N°d'ordre :

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE CHIMIE

THÈSE DE DOCTORAT LMD

Filière : Chimie
Option : Chimie de l'Environnement
SUJET

Utilisation d'un biomatériau dans la dépollution

Présentée par

M^me^ AILI DIHIA

Soutenu publiquement le : 30 /06 / 2020 Devant le jury composé de :

M^r^. MEZIANE Smail	Professeur	UMMTO	**Président**
M^me^. ADOUR DJABRI Lydia	Professeur	U. Alger 1	**Rapporteur**
Mr. GRIB Hocine	Professeur	ENP	**Examinateur**
M^r^. KADOUCHE Slimane	Maître de conférences A	UMMTO	**Examinateur**
M^r^. YAHIAOUI Idris	Maître de conférences A	U. BEJAIA	**Examinateur**
M^r^. HOUALI Karim	Professeur	UMMTO	**Invité**

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie (L.B.A.B) de l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou et au sein de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, université de Rennes 1.

Cette thèse a été dirigée par Mme ADOUR ép DJABRI Lydia, professeur à l'université d'Alger 1, à qui j'adresse mes remerciements les plus profonds de m'avoir confié ce travail, encadré et guidé. Je la remercie pour son aide technique et scientifique, pour sa confiance et ses encouragements et surtout pour la disponibilité dont elle a fait preuve à mon égard. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude, ses qualités humaines et scientifiques m'ont été d'une aide précieuse.

Je remercie également Mr HOUALI Karim, professeur à l'UMMTO et directeur de laboratoire L.B.A.B, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire où j'ai réalisé la majeure partie de ces travaux de recherche. Je le remercie pour ses précieux conseils et ses encouragements tout au long de ma formation au laboratoire. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour son aide et mon respect le plus profond.

Je tiens aussi à remercier Mr AMRANE Abdeltif, Professeur à l'université de Rennes 1 et membre de l'équipe « Chimie et Ingénierie des Procédés » du laboratoire Sciences Chimiques de Rennes (UMR CNRS 6226 – Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes / Université de Rennes 1) de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour son aide. Il a fait preuve de patience, de disponibilité et de confiance.

Bien évidemment, l'étape finale de ces années de travail ne pourra être complétée que suite à l'avis des membres de jury. Je tiens à remercier Mr MEZIANE Smail, professeur à l'UMMTO, d'avoir accepté de présider ce jury et de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr GRIB Hocine, professeur à l'ENP, Mr KADOUCHE Slimane, maître de conférences A à l'UMMTO et Mr YAHIAOUI Idris maître de conférences A à l'université de BEJAIA, d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, notamment Mme AMMAR KHODJA Nadia et Mme MANSOUR BENAMAR Malika, de m'avoir permis d'avancer grâce à leurs précieux conseils et leur aide.

Je n'oublierai pas, non plus, les personnes du laboratoire L.B.A.B qui m'ont, avant tout, formé et aidé dans mon travail : DERMECHE Samia, SALMI Djouza, TITOUCHE yacine, OUSAID Saliha, CHERGUI Achour et SABANE Hilal.

Mes derniers remerciements et non les moindres vont à mon mari Idris, mes parents et mes sœurs pour leurs encouragements, leur soutien et leur implication. Enfin, je dois souligner le fait que cette thèse n'aurait pas vu le jour sans leur soutien moral et leur encouragement pendant toutes ces années d'études. Je ne pourrai jamais les remercier assez: « merci d'être là pour moi tous les jours et j'espère vous rendre éternellement fiers de moi ».

Dédicaces

Je dédie cette thèse à mes chers parents pour leurs encouragements, leur aide et qui sans eux rien n'aurait été possible.

A mon mari Idris et mon ange Amelia

A mes chères sœurs Hadjira, Sadjia et Ounissa

A mon cher frère Hakim et sa femme ainsi que ses enfants

A ma grand-mère Ouardia

A mes chers beaux-parents

Ainsi qu'à toutes les autres personnes de ma famille

Je la dédie, aussi, à tous mes amis

Dihia AILI

SOMMAIRE

Liste des tableaux
Liste des figures
Abréviations
Introduction Générale 1

Partie I: Synthèse Bibliographique

Chapitre I: Sources, caractéristiques, méthodes d'isolation et les applications de la chitine et du chitosane

I.1. Les sources de la chitine et du chitosane 4
I.1.1. Les sources animales 4
I.1.1.1. Caractéristiques du chitosane d'origine animale 5
I.1.2. Les sources fongiques 7
I.1.2.1. Zygomycètes 9
I.1.2.2. Ascomycètes 10
I.1.2.3. Basidiomycètes 12
I.2. Les polysaccharides fongiques 12
I.2.1. Chitine : Définition, structure et caractéristiques 13
I.2.2. Chitosane : Définition, structure et caractéristiques 15
I.2.3. Glucanes : Définition, structure et caractéristiques 16
I.2.3.1. β-(1-3)-glucanes 16
I.2.3.2. β-(1-6)-glucanes 17
I.3. Présentation de l'espèce fongique « *Penicillium camembertii* » 17
I.3.1. Taxonomie 18
I.3.2. Caractères morphologiques 19
I.3.3. Structure et composition de la paroi cellulaire du *Penicillium camembertii* 20
I.3.4. Caractères physiologiques 21
I.3.5. Les exigences nutritionnelles 23
I.3.6. Les applications industrielles du *Penicillium camembertii* 24
I.4. Procédés d'isolation des polysaccharides fongiques 26
I.4.1. Culture du mycélium fongique : mode et paramètres de fermentation 26

I.4.2. Extraction de la chitine et du chitosane libre (chitosane naturel)..... 28
I.4.2.1. Influence des paramètres d'extraction sur le rendement en chitine et en chitosane libre..... 29
I.4.3. Extraction du chitosane total..... 30
I.5. Applications des polysaccharides (chitine et chitosane) 32
I.5.1. les sources marines 32
I.5.1.1.Utilisation du chitosane comme adsorbant 32
I.5.1.2. Avantages et inconvénients des adsorbants à base du chitosane..... 34
I.5.2. Les sources fongiques 34
I.5.2.1. Activités antimicrobiennes et antifongiques..... 34
I.5.2.2. Biofertilisants 35
I.5.2.3. Immobilisation d'enzymes 36

Chapitre II : Théorie de la biosorption

II.1. Définition de l'adsorption..... 37
II.2. Propriétés des adsorbants 37
II.3. Types d'adsorption 37
II.4. Isothermes d'adsorption 39
II.4.1. Classification des isothermes d'adsorption..... 40
II.5. Modélisation des isothermes d'adsorption 43
II.5.1. Modèle de Langmuir 43
II.5.2. Modèle de Freundlich..... 44

Partie II: Matériel et méthodes

Chapitre III: Matériel et méthodes

III.1. Extraction des polysaccharides 60
III.1.1. Effet du mode de culture sur l'isolation de la chitine et du chitosane libre 60
III.1.1.1. Description du mode opératoire de préparation des milieux de culture 60
III.1.1.2. Préparation de la biomasse de *Penicillium camembertii* 61
III.1.1.3. Isolation simultanée de la chitine et du chitosane libre 62

III.1.1.4. Caractérisation des fractions AcIM par spectrométrie FTIR 64
III.1.2. Effet de la température dans la production de la chitine et du chitosane libre par la culture solide de *Penicillium camembertii* sur un milieu extrait de levure-peptone-glucose (YPGA) 64
III.1.2.1. Conditions de culture 64
III.1.2.2. Extraction des biopolymères 65
III.1.2.3. Analyses 65
III.1.2.3.1. Observation au microscope optique 65
III.1.2.3.2. Caractérisation physico-chimique des biomasses 66
III.1.2.3.3. Analyses spectroscopique et micrographique 66
III.1.2.4. Etude de la désacétylation des chitines 67
III.1.2.4.1. Caractérisation des produits préparés 67
III.2. Application du chitosane fongique dans l'élimination du colorant bleu de méthylène (BM) 68
III.2.1. Préparation des membranes de chitosane 68
III.2.2. Application des membranes de chitosane dans l'élimination du colorant bleu de méthylène (BM) 69
III.2.2.1. Préparation et analyse des solutions d'adsorbat 69
III.2.2.2. Essais d'élimination de colorant 69
III.3. Amélioration du rendement de la chitine et du chitosane libre par la méthode du plan factoriel complet (PFC) 70
III.3.1. Présentation des plans d'expériences 70
III.3.2. Modélisation 71
III.3.3.Analyse statistique 71
III.3.3.1. Vérification de la signification des coefficients 71
III.3.3.2. Validation du modèle 72
III.3.4. Production de la biomasse fongique par la méthode de la planification des expériences 74
III.3.4.1. Choix des paramètres opératoires 74
III.3.4.2. Culture sur milieu solide de *Penicillium camembertii* 75
III.3.5.Extraction des polysaccharides 76

III: Résultats et discussion

Chapitre IV: Extraction des polysaccharides et leur application

IV.1. Extraction des polysaccharides 77
IV.1.1.Effet du mode de culture sur l'isolation de la chitine et du chitosane libre 77
IV.1.1.1. Production de la biomasse mycélienne 77
IV.1.1.2. Extraction de la chitine et du chitosane libre 77
IV.1.1.3. Caractérisation de la fraction AcIM par FTIR 79
IV.1.2. Effet de la température dans la production de la chitine et du chitosane libre par la culture solide de *Penicillium camembertii* sur un milieu extrait de levure-peptone-glucose (YPGA). 80
IV.1.2.1. Développement du mycélium de *Penicillium camembertii* 80
IV.1.2.2. Observation au microscope optique 81
IV.1.2.3.Production des biomasses de *Penicillium camembertii* à différentes températures de croissance 81
IV.1.2.4.Caractérisation physico-chimique des biomasses sèches 82
IV.1.2.5. Analyse structurale des biomasses par spectroscopie ATR 83
IV.1.2.6. Détermination de la morphologie par MEB 86
IV.1.2.7. Traitements chimiques des biomasses 87
IV.1.2.7.1. Traitement alcalin (NaOH 1M) des biomasses sèches 88
IV.1.2.7.2. Analyse des fractions insolubles AIM par MEB 88
IV.1.2.7.3. Traitement acide des fractions AIM 89
IV.1.2.7.4. Analyse des fractions AcIM par spectroscopie ATR 91
IV.1.2.7.5. Analyses des fractions AcIM par MEB 93
IV.1.2.7.6. Analyse de la fraction AcSM 94
IV.1.2.8. Etude de la désacétylation des chitines brutes 97
IV.1.2.8.1. Caractérisation des chitines désacétylées 98
IV.2. Application du chitosane fongique dans l'élimination du colorant Bleu de Méthylène (BM) 100

IV.2.1. Apparence des membranes du chitosanes 101
IV.2.2. Essais d'élimination du colorant 101
IV.2.2.1. Effet du temps de contact à différentes concentrations initiales du BM 101
IV.2.2.2. Effet du pH de la solution 102
IV.2.2.3. Effet de la masse des membranes 104
IV.2.2.4. Effet de la température 106
IV.2.3 Modélisation 107
IV.2.3.1. Modélisation de la cinétique d'élimination 107
IV.2.3.2. Modélisation des isothermes d'adsorption 111
IV.2.3.3. Modèles théoriques 112

Chapitre V: Amélioration du rendement de la chitine et du chitosane libre par la méthode du plan factoriel complet

V.1. Modélisation de la concentration en biomasse mycélienne et des rendements des fractions (AcIM et AcSM) 116
V.1.1.Modélisation de la concentration en biomasse mycélienne (y1) 117
V.1.1.1. Calcul des coefficients du modèle 117
V.1.1.2. Analyse statistique de l'équation de régression 117
V.1.2.Modélisation du rendement des fractions AcSM (y2) 119
V.1.2.1. Calcul des coefficients du modèle 119
V.1.2.2. Analyse statistique de l'équation de régression 119
V.1.3.Modélisation du rendement des fractions AcIM (y3) 121
V.1.3.1. Calcul des coefficients du modèle 121
V.1.3.2. Analyse statistique de l'équation de régression 121
V.2. Optimisation de la production du rendement de la fraction AcIM (y3) ... 123
V.3. Tracé des isoréponses et des surfaces de réponses 123
Conclusion Générale 132
Annexes

Liste des tableaux

Tableau I.1: Pourcentage de chitine dans les êtres vivants marins (Tolaimate et al., 2003) 5
Tableau I.2: Variation de la solubilité du chitosane en fonction du DDA à pH = 6 (Thanou et Junginger, 2005) 7

Tableau II.1: Différences entre la physisorption et la chimisorption (Treybal, 1980 ; Chitour, 1981 ; Smith, 1981). 38

Tableau III.1: Paramètres opératoires étudiés ainsi que leurs niveaux 74
Tableau III.2: Matrice des essais du plan factoriel complet 75
Tableau III.3: Matrice des essais au centre du domaine 76

Tableau IV.1: Récupération des biomasses de *Penicillium camembertii* 77
Tableau IV.2: Masses obtenues des différentes fractions 78
Tableau IV.3: Paramètres physico-chimiques des biomasses cultivées sur milieu solide YPGA et à différentes températures 83
Tableau IV.4: Pourcentages des fractions AcIM et AcSM obtenues pour chaque biomasse cultivée à différentes températures 91
Tableau IV.5: Degré de désacétylation de la fraction AcSM extraite de la biomasse cultivée à 28 °C et celui du chitosane commercial 96
Tableau IV.6: Production du chitosane dans les conditions douces de désacétylation de la chitine fongique 98
Tableau IV.7: Les constantes de la cinétique d'adsorption du colorant BM sur la membrane du chitosane fongique 111
Tableau IV.8: Paramètres de Langmuir et de Freundlich dans l'adsorption du colorant BM sur la membrane du chitosane fongique 114

Tableau V.1: Matrice du plan factoriel 2^4 116
Tableau V.2: Matrice des essais au centre du domaine. 117
Tableau V.3: Valeurs des coefficients de l'équation de régression bj 117
Tableau V.4: Valeurs de tj 118
Tableau V.5: Valeurs des coefficients de l'équation de régression bj 119
Tableau V.6: Valeurs de tj 120
Tableau V.7: Valeurs des coefficients de l'équation de régression bj 121
Tableau V.8: Valeurs de tj 122

Liste des figures

Figure I.1: Structure générale de la paroi cellulaire de *Candida albicans* (Netea et al., 2008)..... 13
Figure I.2: Structure chimique de la chitine (Olteanu et Enescu, 2007)..... 15
Figure I.3: Structure chimique du chitosane (Olteanu et Enescu, 2007). 16
Figure I.4: Liaisons β-(1-3) et β-(1-6) d'un polysaccharide β-glucane des levures (Volman et al., 2008) 17
Figure I.5: Structure de l'appareil sporifère du *Penicillium camembertii* (Cerning et al., 1987)..... 20

Figure II.1: Classification des isothermes d'adsorption (Gilles et al., 1974) 40
Figure II.2: Les isothermes d'adsorption selon l'I.U.P.A.C (Richou, 2007)..... 42

Figure III.1: Schéma de préparation de la biomasse de la souche *P. camembertii* dans les différents modes de culture..... 62
Figure III.2: Schéma du procédé adopté pour l'extraction de la chitine et du chitosane libre (Synowiecki et Al-Khateeb, 1997)..... 63
Figure III.3: Structure chimique du colorant bleu de méthylène..... 69

Figure IV.1: Spectre FTIR des fractions AcIM des BIO 1, BIO 2, BIO 3 et de la chitine commerciale 79
Figure IV.2: (a), (b) et (c) Mycélium condensé de la souche *Penicillium Camembertii* sur milieu YPGA après 6 jours d'incubation et à différentes températures : 20 ; 25 et 28 °C, respectivement. (d) : Observation au microscope optique (grossissement X40) de mycélium en croissance à 25°C 81
Figure IV.3: Effet de la température sur la concentration de la biomasse de *Penicillium camembertii* produite par la culture sur milieu solide YPGA pendant 6 jours..... 82
Figure IV.4: (a), (b) et (c) Spectres ATR de la biomasse cultivée sur un milieu YPGA pendant 6 jours à températures 20 ; 25 et 28 °C, respectivement 86
Figure IV.5: (a), (b) et (c) Micrographies MEB de la biomasse cultivée sur un milieu YPGA pendant 6 jours à températures 20 ; 25 et 28 °C, respectivement 87
Figure IV.6: Les masses des fractions AIM obtenues à partir des biomasses cultivées sur milieu YPGA à différentes températures 88
Figure IV. 7: (a), (b) et (c) Micrographies MEB des fractions AIM développées sur milieu YPGA pendant 6 jours à températures 20 ; 25 et 28 °C, respectivement..... 89
Figure IV. 8: (a), (b) et (c) Spectres ATR de la fraction AcIM développée sur milieu YPGA pendant 6 jours, températures 20 ; 25 et 28 °C, respectivement. (d) Spectre ATR de la chitine commerciale 93
Figure IV.9: (a), (b) et (c) Micrographies MEB de la fraction AcIM développée sur milieu YPGA pendant 6 jours, températures 20 ; 25 et 28 °C, respectivement. (d) Micrographies MEB de la chitine commerciale 94
Figure IV.10: (a) Spectres ATR de la fraction AcSM après précipitation, développée sur milieu YPGA pendant 6 jours à 28 °C. (b) Spectres ATR du chitosane commercial 96
Figure IV.11: (a) Micrographies MEB de la fraction AcSM précipitée obtenue à 28 °C sur milieu YPGA pendant 6 jours. (b) Micrographies MEB du chitosane commercial 97
Figure IV.12: Test de solubilité des chitines DA (température d'incubation du mycélium 25°C) 99

Figure IV.13: (a) Spectres FTIR de la chitine obtenue à température d'incubation de 25 °C, désacétylée 2 fois à 35°C pendant 7 jours. (b) Spectres FTIR du chitosane commercial et (c) Spectres FTIR du glucane 100
Figure IV.14: Membranes du chitosanes : (a) chitosane fongique ; (b) chitosane marin. 101
Figure IV.15: Effet du temps de contact adsorbat-adsorbant sur le taux de rétention du colorant BM à différentes concentrations initiales 5 à 100 mg/L (pH 7,61 ; 25 °C et 1g de membrane du chitosane fongique par 100 mL de solution du BM) 102
Figure IV.16: Effet du pH sur le taux d'élimination du colorant BM traité sur la membrane du chitosane fongique (25 °C, 10 mg/L, 1g de membrane par 100 mL de la solution du BM) 103
Figure IV.17: Effet du pH sur le taux d'élimination du colorant BM traité sur la membrane du chitosane marin (25 °C, 10 mg/L, 1g de membrane par 100 mL de la solution du BM) 103
Figure IV.18: Effet de la masse de la membrane du chitosane fongique sur l'adsorption du colorant BM (pH 7,61 ; 25 °C et 10 mg/L de solution du BM)..... 105
Figure IV.19: Effet de la masse de la membrane du chitosane marin (commercial) sur l'adsorption du colorant BM (pH 7,61 ; 25 °C et 10 mg/L de la solution du BM)..... 105
Figure IV. 20: Effet de la température sur le taux d'élimination du colorant BM sur la membrane du chitosane fongique (pH 7,6 ; 25 °C ; 10 mg/L et 1g de la membrane par 100 mL de la solution du BM) 106
Figure IV.21: Modèle cinétique du pseudo premier ordre pour l'adsorption du colorant BM. (a) : Concentration initiale 5 mg/L ; (b) : Concentration initiale 10 mg/L ; (c) : Concentration initiale 20 mg/L ; (d) : Concentration initiale 50 mg/L ; (e) : Concentration initiale 100 mg/L 108
Figure IV.22 : Modèle cinétique du pseudo second ordre pour l'adsorption du colorant BM. (a) : Concentration initiale 5 mg/L ; (b) : Concentration initiale 10 mg/L ; (c) : Concentration initiale 20 mg/L ; (d) : Concentration initiale 50mg/L ; (e) : Concentration initiale 100 mg/L 110
Figure IV.23: Isotherme d'adoption du colorant BM sur la membrane du chitosane fongique 112
Figure IV. 24: Modèle de Langmuir..... 113
Figure IV.25: Modèle linéaire de Freundlich 114

Figure V.1:(a) Surface de réponse ; (b) Courbe isoréponse 125

Symboles et Abréviations

Symboles

µm: Micromètre

b_0: Terme constant de l'équation de régression

$b_{j\,j}$: Effets quadratiques

b_j: Effets linéaires

$b_{u\,j}$: Effets d'interaction

C_0 : Concentration initiale

C_e : Concentration à l'équilibre

Da : Dalton

Ɛ : Erreur expérimentale

k_1 : Constante de vitesse de premier ordre

KDa : Kilo-Dalton

k_F : Constante de Freundlich

k_L: Constante de Langmuir

m_B : Masse du bioadsorbant utilisée

min : Minute

MPa : Mégapascal

Mw: Molecular Weight

n_0: Nombre d'essais répétés au centre

nm: Nanomètre

q_e: Quantité adsorbée

q_{max}: Capacité maximale d'adsorption

S_{bj}: Ecart quadratique moyen.

t : Temps

T: Température

V : Volume de la solution de BM

x_j : Coordonnées des facteurs Z_j

$\hat{y}$: L'estimé (valeur prédite par le modèle) de y

y: Réponse expérimentale

$\bar{y}_0$: Moyenne des essais au centre du domaine

y_i : Valeur de rendement de l'essai i

Z_k : Facteurs contrôlés

Abréviations

AcIM: Alcalin Acid Insoluble Material

AcSM: Alcalin Acid soluble Material

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIM: Alcalin Insoluble Material

ARN : Acide Ribonucléique

ATR : Spectroscopie Infra Rouge

BIO : Biomasse

BM : Bleu de méthylène

DA : Désacétylée

DDA: Degré de Désacétylation

DMAc : Diméthylacétamide

EDTA: Éthylène Diamine Tétra-Acétique.

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

GlcN : D-glucosamine

GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine

MEB : Microscope Electronique à Balayage

MS : Matière Sèche

MSM : Molasses Salt Medium

NTU : Nephelometric Turbidity Unit

O.E: Oligo-éléments

P. camamebertii : Penicillium camembertii

P.F : Plan factoriel

PCP : Pentachlorophénol

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

pH : Potentiel d'hydrogène

P_i : Phosphates inorganiques

PM : Poids Moléculaire

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

rpm : Revolution per minutes

S.A: Source Azotée

SmF: Submerged fermentation

SSF: Solid State Fermentation

YPG : Extrait de levure Peptone Glucose

YPGA : Extrait de levure Peptone Glucose Agar

Introduction Générale

L'utilisation de biomatériaux tend à se développer en raison de leur faible coût de préparation et la possibilité de les produire à partir de sources renouvelables. Les polysaccharides font partie de cette famille, ce sont des matériaux d'une importance sans cesse croissante pour l'industrie. Leurs propriétés exceptionnelles expliquent l'engouement pour ces macromolécules naturelles extraites de différentes origines (marine, végétale ou microbienne). Ces biopolymères, à très bon marché, peuvent participer à l'élaboration de nombreux produits commerciaux à haute valeur ajoutée.

Le chitosane est un polysaccharide, polycationique, chélatant ayant des propriétés filmogènes en raison de la présence de groupes fonctionnels amines et hydroxyles. Il présente également un ensemble de propriétés biologiques, telles que l'activité antimicrobienne, la résistance aux maladies induites chez les plantes et diverses propriétés stimulantes ou inhibitrices à l'égard d'un certain nombre de lignées cellulaires humaines. Grâce à ces propriétés, le chitosane est fortement utilisé dans divers domaines, allant de la médecine, les nano-sciences, le génie chimique, le pharmaceutique, la nutrition, l'agriculture et l'environnement.

Traditionnellement, le chitosane est dérivé de la chitine naturelle. Cette dernière provient généralement des carapaces de crustacés, telles que les crabes et les crevettes. Le chitosane est obtenu par désacétylation chimique de la chitine. Toutefois, les chitosanes obtenus à partir des crustacés souffrent de certains inconvénients, tels que la non disponibilité des déchets de crustacés qui sont limités par les saisons et les emplacements de l'industrie de la pêche. Par conséquent, les approches biologiques pour la synthèse du chitosane ont été explorées.

La présence naturelle de la chitine dans de nombreuses souches de champignons pourrait être considérée comme une bonne source du chitosane. De plus, ces souches fongiques sont largement utilisées dans des procédés biotechnologiques à l'échelle industrielle. Dans cette perspective, la production du chitosane à partir des parois cellulaires des champignons, cultivés sous des conditions contrôlées, offre un grand potentiel d'obtention d'un chitosane homogène.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps à l'extraction des polysaccharides (chitine/chitosane/glucane) à partir du mycélium d'un champignon choisi : *Penicillium camembertii (P. Camembertii)* ainsi qu'à la caractérisation des polysaccharides produits. *Penicillium camembertii* est une moisissure à usage comestible fréquemment utilisée dans la fabrication des fromages à pâte molle et à croûte fleurie tels que: le camembert. Il est à noter que ce champignon a largement montré sa capacité dans la

production de métabolites à hautes valeurs ajoutées, alors que sa biomasse mycélienne n'a pas été sujet d'étude dans l'isolation de polysaccharides. Dans un deuxième temps, nous nous sommes focalisés sur la préparation de membranes à partir de polysaccharides extraits du champignon *P. Camembertii* en vue de les appliquer dans l'élimination du colorant cationique, le bleu de méthylène (BM).

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons subdivisé notre travail en 03 parties:

La première partie est consacrée à l'état de l'art, permettant ainsi de donner un rappel bibliographique portant sur les biopolymères (chitine, chitosane et glucane). Elle décrit leurs structures, leurs sources et leurs caractéristiques. Un aperçu sur le champignon *P. camembertii* accompagné d'une synthèse bibliographique, y sont aussi inclus. Dans cette partie, un accent particulier est porté sur les applications environnementales des biopolymères.

Les aspects expérimentaux de ce travail, à savoir, la description du protocole d'extraction, le matériel ainsi que les différentes techniques de caractérisation utilisées sont présentés dans la deuxième partie.

Il sera traité dans cette partie :

- La culture de *P. camembertii* en milieu YPG :

  1/ L'étude de l'effet du mode de culture (solide et liquide) sur l'isolation de la chitine et du chitosane libre

  2/ L'étude de l'influence de l'addition de l'arginine sur l'isolation de la chitine et du chitosane en milieu liquide

  3/ L'étude de l'influence de la température de croissance du champignon sur la production de la chitine et du chitosane en milieu solide

- L'application des membranes de chitosane fongique dans l'élimination du colorant, le bleu de méthylène (BM) en milieu aqueux. L'effet de 05 paramètres (durée de contact BM-membrane, concentration du colorant BM, pH initial, masse de membrane et température) a été étudié et le calcul du rendement d'élimination du colorant a été effectué par chaque condition opératoire. L'étude a été poursuivie par la détermination du type d'isotherme d'adsorption et de la cinétique de réaction d'adsorption (pseudo-premier ordre et pseudo-second ordre).

- L'amélioration du rendement des bioplymères (chitine et chitosane) par l'optimisation des paramètres de culture de champignon *P. Camembertii*, en utilisant la méthode du plan factoriel complet (PFC).

La troisième partie est destinée à la présentation de tous les résultats obtenus ainsi qu'à leur discussion.

La thèse est finalisée par une conclusion générale suivie de quelques perspectives en vue de valoriser les biopolymères fongiques.

Partie I : Synthèse Bibliographique

I.1. Les sources de la chitine et du chitosane

En 1811, Henri Braconnot a isolé une substance fibreuse d'un certain type de champignon, qu'il a appelée "fongine". 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 nommée chitine. En 1859, Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et il a observé les différentes solubilités de celle-ci. La substance, résultat du traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. Cependant, c'est seulement en 1894 que cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler. La production du chitosane a débuté en 1920, mais sa structure chimique n'a été identifiée que 50 ans plus tard grâce à la cristallographie et la spectroscopie infrarouge (Malette, 1986).

I.1.1. Les sources animales

Les sources de la chitine sont variées, les premiers produits naturels sont d'origine animale. Les arthropodes (crustacés, insectes et arachnides), comptant plus de 10^6 espèces, constituent en particulier une source abondante de ce polymère. La chitine est présente dans les crevettes, les homards, les crabes, les langoustines, les calamars et les insectes (blattes et fourmis) (tableau I.1) (Kurita, 2001 ; Tolaimate et al., 2003). Le pourcentage de la forme α-chitine varie de 7% chez le Barnacle (*Lepas anatifera*) à 36% chez les écrevisses (*Astacus fuviatilis*). Parmi les céphalopodes, l'os de seiche (*Sepia ofcinalis*) contient 20% de β-chitine et le calamar (*Loligo vulgaris*) 40% (Tolaimate et al., 2003). Chez les mollusques bivalves, l'α-chitine forme avec les protéines un complexe distribué dans l'axe et sur le bord de la coquille. La chitine joue un rôle dans les forces mécaniques servant à intégrer les régions flexibles et à coordonner le changement au cours de la formation de coquilles (Weiss et Schonitzer, 2006).

Pour le chitosane, sa source majeure provient de la désacétylation de la chitine extraite des crustacés. Principalement, les crevettes et les crabes représentent les deux sources naturelles les plus abondantes. En raison des inquiétudes sanitaires liées aux maladies animales et la réduction des ressources naturelles, de nouvelles voies alternatives sont apparues telles que les cultures des moisissures (*Aspergillus niger, Mucor rouxii*) (Tayel et al., 2010).

Tableau I.1: Pourcentage de chitine dans les êtres vivants marins (Tolaimate et al., 2003)

Sources de chitine	**Type de chitine**	**Pourcentage de chitine**
Anatife (*Lepas anatifera*)	Chitine α	7
Crabe marbré (*Grapsus marmoratus*)	//	10
Crabe rouge (*Portunus puber*)	//	10
Araignée de mer (*Maia squinado*)	//	16
Homard (*Homarus vulgaris*)	//	17
Petite cigale de mer (*Scyllarus arctus*)	//	25
Langouste (*Palinurus vulgaris*)	//	32
Ecrevisse (*Astacus fluviatilis*)	//	36
Crevette (*Palaemon fabricius*)	//	22
Mante de mer (*Squilla mantis*)	//	24
Seiche (*Sepia officinalis*)	Chitine β	20
Calamar (*Loligo vulgaris*)	//	40

I.1.1.1. Caractéristiques du chitosane d'origine animale

a) Pureté

La pureté du produit est importante pour les applications dans le domaine de la biomédecine, des produits pharmaceutiques ou cosmétiques. Les protéines résiduelles dans le chitosane peuvent provoquer des réactions allergiques telles qu'une hypersensibilité (Aranaz et al., 2009), ce qui limite l'utilisation du chitosane dans le secteur de la biomédecine (Lin et Lin, 2003 ; Percot et al., 2003 ; Van-De-Velde et Kiekens, 2004).

Pour diverses applications, telles que le traitement des eaux usées où le chitosane de pureté inférieure est utilisé, la pureté est un facteur préoccupant, car les cendres ou les protéines restantes ont tendance à bloquer les sites actifs du chitosane, en particulier les groupements amines. En raison du blocage de ces sites, ils ne seront pas disponibles pour être liés. Par conséquent, une plus grande quantité du chitosane est nécessaire pour un traitement efficace.

b) Degré de désacétylation (DDA)

Le degré de désacétylation représente le taux de groupements acétylés par rapport aux groupements non acétylés (Zohuriaan-Mehr, 2005). C'est un paramètre extrêmement important car il influence d'une part, les caractéristiques physique et chimique du chitosane, telles que la solubilité, la flexibilité des chaînes macromoléculaires, la conformation du polymère, et donc la viscosité des solutions et d'autre part, la biodégradation et l'activité immunologique de celui-ci. Diverses méthodes ont été développées afin de déterminer le degré de désacétylation (DDA) : il s'agit de la spectroscopie Infra Rouge (Domszy et Roberts, 1985 ; Brugnerotto et al., 2001), l'analyse élémentaire (Kasaai et al., 1999), RMN du liquide (Yang et Montgomery, 1999) et la RMN du solide (Heux et al., 2000). La méthode la plus utilisée par les chercheurs est celle proposée par Khan et al (2000). Elle se repose sur la spectroscopie infra rouge, ainsi le DDA est déterminé en utilisant la relation suivante :

$$DDA(\%) = \left[100 - 100 \times \left(\frac{A_{co}/A_{OH}}{1{,}33}\right)\right] \qquad (\text{I. 1})$$

A_{co} et A_{OH} représentent l'absorbance du groupement carbonyle de l'amide I et l'absorbance du groupement hydroxyle qui est stable dans la structure de la chitine et du chitosane, et qui n'est pas affecté par l'hydrolyse de la chitine en chitosane.

Le facteur 1,33 représente le rapport (A_{co} / A_{OH}) pour un chitosane entièrement désacétylé.

c) Solubilité

La solubilité du chitosane est couramment évaluée dans l'acide acétique ; toutefois, le volume d'acide nécessaire dépend de la quantité du chitosane à dissoudre et du nombre de protons nécessaires, ce dernier est égal à celui des unités amine NH_2. Cette caractéristique est utile pour déterminer la pureté des produits obtenus (Crini et al., 2009). En général, la solubilité du chitosane dépend non seulement de la valeur moyenne de degré de DA, mais aussi de la distribution des groupements acétylés le long de la chaîne macromoléculaire et également de son poids moléculaire (Rinaudo et Domard, 1989 ; Kubota et Eguchi, 1997). La solubilité du chitosane diminue lorsque la valeur de DDA diminue (tableau I.2). Le chitosane est en effet insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines concentrées ou diluées, ainsi que dans les solvants purs et les acides concentrés en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau (Kurita, 2006).

Tableau I.2: Variation de la solubilité du chitosane en fonction du DDA à pH = 6 (Thanou et Junginger, 2005)

Degré de désacétylation (DDA %)	**Solubilité du chitosane**
>75	Parfaite
=50	Moyenne
< 40	Faible

d) Cristallinité

La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles (Rinaudo, 2006). La cristallinité est, en général, déterminée par des mesures de diffraction de rayons X (Roberts, 1992). En fait, le chitosane est, généralement, une substance semi-cristalline. Il cristallise dans le système orthorhombique. Deux types de produits sont connus: le chitosane I (faible DDA, sous forme de sel) est plus désordonné que le chitosane II (fort DDA, forme amine libre) (Kurita, 2006).

e) Poids moléculaire

Le poids moléculaire d'un agent polymérique coagulant est considéré comme étant une des caractéristiques les plus importantes affectant la fonctionnalité du polymère en question. Parmi les différentes méthodes décrites dans la littérature, la chromatographie par perméation de gel est la plus couramment utilisée pour la détermination du poids moléculaire du chitosane ainsi que de sa polydispersité. Par ailleurs, la viscosimètrie demeure une méthode simple et rapide (Felt et al., 1998).

A l'instar de sa composition, le poids moléculaire du chitosane varie selon la source du produit brut utilisée ainsi que la méthode de préparation. En général, les hautes températures et les conditions drastiques peuvent provoquer la dégradation du chitosane, induisant ainsi la diminution de son poids moléculaire (Felt et al., 1998).

I.1.2. Les sources fongiques

La chitine est largement répandue dans le règne des champignons, notamment dans les zygomycètes, les ascomycètes, les basidiomycètes et les phycomycètes où elle est un composant des parois cellulaires et des membranes structurelles des mycéliums, des tiges et

des spores. La quantité de chitine varie de traces à 40-45% de la fraction organique, le reste étant principalement constitué de protéines, lipides, glucanes et mannanes (tableau I.3) (Wessels et Sietsma, 1981 ; Roberts, 1992). Cependant, les variations dans les quantités de chitine peuvent dépendre des modifications physiologiques de l'environnement naturel ainsi que des conditions de fermentation pendant le traitement biologique des cultures fongiques.

Le chitosane, le dérivé désacétylé de la chitine, est un constituant important de la paroi cellulaire à différents moments du cycle de vie de certaines espèces de champignons (Christodoulidou et al., 1996). Le chitosane n'est pas synthétisé directement mais l'enzyme désacétylase peut agir efficacement pour convertir la chitine en chitosane. La N-désacétylation est une étape courante dans la modification des fragments de sucre, ce qui peut conférer une résistance à l'action du lysozyme (Muzzarelli, 1977). Il est suggéré, par certains auteurs que les chitines désacétylases se trouvent à proximité des régions où la chitine traverse la membrane plasmique (Araki et Ito, 1975; Kafetzopoulos et al., 1993). Lorsque la chitine est synthétisée, l'enzyme désacétylase la convertit en chitosane. Parmi les rares espèces fongiques synthétisant le chitosane, celles appartenant à la classe des *Mucora* se sont avérées générer du chitosane au cours de la phase de croissance végétative (Orlowski, 1991), tandis que *S. cerevisiae* ne produit du chitosane qu'au cours de la sporulation (Christodoulidou et al., 1996).

Tableau I.3 : Différents polymères présents dans la paroi cellulaire des champignons

Groupes taxonomiques	**Polymères de la paroi cellulaire**	
	Soluble en milieu alcalin	**Insoluble en milieu alcalin**
Basidiomycètes	Xylo-manno-protèine (1-3)-α-D-glucane [a]	(1-3)-β/(1-6)-β-D-glucane chitine
Ascomycètes	(Galacto)-manno-protèine (1-3)-α-D-glucane [a]	(1-3)-β/(1-6)-β-D-glucane Chitine
Zygomycètes	Glucuronomanno-protèine Polyphosphate	Acide polyglucuronique Chitosane chitine
Chytridiomycètes	Glucane [b]	Glucane[b],chitine
Hyphochytridiomycètes	Non déterminé	Chitine, cellulose
Oomycètes	(1-3)-β/(1-6)-β-D-glucane	(1-3)-β/(1-6)-β-D-glucane Cellulose

[a] : Dans un certain nombre de cas, la fraction soluble dans les traitements alcalins contient également une partie du (1-3)-β/(1-6)-β-D-glucane.

[b] : Incomplètement caractérisé ; probablement (1-3)-β/(1-6)–β-lié.

I.1.2.1. Zygomycètes

La paroi cellulaire de la classe des zygomycètes est principalement composée de 20 à 50% de chitine et du chitosane alors que les polymères d'acide glucuronique sont présents à des concentrations plus faibles. Dans cette classe de champignons, le glucose ne se trouve que dans les spores (Ruiz-Herrera, 1992). Les phosphates, considérés comme des contaminants majeurs, sont également présents dans les parois cellulaires de ces champignons. Dans la paroi cellulaire des zygomycètes, le chitosane peut interagir avec d'autres polysaccharides et phosphates pour former un complexe, de sorte que, les traitements acides courants ne soient pas capables de rompre et d'extraire complètement le chitosane de la paroi cellulaire. Dans ce cas, une quantité considérable du chitosane reste dans le matériau insoluble en traitements alcalin et acide.

a) *Rhizopus*

Nadarajah et al (2001) ont étudié l'extraction du chitosane à partir des différentes souches de Zygomycètes, telles que *Rhizopus oryzae*. *KN01*et *Rhizopus oryzae KN02*. Ils ont démontré que la plus grande quantité du chitosane peut être obtenue pendant la phase de croissance exponentielle. Le chitosane produit par *R. oryzae* présentait une activité antibactérienne plus élevée comparé au chitosane des coques de crabe.

b) *Mucor*

Parmi les zygomycètes, les Mucorales sont les seuls à contenir à la fois de la chitine et du chitosane dans leurs parois cellulaires. Les chitosanes isolés à partir des Mucorales présentent généralement un poids moléculaire compris entre 4 $x10^5$ et 1,2 $x10^6$ daltons.

Mucor rouxii est un champignon largement étudié pour la production du chitosane. Ses rendements en chitosane varient de 6 à 25% de la masse cellulaire sèche (White et al., 1979 ; Nadarajah et al., 2001). Synoweicki et AI-Khateeb (1997) ont étudié l'influence du temps de croissance de *M. rouxii* sur le rendement en chitosane. Ces auteurs ont démontré que la quantité du chitosane extractible atteignait un rendement maximal de 7,3% de mycélium sec après 48 heures d'incubation et que le rendement n'était pas influencé par une croissance prolongée pouvant aller jusqu'à 5 jours.

c) *Rhizomucor*

Appartenant aux Zygomycètes, *Rhizomucor pusillus CCUG 11292* a été cultivé pour l'extraction du chitosane par l'acide sulfurique dilué (Zamani et al., 2007). Le champignon a

été cultivé dans les eaux usées riches en xylose d'une usine d'éthanol industriel. Le rendement était de 45,3% de matière insoluble dans le traitement alcalin.

d) *Absidia*

Jaworska et Konieczna (2001) ont étudié l'influence des ions ferreux, des ions manganèse, des ions cobalt, de la trypsine et de la chitine en tant que suppléments individuels du milieu nutritif sur l'activité de la chitine synthase et de la chitine désacétylase pour former le chitosane dans le champignon *Absidia orchidis*. Ils ont réussi à démontrer que le manganèse et le fer donnaient des résultats plus significatifs avec une augmentation de la production du chitosane en augmentant la production de biomasse plutôt qu'en augmentant le contenu en chitosane dans les parois cellulaires. Rane et Hoover (1993) ont étudié l'effet des milieux sur la production du chitosane à partir d'*Absidia coerulea.* Les rendements les plus élevés en chitosane ont été obtenus avec des cultures riches en minéraux par rapport aux cultures développées dans des milieux minimums. Hu et al (1999) ont démontré que du chitosane pur avec un rendement élevé (490,4 ± 6,6 mg du chitosane/g de AIM) est produit à partir d'*Absidia glauca* cultivé dans des conditions de culture submergées. Rane et Hoover (1993) ont également démontré que le pH du milieu de culture influe sur le rendement et le degré de N-acétylation du chitosane d'*Absidia coerulea*, probablement en raison du pH optimal (4,5) de la chitine désacétylase, enzyme responsable de la conversion de la chitine en chitosane.

e) *Gongronella butleri*

Nwe et Stevens (2002) ont développé une méthode améliorée d'extraction du chitosane en utilisant la culture à l'état solide de *Gongronella butleri (USDB 0201)* pendant 6 jours, suivi de l'extraction du chitosane. Le chitosane de *Gongronella butleri* est extrait à l'aide de NaOH 11 M à 45 °C, solubilisé dans l'acide acétique 0,35 M à 95 °C puis clarifié en utilisant une enzyme α-amylase thermostable. Des rendements en chitosane de 4 à 6% de mycélium sec et un poids moléculaire moyen de 44-54 kDa ont été obtenus. Nwe et Stevens (2004) ont étudié l'influence de l'urée comme source d'azote afin d'optimiser la production du chitosane. Ils ont obtenu un rendement en chitosane de 11% de la masse cellulaire sèche.

I.1.2.2. Ascomycètes

La présence naturelle de la chitine dans ces souches fongiques pourrait être considérée comme une source alternative du chitosane peu coûteuse en plus de la source industrielle

traditionnelle de déchets des crustacés. Ces souches fongiques sont largement utilisées dans divers procédés biotechnologiques à une échelle industrielle. Ainsi, les déchets de mycélium de différentes souches fongiques résultant de divers processus de fermentation peuvent être utilisés pour l'extraction du chitosane.

a) *Aspergillus*

Les souches *d'Aspergillus niger* (*A. niger)* sont largement utilisées pour la production d'acide citrique et d'autres produits biotechnologiques et pharmaceutiques (Dhillon et al., 2010 ; Dhillon et al., 2011). La production mondiale annuelle d'acide citrique est estimée à 1,7 million de tonnes, ce qui donnera 0,34 million de tonnes de déchets de mycélium d'*A. Niger* (Kucera, 2004). Le résidu de la paroi cellulaire insoluble dans les traitements alcalins de la biomasse d'*A. niger* est principalement constitué du chitosane, de la chitine et de β-glucanes, avec une prévalence significative de (1-3)-β-D-glucane. Maghsoodi et al (2008) ont étudié l'effet des différentes sources d'azote sur la quantité du chitosane produite par *A. niger (PTCC 5012)*. Les auteurs ont utilisé des substrats de déchets naturels, tels que des graines de soja, des graines de maïs et du canola comme substrats pour la culture d'*A. Niger*. Ils ont obtenu la plus grande quantité du chitosane (17,05 ± 0,95 g/kg des déchets) à partir de résidus de soja ayant une teneur en azote de 8,4 ± 0,26% après une période d'incubation de 12 jours. Cependant, les résidus de semences de maïs, ayant une teneur en azote de 1,9 ± 0,4%, ont entraîné des rendements beaucoup plus faibles en chitosane.

b) *Penicillium*

Penicillium chrysogenum (*P. chrysogenum)* est utilisé pour la production à grande échelle d'antibiotiques. En tant que sous-produit de l'industrie des antibiotiques, une grande quantité de mycéliums de *P. chrysogenum* est éliminée par incinération. Seul un faible pourcentage est utilisé en tant qu'additif pour l'alimentation du bétail et en tant qu'engrais. L'utilisation de cette biomasse pour produire du chitosane présente, non seulement, un avantage commercial, mais également un avantage écologique.

Tianqi et al (2007) ont mis au point une méthode d'extraction intégrative du chitosane, de l'ergostérol et du (1-3)-α-D-glucane à partir de mycélium du *P. chrysogenum* fourni par une société pharmaceutique. Un rendement en chitosane de 5,7% a été atteint avec un DDA de 86%. Ebrahimzadeh et al (2013) ont utilisé des *Penicillium spp* pour produire du chitosane, le rendement obtenu varie entre 20 et 30%. La viscosité et le DDA du chitosane étaient dans la gamme de 8,9 à 11,3 cP et 47 à 65%, respectivement. Ces travaux ont montré que les

mycéliums issus des industries biotechnologique et pharmaceutique, tels que les déchets du *Penicillium* provenant de la production d'antibiotiques sont des sources prometteuses de chitosane fongique.

