REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MNISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Faculté des sciences de la nature et de la vie

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS – MOSTAGANEM

Spécialité: Nutrition humaine.

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN SCIENCES

De l'université de Mostaganem

Par

Fatma YOUCEFI

Effet biopréservateur du chitosane associé à des substances protéiques antimicrobiennes dans le cas des produits marins

Soutenue le 14 juin 2015 devant le jury d'examen composé de :

Président :	Mr Halbouche Miloud, Professeur à l'univ. Mostaganem.
Rapporteur :	Mr Riazi Ali, Professeur à l'univ. Mostaganem.
Examinateurs :	Mr Mr Kheroua Omar, Professeur à l'univ. Es-Senia Oran.
	Mr Dilmi-Bouras Abdelkader, Professeur à l'univ. Chlef.
	Mr Benali Mohamed, Professeur à l'univ. Sidi-Bel-Abbès.
	Mme Merzouk Hafida, Professeur à l' univ. Tlemcen.

Année Universitaire : 2014 / 2015.

Dédicace

Je dédie cette thèse

À mon père et mes grands parents

À ma très chère mère

À mon époux Rachid et mes enfants Abderrahmen, Habib, Niema et Taki

À mes soeurs Samira, Khadidja, Naima et Ikram

À mes frères Mohamed, Krimo, Zoubir et Abdellah

À mon amie Chahinez

À Sihem

À toute ma famille et ma belle-famille

À toutes les personnes qui me sont chères.

Fatma

AVANT- PROPOS

La plus grande partie de ce travail de thèse a été réalisée au sein du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem. Certaines expériences spécifiques comme la caractérisation génotypique des souches lactiques isolées ont été réalisées à l'unité mixte de recherches BIA (Biopolymères Interactions Assemblages) (INRA de Nantes 1268, France), précisément dans l'équipe Fonctions et interactions des protéines (FIP).

Je tiens, tout d'abord, à témoigner ma profonde reconnaissance à mon directeur de recherches, Mr Riazi Ali, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour m'avoir acceptée dans son laboratoire, initiée à la recherche depuis le démarrage de mon magister jusqu'au doctorat, et pour avoir consacré tout son temps et ses moyens à la bonne conduite de ce travail. Soyez rassuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Mes chaleureux et respectueux remerciements sont adressés à Mr Halbouche Miloud, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, qui a bien voulu présider le jury de ma thèse malgré l'étroitesse du temps qui lui est imparti pour ses nombreuses responsabilités pédagogiques et scientifiques.

Je suis honorée par la participation de Mr Kheroua Omar, Professeur à l'Université d'Oran à l'examen de cette thèse.

Je remercie également mon enseignant, Mr Dilmi-Bouras Abdelkader, Professeur à l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef et actuel président de la Société Algérienne de Microbiologie (SAM), pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements sont aussi adressés à Mr Benali Mohamed, Professeur à l'Université Djillali Liabes de Sidi-Bel-Abbès, pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie Mme Merzouk Hafida, Professeur Directrice du laboratoire PPABIONUT Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition Faculté SNVTU, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie, d'avoir aimablement accepté d'apporter ses critiques à ce travail.

Je tiens à remercier également le Dr Jean-Marc Chobert (Directeur de recherches à l'unité FIP, INRA de Nantes, France) pour avoir accepté de m'accueillir dans son équipe, mis à ma disposition les moyens pour réaliser mes manipulations spécifiques.

Je voudrais également remercier tout particulièrement toutes les personnes rencontrées dans le laboratoire français où j'avais séjourné et je pense à Yvan Choiset pour son aide.

Je salue et remercie chaleureusement mes amis et collègues du LMBAFS pour leurs encouragements, leurs précieux conseils et leur aide morale.

Enfin, un immense merci à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation, à mes étudiants de l'université d'ABOU BAKR BELKAID Tlemcen où j'ai commencé ma carrière d'enseignante. Je remercie mes étudiants d'avoir accepté d'avancer avec moi sur des terrains de recherche nouveaux, parfois glissants, ainsi que pour leur soutien, leur dévouement et le respect dont ils ont fait preuve à mon égard.

Fatma Youcefi

Résumé

L'objectif principal de cette thèse est la mise au point d'une stratégie de biopréservation de la crevette royale rose *Penaeus braziliensis* par ; soit des substances antagonistes sécrétées par - une bactérie lactique, *Lactobacillus plantarum*, isolée à partir de ce même crustacé ; soit par un biopolymère, le chitosane, extrait de la carapace de crustacé ou encore par l'association des deux. Dans un premier temps, des souches bactériennes ont été isolées à partir de la crevette et identifiées par PCR : *Lb. plantarum, Lb. Brevis, Enterococcus faecalis, Pediococcus pentosaceus, Leuconostoc et Weissella paramesenteroïdes*. Une sélection basée sur leur pouvoir antagoniste et leur aptitude à croître à 30 et à 8°C a permis de dégager une souche psychrophile, *Lb. plantarum* Lbr1, qui manifeste un antagonisme notable (diamètre de zones d'inhibition compris entre 15.7 et 23.83 mm) vis-à-vis de plusieurs souches pathogènes testées. Cette souche produit de l'acide lactique (18g/L/24h) et un inhibiteur thermorésistant à 100°C pendant 20 min (SANA1). Dans un deuxième temps, le chitosane extrait des carapaces de crevette a été caractérisé sur le plan de son degré de déacétylation (75%) ; de sa viscosité (119.7±0.04 Pa.s) ; de son poids moléculaire (1414.33±16.99 kDa) ; de son contenu en cendres (0.34g/g de chitosane), matière sèche (0.74g/g de chitosane) et en protéines (0.37g/g de chitosane) ; de sa capacité à réduire le DPPH (62.6%) et de son activité antimicrobienne exprimée en diamètre de la zone d'inhibition vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* STRM (28 mm), *Escherichia coli* CIP76.24 (14 mm), *Bacillus subtilis* DSMZ10 (15,83 mm), *Salmonella enterica* CIP81.3 (18,66 mm), *Shewanella putrefaciens* EU2187 (25,66 mm) et de *Listeria monocytogenes* (21,66 mm). Le pouvoir chélateur du chitosane utilisé à des concentrations de 3, 6 et 9 ppm est, respectivement, de 80.33, 82.50 et 86.22% vis-à-vis du manganèse ; de 51.44, 53.63 et 45.77% vis-à-vis du nickel et de 66.53, 66 et 51,70 % vis-à-vis du zinc. Dans un troisième temps, l'effet biopréservateur du biofilm chitosane seul, du facteur protéique SLbr1 seul ou de la combinaison chitosane/SLbr1 sur des crevettes inoculées avec *Staphylococcus aureus* STRM et conservées pendant trois semaines à 4°C s'est révélé remarquable étant donné la forte diminution (-99%) de la charge microbienne du germe pathogène. Les caractéristiques organoleptiques de la crevette n'étaient pas affectées.

Mots clefs: Bactéries lactiques psychrotrophes- Substances antagonistes- Pathogènes- Chitosane- Chélation-Métaux lourds- Biopréservation- Crevette.

Abstract

The objective of this study was to develop a biopreservation strategy of the royal pink shrimp *Penaeus braziliensis* by either using antagonistic substances *produced* by *lactic acid bacteria, , Lactobacillus plantarum,* isolated from the same shellfish; using a biopolymer extracted from *Crustacean Shells* known as chitoan; or by the combination of both of them. First of all, bacterial species were isolated from the shrimps and identified by PCR: *Lb. plantarum, Lb. Brevis, Enterococcus faecalis, Pediococcus pentosaceus, Leuconostoc et Weissella paramesenteroïdes*. One psychrophile strain, *Lb. plantarum* Lbr1, was selected based on its high antagonistic activities against some pathogenic strains (inhibition zones comprised between 15.7 and 23.83 mm). This strain is able to produce lactic acid (18g / L / 24h) and a protein factor inhibitor (SANA1) that resists to temperatures of 100 ° C for 20 min. Secondly, chitosan extracted from shrimp shells was characterized in terms of the degree of deacetylation (75%), viscosity (119.7±0.04 Pa.s) , molecular weight (1414.33±16.99 kDa), ash content (0.34g/g of chitosan), dry matter (0.74±0.02 g /g of chitosan) and protein content (0.37g/g of chitosan). The chitosan ability to reduce DPPH (62.6%) and its antimicrobial activity was also studied. A remarkable inhibition zones were obtained against *Staphylococcus aureus* STRM (28 mm), *E. coli* CIP76.24 (14 mm), *Bacillus subtilis* DSMZ10 (15.83 mm), *Salmonella enterica* CIP81.3 (18.66 mm), *Shewanella putrefaciens* EU2187 (25.66 mm) and *Listeria monocytogenes* (21.66 mm). *The chelating* properties of chitosan (3, 6 and 9 ppm) were 80.33, 82.50 and 86.22% with manganese, 51.44, 53.63 and 45.77% with nickel and 66.53, 51.70 and 66% with the zinc, respectively. Finally, the preservative effect of the chitosan biofilm alone, the protein factor SLbr1 alone or both of them combined chitosan / SLbr1 on shrimp inoculated with *Staphylococcus aureus* STRM and stored for three weeks at 4 ° C was remarkably effective and a inhibition of 99% of this pathogenic strain was obtained. In the same time, the organoleptic characteristics of the shrimp were not affected.

Keywords: Lactic acid bacteria- Psychrophile -Antagonistic substances-Pathogens-Chitosan-Chelation- Heavy metals- Biopreservation- Shrimp.

Liste des abréviations

- *Cb : Carnobacterium.*
- *Lb : Lactobacillus.*
- *Lc : Leuconostoc.*
- *Ec : Enterococcus.*
- *L : Listeria. monocytogenes.*
- *B* : *Bacillus.*
- DA : Degré d'acétylation.
- DD : Degré de désacétylation.
- IR : Infrarouge.
- RMN : La résonance magnétique nucléaire
- HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance (High-performance liquid chromatography).
- BHT : L'hydroxytoluène butylé.
- BHI : BD Brain Heart Infusion.
- CMI : concentration minimale inhibitrice.
- CMB : concentration minimale bactéricide.
- FTIR : La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
- STRM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.
- SANA : Substance antimicrobienne non acide.
- US FDA : United States Food and Drug Administration.
- ISO : Organisation internationale de normalisation.
- EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique.
- PCR : Polymerase Chaine Reaction.
- AWDA : Agar-well diffusion method.
- UFC : Unité Formant Colonies.
- INMV : institut National de la Médecine Vétérinaire.
- TSB : BD Tryptic Soy Broth.
- AOAC : Association of Official Analytical Chemists.
- BSA : Sérum à base d'albumine bovine.
- ATCC : American type culture collection.
- INT : piodonitrotétrazolium violet.

Liste des tableaux et des figures

Liste des tableaux

CHAPITRE II : Le chitosane

Tableau 1: Quelques applications de la chitine et du chitosane (Bensaha, 2010)…….....pp 22.

CHAPITRE III : Caractérisation phénotypique et génotypique de bactéries lactiques psychrotrophes à partir d'un produit marin.

Tableau 2: Origine, milieu de culture et température de croissance des différentes souches utilisées....pp 29.

Tableau 3: Mélange réactionnel de la PCR.....pp 34.

Tableau 4: Programme établi pour l'amplification PCR par le thermocycleur Verity…....pp 35.

Tableau 5: Principales caractéristiques morphologiques des colonies de bactéries lactiques isolées.....pp41.

Tableau 6: Tableau récapitulatif des caractéristiques morphologiques, culturales et physiologiques des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la crevette.....pp 43.

Tableau 7: Profils fermentaires des isolats par les galeries API 50 CHL.....pp 45.

Tableau 8: Profil enzymatique des bactéries lactiques sélectionnées.....pp 47.

Tableau 9 : Identification des bactéries lactiques isolées par la technique de l'ARNr16s.....pp 49.

Tableau 10 : Distribution des espèces de bactéries lactiques isolées identifiées par PCR.....pp 50.

Tableau 11: Les moyennes des diamètres d'inhibition exprimées en millimètres obtenues pour chaque souche..... pp 54.

CHAPITRE IV : Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette : Le chitosane.

Tableau 12: Origine, milieu de culture et température de croissance des différentes souches utilisées..pp 69.

Tableau 13: Caractérisation physicochimique du chitosane extrait.....pp 84.

Tableau 14: Pouvoir anti-oxydante à différentes concentrations du chitosane extrait 0.5, 1, 1.5, 2 .....pp 86.

Tableau 15: valeurs de CMI et de CMB (ppm/mL) du chitosane à différentes concentration testés contre les souches bactériennes testées *Staphylococcus aureus résistante à la* methicilline et *Escherichia coli CIP76.24*.....pp 89.

Tableau16: Effet d'adsorption du chitosane sur les métaux lourds Mn, Zn et Ni avec des concentrations initiales en ppm 3,6 et 9.....pp 90.

CHAPITRE V : CHAPITRE V : Effet combiné du chitosane associé au facteur protéique produit par *Lactobacillus plantarum* Lbr1 sur la biopréservation de la qualité microbiologique et organoleptique de la crevette *Penaeus brasiliensis.*

Tableau 17: caractérisques du chitosane extrait.....pp 94.

Tableau 18: récapitulatif des essais effectués au laboratoire.....pp 98.

Tableau 19: Barème de cotation des caractéristiques organoleptiques de la crevette rose Penaeus brasiliensis (Nielsen, 1993).....pp 99.

Tableau 20: Evaluation organoleptique du lot CR 1 : Crevettes aspergées de 100µl à 105UFC/ml de Staphylococcus aureus.....pp 103.

Tableau 21: Evaluation organoleptique du .lot CR2 : Crevettes contaminées de 100µl à 105UFC/ml de Staphylococcus aureus puis sont enrobées d'un biofilm Chitosane /biomolécule SLbr1.....pp 104.

Tableau 22: Evaluation organoleptique du lot CR 3 Crevettes sont contaminées de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* puis sont aspergées 100µl de la biomolécule de la SANA1.....pp 105.

Tableau 23: Evaluation organoleptique du .lot CR4 : Crevettes sont aspergées de 100µl à 105UFC/ml de Staphylococcus aureus puis sont enrobées d'un biofilm Chitosane seul.....pp 106.

Liste des figures

CHAPITRE II : Le chitosane

Figure 1: Structure chimique du chitosane (Nugraha, 2006).....pp 13.

Figure 2: Extraction du chitosane de carapace de crevettes (Truong et al., 2007)…….....…. pp 15.

Figure 3: Conversion de chitine en chitosane par désacétylation (Bensaha, 2010).....pp 15.

Figure 4: Film comestible de chitosane (A) et son application dans la protection du poisson (B) (Pérez-Mateos, 2007).....pp 25.

CHAPITRE III : Caractérisation phénotypique et génotypique de bactéries lactiques psychrotrophes à partir d'un produit marin.

Figure 5: Amorces spécifiques (Fd1 et RP2).....pp 34.

Figure 6: Aspect macroscopique sur milieu Elliker des souches isolées.....pp 41.

Figure 7: Morphologie des bactéries isolées de la crevette au microscope optique (x 1000).....pp 42.

Figure 8: Gel d'électrophorèse des produits de la PCR des isolats de bactéries lactiques (Photos visualisées par le système de photo documentation « GBox »).....… pp 49.

Figure 9: Pouvoir antibactérien par la méthode des spots (spot on the lawn) des *subtilis* DSMZ10, *Escherichia coli CIP*76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Staphylococcus aureus* STRM, Listeria *monocytogenes* EU2160, *Listeria ivanovii* EU2162, durant 24h de culture à 30°C.....pp 54

Figure 10: Spectre d'activité des la souche lactiques identifiées : **(A)** - L br1- *Lb. Plantarum,* souche psychrotrophe**. (B)** Lbr2- *Weissella paramesenteroïdes* ,souche mésophile . **(C)-** Lbr3 - *Lactobacillus gasseri,* souche mésophile**. (D)-**Lbr4- *Lb. plantarum* souche mésophile. **(E)-**Lbr5- *L brevis* , souche mésophile, vis-à-vis des souches indésirables : *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Escherichia coli CIP*76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Staphylococcus aureus* CIP76.25, Listeria *monocytogenes* EU2160, *Listeria ivanovii* EU2162 , durant 24h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SD (n=3).....pp 55.

Figure 11: Spectre d'activité des la souches lactiques identifiées : **(F)** - L br6- *L brevis,* souche mésophile**. (G)** Lbr7- *Enterococcus faecalis,*souche mésophile . **(H)-** Lbr8 - *Pediococcus pentosaceus,* souche mésophile**. (I)-**Lbr9- *Pediococcus pentosaceus* ,souche mésophile, vis-à-vis des souches indésirables : *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Escherichia coli CIP*76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Staphylococcus aureus* CIP76.25, Listeria *monocytogenes* EU2160, *Listeria ivanovii* EU2162 , durant 24h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SD (n=3).....pp 56.

Figure 12: Chromatogramme de l'extrait de surnageant de la souche Lbr1- *Lb. Plantarum*.....pp 57.

