

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Sciences Biologiques
Option : Biotechnologie Microbienne

THEME

Production du Chitosane par voie fongique

Présenté par : M^{elle} KOLLI Cylia et M^{elle} GUENAOUI Lamia

Soutenu le : 13-07-2017

Devant le jury :

Président : M^r METAHRI MS.

Maître de Conférences classe A à l'UMMTO

Promotrice: M^{me} BENAHMED DJILALI A.

Maître de Conférences classe A à l'UMMTO

Examineurs: M^r TITOUCHE Y.

Maître Assistant classe A à l'UMMTO

Examineurs : M^r MOUALEK I.

Maître Assistant classe A à l'UMMTO

Promotion : 2016 /2017

A :	Aspergillus
A_w :	Activité de l'eau
AIM :	Matières insolubles alcalins
DA :	Degré d'acétylation
DD :	Degré de désacétylation
F :	Ficus
G :	Grossissements
HCl :	Acide chlorhydrique
H₂SO₄ :	Acide sulfurique
IR :	Rayonnement infrarouge
L :	Litre
N :	Normalité
NaOH :	Hydroxyde de sodium
nm :	Nanomètre
M :	Molarité
OGA :	Oxytetracycline Glucose Agar
pH :	Potentiel Hydrogène
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
SR :	Sucres Réducteurs
SSF :	Solide state fermentation
ST :	Sucres Totaux
t :	Temps
trs :	Tours
V :	Volume
FTIR :	Fourier Transform Infra Red Spectroscopy

Figure	Titres	Page
01	Fruits immatures et matures de <i>Ficus microcarpa</i> .	4
02	Structure chimique de chitosane (Nugraha, 2006).	7
03	Procédé d'extraction de chitosane à partir de la chitine des carapaces de crustacés (suyatma, 2006).	8
04	a) Aspect microscopique, b) représentation schématique de la conidiophore d' <i>A. niger</i> (pasqualotto, 2010).	16
05	a) photo de sirop de fruit, b) photo de sirop de glucose.	21
06	Photo d'un pH mètre (INOLAB)	24
07	Photo de refractomètre (RB 80)	26
08	Diagramme d'extraction de chitosane à partir de la biomasse mycélienne (New et al, 2010; Aghdam, 2010).	30
09	a) Photo du Spectre infrarouge (BRUCKER ALPHA), b) Photo de l'ordinateur (Hpcompaq), c) Photo de l'imprimante (EPSON).	31
10	Photo du spectrophotomètre (MEDLINE)	32
11	Aspect macroscopique du tapis mycélien d' <i>Aspergillus niger</i> (photo originale)	33
12	Aspect microscopique d' <i>Aspergillus niger</i> (photo originale)	34
13	Evolution du pH en fonction du temps cas de la culture en surface.	35
14	Evolution du pH en fonction du temps cas de la culture submergée.	36
15	Evolution de l'acidité en fonction du temps cas de la culture en	37

	surface	
16	Evolution de l'acidité en fonction du temps cas de la culture submergée	37
17	évolution de Brix en fonction du temps cas de la culture en surface	38
18	Evolution de Brix en fonction du temps cas de la culture submergée	38
19	Evolution des taux des sucres réducteurs en fonction du temps cas de la culture en surface	39
20	Evolution des taux des sucres réducteurs en fonction du temps cas de la culture submergée	40
21	Evolution des taux des sucres totaux en fonction du temps cas de la culture en surface.	41
22	Evolution des taux des sucres totaux en fonction du temps cas de la culture submergée.	41
23	évolution du poids sec de mycélium au cours de la fermentation	43
24	évolution des vitesses de la croissance mycélienne au cours du temps de fermentation.	44
25	a) photo de chitosane issu de la culture en surface, b) photo de chitosane issu de la culture submergée.	45
26	Les résultats de l'infrarouge des poudres de chitosane issues des cultures en surface et submergée	46
27	Spectre UV- visible à balayage pour les deux cultures surface et submergée	47

Tableau	Titres	Page
I	Corrélation entre les valeurs DD et la solubilité du chitosane à pH 6	9
II	Les applications du chitosane	11
III	Les conditions de fermentation pour les deux cultures surface et submergée	23
IV	Caractéristiques physico-chimiques des deux sirops.	34
V	Quantité de chitosane pour les deux milieux de cultures dans différents sirops.	44

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

Partie Bibliographique

Chapitre I : Généralités sur *Ficus microcarpa*

I.1 Généralités sur <i>Ficus microcarpa</i>	3
I. 2 Classification	3
I.3 Description botanique	4
I.4 Exigences climatiques	4

Chapitre II : Généralités sur le chitosane

II.1 Historique	6
II.2 Définition	6
II.3 Source de chitosane (origine)	7
II.4 Propriétés physico-chimiques	8
II.4.1 Degré d'acétylation	8
II.4.2 Solubilité	9
II.4.3 Viscosité.....	10
II.5 Propriétés biologiques	10
II.6 Applications du chitosane.....	11

Chapitre III : Microorganismes producteurs de chitosane : *Aspergillus*

III.1 Introduction	13
--------------------------	----

III .2 Généralités sur <i>Aspergillus niger</i>	13
III.4 Ecologie	14
III.5 Reproduction	15
III.6 Aspect macroscopique	15
III.7 Aspect microscopique	15
III.8 Besoins nutritionnels et culturaux des <i>Aspergillus</i>	16

Chapitre IV : Mode de production par *Aspergillus niger*

IV.1 Introduction	17
IV.2 Modes de culture	18
IV.2.1 Culture en semi-conducteurs	18
IV.2.2 Culture submergée	19
IV.2.3 Culture sur surface	19

Partie Pratique

Matériels et Méthodes

V.1 Cadre de l'étude	20
V.2 Matériel	20
V.2.1 Matériel végétal	20
V.2.2 Matériel biologique	20
V.3 Méthodes	21
V.3.1 Préparation du sirop	21

V.3.2 Prélèvement et purification de la souche	22
V.3.3 Identification	22
V.3.4 Caractérisation des sirops	22
V.3.5 Fermentation	23
V.3.6 Suivi des paramètres de la fermentation	24
V.3.7 Extraction du chitosan.....	29
V.4 Caractérisation du chitosane.....	31
V.4.1Analyse des groupements fonctionnels par Infra Rouge	31
V.4.2 Spectre UV-visible à balayage.....	32

Résultats et Discussion

VI.1Résultats de l'identification macroscopique	33
VI.2 Identification microscopique	33
VI.3 Caractéristiques physico-chimiques des sirops.....	34
VI.4 Suivi de la fermentation	35
VI.4.1 La croissance mycélienne	35
VI.4.2 Evolution du Ph	35
VI.4.3 Résultats de l'acidité titrable	36
VI.4.4 Degré de Brix.....	37
VI.4.5 Résultats de dosage des sucres réducteurs.....	39
VI.4.6 Résultats de dosage des sucres totaux	40

VI.4.7 Cinétique de la fermentation.....	42
VI.4.8 Croissance mycélienne	42
VI.4.9 Résultats des rendements en chitosane	44
VI.4.10 Résultats de la caractérisation du chitosane.....	46
Conclusion Générale	48

Bibliographie.

Annexes.

Introduction

La chitine et le chitosane sont deux biopolymères produits par certains animaux, ils sont donc biodégradables, deux propriétés primordiales à notre époque où la protection de l'environnement joue un rôle important.

La production de chitosane à partir de sources fongiques a attiré l'attention des chercheurs ces dernières années en raison des avantages potentiels par rapport à la source actuelle. Par exemple, les crustacés, les approvisionnements en déchets sont limités par les saisons et l'industrie de la pêche. Tandis que, le mycélium fongique peut être obtenu par simple fermentation indépendamment de la situation géographique ou de la saison (White et al, 1979).

Le chitosane a suscité un intérêt plus vif que la chitine, étant donné le nombre le plus important de groupe amines présents sur sa chaîne (Zhang et al, 2003. Kittur et al, 2002). Les premières applications ont été développées dans les domaines où le chitosane présentait un intérêt notable notamment en pharmacologie, médecine et surtout en traitement des eaux (Sriniva Sa et al, 2004 ; Inger et al, 2003).

De plus, en 1996, l'argument principal sur la production de chitosane à partir de coquilles de crevettes était la présence de l'antigène de la crevette dans le produit final du chitosane (Tan et al, 1996). Pour contrer ces problèmes la production de chitosane peut être contournée par l'extraction du chitosane à partir de mycélium fongique.

Par ailleurs, le fruit de *Ficus microcarpa* peut constituer un substrat de choix pour la production de substance à forte valeur ajoutée qui est le chitosane en l'occurrence en mettant en œuvre la culture d'une moisissure d'*Aspergillus niger* réputée meilleure productrice du chitosane.

Aspergillus niger représente le microorganisme de choix à l'échelle industrielle pour sa facilité de culture, sa stabilité génétique, ses rendements élevés, sa capacité d'utilisation du matériel à bon marché et l'absence de métabolites indésirables (Zegat, 1996).

Le présent travail vise à étudier la possibilité d'extraction du chitosane à partir de mycélium fongique issu de la culture d'*Aspergillus niger* dans des milieux préparés à base de fruit de *Ficus microcarpa* et du glucose comme substrats.

Le procédé de production de chitosane peut se faire en mode submergé et/ou en surface. Cette étude comporte deux parties essentielles ; La partie bibliographique qui présente quatre chapitres.

Le premier qui s'intitule: Généralités sur *Ficus microcarpa* dans lequel nous parlerons sur les généralités, systématiques, description et les exigences de *Ficus microcarpa*.

Dans le deuxième chapitre nous parlerons sur les généralités du chitosane et ces différents caractéristiques et applications.

Dans le troisième chapitre nous nous intéresserons aux généralités sur *Aspergillus niger*.

Le quatrième chapitre traite les différents modes de production par *Aspergillus niger*.

La partie pratique qui contribue à :

1. Isolement, purification de la souche à partir des organes (pourriture verte).
2. Préparation des milieux de culture à partir d'un fruit et le glucose.
3. Inoculation du milieu de fermentation et fermentation.
4. Extraction du chitosane
5. C'est présenté en matériel et méthodes c'est une répétition

Etude bibliographique

Chapitre I :
Généralités sur Ficus
microcarpa

I.1 Généralités sur *Ficus microcarpa*

Ficus (Moraceae) est l'un des plus grands et les plus divers types de plantes à fleurs. Les espèces de *Ficus* se situent principalement dans les régions subtropicales et tropicales du monde (Berg et Corner 2005). Ce premier est classé en six sous-genres basés principalement sur leurs différences dans les morphologies d'habitude et d'inflorescence (Berg, 2003) et des syndromes de pollinisation spécifiques à la prise de vue de l'espèce (Noort et Rasplus, 2015).

L'espèce *Ficus microcarpa* est un arbre monologue à feuilles persistantes originaire du Sri Lanka à travers l'Inde vers le sud de la Chine, Singapour, Taiwan, Japon, les îles Ryukyu, le nord de l'Australie, la Nouvelle-Calédonie et de nombreuses îles du Pacifique, où elle pousse du niveau de la mer à environ 1 800 m d'élévation (Wagner et al, 1999; Berg et Corner 2005; Tan et al, 2009; Van Noort et Rasplus 2015).

I. 2 Classification

La classification de *Ficus microcarpa* est présentée comme suit :

Famille : Moraceae

Nom latin : *ficus microcarpa* (Wagner et al, 1999)

Synonymes : *F.nitida* sensu anct, *F.retusa* sensu anct (Wagner et al. 1999)
Urostigmamicrocarpum (L.f), *F.retusiformis*H.Lev. (Missouri 2002).

Noms communs : Chinese or Malayan banyan (Wagner et al, 1999) Indian Laurel (Bailey et Bailey, 1976) curtain fig (Brickell et Zuk, 1997).

Notes botaniques : Le genre *Ficus* est constitué d'environ 1000 espèces d'origine tropical et subtropical (Wagner et al, 1999).

Nomenclature : Le nom de l'espèce, *microcarpa*, se réfère à la petite taille des fruits.

I.3 Description botanique

Ficus microcarpa est un arbre qui se caractérise par une hauteur de 15m ou plus, il comporte une couronne dense arrondie et une écorce grise lisse avec une sève laiteuse et des racines aériennes longues, minces et pendantes souvent prolifiques en milieu urbain (corlett 2006 ; Shuyi 2009).

Cet arbre à feuilles alternées, simples de 6 cm avec pointes courtes et pointues, ovales elliptiques en forme de diamant. Généralement, les feuilles sont de couleur vert brillant profond. Les fleurs sont minuscules, unisexués cachées dans le figuier elles permettent le développement en plusieurs fruit.

Les fruits (figure 1) sont petits de 1 Cm de diamètre de couleur vert tournant au jaune ou au rouge foncé. *Ficus microcarpa* produit des fruits matures (Mckey 1989).

La figure ci-dessous représente des fruits matures et immatures de *Ficus microcarpa* récoltés fin août.



Figure 1 : Fruits immatures et matures de *Ficus microcarpa*.

I.4 Exigences climatiques

En dehors de la culture, *F. microcarpa* pousse sur les roches, les falaises et les collines, en particulier sur le calcaire, le long des côtes rocheuses, dans les forêts de plage, sur les plaines d'inondation et les rives des rivières de marée, au bord des marais et des mangroves, dans les forêts tropicales et souvent une épiphyte sur d'autres arbres (Chew 1989; Keng et al, 1990; Corner 1997; Weber 2003; Berg et Corner 2005).

Dans les habitats côtiers, il est souvent exposé à la pulvérisation de sel et tolère les sols exploités par l'eau dans un large éventail de concentrations de salinité (Corner 1997; Tan et al, 2009; Yeo et Tan 2011). En conséquence, *F. microcarpa* a été identifiée comme un halophyte (Menzel et Lieth 2003; Yensen 2015).

En outre, Aronson (1989) l'a qualifié d'hydro-halophyte. En Malaisie, *F. microcarpa* peut former des monocultures sur des sites côtiers même dans sa gamme native (Berg & Corner 2005).

Ficus microcarpa est également réputée pour son adaptabilité et sa tolérance aux conditions sèches et difficiles dans sa gamme native et où il a été introduite. Tout au long de sa gamme, elle pousse dans des forêts tropicales ou des sites côtiers secs, des habitats fragmentés et perturbés, des climats méditerranéens sèches à l'été et souvent en milieu urbain (Starr et al, 2003; Weber 2003; Anbarashan et Parthasarathy 2013; Uotila 2015).

Chapitre II :
Généralités sur le Chitosane

II.1 Historique

En 1811, le Pr. Henri Braconnot, Directeur du jardin biologique à Nancy (France) a isolé une substance fibreuse d'un certain type de champignon. De plus, il a observé que, cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses acides. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (coléoptère) et a été ensuite nommée chitine (provient du mot grec "kitos" qui signifie l'enveloppe). En 1859, Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultante du traitement alcalin, a été dissoute dans les acides. Cependant, seulement en 1894 cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler (Jaouen, 1994).