I.1.2.3. Basidiomycètes

Kannan et al (2010) ont utilisé trois champignons appartenant à la famille des basidiomycètes, notamment *Agaricus sp, Pleurotus sp* et *Ganoderma sp* pour la production du chitosane par fermentation à l'état solide en utilisant différentes compositions en substrat solide. Les auteurs ont montré que la durée d'incubation, la température et la concentration de la base et d'acide affectaient de manière significative la production et les propriétés physico-chimiques du chitosane lors de l'extraction de ce dernier par des traitements alcalins et acides. Dans la littérature, les plus hauts rendements en chitosane fongique ont été obtenus principalement pendant la phase de croissance exponentielle, ce qui démontre que le chitosane formé par la chitine désacétylase est prédominé à ce stade. Il est constaté que pendant la phase de croissance, la chitine présente une structure moins cristalline (Davis et Bartinicki-Garcia, 1984). Les champignons comestibles, tels que le champignon blanc et *Agaricus bisporus* sont produits et consommés à grande échelle. La quantité de déchets qui reste après l'élimination de la partie comestible se compose principalement de tiges et de carpophores de dimensions et de formes irrégulières, elle représente 5 à 20% du volume de production totale. Aux États-Unis, la production de champignons donne près de 50000 tonnes métriques de déchets de champignons par an sans application commerciale appropriée (Wu et al., 2005). Compte tenu de l'énorme quantité de déchets de champignons comestibles d'importance commerciale, tels que *Agaricus bisporus, Lentinus edodes, Pleurotus sajor-caju* et *Volvariella volvacea*, il est nécessaire d'en rechercher les applications potentielles.

I.2. Les polysaccharides fongiques

La paroi fongique est constituée essentiellement de polysaccharides (80 à 90%) tels que la chitine, le chitosane, les glucanes (organisés en microfibrilles), de proteines et de mannanes (Bartnicki-García, 1968 ; Buckeridge, 2010).Tous ces composants sont associés entre eux pour donner lieu à une structure rigide, décrite dans la figure I.1.

Suivant leurs fonctions, les polysaccharides fongiques peuvent être classés en deux catégories:

- Les polymères dits structurels ou polysaccharides fibrillaires : situés à proximité de la membrane plasmique (couche interne de la paroi cellulaire) pour être en mesure d'accomplir leur fonction mécanique, ils sont donc responsables de la rigidité de la paroi cellulaire (Lipke et Ovalle, 1998 ; De Groot et al., 2005). La chitine forme une barrière physique entre le corps de l'organisme et son environnement. Elle participe à sa protection contre les radiations, la chaleur et les agressions chimiques et physiques (Roer et Dillaman, 1984).
- Les polymères de matrice ou polysaccharides amorphes (les glucanes) : de type gel matriciel (matrice extracellulaire), ils agissent comme des interconnexions entre les molécules de la couche interne (chitine) et la couche externe (les glycoprotéines). Ils sont présents dans la paroi cellulaire entière (Wessels et Sietsma, 1981 ; Wessels, 1994).

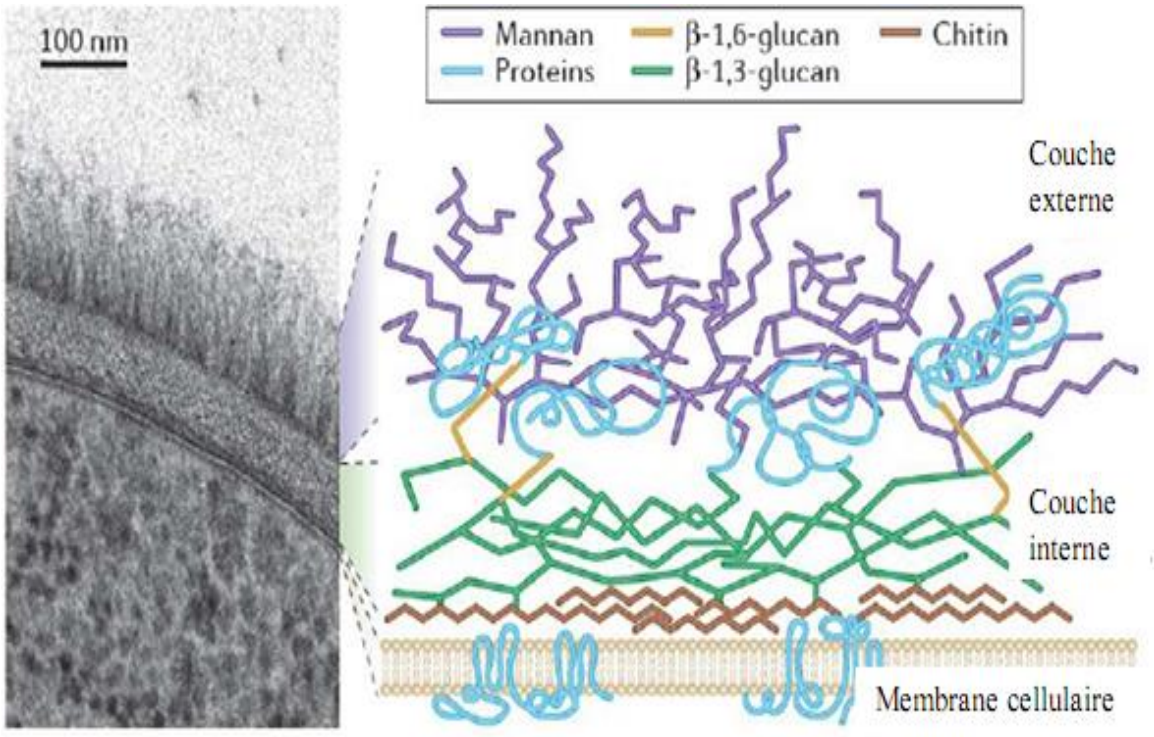


Figure I.1: Structure générale de la paroi cellulaire de *Candida albicans* (Netea et al., 2008)

I.2.1. Chitine : Définition, structure et caractéristiques

La chitine est le biopolymère le plus abondant dans la nature après la cellulose (Vincent et Wegst, 2004). C'est un polysaccharide, plus précisément, un aminoglucopyranane relié par des liaisons covalentes β (1-4) (figure I.2) (Berezina, 2016).

La présence des groupements acétamide confère à la chitine des fonctions biologiques telles que la biodégradabilité et la biocompatibilité, ce qui fait de ce biopolymère un matériau fonctionnel de grande importance (Muzzarelli, 1977). Entre 20-400 chaînes du polysaccharide s'associent par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes pour créer la forme structurale du polysaccharide et donner naissances à des microfibrilles qui confèrent le rôle squelettique de la chitine (Ruiz-Herrera et San-Blas, 2003). La chitine possède également une grande stabilité structurale due à la présence de fortes liaisons hydrogène intra- et inter-moléculaires.

La chitine se présente sous trois formes cristallines : α, β et γ (tableau I.4). Ces formes diffèrent par l'arrangement de la chaîne polysaccharidique et la disposition des liaisons hydrogène (Peesan et al., 2003; Rudall et Kenchington, 1973).

L'α-chitine est la forme la plus stable et la plus abondante présente chez les champignons (Noishiki et al., 2005). Elle est caractérisée par des chaînes antiparallèles constituant une structure cristalline régulière. Les liaisons hydrogène intermoléculaires attribuent au polymère une grande stabilité vis-à-vis des solvants et des solutions aqueuses. Cependant, l'utilisation de solvants spécifiques tels que le N, N-diméthylacétamide (DMAc), contenant de 5-10% de LiCl et des solutions à base de fluorine hexafluoroacétone et hexafluoro-2-propanol, favorise la solubilisation de l'α-chitine. Cette solubilité dépend également de la source du polymère (Austin, 1984).

Concernant la β-chitine, les macromolécules sont organisées sous un arrangement parallèle conduisant à des liaisons intermoléculaires de faible énergie. Dans ce cas, les groupements N-acétyl jouent le rôle d'espaceurs facilitant ainsi l'accès aux molécules d'eau à des fins d'hydratation et de formation de gel (Thomas et al., 2013). En opposition avec l'α-chitine, la β-chitine a une grande affinité pour les solvants organiques et l'eau (Sannan et al., 1976). Elle se trouve essentiellement dans les épines des diatomées et l'endosquelette de seiche (Noishiki et al., 2005).

La γ-chitine a été identifiée dans les cocons des insectes (Atkins, 1985). Elle est principalement composée de deux couches parallèles et une antiparallèle. Sa force et sa résistance sont plus proches du type β. Les groupements N-acétyl jouent le même rôle dans ces deux arrangements (Rudall, 1969 ; Kenchington, 1976).

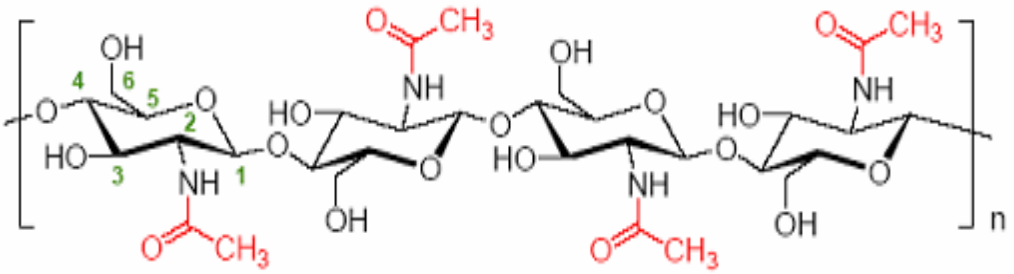


Figure I.2: Structure chimique de la chitine (Olteanu et Enescu, 2007)

Tableau I.4 : Arrangement des chaînes dans les trois formes de chitine (Crini, 2009)

Forme	Arrangement des chaines	Schématisation
Chaine-α	Antiparallèle	↓↑↓↑↓↑
Chaine-β	Parallèle	↑↑↑↑↑↑
Chaine-γ	Deux parallèles pour une antiparallèle	↑↑↓↑↑↓

I.2.2. Chitosane : Définition, structure et caractéristiques

Le chitosane est un copolymère linéaire constitué d'unités D-glucosamine (GlcN) et N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées par une liaison β-(1-4) (figure I.3). Le terme «chitosane» est habituellement limité à toute chitine suffisamment N-désacétylée pour être soluble en milieu acide dilué. Pour parler du chitosane, il faut que la chitine soit désacétylée plus de 50% (Rinaudo, 2007 ; Rinaudo, 2008).

Le chitosane possède trois types de groupement fonctionnels réactifs, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C_2, C_3 et C_6, respectivement. Grâce à ses groupements amine libres, ce composé possède des propriétés intéressantes très différentes de celles de la chitine. Le chitosane est soluble dans les acides faibles, il possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement (Rinaudo, 2006).

Le chitosane issu des champignons a un degré de désacétylation de 60 à 90% et un poids moléculaire moyen de 1 à 2.10^5 Da. Ces paramètres dépendent fortement de l'espèce fongique utilisée et des conditions de traitement appliquées au cours du processus d'extraction du chitosane (Ivshina et al., 2009).

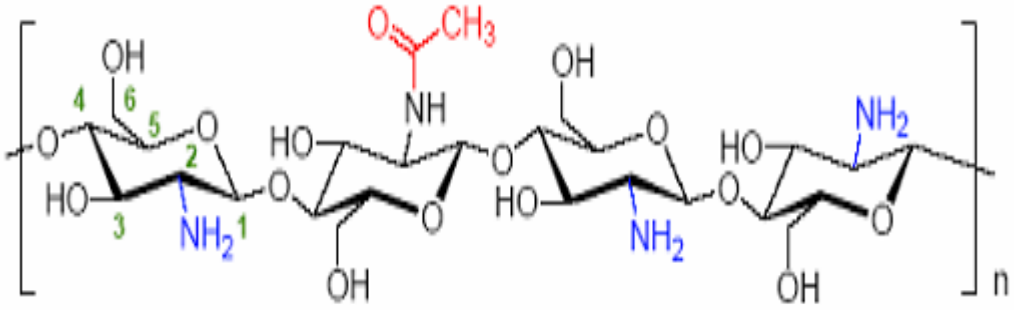


Figure I.3: Structure chimique du chitosane (Olteanu et Enescu, 2007).

I.2.3. Glucanes : Définition, structure et caractéristiques

Le glucane est un polysaccharide d'importance majeure dans la structure pariétale. Ce polymère est constitué exclusivement de monomères de D-glucose. Selon leur structure, les glucanes peuvent être divisés en deux grands groupes: les α-glucanes et les β-glucanes. Les deux sont présents dans un grand nombre de champignons à quelques exceptions près de certaines espèces de *Basidiomycota*, par exemple *Armillaria mellea* (Hernández et al., 1993) et les *Zygomycota.* Presque toutes les études sur ces polysaccharides ont été réalisées avec des champignons *Ascomycota,* le pourcentage des glucanes présents dans la paroi de ces derniers est le plus signifiant (Bowman et Free, 2006).

La plupart des α-glucanes sont constitués d'unités glucosyle reliées par des liaisons α-(1-3) ou α-(1-4). Les α-(1-3)-glucanes, liés à la paroi cellulaire, sont des homopolymères linéaires insolubles dans l'eau, mais soluble dans les solutions alcalines froides (Sanchez-Hernandez et al., 1993). Les β-glucanes sont principalement constitués d'unités glucosyle liées par des liaisons β-(1-3) et/ou β-(1-6). Les β-(1-3)-glucanes sont les polysaccharides les plus abondants présents dans les parois cellulaires des champignons, ces β-(1-3)-glucanes sont faiblement cristallins (figure I.4). Les β-glucanes sont liées à la chitine par des liaisons covalentes en passant par des acides aminés, ce lien explique l'insolubilité d'une partie des glucanes sous les conditions alcalines (Sietsma et al., 1977 ; Ruiz-Herrera, 2012).

I.2.3.1. β-(1-3)-glucanes

Les β-(1-3)-glucanes sont composés de longs polymères linéaires de β-(1-3)-glucose avec quelques branchements en β-(1-6) (Legentil et al., 2015). Les chaines de β-(1-3)-glucanes sont constituées d'environ 1500 unités de glucose, avec une structure microfibrillaire qui peut participer à la rigidité des parois cellulaires. Les β-(1-3)-glucanes peuvent être liés

covalemment à d'autres composés des parois : ses régions non réductrices se lient aux extrémités réductrices de chaînes de chitine via des liaisons β-(1-4), β-(1-6) et β-(1-3)-glucanes (Lesage et Bussey, 2006). Chez les levures, les parois cellulaires de *C. albicans* et *S. cerevisiae* contiennent, respectivement, 30-39% et 30-45% de β-(1-3)-glucanes (Aguilar-Uscanga et François, 2003 ; Ruiz-Herrera et al., 2006). Chez les oomycètes, des études détaillées chez le genre *Phytophthora* ont permis de déterminer la teneur et la structure des β-(1-3)-glucanes, appelés aussi glucanes non cellulosiques. En effet, le mycélium de *Phytophthora cinnamomi* contient 66% de β-(1-3)-glucanes (Bartnicki-Garcia, 1966). Chez l'espèce *Phytophthora palmivora*, les parois cellulaires des kystes et des sporanges contiennent respectivement 48% et 54% de glucanes dont 6-8% sont des unités de glucoses avec des liaisons β-(1-3).

I.2.3.2. β-(1-6)-glucanes

Les β-(1-6)-glucanes sont formés d'environ 350 monomères de glucose. Les chaînes de β-(1-6)-glucose sont de nature amorphe et pourraient agir comme une «colle» en formant des liaisons covalentes avec des β-(1-3)-glucanes, de la chitine et des mannoprotéines des parois cellulaires (Kollar et al., 1997). Les β-(1-6)-glucanes représentent des teneurs variables dans la paroi cellulaire des champignons (Ruiz-Herrera et al., 2006). Les β-(1-6)-glucanes ont été largement rapportés parmi les champignons filamenteux, incluant les Hemi-ascomycètes, *archaea* (Archéobactéries), Euascomycètes (vrais ascomycètes) et Basidiomycètes (Vink et al., 2004).

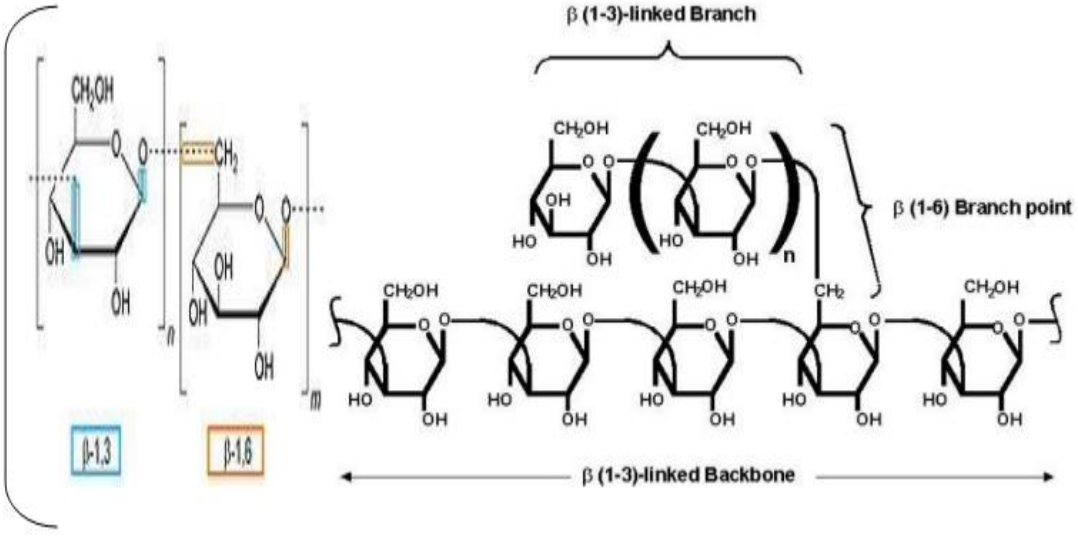


Figure I.4: Liaisons β-(1-3) et β-(1-6) d'un polysaccharide β-glucane des levures (Volman et al., 2008)

I.3. Présentation de l'espèce fongique « *Penicillium camembertii* »

Les moisissures sont des champignons inférieurs, microscopiques, hétérotrophes, filamenteux et immobiles dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique et comportant environ 1850 genres et 15000 espèces (Botton et al., 1990), essentiellement aérobies. Certaines sont des saprophytes se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition, d'autres vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres enfin sont des parasites des animaux et des végétaux (Bourgeois, 1996 ; Bouix et Leveau, 1993). Les moisissures possèdent un appareil végétatif constitué par des hyphes plus ou moins enchevêtrés provenant des spores et constituant un thalle filamenteux appelé mycélium. Les moisissures ont marqué leurs intenses utilisations dans divers domaines industriels : la transformation des stéroïdes (Chabasse et al., 2002), la production d'antibiotiques ainsi que la production d'enzymes ou d'acides organiques (Sicard, 1982).

Les spores, du genre *Penicillium,* sont dispersées dans l'atmosphère avec le moindre courant d'air. Elles ne germent pas dans l'eau pure mais peuvent le faire rapidement en présence de traces de nourriture ou sur les fruits. Le nom *Penicillium* signifie en latin « pinceau » et fait référence à l'apparence du conidiophore (l'organe qui porte les spores) du champignon (figure I.5) (Pitt, 1979).

Penicillium camembertii (*P. camembertii)* est une moisissure filamenteuse blanche pouvant être responsable de l'apparence caractéristique des fromages à pâte molle, tels que le Camembert, le Brie et les flaveurs associées à ces types de fromages affinés (Lenoir, 1970 ; Desmazeaud et al., 1976 ; Karahadian et al., 1985 ; Molimard et Spinnler, 1996).

I.3.1. Taxonomie

P. camembertii est une moisissure anamorphe (reproductrice asexuée) qui forme un mycélium blanc duveteux (Samson et al., 2004). Sa classification est basée sur des caractères purement morphologiques comme : la structure, les modes de reproduction ainsi que les caractéristiques des spores (Davet, 1996). Selon les travaux de Webster et Weber (2007), *P. camembertii* est classé comme suit:

- Règne : Fungi
- Division : *Ascomycota*
- Classe : Eurotiomycètes
- Ordre : Eurotiales

- Famille : Trichocomaceae
- Genre : *Penicillium Link* (1809)
- Espèce : *Penicillium camembertii*

Penicillium camembertii peut être nommé de plusieurs façons et ce en raison d'anciennes appellations. En 1809, après avoir identifié le genre *Penicillium,* le chercheur Link le divisa en trois espèces et donna le nom de *Penicillium candidum* à toutes les variantes blanches (Moreau, 1979). Ce nom est encore fréquemment utilisé dans l'industrie fromagère (Bockelman, 2010). En 1905, Mazé nomme *Penicillium album* la moisissure du Camembert, pourtant ce nom avait préalablement été donné à d'autres moisissures. Des fromagers français emploient encore le nom de *Penicillium album* pour le ferment d'affinage du Camembert même si celui-ci n'a jamais été scientifiquement approuvé (Moreau, 1979). En 1977, Samson et ses collaborateurs, ont proposé de réunir deux types de moisissures utilisées pour la fabrication du Camembert sous le nom de *P. camemberti* : *P. caseicolum* Bainer, formant des thalles blancs et *P. camemberti* Thom, formant des thalles blancs devenant légèrement gris. Ces espèces étaient auparavant jugées différentes sur des bases morphologiques et physiologiques peu spécifiques (Samson et al., 1977).

I.3.2. Caractères morphologiques

Les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceaux. Le thalle, composé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, ramifiés ou simples qui se termine par un pénicille. Les conidiophores peuvent être agrégés en corémies individualisés ou groupés en faisceaux, comme ils peuvent être isolés (figure I.5) (Ripert, 2013). Selon Pitt (1979), l'espèce *P. camembertii* possède les caractères morphologiques suivants:

• Sur milieu de Czapek gélosé, thalles croissant lentement, atteignant un diamètre de 2-3,5 cm en 2 semaines à 25 °C, constitués de mycélium aérien floconneux pouvant avoir jusqu'à 1 cm de hauteur, d'abord blanc, demeurant de cette couleur ou devenant jaunâtre, crème (rarement) ou gris-verdâtre, cette dernière coloration apparait généralement assez tardivement au cours du développement du thalle.

• Pénicilles grands et irréguliers: biverticillés, triverticillés ou quadriverticillés.

• Conidiophores finement granuleux ou rarement lisses portés par des hyphes aériens.

• Conidies lisses disposées en chaînes enchevêtrées sub-globuleuses ou globuleuses de taille variable.

- Paroi des stipes lisse ou rugueuse.
- Appareil sporifère triverticillé.
- Phialides ampouliformes, avec un col long et large (Cerning et al., 1987).

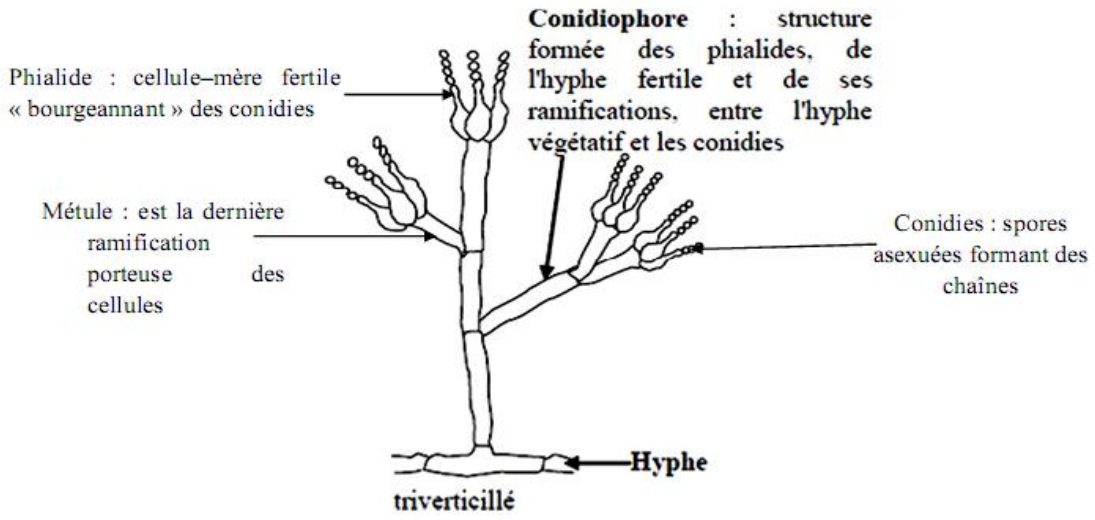


Figure I.5: Structure de l'appareil sporifère du *Penicillium camembertii* (Cerning et al., 1987)

I.3.3. Structure et composition de la paroi cellulaire du Penicillium camembertii

La paroi fongique est une enveloppe fibreuse qui représente environ 30% du poids sec total de la cellule (Valentin et al., 1987), elle assure la protection des moisissures vis-à-vis des agressions du milieu extérieur, telles que la pression osmotique, la variation du pH, la température ou les chocs mécaniques (Klis et al., 2009).

La paroi cellulaire est constituée d'une structure squelettique interne formée par un réseau tridimensionnel de β-(1-3)-glucanes qui entoure la cellule entière. Des mannoprotéines sont retrouvées à l'extérieur de cette structure squelettique. La structure squelettique est aussi renforcée par une quantité de chitine liée covalemment aux β-(1-3)-glucanes.

Les lipides constituent une composante mineure de la paroi cellulaire, allant de 1 à 10%. La présence des stérols, des esters de stérol, des triglycérides, des acides gras libres et des phospholipides est également décrite dans la littérature, Il est possible que ces éléments jouent un rôle dans la protection de la paroi contre le dessèchement (Ruiz-Herrera, 1992). La souche *P. camembertii* contient 25,2% de lipide (Bizet et al., 1997), en accord avec Fanni (1977) qui a rapporté une quantité de 23,5% pour la même souche se développant sur le fromage. Cochrane (1958) a montré une variabilité élevée de la teneur en lipides, de 1,4 à 34,5% en matière sèche pour *P. chrysogenum* et *P. griseofulvum*, respectivement.

Les protéines représentent 2 à 30% du poids sec de la paroi d'un champignon. Les plus fréquemment retrouvées sont des glycoprotéines (Bowman et Free, 2006). L'espèce *P. camembertii* contient 33,3% de glucides totaux (Bizet et al., 1997). Cavazzoni et Adami (1992) estiment la teneur en glucides dans les champignons est comprise entre 30 et 61,2%. En ce qui concerne les cendres, *P. camembertii* contient 4,5% (Bizet et al., 1997). Les minéraux représentent 3,4% de poids sec (Bizet et al., 1997).

Il faut signaler que la composition de la paroi fongique peut être modifiée selon la phase du cycle cellulaire, les conditions du milieu ainsi que le stade de développement du champignon (De Groot et al., 2005). Le taux de chaque composant dépend des conditions de croissance, de la nature de la source des éléments nutritifs, du pH, de la température et du mode de culture des cellules (milieu solide ou liquide) (Grisaro et al., 1968 ; Aguilar-Uscanga et Francois, 2003 ; Ruiz-Herrera, 2012).

I.3.4. Caractères physiologiques

a) Vitesse de croissance

La croissance de *P. camembertii* commence par la germination des spores. Cette étape survient lorsque des conditions favorables sont présentes (Roca et al., 2005). Comparé à d'autres espèces, *P. camembertii* a une faible vitesse de croissance, il forme des colonies de 25 à 35 mm de diamètre sur l'extrait de malt-gélose en deux semaines à 25 °C (Choisy et al., 1984). Généralement, les *Penicillium* ont une croissance plus importante et surtout plus rapide en début de culture. Le temps nécessaire à l'apparition d'une teinte verte pâle, due à la sporulation, est très variable, de 4 à 14 jours à 22 °C pour les variétés blanches ; mais il peut être beaucoup plus court si on se réfère à Rapper et Thom (1949). Ces auteurs ont constaté que l'épaisseur du mycélium se situe entre 2 et 3 mm ou entre 5 et 7 mm après le quatrième jour de croissance (Rapper et Thom, 1949).

b) Température

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne de *P. camembertii*, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Tiwari et al., 2007).

La plupart des moisissures sont mésophiles, se développent entre 15 et 30 °C avec une croissance optimale aux environs de 25-30 °C (Botton et al., 1990 ; Julien, 2002). Chez certaines espèces (psychrophiles ou psychrotolérantes), les spores survivent à de très basses

températures (jusqu'à -190 °C) et resteront aptes à germer lors du retour à des conditions normales (Sun et al., 2008). D'autres espèces sont thermophiles et peuvent croître dans de hautes températures (au-dessus de 50 °C) avec une croissance optimale aux environs de 20 à 25 °C (Botton et al., 1990). *P. camembertii* a une croissance optimale à une température qui se situe entre 20 et 25 °C. Il peut croître lentement à 4 °C mais pas à 37°C (Jakobsen et al., 2002). Ces données concordent avec les températures de la production de Camembert.

c) Humidité

Les moisissures ont, en général, un besoin faible en eau par rapport aux autres microorganismes. Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures, non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais également sur la germination des spores (Bourgeois, 1996).

Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation ; leur développement s'arrête lorsque le potentiel hydrique descend au-dessous de -4 MPa, tandis que les moisissures à mycélium cloisonné sont les plus résistantes, elles peuvent supporter jusqu'à10 MPa environ. Cependant, les *Penicillium* peuvent, en général, se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de -20 MPa (Davet, 1996).

La souche *P.camembertii* affectionne principalement les milieux humides où l'activité de l'eau est élevée (aw).

d) Oxygène (aération)

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important pour le développement (Nathalie et al., 1993). *P. camembertii* est une moisissure strictement aérobie (Pitt, 1979) ; les souches les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte (Bourgeois, 1996 ; Botton et al., 1990). Généralement, c'est l'oxygène dissous dans le milieu qui influe sur le développement plus que l'oxygène atmosphérique, d'où l'intérêt d'une agitation vigoureuse (150 à 200 rpm) pour avoir une aération adéquate et suffisante pour un bon développement de la moisissure (Pitt, 1979).

e) pH

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4,5-8,0 (Botton et al., 1990), mais ils peuvent croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acides.

Le pH influe sur la croissance des moisissures, soit directement par action sur la membrane cellulaire, soit indirectement en agissant sur la disponibilité des éléments nutritifs (à pH acide, le fer reste sous forme d'ions ferreux assimilables). La plupart des moisissures n'ont que peu d'exigence concernant le pH car elles savent l'ajuster rapidement à leur convenance (Nigam et Singh, 1995) ; elles modifient souvent le pH du milieu par absorption sélective, échange d'ions, production de CO_2 ou de NH_3 ou par production d'acides organiques (Boiron, 1996).
P. camembertii marque une croissance optimale dans une gamme de pH comprise entre 4,0 et 6,0. Les variations de 3,0 et 8,0 ont peu d'influence sur le développement des souches commerciales (Pandey et al., 2000).

f) Lumière

Généralement, les radiations du spectre visible (380 -720 nm) n'ont pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (Botton et al., 1990).

I.3.5. Les exigences nutritionnelles

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. La panoplie enzymatique extrêmement riche qu'elles possèdent leur confère l'aptitude d'utiliser les substrats les plus complexes d'une manière plus efficace que les bactéries.
Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996).

a) Sources de carbone et d'azote

Les moisissures se comportent, généralement, en chimio-organotrophes hétérotrophes. La nature des substances carbonées conditionne le développement des spores présentes sur un substrat donné et sera à l'origine des successions des flores qui colonisent ce dernier (Lamberet et Lenoir ,1976).
La croissance la plus élevée est obtenue avec le fructose et le maltose (Botton et al., 1990). Les substances organiques, telles que les déchets issus de l'industrie agro-alimentaire comme les mêlasses des betteraves, des oranges, des abricots, des dattes et le lactosérum provoquent à

la fois une meilleure sporulation et une meilleure croissance pondérale des moisissures (Gerhartz, 1990 ; Krasniewski et al., 2006).

La source d'azote n'a pas seulement un effet sur la croissance des microorganismes ; elle est ajoutée particulièrement dans les cultures pour produire de métabolites et d'enzymes. On utilise des sources azotées minérales comme le sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ (Pederson et Nielsen, 2000) ou organique comme les caséines (Kathiresan et Manivannana, 2006).

b) Les sels minéraux

La présence des ions minéraux et des métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de SO_4^{2-}, PO_4^{3-}, $Mn^{2+,}$ K^+ et Na^+ avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (Uchikoba et al., 2001).

Le genre *Penicillium* pourrait voir sa croissance légèrement stimulée aux faibles concentrations en sel, de 1 à 5%, mais une concentration de 20% est nécessaire pour entraîner une inhibition totale de la croissance (Lamberet et al., 1976) ; Choisy et al., 1984). Pour *P. camembertii*, la sensibilité au sel est assez faible (il tolère 20-25% de NaCl). La présence de phosphates, de magnésium et de divers oligo-éléments minéraux dans le milieu de culture est favorable à la croissance de *P. camembertii* (Lenoir et al., 1979).

I.3.6. Les applications industrielles du Penicillium camembertii

Actuellement, les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines; elles sont mises à profit des industries alimentaires et chimiques, de la biolixiviation et de la biotransformation. Leur intérêt économique provient essentiellement de leur activité biologique dans la production d'un ensemble très varié de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier en médecine ainsi que par l'industrie pharmaceutique (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992).

a) Fabrication des fromages

La souche *P. camembertii* joue un rôle prédominant dans le développement de la texture molle et des arômes caractéristiques des fromages à croûte fleurie (Molimard et Spinnler, 1996 ; Desmasures, 2014). Du point de vue des caractéristiques physiques, le mycélium de cette moisissure présente une grande élasticité qui lui permet de s'adapter à la déformation durant le conditionnement du fromage. Sa faible perméabilité à la vapeur d'eau ($2{,}42.10^{-10}$ $m^3.s^{-1}$) (Bizet et al., 1997), ainsi que la forte capacité de fixation de vapeur d'eau

du film, ralentissent les transferts d'eau entre la croûte du fromage et l'air ambiant. Par conséquent, *P. camembertii* joue véritablement le rôle de premier emballage autour du fromage, ce qui lui donne une résistance contre les microorganismes pathogènes (Bizet et al., 1997).

b) Fabrications pharmaceutiques

L'enzyme α-amylase est produite industriellement à partir de *P. camembertii* (Nouadri, 2011). Les α- amylases fongiques sont utilisées comme:

- Aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Liu et al., 2010).
- Agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement antibiotique (Lo et al., 2001).

c) Lutte contre la pollution

La souche *P. camembertii* joue un rôle prépondérant dans la bioremédiation des polluants. Elle se trouve très efficace dans le traitement des effluents formés pendant le blanchiment au chlore des pâtes à papier. Ces dernières contiennent une large gamme de composés organiques chlorés qui sont connus pour leur comportement récalcitrant dans l'environnement en raison de leurs teneurs élevés en chlore ainsi que leur toxicité aiguë (Taseli et Gokcay ,1999). Les études effectuées avec le pentachlorophénol (PCP), le 2-chlorophénol et l'acide trichloroacétique ont montré que des hydrocarbures aromatiques chlorés étaient mieux déchlorées par *P. camembertii* par rapport aux hydrocarbures aliphatiques chlorés et que les composés cycliques avec de nombreux atomes de chlore étaient mieux dégradées que ceux ayant moins d'atomes de chlore. Il faut signaler que PCP est un hydrocarbure chloré utilisé comme insecticide et fongicide, il est principalement utilisé pour protéger le bois contre la pourriture fongique et les insectes xylophages. Ce composé est très toxique, notamment lorsqu'il pénètre dans la peau ou inhalé (Taseli et Gokcay, 2005).

Des études dirigées par Dugal et Gangawane en 2012 ont montré la tolérance de nombreuses espèces, appartenant au genre *Penicillium* (exemple *P. oxalicum*), à des concentrations importantes en métaux lourds grâce à leur aptitude à développer des résistances contre ce genre de polluants (exemple, les ions Cd^{2+}). Cette propriété est prometteuse pour le domaine de mycoremédiation (bioremédiation par des champignons) des eaux contaminées par les métaux lourds. Dans le même contexte, Hemambika et al (2011) ont signalé que la capacité éventuelle d'élimination des ions Cd^{2+} par des espèces appartenant au genre *Penicillium* isolé en Inde est presque totale.

I.4. Procédés d'isolation des polysaccharides fongiques

I.4.1. Culture du mycélium fongique : mode et paramètres de fermentation

La fermentation des champignons filamenteux pour la production de matériel chitineux peut offrir l'opportunité de manipuler et standardiser les propriétés physicochimiques des matériaux en contrôlant les paramètres de la fermentation (Tan et al., 1996). Le rendement en chitosane issu de la biomasse fongique dépend largement de plusieurs facteurs, tels que les souches des champignons utilisés, les méthodes de culture et les paramètres du procédé (pH, température, vitesse de mélange, temps d'incubation et le bouillon rhéologique). Une augmentation du rendement en chitosane peut être obtenue soit par l'augmentation du rendement de la biomasse ou par une augmentation de la teneur de la paroi cellulaire en chitosane (Jaworska et Konieczna, 2001).

La biomasse fongique est produite par fermentation, soit sur solide (appelée solid state fermentation SSF), soit en milieu liquide (appelée Submerged Fermentation SmF). La culture liquide (SmF) présente un avantage spécifique car elle permet un contrôle plus aisé des paramètres de fermentation, tels que le pH, la température d'incubation et la concentration en nutriments dans le milieu de fermentation (Arcidiacono et Kaplan, 1992). Expérimentalement, l'isolation de la chitine et du chitosane est fréquemment effectuée en milieu de culture YPG (Yeast Peptone Glucose broth), milieu PDB (Potato Dextrose Broth) ou milieu MSM (Molasses Salt Medium). Chatterjee et al (2004) ont comparé les performances de différents milieux et n'ont pas trouvé de différences significatives entre les rendements et les propriétés physico-chimiques du chitosane et de la chitine obtenus. Généralement, les milieux préconisés par un grand nombre d'auteurs dans la production du chitosane à partir des champignons, contiennent de l'extrait de levure, du D-glucose et de la peptone (milieu YPG) (Nwe et Stevens, 2002 ; Khalaf, 2004 ; Streit et al., 2009 ; Kannan et al., 2010 ; Tai et al., 2010). Au cours de la dernière décennie, la fermentation sur milieu solide SSF a suscité un intérêt scientifique croissant, car elle offre plusieurs avantages économiques et pratiques par rapport à la fermentation liquide (SmF): un rendement et une qualité des produits supérieurs et meilleurs, une sécurité, une récupération améliorée des produits, une réduction des déchets ainsi que des coûts d'exploitation des usines les plus faibles (Blandino et al., 2002).

Le pH initial du milieu SSF influe fortement sur la vitesse de croissance fongique (Barbosa et al., 1997). La plupart des champignons, responsables de la pourriture blanche, poussent dans le sol à des valeurs du pH légèrement acides, comprises entre 4 et 5 (Dube,

2013). Nwe et Stewens (2004) ont démontré un faible poids moléculaire (Mw) du chitosane à pH 3,77 (Mw = 235±55 KDa) et 4,92 (Mw = 237±15 KDa), il est augmenté à un pH d'environ 5,5 (Mw = 317±46 KDa) dans la fermentation SSF. Arcidiacono et Kaplan (1992) ont observé que la biomasse du *Mucor rouxii* et le poids moléculaire à un niveau constant dans la plage de pH 4,0 (Mw est de 462 KDa) à 5.0 (Mw est de 425 KDa) et diminuaient à pH 3 (Mw est de 325 KDa) et que le poids moléculaire augmentait légèrement à pH 6 (Mw est de 550 KDa) dans SmF.

La température influence les activités métaboliques et la croissance microbienne, ce qui affecte la production. Afin de déterminer l'effet de la température sur la production du chitosane fongique, Gharieb et al., 2015 ont réalisé une fermentation à différentes températures : 20 ; 25 ; 30 et 35 °C. Le rendement augmentait avec l'augmentation de la température de 20 à 30 °C et diminuait, ensuite, à 35 °C. Une production maximale du chitosane a été observée à 30 °C : 17 mg/50 mL de milieu YPG pour la souche *Cuninghamella*, 5,7 mg/50 mL de milieu YPG pour la souche *Mucor* et 6,5 mg/50 mL de milieu YPG pour la souche *Rhizopus*.

Comme le chitosane est un biopolymère contenant de l'azote, les champignons ont besoin d'une source d'azote inorganique ou organique en tant que nutriment pour produire de chitine/chitosane au niveau de leur paroi cellulaire. Les champignons utilisent directement les ions d'ammonium comme source d'azote, tandis que les autres formes d'azote inorganiques sont d'abord réduites au niveau rédox de l'ammonium. La source d'azote est considérée comme l'un des facteurs importants de la production du chitosane par les champignons. Parmi les différentes sources d'azote, l'urée s'avère être la meilleure source d'azote pour la production du chitosane fongique par fermentation en substrat solide (SSF) (Nwe et Stevens, 2004). Arcidiacono et Kaplan (1992) ont démontré que l'on pouvait augmenter le poids moléculaire du chitosane en utilisant davantage de source d'azote (peptone) dans le milieu de fermentation submergé. Gharieb et al (2015) ont étudié l'effet des différentes sources d'azote sur le rendement du chitosane libre. Le nitrate de sodium ($NaNO_3$) a produit la plus grande quantité avec 23 mg/50 mL de milieu YPG pour la souche de *Cuninghamella* et 10 mg/50 mL de milieu pour la souche de *Mucor*, alors que l'urée a été le meilleur substrat pour la souche *Rhizopus* (13 mg/50 mL de milieu YPG). En l'absence de source d'azote, le rendement en chitosane a été considérablement réduit. On peut donc en conclure que cette source d'azote est un paramètre important dans la production du chitosane fongique.

I.4.2. Extraction de la chitine et du chitosane libre (chitosane naturel)

Divers procédés d'extraction du chitosane à partir des espèces fongiques ont été développés dans la littérature. Les procédés chimiques d'extraction du chitosane à partir d'une biomasse fongique sont similaires au processus industriel de son extraction à partir des crustacés (crevettes), excepté l'étape de déminéralisation, cela est dû au faible teneur de mycélium fongique en minéraux (Synowiecki et AI-Khateeb, 1997). Généralement, le processus d'extraction comporte trois étapes : la première est le traitement alcalin qui permet d'éliminer les protéines et les polysaccharides solubles, la deuxième étant le reflux acide qui vise à séparer la chitine du chitosane libre, et l'étape de précipitation en milieu basique qui permet de récupérer le chitosane pur.

La chitine est insoluble dans la plupart des solvants alors que le chitosane est soluble dans la plupart des solutions acides à pH <6,5, telles que les acides formique, acétique, citrique, chlorhydrique, lactique et tartrique (Peniston et Johnson, 1980 ; Le Houx et Grondin, 1993). Ce dernier est insoluble dans les acides phosphorique et sulfurique à la température ambiante mais avec une solubilité possible dans ces solutions en ébullition. Le chitosane est extrait à partir de la paroi cellulaire de champignons par un processus d'extraction en deux étapes successives: traitements basiques puis acides (Rane et Hoover, 1993 ; Crestini et al., 1996) . Les protéines, les lipides et les polysaccharides, solubles dans les bases, sont d'abord dissous dans une solution alcaline NaOH 2-4% à 90-12 °C pendant 15 -120 min, le résidu de la paroi cellulaire renferme du chitosane naturel et une fraction AIM (Matériel Insoluble en milieu Alcalin). La fraction AIM est ensuite traitée avec une solution acide, telle que l'acide acétique 2-10% à 25-95 °C pendant 1-24 heures afin de dissoudre les substrats solubles en milieu acide, nommés fraction AcSM. L'autre fraction insoluble récupérée par filtration/centrifugation représente la fraction AcIM (matériel insoluble en milieu acide acétique). La fraction AcSM est généralement considérée comme riche en "chitosane naturel" et peut être précipité en augmentant le pH à 9-10. La pesée est réalisée après séparation par centrifugation puis lavée à l'éthanol (Tan et al., 1996 ; Synowiecki et AI-Khateeb, 1997 ; Chatterjee et al., 2005).

Dans une autre étude, Rane et Hoover (1993) ont étudié l'extraction du chitosane de mycélium *d'Absidia coerulea A TCC 14076* en utilisant des traitements alcalins et acides à chaud. Des traitements alcalins ont été effectués à 95 °C et à 121 °C dans l'autoclave en utilisant du NaOH avec des temps d'extraction variables (de 30 min jusqu'à 6 h). Les traitements acides ont été effectués à 95 °C avec des acides chlorhydrique, formique et

acétique dans différents temps d'extraction (de 3 h jusqu'à 12 h). Les rendements les plus élevés en chitosane ont été obtenus avec une extraction alcaline à 121 °C pendant 30 min et une extraction à l'acide chlorhydrique à 95 °C pendant 12 h. Les effets sur le degré DA et la viscosité du chitosane des différents traitements ont également été examinés.