Figure 13: Pic du standard d'acide lactique (10g/L) au temps de rétention 11,83 min.....pp 57.

Figure 14: Pic du standard d'acide acétique (10g/L) au temps de rétention 14,25 min.....pp 58.

Figure 15: A : courbe étalon Acide lactique, **B :** courbe étalon acide acétique. ….....pp 58.

Figure 16: Cinétiques de croissance bactérienne de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 en milieu Elliker liquide et de production de la biomolécule à 30°C.....pp 59.

Figure 17: Cinétiques de croissance bactérienne de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 en milieu Elliker liquide et de production de la biomolécule à 8°C.....pp 59.

Figure 18 : Effet de différentes températures sur l'activité de la biomolécule de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 contre *Listeria ivanovii EU2162*. …….....pp 61.

Figure 19: Effet de la température sur l'activité inhibitrice de la biomolécule de *Lactobacillus plantarum* Lbr1 à différentes températures 8, 30, 80,100 et 121°C pendant 10 et 20 min contre *Listeria ivanovii EU2162*.....pp 62.

Figure 20: Effet des enzymes la trypsine, la pronase E, la protéinase K , la lipase A et a amylase à sur la biomolécule de la souche *Lb. plantarum* Lbr1 ….....pp 63.

CHAPITRE IV : Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette : Le chitosane.

Figure 21: carapace de crevette après lavage pour leur utilisation.....pp 70.

Figure 22: Procédé d'extraction de la chitine et du chitosane (Mokrani, 2012).....pp 72.

Figure 23: Schéma des réactions chimiques de désacétylation de la chitine (Gizatulina, 2005)..... pp 73.

Figure 24: Le chitosane après désacétylation.....pp 73.

Figure 25: Viscosimètre capillaire d'Ubbelhode ….....pp 75.

Figure 26: Spectre Infra-Rouge du chitosane extrait. . ….....pp 82.

Figure 27: Pouvoir anti-oxydante à différentes concentrations du chitosane extrait 0,5/1/1,5 et 2g/100ml et de l'acide ascorbique. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations ±SEM (n .....pp 84.

Figure 28: Concentration efficace 50% (CE50) d'inhibition de l'activité anti-radicalaire (RSA) du chitosane.....pp 85.

Figure 29: Pouvoir antibactérien du chitosane (diamètre d'inhibition en mm) contre *Escherichia coli* CIP76.24, *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Listeria monocytogenes* EU2160 et *Staphylococcus aureus* résistante à la methicilline. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations ± SEM (n = 3) pp 87.

Figure 30: Pouvoir antibactérien du chitosane et son spectre d'action par la méthode de diffusion en puits contre Escherichia coli CIP76.24, Salmonella enterica CIP81.3, Shewanella putrefaciens EU2187, Listeria monocytogenes EU2160 et Staphylococcus aureus résistante à la methicilline.....pp 87.

CHAPITRE V : Effet combiné du chitosane associé au facteur protéique produit par *Lactobacillus plantarum* Lbr1 sur la biopréservation de la qualité microbiologique et organoleptique de la crevette *Penaeus brasiliensis*.

Figure 31: Le chitosane extrait des carapaces de crevettes..... pp 94.

Figure 32: Crevette Penaeus brasiliensis utilisée.....pp 95.

Figure 33: biofilm de chitosane à gauche et chitosane biomolécule Lbr1 à droite.....pp 100.

Figure 34: Evolution de la charge microbienne de *Staphylococcus aureus* STRM au cours du stockage à 4°C CR2 : Crevettes contaminées de de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* puis sont enrobées d'un biofilm Chitosane /biomoléculeSLbr1. CR3 : Crevettes sont contaminées de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* puis sont aspergées 100µl de la biomolécule SLbr1. CR4 : Crevettes sont aspergées de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* puis sont enrobées d'un biofilm Chitosane seul. . Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SD (n=3).pp 118.....pp 102.

Table des matières

Dédicace
Avant-propos
Résumé
Abstract
Liste des abréviations
Liste des tableaux et des figures
Table des matières

Introduction..... 1

CHAPITRE I : La biopréservation

I.1. Généralités ……..…….....……..... 4

I.2. Aspects généraux de la biopréservation ……..... 4

I.2.1. La technologie des barrières …… ……..... 4

I.2.2. La biopréservation des aliments.....……..... 5

I.3. Les bactéries lactiques 6

I.3.1. Définition ……..... 6

I.3.2. Les métabolites à activité antimicrobienne produits par les bactéries lactiques..... 7

I.3.2.1. Les bactériocines..... 7

I.3.2.2. Les acides organiques ……..... 8

I.3.2.3. Le peroxyde d'hydrogène ……..... 8

I.3.2.4. Le dioxyde de carbone…….....…….....…….....

II.4.2.2. Biodégradabilité..……..... 18
II.4.2.3. Propriétés bactériostatiques et fongistatiques du chitosane…….....…. 18
II.4.2.4. Activité antimicrobienne du chitosane ……..... 19
II.4.2.5. Effet antioxydant du chitosane ……..... 20
II.4.3. Propriétés gélifiante et émulsionnante du chitosane…….....…….. 21
II.4. Les applications de la chitine et du chitosane…...…….... 22
II.4.1.Les applications alimentaires ……..... 23
II.4.2. Le chitosane comme additif alimentaire ……..... 24
II.4.3. Application du chitosane en tant que bio-emballage..... 24
II.4.4. Le chitosane comme ingrédient fonctionnel : capacité de fixation des graisses..... 25

CHAPITRE III : Caractérisation phénotypique et génotypique de bactéries lactiques psychrotrophes à partir d'un produit marin.

Introduction 27
III.1. Matériels et Méthodes 28
III.1.1. Matériels 28
III.1.1.1. Souches bactériennes : description, conservation et préparation .....……..... 28
III.1.1.1.1. Les souches expérimentales …..... 28
III.1.1.1.2. La souche *Lactobacillus curvatus* EU 762 EU..... 28
III.1.1.1.3. Les souches pathogènes …...…….... 28
III.1.1.1.4. Milieux de culture et conditions de croissance..... 29
III.1.1.2. Milieux de culture et réactifs pour les tests d'orientation ……..... 30
III.1.2. Échantillonnage des crevettes et isolement des bactéries lactiques..... 31
III.1.2.1.Collecte des échantillons de crevettes ….....……..... 31
III.1.2.2. Isolement et identification des souches lactiques mésophiles..... 31
III.1.2.3.Tests d'orientation pour l'identification des bactéries lactiques..... 31
III.1.2.4. Sélection et identification des souches lactiques psychrotrophes..... 32
III.1.2.5. Screening des souches lactiques par fermentation des sucres..... 32
III.1.2.6. Screening enzymatique des bactéries lactiques….……..... 33
III.1.2.7. Identification génotypique des bactéries lactiques..... 33
III.1.2.7.1. Extraction d'ADN..... 33
III.1.2.7.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)..... 34
III.1.2.7.3. Séquençage de la sous unité ribosomale 16S..... 36
III.1.2.7.4. Analyse des séquences et identification des bactéries..... 36
III.1.2.8. Détermination de l'activité antimicrobienne des souches..... 37
III.1.2.9. Caractérisation de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 isolée de crevette.. 38
III.1.2.9.1. Analyse HPLC des acides organiques produits par Lb plantarum Lbr1..... 38
III.1.2.9.2. Mise en évidence d'une substance antimicrobienne non acide chez Lb

plantarum Lbr1 (SANA1)..... 38
III.1.3.Traitement statistique des résultats..... 40
III.2. Résultats et discussion..... 40
III.2.1. Isolement et identification préliminaire des bactéries lactiques isolées de crevette.. 40
III.2.2. Identification préliminaire des bactéries lactiques ……..... 40
III.2.3.Caractéristiques morphologiques, culturales et biochimiques des bactéries isolées... 41
III.2.4. Caractéristiques physiologiques ……..... 42
III.2.5. Profil biochimique des bactéries lactiques isolées et sélectionnées..... 43
III.2.6. Profil enzymatique des bactéries lactiques sélectionnées..... 46
III.2.7. Caractérisation génotypique des bactéries lactiques..... 47
III.2.7.1. Séquences nucléotidiques des souches isolées..... 50
III.2.8. Pouvoir antibactérien des souches et leur spectre d'action..... 52
III.2.9. Le profil fermentaire de *Lactobacillus plantarum* Lbr1..... 57
III.2.10.Température optimale et cinétique de production du de la substance antimicrobienne non acide (SANA1)..... 59
III.2.11.L'effet de la température..... 61
III.2.12.Confirmation de la nature protéique de SANA1..... 63
III.2.13. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de SANA1..... 64
III.3.Conclusion 64

CHAPITRE IV : Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette : Le chitosane

Introduction.……..……..... 67
IV.1. Matériels et Méthodes ……..... 68
IV.1.1. Matériels……..... 68
IV.1.1.1. Collecte des carapaces, origine ……..... 68
IV.1.1.2. Les souches pathogènes utilisées ……..... 68
IV.1.2. Méthodes……..... 70
IV.1.2.1. Réactivation des souches pathogènes …… ……..... 70
IV.1.2.2. Prétraitement des carapaces..... 70
IV.1.2.3. Extraction de la chitine ……..... 71
IV.1.2.4. Préparation du chitosane à partir de la chitine (Processus de déacétylation)..... 73
IV.1.2.5. Mesure du degré de déacétylation par Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourrier – FTIR..... 74
IV.1.2.6. Mesure de la viscosité et poids moléculaire du chitosane..... 74
IV.1.2.7. Détermination de la matière sèche..... 75
IV.1.2.8. Détermination de la teneur en cendres..... 76
IV.1.2.9. Dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Lowry..... 76

IV.1.2.10. Détermination de l'activité antioxydante du chitosane par la méthode de diffusion en puits..... 77
IV.1.2.11. Mesure du pouvoir antibactérien et du spectre d'action du chitosane..... 77
IV.1.2.12. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)..... 78
IV.1.2.13. Détermination du pouvoir d'adsorption des métaux lourds Ni, Zn, Mn par le chitosane..... 79
IV.2. Résultats et discussion..... 79
IV.2.1. Rendements d'extraction..... 79
IV.2.2. Degré de déacétylation du chitosane …… 80
IV.2.3.Viscosité et poids moléculaire du chitosane..... 82
IV.2.4. Caractérisation physicochimique du chitosane extrait..... 83
IV.2.5. Pouvoir antioxydant du chitosane..... 84
IV.2.6. Pouvoir antibactérien du chitosane et son spectre d'action par la méthode de diffusion en puits..... 86
IV.2.7. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) du chitosane..... 89
IV.2.8. Pouvoir chélateur du chitosane……..... 90
IV.3. Conclusion..... 91

CHAPITRE V: Effet combiné du chitosane associé au facteur protéique produit par *Lactobacillus plantarum* Lbr1 sur la biopréservation de la qualité microbiologique et organoleptique de la crevette *Penaeus brasiliensis.*

Introduction..... 93
V.1. Matériels et Méthodes..... 94
V.1.1. Matériel biologique..... 94
V.1.1.1. Le chitosane..... 94
V.1.1.2. Les crevettes utilisées dans ce travail..... 95
V.1.1.3. La souche pathogène..... 95
V.1.1.4. Milieux de culture..... 95
V.1.2. Méthodes..... 96
V.1.2.1. Préparation de membranes de chitosane..... 96
V.1.2.2. Préparation de membranes de chitosane pur..... 96
V.1.2.3. préparation des échantillons de crevettes..... 97
V.1.2.4. Suivi de l'évolution de la charge microbienne..... 97
V.1.2.5. Evaluation organoleptique au cours du stockage..... 98
V.2. Résultats et discussion..... 99
V.2.1. Aspect des biofilms..... 99

V.2.2. Suivi de l'évolution de la charge de la crevette en *Staphylococcus aureus* au cours du stockage à 4°C..... 100

V.2.3. Évaluation organoleptique de la crevette au cours du stockage à4ºC..... 102

V.3. Conclusion..... 106

Conclusion générale..... 108

Références bibliographiques

Annexes

Introduction Générale

Introduction Générale

La sécurité sanitaire des aliments a été au centre des préoccupations de l'humanité, dès les premières civilisations. De ce fait, la présence de microflore d'altération ou de micro-organismes pathogènes reste encore un souci majeur dans le domaine alimentaire.

La conservation des aliments utilise un large panel d'opérations unitaires faisant appel à des méthodes physiques (la pasteurisation, la congélation, le stockage en atmosphère contrôlée, etc.…) et chimiques (les additifs alimentaires de synthèse), dont les effets négatifs sur la santé sont de plus en plus mis en avant par le consommateur lambda qui privilégie une alimentation exempte d'additifs chimiques. C'est pourquoi, de nouvelles stratégies de conservation des aliments devraient être développées.

Les bactéries lactiques forment un groupe bactérien complexe et hétérogène, qui a subi de nombreux remaniements au cours de son existence, depuis les premières observations d'Orla-Jensen dans les années 1920, jusqu'aux méthodes moléculaires d'aujourd'hui. Les dernières modifications majeures remontent aux années 1990, et de nouvelles espèces sont identifiées régulièrement. Il est aujourd'hui possible de sélectionner, identifier et cultiver des germes pour toute sorte d'usages : alimentaires (starters de fermentation), médicaux (probiotiques) ou biotechnologiques (production de molécules d'intérêt : bactériocines, polysaccharides).

Les principaux secteurs d'activité alimentaire dans lesquels le rôle des bactéries lactiques est reconnu sont l'industrie laitière, l'industrie des produits carnés fermentés, la panification et la vinification. Comme on peut le constater, il s'agit, avant tout, de méthodes ancestrales de conservation et d'élaboration d'aliments qui ont été, et que l'on cherche toujours, à améliorer en vue de mieux les maîtriser.

La biopréservation consiste à inoculer un produit par des bactéries sélectionnées pour leur aptitude à inhiber le développement de germes indésirables, sans modifier les qualités organoleptiques et sanitaires de ce produit. Les bactéries lactiques sont de bons candidats pour cette technologie car elles produisent souvent une large gamme de composés inhibiteurs (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacéthyl, bactériocines, reutérine (Nillson et al., 1997).

Récemment et dans le but de réduire l'incidence des germes pathogènes dans les produits marins frais et par conséquent le risque de contamination, la biopréservation a été proposée comme une nouvelle alternative pour pallier les inconvénients liés à l'utilisation des barrières microbiologiques traditionnelles.

La biopréservation est une approche naturelle basée sur l'utilisation des bactéries lactiques ou de leurs métabolites tels les acides organiques et les bactériocines, et qui a pour but de contrôler la prolifération des bactéries pathogènes et d'altération dans les aliments.

Trois approches peuvent être utilisées pour l'exploitation des bactéries lactiques comme agent de bioconservation :

- L'inoculation directe des produits par la souche productrice de substance inhibitrice.
- L'ajout de la substance inhibitrice comme les bactériocines sous sa forme purifiée ou semi-purifiée (la nisine est un exemple de bactériocine autorisée à être utilisée comme biopréservateur).
- L'incorporation des bactériocines après immobilisation dans une matrice de polymère pour former des films antimicrobiens qui peuvent être appliqués sur la surface de l'aliment. Celle-ci permet de minimiser considérablement les interactions de la bactériocine avec les composants de la matrice alimentaire, en maintenant une concentration importante de la bactériocine à la surface et en assurant une libération progressive de la bactériocine durant toute la période de stockage ce qui donne un effet synergique avec un polymère (le chitosane) déjà doté d'une activité antimicrobienne tel (Cutter et al., 2001; Coma et al., 2002; Pranoto et al., 2005).

Les produits semi-préservés sont des produits fragiles, dont les qualités microbiologiques et organoleptiques peuvent se dégrader rapidement. Ils ont généralement des temps de conservation courts.

L'objectif de ce travail de thèse est d'isoler et de caractériser de nouvelles souches de bactéries lactiques psychrotrophes à partir de la crevette permettant de ralentir les processus d'altération microbienne et de limiter le développement des bactéries

pathogènes. Tout comme, nous nous proposons d'extraire, de caractériser et d'exploiter aussi simultanément les propriétés du chitosane extrait de carapace de crevettes en tant que polymère doté de propriétés antibactériennes et antifongiques intrinsèques (Begin et Van Calsteren., 1999; Srinivasa et al., 2004) et d'un SANA1 sécrété par une bactérie lactique psychrotrophe nouvellement isolée, *Lactobacillus plantarum.*

Etude bibliographique :

CHAPITRE I :

La biopréservation.

CHAPITRE I : La biopréservation

I.1. Généralités

La contamination et l'altération des aliments par les microorganismes constituent un problème perpétuel auquel est confronté l'homme qui, pourtant dispose d'une panoplie de moyens de conservation fiables (comme la réfrigération, congélation, surgélation, stérilisation, séchage, lyophilisation, le salage, le fumage, etc....Soucieux de résoudre ce problème tout en se conformant à la nouvelle tendance des consommateurs à éviter les aliments contenant des conservateurs chimiques, les acteurs du secteur agro-alimentaire cherchent en permanence des substituts biologiques capables d'assurer aussi efficacement la préservation des denrées alimentaires (Thonart et Hiligsmann, 2009). Ces substituts biologiques aux agents chimiques de conservation peuvent être des substances d'origine végétale, animale ou bactérienne.