Entre 1930 et 1940, ces biopolymères (la chitine et le chitosane) ont suscité beaucoup d'intérêt dans le monde oriental, principalement leur l'application dans le domaine médical et la purification de l'eau. Depuis 1970, la production industrielle et l'utilisation de ces deux biopolymères sont en constante augmentation grâce à leur abondance dans la nature et leurs sources renouvelables (Muzzarelli, 1977).

II.2 Définition

Le chitosane est un polymère naturel de la famille des polysaccharides (Payet et *al*, 2002), il est principalement dérivé de la chitine, et obtenu par N-deacétylation en milieu alcalin concentré on le trouve aussi chez certains champignons et certains insectes, mais son abondance est beaucoup moins étendue que celle issue de la chitine (Gaf robert 1992).

Ledit polymère (Figure 2) est un polyoside composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine lié en β -(1-4) (unité desacétylée et de N-acetyl-D-glucosamine) (unité acétylée) (Crini et *al*, 2007).

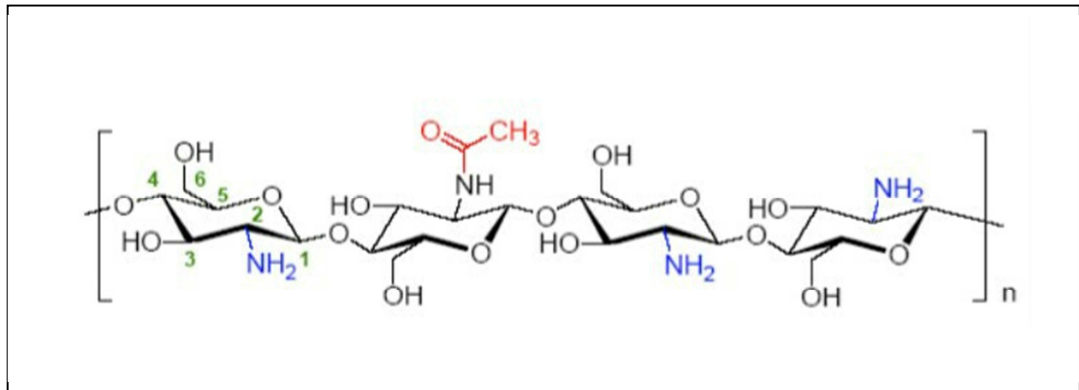


Figure 2 : Structure chimique de chitosane (Nugraha, 2006)

Le chitosane est composé de trois types de groupes fonctionnels, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en position C_1 , C_2 et C_3 respectivement. Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés très intéressantes. Ce premier est soluble dans les acides faibles, possède une charge positive alors que, la plupart des polysaccharides sont chargés négativement (Shahidi et *al*, 1999).

II.3 Source de chitosane (origine)

Le chitosane, est un dérivé de la chitine, se situe naturellement dans la paroi des zygomycètes, la paroi de certaines algues vertes, de façon temporaire, dans les carapaces d'arthropodes lors de leur mue (Crini et *al*, 2009). Néanmoins, la principale source de chitosane demeure la chitine que l'on traite chimiquement par hydrolyse basique (désacétylation) ou enzymatique.

Le diagramme ci-dessous présente les différentes étapes adoptées pour extraire le chitosane par voie chimique à partir de la chitine des carapaces de crustacés.

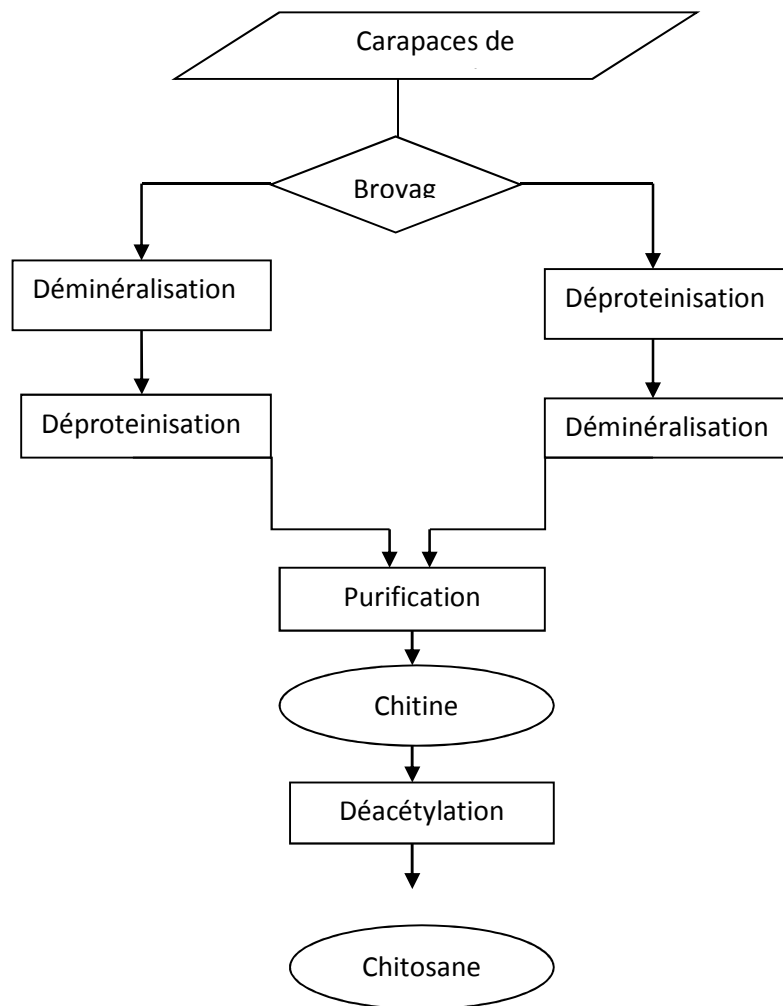


Figure 3 : Procédé d'extraction de chitosane à partir de la chitine des carapaces de crustacés (Suyatma 2006)

II.4 Propriétés physico-chimiques

II.4.1 Degré d'acétylation

Le chitosane est principalement caractérisé par son degré d'acétylation (DA) et par sa masse molaire, dont la détermination nécessite la mise en solution du polymère. Le degré d'acétylation présente le taux de groupe acétylé par rapport au groupe non acétylé (Figure 2).

De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le DA des échantillons solides : la spectroscopie IR (Brugnerotto, 2001), l'analyse élémentaire (Kasaai et al, 1999), la RMN solide (Heux et al, 2000), ou sur les échantillons en solution : dosage UV (Maghami et Roberts, 1988), titrage colloïdal (Chen et al, 1997), RMM liquide (Yang et Montgomery, 2000).

II.4.2 Solubilité

Le chitosane est insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines concentrées ou diluées. Il est également insoluble dans les solvants purs et les acides concentrés, en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau (Kurita, 2006). L'acide le plus utilisé pour préparer une solution de chitosane est l'acide acétique dilué (0,1-1 %).

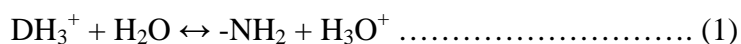
La solubilité du chitosane dépend de la valeur de DD, de la force ionique, du pH, de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles le long de la chaîne macromoléculaire (Rinaudo, 2006). De ce fait, un chitosane avec un DD supérieur à 70 % est utilisé pour augmenter sa solubilité.

Selon Grabovac *et al*, (2005), la solubilité du chitosane augmente lorsque la masse molaire diminue. Le tableau I présente la corrélation entre les valeurs de DD et la solubilité du chitosane.

Tableau I : corrélation entre les valeurs DD et la solubilité du chitosane à pH 6 (Thanou et Junginger, 2005)

DD (%)	Solubilité du chitosane
> 75	parfaite
= 50	moyen
< 40	faible

Le chitosane est soluble dans les acides dilués grâce à la protonation de ses fonctions amines suivant l'équilibre (1) :



$$K_a = \frac{[\text{-NH}_2] \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{-NH}_3^+]} \dots\dots\dots (2)$$

II.4.3 Viscosité

La viscosité du chitosane dépend du degré de désacétylation (DD) de ce polymère. Plus il est désacétylé, plus il y'a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et par voie de conséquence sa viscosité est plus importante. La viscosité dépend également : de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (diminue lorsque la température augmente), du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire) et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée) (Berth *et al*, 1998).

II.5 Propriétés biologiques

Le chitosane présente l'avantage de réunir des propriétés très intéressantes.

En effet, il inhibe la croissance de nombreux parasites et il réduit le développement des infections : c'est un bon agent antibactérien et antifongique (Shi *et al*, 2006).

En outre, ce polymère a des propriétés anti tumorales, antivirales, ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables (Bacon *et al*, 2000). Il augmente la vitesse de cicatrisation des plaies ouvertes et la reconstruction des tissus tout en prévenant les infections microbiennes.

Le chitosane stimule non seulement la croissance cellulaire, mais il peut également être utilisé comme substrat pour la culture cellulaire (les cellules adhèrent au matériau et le colonisent) (Muzzarelli et Muzzarelli, 2005).

La biocompatibilité, la biodégradabilité, la non-toxicité, l'inertie physiologique et l'affinité remarquable aux protéines ont été aussi étudiées (LGM, 2009).

II.6 Applications du chitosane

De part leurs bonnes caractéristiques et propriétés biologiques, le chitosane présente des applications étendues et très diverses comme dans les industries d'alimentation, de textile et de produits de beauté, en plus des applications environnementales et biomédicales (Ayer et *al*, 2000). Le tableau II présente quelques applications du chitosane.

Tableau II : Les applications du chitosane (Grégorio et Pierre marie, 2007)

Domaines	Applications
Agriculture	Protection des plantes ; augmentation des rendements de récolte (réduction de la croissance des mycètes phytopathologique); enduit de graine et d'engrais; traitement du sol.
Technologie Biomédicale	Activités biologiques (antifongique, antimicrobien, anti-infectieux) ; agent anti-tumoral; effet hémostatique ; augmentation de la coagulation du sang; favorise la croissance du tissu; stimule de la prolifération des cellules; peau artificielle ; fils de suture/bandage, ophtalmologie ; lentilles de contact.
Biotechnologie	Immobilisation des cellules et des enzymes ; matériaux stimulants de cellules ; matrice pour l'affinité ou les membranes.
Chimie Industrielle	Purification d'eau (chélation des métaux) ; technologie de l'eau (floculation, absorption) ; traitement des boues ; membranes d'osmose inverse, membranes de filtration ; séparation des gaz ; production de films d'emballage biodégradables ; la catalyse.
Cosmétique et Toilette	Les laques pour les cheveux ; lotion ; crème pour le corps et les mains; shampooing ; crèmes hydratantes.
Industrie Alimentaire	Régime alimentaire et fibre diététique ; activité hypocholestérolémie (liaison cholestérol, acides gras et mono glycérides) ; la conservation des nourritures de la détérioration microbienne ; la bioconversion pour la production de produits alimentaires à valeur additionnée; rétablissement des déchets de la transformation des produits alimentaires ; clarification et désacidification des jus de fruit et des

	boissons ; agent émulsionnant; stabilisant de couleur ; additives alimentaires des animaux.
Pharmaceutique	Commandés de micro capsules (formant des gels et des capsules avec des polymères anioniques) ; transporteur des médicaments à libération contrôlée ; produits dermatologiques (traitement de l'acné).
Autres	Textile (propriétés anti- bactériennes) ; pulpe et papier (résistance au mouillage) ; oenologie (clarification, désacidification) ; dentisterie (implants dentaires) ; photographie (papier).

Chapitre III :
Microorganismes
producteurs de chitosane :
Aspergillus

III.1 Introduction

Des progrès récents dans la technologie de la fermentation suggèrent que, la culture de champignons peut fournir une autre source de chitosane. Les murs cellulaires fongiques et les septa d'Ascomycetes, Zygomycetes, Basidiomycetes et Deuteromycetes contiennent principalement de la chitine. Cette dernière maintient la forme, la force et l'intégrité de la structure (Ruiz-Herrera et al, 1992; Hon 1996).

Le chitosan se retrouve comme un matériaux de soutien dans de nombreux organismes aquatiques (coquilles de crevettes, de crabes, des plaques osseuses, de calmars et de seiches), dans de nombreux insectes (moustiques, cafards, abeilles, vers à soie, *Drosophilamelanogaster*, *Extatosomatiaratum* et *Sipyloideasipylus*), Les crustacés (*Armadillidiumvulgare*, *Porcellioscaber*), dans les nématodes, dans les champignons (*Agaricusbisporus*, *Auricularia auriculajudae*, *Lentinulaedodes*, *Trametesversicolor*, *Armillariamellea*, *Pleurotusostreatus*, *Pleurotussajo-cajuand* *Pleurotuseryngii*) et dans certains microorganismes (levure, champignon et les algues) (Carlberg, 1982; Nemtsev et al, 2004; Veronico et al, 2001; Paulino et al, 2006; Moussian et al, 2005; Tauber, 2005; Hild et al, 2008; Anantaraman et Ravindranath, 1976; Pochanavanich et Suntornsuk, 2002; Mario et al, 2008; Yen & Mau, 2007 cité dans Nwe et al, 2010).

III .2 Généralités sur *Aspergillus niger*

Aspergillus niger est un champignon cosmopolite. Il peut être isolé de tous les continents et n'est pas très sélectif par rapport aux conditions environnementales. Il croît entre 6 et 47 °C, pH 1,5 et 9,8 et une activité hydrique de $\geq 0,77$ (Pitt et Hocking 2009).

Ledit champignon, prospère dans le sol et sur le matériau végétal en décomposition, mais est également abondant dans les environnements artificiels. Par exemple, il se trouve sur le sol et dans des poussières de tapis et de matelas (Flannigan et al, 2011). Il est aussi utilisé comme usine cellulaire pour la production d'enzymes comme pectinase, protéase et amyloglucosidase qui étaient les premières à être exploitées et ont été initialement produites en culture de surface (Schuster et al, 2002).

III.5 Reproduction

L'état asexuel d'*Aspergillus* est ce qui attire le plus souvent les bio-technologistes.

Il est en fait caractérisé par la production d'un grand nombre de spore en chaîne.

La sporulation produit des conidies contenant des spores asexuées haploïdes, disséminées dans l'atmosphère après maturation. La croissance végétative est initiée par la germination des spores avec formation d'un hyphes tubulaire (extension strictement apicale) donnant naissance à un réseau mycélien par ramification qui acquiert les éléments nutritifs de l'environnement (Meyer et *al*, 2004 ; Ward et *al*, 2006).

III.6 Aspect macroscopique

Ce champignon pousse rapidement (2 - 3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A.niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*A.niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunâtres et à maturité elles deviennent noires.

Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle montrant parfois des zones concentrées (Guillaume, 2006). Sur le milieu Czapek, *A.niger* forme des colonies à mycélium blanc ou jaune, et revers souvent incolores.

