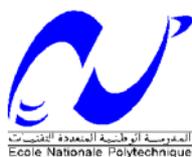


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
Département du génie 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 : **Biotechnologies**

Thème :

Production de la chitine par voie fermentaire à partir d'une biomasse marine

Etudié par :

M^{elle} ARBIA Wassila
Ingénieur d'Etat en Génie Biologique (U.S.T.H.B.)

Président du jury :	R. BOUARAB	Maître de conférence	E. N. P
Directeurs de mémoire :	L. DJABRI ADOUR	Maître de conférence	U. M. M, TO
	N. MAMERI	Professeur	E. N. P
Examineurs:	R. BAKOUR	Professeur	U. S. T. H. B
	N. ABDI	Maître de conférence	E. N. P
	O. YAHIAOUI	Chargé de cours	U. M. M, TO

Année Universitaire 2006 – 2007

ENP- 10 avenue Hacen Badi – El Harrach - ALGER

Je dédie ce modeste travail à :

La mémoire de Madame BELHOUCINE- MAMERI Djamila

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

Que dieu vous garde pour nous.

Mes chers frères : Rachid et sa femme

Sidali et Mohamed.

Mes chères sœurs : Rachida et son mari Ismail

Leila et Amina pour leur gentillesse, leur compréhension et leur soutien moral.

A mon petit poussin IDRISOU

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

Ma belle famille, surtout à Dalila et Mouna.

Mes amies Hassina, Zahra et Nora.

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

La réalisation de ce mémoire n'aurait pas été possible sans la gentillesse et la bonne humeur de l'ensemble des personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de travailler, particulièrement : Hassiba, Souhila, Samira Benchaita, Soraya, Lyess, Samira Slam, Hanane et Hassina sans oublier Rachida qui m'a beaucoup aidé, Leila, Idir, Mourad et toute l'équipe de Biotechnologie et Environnement.

Wassila

Remerciements

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

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

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

Je tiens à remercier M^r R. BOUARAB, Maître de conférence à l'E.N.P., d'avoir accepter d'être le président du jury.

Je tiens à remercier vivement M^r. le Professeur R. BAKOUR, U. S. T. H. B, qui, malgré ses occupations, m'a fait l'honneur d'examiner mon travail.

Mes remerciements s'adressent également à M^{me} N. ABDI, Maître de conférence à l'E. N. P et M^{me} O. YAHIAOUI, Chargé de cours à l'U. M. M, TO., pour l'intérêt qu'elles portent à ce travail en acceptant de l'examiner.

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

Mes sincères remerciements s'adressent particulièrement à M^{elle} ALOUACHE S., M^{me} LARIBI H., M^r BENHABILES M. S. et M^{me} Tassist A., pour leurs aides précieuses et leurs conseils.

Remerciements

Mes remerciements s'adressent également à :

** HAMIDA et MAHFOUD pour leurs gentillesse et leur aides.*

** Mr AHMED ZAIED Chef du département de Génie chimique, ENP*

** SOUMIA, Ingénieur du Laboratoire de Technologie Alimentaire, INA et Mr FAIÇAL du Laboratoire d'éco pédologie, USTHB, pour m'avoir aider énormément en acceptant d'effectuer des analyses au sein de leurs laboratoires.*

** M^{elle} LAMIA (INA)*

** M^{elle} MESSAI Y. et toute l'équipe du Laboratoire de Génétique, et à Madame HAFAR N., USTHB.*

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

Sommaire

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : La chitine et ses dérivés	
I. 1. Historique.....	3
I. 2. La chitine.....	4
I. 2. 1. Définition de la chitine.....	4
I. 2. 2. Les sources de chitine.....	6
I. 2. 3. Les propriétés de la chitine.....	10
I. 2. 3. 1. Les propriétés biologiques.....	10
I. 2. 3. 2. Les propriétés physico-chimiques.....	11
I. 3. Les dérivés de la chitine.....	12
I. 3. 1. Le chitosane.....	14
I. 3. 2. Les dérivés carboxyméthylés de la chitine et du chitosane.....	15
I. 3. 3. Les oligo-mères de la chitine et du chitosane.....	16
Chapitre II : Les applications de la chitine et ses dérivés	
II. 1. En agriculture.....	17
II. 2. Traitement des eaux usées et protection de l'environnement.....	18
II. 3. Applications biomédicales et pharmaceutiques.....	19
II. 3. 1. En chirurgie.....	19
II. 3. 2. En ingénierie tissulaire.....	19
II. 3. 3. En ophtalmologie.....	19
II. 3. 4. Traitement du cancer.....	20
II. 3. 5. Contrôle de l'hypercholestérolémie et du surplus du poids.....	20
II. 3. 6. Activation du système immunitaire.....	21
II. 3. 7. Activité anticoagulante.....	21
II. 4. Activité antimicrobienne.....	21
II. 5. En industrie agro-alimentaire.....	22
II. 6. En biotechnologie.....	22
II. 7. Autres applications.....	22
Chapitre III : Les méthodes d'extraction de la chitine	
III. 1. Introduction.....	24

Sommaire

III. 2. La méthode chimique.....	25
III. 3. La méthode biologique.....	26

Chapitre IV : Les bactéries lactiques et traitement biologique du déchet de crevettes

IV. 1. Les bactéries lactiques.....	29
IV. 1. 1. Les caractères bactériologiques.....	29
IV. 1. 2. Les caractères biochimiques.....	30
IV. 1. 3. Habitat.....	30
IV. 1. 4. Rôles et intérêts des bactéries lactiques.....	30
IV. 1. 4. 1. Utilisation industrielle.....	30
IV. 1. 4. 2. Intérêts des bactéries lactiques sur la santé humaine.....	31
IV. 2. Les bactéries lactiques et déchet de crevette.....	31

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre V : Matériels et Méthodes

V. 1. Matériels.....	34
V. 1. 1. La souche bactérienne.....	34
V. 1. 2. La carapace.....	34
V. 1. 3. La source naturelle de carbone : le jus de dattes.....	34
V. 2. Méthodes analytiques et expérimentales	34
V. 2. 1. <i>Lactobacillus helveticus</i>	34
V. 2. 1. 1. Coloration simple au bleu de méthylène.....	34
V. 2. 1. 2. Coloration de Gram.....	35
V. 2. 2. Carapace	35
V. 2. 2. 1. Préparation de la poudre de carapace.....	35
V. 2. 2. 2. Analyses physico-chimiques de la carapace.....	36
V. 2. 2. 2. 1. Détermination du pH à 10% (masse/volume).....	36
V. 2. 2. 2. 2. Mesure de l'humidité.....	36
V. 2. 2. 2. 3. Détermination du taux de cendres.....	36
V. 2. 2. 2. 4. Détermination de la teneur en chitine.....	37
V. 2. 2. 2. 5. Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl.....	38
V. 2. 3. La fermentation.....	39
V. 2. 4. Le jus de dattes.....	39

Sommaire

V. 2. 4. 1. Préparation du jus de dattes.....	39
V. 2. 4. 2. Dosage des sucres réducteurs par la méthode ADNS.....	40
V. 2. 4. 3. Dosage colorimétrique des protéines totales.....	40
V. 2. 4. 4. Dosage de l'ammoniaque par le réactif de NESSLER.....	41
 Chapitre VI : Résultats et discussion	
VI. 1. Réidentification de la souche.....	42
VI. 2. Caractérisation de la carapace.....	42
VI. 2. 1. Les propriétés physico-chimiques de la carapace.....	42
VI. 2. 2. Le spectre infra-rouge.....	43
VI. 3. Caractérisation du jus de dattes.....	44
VI. 4. Influence des conditions opératoires sur l'évolution de pH du milieu.....	45
VI. 4. 1. Effet de la concentration initiale en glucose sur l'évolution du pH en milieu stérile.....	45
VI. 4. 2. Effet de la stérilisation de la carapace sur l'évolution de pH du milieu.....	50
VI. 4. 3. Effet de la concentration élevée en glucose sur l'évolution du pH du milieu.....	51
VI. 4. 4. Effet de la température sur l'évolution de pH du milieu.....	60
VI. 4. 5. Effet du pH initial sur l'évolution du pH du milieu.....	61
VI. 4. 6. Effet de la source de carbone.....	62
VI. 4. 6. 1. Influence de la concentration en sucres dans le jus de dattes sur l'évolution du pH.....	62
VI. 4. 6. 2. Influence de la température sur l'évolution du pH	66
 CONCLUSION	 68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70
ANNEXES	

Fig. 1 : La structure moléculaire : A- Chitine et B- Cellulose	4
Fig. 2 : structure moléculaire et représentation conventionnelle de l' α - chitine.....	5
Fig. 3 : structure moléculaire et représentation conventionnelle de la β - chitine.....	6
Fig. 4 : La représentation conventionnelle de la γ -chitine.....	6
Fig. 5 : Inclusion des fibrilles de chitine dans la matrice protéique.....	8
Fig. 6 : Fabrication de la chitine et de ses dérivés.....	13
Fig. 7 : La structure chimique du chitosane.....	14
Fig. 8 : Structure chimique du carboxyméthyl chitine.....	15
Fig. 9 : Structure chimique du N, O carboxyméthyl chitosane.....	15
Fig. 10 : Structure chimique du N- carboxyméthyl chitosane.....	16
Fig. 11 : Liaison covalente probable dans le complexe chitine- protéine.....	24
Fig. 12 : Modes de récupération de la chitine et du chitosane par la méthode chimique.....	25
Fig. 13 : Schéma présentant la récupération de la chitine par voie biologique.....	27
Fig.14 : Spectre infra rouge de la carapace brute de <i>Parapenaeus longirostris</i>	43
Fig. 15 : Influence de la concentration initiale en glucose sur l'évolution du pH.....	46
Fig.16 : Influence de la concentration initiale en glucose sur la déprotéinisation et la déminéralisation de la carapace.....	46
Fig. 17 : Evolution de la concentration des protéines dans le milieu de fermentation.....	47
Fig. 18 : Spectres infra rouge de la carapace brute (a) et de la carapace déprotéinisée (76%) avec 80 g/l en glucose.....	49
Fig. 19 : Influence de la stérilisation de la carapace sur l'évolution du pH du milieu de fermentation.....	50
Fig. 20 : Influence de la stérilisation sur la déminéralisation et la déprotéinisation du déchet de crevette.....	51
Fig. 21 : Influence de fortes concentrations en glucose sur l'évolution du pH du milieu de fermentation en milieu non stérile.....	52
Fig. 22 : Evolution du pH, de la concentration en glucose et de la biomasse (densité optique) en fonction du temps :(a) [glucose] ₀ = 200 g/l, b) [glucose] ₀ = 400 g/l, c) [glucose] ₀ = 500 g/l).....	53
Fig. 23 : Courbes d'évolution du pH et de la concentration en ammoniacque en fonction	

du temps à différentes concentrations initiales en glucose : 200 g/l (a), 400 g/l (b), 500 g/l(c).....	55
Fig. 24 : Courbes d'évolution du pH, de la concentration en glucose et de la biomasse (DO) (a) du pH, de la concentration en ammoniacque et des protéines (b) en fonction du temps	56
Fig. 25 : Evolution de la croissance bactérienne en fonction du temps à différentes concentrations initiales en glucose.....	57
Fig. 26 : Taux de déminéralisation et de déprotéinisation en fonction de fortes concentrations initiales en glucose.....	58
Fig. 27 : Spectres infra rouge de la carapace brute (a) et de la carapace déminéralisée (53%) avec 300 g/l en glucose (b)	59
Fig. 28 : Influence de la température sur l'évolution du pH en fonction du temps pour une concentration en 300 g/l.....	60
Fig. 29 : Taux de déminéralisation et de déprotéinisation en fonction de la température d'incubation avec 300 g/l en glucose.....	61
Fig. 30 : Influence du pH initial sur l'évolution du pH du milieu de fermentation en fonction du temps à 30 °C.....	62
Fig. 31 : Evolution du pH du milieu en fonction du temps à différentes concentrations en jus de dattes à 30°C.....	63
Fig. 32 : Influence de la concentration initiale en sucres sur les taux de déprotéinisation et déminéralisation de la carapace non stérilisée.....	64
Fig. 33 : Evolution du pH, de la concentration en ammoniacque et des protéines en fonction du temps à différentes concentrations en sucres réducteurs (a) 80g/l, b) 100g/l, c) 150g/l à température d'incubation 30°C.....	65
Fig. 34 : Evolution du pH en fonction du temps à différentes températures d'incubation avec 208 g/l en sucres réducteurs.....	66
Fig. 35 : Taux de déminéralisation et de déprotéinisation de la carapace en fonction de la température avec 208 g/l en sucres réducteurs.....	67

Tableau 1 : Le pourcentage de chitine chez certains crustacés, insectes, mollusques et champignons.....	7
Tableau 2 : La production de crustacés dans le monde.....	9
Tableau 3 : La production de crustacés en Algérie.....	10
Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques de la carapace.....	42
Tableau 5 : La composition de jus des dattes Deglet- Nour.....	44

Introduction

Introduction

Nous vivons dans un monde où l'industrialisation est en constant essor. Ce phénomène nous a poussé à abuser des ressources disponibles et à consommer de façon démesurée. Les hommes ont trop longtemps pensé en terme de profits sans se soucier des torts causés à l'environnement. Les effets de cette production industrielle massive et de cette consommation abusive sont trop souvent la génération de grandes variétés et quantités de déchets.

Les industries de transformation des pêches situées en bordure des côtes génèrent à chaque année plusieurs millions de tonnes de carapaces d'invertébrés marins riches en chitine. Ces résidus chitineux sont soit rejetés à la mer, créant un problème de pollution autour des usines, ou simplement enfouis dans le sol. La stratégie de revalorisation des déchets occupe une place prépondérante.

La chitine est le polymère le plus répandu dans la nature après la cellulose. Ce polymère hautement hydrophile est présent dans la cuticule ou exosquelette des insectes, dans la paroi des champignons et de certaines algues chlorophycées, mais surtout dans les carapaces d'invertébrés marins et d'eau douce comme les crevettes, crabes, homards, Krill. Les carapaces les plus exploitées sont celles des crevettes et des crabes à cause de leur teneur élevée en chitine qui représente 14%-27% et 13%-15% respectivement (No *et al.*, 1989).

Dans certains pays (Japon, Etats-Unis, etc), les résidus chitineux commencent à être revalorisés. Des usines d'extraction et de production de la chitine et du chitosane ont été mises au point. On utilise ces produits ou leurs dérivés notamment en agriculture, dans l'industrie des cosmétiques, dans l'alimentation, dans le domaine de la santé, dans le traitement des déchets, etc. (Leclerc, 1997). La production industrielle de la chitine à partir des déchets de pêche, pourrait atteindre, selon la F.A.O (Food and Agricultural Organization), 36700 tonnes par an (Dubrana, 1992).

L'extraction de la chitine passe par deux étapes : la déminéralisation et la déprotéinisation. Cette isolation peut se faire par deux méthodes : chimique et biologique. La méthode chimique nécessite l'utilisation des acides et des bases, alors que la méthode biologique fait appel à des bactéries lactiques. Ces bactéries ont la capacité de produire l'acide lactique conduisant ainsi à la déminéralisation et d'excréter des enzymes protéolytiques conduisant à la déprotéinisation des carapaces de crustacés.

L'objectif de ce travail vise à extraire la chitine à partir de la crevette blanche *Parapenaeus longirostris* par fermentation lactique en utilisant une bactérie thermophile *Lactobacillus helveticus*. La réalisation de cette étude a nécessité :

- 1- la revivification des bactéries lactiques.

Introduction

2- l'optimisation des paramètres physico-chimiques choisis : la concentration initiale en glucose, la stérilisation, la température d'incubation et le pH initial du milieu de fermentation pour une déminéralisation (DM) et une déprotéinisation (DP) maximales de la carapace.

3- l'utilisation d'une source de carbone naturelle : le jus de dattes à la place du substrat carboné pur puis la comparaison des rendements d'extraction (DM et DP) avec celui obtenu en utilisant le glucose.

Ce mémoire s'organise en deux parties :

A) Une partie théorique qui regroupe des généralités sur la chitine et ses différents dérivés (chapitre I), leurs applications (chapitre II) ainsi que les différentes méthodes d'extraction de la chitine (chapitre III). Enfin, une synthèse bibliographique sur les bactéries lactiques et les différents travaux d'extraction de chitine par voie biologique cités dans la bibliographie (chapitre IV).

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

Partie bibliographique

Partie bibliographique

Chapitre I

La chitine et ses dérivés

I. 1. Historique

La chitine fut isolée pour la première fois en 1811 par le Professeur *H. BRACONNOT*, Directeur du jardin botanique de l'Université de Nancy en France. Il obtient, à partir du champignon *Agaricus volvaccus* (Seda et *al.*, 2004), une substance fibreuse résistante aux solutions alcalines concentrées et insoluble dans les solutions acides, telles que l'acide sulfurique. Le composé qu'il nomma «fungine» était, toutefois, un mélange de chitine et d'un autre polysaccharide non azoté (Mrunal, 2004). En 1823, le scientifique Français *ODIER* isola un résidu insoluble et qu'il appela «chitine» (du Grec *Khitōn* qui signifie enveloppe) (Kramer et *al.*, 1985) à partir des carapaces de scarabées par des traitements répétés avec des solutions chaudes de KOH (Poirier, 2000).

En 1859, le Professeur *C. ROUGET* a fait subir à la chitine un traitement alcalin produisant ainsi une substance qui est, à la différence de celle-ci, soluble dans les acides. Mais ce n'est qu'en 1894 que *H. SEYLER* nomma cette substance «chitosane» (Mrunal, 2004). En 1879, *LEDDERHOSE* a proposé de produire la chitine avec du glucosamine et de l'acide acétique. Cette composition chimique a été confirmée par *E. GILSON* en 1894 (Kramer, 1985).

La chitine, le chitosane et la cellulose ont été confondus pendant longtemps. En 1886, *TIEMANN* confirma la présence d'un groupement amine sur le carbone 2 de la configuration D-glucose du chitosane. Ce n'est qu'en 1912 que *BARCH* et *VON FÜRTH* conclurent que la chitine était un N-acétyl-D-glucosamine polymérisé (Poirier, 2000).

Durant les années 1930 et 1940, ces biopolymères de glucosamine ont été principalement appliqués dans le domaine médical et le traitement des eaux usées. Mais ce n'est qu'en 1970 que ces polymères ont suscité un réel intérêt ayant pour résultat, la première conférence de chitine-chitosane qui a eu lieu aux Etats-Unis (Boston) en 1977 (Muzzarelli et Riccardo, 1983).

Les travaux de *MUZZARELLI* durant l'année 1980, ont considérablement amélioré la compréhension de ces matériaux. Aujourd'hui, on connaît que la chitine et le chitosane, appelés aussi substances chitineuses, sont des sources renouvelables et abondantes dans la nature, elles font l'objet de plusieurs études et ont retenu l'attention en tant que candidat pour

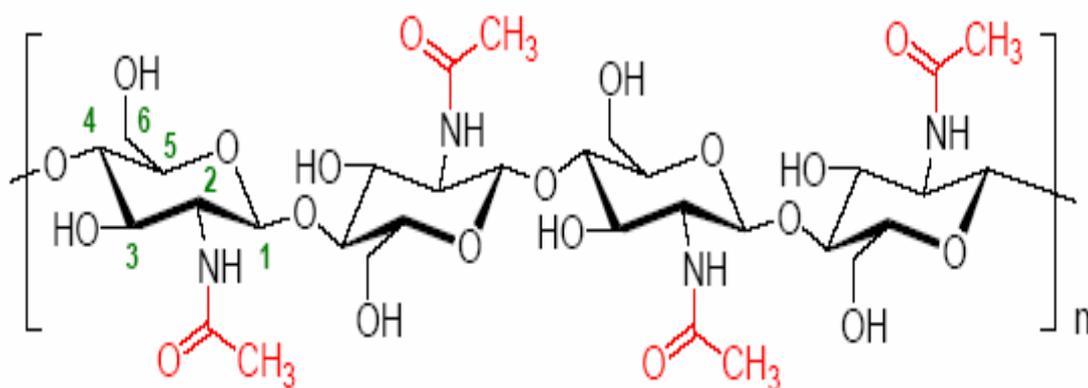
plusieurs applications en médecine (antitumoral, antiviral, antimicrobien,...), dans le traitement des eaux (adsorption des métaux lourds,...), en biotechnologie, etc (Mrunal, 2004).

I. 2. La chitine

I. 2. 1. Définition de la chitine

La chitine est, après la cellulose, le polysaccharide le plus répandu dans la nature. C'est un copolymère constitué d'une chaîne linéaire d'unités de 2-acétamido-2-desoxy-D-glucose et 2-amino-2-desoxy-D-glucose ($C_8H_{12}O_5N$)_n avec $n \gg 1$ (Kramer *et al.*, 1985), liées entre elles par des liaisons osidiques β (1-4) (A) (Kittur *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2003). Il s'agit donc, d'un composé dont la structure se rapproche de celle de la cellulose (Morimoto *et al.*, 2002) (B) (Fig. 1).

A



B

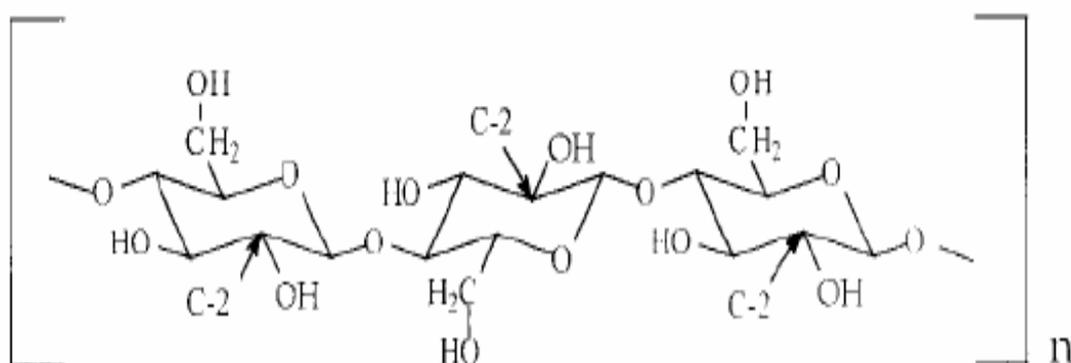


Fig. 1 : Les structures moléculaires : **chitine (A)** et **cellulose (B)**

(Onar et Sariisik, 2000; Mrunal, 2004)

Chapitre I : La chitine et ses dérivés

La chitine possède une structure cristalline et constitue un réseau de fibres organisées, elle confère une rigidité et une résistance aux organismes qui en contiennent (Montserrat, 2002). Les différents organismes qui la synthétisent sont présents dans de très nombreux écosystèmes, autant terrestres qu'aquatiques. Sa production annuelle par biosynthèse est de 10^{10} à 10^{11} tonnes (Hobel, 2004).

L'analyse aux rayons X montre que la chitine est une substance polymorphe qui se rencontre sous trois formes : α , β , γ et dont la différence réside dans l'orientation des chaînes polysaccharidiques (Tabaoda et al., 2003), le degré d'hydratation, la taille de la cellule unitaire et le nombre de chaîne de chitine par cellule unitaire (Merzendorfer and Zimoch, 2003; Allache, 2005).

La forme α (Fig. 2) constituée de chaînes antiparallèles (Minke et Blackwell, 1978 ; Pawadee et al., 2003) représente la forme la plus répandue et la plus stable dans la nature (Svitil et al., 1997). Elle est rencontrée chez les mollusques, les planctons et dans les cuticules des arthropodes tels que les crustacés (crevettes, crabes, langoustes,...) et dans la paroi des champignons (levures et moisissures) (Zhang et al., 2000 ; Hobel, 2004).

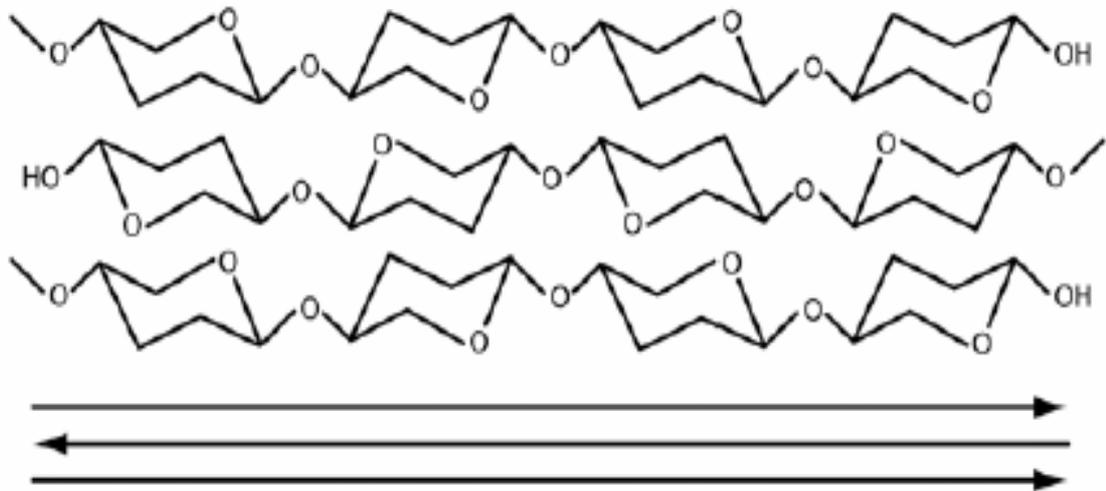


Fig.2 : Structure moléculaire et représentation conventionnelle de l' α - chitine
(Tharanathan et Kittur, 2003)

La forme β (Fig. 3) caractérisée par un alignement parallèle des chaînes polysaccharidiques (Tomoya et al., 2003) représente la forme la moins stable et la plus dégradable de la chitine (Manisara et al., 2003). Elle est rencontrée chez les mollusques tels que les calmars, les cocons d'insectes ainsi que la paroi des champignons (Hobel, 2004).