De part leur activité métabolique, les microorganismes, en général, et les bactéries lactiques, en particulier, produisent des substances capables d'inhiber le développement de souches d'altération des aliments et, ainsi, contribuer à leur préservation (Vermeiren et al., 2004).

Ces microorganismes bénéfiques font partie d'un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production de substances antimicrobiennes et qui appartiennent à divers genres comme *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Carnobacterium* (Thonart et Hiligsmann, 2009).

I.2. Aspects généraux de la biopréservation

I.2.1. La technologie des barrières

Certaines techniques de conservation suffisent à elles seules à préserver un aliment pour une durée satisfaisante. Dans le cas de la pasteurisation ou de l'appertisation, la majorité des flores présentes sur le produit est détruite par la chaleur, et le conditionnement hermétique empêche une recontamination ultérieure. De même le salage

ou le séchage modifient de façon radicale le produit (taux de sel supérieur à 15-20%), ce qui retarde la croissance des flores susceptibles d'entraîner une altération.

Cependant ces techniques s'accompagnent d'une transformation importante de l'aspect et du goût du produit. Une approche permettant d'obtenir une bonne conservation des aliments sans les soumettre à des transformations trop marquées est l'utilisation de la technologie des barrières qui consiste à appliquer, successivement, plusieurs techniques ralentissant la croissance des microorganismes. Chacune de ces techniques n'a que peu d'effet sur les qualités organoleptiques du produit, mais n'est pas suffisante en soi pour obtenir une bonne conservation. Les techniques les plus couramment utilisées reposent sur la température d'entreposage, l'activité de l'eau, le pH, le potentiel d'oxydoréduction, l'ajout de conservateurs (nitrates, sulfates, sorbate…) et la biopréservation (Leistner, 2000).

I.2.2. La biopréservation des aliments

La biopréservation consiste à inoculer un produit alimentaire par des souches bactériennes sélectionnées selon des critères très stricts, de manière à inhiber le développement de la flore indésirable qui pourrait s'y trouver, sans en modifier les caractéristiques organoleptiques (Rodgers, 2001). La biopréservation fait partie des techniques qui peuvent être appliquées dans le cadre de la technologie des barrières. Elle peut être utilisée pour des produits légèrement préservés, des produits frais emballés sous atmosphère modifiée, ou pour des produits ayant subi une cuisson rapide.

Différents mécanismes entrent en jeu lors de la biopréservation. L'inhibition des germes indésirables par les bactéries bioprotectrices peut être due à la compétition nutritionnelle lors de la croissance, à la présence de certains produits du métabolisme ou à la production de facteurs protéiques appelés bactériocines (Helander et al., 1997). L'ajout de bactériocine purifiée directement sur un produit alimentaire, parfois considéré comme une forme de biopréservation (Stiles, 1996) se rapproche davantage de l'ajout d'additifs conservateurs. A l'heure actuelle, seule la nisine est autorisée pour ce genre d'utilisation (Thonart et Hiligsmann, 2009).

La bioconservation peut constituer une stratégie permettant d'améliorer la conservation et la salubrité de ces produits. Les bactéries lactiques sont généralement considérées comme sûres et utilisées comme starters pour améliorer la conservation des

denrées alimentaires fermentées. Ces bactéries acidifient les aliments crus, produisent du peroxyde d'hydrogène, du diacétyle, des acides gras antifongiques, de l'acide phényl-lactique, et/ou des bactériocines ; ainsi que des arômes (Corsetti et al., 2004).

Les bactériocines de bactéries lactiques font partie de la gamme de conservateurs naturels utilisés pour améliorer la conservation et la sécurité des denrées alimentaires (O'Sullivan et al., 2002). Ce sont des composés synthétisés au niveau des ribosomes et produits par certaines bactéries pour inhiber la croissance d'autres bactéries qui leur sont proches phylogénétiquement.

I.3. Les bactéries lactiques

I.3.1. Définition

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont Gram +, généralement immobiles, asporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994).

Il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. En effet les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique, alors que les bactéries hétérolactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO2 en plus de l'acide lactique (Doleyres et al., 2002).

Onze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques, il s'agit de :

Aerococcus, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leucon ostoc*, Pediococcus, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière.

I.3.2. Les métabolites à activités antimicrobiennes produits par les bactéries lactiques

I.3.2.1. Les bactériocines

Les bactériocines sont définies comme des protéines, ou complexes de protéines, ayant une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice (Klaenhammer, 1988).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme cela a été proposé par Klaenhammer (1993) : Classe I **:** *les lantibiotiques* : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur, classe II : peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes,* classe III : Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur et classe IV : aucune bactériocine de cette classe n'a encore été décrite.

Les bactériocines interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II, un précurseur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les bactériocines peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va permettre le passage rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc.… Il y a ainsi une augmentation de la perméabilité membranaire conduisant à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule.

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme GRAS (generally recognized as safe), sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Wijaya et al., 2006). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques.

Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées peuvent, théoriquement, être utilisées comme additif alimentaire; mais, jusqu'à présent, seule la nisine, est autorisée (E234) (Guinane et al., 2005).

Les bactériocines sont généralement utilisées sous forme immobilisées dans des gels ou des films d'alginate de calcium, de gélatine, cellulose, protéines de soja, de polysaccharides, etc… Elles seront ensuite libérées dans le produit au cours de la

conservation. Depuis peu, des emballages en polyéthylène ou d'autres films plastiques contenant des bactériocines ont été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes indésirables pouvant se développer en surface durant la conservation du produit (Luchansky et al., 2004 ; Deegan et al., 2006 ; Ghalfi et al., 2006 ; Galvez et al., 2007).

I.3.2.2. Les acides organiques

La production d'acides organiques et plus particulièrement d'acide lactique comme métabolite majeur représente une caractéristique importante du groupe des bactéries lactiques. C'est cette caractéristique qui est exploitée dans de multiples domaines de l'industrie agro-alimentaire (préservation de la viande, industrie laitière, etc.…) (Gilliland, 1985 ; Ouattara et al., 1997).

L'application de sels de l'acide acétique et de l'acide lactique ou du mélange des deux permet le contrôle de la croissance de plusieurs bactéries indésirables dans les produits carnés (Houtsma et al., 1993; Stekelenburg et Kant-Muermans, 2001).

I.3.2.3. Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs peuvent leurs êtres néfastes. Ceci peut probablement être relié au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est produit par ces bactéries en présence d'air. Le peroxyde d'hydrogène doit être éliminé car son accumulation devient toxique pour la cellule. Le système le plus efficace d'élimination de l'H_2O_2 est celui de l'enzyme catalase dont les bactéries lactiques sont déficientes. Les bactéries lactiques possèdent plutôt une peroxydase, moins efficace que la catalase. Ainsi, comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde, elles sont considérées comme micro-aérophiles (Doleyres et al., 2002).

L'effet antimicrobien du peroxyde d'hydrogène a été attribué à son pouvoir d'oxydation des lipides membranaires et de destruction de la structure moléculaire des protéines cellulaires (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

L'utilisation du peroxyde d'hydrogène dans la biopréservation est limitée par plusieurs facteurs tels que la disponibilité de l'oxygène, le pouvoir oxydant du peroxyde d'hydrogène et des radicaux libres produits en sa présence affectant ainsi la qualité sensorielle du produit (Tamura et al., 1991; Earnshaw, 1992).

I.3.2.4. Le dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone (CO_2) produit par les bactéries lactiques lors de la fermentation hétérolactique, créé une atmosphère anaérobie qui est toxique pour les bactéries aérobies strictes qui ont besoin d'oxygène comme seul accepteur final d'électron lors de la respiration. Les bactéries Gram(-) sont plus sensibles au dioxyde de carbone que les bactéries Gram (+) (Devlieghere et Debevere, 2000). Le dioxyde de carbone est toxique pour un certain nombre de bactéries d'altération, cependant il peut stimuler la croissance d'autres types de microorganismes (Holzapfel et al., 1995).

I.3.2.5. Le diacétyle

Le diacétyle est issu du métabolisme du citrate et est produit principalement par les bactéries lactiques des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Ce composé possède à la fois des propriétés antimicrobiennes et des propriétés aromatiques qui sont intéressantes dans le domaine de l'industrie laitière. L'acidification qui a lieu lors de la production de yaourt par exemple, augmente l'action du diacétyle qui tend alors à inhiber préférentiellement les bactéries à Gram négatif ainsi que les levures, mais son effet reste limité, car le diacétyle présent dans les produits fermentés n'est généralement pas en quantité suffisante pour contribuer efficacement à une activité antimicrobienne (Brillet et al., 2005).

I.3.3. Effets bioconservateurs des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont les bactéries les plus intéressantes pour la biopréservation ; et c'est grâce à leurs métabolites qu'elles exercent des effets bioconservateurs des denrées alimentaires fort utiles. Certaines bactéries lactiques peuvent se développer rapidement dans les produits réfrigérés et emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée. Certaines souches produisent des composés antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyle et bactériocines) et elles sont généralement

reconnues sans risques dans l'alimentation. De surcroît, elles disposent auprès des consommateurs d'une image naturelle et bénéfique pour la santé, due à leur présence dans des produits laitiers et à l'effet probiotique de certaines souches (Stiles, 1996 ; Guinane et al., 2005).

Parmi les composés inhibiteurs issus du métabolisme des bactéries lactiques on peut citer les acides lactique et acétique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines.

Cependant, dans certains produits alimentaires, une forte diminution du pH peut être considérée comme un signe d'altération.

I.4. Les bactéries lactiques et les produits marins

I.4.1. Place des bactéries lactiques dans la microflore des poissons vivants

La microflore des produits de la mer dépend de plusieurs facteurs, dont la charge bactérienne de la matière première. La microflore du poisson est répartie sur les surfaces d'échange avec l'environnement : la peau, les branchies, le mucus et le tractus intestinal. Le muscle du poisson est à priori stérile, excepté en cas d'infection. Etant directement en contact avec l'extérieur, la microflore subit directement l'influence de l'environnement : alimentation, température de l'eau, salinité, période de l'année et pollution.

Chez les poissons vivants, la microflore est dominée par des bacilles psychrotrophes à Gram négatif telles que *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio* et *Aeromonas*. Des proportions variables de bactéries à Gram positif telles que *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Corynebacterium* peuvent aussi être retrouvées (Gram et Huss, 1996). L'influence de l'aquaculture sur la flore des organismes vivants a aussi été mise en évidence. Sur ce plan, des taux variables d'entérobactéries et de *Vibrio* ont été observés sur des crevettes issues de différentes fermes aquacoles (Mohamed Hatha et al., 2003 ; Koonse et al., 2005 ; Goarant et Merien, 2006).

Des bactéries lactiques ont souvent été isolées de poissons vivants, en général à partir du tractus intestinal. Des bactéries du genre *Lactobacillus* ont été retrouvées dans du saumon (*Salmo salar*) (Ringø et al., 2000) et dans l'omble chevalier (*Salvelinus L. alpinus*)

(Ringo et al., 1997). D'autres bactéries du genre *Carnobacterium* ont été isolées elles aussi du saumon (Joborn et al., 1999) et de l'omble chevalier, ainsi que de la truite (Pilet et al., 1995 ; Huber et al., 2004 ; Kim et al., 2007) , de la morue et du loup (Ringo et al., 2001).

Les espèces de *Carnobacterium* les plus fréquemment retrouvées sont *Cb. divergens* et *Cb. maltaromaticum* (anciennement *Cb. piscicola*). La présence d'autres genres et espèces tels que *Lactococcus piscium* (Williams et al., 1990), *Streptococcus* et *Leuconostoc* (Ringø et Gatesoupe, 1998) a également été rapportée. Récemment, l'identification bactérienne par le séquençage des régions variables V1 et V2 du gène de l'ARN 16S ont permis de mettre en évidence la biodiversité de la flore lactique présente dans le tractus digestif de différents salmonidés (truite et saumon). Si *Cb. maltaromaticum* s'est encore révélée être l'espèce majoritaire de cet écosystème, les genres *Lactococcus* (représenté par l'espèce *Lc. lactis*), *Lactobacillus* (*Lb. plantarum, Lb. sakei* et *Lb. curvatus*) ainsi que *Leuconostoc* (*Lc. mesenteroides*) étaient aussi présents (Balcazar et al., 2007). Enfin, il faut ajouter que *Lc. lactis* et *Lc. raffinolactis* ont été retrouvées en temps qu'espèces dominantes de la flore intestinale de poissons d'eau douce (carpes) (Hagi et al., 2004).

La plupart des bactéries lactiques retrouvées dans les poissons sont reconnues comme des germes non pathogènes, voire même comme ayant un effet probiotique chez l'animal. Ringø et al. (2000) ont, par exemple, montré que des souches de *Cb. piscicola* isolées du tractus digestif de poissons d'élevage possédaient des capacités inhibitrices vis à vis de pathogènes du poisson tel que *Aeromonas salmonicida*. A l'inverse, l'espèce *Lactococcus garvieae* est reconnue comme un pathogène du poisson, pouvant entraîner des septicémies fatales (Eldar et al., 1996).

I.4.2. La biopréservation des produits de la mer par les bactéries lactiques

Les produits de la mer transformés et conditionnés sont des produits dont la qualité microbiologique est difficile à maîtriser, et qui présentent généralement une forte présence de bactéries lactiques. Ces deux éléments y rendent possible le développement de la biopréservation. La majorité des essais a porté sur l'inhibition de *L. monocytogenes*, en particulier dans le saumon fumé. Wessels et Huss (1996) ont montré une inhibition de ce

pathogène sur des tranches de saumon fumé par une souche de *Lc. lactis* productrice de nisine.

Les souches de *Carnobacterium* sont particulièrement adaptées à la biopréservation du saumon fumé conservé au froid car elles poussent à 5°C, ont un pouvoir antagoniste et n'ont pas d'impact négatif sur sa qualité organoleptique. Une réduction de 4 à 5 logs du taux de *L. monocytogenes* sur des tranches de saumon emballées sous vide a été constaté en présence de *Cb. piscicola* utilisé à 10^6 UFC/g de saumon à 5°C comparé au témoin non ensemencé (Nilsson et al., 1999). Cet effet bactéricide de *Cb piscicola* a, également, été rapporté par Yamazaki et al. (2003). Par ailleurs, concernant toujours ce genre *Carnoacterium*, Brillet et al. (2004) ont montré que trois souches de *Cb. divergens* et *Cb. piscicola* productrices de bactériocines avaient une activité antibactérienne sur toutes les souches d'une large collection de *L. monocytogenes* isolées de saurisseries françaises.

Dans une autre expérience, Katla et al. (2001) ont montré que la souche *Lb. sakei* productrice de bactériocine et utilisée au taux de 10^3 UFC/g avait un effet bactériostatique sur *L. monocytogenes* inoculée à un taux de 10^3 UFC/g dans le saumon fumé conservé 4 semaines à 10°C.

Certains expérimentateurs comme Vescovo et al. (2006) ont constaté une plus grande efficacité des cocultures de *Lb. Casei* et *Lb. plantarum* inoculées (au taux de10^6 UFC/g chacune) par rapport aux monocultures dans l'action bactéricide (réduction de 3.2 log) vis-à-vis de *Listeria innocua* (une souche indicatrice ayant les mêmes performances de croissance que *L. monocytogenes*) au cours de 30 jours de stockage du saumon fumé à 4°C.

La production de bactériocines est souvent le facteur principal d'inhibition. Une inhibition de 6 log d'une population de *L. monocytogenes* a été observée avec une souche de *Cb. Piscicola* productrice de bactériocine, alors qu'elle n'était que de 3 log avec un mutant de cette même souche non producteur de bactériocine (Nilsson et al., 2004).

Il en est de même sur du saumon fumé stérile, la souche productrice de bactériocine *Cb. divergens* V41 a permis d'inhiber totalement la croissance de *L. monocytogenes* tandis que son mutant non producteur de bactériocine n'avait aucun effet (Richard et al., 2003). Peu d'études ont été réalisées sur la biopréservation par des bactéries lactiques non productrices de bactériocines.

CHAPITRE II :

Le chitosane.

CHAPITRE II : Le Chitosane

II.1. Caractéristiques physico-chimiques du chitosane

Le chitosane est dérivé de la chitine, le deuxième composant très abondant dans la nature après la cellulose. Elle est la composante principale d'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes (calamards…), des cuticules des insectes. Ce polymère se trouve également dans la paroi de la plupart des champignons et dans certaines algues chlorophycées, levures et bactéries (Tolaimate et al., 2003). En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, il contribue à la régulation de la pression osmotique.