III.7 Aspect microscopique

Les têtes conidiennes, bisériées et radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres à noires. Les conidiophores sont longs atteignant 1.5 - 3 mm, lisses à stipes non cloisonnés, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure, formés d'une cellule courte appelée cellule podale (Footcell) avec un hyphes fertile. Les vésicules (50 - 70 µm) sont globuleuses avec des têtes aspergillaires hémisphériques volumineuses, à panache radié. Les phialides (7-3 × 3-3.5 µm) sont portées par des metules brunâtres, de dimensions variables (10-15 µm). Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties de couleur brunâtre et qui mesurent 3.5 à 4.5 µm ; parfois légèrement aplaties de couleur brunâtre et qui mesurent 3.5 à 4.5 µm ; parfois jusqu'à 6 µm de diamètre (figure 4) (Abraca et *al*, 2004 ; Pasqualotto, 2010).

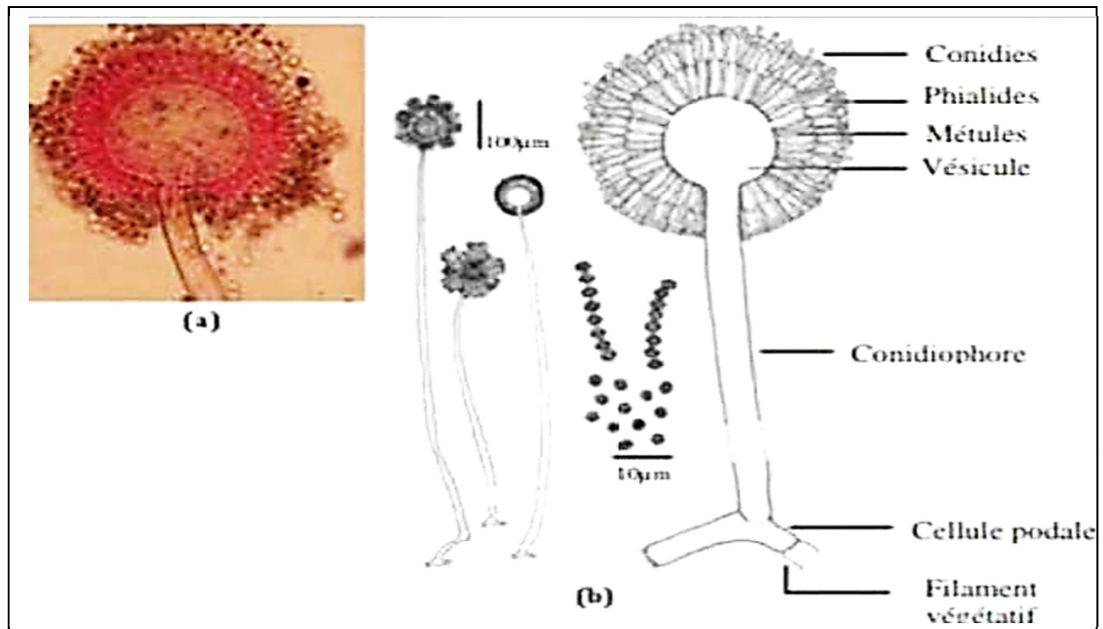


Figure 4 : a) Aspect microscopique, b) représentation schématique de la conidiophore d'*A. niger* (Pasqualotto, 2010).

III.8 Besoins nutritionnels et culturaux des Aspergillus

- **Carbone**

Les Aspergillus peuvent métaboliser plusieurs composés carbonés, tel que, glucose, fructose, mannose, saccharose et maltose (Pazouki et *al*, 2000).

Les sucres réducteurs (fructose et glucose) sont inclus dans le cycle de la glycolyse par contre, le saccharose et le maltose doivent être hydrolysés en sucre simple. Les substances carbonées sont soit assimilées ou fermentées par les Aspergillus.

- **Azote**

Il est à noter que la source et la teneur en azote affecte d'une manière nette la croissance d'Aspergillus. Les sources d'azote utilisées en fermentation sont le sulfate d'ammonium, le nitrate de sodium, le nitrate de potassium et l'urée. Ainsi,

Chapitre III : Microorganismes producteurs de Chitosane : Aspergillus

une teneur élevée en azote a pour effet, une augmentation de la croissance cellulaire et de la consommation des sucres (Mattey, 1992; Kristiansen et Sinclair, 1978).

- **Sels minéraux**

Les sels minéraux sont des éléments indispensables pour la croissance et la multiplication des aspergillus et leurs déficiences ou leurs excès ont des répercussions négatives sur la fermentation. A cet effet, une forte teneur en phosphore conduit à une élévation de la croissance cellulaire (Kubicek et Rohr, 1997 ; Papagianni, 2007).

- **Besoins cultureux**

La température idéale pour la croissance des aspergillus est comprise entre 20 et 42 °C, un pH de 2 à 6,5 et une activité de l'eau (aw) faible soit 0,77 (Cahagnier, 1997).

Chapitre IV :
Mode de production par
Aspergillus niger

IV.1 Introduction

La fermentation est le processus le plus économique, largement utilisé pour la production commerciale de l'acide citrique. Ainsi, dès 1919 un fabricant Belge de l'acide citrique à l'échelle industriel en employant *Aspergillus niger* et en utilisant un procédé de fermentation appelé culture de surface. Cette méthode avait été adoptée à grand échelle pour produire de l'acide citrique jusqu'à 1950. Après la deuxième guerre mondiale, une compagnie américaine (Milles) a adopté un autre procédé qui est la fermentation submergée pour produire de l'acide citrique à l'échelle industriel. Depuis ce temps ce procédé s'est généralisé progressivement (Guebel et Nestor-Darias, 2001).

IV.2 Modes de culture

Actuellement, il existe trois types de procédés de culture d'*Aspergillus niger* et nous prenons comme exemple la production d'acide citrique par ce dernier :

- Culture sur surface.
- Culture submergée.
- Culture en semi-conducteurs.

IV.2.1 Culture sur surface

C'est une méthode originale et d'une utilisation simple. Aussi, elle consomme moins d'énergie et nécessitant moins de main d'œuvre. Ainsi, le milieu de fermentation est stérilisé, refroidi et pompé dans des bacs de faibles profondeurs. L'inoculation est faite en soufflant avec l'air des spores d'*Aspergillus niger* sur la surface des bacs en aluminium ayant une capacité de 50 à 100 litres. Aussi, l'air est apporté au dessus de la surface de culture afin de fournir l'oxygène nécessaire au milieu de fermentation. Les spores en germant forment un tapis mycélien. Le milieu de culture utilisé est dilué de façon à avoir une teneur en sucre de 15%. La température est maintenue entre 28 et 30°C.

Le pH de milieu de culture doit être inférieur à 2, au-delà d'un pH 3. L'humidité relative est fixée entre 40 et 60%. La durée de fermentation est de 8 à 12 jours. A la fin de fermentation, le milieu de culture fermenté est versé dans des bacs et l'acide citrique est séparé de mycélium par filtration (Drysdale et McKay, 1995).

IV.2.2 Culture submergée

Les microorganismes sont cultivés en suspension dans des cuves de grandes dimensions, sous des conditions environnementales strictement contrôlées. On préconise pour la production de chitosane, le mode de culture submergée. Pour ce mode, on utilise des fermenteurs peuvent avoir des capacités en milliers de m^3 . Ces fermenteurs sont fabriqués en acier inoxydable qui peut être stérilisés à la chaleur et doivent à la fois être très étanches et lisses, pour éviter la contamination par d'autres microorganismes.

Les fermenteurs doivent être munies de plusieurs ouvertures pour placer les différents instruments de mesure, les entrées et sorties des différents produits utilisés et l'entretien (Sikander, 2004).

IV.2.3 Culture en semi-conducteurs

La fermentation SSF (solide state fermentation) est caractérisée par le développement de microorganisme dans un milieu sec ou présentant une teneur en eau faible et sur un matériau non soluble agissant à la fois comme source de nutriments et comme support physique. Cependant, il n'est pas nécessaire de combiner le rôle de l'appui et du substrat mais de reproduire plutôt les conditions d'une faible activité de l'eau et d'un haut transfert d'oxygène en employant un matériel inerte imbibé d'une solution d'éléments nutritifs.

SSF offre de nombreux avantages en commençant par l'utilisation des résidus des industries agro-alimentaires aussi, elle consomme moins d'énergie par rapport à la fermentation submergée (Pintado et *al*, 1998; Prado et *al*, 2005).

Partie II :
Partie pratique

Matériel et méthodes

V.1 Cadre de l'étude

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein des laboratoires communs (I et II) D'analyses physico-chimiques, de même que le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO). Ainsi que le laboratoire de l'Université de Boumerdès INH (Institut National d'Hydrocarbure).

L'objectif principal de ce travail, est d'optimiser la production du chitosane à partir de mycélium fongique (*Aspergillus niger*) au moyen de deux cultures (surface et submergée).

Le travail pratique est divisé en quatre parties suivantes :

1. Isolement et purification de la souche
2. Préparations des deux sirops pour la culture.
3. Inoculation du milieu de fermentation et fermentation.
4. Extraction et caractérisation de la poudre (chitosane).

V.2 Matériel

V.2.1 Matériel végétal

Le fruit de *Ficus microcarpa* a été utilisé comme substrat durant cette étude. La récolte a été faite dans la wilaya de Boumerdès (nord de l'Algérie) durant la période allant du mois d'Octobre jusqu'au mois de Novembre 2016.

Le fruit est trié, lavé à l'eau de robinet, puis transformé en sirop et conservé à 4°C réfrigérateur avant son utilisation.

V.2.2 Matériel biologique

La souche de moisissure utilisée pour lancer la fermentation est une souche sauvage appartenant au genre *Aspergillus* a été isolée à partir d'une pourriture d'orange par les ingénieurs de laboratoire de microbiologie de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Par la suite, la souche a été purifiée, puis conservée à 4°C sur gélose inclinée (Sabouraud).

V.3 Méthodes

V.3.1 Préparation du sirop

Dans cette étude, nous avons utilisé deux substrats de fermentation dans un but comparatif (Figure 5). Le premier a été préparé à partir de fruit de *Ficus microcarpa* et l'autre est à base de glucose.

V.3.1.1 Sirop de fruit

Le fruit est lavé et coupé en petits morceaux à l'aide d'un mixeur, le broyat est trempé dans de l'eau en respectant le rapport (1/3) (g/g) fruit/eau, puis chauffé à 65°C dans un bain marie pendant 3 heures avec agitation manuelle.

A la fin on réalise une filtration afin d'extraire le maximum de sucres. Le sirop ainsi obtenu est stérilisé par tyndallisation puis conservé au réfrigérateur à 4°C.

V.3.1.2 Sirop de glucose

Le sirop de glucose a été préparé en respectant le même pourcentage de Brix que celui du sirop de fruit qui est de l'ordre de 5%. 5g de la poudre de glucose est dissoute dans 100ml d'eau distillée à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à homogénéisation totale. La solution obtenue est tyndallisée par une série de 3 pasteurisations de 1h à une température de 60 à 70° C séparées par un intervalle de 24 heures à température ambiante puis conservée à 4°C au réfrigérateur.



(a)



(b)

Figure 5: a) photo de sirop de fruit, b) photo de sirop de glucose.

V.3.2 Prélèvement et purification de la souche

Le prélèvement a été réalisé aseptiquement à l'aide d'une anse à boucle flambée à partir d'une pourriture d'un orange de couleur verte. L'isolement a été effectué au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Pour se faire, un échantillon de la pourriture verte est ensemencé sur la surface d'un milieu de culture (Oxytetracycline Glucose Agar (OGA)) contenu dans trois boîtes de Pétri.

Les boîtes sont ensuite mises à incuber à 37°C pendant 7 jours. Par la suite, une purification a été réalisée cinq fois sur le même milieu dont le but d'avoir des colonies identiques (Delarras, 2007).

V.3.3 Identification

V.3.3.1 Identification macroscopique

Les critères macroscopiques (couleur, taille, texture...) de la souche obtenue ont été déterminés visuellement à l'aide d'une loupe binoculaire.

V.3.3.2 Identification microscopique

L'examen microscopique a été effectué à l'aide d'un microscope photonique par étalement sur lame et lamelle avec une goutte d'eau distillé stérile.

Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des caractéristiques microscopique d'*Aspergillus niger*. (Cahegnier et Richard-Mollard 1998).

L'observation microscopique permet de détecter la présence du thalle, la présence ou l'absence du septum, la nature de la production et les caractéristiques des fructifications et des spores (Hawkswarth et *al*, 1995).

V.3.4 Caractérisation des sirops

Des analyses physico-chimiques sont été effectuées sur les deux sirops à savoir : le pH, l'acidité, le Brix et les sucres.

V.3.5 Fermentation

❖ Préparation de l'inoculum

La souche a été ensemencée stérilement dans 10 boîtes de Pétri contenant le milieu OGA et incubée pendant 7 jours dans une étuve de type (MEMMERT) à 37°C pour récupérer le maximum de spores.

Après incubation, les spores apparaissent à la surface du tapis mycélien. Elles sont récupérées dans de l'eau distillée stérile puis dénombrées à l'aide de la cellule de malassez (Zergat, 1996).

La suspension fongique est ensuite diluée de façon à obtenir une concentration de l'ordre de 3.10^6 spores/ml (voir annexe 1). Cette concentration suffit pour inoculer 50 ml de moût (Zergat, 1996).

❖ Inoculation des milieux de fermentation

On ensemence stérilement les deux sirops de fermentation par la même concentration en spores d'*A.niger* à raison de (50/300) (v/v) inoculum/milieu de fermentation et ce pour les deux modes de culture (culture en surface et submergée).

Le tableau ci-dessous résume les différentes conditions de fermentation respectées pour les deux modes de cultures en utilisant les deux sirops.

Tableau III : Les conditions de fermentation pour les deux cultures surface et submergée

Conditions de fermentation	Culture en surface	Culture en submergée
Durée de fermentation	14 jours	14 jours
Brix	5%	5%
Mout de fermentation (sirop de fruit)	300ml	300ml
inoculum	50ml	50ml
Concentration des spores	3.10^6	3.10^6
Température d'incubation (°C)	37°C	37°C

V.3.6 Suivi des paramètres de la fermentation

❖ Prélèvements

Des prélèvements ont été réalisés tous les deux jours afin de contrôler les paramètres de fermentation qui consistait en la mesure du pH, l'acidité, la teneur en sucres totaux et réducteurs, et la mesure de Brix.

V.3.6.1 Mesure du pH

La détermination du pH, est essentielle pour le contrôle du goût, avant et au cours de la fermentation. Cette mesure nous renseigne sur l'activité métabolique du champignon, donc la transformation des sucres en chitosane. Elle consiste en une lecture directe à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné (Figure 6).



Figure 6 : photo d'un pH mètre (INOLAB)

V.3.6.2 Détermination de l'acidité titrable

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique décrite par la norme Française (NFV 05 - 101 du janvier 1994).

✓ Principe

Le titrage de l'acidité fait avec une solution, d'hydroxyde de sodium NaOH de 0,1 N en présence de quelques gouttes de phénophtaléine comme indicateur.

✓ Mode opératoire

- Prélever 25ml de moût de fermentation et les verser dans une fiole jaugé de 250ml, compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée puis agiter (dilution).
- Prélever un volume de $V=25\text{ml}$ de la solution préparée, puis ajouter 0,25 à 0,5 ml de phénophtaléine.
- Doser cette solution à l'aide d'une solution de soude de concentration 0,1 N et repérer le volume équivalent au moment du virage de l'indicateur coloré (coloration rose).