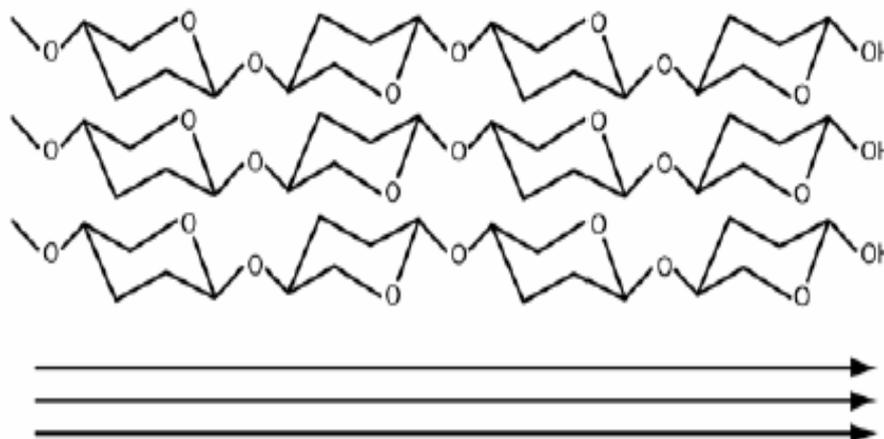


Fig. 3 : Structure moléculaire et représentation conventionnelle de la β - chitine
(Tharanathan and Kittur, 2003)

La forme γ constituée d'un mélange de chaînes parallèles et antiparallèles (Fig. 4), est rencontrée dans l'estomac du calmar *Loligo sp* (Hobel, 2004) et les cocons des insectes (Falini et *al.*, 2003).

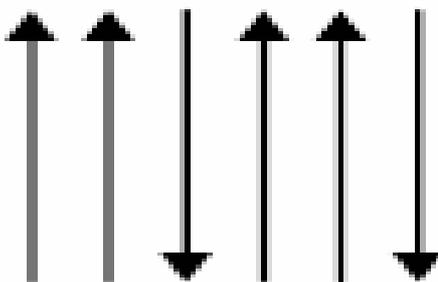


Fig. 4 : La représentation conventionnelle de la γ -chitine
(Donadel, 2004)

I. 2. 2. Les sources de chitine

La chitine se retrouve naturellement dans les téguments d'insectes, de nématodes et d'invertébrés marins. On en retrouve, également, dans la paroi cellulaire de certaines algues et dans la paroi des champignons (Kamst et Spaink, 1999 ;Gogev et *al.*, 2003). Cependant, le pourcentage de chitine présente chez ces différents organismes varie en fonction de l'espèce et la région (Mrunal, 2004) (Tableau 1).

Chapitre I : La chitine et ses dérivés

Tableau 1 : Le pourcentage de chitine chez certains crustacés, insectes, mollusques et champignons (Hobel, 2004)

Organismes	% de chitine	Organismes	% de chitine
<u>Crustacés :</u>		<i>bombyx</i> (ver de soie)	44,2 ^c
<i>cancer</i> (crabe)	72,1 ^c	<i>calleria</i> (ver à cire)	33,7 ^c
<i>carcinus</i> (crabe)	64,2 ^b	<u>Mollusques :</u>	
<i>paralithodes</i> (crabe royal)	35,0 ^b	Palourde	6,1
<i>callinectes</i> (crabe bleu)	14,0 ^a	Coquille des huîtres	3,6
<i>crangon</i> (crevette)	69,1 ^c	Stylo de calmar	41,0
crevette d'Alaska	28,0 ^d	Krill, carapace déprotéinée	40,2
<i>nephros</i> (langouste)	69,8 ^c	<u>Champignons :</u>	
<i>homarus</i> (langouste)	60- 75 ^c	<i>Aspergillus niger</i>	42,0 ^e
<i>lepas</i> (bernacles)	58,3 ^c	<i>Penicillium notatum</i>	18,5 ^e
<u>Insectes :</u>		<i>Penicillium chrysogenum</i>	20,1 ^e
<i>Periplaneta</i> (cafard)	2,0 ^d	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,9 ^e
<i>Blatella</i> (cafard)	18,4 ^c	<i>Mucor rouxii</i>	44,5
<i>Cleoptera</i> (coccinelle)	27- 35 ^c	<i>Lactarius vellereus</i>	19,0
<i>Diptera</i>	54,8 ^c		
<i>Pieris</i> (papillon)	64,0 ^c		

a : par rapport au poids frais de l'organisme.

b : par rapport au poids sec de l'organisme.

c : par rapport au poids organique de la cuticule.

d : par rapport au poids total de la cuticule.

e : par rapport au poids sec de la paroi cellulaire.

Dans la cuticule des arthropodes et précisément les crustacés, la chitine est associée à des composés protidiques variés qui lui donnent une consistance rigide, molle ou élastique (Grassé, 1979). La chitine est disposée en lits de fibres incluses dans la matrice protéique (Fig. 5) (Hamodrakas et *al.*, 2002).

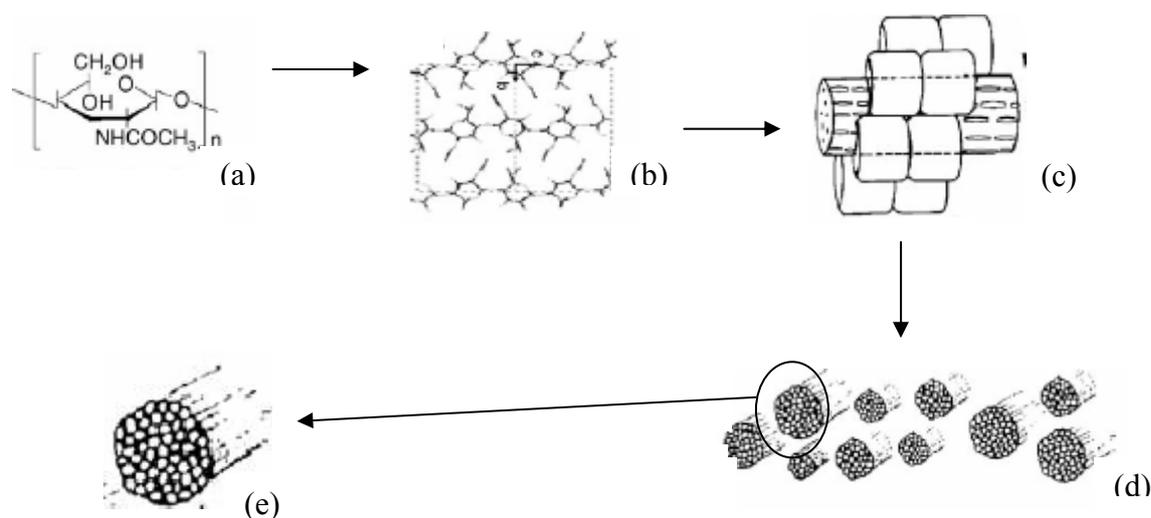


Fig. 5 : Enchâssement des fibrilles de chitine dans la matrice protéique (Raabe et *al.*, 2006)

L'alignement antiparallèle des molécules de chitine (a) donne naissance à α chitine (b). L'arrangement de 18 à 25 chaînes de chitine forme de longues unités cristallines entourées par une gaine protéique protectrice (6 hélices) (Kramer et *al.*, 1985), et produit une nano-fibrille de 2-5 nm de diamètre et de 300 nm de longueur (c). Les nano-fibrilles se regroupent pour former de longues fibres de chitine-protéine (d) de 50-250 nm de diamètre (Raabe et *al.*, 2006).

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

La chitine peut être extraite à partir des trois sources à savoir : les crustacés, les micro-organismes et les insectes. Cependant, la principale source de chitine exploitée commercialement demeure néanmoins les carapaces d'invertébrés marins et d'eau douce comme les crevettes, les crabes, les homards et les krill qui sont fournis en grandes quantités par l'industrie de transformation alimentaire des crustacés. Pour ces industries, les téguments sont un véritable déchet et leur utilisation est une forme de revalorisation de la biomasse.

Les champignons utilisés par l'industrie de la fermentation sont une deuxième source de chitine exploitée commercialement. Ces industries produisent, entre autres, des

Chapitre I : La chitine et ses dérivés

antibiotiques et de l'acide citrique. Dans ce cas, la chitine est extraite des parois des microorganismes après leur utilisation en fermenteur (Plouffe, 1997).

Chez les insectes, la chitine constitue 1,4% du poids frais de l'animal, ce qui explique l'absence d'exploitation (Kiefer, 1999).

Les crustacés peuvent être définis comme des arthropodes mandibules, antennates à respiration branchiale, la cuticule contient approximativement 30-40% de protéines, 20-30% de chitine, 50% de carbonate de calcium et 5-19% de phosphate de calcium et de magnésium (Beaumont et Cassier, 2000 ; Fernandez-Kim, 2004). Les carapaces les plus exploitées sont celles des crevettes et des crabes à cause de leur teneur élevée en chitine qui représente 14-2% et 13-15%, respectivement (No et *al.*, 1989).

Selon les données de la F.A.O, la production mondiale des crustacés est de 8.856.341 tonnes métriques en 2003, avec prédominance de la production de crevette qui est de 5.238.843 tonnes métriques (Tableau 2) (FAO, site électronique consulté le 02/03/2006).

Tableau 2 : La production de crustacés dans le monde (FAO, site électronique consulté le 02/03/2006).

	2000	2001	2002	2003
Crustacés d'eau douce	1.052.305	1.221.011	1.479.719	1.066.931
Crabes (araignées de mer)	1.233.194	1.247.914	1.301.775	1.506.925
Homards et langoustes	227.669	221.796	224.913	224.109
Crevettes	4.241.001	4.288.465	4.348.146	5.328.843
Krill, crustacés planctoniques	114.430	104.218	125.987	117.120
Crustacés marins divers	1.406.201	1.466.886	1.410.288	567.629

En Algérie, la production de crevette prédomine également celle des autres crustacés. Cette production a atteint 2550-2695 tonnes métriques en 2002-2003, respectivement (Tableau 3).

Chapitre I : La chitine et ses dérivés

Tableau 3 : La production de crustacés en Algérie (FAO, site électronique consulté le 02/03/2006).

	2000	2001	2002	2003
Homards et langoustes (tonnes métriques)	125	79	102	110
Crevette (tonnes métriques)	3812	2849	2550	2695
Crustacés marins divers (tonnes métriques)	308	222	297	315

Toutes ces données justifient l'utilisation des déchets de crevette comme source de chitine. Bien que, la production algérienne des crevettes soit faible par rapport à la production mondiale, la valorisation de ces déchets est toujours utile surtout lorsqu'il s'agit de la récupération d'un biopolymère tel que la chitine qui possède un vaste champ d'application (**Chap. II**).

I. 2. 3. Les propriétés de la chitine

La chitine est un polysaccharide azoté, basique, cationique, de couleur blanchâtre et non toxique. Elle est caractérisée par sa rigidité, sa faible réactivité chimique, ses propriétés biologiques et physico-chimiques (Majeti et *al.*, 2000 ; Morimoto et *al.*, 2002 ; Mrunal, 2004).

I. 2. 3. 1. Les propriétés biologiques

- **La biodégradabilité** : la dégradation biologique de la chitine est réalisée par une série d'enzymes : chitinases, lysozyme et glucanases (Shigemasa et *al.*, 1994 ; Chih-Min et *al.*, 2002 ; Yang et *al.*, 2004). Parmi les chitinases, les endo-chitinases (Laura et *al.*, 2006) hydrolysent le polymère de façon aléatoire pour produire des dimères et des trimères de N-acétylglucosamine (NAG), tandis que les exo-chitinases (Laura et *al.*, 2006) hydrolysent la chitine de haut poids moléculaire en produisant uniquement des dimères de NAG. Finalement, les N-acétylglucosaminidases aussi appelées chitobiasés ou N-acétyl hexoaminidases hydrolysent les dimères de NAG et parfois le NAG des extrémités non-réductrices des chaînes de chitine pour produire des monomères de NAG (Plouffe, 1997).

- **La biocompatibilité** : sa présence dans l'organisme vivant n'induit aucun effet néfaste à la santé du receveur (Foscolo et Phillipon, 1997 ; Bal et *al.*, 2006).

- **Effets bactériostatique et bactéricide** (Morimoto et *al.*, 2002).

I. 2. 3. 2. Les propriétés physico-chimiques : Ces propriétés influencent l'utilisation industrielle de la chitine.

-Le degré d'acétylation (DA) : c'est un des plus importants caractéristiques de la chitine (Muzzarelli et Riccardo, 1980). Il est défini comme étant le nombre de groupe N-acétylglucosamine présent sur le polymère par rapport au nombre total d'unités (Montserrat, 2002).

On parlera de chitine lorsque DA est supérieur à 70% (Kiefer, 1999). Cependant, une désacétylation peut avoir lieu au cours de l'extraction de la chitine, on parle alors du degré de désacétylation qui varie en fonction de l'origine et la méthode d'extraction de la chitine (Kurita, 2001).

Le degré de désacétylation (DD), défini comme étant le nombre de groupes D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités, est relié au DA ($DD = 100 - DA$). C'est un paramètre structural important qui influence les propriétés physico-chimiques de la chitine (poids moléculaire, viscosité, solubilité, l'activité physiologique, la réactivité chimique et la biodégradabilité,...) (Suzuki et *al.*, 1990 ; Kittur et *al.*, 2002).

Afin de déterminer le degré d'acétylation avec une plus grande précision, plusieurs techniques ont été testées. La technique qui semble la plus adaptée pour une caractérisation rapide est la spectroscopie infrarouge (Muzzarelli et *al.*, 1980 ; Montserrat, 2002).

- La solubilité : malgré la similarité structurale, la chitine est insoluble dans les solvants usuellement utilisés pour la cellulose (solutions aqueuses d'hydroxyde de cuprammonium, de cupriéthylènediamine et de cadoxen) (Poirier, 2000). Elle est fortement hydrophobe et insoluble dans les solvants organiques usuels à cause de sa structure cristalline (Morimoto et *al.*, 2002). Elle se dissout dans quelques solvants corrosifs et toxiques tels que : hexafluoroisopropanol, hexafluoroacétone, chloroalcools en présence d'acides minéraux. 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, ces solvants provoquent sa dégradation (Gagné, 1993).

Les mélanges N,N- diméthylacétamide (DMAc)/ LiCl et N- méthylpyrrolidone (NMP)/ LiCl utilisés également pour la solubilisation de la chitine furent découverts en 1977.

RUTHERFORD et AUSTIN comparèrent l'efficacité de ces deux systèmes de solvants à plus de 200 autres systèmes potentiels. Ils conclurent que DMAc/ LiCl et NMP/ LiCl présentaient des propriétés les plus intéressantes pour la solubilisation de la chitine. A température ambiante, ces systèmes engendrent ni dégradation ni modification chimique. Une solution de chitine dans DMAc/ LiCl 5% (poids/poids) peut conserver sa viscosité initiale pendant 48 jours. Plusieurs études par RMN démontrent qu'il n'y a pas de réaction entre la chitine et DMAc/ LiCl 5%, donc il s'agit d'un vrai solvant de la chitine. On peut utiliser DMAc/ LiCl (4-9%) pour différentes méthodes de mesure de masse moléculaire (viscosimétrie, chromatographie d'exclusion stérique et diffusion de la lumière), pour la synthèse de dérivés de chitine en conditions homogènes et aussi pour la préparation de fibres, de films (Poirier, 2000) et de membrane à base de chitine pour la microencapsulation (Roderick, 1998).

La solubilité de la chitine dans DMAc/ LiCl semble dépendre du degré d'acétylation. Plus le degré d'acétylation est élevé, plus le pourcentage de solubilité est élevé. Cela démontre l'importance du groupement N-acétyl dans le mécanisme de solubilisation.

- **Le poids moléculaire :** la définition du poids moléculaire des polysaccharides et la compréhension de ses conséquences sur les propriétés physico-chimiques, ont présenté un vrai défi aux chimistes pendant un certain nombre d'années. Dans le cas de la chitine, la connaissance de tel paramètre est très importante pour les usages industriels (Montserrat, 2002). Il varie entre 1,03 et 2,5 MDa (Fernandez-Kim., 2004).

I. 3. Les dérivés de la chitine

L'hydrophobicité de la chitine limite son utilisation (Manisara et *al.*, 2003 ; Freier et *al.*, 2005). Pour y remédier, des dérivés de chitine ont été mis en évidence par modification de sa structure chimique. Ces modifications peuvent être une désacétylation par élimination du radical acétyl, une substitution du polymère avec un composé chimique ou une réaction d'hydrolyse (Fig.6).

La chitine est modifiée pour obtenir des polysaccharides amphiphiles de structure contrôlée qui peuvent être cationiques (chitosane) ou anioniques (carboxyméthyle chitine) (Desbrières, 2003).

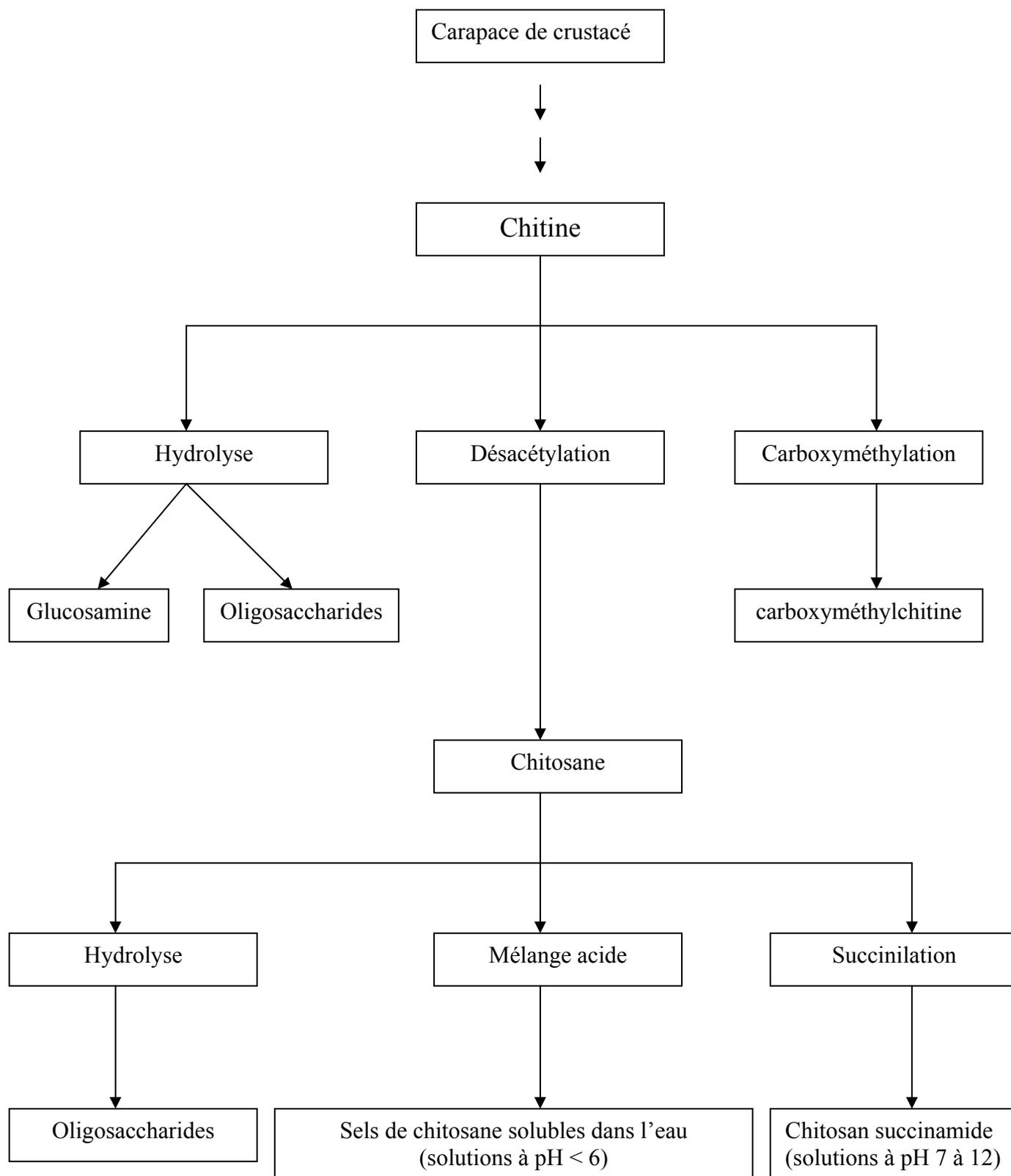


Fig. 6 : Fabrication de la chitine et de ses dérivés

(www.France-chitine.com/fab.e.htm)

I. 3. 1. Le chitosane

Le chitosane est un copolymère cationique, constitué d'unités de β (1-4) 2-amino-2-desoxy-D-glucose (D-glucosamine) et β (1-4) N-acétyl-2-amino-2-desoxy-D-glucose (Graham et Mark, 1995 ; Hitoshi et Yoshihiro, 1999 ; Berger et *al.*, 2004) (Fig. 7). Ce polymère est rarement rencontré chez les micro-organismes, sauf chez certains types de champignons tels que les zygomycètes où il se trouve en abondance (Nadarajah et *al.*, 2001).

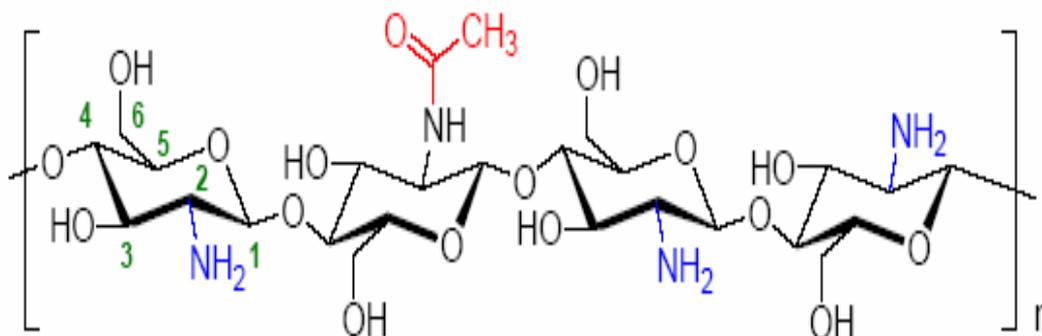


Fig. 7 : Structure chimique du chitosane (Mrunal, 2004)

Le chitosane est comme la chitine, un polysaccharide biodégradable, biocompatible (Begoña et Ruth, 1997 ; Shobhan et Lawrence, 2000 ; Preynat et *al.*, 2003), bioadhésif, non toxique (Caiqin et *al.*, 2004) et non allergénique. Il peut être caractérisé par ses propriétés intrinsèques (pureté, poids moléculaire, viscosité) et le degré de désacétylation (DD) (Lanveer et *al.*, 2002). Ce dernier varie entre 70% et 95% alors que son poids moléculaire (PM) varie entre 10-1000 KDa. Ces deux paramètres sont altérés par les conditions de la réaction et la méthode de désacétylation (Säkkinen, 2003) et modifiés par une réaction de réacétylation afin d'abaisser le DD ou une dépolymérisation acide pour diminuer le PM.

Grâce aux grands nombres de groupements aminés protonés (NH_4^+) présents sur les unités glucidiques, le chitosane est soluble dans les acides organiques dilués mais insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques usuels (Säkkinen, 2003 ; Mrunal, 2004). Il se dissout dans l'acide chlorhydrique et les acides organiques tels que l'acide formique, l'acide acétique, l'acide oxalique et l'acide lactique (Kurita, 2001), et se précipite à pH basique. Pour le rendre soluble dans l'eau, sa structure chimique a été modifiée donnant naissance à des dérivés hydrosolubles tels que : le chitosane succinamide produit par une réaction avec l'acide succinique (Kamiyama et *al.*, 1999 ; Hitoshi et Yoshihiro, 1999).

I. 3. 2. Les dérivés carboxyméthylés de la chitine et du chitosane

L'introduction d'un groupement carboxyméthyle dans le polymère de chitine ou de chitosane donne naissance à des dérivés anioniques (Kurita, 2001).

I. 3. 2. 1. La chitine :

La carboxyméthylation de la chitine par l'acide monochloroacétique dans des conditions alcalines, permet l'introduction d'un groupement carboxyle au niveau du groupement hydroxyle C₆ de la chitine (Fig.8) (Morimoto et *al.*, 2002).

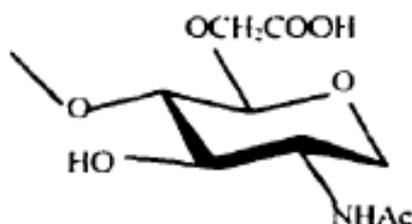


Fig. 8 : Structure chimique du carboxyméthylchitine.

Au cours de cette réaction, une désacétylation de la chitine peut avoir lieu en solution aqueuse fortement alcaline donnant naissance à des polymères amphotères, possédant à la fois des groupes carboxyméthylés et amines dont le DD peut atteindre 50% (Kurita, 2001).

I. 3. 2. 2. Le chitosane :

La réaction du chitosane avec l'acide monochloroacétique (Muzzarelli and Riccardo, 1988) dans les mêmes conditions, donne des dérivés N, O carboxyméthylés (Fig.9) (Morimoto et *al.*, 2002).



Fig. 9 : Structure chimique du N, O-carboxyméthylchitosane.

Le N-carboxyméthyle chitosane est préparé également par une réaction d'alkylation réductive qui est régiosélective c'est à dire qu'elle touche uniquement les groupes amines contrairement à la carboxyméthylation par l'acide monochloroacétique. Cette alkylation a eu lieu en faisant réagir le chitosane avec le groupement aldéhyde de l'acide glyoxilique en milieu acide (Fig.10) ((Morimoto et *al.*, 2002).