Le terme chitosane, loin de répondre à une seule et unique structure chimique bien définie, s'adresse à toute une famille de copolymères linéaires à arrangement aléatoire d'unités N-acétyl-D-glucosamine et de D-glucosamine en proportions variables (Roberts, 1992), et liées entre elles par des liaisons β-(1-4) (fig. 1) qui confèrent au chitosane de bonnes caractéristiques filmogènes (Caroline et al., 2006) . Le terme chitosane est habituellement utilisé quand les polymères sont solubles dans une solution d'acide dilué (Zohuriaan-Mehr, 2005).

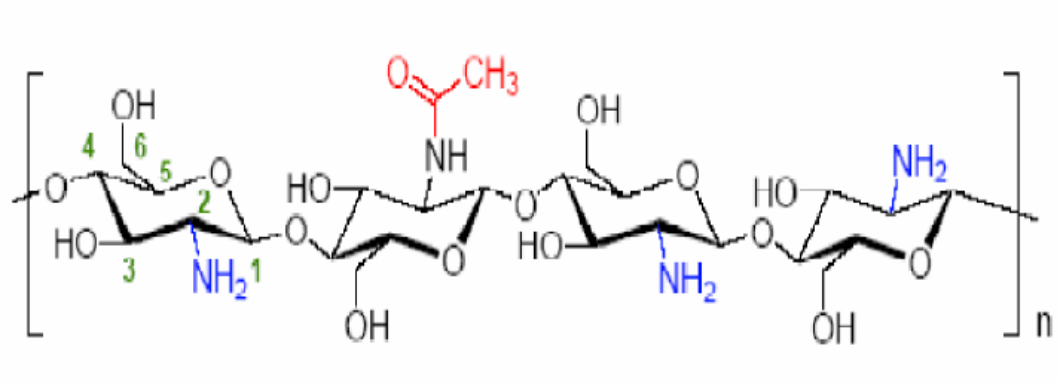


Figure 1 : Structure chimique du chitosane (Nugraha, 2006).

Ce biopolymère, naturel et non toxique, est actuellement largement produit à partir des déchets des carapaces de crabe et de crevette (No et al., 2000).

Bien que le terme « chitosane » soit habituellement limité à toute chitine suffisamment N-déacétylée pour être soluble en milieu acide dilué, il n'existe pas de nomenclature officielle proposant la limite précise entre les deux termes. En conséquence, nous appellerons chitosane tout copolymère formé d'unités constituées de N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine dont le degré de déacétylation (DD) est inferieure a 50% (Shahidi et Abuzaytoun, 2005).

Généralement, le chitosane possède trois types de groupes fonctionnels réactifs : les groupes amines sur le carbone C2, les groupes hydroxyles primaires et secondaires sur le carbone C3 et le carbone C6. La nature chimique du chitosane fournit beaucoup de possibilités alternatives pour des modifications covalentes et ioniques qui permettent l'ajustement étendu des propriétés mécaniques et biologiques (Nugraha, 2006).

Contrairement à la chitine, le chitosane est peu répandu dans la nature. Il se trouve dans les parois d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes et chez quelques insectes. Le chitosane commercialisé provient essentiellement de la déacétylation alcaline de la chitine.

II.2. Production de chitosane à partir de la chitine (réaction de déacétylation)

La production de chitosane comporte trois étapes successives : déminéralisation, déprotéinisation et déacétylation (fig. 2). La déacétylation peut être effectuée selon trois voies différentes : chimique, enzymatique et thermo-mécanique (Truong et al., 2007).

- La voie chimique utilise uniquement du NaOH concentré et requiert trois à quatre jours pour atteindre un degré de déacétylation de 70 à 75 % (Hirano, 1989).

- La voie enzymatique utilise la trypsine, chitosanase et/ou mycelia (mycélium est la partie végétative des champignons) (Frehaut, 2002; Nwe et Stevens, 2002). Elle permet l'obtention d'un degré de déacétylation de 74% en 28h (Pelletier et al., 1990); mais nécessite de grandes quantités d'enzymes (par exemple 0.69 g d'enzyme chitosanase pour déacétyler 1g de chitine) qu'il est difficile d'écarter après (Plonski et al., 1990).

- Le troisième voie de déacétylation consiste à traiter la chitine avec l'hydroxyde de sodium ou de potassium concentré (40-50 % : P/V) à une température ≥ 100 °C, pendant au moins 30 min pour éliminer les groupements acétyle (No et Meyers, 1995).

La déacétylation ne peut pas être réalisée avec un réactif acide (Muzzarelli, 1977). Le rendement de déacétylation dépend de la température, la durée du traitement, la concentration d'alcalin, les traitements préalables pour l'obtention de la chitine, l'atmosphère (air ou azote), la quantité de chitine par rapport à la solution alcaline, la densité de la chitine et la taille des particules. L'objectif idéal de la déacétylation est de préparer un chitosane qui est non dégradé et parfaitement soluble dans l' des acides faibles comme les acides acétique, lactique et citrique. La déacétylation signifie l'hydrolyse des groupements acétyles présents dans la chitine pour avoir des groupes amines (fig. 3). D'habitude, la chitine est partiellement déacétylé par N-déacétylation alcalines (Bajaj, 2011).

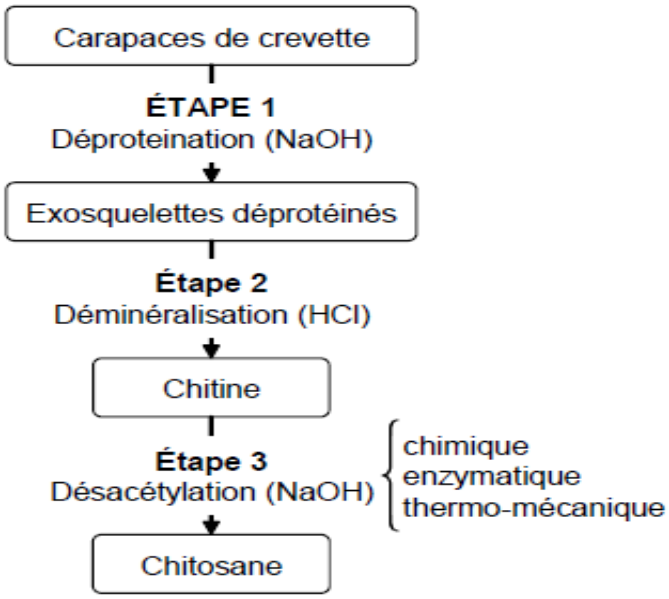


Figure 2 : Extraction du chitosane de carapace de crevette (Truong et al., 2007).

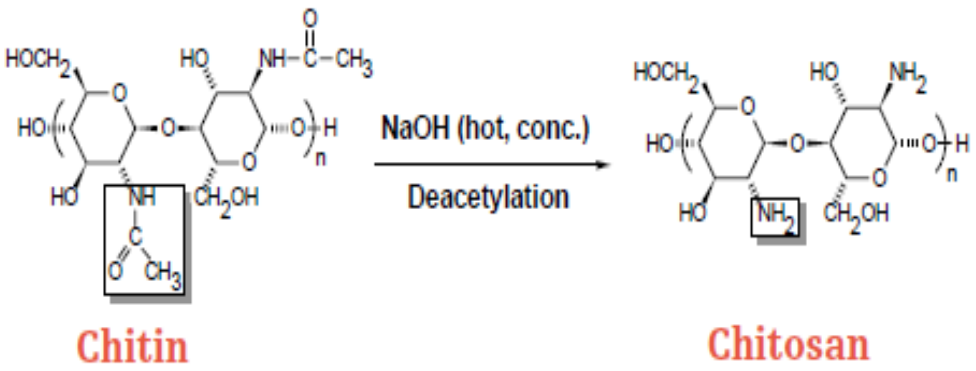


Figure 3 : Conversion de la chitine en chitosane par déacétylation (Bajaj, 2011).

II.3. Propriétés de chitosane

II.3.1. Propriétés physico-chimiques du chitosane.

II.3.1.1. Degré de déacétylation(DD)

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré de déacétylation(DD) et par leur masse molaire, dont la détermination nécessite la mise en solution du polymère. De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le degré d'acétylation (DA) sur des échantillons solides: la spectroscopie IR (Brugnerotto, 2001), l'analyse élémentaire (Kasaai et al., 1999), la RMN solide (Heux et al., 2000), ou sur des échantillons en solution : spectrophotométrie UV (Maghami et Roberts, 1988), titrage colloïdal (Chen, et al., 1997), RMN liquide (Yang et Montgomery, 2000).

Le degré de déacétylation(DD) est l'une des propriétés les plus importantes du chitosane. Il influe, non seulement sur les caractéristiques physico-chimiques, mais aussi sur la biodégradation et l'activité immunologique du chitosane (Chatelet et al., 2001).

II.3.1.2. La solubilité et la masse molaire du chitosane

La chitine est soluble dans très peu de solvants. Sa masse molaire initiale est de l'ordre de 800 000 à 10^6 $g.mol^{-1}$ et elle est généralement fortement acétylée. Les chitosane obtenus industriellement ont une masse molaire de l'ordre de 200 000 $g.mol^{-1}$ et un DD allant de 2 à 25%. Pour le chitosane, la masse molaire et la répartition des motifs N-acétylés le long de la chaîne sont dépendantes de la méthode de déacétylation utilisée. De plus, un enchaînement successif de plusieurs motifs N-acétylés confère au polymère un caractère plus hydrophobe, et donc des propriétés auto associatives (propriétés épaississantes et gélifiantes) et modifie sa solubilité.

En raison de sa solubilisation en solution acide, le chitosane se comporte comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge. Ses propriétés dépendent du pH du milieu. Le chitosane acido-solubilisé devient cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6.3 (Peter, 1995). A un pH supérieur à 6.5, les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane se précipite. Autour de pH 6, le nombre de fonctions amine libres devient suffisamment élevé pour induire une association des chaînes et la précipitation du polymère. La viscosité du chitosane en solution est

influencée par différents facteurs, comme le DD, la masse molaire, la concentration, la force ionique, le pH et la température.

Le poids moléculaire du chitosane peut être déterminé par HPLC. Cependant, la viscométrie demeure une méthode simple et rapide pour déterminer le poids moléculaire en utilisant la formule de Marc-Houwink et Sakurada (Zemmouri, 2008).

II.3.1.3. La viscosité du chitosane

La viscosité du chitosane dépend du degré d'acétylation de ce polymère. Plus il est déacétylée, plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et par voie de conséquence sa viscosité sera plus importante (Wang et Xu, 1994)**.**

La viscosité dépend, également, de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente) (Pejic et al., 2009)**,** du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire) (Berth et al.,1998) et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée).

II.3.1.4. La structure cristalline du chitosane

Le chitosane se cristallise dans le système orthorhombique (système cristallin). Zemmouri (2008) propose pour le chitosane deux types de cristallinité différents. Le type I de cristallinité du chitosane correspondant à un degré de déacétylation moyen (60 %) (Sels de chitosane) est plus désordonné que le type II qui a un fort degré de déacétylation (90 %) (Forme amine libre).

II.3.2. Propriétés biologiques du chitosane

II.3.2.1. Biocompatibilité du chitosane

Le non toxicité du chitosane a été démontré chez le rat et la souris pour une utilisation en tant qu'additif alimentaire et dans la formulation cosmétique. La dose létale 50 (DL50) est estimée à 1.5 $g.Kg^{-1}$ par voie orale chez le rat, à 10 $g.Kg^{-1}$ en sous-cutané chez la souris, à 5.2 $g.Kg^{-1}$ et 3 $g.Kg^{-1}$ en injection intra-péritonéale chez la souris chez le rat, respectivement (Minami et al., 1996).

Une seule étude menée chez le chien rapporte toutefois des cas d'anorexie et de pneumonie fatale, suite à une administration sous-cutanée de chitosane de l'ordre 50g.kg^{-1} et 150 g.Kg^{-1}, respectivement (Minami et al., 1996). Globalement, et pour des doses administrées raisonnables, la non toxicité du chitosane est admise (Rao et Sharma, 1997).

Chatelete et al. (2001), ont étudié in-vitro la cytocompatibilité du chitosane vis-à-vis des fibroblastes et des kératinocytes. Ils ont observé qu'un chitosane de faible DD favorise la prolifération des kératinocytes.

II.3.2.2. Biodégradabilité du chitosane

La biodégradabilité d'un biomatériau conditionne ses performances à long terme, car elle affecte la prolifération cellulaire et la réponse de l'hôte.

Dans la cellule, le chitosane peut être hydrolysé par voie enzymatique (lysozymes) ou non enzymatique (comme celle utilisant le monoxyde d'azote) (Valenti et al., 2003 ; Lestaevel et al., 2003).

Les lysozymes sont les principales enzymes responsables de l'hydrolyse du chitosane ; elles agissent sur les portions qui sont les plus acétylés (Hirano et al., 1989). Les produits de dégradation obtenus sont des oligomères de chitosane, dont la distribution de taille est large et dont les propriétés biologiques sont encore mal connues en fonction de la structure moléculaire.

La vitesse de dégradation du chitosane est en fonction du DD qui joue également sur la cristallinité des formes solides et hydrogels. Ainsi le chitosane de faible DD connait une vitesse de dégradation plus lente *in vivo* (pouvant atteindre plusieurs mois) ; tandis que le chitosane de DD élevé est rapidement dégradé (Paradossi et al., 1992 ; Kamiyama et al., 1999).

II.3.2.3. Propriétés bactériostatique et fongistatique du chitosane

L'une des propriétés conférant au chitosane un grand intérêt pour l'application médicale et agro-alimentaire est celle liée à son large spectre d'activité antibactérienne et antifongique. Aimin et al. (1999) ont montré que le chitosane peut réduire la vitesse de

développement de la prolifération de l'infection dans le cas d'une ostéomyélite induite expérimentalement chez des lapins par *staphylococcus aureus.*

Le caractère bactériostatique du chitosane a été mis en évidence vis-à-vis de bactéries du genre *Echerichia coli* et *Pseudomonas,* et de champignons comme *Candida, Fusarium, Saccharomyces,* etc.… (Jung et al., 2010 ; No et al., 2002). L'hypothèse de Yuong et Kauss (1983) a tenté d'expliquer le mécanisme d'action du chitosane par la nature cationique de ce polymère qui réagit avec les résidus chargés négativement et qui sont présent à la surface de la membrane externe des bactéries ; ce qui conduit a une perméabilité de la paroi cellulaire bactérienne (Yuong et al., 1982) et donc a une fuite des constituants intracellulaires.

Le chitosane posséderait également la faculté de se lier spécifiquement avec certaines macromolécules et formerait des liaisons avec les protéines et les électrolytes présents dans le cytoplasme; il perturberait, ainsi, l'action de certaines enzymes et inhiberait la synthèse d'ARNm en se liant a l'ADN bactérien, après pénétration dans le noyau du microorganismes (Rabea et al., 2003).

Plusieurs auteurs rapportent que l'activité antibactérienne du chitosane est plus importante vis-à-vis des bactéries gram-positives que vis-à-vis des gram-négatives (Jung et al., 2010 ; No et al., 2002 ; Jeon et al., 2001 ; Zheng et Zhu, 2003). No et al. (2002) ont montré que les propriétés antibactériennes des oligomères sont limitées. En ce qui concerne l'influence du dégrée d'acétylation, Jung et al. (2010) ont observé que le chitosane de faible DD présente une activité bactériostatique supérieure.

Le chitosane est décrit dans la littérature comme un floculant, capable d'agglutiner les cellules microbiennes. (Strand et al., 2001) ont monté que dans le cas d'*Escherichia coli*, plus le DD est élevé, plus le pouvoir floculant est grand.

II.3.2.4. Activité antimicrobienne du chitosane

Le mécanisme exact de l'action antimicrobienne du chitosane est encore inconnu mais certains mécanismes ont été proposés. L'activité antibactérienne du chitosane serait due essentiellement à la charge positive du chitosane qui interagit avec les phospholipides membranaires chargés négativement (Chen et al., 1996). Cette interaction crée une perturbation au niveau de la membrane plasmique avec une diminution des échanges de

nutriments entre la bactérie et le milieu extérieur qui entraîne la mort cellulaire (Shahidi et al., 1999).

Par ailleurs, Helander et al. (2001) ont démontré que la clé de l'activité antimicrobienne du chitosane provient de la charge positive des groupements amine du carbone C_2 (structure polycationique à pH < 6.3). Le même résultat a été rapporté par Tsai et Su (1999) pour lesquels, le mécanisme d'action antimicrobienne du chitosane est lié aux interactions entre les cations du chitosane et les anions à la surface des bactéries qui modifient la perméabilité de la membrane cellulaire. De plus, le chitosane semblerait interférer et perturber la synthèse des ARN messagers en interaction avec l'ADN (Shahidi et al., 1999 ; Liu et al., 2000).

