/l) et à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....53
- Fig.28 :** Taux de déminéralisation et de déprotéinisation de la carapace en fonction de la concentration en sucres réducteurs et à température 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....54

Liste des figures et des tableaux

Fig.29 : Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps de fermentation à différentes concentrations en sucres réducteurs et à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)	55
Fig.30 : Le pourcentage de DM en fonction de la concentration en acide lactique à température 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.).....	55
Fig. 31 : Taux résiduel du carbonate de calcium dans les carapaces brute et fermentées dans du glucose et jus de dattes dans des conditions de déminéralisation maximales.....	58
Fig. 32 : Spectre FTIR de la chitine pure (préparée par voie chimique)	59
Fig. 33: Spectre FTIR de la carapace brute.....	60
Fig. 34 : Spectre FTIR de la carapace fermentée (milieu à base de glucose 300g/l à température d'incubation de 35°C).....	60
Fig. 35 : Spectre FTIR de la chitine fermentée (milieu à base de sucres réducteurs 200g/l à 30°C).....	61
Fig. 36 : Spectre de diffraction aux rayons X de la carapace brute.....	63
Fig. 37 : Spectre de diffraction aux rayons X de la carapace traitée par le glucose.....	64
Fig. 38 : Spectre de diffraction aux rayons X de la carapace traitée par le jus de datte....	64
Tableau 1: Propriétés physico-chimiques de la carapace.....	32
Tableau 2: Composition du jus de dattes Deglet-Nour.....	47
Tableau 3: Les pics caractéristiques des échantillons (chitine pure, carapace brute, carapaces fermentées).....	62
Tableau 4: Résultats de l'analyse élémentaire par Fluorescence X des carapaces fermentées.....	65

Introduction

Les océans recouvrent plus de deux tiers de la surface du globe et une très grande diversité d'organismes y vivent et y prolifèrent. Certains de ces organismes élaborent des composés biochimiques forts prometteurs pour l'humanité. Les travaux de recherche, portant sur la valorisation de ces composés communément appelés «biomolécules», ont débuté au cours des années 50 (Seng, 1988). L'une des recherches a permis la découverte de la chitine composante structurelle majeure de l'exosquelette d'invertébrés marins, principalement, des crustacés.

Les propriétés physicochimiques et la grande variété d'activités biologiques font de la chitine et ses dérivés des biopolymères de choix pour de nombreuses applications telle que : la biotechnologie, la médecine, l'agroalimentaire, l'environnement, etc.

La récupération de la chitine s'effectue habituellement par une méthode chimique utilisant de fortes concentrations d'acides et de bases. Mais le coût onéreux de cette transformation et la pollution chimique générée lors de l'extraction de la chitine limitent l'extrapolation de ce procédé à l'échelle industrielle. Pour y remédier, une méthode biologique a été développée.

En effet, l'extraction de la chitine par voie biologique repose sur l'utilisation des bactéries lactiques. Ces bactéries ont la capacité de produire l'acide lactique pour solubiliser les minéraux et d'excréter des protéases conduisant à la déminéralisation et à la déprotéinisation, respectivement.

Les objectifs de notre travail de recherche et des nombreux tests expérimentaux, réalisés au laboratoire, rentrent dans le cadre de la valorisation de deux produits : les carapaces de crevette blanche *Parapenaeus longirostris* et les déchets de dattes Deglet Nour produites en grande quantité dans le sud d'Algérie. Le choix de ces produits réside dans la richesse en chitine de la carapace des crevettes ainsi que la richesse en sucres réducteurs dans le jus de dattes nécessaires à la croissance de la bactérie lactique *Lactobacillus helveticus* cultivée dans un fermenteur en batch.

La récupération de la chitine nécessite deux étapes : la déminéralisation et la déprotéinisation de la carapace puisque le biopolymère se trouve lié aux protéines formant ainsi une matrice protéique et renfermant des sels minéraux insolubles, principalement, les carbonates de calcium.

L'élimination biologique des protéines et des minéraux nécessite donc l'optimisation des paramètres physico-chimiques liés à la fermentation lactique de la bactérie inoculée dans le milieu de culture. Nous avons choisi dans ce travail : la nature du substrat carboné ainsi que sa concentration initiale, la source azotée, la micro aération du milieu et la température d'incubation.

Les analyses physico-chimiques et spectroscopiques (taux de CaCO_3 , spectroscopie FTIR, diffraction des RX et fluorescence X) ont été effectués afin de confirmer l'élimination des minéraux ainsi que la présence de la structure cristalline de l' α -chitine dans la carapace après fermentation lactique dans les différents milieux de fermentation étudiés.

Ce mémoire comporte deux grandes parties :

- * Une partie bibliographique consacrée aux généralités sur la chitine et ses applications, à la croissance bactérienne et les besoins nutritifs, aux bactéries lactiques, leurs métabolismes et leurs applications dans l'extraction de la chitine.
- * Une partie expérimentale consacrée aux matériels et méthodes, à la discussion et à l'interprétation des résultats obtenus.

Chapitre I

Chitine et ses applications

I.1. Historique

En 1811, BRACONNOT Henri directeur du jardin botanique de Nancy, a été le premier à isoler une fraction de la membrane de certains champignons, qu'il a appelé fongine. Cette découverte précède de trente ans l'isolement de la cellulose des plantes. Un peu plus tard, soit en 1823, ODIER renomme la fongine en chitine, terme dérivé du grec et signifiant tunique (Beaulieu, 2007).

I.2. Définition

La chitine est un polymère formé d'une répétition d'unités de N-acétyl-D-glucosamine, c'est le deuxième polymère le plus abondant après la cellulose (Aytekin et al., 2007). Elle est la composante majeure de la paroi cellulaire de beaucoup de champignons ainsi que dans des carapaces de crustacés tels que : homards, crevettes et crabes (Kasaai, 2008). Elle forme, également, le tégument externe rigide des sauterelles, des scarabées, des cafards ainsi que de nombreux autres insectes (Jerome et al., 2004).

Dans de nombreux pays industrialisés, on constate une forte exploitation de ces ressources naturelles qui, contrairement aux produits dérivés du pétrole, la chitine est un produit renouvelable, non toxique (Koide, 1998), hypoallergique et surtout biodégradable et par conséquent non polluante (Beaulieu, 2007).

I. 3. Structure de la chitine

La chitine est un copolymère constitué d'une chaîne linéaire d'unités de 2-acétamido-2-desoxy- β -D- glucose liées par la liaison glucosidiques β (1-4) (Jun Cai et al., 2006 ; Aytekin et al., 2007). Sa structure est similaire à celle de la cellulose (Akkaya et al., 2007), à l'exception des groupements hydroxyles C-2 acétylés comme le montre le schéma (Fig 1).

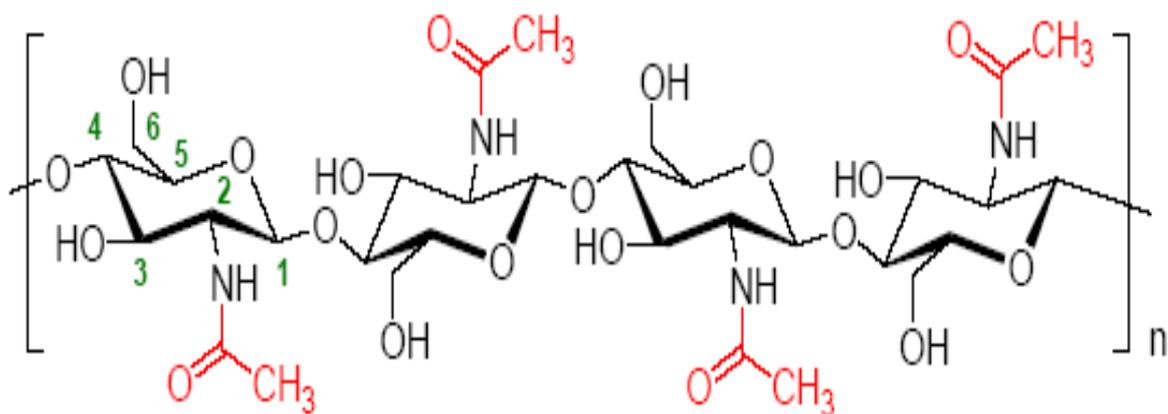
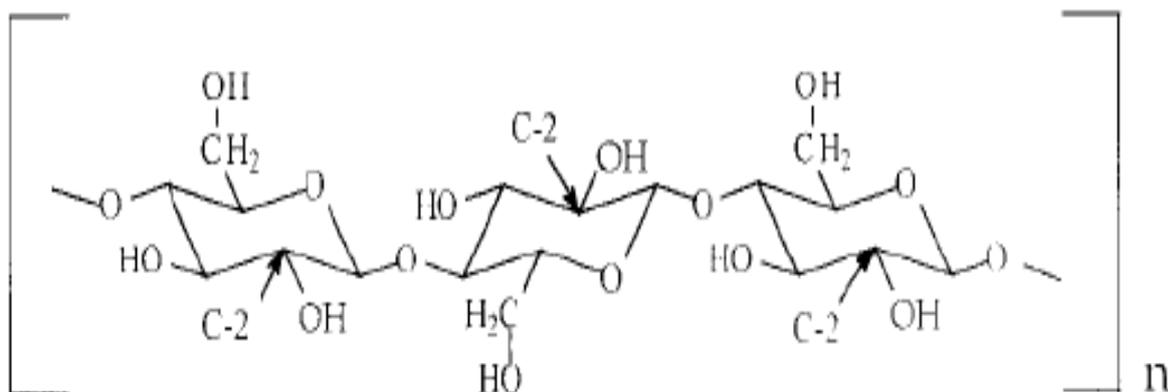
A*B*

Fig. 1 : Les structures moléculaires : chitine (A) et cellulose (B)
(Onar and Sariisik, 2000; Mrunal, 2004)

Elle se présente sous forme de grands rubans qui parcourent la paroi chez les cellules des champignons et l'exosquelette des crustacés, des insectes et des araignées (**Jerome et al., 2004**).

La chitine se retrouve naturellement sous trois formes polymorphes (α , β et γ) qui diffèrent selon l'arrangement des chaînes (**Poirier, 2000; Rinaudo, 2006**) :

La forme α (Fig 2) représente la forme la plus abondante, la plus stable et la plus accessible dans la nature. Elle est constituée par des molécules alignées formant des chaînes antiparallèles dans la direction C. Cet arrangement, confère à l' α -chitine une structure cristalline rigide avec de fortes liaisons hydrogènes donnant des propriétés physiques considérables au biopolymère. Le groupement N-acétyl se situe au dessus des liaisons hydrogènes inter et intra-chaines N-H...C=O liées au groupement C₂-acétamide. La forme α se trouve généralement chez les mollusques, les crustacés, les épines des diatomées et des calamars et dans la paroi fongique (**Kurita, 2001; Khor, 2001, Rinaudo, 2006**).

La forme β (Fig 3) représente la forme la moins stable et la plus biodégradable de la chitine (**Manisara et al., 2003**). Elle a un arrangement parallèle engendrant de faibles forces intermoléculaires (sur l'axe C) ce qui confère à la molécule une moindre stabilité comparativement à la forme α (**Lavall, 2007**). Ce positionnement facilite l'incorporation des molécules d'eau entre les chaînes de β chitine (**Khor, 2001**).

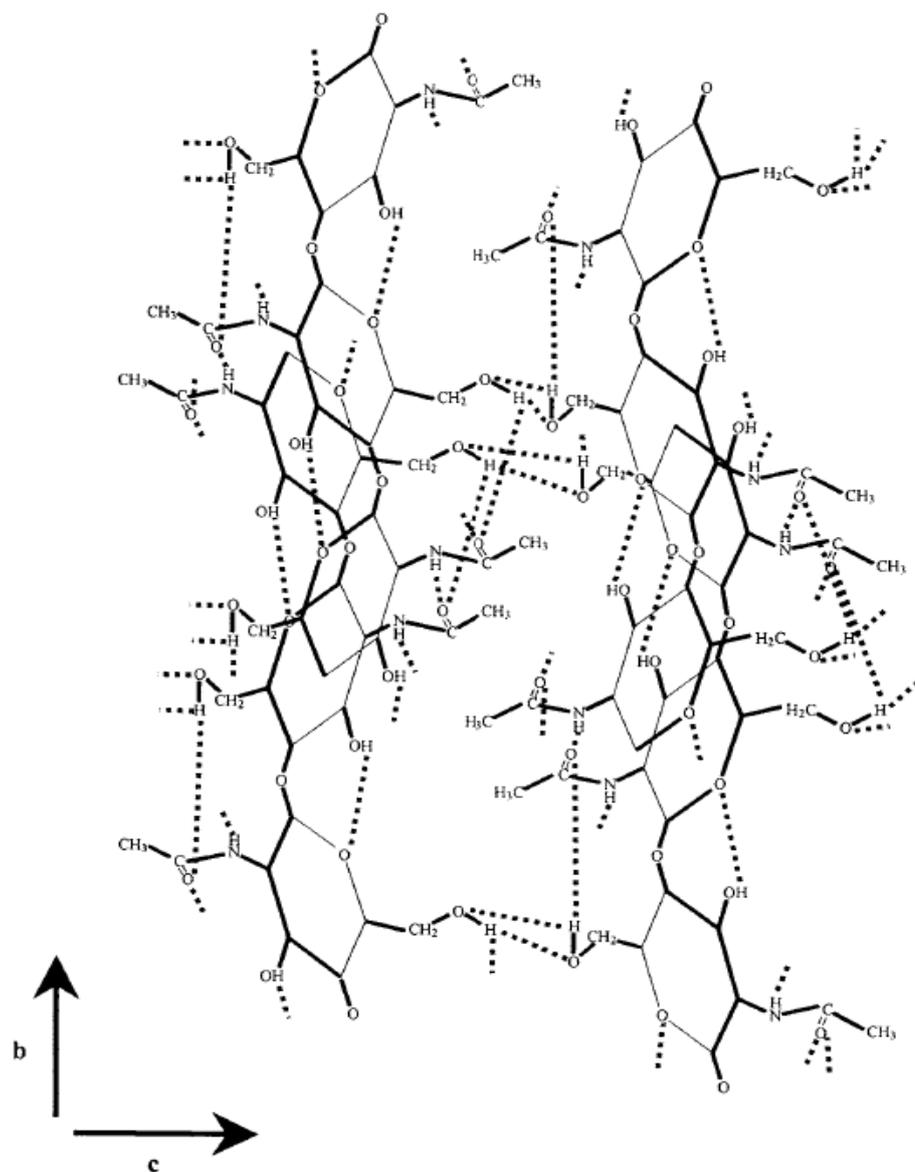


Fig.2 : Structure moléculaire et représentation conventionnelle de l' α -chitine
(Khor, 2001)

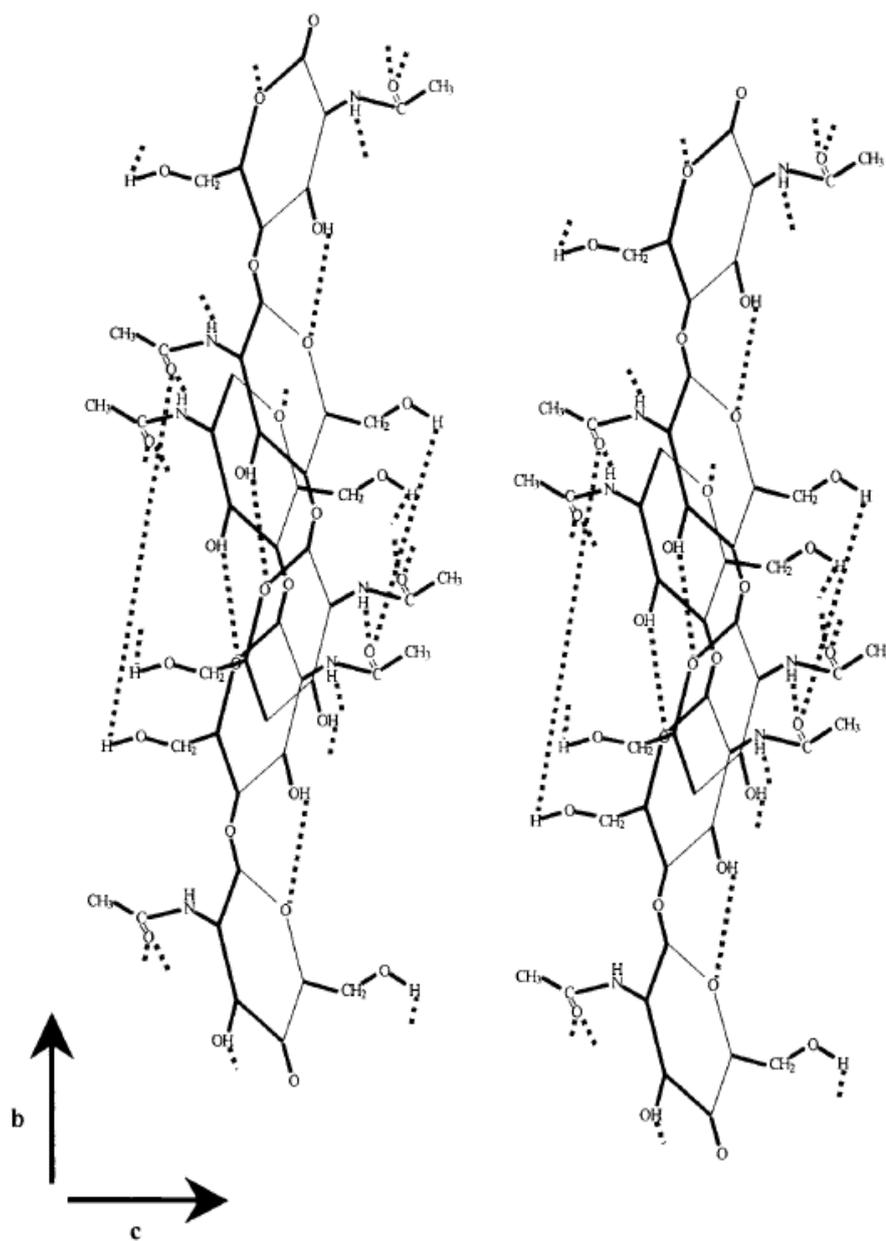


Fig. 3 : Structure moléculaire et représentation conventionnelle de la β -chitine
(Khor, 2001)

La troisième forme polymorphique est la γ -chitine (Fig 4) qui constitue le mélange des deux formes α et β (**Ramirez-Coutiño et al., 2006**).

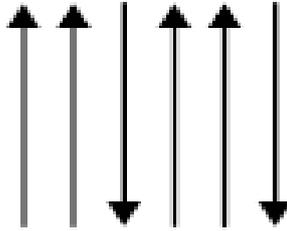


Fig. 4 : La représentation conventionnelle de la γ -chitine
(**Donadel, 2004**)

De plus, la chitine existe rarement à l'état libre, elle est presque toujours liée par des liaisons covalentes à des protéines, sous forme de complexes chitino-protéiques. Cette complexation a pour conséquence une résistance aux hydrolyses chimiques et enzymatiques. Une telle structure rigide ne rend pas son étude aisée, et cela d'autant plus qu'il n'existe pas un seul type de chitine mais des polymères qui se différencient par la taille, le pourcentage d'acétylation, et l'état plus ou moins cristallin, etc (**Seng, 1988**).

I.4. Les propriétés de la chitine

La chitine et ses dérivés, principalement le chitosane, la forme désacétylée de la chitine, ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs et industriels depuis une trentaine d'années à cause de leurs propriétés physicochimiques et biologiques (**Muzzarelli, 1977; Mathur and Narang 1990; Li et al., 1992; Percot et al., 2003; Kurita et al., 2005**).

La chitine est fortement hydrophobe et insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques (**Mario et al., 2007**). C'est un polysaccharide azoté, basique, cationique, de couleur blanchâtre et non toxique (**Majeti et al., 2000; Morimoto et al., 2002; Mrunal, 2004**). Elle est caractérisée par : le degré de N-acétylation, le degré de substitution, le poids moléculaire et la solubilité (**Majeti et al., 2000; Kittur, 2002**).

I.4.1. Les propriétés physicochimiques

a) Degré de N-acétylation

Le degré d'acétylation (DA) est un paramètre fondamental qui influence les propriétés des biopolymères chitineux. La détermination de DA est essentiel pour étudier la structure chimique, les propriétés des copolymères et la relation structure chimique- propriétés (**Kasaai, 2008**). Il est défini comme étant le nombre d'unités de glucopyranose de la chaîne de biopolymère ayant un groupement N-acétyle (**Khor, 2001**).

Les groupements amines au niveau de C-2 sont parfaitement acétylés. Généralement, 5 à 15% de désacétylation est provoqué par le traitement alcalin lors du processus d'extraction de la chitine (**Morimoto et al., 2002**). On parlera de chitine lorsque le degré d'acétylation est supérieur à 70% (**Kiefer, 1999 ; Morimoto et al., 2002**).

b) La solubilité

La chitine est insoluble dans les solvants usuellement utilisés pour la cellulose (solutions aqueuses d'hydroxyde de cuprammonium et de cupriéthylènediamine) (**Poirier, 2000**). Cette faible affinité pour les solvants est due aux fortes liaisons hydrogènes intermoléculaires (**Kurita, 2001**).

Généralement, la chitine (α -chitine) est soluble dans quelques solvants comme N,N-diméthylacétamide (DMAc) qui contient 5-10% de LiCl et quelques solvants fluorés comme hexafluoroacétone et hexafluoro-2-propanol. Elle est également soluble dans l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide acétique et l'acide phosphorique à 78-97% (**Yang et al., 2004**). Cependant, la solubilité dépend de la source de chitine (**Kurita, 2001**).

c) Le poids moléculaire

Le poids moléculaire de la chitine est également un facteur important pour sa caractérisation (**Kurita, 2001**). La connaissance de tel paramètre est nécessaire pour les usages industriels (voir les applications de la chitine) (**Montserrat, 2002**). Il varie entre 1,03 et 2,5 MDa (**Fernandez, 2004**).

I.4.2. Les propriétés biologiques

a) Biocompatibilité

La chitine n'a aucun caractère antigénique et de ce fait elle est parfaitement compatible avec les tissus vivants. Son caractère antithrombogène et hémostatique confirme sa possibilité d'emploi dans tous les domaines de la biologie (**Bal et al., 2006 ; Juraj et al., 2007**).

b) Biodégradabilité

La chitine est biodégradable, elle est hydrolysée par une série d'enzymes telles les chitinases (**Reetarani et al., 2000**), le lysozyme et les glucanases (**Yang et al., 2004**). Les chitinases scindent la chitine en de nombreux points pour former principalement le chitobiose (disaccharide) et le chitotriose. Une autre enzyme la chitobiase hydrolyse le chitobiose et le chitotriose en monomères qui peuvent être rapidement biodégradés (**Jerome et al., 2004**).