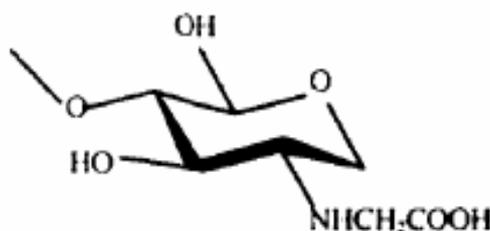


Fig. 10 : Structure chimique du N-carboxyméthylchitosane.

I. 3. 3. Les oligomères de la chitine et du chitosane

La préparation de ces oligosaccharides se fait par deux méthodes :

- **Hydrolyse chimique** : en utilisant l'acide chlorhydrique à haute température (Ferrer et *al.*, 1996).
- **Hydrolyse enzymatique** : elle a eu lieu en utilisant des chitinases (EC : 3.2.1.14) (Huang et *al.*, 2005), des chitosanases (EC : 3.2.1.99) (Yoon et *al.*, 2000 ; Acharya et *al.*, 2005), des lysozymes et des cellulases (Laura et *al.*, 2006) et la papaïne (Muzzarelli et *al.*, 1994). Elle est utilisée pour préparer des oligomères spécifiques en particulier des dimères et des oligomères de haut DP (DP > 5) (Shahidi et *al.*, 1999 ; Kurita, 2001).

Chapitre II

Applications de la chitine et ses dérivés

Chapitre II : Les applications de la chitine et ses dérivés

La chitine et ses dérivés possèdent une grande valeur économique à cause de leurs activités biologiques et leurs applications industrielles et biomédicales (Pawadee et *al.*, 2003). La production et l'utilisation industrielle de la chitine et ses dérivés augmentent continuellement depuis les années 1970. Actuellement, à cause de leurs caractéristiques telles que le poids moléculaire, la charge cationique, leur capacité à stocker la vapeur d'eau, la formation des films et l'adsorption des métaux lourds, la chitine et ses dérivés ont divers champs d'application qui s'étendent de l'agriculture, le traitement d'eau, la fabrication du papier et des produits de beauté, à l'industrie pharmaceutique et la biotechnologie (Harkness et *al.*, 2003 ; Preyanat et *al.*, 2003).

II. 1. En agriculture

La chitine, le chitosane et leurs oligomères ont des propriétés fortes intéressantes. Ils peuvent, en effet, agir comme éliciteurs des mécanismes de défense des plantes (Leclerc, 1997) et leur confère une résistance systémique face à certains agents phytopathogènes (Bouarab, 2000).

Il a été démontré que le chitosane et ses dérivés, appliqués sur les tissus des plantes provoquent :

- 1) l'induction de plusieurs mécanismes biologiques, similaires à ceux observés lors de l'infection par des pathogènes (Côté, 1999).
- 2) la synthèse de plusieurs protéinases telles les chitinases et de certaines protéases inhibitrices.
- 3) l'accumulation de phytoalexines (Muzzarelli et Riccardo, 1983; Bouarab, 2000; Lateur, 2002).
- 4) l'augmentation de la lignification dans les tissus.

Les propriétés antifongiques que confèrent la chitine et ses dérivés ont fait l'objet de plusieurs études. Leur mécanisme d'action est un relâchement des molécules de la paroi des champignons, une augmentation de la vacuolation et la désintégration des protoplasmes des hyphes. Ce qui explique pourquoi l'agent pathogène ne peut coloniser les tissus racinaires en présence de chitosane (Bell et *al.*, 1998 ; Côté, 1999 ; Laflamme, 2000).

Le chitosane permet également de prolonger le temps de conservation des fraises, des poivrons, des concombres et des tomates (El-Ghaout et *al.*, 1992), à cause de sa capacité à

former un enrobage semi-perméable (Ait Barka et *al.*, 2004) qui modifie l'atmosphère interne des fruits en retardant le vieillissement rapide et le taux de respiration (Amilali, 1999).

Ali et *al* (1997) ont observé, suite à l'ajout de matière organique chitineuse, que les feuilles et les tiges de soja accumulent plus d'azote (Côté, 1999).

II. 2. Traitement des eaux usées et protection de l'environnement

Les rejets industriels colorés présentent un problème de résistance des polluants et constituent un impact pour l'environnement. En effet, la présence dans ces rejets des substances organiques ou minérales non biodégradables, voire toxiques, engendre un impact négatif sur le milieu récepteur (sol, cours d'eau, mer,...) (Gülbahar et *al.*, 2007), ce qui impose leur traitement avant de les évacuer dans ce milieu. En particulier, les colorants contenus dans les effluents des textiles nécessitent des techniques physico-chimiques pour les dégrader telles que : la coagulation-floculation, oxydation, ultrafiltration, ...). Cependant, l'utilisation de ces techniques reste limitée à cause du coût de traitement élevé ou des difficultés de gestion des boues qui en résultent. L'utilisation des substances chitineuses (chitine et chitosane) pour la décoloration des effluents par adsorption et par coagulation-floculation constitue une alternative aux différentes techniques de dépollution précédemment citées (Joseph et Laszlo, 1994 ; Elisane et *al.*, 1998 ; Bribri et *al.*, 2005).

La chitine, le chitosane et leurs dérivés sont également caractérisés par leur grande capacité d'adsorber des ions métalliques (Jaroslaw et *al.*, 2005) tels que les ions Cd^{2+} (Benguella et Benaissa, 2002), et les ions Cu^{2+} (Bal et *al.*, 2006; Taboada et *al.*, 2003). Leur capacité à former des complexes avec des ions métalliques a été exploitée au Japon pour la purification des eaux (Shahidi et *al.*, 1999).

Les dérivés du chitosane : N- 2-pyridyl- méthyl- chitosane (PMC), N- 2- thiényl-méthyl-chitosane (TMC) et N- 3- méthyl-thiopropyl chitosane (MTPC) peuvent sélectivement adsorber des métaux précieux tels que : l'or (III), palladium (II) et platinium (IV) dans l'acide chlorhydrique (Yoshinari et *al.*, 1998). Le pouvoir chélateur de ces substances (Muzzarelli et Riccardo, 1970 ; Laurance et Mansur, 1980) est expliqué par la présence de groupement acétylamine ($NHCOH_3$) et le groupement amine ($-NH_2$) sur les polymères chitine et chitosane, respectivement (Mrunal, 2004).

Chapitre II : Les applications de la chitine et ses dérivés

Selon Bailey et ses collaborateurs (1999), le chitosane possède une affinité exceptionnelle pour l'adsorption des ions métalliques, avec une capacité supérieure à 1mmol de métal/g, pour la plupart des métaux lourds tels que l'arsenic.

En plus des métaux lourds, la chitine et ses dérivés peuvent être utilisés pour l'élimination des nitrates (Jaafari et *al.*, 2001) et la pré-concentration du phénol et chlorophénol dans l'eau (Rhee Jae- Seong et *al.*, 1998).

II. 3. Applications biomédicales et pharmaceutiques

II. 3. 1. En chirurgie

Les substances chitineuses ont la particularité de résister à la bile, aux jus pancréatiques et aux urines, ce qui justifie la fabrication des fils de suture en chitine (Wachter, 1998).

II. 3. 2. En ingénierie tissulaire

Le chitosane potentialise la différenciation des cellules ostéoprogenitrices et facilite la formation osseuse *in vitro* (Klokkevold, 1995). L'induction de la formation osseuse est aussi observée *in vivo*. Elle semble être favorisée par l'attraction des facteurs de croissance grâce aux propriétés poly cationiques du chitosane. Il constitue aussi un bon agent ostéoconducteur lors des chirurgies dentaires (Côté, 1999).

Dans un modèle de reconstitution tissulaire, Muzzarelli (1999) a montré que l'utilisation du chitosane active les macrophages et stimule les fibroblastes conduisant ainsi, à la formation de tissus vascularisés et physiologiquement normaux qui accélèrent la cicatrisation (Muzzarelli and Riccardo, 1983). Des analyses histologiques après implantation chez le rat, au niveau musculaire, ont montré une bonne tolérance des particules de chitosane par les tissus environnants (Côté, 1999). Il améliore également l'hémostase (Nettles, 2001).

II. 3. 3. En ophtalmologie

Les hydrogels sont de formes semi-solides susceptibles d'augmenter le temps de contact avec les tissus oculaires et d'améliorer la biodisponibilité des médicaments administrés localement comparativement aux collyres conventionnels. Le chitosane, utilisé jusqu'alors pour la fabrication de nombreuses formes pharmaceutiques (comprimés, injectables, formes nasales), a été choisi comme véhicule pour la mise au point d'hydrogels ophtalmiques (Felt, 1999 ; Morfin et *al.*, 2002).

II. 3. 4. Traitement du cancer

Les chitosanes, seuls ou en complexe avec un polymère anionique, sont un excellent support pour le transport et le relargage lent de principes actifs médicamenteux (Gogev et *al.*, 2003 ; Jae-Young et *al.*, 2006).

La biodégradabilité de ces biopolymères a permis de fabriquer des dispositifs plus précis, libérant des substances actives à la vitesse et à l'endroit choisis (Foscolo et Phillipon, 1997).

La bio adhésion est aussi une propriété d'utilité non négligeable dans l'utilisation du chitosane dans la libération d'agents thérapeutiques. Elle vise à augmenter le temps de résidence du système polymère/médicament et sa stabilité, par attachement du polymère à la surface ciblée et permettre ainsi une optimisation de l'assimilation médicamenteuse. Cette propriété est conférée par le caractère poly ionique. En fait, plus la densité de charge est importante, meilleure est l'adhésion du polymère (Côté, 1999).

Le chitosane a été abondamment utilisé comme excipient de base pour des formes injectables. La majorité des recherches dans ce domaine est axée sur l'utilisation du polysaccharide dans des formes galéniques de type microsphères ou conjugués macromoléculaires chargés en principes actifs appartenant à la classe des antinéoplasiques (mitoxantrone, 5-fluorourcile, cisplatine, cytrabine et paclitaxel) (Felt, 1999 ; Anand et Ramesh, 2004).

II. 3. 5. Contrôle de l'hypercholestérolémie et du surplus de poids

Le chitosane a des propriétés hypercholestérolémiantes dans le serum et le foie (Ousamu et *al.*, 1994 ; Kim Se-Jae et *al.*, 1999), anti-ulcères, anti-arthriques et anti-uricémies. Le chitosane alimentaire réagit dans l'intestin et se lie avec les acides gras et autres lipides comme les triglycérides, les stérols, le cholestérol et les acides biliaires. Ces nouveaux composés chitosane-lipides sont fortement excrétés et réduisent d'autant la réabsorption intestinale (Muzzarelli et Riccardo, 1983 ; Muzzarelli, 1999).

Le chitosane est partiellement métabolisé par les bactéries de l'intestin et libère de la glucosamine et du N-acétylglucosamine, deux produits reconnus pour soulager l'arthrose (Muzzarelli, 1999).

II. 3. 6. Activation du système immunitaire

Les chitosanes peuvent également déclencher la production du TNF α (Tumor Necrosis Factor) par les monocytes humains via les récepteurs lipopolysaccharidiques (Otterlei et *al.*, 1994). En outre, il a été démontré qu'un chitosane partiellement désacétylé augmente l'activité cytolytique des macrophages péritonéaux. Enfin, il stimule également la production d'IL-1 (interleukine-1) par les macrophages péritonéaux chez la souris (Gogev et *al.*, 2003).

L'efficacité du chitosane comme adjuvant (substance qui, lorsqu'elle est administrée en même temps qu'un antigène, augmente la réponse immunitaire à cet antigène) en vaccination est bien établie actuellement (Gogev et *al.*, 2003). De plus, le chitosane a la capacité d'activer le complément qui intervient dans la défense immunitaire humorale non spécifique (Benesch, 2001).

Outre la formulation soluble de chitosane, de ses sels et dérivés, des nanoparticules et microparticules de chitosane ont été également administrés par voie intranasale (Soane et *al.*, 2001). Il a été démontré que des nanoparticules faites de chitosane étaient efficaces pour augmenter l'absorption nasale d'insuline chez le lapin, le rat et le mouton (Gogev et *al.*, 2003).

II. 3. 7. Activité anticoagulante

Au niveau sanguin, la chitine, le chitosane et leurs dérivés poly sulfatés ont des propriétés anticoagulantes, grâce à leurs structure proche de l'héparine, ils se comportent comme cette dernière en inhibant directement l'activité de la thrombine (Benesch, 2001 ; Preyanat et *al.*, 2003 ; Jayakumar et *al.*, 2006), et ne produisent ni hémolyse ni altération des lymphocytes et érythrocytes (Côté, 1999).

II. 4. Activité antimicrobienne

Le chitosane et ses dérivés inhibent la croissance d'une variété de microorganismes (bactéries et champignons). L'avantage que présente ces biopolymères par rapport aux autres désinfectants c'est qu'ils soient biodégradables et présentent une faible toxicité vis-à-vis des cellules des mammifères (Xiao et *al.*, 2001).

Chapitre II : Les applications de la chitine et ses dérivés

Aujourd'hui, l'activité antimicrobienne du chitosane et ses dérivés est bien déterminée, mais leur mode d'action reste inconnu (Jae-Young et *al.*, 2006). Plusieurs mécanismes ont été proposés :

- 1- Altération de la perméabilité cellulaire en se fixant sur la membrane de la cellule (El-Ghaouth et *al.*, 1992).
- 2- Inhibition de la synthèse protéique par l'interaction du chitosane et l'ADN ce qui bloque la formation de l'ARNm (Xiao et *al.*, 2001).
- 3- A cause de son pouvoir chélateur, le chitosane fixe les ions métalliques inhibant ainsi la production de toxines et la croissance cellulaire (Jae-Young et *al.*, 2006).
- 4- Inhibition de l'activité enzymatique par l'absorption des molécules d'eau (Shahidi et *al.*, 1999).

II. 5. En industrie agro-alimentaire

La chitine et ses dérivés : chitosane, N-méthylène phosphonique chitosane (NMPC) et N-Lauryl- N- méthylène phosphonique chitosane (LMPC) sont des biopolymères qui ont la capacité de former des films biodégradables, d'immobiliser les enzymes et préserver les aliments contre la détérioration microbienne (Shahidi et *al.*, 1999). Ils sont également utilisés comme additif alimentaire (Agulló et *al.*, 2003). Le chitosane a été proposé également dans la composition d'aliments à faible teneur en sucre et en sel.

II. 6. En biotechnologie

Faisant partie des polymères cationiques, le chitosane permettrait la complexation de l'ADN et a le potentiel d'être utilisé en tant que vecteur non viral pour délivrer des gènes (Côté, 1999 ; Suna Özbas-Turan et *al.*, 2003). Il a été utilisé également pour l'immobilisation des enzymes (Muzzarelli et Riccardo, 1980) et l'encapsulation des cellules des mammifères (Jinjiang, 1996).

II. 7. Autres applications

Le chitosane peut être appliqué dans l'industrie papetière. Les chimistes ont remarqué que la molécule de chitosane ressemble étonnamment à la cellulose. Il suffit de remplacer les groupements amines (NH₂) du chitosane par des groupements hydroxyles (OH) pour obtenir la cellulose. Des industriels américains comptent bien utiliser les dérivés du chitosane pour la fabrication de pâte à papier (Dubrana, 1992).

Chapitre II : Les applications de la chitine et ses dérivés

Dans l'industrie photographique, le chitosane est utilisé pour récupérer les sels d'argent qui viennent se fixer sur le bio polymère.

En Microbiologie, la chitine peut être utilisée comme source de carbone dans les milieux de culture de bactéries chitinolytiques telles que *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* K-187. Par conséquent, elle induit la production des chitinases (Wang et *al.*, 1995 ; Chang et *al.*, 2006) qui peuvent être extraites du milieu pour être utilisées comme des biopesticides (Kramer et Muthukrishnan, 1997), des antibactériens et des fongicides (Huang et *al.*, 2005).

En outre, les hydrolysats de chitine sont également utilisés comme source de carbone et d'azote pour la production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (POU) (Ferrer et *al.*, 1996 ; Shin et *al.*, 2000).

Chapitre III

Méthodes d'extraction de la chitine

III. 1. Introduction

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

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

Par des études de diffraction des rayons X, *RUDALL* et *KENCHINGTON* ont observé des répétitions régulières de liaisons protéiques à des intervalles de 31Å sur la chaîne de chitine. En support à d'autres études, cela démontre qu'une protéine est liée de façon covalente à toutes les six unités N-acétylglucosamine, probablement par une structure N-acyl (Fig. 11) (Poirier, 2000).

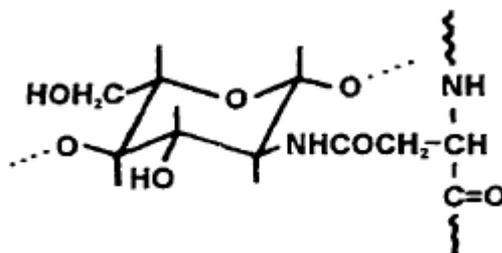


Fig. 11 : Liaison covalente probable dans le complexe chitine-protéine (Poirier, 2000).

La purification complète de la chitine native nécessite l'enlèvement de quatre ensemble de constituants principaux : protéines, minéraux, lipides et pigments caroténoïdes. La présence de liaisons covalentes chitine-protéines demande généralement des processus de déprotéinisation sévères qui peuvent affecter la masse moléculaire de la chitine résultante. Il en est de même pour les méthodes de déminéralisation en milieu acide.

Les lipides et les pigments étant associés aux protéines, ceux-ci sont majoritairement arrachés lors de la déprotéinisation. Le principal pigment caroténoïde, l'astaxanthine (3,3'-dihydroxy- β,β-carotène- 4,4'-dione), peut ainsi être récupéré sous forme de caroténoprotéine.

Chapitre III : Les méthodes d'extraction de la chitine

Les lipides et les pigments qui n'ont pas été éliminés lors des traitements de déprotéinisation et de déminéralisation sont enlevés par un lavage final avec de l'acétone absolu, ou une solution de peroxyde d'hydrogène, ou une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel) (No et *al.*, 1989a) et ou un mélange de chloroforme, méthanol et eau distillée (1:2:4) à 25°C (Cira et *al.*, 2002).

L'isolation de la chitine passe par deux étapes : la déminéralisation et la déprotéinisation. Cette extraction peut se faire par deux méthodes : la méthode chimique et la méthode biologique.

III. 2. La méthode chimique

Elle fait appel à l'utilisation des acides et des bases. La solubilisation des minéraux nécessite l'utilisation d'une variété d'acides (HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH et HCOOH) (Jinjiang, 1996). Cependant, l'acide chlorhydrique (HCl) à température ambiante est le plus utilisé afin de dissoudre CaCO₃. Ce dernier en réagissant avec HCl donne naissance à un composé soluble (CaCl₂) qui sera éliminé par un simple lavage (Fernandez-Kim, 2004).

Quant à la déprotéinisation, elle nécessite un traitement basique en utilisant une des bases suivantes : Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, NaHSO₃ et CaHSO₃ (Jinjiang, 1996).

La déprotéinisation par des solutions de NaOH et la déminéralisation par des solutions de HCl sont, toutefois, les méthodes les plus utilisées (Fig. 12).

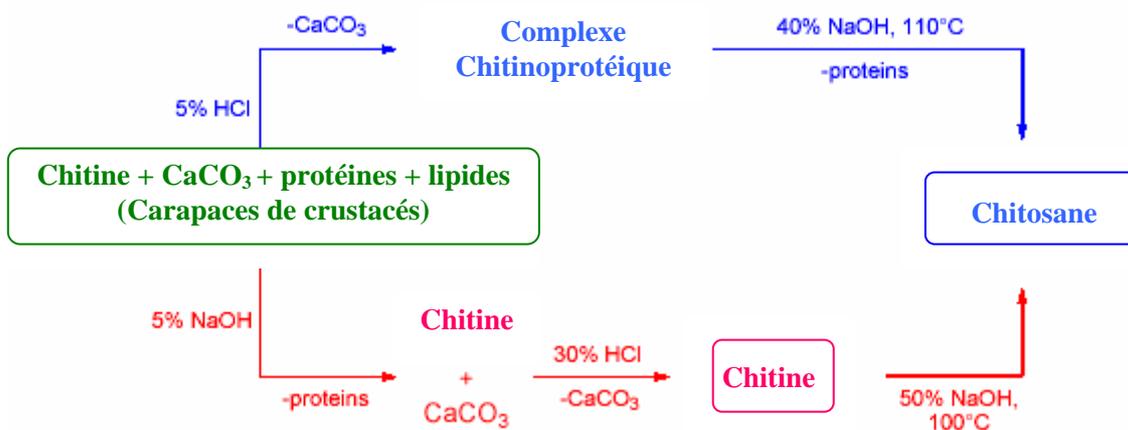


Fig. 12 : Modes de récupération de la chitine et du chitosane par la méthode chimique

Chapitre III : Les méthodes d'extraction de la chitine

NO et ses collaborateurs (1989), ont déterminé les conditions de déminéralisation et de déprotéinisation. Ces dernières varient en fonction du degré de minéralisation des carapaces, les saisons et les conditions de température (Chellat, 1999).

Ceci est confirmé par les conditions optimales mises en évidence dans les différentes études réalisées par Mirzadeh et ses collaborateurs (2002) et celles réalisées au niveau de notre laboratoire des Biotechnologies et Génie des Procédés (BIOGEP) par Salah (2005) et Tazdait (2005).

Cependant, cette méthode présente de nombreux inconvénients. Parmi eux, on cite la pollution chimique provoquée par les effluents d'acides et de bases produits lors de l'extraction de chitine ainsi que le coût élevé de leur traitement avant qu'ils soient évacués dans l'environnement (Yang *et al.*, 2000 ; Shirai *et al.*, 2001 ; Jung *et al.*, 2005a). Ces traitements conduisent à l'augmentation de prix de revient de la chitine.

L'utilisation de HCl et NaOH à forte température conduit également à la dépolymérisation et désacétylation de la chitine donnant naissance à des produits de qualité variable, non reproductible et non homogène (Gagné, 1993 ; Legros *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2000 ; Shirai *et al.*, 2002).

III. 3. La méthode biologique

C'est une nouvelle méthode qui a été mise en évidence pour remplacer la méthode chimique en raison de ces nombreux inconvénients cités précédemment (Evonne et Lee, 2002). Cette méthode est basée sur l'utilisation des bactéries lactiques et/ou des enzymes protéolytiques (Gagné, 1993). Elle conduit à la formation d'une fraction liquide riche en protéines, en minéraux et en pigments et une fraction solide : la chitine (Rao *et al.*, 2000) (Fig. 13).

Les protéines extraites de la carapace des crustacés par méthode biologique, représentent un bon supplément pour l'alimentation animale et une excellente source d'acides aminés essentiels pour la nutrition humaine (Cremades *et al.*, 2001). Quant à l'asthaxanthine (3, 3'-dihydroxy- β,β -carotène-4,4'-dione), pigment de haute valeur économique à cause de son rôle biologique (précurseur de vitamine A), il est utilisé dans l'alimentation des salmonidés afin d'acquérir une plus forte pigmentation et également comme additif dans l'alimentation des volailles (Zakaria *et al.*, 1998 ; Cremades *et al.*, 2001).

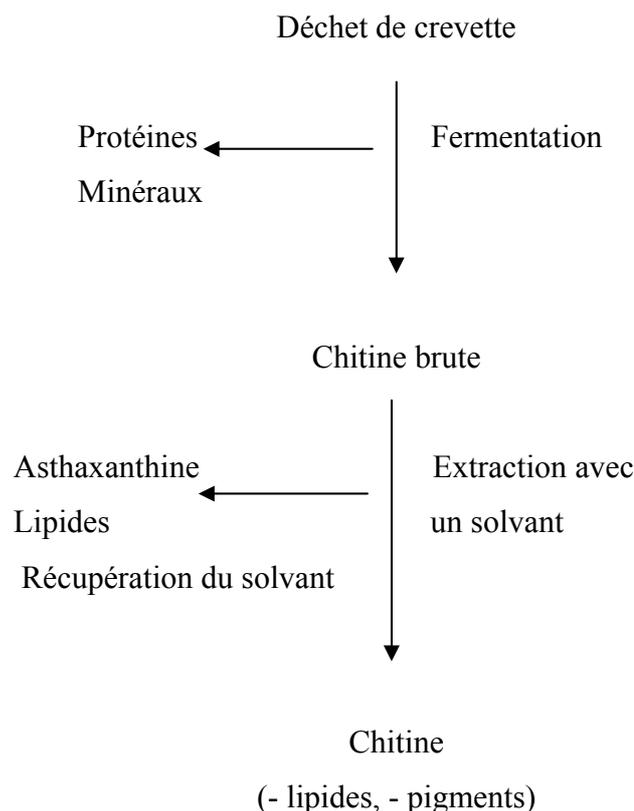


Fig. 13 : Schéma présentant la récupération de la chitine par voie biologique

Ce pigment est récupéré après une réaction de décoloration qui a lieu en utilisant une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel), de l'acétone absolu, une solution de peroxyde d'hydrogène (No et *al.*, 1989) ou un mélange de chloroforme, méthanol, eau distillée (Cira et *al.*, 2002).

La déminéralisation biologique des carapaces de crevette fait intervenir l'acide lactique produit, par hydrolyse de la source de carbone présente dans le milieu de fermentation, par la bactérie lactique. Cette fermentation provoque un abaissement du pH, qui a pour effet d'éviter les contaminations et de déminéraliser les carapaces. La réaction de l'acide lactique avec le carbonate de calcium conduit à la formation du lactate de calcium qui peut être éliminé par un simple lavage. Quant à la déprotéinisation, elle est assurée par les protéases produites par les bactéries lactiques, les bactéries résiduelles et les protéases présentes dans les déchets de crevette (Rao et *al.*, 2000).