En ce qui concerne l'activité antifongique, le chitosane peut interagir avec la membrane des cellules pour altérer leur perméabilité. Par exemple, la fermentation avec la levure boulangère est inhibée par certains cations qui agissent sur la surface des cellules de la levure en empêchant l'entrée du glucose. L'analyse par absorption UV a indiqué que le chitosane provoque une perte considérable de protéines de *Pythium oaroecandrum* (Rabea et al., 2003).

Le chitosane agit aussi comme un agent chélatant qui forme des complexes avec les traces de métaux et ainsi il inhibe la production de toxines et la croissance des champignons (Cuero et al., 1991). Il assure aussi certains mécanismes de défense à l'extérieur de la cellule comme son action d'agent absorbant d'eau et d'inhibiteur de l'activité des différentes enzymes (Bai et al., 1988 ; El Ghouth et al., 1992).

II.3.2.5. Effet antioxydant du chitosane

Le chitosane et ses dérivés peuvent être utilisés pour retarder ou prévenir l'oxydation d'autres composés, principalement les graisses, ce qui évite à l'aliment de rancir. Encore une fois, son rôle est d'extraire et de fixer les métaux, et/ou de se combiner aux lipides. Son efficacité dépend de sa concentration et du type de chitosane utilisé (Kaminski et al., 2008 ; Wydro et al., 2007). Des exemples peuvent être trouvés dans la littérature sur la capacité du chitosane à réduire l'oxydation lipidique dans la chair des produits de la pêche (Kim et Thomasa, 2007 ; Mao et Wu, 2007 ; Shahidi et *al*., 2002) , et

dans les viandes (Darmadji et Izumimoto, 1994 ; Georgantelis et al., 2007 ; Kanatt et al., 2008 ; Kanatt et al., 2008).

Le chitosane permet, par exemple, d'extraire le fer qui est responsable des mauvaises odeurs dans les viandes. Kim et Thomas (2007) ont mis en évidence la similarité entre la capacité antioxydante du chitosane et celle d'antioxydants synthétiques traditionnels comme le BHT. Néanmoins, les performances dépendent de la masse moléculaire et du degré d'acétylation du chitosane (Yen et al., 2007 ; Xing et al., 2005). D'autres auteurs mettent davantage en avant le pouvoir antibactérien du chitosane plutôt que sa capacité antioxydante (Rao et al., 2005 ; Kanatt et al., 2008).

II.3.3. Propriétés gélifiante et émulsionnante du chitosane

Le chitosane joue également un rôle important dans l'alimentation en tant qu'agent liant (stabilisant, épaississant, émulsionnant…). Il a été démontré que le chitosane peut être utilisé pour la stabilisation d'émulsions dans la préparation de sauces. Il augmente la viscosité, la stabilité à l'écrémage, tout en diminuant la taille des gouttelettes formées lors de l'émulsion. Son mécanisme d'action est dû à des interactions électrostatiques (Speiciene et al., 2007 ; Rodriguez et al., 2002)..

Le chitosane peut être utilisé comme gélifiant dans des produits restructurés de viande et de poisson (Chen et al., 2003 ; Benjakul et al., 2003 ; Benjakul et al., 2001 ; Mao et Wu, 2007 ; Gómez-Guillén et al., 2005 ; Kataoka et al., 1998) . Il semblerait qu'il agisse dans la fixation des protéines, principalement par des ponts électrostatiques entre les groupes cationiques du chitosane et les groupes anioniques de la protéine.

Ces mécanismes permettent d'expliquer l'amélioration de la texture et de la capacité de rétention de l'eau et de la graisse (Kachanechai et al., 2008). Dans le cas précis du poisson, il a été mis en évidence une interaction entre le chitosane et une enzyme propre à quelques espèces de poisson, la transglutaminase, qui intervient dans le processus de contrôle de la texture des protéines musculaires (Benjakul et al., 2003 ; Kataoka et al., 1998).

II.4. Les applications de la chitine et du chitosane

De part leurs bonnes caractéristiques et propriétés biologiques uniques telles que : la biocompatibilité, la biodégradabilité, la non-toxicité, l'inertie physiologique et l'affinité remarquable aux protéines (Li et al., 2009), la chitine et le chitosane ont des applications étendues et très diverses comme dans les industries alimentaires, textiles et cosmétiques, en plus des applications environnementales et biomédicales (Ayer et al., 2000). Le tableau 1 présente quelques applications de la chitine et du chitosane.

Tableau 1: Quelques applications de la chitine et du chitosane (Bajaj, 2011).

Domaines	Applications
Agriculture	Protection des plantes ; augmentation des rendements de récolte (réduction de la croissance des mycètes phytopathologiques); enduit de graines et d'engrais; traitement du sol.
Technologie biomédicale	Activités biologiques (antifongique, antimicrobien, anti-infectieux) ; agent anti-tumoral; effet hémostatique ; augmentation de la coagulation du sang ; stimulation de la croissance du tissu ; stimulation de la prolifération des cellules ; peau artificielle ; fils de suture/bandage, ophtalmologie ; lentilles de contact.
biotechnologie	Immobilisation des cellules et des enzymes ; matériaux stimulants de cellules ; matrice pour l'affinité ou les membranes.
Chimie industrielle	Purification d'eau (chélation des métaux) ; technologie de l'eau (floculation, absorption) ; traitement des boues ; membranes d'osmose inverse, membranes de filtration ; séparation des gaz ; production de films d'emballage biodégradables ; la catalyse.
Cosmétique et toiletterie	Les laques pour les cheveux ; lotion ; crème pour le corps et les mains; shampooing ; crèmes hydratantes.
Industrie alimentaire	Régime alimentaire et fibre diététique ; activité hypocholestérolémiante (liaison cholestérol, acides gras et mono glycérides) ; préservation des des aliments de l'altération microbienne ; la bioconversion pour la production produits alimentaires à valeur ajoutée valorisation des sous-produits et déchets de l'industrie alimentaire ; clarification et désacidification des jus de fruit et des boissons ; agent émulsionnant; stabilisant de couleur; additifs alimentaires des animaux.
Pharmaceutique	fabrication de micro capsules (formant des gels et des capsules avec des polymères anioniques) ; transporteur des médicaments à libération contrôlée ; produits dermatologiques (traitement de l'acné).
Autres	Textile (propriétés anti- bactériennes) ; pulpe et papier (résistance au mouillage) ; œnologie (clarification, désacidification) ; dentisterie (implants dentaires) ; photographie (papier).

II.4.1. Les applications alimentaires

L'application du chitosane dans le domaine alimentaire est très prometteuse à cause de sa biocompatibilité et sa non-toxicité. En 1992, le département de santé japonais a autorisé l'utilisation de la chitine et de ses dérivés, notamment le chitosane en tant qu'ingrédient alimentaire fonctionnel. Ainsi, il a été utilisé au Japon dans des produits alimentaires grâce à ses effets diététiques (Jeon et al., 2002). C'était en 2001 que l'US FDA a approuvé le statut GRAS du chitosane.

En tant que polymère naturel, le chitosane peut être utilisé dans la fabrication de films alimentaires comestibles. Agullo et al. (2003) ont étudié l'effet antimicrobien d'un film comestible de chitosane pour la conservation de pizza prêt à consommer. Ils ont démontré que le chitosane retardait la croissance de microorganismes *(Alternaria sp, Penicillium sp* et *Cladosporium sp)* responsables d'altérations de ce type de produit.

Par ailleurs, il a été démontré que le chitosane pouvait réduire le taux d'incorporation des additifs chimiques dans les produits alimentaires. Ainsi, l'équipe de Roller (Roller et al., 2002) a montré qu'une combinaison entre le chitosane et de faibles doses de sulfites a permis de retarder significativement la croissance microbienne dans des saucisses comparativement à une concentration élevée de sulfites en absence du chitosane.

En outre, des films antimicrobiens à base de chitosane ont été développés comme matrice d'incorporation d'acides organiques et d'huiles essentielles (Ouattara et al., 2000). Ces composés chimiques naturels ont été sélectionnés sur la base de leur efficacité à inhiber les bactéries d'altération des viandes. Cette étude a montré que des antimicrobiens actifs contre les bactéries d'altération des viandes peuvent être immobilisés dans des emballages par le biais d'une formulation adéquate.

L'effet antimicrobien du chitosane peut différer si ce biopolymère est utilisé seul ou en combinaison avec d'autres substances antimicrobiennes, aussi son effet est lié à son mode d'utilisation (ingrédient, enrobage, film) ainsi que la matrice d'application. Cependant, aucune étude n'a montré l'effet antimicrobien de film à base de chitosane seul incorporant une bactériocine pour la conservation du saumon fumé à froid.

II.4.2. Le chitosane comme additif alimentaire

On peut utiliser le chitosane d'un point de vue technologique principalement pour son pouvoir antimicrobien et antioxydant, pour ses propriétés émulsifiantes, épaississantes et liantes, ainsi que pour sa capacité à former des films protecteurs (Pérez-Mateos, 2007).

Plusieurs études ont montré que l'incorporation du chitosane dans les aliments permet d'éviter l'oxydation lipidique et la dégradation microbienne des viandes et des poissons et permet également de modifier la texture des saucisses et des hamburgers (on parle de restructuration des aliments) (Darmadji et Izumimoto, 1994 ; Mao et Wu, 2007).

Le chitosane permet de prolonger la durée de vie des oeufs (Su et al., 2007 ; No et al., 2005 ; Kimet al., 2007 ; Caner et Cansiz, 2007), des fruits et légumes (Chien et Chou, 2006 ; Devlieghere et al., 2004), des fromages (Duan et al., 2007) ou encore des céréales et dérivés (Tsai et al., 2006 ; Huang et al., 2007 ; Rodriguez et al., 2003).

Il faut noter que le chitosane n´affecte pas les caractéristiques organoleptiques des produits (couleur, saveur et texture). Le chitosane est également utilisé pour désacidifier et détoxifier des boissons comme les bières, les jus de fruits et les vins (Gik et al., 2004 ; Cheng et *al.*, 2005 ; Oszmianski et al., 2007),ou tout simplement pour purifier et clarifier des eaux et des liquides alimentaires (Wibowo etv al., 2005 ; Konovalova, 2004).

Le chitosane est, également, un agent de stabilisation de la couleur et des arômes. Il peut aussi servir pour immobiliser des enzymes (papaïne) ou pour encapsuler des composés bioactifs dans les aliments (Agullo et al., 2003 ; Shahidi et al., 1999).

II.4.3. Application du chitosane en tant que bio-emballage

Le chitosane est filmogène (Tual et al.,, 2000), on peut donc l'utiliser sous forme de film pour l'emballage. De plus, le film de chitosane montre une bonne propriété barrière aux gaz (Hosokawa et al., 1990), de bonnes propriétés mécaniques sauf l'élasticité (Cheung et coll., 2002), des activités bactériostatiques (Tsai et Su, 1999 ; Möller et al. 2004 ; Coma et al., 2002), et des activités fongistatiques (Roller et Covill, 1999).

Jiang et Li (2001) ont rapporté que l'enrobage par du chitosane pouvait réduire la vitesse de respiration et la perte de poids des fruits et légumes. Il retarde l'augmentation de

l'activité enzymatique de la polyphénoloxidase, le changement de couleur et l'altération de la qualité nutritionnelle, par exemple il inhibe partiellement la pourriture des longanes stockées à 2°C et sous une humidité relative de 90%.

Le prolongement de la durée de vie et le contrôle efficace sur la pourriture des fruits (pêches, poires japonaises et kiwis) par l'application du film de chitosane ont été confirmés (Du et al., 1997). De même, les concombres et poivrons (El Ghaouth et al., 1991), les fraises (El Ghaouth et al., 1991), les litchis (Zhang et Quantick, 1997) et les tomates (El Ghaouth et al., 1992) peuvent être conservés pour une longue période quand ils sont enrobés dans le chitosane.

La production industrielle et l'utilisation du chitosane sont en constante augmentation depuis 1970. Actuellement, la production de chitine et de chitosane à partir des carapaces de crabes et de crevettes, est économiquement rentable (Kumar, 2000); surtout, si la récupération des caroténoïdes et des protéines peut être effectuée.

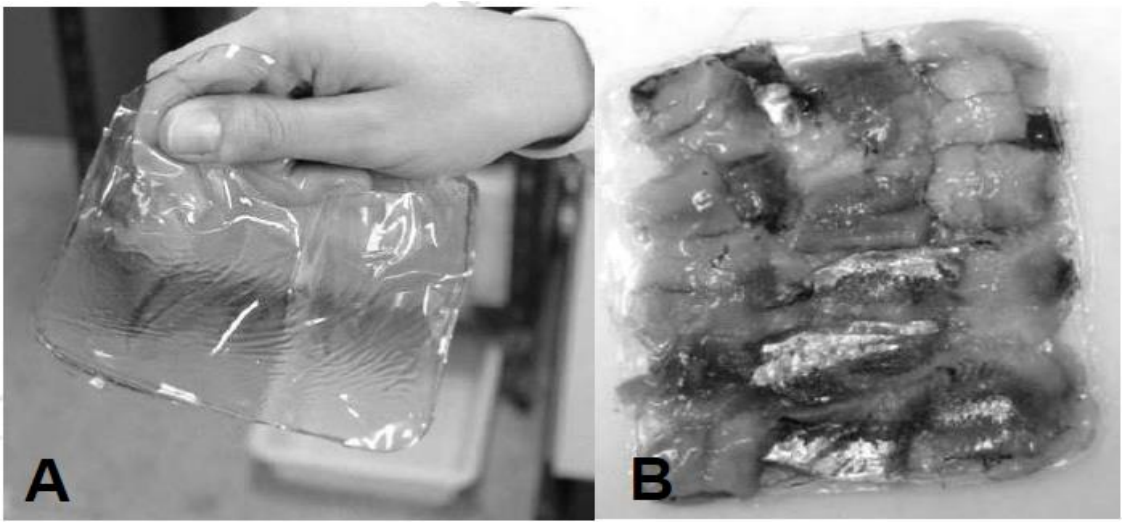


Figure 4: Film comestible de chitosane (A) et son application dans la protection du poisson (B) (Pérez-Mateos, 2007).

II.4.4. Le chitosane comme ingrédient fonctionnel : capacité de fixation des graisses

Le chitosane est une fibre naturelle capable d'apporter des propriétés technologiques (rôle d'additif) aux aliments. Il peut aussi présenter des propriétés de fibre diététique dans l'organisme une fois l'aliment ingéré. Le chitosane est, en effet, connu pour sa capacité à adsorber des substances comme le cholestérol, le glucose ou encore les acides biliaires

(Pérez-Mateos, 2007). Il est ainsi utilisé comme complément alimentaire et produit diététique car il exerce une activité hypocholestérolémiante en piégeant les lipides, ce qui favorise la perte de poids (Ylitalo et al., 2002 ;Gallaher et al.,2002 ; Liu et al., 2008). Le mécanisme d'action est dû au fait que le chitosane émulsionne les lipides en milieu acide (Rodríguez et al., 2005).

A la différence des fibres d'origine végétale, les groupes amine du chitosane captent des protons dans les fluides acides de l'estomac, ce qui entraîne la formation de groupes aminés protonés. Ainsi, les molécules chargées négativement comme les graisses, les acides gras, les autres lipides et les acides biliaires présentent une interaction avec le chitosane. Le chitosane interfère aussi en piégeant les lipides neutres, tels que le cholestérol et les autres stérols par des ponts hydrophobes (Wydro et al., 2007). Ces liaisons électrostatiques et hydrophobes sont à l'origine de la formation de substances macromoléculaires complexes qui sont faiblement attaqués par les processus digestifs dans l'organisme et sont alors éliminés par les voies naturelles.

En effet, une fois dans l'intestin, l'émulsion de graisse avec le chitosane change immédiatement pour devenir un gel insoluble en raison du pH du milieu ; de cette manière les vésicules de graisse ne peuvent être attaquées par les enzymes pancréatiques ou intestinales, ce qui empêche ainsi l'absorption des graisses (Rodríguez et al., 2005).

La présence de l'acide ascorbique peut favoriser une plus forte élimination des graisses (Kanauchi et al., 1995). Le chitosane a, également, d'autres effets bénéfiques comme l'amélioration du transit intestinal en contribuant à rétablir la flore bactérienne, et la diminution de l'acide urique en favorisant la rétention d'eau.

Partie Expérimentale

CHAPITRE III :

Caractérisation phénotypique et génotypique de bactéries lactiques psychrotrophes à partir d'un produit marin.

CHAPITRE III :

Caractérisation phénotypique et génotypique de bactéries lactiques psychrotrophes isolées à partir de la crevette.

Introduction

Des bactéries lactiques présentant des propriétés antibactériennes ont été isolées à plusieurs reprises de produits de la mer variés tels que la truite fraîche (Pilet et al., 1995), le surimi (Yamazaki et al., 2003) ou encore le saumon fumé (Duffes et al., 1999).