I.5. Les applications de la chitine

Les activités biologiques incluant les propriétés antifongiques et antibactériennes, la stimulation des réactions de défense chez les plantes, les propriétés curatives, l'inhibition des tumeurs et les effets nutritionnels. Ses propriétés biologiques font de la chitine un biopolymère très intéressant pour des applications dans plusieurs domaines tels que l'agriculture, l'agroalimentaire, la médecine, la cosmétologie, le textile et le traitement des eaux usées (**Neetu et al., 2006 ; Theruvathil et al., 2007**).

I.5.1. En agriculture

La chitine joue un rôle d'éliciteur (inducteur) des mécanismes de défense des plantes (**Kurita, 1997 ; Leclerc, 1997**). Elle leur confère une résistance contre les infections et les agressions parasitaires. La chitine et ses dérivés peuvent être également, utilisés comme insecticides naturels (**Jun Cai et al., 2006**), comme agents de conservation des fruits et légumes (fraises, poivrons, concombres et tomates) (**El-Ghaout et al., 1992**) et comme engrais biologiques. En effet, **Ali et ses collaborateurs (1997)** ont observé, suite à l'ajout de matière organique chitineuse, que les feuilles et les tiges de soja accumulent plus d'azote.

I.5.2. En traitement des eaux usées

A cause de leur grande capacité d'adsorption, la chitine et ses dérivés sont utilisés comme agents de chélation des cations et des ions métalliques à savoir Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} (**Hua et al., 2004**). Le pouvoir chélateur de ces substances (**Muzzarelli R. and Muzzarelli C., 2006; Laurance and Mansur, 1980**) est expliqué par la présence de groupement acétylamine ($-\text{NHCOCH}_3$) et le groupement amine ($-\text{NH}_2$) sur les polymères chitine et chitosane, respectivement (**Mrunal, 2004**). Ils sont également utilisés pour traiter les effluents, de l'industrie textile, riches en colorants par adsorption et par coagulation - floculation (**Kurita, 1997**).

I.5.3. En médecine

La chitine possède des capacités cicatrisantes (**Koide, 1998**), immunologiques (**Hitoshi and Aiba, 2004**), antitumorales (**Koide, 1998**), hémostatiques et anticoagulantes (**Benesch, 2001 ; Preyanat et al., 2003 ; Jayakumar et al., 2006**). Grâce à leur résistance à la bile, à la biocompatibilité (**Yongle et al., 2007**) et à la biodégradabilité (**Speiciene et al., 2007**), les substances chitineuses sont utilisées dans la fabrication des fils de suture et servent de transporteurs des substances actives médicamenteuses à la vitesse et à l'endroit choisis (**Foscolo and Phillipon, 1997**). Le chitosane est également utilisé en ophtalmologie comme véhicule pour la mise au point d'hydrogels ophtalmiques (**Felt, 1999 ; Morfin et al., 2002**).

I.5.4. Autres applications

La chitine et ses dérivés peuvent être utilisés dans d'autres domaines tels que la cosmétologie (**Jun Cai et al., 2006**) pour la fabrication des crèmes hydratantes et amincissantes, l'industrie papetière pour la fabrication de la cellulose (**Dubrana, 1992**), en microbiologie comme sources de carbone (**Wang et al., 1995; Chang et al., 2006**) et pour la production de chitinases (**Suresh and Chandrasekaran, 1998**), en biotechnologie pour l'encapsulation et l'immobilisation des enzymes (**Muzzarelli and Riccardo, 1983; Jinjiang, 1996**) et dans l'industrie agro-alimentaire (**Xiaolan et al., 2005**) comme conservateurs et additifs alimentaires (**Shahidi et al., 1999; Agulló et al., 2003**).

I.6. L'extraction de la chitine :

On retrouve la chitine, essentiellement, dans les carapaces des animaux marins invertébrés, tels les crevettes et les homards. Elle est associée à la calcite et à certaines protéines, formant un exosquelette solide chez certains invertébrés (**Giraud-Guille et al., 2004**). En effet, dans sa structure, la chitine est souvent liée aux autres constituants majeurs de la carapace, formant des liens covalents avec les protéines. La matrice complexe protéique ainsi formée, renferme des cristaux de sels composés de carbonate et/ou de phosphate de calcium (CaCO_3 et/ou CaPO_4) (**Percot et al., 2002**).

De nos jours, la chitine est extraite principalement à partir des sous-produits issus de la pêche des crustacés qui en contiennent 20 à 50% sur base sèche (**Alexandre et al., 2006; Beaulieu, 2007**).

L'extraction de la chitine de la carapace nécessite au moins deux étapes distinctes lorsque l'on procède à la méthode chimique : la déminéralisation en milieu acide et la déprotéinisation en milieu basique (**Percot et al., 2002**).

La déminéralisation de la chitine s'effectue habituellement avec une solution d'acide généralement HCl (0.1-1M) (**Gentilia et al., 2006**), afin de transformer les minéraux non solubles de la carapace en sels solubles. Le carbonate de calcium, principal composé minéral de la carapace, réagit avec l'acide pour former du chlorure de calcium, de l'eau et du gaz carbonique. La réaction peut être décrite comme suivante :



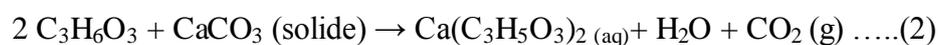
La plupart des autres minéraux, tel que le magnésium, manganèse et le cuivre présents réagissent de façon similaire et donnent des sels solubles en présence d'acide. Les sels formés peuvent être séparés de la chitine par une simple filtration suivie d'un lavage à l'eau distillée de la carapace. Ces sels, ensuite, peuvent être récupérés pour une valorisation par précipitation. Une grande quantité de mousse est produite durant la déminéralisation résultant du dégagement du gaz carbonique (**No and Hur, 1989 ; Duval, 2008**).

Quant à la déprotéinisation de la carapace, elle consiste à solubiliser les protéines, présentes dans la matrice de chitine, dans une solution basique. Elle peut être effectuée de façon douce ou sévère.

La méthode sévère dite chimique apparaît plus rapide et plus efficace mais très polluante à cause des effluents d'acides et de bases produits lors de l'extraction de la chitine (**Jung et al., 2005**). En plus, l'utilisation des acides forts conduit à la modification des propriétés physicochimiques de la chitine suite à la dépolymérisation et à la désacétylation du polymère (**Shirai et al., 2001; Mahmoud et al., 2007**).

La méthode douce dite biologique, mise en évidence pour remplacer la méthode chimique (**Evonne and Lee, 2002**), est basée sur l'utilisation des bactéries lactiques et/ou des enzymes protéolytiques qui dégradent les protéines en peptides solubles dans la solution aqueuse (**Percot et al., 2002, Synowiecki and Al-Khateeb, 2000; Duval, 2008**).

L'utilisation des bactéries lactiques dans l'extraction de la chitine présente un double avantage, car en plus de la présence d'enzymes protéolytiques (**Rao et al., 2000**), qui favorisent la déprotéinisation de la carapace, ces bactéries produisent l'acide lactique en dégradant la source de carbone additionnée dans le milieu de fermentation. L'acide produit provoque un abaissement de pH du milieu réactionnel conduisant ainsi à la solubilisation des minéraux principalement les carbonates de calcium et par conséquent il provoque la déminéralisation de la carapace. Le carbonate de calcium, libéré de la carapace, réagit avec l'acide lactique produit et forme le lactate de calcium soluble dans le milieu. La réaction est décrite par l'équation suivante :



Chapitre II

Les bactéries lactiques

II. 1. Les bactéries lactiques et leur utilisation dans l'extraction des biopolymères « la chitine »

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (Doleyres, 2003), des bactéries à Gram- positif, de formes en bâtonnet ou en coque, immobiles et non sporulantes.

Il existe 11 genres bactériens qui figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (Doleyres, 2003). Les bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène, de grandes teneurs peuvent leur être néfastes. Ceci peut probablement être relié au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est produit dans les cellules en présence d'air. Ce dernier doit être éliminé, dans le cas contraire son accumulation devient toxique. Le système le plus efficace d'élimination de H₂O₂ est une enzyme nommée catalase dont les bactéries lactiques sont déficientes. Les bactéries lactiques possèdent plutôt une peroxydase, moins efficace que la catalase. Ainsi, comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde, elles sont considérées comme microaérophiles (Doleyres, 2003).

Elles se développent majoritairement à pH 4,0- 4,5 et certaines sont encore actives à pH basique (9,6) ou pH acide (3,2). Elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du sel (Ballarda, 2003).

II. 2. Origine

Les bactéries lactiques colonisent des milieux naturels variés telles que la surface des végétaux et les muqueuses des mammifères (intestin, bouches, vagin et surface de la peau) (Badis et al., 2005).

II. 3. Isolement

L'isolement de ces bactéries est difficile et il se réalise dans un milieu particulier : milieu MRS en anaérobiose. Les bactéries lactiques sont exigeantes en facteurs de croissance pendant la fermentation homolactique ou hétérolactique. En effet, en présence seulement de peptones, elles ne sont pas capables de se développer.

II. 4. Pouvoir pathogène

Les Lactobacilles ne sont pas pathogènes puisqu'elles sont très employées dans la fabrication des produits laitiers. On trouvera bien entendu de rares infections chez des patients très immunodéprimés.

II. 5. Rôles des bactéries lactiques

En industrie, les *Lactobacillus* sont utilisés comme starters (*L. helveticus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*) pour la production de nombreux fromages et des yaourts. Ils jouent un rôle important dans les produits à base de viande, par exemple dans la préparation des saucissons crus (**Leclerc et al., 1995**).

L'action de la flore lactique dans la conservation d'un aliment est liée à l'abaissement du pH consécutif à la production d'acide lactique. Les bactéries lactiques peuvent aussi produire de nombreux agents anti-bactériens tels que les bactériocines qui contribuent à inhiber la croissance des flores indésirables. Enfin, elles ont une action déterminante sur les qualités organoleptiques des produits fermentés (texture et arôme) (**Drouault et al., 2001**). Les bactéries lactiques ont un potentiel enzymatique énorme, ce qui d'ailleurs leur confère une importance en industrie (**Djould, 2004**).

Aujourd'hui, les applications des bactéries lactiques se sont élargies à la production des biopolymères, principalement la chitine. Un grand nombre de biomasses marines ont pu être valorisées et ce sont essentiellement les carapaces des crevettes, des crabes et des langoustines.

- Avec la souche *Lactobacillus paracasei*, **Zakaria et al. (1998)** ont réalisé une extraction de la chitine à partir des déchets de langoustine. Dans un bioréacteur agité et incubé à température de 30°C, un milieu de fermentation contenant 1 Kg de déchets de langoustine, 10% de glucose (volume/masse) et 10% d'inoculum (volume/masse). Au bout de 3 jours de fermentation, les essais ont abouti à des taux de déminéralisation (DM) et de déprotéinisation (DP) de 61% et 77,5%, respectivement.

- Avec des carapaces de crevettes, une autre espèce de *Lactobacillus* a été utilisée *Lactobacillus plantarum* 541 par **Rao et al. (2000)**. Cette étude a été portée sur l'optimisation des paramètres physicochimiques tels que : la concentration en glucose (0 à 8,7%), le pH initial (après ajustement à l'acide acétique 1%). Les résultats obtenus ont montré qu'avec une concentration de 5% en glucose et un pH initial égale à 6 ajusté avec de l'acide acétique, des taux élevés ont été atteints : DM 90% et DP 88%. Alors que, les expériences réalisées à pH libre (8-9) donnent des taux plus faibles : DM et DP 47,9% et 87,3%, respectivement.

- D'autres séries de fermentations lactiques ont été, depuis, réalisées sur les carapaces des crevettes. L'équipe de **Cira (2002)** ont étudié l'effet de la source de carbone (lactose, sucrose et lactosérum) sur la souche *Lactobacillus* B2 à deux concentrations (0,5 et 10 volume/masse). Les meilleurs résultats ont été donnés par le sucrose fermenté à 10% (masse/volume) et un inoculum de 5% (volume/masse). Le taux de DM obtenu est de 56,8% et le taux de DP est de 63,5%.

Par la suite, de nouveaux essais ont été élaborés dans le but d'améliorer le procédé d'extraction de la chitine en vue d'augmenter les taux de DM et de DP. Sur des carapaces de crevettes, il a été précédé au traitement biologique le traitement chimique. Pour ce cas, de faibles concentrations en acide HCl (0,5M) et en base NaOH (0,4M) ont été utilisées. Les résultats obtenus sont 89,4% de DP et 82,5% de DM.

L'amélioration des taux de DM et de DP a été aussi envisagée par l'utilisation d'un mélange de bactéries lactiques et de bactéries protéolytiques. Selon **Healy et al. (2003)**, le mélange de deux bactéries lactiques (*Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus salivarius*) et deux bactéries protéolytiques (*Pediococcus acidilactici* et *Streptococcus faecium*) a permis d'aboutir à un taux de DM de 90,99% et à une élimination totale de l'azote protéique.

Par cofermentation, **Jung et al. (2005)** ont utilisé un mélange comportant *Lactobacillus paracasei* subsp. Tolerans KCTC-3074 et une bactérie protéolytique *Serratia marcescens* FS-3 pour extraire la chitine à partir de la carapace des crabes rouges (*Chionoecetes japonicus*). Le couplage a donné une déminéralisation de 97,2% et une déprotéinisation de 52,6%. En utilisant la bactérie protéolytique seule, la déprotéinisation a été améliorée, le taux a atteint 84%.

Rao and Stevens (2006) ont réalisé deux fermentations, l'une avec une bactérie lactique amylolytique (*Lactobacillus plantarum* A6) et l'autre avec une bactérie lactique non amylolytique (*Lactobacillus plantarum* 541) à différentes concentrations en NaCl. En présence de 2% de sel, les résultats obtenus sont 81,4% de DM et 59,8% de DP avec la souche 541 et 65,5% de DM et 52,2% de DP avec la souche A6.

Lors des travaux réalisés par **Aytekin et al. (2007)** sur la carapace des crevettes roses, une optimisation de la concentration en glucose de 1 à 15% a été étudiée sur trois souches en cultures pures, deux bactériennes (*Teredinobacter*, *Lactobacillus lactis*) et l'autre

fongique (*Rhizopus oryzae*). Les résultats révèlent une concentration optimale en glucose de 15% avec des taux de DM et de DP de 18,52% et 63,20%, respectivement pour *Teredinobacter*, 78,83% et 76,49%, respectivement pour *Lactobacillus lactis*, et enfin 68,25% et 69,51%, respectivement pour *Rhizopus oryzae*.

Les travaux de **Arbia (2007)** ont porté sur l'optimisation des paramètres physicochimiques (température, la nature et la concentration en substrat carboné) de l'extraction de la chitine à partir des carapaces de la crevette blanche *Parapenaeus longirostris* par *Lactobacillus helveticus*. Les résultats obtenus sont 60% de DM avec une concentration de 300 g/l en glucose et 76% de DP avec une concentration de 80 g/l en glucose. La deuxième partie consiste à remplacer le glucose par un substrat naturel carbohydraté « jus de dattes ». Ces essais ont permis d'améliorer la DP à un taux de 91%.

Jung et al. (2007) ont extrait la chitine par voie biologique à partir de la carapace des crabes rouges. Ce travail a montré que l'ordre d'utilisation de la bactérie lactique et de la bactérie protéolytique était important.

L'utilisation de la bactérie *Serratia marcescens* FS-3 suivie par *Lactobacillus paracasei* subsp. Tolerans KCTC-3074 donne de meilleur résultat pour la co-élimination de CaCO_3 et des protéines présentes dans la carapace des crabes. Les taux de DP et de DM obtenus sont 68,9% et 94,3%, respectivement.

D'après ce même auteur, puisque la bactérie *Serratia marcescens* FS-3 présente une forte activité protéolytique qui est de 60,7 U/ml au bout de 3 jours d'incubation, il est possible d'améliorer le taux de DP. L'inoculation de ce milieu de fermentation avec 10% de FS-3 a permis d'atteindre 84% au bout de 7 jours. Un taux de DM de 47% a été, également, observé.

Xu et al. (2008) ont purifié la chitine à partir des carapaces de *Panaeus monodon* et *Crangon crangon* par un procédé de fermentation en deux étapes avec déprotéinisation anaérobique en utilisant une bactérie sporulante qui possède une activité protéolytique de 76 U/ml, suivie d'une décalcification par une bactérie homolactique *Lactobacillus casei*. Cette bactérie anaérobique a conduit à un taux protéique restant de 5,8%. En ce qui concerne la DM, l'acide lactique produit par *Lactobacillus casei* a conduit à la solubilisation du carbonate de calcium, avec un taux de 0,4% de calcium résiduel.

D'autres genres de bactéries ont été utilisés dans l'extraction de la chitine :

- Soit *Pseudomonas aeruginosa* F722 étudiée par **Kyung Taek Oh et al. (2007)**. Cette bactérie est incubée avec la poudre de carapace des crabes pendant 7 jours à différentes températures (25, 30 et 35°C) et à différentes quantités de carapaces. A température optimale observée de 30°C et à quantité optimale de poudre de carapace de 5%, des taux de DM de 92% et de DP de 63% ont été aboutis.
- Soit *Bacillus subtilis* étudiée par **Theruvathil et al. (2007)**. Ces chercheurs ont constaté que la bactérie produit, d'une part, une quantité suffisante d'acide pour éliminer les minéraux de la carapace des crevettes et libère, d'autre part, des protéases qui sont responsables de la DP. Cette étude abouti à des taux de DM et de DP de 72% et 84%, respectivement.
- Soient *Bacillus cereus* et *Exiguobacterium acetylicum* étudiées par **Iryna et al. (2009)**. Ces deux bactéries ont été incubées séparément avec 10% de la poudre de carapace des crevettes à 37°C pendant 14 jours dans un fermenteur de 12 litres. Les meilleurs résultats sont donnés par *B. cereus* avec 78,6% de DP et 73% de DM.
- Soient la bactérie *Lactococcus lactis* et la bactérie marine *Teredinobacter turnirae* étudiées pour l'extraction de la chitine à partir de la crevette rose par **Aytekin et al. (2009)**. Différentes stratégies d'inoculation des bactéries ont été appliquées utilisant l'acide lactique produit par *L. lactis* et les protéases produites par *T. turnirae*. Le meilleur rendement 95,5% est obtenu lorsque *T. turnirae* a été inoculée en premier.

Chapitre III

La croissance bactérienne

III.1. Introduction

La croissance se définit comme l'accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme. Chez les microorganismes unicellulaires (bactéries, levures), elle aboutit à une augmentation du nombre d'individus. Cet accroissement est donc synonyme de multiplication, puisque toutes les 20 minutes environ, une bactérie peut donner naissance à deux nouvelles bactéries. C'est un phénomène de grand intérêt biologique, dont l'importance écologique et pratique sont considérables (**Leclerc et al., 1983**).

Les bactéries ont toutes des besoins communs de base, comme eau, source d'énergie, et nutriments (source de carbone, d'azote et autres éléments nécessaires aux biosynthèses). (**Bosgiraud, 2003**).

III.2. Les besoins nutritifs

L'analyse de la cellule montre que 95% du poids sec de la cellule sont composés de quelques éléments majeurs: carbone, oxygène, hydrogène, azote, soufre, phosphore, potassium, calcium, magnésium, et fer. Ceux-ci sont nécessaires aux microorganismes en quantités importantes et sont appelés macroéléments ou macronutriments. Les six premiers éléments (C, O, H, N, S et P) sont des constituants des glucides, des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Les quatre derniers éléments existent dans la cellule à l'état de cations et jouent plusieurs rôles : le potassium (K^+) est nécessaire à l'activité de plusieurs enzymes y compris celles qui interviennent dans la synthèse protéique, le calcium (Ca^{2+}) a de nombreuses fonctions à savoir la contribution à la thermorésistance des endospores bactériennes (**Prescott et al., 2003**) et l'activation des protéases (**Leveau and Bouix, 1980**), le magnésium (Mg^{2+}) est un cofacteur de nombreuses enzymes.

La croissance nécessite également de bonnes conditions physicochimiques (pH, température, pression osmotique, aération ou anaérobiose) et d'une absence de prédateurs de produits inhibiteurs (**Prescott et al., 2003**).

III.3. Influence des facteurs extérieurs sur la croissance microbienne

Les facteurs physicochimiques qui conditionnent la nutrition sont les mêmes qui influent sur la croissance.

III.3.1. Le pH

L'effet du pH sur l'ensemble de l'activité cellulaire est très important. Il a une grande incidence sur l'équilibre ionique du milieu, donc sur la perméabilité cellulaire et la

disponibilité des substrats, sur les activités enzymatiques extracellulaires et à un bien moindre degré sur les activités intracellulaires (**Guiraud, 2003**). L'acidification des milieux au cours de la croissance est liée à la dégradation des sucres, tandis que l'alcalinisation dérive de celle des sources azotées. On remarque que la croissance prend une valeur maximale pour une valeur de pH optimale et elle est nulle en dehors des pH physiologiques (**Guiraud, 2003**).

III.3.2. La température

La température exerce une influence déterminante sur l'ensemble de l'activité cellulaire microbienne. Cette dernière peut être totalement inhibée aux basses températures. On peut observer trois types de microorganismes :

- Les microorganismes psychrophiles : se développent en dessous de 15-20°C même jusqu'à des températures négatives. Ils existent des psychrophiles facultatifs et d'autres obligatoires ;
- Les mésophiles qui comprennent la majorité des microorganismes se développent entre 15-45°C;
- Les thermophiles sont capables de se développer au dessus de 45°C et les thermophiles extrêmes jusqu'à 75-80°C et même au dessus ;

L'action de la température intervient à plusieurs niveaux : activation du métabolisme selon la loi d'Arrhénius, stress thermique et dénaturation des constituants cellulaires, et intervient également sur les transferts physiques (**Guiraud, 2003**).

III.3.2. L'agitation

L'agitation aura pour but d'homogénéiser le milieu, de maintenir les bactéries en suspension, d'assurer une concentration maximale d'oxygène et d'optimiser le transfert des substances nutritives du milieu extérieur vers les cellules.

III. 4. La courbe de croissance dans un milieu non renouvelé

Dans un milieu non renouvelé, la croissance d'une population bactérienne s'arrête après 16 à 24 heures de culture (sauf espèces à croissance lente : les levures et les moisissures) du fait de la raréfaction des nutriments et de l'accumulation des substances toxiques.

En pratique, pour obtenir une courbe de croissance, on inocule au temps ($t_0=0$) un milieu liquide avec un petit nombre de bactéries, puis on pratique des prélèvements périodiques (toutes les heures par exemple). La courbe tracée représente l'évolution du logarithme du nombre de bactéries par unité de volume en fonction du temps (**Leyral et al., 2007**).