I.4.2.1. Influence des paramètres d'extraction sur le rendement en chitine et en chitosane libre

a) Effet du traitement alcalin

La concentration de la base, utilisée dans le processus d'extraction, affecte de manière significative le degré DA (Hu et al., 1999). Kannan et al (2010) ont démontré qu'une augmentation de la concentration de la base entraînait une augmentation significative du DDA. La concentration de la base doit être soigneusement optimisée pour la production de produits hautement cohérents (Hu et al., 1999).

b) Effet du traitement acide

La nature de l'acide utilisé peut affecter le rendement final en chitosane au cours de l'extraction. L'utilisation de l'acide formique (6% v/v) en tant que solution d'extraction s'est révélée avoir un rendement plus élevé en chitosane par rapport à l'acide acétique, suivi de l'acide chlorhydrique (Hu et al., 1999). Les auteurs ont également observé que lors de l'extraction du chitosane, divers acides produisaient des interactions et des effets différents à la même période d'extraction et à la même concentration. L'extraction du chitosane à l'aide d'acide chlorhydrique (concentration 8%) donnait un degré DA de 89%, nettement supérieure à l'extraction du chitosane à l'aide l'acide acétique et de l'acide formique (76,16%) (Kannan et al., 2010). Cependant, il a été constaté que l'acide chlorhydrique, étant un acide fort par rapport aux acides acétique et formique, provoque une plus grande hydrolyse des fractions acétyle ainsi qu'une hydrolyse au sein du réseau de monomères du chitosane. L'augmentation de la concentration des différents acides a également entraîné une augmentation du degré DA. Une concentration élevée en acide et une température élevée produisaient du chitosane de couleur plus sombre, tandis que des traitements plus doux donnaient du chitosane de couleur plus claire.

Dans une autre étude, Alagesan et al (2016) ont utilisé différents acides pour l'extraction du chitosane à partir du champignon *P. chrsogenum* cultivé dans un bouillon

Czapex Dox. Les résultats obtenus ont révélé que le traitement à l'acide acétique donne le rendement le plus élevé, suivi par l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique.

c) Effet de la température et de la durée des traitements

Des températures plus élevées et des périodes d'extraction plus longues sont nécessaires pour permettre des interactions efficaces entre la base, telle que NaOH, et les constituants de la paroi cellulaire fongique, ce qui réduira à son tour la possibilité d'extraire des concentrations plus élevées du chitosane. De plus, un temps d'extraction plus long permet également à la base d'agir plus longtemps sur les structures de la chitine et du chitosane pour les séparer des autres polysaccharides de la paroi. Kannan et al (2010) ont atteint un rendement maximal en chitosane à 121 °C après 30 min. Ils ont également constaté que le degrée DA augmentait avec la durée d'extraction (optimum à 30 min), ainsi que la température (optimale à 121 °C) utilisées lors du traitement alcalin (Kannan et al., 2010).

I.4.3. Extraction du chitosane total

a) Traitements chimiques (basique et acide)

Les études effectuées sur *Gongronella butleri* et *Absidia coerulea* ont montré que la meilleure dissociation du mycélium est obtenue lorsque celui-ci est traité avec NaOH 11 M à 45 °C pendant 13 h, suivi du traitement de la fraction AIM par une solution d'acide acétique à concentration 0,35 M à 95 °C pendant 5h (Nwe et al., 2010). L'utilisation de NaOH à forte concentration 11 M permet d'effectuer simultanément l'élimination des protéines, les glucanes solubles, les autres polysaccharides, l'ADN et l'ARN ainsi que la conversion de la chitine en chitosane. Ce dernier étant insoluble en milieu alcalin, il est récupéré après lavage à l'eau distillée jusqu'à pH neutre (Nwe et al., 2010). Dans ce cas, le chitosane libre et le complexe chitosane-glucane peuvent se retrouver dans la fraction insoluble AIM (Nwe et Stevens, 2002). Lors du traitement acide, il a été constaté que ces polymères restent en suspension dans l'acide acétique (tableau I.5). Pour pouvoir séparer la fraction AIM en ses différents constituants, la liaison covalente entre le chitosane et le glucane doit être brisée par hydrolyse enzymatique.

Tableau I.5: Comportement des constituants de la fraction AIM en solution suivant le pH (Nwe et al., 2010)

	Solubilité du chitosane et des glucanes		
pH de la solution	**Chitosane**	**Glucanes**	**Chitosane-glucanes**
4	soluble	Insoluble	Suspension turbide
9	Précipité	Soluble Insoluble	Précipité

Suivant sa nature polycationique, le chitosane se dissolve dans les acides organiques à pH 4 et il se précipite à pH 9 alors que la plupart des glucanes sont insolubles dans les mêmes conditions. Les constituants de la fraction AIM forment une suspension stable à pH 4 (Nwe et Stevens, 2002). Ces observations ont permis de supposer que le glucane et le chitosane sont liés l'un à l'autre et montrent des comportements de suspension/précipitation suivant la nature physico-chimique du chitosane constitutif du complexe : à pH 4, le chitosane est partiellement protoné, ce qui lui confère l'aptitude de maintenir le complexe en suspension, tandis qu'à pH 9, le chitosane perd ses charges et ne peut plus maintenir le complexe, ce dernier se précipite (Nwe et Stevens, 2002a).

b) Traitement enzymatique

Selon les travaux de Nwe et Stevens (2002) par rapport à la paroi cellulaire du champignon *Gongronella butleri*, la turbidité de la suspension décroit de la turbidité initiale de 1000 NTU jusqu'à 10 NTU lorsqu'elle est traitée par l'enzyme commerciale l'α-amylase dans les conditions optimales : pH 4,5 ; 4% (v/v) d'enzyme à 65 °C pendant 3 h à une vitesse d'agitation de 225 rpm.

La séparation des phases (instabilité de la suspension) s'est produite par l'action enzymatique, le dépôt est riche en glucanes alors que le surnageant (clair) renferme du chitosane total. Selon Nwe et Stevens (2002), le chitosane total représente le chitosane libre et le chitosane résultant du clivage du complexe chitosane-glucane par l'enzyme.

I.5. Applications des polysaccharides (chitine et chitosane)

I.5.1. les sources marines

La chitine et son dérivé le chitosane ont reçu une attention considérable en tant que biopolymères et cela en raison de leurs nombreuses applications potentielles dans l'agriculture, l'industrie alimentaire, la médecine, la fabrication du papier, l'industrie textile et les traitements des eaux. Cet intérêt est dû à leurs nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques (Flores et al., 2007 ; Álvarez et al., 2014).

I.5.1.1. Utilisation du chitosane comme adsorbant

L'adsorption sur des matériaux à faible coût s'est révélée être l'une des méthodes les plus efficaces pour éliminer les colorants, en particulier pour les effluents à faible concentration (Bharathi et Ramesh, 2013). Divers matériaux ont été utilisés pour l'élimination des colorants tels que la sciure d'oranger (Azzaz et al., 2017), le bioadsorbant à base de cellulose (Liu et al., 2015), les différentes macro-algues marines (Omar et al., 2018) et le chitosane (Vega-Negron et al., 2018).

Le chitosane peut être fabriqué sous différentes formes, notamment des particules, des fibres, des films et des billes pour l'adsorption (tableau I.6). Malgré une forte affinité d'adsorption du chitosane, l'un des inconvénients de son utilisation comme adsorbant est sa solubilité dans certains milieux acides (pH <5,5). Il en résulte la formation de gels de chitosane qui peuvent éventuellement conduire à des pertes de capacité d'adsorption. La réticulation est une méthode de modification chimique qui rend le chitosane insoluble dans les milieux acides. Le chitosane réticulé maintient une réactivité constante dans une large gamme de pH et se caractérise par une résistance mécanique élevée (Filipkowska, 2012). La conversion des flocons de chitosane en membrane et en film est une autre façon de préparer des adsorbants à partir du chitosane présentant une structure fibreuse, de bonnes propriétés mécaniques et des surfaces plus élevées (Dotto et al., 2013). Le chitosane sous forme de membrane et de films a été signalé par quelques chercheurs comme adsorbant pour l'élimination des colorants des solutions aqueuses. Rêgo et al (2013) ont identifié l'élimination des colorants azoïques (tartrazine et amarante) des solutions aqueuses via un film de chitosane. Les résultats ont montré que les films de chitosane pouvaient être des adsorbants appropriés à un pH de 2 et à une concentration de film de chitosane de 100 mg/L pour l'adsorption des colorants azoïques.

Ces dernières années, les chercheurs ont étudié l'utilisation du chitosane et de ses composites pour éliminer des colorants. La membrane nanofibreuse du chitosane est considérée comme une forme prometteuse pour adsorber la substance colorée dans les eaux usées car elle a une surface spécifique élevée et une structure de porosité macroscopique (Li et al., 2018). Des composites du chitosane, tels que la nanofibre de mélange de poly (vinyl alcohol) et du chitosane ont été utilisés pour éliminer les colorants anioniques : y compris Direct Red 80 (DR80), Direct Red 81 (DR81) et Direct Red 180 (DR180) avec une capacité d'adsorption de 102, 96 et 121 mg/g, respectivement (Mahmoodi et Mokhtari-Shourijeh, 2015).

Tableau I.6 : Élimination des différents colorants des solutions aqueuses par du chitosane

forme du Chitosane	**colorant**	**Capacité d'adsorption (mg/g)**	**Température °C**	**pH**	**référence**
Poudre	Reactive black 5	200	-	7	(Guibal et al., 2003)
Poudre	Remazol yellow Gelb 3RS	417	25	2	(Kyzas et Lazaridis, 2009)
Poudre	Acid orange 10	696,65	25	4	(Cheung et al., 2007)
Billes	Reactive red	648	25	2	(Kyzas et al., 2011)
Billes	Reactive black 5	201,90	30	4	(Chatterjee et al., 2011)
Billes	Reactive black 5	4,83	25	7	(Ong et Seou, 2013)
Film	Acid red 18	194,6	25	7	(Dotto et al., 2013)
Film	Tartrazine	413,8	25	2	(Rêgo et al., 2013)

I.5.1.2. Avantages et inconvénients des adsorbants à base du chitosane

Comparés aux adsorbants conventionnels utilisés pour l'élimination des polluants des solutions, les adsorbants à base du chitosane offrent plusieurs avantages et présentent quelques inconvénients qu'on peut énumérer dans le tableau I.7 (Crini, 2005) :

Tableau I.7: Avantages et inconvénients des adsorbants à base du chitosane (Crini, 2005 ; Crini et Badot, 2008 ; Zhou et al., 2009)

Adsorbant	Avantages	Inconvénients
Matériau à base du Chitosane	- Polymère naturel peu coûteux - Doux pour l'environnement - Capacités exceptionnelles pour les liaisons métalliques et les colorants - Rendement et sélectivité élevés en détoxication des solutions très diluées ou concentrées - Excellentes propriétés de diffusion - Régénération facile.	- Adsorbant non poreux. - Capacité de sorption dépendant de l'origine du polysaccharide et du degré de désacétylation - Dépend du pH - Exige la modification chimique pour améliorer sa capacité d'adsorption. - Basse affinité pour les colorants basiques

I.5.2. Les sources fongiques

I.5.2.1. Activités antimicrobiennes et antifongiques

Actuellement, l'utilisation d'antibiotiques est une source de préoccupation majeure, à savoir l'accumulation de substances synthétiques dans l'organisme ainsi que le taux élevé de la sélection de microorganismes résistant aux médicaments connus. Par conséquent, certains groupes de chercheurs ont mené des études dans lesquelles ils utilisaient du chitosane fongique comme agent bactéricide (De Oliveira et al., 2014 ; Souza et al., 2017). Pour que l'action antimicrobienne se produise, plusieurs études ont montré qu'il faut que le degré de désacétylation soit supérieur à 75% ; et que le poids moléculaire soit élevé (Amorim et al., 2003 ; Franco et al., 2004 ; Tajdini et al., 2010 ; Moussa et al., 2013 ; De Oliveira et al.,

2014).

En 2014, Souza Paiva et ses collaborateurs ont testé le chitosane extrait de *Cunninghamella elegans* en tant qu'agent antibactérien contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Cette étude a réussi à inhiber les bactéries étudiées, prouvant ainsi l'efficacité du chitosane en tant qu'agent antibactérien (Souza Paiva et al., 2014) .

En plus de l'activité bactéricide, le chitosane fongique peut également avoir une activité fongicide. De Oliveira et al (2014) ont extrait le chitosane de *Cunninghamella elegans* pour enrober les fruits (raisin - *Vitis labrusca L*.) et empêcher la croissance de champignons pathogènes. Dans cette étude, le chitosane a été utilisé sous forme de film avec un degré de désacétylation de 81%. Pour cette application particulière, les mesures de la traction et de la perméabilité du film à base du chitosane ont montré une influence significative sur les valeurs du degré DA et du poids moléculaire. En effet, il a été souligné que si le polymère étudié avait un faible poids moléculaire, il en résulterait une diminution de la résistance à la traction et de la perméabilité du film. Dans le cadre de cette expérience, ils ont également constaté que ce revêtement alternatif n'influait pas sur les conditions sensorielles de ce fruit.

I.5.2.2. Biofertilisants

Les biofertilisants biodégradables, tels que le chitosane attirent le monde de la recherche pour éviter les risques liés à l'utilisation d'engrais inorganiques. Le chitosane est un biopolymère à base de polysaccharides qui stimule l'activité des microorganismes symbiotiques des plantes (Bell et al., 1998 ; Murphy et al., 2000). Dans des recherches récentes, le chitosane a été utilisé comme biofertilisant pour améliorer le rendement des cultures avec moins de contaminations environnementales. Conformément à cette affirmation, le chitosane en association avec le lysozyme a montré des effets bénéfiques, en réduisant de manière significative le taux de lésions des tiges de tomate à 14% (Neova Technologies Inc, 2010). Dans le cas de la pomme de terre, le mildiou est une maladie importante qui cause des dommages aux rendements de la pomme de terre. Cependant, après une inoculation du sol avec du chitosane en tant que biofertilisant, une réduction significative de l'infestation des tubercules par le mildiou a été constatée, une augmentation de l'absorption d'éléments nutritifs par les plantes a également été enregistrée (O'Herlihy et al., 2003). De même, 1% du chitosane mélangé avec de l'engrais améliorait la teneur en azote et en phosphore des racines et des pousses d'*Eustoma grandiflorum* par rapport aux plantes cultivées dans un sol mélangé sans chitosane (Ohta et al., 2000). Le chitosane a récemment été utilisé pour contrôler la

libération d'engrais minéraux afin de limiter les effets nocifs d'une fertilisation excessive (Wu et Liu, 2008 ; Corradini et al., 2010 ; Hussain et al., 2012). Wu et Liu (2008) ont suggéré que l'utilisation d'un enrobage du chitosane sur les engrais améliore l'efficacité de l'absorption d'engrais par plantes et réduit également les coûts de production. Par conséquent et afin de minimiser l'utilisation excessive d'engrais chimiques dans les légumes et les fruits en réduisant le processus de lixiviation et de volatilisation, les agriculteurs doivent considérer le chitosane comme matériau d'enrobage.

I.5.2.3. Immobilisation d'enzymes

La technique d'immobilisation d'enzymes est très appréciée dans les industries cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques. Amorim et al (2003) ont utilisé le chitosane fongique comme film pour réaliser l'immobilisation d'enzyme. Dans leur expérience, le degré de désacétylation du chitosane fongique était de 88,9%. Ces chercheurs ont visé l'immobilisation d'une enzyme appelée lipase et ils ont surveillé le temps d'activité de cette dernière. En conséquence, ils ont retrouvé 47% de l'activité catalytique initiale après quatre cycles de réaction. Ces résultats sont aussi efficaces que ceux trouvés dans les études utilisant du chitosane obtenu à partir de coquilles de crustacés.

II.1. Définition de l'adsorption

L'adsorption définit la propriété de certains matériaux (dits adsorbants) de fixer à leur surface les molécules d'un fluide (gaz ou liquide), appelées adsorbât. On désigne par la surface du solide, les surfaces externes et internes engendrées par le réseau de pores et de cavités à l'intérieur de l'adsorbant (Mouchet, 2000).

II.2. Propriétés des adsorbants

Beaucoup de substances chimiques de nature très différente peuvent être utilisées comme adsorbants à condition de présenter certaines propriétés (Mahuzier et al., 1999) :

- ✓ **Insolubilité:** les adsorbants doivent avoir une inertie chimique vis-à-vis d'eux et des substances à adsorber.
- ✓ **Surface spécifique importante:** la surface spécifique des adsorbants est leur surface par unité de masse. Elle est liée à leur granulométrie et à leur porosité. Une grande surface spécifique est en général souhaitable, elle permet d'obtenir de meilleures capacités d'adsorption. La surface spécifique dépend de la nature de l'adsorbant et de sa préparation.

II.3. Types d'adsorption

Suivant la grandeur des énergies mises en jeu, le problème d'adsorption présente les caractéristiques qui permettent de le classer soit dans la catégorie de l'adsorption physique ou physisorption, soit dans celle de l'adsorption chimique ou chimisorption (Fripiat et al., 1971).

- ✓ **L'adsorption physique**

L'adsorption est dite physique lorsqu'elle est due à des forces d'interactions physiques entre les atomes ou groupements d'atomes du solide et les molécules de soluté.

Les énergies mises en jeu sont généralement beaucoup plus faibles qu'en chimisorption et plus facilement réversibles: la chaleur d'adsorption est de l'ordre de 5 à 25 $kJ.mol^{-1}$, quant aux forces électrostatiques, il s'agit d'interaction ou de répulsion entre espèces chargées (Barka, 2008):

- Interaction de type Van Der Waals
- Liaisons hydrogène.

L'adsorption physique se caractérise par (Koller, 2013) :

- La rapidité dans l'établissement de l'équilibre entre la phase adsorbée et la phase fluide
- La réduction de la capacité d'adsorption avec l'élévation de la température
- Une réversibilité relativement facile et une absence de spécificité
- L'adsorption physique peut avoir lieu en monocouche ou en multicouches.

✓ **Adsorption chimique**

L'adsorption chimique met en jeu des énergies, en général, supérieur à 10 Kcal. mol^{-1}. Elle se traduit par la formation de liens chimiques entre les atomes superficiels et les atomes ou molécules adsorbés, et elle est en général favorisée par un accroissement de la température. Cette adsorption est spécifique puisqu'elle dépend de la nature des liens chimiques des atomes en contact. Au cours de l'adsorption chimique, la surface se garnie au maximum de recouvrement d'une couche mono-moléculaire de l'adsorbât. En outre, l'adsorption chimique est généralement irréversible, la désorption est plus difficile (Fripiat et al., 1971). Les différences entre la physisorption et la chimisorption sont indiquées dans le tableau II.1 :

Tableau II.1: Différences entre la physisorption et la chimisorption (Treybal, 1980 ; Chitour, 1981 ; Smith, 1981).

Propriétés	**Adsorption physique**	**Adsorption chimique**
Température du processus	Relativement basse	Plus élevée
Chaleur d'adsorption	5 $Kcal.mol^{-1}$	$\geq$10 $Kcal.mol^{-1}$
Liaison	Physique de Van der Waals	Chimique
Spécificité	Processus non spécifique	Processus spécifique
Désorption	Facile	Difficile
Cinétique	Rapide	Lente
Couches formées	Monocouches ou Multicouches	Monocouches

d) Les facteurs influençant l'équilibre d'adsorption

Au regard des nombreux paramètres qui entrent en jeu dans les mécanismes d'adsorption d'espèces neutres ou chargées en solution, il apparaît toujours très difficile de

définir le rôle distinct de chacun d'entre eux tant le processus global résulte d'une interaction complexe entre ces différents paramètres. L'efficacité d'un adsorbant à adsorber un soluté (adsorbât) dépend de plusieurs paramètres, parmi lesquels on distingue les facteurs liés à :

- **La nature de l'adsorbant**
  - ✓ Surface spécifique
  - ✓ Distribution de la taille des pores
  - ✓ Densité et nature des groupes fonctionnels qui se trouvent à surface de l'adsorbant.
- **La nature de l'adsorbat**
  - ✓ Masse moléculaire
  - ✓ Polarité
  - ✓ Solubilité
  - ✓ Taille des molécules
  - ✓ Nature des groupements fonctionnels (acides ou basiques).
- **Les conditions opératoires**
  - ✓ Concentration en adsorbant et en adsorbat
  - ✓ Température du milieu réactionnel
  - ✓ Présence d'espèces compétitives pour les mêmes sites d'adsorption (cas des mélanges)
  - ✓ pH du milieu
  - ✓ Temps de contact entre l'adsorbant et l'adsorbat
  - ✓ Vitesse d'agitation.

II.4. Isothermes d'adsorption

L'étude de l'adsorption d'un soluté par un solide est en général destinée à fournir des informations sur la surface spécifique et sur la structure poreuse du solide. Les phénomènes d'adsorption sont souvent abordés par leur comportement isotherme. Les courbes isothermes décrivent la relation existante à l'équilibre d'adsorption entre la quantité adsorbée et la concentration en soluté dans un solvant donné à une température constante.

Les isothermes d'adsorption sont des courbes expérimentales qui représentent les variations (masse ou volume) du substrat adsorbé (gaz ou liquide) par la masse d'adsorbant en fonction de la concentration (en phase liquide) ou de la pression (en phase gazeuse). Elles sont exprimées généralement sous forme d'équations mathématiques non cinétiques, lesquelles

sont obtenues à partir d'expériences réalisées en réacteur statique. Elles permettent essentiellement (Slejko, 1985) :

- De déterminer le taux de recouvrement de la surface d'un support par un substrat
- D'identifier le type d'adsorption pouvant se produire
- De choisir l'adsorbant qui conviendrait le mieux à la rétention de l'adsorbat.

II.4.1. Classification des isothermes d'adsorption

Les classifications des isothermes les plus connues sont :

a) Classification selon Gilles

Gilles et al (1974) ont proposé des modèles d'adsorption dont on distingue quatre classes principales d'isothermes : L (Langmuir), S (Sigmoïde), H (Haute affinité) et C (Partition constante). La figure II.1 illustre la forme de chaque type d'isotherme.

Dans chaque classe, on rencontre un palier correspondant à la formation d'une couche mono-moléculaire de soluté adsorbé. Une augmentation de l'adsorption au-delà de ce palier peut induire une réorientation des molécules déjà adsorbées pour donner lieu à une couche compacte et condensée ou bien à une adsorption en multicouches (Dabrowski et al., 2005).

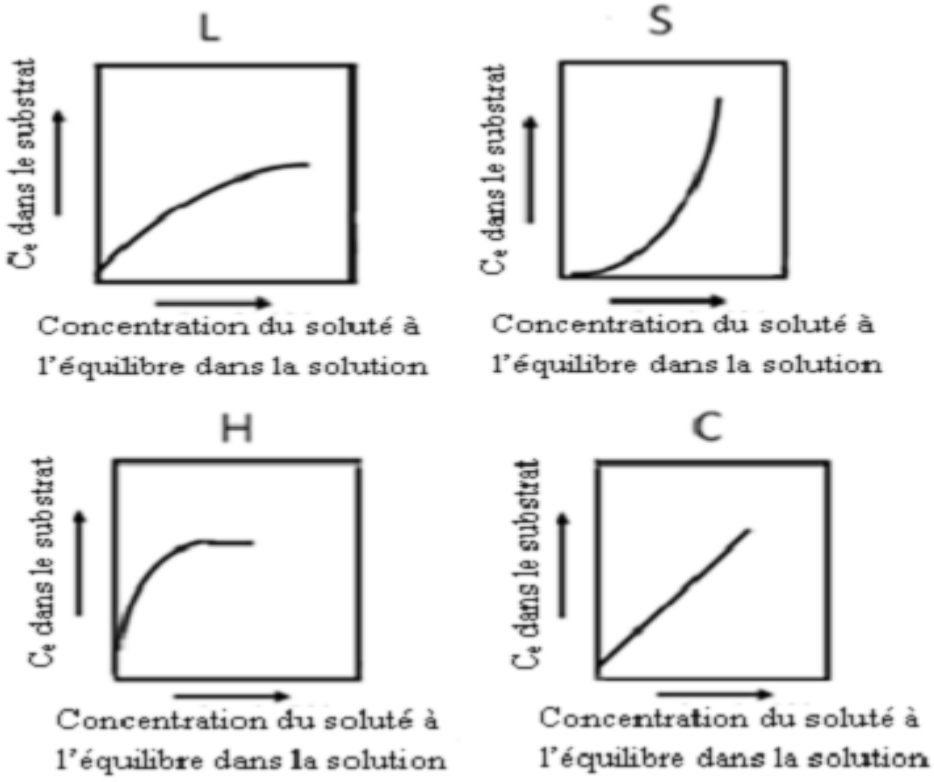


Figure II.1: Classification des isothermes d'adsorption (Gilles et al., 1974)

- ✓ **Classe L**

Les isothermes de classe L présentent, à faible concentration en solution, une concavité tournée vers le bas qui traduit une diminution des sites libres au fur et à mesure de la progression de l'adsorption.

- ✓ **Classe S**

Les isothermes de cette classe présentent, à faible concentration, une concavité tournée vers le haut. Les molécules adsorbées favorisent l'adsorption ultérieure d'autres molécules (adsorption coopérative). Ceci est dû aux molécules qui s'attirent par des forces de Van Der Waals et se regroupent en îlots dans lesquels elles se tassent les unes contre les autres.

- ✓ **Classe H**

La partie initiale de l'isotherme est presque verticale, la quantité adsorbée apparaît importante à concentration quasiment nulle du soluté dans la solution. Ce phénomène se produit lorsque les interactions entre les molécules adsorbées et la surface du solide sont très fortes. L'isotherme de classe H est aussi constaté lors de l'adsorption de micelles ou de polymères formés à partir des molécules de soluté.

- ✓ **Classe C**

Les isothermes de cette classe se caractérisent par une partition constante entre la solution et le substrat. La linéarité montre que le nombre de sites libres reste constant au cours de l'adsorption. Ceci signifie que les sites sont créés au cours de l'adsorption, ce qui implique que les isothermes de cette classe sont obtenues quand les molécules de soluté sont capables de modifier la texture du substrat en ouvrant des pores qui n'ont pas été ouverts préalablement par le solvant.

b) Classification selon l'I.U.P.A.C

Selon l'I.U.P.A.C (L'union internationale de chimie pure et appliquée), les formes d'isothermes les plus couramment rencontrées sont regroupées selon la classification établie par Brunauer, Deming et Teller en six catégories rassemblées sur la figure II.2. Cette classification reste néanmoins très simplifiée puisque les isothermes, mesurées expérimentalement, sont souvent plus complexes et relèvent d'une combinaison de plusieurs des types I à VI (Babaa, 2004) :

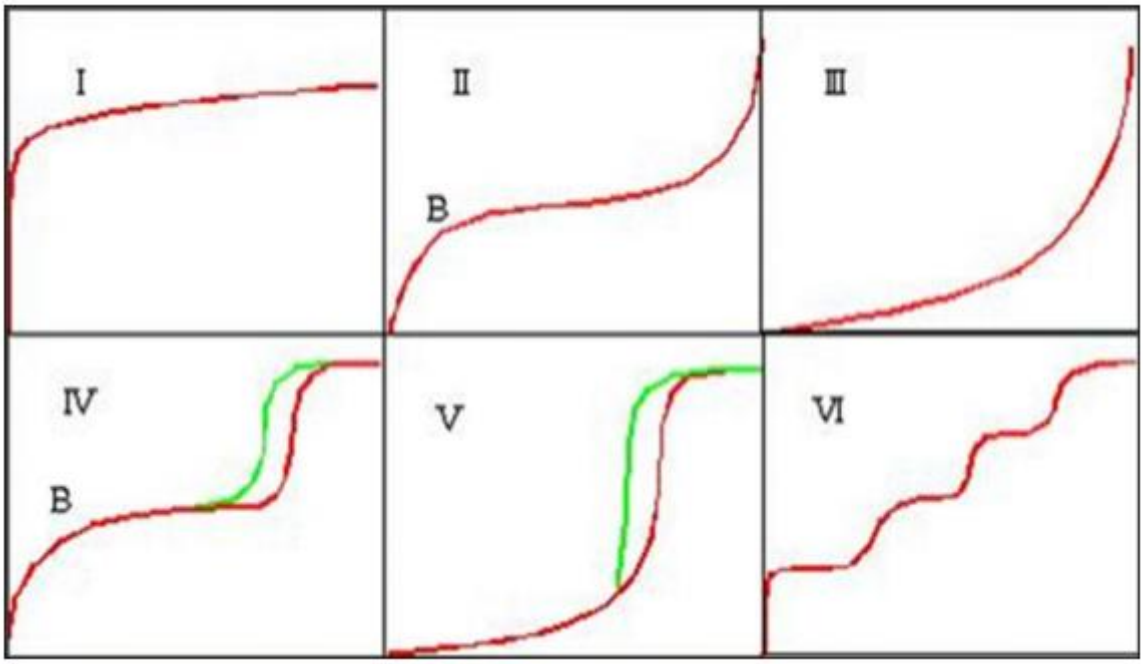


Figure II.2: Les isothermes d'adsorption selon l'I.U.P.A.C (Richou, 2007)

- ✓ **Isotherme de type I**

Elle est caractérisée par une augmentation rapide de la quantité adsorbée dans le domaine des faibles pressions d'équilibre suivi par un palier approximativement horizontal jusqu'à la pression de vapeur saturante (pression des molécules de gaz en équilibre avec la phase liquide pour une température donnée). Cette isotherme est généralement attribuée à l'adsorption sur une surface comportant des micropores, c'est-à-dire des pores de diamètres inférieurs à 2 nm selon la classification I.U.P.A.C. Mais ces mêmes courbes peuvent traduire la formation d'une monocouche sur une surface non poreuse dans certains cas. La quantité adsorbée correspondant au palier est la quantité nécessaire pour former une couche mono-moléculaire complète sur la surface du solide (Babaa, 2004).

- ✓ **Les isothermes de type II**

Sont de loin les plus couramment rencontrées, elles traduisent l'adsorption sur des surfaces non poreuses ou macro-poreuses. Leur étude pour de très nombreux couples adsorbat -adsorbant a conduit à conclure empiriquement que la quantité de gaz adsorbée au point B, figure I.7, qui marque le coude sur l'isotherme, devrait correspondre approximativement à l'adsorption d'une monocouche. L'adsorption multicouche commence aux pressions plus élevées (Babaa, 2004).

- ✓ **Les isothermes de type III**

Sont assez rares. Elles montrent une faible adsorption aux basses pressions liées à un mauvais mouillage de l'adsorbant par l'adsorbat. L'adsorption devient d'autant plus facile lorsque la quantité déjà adsorbée est importante. Cela s'explique à la fois par une faible attraction adsorbat-adsorbant et par de fortes attractions entre molécules adsorbées. Dans un tel cas, la condensation est atteinte pour sa pression saturante alors que l'adsorption sur la surface est encore limitée. C'est le cas par exemple de l'adsorption de l'eau sur le graphite.

- ✓ **Les isothermes de types IV et V**

Ont la particularité de présenter des hystérèses qui se manifestent lorsque les pressions d'équilibre sont différentes lors de l'adsorption et la désorption. Ces courbes sont obtenues lorsque les adsorbants contiennent des pores de petits diamètres, appelés mésopores (pour lesquels les diamètres sont compris approximativement entre 2 et 50 nm). Dans ce cas, il peut se superposer à l'adsorption proprement dite une condensation capillaire de l'adsorbat. L'analyse de ce type d'isothermes permet d'obtenir plusieurs informations concernant la texture poreuse du substrat (Babaa, 2004).

- ✓ **L'isotherme de type VI**

Est caractéristique de l'adsorption sur une surface uniforme. L'adsorption s'effectue couche par couche, ce qui se traduit sur la courbe par une succession de marches sur le tracé de l'isotherme.

II.5. Modélisation des isothermes d'adsorption

L'isotherme décrit la relation existante à l'équilibre pour une température donnée entre la concentration de l'adsorbat dans la phase liquide et celle adsorbée à la surface de l'adsorbant. Plusieurs théories ont été proposées pour décrire ces isothermes, les plus connus sont ceux de Langmuir, Freundlich et BET (modèle de Brunauer, Emmett et Teller) (Barka, 2008).

II.5.1. Modèle de Langmuir

Le modèle de Langmuir, initialement développé pour l'adsorption en phase gazeuse, s'adapte très bien à la représentation d'isothermes de type I en phase aqueuse. Ce modèle est basé sur plusieurs hypothèses (Dabrowski et al., 2005) :

- Les sites d'adsorption à la surface du solide sont tous énergiquement équivalents ;

- Chacun des sites ne peut fixer qu'une seule molécule
- L'adsorption se fait en monocouche
- Il n'y a pas d'interaction entre les molécules adsorbées.

Dans ces conditions, les isothermes peuvent être modélisées par l'équation :

$$q_e = \frac{q_{max} k_L C_e}{1 + k_L C_e} \qquad \text{(II. 1)}$$

Où :

q_e : Quantité de soluté adsorbé par unité de masse d'adsorbant à l'équilibre ($mg.g^{-1}$)

q_m: Quantité nécessaire pour couvrir la surface d'un gramme d'adsorbant d'une couche mono-moléculaire de soluté ($mg.g^{-1}$)

C_e: Concentration en soluté de la solution à l'équilibre ($mg.L^{-1}$)

k_L : Constante de Langmuir, relative à l'énergie d'adsorption ($L.mg^{-1}$).

La linéarisation de l'équation de Langmuir permet de déduire la quantité maximale q_m et la constante k_L.

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{k_L q_m} \frac{1}{C_e} \qquad \text{(II. 2)}$$

II.5.2. Modèle de Freundlich

Le modèle de Freundlich est un modèle empirique qui permet de modéliser des isothermes d'adsorption sur des surfaces énergétiquement hétérogènes (cas de l'adsorption non idéale) et la formation de multicouches. Freundlich a supposé que l'énergie de liaison ou la chaleur d'adsorption décroit exponentiellement avec l'augmentation de la saturation de la surface du solide. L'expression mathématique associée à ce modèle est donnée par l'équation suivante:

$$q_e = \frac{X}{m} = k_F C_e^{1/n} \qquad \text{(II. 3)}$$

Où :

x : Quantité de soluté adsorbée (mg)

m : Masse de l'adsorbant (g)

k_F : Constante de Freundlich qui donne une indication grossière sur la capacité d'adsorption de l'adsorbant. Lorsque K_F augmente, la capacité d'adsorption augmente.

L'équation de Freundlich peut être représentée sous une forme linéaire comme suit:

$$Ln\ q_e = Lnk_F + \frac{1}{n} LnC_e \qquad (II.4)$$

La forme de l'isotherme dépendra de la valeur de 1/n, qui représente l'intensité d'adsorption et qui nous donne des informations capitales quant aux mécanismes régissant l'adsorption du composé sur l'adsorbant. Selon la valeur de 1/n, on distingue les différents cas suivants (Molle, 2003):

- 1/n = 1 : l'isotherme est linéaire de type C
- 1/n > 1 : l'isotherme est convexe de type S
- 1/n < 1 : l'isotherme est concave de type L
- 1/n<<1 : l'isotherme est de type H.

Si :

- n est compris entre 2 et 10, l'adsorption est bonne (facile)
- n est compris entre 1 et 2, l'adsorption est modérément difficile
- n est inférieur à 1, l'adsorption est faible. Dans ce cas, une masse importante d'adsorbant est utilisée pour récupérer une fraction appréciable du soluté (Al-Degs, 2006).

A

Aguilar-Uscanga, B., & Francois, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in applied microbiology*, *37*(3), 268-274.

Alagesan, C. M., Pannerselvam, A., & Subbu Rathinam, K. M. (2016). Extraction, optimization and characterization of chitosan from Penicillium chrysogenum. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, *3*, 19-26.

Al-Degs, Y. S., El-Barghouthi, M. I., Issa, A. A., Khraisheh, M. A., & Walker, G. M. (2006). Sorption of Zn (II), Pb (II), and Co (II) using natural sorbents: equilibrium and kinetic studies. *Water research*, *40*(14), 2645-2658.

Ospina Álvarez, S. P., Ramírez Cadavid, D. A., Escobar Sierra, D. M., Ossa Orozco, C. P., Rojas Vahos, D. F., Zapata Ocampo, P., & Atehortúa, L. (2014). Comparison of extraction methods of chitin from Ganoderma lucidum mushroom obtained in submerged culture. *BioMed research international*, *2014*.

Amorim, R. V. S., Melo, E. S., Carneiro-da-Cunha, M. G., Ledingham, W. M., & Campos-Takaki, G. M. (2003). Chitosan from Syncephalastrum racemosum used as a film support for lipase immobilization. *Bioresource technology*, *89*(1), 35-39.

Araki, Y., & Ito, E. (1975). A pathway of chitosan formation in Mucor rouxii: enzymatic deacetylation of chitin. *European Journal of Biochemistry*, *55*(1), 71-78.

Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., ... & Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current chemical biology*, *3*(2), 203-230.

Arcidiacono, S., & Kaplan, D. L. (1992). Molecular weight distribution of chitosan isolated from Mucor rouxii under different culture and processing conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, *39*(3), 281-286.

Atkins, E. (1985). Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates. *Journal of Biosciences*, *8*(1-2), 375-387.

Austin, P. R. (1984). Chitin solvents and solubility parameters. In *Chitin, Chitosan, and Related Enzymes* (pp. 227-237). Academic Press.

Azzaz, A. A., Jellali, S., Souissi, R., Ergaieg, K., & Bousselmi, L. (2017). Alkaline-treated sawdust as an effective material for cationic dye removal from textile effluents under dynamic conditions: breakthrough curve prediction and mechanism exploration. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(22), 18240-18256.

B

Babaa, M. R. (2004). *Contribution à l'étude de l'adsorption physique de gaz sur les nanotubes de carbone mono-et multiparois* (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1) France.

Barbosa, M. C. S., Soccol, C. R., Marin, B., Todeschini, M. L., Tonial, T., & Flores, V. (1997). Prospect for production of Pleurotus sajor—caju from cassava fibrous waste. In *Advances in Solid State Fermentation* (pp. 515-527). Springer, Dordrecht.

Barka, N. (2008). L'élimination des colorants de synthèse par adsorption sur un phosphate naturel et par dégradation photocatalytique sur TiO2 supporté. *Université Ibn Zohr Faculté des Sciences d'Agadir, Maroc*.

Bartnicki-Garcia, S. (1966). Chemistry of hyphal walls of Phytophthora. *Microbiology*, *42*(1), 57-69.

Bartnicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Reviews in Microbiology*, *22*(1), 87-108.

Bell, A. A., Hubbard, J. C., Liu, L., Davis, R. M., & Subbarao, K. V. (1998). Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of Fusarium yellows of celery. *Plant Disease*, *82*(3), 322-328.

Berezina, N. (2016). Production and application of chitin. *Physical Sciences Reviews*, *1*(9):1-8.

Bharathi, K. S., & Ramesh, S. T. (2013). Removal of dyes using agricultural waste as low-cost adsorbents: a review. *Applied Water Science*, *3*(4), 773-790.

Bizet, C., Desobry, S., Fanni, J., & Hardy, J. (1997). Composition and physical properties of the Penicillium camemberti mycelium. *Le Lait*, *77*(4), 461-466.

Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S., Cantero, D., & Webb, C. (2002). Polygalacturonase production by Aspergillus awamori on wheat in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *58*(2), 164-169.

Bockelmann, W. (2010). Secondary cheese starter cultures. *Technology of cheesemaking*, Chapter 6. Second Edition, Wiley-Blackwell, Oxford.193-230.

Boiron, P., & Périlleux, E. (1996). *Organisation et biologie des champignons*. Nathan.

Botton, B., Breton, A., Fevre, M., & Gauthier, S. (1990). Guy Ph. *Larpent JP., Reymond P., Sanglier JJ., Vayssier Y. and Veau P.," Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle",(ed) Masson, Paris*.

Leveau, J. Y., & Bouix, M. (1993). Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'interet industriel .Tome 01, Edition Lavoisier technique et documentation, Paris.

Bourgeois, C. M., Mescle, J. F., & Zucca, J. (Eds.). (1996). *Microbiologie alimentaire: tome 1-Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. tome 2-Aliments fermentés et fermentations alimentaires*. Tec & Doc Lavoisier-Paris.

Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, *28*(8), 799-808.

Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, *42*(8), 3569-3580.

Buckeridge, M. S. (2010). Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant physiology*, *154*(3), 1017-1023.

C

Cavazzoni, V., & Adami, A. (1992). Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms. *Italian journal of food science*, *4*(1), 9-15.

Cerning, J., Gripon, J. C., Lamberet, G., & Lenoir, J. (1987). Les activités biochimiques des Penicillium utilisés en fromagerie. *Le Lait*, *67*(1), 3-39.

Chabasse, D., Bouchara, J. P., Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., & Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation Biologie médicale N° 25. Bioforma edition. Paris.

Chatterjee, A., Majee, M., Ghosh, S., & Majumder, A. L. (2004). sll1722, an unassigned open reading frame of Synechocystis PCC 6803, codes for L-myo-inositol 1-phosphate synthase. *Planta*, *218*(6), 989-998.

Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A. K., & Chatterjee, B. P. (2005). Chitosan from Mucor rouxii: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry*, *40*(1), 395-400.

Chatterjee, S., Chatterjee, T., & Woo, S. H. (2011). Influence of the polyethyleneimine grafting on the adsorption capacity of chitosan beads for Reactive Black 5 from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, *166*(1), 168-175.

Cheung, W. H., Szeto, Y. S., & McKay, G. (2007). Intraparticle diffusion processes during acid dye adsorption onto chitosan. *Bioresource technology*, *98*(15), 2897-2904.

Chitour, S. E. (1981). Chimie des surfaces, Introduction à la catalyse. *Edition OPU. Alger*.

Choisy, C., Desmazeaud, M., Gueguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J. L., & Tourneur, C. (1997). Les phénomènes microbiens, In : Le Fromage, éd. A. Eck, Lavoisier Paris.

Christodoulidou, A., Bouriotis, V., & Thireos, G. (1996). Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(49), 31420-31425.

Cochrane, V. W. (1958). Physiology offungi. Wiley& Sons. *Inc., New York*.

Corradini, E., De Moura, M. R., & Mattoso, L. H. C. (2010). A preliminary study of the incorparation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. *Express Polymer Letters*, *4*(8).

Crestini, C., Kovac, B., & Giovannozzi-Sermanni, G. (1996). Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from Lentinus edodes. *Biotechnology and bioengineering*, *50*(2), 207-210.

Crini, G. (2005). Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in polymer science*, *30*(1), 38-70.

Crini, G., Guibal, E., Morcellet, M., Torri, G., & Badot, P. M. (2009). Chitine et chitosane. Préparation, propriétés et principales applications. In *Chitine et chitosane (du biopolymère à l'application)* (pp. 19-54).

Crini, G., Gimbert, F., Robert, C., Martel, B., Adam, O., Morin-Crini, N., ... & Badot, P. M. (2008). The removal of Basic Blue 3 from aqueous solutions by chitosan-based adsorbent: Batch studies. *Journal of Hazardous Materials*, *153*(1-2), 96-106.

D

Dąbrowski, A., Podkościelny, P., Hubicki, Z., & Barczak, M. (2005). Adsorption of phenolic compounds by activated carbon—a critical review. *Chemosphere*, *58*(8), 1049-1070.

Davet, P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*. Editions Quae. INRA, Paris.

Davis, L. L., & Bartnicki-Garcia, S. (1984). Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from Mucor rouxii. *Biochemistry*, *23*(6), 1065-1073.

De Groot, P. W., Ram, A. F., & Klis, F. M. (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genetics and Biology*, *42*(8), 657-675.

De Oliveira, C. E. V., Magnani, M., de Sales, C. V., de Souza Pontes, A. L., Campos-Takaki, G. M., Stamford, T. C. M., & de Souza, E. L. (2014). Effects of chitosan from Cunninghamella elegans on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (Vitis labrusca L.). *International journal of food microbiology*, *171*, 54-61.

Desmasures, N. (2014). CHEESE| Mold-ripened varieties p409-415. *Encyclopedia of Food Microbiology 2nd ed doi*, *10*.

Desmazeaud, M. J., Gripon, J. C., Le Bars, D., & Bergere, J. L. (1976). Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organismes (*Streptococcus lactis*, *Penicillium caseicolum* et *P. roqueforti*). *Le Lait*, *56*(557), 379-396.

Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M., & Tyagi, R. D. (2011). Recent advances in citric acid bio-production and recovery. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(4), 505-529.

Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M., & Tyagi, R. D. (2011). Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by Aspergillus niger. *Biochemical Engineering Journal*, *54*(2), 83-92.

Domszy, J. G., & Roberts, G. A. (1985). Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, *186*(8), 1671-1677.

Dotto, G. L., Moura, J. M. D., Cadaval, T. R. S., & Pinto, L. A. D. A. (2013). Application of chitosan films for the removal of food dyes from aqueous solutions by adsorption. *Chemical Engineering Journal*, *214*, 8-16.

Dube, H. C. (2013). *An introduction to fungi*. Scientific Publishers, India.

Dugal, S., & Gangawane, M. (2012). Metal tolerance and potential of penicillium species for use in mycoremediation. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *4*(5), 2362-2366.

E

Ebrahimzadeh, M. A., Chabra, A., Gharaei-Fathabad, E., & Pourmorad, F. (2013). Preparation of chitosan from Penicillium spp. and determination of their degree of deacetylation. Indian Journal of Biotechnology, 12: 231-235.

F

Fanni, J. (1977). *Importance de la contribution de la flore fongique dans l'accumulation du calcium et du phosphore à la surface d'un fromage à pâte molle de type camembert* (Doctoral dissertation), Thèse de docteur-ingénieur de l'Institut national polytechnique de Lorraine, Nancy.

Felt, O., Buri, P., & Gurny, R. (1998). Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, *24*(11), 979-993.

Filipkowska, U. (2012). Effectiveness of dye adsorption onto non-cross-linked and cross-linked chitosan beads. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, *17*, 43-52.

Flores, R., Barrera-Rodríguez, S., Shirai, K., & Durán-de-Bazúa, C. (2007). Chitin sponge, extraction procedure from shrimp wastes using green chemistry. *Journal of applied polymer science*, *104*(6), 3909-3916.