Peu de travaux se sont penchés sur l'inhibition de la flore d'altération de ces produits, ainsi que sur la croissance des souches bioprotectrices à basse température. Dans le but de les utiliser pour la biopréservation de produits de la mer, une nouvelle sélection de bactéries lactiques a été réalisée à partir de ces mêmes produits en utilisant des critères de sélection différents, parmi lesquels on a l'absence de croissance à 30°C et la capacité d'inhiber des souches de bactéries susceptibles d'être présentes sur les produits de la mer, aussi bien pathogènes qu'altérantes.

Pour cela, les isolats ont été testés *in-vitro* contre 7 souches cibles. La croissance à basse température est très importante pour des souches bioprotectrices, car elles vont devoir se développer dans des produits réfrigérés à des températures de 2 à 5°C. Cependant, cette caractéristique est rarement prise en compte lors de la sélection de bactéries inhibitrices. Les isolats ont également été identifiés par des méthodes moléculaires. Enfin, l'influence de la température sur la croissance des isolats a été étudiée pour confirmer leur caractère psychrotrophe.

III.1. Matériels et Méthodes

III.1.1. Matériel biologique

III.1.1.1. Les souches bactériennes utilisées

La nature et l'origine des souches utilisées dans ce travail sont indiquées au tableau 2.

III.1.1.1.1. Les souches expérimentales

Les souches expérimentales ont été isolées à partir de l'abdomen de crevettes et partiellement identifiées (morphologiquement et biochimiquement) dans notre laboratoire.

III.1.1.1.2. La souche *Lactobacillus curvatus* EU 762 EU

C'est une souche de référence ne présentant aucun effet antimicrobien contre les bactéries pathogènes, répertoriée sous l'étiquette « Européen SEAFOOD plus » et faisant partie de la collection IFREMER, Nantes, France.

III.1.1.1.3. Les souches pathogènes

La nature, l'origine, le milieu de culture et la température de croissance des souches pathogènes de référence utilisées dans le présent travail sont reportés au tableau 2.

Après avoir servi à inoculer un volume de 9 mL de milieu BHI pour les souches pathogènes et de bouillon Elliker pour *Lactobacillus curvatus*, respectivement pour ainsi réaliser un premier repiquage (réactivation), Chaque souche pure a été conservée individuellement à -80° dans des cryovials renfermant 1mL de culture.

Tableau 2: Nature, origine, milieu de culture et température de croissance des différentes souches utilisées.

Souches	Origine de la souche	Milieu de culture	Température de croissance
***Bacillus subtilis* DSMZ10**	DSMZ: Deutsche SammLung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany	BHI (Réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)	37°C
***Escherichia coli* CIP76.24**	CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France	BHI (Réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)	37°C
***Salmonella enterica* CIP81.3**	CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France	BHI (Réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)	37°C
***Shewanella putrefaciens* EU2187**	EU: European SEAFOOD plus collection IFREMER,Nantes, France	BHI (Réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)	20°C
***Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (STRM)**	Collection laboratoire IN MV	BHI (Réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)	37°C
***Listeria monocytogenes* EU2160**	EU: European SEAFOOD plus collection IFREMER, Nantes, France	BHI (Réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)	20°C
***Listeria ivanovii* EU2162**	EU: European SEAFOOD plus collection IFREMER, Nantes, France	BHI (Réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)	20°C
***Lactobacillus curvatus* EU 762**	EU: European SEAFOOD plus collection IFREMER,Nantes, France	Elliker (Réf. M368 HiMedia, France)	8°C

III.1.1.1.4. Milieux de culture et conditions de croissance

Tous les milieux de culture préparés sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15 min. La souche de référence : *Lactobacillus curvatus* EU 762 a été réactivée deux fois et cultivée sur bouillon Elliker (Réf. M368 HiMedia, France). L'incubation est faite en anaérobiose en utilisant un Anaerocult® A (réf Merck Cat. No. 1.13829.) pendant 24h à 30°C.

Les germes pathogènes: *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Escherichia coli* CIP76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187**,** *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (STRM), *Listeria monocytogenes* EU2160, *et Listeria ivanovii* EU2162 ont été réactivées et cultivées sur bouillon cœur cervelle ou BHI **(**Brain-Heart-Infusion : réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France) et incubées en aérobiose aux températures spécifiques pendant 24h. Toutes les souches ont été cultivées au moins trois fois avant l'expérience.

Les autres milieux utilisés sont Elliker gélose pour l'isolement des souches lactiques à partir des crevettes et le milieu Mueller-Hinton **(**réf : CM0405 Oxoid, Biomérieux, France) pour tester la sensibilité des germes pathogènes aux substances bioactives produites par les bactéries lactiques isolées.

Le milieu Ringer "CALGON" **(**Réf : BR0049 Oxoid, Biomérieux, France) a été aussi utilisé comme diluant pour l'homogénéisation des échantillons de crevettes.

III.1.1.2. Milieux de culture et réactifs pour les tests d'orientation

Les milieux et réactifs utilisés pour les identifications préliminaires des microorganismes sont :

- Colorants de Gram : violet de gentiane, lugol, éthanol et fuchsine pour la coloration des microorganismes servant à l'examen microscopique.
- Solution d'eau oxygénée à 30 % pour mettre en évidence la catalase des microorganismes étudiés.
- Milieu Elliker pour la mobilité : le bouillon d'Elliker additionné de 8 $g.L^{-1}$ de gélose permet aussi d'évaluer la mobilité des bactéries après ensemencement par piqûre centrale. Un développement après incubation sur toute la largeur du tube traduit une mobilité.
- Bouillon d' Elliker muni de cloches de durham pour tester la production de gaz par les bactéries lactiques.

III.1.2. Échantillonnage des crevettes et isolement des bactéries lactiques

III.1.2.1. Collecte des échantillons de crevettes

Les crevettes à partir desquelles ont été isolées les souches de bactéries lactiques appartiennent à différentes espèces et ont été pêchées au large de Béni Saf. Leur collecte s'est faite le matin à 7h et leur transport au laboratoire a été effectué sous glace dans des sacs stériles adaptés (sac Gosselin, réf 8755890 S/S 25).

III.1.2.2. Isolement et identification des souches lactiques mésophiles

Chaque échantillon (environ 10 g de chair de crevette) est ajouté à 90 mL de milieu Ringer. Ce mélange est homogénéisé durant 2 min à la vitesse normale (230 rpm ± 5 %) dans un Stomacher (Lab-Blender 400, London, England). Une série de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-6}) est réalisée afin de dénombrer les bactéries lactiques. Pour ce faire, un volume de 0.1 mL de suspension microbienne est stérilement déposé à la surface du milieu (Elliker, HiMedia) puis soigneusement réparti sur la surface avec un étaloir. Chaque dilution décimale est ensemencée en triple. Après 72h d'incubation à 30°C en anaérobiose, les boîtes contenant un nombre de colonies caractéristiques compris entre 15 et 300, sont retenues pour le dénombrement des bactéries lactiques. La lecture et l'expression du nombre de bactéries lactiques sont faites suivant la norme ISO 15214:1998 (méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles et technique de comptage des colonies à 30°C.

III.1.2.3. Tests d'orientation pour l'identification des bactéries lactiques

Sur chacune des boîtes servant au dénombrement, sont classées les colonies en catégories selon leur aspect macroscopique. Le pourcentage de chaque type de colonie est noté pour chaque dénombrement. Dans chaque catégorie, nous choisissons aléatoirement une colonie supposée représentative pour réaliser les premiers tests d'orientation.

Chaque colonie suspectée regroupant des bactéries lactiques est purifiée deux fois par isolement sur le milieu Elliker gélosé (incubation en anaérobiose 48h à 30°C). Des cultures pures issues de ces isolements sont réalisées pour conserver les souches à -20°C dans un bouillon Elliker contenant du glycérol pour des analyses ultérieures.

L'identification préliminaire des bactéries lactiques s'est basée sur des observations morphologiques (les formes caractéristiques des cellules microbiennes, leur arrangement, la présence ou non de spore), la coloration de Gram, la mobilité, la croissance ; ainsi que sur des tests biochimiques (catalase, type fermentaire) ou physico-chimiques (croissance à différentes températures et en milieu hypersalé).

a) **Croissance à différentes températures :** ce test distingue entre bactéries lactiques mésophiles et thermophiles. Après inoculation du bouillon Elliker par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24à 48h aux températures 30 et 45°C. Après incubation, les tubes présentant un trouble sont considérés positifs.

b) **Croissance sur milieu hypersalé :** les cultures à tester ont été ensemencées sur des bouillons hypersalés à 4 et 6.5% de NaCl. Après une incubation à 37°C pendant 24h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble**.**

III.1.2.4. Sélection et identification des souches lactiques psychrotrophes

Les bactéries mésophiles déjà sélectionnées sont repiquées sur milieu Elliker solide, milieu adapté à la recherche spécifique des *lactobacilles*. La température d'incubation des boites de Pétri était de 8°C pendant 7 jours afin de favoriser la sélection de bactéries psychrotrophes. Seules les souches ayant une capacité de se developper 8°C sont retenues. La purification est effectuée par quatre repiquages successifs dans le milieu Elliker solide. La conservation de ces souches se fait sur milieu Elliker incliné à +4°C en tubes à essais à l'obscurité.

III.1.2.5. Screening des souches lactiques par fermentation des sucres

Le screening des souches lactiques par fermentation des sucres a été effectué sur des galeries API50CH (Réf 50300, Biomérieux). Le milieu API50CHL de couleur pourpre a été utilisé pour l'identification des *Lactobacillus*. Chaque puits de la galerie contient un sucre à fermenter. Le premier puits qui sert de témoin ne contient pas de sucre.

Les souches sélectionnées pour ce test ont été cultivées en anaérobiose sur une gélose Elliker pendant 36h pour vérifier leur pureté. Puis, 2 mL d'une suspension de colonie bactérienne dans du bouillon Elliker fut préparée afin d'obtenir une densité bactérienne égale à 2 Mc Farland.

La suspension bactérienne a été, ensuite, répartie à l'aide d'une pipette stérile dans les 49 puits de la galerie. Chaque puits a été ensuite recouvert d'huile de paraffine afin de créer les conditions d'anaérobiose. Les galeries ont été ensuites incubées à 30°C pendant 48h. La fermentation des sucres est mise en évidence par l'acidification due à la croissance bactérienne. L'assimilation des sucres par les souches se traduit par une acidification du milieu qui fait virer la couleur du bromocrésol qui y est contenu, du pourpre au jaune ; excepté pour l'esculine (puits 25) où le virage se fait du pourpre au noir. Les différents profils obtenus ont été identifiés à l'aide du logiciel APIweb fourni par la société Biomérieux.

III.1.2.6. Screening enzymatique des bactéries lactiques

L'étude du profil enzymatique consiste à mettre en évidence les activités enzymatiques de chaque bactérie. Grâce au système standardisé APIZYM (Réf. 25200, Biomérieux). Chaque puits de la galerie APIZYM comprend une enzyme dont l'activité est à détecter chez la bactérie à tester. Une colonie bactérienne est suspendue dans 2mL d'eau distillée stérile à partir de chaque culture pure de façon à obtenir une densité bactérienne égale à 2 Mc Farland. Cette suspension a été répartie dans la galerie à raison de 65µL par puits avant d'être incubée 4h à 30°C. Après incubation, les activités enzymatiques sont révélées par addition d'une goutte de chaque réactif ZYM A (Réf. 70494, Biomérieux) et B (Réf.70493) suivie de 10min d'incubation à température ambiante. Les activités enzymatiques positives ont été révélées par une coloration violette, orange, bleue ou marron selon les puits.

III.1.2.7. Identification génotypique des bactéries lactiques

III.1.2.7.1. Extraction d'ADN

L'extraction et la purification de l'ADN a été réalisée sur une culture de 16 h à 30°C de chaque souche à identifier dans 5 mL de bouillon Elliker en utilisant le Kit GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich, Allemagne). La concentration d'ADN a été obtenue par mesure de l'absorbance au spectrophotomètre Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). La pureté de l'ADN a été évaluée par le rapport des densités optiques DO 260/280 nm. Un extrait d'ADN de bonne qualité donne un rapport compris entre 1.8 et 2. L'ADN est libéré par lyse de quelques colonies bactériennes durant une incubation de 30

minutes à 55°C en présence de la protéinase K et d'un tampon de lyse. Pour précipiter l'ADN génomique sur la membrane de la colonne, il est nécessaire d'ajouter de l'éthanol au lysat. Une fois l'ADN génomique fixé sur la membrane de la colonne, les contaminants sont éliminés par deux solutions de lavage WSC1 (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) suivie de WSC2 (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide). L'élution de l'ADN génomique se fait par ajout de 200µl de TE (Tris EDTA) sur la colonne suivie d'une centrifugation.

III.1.2.7.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

- **Préparation des mélanges réactionnels**

La PCR consiste à multiplier la séquence du gène de l'ADNr 16S à l'aide d'amorces spécifiques (Fd1 et RP2) encadrant la séquence de ce gène et générant un amplicon de 1500bp (fig. 5). Les réactions PCR sont réalisées dans un volume total de 25 µl contenant le tampon de réaction au 1/10 du volume final et qui contient 10mM de chaque deoxyribonucléoside triphosphate (dNTP), 50mM $MgCl_2$, 20 pM de chaque amorce, 5U de la Taq polymérase et 5µl de l'échantillon d'ADN. Dans le témoin négatif, les 5 µl d'ADN sont remplacés par 5 µl d'H2O stérile (Tableau 3).

Amorce	Séquence 5' 3' ⟹
Fd1	**5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'**
RP2	**5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'**

Figure 5 : Amorces spécifiques (Fd1 et RP2).

Tableau : 3 Mélange réactionnel de la PCR.

Réactifs (Tampon et Taq platinium d'Invitrogen)	Quantités en (µl) pour un microtube
Tampon 10x	2.5
dNTP 10Mm	2
Amorce RP2 (100uM)	0.125
Amorces Fd1 (100uM)	0.125
MgCL2 (50mM)	0.75
Taq DNA polymerase 5U/ul	0.2
H2O	14.3

Les microtubes sont ensuite placés dans un thermocycleur (Verity, ABI, Singapour). Les amplifications sont réalisées selon le programme mentionné dans le tableau 4.

Tableau 4 : Programme établi pour l'amplification PCR par le thermocycleur Verity.

Cycle	T °C	Temps	Etape
Dénaturation Préliminaire	**94**	**2 min**	**1**
Dénaturation	**94**	**40 S**	**10**
Hybridation	**60**	**60 S**	
Elongation	**72**	**120 S**	
Dénaturation	**94**	**40 S**	**25**
Hybridation	**50**	**60 S**	
Elongation	**72**	**60 S**	
Elongation finale	**72**	**3 min**	**2**

- **Electrophorèse des produits de la réaction PCR**

Une fois l'amplification terminée, un aliquote de 10µl de chaque amplifiat est mélangé avec 2µl d'un tampon de charge (Promega, USA). Les différents mélanges sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (poids/volume) dans le tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE 1x) préparé à partir d'une solution mère concentrée 10 fois (Promega, USA) pendant une 30 min à 100V. Le stepladder 1Kb (Promega, USA) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Le Gel a été ensuite photographié sur le GBOX, SYNGENE, l'acquisition et l'analyse de l'image est réalisée par le logiciel GenSnap.

- **Purification des produits PCR**

La purification des produits PCR a été réalisée par l'enzyme Exosap. Pour ce faire, 2 µl de cette enzyme est directement ajouté au produit PCR, le tout est incubé à 37°C pendant 15 min, suivie d'une inactivation par chauffage à 80°C pendant 15 min. On

prélève 1µl du produit PCR purifié pour le doser au Nanodrop (Thermo Fisher scientific, USA**).**

III.1.2.7.3. Séquençage de la sous unité ribosomale 16S

- **Séquençage par la technique de Sanger**

Les amplicons ont été séquencés par la technique de Sanger (1977) en utilisant le kit Big Dye v3.1 d'Applied Biosystems et les amorces de la PCR (Fd1et RP2). La réaction de séquençage consiste à avoir un mélange constitué de 1µl de Big Dye (contient les ddNTPS, dNTP, Enzyme, tampon), plus 3µl du tampon de séquençage 5 fois (pour diluer le Big Dye). Le volume total des amorces, d'eau et de produit PCR étant de 6 µl.

- **Purification des produits de la réaction de séquençage**

Pour la purification des produits de la réaction de séquençage, on utilise le kit BigDye X Terminator (Applied Biosystems, USA) constitué de deux réactifs (Solution SAM : S-adénosyl-L-méthionine et X Terminator). Après réaction de séquençage, on centrifuge la plaque pendant 1 min à 1000 tours/ min puis on ajoute 45µl de la solution SAM (tampon) et 10 µl du réactif X terminator et on laisse 30 min sous agitation continue. Le réactif X terminator capte les ddNTPS non incorporés. Une seconde centrifugation de 2 min à 1000 tours/ min est nécessaire pour finaliser la préparation de la plaque pour le séquençage.

- **Lecture des séquences sur analyseur génétique**

Les divers fragments à séquencer sont d'abord séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire. La répartition à lieu sous l'action d'un courant électrique dans un automate d'électrophorèse à 16 capillaires ABI 3130xl (Luxembourg) en utilisant le logiciel data collection v3.0 (Applied Biosystems).