L'expression des résultats sont représentés par la formule suivante :

$$\text{Acidité (\%)} = \frac{250}{25} \times \frac{V_1}{10} \times \frac{100}{V_0}$$

- V_0 = volume en ml de l'échantillon.
- V_1 = volume en ml de la solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N utilisée.

V.3.6.3 Mesure de Brix

✓ Principe

Le degré de Brix est mesuré par un réfractomètre (Figure 7) et les résultats sont exprimés en pourcentage (%) et la température de référence est de 20°C.

✓ Mode opératoire

- Avant l'utilisation de l'appareil, réaliser son calibrage avec l'eau distillée. Tourner la vis de réglage et faire coïncider la ligne de séparation des parties bleues-blanches avec le zéro. essuyer et sécher le prisme.
- Placer ensuite, une goutte de l'échantillon à analyser sur la surface dépoilée de prisme.
- Rabattre le prisme en évitant la formation de bulles d'air.
- Regarder à travers l'oculaire en lisant directement dans l'échelle de concentration.

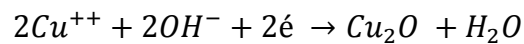
- La lecture du degré Brix se fait directement, et les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de Brix.



Figure 7 : Photo de refractomètre (RB 80).

V.3.6.4 Dosage des sucres (AFNOR 1986)

La méthode est basée sur la capacité des sucres réducteurs à réduire l'hydroxyde cuivrique en oxyde cuivreux selon la réaction suivante :



On titre à chaud un volume donné de Fehling à l'aide de solution de sucre en présence du bleu de méthylène comme indicateur coloré.

Avant le dosage on a préparé la solution Fehling A et Fehling B et des filtrats (1 et 2) dont la composition est:

- **Filtrat 1 :**
 - 20 ml de l'échantillon
 - 5 ml d'acétate de plomb (zinc)
 - Ajuster à 100 ml avec l'eau distillée
 - Filtrer le mélange

- **Filtrat 2 :**

- Prélever 50 ml de filtrat 1
- Ajouter 5 ml d'HCL concentré
- Porter au bain marie (T 70°C /5 min)
- neutraliser avec NaOH à 10N en présence de phénophtaléine à 2 % jusqu'à apparition d'une couleur rose persistante.

- **Mode opératoire de dosage des sucres réducteurs**

- Introduire 5 ml de Fehling A et 5 ml de Fehling B dans un bécher de 500 ml
- Ajuster à 100 ml avec l'eau de robinet et mettre à ébullition.
- Verser 2 gouttes de bleu de méthylène dans la solution diluée de liqueur en ébullition
- Titrer ce mélange par le filtrat (1) jusqu'à ce que la coloration bleue soit remplacée par une coloration rouge brique.

La teneur en sucres réducteurs (SR), exprimée en g /l est présentée par la formule suivante :

$$SR = \frac{240}{V(V_1 - 0,05)} \times 10$$

Soit :

- V : volume de l'échantillon analysé (ml)
- V_1 : volume de filtrat consommé

- **Mode opératoire de dosage des sucres totaux**

Dans ce dosage le titrage est effectué avec le filtrat (2) jusqu'à apparition d'une coloration marron cuivrée

La teneur en sucres totaux (ST), exprimée en (g /l) est donnée par la formule suivante :

$$ST = \frac{500}{V(V_2 - 0,05)} \times 10$$

Soit :

- V : volume de l'échantillon analysé (ml)
- V_2 : volume de filtrat consommé.

V.3.6.5 Etude de la cinétique de fermentation

La croissance mycélienne d'*Aspergillus niger* en culture surface et submergée se déroule en cinq phases.

- **Phase de germination de spores**

La durée de cette phase dépendant étroitement de la température, peut être écourtée par l'utilisation de spores pré germées.

- **Phase exponentielle de croissance**

Dépendant de la température, cette phase est caractérisée par une intense multiplication du mycélium et par un taux de croissance (μ) constant.

La croissance mycélienne obéit à l'équation suivante :

$$X_t = X_a e^{\mu(t-t_a)}$$

X_t : poids sec du mycélium au temps t en (g/l).

X_a : poids sec du mycélium au temps t_a en (g/l).

t : temps marquant le début de la phase 2 (heure).

μ : taux de croissance (heure^{-1}).

La vitesse de croissance obéit à l'équation :

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot X$$

- **Phase de perturbation de la croissance**

Lors de cette phase, nous assistons à une inhibition de la croissance et à un début de la production de chitosane. Le taux de croissance est caractérisé par 03 étapes successives ; il diminue, s'annule puis augmente.

- **Phase secondaire de croissance**

Cette phase est caractérisée par une accélération de la vitesse de production de chitosane. La variation de la croissance mycélienne suit l'équation suivante:

$$X_t^2 = X_c^2 + 2K(t-t_c)$$

- X_t : poids sec du mycélium au temps t_c en (g/l).
- X_c : temps marquant le début de la phase 4.
- K : constante de la croissance secondaire g^2/l^2h .

La vitesse de croissance obéit à l'équation:

$$\frac{dx}{dt} = K \cdot X^{-1}$$

V.3.7 Extraction du chitosan

L'extraction chimique du chitosan à partir de la biomasse fongique a été effectuée en utilisant un protocole standard (New *et al*, 2010; Aghdam, 2010).

Le mycélium fongique a été homogénéisé et mis en suspension dans 25ml de NaOH (10M) sous une agitation pendant une nuit.

La suspension a été centrifugée à 5000 tr/min pendant 30 minutes et le culot a été traité avec H_2SO_4 (1M). La suspension ainsi obtenue est filtrée et 25ml de NaOH (10M) ont été ajoutés au filtrat. Les matières insolubles alcalines (AIM) ont été récupérées par centrifugation à 5000 tr/min pendant 30 minutes, lavées 3 à 4 fois avec de l'eau distillée et séchées.

Le chitosan a été extrait d'AIM en utilisant de l'acide acétique à 1% à 95°C pendant 8h, puis centrifugé à 1000 tr/min pendant 2 minutes. La fraction insoluble a été éliminée et le pH du supernageant a été ajusté à 10 avec NaOH (2M). La solution est centrifugée à nouveau à 10000 tr/min pendant 2 minutes et le chitosan précipité est lavé avec de l'eau distillée et séché à l'étuve à 60°C.

Après séchage la poudre a été grattée et pesée à l'aide d'une balance à précision.

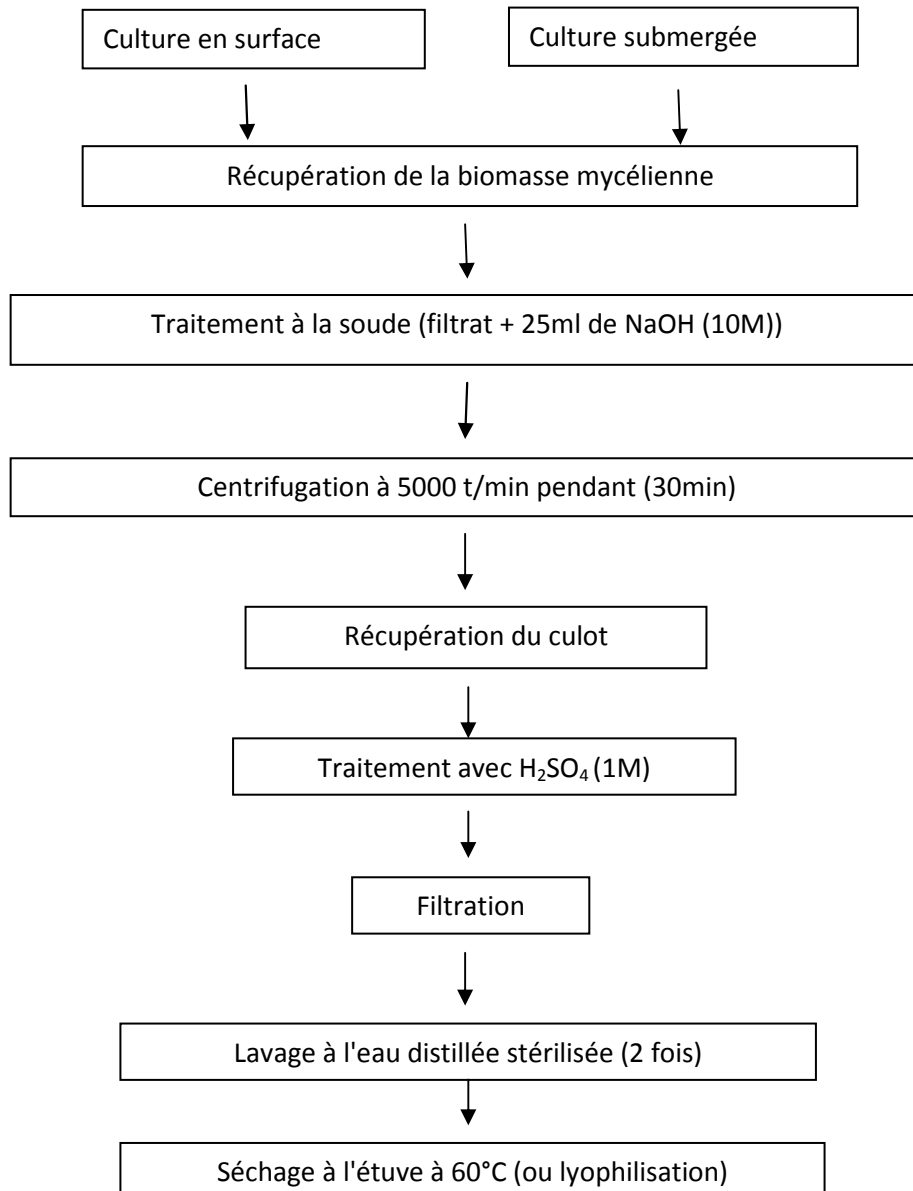


Figure 8: Diagramme d'extraction de chitosane à partir de la biomasse mycélienne (New et al, 2010; Aghdam, 2010).

V.4 Caractérisation du Chitosane

V.4.1 Analyse des groupements fonctionnels par Infra Rouge

- **Principe**

La spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse physique rapide, simple à mettre en œuvre et ne nécessitant que peu de quantité de matière à analyser. Basée sur les transitions entre les états vibrationnels et rotationnels d'une molécule, elle est employée tout aussi facilement sur des échantillons bruts ou purifiés. Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} ($2,5 - 25\text{ }\mu\text{m}$) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

L'analyse d'infrarouge d'un échantillon d'origine biologique est une méthode qualitative qui permet de repérer la présence de certains groupements fonctionnels caractéristiques présents dans la molécule. Les spectres des poudres sont obtenus par un spectromètre (BRUCKER). Cette analyse a été réalisée au niveau du laboratoire de chimie pharmaceutique de l'Université de Boumerdès.

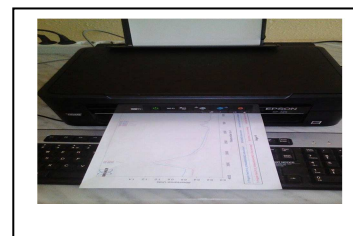
Les photos ci-dessous représentent les différents appareils utilisés pour réaliser l'analyse infrarouge.



(a)



(b)



(c)

Figure 9: a) Photo du Spectre infrarouge (BRUCKER ALPHA), b) Photo de l'ordinateur (Hpcompaq), c) Photo de l'imprimante (EPSON).

V.4.2 Spectre UV-visible à balayage

Une solution de chitosan de 5mg/100ml Hcl a été préparée. Ensuite, un échantillon de cette solution a été balayé par un spectre UV-visible de 200-800 nm par le spectrophotomètre UV-visible. Le trajet optique de cellule utilisée est de 1cm. Pour chaque longueur d'onde l'absorbance est mesurée et les données recueillies sont utilisées pour tracer les variations de l'absorbance (en ordonnées) en fonction de la longueur d'onde (en abscisse). Le graphique ainsi obtenu constitue un spectre UV-visible.

La photo ci-dessous représente le spectre UV-visible (Medline) utilisé pour effectuer l'analyse de spectroscopie à balayage.



Figure 10: Photo du spectrophotomètre (Medline)

Résultats et discussion

VI.1 Résultats de l'identification macroscopique

- Les colonies d'*Aspergillus niger* ont un aspect laineux et granuleux.
- Les reliefs des colonies d'*Aspergillus niger* ont un aspect plissé et mou.
- La couleur des colonies apparaît blanche, ensuite jaune et à la fin noirâtre et le verso présente une coloration jaune pâle (Diguta, 2010).

La photo ci-dessous représente une photo originale de l'aspect macroscopique du tapis mycélien d'*Aspergillus niger* poussée sur milieu OGA:



Figure 11 : Aspect macroscopique du tapis mycélien d'*Aspergillus niger* (photo originale)

VI.2 Identification microscopique

- Le thalle d'*Aspergillus niger* possède un appareil végétatif constitué des filaments (les hyphes). Ce premier a la forme cloisonné (septé).

- Les spores, sont le produit de reproduction asexuée, les spores (les conidies) d'*Aspergillus niger* sont exogènes et sont formés par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée.

L'espèce étudiée possède des amérospores qui sont unicellulaires de petite taille et cet aspect est distingué selon la forme et les modalités de septation (Diguta, 2010).

La photo N 12 présente une photo originale de l'aspect microscopique d'*Aspergillus niger* observée par un microscope photonique au G 400.



Figure 12 : Aspect microscopique d'*Aspergillus niger* (photo originale)

VI.3 Caractéristiques physico-chimiques des sirops

Le tableau IV résume les résultats des différents paramètres physico-chimiques des sirops (sirop de glucose et sirop de fruit):

Tableau IV: paramètres physico-chimiques des deux sirops

	Sirop de fruit	Sirop de glucose
pH	5.8±0.025	6,75±0.015
Brix	5%	5%
Sucres totaux (g/ml)	67.80±0.025	33.61±0.03
Sucres réducteurs (g/ml)	13.81±0.025	32.54±0.03
Acidité (%)	2	0.8

Les résultats de ce tableau révèlent que, le sirop à base de fruit est moins concentré en sucres réducteurs et possède une acidité élevée en comparaison avec le sirop préparé à base de glucose.

VI.4 Suivi de la fermentation

VI.4.1 La croissance mycélienne

Pour la croissance mycélienne on constate que, la croissance d'*A.niger* pour les deux cultures en surface et submergée en utilisant le sirop de fruit présente la même allure. Le poids du tapis mycélien obtenu à la fin de fermentation est de 41 ± 0.25 g/l pour la culture en surface et de 37.2 ± 0.25 g/l pour la culture submergée.

Par contre, pour le sirop de glucose, une inhibition de la croissance a été enregistrée après deux jours de culture et pour les deux modes (en surface et submergée). Cette inhibition peut être expliquée par manque des éléments minéraux nécessaires à la culture de cette moisissure.

Donc le sirop de fruit constitue est un bon milieu de culture pour *Aspergillus niger* assurant une bonne croissance et une bonne production de chitosane grâce à la disponibilité des éléments essentiels et en quantités équilibrées.