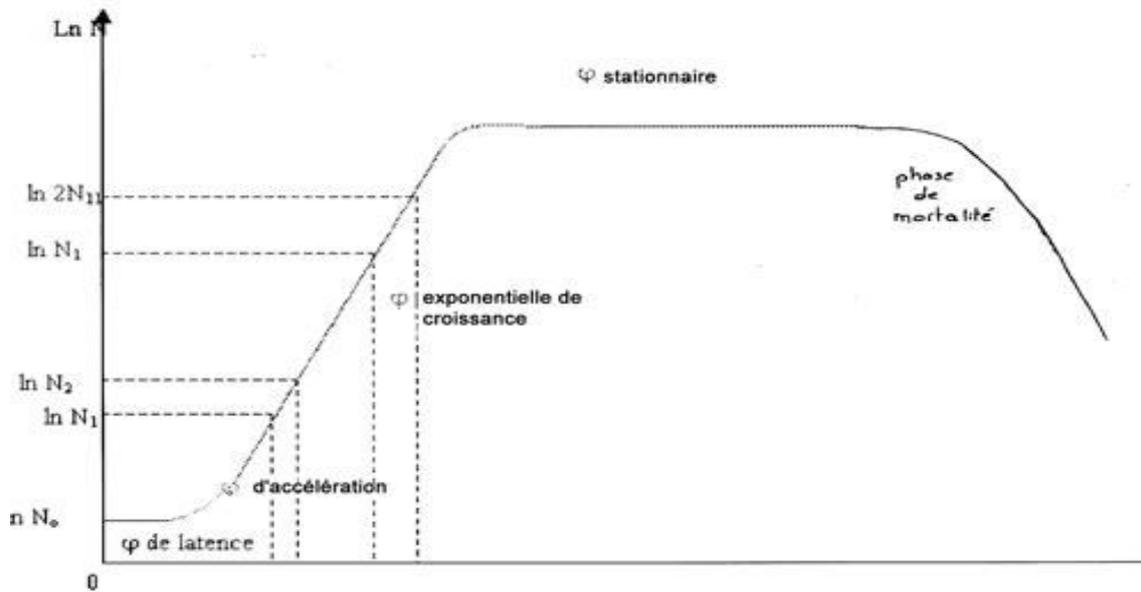


Fig.5 : Courbe de croissance dans milieu non renouvelé

III. 4. 1. La phase de latence :

Le taux de croissance est égal à zéro Il n'y a pas d'augmentation apparente du nombre de bactéries. Les bactéries s'adaptent aux nutriments et aux paramètres physico-chimiques. La durée de cette phase varie selon l'âge et le nombre initial des bactéries et selon la nécessité d'adaptation des bactéries au milieu (Bosgiraud, 2003).

III. 4. 2. La phase d'accélération :

Pendant cette phase, on remarque un phénomène d'accélération de la croissance de la population. La concentration cellulaire, ou concentration en biomasse : X , augmente lentement tout d'abord puis plus vite. La vitesse de reproduction augmente, ainsi que la vitesse spécifique de croissance (Scriban, 1999).

III. 4. 3. La phase exponentielle :

Elle est caractérisée par un taux de croissance constant et maximum. On parle alors de phase logarithmique ou exponentielle de croissance.

III. 4. 4. La phase de ralentissement :

La courbe présente un point d'inflexion qui correspond à l'appauvrissement du milieu de

culture suite à la disparition d'un ou de plusieurs composés nécessaires à la croissance bactérienne (Scriban, 1999). Cette phase est caractérisée par une diminution du taux de croissance.

III. 4. 5. La phase stationnaire :

Le milieu devient de moins en moins favorable à la croissance. Le nombre des cellules viables reste constant. Cette phase est caractérisée par une annulation du taux de croissance. L'arrêt de la croissance peut survenir théoriquement, soit parce qu'un aliment indispensable est totalement épuisé, soit par suite de l'accumulation de métabolites toxiques (Leclerc et al., 1995).

III. 4. 6. La phase de déclin (ou phase de mortalité):

Au cours de cette dernière phase, les bactéries ne se divisent plus. Beaucoup d'entre elles meurent et sont lysées par les enzymes qu'elles libèrent (autolyse). Le taux de mortalité peut être constant comme le taux de croissance (Leclerc et al., 1995).

III. 5. Le métabolisme du glucose chez les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. Certaines sont dites hétérofermentaires et produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate et éthanol en général) alors que d'autres sont dites homofermentaires car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique (Bourgeois et al., 1993 ; Drouault et al., 2001).

Dans les conditions normales, c'est-à-dire en présence de forte concentration en source de carbone et faible oxygénation, le pyruvate est réduit en acide lactique (métabolisme fermentaire) par l'enzyme lactate déshydrogénase NAD dépendante (nLDH), réoxydant ainsi le NADH formé au début de la glycolyse (Axelsson, 2004) (Fig 6).

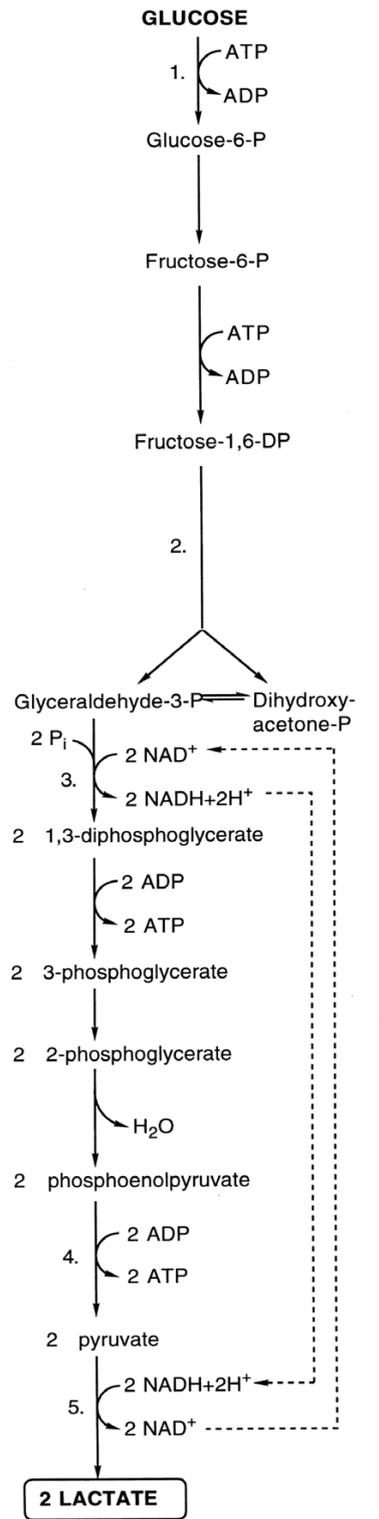


Fig.6 : La glycolyse ou la voie d'Embden-Meyerhof-Paranas (Axelsson, 2004)

Dans la plupart des fermentations bactériennes, le D-glucose est le donneur d'électrons, il est oxydé via la glycolyse et conduit à la formation de pyruvate ou d'un composé qui en dérive tel que l'acétyl-CoA, l'acétaldéhyde, le lactyl-CoA, l' α -acétolactate (2-hydroxy-2-méthyl-3-oxobutanedioate) ou de métabolites dérivant de ce dernier. Ces produits servent alors d'accepteurs d'électrons, ce qui conduit à une grande variété de métabolites (**Bosgiraud, 2003**).

Il est bien connu que les bactéries lactiques changent leur métabolisme en fonction des conditions du milieu, aboutissant aux différents produits finaux (**Axelsson, 2004**). Le pyruvate est la dernière molécule de la glycolyse. On peut le considérer comme la plaque tournante du métabolisme, dans la plupart des cas, le changement peut être attribué à l'altération du métabolisme du pyruvate, à l'utilisation d'accepteur externe d'électrons ou les deux en même temps (**Axelsson, 2004 ; Corrieu and Luquet, 2008**).

Chez les bactéries lactiques, en absence de respiration, le pyruvate va être pris en charge par des réactions de fermentation, principalement par la lactate déshydrogénase (LDH) pour la production de lactate. Leur aptitude à tolérer l'oxygène n'est pas sans conséquence sur leur métabolisme. Ainsi, en présence d'oxygène, le métabolisme du pyruvate est alors modifié. Dans certaines conditions, une limitation en source de carbone ou bien la nature de cette source de carbone, le pyruvate peut aussi être métabolisé en acétate et éthanol *via* la pyruvate déshydrogénase ou bien donner lieu, *via* l'acétolactate synthétase, à la production d'acétoïne et le diacétyle ; ce dernier composé étant recherché pour sa valeur aromatique dans les produits laitiers (**Axelsson, 2004 ; Corrieu and Luquet, 2008**).

Chapitre IV

Matériel et méthodes

IV.1. Matériels

IV.1.1. La souche bactérienne :

La bactérie utilisée, dans ce travail, est *Lactobacillus helveticus* souche *milano* qui provient de la société Even (Ploudaniel, France). Pour sa conservation, elle est cultivée (42°C, 24h) sur lait écrémé reconstitué à 10% (masse/volume) puis placée à -16°C.

IV.1.2. La carapace :

Les carapaces (y compris têtes et thorax) utilisées dans notre étude, proviennent des crevettes *Parapenaeus longirostris*.

IV. 1. 3. Le jus de dattes :

Préparé à partir des déchets de dattes issus de la variété Deglet-Nour, récoltés en 2007. Le choix a été porté sur le jus de dattes, du fait que le secteur phoenicicole algérien fournit à chaque campagne près de 60000 tonnes de déchets de dattes provenant soit directement des palmiers, soit des écarts de stationnement de conditionnement au sud d'Algérie (Boudjelal and Nacib, 2001).

IV. 2. Méthodes de préparation :

IV.2.1. La poudre de carapace:

La poudre de carapace des crevettes est préparée suivant le procédé cité par **Mukherjee, 2001** :

- Débarrasser la carapace de la chaire, des antennes et des pattes ;
- Faire bouillir la carapace dans de l'eau pendant 1h pour enlever le maximum de tissus ;
- Séchage dans l'étuve;
- Laisser refroidir ;
- Débarrasser d'éventuels tissus encore présents, par frottement ;
- Faire subir les carapaces un choc thermique qui permet de casser la structure cristalline qui caractérise la carapace et de les rendre plus faciles à broyer ;
- Mettre les carapaces ainsi chaudes dans un récipient puis l'ensemble est rapidement plongé dans un bain d'acétone contenant de la glace ;
- Broyer les carapaces à l'aide d'un broyeur pour obtenir une poudre de granulométrie variable de 1 à 3mm (choisi arbitrairement dans notre travail).

IV. 2. 2. Le jus de dattes :

Le jus de datte est préparé par la méthode citée par **Boudjelal and Nancib (2001)** :

- Laver et dénoyauter les dattes soigneusement ;
- Additionner d'eau à raison de 2 l/Kg de pulpes ;
- Chauffer le mélange à 80°C pendant 2h ;
- Centrifuger l'extrait obtenu à 5000r.p.m pendant 30mn pour séparer les débris cellulosiques ;
- Diluer le surnageant recueilli aux proportions voulues.

IV. 3. Méthodes analytiques :**-Détermination du pH de la carapace à 10% (masse/volume) :**

Pour estimer le pH de la carapace de crevettes, 10 g de poudre sont mis à macérer dans 100 ml d'eau distillée pendant 1h. La valeur du pH est déterminée par une lecture directe du surnageant à l'aide d'un pH mètre.

-Mesure de l'humidité de la carapace:

La teneur en eau de la carapace est déterminée, selon la norme **AFNOR (NF ISO 712, 1989)**. La méthode consiste en un étuvage à 105°C pendant 24h. La perte de masse est équivalente à la quantité d'eau présente dans la carapace. L'humidité notée H (%) se calculera par :

$$H = \left(\frac{m_0 - m_1}{m_0} \right) \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

m_0 : masse de la prise d'essai (g).

m_1 : masse de la prise d'essai après étuvage (g).

-Détermination du taux de cendres dans la carapace:

Le taux de cendres correspond au pourcentage de la matière minérale présente dans la carapace. Il nous a permis, dans notre travail, de déduire le taux ou le pourcentage de déminéralisation de la carapace mesuré à la fin de la fermentation. Le principe repose sur l'incinération de 1g de poudre de carapace à 900°C pendant 2,5h dans un four à moufle (**AFNOR, 1988**) (**NF V03-922, 1967**).

Le taux de minéralisation (TM) (%) se calculera par :

$$TM = \left(\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \right) \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

m_2 : masse du creuset chargé de la prise d'essai après incinération (g).

m_0 : masse du creuset vide (g).

m_1 : masse du creuset chargé de la prise d'essai avant incinération (g).

TM : taux de minéralisation (avant la fermentation).

Ainsi, il en déduira le pourcentage de déminéralisation noté DM:

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

TM_0 : taux de minéralisation avant fermentation.

TM_f : taux de minéralisation à la fin de la fermentation.

m_i : masse d'échantillon initial (avant fermentation) (g).

m_f : masse d'échantillon final (à la fin de la fermentation) (g).

-Dosage du carbonate de calcium (CaCO₃) (AFNOR, 1987) :

Le principe repose sur la détermination volumétrique du dioxyde de carbone (CO₂) dégagé sous l'action d'un acide fort à température ambiante par l'échantillon préparé pour l'essai.

Le protocole s'effectue comme suit :

- Verser 1g de prise d'essai dans la fiole, y introduire le tube contenant 10ml de solution de l'acide chlorhydrique en prenant soin de ne pas les verser sur la prise d'essai ;
- Relier la fiole au calcimètre ;
- Equilibrer les pressions en ramenant le niveau d'eau de l'ampoule au zéro de la colonne par le dispositif prévu ;
- Verser l'acide contenu dans le tube sur la prise d'essai en inclinant la fiole puis agiter énergiquement (en tenant la fiole par le col et en évitant tout réchauffement).

Par conversion, la teneur en calcaire total exprimée en pourcentage de matière sèche de l'échantillon préparé pour l'essai est la teneur en carbonate de calcium. Elle est égale à :

$$taux (CaCO_3) = \left(\frac{m_2}{m_1} \right) \times 100 \dots\dots\dots (4)$$

m_1 : masse de la prise d'essai sèche (g).

m_2 : masse de carbonate de calcium contenu dans la prise d'essai (g).

-Dosage de l'acide lactique : (NF V04-206 ; Kyung, 2007)

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 en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré.

Mode opératoire :

- Prélever 10ml d'échantillon ;
- Ajouter 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine ;
- Titrer par l'hydroxyde de sodium 1/9 N.

-Détermination de la teneur en chitine :

La teneur en chitine dans les carapaces est déduite par le dosage des résidus N-acétyl glucosamines libérés par hydrolyse acide de la chitine réalisée avec de l'acide chlorhydrique 4N pendant 18h à 105°C. Le dosage des résidus N-acétyl glucosamines libérés se fait 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 en p-diméthylaminobenzaldéhyde conduisant à une coloration rouge violacée (**Percheron et al., 1981**).

Cette méthode utilise deux réactifs :

- Le tetraborate de potassium (réactif A) : solution 0,8M dans le borate. Le pH est ajusté à 9,1 avec KOH.
- Réactif à la p-diméthylaminobenzaldéhyde (réactif B) : on dissout 10mg de ce réactif dans 100ml d'acide acétique glacial très pur, 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 :

- Choisir une gamme comprise entre 0 et 8mg d'acétyl glucosamine dans un volume d'un litre d'eau distillée ;
- Répartir 0,5ml de chaque solution préparée, de concentration connue, dans une série de tubes à essai ;

- Ajouter 0,1ml de tetraborate de potassium et chauffer dans un bain marie bouillant pendant exactement trois minutes ;
- Refroidir dans un bain d'eau froide, puis ajouter 3ml de réactif B.
- Mélanger et porter immédiatement dans un bain à 38°C.
- Refroidir dans un bain d'eau froide (20°C) et lire l'absorbance à 530nm au spectrophotomètre 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 :

$$Teneur\ en\ chitine = \left(\frac{\text{masse d'acétylglucosamine}}{\text{masse d'échantillon}} \right) \times 100 \dots\dots\dots(5)$$

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

$$N(chitine) = \frac{\text{teneur en chitine}}{14,5} \dots\dots\dots(6)$$

- Dosage des sucres réducteurs par la méthode de l'acide dinitrosalicylique Kyung, 2007) :

C'est une méthode basée sur la formation d'un chromatophore entre le réactif DNS et les terminaisons réductrices des molécules de 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 aldéhydes des sucres sont oxydés en groupements carboxyles.

- Dosage des protéines par la méthode de Biuret (Apria, 1981) :

En milieu alcalin, les composés contenant au moins deux groupements (-CO-NH ou -CO-NH₂) forment avec les ions cuivriques (Cu²⁺) un complexe bleu-violet. Cette coloration se développe en particulier avec le Biuret, NH₂-CO-NH-CO-NH₂ d'où son appellation de coloration de Biuret.

L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques. Il en résulte que pour une protéine pure, l'intensité est proportionnelle à la concentration de celle-ci. Toute fois, cette concentration ne doit pas excéder 10mg/l.

Mode opératoire :

- Diluer l'échantillon, à doser, au 1/20^{ème} avec de l'eau physiologique.
- Prélever 1ml de cette dilution et ajouter 4ml du réactif de Cornall, bien mélanger, attendre 30mn à l'obscurité et lire au spectrophotomètre (DO).
- A partir de la valeur lue (DO), la concentration est déduite de la courbe d'étalonnage, en tenant compte de la dilution.

Ainsi, il en déduira le pourcentage de déprotéinisation noté DP:

$$DP = \left(\frac{TP_0 \times m_i - TP_f \times m_f}{TP_0 \times m_i} \right) \dots\dots\dots (7)$$

TP₀ : taux de protéines avant fermentation.

TM_f : taux de protéines à la fin de la fermentation.

m_i : masse d'échantillon initial (avant fermentation) (g).

m_f : masse d'échantillon final (à la fin de la fermentation) (g).

-Mesure de la biomasse bactérienne :

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 :

$$X (mg / l) = \left(\frac{m}{50} \right) \times 10^6 \dots\dots\dots(8)$$

- 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.

-Analyses spectroscopiques infrarouge :

La spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (FTIR) permet d'identifier la présence de groupements chimiques spécifiques. Les liaisons entre atomes vibrent selon une fréquence spécifique qui dépend de la masse des atomes engagés et de la rigidité relative de la liaison. Ces liaisons absorbent des ondes infrarouges d'énergie spécifique selon la fréquence de leur vibration. L'analyse spectroscopique infrarouge permet d'identifier les plages de fréquence d'absorption des infrarouges d'un échantillon et de déterminer par la suite les groupes chimiques conséquents (**Duval, 2008**).

-Analyse de Diffraction des rayons X (DRX) :

La diffraction des rayons X est utilisée dans l'étude de la cristallinité des différents matériaux. La méthode générale consiste à bombarder l'échantillon avec des rayons X, et à regarder l'intensité de rayons X qui est diffusée selon l'orientation dans l'espace (Gwenn, 2008). La déviation structurée de ce rayon-X sur les cristaux permet de déterminer le taux de cristallinité, le type de cristaux et d'estimer leur taille moyenne (**Duval, 2008**).

-Analyse par spectrométrie de fluorescence X :

La spectrométrie de fluorescence X est une méthode d'analyse chimique élémentaire utilisant une propriété physique de la matière, la fluorescence de rayon X. Le principe de la méthode consiste à irradier l'échantillon soit par un faisceau de rayon X, soit par bombardement avec des particules, généralement des électrons. Lorsque l'on bombarde de la matière avec des rayons X, la matière réémet de l'énergie sous la forme, entre autres, de rayons X ; c'est la fluorescence X, ou émission secondaire de rayon X. Le spectre des rayons X émis par la matière est caractéristique de la composition de l'échantillon. En analysant ce spectre, on peut en déduire la composition élémentaire, c'est-à-dire les concentrations massiques en éléments (**Rouessac et al., 2000**).

IV.4. Dispositif expérimental :

Des cultures en mode batch ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml avec un volume utile de 100 ml, 10g de carapace ont été rajoutés au milieu de culture et une agitation douce de 200 r.p.m est effectuée afin d'optimiser les paramètres d'extraction (**Rao et al., 2000**).

Chapitre V

Résultats et discussion

V. 1. Caractérisation physicochimique de la carapace brute de crevettes :

Les analyses physicochimiques réalisées dans le cadre de notre travail sont basées sur la détermination de l'alcalinité de la poudre de carapace mise en solution aqueuse, ainsi que de sa teneur en eau, de sa teneur en minéraux (cendres) et en particulier le carbonate de calcium, de ses teneurs en protéines et en polysaccharide (la chitine), en lipides et en pigments (responsables de la coloration de la carapace). L'ensemble des résultats est rassemblé dans le tableau 1.

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques de la carapace *Parapenaeus longirostris*

pH	8-9
Humidité	3,25%
Cendres (CaCO₃)	27% (13%)
Protéines (libres et liées)	12%
Chitine	23%
Lipides et pigments	34,75%

Le tableau 1 montre que la carapace de *Parapenaeus longirostris* possède un pH basique qui varie entre 8 et 9, un taux de cendres de 27% dont la moitié presque (13%) est formée par le carbonate de calcium, probablement, responsable de cette alcalinité. Cependant, il est constaté que ce taux est supérieur à celui obtenu par **Zakaria et al. (1998)** qui est de l'ordre de 21% chez les langoustines et par **Rao et al. (2000)** qui est de l'ordre de 18-23% chez la crevette tropicale. Alors que les travaux de **Jung et al. (2005)** ont montré que le taux de minéralisation chez les crabes rouges est plus élevé et il est de 41%. Avec la même espèce de crevette *Parapenaeus longirostris*, il a été constaté un taux plus important et de l'ordre de 35,5% lors des travaux de **Arbia (2007)**.

La carapace de crevettes renferme un taux protéique de l'ordre de 12%, il reste aussi plus faible, que celui obtenu par **Arbia (2007)** chez la même espèce de crevettes avec un taux de 27 %.

Ces variations constatées dans les taux (cendres et protéines) peuvent être dues aux différences : de la période saisonnière, de leur habitat de reproduction et de l'environnement extérieur dans lequel le crustacé est exposé.

L'analyse des N-acétyl glucosamines après hydrolyse acide de la carapace montre qu'elle renferme un taux de 23% de chitine, ce taux reste en accord avec celui rapporté par **No et ses coll. (1989)** (14-27% chez les crevettes) et par **Arbia (2007)** (24% chez *Parapenaeus longirostris*).

Notre carapace est, également, caractérisée par une faible humidité liée à sa structure rigide et par une forte coloration traduite par la présence de 34.75% de lipides et de pigments.

V. 2. Etude de la fermentation lactique pour la récupération de la chitine

Comme tout procédé biologique, l'extraction de la chitine par voie fermentaire est essentiellement conditionnée par les paramètres physicochimiques liés aux facteurs de croissance de la bactérie étudiée et ce sont : la nature du substrat carboné ainsi que sa concentration initiale, la composition du milieu en éléments nutritifs (par exemple la source azotée), l'apport d'oxygène, le pH, la température d'incubation,...