III.1.2.7.4. Analyse des séquences et identification des bactéries

- **Alignement des séquences**

Après l'électrophorèse capillaire, les séquences obtenues sont alignées par le logiciel sequencing analysis v (Applied Biosystems).

- **Détermination de l'espèce bactérienne.**

Les séquences sont comparées aux séquences homologues contenues dans les banques de données de séquences à travers le portail NCBI (National Center for Biotechnology Information : (http://www.ncbi.gov/Blast.cgi) en utilisant le programme Blast (Basic Local Alignment Seach Tools).

- **Critères d'identification**

L'identification du genre ou de l'espèce est effectuée selon les critères suivants (Ennahar et al., 2000) :

- Si la comparaison de la séquence obtenue avec une séquence d'une espèce de référence classifiée fait apparaître des pourcentages de similitude ≥ 99%, l'isolat inconnu sera assigné à cette espèce.
- Si les pourcentages sont entre 97 et 99% l'isolat inconnu sera assigné au genre correspondant.
- Si les pourcentages sont < 97%, l'isolat inconnu sera assigné à une famille.

III.1.2.8. Détermination de l'activité antimicrobienne des souches

Les souches cibles utilisées dans notre protocole expérimental sont *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Escherichia coli* CIP76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens,* EU2187**,** *Staphylococcus aureus* STRM, *Listeria monocytogenes* EU2160 et *Listeria ivanovii* EU2162) en présence d'une souche témoin, *Lactobacillus curvatus* EU 762.

L'activité antimicrobienne des souches a été déterminée par la méthode des spots (spot on the lawn) qui permet de mettre en évidence cet antagonisme chez plusieurs souches à la fois (Tagg et al., 1976 ; Riley et Chavan, 2007). Elle consiste à étaler 100ul d'une culture jeune de la souche indicatrice à 10^7 UFC/mL sur de la gélose Muller Hinton, qui est ensuite ensemencée par des cultures fraîches des souches lactiques de 10^7 UFC/mL (souches test) sous forme de spots de 10 µL. Après 24 H d'incubation à 30°C, les boites sont examinées pour mesurer le diamètre des zones d'inhibition. Le pouvoir antagoniste est exprimé par la moyenne de deux diamètres perpendiculaires).

Le pouvoir antibactérien est comparé à une souche témoin de référence *Lactobacillus curvatus* EU 762 avec la même quantité d'inoculum.

III.1.2.9. Caractérisation de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 isolée de crevette

III.1.2.9.1. Analyse HPLC des acides organiques produits par *Lb plantarum* Lbr1

L'analyse HPLC des acides organiques (acides lactique et acétique, principalement) a porté sur le surnageant (1 mL) filtré (0.45µm), dilué de moitié et issu d'une pré-culture de 24h sur milieu Elliker (5mL) incubée 18h à 30°C pendant 30 min.

Les étalons sont préparés à partir de standards d'acide lactique (Fluka 69775) et d'acide acétique (Acros organique 124040010) suivant une gamme étalon de chaque acide avec des concentrations de 0.1g/l, 0.5g/l, 1g/l, 5g/l, 10g/l et 20g/l.

L'appareillage HPLC (Agilent Technologies, États-Unis) utilisé est composé d'un dégazeur (1200 Series Degasser), d'une pompe quaternaire (1200 Series Quaternary Pump), d'un échantillonneur liquide automatique (1200 Series Automatic Liquid Sampler) et d'un détecteur à barette de diodes (1200 Series Diode-Array Detector) paramétré à 210 nm d'absorbance. La colonne utilisée est une Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) Biorad gardée à une température constante de 30°C.

La détection des acides organiques a été réalisée par UV à 210 nm. La phase mobile est constituée d'une solution d'acide sulfurique à 0.005mol/L. L'élution est réalisée de manière isocratique à un débit de 0.6 mL/min. La répétabilité de l'analyse chromatographique a été vérifiée sur des solutions de références : acide lactique (Fluka 69775, États-Unis), acide acétique (Acros organique 124040010, Allemagne).

III.1.2.9.2. Mise en évidence d'une substance antimicrobienne non acide chez *Lb plantarum* Lbr1 (SANA1)

L'activité antimicrobienne des 9 souches lactiques isolées à partir de crevettes a été déterminée. La cinétique de croissance (estimée par la mesure de la densité optique à λ = 600nm) et la cinétique de production de substance antimicrobienne non acide (désignée ici

SANA1) de la souche ayant manifesté le plus d'activité antagoniste (i.e *Lb plantarum* Lbr1) à deux températures (8 et 30°C) ont été suivies pendant 24h.

Le surnageant d'une culture aérobie de 24h de *Lb plantarum* Lbr1sur milieu Elliker liquide a été chauffé à 80°C pour dénaturer les protéines et les peptides thermolabiles, puis son acidité neutralisée par ajustement du pH à 7 en vue de caractériser la substance antimicrobienne non acide SANA1.

L'effet de plusieurs températures (60, 80 ,100 et 121°C) appliquées pendant 10 et 20 min sur l'activité antimicrobienne des surnageants de *Lb plantarum* Lbr1vis-à-vis d'une une souche indicatrice, *Listeria ivanovii* EU2162, a été déterminé selon la méthode de diffusion en puits (schillinger, 1989). .

La nature protéique de la substance SANA1 a été vérifiée par des tests enzymatiques mettant en œuvre différentes enzymes : la trypsine, la pronase E (Sigma), la protéinase K (Boehringer), la lipase A (Sigma) et α-amylase (Sigma) à concentration finale de 1 mg/mL. Pour ce faire, le surnageant bactérien a été incubé en présence de chaque enzyme pendant 2h ; et son activité antimicrobienne testée de nouveau par la méthode AWDA (Agar-well diffusion method) (schillinger, 1989).

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la substance SANA1 a été effectuée sur la base de sa quantification en unités arbitraires par millilitre (UA/mL) de surnageant selon la méthode décrite par Pucci et al. (1988) qui se base sur des dilutions « Critical Dilution Assay » et adaptée à la méthode de Lücke et schillinger (1989) selon Yanagida et al. (2005). La procédure consiste à faire des dilutions en cascade (à des taux de 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 et de 0.016) du surnageant contenant SANA1 et issu d'une culture de 20h à 30°C de *Lb plantarum* Lbr1 en milieu Elliker.

Un volume de 70 µl de ces dilutions a été testé par la méthode de schillinger et Lücke (1989) en utilisant une gélose molle. Les boîtes de Pétri sont alors incubées à 30 °C pendant 24 h. La concentration en SANA1 en unité arbitraire ramenée au mL, correspond à l'inverse de la plus grande dilution montrant une zone d'inhibition, soit :

UA/mL = (1000/*d*)**D* (Parente et al., 1994) ;
Où *d* est le volume mis dans les puits et *D* représente le facteur de dilution.

III.1.3.Traitement statistique des résultats

L'analyse statistique des données (analyse de la variance p=0.05% et test de Student Newman et Keuls) a été réalisée par le logiciel « Statistical Analysis System » (SAS, Institut NC, USA).

III.2. Résultats et discussion

III.2.1. Isolement et identification préliminaire des bactéries lactiques isolées de la crevette

Les bactéries lactiques étudiées dans ce chapitre ont été isolées de la partie abdomen de la crevette afin de minimiser les risques de contamination par la flore fécale majoritaire de la tête de la crevette. Cette partie contient 80 à 85% d'humidité (Bessadok et al., 2014), auquel s'ajoutent une importante quantité de protéines, d'amino-acides, des taux en lipide relativement faibles et d'autres nutriments. Tous ces facteurs physico-chimiques et nutritionnels vont favoriser le développement d'une microflore constituée à 95% de bactéries et 5% de champignons et de levures entraînant la putréfaction de la crevette (Degnon et al., 2012).

Globalement, les résultats du dénombrement des bactéries lactiques ont affiché des valeurs faibles dans la majorité des échantillons de crevettes étudiés. La charge des crevettes en lactiques présumées varie entre 2 $x10^2$ à $6x10^2$UFC/g. Notre étude a porté sur les bactéries lactiques ayant montré un pouvoir antibactérien vis-à-vis des bactéries pathogènes. Ainsi, un total de 9 bactéries lactiques a fait l'objet d'une identification phénotypique et génotypique.

III.2.2. Identification préliminaire des bactéries lactiques

L'étude préliminaire des bactéries prend en compte les caractères morphologiques macroscopiques (aspect de la colonie sur gélose Elliker), les caractères morphologiques microscopiques (Coloration de Gram, forme, mobilité, sporulation), les caractères culturaux (type de respiratoire), les caractères physiologiques (la croissance à différente températures, à différentes concentrations de NaCl, la production de CO_2 et les caractères

biochimiques qui sont : l'acidité dornic, le métabolisme des sucres mis en évidence par le test API 50CH et la production d'enzymes détectées par la galerie APIZYM.

III.2.3. Caractéristiques morphologiques, culturales et biochimiques des bactéries isolées

- **Etude des caractères morphologiques macroscopiques**

Après purification sur gélose Elliker, l'étude macroscopique des neuf souches bactériennes a permis de définir quatre types de colonies bactériennes selon 5 critères (Tableau 5) qui sont les suivants: la couleur, le contour, l'aspect, le relief et le diamètre de la colonie (fig. 6).

- **Etude des caractères morphologiques microscopiques**

L'aspect microscopique des souches après coloration de Gram a révélé deux formes de cellules : Coques et Bâtonnets. Les coques sont disposées en paires (diplocoques) ou en courtes chaînettes (fig. 7), mais les bâtonnets présents sont des cellules associées en paires ou en courtes chaînettes (fig. 7).

Tableau 5 : Principales caractéristiques morphologiques des colonies de bactéries lactiques isolées.

Couleur	Contour	Aspect	Relief	Diamètre (mm)
Blanchâtre	lisse	Mate	Peu bombé	0 .5
Blanche	lisse	Mate	plat	2 .5
Jaunâtre	lisse	coulante	Peu bombé	2 .5
Jaunâtre	lisse	crèmeux	Peu bombé	3

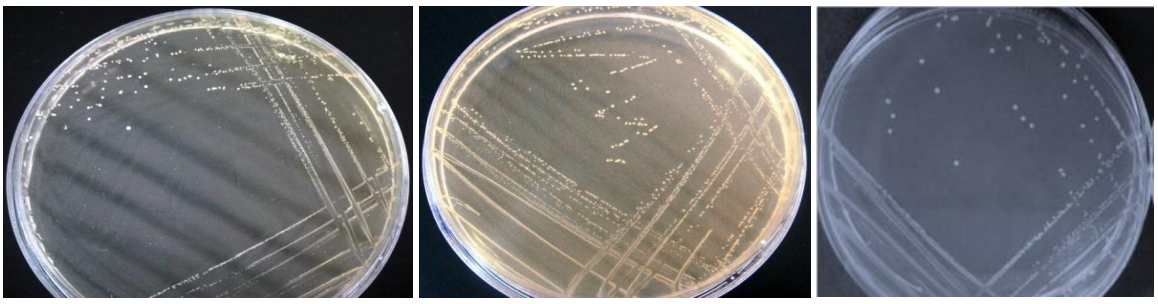


Figure 6 : Aspect macroscopique sur milieu Elliker des souches isolées.

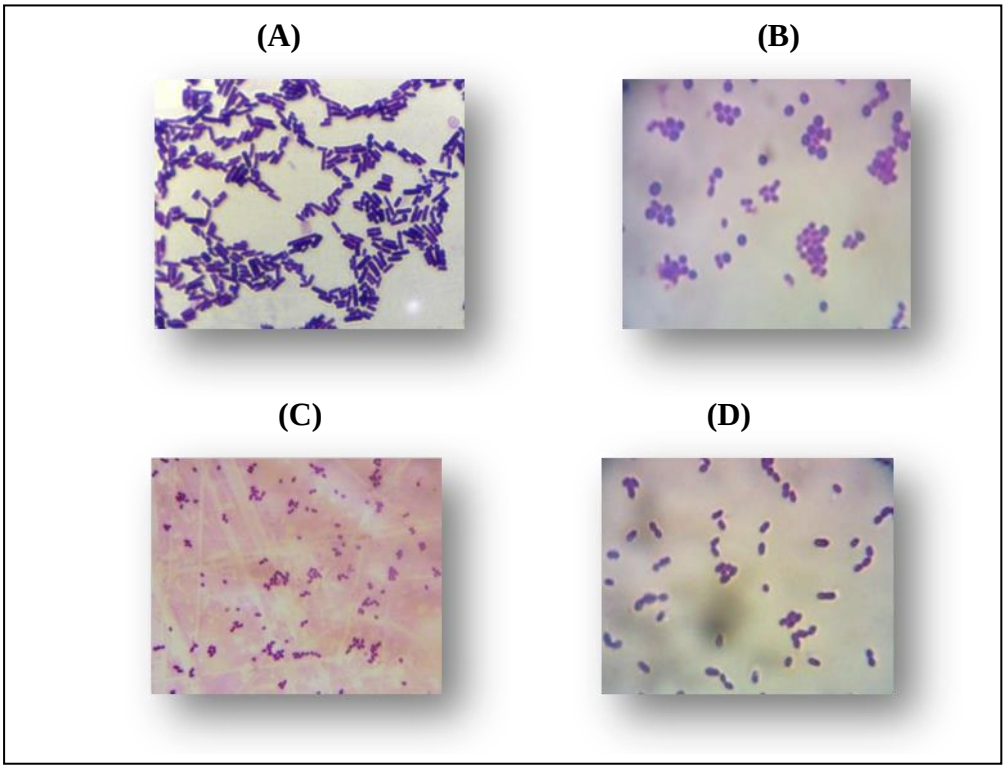


Figure 7: Observation microscopique de la souche *Lactobacillus* (A), *Leuconostoc* (B), *Lactocoques* (C) et *Enterococcus* (D) après coloration de Gram (G x100).

III.2.4. Caractéristiques physiologiques

Toutes les bactéries lactiques étudiées présentent les mêmes caractéristiques physiologiques (Tableau 6). Elles ne produisent pas de CO_2 et sont donc toutes homofermentaires ; elles ne sont pas thermotolérantes (ne croissent pas à 45°C), mais se développent à 30°C, donc ces bactéries sont mésophiles par contre une seule bactérie Lbcr1 montre une aptitude à la croissance à basse température à 8°C c'est donc une bactérie psychotrophe. Nous pouvons à la suite de ces analyses conclure que ces bactéries sont homofermentaires facultatifs.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des caractéristiques morphologiques, culturales et physiologiques des bactéries lactiques isolées et sélectionnées de la crevette.

Souches de bactéries lactique	Lbcr1	Lbcr2	Lbcr3	Lbcr4	Lbcr5	Lbcr6	Lbcr7	Lbcr8	Lbcr9
NaCl 6.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de CO2	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Croissance 8°C	+	–	–	–	–	–	+	–	–
Croissance à 30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croisssance à 45°C	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mobilité	Immobile								
Catalase	Négative								
Spore	Asporulée								
Morphologie	Coccobacilles en paire ou courtes chaînes et bacilles								

III.2.5. Profil biochimique des bactéries lactiques isolées et sélectionnées

Dans le tableau 7, on rapporte les profils de fermentation sur galeries API 50 CHL (Biomérieux, France) des 9 souches isolées. Le système API 50 CHL (Biomérieux, France) a été utilisé pour déterminer la production d'acides à partir des hydrates de carbone. Les espèces lactiques sont variées. Les *Lb. Plantarum* occupent un pourcentage important de l'échantillon (44.44%). Puis, viennent les *Lactobacillus brevis* avec un pourcentage de (33.33%). *Leuconostoc mesenteroides* représente 22.22%. Nous remarquons que *Lb. plantarum*, est prépondérente du point de vue nombre. Bien que non majoritaires, les bactéries lactiques ont souvent été isolées des poissons. Des *Lactobacilles*, notamment *Lactobacillus plantarum*, ont été retrouvés dans du saumon d'Atlantique (*Salmo salar*) (Ringo et al., 1997) , dans les crevettes (*Palaemon serratus*) (Schroder at al., 1980), de l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus L.*) (Ringo et al., 1998) et de la morue (*Gadus morhua*) (Strom et Olafsen, 1990). Des *Lactobacillus brevis*, ont également été isolées de toutes ces espèces, ainsi que dans de la truite arc en ciel (Oncorhyncus mykiss) (Joborn et al., 1999 ; Ringo et al., 2001 ; Huber et al., 2004). Les carnobactéries ont même été citées

comme étant le genre dominant du tractus gastro-intestinal de juvéniles de saumon d'Atlantique (Ringo et al., 1997) et de morue (Seppola et al., 2006). D'autres auteurs rapportent également la présence de *Streptococcus spp., Leuconostoc mesenteroides, Lactococcus lactis et Vagococcus salmoninarum* (Wallbanks et al., 1990 ; Williams et al., 1990 ; Ringo et Strøm, 1994 ; Ringo et al., 1998). Les charges bactériennes les plus fréquemment rencontrées varient de 10^3 à 10^7 germes/cm² de branchies, 10^2 à 10^5 germes/cm² de peau et 10^3 à 10^5 g/cm² de féces (Abgrall, 1988). Chez les poissons tropicaux, la flore a globalement la même composition, mais avec une prédominance de bactéries à Gram positif et d'entérobactéries (Liston, 1980)

Tableau 7 : Profils fermentaires des isolats par les galeries API 50 CHL.