Pour couvrir les besoins de ce microorganisme, le moût doit contenir de bonnes proportions d'éléments minéraux (Zergat, 1996).

VI.4.2 Evolution du pH

L'évolution du pH des moûts de fermentation pour les deux modes de culture est présentée dans les figures 13 et 14.

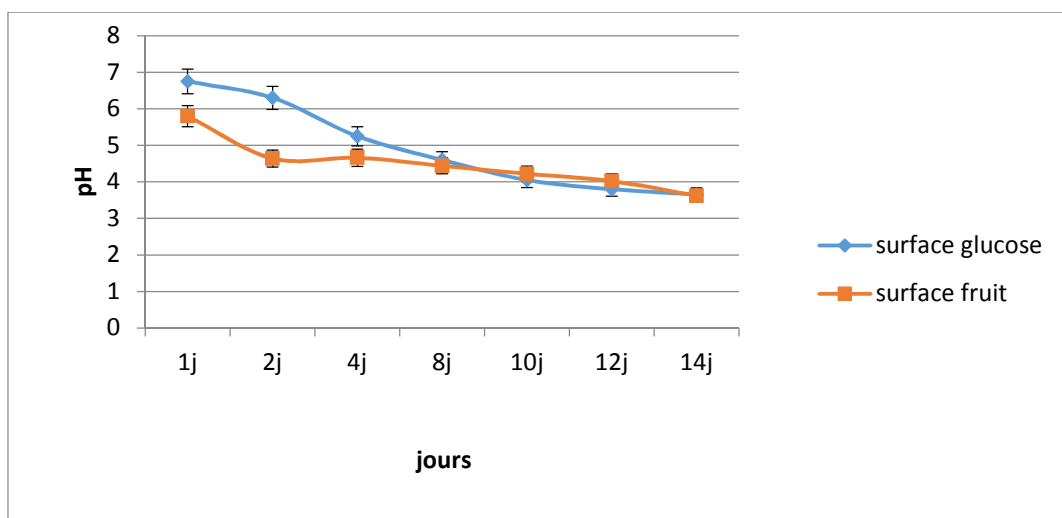


Figure 13 : Evolution du pH en fonction du temps cas de la culture en surface.

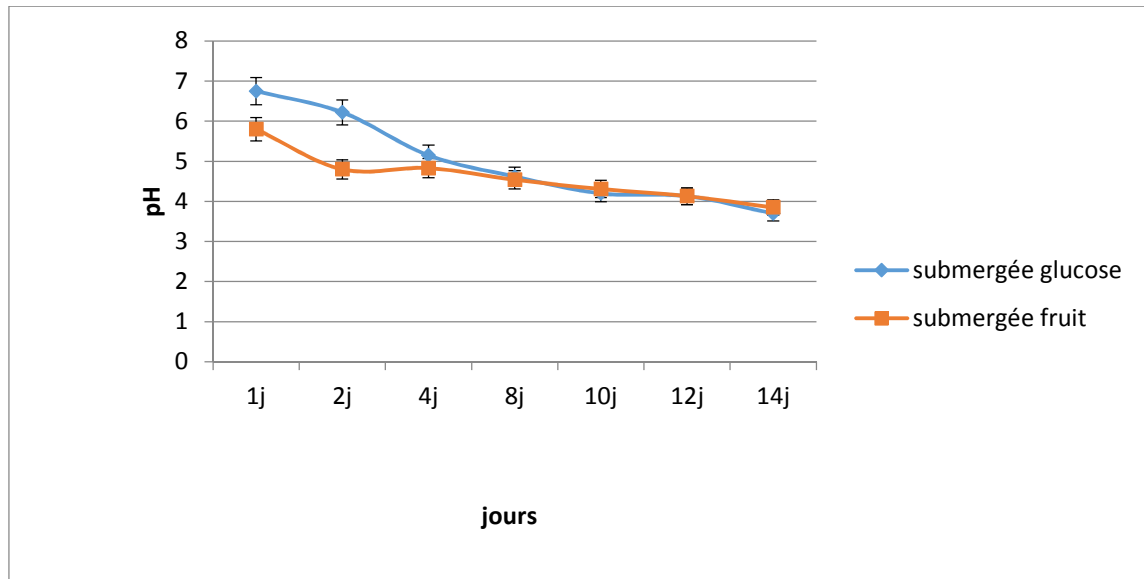


Figure 14 : Evolution du pH en fonction du temps cas de la culture submergée.

D’après ces figures nous constatons globalement que, le pH des moûts diminue et ce pour les deux modes de culture adoptés pour atteindre des valeurs acides.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Synowiecki et Al-khateeb (2003). Selon les deux auteurs un pH de 4,5 est optimale pour la production fongique de chitosane par la souche *Rhizopus* (10mg /50ml).

Pendant, un pH qui varie de 4,5 à 5,5 favorise la production de la chitine désacétylase par voie enzymatique. Cette enzyme, convertit la chitine en chitosane dans la paroi cellulaire fongique (Arcidiacono et kaplan, 1992).

C’est résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Benahmed djilali 2015 sur l’abaissements du pH (près de 2,8) dans les différents milieu étudié dans les deux culture pour la production d’acide citrique par *l’A niger* .

VI.4.3 Résultats de l'acidité titrable

Après titrage de l’acidité des deux cultures en surface et submergée, nous constatons des valeurs en acidité très faibles enregistrées à la fin de fermentation (Figures 15 et 16).

Cette diminution est due à la formation d’acides organiques restent à identifier et aussi en partie, à des acides minéraux mis en libertés (kiesel, 1913).

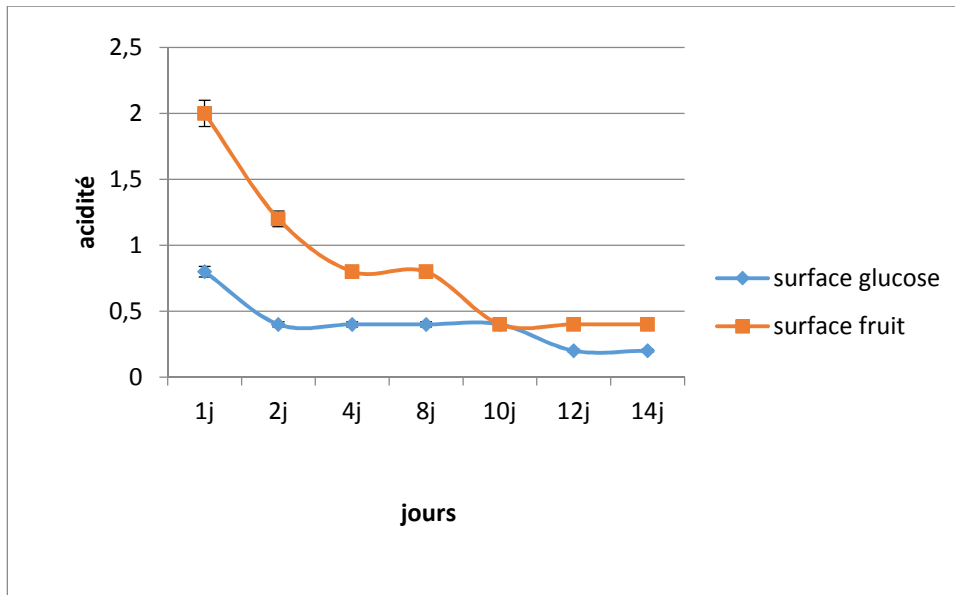


Figure 15 : Evolution de l'acidité en fonction du temps cas de la culture en surface

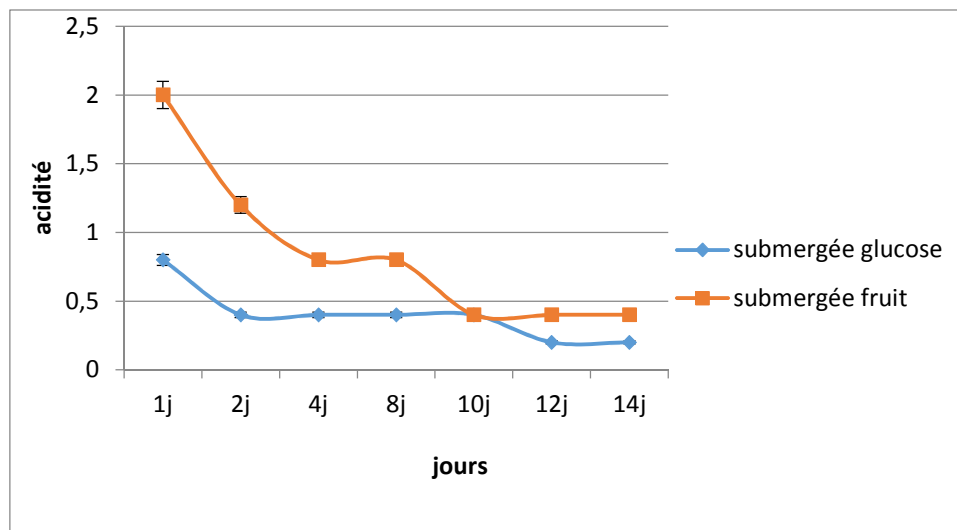


Figure 16 : Evolution de l'acidité en fonction du temps cas de la culture submergée

VI.4.4 Degré de Brix

Les résultats d'analyses de degré de Brix pour les deux sirops (fruit et glucose) des deux cultures en surface et submergée sont représentés dans les figures 17 et 18.

Au cours de la fermentation, le taux de Brix du moût de fruit diminue pour les deux cultures (surface et submergée) pour atteindre la valeur de 2% au bout de quatre jours puis il se stabilise à cette valeur jusqu'à la fin de fermentation.

Par contre, pour le sirop de glucose le degré de Brix se stabilise à 4% à partir du deuxième jour jusqu'à la fin de fermentation. Cette différence de dégradation des sucres peut s'expliquer par l'inhibition de la croissance d'*A.niger* sous l'effet de l'absence totale des minéraux dans le sirop de glucose en comparaison avec la dégradation des sucres dans le sirop de fruit.

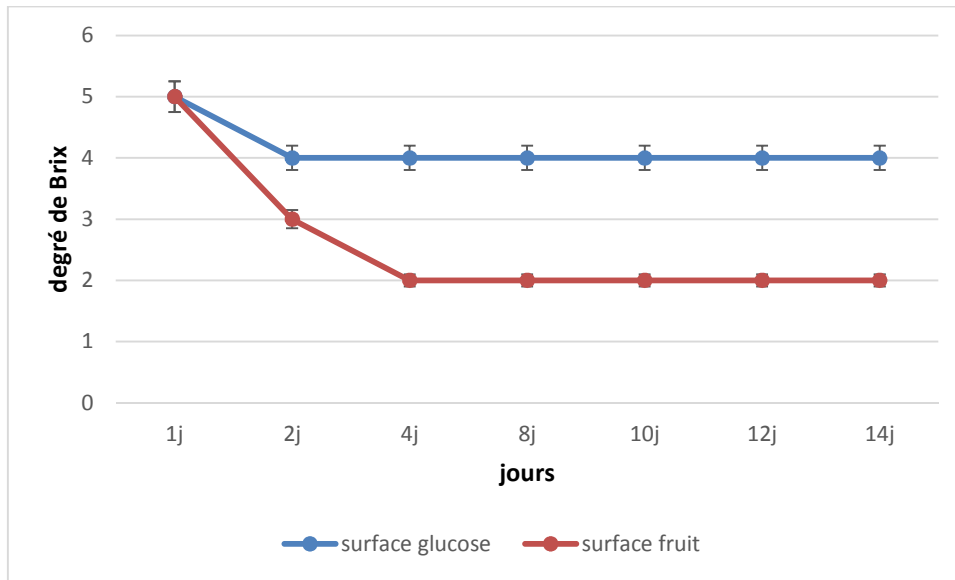


Figure 17 : évolution de Brix en fonction du temps cas de la culture en surface

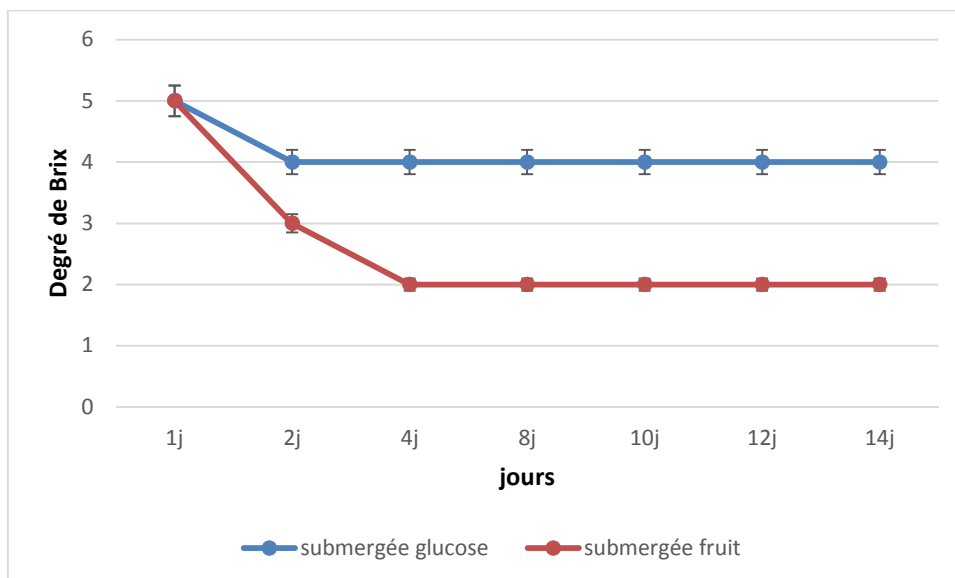


Figure 18 : évolution de Brix en fonction du temps cas de la culture submergée

VI.4.5 Résultats de dosage des sucres réducteurs

Les taux de sucres réducteurs diminuent en fonction du temps, et nous constatons une diminution rapide des sucres réducteurs au cours des deux premiers jours de fermentation pour les deux cultures submergée et en surface et ce pour les deux types de sirops.

À partir du deuxième jour, les taux de sucres diminuent progressivement jusqu'à la fin de fermentation pour les deux cultures.

Les taux de sucres réducteurs à la fin de fermentation sont de $4,89 \pm 0,02$ g/ml pour le sirop de glucose et de $0,55 \pm 0,02$ g/ml pour le sirop de fruit cas de la culture en surface.

Pour la culture submergée, les taux des sucres réducteurs à la fin de fermentation sont respectivement de $4,53 \pm 0,02$ et $1,39 \pm 0,02$ pour le sirop de glucose et de fruit.