Franco, L. D. O., Maia, R. D. C. C., Porto, A. L. F., Messias, A. S., Fukushima, K., & Campos-Takaki, G. M. D. (2004). Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from Cunninghamella elegans (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology*, *35*(3), 243-247.

Fripiat, J., Chaussidon, J., & Jelli, A. (1971). *Chimie-physique des phénomènes de surface: Applications aux oxydes et aux silicates* (p. 173). París: Masson.

G

Gerhartz, W. (1990). General Production Methods In: Enzymes in Industry. *VCH, Co., Ltd., New York*, *67*, 723-727.

Gharieb, M. M., El-Sabbagh, S. M., Shalaby, M. A., & Darwesh, O. M. (2015). Production of chitosan from different species of zygomycetes and its antimicrobial activity. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, *6*(4), 123-130.

Giles, C. H., Smith, D., & Huitson, A. (1974). A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *Journal of colloid and interface science*, *47*(3), 755-765.

Grisaro, V., Sharon, N., & BARKAI-GOLAN, R. I. V. K. A. (1968). The Chemical Composition of the Cell Walls of Penicillium digitatum Sacc. and Penicillium italicum Whem. *Microbiology*, *51*(1), 145-150.

Guibal, E., McCarrick, P., & Tobin, J. M. (2003). Comparison of the sorption of anionic dyes on activated carbon and chitosan derivatives from dilute solutions. *Separation science and technology*, *38*(12-13), 3049-3073.

H

Hemambika, B., Rani, M. J., & Kannan, V. R. (2011). Biosorption of heavy metals by immobilized and dead fungal cells: A comparative assessment. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, *3*(5), 168-175.

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. *Biomacromolecules*, *1*(4), 746-751.

Hu, K. J., Yeung, K. W., Ho, K. P., & HU, J. L. (1999). Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of Absidia glauca. *Journal of food biochemistry*, *23*(2), 187-196.

Hussain, M. R., Devi, R. R., & Maji, T. K. (2012). Controlled release of urea from chitosan microspheres prepared by emulsification and cross-linking method. *Iranian Polymer Journal*, *21*(8), 473-479.

I

Ivshina, T. N., Artamonova, S. D., Ivshin, V. P., & Sharnina, F. F. (2009). Isolation of the chitin-glucan complex from the fruiting bodies of mycothallus. *Applied biochemistry and microbiology*, *45*(3), 313-318.

J

Gori, K., Cantor, M. D., Jakobsen, M., & Jespersen, L. (2011). Production of bread, cheese and meat. In *Industrial applications* (pp. 3-27). Springer, Berlin, Heidelberg.

Jaworska, M., & Konieczna, E. (2001). The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus Absidia orchidis. *Applied microbiology and biotechnology*, *56*(1-2), 220-224.

K

Kafetzopoulos, D., Martinou, A., & Bouriotis, V. (1993). Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from Mucor rouxii. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(7), 2564-2568.

Kannan, M., Nesakumari, M., Rajarathinam, K., & Singh, A. J. A. R. (2010). Production and characterization of mushroom chitosan under solid-state fermentation conditions. *Adv Biol Res*, *4*(1), 10-13.

Karahadian, C., Josephson, D. B., & Lindsay, R. C. (1985). Contribution of Penicillium sp. to the flavors of Brie and Camembert cheese. *Journal of Dairy Science*, *68*(8), 1865-1877.

Kasaai, M. R., Arul, J., Chin, S. L., & Charlet, G. (1999). The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *120*(3), 201-205.

Kathiresan, K., & Manivannan, S. (2006). -Amylase production by Penicillium fellutanum isolated from mangrove rhizosphere soil. *African journal of Biotechnology*, *5*(10).

Kenchington, W. (1976). Adaptation of insect peritrophic membranes to form cocoon fabrics. *The insect integument*, 497-513.

Khalaf, S. A. (2004). Production and characterization of fungal chitosan under solid-statefermentation conditions. *International Journal of Agriculture and Biology (Pakistan)*.

Khan, T. A., Peh, K. K., & Ch'ng, H. S. (2000). Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *J Pharm Pharm Sci*, *3*(3), 303-311.

Klis, F. M., Sosinska, G. J., De Groot, P. W., & Brul, S. (2009). Covalently linked cell wall proteins of Candida albicans and their role in fitness and virulence. *FEMS yeast research*, *9*(7), 1013-1028.

Kollár, R., Reinhold, B. B., Petráková, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonová, J., ... & Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall β (1→ 6)-glucan interconnects mannoprotein, β (1→ 3)-glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(28), 17762-17775.

Koller, E. (2013). *Aide-mémoire de génie chimique-4e éd*. Dunod.

Krasniewski, I., Molimard, P., Feron, G., Vergoignan, C., Durand, A., Cavin, J. F., & Cotton, P. (2006). Impact of solid medium composition on the conidiation in Penicillium camemberti. *Process Biochemistry*, *41*(6), 1318-1324.

Kubota, N., & Eguchi, Y. (1997). Facile preparation of water-soluble N-acetylated chitosan and molecular weight dependence of its water-solubility. *Polymer journal*, *29*(2), 123-127.

Kučera, J. (2004). Fungal mycelium—the source of chitosan for chromatography. *Journal of Chromatography B*, *808*(1), 69-73.

Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in polymer science*, *26*(9), 1921-1971.

Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, *8*(3), 203-226.

Kyzas, G. Z., & Lazaridis, N. K. (2009). Reactive and basic dyes removal by sorption onto chitosan derivatives. *Journal of Colloid and Interface Science*, *331*(1), 32-39.

Kyzas, G. Z., Kostoglou, M., Vassiliou, A. A., & Lazaridis, N. K. (2011). Treatment of real effluents from dyeing reactor: Experimental and modeling approach by adsorption onto chitosan. *Chemical Engineering Journal*, *168*(2), 577-585.

L

Lamberet, G., & Lenoir, J. (1976). Les caractères du système lipolytique de l'espèce *Penicillium caseicolum*. Purification et propriétes de la lipase majeure. *Le Lait*, *56*(559-560), 622-644.

Larpent-Gourgaud, M., & Sauglier, J.J. (1992). Biotechnologie : principes et méthodes. Biosciences et techniques, 67-42.

Legentil, L., Paris, F., Ballet, C., Trouvelot, S., Daire, X., Vetvicka, V., & Ferrières, V. (2015). Molecular interactions of β-(1→ 3)-glucans with their receptors. *Molecules*, *20*(6), 9745-9766.

LeHoux, J. G., & Grondin, F. R. A. N. C. I. N. E. (1993). Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology*, *132*(3), 1078-1084.

Lenoir, J. (1970). activite proteasique dans les fromages a pate molle de type camembert. *Rev Lait Franc*, 275: 231-6.

Lenoir, J., Auberger, B., & Gripon, J. C. (1979). Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. III. Caractérisation d'une protéase acide. *Le lait*, *59*(585-586), 244-268.

Lesage, G., & Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiology and molecular biology reviews*, *70*(2), 317-343.

Li, C., Lou, T., Yan, X., Long, Y. Z., Cui, G., & Wang, X. (2018). Fabrication of pure chitosan nanofibrous membranes as effective absorbent for dye removal. *International journal of biological macromolecules*, *106*, 768-774.

Lin, C. W., & Lin, J. C. (2003). Characterization and blood coagulation evaluation of the water-soluble chitooligosaccharides prepared by a facile fractionation method. *Biomacromolecules*, *4*(6), 1691-1697.

Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of bacteriology*, *180*(15), 3735-3740.

Liu, Y., Lu, F., Chen, G., Snyder, C. L., Sun, J., Li, Y., ... & Xiao, J. (2010). High-level expression, purification and characterization of a recombinant medium-temperature α-amylase from Bacillus subtilis. *Biotechnology letters*, *32*(1), 119-124.

Lo, H. F., Lin, L. L., Chen, H. L., Hsu, W. H., & Chang, C. T. (2001). Enzymic properties of a SDS-resistant Bacillus sp. TS-23 α-amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, *36*(8-9), 743-750.

M

Maghsoudi, V., Yaghmaei, S., & BEYGI, S. (2008). Influence of different nitrogen sources on amount of chitosan production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE), 27(1): 47-52.

Mahmoodi, N. M., & Mokhtari-Shourijeh, Z. (2015). Preparation of PVA-chitosan blend nanofiber and its dye removal ability from colored wastewater. *Fibers and Polymers*, *16*(9), 1861-1869.

Mahuzier, G., Hamon, D., Ferrier M., & Prognon P. (1999). Chimie Analytique (tome 2) : Méthode de séparation. 3ème édition. Elsevier Masson (edt.), 312p, Paris.

Molimard, P., & Spinnler, H. E. (1996). Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of dairy science*, *79*(2), 169-184.

Molle, P. (2003). *Filtres plantés de roseaux: limites hydrauliques et rétention du phosphore* (Doctoral dissertation, Doctorat discipline Energétique génie des procédés, Université Montpellier II), 217p. France.

Moreau, C. (1979). Nomenclature des *Penicillium* utiles à la préparation du Camembert. *Le Lait*, *59*(585-586), 219-233.

Mouchet, P. (2000). Traitement des eaux avant utilisation. Matières particulaires. Ed. Techniques Ingénieur. France.

Moussa, S. H., Tayel, A. A., & Al-Turki, A. I. (2013). Evaluation of fungal chitosan as a biocontrol and antibacterial agent using fluorescence-labeling. *International Journal of Biological Macromolecules*, *54*, 204-208.

Murphy, J. G., Rafferty, S. M., & Cassells, A. C. (2000). Stimulation of wild strawberry (Fragaria vesca) arbuscular mycorrhizas by addition of shellfish waste to the growth substrate: interaction between mycorrhization, substrate amendment and susceptibility to red core (Phytophthora fragariae). *Applied Soil Ecology*, *15*(2), 153-158.

Muzzarelli, R. A. A. (1977). Depolymerization of chitins and chitosans with hemicellulase, lysozyme, papain and lipase. *Chitin handbook*, 153-165.

Malette, W. G. (1986). Chitin in nature and technology. *Chitosan effect in nature and technology*.

N

Nadarajah, K., Kader, J., Mazmira, M., & Paul, D. C. (2001). Production of chitosan by fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *4*(3), 263-265.

Inc, N. T. (2010). Efficacite du Lysozyme dans le Contrˆolede la Croissance des Agents Pathog ‘enes des Plants de Serres. *Neova Technologies Inc.: Abbotsford, BC, Canada*.

Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., & Gow, N. A. (2008). An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(1), 67-78.

Nigam, P., & Singh, D. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, *17*(9), 770-778.

Noishiki, Y., Nishiyama, Y., Wada, M., & Kuga, S. (2005). Complexation of α-chitin with aliphatic amines. *Biomacromolecules*, *6*(4), 2362-2364.

Nouadri, T. (2011). L’α-amylase de Penicillium camemberti PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. *Diplôme de Doctorat. Université Mentouri, Constantine. 143p*.

Nwe, N., & Stevens, W. F. (2002). Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. *Biotechnology letters*, *24*(2), 131-134.

Nwe, N., & Stevens, W. F. (2004). Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, *39*(11), 1639-1642.

Nwe, N. (2004). Application of chitosan in Myanmar's agricultural sector. In *Proceedings of the 6^< th> Asia Pacific chitin and chitosan symposium, Singapore, May 23-26, 2004*.

Nwe, N., Chandrkrachang, S., Stevens, W. F., Maw, T., Tan, T. K., Khor, E., & Wong, S. M. (2002). Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. *Carbohydrate Polymers*, *49*(2), 235-237.

Nwe, N., Furuike, T., & Tamura, H. (2010). Chitin and chitosan from terrestrial organisms. *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: Biological activities and applications*, Kim S.K. (Ed.), Florida ; CRC Press. 3-10.

O

O'Herlihy, E. A., Duffy, E. M., & Cassells, A. C. (2003). The effects of arbuscular mycorrhizal fungi and chitosan sprays on yield and late blight resistance in potato crops from microplants. *Folia Geobotanica*, *38*(2), 201-207.

Ohta, K., Atarashi, H., Shimatani, Y., Matsumoto, S., Asao, T., & Hosoki, T. (2000). Effects of chitosan with or without nitrogen treatments on seedling growth in Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn. Cv. Kairyou Wakamurasaki. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, *69*(1), 63-65.

Olteanu, C. E., & Enescu, D. (2007). Chitosan involved tissue engineering and regenerative medicine. *Romanian Biotechnological Letters*, *12*(3), 3217.

Omar, H., El-Gendy, A., & Al-Ahmary, K. (2018). Bioremoval of toxic dye by using different marine macroalgae. *Turkish Journal of Botany*, *42*(1), 15-27.

Ong, S. T., & Seou, C. K. (2014). Removal of reactive black 5 from aqueous solution using chitosan beads: optimization by Plackett–Burman design and response surface analysis. *Desalination and water treatment*, *52*(40-42), 7673-7684.

Orlowski, M. (1991). Mucor dimorphism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *55*(2), 234-258.

P

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, *31*(2), 135-152.

Pedersen, H., & Nielsen, J. (2000). The influence of nitrogen sources on the α-amylase productivity of Aspergillus oryzae in continuous cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *53*(3), 278-281.

Peesan, M., Rujiravanit, R., & Supaphol, P. (2003). Characterisation of beta-chitin/poly (vinyl alcohol) blend films. *Polymer testing*, *22*(4), 381-387.

Peniston, Q. P., & Johnson, E. L. (1980). Process for the Manufacture of Chitosan. US Patent 4, 195175. *Roberts GAF (1992) Chitin Chemistry*, 54-83.

Percot, A., Viton, C., & Domard, A. (2003). Characterization of shrimp shell deproteinization. *Biomacromolecules*, *4*(5), 1380-1385.

Pitt, J. I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces. *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces.* Academic Press Inc Ltd.: Londre.

R

Rane, K. D., & Hoover, D. G. (1993). An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi. *Process Biochemistry*, *28*(2), 115-118.

Rêgo, T. V., Cadaval Jr, T. R. S., Dotto, G. L., & Pinto, L. A. A. (2013). Statistical optimization, interaction analysis and desorption studies for the azo dyes adsorption onto chitosan films. *Journal of colloid and interface science*, *411*, 27-33.

Richou, M. (2007). *Etude multi échelle des dépôts carbonés collectés dans les tokamaks Tore Supra et TEXTOR* (Doctoral dissertation) : Rayonnement et Plasmas Matériaux. Université de Provence - Aix-Marseille 160p.

Rinaudo, M., & Domard, A. (1989). Solution properties of chitosan. In Chitin and Chitosan. (Skjak-Brrek G. Anthonsen T. and Sandford P. Eds.) London, UK. Elsevier. 71-86.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, *31*(7), 603-632.

Rinaudo, M. (2007). Properties and degradation of selected polysaccharides: hyaluronan and chitosan. *Corrosion engineering, science and technology*, *42*(4), 324-334.

Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, *57*(3), 397-430.

Roca, M. G., Arlt, J., Jeffree, C. E., & Read, N. D. (2005). Cell biology of conidial anastomosis tubes in Neurospora crassa. *Eukaryotic cell*, *4*(5), 911-919.

Roer, R., & Dillaman, R. (1984). The structure and calcification of the crustacean cuticle. *American Zoologist*, *24*(4), 893-909.

Rudall, K. M. (1969). Chitin and its association with other molecules. In *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia* (Vol. 28, No. 1, pp. 83-102). New York: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

Rudall, K. M., & Kenchington, W. (1973). The chitin system. *Biological Reviews*, *48*(4), 597-633.

Ruiz-Herrera, J. (1991). *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*. CRC press.

Ruiz-Herrera, J., & San-Blas, G. (2003). Chitin synthesis as a target for antifungal drugs. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, *3*(1), 77-91.

Ruiz-Herrera, J., Xoconostle-Cázares, B., Reynaga-Peña, C. G., León-Ramírez, C., & Cárabez-Trejo, A. (2006). Immunolocalization of chitin synthases in the phytopathogenic dimorphic fungus Ustilago maydis. *FEMS yeast research*, *6*(7), 999-1009.

Ruiz-Herrera, J. (2012). Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly. In J. Ruiz-Herrera (Ed.), Current Topics in Medical Mycology (3), 168–217, New York.

S

Samson, R. A., Eckardt, C., & Orth, R. (1977). The taxonomy ofPenicillium species from fermented cheeses. *Antonie van Leeuwenhoek*, *43*(3-4), 341-350.

Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F., Houbraken, J. A. M. P., & Frisvad, J. C. (2004). Phylogenetic analysis of *Penicillium subgenus Penicillium* using partial β-tubulin sequences. *Stud Mycol*, *49*(1), 175-200.

Hernández, M. S., Mendoza, C. G., & Novaes-Ledieu, M. (1993). Two different alkali-soluble a-glucans in hyphal walls of the basidiomycete Armillaria mellea. *PUBLICACIÓN DE U\SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA*, 34.

Sannan, T., Kurita, K., & Iwakura, Y. (1976). Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, *177*(12), 3589-3600.

Sietsma, J. H., & Wessels, J. G. H. (1977). Chemical analysis of the hyphal walls of Schizophyllum commune. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *496*(1), 225-239.

Slejko, F. L. (Ed.). (1985). *Adsorption technology: a step-by-step approach to process evaluation and application* (pp. 1-6). M. Dekker.

Smith, J. M. (1981). Chemical engineering kinetics (No. TP149 S58), New York

Souza Neto, F. E. D., Silva, H. C. D. A., Paiva, W. D. S., Torres, T. M., Rocha, A. C. P. D., Bezerra, A. C. D. S., & Batista, A. C. D. L. (2017). Fungal chitosan on gastrointestinal nematodes larvae of goats. *Arq. Inst. Biol.*, 01-05.

Paiva, W. D. S., & SOUZA, N. (2014). FE de; LIMA BATISTA, AC de L. Avaliação da atividade antibacteriana da quitosana fúngica. *Ciências Biológicas e da Saúde. PerspectivasOnline*, *13*(4), 37-43.

Streit, F., Koch, F., Laranjeira, M., & Ninow, J. L. (2009). Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*(1), 20-25.

Sun, X., Liu, Z., Qu, Y., & Li, X. (2007). The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. In Biotechnology for Fuels and Chemicals (pp. 239-248). Humana Press.

Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. A. Q. (1997). Mycelia of Mucor rouxii as a source of chitin and chitosan. Food Chemistry, 60(4), 605-610.

T

Tai, C., Li, S., Xu, Q., Ying, H., Huang, H., & Ouyang, P. (2010). Chitosan production from hemicellulose hydrolysate of corn straw: impact of degradation products on Rhizopus oryzae growth and chitosan fermentation. *Letters in applied microbiology*, *51*(3), 278-284.

Tajdini, F., Amini, M. A., Nafissi-Varcheh, N., & Faramarzi, M. A. (2010). Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from Rhizomucor miehei and Mucor racemosus. *International journal of biological macromolecules*, *47*(2), 180-183.

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*(4), 239-242.

Taseli, B. K., & Gokcay, C. F. (1999). Biological treatment of paper pulping effluents by using a fungal reactor. *Water science and technology*, *40*(11-12), 93-99.

Taseli, B. K., & Gokcay, C. F. (2005). Degradation of chlorinated compounds by Penicillium camemberti in batch and up-flow column reactors. *Process Biochemistry*, *40*(2), 917-923.

Tayel, A. A., Moussa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., & Nickisch-Hartfiel, A. (2010). Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *International journal of biological macromolecules*, *47*(1), 10-14.

Thanou, M., & Junginger, H.E. (2005). Pharmaceutical applications of chitosan and derivatives. In Polysaccharides. Structural Diversity and Functional Versatility, 2nd ed (2), 661-677.

Thomas, S., Durand, D., Chassenieux C. & Jyotishkumar, P. (2013). Handbook of biopolymer-based materials: from blends and composites to gels and complex networks. John Wiley & Sons.-VCH, Verlag GmbH, Germany. 988.

Tianqi, W., Hanxiang, L. I., Manyi, W., & Tianwei, T. A. N. (2007). Integrative extraction of ergosterol,(1→ 3)-α-D-glucan and chitosan from *Penicillium chrysogenum* mycelia. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *15*(5), 725-729.

Tiwari, K. L., Jadhav, S. K., & Fatima, A. (2007). Culture condition for the production of thermostable amylase by *Penicillium rugulosum*. *Global journal of Biotechnology and Biochemistry*, *2*(1), 21-24.

Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., & Alagui, A. (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer*, *44*(26), 7939-7952.

U

Uchikoba, T., Mase, T., Arima, K., Yonezawa, H., & Kaneda, M. (2001). Isolation and characterization of a trypsin-like protease from Trichoderma viride. *Biological chemistry*, *382*(10), 1509-1513.

V

Valentin, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall, F., & Sentandreu, R. (1987). Cell wall mannoproteins during the population growth phases in Saccharomyces cerevisiae. *Archives of microbiology*, *148*(2), 88-94.

Van de Velde, K., & Kiekens, P. (2004). Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutyrylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state 13C NMR. *Carbohydrate polymers*, *58*(4), 409-416.

Vega-Negron, A. L., Alamo-Nole, L., Perales-Perez, O., Gonzalez-Mederos, A. M., Jusino-Olivencia, C., & Roman-Velazquez, F. R. (2018). Simultaneous adsorption of cationic and anionic dyes by chitosan/cellulose beads for wastewaters treatment. *International Journal of Environmental Research*, *12*(1), 59-65.

Vincent, J. F., & Wegst, U. G. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod structure & development*, *33*(3), 187-199.

Vink, E., Rodriguez-Suarez, R. J., Gérard-Vincent, M., Ribas, J. C., de Nobel, H., van den Ende, H., ... & Bussey, H. (2004). An in vitro assay for (1→ 6)-β-D-glucan synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, *21*(13), 1121-1131.

Volman, J. J., Ramakers, J. D., & Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by β-glucans. *Physiology & behavior*, *94*(2), 276-284.

W

Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.

Weiss, I. M., & Schönitzer, V. (2006). The distribution of chitin in larval shells of the bivalve mollusk Mytilus galloprovincialis. *Journal of structural biology*, *153*(3), 264-277.

Wessels, J. G. H., & Sietsma, J. H. (1981). Fungal cell walls: a survey. In *Plant Carbohydrates II* (pp. 352-394). Springer, Berlin, Heidelberg.

Wessels, J. G. H. (1994). Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual review of phytopathology*, *32*(1), 413-437.

White, S. A., Farina, P. R., & Fulton, I. (1979). Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied and Environmental Microbiology*, *38*(2), 323-328.

Wu, L., & Liu, M. (2008). Preparation and properties of chitosan-coated NPK compound fertilizer with controlled-release and water-retention. *Carbohydrate Polymers*, *72*(2), 240-247.

Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F. A., Conway, W. S., & Sams, C. E. (2005). Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(10), 3888-3894.

Y

Yang, B. Y., & Montgomery, R. (1999). Degree of acetylation of heteropolysaccharides. *Carbohydrate research*, *323*(1-4), 156-162.

Z

Zamani, A., Edebo, L., Sjöström, B., & Taherzadeh, M. J. (2007). Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. *Biomacromolecules*, *8*(12), 3786-3790.

Zhou, L., Liu, J., & Liu, Z. (2009). Adsorption of platinum (IV) and palladium (II) from aqueous solution by thiourea-modified chitosan microspheres. *Journal of hazardous materials*, *172*(1), 439-446.

Zohourian, M. M. (2005). Advances in Chitin and Chitosan Modification through Graft Copolymerization:a comprehensive review. Iranian Polymer, 14 (3): 235-265.

Partie II: Matériel et méthodes

Ce chapitre est consacré à la présentation des protocoles expérimentaux utilisés dans la préparation des différents biopolymères étudiés dans notre travail, ainsi que la caractérisation physicochimique des biopolymères extraits.

Il faut signaler qu'aucun travail n'a été cité dans la bibliographie concernant l'extraction des biopolymères (chitine/chitosane/glucane) du mycélium de la souche *Penicillium camembertii (P. camembertii)*. Les procédés adoptés dans cette étude concernent ceux proposés par les auteurs : Crestini et al (1996) pour les Basidiomycètes, Rane et Hoover (1993), Synowiecki et Al-Khateeb (1997) et Nwe et Stevens (2002) pour les Zygomycètes.

III.1. Extraction des polysaccharides

III.1.1. Effet du mode de culture sur l'isolation de la chitine et du chitosane libre

L'objectif de cette étude est l'isolation simultanée de la chitine et du chitosane libre à partir du mycélium de *P. camembertii* cultivé sur deux modes de cultures:

- Culture solide : constituée de milieu YPGA enrichi
- Culture liquide : constituée de milieu YPG enrichi sans et avec addition de l'arginine.

III.1.1.1. Description du mode opératoire de préparation des milieux de culture

a) Préparation du milieu solide YPGA enrichi

Le milieu de culture est composé de :

5 g/L d'extrait de levure, 10 g/L de peptone, 20 g/L de glucose, des phosphates (3,4 g/L de KH_2PO_4 et 3,07 g/L de NaH_2PO_4), 50 mL/L d'oligo-éléments (solution de Trinci Annexe I) et 20 g/L d'agar ; le pH est ajusté à 5 avec HCl 1 M (White et al., 1979 ; Jaworska et Konieczna 2001 ; Khalaf, 2004).

b) Préparation du milieu liquide YPG enrichi

La préparation du milieu nutritif YPG est identique à celle du milieu solide YPGA.

c) Préparation du milieu liquide YPG enrichi et additionné de l'Arginine

Il s'agit du même mode opératoire utilisé pour la préparation du milieu YPG enrichi (cité précédemment), additionné de l'Arginine à 6 g/L.

III.1.1.2. Préparation de la biomasse de *Penicillium camembertii*

Les spores lyophilisées de *P. camembertii (Pc TT033)*, offertes gracieusement par l'ONALAIT de Drâa Ben Khedda, Tizi-ouzou, Algérie, ont été conservées à 4 °C avant leurs utilisations.

a) Inoculation de la souche sur milieu solide

La suspension de spores activées est obtenue par la culture des spores lyophilisées de la souche *P. camembertii* dans des boîtes de petri (de 90 mm de diamètre) sur milieu PDA (Annexe II). Après l'incubation pendant 10 jours à 25 °C, la suspension de spores activées a été récupérée dans 10 mL de milieu YPG enrichi d'oligo-éléments. La dilution a été effectuée de façon à obtenir une concentration de 2-3x10^8 spores/mL. Avant son utilisation, la suspension est conservée pendant 1 heure pour la germination des spores (Amrane et al., 1999).

1 L de milieu YPGA enrichi en d'oligo-éléments et en phosphates a été réparti équitablement dans des boites de pétri de 90 mm de diamètre. Après solidification, chaque boite a été inoculée par la suspension de spores activées à concentration de 2-3x10^8 Spores/mL, puis incubée dans une étuve à température de 25 °C (température favorable pour la croissance de la souche *P. camembertii*) pendant 6 jours (phase exponentielle de la croissance de champignon *P. camembertii* sur milieu solide) (Amrane et Prigent, 1997) (figure III.1).

b) Inoculation de la souche dans le milieu liquide

1 L de milieu YPG enrichi, sans et avec addition de l'Arginine, a été réparti dans des flacons de 250 mL, contenant 100 mL de milieu inoculés par 5 disques de 5 mm de diamètre de mycélium *P. camembertii* cultivés au préalable sur PDA. Toutes les cultures ont été réalisées à la vitesse d'agitation de 180 tr/mn, au pH initial ajusté à 5 et à température 25 °C. La durée de la fermentation liquide a été fixée à 16 jours (phase exponentielle de la croissance de champignon *P. camembertii* sur milieu liquide) (Molimard et al., 1995) (figure III.1).

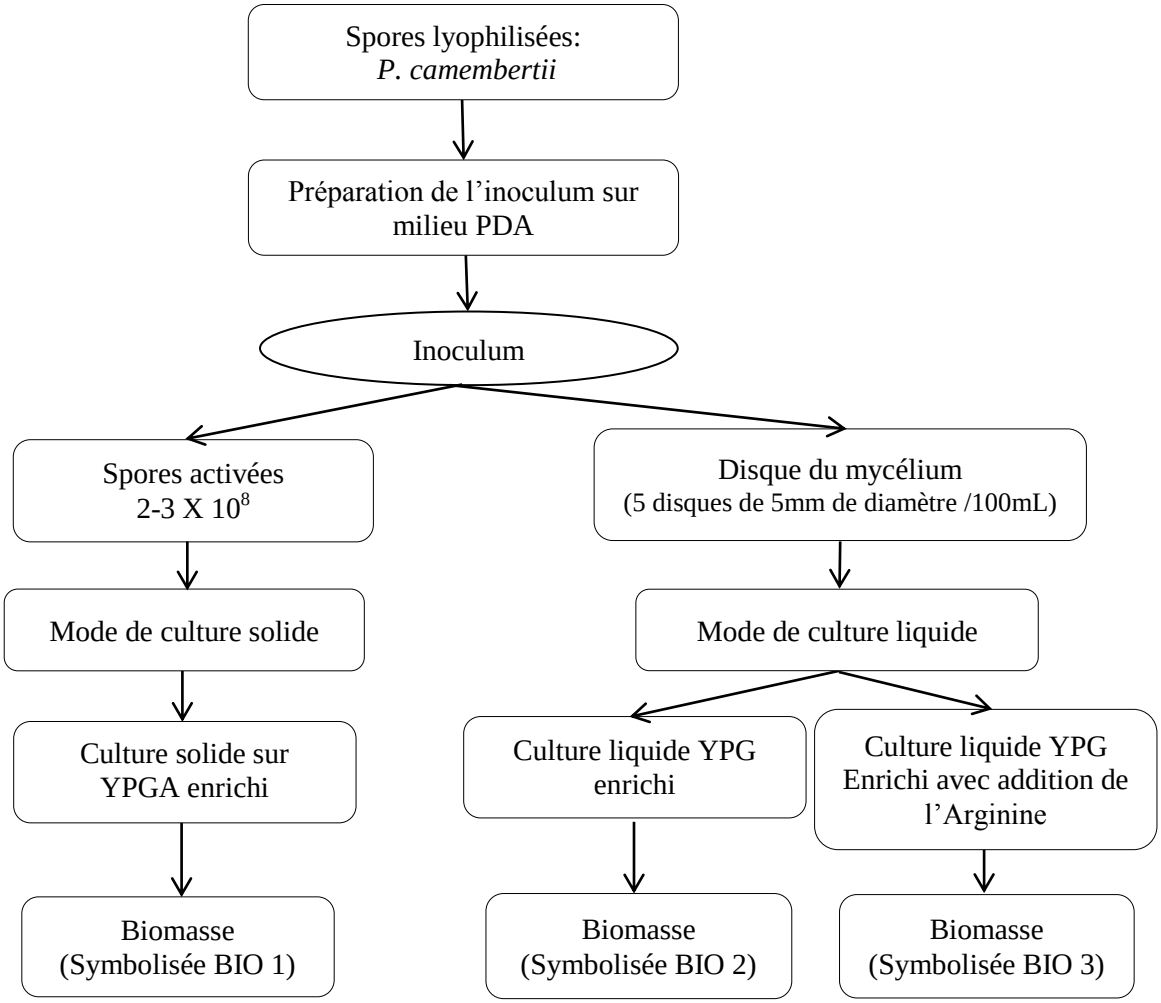


Figure III.1: Schéma de préparation de la biomasse de la souche *P. camembertii* dans les différents modes de culture

III.1.1.3. Isolation simultanée de la chitine et du chitosane libre

L'isolation de la chitine et du chitosane libre a été effectuée selon le protocole tiré des travaux de Synowiecki et Al-Khateeb (1997) (figure III.2).

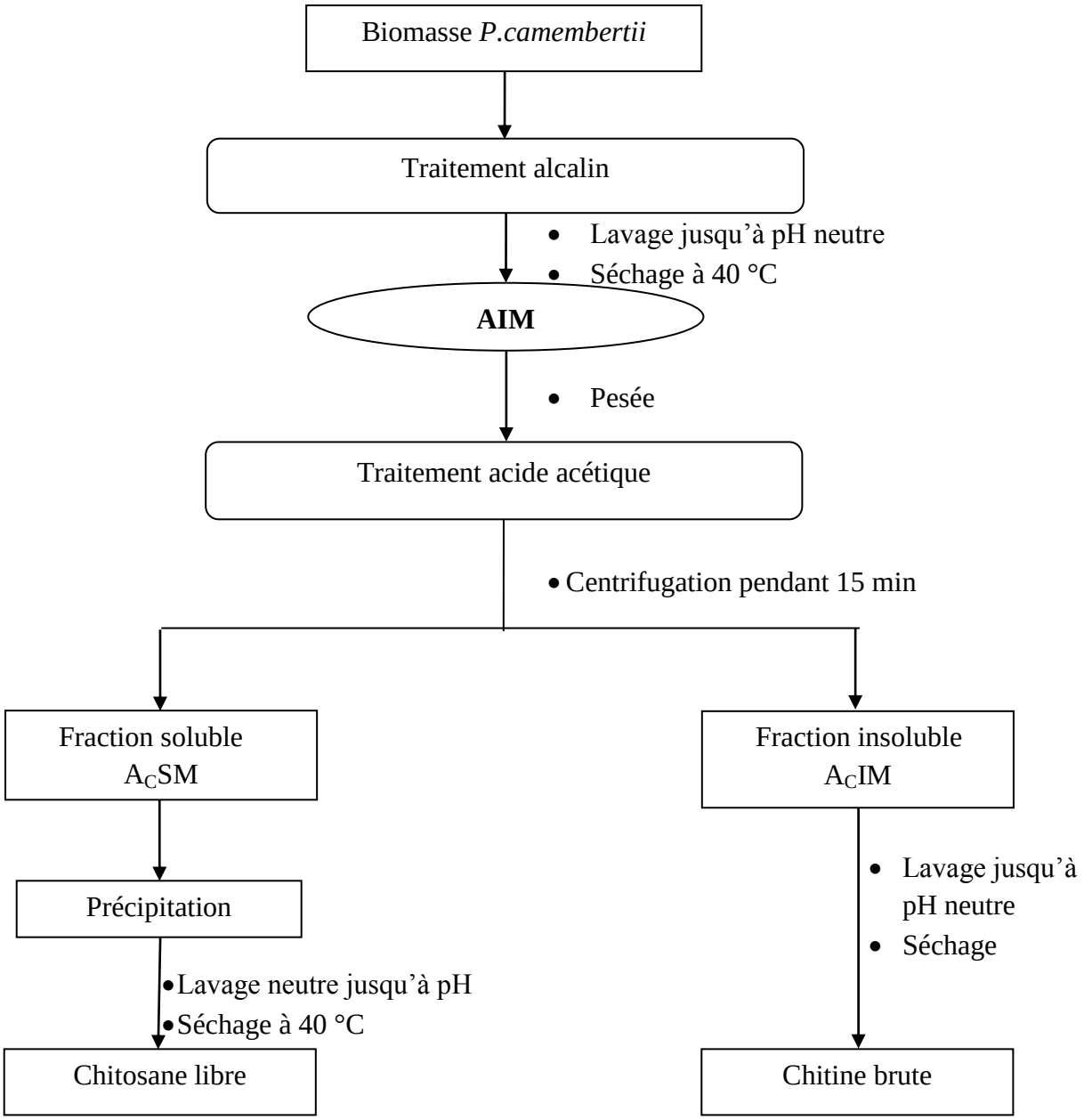


Figure III.2: Schéma du procédé adopté pour l'extraction de la chitine et du chitosane libre (Synowiecki et Al-Khateeb, 1997)

-Fraction AIM : Alcalin Insoluble Materiel (produit insoluble en milieu alcalin)

-Fraction soluble AcSM : Acetic acid Soluble Materiel (produit soluble en milieu acide)

-Fraction insoluble AcIM : Acetic acid Insoluble Materiel (produit insoluble en milieu acide).

a) Traitement alcalin

Pour chaque biomasse (BIO 1, BIO 2 et BIO 3), une quantité de biomasse a été mélangée avec NaOH 2% dans un rapport (1/30) (masse /volume). Le mélange obtenu est traité dans l'étuve à 90 °C pendant 2 heures. La récupération de la fraction insoluble dans NaOH (symbolisée par AIM) a été réalisée par centrifugation à une vitesse de 4000 tr/min pendant

15 min. La fraction AIM est ensuite lavée avec de l'eau distillée jusqu'à pH stable, séchée à l'étuve à 40 °C et pesée.

b) Traitement acide

Des quantités de AIM sèches ont été mélangées à la solution d'acide acétique 10% puis chauffées à 60 °C pendant 6 heures. La fraction insoluble dans l'acide acétique (AcIM) a été extraite par centrifugation à une vitesse de 4000 tr/min pendant 15 min, puis lavée à l'eau distillée jusqu'à pH stable, séchée à l'étuve à 40 °C et pesée. Le pH du surnagent (fraction soluble dans l'acide acétique : AcSM) a été ajusté à 10 par NaOH 30 M. Le précipité obtenu est lavé avec de l'eau distillée jusqu'à un pH stable et séché à l'étuve à 40 °C jusqu'au poids constant puis pesé.

III.1.1.4. Caractérisation des fractions AcIM par spectrométrie FTIR

Des analyses FTIR ont été réalisées pour les fractions AcIM. Les spectres obtenus ont été comparés à celui de la chitine commerciale. L'enregistrement des spectres IR a été effectué grâce à un spectromètre FTIR de marque Agilent Technologies Cary 630 FTIR.

III.1.2. Effet de la température dans la production de la chitine et du chitosane libre par la culture solide de *Penicillium camembertii* sur un milieu extrait de levure-peptone-glucose (YPGA)

L'objectif de cette étude originale est de démontrer l'influence de la température de croissance du champignon, située entre 20 à 28 °C, sur la production de la chitine et du chitosane à partir de la paroi cellulaire du *P. camembertii* cultivé sur milieu solide YPGA.

III.1.2.1. Conditions de culture

Les spores activées de *P. camembertii* sont utilisées pour l'ensemencement de 2 L de milieu YPGA enrichi d'oligo-éléments et répartis équitablement dans environ une centaine de boîtes de pétri. La croissance microbienne a été suivie pendant 6 jours et à 3 températures d'incubation: 20 ; 25 et 28 °C. Cet intervalle a été choisi car les températures sont toutes favorables à la croissance mycélienne (Choisy et al., 1984). Pour chaque température, 3 à 5 répétitions ont été réalisées afin de calculer l'écart type.

A la fin de la durée d'incubation, pour chaque température, le mycélium a été séparé manuellement du milieu gélosé. Différents traitements ont été appliqués pour la production de

la biomasse mycélienne: lavage à l'eau distillée, séchage à 40 °C, broyage et tamisage pour l'obtention de particules de diamètre inférieur à 850 µm.

III.1.2.2. Extraction des biopolymères

Pour l'extraction de la chitine et du chitosane libre, nous avons adopté le protocole des auteurs Rane et Hoover (1993) et Crestini et al (1996).

a) Traitement alcalin

Pour chaque température d'incubation, une quantité de biomasse a été mélangée à un volume de NaOH 1 M dans un rapport (1/30) (masse/volume). Le mélange est traité dans l'autoclave de marque PB INTERNATIONAL à 120 °C pendant 20 minutes. La récupération de la fraction insoluble (symbolisée par AIM) a été réalisée par centrifugation à une vitesse de 12000 tr/min pendant 15 minutes. Elle est ensuite lavée avec de l'eau distillée jusqu'à pH stable, séchée à l'étuve à 40 °C puis pesée.

b) Traitement à reflux acide

Pour chaque température d'incubation, une quantité de AIM a été mélangée avec un volume de la solution d'acide acétique à 2% dans un rapport de (1/40) (masse/volume) puis chauffé à 95 °C pendant 8 heures sous reflux. La fraction insoluble dans l'acide acétique (symbolisée par AcIM) a été extraite par centrifugation à une vitesse de 14000 tr/min pendant 15 minutes, lavée à l'eau distillée jusqu'à pH stable, séchée à l'étuve à 40 °C puis pesée.
Le pH du surnagent (fraction soluble dans l'acide acétique, symbolisée par AcSM) a été ajusté à 10 par NaOH 2 M. Le précipité obtenu est lavé avec de l'eau distillée jusqu'à un pH stable et séché à l'étuve à 40 °C jusqu'au poids constant puis pesé.

III.1.2.3. Analyses

III.1.2.3.1. Observation au microscope optique

La détermination des moisissures fait appel aux caractères morphologiques des hyphes: couleur, présence ou non de cloisons, diamètre approximatif, structures particulières et structures de reproduction.
Les études microscopiques sont réalisées à partir d'un échantillon de mycélium monté entre lame et lamelle dans une goutte d'eau ou d'un colorant.

III.1.2.3.2. Caractérisation physico-chimique des biomasses

a) Calcul de la matière sèche (MS)

La méthode consiste à faire sécher dans une étuve (105 °C, 5 h) 2 g du mycélium introduit dans un creuset, préalablement pesé. Les valeurs de MS, exprimées en pourcentage, sont calculées par l'équation (III. 1) (Amariglio, 1986) :

$$MS = \left(\frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}\right) \times 100 \qquad \text{(III. 1)}$$

M_0 : Masse du creuset vide (g)

M_1 : Masse du creuset avec le produit avant séchage (g)

M_2 : Masse du creuset avec le produit après séchage (g).

b) Détermination du taux des cendres

La prise d'essai, ayant servi à la détermination de la matière sèche, est suivie par une calcination dans un four à moufle à 550 °C pendant 5 heures. Les cendres, exprimées en pourcentage de masse, sont calculées par l'équation (III. 2) (Audigié et al., 1984):

$$Taux\ de\ cendres = \left(\frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}\right) \times 100 \qquad \text{(III. 2)}$$

M_0 : Masse du creuset vide (g)

M_1 : Masse du creuset avec le produit avant calcination

M_2 : Masse du creuset avec le produit après calcination.

c) Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH est déterminé pour une suspension de biomasse dans de l'eau distillée dans un rapport de 1/10 (masse/volume) après 3 heures à l'aide d'un pH mètre.

III.1.2.3.3. Analyses spectroscopique et micrographique

a) Spectroscopie Infra Rouge ATR

La spectroscopie IR constitue une méthode de choix pour identifier les groupements fonctionnels présents à la surface des différents produits obtenus dans les 03 températures: 20 ; 25 et 28 °C (biomasses, fractions AcSM et fractions AcIM).

En fonction du traitement chimique utilisé, les spectres obtenus ont été comparés au spectre du chitosane commercial ou à celui de la chitine commerciale. L'enregistrement des spectres IR a été effectué grâce à un spectromètre ATR de marque BRUKER, modèle TENSOR 27 avec un balayage de 500-4000 cm^{-1}.

b) Détermination du degré de désacétylation par spectroscopie ATR

La méthode la plus simple et la plus rapide pour calculer le degré DA est celle de la spectroscopie IR proposée par Khan et al (2000). Le degré DA des échantillons a été déterminé en utilisant la formule suivante **(**Brugnerotto et al., 2001) :

$$DDA = 100 - [\frac{(A_{1320}/A_{1420}) - 0{,}3822}{0{,}03233}\ ] \qquad \text{(III.3)}$$

A_{1320} : Absorbance à 1320 cm^{-1} correspondant à l'amide III

A_{1420} : Absorbance à 1420 cm^{-1} correspondant à la déformation symétrique de CH_3 et CH_2

Brugnerotto et al (2001) ont signalé que le DDA déterminé à partir du ratio A_{1320}/A_{1420} se rapproche du DDA déterminé à partir de la RMN (^1H) et les spectres RMN (^{13}C) pour toute la gamme des DDA. L'explication donnée est que les intensités et les positions des bandes apparues à 1320 et 1420 cm^{-1} n'ont pas été changées par l'humidité et les liaisons hydrogène.

c) Microscope Electronique à Balayage (MEB)

L'observation de la morphologie des différents produits obtenus dans les trois températures: 20 ; 25 et 28 °C (biomasses, fractions AIM, fractions AcSM et fractions AcIM) a été effectuée au grossissement de 10 µm. L'appareil utilisé est de type ESEM XL30, marque PHILIPS. En fonction du traitement chimique utilisé, les micrographies obtenues ont été comparées à la micrographie du chitosane commercial ou à celle de la chitine commerciale.

III.1.2.4. Etude de la désacétylation des chitines

Les chitines brutes isolées (fractions AcIM) ont subi des traitements de désacétylation selon le mode opératoire tiré des travaux de Kadouche (2013). Pour cela: 1 g de fraction AcIM sec est mis en suspension dans 50 mL de la solution NaOH 40% à température 35 °C pendant 7 jours. Les produits sont ensuite filtrés et lavés avec de l'eau distillée jusqu'à stabilité du pH, puis séchés à l'étuve à 40 °C jusqu'au poids constant et pesés. La fraction AcIM (température d'incubation du mycélium à 25 °C) a subi un deuxième traitement basique avec les mêmes conditions (40% NaOH à 35 °C pendant 7 jours).

III.1.2.4.1. Caractérisation des produits préparés

a) Test de solubilité des chitines désacétylées

L'une des caractéristiques du chitosane par rapport à la chitine est sa solubilisation en milieu acide dilué. L'acide le plus fréquemment utilisé est l'acide acétique (Crini et al., 2009).