Chapitre III : Les méthodes d'extraction de la chitine

De nombreuses recherches sur l'utilisation des protéases pour la valorisation des rejets solides de poissonneries ont été réalisées. La pepsine est une des enzymes utilisées pour obtenir un concentré protéique de haute valeur nutritionnelle (Benhabiles, 1992).

Dans le cas de l'extraction de la chitine, l'addition des protéases commerciales telles que l'alcane (Synowiecki et Al-Khateeb, 2000), la papaïne (Evonne and Lee, 2002) et les protéases de *Bacillus subtilis* (Yang et al., 2000), améliorent la déprotéinisation produisant ainsi une chitine de bonne qualité (Evonne et Lee, 2002).

Chapitre IV

Bactéries lactiques et traitement biologique du déchet de crevette

Chapitre IV

Bactéries lactiques et traitement biologique du déchet de crevette

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907, par le russe *METCHNIKOFF* (Doleyres, 2003). Selon cet auteur, les lactobacilles pouvaient réduire la putréfaction intestinale, en modifiant la microflore intestinale, et ainsi prolonger la vie.

Depuis, un grand nombre d'études sur l'effet du potentiel des bactéries lactiques sur la santé ont été publiées. Les effets bénéfiques potentiels cités sont nombreux et variés. Certains sont maintenant bien établis tels que l'amélioration de la digestion du lactose et le traitement des désordres diarrhéiques, d'autres restent encore controversés tels que la diminution du cholestérol sérique ou encore la réduction de la formation de tumeurs.

Dans l'industrie, les bactéries lactiques sont utilisées dans le domaine agro-alimentaire spécialement dans l'industrie laitière telle que la production de fromage, yaourt,..... Aujourd'hui, elles sont utilisées pour extraire la chitine.

IV. 1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très anciennes, elles sont apparues avant les cyanobactéries, il y a près de trois milliards d'années (Tailliez, 2001).

Les bactéries lactiques ont été classées en trois groupes, par *ORLA-JENSEN* (1919) (Leveau et Bouix, 1980) :

- *Thermobacterium* : homofermentaire et thermophile (ex : *Lactobacillus helveticus*).
- *Streptobacterium* : homofermentaire et mésophile (ex : *Lactobacillus plantarum*).
- *Betabacterium* : hétérofermentaire, soit mésophile soit thermophile (ex : *Lactobacillus brevis*).

Ce sont des bactéries Gram positif qui regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Pediococcus* (Drouault et Gérard, 2001)

IV. 1. 1. Caractères bactériologiques

Les bactéries lactiques sont des bacilles souvent allongés, Gram positif, asporulés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles (Guiraud, 2003). Ce sont des bactéries micro aérophiles, hétérotrophes et chimio-organotrophes (Doleyres, 2003). Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en acides aminés, en peptides, en vitamines, en acides gras et en glucides fermentescibles (Leclerc et *al.*, 1995).

IV. 1. 2. Caractères biochimiques

Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique (Leveau et Bouix, 1980). Ce dernier, acide faible, est favorable à la conservation des aliments (Niju et *al.*, 2004).

Il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. En effet, les bactéries homolactiques strictes telles que : *Lactobacillus helveticus*, produisent uniquement de l'acide lactique par la voie d'Embden Meyerhof Parnas, alors que les bactéries hétérolactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du dioxyde de carbone en plus de l'acide lactique par la voie des pentoses (Leveau et *al.*, 1991 ; Drouault et Gérard, 2001).

IV. 1. 3. Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux (Leveau et Bouix, 1980), la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (Drouault et Gérard, 2001).

IV. 1. 4. Rôles et intérêts des bactéries lactiques

IV. 1. 4. 1. Utilisation industrielle

Les bactéries lactiques constituent un ensemble de micro-organismes capables de transformer des sucres simples, comme le lactose ou le glucose en acide lactique, ce qui provoque l'abaissement de pH du milieu (Djould, 2004). Leur importance, découle de leur habilité à découpler leur croissance cellulaire de la transformation des sucres en lactate, et de poursuivre cette bioconversion, bien au-delà de la phase de multiplication cellulaire (Larpen J. P. et Larpen G. M., 1985). Ceci est un point important à souligner, car cela explique que même dans des milieux non optimisés, ces bactéries exigeantes en acides aminés peuvent réaliser des bioconversions pondérales importantes (Law et Valade, 1983). En plus de leur rôle dans la production des acides organiques, les bactéries lactiques ont un potentiel enzymatique énorme, ce qui d'ailleurs leur confère une importance en industrie (Djould, 2004).

L'activité protéolytique globale des bactéries lactiques est considérée, comme faible comparée à celle d'autres genres bactériens comme *Bacillus* ou *Pseudomonas*. Cependant, elles sont utilisées depuis longtemps dans de nombreuses fermentations à cause de leurs

qualités propres. Parmi elles, les *Lactobacillus* sont, souvent citées, par leur caractère non pathogène, leur absence de toxicité, leur stabilité et leur bonne viabilité, et leur résistance au pH et à l'acide lactique (Leveau et Bouix, 1980).

Leur équipement enzymatique est complexe par la diversité des enzymes détectées et par leur localisation intra ou extracellulaire. Le système protéolytique des bactéries lactiques est constitué de deux types d'enzymes distincts : les protéases capables d'hydrolyser des protéines natives et les peptidases détectés par l'hydrolyse de peptides issus de la dégradation des protéines. En plus des protéases intra et extracellulaire, elle possède une protéase de paroi et une aminopeptidase à spectre d'action très large (Leveau et Bouix, 1980).

En outre, la fermentation lactique des aliments constitue l'une des plus anciennes formes de conservation de la nourriture. Les bactéries lactiques sont utilisées empiriquement depuis des siècles dans la fabrication de nombreux aliments fermentés comme les produits laitiers (yaourts et fromages) (Drouault et Gérard, 2001). Elles sont également utilisées pour fermenter les déchets de crevette, afin d'extraire la chitine par voie biologique et ainsi à réduire les problèmes causés, par ces déchets, à l'environnement (Guyot, 2000).

Les bactéries lactiques peuvent aussi produire de nombreux agents antibactériens tels que les bactériocines, qui contribuent à inhiber la croissance des flores indésirables (Drouault et Gérard, 2001).

IV. 1. 4. 2. Intérêts des bactéries lactiques sur la santé humaine

Les bactéries lactiques, pour lesquelles ces effets sont décrits, sont appelées probiotiques (Alejandra et *al.*, 2005). Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants, qui après ingestion, exercent des effets bénéfiques sur la santé allant au-delà des vertus nutritives inhérentes de l'aliment (Drouault et Gérard, 2001).

IV. 2. Les bactéries lactiques et les déchets de crevette

Plusieurs travaux d'extraction de chitine par voie biologique ont été réalisés, en utilisant différentes souches de *Lactobacillus* et/ou bactéries protéolytiques cultivées sur différentes sources de carbone.

ZAKARIA et ses collaborateurs (1998), ont extrait la chitine à partir des langoustines (*Nephros norvegicus*). Ils ont préparé une mixture semi-solide constituée d'1kg de poudre de

Chapitre IV : Les bactéries lactiques et traitement biologique du déchet de crevettes

déchet de langoustine, du glucose (10% masse/masse) et d'une suspension bactérienne de *Lactobacillus paracasei* A₃ (10% volume/masse), le tout est incubé à température contrôlée 30°C pendant 3 jours. Les résultats obtenus par ce chercheur sont : 61% de déminéralisation et 77,5 % de déprotéinisation.

RAO et son équipe (2000), ont utilisé un inoculum de 10% (volume/masse) de *Lactobacillus plantarum* 541 et différentes concentrations en glucose (0- 8,4% masse/masse) à la température d'incubation de 30°C pendant 24h. Ces expériences réalisées à pH libre (8-9) ont conduit à 84,47% de déprotéinisation et 70,02% de déminéralisation.

Une autre série d'expériences a été réalisée par la même équipe mais cette fois en ajustant le pH initial dans le but d'étudier l'influence de ce paramètre sur le procédé. Ils ont constaté qu'en ajustant le pH initial à 6 avec une solution d'acide acétique glacial (1%), 75% de déprotéinisation et 86% de déminéralisation ont été obtenus avec une concentration de 5% en glucose.

Ainsi, il a été conclu que l'acidification initiale du milieu de fermentation a permis d'améliorer la déminéralisation et de diminuer la déprotéinisation.

CIRA et son équipe (2002), ont étudié l'effet du substrat carboné sur l'extraction de la chitine en utilisant différentes sources de carbone (10% ou 20% masse/masse) telles que : le sucrose, le lactose et le lactosérum et d'une suspension bactérienne de *Lactobacillus* B2 à différentes concentrations (0,5 et 10% volume/masse) isolée à partir du déchet de crustacés. Les conditions optimales obtenues dans cette étude : 10% (masse/masse) de sucrose fermenté avec un inoculum de 5% (volume/masse) ont donné 63,5% de déprotéinisation et 56,78% de déminéralisation.

Afin d'améliorer ces résultats, CIRA et al. (2002) ont effectué un couplage de la méthode biologique et la méthode chimique. Ils ont constaté que l'extraction de la chitine de la carapace préalablement fermentée, nécessite de faibles concentrations d'acide et de base 0,5 et 0,4 M, respectivement. Alors que les concentrations utilisées sur une poudre de carapace non fermentée étaient de l'ordre de 1-1,5 N et 1,75 N en acides et en bases, respectivement.

D'autres travaux ont consisté en un couplage de la méthode biologique et la méthode chimique afin de réduire les quantités d'HCl et de NaOH utilisées.

SYNOWIECKI et *AL-KHATEEB* (2000), ont extrait les protéines des carapaces des crevettes (*Crangon*) déminéralisées par voie biologique. Ils ont utilisé l'alcalase afin d'avoir un hydrolysate de protéine. La déminéralisation chimique des carapaces a été réalisée en utilisant une solution de HCl à 10% (masse/volume).

Par contre, *CIRA* et ses collaborateurs (2002), ont utilisé la fermentation lactique comme un prétraitement du déchet de crevettes suivi de la déminéralisation et de la déprotéinisation en utilisant de faibles concentrations en de HCl (0.5M) et NaOH (0.4 M).

D'autres études d'extraction de la chitine ont été réalisées en utilisant un mélange de bactéries lactiques et bactéries protéolytiques afin d'obtenir une meilleure déprotéinisation de la carapace (Healy et al., 2003 ; Jung et al., 2005b).

HEALY et al. (2003) ont extrait la chitine à partir de langoustines (*Nephrops norvegicus*) en utilisant deux bactéries lactiques *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus salivarius* et deux bactéries protéolytiques *Streptococcus faecium* et *Pediococcus acidilactici*. Le résultat obtenu est 90,99% de déminéralisation, alors que le dosage de l'azote a donné un taux de 6,31% qui correspond à l'azote présent dans la chitine. D'où, l'azote protéique est complètement éliminé.

JUNG et al. (2005b), ont également utilisé un mélange de bactérie lactique *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 et une bactérie qui a un grand pouvoir protéolytique *Serratia marcescens* FS-3 afin d'extraire la chitine à partir des carapaces des crabes rouges (*Chionoectes japonicus*).

Ils ont remarqué que la déprotéinisation (83,8%) en utilisant la bactérie protéolytique seule est supérieure à celle obtenue en utilisant la cofermentation (52,6%). Tandis que la déminéralisation passe de 92,25% en utilisant *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 seul, à 97,2% en utilisant le mélange de *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 et *Serratia marcescens* FS-3.

Une autre cofermentation a été réalisée par *RAO* et *Stevens* (2006). Mais cette fois en utilisant une bactérie lactique amylolytique (*Lactobacillus plantarum* A6), qui a la capacité de dégrader l'amidon, et une bactérie lactique non amylolytique (*Lactobacillus plantarum* 541) en présence de 2% de NaCl. Ils ont obtenu 81,4% de déminéralisation et 59,8% de déprotéinisation avec la souche 541 et 65,5% de déminéralisation et 52,2% de déprotéinisation avec la souche A6.

Partie expérimentale
Partie expérimentale

Chapitre V

Matériels et Méthodes

Chapitre V : Matériels et Méthodes

L'objectif de ce travail est l'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevette par voie fermentaire en utilisant une bactérie lactique et une source de carbone peu onéreuse qui peut remplacer le glucose.

Il s'agit dans une première étape, de revivifier (réactiver) les bactéries, de caractériser la carapace et d'optimiser les paramètres d'extraction de la chitine en utilisant le glucose comme source de carbone. Dans la deuxième étape, on a utilisé le jus de dattes comme source naturelle de carbone pour notre fermentation. Ce jus a été préparé à partir des déchets de dattes (dattes pourries) issues de Deglet-Nour.

V.1. Matériels

V.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.

V.1.2. La carapace

Les carapaces (têtes et thorax) utilisées dans notre étude, proviennent des crevettes *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), identifiées au niveau du laboratoire Halieutique de la Faculté des Sciences Biologiques de l'U.S.T.H.B.

V.1.3. La source naturelle de carbone : le jus de dattes

Le but de ce travail est non seulement l'extraction de la chitine par voie biologique mais aussi la recherche d'une autre source de carbone bon marché pouvant remplacer le glucose pur.

Notre choix a été porté sur le jus de dattes, du fait que le secteur phoenicicole algérien fournit à chaque campagne près de 60.000 tonnes de déchets de dattes provenant soit directement des palmeraies, soit des écarts des stations de conditionnements. En plus, les dattes présentent une richesse en sucres fermentescibles à savoir le glucose, le fructose et le saccharose (Boudjelal and Nancib, 2001).

V.2. Méthodes analytiques et expérimentales

V.2.1. *Lactobacillus helveticus*

V.2.1.1. Coloration simple au bleu de méthylène

On procède de la façon suivante :

- * Mettez une colonie avec une goutte d'eau distillée sur une lame
- * Fixez la préparation à la flamme.
- * Colorez avec une solution de bleu de méthylène pendant une minute.
- * Lavez la lame à l'eau et séchez sur papier filtre.
- * Observation microscopique : faire d'abord une mise au point avec le plus faible grossissement, ensuite passez au plus fort grossissement (x100).

Résultats : les bactéries sont colorées en bleu et présentant des formes (spécifiques aux bactéries).

V.2.1.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram a été mise au point par le médecin danois (Christian Gram) en 1884. Elle est la base de toute étude bactériologique et sert à différencier les bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et Gram négatif.

Mode opératoire

Technique des secondes (plus rapide)

- Recouvrir la lame avec du violet de gentiane qui colore les bactéries Gram positif ou Gram négatif.
- Laisser agir 20 secondes.
- Recouvrir la lame du lugol (solution qui renforce la coloration).
- Laisser agir 7 secondes puis renouveler le mordantage 2 fois.
- Incliner la lame puis laisser couler de l'éthanol (95 degré) durant 4 secondes.
- Rincer à l'eau.
- Recoloration à la fuchsine (sert à colorer les bactéries qui se sont décolorées).
- Laisser agir 20 secondes puis rincer à l'eau.

Résultats :

- Les bactéries Gram positif restent colorées en violet.
- Les bactéries Gram négatif sont colorées en rose.

V.2.2. Carapace

V.2.2.1. Préparation de la poudre de carapace (Mukherjee, 2001)

Avant leur utilisation, les carapaces des crevettes sont débarrassées de la chaire, des antennes et des pattes. Les carapaces, sont ensuite bouillies dans de l'eau pendant 1h pour enlever le maximum de tissus. Puis, elles sont séchées dans l'étuve à 163° C pendant 1h.

On laisse, ensuite, refroidir. Après séchage, les carapaces sont débarrassées d'éventuels tissus encore présents, par frottement.

A la fin, les carapaces subissent un choc thermique qui permet de casser la structure cristalline de la chitine et de rendre les carapaces plus faciles à broyer. Pour cela, le « quenching » consiste à placer les carapaces dans l'étuve à 80°C pendant 48h. Les carapaces ainsi chaudes, sont ensuite mises dans un récipient puis le tout est rapidement plongé dans un bain d'acétone contenant de la glace. En dernier, les carapaces sont broyées à l'aide d'un broyeur (moulin à café, dans notre cas) pour obtenir une poudre de granulométrie variable environ de 1 à 3mm.

V. 2.2.2. Analyses physico-chimiques de la carapace

V.2.2.2.1. Détermination du pH à 10% (masse/volume)

Ce paramètre nous permet d'avoir une idée sur le caractère alcalin ou acide de la carapace. Pour estimer son pH, 10 g de poudre de carapace sont mis à macérer dans 100ml d'eau distillée pendant 1h. La valeur du pH est déterminée par une lecture directe à l'aide d'un pH mètre.

V.2.2.2.2. Mesure de l'humidité

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

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

H : % d'humidité.

*M*₀ : masse de la prise d'essai (g).

*M*₁ : masse de la prise d'essai après étuvage (g).

V.2.2.2.3. Détermination du taux de cendres

Le taux de cendres correspond au pourcentage de la matière minérale présente dans la carapace. Il nous permet ainsi, de déduire le taux ou le pourcentage de déminéralisation de la carapace après la fermentation.

Le principe repose sur l'incinération de 1g de poudre de carapace à 900°C pendant 2,5h dans un four à moufle (Mirzadeh *et al.*, 2002). Le taux de minéralisation (TM) se calculera par :

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

M_2 : masse du creuset avec les cendres (g).

M_0 : masse du creuset vide (g).

M_1 : masse du creuset chargé de la prise d'essai (g).

TM : taux de minéralisation avant la fermentation.

Il en déduira le pourcentage de déminéralisation noté DM:

$$DM = \left(\frac{TM_0 \times m_0 - TM_f \times m_f}{TM_0 \times m_0} \right) \quad (3)$$

TM_0 : taux de minéralisation avant fermentation.

TM_f : taux de minéralisation après fermentation.

m_0 : masse d'échantillon avant fermentation (g).

m_f : masse d'échantillon après fermentation (g).

V.2.2.2.4. Détermination de la teneur en chitine

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

Cette méthode utilise deux réactifs :

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

Préparation de la gamme étalon

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

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

$$Teneur\ en\ chitine = \left(\frac{\text{masse d'acétyl glucosamine}}{\text{masse d'échantillon}} \right) \times 100 \quad (4)$$

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

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

V.2.2.2.5. Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl (AFNOR, 1982)

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

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

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

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

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

Chapitre V : Matériels et Méthodes

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

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

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

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

$$DP = \left(\frac{TP_0 \times m_0 - TP_f \times m_f}{TP_0 \times m_0} \right) \quad (9)$$

TP₀ : taux de protéines avant fermentation.

TP_f : taux de protéines après fermentation.

m₀ : masse d'échantillon avant fermentation (g).

m_f : masse d'échantillon après fermentation (g).

V.2.3. La fermentation

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

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

- 1- Dans le but de réactiver la bactérie, nous avons réalisé, tout d'abord, une culture sur un milieu MRS solide incubé à 30°C pendant 24h. Il a été entrepris, par la suite, une pré-culture.
- 2- La pré-culture consiste à prélever quelques colonies pour les ensemercer dans 5ml de milieu MRS liquide puis incubée à 30°C pendant 24h. Cette pré-culture servira à ensemercer une culture de 10 ml à raison de 5% (volume/volume). Cette culture sera également incubée à 30°C pendant 24 h (Rao et *al.*, 2000).
- 3- La culture ainsi obtenue servira à ensemercer le fermenteur de 100 ml à raison de 10% (volume/volume).

V.2.4. Le jus de dattes

V.2.4.1. Préparation du jus de dattes (Boudjelal and Nancib, 2001)

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

V.2.4.2. Dosage des sucres réducteurs par la méthode de l'acide dinitrosalicylique :

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

Mode opératoire :

- Mettez 3ml d'échantillon convenablement dilué dans un tube à essai.
- Ajoutez 3ml du réactif DNS. Agitez et plongez-le dans un bain-marie bouillant pendant 5mn.
- Ajoutez, alors, 1ml de Rochelle salt et laissez- le refroidir.
- Lire la densité optique à 575nm.

V.2.4.3. Dosage colorimétrique des protéines totales

Le dosage des protéines totales dans les échantillons liquides, prélevés du milieu de fermentation, a été réalisé par la méthode de Biuret à 540nm (Apria, 1981).

En milieu alcalin, les composés contenant au moins deux groupements ($-\text{CO}-\text{NH}$ ou $-\text{CO}-\text{NH}_2$) forment avec les ions cuivriques (Cu^{2+}) un complexe bleu-violet. Cette coloration se développe en particulier avec le Biuret, $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ 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 :

a) Courbe d'étalonnage

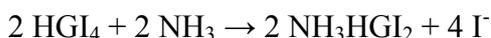
- A partir du sérum étalon dont le titre en protéines est connu ρ (g/), réaliser des dilutions de $1/10^{\text{ème}}$, $1/20^{\text{ème}}$, $1/40^{\text{ème}}$ et $1/80^{\text{ème}}$, pour cela, prélever 2ml, 1ml, 0,5ml et 0,25ml de sérum puis compléter à 20ml avec de l'eau physiologique.
- Dans une série de tubes à essai (1, 2, 3, 4), introduire 1ml de chacune des dilutions et 4ml du réactif de cornall (voir annexes).
- Le témoin ou le blanc est réalisé avec 1ml d'eau physiologique et 4ml du réactif de cornall.
- Mélanger, attendre 30mn à température ambiante et à l'obscurité.
- Une fois que la coloration est stable, lire DO de chaque tube contre le blanc à 540nm.

b) Dosage des protéines totales

- 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.

V.2.4.4. Dosage de l'ammoniaque par le réactif de NESSLER :

a) Principe :



b) Préparation du réactif de NESSLER : (solution A + solution B)

A- 1 volume HgCl_2 (chlorure de mercure) + IK (iodure de potassium) (stable)

B- 0,3 volume NaOH 10 M (stable)

c) Mode opératoire :

5ml de solution à doser convenablement diluée + 0,1ml de réactif de NESSLER (préparé juste avant l'utilisation). Décaler l'ajout du réactif de NESSLER 1mn par tube. Laisser incuber à température ambiante pendant 10mn après l'ajout du réactif de NESSLER. Lire DO à 420nm. Enfin, déduire de la courbe d'étalonnage, dont la gamme de concentration est de 0 à 2ppm en NH_4^+ , la teneur en azote ammoniacal présente dans l'échantillon.

Chapitre VI

Résultats et discussion

Chapitre VI : Résultats et discussion

VI. 1. Ré identification de la souche

La confirmation de la forme allongée de la bactérie lactique *Lactobacillus helveticus*, utilisée dans notre étude, a été établie suite à la coloration au bleu de méthylène. Ainsi, la coloration de Gram nous a montré que notre souche appartient au groupe des Gram positif.

VI. 2. Caractérisation de la carapace

VI. 2. 1. Les propriétés physico-chimiques de la carapace

Les analyses physico-chimiques de la poudre de carapace ont été portées sur la détermination des taux de protéines, de minéraux et de chitine ainsi que la teneur en eau. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques de la carapace

pH	8-9
Humidité	3,25%
Cendres	35,5%
Protéines (libres et liées)	27,61%
Chitine	23,61%
Lipides et pigments	13,28%

La carapace de *Parapenaeus longirostris* est caractérisée par un pH basique qui varie entre 8-9. Elle présente un taux de cendres élevé 35,5% par rapport à celui retrouvé chez les langoustines (20,8%) (Zakaria et al., 1998) et chez la crevette tropicale (18-23%) (Rao et al., 2000). Par contre, les crabes rouges présentent une minéralisation plus importante qui est de l'ordre de 41,2% (Jung et al., 2005b). Notre carapace caractérisée par une minéralisation assez importante peut rendre la déminéralisation difficile (Chellat, 1999).

Le taux de protéines que renferme la carapace étudiée est de l'ordre de 27,61%. Ce taux est de 22,4% chez les crabes rouges (Jung et al., 2005b) et de 30-40% chez la crevette tropicale (Rao et al., 2000).

Un faible taux d'humidité (3,25%) est obtenu, ce qui indique une faible hydratation.

Chapitre VI : Résultats et discussion

La quantité de chitine est de l'ordre de 23,61%. Elle est, en accord, avec le taux rapporté par No *et al.*, (1989) (14-27% chez la crevette).

VI. 2. 2. Le spectre infra-rouge

La spectroscopie infra-rouge est une technique peu coûteuse qui a l'avantage d'identifier les groupements chimiques tels que (NH, CO,etc) présents à la surface du matériau brut. Le spectre obtenu est représenté dans la figure 14.