Comme cette étude rentre dans l'objectif de la récupération d'un biopolymère à haute valeur ajoutée, l'utilisation de la voie biologique nécessite, dans une 1^{ère} étape, l'identification du milieu de culture adéquat à la bactérie inoculée. Pour cette raison, deux milieux ont été choisis dans ce travail :

- ✓ le 1^{er} est un milieu synthétique dont la composition est connue et simple,
- ✓ le 2^{ème} est un milieu naturel et complexe riche en sucres réducteurs et en oligo-éléments (Arbia, 2007).

V. 2.1 Etude de la fermentation lactique dans un milieu synthétique (à base de glucose):

Dans une 1^{ère} étape, nous avons utilisé un milieu contenant seulement du glucose. Le choix de ce substrat revient à deux raisons : sa disponibilité et sa facilité d'assimilation par presque tous les microorganismes (Leclerc et al., 1995). Des travaux de thèse de Arbia (2007) ont montré que la déminéralisation (DM) et la déprotéinisation (DP) de la carapace de *Parapenaeus longirostris* pouvaient se réaliser, dans des conditions totalement distinctes de concentrations en source carbonée ainsi de la température d'incubation. Avec une faible concentration en glucose, un taux maximal de DP est obtenu (76% avec une concentration de 80g/l à une température d'incubation de 30°C) et avec une concentration élevée en glucose, un taux maximal de DM est obtenu (60% avec une concentration de 300g/l à une température d'incubation de 35°C). Cependant, l'étude des autres paramètres physico-chimiques pourrait, éventuellement, améliorer le traitement biologique pour la récupération de la chitine de la carapace de *Parapenaeus longirostris*. Il a été, donc, envisagé d'améliorer, la déminéralisation et la déprotéinisation du matériau.

Un grand nombre de tests de fermentation ont été réalisés. A chacune des deux concentrations (80 et 300g/l), différentes températures d'incubation 30, 35 et 42°C ont été étudiées. Pour chaque cas, les taux de déminéralisation (DM) et de déprotéinisation (DP) ont été calculés puis comparés.

Dans la 1^{ère} démarche (pour une meilleure DM), nous avons étudié l'influence de la température d'incubation sur le taux de DM avec la concentration en glucose de 300g/l et pH libre (8-9). Deux valeurs de températures ont été prises 35°C et 42°C puisqu'elles appartiennent à l'intervalle de température optimale de croissance du *Lactobacillus helveticus*.

L'évolution du pH dans le temps (Fig 7) a montré que le pH diminue jusqu'à atteindre une valeur stable au bout de 140h de fermentation. La plus faible valeur obtenue est de l'ordre de 4,7 à 35°C accompagné d'un taux de DM de 61%, et elle est de l'ordre de 5 à 42°C accompagné d'un taux de DM de 26%. En effet, la déminéralisation de la carapace à température de 35°C est semblable à celle trouvée par **Arbia (2007)** mais elle reste, cependant, insuffisante.

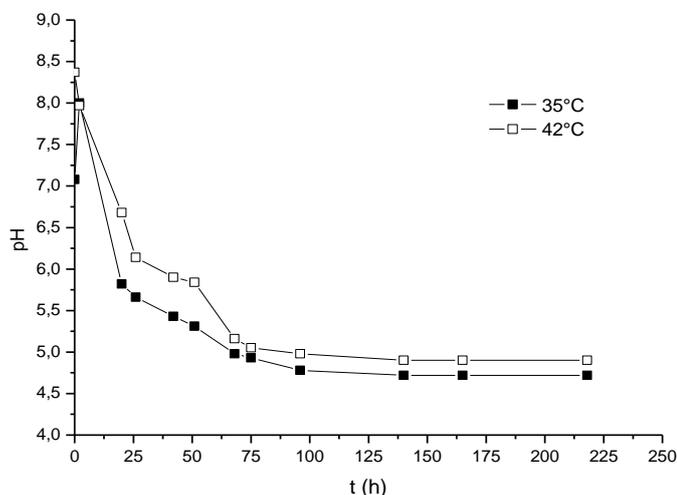


Fig. 7: Evolution du pH en fonction du temps à différentes températures 35°C et 42°C (300g/l en glucose, volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par un grand nombre de chercheurs qui ont utilisé la bactérie lactique pure pour l'extraction de la chitine : **Zakaria et al. (1998)** ont abouti à un taux de 61% avec *Lactobacillus paracasei* et **Adour et al. (2008)** ont obtenu un taux de 60% avec *Lactobacillus helveticus* à température d'incubation de 35°C. Par contre,

Aytekin et al. (2007) ont révélé un taux de 78% avec *Lactobacillus lactis* et **Kyung et al. (2007)** ont montré que le taux de DM est plus élevé et de 92% en utilisant la bactérie « *Pseudomonas aeruginosa* ».

D'autres travaux ont montré que ces taux pouvaient être améliorés soit par couplage de la méthode biologique et de la méthode chimique (**Rao et al., 2000**) soit par l'utilisation de deux bactéries, l'une lactique et l'autre protéolytique (**Healy et al., 2003 ; Jung et al., 2005**).

Il est remarqué, qu'aux cours des essais réalisés avec *Lactobacillus helveticus*, il se produit, dans nos conditions expérimentales, une limitation du taux de DM (maximal de 60%) alors que le substrat carboné n'est pas totalement épuisé pour les deux températures (Figs 8 et 9).

Les courbes donnant les cinétiques de production d'acide lactique et de la croissance bactérienne (Figs 10 et 11), montrent qu'à 35°C, la source de carbone (le glucose) est destinée à partir de 25h à la production de l'acide lactique accompagnée de l'absence de la phase stationnaire. Ce résultat est confirmé par les travaux de **Amrane et al. (1998)** qui ont étudié le rendement de la production de l'acide lactique pendant les différentes phases de croissance. Cette étude a montré que la grande quantité d'acide est produite lors de la phase de ralentissement.

Au contraire, à température plus élevée (42°C), la production de l'acide s'arrête après 100h de fermentation (Fig 10), alors que la bactérie continue à consommer le glucose comme source d'énergie pour le maintien cellulaire, ce qui a permis l'apparition d'une longue phase stationnaire (Fig 9).

Dans nos conditions de culture à base de glucose, il est constaté que la température optimale qui conduit à une meilleure déminéralisation est de 35°C.

Dans les deux cas de températures, on constate que seulement 50% de glucose est métabolisable par la bactérie lactique. A la fin de la fermentation, il reste environ 150g/l de glucose alors qu'il y a arrêt de la croissance cellulaire. L'explication la plus probable qu'on puisse donner est l'effet de l'inhibition de la croissance par le produit final et l'accumulation de métabolites toxiques (**Leclerc et al., 1995**). Ce résultat est confirmé par **Amrane et al. (1998)**.

Il est signalé que les courbes donnant l'évolution du pH dans le temps (Figs 8 et 9) montrent qu'il y a une persistance et une stabilité de l'acidité du milieu de fermentation. Ceci se traduirait par le métabolisme du glucose par voie fermentaire (**Mohammedi, 1993**) à cause

de l'anoxie créée par la forte concentration en glucose, de la libération du gaz carbonique dans le milieu lors de la solubilisation du carbonate de calcium par l'acide lactique produit par *Lactobacillus helveticus*.

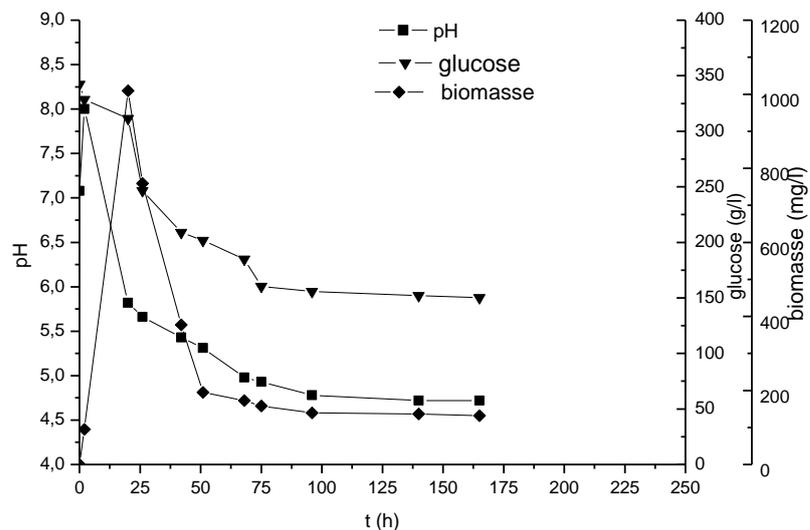


Fig. 8: Evolution du pH, de la concentration en glucose, de la biomasse en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200r.p.m)

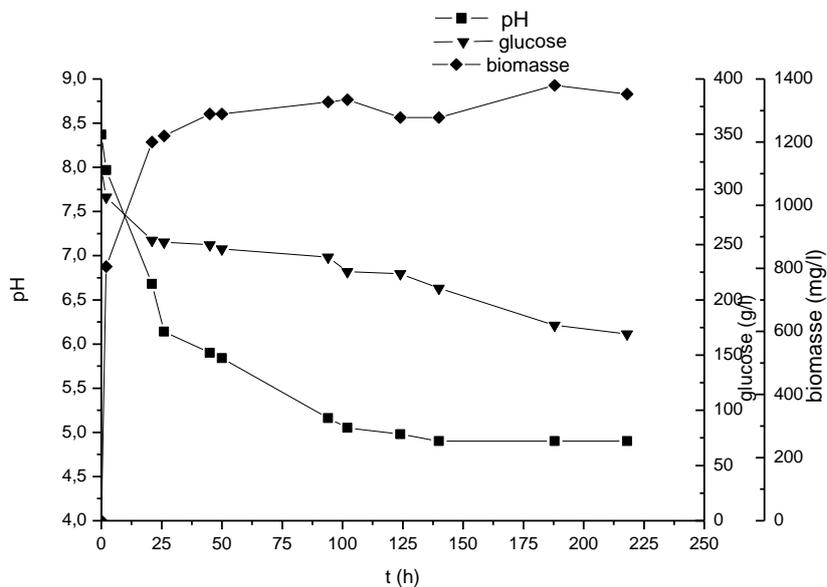


Fig. 9: Evolution du pH, de la biomasse et de la concentration en glucose en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 42°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

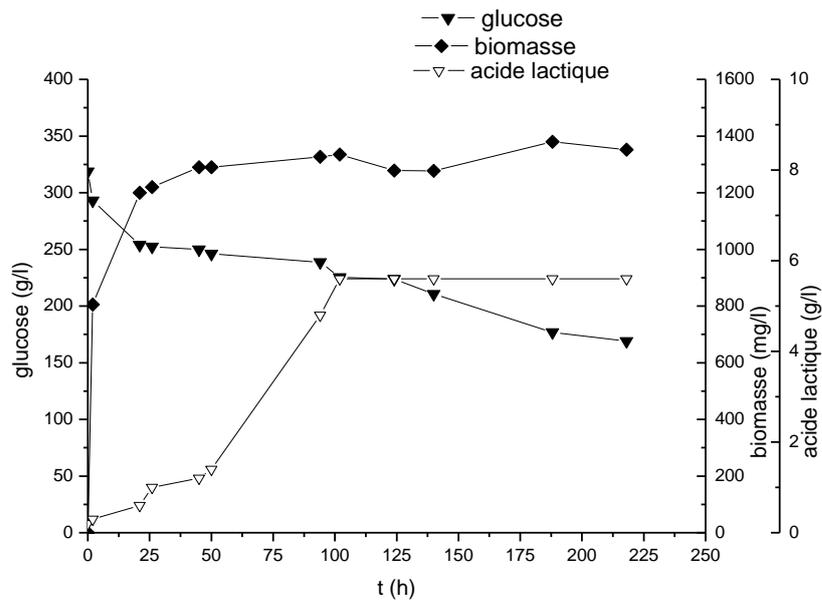


Fig. 10: Evolution de la concentration en glucose, de la biomasse et de la concentration en acide lactique en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 42°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

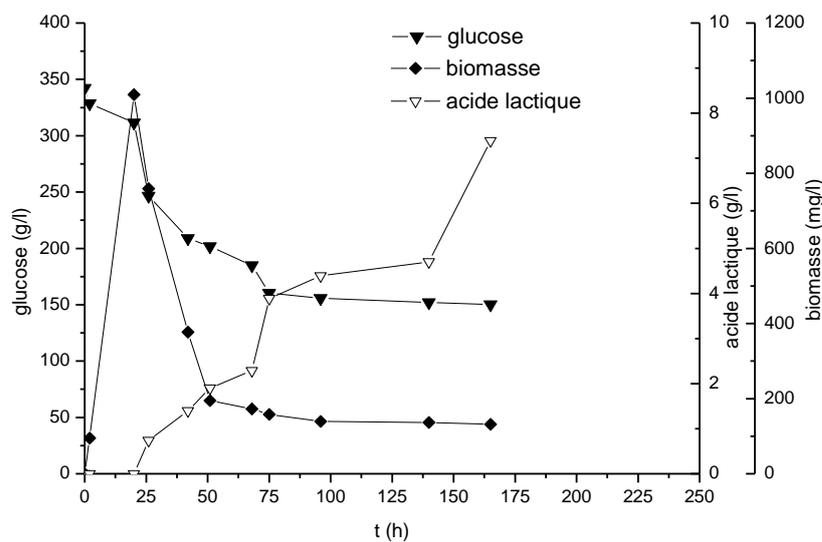


Fig. 11: Evolution de la concentration en glucose, de la biomasse et de la concentration en acide lactique en fonction du temps avec 300g/l en glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

Dans la 2^{ème} démarche (pour une meilleure DP), nous avons étudié l'influence de la température d'incubation sur le taux de DP avec la concentration en glucose de 80g/l et pH libre (8-9). Deux valeurs de température ont été choisies 30°C et 35°C.

On remarque qu'aux deux températures d'incubation 30°C (Fig 12) et 35°C (Fig 13), le pH diminue jusqu'à atteindre la valeur 6 au bout de 24h de culture puis remonte plus rapidement pour atteindre une valeur neutre située à 6,5 (Figs 12 et 13).

L'insuffisance de l'acidification du milieu (comparativement avec 300g/l) est responsable de l'absence de la déminéralisation.

La remontée rapide du pH (Fig 12) montre l'existence du métabolisme oxydatif de la bactérie. Le calcul du taux de DP, à la fin de la fermentation, a montré que la valeur du pH aux alentours de 6 est optimale à l'activité des enzymes protéolytiques ce qui aboutit à une déprotéinisation de 70% à la température de 30°C par contre la déprotéinisation n'est que 9% à la température de 35°C. Ceci est du à la température et au pH qui sont favorables à l'activité des protéases.

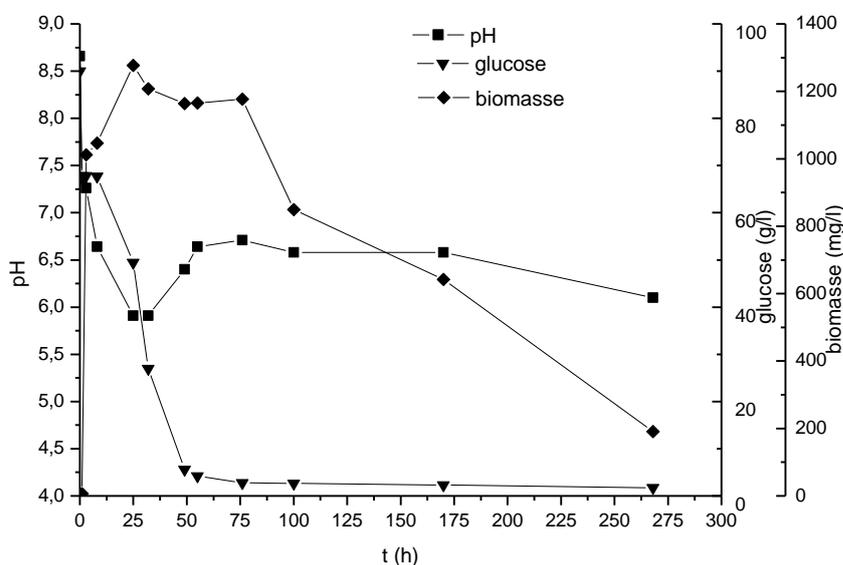


Fig. 12 : Evolution du pH, de la concentration en glucose et de la biomasse avec 80g/l glucose à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200r.p.m.)

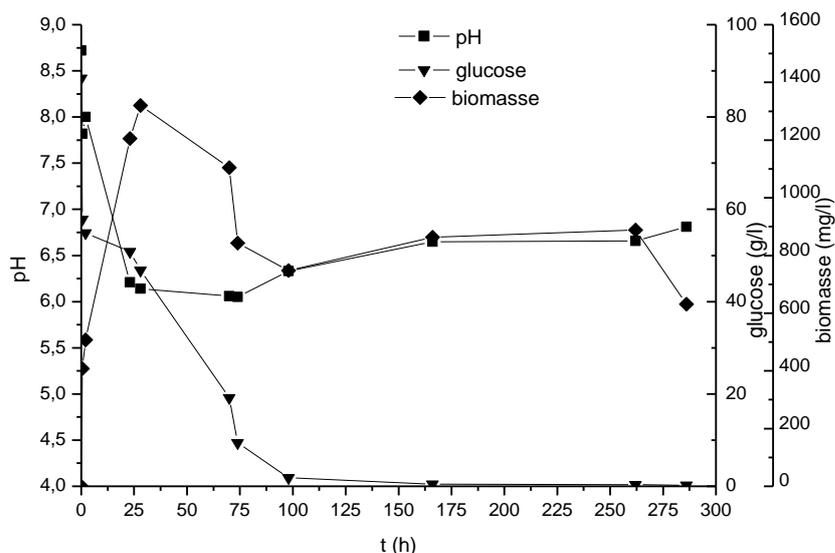


Fig. 13 : Evolution du pH, de la concentration en glucose et de la biomasse avec 80g/l glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum 10%, agitation 200 r.p.m.)

Dans nos conditions de fermentation, il est constaté que la température optimale qui conduit à une meilleure déprotéinisation, inférieure à celle de la déminéralisation, est de 30°C. L'élimination maximale des protéines de la carapace de notre crustacé nécessite un pH légèrement acide favorable à l'activité des protéases, une concentration faible en glucose (optimale de 80g/l) est recommandable pour la déprotéinisation biologique de la carapace.

Nos résultats obtenus sont presque en accord avec ceux de **Arbia (2007)**. En effet, le taux de DP est de 76% avec 80g/l de glucose à 30°C sur la même espèce de crevette composée de 27 % de protéines contre 12% dans notre matériau. En outre, **Aytekin et al. (2007)** ont abouti à un taux de 63 % avec la bactérie marine *Teredinobacter* et un taux de 69 % avec le champignon *Rhizopus oryzae*.

Dans le milieu de fermentation contenant du glucose et à pH libre, la déprotéinisation de la carapace des crevettes, nécessite des conditions pH totalement différentes de celles de la déminéralisation : faible concentration en glucose (80g/l), température optimale de 30°C pour l'extraction des protéines et forte concentration en glucose (300g/l), température de 35°C pour la solubilisation des minéraux.

V. 2.2. Effet de l'extrait de levure et de la micro aération sur le taux de DM :

Dans la suite de notre recherche, il a été envisagé d'enrichir le milieu nutritif par ajout d'extrait de levure et/ou de l'apport d'une microaération (**Ghaly and EI-Taweel, 1995**).

Dans le but d'augmenter la production biologique de l'acide lactique et par conséquent d'améliorer la déminéralisation biologique de notre carapace, il a été choisi l'extrait de levure car riche en cofacteurs de croissance à savoir: les acides aminés, les lipides, les nucléotides et les vitamines (**Ghali et al., 2004**), ainsi qu'une micro aération pour stimuler la croissance des cellules. Nous avons, pour cela, réalisé trois séries expérimentales :

- 1^{ère} série (seule addition d'extrait de levure): 3 tests de fermentation en batch à des concentrations en extrait de levure de 4, 5 et 10g/l avec 300g/l en glucose, pH libre et température 35°C;
- 2^{ème} série (apport seul d'une micro aération): un seul test de fermentation avec micro aération à 0,044 V/V/M pendant les 10 premières minutes de culture avec 300 g/l en glucose, sans addition d'extrait de levure et température 35°C ;
- 3^{ème} série : un seul test de fermentation avec couplage d'une micro aération de 0,044 V/V/M et de l'ajout de l'extrait de levure à concentration choisie lors de la 1^{ère} série.

Dans la 1^{ère} série, pour les 3 teneurs en extrait de levure, le pH du milieu atteint une valeur située entre 5 et 5,27 au bout d'environ 140h de fermentation (Fig 14). Il est donc important de remarquer que l'acidification reste plus importante en absence de l'extrait de levure (pH_{min} 4,7 au bout de 140h de fermentation) (Fig 8).

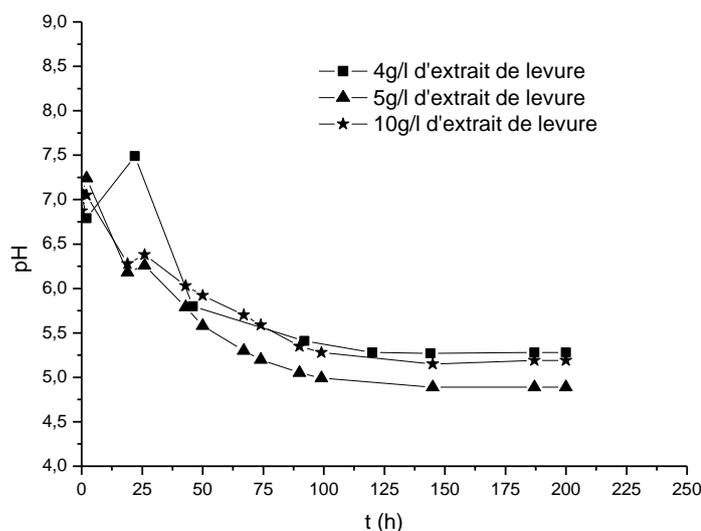


Fig.14 : Evolution du pH en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levure 4, 5 et 10 g/l avec 300g/l glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, carapace 10g, inoculum 10%, agitation 200 r.p.m.)

L'addition de la source d'azote dans le milieu de fermentation conduit à une déminéralisation de l'ordre de 46,3 ; 47,3 et 35,7% pour des concentrations en extrait de levure de 4, 5 et 10g/l, respectivement. L'enrichissement de notre milieu de fermentation par l'extrait de levure n'améliore pas la déminéralisation de notre carapace. En effet, le glucose se trouve métaboliser en grande partie pour la croissance bactérienne (Fig 17). La lyse des cellules est plus lente et le substrat carboné est totalement épuisé en fin de fermentation (Fig 15) en présence de l'extrait de levure (4 et 10g/l) qu'à son absence. Cependant, avec 5g/l d'extrait de levure, le glucose n'est pas entièrement consommé (glucose résiduel 250g/l) contrairement aux teneurs de 4 et 10g/l (Fig 15). L'épuisement total en glucose est plus rapide lorsque la teneur en extrait de levure est faible. Avec 4g/l, il est atteint au bout de 140h et avec 10g/l il est atteint après 190h de fermentation (Fig 15). Dans ces cas, le glucose intervient en grande partie dans la croissance cellulaire qui est traduite par une production de biomasse plus importante et par conséquent d'une phase de déclin plus lente (Fig 17).