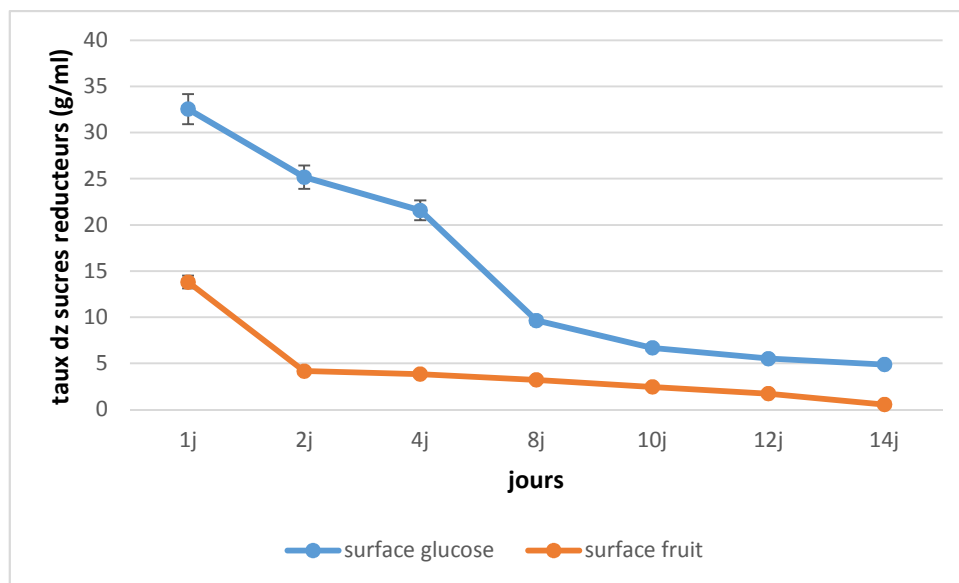


Figure 19 : Evolution des taux des sucres réducteurs en fonction du temps cas de la culture en surface

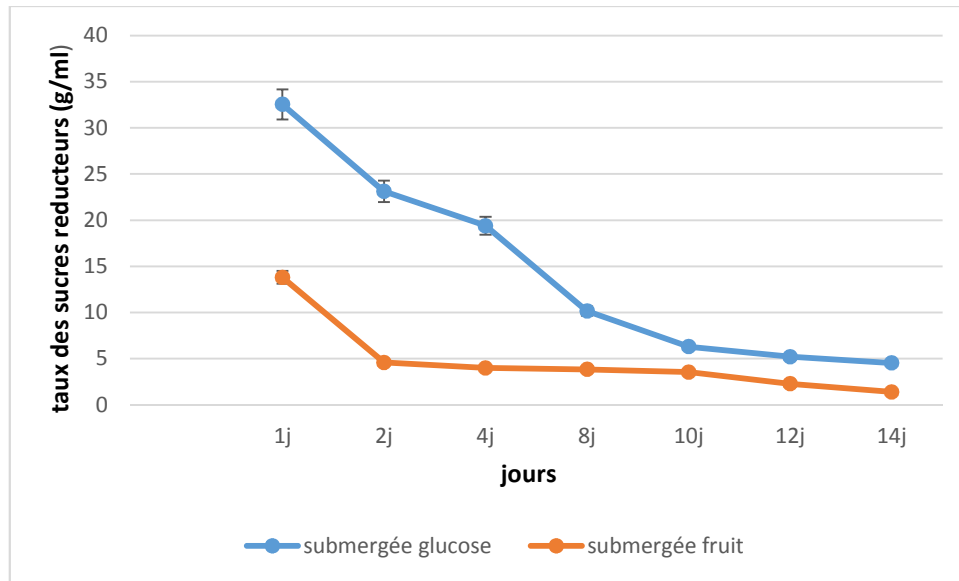


Figure 20 : Evolution des taux des sucres réducteurs en fonction du temps cas de la culture submergée

VI.4.6 Résultats de dosage des sucres totaux

On constate une diminution rapide dans les taux des sucres totaux au cours des deux premiers jours, pour les deux modes de culture en surface et submergée.

Les taux de sucres totaux diminuent progressivement jusqu'à atteindre une valeur de $1,18 \pm 0,04$ pour le sirop de fruit et de $0,75 \pm 0,01$ pour le sirop de glucose en surface.

Pour la culture submergée les taux des sucres totaux atteignent une valeur de $1,48 \pm 0,2$ pour le sirop de fruit et de $0,89 \pm 0,02$ pour le sirop de glucose.

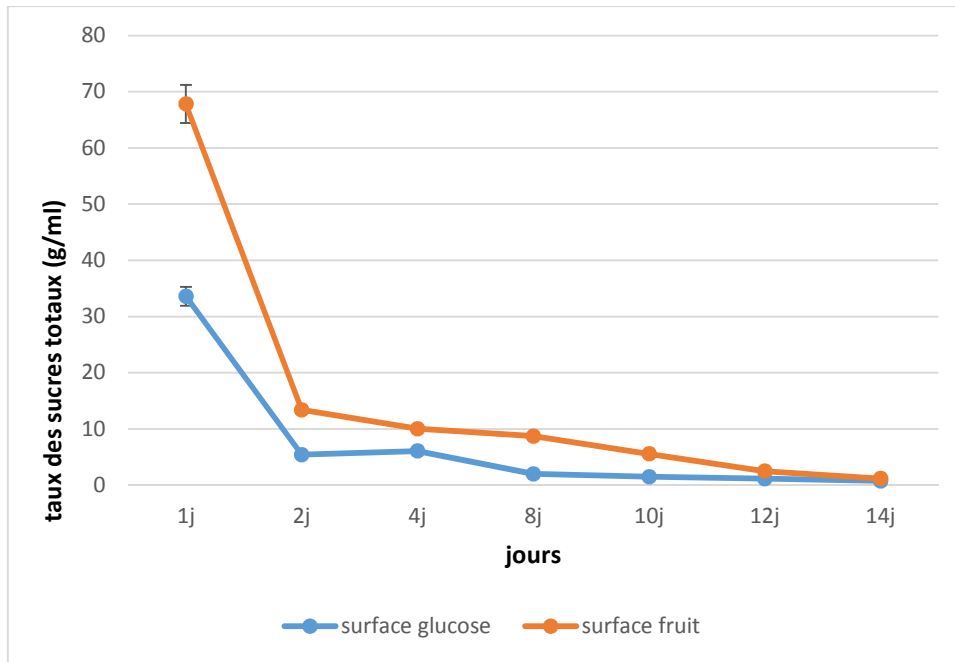


Figure 21 : Evolution des taux de sucres totaux en fonction du temps cas de la culture en surface.

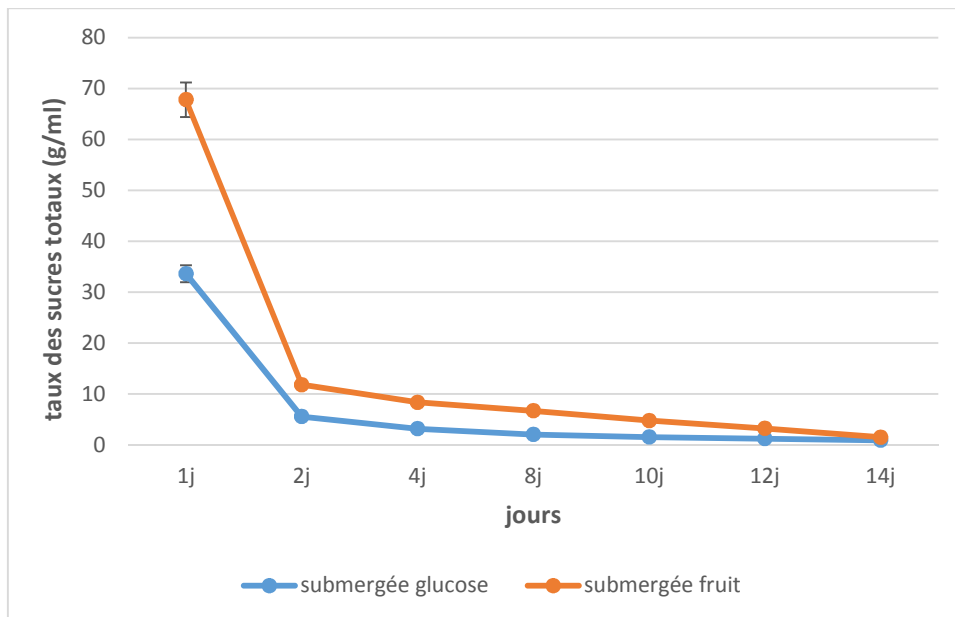


Figure 22 : Evolution des taux des sucres totaux en fonction du temps cas de la culture submergée.

VI.4.7 Cinétique de la fermentation

La cinétique de fermentation est une étape très importante parce qu'elle permet d'étudier la vitesse de production de cellules microbiennes ou des produits métabolisés par celles-ci dans le temps, en fonction du milieu environnant (Zergat, 1996).

VI.4.8 Croissance mycélienne

➤ Evolution de la croissance

Les courbes d'évolution de la croissance mycélienne dans le sirop de fruit pour les types de culture, présentent presque la même allure. Le tapis mycélien évolue progressivement pour atteindre à la fin de la fermentation de masse soit 41 g/ml pour la culture surface et 37,2g/ml pour la culture submergée.

L'évolution de la biomasse de la souche est irrégulière. La croissance mycélienne se déroule en 4 phases :

La phase de latence n'étant pas apparente, nous pensons que cela serait dû à l'utilisation de spores pré germées.

Au cours de la première étape et qui dure 02 jours, la croissance du mycélium est exponentielle. A cette étape les vitesses de croissance du mycélium atteignent leur maximum soit respectivement : 10.06g/ml/j et 12,05 g/ml/j pour la culture en surface et la culture submergée. La consommation des sucres durant cette phase est très importante, tandis que le pH est faiblement modifié. Cette consommation se traduit par une forte production mycélienne qui est corrélée par une teneur élevée en chitosan.

La seconde étape est caractérisée par la chute des vitesses de croissance atteignent 0,56g/ml/j après 8 jours pour la culture surface et 0,93 g/ml/j après 8 jours pour la culture submergée.

Selon Zergat (1996), la diminution de vitesse de croissance serait due à la perturbation du métabolisme primaire d'*Aspergillus niger* qui résulterait de l'épuisement du milieu en phosphore et en azote.

Au cours de la 3^{ème} étape, les vitesses de croissance augmentent de nouveau atteignant 1.45 g/m³/j et 0.69 au douzième jour respectivement pour la culture surface et la culture submergée.

Selon Chmie (1975) in Zergat (1996), durant cette phase il y a un déclenchement du métabolisme secondaire d'*Aspergillus niger* induit par la concentration élevée en sucres dans le milieu.

La quatrième étape dure 2 jours. Au cours de celle-ci le champignon réduit sa vitesse de croissance qui atteint à la fin de la fermentation 1.39 g/m³/j et 0.64 g/m³/j respectivement pour les deux cultures en surface et submergée.

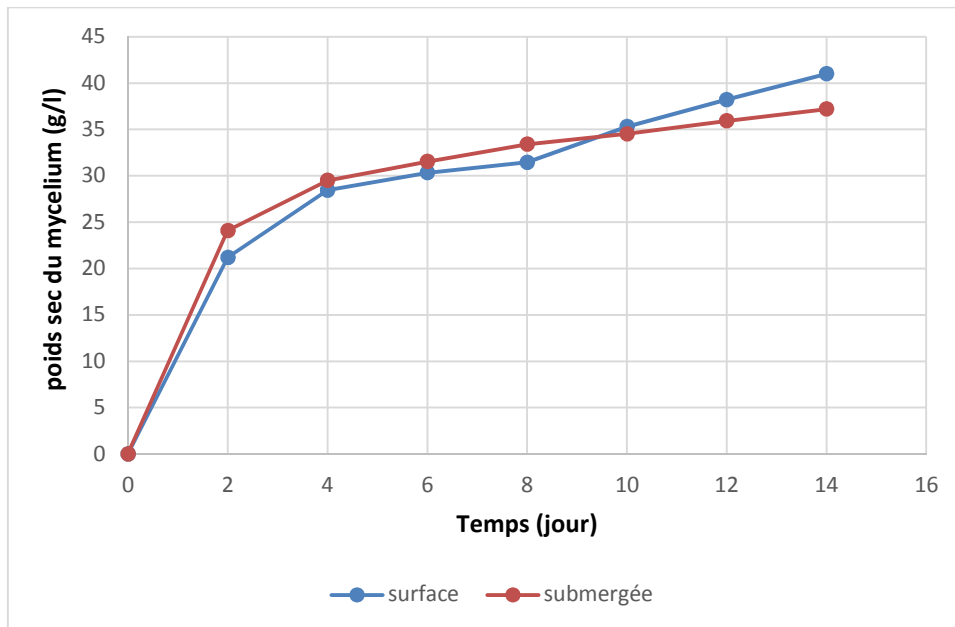


Figure 23: évolution du poids sec de mycélium au cours de la fermentation.

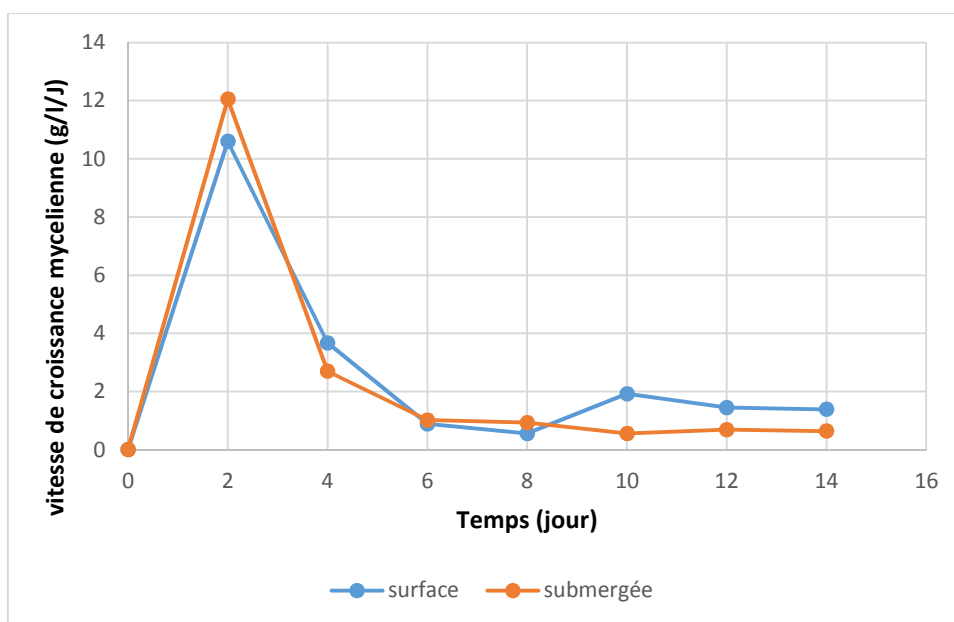


Figure 24 : évolution des vitesses de la croissance mycélienne au cours de la fermentation.

VI.4.9 Résultats des rendements en chitosane

Les quantités de chitosane extraites à partir des biomasses mycéliennes issues de la culture d'*A.niger* dans les deux sirops pour la culture en surface et submergée sont présentées dans le tableau suivant:

Tableau V: Quantités de chitosane issues des deux cultures et dans les différents sirops.