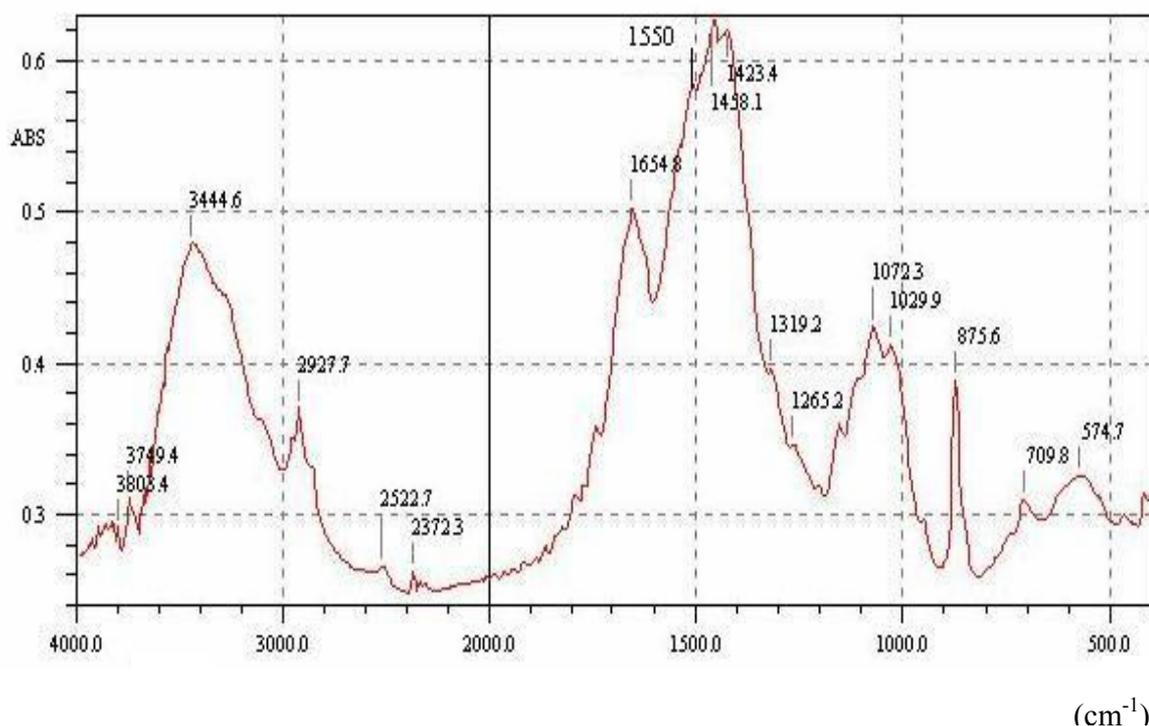


Fig. 14 : Spectre Infra-Rouge de la carapace brute de *Parapenaeus longirostris*.

L'étude par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) montre l'apparition de bandes caractéristiques de la calcite à 2522,7 cm^{-1} , 1458,1 cm^{-1} , 875,6 cm^{-1} et 709,8 cm^{-1} . Ces résultats sont confirmés par les travaux de Heredia *et al.* (2006).

Tous les amides présentent une bande carbonyle connue sous le nom de bande I des amides. Sa position est modifiée par la formation de liaison hydrogène (Zerarka, 1994). En plus, tous les amides primaires et secondaires possèdent entre 1650 et 1515 cm^{-1} une bande résultant de la déformation des groupes NH_2 lié et NH. Cette bande est connue sous le nom de bande II des amides (Zerarka, 1994). La plupart des amines primaires présentent une bande large vers 900-650 cm^{-1} (Zerarka, 1994).

Chapitre VI : Résultats et discussion

Selon Seung et Cheong (2006), les pics caractéristiques de la carapace des crustacés sont : I : 1660 cm^{-1} [C=O], II : 1550 cm^{-1} [NH], III : 973 cm^{-1} [NH].

Pour notre échantillon, on remarque l'apparition d'une bande intense à $1654,8\text{ cm}^{-1}$ qui correspond à la liaison (C=O) caractéristique de la bande I des amides et un pic à environ 1550 cm^{-1} qui correspond à la liaison (N-H) caractéristique de la bande II des amides.

On note, également, l'apparition d'un pic à 2927 cm^{-1} qui correspond à une liaison C-H, cette bande est comprise entre 3000 et 2840 cm^{-1} selon Zerarka (1994).

On remarque, également, un pic à $3444,6\text{ cm}^{-1}$ qui correspond au groupement O-H (Zerarka, 1994).

VI. 3. Caractérisation du jus de dattes

Tout processus de fermentation est lié à la qualité du milieu de culture utilisé. Par conséquent, la détermination de la composition biochimique du jus de dattes est nécessaire. Les analyses ont été réalisées au niveau du laboratoire du Centre de Recherche et de Développement de Sonatrach. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Composition du jus de dattes Deglet-Nour

pH	4-5,6
Sucres réducteurs	207,76 g/l
Saccharose	16,93% à $21,9^{\circ}\text{C}$
<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

Chapitre VI : Résultats et discussion

Les résultats obtenus montrent que le jus issu de Deglet- Nour présente une teneur élevée en sucres réducteurs (207,76 g/l), en potassium (1580 mg/l) et en calcium (75,14 mg/l). Par contre, il est pauvre en protéines (0,086 mg/l).

Cette composition chimique, nous a permis d'utiliser le jus de dattes comme milieu de fermentation pour les bactéries lactiques (Boudjelal and Nancib, 2001) afin de récupérer la chitine puisqu'il est riche en sucres fermentescibles et contient des oligo-éléments qui peuvent jouer un rôle de cofacteurs pour les enzymes protéolytiques ainsi que pour la croissance bactérienne.

VI. 4. Influence des conditions opératoires sur l'évolution du pH du milieu

Plusieurs paramètres physico-chimiques peuvent influencer la croissance bactérienne et par conséquent, la production de l'acide lactique. Cette dernière peut être exprimée par l'évolution du pH du milieu de fermentation.

Les paramètres qui ont été optimisés dans notre travail sont : la concentration initiale en glucose (0- 500 g/l), avec et sans stérilisation de la carapace, la température d'incubation (30-42°C), le pH initial et la source de carbone. Pour cela, nous avons utilisé un carbohydrate naturel : du jus de dattes en remplacement du glucose pur.

Pour le jus de dattes, différentes concentrations en sucre ont été préparées en réalisant des dilutions de la solution mère (208 g/l).

VI. 4. 1. Effet de la concentration initiale en glucose sur l'évolution du pH en milieu stérile

Le traitement biologique de la carapace stérile par *Lactobacillus helveticus* à différentes concentrations en glucose (0-150 g/l) et à température 30°C, a permis d'obtenir les résultats représentés dans la figure 15.

On remarque que, plus la concentration initiale en glucose augmente plus l'acidification est importante. En effet, avec 20 g/l en glucose, le pH initial atteint la valeur de 6,9 alors qu'avec 150 g/l en glucose, le pH minimal est de 6,01.

Chapitre VI : Résultats et discussion

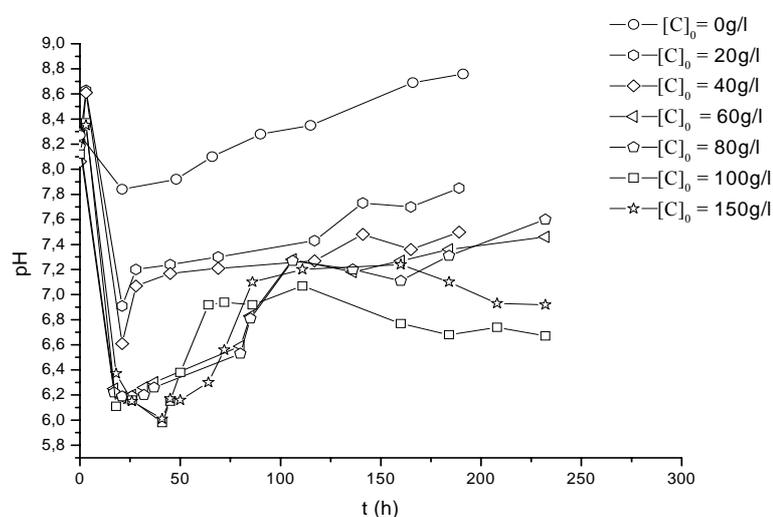


Fig. 15 : Influence de la concentration initiale en glucose sur l'évolution du pH en fonction du temps à 30°C

L'influence de la concentration du glucose sur la déminéralisation et la déprotéinisation de la carapace, a été estimée par le calcul du pourcentage de cendres et de protéines restants dans la carapace fermentée. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 16.

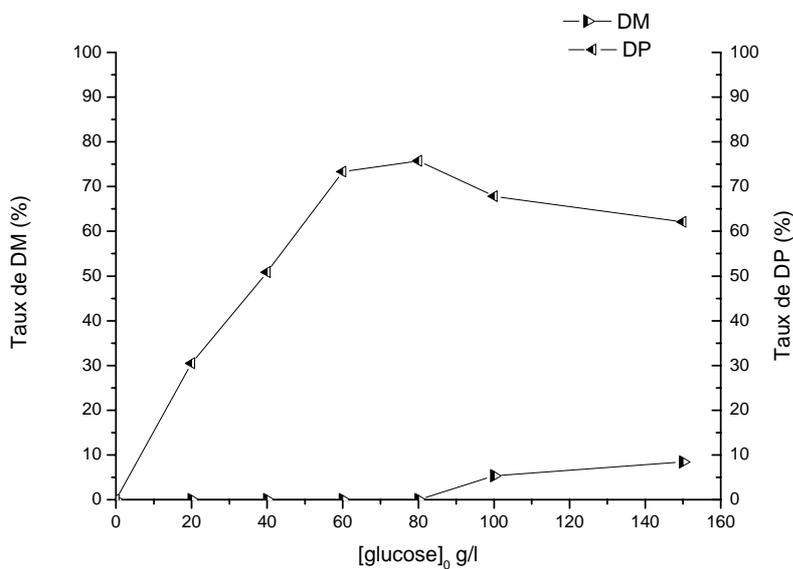


Fig. 16 : Influence de la concentration initiale en glucose sur les taux de déprotéinisation et de déminéralisation de la carapace stérile

Chapitre VI : Résultats et discussion

On constate que lorsque la concentration initiale en glucose varie entre 0 et 80 g/l, le poids des cendres reste constant, cela signifie que la déminéralisation n'a pas eu lieu. Par contre, ce n'est qu'à partir de 100 g/l qu'on commence à avoir une déminéralisation mais qui reste, toute fois, faible (5,35%). Celle-ci augmente jusqu'à 8,45% à une concentration de 150 g/l.

Inversement, la déprotéinisation augmente avec la concentration initiale en glucose, jusqu'à atteindre un maximum de 76% à une concentration de 80 g/l puis elle commence à diminuer dès que la déminéralisation débute. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par Jung et *al.*, (2005b). Le traitement, de la carapace de crabe rouge, par la bactérie protéolytique *Serratia marcescens* FS-3 a permis d'obtenir un taux de déprotéinisation de 83,3%. Ce taux diminue pour atteindre 52,6% en utilisant un mélange de *Serratia marcescens* FS-3 et *Lactobacillus paracasei* (Jung et *al.*, 2005b).

Nos résultats, nous ont permis de conclure qu'à faible concentration initiale en glucose, on favorise la déprotéinisation car avec le milieu légèrement acide (6,2-6,5), le pH est optimal pour l'activité des protéases. La présence de ces protéines a été confirmée par le dosage des protéines en solution par la méthode de Biuret. Ce dosage a montré que la concentration des protéines augmente sans cesse dans le milieu de fermentation (Fig. 17).

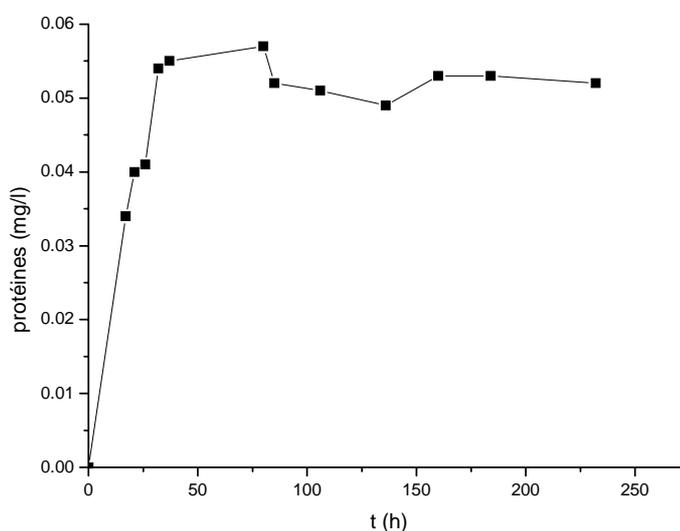


Fig. 17 : Evolution de la concentration en protéines dans le milieu de fermentation en fonction du temps (80 g/l en glucose et 30°C)

Chapitre VI : Résultats et discussion

Cette augmentation de la concentration des protéines en solution au cours du temps traduit une élimination des protéines de la carapace, sous l'effet des protéases bactériennes. Ce qui explique les taux de déprotéinisation obtenus sur la carapace (Fig.17).

Pour des concentrations initiales plus élevées en glucose, on commence à favoriser la déminéralisation . Ces résultats seront confirmés dans la suite de notre travail.

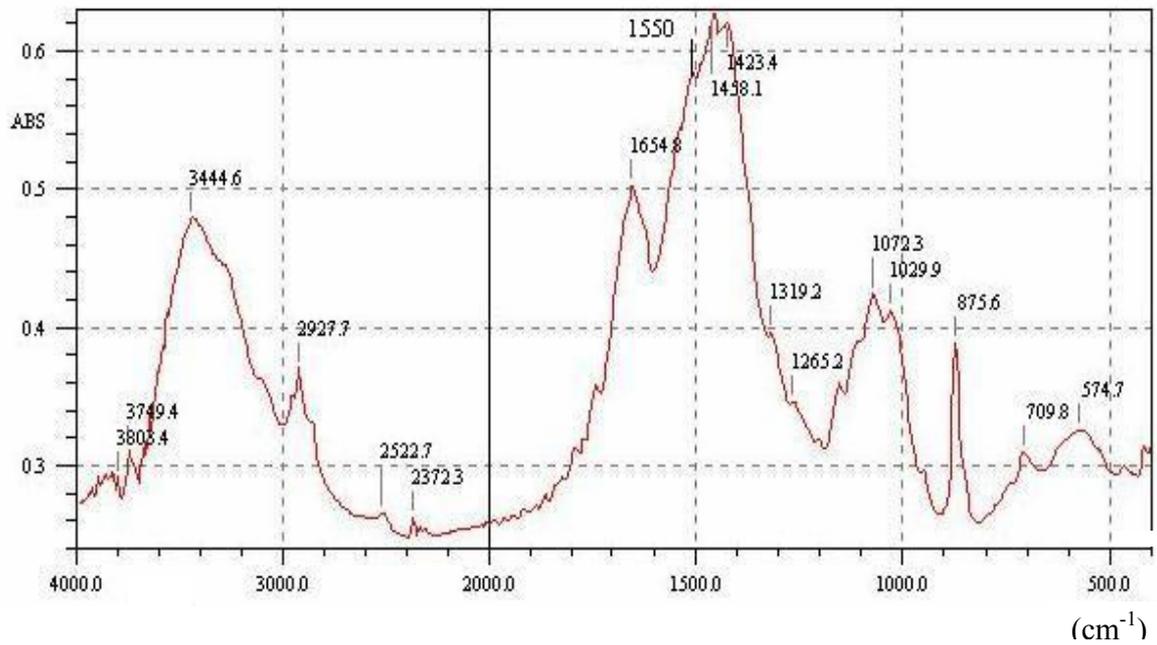
L'analyse de la carapace déprotéinisée à 76% avec 80 g/l de glucose par spectroscopie infrarouge a donné le spectre représenté dans la figure 18.

On remarque que les bandes caractéristiques de la calcite existent toujours dans le spectre de la carapace déprotéinisée, et elles sont plus ou moins intenses comparant à celle de la carapace brute.

On note l'apparition de nouveaux pics à $2889,2 \text{ cm}^{-1}$, 3109 cm^{-1} qui correspondent aux liaisons (CH), et un pic à $3274,9 \text{ cm}^{-1}$ qui correspond à la liaison (C=O.....NH). Ces bandes sont caractéristiques de α -chitine selon Heredia *et al.* (2006).

Chapitre VI : Résultats et discussion

a)



b)

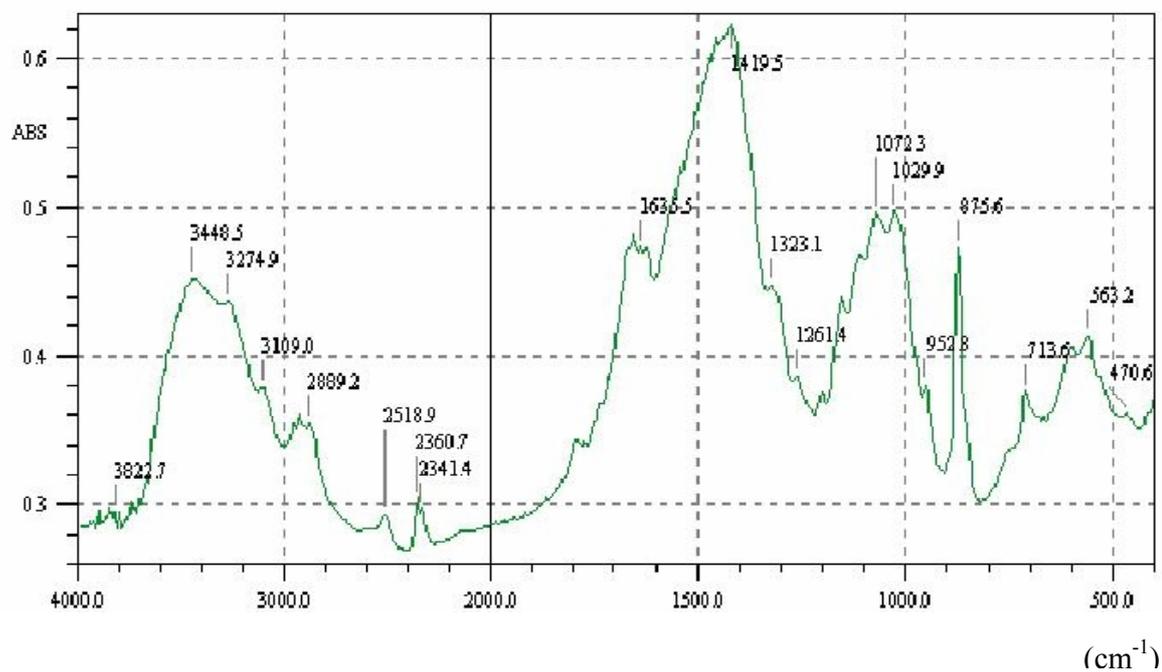


Fig. 18 : Spectres Infra Rouge de la carapace brute (a) et de la carapace déprotéinée (76%) (b) avec 80 g/l en glucose

Chapitre VI : Résultats et discussion

VI. 4. 2. Effet de la stérilisation de la carapace sur l'évolution du pH du milieu

L'influence de la stérilisation de la carapace a été étudiée en reprenant l'essai effectué avec 150 g/l de glucose à température d'incubation 30°C, sans stériliser la carapace. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 19.

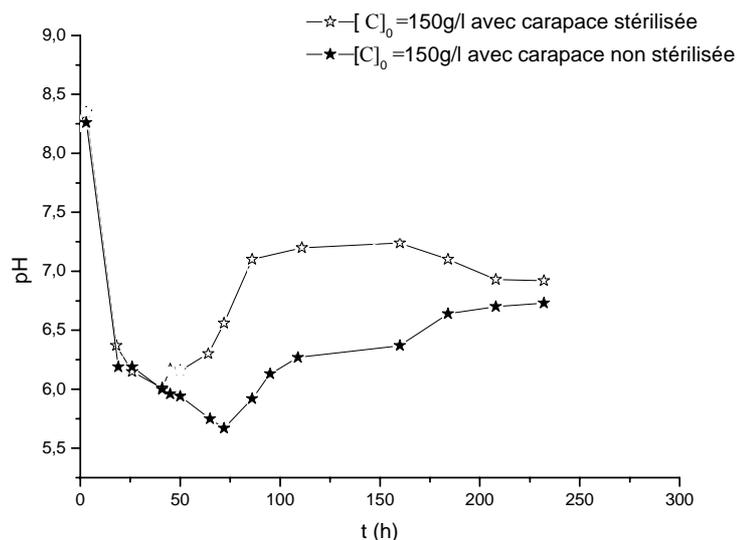


Fig. 19 : Influence de la stérilisation de la carapace sur l'évolution du pH du milieu de fermentation en fonction du temps (150 g/l en glucose et 30°C)

D'après la figure 19, l'effet de la stérilisation est bien observé avec 150 g/l de glucose. On remarque que les plus faibles valeurs du pH obtenues sont de 6,01 et 5,75 avec et sans stérilisation, respectivement. Donc, l'abaissement du pH qui favorise la déminéralisation était meilleur dans les conditions non stériles. Ce résultat est confirmé par le calcul des taux de déminéralisation et de déprotéinisation (Fig. 20).

Chapitre VI : Résultats et discussion

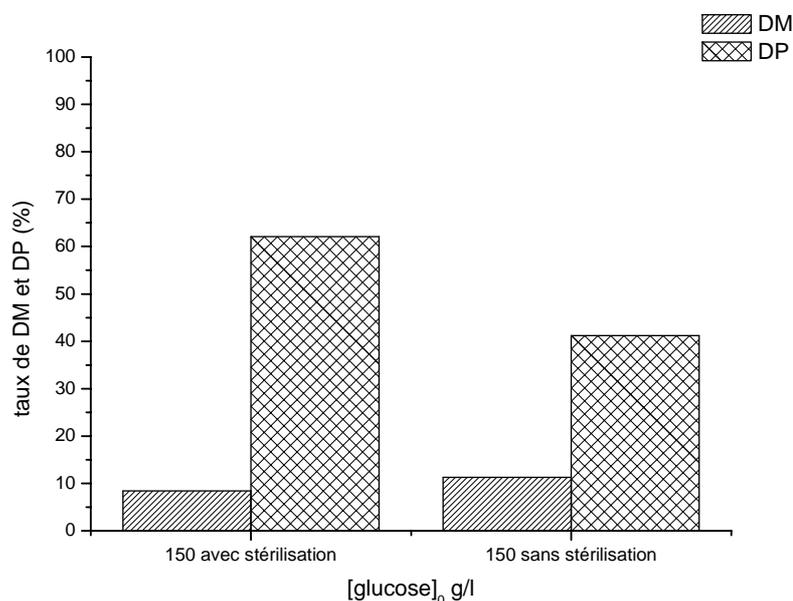


Fig. 20: Influence de la stérilisation sur les taux de déminéralisation et de déprotéinisation du déchet de crevette

D'après la figure 20, on remarque qu'avec 150 g/l en glucose, la déminéralisation atteint un taux de 8,45% et 11,26% avec et sans stérilisation, respectivement. D'après Rao et *al.* (2000), la flore microbienne habituelle de la carapace semble contribuer à l'acidification du milieu. Cependant, il est remarqué une diminution du taux de déprotéinisation avec la carapace non stérile.

VI. 4. 3. Effet de la concentration élevée en glucose sur l'évolution du pH du milieu

Afin d'améliorer la déminéralisation de la carapace, nous avons proposé d'augmenter la concentration initiale en glucose. Quatre concentrations ont été choisies 200, 300, 400 et 500 g/l et la carapace non stérile a été utilisée. Les résultats donnant l'évolution du pH sont représentés dans la figure 21.

Chapitre VI : Résultats et discussion

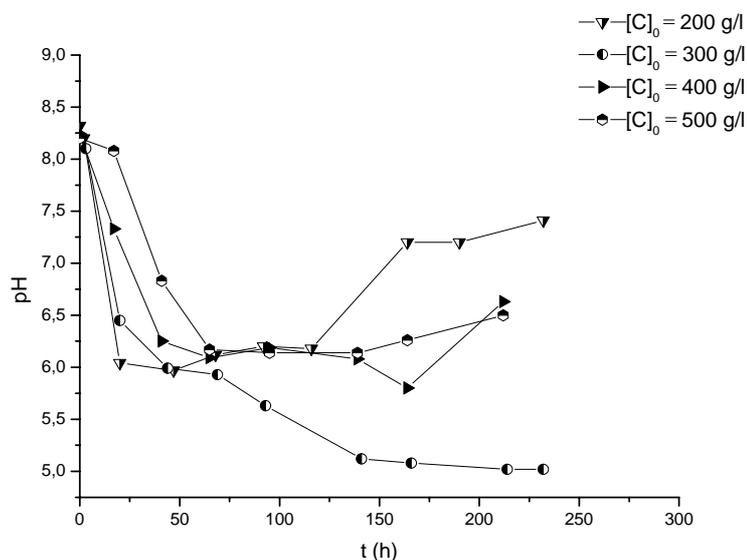


Fig. 21 : Influence de fortes concentrations en glucose sur l'évolution du pH du milieu de fermentation en fonction du temps sur la carapace non stérile

On remarque que pour toutes les concentrations initiales en glucose (Fig. 21), sauf pour 300 g/l, les courbes tracées présentent trois phases. Celles-ci ont été, également, observées avec la carapace stérile.

- La première phase dite phase d'acidification : elle est expliquée par la production d'acide lactique au cours de la croissance bactérienne suite à la conversion du glucose (Fig. 22). Ce résultat est confirmé par les chercheurs Yun *et al.* (2003) et Luquet et Corrieu (2005). La durée de l'acidification varie en fonction de la concentration en glucose. Elle est de 47h pour 200 g/l de glucose, 164h pour 400 g/l de glucose et seulement 139h pour 500 g/l de glucose. Le glucose est utilisé comme source de carbone et d'énergie pour la croissance bactérienne (Fig. 22). L'arrêt de l'acidification lactique coïncide avec l'épuisement du glucose.

En absence de l'inoculum, la carapace en milieu aqueux présente un caractère basique, le pH est compris entre 8 et 9. Sur toutes les figures (22a, 22b et 22c), nous remarquons que la fermentation débute à pH 8-8,5. Ce résultat est expliqué par la présence, lors du dosage, d'une forte concentration en ammoniacque dans le milieu et qui est de l'ordre de 2 g/l.