En général, le chitosane est parfaitement soluble à pH 3-4 mais également soluble dans des solutions diluées (0,1-1%) d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique. En effet, les groupements aminés (NH_2) du chitosane sont protonés à partir du pH 3-4 et le polymère, chargé positivement (NH_3^+), devient soluble. Grâce à cette propriété, il est possible de confirmer avec certitude que les produits préparés sont des chitosanes (Austin, 1984).
Dans cette étude, 50 mg de chitine désacétylée a été solubilisée dans 50 mL d'acide acétique à 1% (v/v) (Zemmouri et al., 2011).

b) Analyse de la fraction AcIM désacétylée par FTIR

Les analyses FTIR ont été réalisées pour la fraction AcIM à température d'incubation de 25 °C, désacétylée 2 fois pendant 7 jours à 35 °C. Le spectre obtenu est comparé à celui du chitosane commercial. L'enregistrement des spectres IR a été effectué grâce à un spectromètre FTIR de marque Agilent Technologies Cary 630 FTIR.

III.2. Application du chitosane fongique dans l'élimination du colorant bleu de méthylène (BM)

III.2.1. Préparation des membranes de chitosane

0,5 g de poudre de chitine fongique désacétylée (milieu solide YPGA, température d'incubation 28 °C) sont dispersés dans 25 mL de la solution d'acide acétique à 1% (v/v) ; sous agitation continue à 1200 tr/min à l'aide d'un agitateur magnétique pendant une nuit et à une température ambiante pour obtenir un mélange homogène. Ensuite, 30 µL de glycérol ont été ajoutés sous la même agitation (1200 tr/min). Tout le volume a été versé dans une boite de pétri de 7,5 cm de diamètre. Après évaporation du solvant, réalisée dans une étuve réglée à température 40 °C, la solution de soude à 2% a été mise en contact avec la membrane formée au fond de la boîte pendant une durée de 1 heure de façon à garantir leur insolubilité et leur neutralité. Après filtration, la membrane a subi plusieurs lavages avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention de la neutralité des eaux (Muzzarelli, 1977 ; Benbettaïeb et al., 2014). En vue de la comparaison, une membrane de chitosane commercial (d'origine marine) a également été préparée dans les mêmes conditions que celle d'origine fongique.

III.2.2. Application des membranes de chitosane dans l'élimination du colorant bleu de méthylène (BM)

III.2.2.1. Préparation et analyse des solutions d'adsorbat

a) Nature du colorant

Le bleu de méthylène (BM) a été choisi comme colorant organique modèle en raison de sa disponibilité et son large utilisation en laboratoire comme colorant de teinture de la soie, du coton et du bois. Comme tous les colorants, il se caractérise par sa persistance, sa toxicité et son pouvoir d'accumulation dans le milieu naturel. Le colorant BM appartient à la grande famille des colorants cationiques. Il est caractérisé par la formule chimique $C_{16}H_{18}ClN_3S$, d'un poids moléculaire de 320 g/mol. Sa structure chimique est donnée dans la figure III.3 :

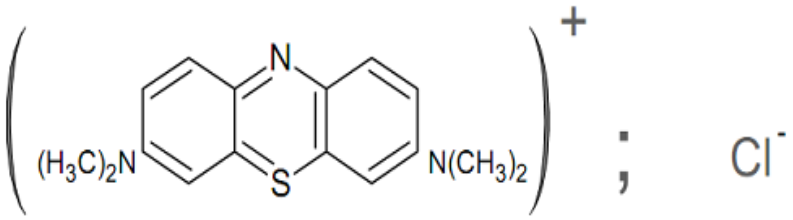


Figure III.3: Structure chimique du colorant bleu de méthylène

b) Méthode de dosage

Les analyses sont effectuées par un spectrophotomètre UV-Visible à mono faisceaux de marque BIOTECH ENGINEERING MANAGEMENT CO. LTD. (UK).

Les échantillons sont analysés à une longueur d'onde maximale correspondant au maximum d'absorption du colorant (λ_{max}). Cette valeur de λ_{max} a été déterminée après balayage des longueurs d'ondes comprises entre 400 et 700 nm sur un échantillon de solution du colorant (Annexe III). Avant chaque analyse, l'établissement d'une courbe d'étalonnage est réalisée afin de déterminer la concentration résiduelle du colorant traité par les membranes préparées.

A partir d'une solution mère du colorant BM de concentration 1 g/L, une série de solutions de concentrations bien déterminées (de 1-8 mg/L) a été préparée par dilution successive. La droite d'étalonnage est ainsi déterminée (Annexe IV).

III.2.2.2. Essais d'élimination de colorant

Tous les essais expérimentaux réalisés contribuent essentiellement à l'évaluation de l'efficacité des membranes préparées dans l'élimination du colorant BM.

Les essais d'élimination du colorant BM ont été effectués en mode batch. Pour chaque essai expérimental, une masse de membrane est mise en contact avec 100 mL de colorant BM sous agitation constante. Les différents paramètres étudiés sont :

- Effet du temps de contact à différentes concentrations initiales du BM
- Effet du pH de la solution
- Effet de la masse des membranes
- Effet de la température

L'évaluation de l'efficacité d'adsorption est réalisée par la détermination du taux d'élimination du colorant BM par la membrane.

✓ Le taux d'élimination est calculé à l'aide de la relation :

$$E\ (\%) = \frac{C_0 - C_e}{C_0} X100 \qquad \text{(III.4)}$$

C_0 : Concentration initiale (mg/L)

C_e : Concentration à l'équilibre (mg/L)

C_e : Concentration à l'équilibre (mg/L)

III.3. Amélioration du rendement de la chitine et du chitosane libre par la méthode des plans d'expériences en utilisant un plan factoriel complet (PFC)

L'objectif de cette étude est d'optimiser la production de la chitine et du chitosane libre par la méthode de la planification des expériences en utilisant un plan factoriel complet (PFC). Les paramètres étudiés sont : la température, la durée, les oligo-éléments et la source azotée (rapport extrait de levure /peptone).

III.3.1. Présentation des plans d'expériences

Un plan d'expérience est une approche statistique permettant de maîtriser un problème à plusieurs paramètres tout en suivant un programme préconçu des différentes expériences qu'on doit effectuer. Il a pour but de minimiser le nombre d'essais pour obtenir des résultats fiables et qui reflètent la variation réelle du phénomène étudié en fonction des divers facteurs opératoires (Ozil, 1997 ; Goupy, 2006).

En général, la méthode des plans d'expériences consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou de plusieurs facteurs à chaque essai. Cette méthodologie permet de détecter

les interactions entre les facteurs et détermine le réglage dit optimal de ces facteurs par rapport à une réponse (Goupy, 1990 ; Vial et Jardy, 1998).

III.3.2. Modélisation

La modélisation est l'objet même du plan d'expérience, elle permet, une fois que les facteurs influents sont identifiés, de trouver la forme de cette influence et l'équation ou la fonction qui décrit les variations du phénomène étudié en fonction des facteurs influents (Goupy, 1999).

Toute réponse expérimentale peut être écrite sous la forme suivante :

$$y = f(Z_1, Z_2, \ldots Z_k) + \varepsilon \qquad \text{(III.5)}$$

Avec :

y: Réponse expérimentale

Z_k : Facteurs contrôlés

ε : Erreur expérimentale

Où f est une fonction inconnue (modèle théorique) des facteurs influents contrôlés (Z_1, Z_2,…..,Z_k)

L'équation de régression obtenue sur la base de l'expérience s'écrit sous la forme suivante:

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{j=1}^{k} b_j x_j + \sum_{\substack{u,j=1 \\ u \neq j}}^{k} b_{uj} x_u x_j + \sum_{j=1}^{k} b_{jj} x_j^2 \qquad \text{(III.6)}$$

Où :

- $\hat{y}$: L'estimé (valeur prédite par le modèle) de y (valeur expérimentale)
- x_j : Coordonnées des facteurs Z_j exprimées en variables centrées réduites, (j=1,….k)
- b_0: Terme constant de l'équation de régression
- b_j: Effets linéaires
- $b_{u\,j}$: Effets d'interaction
- $b_{j\,j}$: Effets quadratiques

III.3.3.Analyse statistique

III.3.3.1. Vérification de la signification des coefficients

La procédure de calcul consiste à déterminer :

- La variance de reproductibilité qui est estimée par celle calculée au centre du domaine expérimental:

$$S_{rep}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_0}(y_i - \overline{y_0})^2}{n_0 - 1} \quad \text{(III.7)}$$

Avec :

y_i : Valeur de rendement de l'essai i

$\bar{y}_0$: Moyenne des essais au centre du domaine

n_0: Nombre d'essais répétés au centre

La variance de reproductibilité est indispensable pour estimer la signification des coefficients de l'équation de régression par le test de Student. Un coefficient est dit significatif, s'il est, pour un risque donné, significativement différent de zéro. On testera donc l'hypothèse :
H_0 = « bj = 0 », contre l'hypothèse H_1 = « bj ≠ 0 ». Pour ce faire, on calcule le rapport :

$$t_j = \frac{|b_j|}{S_{bj}} \quad \text{(III.8)}$$

Où :

t_j : Suit la loi de student

b_j : $j^{ème}$ coefficient de l'équation de régression

S_{bj}: Ecart quadratique moyen. Il est définit dans le cas d'un modèle du premier degré par :

$$S_{bj} = \frac{S_{rep}}{\sqrt{N}} \quad \text{(III.9)}$$

Pour un niveau de signification α et un nombre de degrés de liberté f (n_0-1), la table de Student relative à un test bilatéral permet d'accéder à la valeur de t_α (f = n_0-1).
Si :

- tj > t_α (f) : on rejette H_0 au risque accepté
- tj < t_α (f) : on accepte H_0 au risque accepté

Si l'hypothèse H_0 est acceptée, cela veut dire que le coefficient en question n'est pas significativement différent de zéro au risque α, donc la variable qui lui est associée n'a pas d'influence sur la réponse.

III.3.3.2. Validation du modèle

Avant d'accepter le modèle postulé, nous devons vérifier l'absence de biais. Le modèle doit décrire correctement les variations de la réponse en fonction des facteurs.

a) Recherche de biais

La recherche du biais peut se faire à l'aide du test de Fisher Snedecor, en comparant la variance résiduelle à la variance de reproductibilité. Elle est définie par :

$$F = \frac{S^2_{rés}}{S^2_{rep}} \qquad \text{(III.10)}$$

La variance de reproductibilité est donnée par l'équation (III.7):

La variance résiduelle pour (N- ℓ) degré de liberté est donnée par :

$$S^2_{rés} = \frac{\sum_{i=1}^{n_0}(y_i - \hat{y}_i)^2}{N-\ell} \qquad \text{(III.11)}$$

Avec :

$(N-\ell)$: Nombre de degrés de liberté (ℓ étant le nombre de coefficients significatifs)

Si : $F = \frac{S^2_{rés}}{S^2_{rep}} < F(0{,}95, N-\ell, n_0-1)$, alors la variance résiduelle peut être considérée comme non significativement différente de la variance aléatoire au centre du domaine et nous concluons l'absence de biais. Ce résultat signifie que la part des variations de *y* non expliquées par le modèle est aléatoire.

b) Test de signification de la régression

Lorsque le modèle est sans biais, nous pouvons effectuer le test de signification de la régression. La part des variations de y, expliquée par la régression, est-elle significativement plus grande que la part due aux variations aléatoires. Pour répondre à cette question, il suffit de calculer le rapport suivant :

$$F = \frac{\sum_{i=1}^{N}(\hat{y}_i - \bar{y})^2 \Big/ \ell-1}{\sum_{i=1}^{N}(y_i - \hat{y}_i)^2 \Big/ N-\ell} \qquad \text{(III. 12)}$$

Où : $\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^{N} y_i}{N}$ (III. 13)

Si F est supérieur à la valeur tabulée du test de Fisher F_α $(\ell-1, N-\ell)$ pour le niveau de signification α et les nombres de degrés de liberté $\ell-1$ et $N-\ell$, dans ce cas, les variables retenues pour la modélisation ont, dans leur ensemble, un effet significatif sur y et l'équation est ainsi adéquate.

c) Calcul des coefficients de détermination

La valeur du coefficient de détermination est définie par :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N}(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^{N}(y_i - \bar{y})^2} \qquad \text{(III. 14)}$$

III.3.4. Production de la biomasse fongique par la méthode de planification des expériences

III.3.4.1. Choix des paramètres opératoires

La culture solide (agar-agar) de l'espèce fongique *P. camembertii* a été réalisée à partir de paramètres dont certains sont fixes et d'autres sont variables.

- Les paramètres fixés sont :
  - La source de carbone (D-glucose) : 20 g/L
  - Les phosphates : KH_2PO_4 : 3,4g/L et NaH_2PO_4, $2H_2O$: 4g/L (Amrane et al, 1999).
  - Le pH ajusté à 5
- Les quatre paramètres variables choisis sont présentés dans le tableau III.1 et représentés par :
  - Durée de culture (Z_1) : [8j - 30j]
  - Température (Z_2) : [25 °C-35 °C]
  - Oligo-élément (Z_3) : [0 -100 mL/L]
  - Source azotée (Z_4) : extrait de levure / peptone = [0,2-1]

Ces intervalles ont été choisis à partir des travaux de Gharieb et al (2015). Ces derniers ont observé une influence significative de la production de la chitine et du chitosane lors de la culture liquide de différentes espèces de la classe des zygomycètes (*Mucor rouxii*, *Cunninghamella elegans* et *Rhizopus sp*).

Tableau III.1: Paramètres opératoires étudiés ainsi que leurs niveaux

	Niveau	
Variables	**-1**	**+1**
Z_1 : Durée (Jours)	13,5	24,5
Z_2 : Température (°C)	27,5	32,5
Z_3 : OE (mL/ L)	25	75
Z_4 : SA	0,4	0,8

III.3.4.2. Culture sur milieu solide de *Penicillium camembertii*

La production de la biomasse de *P. camembertii* consiste à l'activation des spores du champignon, suivie de son inoculation sur milieu solide YPG afin de produire de la biomasse mycélienne destinée, éventuellement, à l'isolation des polysaccharides (chitine et chitosane).
1 L du milieu YPGA enrichi en oligo-éléments et en phosphates a été réparti dans des boites de pétri. Chaque boite a été inoculée par la suspension de spores préparées précédemment.

a) Construction de la matrice des essais pour la production de la biomasse mycélienne

En vue de la production de la biomasse de *P. camembertii*, des matrices des essais ont été construites:

- Matrice des essais du plan factoriel : Ces plans possèdent un nombre de niveaux limité à deux pour chaque facteur. Toutes les combinaisons de niveaux sont effectuées au cours de l'expérimentation (tableau III.2).
- Matrice des essais au centre du domaine: Représentée dans le tableau III.3

Tableau III.2: Matrice des essais du plan factoriel complet

N° Essais	Variables réelles				Variables Codées			
	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4	x_1	x_2	x_3	x_4
1	13,5	27,5	25	0,4	-1	-1	-1	-1
2	13,5	27,5	25	0,8	-1	-1	-1	1
3	13,5	27,5	75	0,4	-1	-1	1	-1
4	13,5	27,5	75	0,8	-1	-1	1	1
5	13,5	32,5	25	0,4	-1	1	-1	-1
6	13,5	32,5	25	0,8	-1	1	-1	1
7	13,5	32,5	75	0,4	-1	1	1	-1
8	13,5	32,5	75	0,8	-1	1	1	1
9	24,5	27,5	25	0,4	1	-1	-1	-1
10	24,5	27,5	25	0,8	1	-1	-1	1
11	24,5	27,5	75	0,4	1	-1	1	-1
12	24,5	27,5	75	0,8	1	-1	1	1
13	24,5	32,5	25	0,4	1	1	-1	-1
14	24,5	32,5	25	0,8	1	1	-1	1
15	24,5	32,5	75	0,4	1	1	1	-1
16	24,5	32,5	75	0,8	1	1	1	1

Tableau III.3: Matrice des essais au centre du domaine

N° Essais	Variables réelles				Variables Codées			
	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4	x_1	x_2	x_3	x_4
1	19	30	50	0,6	0	0	0	0
2	19	30	50	0,6	0	0	0	0
3	19	30	50	0,6	0	0	0	0

b) Récupération des différentes biomasses mycéliennes

Pour chaque essai, la biomasse totale fongique a été récupérée pour un volume de 1 L de milieu YPGA. Avant l'extraction des polysaccharides, la biomasse subit un lavage à l'eau distillée, un séchage dans l'étuve à 40 °C jusqu'à la masse constante, pesée puis un broyage en fines particules de diamètre inférieure à 1 mm. Chaque biomasse produite sur milieu solide YPGA a fait l'objet d'une valorisation par isolation des polysaccharides (chitine et chitosane).

III.3.5.Extraction des polysaccharides

Pour 1 L de milieu YPGA, la masse mycélienne obtenue de chaque essai réalisé a subi des traitements chimiques (basique et acide) en vue de l'extraction de la chitine et du chitosane d'origine fongique. Le procédé des traitements utilisés est tiré des travaux de Synowiecki et Al-Khateeb (1997) dans de l'étude de l'isolement de la chitine et du chitosane du *Mocur Rouxii.*

Partie III: Résultats et discussion

IV.1. Extraction des polysaccharides

IV.1.1.Effet du mode de culture sur l'isolation de la chitine et du chitosane libre

IV.1.1.1. Production de la biomasse mycélienne

Le mycélium de *Penicillium camembertii (P. camembertii)* a été récupéré, séché à l'étuve 40 °C jusqu'au poids constant puis pesé (Tableau IV.1). Le broyage a été réalisé en vue de l'isolation des polysaccharides. Les particules de 1 à 2 mm de diamètres ont été récupérées afin de faciliter l'isolation des polysaccharides.

Tableau IV.1: Récupération des biomasses de *Penicillium camembertii*

Milieux	**Biomasses** *	**Masse en g/L**
Solide	BIO 1	12,35
Liquide	BIO 2	1,95
	BIO 3	3,40

* : 1L de milieu nutritif

BIO 1 : Biomasse de *P. camembertii* cultivée sur milieu YPGA enrichi.
BIO 2 : Biomasse de *P. camembertii* cultivée dans le milieu YPG enrichi.
BIO 3 : Biomasse de *P. camembertii* cultivée dans milieu YPG enrichi et avec addition de 6g de l'Arginine.

Le meilleur rendement en biomasse est obtenu en culture solide avec 12,35 g de biomasse/L du milieu YPGA enrichi d'oligo-élément (solution de Trinci) et en P_i (phosphates inorganiques). Le milieu liquide YPG enrichi a conduit à de faibles concentrations (1,95 g/L) même avec l'addition de l'Arginine comme source azotée (3,40 g/L).

IV.1.1.2. Extraction de la chitine et du chitosane libre

a) Traitement alcalin et acide

La chitine et le chitosane ont été extraits à partir de chaque biomasse : BIO 1 ; BIO 2 et BIO 3. Dans l'étape de traitement basique (déprotéinisation), le traitement chimique est utilisé pour détruire les liaisons chimiques covalentes entre les complexes chitine-protéine (Hamodrakas et al., 2002 ; Nakagawa et al., 2015). La solution alcaline d'hydroxyde de sodium permet aussi d'éliminer les faibles quantités de lipides et les pigments (Blackwell et Weih, 1980; Kaya et al., 2015).

Le traitement acide a été effectué pour séparer le chitosane libre, éventuellement, présent de la chitine fongique. La solubilisation du chitosane en milieu acide favorise fortement son extraction, facilitant ainsi sa séparation de la chitine. Cette étape a également contribué à l'élimination des impuretés minérales résiduelles de la chitine (Wu et al., 2004). Le tableau IV.2 suivant donne les masses obtenues des différentes fractions après chaque étape de traitement :

Tableau IV.2: Masses obtenues des différentes fractions

Echantillons	**Mode de culture**	**fraction AIM**	**fraction AcIM**	**Précipité AcSM**
		g/100g biomasse		**mg/100g biomasse**
BIO 1	Solide	13,10	10,00	6
BIO 2	Liquide	12,00	08,50	négligeable
BIO 3		10,00	08,20	négligeable

Le traitement basique par NaOH 2% des biomasses (BIO 1 ; 2 et 3) indique que la teneur en AIM est presque identique pour les trois milieux de culture: 13,1 g/100g de biomasse pour BIO 1 ; 12 g/100g de biomasse pour BIO 2 et 10 g/100g de biomasse pour BIO3. Cela veut dire que la paroi cellulaire de *P. camembertii* possède des fractions solubles en milieu alcalin à 2% avec un rendement de 80 à 90%.

Les fractions AIM ont été traitées par l'acide acétique. Selon les valeurs obtenues, nous avons remarqués qu'il y a une solubilisation de 10 à 30%. La filtration des fractions AcIM conduit à 0, 763 g/g de AIM (BIO 1) ; 0,708 g/g de AIM (BIO 2) ; 0,82 g/g de AIM (BIO 3). Ces valeurs correspondent respectivement à 0,1 g/g de BIO 1 ; 0,085 g/g de BIO 2 ; et 0,082 g/g de BIO 3, par conséquence, la chitine brute représente ≈10% de la biomasse mycélienne.

Les quantités du chitosane libre issues des différentes biomasses isolées par ajustement du pH du surnageant avec NaOH 30 M sont négligeables.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que le mycélium du *P. camembertii* contient des polysaccharides insolubles en milieu basique AIM et acide AcIM. Ce mycélium contient aussi du chitosane libre mais à de très faibles quantités. Les rendements en chitine ne sont pas

influencés par le mode de culture (milieu solide ou liquide). L'enrichissement avec les oligo-éléments et les P_i (phosphates inorganiques) ainsi qu'en Arginine a permis d'augmenter la concentration en biomasse. Par contre, il ne présente aucun effet sur la teneur en polysaccharides.

IV.1.1.3. Caractérisation de la fraction AcIM par FTIR

Les spectres d'absorption FTIR de la fraction AcIM des BIO 1 ; 2 et 3, et de la chitine commerciale sont représentés sur la figure IV.1 :

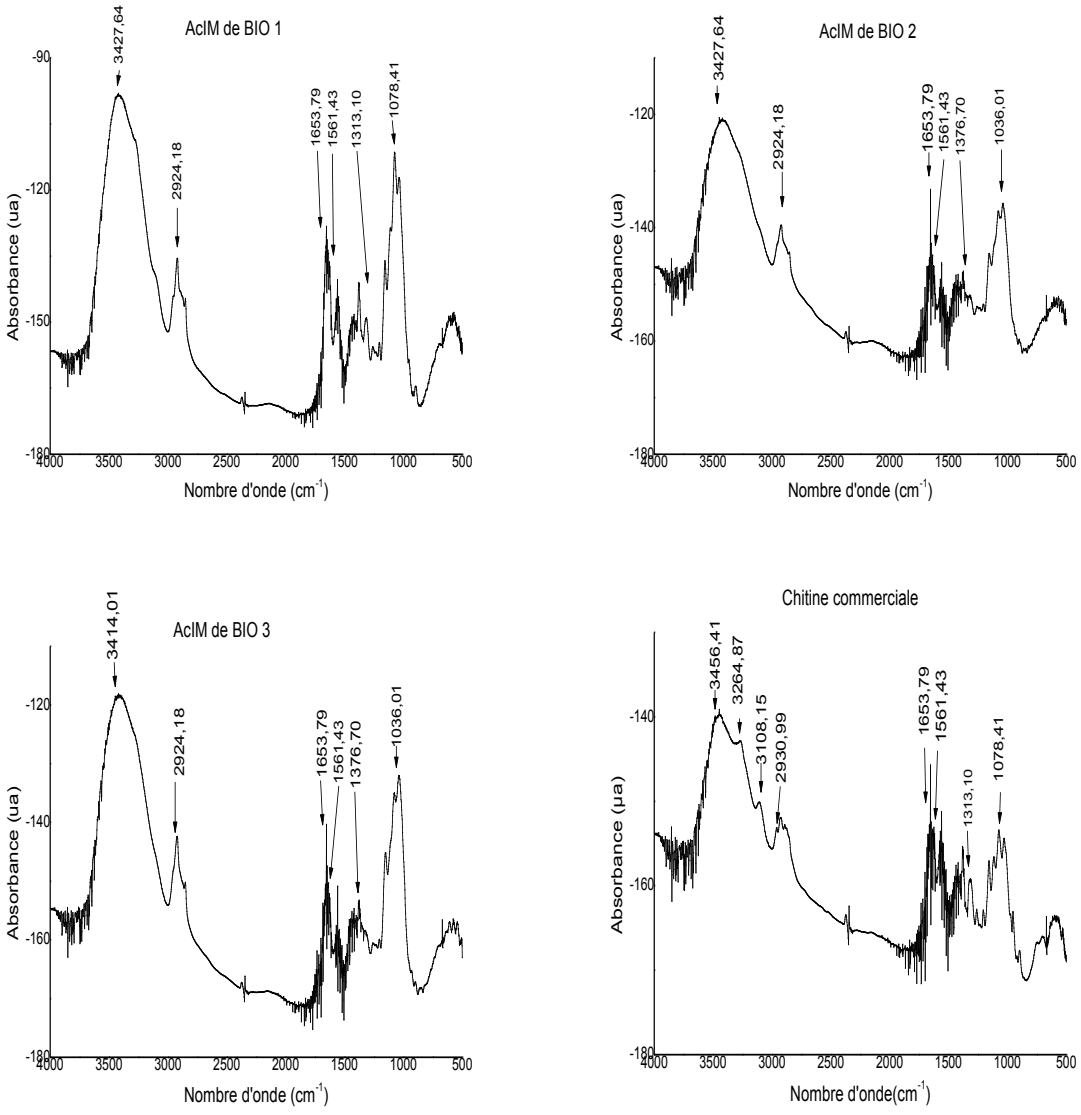


Figure IV.1: Spectre FTIR des fractions AcIM des BIO 1, BIO 2, BIO 3 et de la chitine commerciale

Les principaux pics caractéristiques de la chitine sont : 1650 cm^{-1} correspondant à l'amide I, 1583 cm^{-1} à l'amide II, 1420 cm^{-1} à la déformation symétrique de $–CH_3$ et $–CH_2$, 1320 cm^{-1} à l'amide III, 3200 à et 3100 cm^{-1} à la liaison d'hydrogène intermoléculaire $(C)_{(6)}OH…OH\text{-}C_{(6)}$.

- En observant les spectres AcIM des BIO 1 ; 2 et 3, l'apparition des pics ou des bandes d'absorption est plus nette avec la fraction AcIM sur milieu solide comparativement à la fraction AcIM dans le milieu liquide.

  Les pics caractéristiques de la chitine pure, situés à 3264,87 et 3108 cm^{-1}, sont présents dans la fraction AcIM sur milieu solide YPGA (BIO 1) contrairement à la fraction AcIM dans le milieu liquide YPG (BIO 2). Comparativement à la chitine commerciale, ces deux pics semblent être masqués par la présence d'autres polymères, les β- glucanes ; ce résultat est confirmé par Ahmad et al (2010).
- Le milieu YPG renferme, au préalable, des sources azotées provenant de peptone et de l'extrait de levure. L'ajout supplémentaire d'une autre source azotée, complètement différente, n'influe pas sur la nature des polymères dans la fraction AcIM.
- La chitine brute, produite sur milieu solide YPGA enrichi, se rapproche plus de la chitine commerciale que de la chitine produite dans le milieu liquide. L'enrichissement en oligo-éléments et les P_i (phosphates inorganiques) favorise la croissance de *P. camembertii* mais en aucun cas la quantité de chitine produite. La présence de ces oligo-éléments reste nécessaire pour que ce champignon puisse se développer dans les milieux de composition limité.

IV.1.2. Effet de la température dans la production de la chitine et du chitosane libre par la culture solide de *Penicillium camembertii* sur un milieu extrait de levure-peptone-glucose (YPGA).

IV.1.2.1. Développement du mycélium de *Penicillium camembertii*

La croissance de la souche *P. camembertii* sur milieu solide YPGA, dans les conditions de cette étude, a conduit au recouvrement maximum de la surface de la boîte de pétri qui est plus marqué aux températures 20 et 25 °C contrairement à 28 °C (figure IV.2 (a, b et c)). Selon Choisy et al (1984), la température optimale de croissance de la moisissure *P. camembertii* est située entre 20 et 25 °C. Dans cet intervalle, la croissance est plus favorisée.

IV.1.2.2. Observation au microscope optique

A l'échelle microscopique, le *P. camembertii* se distingue par son organisation en pinceaux. Le thalle, composé de filaments mycéliens septes et hyalins, porte des conidiospores ramifiés ou simples qui se terminent par un pénicille (figure IV.2 (d)). Selon Pitt (1979), l'espèce *P. camembertii* possède les caractères morphologiques suivants : Thalle floconneux blanc mais pouvant virer lentement au vert grisâtre, pâle.

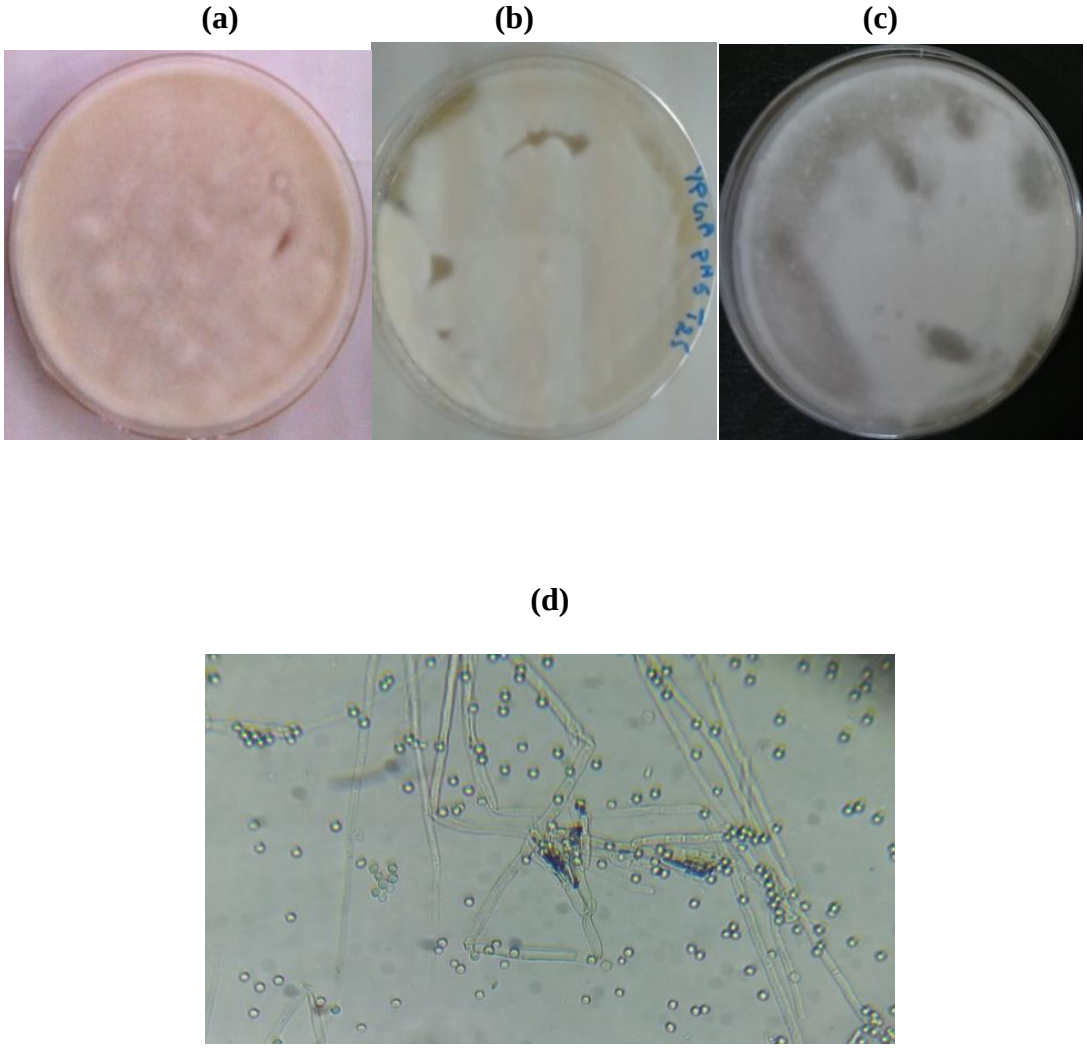


Figure IV.2: (a), (b) et (c) Mycélium condensé de la souche *Penicillium Camembertii* sur milieu YPGA après 6 jours d'incubation et à différentes températures : 20 ; 25 et 28 °C, respectivement. (d) : Observation au microscope optique (grossissement X40) de mycélium en croissance à 25°C

IV.1.2.3. Production des biomasses de *Penicillium camembertii* à différentes températures de croissance

Les concentrations des biomasses sont présentées dans la figure IV.3. Le mycélium de *P. camembertii*, développé à température 20 °C ainsi qu'à 25 °C, a donné la plus grande quantité de biomasse : 12,97 ±1,10 g/L et 12,35 ±1,56 g/L, respectivement, comparée à 28 °C où la concentration atteint une valeur de 11,63 ±1,73 g/L. Il est à signaler l'apparition d'une coloration verdâtre après séchage des différents mycéliums.

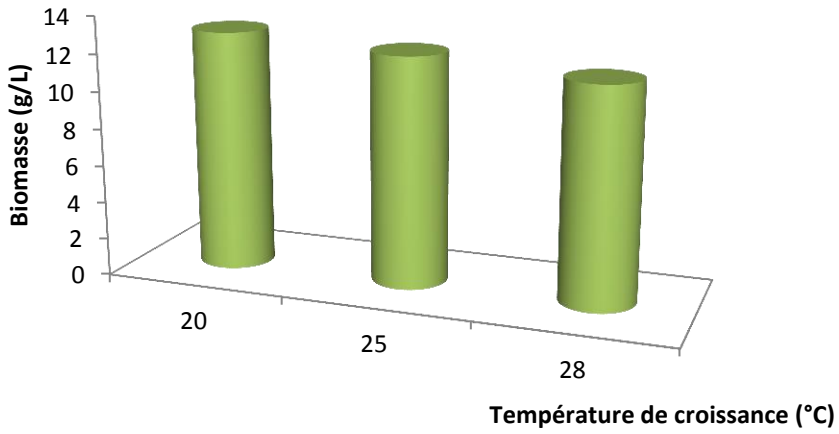


Figure IV.3: Effet de la température sur la concentration de la biomasse de *Penicillium camembertii* produite par la culture sur milieu solide YPGA pendant 6 jours

IV.1.2.4.Caractérisation physico-chimique des biomasses sèches

Les caractéristiques physico-chimiques des biomasses cultivées à différentes températures : 20 ; 25 et 28 °C sont données dans le Tableau IV.3.

La biomasse cultivée sur milieu YPGA est neutre, elle possède un pH situé entre 6,66 et 7,03 pour les trois températures.

La teneur en matière sèche (MS) est de 88,71 ; 89,15 et 87,51% du poids sec des biomasses cultivées à 20 ; 25 et 28 °C, respectivement. La température d'incubation du *P. camembertii*, comprise entre 20 et 28 °C, conduit à des taux de MS très proches. Cependant, ces valeurs sont inférieures à celles trouvées par Bizet et al (1997) pour le champignon *P. camembertii* cultivé sur un milieu à base d'agar et de composition nutritive proche de celle du fromage et à température 25 °C.

Les biomasses cultivées à différentes températures : 20 ; 25 et 28 °C renferment des quantités

faibles en minéraux, elles sont de l'ordre de 3,49 ; 5,67 et 1,2%, respectivement. Ces résultats sont compatibles avec ceux trouvés par Bizet et al (1997) pour le champignon *P. camembertii* cultivé sur un milieu à base d'agar et de composition nutritive proche de celle du fromage et à température 25 °C (soit environ 4,5 ± 0,3%). Les faibles valeurs du taux de cendre confirment que l'étape de déminéralisation n'est pas nécessaire durant le procédé d'extraction des polysaccharides à partir du mycélium de *P. camembertii* cultivé sur milieu YPGA. D'autre part, il est à signaler la faible teneur du taux de cendres pour la biomasse cultivée à 28 °C comparativement à celles qui sont cultivées à 20 et 25 °C.

Tableau IV.3: Paramètres physico-chimiques des biomasses cultivées sur milieu solide YPGA et à différentes températures

Températures / **Paramètres**	**20 °C**	**25 °C**	**28 °C**
Granulométrie	< 850µm		
Paramètres physico-chimiques*			
pH	6,66	7,03	6,90
Matière sèche (%)	88,71	89,15	87,19
Taux de cendres (%)	3,49	5,67	1,20
Coloration	Verdâtre		

* : mesurés et calculés à partir de la biomasse totale (2 L de milieu).

IV.1.2.5. Analyse structurale des biomasses par spectroscopie ATR

La figure IV.4 (a, b et c) représente les spectres ATR des biomasses cultivées à 20 ; 25 et 28 °C, respectivement. L'examen de ces spectres fait apparaitre des bandes d'absorption caractéristiques de complexe chitine-glucane.

- Les spectres des biomasses produites aux différentes températures montrent une large bande d'absorption entre 3600 et 3012 cm^{-1}, ce qui est probablement dû aux vibrations de valence des groupements O-H et N-H de la chitine et du groupement O-H du glucane (Skorik et al., 2010).
- Les biomasses produites à 20 et à 25 °C manifestent un pic d'absorption à 2925,94 et 2924,01 cm^{-1}, respectivement. Pour la biomasse produite à 20 °C, on remarque une

large bande de faible intensité entre 1446 et 1408 cm^{-1}. Dans le cas de la biomasse produite à 25 °C, on constate aussi l'apparition d'un pic d'absorption de faible intensité à 1449,56 cm^{-1}, ces pics correspondent à la vibration de valence et à la déformation des liaisons C-H de la chitine et du glucane dans le complexe chitine-glucane (Skorik et al., 2010). Dans le spectre de la biomasse produite à 28 °C, on remarque également l'apparition d'un faible pic à 2921,38 cm^{-1}, tandis que le pic à 1440 cm^{-1} est masqué.

- Les spectres des biomasses produites à 20 et 25 °C marquent un pic de faible intensité à 2851,50 cm^{-1}, ce dernier est légèrement décalé vers 2854,77 cm^{-1}dans le cas de la biomasse produite à 28 °C. Cela indique la présence de petites quantités de lipides (Ahmad et al., 2010).
- La présence de pics d'absorption de faible intensité à 1641,38 et 1635,59 cm^{-1} sur les spectres des biomasses cultivées à 20 et 25 °C, respectivement, correspondent à l'amide I de la chitine et à la vibration du groupement C-N des protéines (Ahmad et al., 2010 ; Skorik et al., 2010).
- Les pics d'absorption à 1559,80 ; 1558,82 et 1586 cm^{-1} pour les biomasses produites à 20 ; 25 et 28 °C, respectivement, correspondent à l'amide II de la chitine (Skorik et al., 2010). Les pics d'absorption à 1541,17 ; 1539,21 et 1540 cm^{-1} pour les biomasses produites à 20 ; 25 et 28 °C, respectivement, correspondent à la vibration des liaisons N-H des protéines (Kaya et al., 2015).
- Les pics de très faibles intensités à 1371,97 ; 1375,18 et 1377 cm^{-1} qui apparaissent dans les spectres des biomasses produites à 20 ; 25 et 28 °C, respectivement, sont attribués aux vibrations de la déformation des groupements CH_2 et CH_3 de la chitine.
- La présence de pics de très faibles intensités à 1303,85 ; 1312,35 et 1313 cm^{-1} sur les spectres des biomasses produites à 20 ; 25 et 28 °C, respectivement, correspondent aux vibrations de valence des liaisons C-N de l'amide III de la chitine.
- Les pics de très faibles intensités qui apparaissent à 1141,86 et 1142,76 cm^{-1} sur les spectres de la biomasse produites à 20 et 25 °C, respectivement, et le pic intense qui apparait à 1195 cm^{-1} sur le spectre de la biomasse à 28 °C sont attribués aux vibrations de valence de la liaison C-O-C et la liaison C-C de la chitine.
- Les pics d'intensité importante qui apparaissent à 1018,39 ; 1041,95 et 1069 cm^{-1} dans les spectres des biomasses produites à 20 ; 25 et 28 °C, respectivement, correspondent à la vibration de valence des liaisons C-O-H de la chitine et du glucane.

- Les pics de faibles intensités qui apparaissent à 926,90 et 930,18 cm^{-1} dans les spectres des biomasses à produites 20 et 25 °C, respectivement, ainsi que le pic intense qui apparait à 969 cm^{-1} dans le spectre de la biomasse produite à 28 °C indiquent que les unités glycosidiques de la chitine et du glucane sont liées par des liaisons β (Skorik et al., 2010).

Les observations par ATR ont permis de conclure que les biomasses cultivées sur milieu YPGA pendant 6 jours et à différentes températures 20 ; 25 et 28 °C sont constituées d'un mélange de complexe chitine-glucane dans lequel les unités monomères sont liées par des liaisons β, de protéines et de quantité minimes de lipides.

Les spectres ATR des biomasses cultivées aux températures 20 ; 25 et 28 °C sont différents. La différence est plus marquée dans le spectre à 28 °C par rapport aux autres. Cette distinction se manifeste par le masquage du groupement amide I et la présence de pics très intenses dans la zone 1500-1100 cm^{-1} pour le spectre à 28 °C, contrairement à ceux de 20 et 25 °C où le pic de l'amide I est très visible et les pics dans le domaine 1500-1100 cm^{-1} sont de très faible intensité et non séparés.

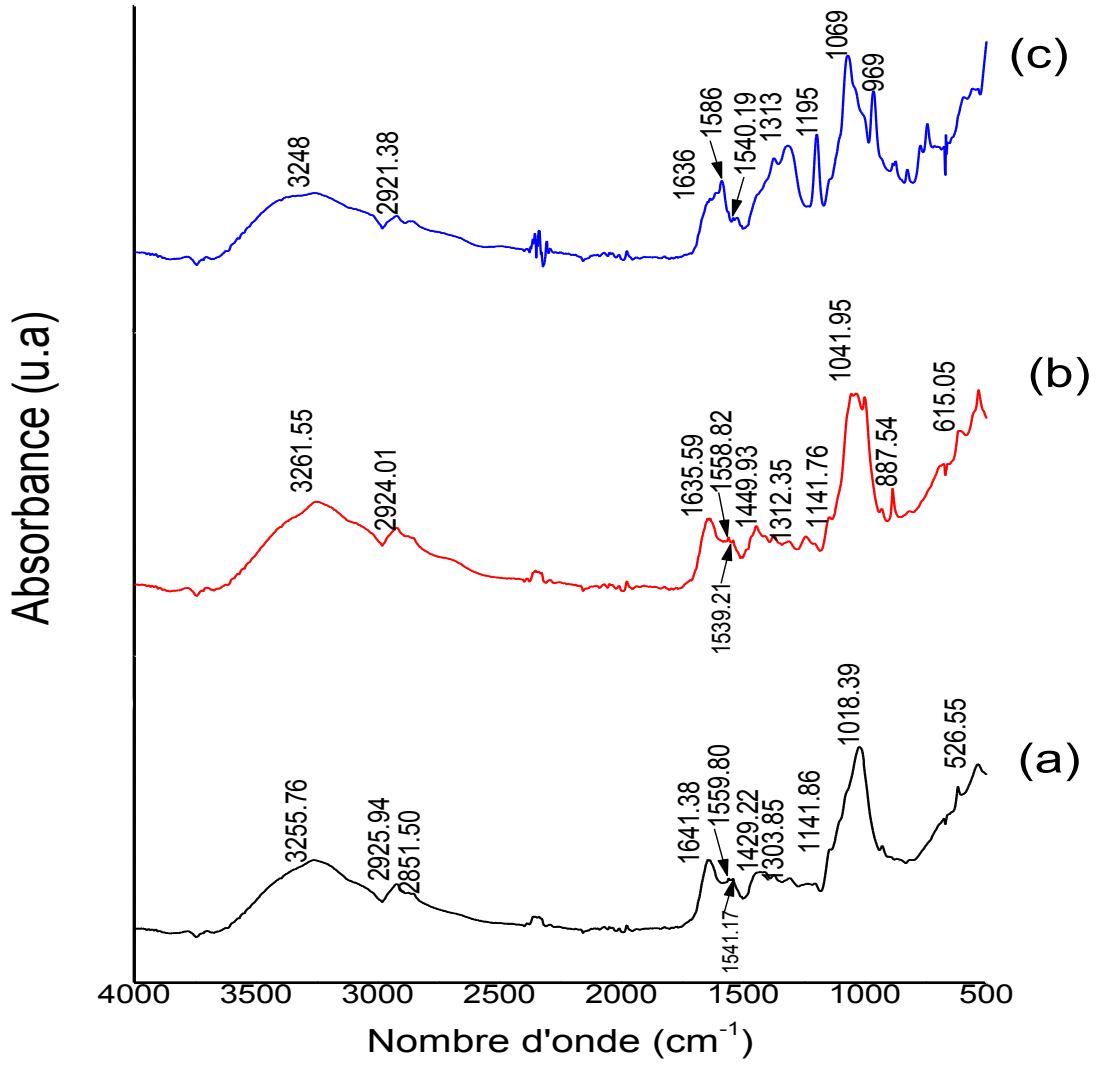


Figure IV.4: (a), (b) et (c) Spectres ATR de la biomasse cultivée sur un milieu YPGA pendant 6 jours à températures 20 ; 25 et 28 °C, respectivement

IV.1.2.6. Détermination de la morphologie par MEB

La figure IV.5 (a, b et c) représente les micrographies des différentes biomasses cultivées sur milieu YPGA pendant 6 jours à température d'incubation 20 ; 25 et 28 °C, respectivement.