	Sirop de fruit	Sirop de glucose
Quantité de chitosane pour la culture en surface	32,55 ± 5,6 mg/g	Pas de production
Quantité de chitosane pour la culture submergée	19,62 ± 3,6 mg/g	Pas de production

Les photos ci-dessous représentent les poudres de chitosane issues de la culture en surface et la culture submergée après séchage à l'étuve à 60°C.

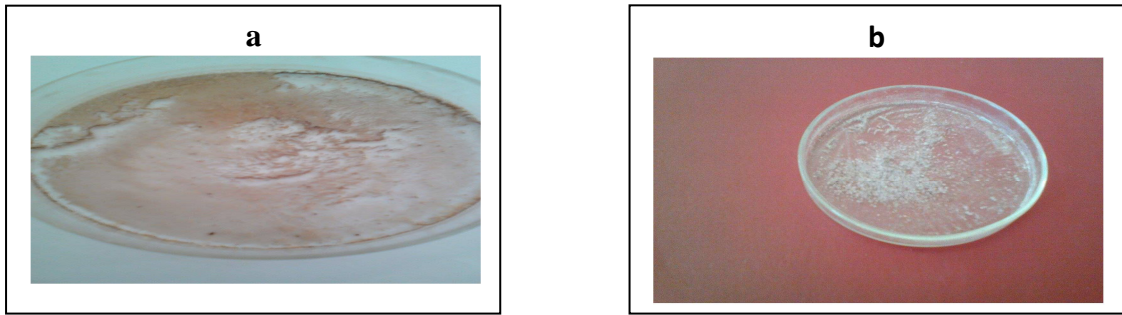


Figure 25 : a) photo de chitosane issu de la culture surface, b) photo de chitosane issu de la culture submergée.

La production de chitosane est élevée dans le cas d'utilisation du sirop de fruit par apport au sirop de glucose on a eu aucune production de chitosane par ce que il y' pas de développement mycélien et cela peut être dû au manque de certains composants qui sont présents dans le sirop de fruit et absents dans le sirop de glucose tels que les minéraux. Selon White *et al*, (1979), la teneur en chitosane des champignons dépend des souches fongiques utilisées, de l'âge du mycélium, du milieu de culture et des conditions de culture. De même, elle dépend également de la méthode d'extraction.

Selon KATARINA *et al*, (1982) in Zergat (1996), le fer, le zinc et le cuivre aident à la consommation des sucres, de l'azote et du phosphore.

Selon Dasgupta *et al*, (1981) in Benyahia (1992), le magnésium serait un ion essentiel pour l'utilisation des sucres par ce champignon.

La quantité en chitosane produite par *Aspergillus niger* durant cette étude est proche à celle signalée par Crestini *et al*, (1996) en utilisant le champignon *L.edodes*. Selon cet auteur, le rendement en chitosane de *L.edodes* était de 20-50 mg/g de poids sec. Cette quantité produite est inférieure à celle produite par *R.oryzae* qui est de 270-700 mg/l (Hang 1990) et celle produite par de *Rhizopus.spp* était de 330-645 mg/l (Shimahara *et al*, 1989).

Le milieu à base de fruit est choisi comme meilleur milieu de culture pour la production du chitosane

VI.4.10 Résultats de la caractérisation du chitosane

a) Analyse des groupements fonctionnels par Infra Rouge

Les spectres des poudres de chitosane issues de la culture d'*Aspergillus niger* en surface et submergée dans le sirop de fruit sont présentés dans la figure 26.

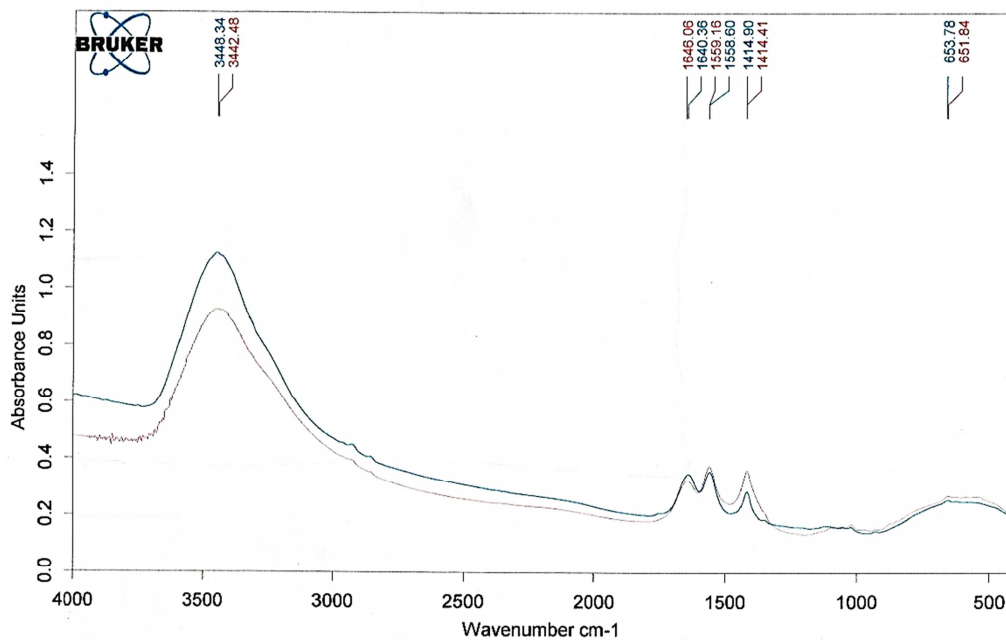


Figure 26 : Les résultats de l'infrarouge de chitosane pour la culture surface et submergée.

Les poudres de chitosane obtenues à partir de la culture d'*A.niger* en surface et submergée sont analysées par IR. Elles présentent les mêmes groupements fonctionnels avec des intensités variables. Les deux spectres révèlent la présence de plusieurs composés qui rentrent dans la composition du chitosane.

- La variation d'élongation à 3448.34 cm^{-1} et 3442.48 cm^{-1} représentent la liaison N-H (amine primaire).
- A 1646.06 cm^{-1} et 1640.36 cm^{-1} appartient à la vibration d'élongation du groupement amide.
- La vibration d'élongation à 1559.16 cm^{-1} et 1558.60 cm^{-1} représentent la C-NO₂ groupement nitro aliphatique.
- La vibration d'élongation à 1414.90 cm^{-1} et 1414.41 cm^{-1} représentent la liaison OH (alcool tertiaire).
- A 653.78 cm^{-1} et 651.84 cm^{-1} appartient à la vibration de déformation du C-H.

Ces résultats sont en bon accord avec un spectre IR de chitosane réalisé par Foher, et *al*, (1990). De même, ces résultats sont aussi très proches à celui produit par *Aspergillus niger* ITCC 7635.09 signalés par Wu et *al*, (2005).

b) Spectre UV-visible à balayage

Les bandes d'absorbance maximales pour les deux cultures en surface et submergée ont été détectées respectivement à 340 nm avec une valeur de 0.177 pour la culture surface et une valeur de 0.120 pour la culture submergée.

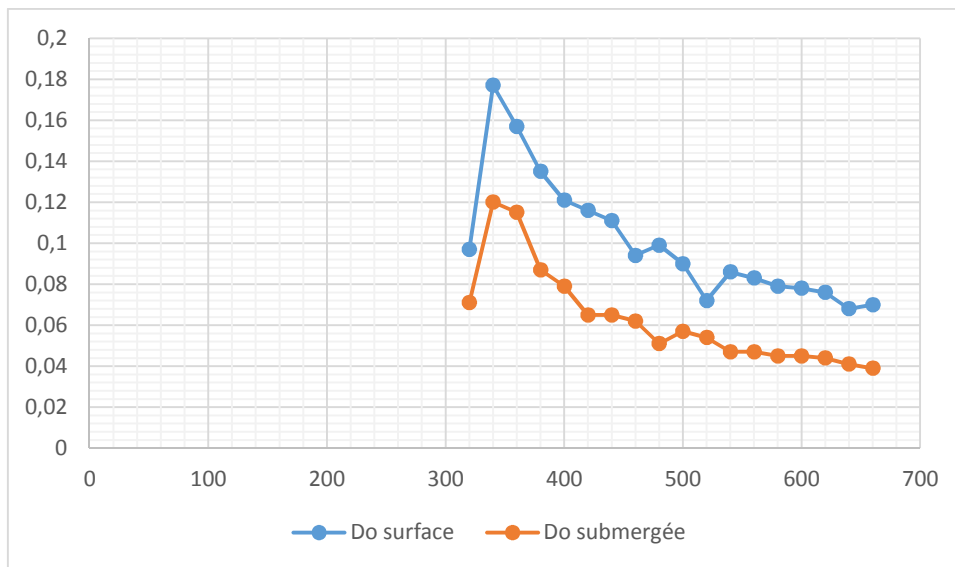


Figure 27 : spectre UV visible à balayage pour les deux cultures surface et submergée

Conclusion

Ce travail avait pour objet d'étudier la production du chitosane par *Aspergillus niger* en utilisant comme moût de fermentation le sirop de fruit de *Ficus microcarpa*.

Nous avons utilisé deux types de culture en surface et submergée avec deux milieux différents : sirop de fruit et sirop de glucose, ces derniers sont inoculés par *Aspergillus niger* à raison de 3.10^6 spores/ml à une température de 37°C.

La meilleure production a été obtenue dans le milieu de culture préparé à base de sirop de fruit avec une valeur égale à $32,55 \pm 5,6$ mg/g pour la culture en surface et de $19,62 \pm 3,6$ mg/g pour la culture submergée.

L'analyse par spectroscopie FTIR nous a permis de déterminer la structure de chitosane et la détermination de ces différents groupements.

Dans les perspectives certains aspects de caractérisation n'ont pas pu être abordés dans ce travail et complèteraient idéalement les résultats présentés. Plus particulièrement, la microscopie à balayage (MEB) qui permet l'observation directe de la morphologie de membrane, la distribution des phases et éventuellement des domaines remixés.

Enfin, il serait intéressant d'en faire des études de viscosité, rayons X et détermination de l'activité antimicrobienne du chitosane.

Références Bibliographiques

- **ABARCA L.M., FRANCESC A., JOSE C., CABANES J. F. (2004).** Taxonomy and significance of black aspergilla. *Antonie van Leeuwenhoek Kluwer, Academic Publisher*, 86: 33-49.
- **AFNOR. (1989).** Méthode de dosage des Sucres réducteurs.
- **AGHDAM M.G. (2010).** Extraction of chitosan from Fungel cell wall by sulfuric acid- Studying the effect of deacety on recovery chitosan. University of Baras. and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*. *Biotechnology Bioengineering*, 50: 207–210.
- **ARCIDIACONO S., KAPLAN D.L. (1992).** Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. *Biotechnology Bioengineering*, 39: 281–286.
- **AYER B., ELVAN Y., NESRIN H.(2000).** Evaluation of chitosan as potential medical iron (III) ionadsorbent, *Turk J Med Sci*, 30: 341-348.
- **BACON A., MAKIN J., SIZER P.J., JABBAL-GILL I., HINCHCLIFFE M., ILLUM L., CHATFIELD S., ROBERT M. (2000).** Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infection and Immunity*, 68: 5764-5770.
- **BADOT., GUIBAL E., (Eds).** Chitine et chitosane. Du biopolymère à l'application (PP. 19-54) Presses Universitaires de France- Conté.
- **BAILEY L. H., BAILEY E.Z. (1976).** *Hortus*. 3rd ed. Macmillan General Reference, NY.
- **Benahmed djilali A., Hadid L., Zerrou D., Derridj A ., et Bouksaim M ,2015** .Economical Citric Acide production using common dates from Algeria .The journal of MACRO trends in applied science. VOL 3 Issue 1.
- **BENYAHIA Z., 1992.** Amélioration du Rendement de Production de l'Acide Citrique par *Aspergillus niger*. Mémoire Ingénieur:U.S.T.H.B, Alger.
- **BERG C.C. (2003).** Flora Malesiana precursor for the treatment of Moraceae 1: the main subdivisi3n of *Ficus*: the subgenera. *Blumea*, 48: 167–178.
- **BERG C.C., CORNER E.J.H. (2005).** Moraceae: Ficeae. -In: Noteboom, H.P. (ed) *Flora Malesiana* ser, vol. 17, part. National Herbarium of Nederland, 2: 1-730.
- **BERTH G., DAUTZENBERG H., PETER M.G. (1998).** Physico-chemical characterization of chitosans varrying in degree of acetylation. *Carbohydrate Polymers*, 36:205-218.
Bishop Museum Press, Honolulu, HI.

- **BOCQUET J. (1993).** Généralités sur les microorganismes en biotechnologies. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.
- **BRICKELL C., ZUK J.D. (1997).** *The American Horticultural Society A-Z Encyclopedia*
- **BRUGNEROTTO J. J., LIZARDI F.M., GOYCOOLEA., RINAUDO M. (2001).** An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polym*, 42: 3569-3580.
- **CAHAGNIER B. (1997).** Moisissures des aliments peu hydrates. Ed : Lavoisier technique et documentation. Paris. 50P.
- **CAHAGNIER B., RICHARD-MOLARD D. (1998).** *Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés*, Ed. Tec & Doc, 140-158P. *Carbohydr, Res*, 323: 156-162 .
- **CHEN R.H., CHANG J.R., SHYUR J.S. (1997).** Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *Carbohydr, Res*, 299: 287-294.
- **CHEW W.L. (1989).** Moraceae In: George A.S. (Ed), *Flora of Australia*, vol. 3: 15-68. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- chitosan and Its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgical Research*, 185-192.
- chitosan. *Die Makromolekulare Chemie*, 189 (1): 195-200.
- *Contrôle sanitaire. Médicale international et TEC et DOC*, Paris. 112-140P.
- **CORLETT R.T. (2006).** Figs (Ficus, Moraceae) in urban Hong Kong, South China. *Biotropica*. 38: 116-121.
- **CORNER E.J.H. (1997).** *Wayside trees of Malaya*, vols, 1-2, 4th ed. Malayan Nature
- **CRESTINI C., KOYAC B., GIOVANNOZZI-SERMANNI G. (1996).** Production
- **CRINI G., GUIBAL E., MORCELLET M., TORRI G., BADOT P.M. (2009).** “Chitine et chitosane” préparation, propriétés et principales application. De Doctorat, Université de Bourgogne, Dijon, France.
- **DELARRAS C. (2007).** *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse de* derivativesz in: Polysccharide, Structural diversity and functional versatility New York :

- **DIGUTA C. F. (2010).** Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse
- **DRYSDALE C.R., MCKAY A.M. (1995).** Citric acid production by *Aspergillus niger* in surface culture on inulin. *Lett- Appl. Microbiol*, 41: 252-254.
- **G.A.F. ROBERTS. (1992).** Chitin Chemistry, The MacMillan Press LTD, London.
- **GRABOVAC V., GUGGI D., BERNKOP-SCHNURCH A. (2005).** Comparison of the
- **GREGORIO C., PIERRE-MARIE B. (2007).** Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies, *Prog. Polym. Sci.*
- **GUEBEL D.V., NESTOR DARIAS N.V. (2001).** Optimization of the citric acid production by *Aspergillus niger* through a metabolic flux balance model. *Biotechnol*, 15: 60-70.
- **GUILLAME V. (2006).** *Mycologie auto-évaluation et manipulation*. Ed De Boeck & Lacier, Bruxelles, 62P.
- **HANG Y.D. (1990).** Chitosan production from *Rhizopus oryzae* mycelia. *Biotechnology letters*, 12: 911–912.
- **HAWKSWORTH D.L., KIRK P.M., SUTTON B., PEGLER D.N. (1995).** Dictionary of the Fungi, 8th Ed. CAB. International Walling Ford. United Kingdom.
- **HEUX L., BRUGNEROTTO J., DESBRIERES J., VERSALI M.F. RINAUDO M. (2000).** Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromol*, 1: 746-751.
- **HON D.N.S. (1996).** Chitin and chitosan: Medical applications. In *Polysaccharides in Medicinal Application*, 631–649P.
- **INGER M.N., VOLD., KJELL M., VARUM., ERIC., GUIBAL., OLAV., SMIDSRD. (2003).** *Carbohydrate Polymer*, 54: 471-477.
- **JAOUEN D. (1994).** Chitine, Chitosane et Dérivés. PHD Thèse en pharmacie, Université d'Angers, Angers (France).
- **KASAAI M. R., J. ARUL M.R., CHIN S.L CHARLET G. (1999).** The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem*, 120: 201-205.