Chapitre VI : Résultats et discussion

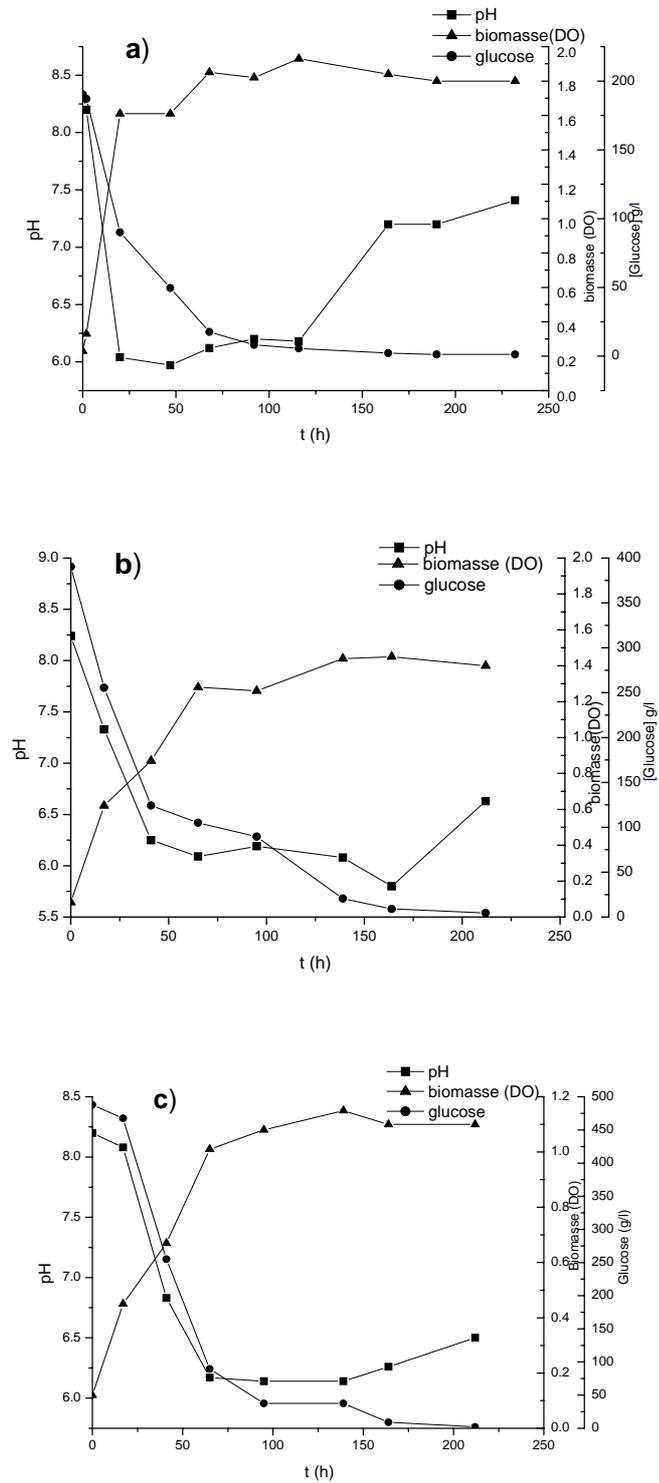


Fig. 22 : Evolutions du pH, de la concentration en glucose et de la biomasse (densité optique) en fonction du temps à différentes concentrations initiales en glucose: 200 g/l (a), 400 g/l (b), 500 g/l (c)

Chapitre VI : Résultats et discussion

Le dosage de l'ammoniaque, à différents temps de fermentation, a montré que durant la phase d'acidification, il y a consommation de l'ammoniaque, par les bactéries, comme source d'azote pour la croissance bactérienne. Ce résultat est confirmé pour toutes les concentrations initiales en glucose (Fig. 23). A la fin de la phase d'acidification la quantité d'ammoniaque restant dans le milieu est de 1,36 g/l pour 200 g/l, 1,11 g/l pour 300 g/l, 3,96 g/l pour 400 g/l et 3,64 g/l pour 500 g/l de glucose.

La diminution du pH est, ainsi, due non seulement à la production de l'acide lactique par conversion du glucose mais aussi à la consommation des ions NH_4^+ présents dans le milieu. Ce résultat n'a pas été signalé et constaté par d'autres travaux.

- Deuxième phase dite phase de stabilité du pH : elle est due à l'arrêt de la production d'acide lactique après épuisement de la source de carbone. Cette phase coïncide avec la phase stationnaire de la croissance bactérienne (Fig. 22). Sa durée est de 96h pour 200 g/l de glucose, 123h pour 400 g/l de glucose et seulement 74h pour 500 g/l de glucose.

- Troisième phase dite phase de la remontée du pH : cette phase s'explique par la production d'ammoniaque dans le milieu de fermentation (Rao et *al.*, 2000 ; Shirai et *al.*, 2001). Cette hypothèse, contrairement à la bibliographie, a été confirmée dans notre travail (Fig. 23), en effet, pour toutes les concentrations initiales en glucose, il y a augmentation, vers la fin de la fermentation, de la concentration en NH_4^+ jusqu'à atteindre des valeurs de 1,83 g/l pour 200 g/l de glucose, 3,95 g/l pour 400 g/l de glucose et 3,63 g/l pour 500 g/l de glucose. La production d'ammoniaque est expliquée par la désamination des acides aminés issus de la dégradation des protéines. Les acides aminés sont utilisés comme sources d'énergie pour le maintien cellulaire durant la phase stationnaire (Fig. 22). Ce résultat a été, aussi, mis en évidence lors de la récupération de la chitine par fermentation en présence de jus de dattes.

Chapitre VI : Résultats et discussion

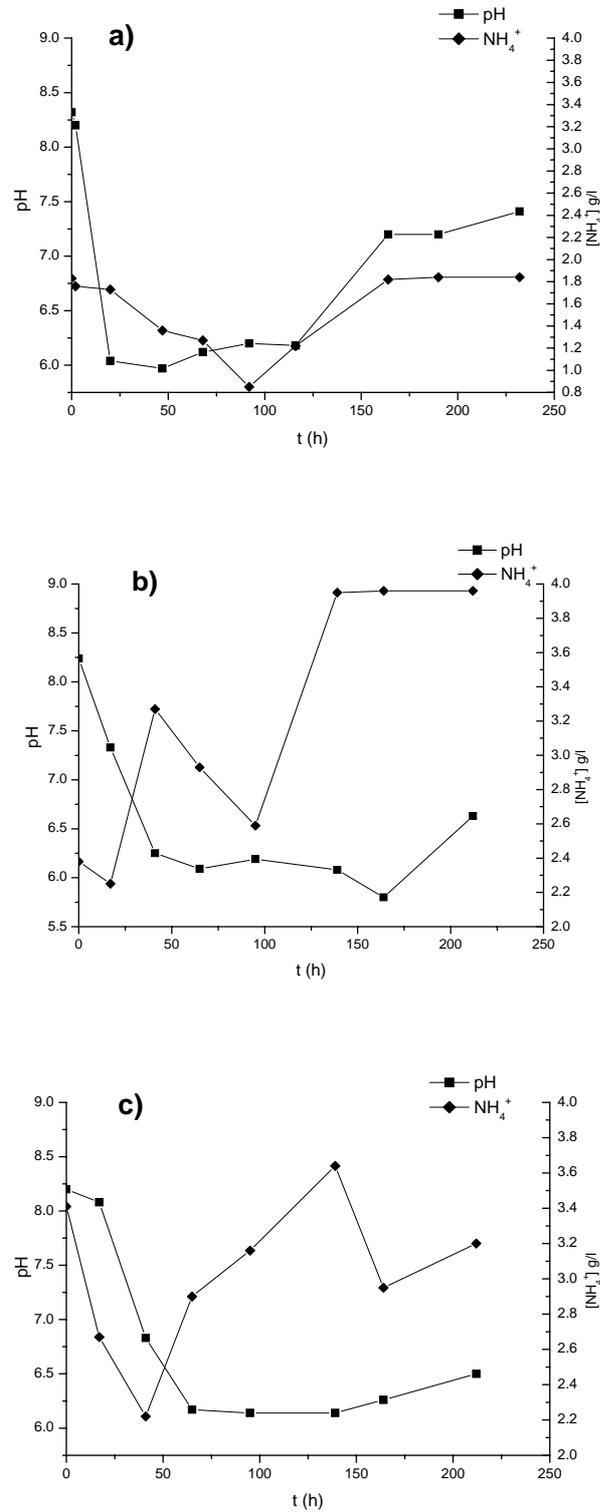


Fig. 23 : Courbes d'évolution du pH et de la concentration en ammoniacque en fonction du temps à différentes concentrations initiales en glucose : 200 g/l (a), 400 g/l (b), 500 g/l (c)

Chapitre VI : Résultats et discussion

La fermentation lactique de la carapace non stérile avec une concentration initiale en glucose de 300 g/l, conduit à des résultats totalement différents de ceux obtenus avec 200, 400 et 500 g/l en glucose. En effet, la figure 24 montre une diminution sans cesse du pH jusqu'à atteindre une valeur de 5 à la fin de la fermentation.

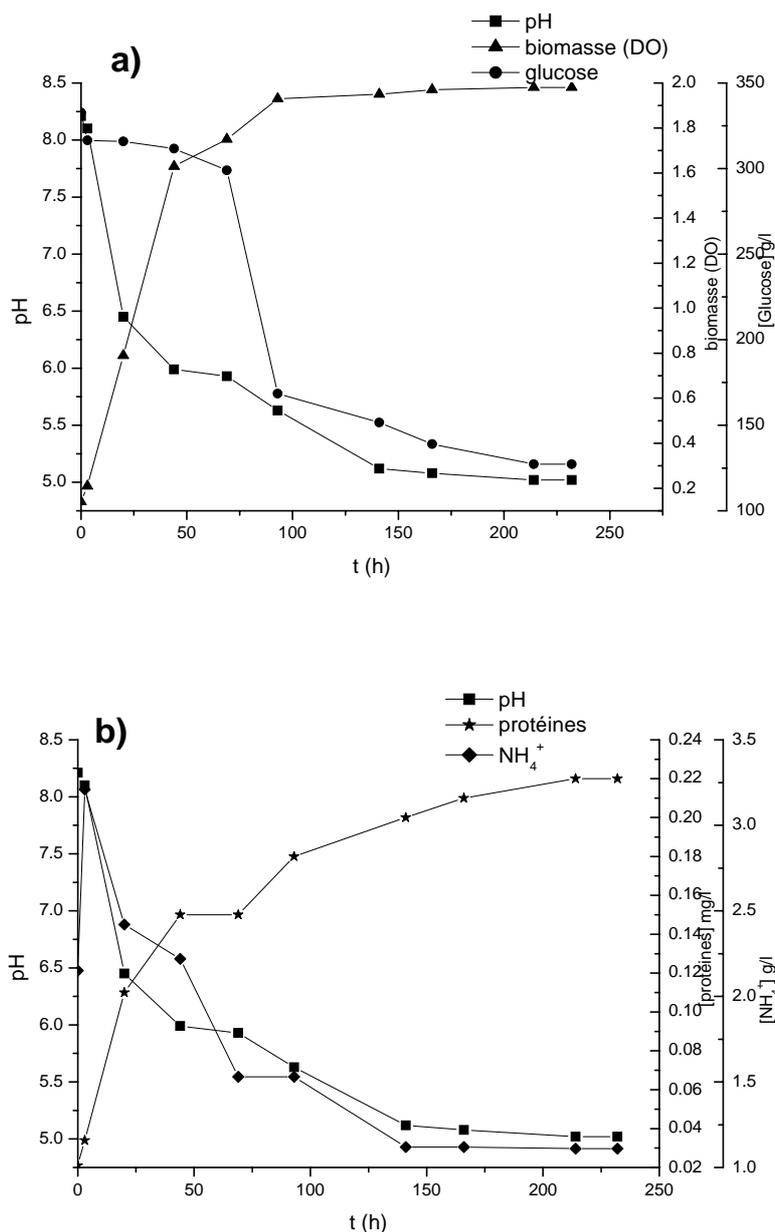


Fig. 24 : Courbes d'évolution du pH, de la concentration en glucose et de la biomasse (densité optique) (a) du pH, des concentrations en ammoniacque et en protéines (b) en fonction du temps

Chapitre VI : Résultats et discussion

Contrairement aux autres concentrations en glucose étudiées, on n'observe pas de production d'ammoniaque. Ce qui explique l'absence de la remontée du pH. L'acidité élevée du milieu (pH égal à 5) peut être responsable de l'inhibition de l'activité protéasique. Selon Chantal *et al.*, (1996), le pH influence l'activité protéolytique des bactéries lactiques.

Pour des concentrations plus élevées en glucose, la croissance bactérienne (Fig. 25) est moins importante qu'avec 300 g/l, car il y a inhibition par excès de substrat. Ce résultat corrobore avec celui obtenu par Yun *et al.* (2003) et Wee *et al.* (2006).

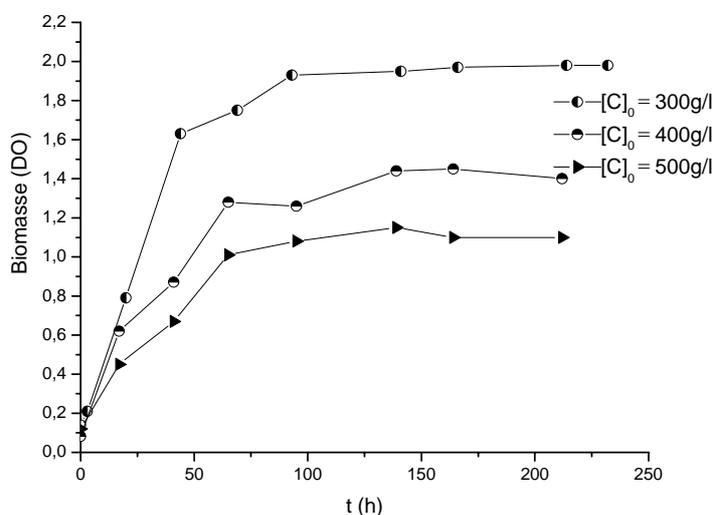


Fig. 25 : Evolution de la croissance bactérienne en fonction du temps à différentes concentrations initiales en glucose

Ces chercheurs ont constaté qu'une fermentation lactique qui se déroule en batch et à fortes concentrations en substrat, la fermentation est inhibée par l'excès du substrat.

Le calcul des taux de déminéralisation et de déprotéinisation, montre que pour une concentration initiale en glucose de 300 g/l, on obtient 53% de déminéralisation et 20,6% de déprotéinisation. Comme le montre la figure 26, cette concentration est optimale.

Chapitre VI : Résultats et discussion

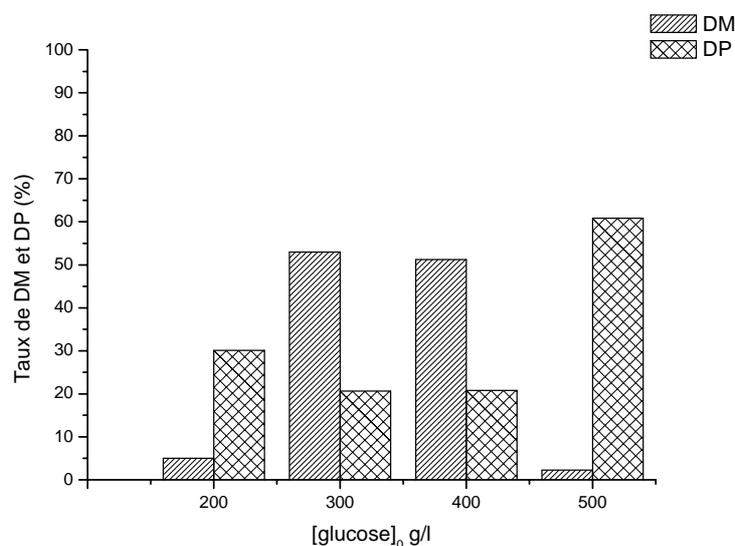


Fig. 26 : Taux de déminéralisation et de déprotéinisation de la carapace en fonction de fortes concentrations initiales en glucose

On remarque qu'avec 500 g/l de glucose, le taux de déprotéinisation est très élevé (60,84%). L'excès du glucose dans le milieu a favorisé le développement de la flore microbienne présente dans la carapace. Ceci est démontré par la coloration verdâtre observée sur la paroi du fermenteur. Dans ce milieu, l'activité protéasique semble être importante.

L'analyse de la carapace fermentée avec 300 g/l de glucose, par spectroscopie infra rouge nous a permis d'obtenir la figure 27.

Chapitre VI : Résultats et discussion

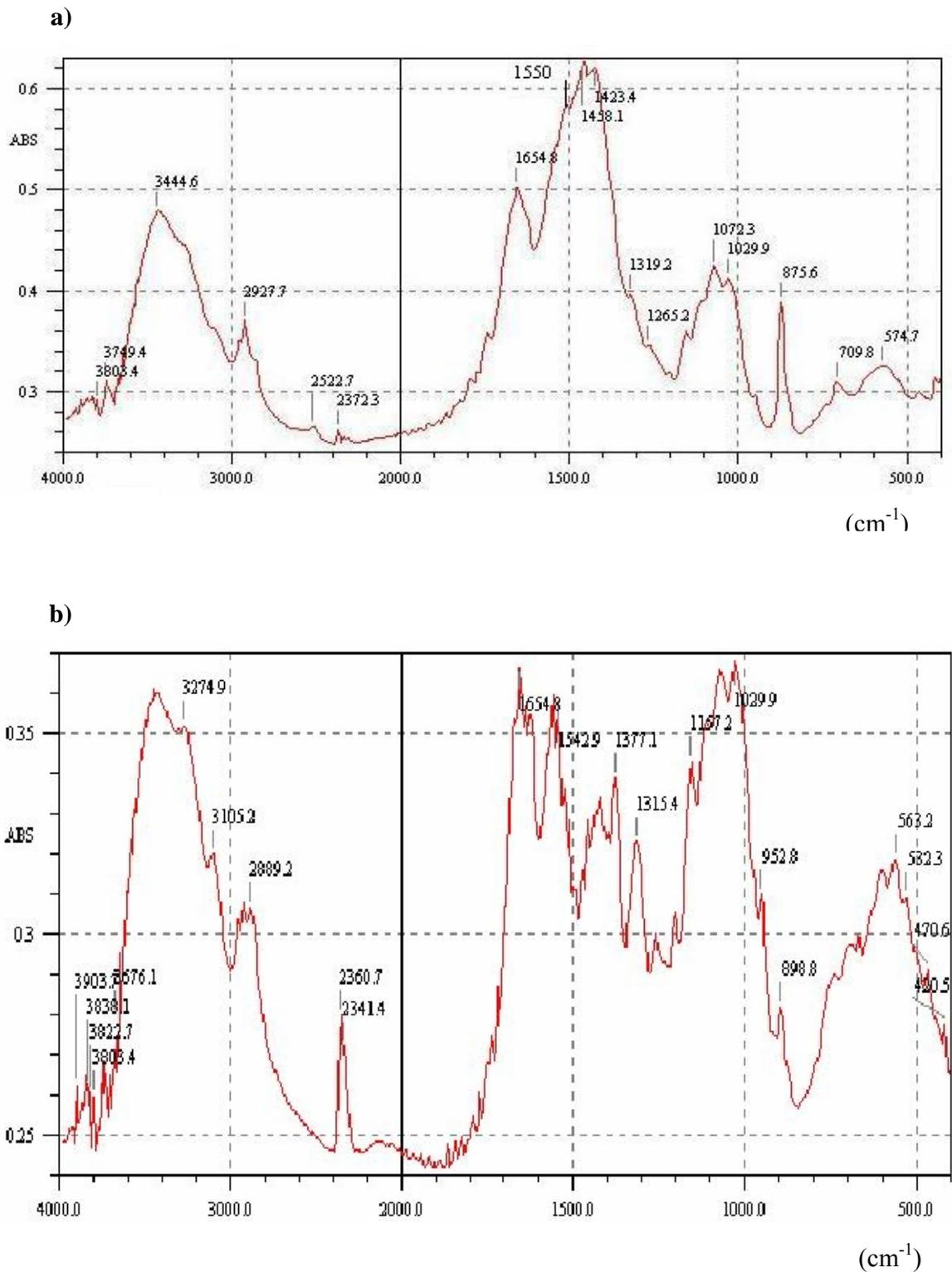


Fig. 27: Spectres Infra Rouge de la carapace brute (a) et de la carapace déminéralisée (b) (53%) avec 300 g/l en glucose

Chapitre VI : Résultats et discussion

Les spectres, montrent qu'il y a disparition des bandes caractéristiques de la calcite. En plus, l'apparition de bandes intenses caractéristiques de la chitine à $3274,9 \text{ cm}^{-1}$ (liaison amide CO-NH), bandes à $2889,2 \text{ cm}^{-1}$ et à $3105,2 \text{ cm}^{-1}$ (liaison C-H) qui ont été masquées, selon Heredia et *al.* (2006), par les bandes de calcite (Fig. 27).

VI. 4. 4. Effet de la température d'incubation sur l'évolution du pH du milieu

Lactobacillus h. est une bactérie lactique thermophile dont la température optimale de croissance bactérienne varie entre 30°C et 45°C .

On a étudié l'influence de la température sur l'évolution du pH du milieu et par conséquent sur la déminéralisation de la carapace.

Deux cultures ont été conduites, l'une à 35°C et l'autre à 42°C sur la carapace non stérile. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 28.

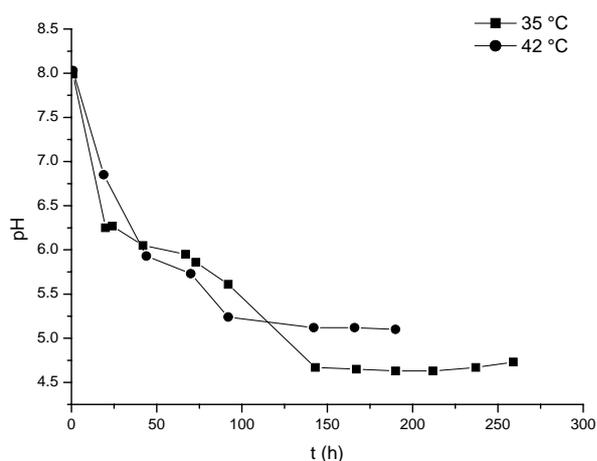


Fig. 28 : Influence de la température sur l'évolution du pH en fonction du temps pour une concentration en glucose de 300 g/l

La figure 28, montre qu'à 35°C le pH diminue jusqu'à pH 4,66 au bout de 150h puis se stabilise. Tandis qu'à 42°C , le pH diminue jusqu'à pH 5,25 au bout de 92h puis se stabilise.

L'augmentation de la température a permis d'obtenir des taux de déminéralisation de 60%

Chapitre VI : Résultats et discussion

à 35°C et 47,88% à 42°C. Les résultats du taux de DM et DP sont illustrés dans la figure 29. Ce résultat nous a permis de conclure que la température optimale de la déminéralisation biologique par *Lactobacillus helveticus* et dans les conditions de notre étude, est 35°C.

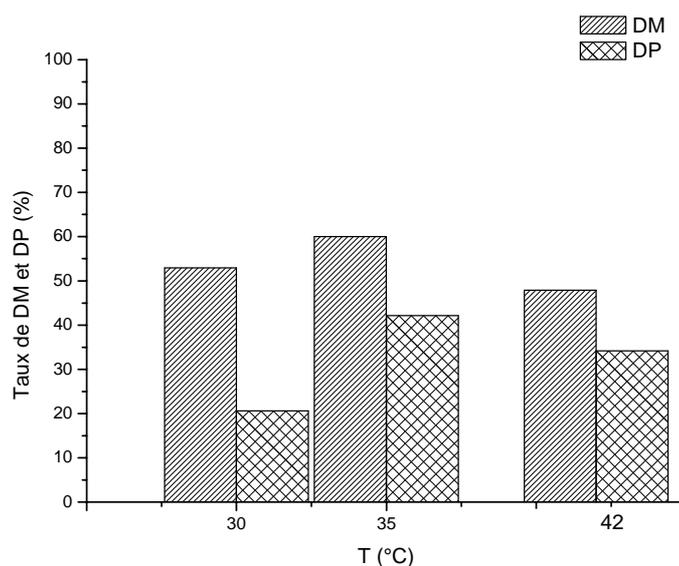


Fig. 29: Taux de déminéralisation et de déprotéinisation en fonction de la température d'incubation avec 300 g/l en glucose

VI. 4. 5. Effet du pH initial sur l'évolution du pH du milieu

Les *Lactobacillus* sont légèrement acidophiles. Leur pH optimal de croissance est compris entre 5,5 et 6,2. La croissance se poursuit jusqu'à pH 5 et parfois au-dessous. La vitesse de croissance est plus faible lorsque la culture commence à pH neutre ou alcalin (Leveau and Bouix, 1991).

Pour ces raisons, nous avons tenté d'améliorer l'acidification, et par conséquent la déminéralisation de la carapace des crevettes, en ajustant le pH initial du milieu de fermentation à 5,5 avec une solution d'acide acétique glacial. Les résultats sont rassemblés sur la figure 30.

Chapitre VI : Résultats et discussion

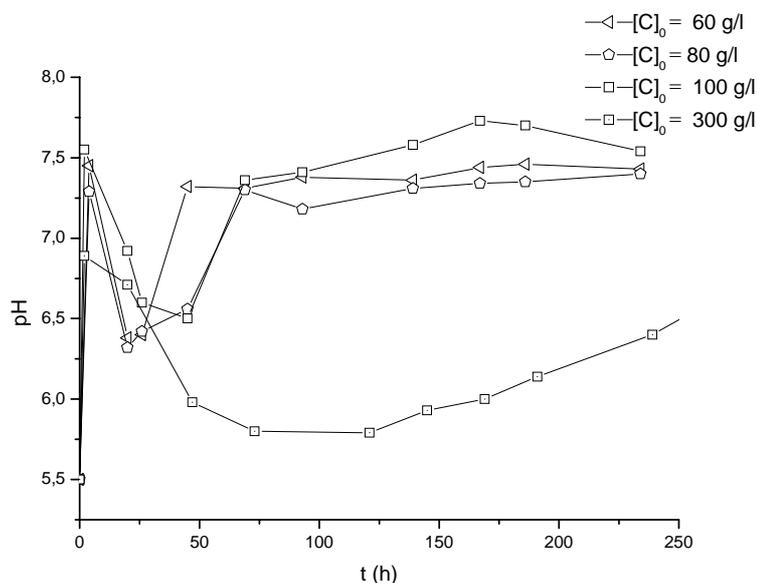


Fig. 30 : Influence du pH initial sur l'évolution du pH du milieu de fermentation en fonction du temps à 30°C

Les résultats représentés sur la figure 30 montrent qu'après ajustement du pH initial, à une valeur acide (5,5), l'addition de la carapace dans le milieu provoque une remontée rapide du pH. Le couplage de la méthode chimique et de la méthode biologique fera l'objet d'une étude ultérieure.