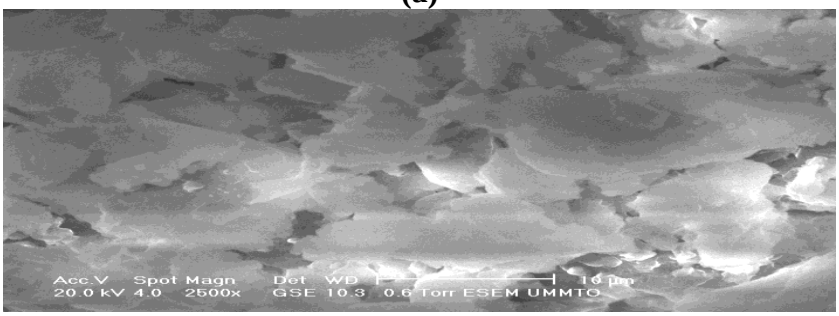
Les mycéliums condensés et séchés se présentent sous forme de granulés ou d'agrégats de particules de structures cristallines et de dimensions de l'ordre de 1 à 5 µm (figures IV.5). Cette association crée en surface une hétérogénéité et une porosité plus prononcée dans les

températures 20 et 25 °C contrairement à 28 °C.

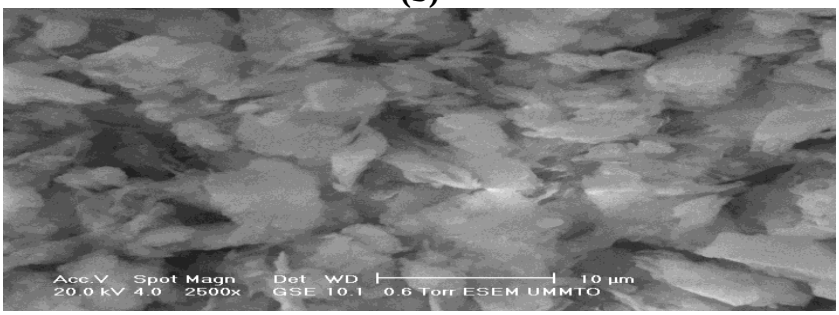
L'arrangement plus ordonné apparu sur la micrographie de la biomasse sèche cultivée, à 28 °C, explique l'apparition de plusieurs pics sur le spectre ATR contrairement aux biomasses cultivées aux températures 20 et 25 °C. Ce résultat peut être interprété par la présence de teneurs variables en chitine, glucane, protéines, minéraux et/ou lipides dans le complexe chitine-glucane identifié dans les spectres ATR.

La température de croissance de la moisissure *P. camembertii* à 28 °C dans le milieu YPGA semble améliorer la composition de la paroi cellulaire en polymères organiques doués de structure cristalline et rigide.

(a)



(b)



(c)

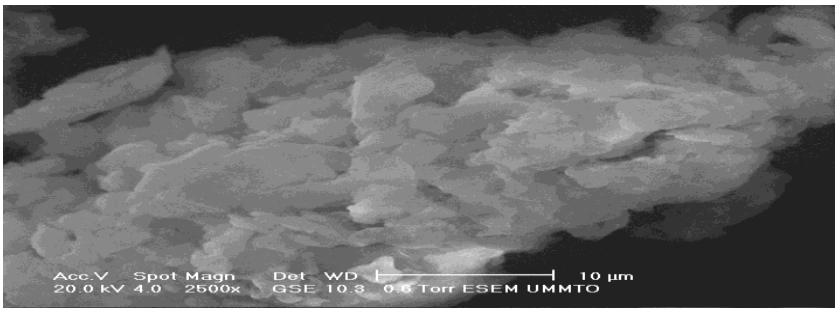


Figure IV.5: (a), (b) et (c) Micrographies MEB de la biomasse cultivée sur un milieu YPGA pendant 6 jours à températures 20 ; 25 et 28 °C, respectivement

IV.1.2.7. Traitements chimiques des biomasses

IV.1.2.7.1. Traitement alcalin (NaOH 1M) des biomasses sèches

Les masses des fractions AIM obtenues des biomasses produites à des températures différentes sont présentées dans la figure IV.6.

Le traitement alcalin 1M des différentes biomasses a réduit de façon significative la masse sèche. La diminution est de 86,33 ; 81,67 et 80,07% aux températures 20 ; 25 et 28 °C, respectivement (figure IV.6). Ce résultat est expliqué par la solubilisation en milieu basique des composés présents dans la paroi cellulaire du *P. camembertii* tels que : les protéines et autres polysaccharides (Fontaine et al., 2000).

Dans nos conditions de culture et avec un milieu YPGA enrichi d'oligo-éléments, la moisissure *P. camembertii,* développée à 20 °C, synthétise d'avantage de substances solubles en milieu basique (protéines) que de polysaccharides insolubles dans ce milieu, tels que la chitine et le glucane.

A la température moins favorable à la croissance du *P. camembertii* (28 °C), le champignon synthétise dans la paroi cellulaire des polysaccharides responsables de la rigidité, de la protection et de la résistance contre les agents extérieurs.

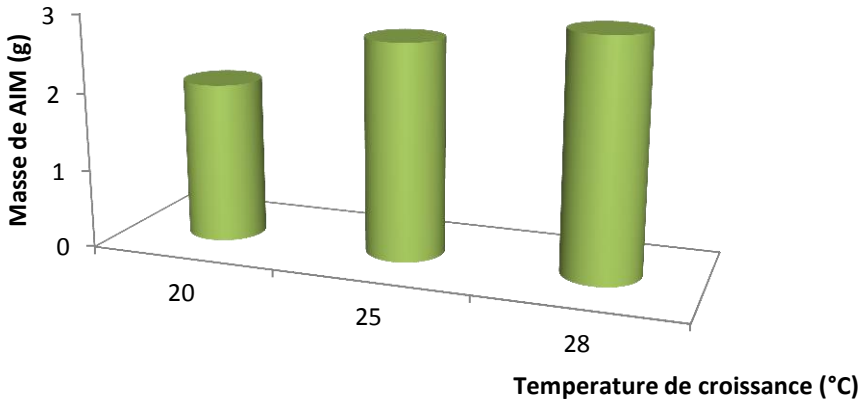


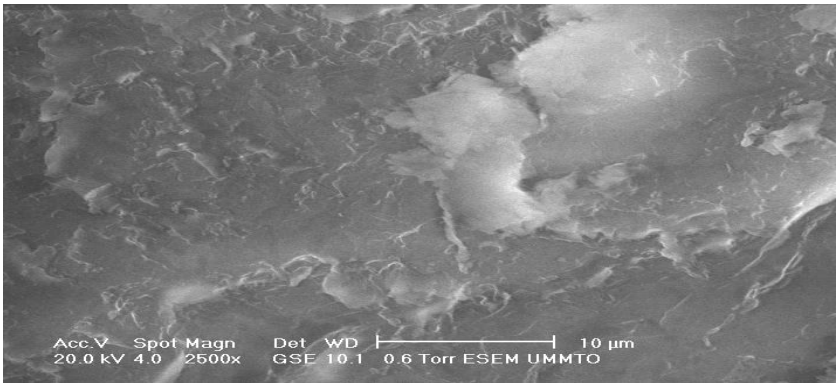
Figure IV.6: Les masses des fractions AIM obtenues à partir des biomasses cultivées sur milieu YPGA à différentes températures

IV.1.2.7.2. Analyse des fractions insolubles AIM par MEB

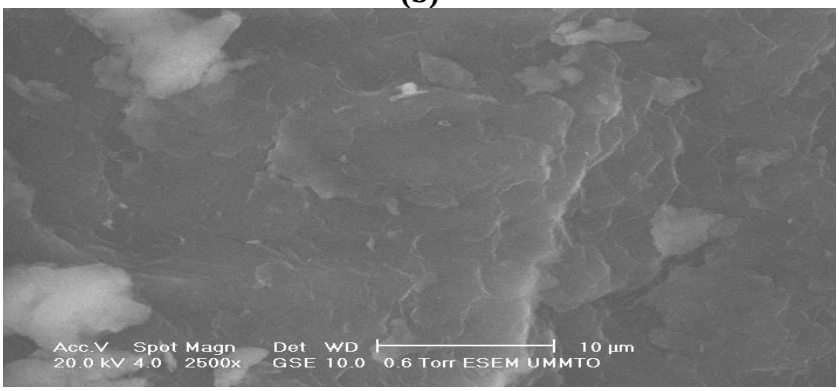
Les micrographies MEB des fractions AIM, obtenues à partir des biomasses cultivées dans le milieu YPGA à différentes températures 20 ; 25 et 28 °C, sont illustrées dans la figure IV.7. Le traitement basique 1M a modifié totalement la structure des biomasses cultivées à 20 ; 25 et 28 °C. Pour l'ensemble, il y a disparition des granulés suite à l'élimination de plus

de 80% de protéines solubles dans le milieu alcalin. Par conséquent, il y a naissance d'une forme compacte et rigide qui caractérise le complexe chitine/glucanes/chitosane libre. D'autre part, l'apparition d'une surface lisse et homogène (figures IV.7 (a, b et c)) démontre la présence de plusieurs structures fibreuses similaires et assemblées grâce à un liant.

(a)



(b)



(c)

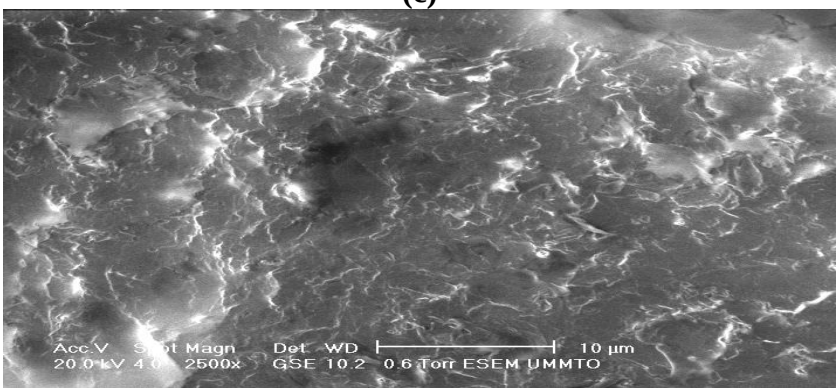


Figure IV. 7: (a), (b) et (c) Micrographies MEB des fractions AIM développées sur milieu YPGA pendant 6 jours à températures 20 ; 25 et 28 °C, respectivement

IV.1.2.7.3. Traitement acide des fractions AIM

La solubilisation des fractions AIM dans l'acide acétique 2% a permis de produire deux phases: la fraction soluble AcSM et la fraction insoluble AcIM. Après séparation, la précipitation de la fraction soluble AcSM par ajustement du pH avec NaOH 2 M a été observée pour toutes les biomasses produites. Les résultats des masses et des pourcentages massiques rapportés à la fraction AIM des différentes fractions AcIM ainsi que des précipités sont rassemblés dans le tableau IV.4.

On constate que toutes les fractions AIM sont constituées majoritairement de molécules insolubles dans l'acide acétique (81,33-89,17%) pour les températures 20 ; 25 et 28 °C. Quant à la fraction soluble, les taux de précipitation sont très faibles (<1%). Le lavage répété a occasionné des pertes de masses.

Le traitement alcalin suivi de traitement acide, appliqués aux biomasses cultivées à différentes températures (20 ; 25 et 28 °C) sur milieu YPGA enrichi d'oligo-éléments, a permis d'extraire 11,14 ; 16,32 et 17,04 (g/100g biomasse) de substances, respectivement.

Comparées aux valeurs obtenues par Yen et Mau (2006) dans la préparation de la chitine fongique à partir du pied de Shiitake selon le procédé de Kurita et al (1993), les rendements en chitine brute sont de l'ordre de 25,08 à 36,72%.

Le rendement total en chitosane obtenu dans nos travaux est comparé aux valeurs obtenues par Ebrahimzadeh et al (2013) à partir de mycélium de *Penicillium spp*. Les résultats obtenus par ces derniers varient entre 20 - 30%, la viscosité et la DDA du chitosane étaient dans la gamme de 8,9 à 11,3 cP et 47 à 65%, respectivement.

Une variation du rendement en chitosane et de ses propriétés (DDA et viscosité) a également été rapportée dans des études antérieures. White et al (1979) ont rapporté 4 à 8% de rendement en chitosane avec environ 27,3% de DA provenant de *Mucor rouxii*, Pochanavanich et suntornsuk (2002) ont enregistré 1,2 à 14% de production de chitosane à partir des espèces *Aspergillus niger*, *Rhizopus oyzae*, *Lentinus edodes* et *Pleurotus sajo-caju* avec un DDA de 84 – 90% et une viscosité de 3,1- 6,2 cP. Wang et al (2007) ont obtenu un rendement de 5,7% de chitosane et 86% de DDA pour l'espèce *Penicillium chrysogenum* et 11,3% de chitosane pour *Penicillium oxalicum*.

Il ressort de ces travaux que la chitine et le chitosane existent dans la paroi cellulaire en quantité variable et cela selon l'espèce fongique, le mode d'extraction et les conditions de culture.

Tableau IV.4: Pourcentages des fractions AcIM et AcSM obtenues pour chaque biomasse cultivée à différentes températures

Temperature (°C)	**g/100g biomasse**	**mg/100g biomasse**
	AcIM	**AcSM**
20	11,14 ± 0,15	85 ± 1,73
25	16,32 ± 0,02	87 ± 2,12
28	17,04 ± 0,06	6 ± 0,71

IV.1.2.7.4. Analyse des fractions AcIM par spectroscopie ATR

Les spectres AcIM obtenus dans des températures d'incubation de 20 ; 25 et 28°C (figure IV.8 (a, b et c)) ont donné des pics et des bandes. Ces résultats ont été comparés au spectre de la chitine commerciale (figure IV.8 (d)).

D'après la figure IV.8 (a, b et c), on remarque une similarité dans les trois spectres d'absorption. Les pics à 1645,45 ; 1641,06 et 1630,82 cm^{-1} des fractions AcIM des différentes températures d'incubation 20 ; 25 et 28 °C, respectivement, correspondent à la vibration asymétrique de valence du groupement C=O de l'amide I de la chitine (Ahmad et al., 2010).

La bande d'amide II de la chitine apparait à 1558,41 ; 1554,02 et à 1554,75 cm^{-1} sur les spectres AcIM des températures d'incubation 20 ; 25 et 28 °C, respectivement (Ahmad et al., 2010) .

L'apparition d'un pic d'absorption à 1308,98 ; 1311,18 et 1311,91 cm^{-1} pour AcIM à température d'incubation de 20 ; 25 et 28 °C, respectivement, confirme la présence de vibration de valence de la liaison C-N de l'amide III de la chitine (Ahmad et al., 2010).

Les pics intenses à 1155,38 et 1027,37cm^{-1} pour AcIM à température d'incubation de 20 °C, les pics à 1152,45 et 1027,37 cm^{-1} à température d'incubation de 25 °C, ainsi que des pics à 1153,18 et 1025,18 cm^{-1} à température d'incubation de 28 °C sont attribués aux vibrations de valence de la liaison C-O-C et C-C de la chitine et du glucane (Ahmad et al., 2010).

Selon Skorik et al (2010), les pics de faible intensité qui apparaissent à 892,78 ; 890,59 et à 894,98 cm^{-1} sur les spectres de AcIM des températures d'incubation 20 ; 25 et 28 °C, respectivement, indiquent que les unités glycosidiques de la chitine sont liées par des liaisons β.

La zone située entre 1100 et 900 cm^{-1} présente des pics plus visibles dans la chitine commerciale que dans les différentes fractions AcIM. Ce résultat démontre que nos produits représentent de la chitine liée dite chitine brute selon les travaux de Kaya et al (2015). Le champignon étudié (*P. camembertii*), appartenant à la classe des ascomycètes, est composé de complexe chitine-glucane (Ruiz-Herrera, 1992).

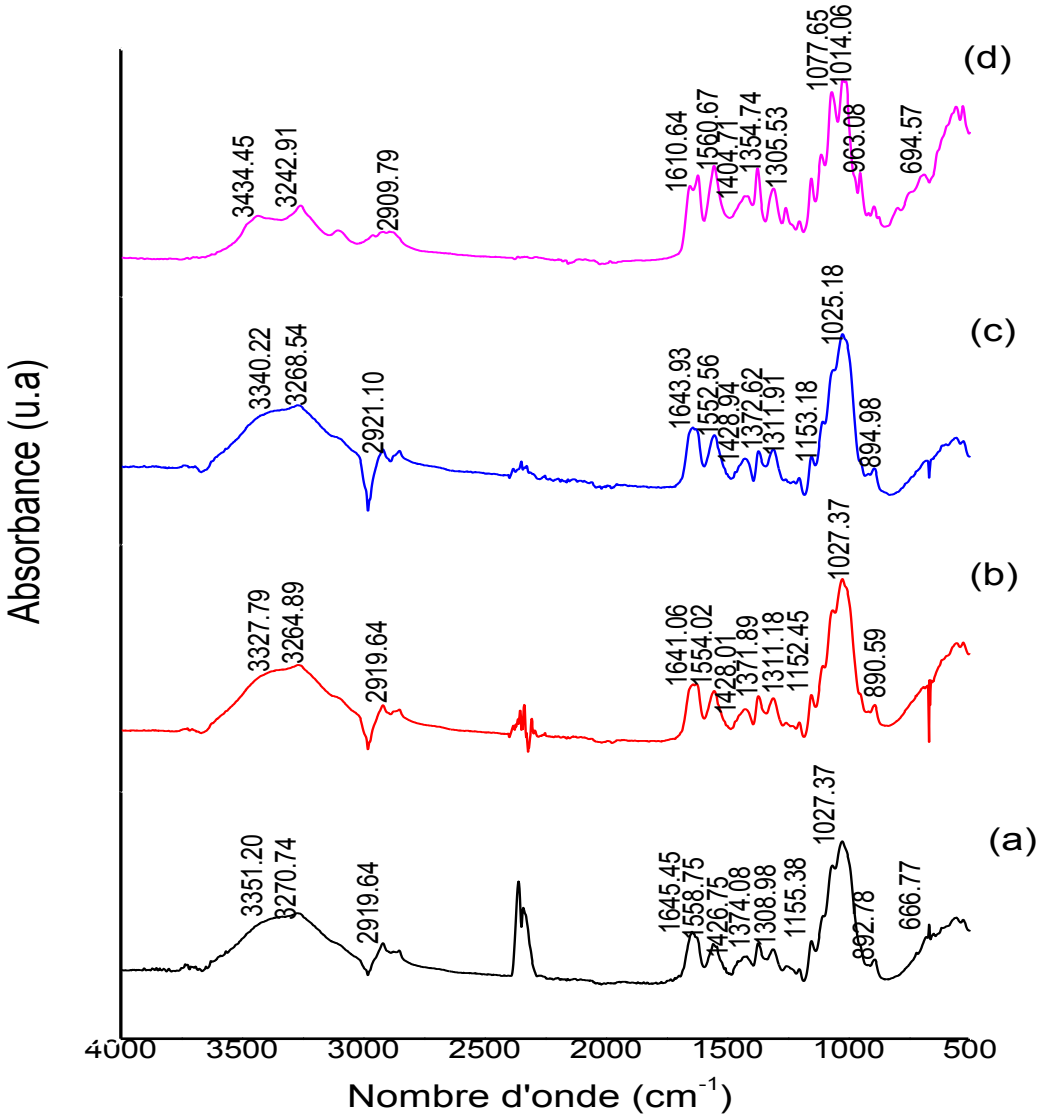
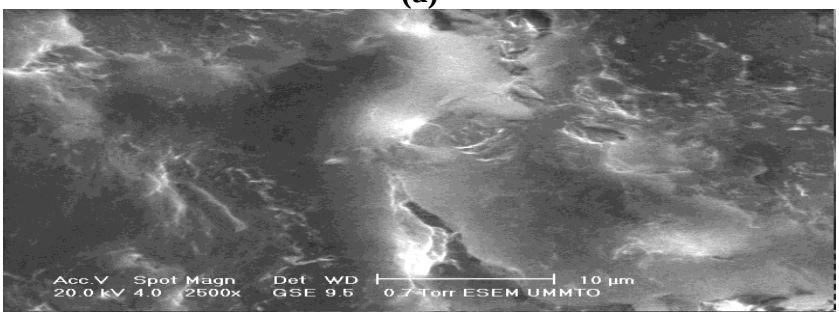


Figure IV. 8: (a), (b) et (c) Spectres ATR de la fraction AcIM développée sur milieu YPGA pendant 6 jours, températures 20 ; 25 et 28 °C, respectivement. (d) Spectre ATR de la chitine commerciale

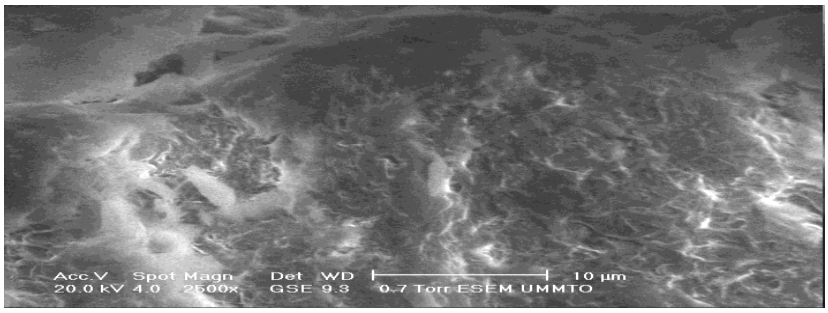
IV.1.2.7.5. Analyses des fractions AcIM par MEB

La figure IV.9 (a, b et c) montre les micrographies des fractions AcIM des températures d'incubation 20 ; 25 et 28 °C, respectivement. Ces dernières sont semblables à celles des fractions AIM correspondantes, mais avec apparition plus nette de la structures fibreuses, notamment à la température d'incubation de 28 °C. Cette morphologie est très proche de la chitine commerciale.

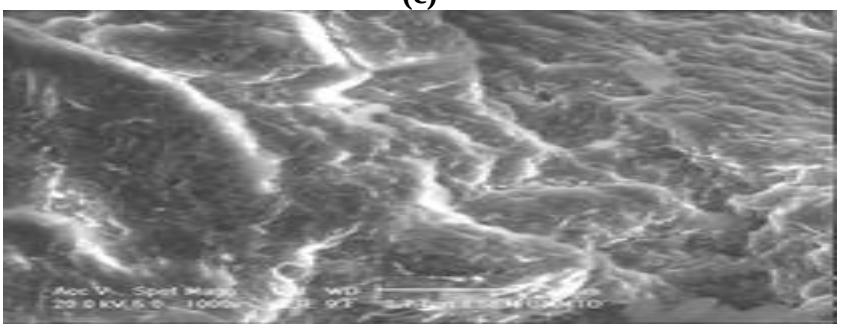
(a)



(b)



(c)



(d)

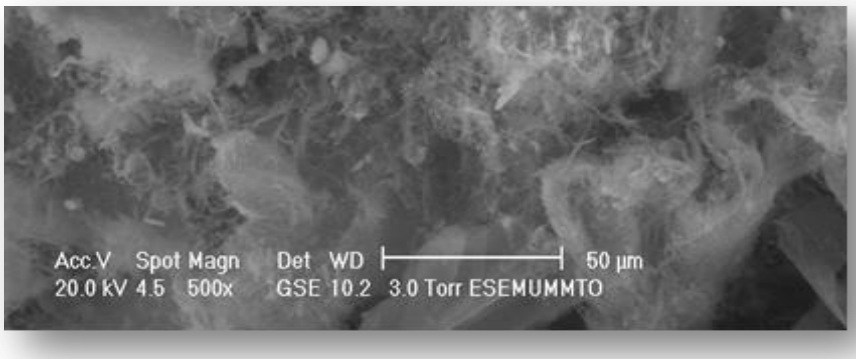


Figure IV.9: (a), (b) et (c) Micrographies MEB de la fraction AcIM développée sur milieu YPGA pendant 6 jours, températures 20 ; 25 et 28 °C, respectivement. (d) Micrographies MEB de la chitine commerciale

IV.1.2.7.6. Analyse de la fraction AcSM

Le choix de la fraction produite à 28 °C est expliqué par la qualité de la fraction AcIM, voisine de la chitine commerciale.

Le spectre de la fraction AcSM, à température d'incubation de 28 °C (figure IV.10 (a)), est comparé au spectre du chitosane commercial (figure IV.10 (b)).

Le pic caractéristique des vibrations de valence du groupement C=O de l'amide I du chitosane est présent mais avec un déplacement vers 1635,59 cm^{-1} accompagné d'un affaiblissement de l'intensité d'absorption par rapport à celle observée dans le spectre de la chitine à température d'incubation de 28 °C (AcIM à 28 °C).

Il y a eu disparition du pic de l'amide II et apparition d'un pic à 1581,59 cm^{-1} qui correspond aux vibrations de valence du groupement amine ($-NH_2$), ce pic est absent dans le spectre de la fraction AcIM à 28 °C.

Le pic à 1367,35 cm^{-1} est associé aux vibrations de déformation des groupements CH_3 et CH_2.

Le spectre ATR de la fraction AcSM à température d'incubation de 28 °C présente des pics situés à des nombres d'onde différents de ceux observés dans le chitosane commercial d'origine marine. Ces résultats se rapprochent des chitosanes d'origine fongiques extraits de deux espèces : *Penicillium viridicatum* (Ebrahimzadeh et al., 2013) et *Mucor rouxii* (Synowiecki et Al-Khateeb, 1997).

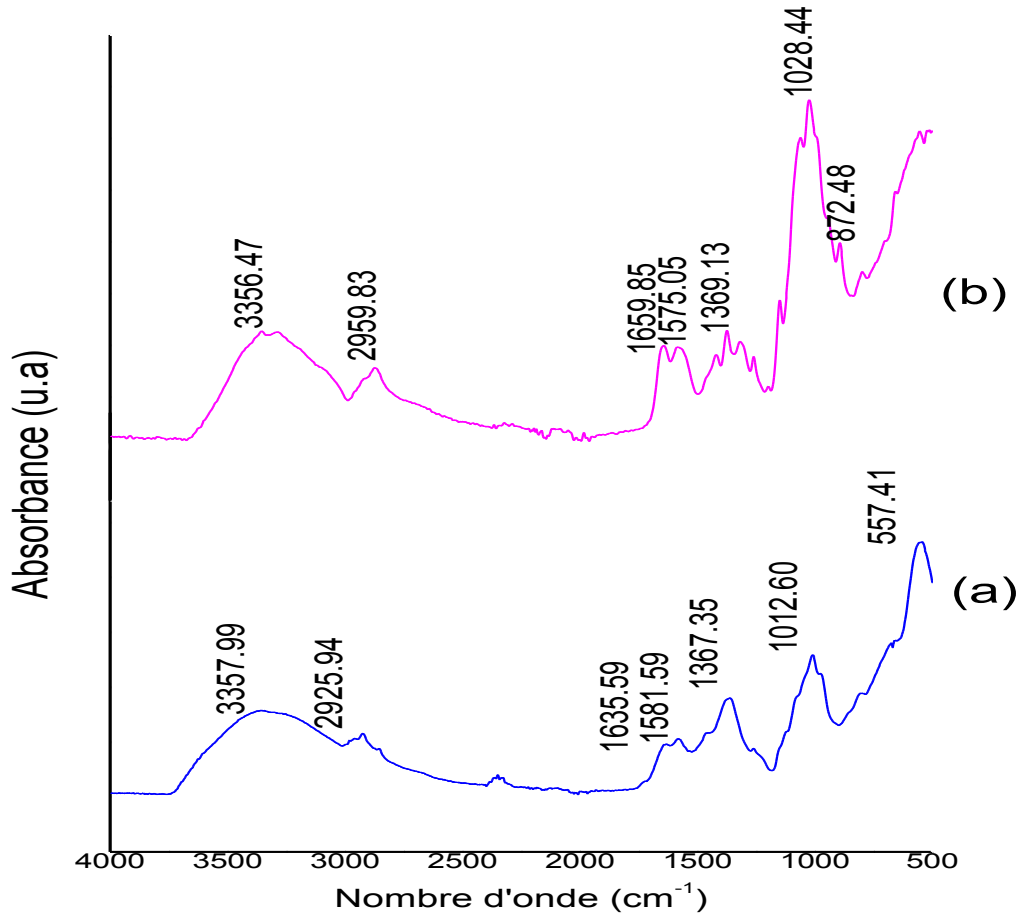


Figure IV.10: (a) Spectres ATR de la fraction AcSM après précipitation, développée sur milieu YPGA pendant 6 jours à 28 °C. (b) Spectres ATR du chitosane commercial

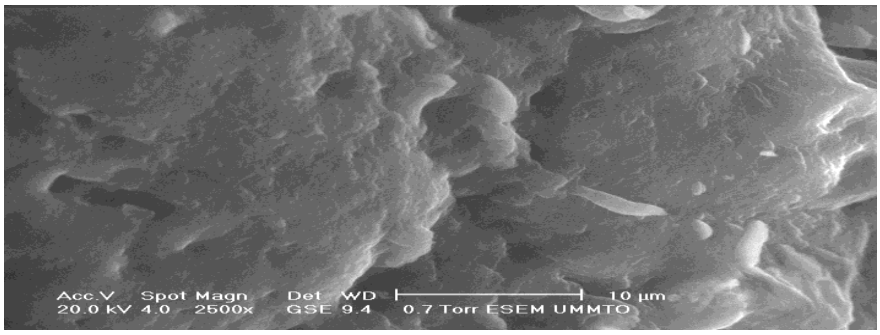
Les micrographies MEB de la fraction AcSM à température d'incubation de 28 °C (figure11(a)) montrent une structure différente de celle du chitosane commercial (figure11(b)). Le calcul du degré de désacétylation (DDA) permet d'expliquer les résultats obtenus. Ces derniers sont représentés dans le tableau IV.5 :

Tableau IV.5: Degré de désacétylation de la fraction AcSM extraite de la biomasse cultivée à 28 °C et celui du chitosane commercial

Echantillon	**$A_{1320\ cm}^{-1}$**	**$A_{1420\ cm}^{-1}$**	**DDA (%)**
Précipité AcSM	0,045	0,0029	63,82
Chitosane Commercial	1,867	2,27	76,68

Le chitosane, obtenu à la température d'incubation de 28 °C, possède un degré de désacétylation de 63,82%, cette valeur est proche de celle des chitosanes extraits des espèces *P. waksmanii et P. citrinum* qui est d'environ 65 et 62,4%, respectivement (Ebrahimzadeh et al., 2013).

(a)



(b)

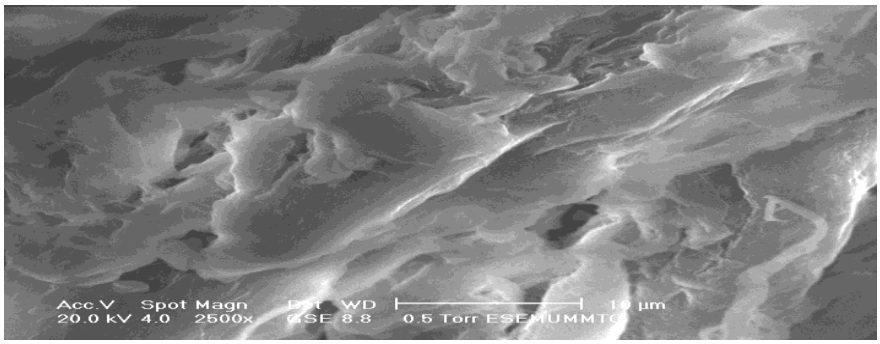


Figure IV.11: (a) Micrographies MEB de la fraction AcSM précipitée obtenue à 28 °C sur milieu YPGA pendant 6 jours. (b) Micrographies MEB du chitosane commercial

IV.1.2.8. Etude de la désacétylation des chitines brutes

La chitine extraite des crustacés (chitine pure) est généralement convertie en chitosane par désacétylation alcaline avec l'hydroxyde de sodium (Chang et al., 1997).

Dans ce travail, la méthode conventionnelle de transformation de la chitine en chitosane a été modifiée par l'utilisation de conditions douces de désacétylation, évitant ainsi la dégradation de la chitine. Pour cela, les fractions AcIM obtenues dans les températures d'incubation du mycélium *P. camembertii* sur milieu YPGA enrichi à 20 ; 25 et 28 °C, respectivement, ont subi un traitement basique à 40% de NaOH avec un rapport de 1g/50 mL à 35 °C pendant 7 jours (Kadouche, 2013). La fraction AcIM (25 °C) a subi un deuxième traitement basique

avec les mêmes conditions (40% NaOH, température 35 °C et une durée de 7 jours). Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau IV.6 :

Tableau IV.6: Production du chitosane dans les conditions douces de désacétylation de la chitine fongique

Echantillons	**Chitine brute DA (g)**	**Chitine brute DA 2 fois (g)**
AcIM 20°C	0,77	/
AcIM 25°C	0,62 →	0,55
AcIM 28°C	0,73	/

Après plusieurs lavages à l'eau distillée, les fractions récupérées ont été pesées. Les rendements des chitines désacétylées (chitines DA) sont : 770 ; 620 et 730 mg/g de AcIM pour les températures d'incubation du mycélium 20 ; 25 et 28 °C, respectivement. Le rendement en chitine DA 2 fois pour la fraction AcIM à température d'incubation du mycélium de 25 °C est de : 550 mg/g de AcIM. Selon les travaux de Di Mario et al (2008), le rendement du chitosane, préparé à partir de la désacétylation de la chitine entre 80 et 150 °C pendant 2 heures issues de différentes souches de *Pleurotus ostreatus* et de *Pleurotus eryngii,* est de 30,7 et 44,8%, respectivement. Comparativement à notre étude, les rendements sont plus élevés. On note que les rendements des chitines désacétylées dépendent des conditions opératoires utilisées (durée et température du traitement basique).

IV.1.2.8.1. Caractérisation des chitines désacétylées

a) Test de solubilité

Les produits obtenus ont été mis dans une solution d'acide acétique 1% afin de tester leur solubilité en milieu acide dilué. Les résultats obtenus ont montré la formation d'une suspension colloïdale (figure IV.12) :

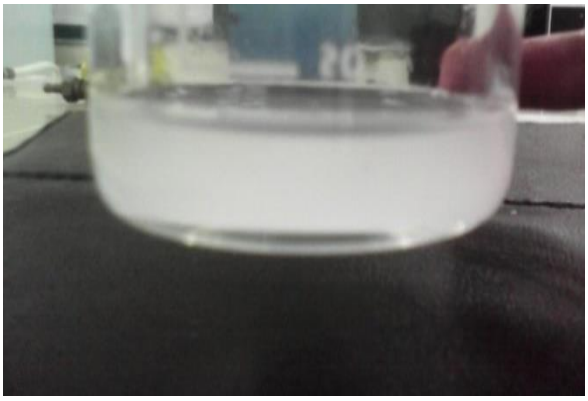
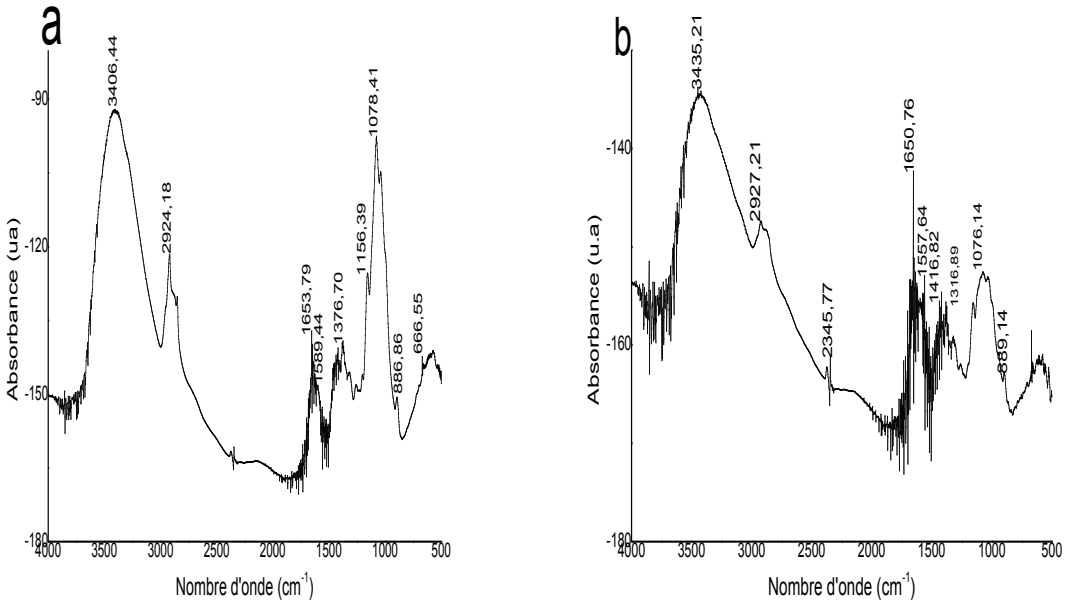


Figure IV.12: Test de solubilité des chitines DA (température d'incubation du mycélium 25°C)

b) Analyse de la chitine désacétylée par FTIR

La chitine obtenue à 25 °C désacétylée 2 fois à 35 °C pendant 7 jours est analysée par spectroscopie FTIR. Le spectre de la chitine désacétylée est comparé à celui du chitosane commercial (Figure IV.13 (a, b et c)) :



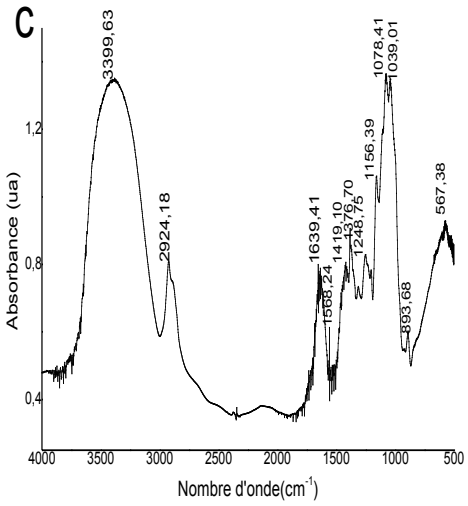


Figure IV.13: (a) Spectres FTIR de la chitine obtenue à température d'incubation de 25 °C, désacétylée 2 fois à 35°C pendant 7 jours. (b) Spectres FTIR du chitosane commercial et (c) Spectres FTIR du glucane

Le spectre d'adsorption FTIR de la chitine désacétylée 2 fois à 35°C pendant 7 jours présente une bande d'adsorption d'une grande intensité à 3406,44 cm^{-1}correspondant à la vibration (OH) et (NH) de la fonction amine. Le spectre présente aussi une bande d'adsorption à 1653,79 cm^{-1} correspondant à amide I, la bande amine apparait à 1589,44 cm^{-1} dans le spectre de la chitine.

La zone située entre 1100 et 900 cm^{-1} présente des pics intenses contrairement au chitosane commercial où l'intensité des pics est diminuée, cette partie ressemble bien au spectre du glucane (figure IV.13 (c)). Ce résultat démontre que nos produits représentent du chitosane lié au glucane (complexe chitosane-glucane).

IV.2. Application du chitosane fongique dans l'élimination du colorant Bleu de Méthylène (BM)

Dans cette étude, on s'est intéressée à la préparation d'un adsorbant naturel à partir du chitosane fongique présenté sous forme de membrane en vue de son utilisation comme biosupport dans l'adsorption d'un colorant de l'industrie textile: le Bleu de Méthylène (BM).

IV.2.1. Apparence des membranes du chitosanes

La membrane préparée à partir du chitosane fongique est de couleur jaunâtre, lisse, souple et flexible. Cependant, celle préparée à partir du chitosane marin (commercial) est transparente, lisse, dure et fragile (figure IV.14).

(a) **(b)**

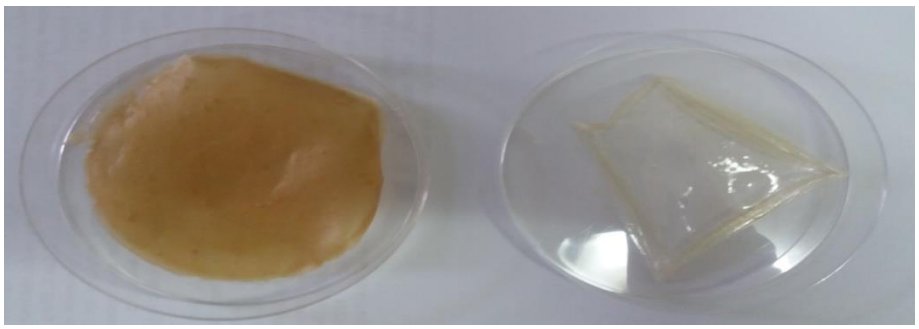


Figure IV.14: Membranes du chitosanes : (a) chitosane fongique ; (b) chitosane marin.

IV.2.2. Essais d'élimination du colorant

L'élimination du colorant : bleu de méthylène (BM) a été étudiée en fonction du temps de contact, de la concentration initiale, du pH initial de la solution du colorant BM, de la masse des membranes de chitosane et de la température. Pour chaque paramètre, le pourcentage d'élimination a été calculé.

IV.2.2.1. Effet du temps de contact à différentes concentrations initiales du BM

L'effet du temps de contact adsorbat-adsorbant sur le taux de rétention du colorant BM est présenté dans la figure IV.15, et à différentes concentrations initiales (5 à 100 mg/L) pour 10 g de membrane fongique par litre de la solution du BM, à pH 7,61 et à température 25 °C.

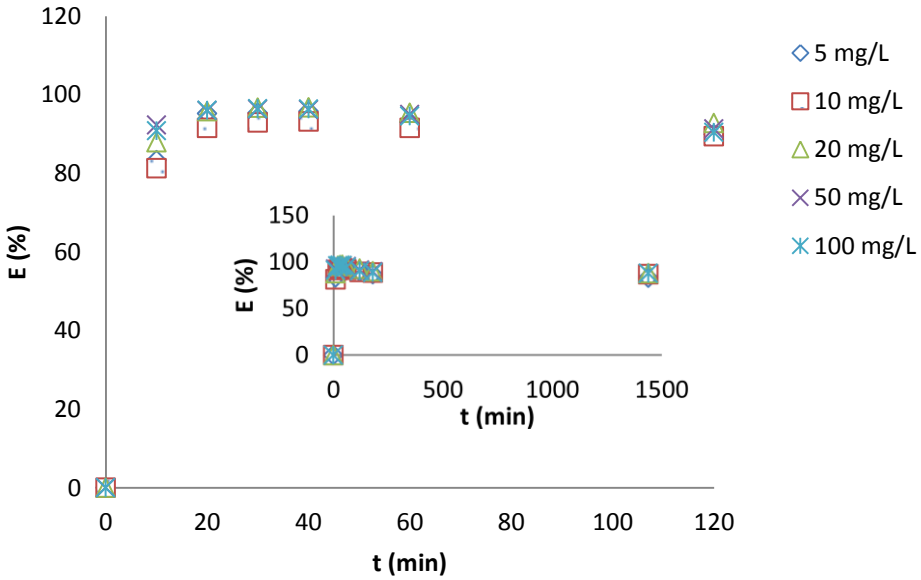


Figure IV.15: Effet du temps de contact adsorbat-adsorbant sur le taux de rétention du colorant BM à différentes concentrations initiales 5 à 100 mg/L (pH 7,61 ; 25 °C et 1g de membrane du chitosane fongique par 100 mL de solution du BM)

Pour les cinq concentrations utilisées, le taux de rétention croît avec l'augmentation du temps de réaction en suivant deux pentes différentes. La première est rapide, elle se situe dans les 20 premières minutes de contact, tandis que la seconde est lente à 40 minutes et pourrait exprimer l'équilibre entre les fractions du colorant retenues et celles désorbées. A l'équilibre, on atteint des taux d'élimination de 95,84%, 93,2%, 96,74%, 96,25% et 96,36 % pour les concentrations initiales de 5 ; 10 ; 20 ; 50 et 100 mg/L, respectivement. L'augmentation du pourcentage d'adsorption avec le temps de contact est due à la disponibilité des sites d'adsorption libres à la surface de la membrane du chitosane fongique (surface non saturée).

IV.2.2.2. Effet du pH de la solution

L'effet du pH de la membrane de chitosane sur le taux de rétention du colorant BM, étudié à différents temps de contact et à la concentration initiale de 10 mg/L avec une masse de 1g dans un volume de 100 mL de la solution du BM et à température de 25 °C, est présenté dans la figure IV.16. Une comparaison a été faite avec la membrane du chitosane marin (figure IV.17).