La production de l'acide lactique est plus élevée avec 5g/l d'extrait de levure (Fig 16). Ce qui explique le taux de DM de 47,3% contrairement aux autres concentrations en extrait de levure. L'ajout de l'extrait de levure dans nos conditions de fermentation (milieu non renouvelé) n'est pas conseillé pour la récupération de la chitine, la déminéralisation de notre carapace n'a pas été améliorée.

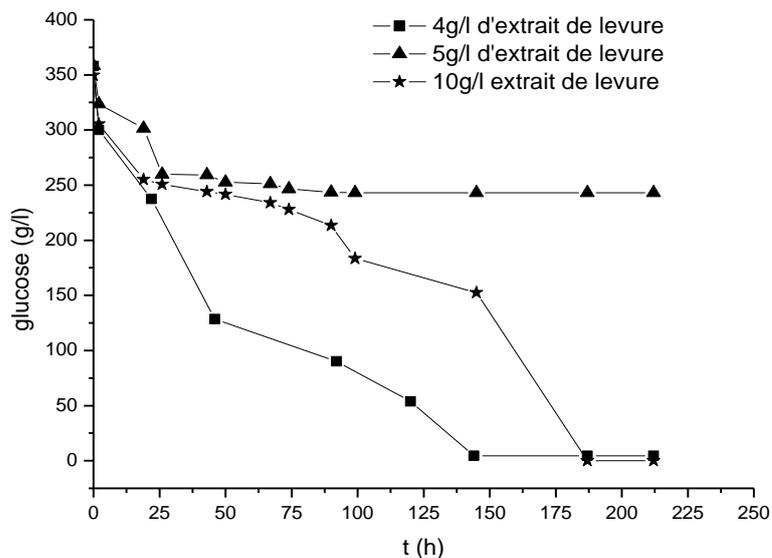


Fig.15 : Evolution de la concentration en glucose en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levure 4, 5 et 10g/l avec 300g/l en glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

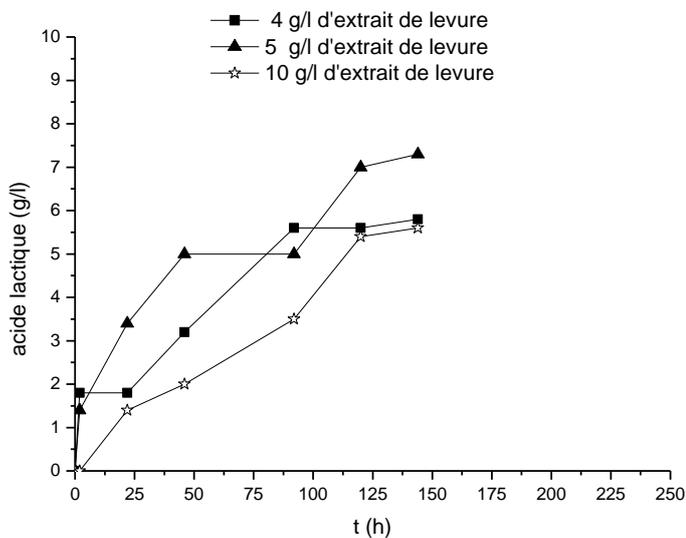


Fig.16 : Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levure 4, 5 et 10g/l avec 300g/l en glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

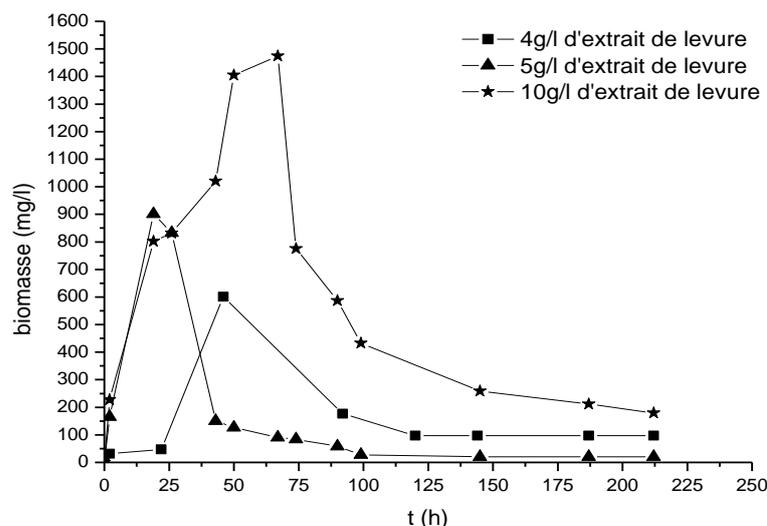


Fig. 17 : Evolution de la concentration en biomasse en fonction du temps à différentes concentrations d'extrait de levure 4, 5 et 10g/l avec 300g/l en glucose à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10 g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

La 2^{ème} série a été envisagée pour deux raisons : la 1^{ère} selon **Ghali et al. (2004)**, l'oxygène est impliqué dans la synthèse des lipides, l'acide oléique et l'ergostérol qui sont des composants essentiels de la membrane cellulaire. La 2^{ème} raison, l'oxygène joue le rôle d'un stimulateur de la croissance dans des conditions de fermentation anaérobique.

Les effets de la micro aération seule (2^{ème} série) puis combinée à l'extrait de levure à faible concentration (2g/l) (3^{ème} série) ont été testés dans notre procédé en vue d'améliorer la déminéralisation de la carapace.

On remarque que l'évolution du pH est presque identique dans les deux conditions (2^{ème} série et 3^{ème} série) (Fig 18). La plus faible valeur de pH obtenue est de 5,23 au bout de 80h. La micro aération semble intervenir pour améliorer la croissance bactérienne.

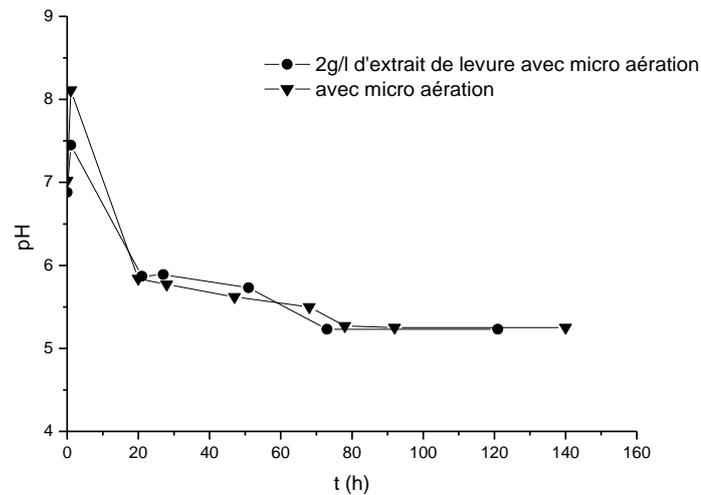


Fig.18: Evolution du pH en fonction du temps avec micro aération combinée avec 2g/l d'extrait de levure et avec micro aération seule (300g/l glucose, température d'incubation 35°C, volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10%d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

L'ajout de l'extrait de levure à faible concentration (2g/l) entraîne l'épuisement du glucose (Fig 19). Ce résultat a aussi été constaté lors des essais réalisés dans la 1^{ère} série expliquant l'utilisation du glucose essentiellement pour la croissance bactérienne. Il est donc évident que l'absence de l'extrait de levure (2^{ème} série) conduit à la consommation partielle du glucose (Fig 20). Le calcul des taux de déminéralisation, avec micro aération, conduit à 48,2% en présence de 2g/l d'extrait de levure et à 50,5% sans extrait de levure.

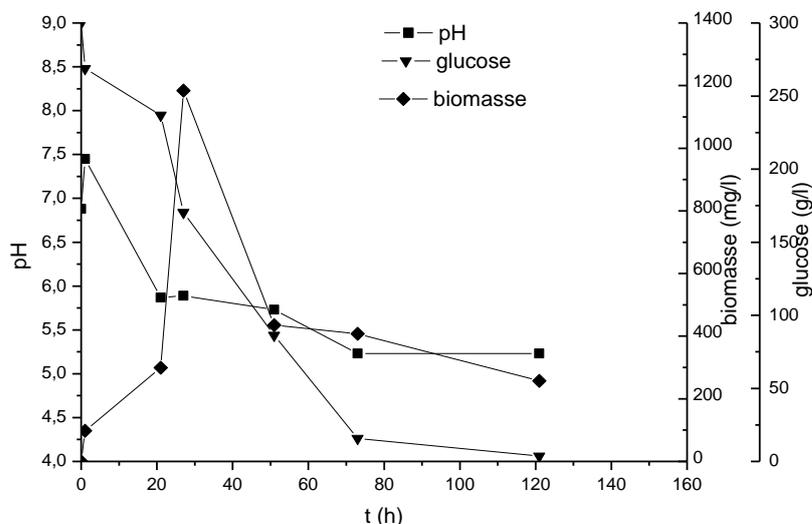


Fig.19 : Evolution du pH, de la concentration en biomasse et de la concentration en glucose en fonction du temps de fermentation avec 2g/l d'extrait de levure et micro aération 0,044V/V/M (300g/l glucose, température d'incubation 35°C, volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

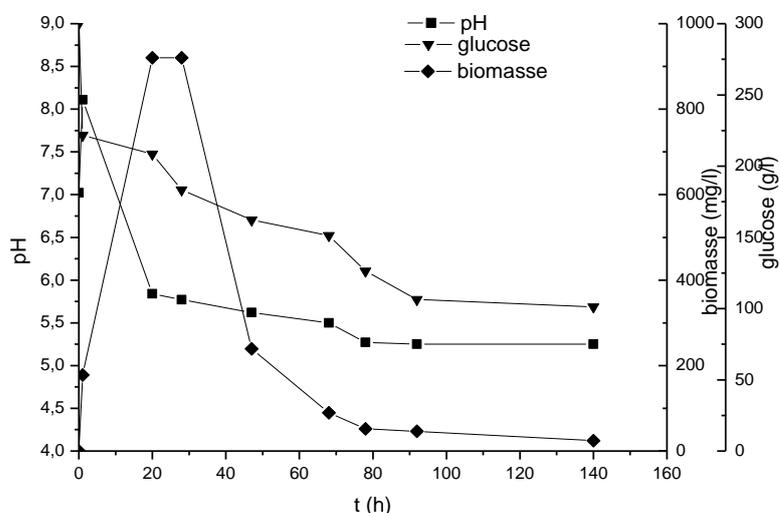


Fig.20 : Evolution du pH, de la concentration en biomasse et de la concentration en glucose en fonction du temps avec barbotage initial (300g/l en glucose, température d'incubation 35°C, volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

Le dosage de l'acidité du milieu de fermentation montre que la production d'acide lactique est plus importante en présence de la microaération seule (Fig 21). La présence de l'extrait de levure (Fig 19), fait augmenter le nombre de cellules bactériennes en réduisant la production du métabolite acide et par conséquent la déminéralisation. L'ajout d'une

microaération dans notre procédé permet d'améliorer la production de la biomasse en augmentant le temps de la phase exponentielle et de la phase stationnaire.

Les travaux de **Tango et al. (1999)** ont montré que l'introduction de la microaération dans la fermentation de *Lactobacillus helveticus* permet de réduire la phase de latence, augmenter le taux de croissance et améliorer la production de l'acide lactique. Contrairement dans notre cas, la production de l'acide n'est pas améliorée (fig 21).

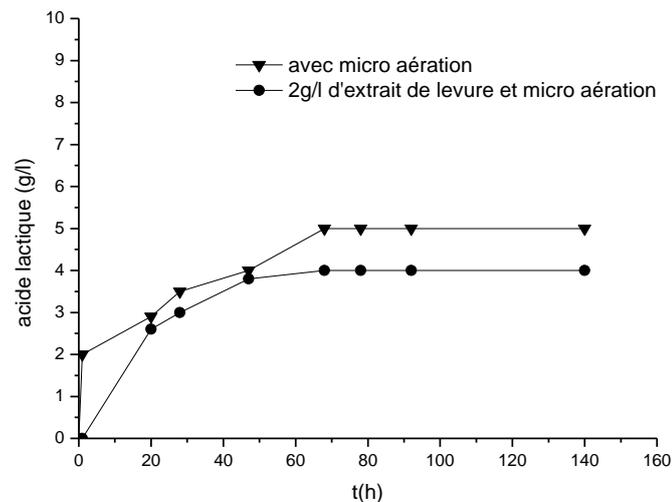


Fig. 21 : Evolution de la concentration en acide lactique avec micro aération et micro aération combinée avec 2g/l d'extrait de levure (300g/l glucose, température d'incubation 35°C volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10%d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

L'ajout de l'extrait de levure et un apport d'une micro aération, comme c'est cité en bibliographie, n'améliorent pas la production de l'acide lactique et par conséquent le rendement de déminéralisation. Cette limitation est peut être due au milieu discontinu utilisé pour la fermentation ce qui peut provoquer l'accumulation de métabolites toxiques et de produit final qui inhibent la croissance bactérienne.

V. 2.3. Etude de la fermentation lactique sur milieu complexe (à base du jus de dattes) :

Dans une 2^{ème} étape, nous avons travaillé avec un milieu naturel carbohydraté: «jus de dattes». Ce produit alimentaire riche en sucres réducteurs est transformé en jus qui est utilisé comme milieu de fermentation du *Lactobacillus helveticus* en vue de l'extraction de la chitine.

Tableau 2 : Composition du jus de dattes Deglet-Nour (Arbia, 2007)

pH	4-5,6
Sucres réducteurs	207,76 g/l
Saccharose	16,93% à 21,9°C
<u>Les minéraux (mg/l) :</u>	
Calcium (Ca ²⁺)	75,14
Potassium (K ⁺)	1580
Sodium (Na ⁺)	25
Zinc (Zn)	1
Fer (Fe)	0,2
Cuivre (Cu)	0,29
Manganèse (Mn)	-
Nickel (Ni)	<0,05
Chrome (Cr)	<0,05
Cadmium (Cd)	<0,01
Plomb (Pb)	<0,01
Acidité titrable (%)	7,6

Le choix d'un milieu naturel et complexe a été fait pour essayer d'améliorer, simultanément, les taux de déminéralisation et de déprotéinisation de la carapace de crevettes obtenus sur milieu synthétique à base de glucose. Pour ces raisons, deux gammes de concentrations en sucres réducteurs et à températures d'incubation différentes ont été choisies: 40-250g/l à 30°C et 10-100g/l à 35°C.

La 1^{ère} série d'expériences a été réalisée sur jus de dattes à température 30°C et à des concentrations en sucres réducteurs allant de 40 à 250g/l.

Le premier point important observé lors du suivi du pH du milieu pour toutes les teneurs en sucres sauf pour 40g/l, représente une différence totale de l'allure de la courbe de pH en fonction du temps (Fig 22) avec celle obtenue dans le milieu à base du glucose à 35°C (Figs 8 et 11). En effet, en présence du sucre simple, le pH diminue sans cesse jusqu'à atteindre un pH minimum et stable (4,7). Tandis que dans le jus de dattes, le pH diminue pour se ralentir et se stabiliser pendant quelques heures puis continue à diminuer jusqu'à atteindre un pH minimal plus au moins stable en fonction de la concentration en sucres réducteurs.

En effet, à 30°C l'évolution du pH en fonction du temps (Fig 22) montre qu'il y a une meilleure acidification (pH minimal situé aux alentours de 4,7- 4,8) dans le milieu de fermentation lorsque la concentration en sucres réducteurs est comprise entre 80 et 200g/l. En dehors de cet intervalle, il ne se produit pas une bonne acidification à cause de l'insuffisance en substrat carboné dans notre milieu (40g/l) et de l'excès de ce dernier (250g/l), respectivement.

Il est, en plus, constaté que le pH_{\min} est semblable à celui obtenu dans le milieu à base de glucose et à température de 35°C mais il est atteint plus rapidement (au bout de 100h). Le dosage de l'acidité (Fig 23) montre bien une production plus élevée d'acide lactique dans cet intervalle de concentrations (80-200g/l) contrairement avec les deux concentrations 40 et 250g/l en sucres.

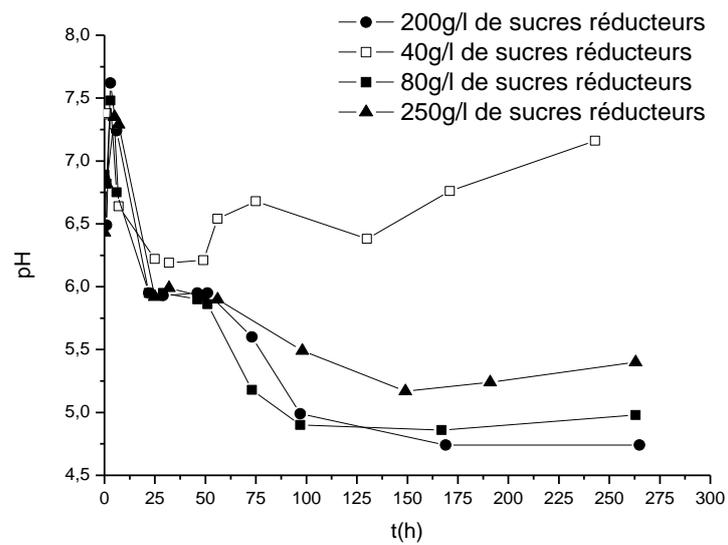


Fig. 22 : Evolution du pH en fonction du temps de fermentation à différentes concentrations en sucres réducteurs et à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

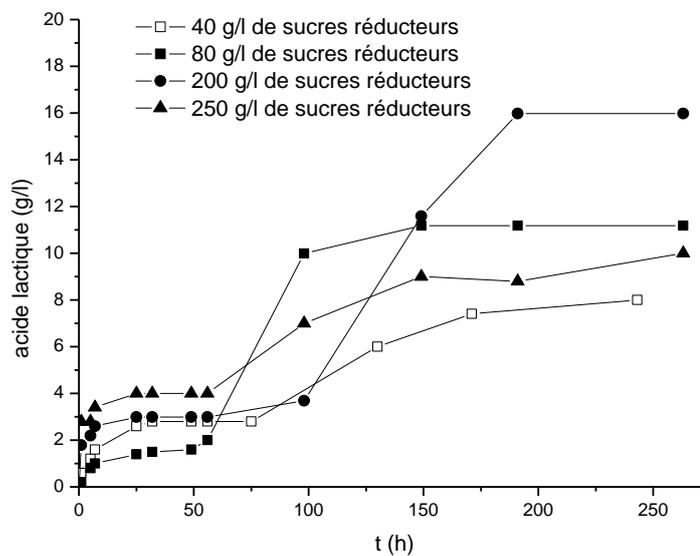


Fig. 23 : Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps à différentes concentrations en sucres réducteurs et à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

Les résultats des taux de déminéralisation et de déprotéinisation (Fig 24) montrent qu'à 30 °C:

- 1- il y a effectivement déprotéinisation de la carapace à n'importe quelle teneur en sucres réducteurs (40-250g/l).
- 2- et à faible concentration en sucres (40g/l), il y a absence de déminéralisation (Fig 24). Ce résultat est bien dû à la faible acidification du milieu (Fig 22) comme il a été constaté dans le milieu à base de glucose où la solubilisation des minéraux de la carapace n'a lieu qu'à partir de 100g/l en substrat carboné (Arbia, 2007) et à température de 30°C. La stabilisation du pH vers la valeur supérieure à 6,5 a permis une déprotéinisation partielle de la carapace (Fig 24).
- 3- et à concentration élevée en sucres (250g/l), la stabilisation du pH autour de la valeur 6 pendant quelques heures a permis une DP de la carapace (Fig 24). La diminution, par la suite, lente du pH (Fig 22) accompagnée d'une production moins importante d'acide (Fig 23) a conduit à une faible DM (Fig 24) contrairement avec 80 et 200g/l en sucres.
- 4- et à concentrations de 80 et 200g/l en sucres, il y a simultanément déminéralisation et déprotéinisation de la carapace dans le jus de dattes et que des taux appréciables sont obtenus. Contrairement au milieu à base de glucose, où la déminéralisation et la déprotéinisation se font séparément (semblable au traitement chimique): la première exige une forte teneur en glucose (300g/l) et la deuxième nécessite une faible teneur en ce substrat simple (80g/l). La richesse de jus de dattes en oligoéléments en est probablement responsable.
- 5- à concentration de 200 g/l en sucres réducteurs, on obtient 61% de déminéralisation et 83% de déprotéinisation (Fig 24) mais à concentration de 80g/l, on obtient des taux plus faibles 26% de déminéralisation et 33%, de déprotéinisation (Fig 24).

On peut tirer de ces résultats quelques conclusions :

- 1- dans nos conditions de fermentation, le taux de déminéralisation de la carapace semble être limité à 60% avec les deux substrats carbonés utilisés (glucose à 35°C et jus de dattes à 30°C). Le dosage de l'acidité du milieu montre que bien qu'elle continue à augmenter vers la fin de la fermentation, cet acide organique ne semble pas adéquat à la solubilisation des minéraux restants dans la carapace.
- 2- la concentration de 200 g/l en sucres réducteurs représente la teneur optimale en substrat carboné pour une DP maximale (83%). La présence dans les dattes de cofacteurs nécessaires à l'activité des protéases en est responsable.

3- la température d'incubation de 30°C semble bien être favorable à la déprotéinisation de la carapace comme il a été démontré dans le milieu à base de glucose.

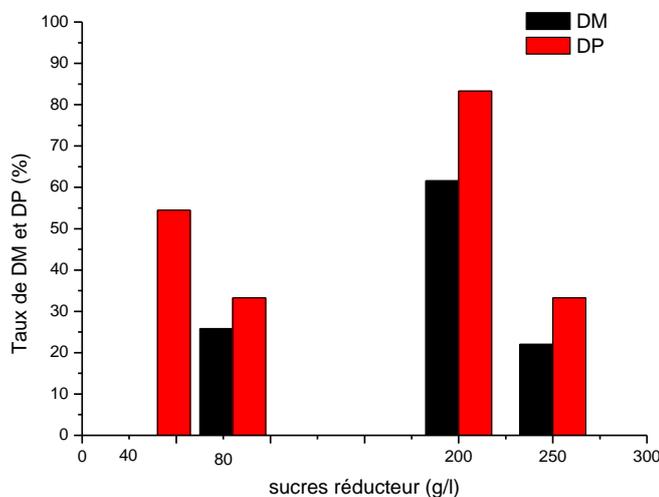


Fig. 24 : Taux de déminéralisation et de déprotéinisation en fonction de la concentration en sucres réducteurs et à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

A température de 30°C, la concentration en sucres réducteurs de 200g/l est optimale dans la récupération de la chitine par notre procédé. L'évolution du pH de fermentation ainsi que la cinétique de l'acidité en fonction du temps expliquent clairement ce résultat. Le pH (Fig 25) s'est stabilisé à une valeur autour de 6, favorable à l'activité des protéases libérées par la bactérie (DP 83%), pendant un temps de 51h. Au cours de cette phase, nous remarquons que la quantité d'acide lactique produite (Fig 25) est assez faible pour favoriser la DP puis elle commence à augmenter pendant la phase de ralentissement de la croissance (Fig 26). La grande quantité d'acide est produite lors de la phase de déclin conduisant à 61% de DM. En outre, l'allure de la courbe de croissance bactérienne montre que la bactérie passe par ses quatre phases caractéristiques de sa croissance (Fig 26) : phase de latence très courte, phase exponentielle (de durée 50h), phase stationnaire (courte) et phase de déclin (lente).