VI. 4. 6. Effet de la source de carbone

La richesse des dattes en sucres et en éléments minéraux offre à celles-ci, la possibilité d'être valorisées par des procédés biotechnologiques. Donc, le jus de dattes peut constituer un bon milieu pour la fermentation.

VI. 4. 6. 1. Influence de la concentration en sucres dans le jus de dattes sur l'évolution du pH

Des essais d'extraction de la chitine ont été réalisés en utilisant différentes concentrations en sucres réducteurs (80, 100 et 150 g/l). Les résultats de l'évolution du pH en fonction du temps à différentes concentrations en sucres dans le jus de dattes sont illustrés dans la figure 31.

Chapitre VI : Résultats et discussion

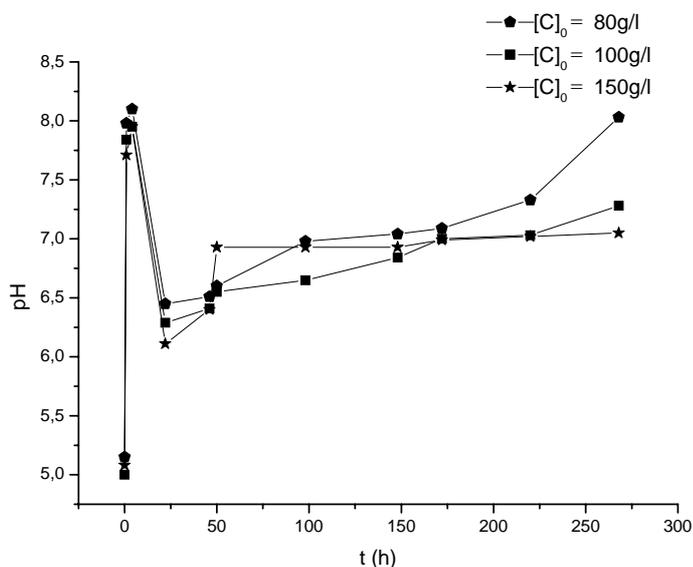


Fig. 31 : Evolution du pH du milieu en fonction du temps à différentes concentrations en sucres dans le jus de dattes à 30°C

Selon la figure 31, on constate que la plus faible valeur du pH (6,08) est obtenue au bout de 23h avec 150 g/l de sucres réducteurs. Avec 80 g/l, le pH du milieu était de l'ordre de 6,42 au bout de 23h.

Pour les trois cultures, on a obtenu une déminéralisation négligeable mais une déprotéinisation importante qui varie entre 76,61% et 91%. La meilleure déprotéinisation est obtenue avec 80g/l en sucres réducteurs à 30°C (Fig. 32).

Comparativement au glucose pur, l'amélioration de la déprotéinisation est due à la composition du milieu de croissance. En outre, selon Leveau et Bouix (1980), les conditions de la culture peuvent modifier l'activité protéolytique totale ou activer/ inhiber une activité protéasique ou peptidasique donnée.

L'utilisation du jus de dattes, comme milieu de fermentation, nous a permis d'améliorer la déprotéinisation. Ceci est dû à la présence de certains ions métalliques dans le jus tels que le calcium, car il est souvent cité pour son rôle dans la paroi cellulaire, en particulier, pour l'activité

Chapitre VI : Résultats et discussion

des protéases de la paroi (Leveau and Bouix, 1980).

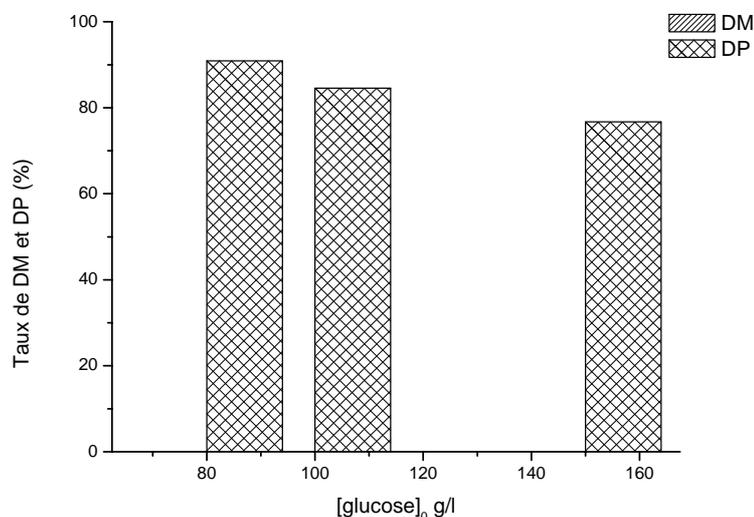


Fig. 32 : Influence de la concentration initiale en sucres sur les taux de déprotéinisation et de déminéralisation de la carapace non stérile.

Cette propriété est attribuée par les auteurs soit à la fixation de l'enzyme sur la paroi, soit à la stabilisation de son activité (Leveau and Bouix, 1980). En plus du calcium, le potassium est exigé pour la croissance de *Lactobacillus helveticus* (Leveau and Bouix, 1980).

Les courbes donnant les évolutions du pH, de NH_4^+ en fonction du temps, présentent les mêmes allures que celles obtenues avec le glucose pur (Fig. 33). En effet, durant la phase d'acidification, il y a consommation de sucres réducteurs (non dosés) comme source de carbone et d'énergie et de l'ammoniaque comme source d'azote pour la croissance bactérienne.

Par contre, durant la phase de remontée du pH, il y a production de NH_4^+ résultant de la dégradation des protéines présentes dans le milieu de culture (Fig. 33).

Chapitre VI : Résultats et discussion

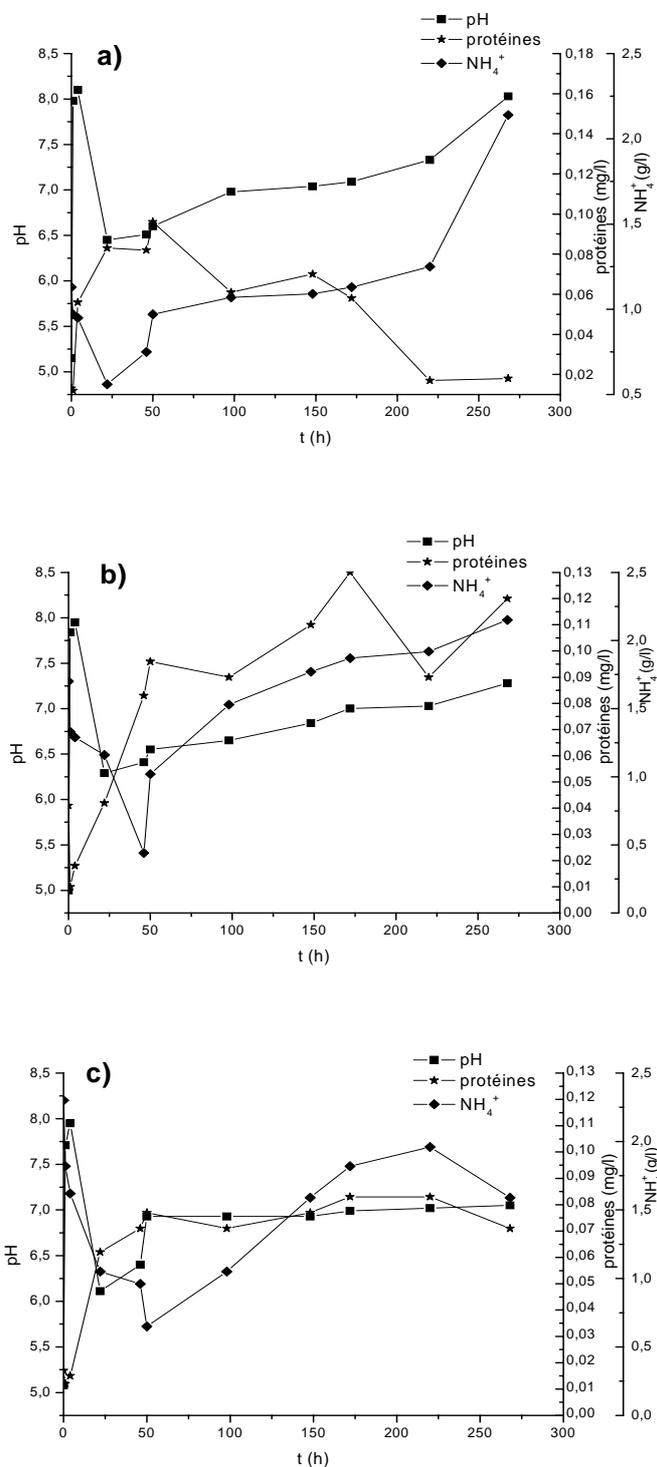


Fig. 33 : Evolutions du pH, de la concentration en NH_4^+ et des protéines en fonction du temps à différentes concentrations en sucres réducteurs : 80 g/l (a), 100 g/l (b), 150 g/l (c) à 30°C

Chapitre VI : Résultats et discussion

VI. 4. 6. 2. Influence de la température sur l'évolution du pH

A 35°C (Fig. 34), on a eu une amélioration de l'acidification. Au bout de 69h, le pH atteint 4,78 avec 208 g/l de sucres réducteurs. Au delà de 60h, il se stabilise puis remonte jusqu'à atteindre une valeur de 6 au bout de 300h. La déminéralisation obtenue avec cette concentration est de l'ordre de 44%. Alors que, la déprotéinisation est de l'ordre de 32%.

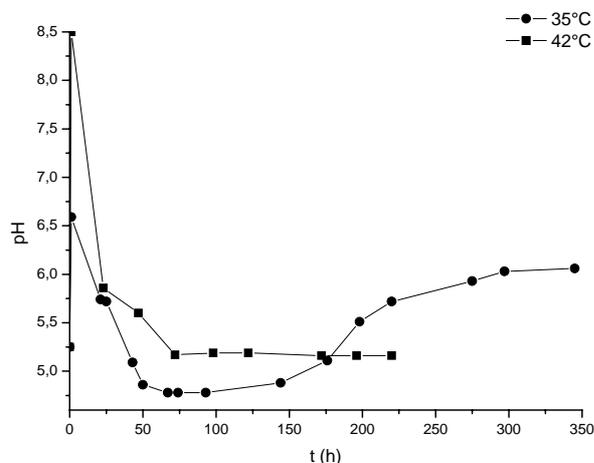


Fig. 34 : Evolution du pH en fonction du temps à différentes températures d'incubation avec 208 g/l en sucres réducteurs

A 42°C (Fig. 34), le pH atteint une valeur de 5,16 au bout de 70h puis se stabilise à cette valeur sans qu'il y ait remontée du pH à la fin de la fermentation. Dans ces conditions, une déminéralisation de 41,4% a été obtenue. Les résultats de déminéralisation et déprotéinisation, obtenus sont illustrés dans la figure 35.

Chapitre VI : Résultats et discussion

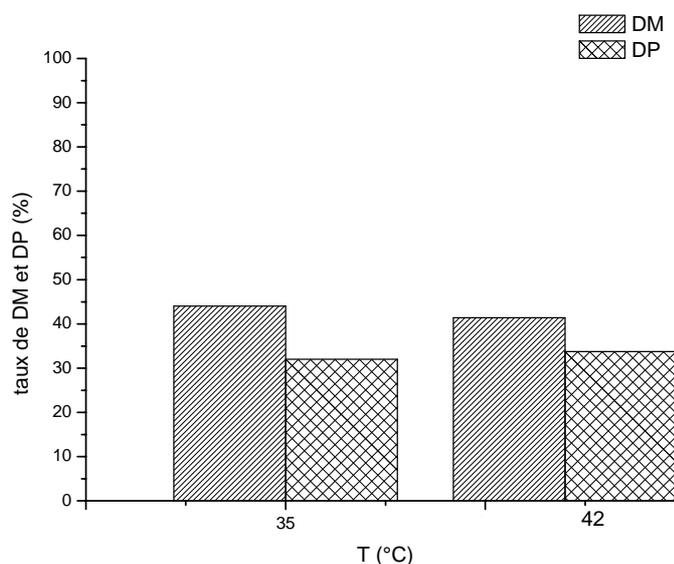


Fig. 35 : Taux de déminéralisation et de déprotéinisation de la carapace en fonction de la température avec 208 g/l en sucres réducteurs

On constate que, comme pour le glucose pur, la déprotéinisation et la déminéralisation se font séparément. La déprotéinisation est maximale (91%) à faible concentration en sucres réducteurs (80 g/l), alors que la déminéralisation (44%) est favorisée par de fortes concentrations en sucres réducteurs (208 g/l), dans nos conditions d'étude. En outre, la température optimale de déminéralisation de la carapace des crevettes par *Lactobacillus helveticus* en présence du jus de dattes est bien 35°C comme pour le glucose pur.

Conclusion

Conclusion

La gestion des déchets est devenue en quelques années un enjeu environnemental majeur, à cause de leur production de plus en plus importante et diversifiée, résultat de notre développement industriel et économique.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à la valorisation biologique de deux déchets : la carapace de crevette *Parapenaeus longirostris* riche en chitine et le jus de dattes riche en sucres fermentescibles utilisés comme milieu de fermentation. Une étude des conditions opératoires pouvant influencer ce procédé biologique a donc été réalisée dans ce mémoire.

Dans une première étape, nous avons caractérisé la carapace de *Parapenaeus longirostris* et le jus de dattes utilisés dans notre étude. Les analyses physico-chimiques de cette carapace, ont montré qu'elle est constituée de 35,5% de cendres, 27,61% de protéines, 23,61% de chitine et 13,28% de lipides et pigments. Ces analyses nous ont permis également de déterminer la composition biochimique de jus de dattes. Les résultats obtenus montrent qu'il présente une teneur élevée en sucres réducteurs (208 g/l), en potassium (1580mg/l), en calcium (75,14 mg/l) et pauvre en protéines (0,086 mg/l).

Dans une deuxième étape, nous avons optimisé les conditions opératoires de la fermentation lactique. L'optimum de la déminéralisation (60%) a été obtenu avec 300 g/l en glucose et à 35°C sur carapace non stérile. Alors que, la meilleure déprotéinisation (76%), a été obtenue à faible concentration en glucose (80 g/l) et à 30°C sur carapace stérile.

Les résultats obtenus démontrent clairement que :

-la déminéralisation et la déprotéinisation maximales par le procédé biologique doivent se faire séparément comme dans le procédé chimique et dans des conditions totalement différentes.

-La stérilisation de la carapace semble être favorable à la déprotéinisation et défavorable à la déminéralisation. La flore microbienne présente dans les crevettes contribue donc à l'acidification du milieu de fermentation lactique.

Dans une troisième étape, nous avons remplacé le glucose pur par le jus de dattes. Une optimisation des paramètres physico-chimiques a été aussi réalisée. L'utilisation du substrat naturel, nous a permis d'améliorer la déprotéinisation. En effet, on a obtenu un taux de 91% avec le jus de dattes dont la concentration est de 80 g/l en sucres réducteurs et à 30°C. On remarque que les conditions d'une déprotéinisation maximale sont identiques à celles du

Conclusion

milieu à base du glucose pur. Concernant la déminéralisation, un taux maximal de 44% est obtenu avec 208g/l en sucres réducteurs et à 35°C. Ce taux reste, par contre, inférieur à celui obtenu avec le glucose pur. Les sels minéraux retrouvés dans le jus de dattes sont responsables dans l'amélioration du taux de déprotéinisation de la carapace.

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'utilisation du jus de dattes dans la récupération de la chitine de la biomasse marine est très intéressante en plus qu'elle rentre dans cadre de la valorisation des déchets.

Afin d'élucider les mécanismes intervenants dans la déminéralisation et la déprotéinisation de la carapace, nous avons effectué des dosages de la DO traduisant la biomasse, des substrats (glucose et ammoniac) et des métabolites (NH_4^+). Nous avons démontré que, l'acidification du milieu de fermentation n'est pas seulement due à la production d'acide lactique par conversion du glucose mais aussi à la consommation des ions NH_4^+ . Ce résultat n'a pas été constaté dans les travaux antérieurs.

La méthode biologique nous permet d'extraire la chitine sans générer des produits chimiques toxiques et polluants comme c'était le cas dans la méthode chimique. En plus, on obtient un milieu liquide riche en protéines, en acides aminés et d'autres matières organiques valorisables et qui seraient intéressant de les doser.

Pour la suite du travail, il sera intéressant pour augmenter la déminéralisation et la déprotéinisation de la carapace d'envisager en perspectives de :

- Répéter plusieurs fois les cycles de fermentation.
- Faire un essai dans un réacteur de volume plus important (par exemple de 3 litres) afin d'améliorer les résultats des dosages des échantillons prélevés.
- Additionner des enzymes protéolytiques et des bactéries lactiques pour une récupération maximale de la chitine.
- Coupler la méthode chimique à la méthode biologique.
- Utiliser une autre source de chitine tels que les micro-organismes issus des industries agro-alimentaires de fabrication de lactosérum, les mélasses,... et pharmaceutiques (antibiotiques) (Seda et *al.*,2004).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1- **Acharya B. Vishu Kumar, Mandyam C. V., Lalitha R. Gowda and Rudrapatnam N. Tharanathan, 2005.** Characterization of chitooligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. Biochem. J. Immediate Publication.
- 2- **AFNOR, 1982** (NA 1158- 1990, ISO 1871)
- 3- **Agulló E., Rodriguez M. S., Ramos V. and Albertengo L., 2003.** Present and future role of chitin and chitosan in food. Macromol. Biosci., 3, 521-530.
- 4- **Ait Barka E., Eullaffroy P., Clément C. and Vernet G. 2004.** Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera L.* against *Botrytis cinerea*. Plant Cell. Rep. 22, 608-614.
- 5- **Alejandra de Moreno de Leblanc, Chantal Matar, Catherine Thérault and Gabriela Pedigón, 2005.** Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus R389* on immune cells associated to mammary glands in normal and a breast cancer model. Immunobio., 210, 349-358.
- 6- **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.
- 7- **Allache F., 2005.** Activité biologique d'un dérégulateur de croissance des insectes : l'hexaflumuron sur la cuticule des larves de *Locusta Migratorine*. Thèse de Magister. L'Institut National Agronomique, El-Harrach.
- 8- **Amilali M., 1999.** Caractérisation des films de chitosane par la perméabilité à la vapeur d'eau et aux gaz (CO₂, O₂). Mémoire de maîtrise en sciences. Faculté d'agriculture, Alimentation et consommation, Université de Laval, Canada.
- 9- **Anand B. D. and Ramesh P., 2004.** Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. The AAPS J., 6 (3) article 27.
- 10- **Andrade V. S., Benicio de Barros N., Kazutaka F. and Galba M.de Campos-Takaki, 2003.** Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides (Mucor javanicus IFO 4570)* a factorial study. Rev Iberoam Micol; 20, 149-153.

Références bibliographiques

- 11- **Apria, 1981.** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries Agro-alimentaires : Analyse des constituants alimentaires, Vol 4 Ed Apria.
- 12- **Bailey S. E., Olin T. J., Bricka R. M., and Adrian D. D., 1999.** A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Wat. Res.* 33 (11), 2469-2479.
- 13- **Bal Y., Bal K. E., Laarabi- Bouamrane O. and Lallam A., 2006.** Copper (II) uptake by *Pleurotus mutilus* biomass, chitin and chitosan. *Mineral Eng.*, 19 (14), 1456- 1458.
- 14- **Beaumont A. et Cassier P., 2000.** Biologie animale : des protozoaires aux métazoaires épithélioneuriens. Edition Dunod. Tome 2, 970.
- 15- **Begoña C. G., Ruth D., 1997.** Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *Interna. J. of Pharmac.*, 148, 231-240.
- 16- **Bell A. A., Hubbard J. C. And Li L., 1998.** Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of Fusarium Yellowings of Celery. *Plant Disease.* 82 (3), 322-328.
- 17- **Benesch J., 2001.** Null Ellipsometry and protein adsorption to model biomaterials. Linköping studies in Science and Technology.
- 18- **Benguella B., Benaissa H., 2002.** Effects of competing cations on cadmium biosorption by chitin. *Colloids Surf Part A. Physicochem. Eng. Aspects*, 201, 143-150.
- 19- **Benhabiles M. S., 1992.** Hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonneries. Thèse de magister, Ecole Nationale Polytechnique, Alger.
- 20- **Berger J., Reist M., Mayer J. M. Felt O. Peppas N. A. and Gurny R., 2004.** Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Europ. J. of Pharmac. and Biopharmac.*, 57, 19-34.
- 21- **Bouarab K., 2000.** Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système *Chondrus crispus* *Acrochaeteoperculata*. Thèse de Doctorat de l'University Paris 6.
- 22- **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.
- 23- **Bribri A., Hafad H., El- Krati M. and Lançar I. T., 2005.** Valorisation de certaines substances naturelles pour la décoloration des rejets liquides. 3^{ème} Journée Internationale des Géosciences de l'environnement, El- Jadida.
- 24- **Caiqin Q., Qi X., Huirong L., Mu F., Yi L., Xinyou C. and Qiang L., 2004.** Calorimetric studies of the action of chitosan- N-2- hydroxypropyl thrimethyl

Références bibliographiques

- ammonium chloride on the growth of microorganisms. *Int. J. of Biol. Macromol.*, 34, 121-126.
- 25- **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. *Biures. Technol.*, 98 (6), 1224- 1230.
- 26- **Chantal Matar, Jean Amiot, Laurent Savoie and Jacques Goulet, 1996.** The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* of the release of peptides during In Vitro digestion. *J. Dairy Sci.* 79 ; 971- 979.
- 27- **Chellat F., 1999.** Biocompatibilité, biodégradabilité et influence de la stérilisation sur le complexe chitosane-xanthane. Mémoire de Maîtrise en Sciences Appliquées (M. Sc. A). Ecole Nationale Polytechnique de Montréal.
- 28- **Chih- Min Wen, Chien- Sheng Tseng, Chih- Yu Cheng and Yaw- Kuen Li, 2002.** Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 213-219.
- 29- **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.*, 37, 1359-1366.
- 30- **Compère Ph., Jaspard-Versali M. F. and Goffinet G., 2002.** Glycoproteins from the cuticle of the Atlantic shore crab *Carcinus maenas* : I. Electrophoresis and western-blot analysis by use of lectins. *Biol. Bull.*, 202, 61- 73.
- 31- **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.
- 32- **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 chitinoproteins and chitin. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5468-5472.
- 33- **Desbrières J., 2003.** Amphiphilic derivatives of chitin and chitosan : Rheological and tensioactive properties. European symposium: Biopolymers: Health, Cosmetic & food applications. Polymerix 21-22 May 2003, Rennes, France.
- 34- **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.

Références bibliographiques

- 35- **Doleyres Y., 2003.** Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Doctorat en Sciences et Technologie des Aliments. Département des sciences des aliments et de nutrition, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université de Laval.
- 36- **Donadel K., 2004.** Estrutura, propriedades e aplicações da quitina e quitosana. Universidade federal de Santa Catarina pós- graduação em ciência e engenharia de materiais disciplina : Tópicos especiais biomateriais.
- 37- **Droualt S., Gérard C., 2001.** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé, 101-117.
- 38- **Dubrana D., 1992.** Chimie industrielle : Les industriels se mettent au homard. Sciences et vie.
- 39- **El- Ghaout A., Arul J., Asselin A., Benhamou N, 1992.** Antifungal activity of chitosan on two post- harvest pathogen of strawberry fruits. *Phytopath* ; 82, 398-402.
- 40- **Elisane Longhinotti, Fabida Pozza, Ligia Furlan, Maria de nazaré de M. Sanchez, Marilene Klug, Mauro C. M. Laranjeira and Valfredo T. Favere, 1998.** Adsorption of anionic dyes on the biopolymer chitin. *J. Braz. Chem. Soc.*, 9 (5), 435-440.
- 41- **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.
- 42- **Falini G., Weiner S. and Addadi L., 2003.** Chitin- silk fibroin interactions : relevance to calcium carbonate formation in invertebrates. *Calci. Tiss. Int.*, 72 (5).
- 43- **Felt O., 1999.** Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. Thèse de doctorat d'état. Université de Genève.
- 44- **Fernandez- Kim S. O., 2004.** Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. Thesis of the Louisiana State University.
- 45- **Ferrer J., Paez G, Marmol Z., Ramones E., Garcia H. and C. F. Forster, 1996.** Acid hydrolysis of shrimp shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. *Biores. Techno.*, 57, 55-60.
- 46- **Foscolo J. and Phillipon P., 1997.** Des molécules qui miment le vivant. *Biofutur* 171, 14-17.
- 47- **Freier T., Montenegro R., Koh H. S. and Shoichet M. S., 2005.** Chitin- based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials*, 26, 4624-4632.