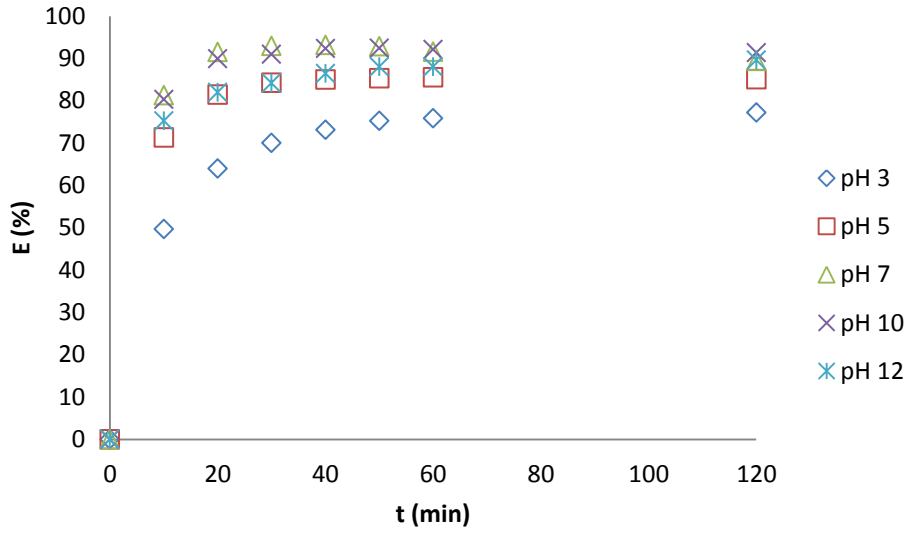


Figure IV.16: Effet du pH sur le taux d'élimination du colorant BM traité sur la membrane du chitosane fongique (25 °C, 10 mg/L, 1g de membrane par 100 mL de la solution du BM)

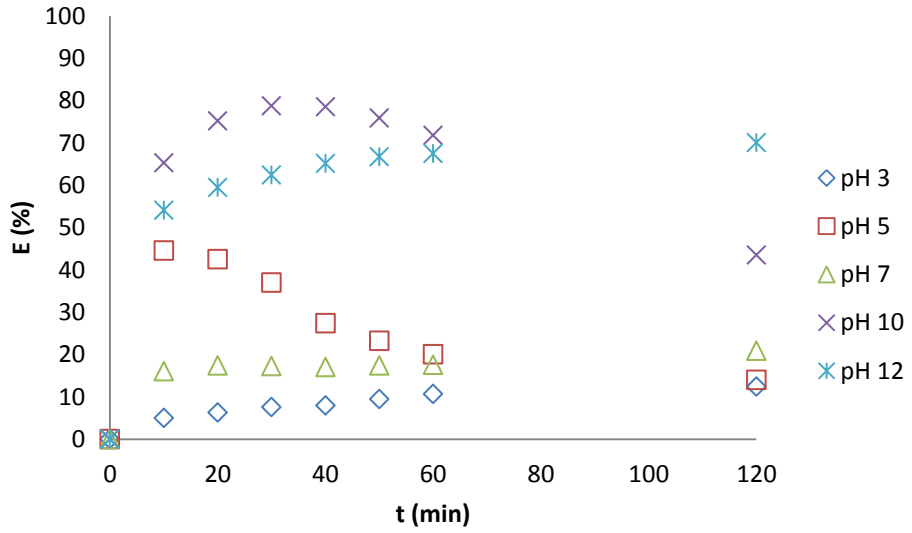


Figure IV.17: Effet du pH sur le taux d'élimination du colorant BM traité sur la membrane du chitosane marin (25 °C, 10 mg/L, 1g de membrane par 100 mL de la solution du BM)

Les résultats de l'adsorption du colorant BM sur les membranes du chitosane fongique, observés sur la figure IV.16, montrent un accroissement du taux d'élimination du colorants BM avec tous les pH étudiés (de 3 à 12). Le taux d'élimination maximal de 93,20% est atteint à pH 7 et à pH 10 après 40 minutes de contact.

Les faibles quantités retenues à pH acide (pH<5) sont probablement dues à l'existence d'une adsorption compétitive entre les ions H_3O^+ et les cations du BM sur les sites actifs de l'adsorbant. En l'absence de cette compétition, l'adsorption du colorant BM devient meilleure (pH 7 et pH10). Par ailleurs, la diminution de la rétention à pH 12 peut être expliquée par l'excès en ions OH^- qui entourent les cations du colorant (Eren, 2009).

Dans le cas de la membrane du chitosane marin (commercial), l'adsorption est meilleure en milieu basique qu'en milieu acide (figure IV.17). De très faibles quantités de BM ont été adsorbées sur la membrane en milieu acide contrairement à la membrane d'origine fongique. Probablement, le chitosane fongique, présenté sous forme de complexe chitosane-glucane, peut posséder un pH_{PCN} acide (< 6,3 de chitosane commercial (Crini et al., 2009)).

Talathoti et al (2014) ont déterminé un pH optimum de 8 pour l'adsorption du colorant BM sur le bioadsorbant à base des feuilles de *Syzygium cumini L.* Ils expliquent aussi une meilleure adsorption de ce colorant en milieu basique par les interactions électrostatiques. Des résultats similaires ont aussi été observés par plusieurs auteurs pour l'adsorption du colorant BM ou d'autres colorants cationiques sur d'autres types d'adsorbants (Houas et al., 1999 ; Madhavakrishman et al., 2009; Zhang et al., 2011 ; Kifuani et al., 2018).

IV.2.2.3. Effet de la masse des membranes

L'effet de la masse de la membrane du chitosane sur le taux de rétention du colorant BM, étudié à différents temps de contact, et à la concentration initiale de 10 mg/L dans un volume de 100 mL de la solution du BM, à pH 7,61 et à température de 25 °C, est présenté dans la figure IV.18. Une comparaison a été faite avec la membrane du chitosane marin (figure IV.19).

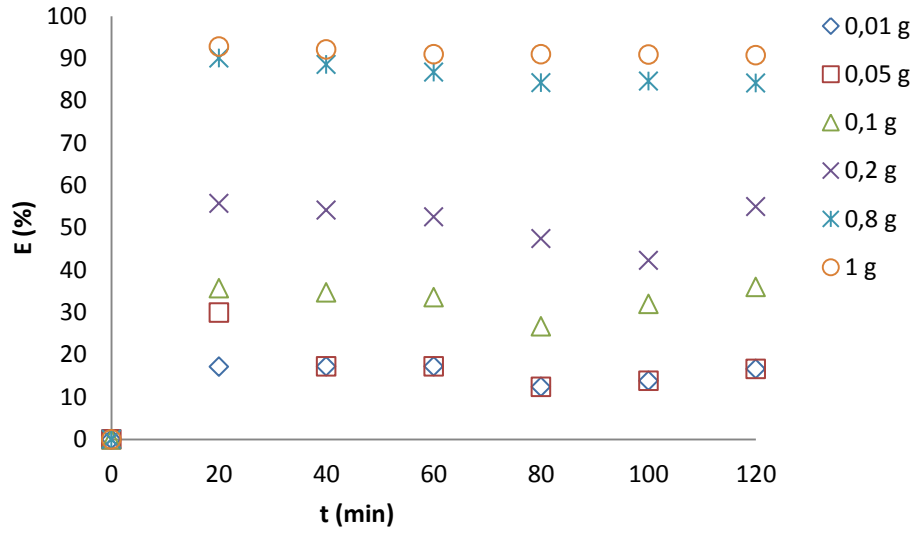


Figure IV.18: Effet de la masse de la membrane du chitosane fongique sur l'adsorption du colorant BM (pH 7,61 ; 25 °C et 10 mg/L de solution du BM)

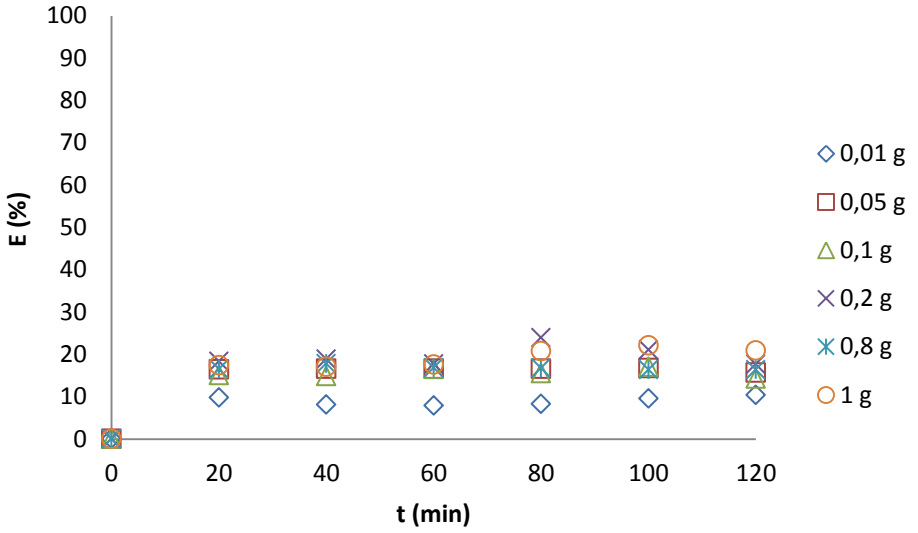


Figure IV.19: Effet de la masse de la membrane du chitosane marin (commercial) sur l'adsorption du colorant BM (pH 7,61 ; 25 °C et 10 mg/L de la solution du BM)

Les résultats présentés dans la figure IV.18 montrent un accroissement du pourcentage d'adsorption avec l'augmentation de la masse de la membrane du chitosane fongique. Le pourcentage d'adsorption passe ainsi de 17,19% à 92,8% lorsque la masse de la membrane du chitosane fongique passe de 10 à 1000 mg après 20 minutes de contact. L'augmentation du pourcentage d'adsorption, observée en fonction de la masse de la membrane du chitosane fongique, est due à la disponibilité des sites libres d'adsorption qui augmentent avec la

quantité d'adsorbant jusqu'à la masse de 1 g. Par contre, le pourcentage d'adsorption passe 9,94% à 16,54% lorsque la masse de la membrane du chitosane marin (commercial) passe de 10 à 50 mg. À partir de 50 mg, l'élimination devient pratiquement constante.

Comparativement au chitosane marin, le chitosane fongique conduit à un meilleur taux d'abattement et cela en raison du pH utilisé (7,61), discuté et justifié dans le paragraphe (IV.2.2.2).

IV.2.2.4. Effet de la température

L'effet de la température sur le taux d'élimination du colorant BM sur la membrane du chitosane fongique a été également étudié. Trois températures différentes ont été utilisées : 25 ; 35 et 45 °C avec une concentration initiale de 10 mg/L, un pH=7,6 et une masse de la membrane égale à 1g /100 mL de solution du colorant BM (figure IV.20) :

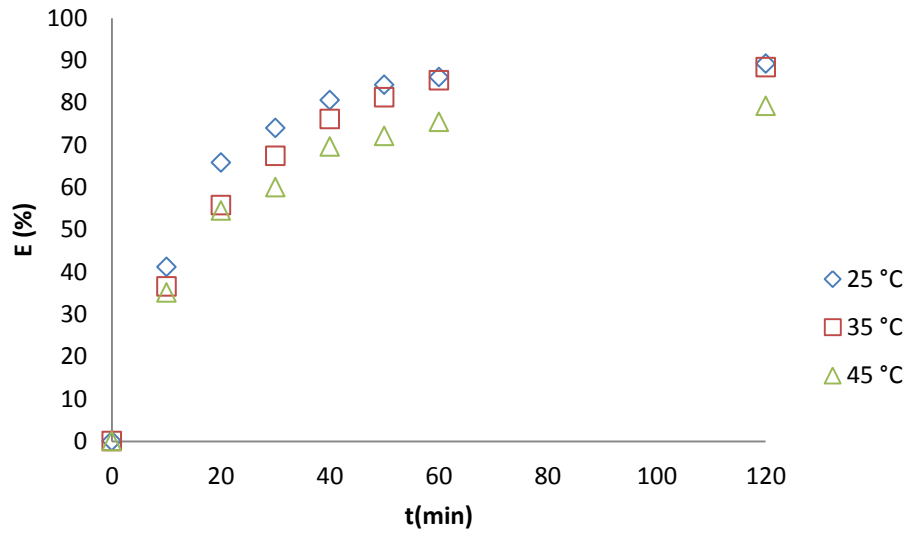


Figure IV. 20: Effet de la température sur le taux d'élimination du colorant BM sur la membrane du chitosane fongique (pH 7,6 ; 25 °C ; 10 mg/L et 1g de la membrane par 100 mL de la solution du BM)

A partir de la figure IV. 20, on peut conclure que le taux d'élimination du colorant BM diminue de 91,84 à 85,24% quand la température varie entre 25 et 45 °C, respectivement. Ce résultat est expliqué par le fait que l'augmentation de la température peut ne pas être en faveur de toute agglomération des cations sur la surface solide.

IV.2.3 Modélisation

IV.2.3.1. Modélisation de la cinétique d'élimination

L'étude du temps de contact colorant-membrane d'origine fongique a été utilisée pour la détermination du type de modèle de cinétique. Plusieurs formalismes sont donnés dans la littérature pour décrire la cinétique d'adsorption. Nous avons utilisé dans cette étude les lois cinétiques du pseudo premier ordre et du second ordre.

a) Modèle du pseudo-ordre 1 (modèle de Lagergren 1898)

Ce modèle suggère la fixation des molécules du colorant à la surface du bioadsorbant. Il est représenté par la formule suivante :

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_{max} - q_t) \qquad \text{(IV.1)}$$

Où :

q_{max} et q_t sont, respectivement, les quantités de soluté adsorbées en mg/g à l'équilibre et à l'instant t.

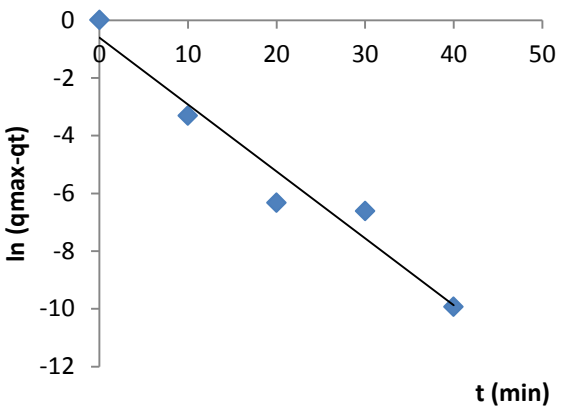
k_1 : Constante de vitesse de premier ordre (min^{-1})

Après intégration, l'équation (IV.1) devient :

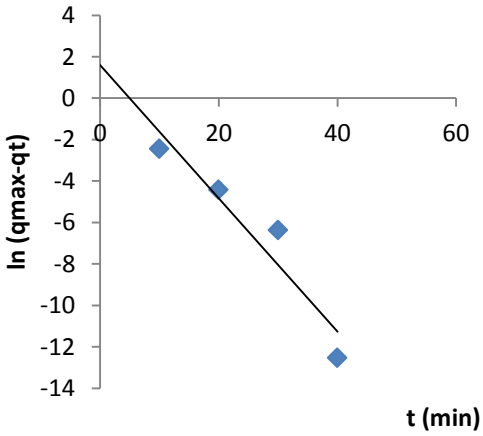
$$\ln(q_{max} - q_t) = \ln q_{max} - k_1.t \qquad \text{(IV.2)}$$

La quantité adsorbée à l'équilibre q_e et la constante de vitesse K_1 peuvent être obtenues à partir de la pente et de l'ordonné à l'origine de la courbe $\ln (q_{max} - q_t) = f(t)$ (figure IV.21) :

(a)



(b)



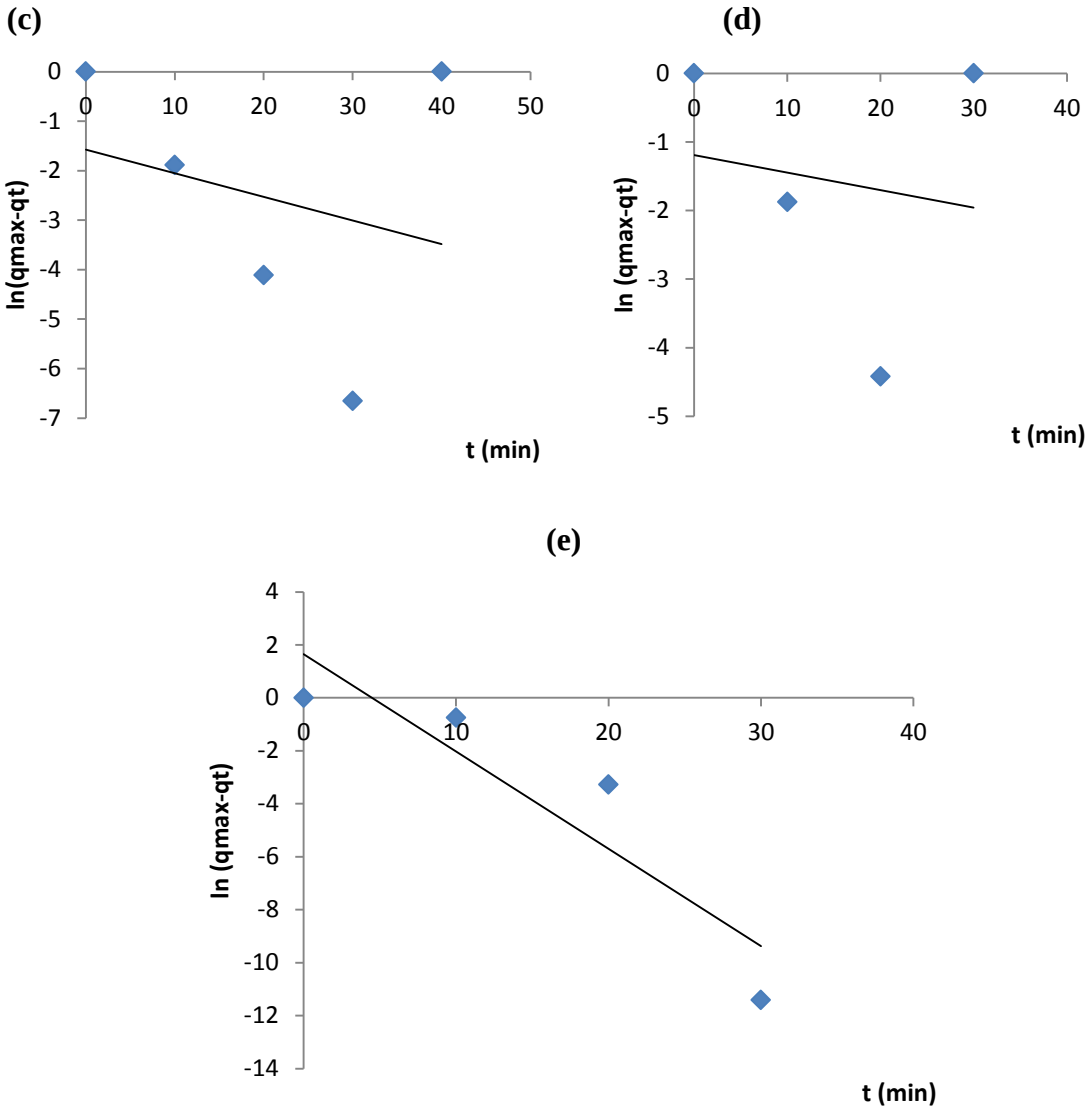


Figure IV.21: Modèle cinétique du pseudo premier ordre pour l'adsorption du colorant BM. (a) : Concentration initiale 5 mg/L ; (b) : Concentration initiale 10 mg/L ; (c) : Concentration initiale 20 mg/L ; (d) : Concentration initiale 50 mg/L ; (e) : Concentration initiale 100 mg/L

Les valeurs des quantités adsorbées q_e, les constantes de pseudo-premier ordre k_1 et les coefficients de régression R^2 pour toutes les concentrations étudiées sont données dans le tableau IV.7. Les valeurs de R^2 sont comprises entre 0,0247 et 0,9535. Le calcul de q_e montre que les quantités du colorant adsorbées sont plutôt faibles par rapport aux quantités expérimentales. Ces observations nous mènent à dire que l'adsorption du colorant BM n'exprime pas un processus de diffusion contrôlée puisqu'il ne suit pas l'équation du pseudo-premier ordre donnée par Lagergren (Srivastava et al., 2006).

b) Modèle du pseudo-deuxième ordre

Il est représenté par la formule suivante :

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_{max} - q_t)^2 \qquad \text{(IV.3)}$$

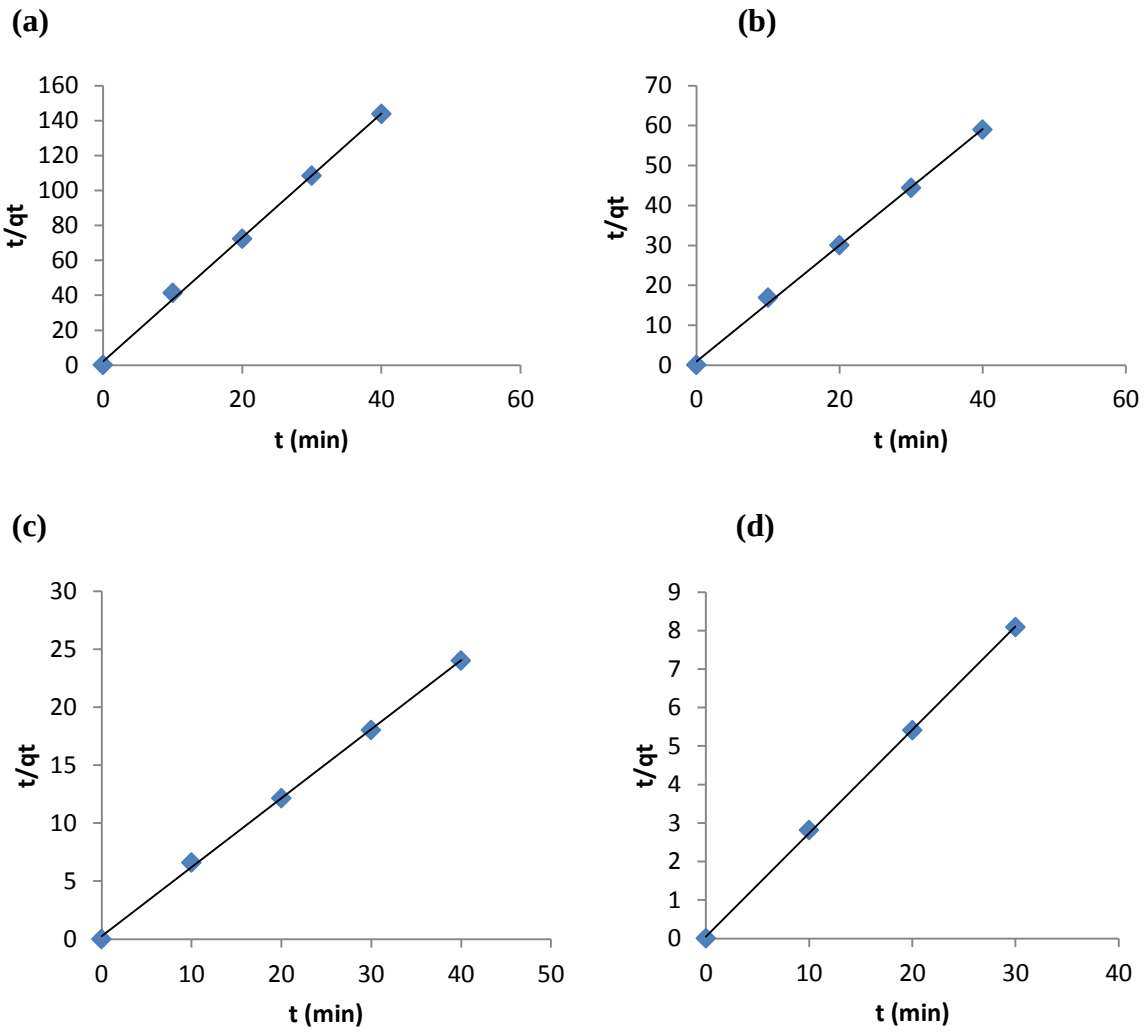
k_2 : Constante de vitesse de second ordre ($g.mg^{-1}.min^{-1}$).

Après intégration, l'équation (IV.3) devient :

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{kq_{max}^2} + \frac{1}{q_{max}}t \qquad \text{(IV.4)}$$

La quantité adsorbée q_e et la constante de vitesse k_2 peuvent être déterminées à partir de la pente et l'ordonné à l'origine de la courbe t/qt et en fonction de t.

La figure IV.22 montre l'application du modèle de cinétique du pseudo-second ordre aux résultats obtenus dans l'élimination du colorant BM. Les valeurs des quantités adsorbées q_e, les constantes de pseudo-second ordre k_2 et les coefficients de régression R^2 pour les concentrations étudiées sont données dans le tableau IV.7 :



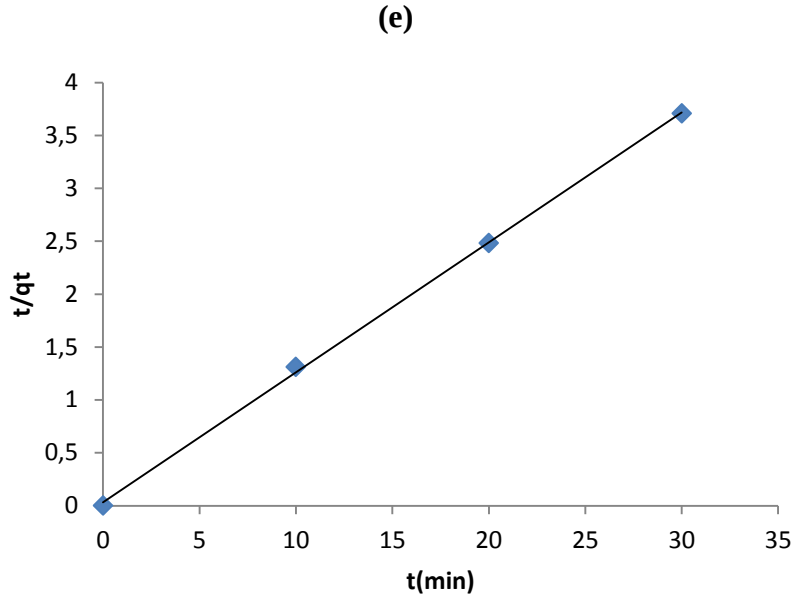


Figure IV.22 : Modèle cinétique du pseudo second ordre pour l'adsorption du colorant BM. (a) : Concentration initiale 5 mg/L ; (b) : Concentration initiale 10 mg/L ; (c) : Concentration initiale 20 mg/L ; (d) : Concentration initiale 50mg/L ; (e) : Concentration initiale 100 mg/L

D'après les résultats obtenus (tableau IV.7), nous remarquons que le modèle du pseudo second ordre est adéquat pour déterminer l'ordre de la cinétique d'adsorption du colorant BM puisque les coefficients de corrélation sont proches de l'unité (R^2 =0,999). Ces valeurs dépassent celles obtenues avec le modèle de pseudo-premier ordre. De même, nous remarquons que les valeurs des capacités d'adsorption calculées sont très proches des valeurs déterminées expérimentalement (0,28 ; 0,68 ; 1,66 ; 3,70 et 8,08 mg/g pour les concentrations initiales de 5 ; 10 ; 20 ; 50 et 100 mg/L, respectivement). Le modèle du pseudo second ordre est le mieux adapté pour décrire le comportement du colorant BM sur les membranes du chitosane fongique. Des résultats similaires ont été publiés par HO et Mckay et al (1999). Ces derniers attestent que la plupart des systèmes d'adsorption sur les matériaux solides suivent une cinétique de pseudo second ordre.

Tableau IV.7: Les constantes de la cinétique d'adsorption du colorant BM sur la membrane du chitosane fongique

Pseudo premier ordre				**Pseudo second ordre**		
C_0 (mg/L)	k_1 (min^{-1})	q_e cal ($mg.g^{-1}$)	R^2	k_2 ($g.mg^{-1}min^{-1}$)	q_e cal ($mg.g^{-1}$)	R^2
5	0,2318	0,545	0,9535	5,71	0,28	0,9985
10	0,3216	4,971	0,9073	2,17	0,69	0,9986
20	0,0477	0,206	0,0694	1,34	1,68	0,9993
50	0,0255	0,304	0,0247	1,49	3,72	0,9998
100	0,3677	5,23	0,8244	0,48	8,14	0,9995

IV.2.3.2. Modélisation des isothermes d'adsorption

Afin de définir le type d'isotherme d'adsorption, nous avons présenté la quantité du colorant adsorbée à l'équilibre en fonction de la concentration de la solution du BM. L'isotherme d'adsorption obtenue est illustrée dans la figure IV.23, il s'agit d'une isotherme linéaire.

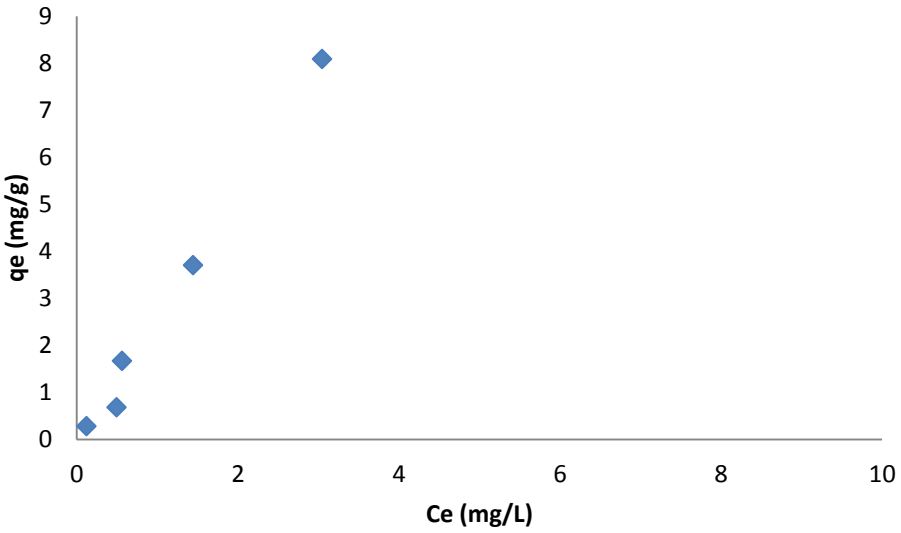


Figure IV.23: Isotherme d'adoption du colorant BM sur la membrane du chitosane fongique

IV.2.3.3. Modèles théoriques

Il existe de nombreux modèles théoriques qui ont été développés pour décrire les isothermes d'adsorption. Cependant, dans cette partie, nous nous intéressons seulement aux modèles de Langmuir et de Freundlich, car ils sont les plus simples et les plus répandus.

a) Modèle de langmuir:

Le modèle de Langmuir (1918) se base sur des principes fondamentaux où la molécule adsorbée est située sur une place bien précise du matériau adsorbé. Chaque site peut occuper une molécule. L'énergie d'adsorption de tous les sites est identique et indépendante.

Le modèle de Langmuir a été utilisé sous sa forme linéaire, représenté par l'équation suivante :

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_{max}} + \frac{1}{k_L q_{max}} \times \frac{1}{C_e} \qquad \text{(IV.5)}$$

Avec :

q_e: Quantité adsorbée (mg/g)

q_{max}: Capacité maximale d'adsorption (mg/g)

k_L: Constante de Langmuir ($L.mg^{-1}$)

C_e: Concentration du soluté en solution à l'équilibre (mg/L).

Le tracé de la courbe C_e/q_e en fonction de C_e nous permet de calculer la capacité maximale d'adsorption q_m et la constante k_L (figure IV.24).

✓ Afin de vérifier l'isotherme d'adsorption de BM sur la membrane de chitosane fongique, nous avons éprouvé le paramètre adimensionnel de Hall (R_L) qui est présenté sous la forme:

$$R_L = \frac{1}{1+k_L C_i} \qquad \text{(IV.6)}$$

C_i : Concentration initiale ($mg.L^{-1}$)

k_L : Constante d'équilibre de Langmuir ($L.mg^{-1}$)

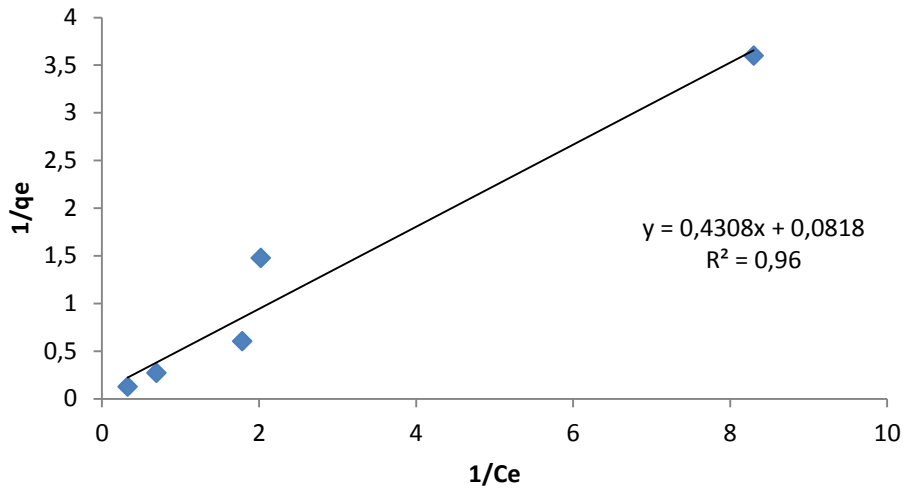


Figure IV. 24: Modèle de Langmuir

La figure IV.24 montre que le processus d'adsorption du colorant BM sur la membrane du chitosane fongique est décrit de façon satisfaisante par le modèle de Langmuir. Le facteur de corrélation est proche de l'unité et la valeur calculée de la capacité maximale d'adsorption est proche de la valeur expérimentale (tableau IV.8).

b) Modèle de Freundlich

Le modèle de Freundlich (1909) est empirique et simple, il établit une relation entre la quantité de soluté adsorbée et la quantité restante en phase liquide.

✓ L'équation linéaire de Freundlich a été utilisée:

$$\ln q_e = \ln k_F + \frac{1}{n} \ln C_e \qquad \text{(IV.7)}$$

Q_e et C_e sont les concentrations du soluté dans le complexe solide et en solution, respectivement.

k_F : Constante de Freundlich, une constante relative à la capacité d'adsorption; c'est donc la capacité d'adsorption lorsque la concentration à l'équilibre est unitaire.

La constante adimensionnelle n'est pas en rapport avec l'intensité d'adsorption. En portant $\ln q_e$ en fonction de $\ln C_e$, cette équation permet de calculer les paramètres k_L et 1/n à partir de l'ordonnée à l'origine et de la pente, respectivement (figure IV.25).

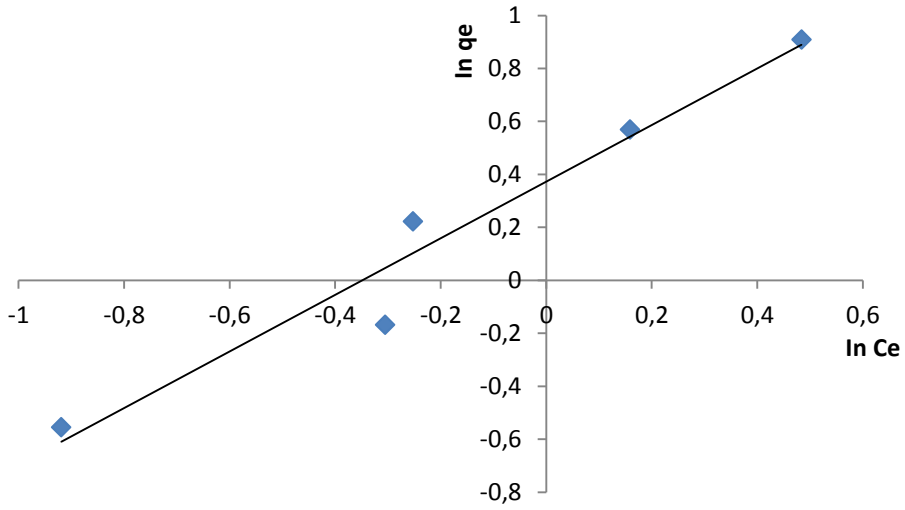


Figure IV.25: Modèle linéaire de Freundlich

Tableau IV.8: Paramètres de Langmuir et de Freundlich dans l'adsorption du colorant BM sur la membrane du chitosane fongique

Modèle de Langmuir								**Modèle de Freundlich**		
q_m (mg/g)	k_L (L/mg)	R_L					R^2	n	k_F (L/mg)	R^2
		5mg/L	10mg/L	20mg/L	50mg/l	100mg/L				
12,22	0,19	0,64	0,42	0,23	0,12	0,06	0,96	0,93	2, 36	0,95

Les coefficients de corrélation repris dans le tableau IV.8 indiquent que le mécanisme est très complexe. Le système membrane-BM peut être décrit par les modèles de Langmuir et de Freundlich.

Le paramètre d'équilibre (ou paramètre de séparation) R_L représente la nature du phénomène d'adsorption. Ce dernier peut être favorable ($0 < R_L < 1$), linéaire ($R_L=1$), non favorable ($R_L>1$) ou irréversible ($R_L=0$) (Aksu et Yener, 2001 ; Karthikeyan et Ilango, 2007 ; Kifuani et al., 2018). Les valeurs de R_L obtenues (comprises entre 0 et 1) indiquent que le processus d'adsorption est favorable. La membrane du chitosane fongique est un bioadsorbant potentiel pour l'élimination du colorant BM des eaux usées et peut donc servir pour le traitement d'épuration des eaux.

V.1. Modélisation de la concentration en biomasse mycélienne et des rendements des fractions (AcIM et AcSM)

Les paramètres opératoires (Z_1, Z_2, Z_3 et Z_4), considérés pour la modélisation de la production de la biomasse mycélienne et les rendements des fractions (AcIM et AcSM), sont donnés dans les tableaux V.1-2 :

Tableau V.1: Matrice du plan factoriel 2^4

N° Essais	**Variables réelles**				**Variables Codées**				**Réponses**		
	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4	x_1	x_2	x_3	x_4	**y_1 (g/L)**	**y_2 (%)**	**y_3 (%)**
1	13,5	27,5	25	0,4	-1	-1	-1	-1	**5,27**	**0,25**	**58,25**
2	13,5	27,5	25	0,8	-1	-1	-1	1	**7,35**	**0,05**	**60,9**
3	13,5	27,5	75	0,4	-1	-1	1	-1	**4,77**	**0,27**	**50,9**
4	13,5	27,5	75	0,8	-1	-1	1	1	**6,82**	**0,24**	**44,6**
5	13,5	32,5	25	0,4	-1	1	-1	-1	**0**	**0**	**0**
6	13,5	32,5	25	0,8	-1	1	-1	1	**0**	**0**	**0**
7	13,5	32,5	75	0,4	-1	1	1	-1	**0**	**0**	**0**
8	13,5	32,5	75	0,8	-1	1	1	1	**0**	**0**	**0**
9	24,5	27,5	25	0,4	1	-1	-1	-1	**0,23**	**0,13**	**34,8**
10	24,5	27,5	25	0,8	1	-1	-1	1	**0,58**	**0,39**	**9,13**
11	24,5	27,5	75	0,4	1	-1	1	-1	**0,94**	**0**	**10,6**
12	24,5	27,5	75	0,8	1	-1	1	1	**3,55**	**0,05**	**22,53**
13	24,5	32.5	25	0,4	1	1	-1	-1	**0**	**0**	**0**
14	24,5	32,5	25	0,8	1	1	-1	1	**0**	**0**	**0**
15	24,5	32,5	75	0,4	1	1	1	-1	**0**	**0**	**0**
16	24,5	32,5	75	0,8	1	1	1	1	**0**	**0**	**0**

y_1: Concentration de la biomasse mycélienne (g/L) ; **y_2:** Rendement de la Fraction AcSM (%) ; **y_3:** Rendement de la Fraction AcIM (%)

Sur 16 milieux de culture, le calcul de la moyenne $\bar{y}$ a donné: 1,84 g/L pour la concentration en biomasse mycélienne ; 0,086% pour le rendement de la fraction AcSM et 18,23% pour le rendement de la fraction AcIM.

Tableau V.2: Matrice des essais au centre du domaine.

N° Essais	Variables réelles				Variables Codées				Réponses		
	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4	x_1	x_2	x_3	x_4	y_1 (g/L)	y_2 (%)	y_3 (%)
1	19	30	50	0,6	0	0	0	0	**6,08**	**0,01**	**34,04**
2	19	30	50	0,6	0	0	0	0	**5,50**	**0,04**	**38,54**
3	19	30	50	0,6	0	0	0	0	**6,57**	**0,02**	**35,00**

La moyenne des concentrations au centre du domaine ($\bar{y}_0$) est de 6,05 g/L pour la biomasse mycélienne, 0,023% pour les rendements des fractions AcSM et 35,86% pour les rendements des fractions AcIM.

V.1.1.Modélisation de la concentration en biomasse mycélienne (y_1)

V.1.1.1. Calcul des coefficients du modèle

Les coefficients de l'équation de régression bj sont obtenus par le produit scalaire de la colonne y par les colonnes xj correspondantes divisés par le nombre d'expériences N. les valeurs de ces coefficients sont regroupées dans le tableau V.3 :

Tableau V.3: Valeurs des coefficients de l'équation de régression bj

Terme constant	**Effets linéaires y_1**			
b_0	**b_1**	**b_2**	**b_3**	**b_4**
1,84	-1,182	-1,844	0,166	0,443

Effets d'interaction y_1										
b_{12}	**b_{13}**	**b_{14}**	**b_{23}**	**b_{24}**	**b_{34}**	**b_{123}**	**b_{124}**	**b_{134}**	**b_{234}**	**b_{1234}**
1,182	0,294	-0,073	-0,166	-0,443	0,139	-0,294	0,073	0,143	-0,139	-0,143

V.1.1.2. Analyse statistique de l'équation de régression

d) Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

Le test de Student permet de déterminer si parmi les coefficients du modèle il existe des coefficients non significatifs, lesquels seront éliminés de l'équation de régression car leur influence sur la production de la biomasse mycélienne est négligeable. La procédure de calcul nous a permis de déterminer:

1/ La variance de reproductibilité: $S_{rep}^2 = 0{,}2869$

2/ Ecart quadratique moyen : S_{bj}= 0,134.

Les valeurs des t_j sont rassemblées dans le tableau V.4 ci-dessous :

Tableau V.4: Valeurs de tj

Terme constant	**Effets linéaires y_1**			
t_0	**t_1**	**t_2**	**t_3**	**t_4**
13,731	8,820	13,764	1,236	3,307

Effets d'interaction y_1										
t_{12}	**t_{13}**	**t_{14}**	**t_{23}**	**t_{24}**	**t_{34}**	**t_{123}**	**t_{124}**	**t_{134}**	**t_{234}**	**t_{1234}**
8,820	2,197	0,546	1,236	3,307	1,040	2,197	0,546	1,068	1,040	1,068

En utilisant la table de Student, relative à un test bilatéral (Annexe V) pour le niveau de signification α= 0,05 et le nombre de degrés de liberté f = n_0-1 qui est égale à 2, la valeur de tα (f) a été déterminée, $t_{0.05}(2)$ = 4,30. Selon le tableauV.4, il est remarqué que les valeurs de t_3, t_4, t_{13}, t_{14}, t_{23}, t_{24}, t_{34}, t_{123}, t_{124}, t_{134}, t_{234}, t_{1234} sont inférieures à la valeur tabulée du test de Student (4,30), déduisant ainsi que les coefficients correspondants (b_3, b_4, b_{13}, b_{14}, b_{23}, b_{24}, b_{34}, b_{123}, b_{124}, b_{134}, b_{234}, b_{1234}) ne sont pas significatifs. Ces derniers sont donc éliminés de l'équation de régression (il y a 4 coefficients significatifs pour la Biomasse).

e) Recherche de biais

La recherche de biais peut se faire à l'aide du test de Fisher Snedecor (F) en comparant la variance résiduelle à la variance de reproductibilité. La variance résiduelle pour (N- ℓ) degré de liberté est de: $S^2_{rés} = 0{,}95$, la valeur donc calculée de F est de 3,31.

En utilisant la table de Fisher $F_{0,95}$ (N- ℓ , n_0-1) (Annexe VI), la valeur trouvée pour $F_{0.95}$ (12, 2) est égale à 19,4. La valeur tabulée du test de Fisher étant supérieure à celle calculée (F=3,31), le modèle de 1er degré est alors sans biais.

f) **Test de validation de l'équation de régression par le test de signification**

Pour la signification de la régression, on utilise le test de Fisher, le rapport F est de 34,83. En utilisant la table de Fisher (Annexe VI), $F_{0,95}$ (ℓ-1, N- ℓ), la valeur trouvée pour $F_{0,95}$ (3,12) est égale à 3,49. Cette dernière valeur, étant inférieure à celle calculée (34,83),

l'équation de régression peut être considérée comme adéquate et le modèle est valide à 95%. L'équation du modèle s'écrit:

$$\hat{y}= 1,84 -1,182x_1 -1,844x_2 +1,182x_{12} \quad (V.1)$$

g) Calcul des coefficients de détermination

Le calcul de R^2 a donné une valeur de 0,90, proche de 1. Ce résultat démontre que le modèle choisi est adéquat.

V.1.2.Modélisation du rendement des fractions AcSM (y_2)

V.1.2.1. Calcul des coefficients du modèle

Les coefficients de l'équation de régression bj du rendement des fractions AcSM sont obtenus par la même procédure que celle calculée pour la concentration de la biomasse. Les valeurs de ces coefficients sont regroupées dans le tableau V.5 :

Tableau V.5: Valeurs des coefficients de l'équation de régression bj

Terme constant	**Effets linéaires y_2**			
b_0	**b_1**	**b_2**	**b_3**	**b_4**
0,086	-0,015	-0,08625	-0,01625	0,005

Effets d'interaction y_2

b_{12}	**b_{13}**	**b_{14}**	**b_{23}**	**b_{24}**	**b_{34}**	**b_{123}**	**b_{124}**	**b_{134}**	**b_{234}**	**b_{1234}**
0,015	-0,043	0,034	0,016	-0,005	-0,003	0,043	-0,034	-0,024	0,003	0,009

V.1.2.2. Analyse statistique de l'équation de régression

a) Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

La variance de reproductibilité, estimée par celle calculée au centre du domaine expérimental, est de : $S_{rep}^2 = 2{,}35.10^{-4}$.