En conclusion, l'utilisation du jus de dattes comme milieu de fermentation à la concentration en sucres réducteurs de 200 g/l et à température d'incubation de 30°C, permet conjointement une déprotéinisation et une déminéralisation de la carapace à des taux appréciables 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 glucose

puisque'il conduit aux meilleurs résultats et surtout en une seule opération contrairement aux milieux synthétiques (DM de 61% avec 300g/l en glucose et à 35°C et DP de 70% avec 80g/l en glucose et à 30°C).

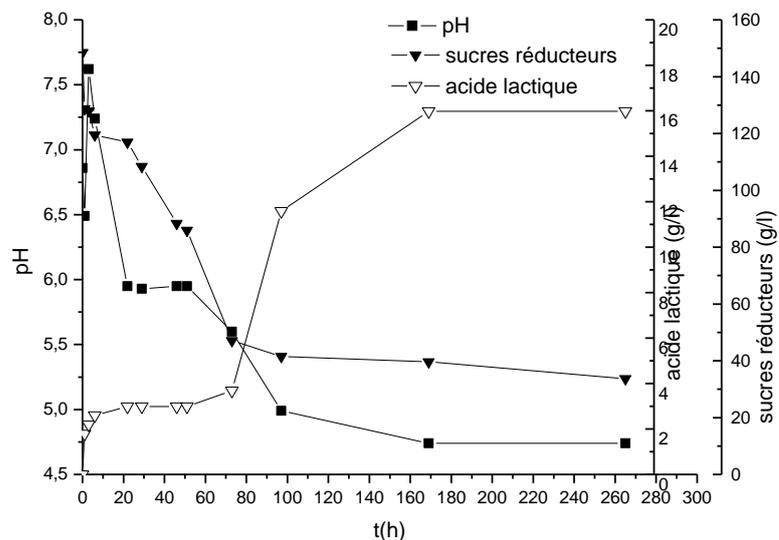


Fig. 25: Evolution du (a) pH, de la concentration en sucres réducteurs et de l'acide lactique en fonction du temps avec 200g/l en sucres réducteurs à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10 %d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

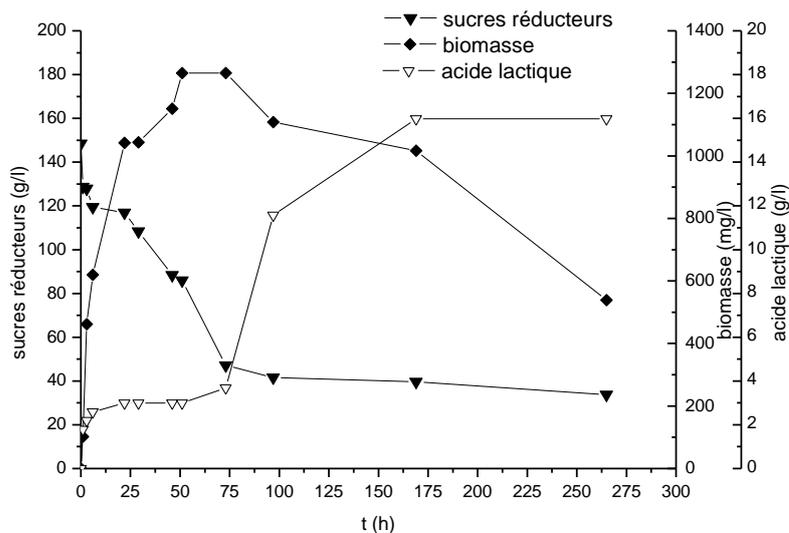


Fig. 26: Evolution de la concentration en sucres réducteurs, de la concentration en acide lactique et de la biomasse en fonction du temps avec 200g/l en sucres réducteurs à 30°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace 10, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

La 2^{ème} série d'expériences a été réalisée sur jus de dattes à température plus élevée (35°C) et à des concentrations en sucres réducteurs plus faibles allant de 10 à 100g/l.

Les courbes d'évolution de pH du milieu de fermentation à différentes concentrations en sucres réducteurs à 35°C (Fig 27) montrent que le pH diminue sans cesse et sans apparition du palier, comme observé avec 30°C, jusqu'à atteindre une valeur comprise entre 5 et 6 pour toutes les teneurs en sucres réducteurs sauf pour 10g/l. Le calcul des taux de déprotéinisation et de déminéralisation (Fig 28) a montré que :

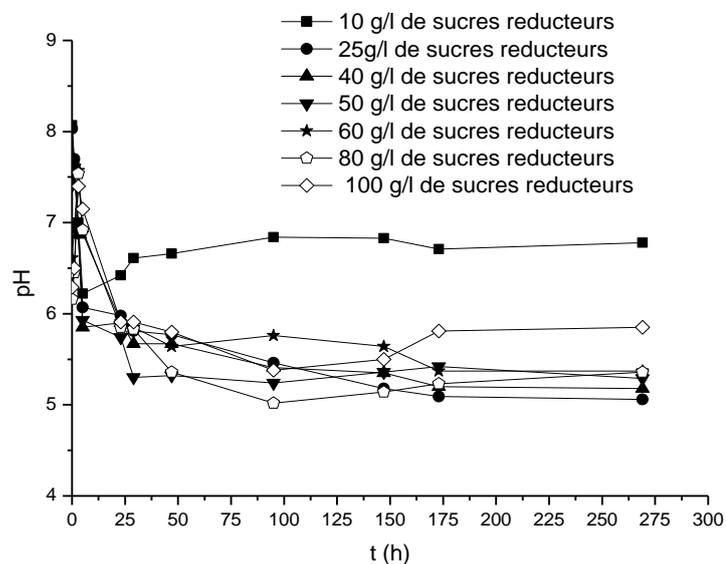


Fig. 27 : Evolution du pH en fonction du temps à différentes concentrations en sucres réducteurs (10-100g/l) et à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

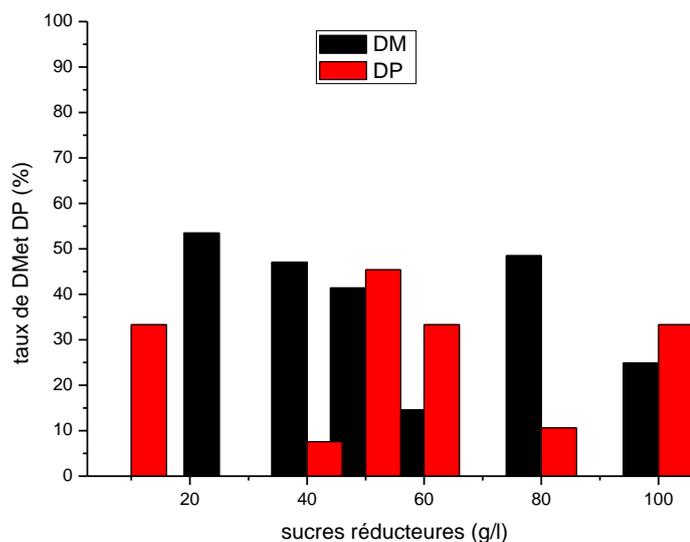


Fig.28 : Taux de déminéralisation et de déprotéinisation de la carapace en fonction de la concentration en sucres réducteurs et à température 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

Contrairement à 30°C, la déminéralisation réalisée à 35°C (Fig 24), a lieu pour toutes les faibles concentrations en sucres réducteurs (inférieures à 40g/l) sauf pour la faible teneur 10g/l : le taux le plus élevé est de 53% avec une concentration de 25g/l en sucres réducteurs. Ces résultats sont en accord avec la quantité d'acide produite (Fig 29). Cette série d'expériences montre clairement que la température optimale de DM est bien de 35°C, ce résultat est confirmé au cours de notre travail dans le milieu à base de glucose.

Des travaux précédents menés par **Arbia (2007)** sur milieu à base de glucose, ont montré qu'aux faibles concentrations en glucose (0-80g/l) et à température de 30°C, la DM est négligeable et ce n'est qu'à partir de 100g/l que la DM commence avec un taux cependant faible de 5%. La présence des oligoéléments semble jouer un rôle dans la stimulation des enzymes qui interviennent dans le métabolisme du glucose (la glycolyse) et sa conversion en acide lactique.

- Comme c'est le cas à température de 30°C, la déprotéinisation a lieu pour toutes les concentrations en sucres réducteurs et à 35°C sauf pour 25g/l : le taux le plus élevé est de 45% avec 50g/l en sucres réducteurs.

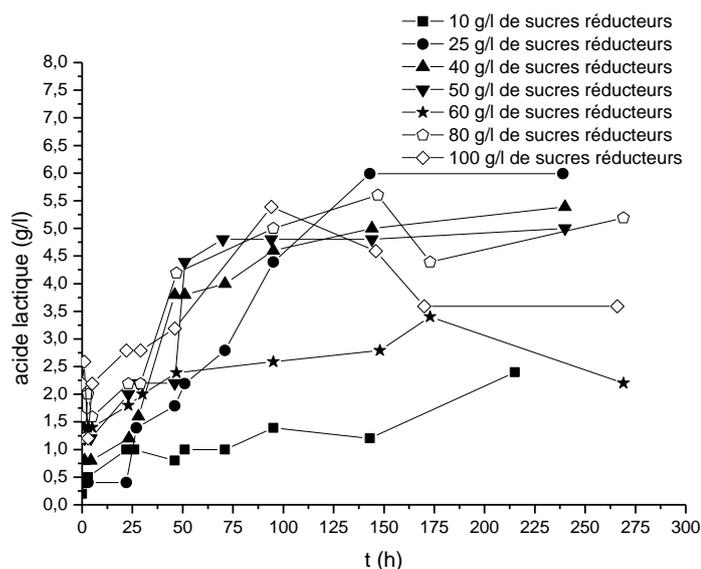


Fig.29 : Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps de fermentation à différentes concentrations en sucres réducteurs et à 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

La représentation du taux de DM en fonction de la concentration en acide produit montre une relation de type linéaire (Fig 30).

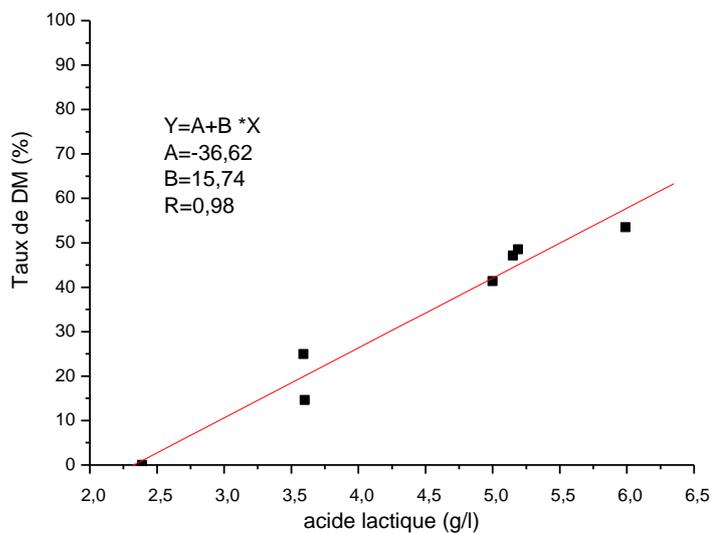


Fig.30 : Le pourcentage de DM en fonction de la concentration en acide lactique à température 35°C (volume de fermentation 100ml, 10g de carapace, 10% d'inoculum, agitation 200 r.p.m.)

On conclut que l'utilisation de jus de dattes à la place du glucose est envisageable pour la récupération de la chitine par notre procédé fonctionnant en batch. Contrairement au glucose, le jus de dattes permet de produire simultanément la déminéralisation et la déprotéinisation de la carapace des crevettes. La déprotéinisation est contrôlée par la température d'incubation ainsi par la présence d'oligoéléments dans le milieu nutritif alors que la déminéralisation est contrôlée par la concentration en sucres réducteurs. On préconisera donc de travailler avec une teneur en sucres réducteurs élevée (de 200g/l) dans le jus de dattes et à température de 30°C.

V.3. Analyses physico-chimiques et spectroscopiques de la carapace de crevettes :

Ces différentes analyses effectuées aussi bien sur la carapace brute (n'ayant pas subi de traitement biologique) que sur les carapaces fermentées ont permis d'apporter, grâce à des comparaisons, des explications sur l'efficacité du traitement biologique. Celles-ci portent :

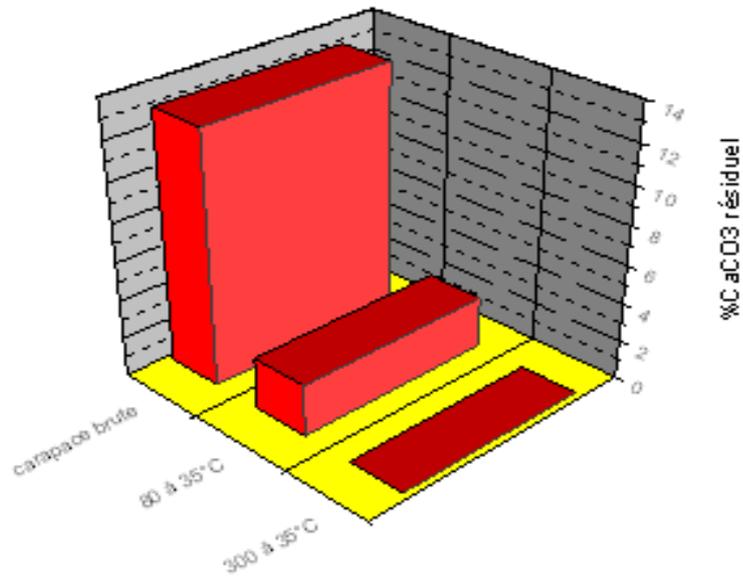
- A. sur le calcul du taux de carbonates de calcium dans les carapaces brutes et fermentées afin de justifier les résultats de calcul des taux de déminéralisation DM ;
- B. sur la détermination de la spectroscopie IR à transformée de Fourier afin d'identifier les différents pics d'absorption caractéristiques de la calcite ainsi que de la chitine dans les carapaces brute et fermentées ;
- C. sur l'analyse par diffraction des RX (XRD) des carapaces brute et fermentées pour déterminer la structure cristalline de la chitine et en déduire la pureté de ce sous-produit après fermentation de la carapace selon **Benosman et ses coll. (2006)** ;
- D. sur la réalisation de la spectrométrie de fluorescence X des carapaces fermentées afin d'identifier la composition élémentaire des différents minéraux pouvant être présents dans la carapace de crevettes après fermentation lactique.

A. Nous avons choisi dans notre travail de calculer le taux de carbonates de calcium dans la carapace fermentée puisque c'est le constituant majeur de la matière minérale (tableau 1). Il est important de noter que dans certains travaux, des chercheurs (**Entsar et al, 2008**) déterminent le taux de carbonate de calcium afin de calculer le taux de DM de la carapace. Dans notre cas, c'est le taux de cendres qui a été choisi pour vérifier l'élimination des minéraux de notre carapace. Trois échantillons ont été testés : carapace brute, carapace traitée avec le glucose (Fig 31a) et carapace traitée avec le jus de dattes (Fig 31b).

Avec les meilleures déminéralisations obtenues dans les deux milieux étudiés (60% au maximum), l'un à base de glucose à 300g/l et à 35°C (Fig 31a) et l'autre à base de jus de dattes à 200g/l en sucres réducteurs et à 30°C (Fig 31b), l'absence des carbonates de calcium dans les carapaces fermentées montrent que ce minéral est totalement solubilisé par l'acide lactique après conversion du substrat carboné présent en excès dans le milieu. En effet, avec de faible concentration en substrats carbonés, 80g/l en glucose et en sucres réducteurs, les taux de CaCO_3 atteints sont 2,68% à 35°C (Fig. 31a) et 0,4% à 30°C (Fig 31b), respectivement.

Le procédé biologique permet, donc, d'éliminer complètement le carbonate de calcium de la carapace des crevettes. La présence (non négligeable) d'autres minéraux insolubles par l'acide lactique, d'une part, réduit l'efficacité de la fermentation lactique en vue de la récupération de la chitine à l'état pur et d'autre part, justifie le faible taux de DM comparativement à la bibliographie.

a)



b)

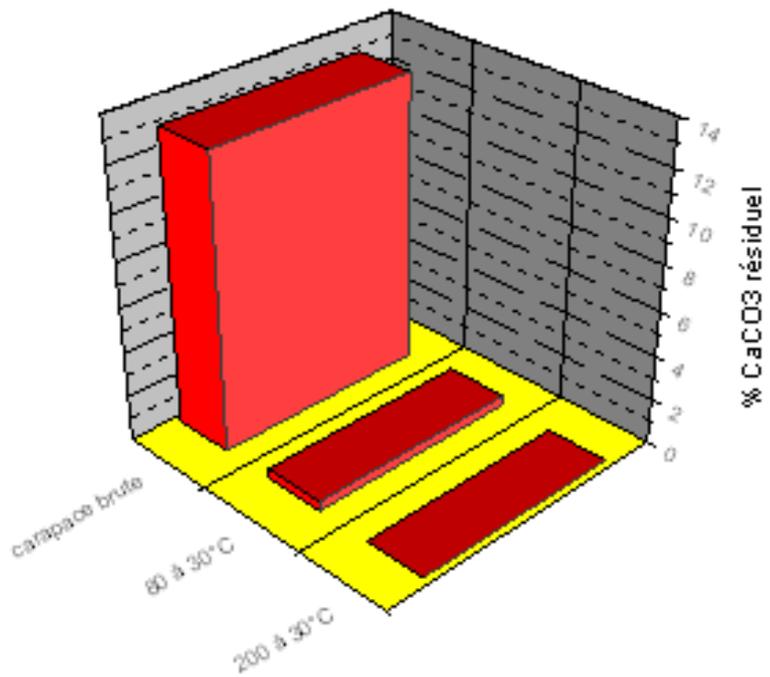


Fig. 31 : Taux résiduel du carbonate de calcium dans les carapaces brute et fermentées dans du glucose et jus de dattes dans des conditions de déminéralisation maximales

B. Les analyses spectroscopiques par IR à transformée de Fourier ont été effectuées sur quatre échantillons : chitine commerciale préparée par voie chimique (Sigma) (Fig 32), carapace brute (Fig 33) et des carapaces fermentées dans les deux milieux à base de glucose (300g/l en glucose à 35°C) (Fig 34) et le jus de dattes (sucres réducteurs 200g/l à 30°C) (Fig 35). Des comparaisons ont été faites par identification des pics caractéristiques des sels minéraux et d'autres liaisons chimiques.

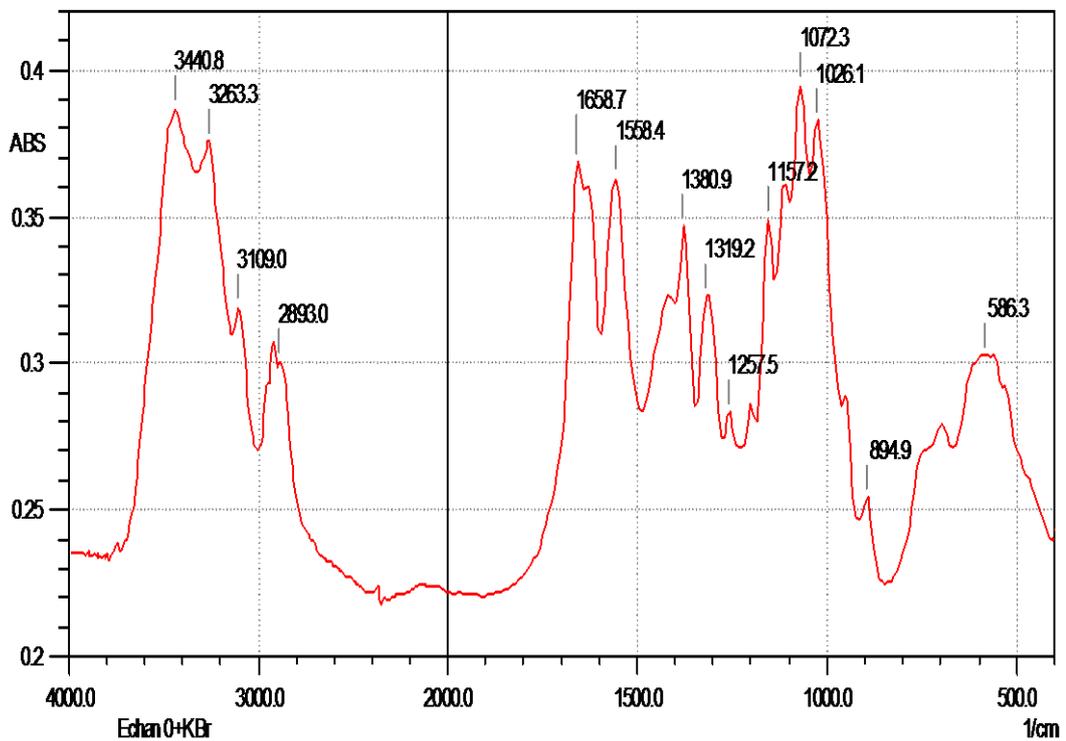


Fig. 32 : Spectre FTIR de la chitine pure (préparée par voie chimique) (Sigma)