Références bibliographiques

- 48- **Gagné Nellie, 1993.** Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid. Master of Sciences. McGill University, Montreal.
- 49- **Giraud- Guille M.- M., Emmanuel Belamie and Gervaise Mosser, 2004.** Organic and mineral networks in carapaces, bones and biomimetic materials. C. R. Plevol, 3, 503-513.
- 50- **Gogev S., Versali M.- F. and Thiry E., 2003.** Les chitosanes- nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux. Ann. Méd. Vét., 147, 343-350.
- 51- **Graham G. Allan and Mark P., 1995.** Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. Carbohy. Resea., 277, 257-272.
- 52- **Grassé P.- P., 1979.** Abrégé de zoologie : 1. Invertébrés. Edition Masson, Paris. Tome 1, 220.
- 53- Green A.T., Healy M. G. and Healy A., **2004.** Production of chitinolytic enzymes by *Serratia marcescens* QMB 1466 using various chitinous substrates. J. of Chemic. Techno. and Biotechno., 80 (1), 28- 34.
- 54- **Guiraud J-P., 2003.** Microbiologie alimentaire. 651. Edition Dunod, Paris.
- 55- **Gülbahar Akkaya, Ilhan Uzun and Fuat Güzel, 2007.** Kinetics of the adsorption of reactive dyes by chitin. Dyes and pigments 73, 168- 177.
- 56- **Guyot J- P., 2000.** De l'alimentation aux cosmétiques : La seconde vie des crevettes thaïlandaises. Sciences au sud- le journal de l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement), (3) janvier/ février.
- 57- **Hamodrakas S. J., Willis J. H. and Iconomido V. A., 2002.** A structural model of the chitin- binding domain of cuticle proteins. Insect biochem. and molec. biology, 32, 1577-1583.
- 58- **Harkness M., Farnum R., Weesner B., Foti D., Wilke W. And Smith D., 2003.** The Case for Chitin. GE Global Research. Technical information Series.
- 59- **Healy M., Green A. and Healy A., 2003.** Bioprocessing of marine crustacean shell waste. Acta Biotechnol., 23, 2- 3, 151-160.
- 60- **Heredia A., Aguilar-Franco A., Magaña C., Flores C., Piña C., Velázquez R., Schäffer T. E., Bucio L., Basiuk V. A., 2006.** Structure and interactions of calcite spherulites with α - chitin in the brown shrimp (*Penaeus aztecus*) shell. Materials Science and Engineering : C, 27 (1), 8- 13.

Références bibliographiques

- 61- **Hirotohi E., Yasuaki T., Noriaki O., Toshihiro K. and Toshiki W., 2004.** A crustacean Ca^{2+} - binding protein with a glutamate- rich sequence promotes CaCO_3 crystalization. *Biochem. J.*, 384, 159-167.
- 62- **Hitoshi S. and Yoshihiro S., 1999.** Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N- acetylated or N- alkylated partially deacetylated chitins. *Carbohy. Polymers*, 39, 127-138.
- 63- **Hobel C. F. V., 2004.** Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods. PhD thesis, University of Iceland.
- 64- **Huang C-J., Wang T-K., Chung S-C. and Chen C-Y., 2005.** Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28- 9. *J. of Biochem. and Mol. Biolo.*, 38 (1), 82-88.
- 65- **Jaafari K., Elmaleh S., Coma J. and Benkhouja K., 2001.** Equilibrium and kinetics of nitrate removal by protonated cross-linked chitosan. *Water SA.* 27 (1).
- 66- **Jae- Young Je and Se- Kwon Kim, 2006.** Antimicrobial action of novel chitin derivative. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, 104-109.
- 67- **Jaroslav M. W., Hiroshi M., Noriaki S., Masao T. and Fumio Y., 2005.** Metal ions adsorption by cross- linked carboxymethylchitin and carboxymethylchitosan hydrogels. *Proceedings of The 8th Polymers for Advanced Techno. Intern. Symposium, Budapest, Hungary.*
- 68- Jayakumar R., Nwe N., Tokura S. and Tamura H., 2006. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of biological macromolecules. Int. J. Biol. Macromol.*, 40 (3), 175- 181.
- 69- **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.
- 70- **Joseph A. Laszlo, 1994.** Removing acid dyes from textile wastewater using biomass for decolorization. *American Dyestuff Reporter.*
- 71- **Jung W. J., Jo G. H., Kuk J. H., Kim K. Y. and Park R. D., 2005b.** Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei sub sp. tolerans sub sp. tolerans kctc- 3074* and *Serratia marcescens FS-3*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 (2), 234- 237.
- 72- **Jung W. J., Kuk J. H., Kim K. Y. and Park R. D., 2005a.** Demineralization of red crab shell waste by lactic acid bacteria fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (6), 851-854.

Références bibliographiques

- 73- **Kamiyama K., Onishi H. and Machida Y., 1999.** Biodisposition characteristics of N-succinyl- chitosan and glycol- chitosan in normal and tumor-bearing mice. *Biol. and phama. bull.* 22 (2), 179-186.
- 74- **Kamst E. and Spaink P. H., 1999.** Functional domains in the chitin oligosaccharide synthase NodC and related β - polysaccharide synthases. *Trends in Glycosc. and Glycotechno.*, 11 (60), 187-199.
- 75- **Kiefer, 1999.** Le chitosane : <http://www.France.com/kiefer/Es.htm>.
- 76- **Kim S- J., Kang S- Y., Park J- G., Park S- L., Lee Y- D. and ko Y- H., 1999.** Effects of chitooligisaccharides on Crabon tetrachloride induced liver injury in rats: http://www.kunpoong.co.fr.kr/PDF/eng/Effect_of_Carbon_Liver_injury_in_rats.PDF.
- 77- **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 colorimetry carbohydrate polymers. 49, 185-193.
- 78- **Klokkevold P. R., 1995.** The effet of Poly-N-Acetyl Glucosaminoglycan (chitosan) on osteogenesis in-vitro. Master of Science in Oral Biology, University of California, Los Angeles.
- 79- **Kramer K. J. and Muthukrishnan S., 1997.** Insect chitinase : Molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect. Biochem. Molecular. Biol.*, 27, 887-900.
- 80- **Kramer K. J., Carol D- T. and Daizo K., 1985.** Chitin metabolism in insects, In: Kerkut G. A. and Gilbert L. I. *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology.* 3: Integument, respiration and circulation, 625. Prgamon Press Oxford. New York. Toronto. Sydney. Paris. Frankfurt.
- 81- **Kurita K., 2001.** Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.*, 26, 1921-1971.
- 82- **Laflamme Ph., 2000.** Evaluation de potentiel du chitosane pour lutter contre la pourriture racinaire causée par *Cylindrocladium floridanum*, chez l'épinette noire. Mémoire de Maîtrise en Science. Université de Laval, Canada.
- 83- **Lanveer A. K., Kok K. P. and Hung S. C., 2002.** Reporting degree of deactylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J Pharm Pharmaceutic Sci.*, 5 (3), 205-212
- 84- **Larpent J. P. et Larpent G. M., 1985.** *Eléments de microbiologie.* Eds Hermann, Paris, 345.

Références bibliographiques

- 85- **Lateur M., 2000.** Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance systémique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 6 (2), 67- 77.
- 86- **Laura Ramírez- Coutiño, 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*, 41, 1106-1110.
- 87- **Laurance D. Hall and Mansur Yalpani, 1980.** Enhancement of the metal-chelating properties of chitin and chitosan. Preliminary Communication *Carbohydrate Research*, 83, C₅-C₇.
- 88- **Law L. and Valade J. L., 1983.** Production of CTMP from aspen. *International Mechanical Pulping Proceedings. TAPPI proceedings*, 259-270.
- 89- **Leclerc H., Gaillard J- L. and Michel S., 1995.** *Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien.* 535. Doin éditeurs, Paris.
- 90- **Leclerc Ph., 1997.** Caractérisation microbiologique des composts à base de résidus chitineux. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.
- 91- **Legros W., Straus A- M., Bultot H. and Versali M- F., 2001.** Kitozyme : Le nouveau spin off de biotechnologie de l'Université de Liège. Conférence de Presse, Château de Colonster.
- 92- **Leveau J. Y. and Bouix M., 1980.** *Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel.* 612. Lavoisier Tec & Doc Apria, Paris.
- 93- **Leveau J. Y., Bouix M. and De Roissart H., 1991.** La flore lactique In : Bourgeois C. M., Leveau J. Y. *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Le contrôle micro biologique.* 2^{ème} édition. Lavoisier- Tec & Doc, Paris. 3. 449.
- 94- **Loiseleur.J, 1963.** *Techniques de laboratoire : Chimie physique, chimie biologique.* Tome 1, 3ème édition, Masson, Paris.
- 95- **Luquet François- Marie and Corrieu Georges, 2005.** *Bactéries lactiques et probiotiques.* Editions TEC & DOC. Lavoisier.
- 96- **Majeti N. V. Ravi Kumar, 2000.** A review of chitin and chitosan applications. *React. & Func. Poly.* 46, 1-27.
- 97- **Manisara P., Ratana R. and Pitt S., 2003.** Characterisation of beta- chitin/ poly (vinyl alcohol) blend films. *Polymer testing*, 22, 381- 387.

Références bibliographiques

- 98- **Merzendorfer Hans and Lars Zimoch, 2003.** Chitin metabolism in insects : structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The J. of Experiment. Biol.* 206, 4393- 4412.
- 99- **Minke R. and Blackwell J., 1978.** The structure of α - chitin. *Journal of Molecular Biology.* 120 (2), 167-181.
- 100- **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.*, 11 (1), 63- 68.
- 101- **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 ciencies quimiques- Menicio doctor Europeu.*
- 102- **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*, 4. suppl., 55- 56.
- 103- **Morimoto M., Saimoto H. and Yoshihiro S., 2002.** Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification. *Trends in Glycosc. and Glycotechno.*, 14 (78), 205- 222.
- 104- **Mrunal R. T., 2004.** Synthesis and antibacterial assessment of water- soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality. *Doctor of philosophy. Louisiana State University.*
- 105- **Mukherjee D. P., 2001.** Method for producing chitin or chitosan. *United States Patents*, 6, 310, 188.
- 106- **Muzzarelli A. A. Riccardo, 1980.** Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. *Enzyme Microb. Technol.*, 2, 177- 184.
- 107- **Muzzarelli A. A. Riccardo, 1988.** Carboxymethylated chitins and chitosans. *Carbohy. Polym.*, 8, 1-21.
- 108- **Muzzarelli A. A. Riccardo, Fabio Tanfani, Gianfranco Scarpini and Giuseppe Laterza, 1980.** The degree of acetylation of chitin by gas chromatography and infrared spectroscopy. *J. of Biochem. and Biophys. Methods*, 2, 299-306.
- 109- **Muzzarelli A. A. Riccardo, Marco Tomasetti and Pierluca Ilari, 1994.** Depolymerisation of chitosan with the aid of papain. *Enz. Microb. Technol.*, 16, 110- 114.

Références bibliographiques

- 110- **Muzzarelli A. and A. Riccardo, 1970.** Uptake of Nitrosyl 106- Ruthenium on chitin and chitosan from waste solutions and polluted sea- water. *Wat. Resea.* Pergamon Press, 4, 451-455.
- 111- **Muzzarelli A. and A. Riccardo, 1983.** Chitin an dits derivatives : New trends of applied research. *Carbohy. Polym.*, (3), 53- 75.
- 112- **Muzzarelli R. A. A., 1999.** Clinical and biochemical evaluation of chitosan for hypercholesterolemia and overweight control. *Chitin and chitosanases.* Birkhäuser Verlag Basel/ Switzerland.
- 113- **Nadarajah K., Kader J., Mohd M. and Paul D. C., 2001.** Production of chitosan by fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4 (3), 263- 265.
- 114- **Nettles D. L., 2001.** Evaluation of chitosan as a cell scaffolding material for cartilage tissue engineering. Master of Science. Mississippi State University.
- 115- **Niju Narayanan, Pradip K. Roychoudhury and Aradhana Srivastava, 2004.** L (+) lactic acid fermentation and its product polymerisation. *Elect. J. of Biotech.* 7 (2), 167- 179.
- 116- **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.* 37 (3), 575- 579.
- 117- **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
- 118- **Otterlei M., Varum K. M., Ryan L. and Espevik T., 1994.** Characterization of binding and TNF- alpha- inducing ability of chitosans on monocyts: the involvement of CD 14. *Vaccine*, 12, 825-832.
- 119- **Ousamu K., Kejji D., Youji I. and Eiichi K., 1994.** Increasing effect of a chitosan and ascorbic acid mixture on fecal dietary fat excretion. *Biotech. Biochem*, 58 (9), 1617-1620.
- 120- **Pawadee M., Malinee P., Thanawit P. and Junya P., 2003.** Heterogenous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carbohy. Polym.*, 52, 119-123.
- 121- **Percheron. F., Perlés. R and Foglietti. J. M., 1981.** Abrégé de biochimie générale. Tome 2, Edition Masson, Paris.
- 122- **Plouffe B., 1997.** Production de chitosanases modulaires munies d'un site d'attachement à la cellulose et étude de leur activité en bioréacteur. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.

Références bibliographiques

- 123- **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.
- 124- **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*, 29, 115-120.
- 125- **Raabe D., Romano P., Sachs C., Fabritius H., Al- Sawalmih A., Yi S.- B., Servos G. and Hartwig H. G., 2006.** Microstructure and crystallographic texture of the chitin- protein network in the biological composite material of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. *Mater. Sci. and Eng., A* 421, 143-153.
- 126- **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.*, 44 (1), 83- 87
- 127- **Rao M. S., Munoz J. and Stevens W. F., 2000.** Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 808-813.
- 128- **Rhee J-S., Jung M-W. and Paeng K-J., 1998.** Evaluation of chitin and chitosan as a sorbent for the preconcentration of phenol and chlorophenols in water. *Analytical sciences.* 14, 1089- 1092.
- 129- **Roderick Bain, 1998.** Microencapsulation of prawn feed using chitin. Undergraduate thesis. University of Queensland.
- 130- **Säkkinen M., 2003.** Biopharmaceutical evaluation of microcrystalline chitosan as release- rate- controlling hydrophobic polymer in granules for gastro- retentive drug delivery. University of Helsinki.
- 131- **Salah Rym, 2005.** Préparation d'oligosaccharides à partir d'une biomasse marine : la chitine. Mémoire de magister, Ecole Nationale Polytechnique, Alger, Algérie.
- 132- **Seda Alper, Sebnam Harsa, Yekta Goksungur and Ali Fazil Yenidunya, 2004.** Fungal chitosan production from molasses. *Biotechnology*: www.b5srl.com.
- 133- **Shahidi F., Janak K. V. A. and Jeon Y-J., 1999.** Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Sci. and Techno.*, (10), 37-51
- 134- **Shigemasa Y., Saito K., Sashiwa H. and Saimoto H., 1994.** Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *Int. J. Biol. Macromol.*, 16 (1) : 43-49.

Références bibliographiques

- 135- **Shin H. P., Lee J-H. and Hong K. L., 2000.** Purification and characterization of chitinase from a Marine Bacterium, *Vibrio sp. 98CJ11027*. The J. of Microbiol., 38 (4), 224- 229.
- 136- **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.*, 28, 446-452.
- 137- **Shobhan S. and Lawrence H. B., 2000.** Chitosan as an enhancing excipient for drug delivery systems I. Molecular modification. *International Macromole.*, 27, 181-186.
- 138- **Soane R. J., Hinchcliffe M., Davis S. S. and Illum L., 2001.** Clearance characteristics of chitosan based formulations in the sheep nasal cavity. *Internal J. of Pharmac.*, 217, issues 1-2, 183-191.
- 139- **Suna Ö- T., Cenk A., Levent K., Meral K- U. and Jülide A., 2003.** Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non- viral gene delivery vehicle. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 6 (1), 27-32.
- 140- **Suzuki S., Watanabe T., Mikami T. and Suzuki M., 1990.** Proceedings of the 5th International Conference on chitin and chitosan, USA, 96- 105.
- 141- **Svitil L. A., Sinéad M., Ni C., Jessica A. M., and Kirchman D. L., 1997.** Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Appl. and Environ. Microb.* 68 (2), 408-413.
- 142- **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*, 68, 147- 152.
- 143- **Taboada E., Gustavo C. and Galo C., 2003.** Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. *J. Chil. Chem. Soc.* 48 (1).
- 144- **Tailliez P., 2001.** Mini-revue : Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait* 81, 1-11.
- 145- **Tazdait Djaber, 2005.** Préparation de conservateurs : chitosane et carboxyméthylchitosane à partir d'une biomasse marine. Mémoire de Magister en biotechnologie environnementale, ENP, Alger.
- 146- **Tharanathan R. N. and Kittur F. S., 2003.** Chitin- the undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 43, 61-87.

Références bibliographiques

- 147- **Tomoya I., Watanabe T., Toshifumi Y. and Junji S., 2003.** The directionality of chitin biosynthesis: a revisit. *Biochem. J.*, 374, 755-760.
- 148- **Wachter R., 1998.** Chitosan- more than just skin protection. Abridged version of a paper presented at the “Seminar der arbeitgemeinschaft für pharmazeutische verfahrenstechnik (APV) in Marburg from 30th september to 1st october.
- 149- **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*, (2), 105-112.
- 150- **Wee Young-Jung, Hyang- Ok Kim, Jong- Sun Yun and Hwa- Won Ryu, 2006.** Pilot- Scale lactic acid production via batch culturing of *Lactobacillus sp. RKY2* using corn steep liquor as a nitrogen source. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2), 293-298.
- 151- www.France-chitine.com/fab.e.htm
- 152- **Xiao F. L., Yun L. G., Dong Z. Y., Zhi L. and Kang D. Y., 2001.** Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of applied polymer science*, 79, 1324- 1335.
- 153- **Yang J-K., Shih I-L., Tzeng Y-M. and Wang S-L., 2000.** Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and microbial technology*, 26, 406- 413.
- 154- **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*. 5 (4): 436- 440.
- 155- **Yoon H-G., Kim H-Y., Lim Y-H., Kim H-K., Shin D-H., Hong B-S. and Cho H-Y., 2000.** Thermostable chitosanase from *Bacillus sp. Strain CK4*: Cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Appl. and Environ. Microb.* 66 (9), 3727-3734.
- 156- **Yoshinari B., Naohiko M., Kohishiro S. and Yoshinobu K., 1998.** Selective adsorption of mercury (II) on chitosan derivatives from hydrochloric acid. *Analytical sciences*, 14, 687- 690.
- 157- **Yun Jong- Sun, Wee Young-Jung and Hwa- Won Ryu, 2003.** Production of optically pure L (+)- lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis RKY1*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 416- 423.

Références bibliographiques

- 158- **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.*, 33 (1), 1-6.
- 159- **Zerarka Tahar-Chérif, 1994.** Méthodes spectroscopiques d'analyses chimiques. Edition Office Des Publications Universitaires (OPU).
- 160- **Zhang M., Haga A., Sekiguchi and Hirano S., 2000.** Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silk worm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *International J. of Biol. Macromol.*(27), 99- 105.

Annexes

Annexes

1- Préparation des réactifs pour les dosages**1- 1- Glucose :****- Préparation du réactif DNS**

Acide dinitrosalicylique	1%
Phénol	0,2%
Sulfite de sodium	0,05%
NaOH	1%
Rochelle salt (tartrate double de sodium et potassium)	40%
Etalon glucose (solution de 1g/l)	

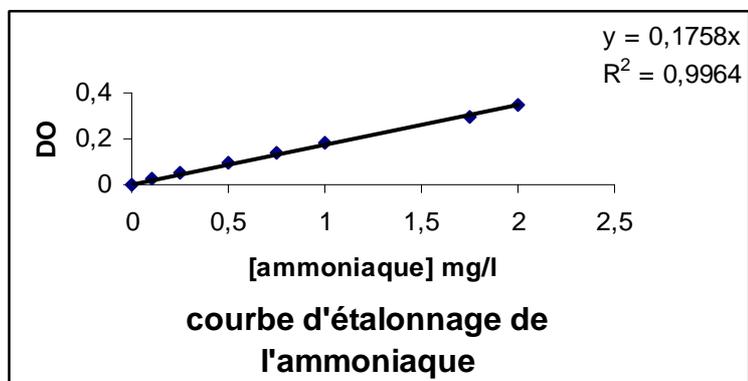
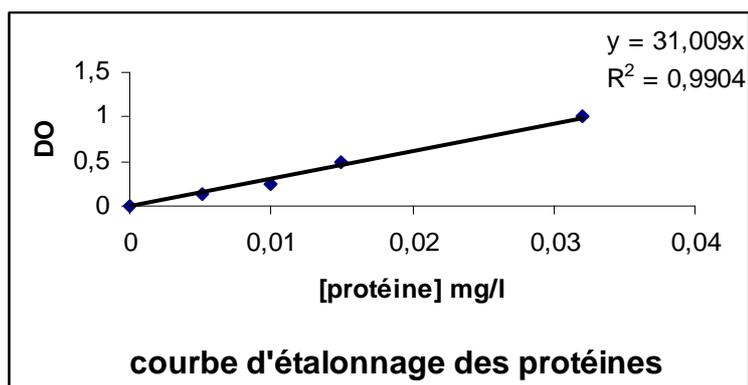
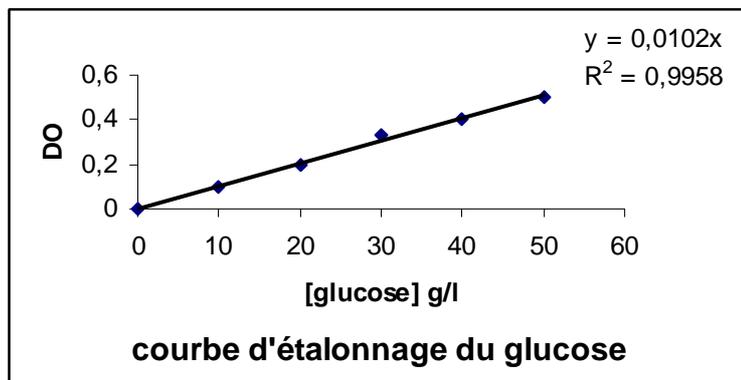
Les réactifs doivent être mélangés dans l'ordre indiqué ci-dessus à l'exception du Rochelle salt qui doit être préparé seul et ajouté aux échantillons après ébullition.

1- 2- Protéines**- Réactif de cornall :**

- Dissoudre 1,5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 250ml d'eau distillée.
- Dissoudre 6g de tartrate double de sodium et potassium dans 250ml d'eau distillée.
- Dissoudre 30g de NaOH dans 300ml d'eau distillée.

Faire le mélange de ces trois solutions et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

2- Les courbes d'étalonnage



ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو استخلاص الكيتين من قوقعة الجمبري *Parapenaeus longirostris* وذلك باستعمال البكتيريا الحليبية *Lactobacillus helveticus milano*. هذه البكتيريا تسمح بنزع الأملاح المعدنية من القوقعة بإنتاج حمض الحليب و التخمير الذي ينتج عنه ، و كذلك نزع البروتينات بإفراز الإنزيمات المهذمة للبروتينات. إن البحث عن منبع آخر للكربون غير مكلف في مكان الجلوكوز كان هدفنا كذلك، اختيارنا وقع على عصير التمر. النتائج المتحصل عليها خلال دراستنا هي: 76 % من نزع البروتينات تحت درجة حرارة 30° مئوية مع تركيز الجلوكوز البدائي 80 غ/ل و 53% من نزع الأملاح المعدنية تحت درجة حرارة 35° مئوية مع تركيز عالي للجلوكوز (300 غ/ل). ولكن استعمال عصير التمر سمح بتحسين نزع البروتينات التي وصلت 91% تحت 30° مئوية مع تركيز السكريات المرجعة تساوي 80 غ/ل و 44% من نزع الأملاح المعدنية تحت 35° مئوية مع تركيز 208 غ/ل للسكريات المرجعة.

كلمات المفتاح : استخلاص الكيتين، بكتيريا حليبية، نزع الأملاح المعدنية، نزع البروتينات.

Résumé :

L'objectif de cette étude est l'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevette *Parapenaeus longirostris*, par voie biologique en utilisant une bactérie lactique *Lactobacillus helveticus milano*. Cette bactérie permet la déminéralisation de la carapace par acidification en produisant l'acide lactique par la conversion du glucose et la déprotéinisation de la carapace par l'excrétion d'enzymes protéolytiques. La recherche d'une autre source de carbone bon marché pouvant remplacer le glucose était également notre objectif. Notre choix a porté sur le jus de dattes. Les résultats obtenus au cours de notre travail sont 76% de déprotéinisation à 30°C avec une concentration initiale en glucose de 80 g/l et 53% de déminéralisation à 35°C avec une concentration élevée en glucose (300 g/l). Par contre, l'utilisation de jus de dattes a permis d'améliorer la déprotéinisation dont on a obtenu 91% de déprotéinisation à 30°C avec une concentration en sucres réducteurs de 80 g/l et 44% de déminéralisation à 35°C avec une concentration en sucres réducteurs de 208 g/l.

Mots clés : carapaces de crevette, extraction de la chitine, bactérie lactique, déminéralisation, déprotéinisation.

Abstract

The purpose of this study is the extraction of the chitin from shrimp shell *Parapenaeus longirostris*, through biologic way using a lactic bacteria *Lactobacillus helveticus milano*. This bacteria allows the demineralization of the shell by acidification and producing the lactic acid, and the deproteinization by excretion of proteolytic enzymes. The research of another carbon source "cheap" able to replace the glucose was also our objective. Our choice was carried on the date's juice. The results obtained during our work are 76% of deproteinization at 30°C with the initial concentration of glucose equals to 80 g/l and 53% of demineralization at 35°C with a high concentration of glucose (300 g/l). However, the use of the date's juice has permitted to ameliorate the deproteinization which was 91% at 30°C with a concentration of reducing sugars of 80 g/l and 44% of demineralization at 35°C with 208 g/l as concentration in reducing sugars.

Key words: chitin extraction, lactic bacteria, demineralization, deproteinization.