- **KENG H., CHIN S.C., TAN H.T.W. (1990).** *The concise flora of Singapore: Gymnosperms and Dicotyledons.* — Singapore University Press, Singapore.
- **KITTUR F.S., PRASHANTH K., SANKA K.V., THARANATHAN R.N., (2002).** Carbohydr. Polym, 49: 185-193.
- **KRISTIANSEM B., SINCLAIR C.G. (1978).** Production of citric acid in batch culture biotechnol. Bioeng, 20: 1711-1722.
- **KUBICEK C.P., ROHR M. (1977).** Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. Europ. J. Appi. Microbiol, 4: 167-168.
- **KURITA K. (2006).** Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans.
- **MAGHAMI G.G., ROBERTS G.A.F. (1988).** Evaluation of the viscometric constants for Marcel Dekker 2ed, 661-670.
Marine Biotechnology, 8: 203-226.
- **MATTEY M. (1992).** The production of organic acids. Crit. Rev- Biotechnol, 12: 87-132.
- **MCKEY D. (1989).** Population biology of figs: applications for conservation. *Experientia*. 45: 661–673.
- **MENZEL U., LIETH H. (2003).** Halophyte database version 2.0. in H. Lieth and M. Mochtchenko, eds. Cash crop halophytes: recent studies. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 221-250P.
- **MEYER A., DEIANA J., BERNARD A. (2004).** *Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés.* 2ème Ed Doin, 430P.
- **MISSOURI BOTANICAL GARDEN. (2002).** WETROPICOS: VAST Specimen database http://mobot.mobot.org/cgi_bin/search_vast.
- **MOREIRA M.T., SANROMAIN A., FEIJOO G., LEMA J.M. (1996).** Control of pellet morphology of filamentous fungi in fluidized bed bioreactors by means of a pulsing flow. *Enzy, Microbiol. Technol*, 19: 261-266.
mucoadhesive properties of various polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 1713-1723.
- **MUZZARELLI R.A.A. (1977).** *Chitin*, Pergamon Press, Oxford, 309p.
- **MUZZARELLI R.A.A., MUZZARELLI C. (2005).** Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. *Advances in Polymer Science*, 186: 151-209.

- **NEW N., FURUIKE T., TAMURA H. (2010).** Production of Fungal chitosan by Enzymatic Method Applications in plant tissue culture and tissue Engineering : 11 years of our progress, present Situation and Future Prospects, *Biopolymers*, 135-162.
- **NEW N., FURUIKE T., TAMURA H. (2010).** Chitin and chitosan from terrestrial organisms, In: *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*, Kim, S. K. (Ed), pp. 3-10, Taylor & Francis Group LLC, ISBN 978-14-398-1603-5, Florida.
- **NF V 05-101. (1974).** Produits dérivés des fruits et légumes. Détermination de L'acidité titrable.
- **NUGRAHA E. (2006).** Développement de films biodégradables à base de chitosane: Etudes du mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation. Thèse de doctorat, Université de Reims.
- *of Garden Plants*, DK Publishing, Inc, NY.
- **PA PAGIANNI M. (2007).** Advances in citric fermentation by *Aspergillus niger*. Biochemical aspects, membrane, transport and modeling. *Biotechnol- Advanc*, N° 25: 244-263.
- **PASQUALOTTO A. C. (2010).** *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Ed Springer Science & Business Media, New York, 1027P.
- **PAYET L., PONTO F., AGENTY P., COLINART J., GRPOSSID. (2000).** Rheologique de la gélification de l'alginate et de chitosane : *effet de la température* Vol. 2 : 46-51 .
- **PAZOUKI M., FELSE P.A., SINHA J., PA DA T. (2000).** Comparative studies on citric acide production by *Aspergillus niger* and candida lipolytica using molasses and glucose. *Biopro.Engin*, 22(4): 353-361.
- physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 53: 3888-3894.
- **PINTADO J., TORRADO A., GONZALEZ M.P., MURADOM.A. (1998).** Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid- State culture of *Aspergillus niger* on polyure than foams. *Enzy Microbiol*, 6: 55-62.
- **PRADO F.C., VANDENBERGH L.P.S., WOICIECHOWSKI A.L., RODRIGUES-LEON J.A., SOCCOL C.R. (2005).** Cytric acid production by solid- State ferment action on a Semi-Pilot Scale using different percentages of treated cassavabagasse *braz.J.Chem.Eengin*, 22 (4): 22-35.

- **RINAUDO M. (2006).** Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer*
- **RUIZ-HERRERA J., SENTANDREU R.R., MARTINEZ J.P. (1992).** Chitin biosynthesis in fungi. In *Handbook of Applied Mycology, Vol. 4. Fungal Biotechnology* ed. Dilip, K.A., Richard, P.E. and Mukerji, K.G. New York: Marcel Dekker, 281–312.
- **SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C. (2004).** *Introduction to food and airborne fungi.* Centralalbureau voor Schimmellcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, 389P.
- **SCHUSTER E., DUNN-COLEMAN N., FRISVAD J. C., VAN DIJCK P.W. (2002).** On the safety of *Aspergillus niger*-a review. *Appl microbiol biotechnol*, 59[4-5]: 426-435.
Science (Oxford), 31: 603-632.
- **SHI C., ZHU Y., RAN X., WANG M., SU Y., CHENG T. (2006).** Therapeutic Potential of
- **SHIMAHARA K., TAKIGUCHI Y., KOBAYASHI T., UDA K., SANNAN T. (1989).** screening of mucoraceae strains suitable for chitosan production. In *Chitin and chitosan* ed. skjak-Braek, G., Anthonsen, T. and Sanford,London: Elsevier Applied Science, 171–178.
- **SHUYI C. (2009).** Threat and weediness attributes of Ficus (Moraceae). Bachelor of Science Thesis, National University of Singapore, Singapore.
- **SIKANDER A. (2004).** Studies on the submerged fermentation of citric acid by *Aspergillus niger* in stirred fermented. Thesis of Doctorate, University of Pendjab, Pakistan, 428P.
Society, Kuala Lumpur.
- **SRINIVASA P.C., RAMESH M.N., KUMAR R., THARANATHAN R.N., (2004).** *Journal of Food Engineering*, 63: 79-85.
- **SUYATMA N.E. (2006).** Development de Films Biodegradable à base de chitosane : Etudes du mélange chitosane / PLA, de la plastification et de la compatibilisation. Thèse de Doctorat, Université de REINS-Champagne Ardene.
- **SYNOWIECKI J., AL-KHATEEB N.A. (2003).** Production, prop-erties, and some new applications of chitin and its deriva-tives. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43(2):145-71.

- **TAN H.T.W., YEO C.K., NG A.B.C. (2009).** *Native and naturalized biodiversity for Singapore waterways and water bodies No. 1. Ficus microcarpa, Malayan Banyan.* Raffles Museum of Biodiversity Research, National University of Singapore, and Singapore-Delft Water Alliance, Faculty of Engineering, National University of Singapore, Singapore.
- **TAN S. C., TAN T.K., WONG S.M. KHOR E. (1996).** The chitosan yield of Zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydrate Polymers*, 30: 239–242.
- **THANOU M., JUNGINGER H. (2005).** Pharmaceutical applications of chitosan and
- **VAN NOORT S., RASPLUS J.Y. (2015).** Figweb: figs and fig wasps checklist of Indo, Australasian Ficus (Moraceae).
- **WAGNER W.L., D.R. HERBST D.R., SOHMER S.H (1999).** Manual of the flowering plants of Hawai'i. Bishop Museum Special Publication 83, University of Hawai'i and Bishop Museum Press, Honolulu.
- **WAGNER W.L., D.R. HERBST D.R., SOHMER S.H. (1999).** *Manual of the Flowering Plants of Hawai'i.* 2 vols. Bishop Museum Special Publication 83, University of Hawai'i and
- **WARD O. P., QIN W. M., DHANJOON J., YE J., SING A. (2006).** Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, 58: 1-75.
- **WEBER E. (2003).** *Invasive plant species of the World: a reference guide to environmental weeds.* CABI Publishing, Wallingford.
- **WHITE S.A., FARINA P.R., FULTON I. (1979).** *Production and isolation of chitosan from Mucor rouxii.* Appl. Environ. Microbiol. 38 (2): 323-328.
- **WHITE S.A., FARINA P.R., FULTON L. (1979).** Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38: 323–328.
- **WU T., ZIVANOVICS S., DRAUGHTOR F.A., CONWAY W.S., SAMS C. (2005),**
- **YANG B.Y., MONTGOMERY R. (2000).** Degree of acetylation of heteropolysaccharides.
- **YENSEN N.P. (2015).** Halophyte database: salt-tolerant plants and their uses, USDA-ARS,

U.S,SalinityLaboratory,Riverside,CA.available:<http://www.ussl.ars.usda.gov/pls/caliche/halo>.

- **YEO C.K., TAN H.T.W. (2011).** Ficus stranglers and Melastoma malabathricum: potential tropical woody plants for phytoremediation of metals in wetlands. *Nature in Singapore*. 4: 213–226.
- **ZERGAT F., (1996).** Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par *Aspergillus niger* Cultivée sur Moût de Dattes. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie saharienne, Université Kasdi Merbah, Ouargla.
- **ZHANG., JUN., YOULING., YUAN JIAN., SHEN., SICONG., (2003).** European Polymer Journal, 39: 847-850.

Annexes

Annexe 1

Tableaux 1 : Appareillage, solvants, réactifs chimiques et milieux de culture et matériel utilisé

Appareillages, verreries de laboratoire	Solvant
agitateurs variés (a barreau magnétique chauffant et non) Autoclave de paillasse (WEBECO) Balance de précision 0,001g (KERN) Bain marie Etuve (MEMMERT) Centrifugeuse Four à moufle (NABERTHERM) Réfractomètre (RB 80) Microscope photonique pH mètre (INOLAB) plaque chauffante (RYP A) spectrophotomètre UV visible Réfrigérateur ENIEM 4°C Bec bunsen	Acide chlorhydrique HCl Acide sulfurique H ₂ SO ₄ Acétate de plomb Bleu de méthylène Eau distillée Eau physiologique stérile (9g/l) Fehling A Fehling B Hydroxyde de sodium NaOH (0,1N, 10N, 10M, 2M) Eau de robinet Phénolphtaléine à (2%, 1%) Poudre de gélose
Milieu de culture	Matériels
Gélose glucosée a l'oxytetracycline OGA Gélose Sabouraud Sirop de fruit Sirop de glucose	Boîtes Pétri Anse de platine Béchers, burettes, fioles, erlenmeyer, entonnoir, flacons, pipettes gradués, pipettes Pasteur, cristallisoirs, éprouvettes et tubes à essai ...etc.

Annexe 2

Procédé de comptage par la cellule de Malassez

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles. Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

Le volume correspondant au quadrillage total est égal à $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$. Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$.

1. Remplissage de la cellule de numération

- Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.
- Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée.
- Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.
- Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont immergées dans un bain d'eau de Javel pendant 5 minutes, puis sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

2. Numération

- Observer à l'objectif **x10** pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
- Observer ensuite à l'objectif **x40** pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).

- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).

3. Calcul de la concentration cellulaire

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée.

Soient :

- **n** : nombre de cellules comptées.
- **V** : volume de comptage.
- **f** : facteur de dilution.
- **N** : nombre de cellules par litres.

Si on a **n** cellules dans **V** litres, alors on a **N** cellules dans un litre :

$$N \times V = n \times 1 \quad N = n / V$$

Si la solution avait été diluée : $N = (n / V) \times f$

Annexe 3

Tableau 3 : Evolution de la biomasse et de la vitesse de la croissance mycélienne au

Cours de la fermentation dans le milieu de sirop de fruit

Temps	Culture en surface		Culture en submergée	
	Poids sec du mycélium (g/l)	Vitesse de croissance mycélienne (g/l/j)	Poids sec du mycélium (g/l)	Vitesse de croissance mycélienne (g/l/j)
0	0	0	0	0
2	21,20	10,6	24,1	12,05
4	28,54	3,67	29,5	2,7
6	30,32	0,89	31,54	1,02
8	31,45	0,56	33,40	0,93
10	35,30	1,92	34,52	0,56
12	38,21	1,45	35,91	0,69
14	41	1,39	35,2	0,64

Vitesse de croissance mycélienne = $\frac{dx}{dt}$ (g/l/j)

$$\frac{dx}{dt} = \frac{X-X_0}{t-t_0}$$

X= poids sec du mycélium au t

X_0 = poids sec du mycélium au t_0

Résumé

La production du chitosane par *A. niger* cultivée en surface et submergée a été réalisée en utilisant le sirop de fruit de *ficus microcarpa*.

Le rendement en chitosane obtenu après 14 jours de fermentation dans le sirop de ce fruit est de l'ordre de $32,55 \pm 5,6$ mg/g pour la culture en surface et de l'ordre de $19,62 \pm 3,6$ mg/g pour la culture submergée.

L'analyse infrarouge des poudres de chitosane issues des deux cultures a prouvé que le spectre de chitosane était très similaire à ceux du chitosane commercialisé et du chitosane extrait de crevette.

Mots clé: *Aspergillus niger* - chitosane - culture en surface - culture submergée - sirop de fruit (*ficus microcarpa*).

Summary

Production of chitosan by surface-grown *aspergillus niger* and submerged was carried out using the fruit syrup of *ficus microcarpa*.

The yield of chitosan obtained after 14 days of fermentation in the syrup of this fruit is of the order of 32.55 ± 5.6 mg / g for the surface cultivation and of the order of 19.62 ± 3.6 mg / G for submerged cultivation.

Infrared analysis of chitosan powders from both cultures demonstrated that the chitosan spectrum was very similar to that of chitosan marketed and chitosan shrimp extract.

Key words: *Aspergillus niger*- chitosan - cultivation surface - submerged culture - fruit syrup (*ficus microcarpa*).