Les valeurs des t_j sont rassemblées dans le tableau V.6 ci-dessous :

Tableau V.6: Valeurs de tj

Terme constant	**Effets linéaires y_2**			
t_0	**t_1**	**t_2**	**t_3**	**t_4**
21,5	3,75	21,5625	4,0625	1,25

Effets d'interactions y_2										
t_{12}	**t_{13}**	**t_{14}**	**t_{23}**	**t_{24}**	**t_{34}**	**t_{123}**	**t_{124}**	**t_{134}**	**t_{234}**	**t_{1234}**
3,75	10,625	8,4375	4,0625	1,25	0,625	10,625	8,4375	5,9375	0,625	2,1875

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe V) pour le niveau de signification α= 0,05 et le nombre de degrés de liberté f = n_0-1 qui est égale à 2, la valeur de tα (f) a été déterminée, $t_{0.05}(2)$ = 4,30. D'après les résultats du tableau V.6, il est remarqué que les valeurs de t_1, t_3, t_4, t_{12}, t_{23}, t_{24}, t_{34}, t_{234} et t_{1234} sont inférieures à la valeur tabulée du test de Student (4,30), déduisant ainsi que les coefficients correspondants (b_1, b_3, b_4, b_{12}, b_{23}, b_{24}, b_{34}, b_{234} et b_{1234}) ne sont pas significatifs. Ces derniers sont donc éliminés de l'équation de régression (il y a 7 coefficients significatifs pour le rendement de la fraction AcSM).

b) Recherche de biais

La variance résiduelle pour (N- ℓ) degré de liberté est de : $S^2_{rés}$ =0,00285, on obtient alors la valeur de F égale à 12,15.

En utilisant la table de Fisher $F_{0,95}$ (N- ℓ , n_0-1) (Annexe VI), la valeur trouvée pour $F_{0.95}$ (9, 2) est égale à 19,4. La valeur tabulée du test de Fisher étant supérieure à celle calculée (F=12,15), le modèle de 1er degré est alors sans biais.

c) Test de validation de l'équation de régression par le test de signification

Pour la signification de la régression, on utilise le test de Fisher, le rapport F est de 13,06. En utilisant la table de Fisher (Annexe VI), $F_{0,95}$ (ℓ-1, N- ℓ), la valeur trouvée pour $F_{0,95}$ (5,10) est égale à 3,33. Cette dernière valeur étant inférieure à celle calculée (13,06), l'équation de régression peut être considérée comme adéquate et le modèle est valide à 95%. L'équation du modèle s'écrit:

$$\hat{y}=0,086-0,086x_2-0,043x_{13}+0,034x_{14}+0,043x_{123}-0,034x_{124}-0,024x_{134} \qquad (V.2)$$

d) Calcul des coefficients de détermination

Le calcul de R^2 a donné une valeur de 0,90, proche de 1. Ce résultat démontre que le modèle choisi est adéquat.

V.1.3.Modélisation du rendement des fractions AcIM (y3)

V.1.3.1. Calcul des coefficients du modèle

Les coefficients de l'équation de régression bj du rendement des fractions AcIM sont obtenus par la même procédure que celle calculée pour la concentration de la biomasse. Les valeurs de ces coefficients sont regroupées dans le tableau V.7 :

Tableau V.7: Valeurs des coefficients de l'équation de régression bj

Terme constant	**Effets linéaires y_3**			
b_0	**b_1**	**b_2**	**b_3**	**b_4**
18,232	-8,599	-18,232	-2,153	-1,833

Effets d'interaction y_3										
b_{12}	**b_{13}**	**b_{14}**	**b_{23}**	**b_{24}**	**b_{34}**	**b_{123}**	**b_{124}**	**b_{134}**	**b_{234}**	**b_{1234}**
8,599	0,803	-0,631	2,153	1,087	1,791	-0,803	0,631	2,909	-1,791	-2,909

V.1.3.2. Analyse statistique de l'équation de régression

a) Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

La variance de reproductibilité, estimée par celle calculée au centre du domaine expérimental, est de: $S_{rep}^2 = 5{,}617$.

Les valeurs des t_j sont rassemblées dans le tableau V.8 :

Tableau V.8: Valeurs de tj

Terme constant	**Effets linéaires y_3**			
t_0	**t_1**	**t_2**	**t_3**	**t_4**
30,75	14,50	30,75	3,63	3, 9

Effets d'interactions y_3										
t_{12}	**t_{13}**	**t_{14}**	**t_{23}**	**t_{24}**	**t_{34}**	**t_{123}**	**t_{124}**	**t_{134}**	**t_{234}**	**t_{1234}**
14,50	1,35	1,06	3,63	1,83	3,02	1,35	1,06	4,91	3,02	4,91

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe V) pour le niveau de signification α= 0,05 et le nombre de degrés de liberté f = n_0-1 qui est égale à 2, la valeur de tα (f) a été déterminée, $t_{0.05}(2)$ = 4,30. D'après les résultats du tableau V.16, il est remarqué que les valeurs de t_3, t_4, t_{13}, t_{14}, t_{23}, t_{24}, t_{34}, t_{123}, t_{124}, t_{234} sont inférieures à la valeur tabulée du test de Student (4,30), déduisant ainsi que les coefficients correspondants (b_3, b_4, b_{13}, b_{14}, b_{23}, b_{24}, b_{34}, b_{123}, b_{124}, b_{234}) ne sont pas significatifs. Ces derniers sont donc éliminés de l'équation de régression (il y a 06 coefficients significatifs pour le rendement de la fraction AcIM).

b) Recherche de biais

La variance résiduelle pour (N- ℓ) degré de liberté est de : $S^2_{rés} = 32{,}21$ et la valeur calculée de F est de 5,73.

En utilisant la table de Fisher $F_{0,95}$ (N- ℓ , n_0-1) (Annexe VI), la valeur trouvée pour $F_{0.95}$ (10,2) est égale à 19,4. La valeur tabulée du test de Fisher étant supérieure à celle calculée (F=5,73), le modèle de 1er degré est alors sans biais.

c) Test de validation de l'équation de régression par le test de signification de régression

Pour la signification de la régression, on utilise le test de Fisher, le rapport F est de 49,39. En utilisant la table de Fisher (Annexe VI), $F_{0,95}$ (ℓ-1, N- ℓ), la valeur trouvée pour $F_{0,95}$ (5,10) est égale à 3,33. Cette dernière valeur étant inférieure à celle calculée (49,39), l'équation de régression peut être considérée comme adéquate et le modèle est valide à 95%. L'équation du modèle s'écrit:

$$\hat{y}=18{,}23-8{,}6x_1-18{,}23x_2+8{,}6x_{12}+2{,}91x_{134}-2{,}91x_{1234} \qquad (V.3)$$

d) Calcul des coefficients de détermination

Le calcul de R^2 a donné une valeur de 0,96, proche de 1. Ce résultat démontre que le modèle choisi est adéquat.

V.2. Optimisation de la production du rendement de la fraction AcIM (y_3)

L'étape de l'optimisation consiste à déterminer les valeurs optimales des différents facteurs, à savoir: la durée de culture (x_1), la température d'incubation (x_2), les oligo-éléments (x_3) et la source azotée (rapport extrait de levure/peptone) (x_4) qui entrainent une meilleure production de la fraction AcIM. A cet effet, les courbes d'isoréponses et les surface de réponses sont tracées par le logiciel STATISTICA afin de localiser la région de domaine d'étude où cet optimum apparait.

A partir de l'équation de régression (V.3), les optimums obtenus en dérivant la variable prédictive par rapport à chacun des paramètres sont : x_1, x_2, x_3 et x_4.

La résolution graphique du système d'équation conduit à :

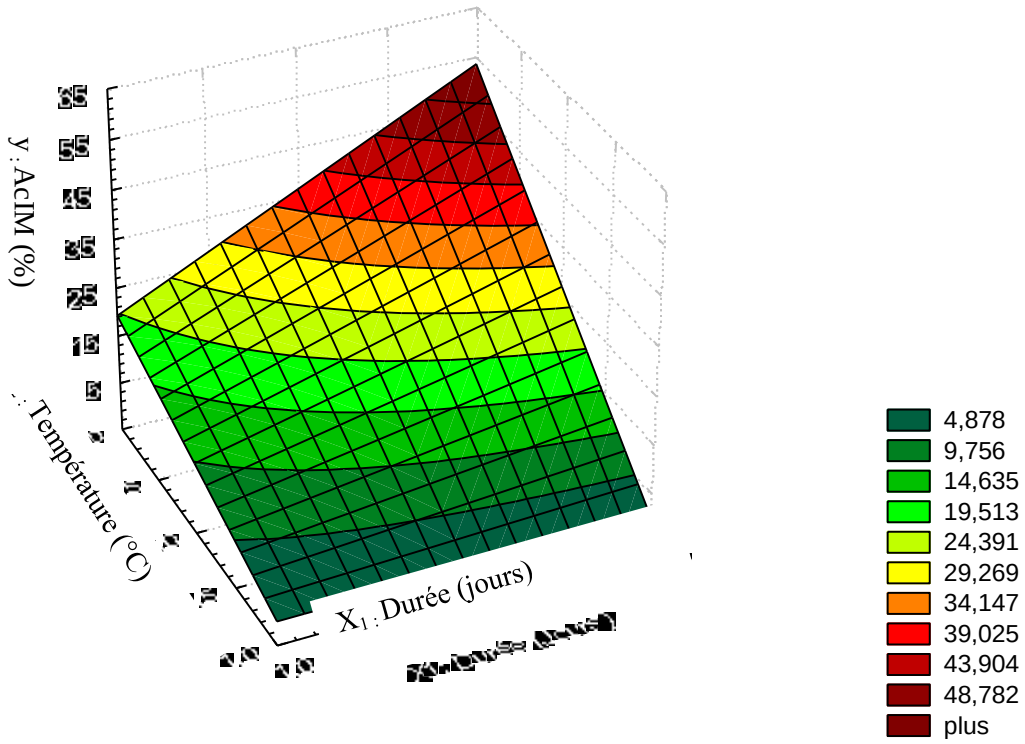
$$\begin{cases} x_{1=-0,715} \\ x_{2=-1} \\ x_{3=0} \\ x_{4=0} \end{cases}$$

Ces variables codées x_1, x_2, x_3 et x_4 correspondent respectivement aux variables réelles : durée de culture de 15 jours, une température d'incubation de 27,5 °C, les oligo-éléments à 50 mL/L et un rapport de 0,6 de l'extrait de levure/peptone. Le rendement théorique obtenu en ce point en remplaçant les variables par ces valeurs dans le modèle postulé est de y_3 (optimal), égale à 48,758%.

V.3. Tracé des isoréponses et des surfaces de réponses

L'objectif de ce travail étant d'obtenir les valeurs optimales des différents facteurs opératoires qui permettent l'obtention du rendement le plus élevé de la fraction AcIM (chitine brute). Pour ce fait, on cherche la région du domaine d'étude où cette condition est respectée. Les surfaces de réponse et les courbes isoréponses, tracées à l'aide du logiciel STATISTICA, sont illustrées dans la figure V.1. La surface de réponse est obtenue en traçant le rendement de la fraction AcIM dans le plans x_1 et x_2 (durée de culture – température d'incubation) et en fixant les variables $x_3 = 0$ et $x_4 = 0$.

(a)


y : AcIM (%)
X2 : Température (°C)
X1 : Durée (jours)
4,878
9,756
14,635
19,513
24,391
29,269
34,147
39,025
43,904
48,782
plus

(b)

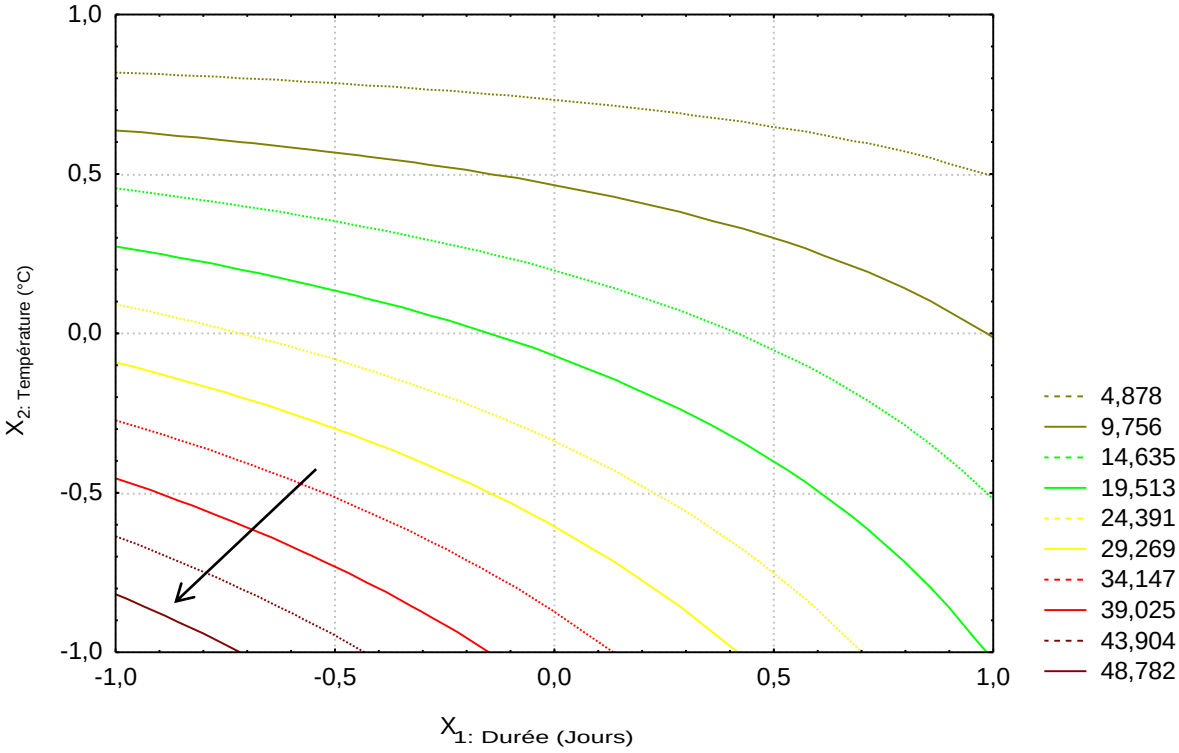


Figure V.1:(a) Surface de réponse ; (b) Courbe isoréponse

Expérimentalement, la réalisation de l'extraction de la fraction AcIM à partir de la biomasse cultivée dans des conditions optimales: durée de 15 jours, température de 27,5°C, oligo-éléments 50 mL/L et rapport extrait de levure /peptone (0,6) a donné un rendement de 50%. Cette valeur est proche de celle prédite par le logiciel qui est de 48,76%, ce qui confirme la validation du modèle.

Probablement, les températures élevées (> 27,5 °C) et des durées longues (> 13,5 j) favorisent la lyse des cellules. Dans ces conditions, les courbes de croissances sont décrites par la phase d'autolyse.

Selon la surface de réponse (figure V.1 (a)) la production de la chitine atteint un rendement de 60% à la température de 27,5°C et une durée de 13,5 j (validé par le résultat de l'Exp 2 du tableau V.1 : Matrice du plan factoriel).

La phase exponentielle de croissance peut probablement représenter les conditions favorables de synthèse de la chitine par les enzymes de chitine synthétases d'où la présence sans

limitation de substrats glucose, extrait de levure/peptone, oligo-élément et les Pi. L'utilisation d'un chemostat, maintenu en phase exponentielle, est souhaitée en pratique pour une production en continue de la chitine.

A

Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., & Ahmed, Z. (2010). Extraction and characterization of β-d-glucan from oat for industrial utilization. *International journal of biological macromolecules*, *46*(3), 304-309.

Aksu, Z., & Yener, J. (2001). A comparative adsorption/biosorption study of mono-chlorinated phenols onto various sorbents. *Waste management*, *21*(8), 695-702.

Amariglio, S. (1986). *Contrôle de la qualité des produits laitiers: analyses physiques et chimiques*. Afnor-itsv,Paris.

Amrane, A., & Prigent, Y. (1997). Comparison of growth parameters for *Geotrichum candidum* Geo17 and *Penicillium camemberti* LV2 in solid and liquid cultures. *Le Lait*, *5*(77), 641-648.

Amrane, A., Plihon, F., & Prigent, Y. (1999). Proton transfer in relation to growth of Geotrichum candidum and Penicillium camemberti in synthetic liquid media. *Enzyme and microbial technology*, *24*(8-9), 561-568.

Audigié, C.L., Fagerella, J., & Zonszain, F. (1984). Manipulation Analyse biochimique, Edition Tec & Doc, *Lavoisier*, 270.

Austin, P. R. (1984). Chitin solvents and solubility parameters. In *Chitin, Chitosan, and Related Enzymes* (pp. 227-237). Academic Press.

B

Benbettaïeb, N., Kurek, M., Bornaz, S., & Debeaufort, F. (2014). Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin–chitosan blend films related to biopolymer interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(12), 2409-2419.

Bizet, C., Desobry, S., Fanni, J., & Hardy, J. (1997). Composition and physical properties of the Penicillium camemberti mycelium. *Le Lait*, *77*(4), 461-466.

Blackwell, J., & Weih, M. A. (1980). Structure of chitin-protein complexes: ovipositor of the ichneumon fly Megarhyssa. *Journal of molecular biology*, *137*(1), 49-60.

Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, *42*(8), 3569-3580.

C

Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J., & Fu, W. R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*, *303*(3), 327-332.

Choisy, C., Desmazeaud, M., Gueguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J. L., & Tourneur, C. (1997). Les phénomènes microbiens, In : Le Fromage, éd. A. Eck, Lavoisier Paris.

Crestini, C., Kovac, B., & Giovannozzi-Sermanni, G. (1996). Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from Lentinus edodes. *Biotechnology and bioengineering*, *50*(2), 207-210.

CRINI, G., MORIN-CRINI, N., & BADOT, P. M. (2009). *Traitement des eaux par du chitosane: intérêts, méthodes et perspectives*. Ed. Techniques Ingénieur.

Crini, G., Guibal, E., Morcellet, M., Torri, G., & Badot, P. M. (2009). Chitine et chitosane. Préparation, propriétés et principales applications. In *Chitine et chitosane (du biopolymère à l'application)* (pp. 19-54).

D

Di Mario, F., Rapana, P., Tomati, U., & Galli, E. (2008). Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules*, *43*(1), 8-12.

E

Ebrahimzadeh, M. A., Chabra, A., Gharaei-Fathabad, E., & Pourmorad, F. (2013). Preparation of chitosan from *Penicillium spp*. and determination of their degree of deacetylation. *Indian Journal of Biotechnology*, 12: 231-235.

Eren, E. (2009). Removal of basic dye by modified Unye bentonite, Turkey. *Journal of hazardous materials*, *162*(2-3), 1355-1363.

F

Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., ... & Latgé, J. P. (2000). Molecular organization of the alkali-insoluble fraction ofAspergillus fumigatus cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(36), 27594-27607.

Freundlich, H. (1922). *Kapillarchemie, eine Darstellung der Chemie der Kolloide und verwandter Gebiete*. Akademische Verlagsgesellschaft mbH / Leipzig.

G

Gharieb, M. M., El-Sabbagh, S. M., Shalaby, M. A., & Darwesh, O. M. (2015). Production of chitosan from different species of zygomycetes and its antimicrobial activity. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, *6*(4), 123-130.

Goupy, J. (1999). Plans d'expériences pour surfaces de réponse. Dunod, Paris.

Goupy, J. (2005). What kind of experimental design for finding and checking robustness of analytical methods?. *Analytica chimica acta*, *544*(1-2), 184-190.

Goupy, J. (2006). Factorial experimental design: Detecting an outlier with the dynamic variable and the Daniel's diagram. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, *80*(2), 156-166.

Goupy, J. L. (1990). Etude comparative de divers plans d'expériences. *Revue de statistique appliquée*, *38*(4), 5-44.

H

Hamodrakas, S. J., Willis, J. H., & Iconomidou, V. A. (2002). A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins. *Insect biochemistry and molecular biology*, *32*(11), 1577-1583.

Ho, Y. S., & McKay, G. (1999). Pseudo-second order model for sorption processes. *Process biochemistry*, *34*(5), 451-465.

Houas, A., Bakir, I., Ksibi, M., & Elaloui, E. (1999). Étude de l'élimination de bleu de méthylène dans l'eau par le charbon actif commercial CECA40. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, *96*(3), 479-486.

J

Jaworska, M., & Konieczna, E. (2001). The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus Absidia orchidis. *Applied microbiology and biotechnology*, *56*(1-2), 220-224.

K

Kadouche, S. (2013). *Utilisation des biomatriaux dans le traitement des eaux* (Doctoral dissertation, Universite Mouloud Mammeri). Algérie 156p

Karthikeyan, G., & Ilango, S. S. (2007). Fluoride sorption using Morringa Indica-based activated carbon. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, *4*(1), 21-28.

Kaya, M., Lelešius, E., Nagrockaitė, R., Sargin, I., Arslan, G., Mol, A., ... & Bitim, B. (2015). Differentiations of chitin content and surface morphologies of chitins extracted from male and female grasshopper species. *PloS one*, *10*(1), e0115531.

Khalaf, S. A. (2004). Production and characterization of fungal chitosan under solid-statefermentation conditions. *International Journal of Agriculture and Biology* , 6: 1033–6. *(Pakistan).*

Khan, T. A., Peh, K. K., & Ch'ng, H. S. (2000). Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *J Pharm Pharm Sci*, *3*(3), 303-311.

Kifuani, K. M., Mayeko, A. K. K., Vesituluta, P. N., Lopaka, B. I., Bakambo, G. E., Mavinga, B. M., & Lunguya, J. M. (2018). Adsorption d'un colorant basique, Bleu de Méthylène, en solution aqueuse, sur un bioadsorbant issu de déchets agricoles de Cucumeropsis mannii Naudin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, *12*(1), 558-575.

Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Nishimura, S. I., & Ishii, S. (1993). Reactivity characteristics of a new form of chitosan. *Polymer Bulletin*, *30*(4), 429-433.

L

Lagergren, S. (1898). Zur theorie der sogenannten adsorption geloster stoffe. Kungliga svenska vetenskapsakademiens. Handlingar, 24 (4): 1-39.

Langmuir, I. (1918). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical society*, *40*(9), 1361-1403.

Gayatri, S. L., & Ahmaruzzaman, M. (2010). Adsorption technique for the removal of phenolic compounds from wastewater using low-cost natural adsorbents. *Assam University Journal of Science and Technology*, *5*(2), 156-166.

M

Madhavakrishnan, S., Manickavasagam, K., Vasanthakumar, R., Rasappan, K., Mohanraj, R., & Pattabhi, S. (2009). Adsorption of crystal violet dye from aqueous solution using Ricinus communis pericarp carbon as an adsorbent. *E-journal of Chemistry*, 6(4): 1109-1116.

Molimard, P., Vassal, L., Bouvier, I., & Spinnler, H. E. (1995). Suivi de croissance de Penicillium camemberti et Geotrichum candidum en culture pure et en association au cours de l'affinage de fromages expérimentaux à pâte molle de type camembert. *Le Lait*, *75*(1), 3-16.

Muzzarelli, R. A. A. (1977). Depolymerization of chitins and chitosans with hemicellulase, lysozyme, papain and lipase. *Chitin handbook*, 153-165.

N

Nakagawa, Y. S., Kudo, M., Loose, J. S., Ishikawa, T., Totani, K., Eijsink, V. G., & Vaaje-Kolstad, G. (2015). A small lytic polysaccharide monooxygenase from Streptomyces griseus targeting α-and β-chitin. *The FEBS journal*, *282*(6), 1065-1079.

Nanseu-Njiki, C. P., Dedzo, G. K., & Ngameni, E. (2010). Study of the removal of paraquat from aqueous solution by biosorption onto Ayous (Triplochiton schleroxylon) sawdust. *Journal of Hazardous Materials*, *179*(1-3), 63-71.

Nwe, N., & Stevens, W. F. (2002). Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. *Biotechnology letters*, *24*(2), 131-134.

O

Ozil, P. (1997). Plans d'expériences: Méthodes de Taguchi. *Grenoble, France, Fascicule I* ENS d'Electrochimie et d'Electrométallurgie. Institut National Polytechnique: INPG, Grenoble (France).

P

Pitt, J. I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium Talaromyces*. Academic Press Inc. Ltd. Londre, UK.634p.

Pochanavanich, P., & Suntornsuk, W. (2002). Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in applied microbiology*, *35*(1), 17-21.

R

Rane, K. D., & Hoover, D. G. (1993). Production of chitosan by fungi. *Food biotechnology*, *7*(1), 11-33.

Ruiz-Herrera, J. (1991). *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*. CRC press.

S

Saeed, A., Sharif, M., & Iqbal, M. (2010). Application potential of grapefruit peel as dye sorbent: kinetics, equilibrium and mechanism of crystal violet adsorption. *Journal of hazardous materials*, *179*(1-3), 564-572.

Skorik, Y. A., Pestov, A. V., & Yatluk, Y. G. (2010). Evaluation of various chitin-glucan derivatives from Aspergillus niger as transition metal adsorbents. *Bioresource technology*, *101*(6), 1769-1775.

Srivastava, V. C., Swamy, M. M., Mall, I. D., Prasad, B., & Mishra, I. M. (2006). Adsorptive removal of phenol by bagasse fly ash and activated carbon: equilibrium, kinetics and thermodynamics. *Colloids and surfaces a: physicochemical and engineering aspects*, *272*(1-2), 89-104.

Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. A. Q. (1997). Mycelia of Mucor rouxii as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry*, *60*(4), 605-610.

Talathoti, G.K., Satyanarayana, S.V. & King, P. (2014). Equilibrium and thermodynamic studies of methylene blue biosorption from aqueous solution using S*yzygium cumini* L. *Journal of Environmental Research and Development*, 8(04), 964-973.

V

Vial, J., & Jardy, A. (1998). Utilisation des plans d'expériences pour évaluer la robustesse d'une méthode d'analyse quantitative par Chromatographie en Phase Liquide. *Analusis*, *26*(1), 15-24.

W

Tianqi, W., Hanxiang, L. I., Manyi, W., & Tianwei, T. A. N. (2007). Integrative extraction of ergosterol,(1→ 3)-α-D-glucan and chitosan from *Penicillium chrysogenum* mycelia. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *15*(5), 725-729.

White, S. A., Farina, P. R., & Fulton, I. (1979). Production and isolation of chitosan from Mucor rouxii. *Applied and Environmental Microbiology*, *38*(2), 323-328.

Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F. A., & Sams, C. E. (2004). Chitin and chitosan value-added products from mushroom waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*(26), 7905-7910.

Y

Yen, M. T., & Mau, J. L. (2006). Preparation of fungal chitin and chitosan from shiitake stipes. *Fungal Science*, *21*(1-2), 1-11.

Z

Zemmouri, H., Kadouche, S., Lounici, H., Hadioui, M., & Mameri, N. (2011). Use of chitosan in coagulation flocculation of raw water of Keddara and Beni Amrane dams. *Water science and technology: Water supply*, *11*(2), 202-210.

Zhang, L., Xu, T., Liu, X., Zhang, Y., & Jin, H. (2011). Adsorption behavior of multi-walled carbon nanotubes for the removal of olaquindox from aqueous solutions. *Journal of hazardous materials*, *197*, 389-396.

Conclusion Générale

Les chercheurs ont utilisé diverses souches phytopathogènes pour l'extraction du chitosane, notamment les ascomycètes, tels que *Ophiostoma ulmi*, *Colletotrichum lindemuthianum* et *Fusarium oxysporum*. De même, dans le genre zygomycètes, certaines espèces, telles que *Rhizopus* et *Absidia*, sont également utilisées (Pipet et al., 2007). Parallèlement, les recherches futures devraient porter sur l'utilisation de micro-organismes non pathogènes. À cet égard, les études devraient être axées sur les résidus de mycélium issus de diverses industries biotechnologiques.

Notre travail s'inscrit dans le contexte de cette problématique de recherche d'une nouvelle source de chitine alternative non pathogène. Cette étude rentre aussi dans le cadre de la protection de l'environnement de la pêche excessive des crustacés provoquant leur réduction ainsi que leur disparition totale dans les années à venir. Pour cela, le champignon *Penicillium camembertii* a été choisi pour son abondance et son cycle de croissance rapide.

Les essais expérimentaux ont montré la possibilité de produire de la chitine et du chitosane libre à partir du champignon *P. camembertii* en faisant subir à la biomasse mycélienne des traitements successifs basique (NaOH) et acide (acide acétique).

L'ensemble des premiers résultats obtenus met en évidence la présence de polysaccharides (chitine et chitosane) dans le champignon *P. camembertii* :

- Le meilleur rendement de biomasse a été obtenu avec la souche *P. camembertii* développée à 25 °C sur milieu solide YPGA avec 12,35 g/L, tandis que la quantité de biomasse de *P. camembertii* cultivée sur milieu liquide YPG est très faible, la concentration de la biomasse ne dépasse pas 3 g/L.
- Les rendements des fractions AIM obtenus après traitement des biomasses avec NaOH 2% sont presque identiques.
- La solubilisation des fractions AIM dans l'acide acétique 10% a permis de séparer les constituants de ces dernières en des fractions insolubles dans le milieu acide AcIM et en des fractions solubles AcSM .
- Le rendement de la chitine (fraction AcIM) atteint une valeur de 10% pour la biomasse de *P. camembertii* cultivé sur milieu solide YPGA à 25 °C pendant 6 jours.
- Le rendement en chitosane libre, obtenu par ajustement du pH de la fraction soluble dans l'acide acétique jusqu'à 10, est faible.

- L'ajout de l'arginine comme source azotée supplémentaire n'influe pas sur la nature des polymères dans la fraction AcIM.
- L'étude de l'effet de la température a permis de conclure que le rendement en précipité (chitosane) et en fraction AcIM (chitine) est influencé par la température d'incubation du champignon. L'extraction de la chitine est favorisée à 28 °C alors que pour le chitosane, elle est favorisée entre 20-25 °C.

  Les points à retenir de cette étude sont les suivants :

  1/La paroi du mycélium *P. camembertii* renferme le complexe chitine-glucanes-chitosane.

  2/Le mode de culture solide a permis de produire une quantité appréciable de biomasse.

  3/La chitine produite n'est pas pure comme fut le cas des biomasses marines. Elle semble être liée aux glucanes insolubles en milieux alcalin et acide.

  4/Le microorganisme renferme au maximum 17% de chitine. Quant au chitosane, sa quantité reste très faible dans les conditions opératoires de cette étude.

  5/L'analyse ATR montre que la zone de nombres d'onde située entre 1200 et 700cm^{-1} est indicatrice de la présence des glucanes liés à la chitine. En effet, avec la chitine commerciale, des pics caractéristiques apparaissent avec une forte intensité alors qu'avec la chitine fongique, ces derniers sont masqués.

  6/Le spectre du chitosane fongique est différent de celui du chitosane marin. Cette différence peut être expliquée par la non pureté du produit due à la précipitation des autres molécules.
- La production du chitosane à partir de la désacétylation douce de la chitine nous a permis de conclure que les fractions AcIM, initialement insolubles, deviennent une suspension colloïdale en milieu acide (1%) après désacétylation.

Nous avons aussi étudié l'élimination du colorant, le bleu de méthylène (BM), sur la membrane du chitosane fongique préparée au laboratoire ainsi que celle du chitosane commercial. Au terme de cette investigation, nous avons constaté que :

- Le temps d'équilibre optimum est de 40 minutes.
- Le changement du pH n'a pas d'impact sur le taux d'élimination du BM. Le taux d'élimination maximal de 93,20% est atteint à pH 7 et à pH 10 après 40 minutes de contact. Dans le cas de la membrane du chitosane marin (commercial), l'adsorption est

meilleure en milieu basique qu'en milieu acide. De très faibles quantités de BM ont été adsorbées sur la membrane en milieu acide contrairement à la membrane d'origine fongique. Probablement, le chitosane fongique, présenté sous forme de complexe chitosane-glucane, peut posséder un pH_{PCN} acide (< 6,3 de chitosane commercial).

- L'élimination du BM sur la membrane de chitosane fongique augmente avec la masse du bioadsorbant de 10 mg à 1000 mg. La concentration optimale de la membrane a été estimée à 1g/100 mL.
- La température optimale est de 25 °C.
- L'étude de la biosorption à l'équilibre révèle le mécanisme est très complexe. Le système membrane-BM peut être décrit par les modèles de Langmuir et de Freundlich.

L'optimisation par un plan factoriel complet a été proposée afin de déterminer les rendements maximums de la chitine et du chitosane, en utilisant des conditions opératoires différentes, à savoir: la température, la durée, la solution d'oligo-élément et la source d'azotée (rapport Extrait de levure/ Peptone).

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que la production de *P. camembertii* sur milieu YPGA est favorable dans les conditions suivantes :

- Durée : 15 jours
- Température 27,5 °C
- Oligo-élément : 50 mL/L
- Source Azotée : rapport Extrait de levure/ Peptone : 0,6.

Le rendement de la fraction AcIM (chitine brute) obtenu après optimisation des paramètres et après 5 répétitions est de 50%. Cette valeur est proche de celle prédite par le logiciel, à savoir 48,76%, ce qui confirme la validité du modèle. Par ailleurs, le champignon *P. camembertii* renferme des quantités négligeables de chitosane libre (fraction AcSM).

En perspective

- Culture de champignon *P. camembertii* sur des substrats naturels issus de l'agriculture et de l'agroalimentaire (jus de dattes, lactosérum).
- Proposer un protocole d'extraction amélioré par un traitement basique 11 M puis utiliser l'α-amylase pour séparer le complexe chitosane-glucane. Ce procédé permet d'obtenir du chitosane et du glucane avec un degré de pureté très élevé sans pour autant dégrader leur qualité.
- Appliquer le biopolymère (pur), sous toutes ses formes (billes, membrane, bioplastique….), dans le domaine environnemental pour le traitement des effluents solides et liquides.
- Appliquer les chitosanes obtenus dans les activités biologiques :
    - Activité antimicrobienne
    - Activité anti-oxydant
    - Activité antitumoral

Annexe I : Préparation de la solution de Trinci

15g d'EDTA di Na, 2H2O ;

5mL de NaOH (10M) ;

5g de MgSO4, 7H2O ;

1,3g de CaCl2, 2H2O ;

0,4g de ZnSO4, 7H2O ;

0,4 g de MnSO4, 5H2O ;

0,1g de CuSO4, 5H2O ;

2,8 g de (NH4)2Fe(SO4)2, 6H2O ;

0,073g de (NH4)6Mo7O24, 6H2O

1litre d'eau distillée.

Annexe II : Préparation de milieu de culture PDA (Potato dextrose agar)

La préparation du milieu PDA est faite dans un flacon de 1 L, et selon le mode opératoire suivant:

1. Peser 20 g d'agar et 20 g de glucose.

2. Verser les 20 g d'agar et de glucose dans un flacon de 1 L.

3. Préparer l'extrait de pomme de terre :

    3.1. Prendre 01 ou 02 pommes de terre, et les éplucher.

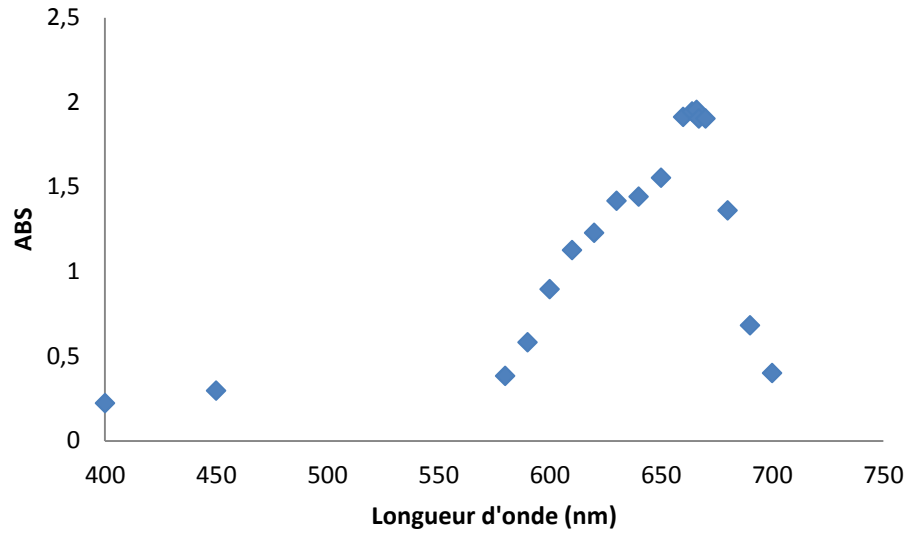
    3.2. Peser 200 g, les découper en dés puis les faire bouillir dans 200 mL d'eau distillée pendant 15 min.

    3.3. Filtrer la pomme de terre à l'aide d'un tissu.

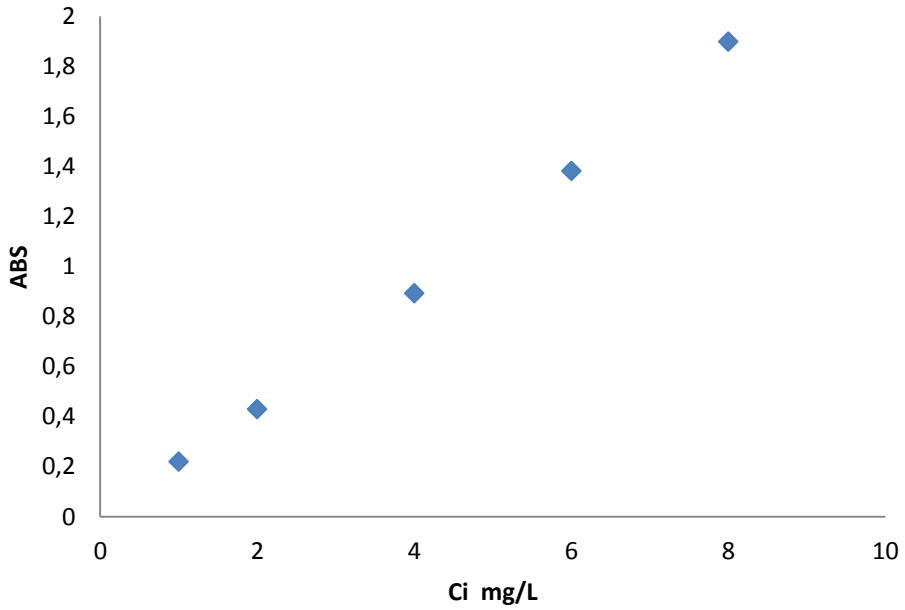
    3.4. Récupérer le filtrat dans le flacon contenant le glucose et l'agar, puis ajuster jusqu'à 1 L.

    3.5. Placer le flacon dans l'autoclave pendant 20 min à T=120°C.

Annexe III : Spectre visible du colorant bleu de méthylène (BM) à une concentration de 10 mg/L



Annexe IV : Courbe d'étalonnage du colorant bleu de méthylène (BM).



Annexe V : Table de Student

Unilatéral Bilatéral	**0,01** **0,20**	**0,05** **0,10**	**0,025** **0,05**	**0,01** **0,02**	**0,005** **0,01**
1	3,08	6,31	12,7	31,8	63,7
2	1,89	2,92	4,30	6,97	9,92
3	1,64	2,35	3,18	4,54	5,84
4	1,53	2,13	2,78	3,75	4,60
5	1,48	2,02	2,57	3,37	4,03
6	1,44	1,94	2,45	3,14	3,71
7	1,42	1,90	2,37	3,00	3,50
8	1,40	1,86	2,31	2,90	3,36
9	1,38	1,83	2,26	2,82	3,25
10	1,37	1,81	2,23	2,76	3,17
11	1,36	1,80	2,20	2,72	3,10
12	1,36	1,78	2,18	2,68	3,06
13	1,35	1,77	2,16	2,65	3,01
14	1,35	1,76	2,15	2,62	2,98
15	1,34	1,75	2,13	2,60	2,95
16	1,34	1,75	2,12	2,58	2,92
17	1,33	1,74	2,11	2,57	2,90
18	1,33	1,73	2,10	2,55	2,88
19	1,33	1,73	2,09	2,54	2,86
20	1,33	1,73	2,09	2,53	2,85
21	1,32	1,72	2,08	2,52	2,83
22	1,32	1,72	2,07	2,51	2,82
23	1,32	1,71	2,07	2,50	2,81
24	1,32	1,71	2,06	2,49	2,80
25	1,32	1,71	2,06	2,49	2,79
26	1,32	1,71	2,06	2,48	2,78
27	1,31	1,70	2,05	2,47	2,77
28	1,31	1,70	2,05	2,47	2,76
29	1,31	1,70	2,05	2,46	2,76
30	1,31	1,70	2,04	2,46	2,75
40	1,30	1,68	2,02	2,42	2,70
∞	1,28	1,65	1,96	2,33	2,58

Annexe VI : Table de Fischer

Valeurs des 95 ièmes centiles (niveaux 0,05)

$F_{0,95}$ pour la distribution F

V_1 degrés de liberté au numérateur

V_2 degrés de liberté au dénominateur

$V_1 \rightarrow$ / $V_2 \downarrow$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	251	252	253	254
2	18,5	19,00	19,2	19,20	19,3	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5
3	10,1	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,7	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40	4,37
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,3	3,27	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45	2,40
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,8	2,75	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34	2,30
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,60	2,53	2,46	2,42	2,38	2,34	2,30	2,25	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,7	2,65	2,60	2,53	2,46	2,39	2,35	2,31	2,27	2,22	2,18	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,48	2,40	2,33	2,29	2,25	2,20	2,16	2,11	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,42	2,35	2,28	2,24	2,19	2,15	2,11	2,06	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,38	2,31	2,23	2,19	2,15	2,1	2,06	2,01	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,34	2,27	2,19	2,15	2,11	2,06	2,02	1,97	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,31	2,23	2,16	2,11	2,07	2,03	1,98	1,93	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,28	2,20	2,12	2,08	2,04	1,99	1,95	1,90	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	2,25	2,18	2,10	2,05	2,01	1,96	1,92	1,87	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,23	2,15	2,07	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	2,20	2,13	2,05	2,01	1,96	1,91	1,86	1,81	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,18	2,11	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,79	1,73
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	2,16	2,09	2,01	1,96	1,92	1,87	1,82	1,77	1,71
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,15	2,07	1,99	1,95	1,9	1,85	1,8	1,75	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,2	2,13	2,06	1,97	1,93	1,88	1,84	1,79	1,73	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,12	2,04	1,96	1,91	1,87	1,82	1,77	1,71	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	2,10	2,03	1,94	1,90	1,85	1,81	1,75	1,70	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,09	2,01	1,93	1,89	1,84	1,79	1,74	1,68	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2,00	1,92	1,84	1,79	1,74	1,69	1,64	1,58	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,92	1,84	1,75	1,70	1,65	1,59	1,53	1,47	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,18	2,09	2,02	1,96	1,91	1,83	1,75	1,66	1,61	1,55	1,50	1,43	1,35	1,25
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,75	1,67	1,57	1,52	1,46	1,39	1,32	1,22	1,00

Résumé

Cette étude a été consacrée à l'extraction des biomatériaux (chitine/chitosane libre) à partir de la paroi cellulaire du champignon *Penicillium camembertii,* très utilisée dans la fabrication des camemberts. L'ensemble des premiers résultats obtenus dans ce travail met en évidence la présence de polysaccharides (chitine et chitosane) dans le champignon *P. camembertii.* Ainsi, ce travail a montré qu'il était possible de compléter la liste des Ascomycètes par la souche *P. camembertii,* comme source potentielle et prometteuse de polysaccharides à haute valeur ajoutée. Cependant, les rendements en chitine et en chitosane restent, toutefois, faibles. Grâce à des tentatives d'essais d'optimisation par un plan factoriel complet, il a été montré qu'il était possible d'améliorer ces rendements pour atteindre des taux supérieurs à 50%, valable pour la chitine alors que le rendement en chitosane reste toujours négligeable. La caractérisation du produit a décelé la présence de la chitine liée à un autre polysaccharide : le glucane. Pour l'application du produit obtenu dans l'élimination du colorant Bleu de Méthylène (BM), les premiers tests réalisés sont très intéressants, ils démontrent l'abattement de plus de 90%, réalisable dans l'intervalle de concentrations allant de 5 à 100 mg/L, à pH acide et basique, à température avoisinante l'ambiant et avec une quantité de chitosane en forme de membranes de (1g/100 mL). Comparativement au chitosane commercial d'origine marine, l'effet du pH en milieu acide influe négativement sur l'efficacité de la membrane.

Mots clés: Biomasse ; Chitine ; Chitosane libre ; *Penicillium camembertii* ; YPGA.

Abstract

This study was devoted to the extraction of biomaterials (chitin/ free chitosan) from the cell wall of the fungus *Penicillium camembertii,* widely used in the manufacture of pie charts. All of the first results obtained in this work demonstrate the presence of polysaccharides (chitin and chitosan) in the fungus *P. camembertii*. Thus, this work has shown that it is possible to complete the list of Ascomycetes with the strain of *P. camembertii*, as a potential and promising source of polysaccharides with high added value. However, the yields of chitin and chitosan remain low. Thanks to attempts at optimization tests using a full factorial design, it has been shown that it was possible to improve these yields to reach levels greater than 50%, valid for chitin while the yield of chitosan remains always negligible. Characterization of the product has detected the presence of chitin linked to another polysaccharide: glucan. For the application of the product obtained in the elimination of the Methylene Blue dye (BM), the first tests carried out are very interesting, they demonstrate the reduction of more than 90%, achievable in the concentration range ranging from 5 to 100 mg/L, at acidic and basic pH, at ambient temperature and with a quantity of chitosan in the form of membranes (1 g/100 mL). Compared with commercial chitosan of marine origin, the effect of pH in an acid medium affects negatively the efficiency of the membrane.

Keys words: Biomass ; Chitin ; Free chitosan; *Penicillium camembertii;* YPGA.