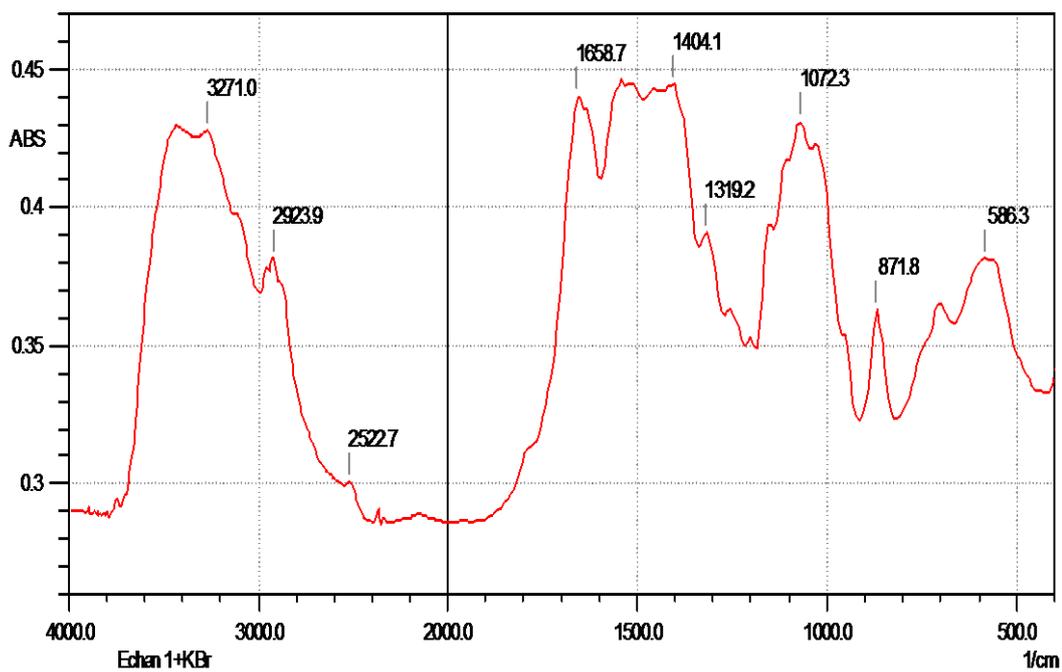


Fig. 33: Spectre FTIR de la carapace brute

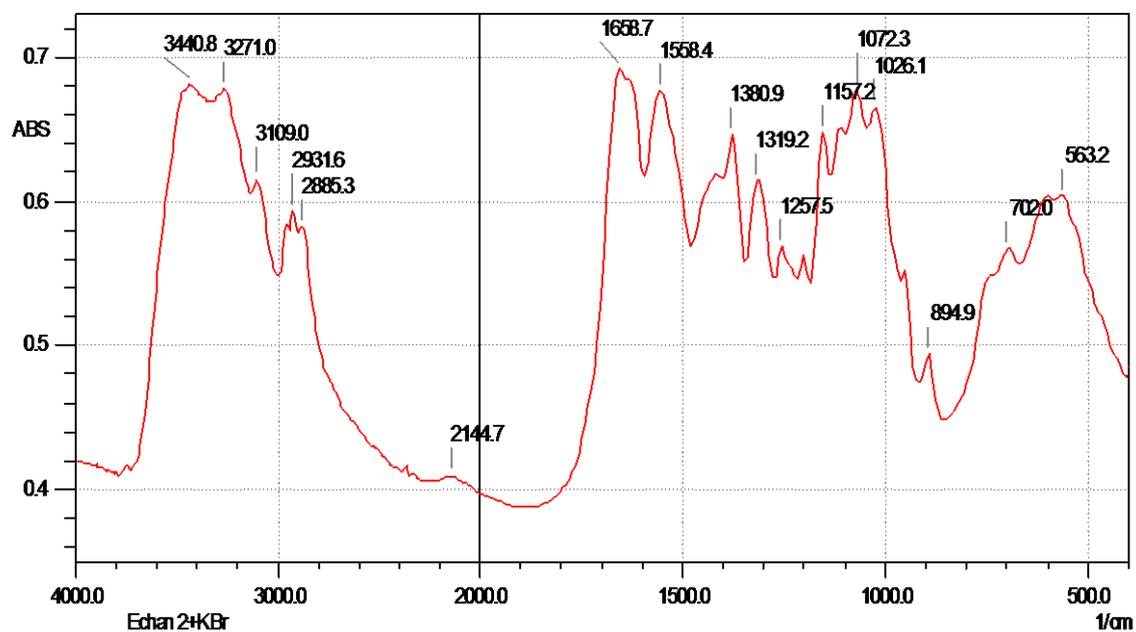


Fig. 34 : Spectre FTIR de la carapace fermentée (milieu à base de glucose 300g/l à température d'incubation de 35°C)

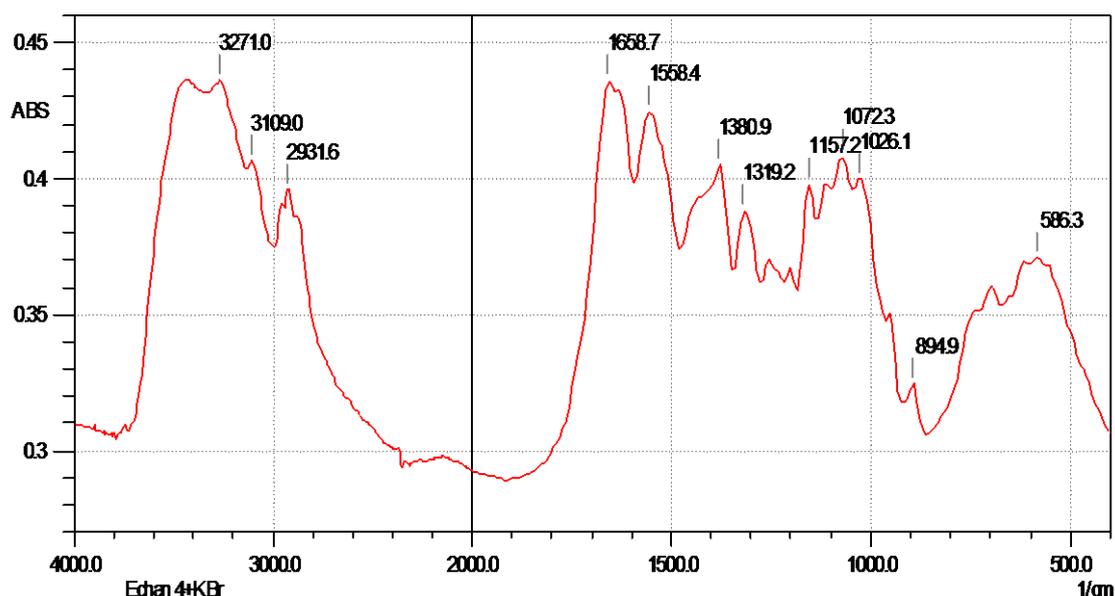


Fig. 35 : Spectre FTIR de la chitine fermentée (milieu à base de sucres réducteurs 200g/l à 30°C)

Le spectre de la carapace brute (Fig 33) montre la présence de la calcite avec des pics d'absorption situés à $871,8 \text{ cm}^{-1}$ et $1404,1 \text{ cm}^{-1}$. Ce qui justifie la présence des sels minéraux principalement CaCO_3 .

En comparant avec le spectre de la chitine pure (Fig. 32), nous remarquons l'absence de ces pics et la présence d'autres pics intenses d'absorption situés à $1157,2 \text{ cm}^{-1}$; $1380,9 \text{ cm}^{-1}$; $1558,4 \text{ cm}^{-1}$; 2893 cm^{-1} ; 3109 cm^{-1} et à $3263,3 \text{ cm}^{-1}$. Ces pics sont caractéristiques de la chitine de type α (Mikkelsen, 1997 ; Zhou *et al*, 2005 ; Lavall *et al*, 2007; Mario *et al*, 2007; Stawski *et al*, 2008).

Les spectres Infrarouge, de la carapace préparée avec 300g/l glucose à 35°C (Fig 34) et de la carapace préparée avec 200g/l en sucres réducteurs à 30°C (Fig 35), montrent la disparition des pics caractéristiques de la calcite et l'apparition de nouveaux pics correspondants à la chitine α .

En plus, il est remarqué suite à la détermination des différents pics d'absorption ainsi que les différentes bandes, caractéristiques des groupements chimiques, observées dans chacun des échantillons, une similarité presque totale entre la chitine pure commerciale et les carapaces fermentées (tableau 3).

Tableau 3 : Les pics caractéristiques des échantillons (chitine pure, carapace brute, carapaces fermentées)
(Mikkelsen, 1997 ; Zhou et al, 2005 ; Mario et al, 2007; Stawski et al, 2008)

α -chitine pure	Carapace fermentée (milieu à base de glucose 300g/l à 35°C)	Carapace fermentée (milieu à base de sucres réducteurs 200g/l à 30°C)	Carapace brute	Les groupements chimiques
-	563.2	-	-	
586.3	-	586.3	586.3	Bande d'amide I
-	702.0	-	-	
-	-	-	871.8	calcite
894.9	894.9	894.9	-	
1026.1	1026.1	1026.1	-	
1072.3	1072.3	1072.3	1072.3	
1157.2	1157.2	1157.2	-	
1257.5	1257.2	-	-	
1319.2	1319.2	1319.2	1319.2	bande d'amide II
1380.9	1380.9	1380.9	-	bande d'amide I
-	-	-	1404.1	forte liaison CO de CaCO ₃
1558.4	1558.4	1558.4	-	Bande d'amide II
1658.7	1658.7	1658.7	1658.7	bande d'amide I
-	-	-	2522.7	calcite
-	2144.7	-	-	
-	2885.3	-	-	fortes liaisons CH
2893.0	-	-	-	liaison CH
-	-	-	2923.9	
-	2931.6	2931.6	-	fortes liaisons CH
3109.0	3109.0	3109.0	-	bande amide II
3263.3	-	-	-	liaison hydrogène intermoléculaire
-	3271.0	3217.0	3271.0	C=O...H-N
3440.8	3440.8	-	-	Les bandes OH (O-3-H...O-5)

C. La comparaison des spectres de diffraction des RX des carapaces brute (Fig 36) et fermentées (Figs.37 et 38) montre la présence de deux pics très intenses à $2\theta = 9,9^\circ$, $2\theta = 19,9^\circ$ et deux autres pics faibles à $2\theta = 27^\circ$ et $2\theta = 32^\circ$. Nos résultats sont similaires aux ceux obtenus par **Zhou et ses coll. (2005)** avec la chitine pure. Ces chercheurs ont montré que l' α -chitine possède deux pics de diffraction $2\theta = 9,3^\circ$ et $19,4^\circ$ et $26,3^\circ$.

D'autres chercheurs (**Entsar et al., 2008**) ont montré que la chitine a une forte réflexion à $2\theta \approx 9-10^\circ$ et $2\theta \approx 20-21^\circ$ et une réflexion mineure à $2\theta \approx 26,4^\circ$. On peut conclure donc, que les pics caractéristiques de la chitine pure apparaissent dans nos deux échantillons préparés par voie biologique. On remarque, également, dans le spectre de la carapace brute qu'il y a un pic intense à $2\theta = 30^\circ$ qui est due à la calcite présente dans la carapace des crevettes (Fig 36).

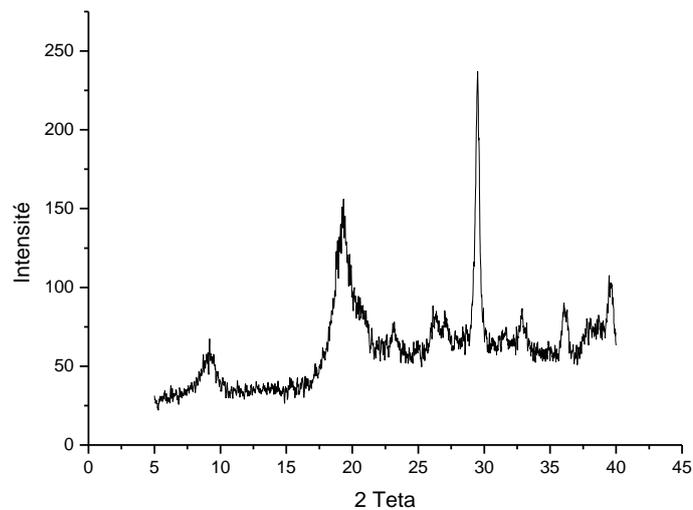


Fig. 36 : Spectre de diffraction aux rayons X de la carapace brute

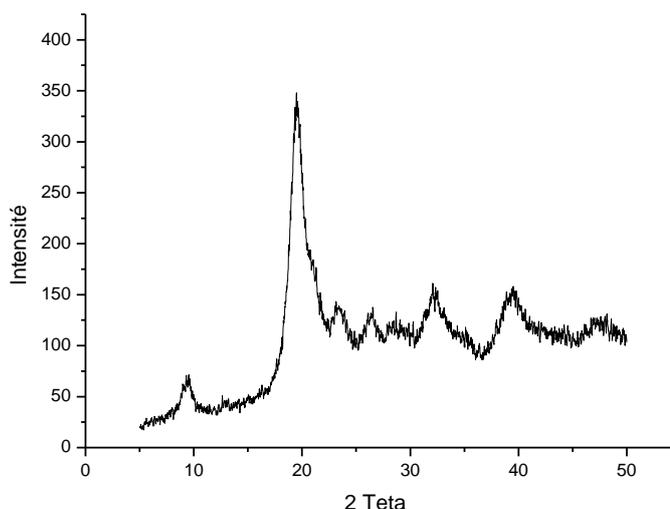


Fig. 37 : Spectre de diffraction aux rayons X de la carapace traitée par le glucose

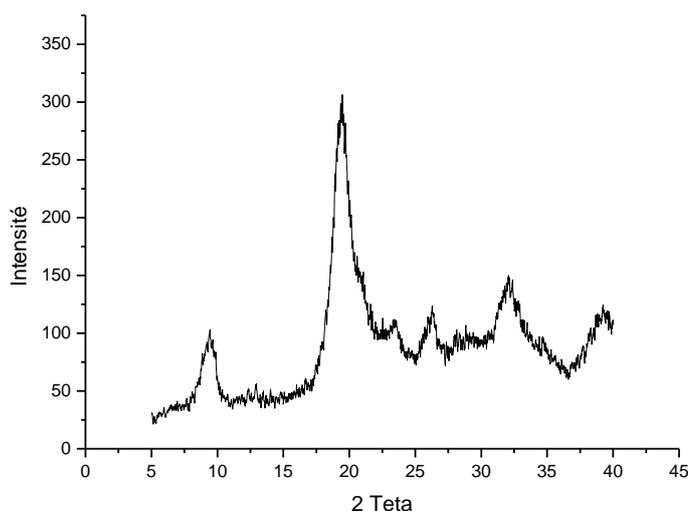


Fig. 38 : Spectre de diffraction aux rayons X de la carapace traitée par le jus de datte

D. Les résultats de l'analyse par fluorescence X des carapaces fermentées montrent (tableau 4) que la majorité des minéraux se trouvent à l'état de trace sauf pour l'oxyde de calcium CaO (9%) et les phosphates P₂O₅ (5%). L'analyse complémentaire par spectrométrie de fluorescence X montre que CaO et P₂O₅ représentent les sels qui n'ont pas subi une solubilisation par l'acide lactique lors de la fermentation.

Il est noté, en plus, une légère différence dans les proportions des autres minéraux (oxydes de Na, de Mg, de Si et de K) présents dans les deux carapaces fermentées. Grâce à l'acidité du

jus de datte, constaté pendant sa préparation, les différents oxydes cités précédemment semblent être solubilisé dans le carbohydre naturel.

Tableau 4 : Résultats de l'analyse élémentaire par Fluorescence X des carapaces fermentées

composés	Carapace fermentée dans le milieu à base de jus de dattes (200g/l à 30°C)	Carapace fermentée dans le milieu à base de glucose (300g/l à 35°C)
Na ₂ O	0.004	0.018
MgO	0.014	0.022
Al ₂ O ₃	0.037	0.045
SiO ₂	0.04	0.171
P ₂ O ₅	5.96	5.42
SO ₃	0.25	0.19
Cl	0.003	0.004
K ₂ O	0.006	0.029
CaO	9.014	8.9
MnO	0.008	Nd
Fe ₂ O ₃	0.03	0.019
Cu	0.005	0.005
Zn	0.023	0.023
Br	0.05	0.017
Sr	0.08	0.012

Conclusion générale et perspectives

La caractérisation physico-chimique de la carapace de crevettes *Parapenaeus longirostris*, produite sur les côtes algériennes révèle une importance et une urgence dans l'exploitation industrielle de ce produit en vue d'extraire, en plus de la chitine, les minéraux (26,8%), les protéines (12%), les lipides et les pigments (35%).

Pour la récupération biologique du biopolymère : la chitine, la concentration en substrat carboné, la présence d'oligo-éléments ainsi que la température d'incubation interviennent, de manière considérable, dans l'efficacité du procédé fonctionnant en discontinu et à pH libre (8-9). L'inoculation du milieu de culture par la bactérie *Lactobacillus helveticus* conduit à des taux élevés de déminéralisation et de déprotéinisation de la carapace selon les conditions opératoires cités précédemment.

La fermentation lactique dans un milieu synthétique à base de glucose (sans extrait de levure et sans micro aération) a montré que :

- ✓ La déminéralisation maximale de la carapace se produit qu'en présence d'une forte concentration en substrat carboné. En effet, il se produit une acidification importante (pH 4,7) du milieu de culture provoquée par l'addition de 300g/l en glucose. Dans ces conditions, il n'y a pas une bonne déprotéinisation de la carapace en raison de l'acidité du milieu.
- ✓ La déminéralisation de la carapace de crevettes est d'autant plus meilleure à température 35°C qu'à température 42°C, le taux maximal est de seulement 60%. Ce résultat traduit l'élimination totale des carbonates de calcium (CaCO₃), dosés dans la carapace, contrairement aux autres minéraux présents (CaO, P₂O₅).
- ✓ Contrairement à la déminéralisation, la déprotéinisation maximale ne se produit qu'à faible concentration en glucose. En effet, il se produit une diminution du pH du milieu de fermentation jusqu'à la valeur située entre 6 et 6,5 avec une concentration initiale de 80g/l en glucose. L'activité protéolytique des enzymes est d'autant meilleure à température de 30°C qu'à 35°C, ce qui explique un taux maximal de déprotéinisation de 70%. Il est probable que l'absence de cofacteurs, nécessaires à l'activation des protéases dans le milieu synthétique, est la principale cause de la limitation de la valeur de DP comparativement à la bibliographie qui mentionne des taux plus élevés.
- ✓ Comme dans le traitement chimique, la déminéralisation et la déprotéinisation de la carapace, dans un milieu de fermentation à base de glucose, se produisent dans des conditions totalement différentes.

- ✓ L'enrichissement du milieu en extrait de levure et l'apport d'une microaération (0,44V/V/M) n'ont favorisé ni la déminéralisation ni la déprotéinisation de la carapace. Dans notre procédé qui fonctionne en batch, l'extrait de levure et l'oxygène interviennent favorablement dans la conversion du glucose en biomasse plutôt qu'en acide lactique. Il est aussi noté que l'extrait de levure et la micro aération augmentent la durée de la fermentation lactique, ces paramètres n'apportent pas une amélioration dans le procédé de récupération de la chitine.

Le milieu à base de glucose exige pour extraire la chitine deux conditions opératoires distinctes : 300g/l et 35°C pour la déminéralisation maximale et 80g/l et 30°C pour la déprotéinisation maximale de la carapace des crevettes.

La fermentation lactique dans un milieu naturel carbohydraté « jus de dattes » a montré que :

- ✓ A faibles concentrations en sucres réducteurs (entre 25 et 100g/l) et à 35°C, il se produit contrairement au milieu à base de glucose (à concentrations inférieures à 100g/l) la déminéralisation, en plus de la déprotéinisation de la carapace. Cependant, ces taux maximums (DM 53% à 25g/l en sucres et DP 45% à 50g/l en sucres) restent faibles comparativement à ceux obtenus avec le sucre simple (DM 61% avec 300g/l en glucose et 70% avec 80g/l en glucose).
- ✓ A concentrations élevées en sucres réducteurs (entre 80 et 250g/l) et à 30°C, la déminéralisation et la déprotéinisation de la carapace atteignent, simultanément, des taux maximums 62% et 83%, respectivement avec 200g/l en sucres. Comparativement au milieu à base de glucose qui nécessite des conditions totalement différentes (en concentration et en température), les taux obtenus avec le jus de dattes sont les plus élevés.
- ✓ Dans les deux milieux étudiés, le taux maximal de DM atteint une limite (environ 60%). Malgré la présence d'acide lactique dans le milieu en fin de fermentation, il doit exister dans la carapace des minéraux autres que les carbonates de calcium incapables de se solubiliser dans cet acide.

Le jus de dattes exige pour extraire la chitine, contrairement au milieu simple, une seule condition opératoire : 200g/l, 30°C pour la déminéralisation et la déprotéinisation maximales de la carapace des crevettes. D'où l'intérêt d'utiliser les déchets de dattes comme milieu de fermentation pour extraire le biopolymère.

Les analyses physico-chimiques de la carapace brute et des carapaces fermentées avec le glucose et le jus de dattes ont montré la solubilisation totale des carbonates de calcium par l'acide lactique et que la présence des autres minéraux dans la carapace nécessite des prétraitements supplémentaires. En plus, la comparaison à la chitine commerciale de nos carapaces fermentées montre la conservation de l' α -chitine dans la carapace à la fin du traitement biologique.

Perspectives :

Quelques améliorations pourraient être apportées à la méthode d'extraction de la chitine par voie biologique :

- Réaliser la fermentation dans un milieu continu afin d'améliorer la concentration d'acide lactique et pour éviter l'inhibition de la croissance par le produit final ainsi que l'accumulation des métabolites toxiques ;
- Elargir la gamme de microorganismes utilisés ou réaliser le couplage de deux souches ou plus ;
- Faire un lavage de la carapace préparée par voie biologique avec une concentration d'acide chlorhydrique dilué afin d'éliminer le reste d'éléments qui semblent difficile à les éliminer par un acide organique.
- Il sera intéressant de calculer les taux de DM et de DP en effectuant des essais avec la même quantité de carapace, réaliser la DM puis la DP dans les conditions optimales obtenues à base de glucose. Calculer la perte de masse.
- Avec cette même quantité de carapace, réaliser la DP puis la DM dans les conditions optimales obtenues à base de glucose. Calculer la perte de masse.

Références bibliographiques

- **Adour L.; Arbia W.; Amrane A. et 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 Technology and Biotechnology* Vol. 82, (12), 1664-1669.
- **Agulló E., Rodriguez M. S., Ramos V. and Albertengo L., 2003.** Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromol. Biosci.* Vol.3, (10), 521-530.
- **Akkaya G., Uzun I. et Guzel F., 2007.** Kinetics of the adsorption of reactive dyes by chitin. *Dyes and Pigments* Vol.73, (2), 168-177.
- **Alexandre T. Paulino, Julliana I. Simionato, Juliana C. Garcia, Jorge Nozaki, 2006.** Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides. *Carbohydrate Polymers* Vol.64, (1), 98–103.
- **Ali M., Howchit T. and Miyagawa S., 1997.** Nodulation, nitrogen formation and growth of soybean plants (*Glycine max* Merr.) in soil supplemented with chitin and chitosan. Cité par **Côté N., 1999.** Impact agronomique de l'application de composts à base de résidus chitineux. **Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.)**. Université de Sherbrooke, Canada.
- **Amrane A. et Prigent Y., 1998.** Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. *World of Biotechnology* Vol.14, (4), 529-534.
- **Amrane A. et Prigent Y., 1998.** Lactic acid production rates during the different growth phases of *Lactobacillus hleveticus* cultivated on whey supplemented with yeast extract. *Biotechnology letters* Vol. 20, (4), 379-383.
- **Apria, 1981.** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries Agro-alimentaires : Analyse des constituants alimentaires. Vol. 4 Ed Apria.
- **Arbia W., 2007.** Production de la chitine par voie fermentaire à partir d'une biomasse marine. Mémoire de magister, Ecole Nationale Polytechnique.
- **Axelsson L., 2004.** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Sepposalminen; Attevonwright and Ouwehand A. Marceldekker, Inc, New York. Basel.
- **Aytekin A.O. et Elibol M., 2007.** Chitin extraction from prawn processing waste by biological methods. *Bioprocess Biosyst Eng. Advances in chitin science* vol. A.

- **Aytekin A.O. et Elibol M., 2009.** Cocultivation of *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae* for biological chitin extraction from prawn waste. *Bioprocess Biosyst Eng.*
- **Badis A.; Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M., et Ouzrout R., 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvres de deux populations caprines locales « ARABIA et KABYLE ». *Science & Technologie* Vol.23, 30- 37.
- **Bal Y., Bal K. E., Laarabi- Bouamrane O. and Lallam A., 2006.** Copper (II) uptake by *Pleurotus mutilus* biomass, chitin and chitosan. *Mineral Eng.* Vol. 19, (14), 1456-1458.
- **Ballarada A., 2003.** Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*. Approches physiologiques et génétiques. Pour obtenir le grade de Docteur. Ecole Doctorale des Sciences du Vivant, Geosciences, Sciences de l'environnement.
- **Beaulieu C., 2007.** Les effets multiples du chitosane. *Phytothérapie* Vol.5, (1), 38-45.
- **Benesch J., 2001.** Null Ellipsometry and protein adsorption to model biomaterials. Department of Physics and Measurement Technology, Biology and Chemistry. *Linköping studies in Science and Technology.*
- **Benosman A.S.; Taibi H.; Mouli M. and Belbachir M., 2006.** La diffraction des rayons X: une méthode intéressante pour la caractérisation de composés du ciment anhydre, argile naturelle et des mélanges ciment anhydre/ argile naturelle. *Communication Science et Technologie* N°4.
- **Bosgiraud C., 2003.** Microbiologie générale et santé. Editions ESKA.
- **Boudjelal A. and Nancib N., 2001.** Production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu à base de jus de dattes. *Rev. Energ. Ren : Production et valorisation- Biomasse*, 41- 46.
- **Bourgeois C. M. and Leveau J. Y., 1993.** Techniques d'analyse et de contrôle dans les Industries agro-alimentaires. Lavoisier-TEC and DOC. Paris.
- **Chang Wen- Teish, Yu- Chung Chen and Chia-Ling Jao, 2006.** Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioures. Technol.* Vol.98, (6), 1224-1230.

- **Cira L. A., Huerta S., Hall G. M. and Shirai K., 2002.** Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Proc. Biochem.* Vol.37, (12), 1359-1366.
- **Corrieu Georges & Luquet François-Marie, 2008.** Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Editions TEC & DOC, Lavoisier.
- **Côté N., 1999.** Impact agronomique de l'application de composts à base de résidus chitineux. *Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.)*. Université de Sherbrooke, Canada.
- **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. *J. Agric. Food Chem.* Vol.49, 5468-5472.
- **Djould D. R., 2004.** Mise au point d'un ferment mixte destiné à la bioconversion des tubercules de MNIOC CYANOGENE. Thèse Doctorat/Ph. D, Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro-industrielles (ENSAI) de l'Université de Ngaoundéré, Cameroon.
- **Donadel K., 2004.** Estrutura, propriedadae e aplicações da quitina et quitosana. Universidade federal de Santa Catarina pos- graduação em ciência e engenharia de materials disciplina : Tópicos especiais biomaterials.
- **Doleyres Y., 2003.** Production continue de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse présentée à la faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (ph.D). Département des sciences des aliments et de nutrition. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval. Québec.
- **Drouault S., Gérard C., 2001.** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.* Vol.32, (2), 101-117.
- **Dubrana D., 1992.** Chimie industrielle : Les industriels se mettent au homard. *Sciences et vie*.
- **Duval M. et Olivier F., 2008.** Isolation et valorisation des constituants de la carapace de la crevette blanche. Mémoire de maitreès sciences (M.sc.). Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'alimentation. Université LAVAL Québec.

- **El- Ghaouth A., Arul J., Asselin A., Benhamou N, 1992.** Antifungal activity of chitosan on two post- harvest pathogen of strawberry fruits. *Phytopath.* Vol.82, (4), 398-402.
- **Entsar S. Abdou ; Khaled S.A. Nagy and Maher Z. Elsabee, 2008.** Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology* Vol.99, (5), 1359-1367.
- **Evonne Wai Yan Tan and Vern Ru Lee, 2002.** Enzymatic hydrolysis of prawn shell waste for the purification of chitin. *Department of Chemical Engineering. Loughborough University.*
- **Felt O., 1999.** Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. Thèse de doctorat d'état. Université de Genève.
- **Fernandez-Kim S. O., 2004.** Physiochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. Thesis of the Louisiana State University.
- **Foscolo J. and Phillipon P., 1997.** Des molécules qui miment le vivant. *Biofutur* Vol.171, 14-17.
- **Gentilia Alejandro R., María. Cubitto, Marcela Ferrerob, María S. Rodríguez, 2006.** Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation* Vol.57, (4), 222–228.
- **Ghali A.E, Tango M.S.A., Mahmoud N.S. and Avery A.C., 2004.** Batch propagation of *Lactobacillus helveticus* for production of lactic acid from lactose concentrated cheese whey with microaeration and nutrients supplementation. *World journal of microbiology and biotechnology* Vol.20, 65-75.
- **Ghaly* & A. A. EI-Taweel, 1995.** Effect of micro-aeration on the growth of *candida pseudotropicalis* and production of ethanol during batch fermentation of cheese whey. *Bioresource Technology* Vol.52, (3), 203-217
- **Giraud-Guille M. M., Emmanuel Belamie, Gervaise Mosser, 2004.** Organic and mineral networks in carapaces, bones and biomimetic materials. *C. R. Palevol* Vol.3, (6-7), 503-513.
- **Guiraud J-P., 2003.** Microbiologie alimentaire. 651. Edition Dunod, Paris.
- **Healy M., Green A. and Healy A., 2003.** Bioprocessing of marine crustacean shell waste. *Acta Biotechnol.* Vol. 23, (2- 3), 151-160.

- **Hitoshi Sashiwa***, **Sei-ichi Aiba**, **2004**. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* Vol.29, (9), 887–908.
- **Hu Ke-Jin ; Hu Jin-Lian ; Ho Kwok-Ping and Yeung Kwok-Wing**, **2004**. Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydrate polymers* Vol.58, (1), 45-52.
- **Iryna S.; April K.; Ludmila G. and Vitaly V., 2009**. Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus Cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol.36 (8), 1123-1126.
- **Jayakumar R., NweN; Tohura S. and Tamura H., 2006**. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of biological macromolecule* vol. 40, (3), 175-181.
- **Jean R.; Lobry Re, 1991**. Re-évaluation du modèle de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard, Lyon I.
- **Jerome J.P., James T. S. et Stephen L., 2004**. Microbiologie. Cours et questions de révisions. Dunod, *Paris*.
- **Jinjiang L., 1996**. The colloidal and liquid crystal properties of surface modified chitin crystallites. Thesis of Doctor of Philosophy. Mc Gill University. Montreal, Quebec, Canada.
- **Jun Cai, Jianhong Yang, Yumin Du, Lihong Fan, Yanlin Qiu, Jin Li, John F., 2006**. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*. *Kennedy Carbohydrate Polymers* Vol.65, (2), 211–217.
- **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. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 71, (2), 234-237.
- **Jung W. J., Jo G. H., Kuk J. H., Kim K. Y. and Park R. D., 2007**. Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Carbohydrate polymers* Vol.68, (4), 746-750.
- **Juraj Majtán , Katarína Biliková, Oskar Markovič, Ján Gróf , Grigorij Kogan, -- Jozef šimúrth, 2007**. Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *International Journal of Biological Macromolecules* Vol.40, (3), 237–241.

- **Kasaai Mohammad R., 2008.** A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* Vol.71, (4) 497–508.
- **Keisuke Kurita, 1997.** Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stabilization* Vol.59, (1-3), 17-20.
- **Ke-Jin Hua, Jin-Lian Hua, Kwok-Ping Hob, Kwok-Wing Yeung, 2004.** Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydrate Polymers* Vol.58, (1), 45–52.
- **Khor E., 2001.** Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise. Elsevier Science
- **Kiefer, 1999.** Le chitosane : <http://www.France.com/kiefer/Es.htm>
- **Kittur F. S., Harish P. K. V., Udaya S. K., Tharanathan R. N., 2002.** Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate polymers* Vol.49, (2), 185-193.
- **koide s. s., 1998.** Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutrition Research* Vol.18, (6), 1091-1101.
- **Kurita K., 1997.** Applications of chitin and chitosan. Goosen MFA, editor. Lancaster, PA. p. 297.
- **Kurita K., 2001.** Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.* Vol.26, (9), 1921-1971.
- **Kurita K., 2006.** Chitin and chitosan from marine crustaceans: Functional biopolymers. *Mini-review Marine Biotechnology* Vol.8, (3), 203-226.
- **Kyung-Taek Oh, Young-Ju K., Van N.N, Woo-Jin Jung, Ro-Dong P., 2007.** Demineralization of crab shell waste by *Pseudomonas aeruginosa* F722. *Process Biochemistry* Vol.42, (7), 1069-1074.
- **Laurance D. Hall and Mansur Yalpani, 1980.** Enhancement of the metal- chelating properties of chitin and chitosan. *Preliminary Communication Carbohydrate Research*, (83), C5-C7.
- **Lavall R. L., Assis O. B.G., Sérgio P. et Campana-Filho, 2007.** β – Chitin from the pens of *Loligo* sp : Extraction and characterization. *Bioresource Technology* Vol.98, (13), 2465-2472.
- **Leclerc H., Izaid D. Husson M.O.; Wattre P. and Jakubczak E., 1983.** Microbiologie générale. Editeurs DOIN.

- **Leclerc H., Gaillard J-L. and Michel S., 1995.** Microbiologie générale. La bacteria et le monde bactérien. 535. Doin éditeurs, Paris.
- **Leclerc Ph., 1997.** Caractérisation microbiologique des composts à base de résidus chitineux. *Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.)*. Université de Sherbrooke, Canada.
- **Leveau J. Y. and Bouix M., 1980.** Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. 612. Lavoisier Tec & Doc Apria, Paris.
- **Leyral G. and Vierling E., 2007.** Microbiologie et toxicologie des aliments. Editeurs DOIN.
- **Li Q. ; Dunn E.T. ; Grandmaison E.W and Goosen M.F.A., 1992.** Applications and Properties of chitosan. *J Bio-act Compat Polym.* Vol.7, (4), 370- 397.
- **Loiseleur J., 1963.** Techniques de laboratoire : Chimie physique, chimie biologique. Tome 1, 3ème édition, Masson, Paris.
- **Mahmoud N.S., Ghaly A.E. et Arab F., 2007.** Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production. *American Journal of Biochemistry* Vol.3, (1), 1-9.
- **Majeti N. V. Ravi Kumar, 2000.** A review of chitin and chitosan applications. *React. & Func. Poly.* Vol.46, (1), 1-27.
- **Manisara P., Ratana R. and Pitt S., 2003.** Characterisation of beta- chitin/ poly (vinyl alcool) blend films. *Polymer testing.* Vol.22, 381- 387.
- **Mario F. Di, P. Rapan`a, U. Tomati, E. Galli, 2007.** Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules* Vol. 43, (1), 8-12.
- **Mathur N.K and Narang C.K., 1990.** Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education* Vol.67, (11), 938-942.
- **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 Crystal Growth* Vol.177, (1-2) 125-134.
- **Mirzadeh Hamid, Nakisa Yaghobi, Saeed Amanpour, Hossein Ahmadi, Ali M. Mohagheghi and Farzin Hormozi, 2002.** Preparation of chitosan derived from shrimp's shell of persian Gulf as a blood hemostasis agent. *Iranian Polym. J.* Vol.11, (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).
- **Montserrat R. P., 2002.** Developpement of techniques based on natural polymers for the recovery of precious metals. Memdria presentada per optar al grau de doctor en ciencias quimiques- Menicio doctor Europeu.
- **Morfin I., Hazot P., Guillot F., Soler C., Korwin-Zmijowska C., Tahiri K., Chevalier X., Corvol M. and Domard A., 2002.** Percolating hydrogels for tissue engineering. *Europ. Cells and Materials*. Vol.4, (1), 55- 56.
- **Morimoto M., Saimoto H. and Yoshihiro S., 2002.** Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification. *Trends in Glycosc. and Glycotechno*. Vol.14, (78), 205- 222.
- **Mrunal R. T., 2004.** Synthesis and antibacterial assessment of water- soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality. Doctor of philosophy. Louisiana State University.
- **Mukherjee D. P., 2001.** Method for producing chitin or chitosan. United States Patents, Vol.6, 310,188.
- **Muzzarelli R. A. A., 1977.** Chitin. Oxford, Pergamon Press.
- **Muzzarelli A. and A. Riccardo, 1983.** Chitin an dits derivatives: New trends of applied research. *Carbohy. Polym*. Vol.3, (1), 53- 75.
- **Muzzarelli R. A. A. et Muzzarelli C., 2006.** Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. *Adv Polym Sci*. Vol.186, 151–209.
- **Neetu Dahiya . Rupinder Tewari, Gurinder Singh Hoondal, 2006.** Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol.71, (6), 773– 782.
- **No H. K., Meyers S. P. and Lee K. S., 1989.** Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agricultural and food chemistry* Vol.37 (3), 575- 579.
- **Onar N. and Sariisik M., 2000.** Using and properties biofibers based on chitin and chitosan on medical applications: www.frt.vslib.cz/indoczech-conference/conference_proceedings/fulltext/turkey_05.
- **Percheron. F., Perlés. R and Foglietti. J. M., 1981.** Abrégé de biochimie générale. Tome 2, Edition Masson, Paris.

- **Percot A. ; Viton C. and Domard A., 2003.** Optimization of chitin extraction from shrimps shells. *Biomacromolecules* Vol.4, (1) 12-18.
- **Poirier Martin, 2000.** Fractionnement et caractérisation de la chitine dans le système N,N-Diméthylacétamide/ chlorure de lithium. *Maîtrise en Sciences (M. Sc.)*. Université Laval, Canada.
- **Prescott Lansing M. ; Harley John P. and Donald Klein A., 2003.** Microbiologie. De Boeck & Larcier.
- **Preyanat V., Warayut S., Watchara K., Damrus S. and Prachya K., 2003.** Anticoagulant activities of the chitosan polysulfate synthesized from marine crab shell by semi- heterogenous conditions. *Science Asia* Vol.29, 115-120.
- **Ramírez- Coutiño L., María del Carmen Marín- Cervantes, Sergio Huerta, Sergio Revah and Keiko Shirai, 2006.** Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry* Vol.41, (5), 1106-1110.
- **Rao M. S., Munoz J. and Stevens W. F., 2000.** Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol.54, (6), 808- 813.
- **Rao M. S. and Stevens W. F., 2006.** Fermentation of shrimp biowaste under different salt concentrations with amyolytic and non-amyolytic *Lactobacillus* strains for chitin production. *Food Technol. Biotechnol.* Vol.44, (1), 83-87.
- **Reetarani S. Patil, Vandana Ghormade, Mukund V. Deshpande, 2000.** Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology* Vol.26, (7), 473–483.
- **Rinaudo M., 2006.** Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* Vol.31, (7), 603-632.
- **Rouessac Francis, Rouessac Annik et Ourisson Guy, 2000.** Analyse chimique Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod, Paris.
- **Scriban R., 1999.** Biotechnologie. Tech & Doc, Paris.
- **Seng J. M, 1988.** Chitine, chitosane et dérivés : de nouvelles perspectives pour l'industrie. 40-44
- **Shahidi F., Janak K. V. A. and Jeon Y-J., 1999.** Food applications of chitin and chitosans. *Tends in Food Sci. and Techno.* Vol.10, (2), 37-51.
- **Shirai K. S., Guerrero I., Huerta S., Saucedo G., Castillo A., Gonzalez R. O. and Hall M. G., 2001.** Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic

- acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enz. and Microbial Technol.* Vol.28, (4-5), 446-452.
- **Speiciene Vilma, Fabien Guilmineau, Ulrich Kulozik, Daiva Leskauskaite, 2007.** The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins. *Food Chemistry* Vol.102, (4), 1048–1054.
 - **Stawski D.; Rabiej S.; Herczynka L. and Draczynski Z., 2008.** Thermogravimetric analysis of chitins of different origin. *Journal of thermal Calorimetry* Vol.93, (2), 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 & Biotechnology* Vol.14, (5), 655-660.
 - **Synowiecki Joseph and Nadia Ali Abdul Quawi Al Khateeb, 2000.** The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry* Vol.68, (2), 147- 152.
 - **Tango M.S.A.et Ghaly A.E., 1999.** Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. *Biomass and Bioenergy* Vol.16, (1), 61-78.
 - **Tango M.S.A.et Ghaly A.E., 1999.** Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro-aeration. *Biomass and Bioenergy* Vol.17, (3), 221-238.
 - **Tharanathan R. N. and Kittur F. S., 2003.** Chitin- the undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* Vol43, (1), 61-87.
 - **Theruvathil K. Sini, Sethumadhavan Santhosh and Paruthapara T. Mathew, 2007.** Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydrate Research* Vol.342, 2423–2429.
 - **Wang SL., Chang WT. and Lu M. C., 1995.** Production of chitinase by *Pseudomonas aeruginosa* K- 187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B.* Vol.19, (2), 105-112.
 - **Xiaolan Zhu, Jibao Cai, Jun Yang and Qingde Su, 2005.** Determination of glucosamine in impure chitin samples by high-performance liquid chromatography. *Carbohydrate Research* Vol.340, (10), 1732–1738.
 - **Xu Y.; Gallert C.; Winter J., 2008.** Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol.79, (4), 687-697.

- **Yang R.D. and Humphrey A.E., 1975.** Dynamic and steady state studies of phenol. Biodegradation in pure and mixed cultures. *John Wiley & Sons, Inc.* Vol.17, (8), 1211-1235.
- **Yang Y- P., Xu X- H., Chen H- F., 2004.** Treatment of chitin-producing wastewater by micro- electrolysis- contact oxidization. *Journal of Zhejiang University Science* Vol. 5, (4), 436- 440.
- **Yongle Liu *, Zhaofeng Liu, Wanlian Pan, Qingji Wu, 2007.** Absorption behaviors and structure changes of chitin in alkali solution. *Carbohydrate Polymers* Vol.72, (2), 235-239.
- **Zakaria Z., Hall G. M and Shama G., 1998.** Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochem.* Vol. 33 (1), 1-6.
- **Zhou D.; Zhang L. and Guo S., 2005.** Mechanisms of lead biosorption on cellulose / chitin beads. *Water Research* Vol.39, (16), 3755-3762.

-
- **AFNOR (N.F. V04-206).**
 - **AFNOR, 1987 (NF X31-105)**
 - **AFNOR, 1988 (NF V03-922, 1967)**
 - **AFNOR, 1989 (NF ISO 712)**

الملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو إستخلاص الكيتين من قوقعة الجمبري *sueaneparaP sirtisorignol* عن طريق التخمير باستعمال البكتيريا اللبنية *sullicabotcaL sucitivleh*. تقوم هذه الأخيرة بفرز كمية من حمض اللبن مما يتسبب في تحميض الوسط و اللذي يؤدي إلى نزع الأملاح المعدنية في شروط ط معينة من الحرارة (35°م) وتركيز الغلوكوز (300غ/ل). و من أجل تهديم البروتينات تحتاج البكتيريا لشروط مغايرة (30°م و 80غ/ل غلوكوز) حتى تفرز الإنزيمات المهدمة (البروتياز). النتائج المحصل عليها هي 61٪ من نزع الأملاح المعدنية و 70٪ من نزع البروتينات.

في الخطوة التالية ، قمنا بمحاولة تحسين شروط إفراز حمض اللبن من طرف البكتيريا ب إضافة منبع للأزوت و الميكروتهوية في الوسط الخاص بعملية التخمير. لكن النتائج المتحصل عليها كانت غير كافية مقارنة مع سابقتها.

في الأخير قمنا باستبدال الغلوكوز بعصير التمر الذي يتكون من سكريات مرجعة بتركيز 200 غ/ل. النتائج المحصل عليها كانت جد متميزة حيث قدرت نسبة نزع الأملاح ب 61٪ و نسبة نزع البروتينات ب 83٪. أهمية هذه النتائج تكمن في أنّ كلتا العمليتان تتمان معا أي في نفس الشروط (30°م و سكريات مرجعة بتركيز 200 غ/ل).

الكلمات المفتاحية: الكيتين، البكتيريا اللبنية، التخمير، نزع الأملاح المعدنية، تهديم البروتينات.

Résumé :

L'objectif de cette étude est porté sur l'extraction de la chitine à partir de la carapace 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.

Dans notre travail, nous avons procédé pour la première étape à ensemercer la bactérie dans milieu synthétique contenant le glucose comme source de carbone. Les résultats obtenus sont : 60% de DM en présence de 300g/l de glucose à température d'incubation 35°C et 70% de DP en présence de 80g/l de glucose à température d'incubation 30°C. La deuxième étape procède à améliorer la production d'acide lactique à d'améliorer la DM, en rajoutant dans le milieu de fermentation une source d'azote « extrait de levure » et une microaération. Les résultats obtenus sont 50.5% de DM. La dernière étape consiste à remplacer le milieu synthétique par un milieu naturel carbohydraté « Le jus de dattes ». Les résultats obtenus sont très satisfaisants parceque la DM et la DP de la carapace sont réalisées dans la même étape et dans les mêmes conditions, 200 g/l en sucres réducteurs à température d'incubation 30°C.

Mots clés : Chitine, Bactéries lactiques, Fermentation, déminéralisation, déprotéinisation.

Abstract :

The purpose of this study is the extraction of chitin from shrimp shell *Parapenaeus longirostris*, by fermentation using a lactic acid bacteria *Lactobacillus helveticus*. The recuperation of the chitin requires two steps, the demineralization (DM) of the shell by acidification producing the lactic acid, and the deproteinisation (DP) by excretion of proteolytics enzymes. In our work, we are cultivated the bacteria in synthetic medium contain the glucose as source of carbon. The results obtained are: 60% of DM and 70% of DP, respectively. The second step, we are tried to ameliorate the production of lactic acid for ameliorate the DM by addition in fermentation medium the source of azotes (Yeast extract) and microaeration. The results obtained are 50.5% of DM. The end step consists to replace the synthetic medium by natural medium carbohydrate "the juice of dates". The results are very satisfactory because the 61 % of DM and 80% of DP are realized in the same step and the same conditions: 200 g/l reducings sugars at 30°C.

Key words: Chitin, lactic bacteria, Fermentation, Demineralization, deproteinization.