: ***Leuconostoc mesenteroides*** : ***Lactobacillus plantarum*** : ***Lactobacillus brevis***

Souches	Glycérol	Erythritol	D-arabinose	L-arabinose	D-ribose	D-xylose	D-adonitol	Methyl-ßD- xylopyranoside	D-galactose	D-glucose	D-fructose	D-mannose	L-sorbose	L-rhamnose	Dulcitol	Inositol	D-Mannitol	D-sorbitol	Methyl-αD-	Methyl-αD-glucopyranoside	N-Acetylglucosamine	Amygdaline	Arbutine	Esculine citrate de fer	Salicine	D-cellobiose	D-Maltose	D-Trehalose	D-Saccharose	D-Melibiose	D-Lactose	Inuline	D-Melezitose	D-Raffinose	Amidon	Glycogene	Xyliotol	Gentiobiose	D-Fucose	D-Tagatose	D-Lyxose	D-Turanose	L-Arabitol	D-Arabitol	L-Fucose	Potassium2- Cetogluconate	Potassium Gluconate	Potassium5-Cetogluconate	Identification
Lbcr1	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
Lbcr2	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
Lbcr3	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
Lbcr4	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
Lbcr5	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lbcr6	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
Lbcr7	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
Lbcr8	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lbcr9	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

III.2.6. Profil enzymatique des bactéries lactiques sélectionnées

Le tableau 8 indique que les bactéries étudiées ne sont pas strictement identiques Cependant elles présentent des points communs à savoir l'absence totale de certaines enzymes telles que la phosphatase alcaline, l'estérase, l'estérase lipase, la lipase, l'alpha-chymotrypsine, la trypsine, l'alpha-mannosidase et l'alpha-fucosidase. En revanche elles produisent toutes la N-acétyl-bêta glucosidase, la bêta- glucosidase et la valine arylamidase.

Conformément aux résultats de la littérature, l'activité de la phosphatase alcaline était absente chez toutes les souches (Durlu-Ozkaya et al., 2001; Centeno et al., 1996). Cette enzyme contribuerait à la déphosphorylation des phosphopeptides produits par les protéinases microbiennes (Akuzawa et Fox, 1998). L'activité des lipases et estérase-lipases était absentes chez toutes les souches. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Requena et al. (1991) et Durlu-Ozkaya et al. (2001) lors de la caractérisation de lactocoques et des lactobacilles.

L'activité aminopeptidasique est d'une grande importance les enzymes déterminées ici libèrent spécifiquement les acides aminés leucines, valine ou cystine situés en position terminale. La valine et la leucine sont des acides aminés ramifiés importants, substrats des aminotransférases. L'activité du type leucine-arylamidase et valine-arylamidase a été notée positive pour toutes les souches. Une activité relativement nulle de cystine-arylamidase a été détectée chez les souches Lbr1, Lbr2, Lbr3, Lbr4, Lbr5, Lbr6 et Lbr7. Bien que certains auteurs (Durlu-Ozkaya et al., 2001) ont obtenu des valeurs faibles pour l'ensemble de ces aminopeptidases, les résultats obtenus sont d'une façon générale en accord avec les résultats de la littérature pour la présence et le niveau d'activité de ces enzymes chez les lactocoques et les lactobacilles (Requena et al., 1996).

La trypsine et l'a-chymotrypsine sont des endopeptidases qui catalysent l'hydrolyse des liens peptidiques en position interne des chaînes de peptides résultant en la libération de larges fragments. Chez les bactéries, une activité protéolytique endopeptidasique serait responsable de la dégradation des peptides issus des protéines du muscle de la crevette via l'activité des protéinases (Tan et al., 1993). L'activité endopeptidasique de type trypsine était absente chez toutes les souches. Une activité nulle du type a-chymotrypsine est généralement rapportée dans la littérature (Requena et al., 1991). Aucune activité n'a été décelée pour les enzymes a-mannosidase, a-fucosidase, N-acetylP-glucosamidase.

Tableau 8 : Profil enzymatique des bactéries lactiques sélectionnées par l'utilisation du système standardisé APIZYM (Ref. 25200, Biomérieux).

	Bactéries lactiques								
Enzymes	**Lbcr1**	**Lbcr2**	**Lbcr3**	**Lbcr4**	**Lbcr5**	**Lbcr6**	**Lbcr7**	**Lbcr8**	**Lbcr9**
Phosphatase alcaline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esterase (C4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esterase lipase C8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipase C14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+++	++	+++	++	++	++	++	++	++
Valine arylamidase	++	+	++	+	+	+	+	+	+
Cystine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	±	±
Trypsine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-chymotrypsine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphatase acide	++	±	++	±	±	±	±	±	±
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	++	±	++	±	±	±	±	±	±
α-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ß-Galactosidase	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ß-Glucuronisidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Glucosidase	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++
ß-Glucosidase	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N-acétyl-ß-glucosaminidase	+++	++	+++	++	+	++	++	+	+
α-Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

III.2.7. Caractérisation génotypique des bactéries lactiques

Les résultats de l'identification moléculaire des bactéries lactiques sont indiqués dans les tableaux 9 et 10. Le Gel d'électrophorèse des produits de la PCR des isolats de bactéries lactiques est indiqué dans la figure 8**.** Le séquençage par la méthode moléculaire de Sanger et al. (1977) a permis l'individualisation de 3 groupes de bactéries lactiques à savoir :

2 souches sont confirmées comme étant des *Lb. plantarum* (22.22%). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par la méthode biochimique (galeries API 50 CHL). En ce qui concerne les autres souches, 1 est *Lb. brevis*, et 1 *Enterococcus faecalis* (11.11% ; et 11.11%, respectivement). Pour les 3 souches identifiées comme étant des *Lb. brevis* par les tests biochimiques, seulement 1 souche est confirmée (soit 11.11 %) par les techniques moléculaires. Les 2 souches restantes sont identifiées comme étant *Pediococcus pentosaceus*

(22,22 %). Les 2 souches appartenant au genre *Leuconostoc* par les tests biochimiques appartiennent après identification moléculaire à *Weissella paramesenteroïdes* (11.11 %) et *Lactobacillus gasseri* (11.11 %).

En ce qui concerne les *Lb. plantarum* et *Lb. brevis*, il n'y a pas toujours concordance entre l'identification biochimique et l'identification par les méthodes moléculaires. Huys et al.(2006) ont démontré que l'utilisation des galeries API 50 CHL n'a pas permis une identification précise pour certaines bactéries lactiques. Benito et al. (2008) les ont également utilisées pour identifier la population lactique dans différents produits de charcuteries de l'Espagne. Selon ces auteurs, l'identification par les galeries API 50 CHL induit maintes erreurs au niveau du genre et de l'espèce.

Les méthodes microbiologiques traditionnelles sont basées sur la culture en boîtes de Pétri et puis sur l'identification biochimique des souches isolées. En ce qui concerne les galeries API 50 CHL, la lecture positive est donnée par un changement de la couleur, sous l'effet de variation du pH essentiellement. Pour cette raison, l'interprétation peut être subjective et devient un facteur important compromettant souvent l'identification des espèces (Coppola et al., 2000). En outre, le nombre de tests est relativement limité et toutes les souches d'une même espèce ne réagissent pas de manière identique pour un même test.

L'introduction dans le domaine de la microbiologie alimentaire de nouvelles approches telles que les méthodes moléculaires, complètent les études réalisées et permettent de surmonter les limitations des méthodes traditionnelles (Rantsiou et Cocolin, 2006).

En ce qui concerne les méthodes moléculaires, le gène le plus fréquemment visé est celui de 16S ARN ribosomal. Il possède quelques attributs clés pour l'identification de ces bactéries lactiques. De plus, une grande base de données de séquences est déjà disponible. Les premières études utilisant les méthodes moléculaires pour identifier les bactéries lactiques ont été publiées en 1998 par Rebecchi et al.

La technique moléculaire a permis de mettre en évidence d'autres genres dans les *Lactobacillus* identifiés par les galeries classiques, comme *Enterococcus*. Les *Enterococcus* sont présents dans plusieurs produits Crevettes marinées emballées sous atmosphère modifiée (Dalgaard et al., 2003). Ce genre est le plus controversé des bactéries lactiques car soit il est considéré comme agent d'altération soit comme un élément contribuant

positivement à la maturation et au développement de la flaveur des produits (Ruiz-Moyano et al., 2008 ; Gracía Fontán et al., 2007 ; Moreno et al., 2006 ; Ammor et al., 2005).

Parmi les autres espèces du groupe *Lb. brevis* obtenues par identification biochimique, les techniques moléculaires ont détectées la présence de *Weissella paramesenteroïdes.* Les genres *Weissella* et *Leuconostoc* ont été également trouvés mais de façon sporadique dans Saumon frais emballé sous atmosphère modifiée (Emborg et al., 2002 ; Rudi et al., 2004 ; Mauguin et Novel, 1994). Ces bactéries lactiques sont considérées comme contaminants indésirables, du fait que leur métabolisme hétéro-fermentaire produit du gaz qui s'emprisonne dans le produit et modifie la texture. En ce qui concerne les *Pediococcus*, au-delà de la discordance entre les deux techniques d'identification, il n'est pas anormal d'en rencontrer dans les poissons (Rodgers et al., 2003).

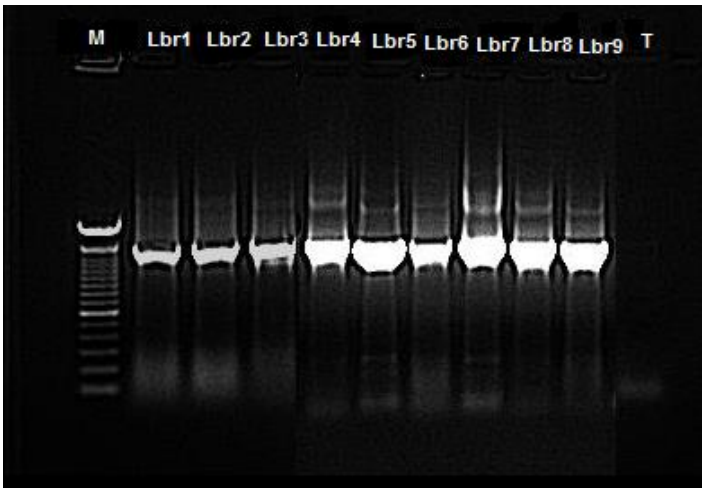


Figure 8 : Gel d'électrophorèse des produits de la PCR des isolats de bactéries lactiques isolées.

Tableau 9 : Identification des bactéries lactiques isolées par la technique de l'ARNr16s.

Souches	Identification moléculaire	%I.D
1	*Lb. plantarum*	99
2	*Lb. brevis,*	100
3	*Enterococcus faecalis*	100
4	*Pediococcus pentosaceus*	99
5	*Weissella paramesenteroïdes*	99
6	*Lactobacillus gasseri*	100

% I.D: Pourcentage d'identification.

Tableau 10 : Distribution des espèces de bactéries lactiques isolées identifiées par PCR.

Genres	Espèces	Nombre d'isolats	% par rapport au total des isolats
LA	*Lb. Plantarum* *Lb. brevis,* *Enterococcus faecalis*	2 1 1	22.22% 11.11% 11.11%
Lb. brevis.	*Lb. brevis,* *Pediococcus pentosaceus*	1 2	11.11 % 22,22%
Leuconostoc mesenteroides	*Weissella paramesenteroïdes* *Lactobacillus gasseri*	1 1	11.11 % 11.11 %

III.2.7.1. Séquences nucléotidiques des souches isolées

Lbr1: ***Lactobacillus plantarum***

AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTCACCGCTACACA
TGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTCACATCAGA
CTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
CGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAG
TTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGC
CTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTG
AGCCGTTACCCCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCA
TGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACTC
ACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTCGACTTGCATGTATTAG

Lbr2 : ***Weissella paramesenteroïdes***

AACTTCGGTTCACCAAGAAAGAAGAGTAGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGCGGGGGATAACAC
TTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATACTTTTTCTCTCATGAGTGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTGCGTCACTGATGGATG
GACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGAC
CGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAAGAGAAT
GTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
TTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGG
GTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAG

Lbr3***: Lactobacillus gasseri***

GCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTCACCG
CTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCGCTTCCTCGGTTAAGCCGAGGGCTTTC
ACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGC
TGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTCACGCCGACAACAGTTACTCTGCCGACCATTCTTCTCCAA
CAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCC
TACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATC
GCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCC
AAGAACCATGCGGTTCTTGGATCTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCAC
GTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCGTTCCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAACTCGTTCGACTTGC
ATGTAT

Lbr4: *Lactobacillus plantarum*

AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTCACCGCTACACA
TGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAG
ACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC
ACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGA
GTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTG
CCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGT
GAGCCGTTACCCCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGRCCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAACTCGGACC
ATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACT
CACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTCGACTTGCATGTA

Lbr5: *Lactobacillus brevis*

CTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGG
AGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACT
AAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG
TAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCTTGAACAGTTACTCTCAAAGGTGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTT
TACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCATTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
CCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATCGTCTTGGTGGGC
CTTTACCTCACCAACTAACTAATACGCCGCGGGATCATCCAGAAGTGATAGCCGAAGCCACCTTTCAAACAAAATCCATGC
GGATTTTGTTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTGCTTCTGGGCAGATTTCCCACGTGTTACTCACC
AGTTCGCCACTCGCTTCATTGTTGAAATCAGTGCAAGCACGTCATTCAACGGAAGCTCGTTCGAC

Lbr6 *Lb. Brevis*

GCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCG
CTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTC
ACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAACCCTTGAACAGTTACTCTCAAAGGTGTTCTTCTTTAA
CAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCATTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCC
TACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATC
GTCTTGGTGGGCCTTTACCTCACCAACTAACTAATACGCCGCGGGATCATCCAGAAGTGATAGCCGAAGCCACCTTTCAAA
CAAAATCCATGCGGATTTTGTTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTGCTTCTGGGCAGATTYCCCAC
GTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCGCTTCATTGTTGAAATCAGTGCAAGCACGTCATTCAACGGAAGCTCGTTCGACTTGCA
TGTATAG

Lbr7: *Enterococcus faecalis*

GCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTCACCGCTACACAT
GGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAG
ACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC
ACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGA
GTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTG
CCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTRGCCTTGGT
GAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAAACC
ATGCGGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACT
CACCCGTTCGCCACTCTTCTTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTACGACTTGCATGTAT

Lbr8 : *Pediococcus pentosaceus*

ATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAA
CCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTTAGTGTCGCATGACACAAAGTTAAA
GGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCA
TAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGG
AAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGC
GGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACG

Lbr9 : *Pediococcus pentosaceus*

AGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGAATAA
AACTTAGTGTCGCATGACACAAAGTTAAACGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCAAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGG
CCTACCAAGACAATGATGATGCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGA
GGCTGCAGTAGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAA
AGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAAT
ACGTGCCGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATT
AAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCA

III.2.8. Pouvoir antibactérien des souches et leur spectre d'action

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que se soit dans la bioconservation des aliments ou dans la biothérapie grâce à leur pouvoir d'inhiber les bactéries pathogènes et altérantes (Uehara et al., 2006 ; Dortu et Thonart, 2009 ; El-Ghaish et al., 2011). Cette inhibition est conférée soit par la diminution du pH suite à la production d'acides organiques, ou par la production de différents autres métabolites tels le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, le dioxyde de carbone, la reutérine et les bactériocines (Albano et al., 2007 ; Anas et al., 2008).

Afin d'évaluer leur potentiel antimicrobien, le spectre d'activité de ces souches a été élargi à une gamme de souches de bactéries pathogènes et/ou altérantes à Gram positif et à Gram négatif : *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Escherichia coli CIP*76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Staphylococcus aureus* STRM, *Listeria monocytogenes* EU2160, *Listeria ivanovii* EU2162 en présence d'une souche témoin. La méthode des puits sur agar a été choisie pour cet objectif car c'est une méthode simple qui permet de tester l'effet de plusieurs bactéries lactiques à la fois vis-à-vis d'une souche indicatrice (Polak- Berecka et al., 2009).

Les résultats obtenus au niveau de la figure 9 ont démontré la présence de zones d'inhibition traduisant ainsi une activité inhibitrice des souches lactiques testées contre la plupart des souches cibles utilisées. Le tableau (11) représente les moyennes des diamètres d'inhibition exprimées en millimètres obtenues pour chaque souche. Le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques, contre des bactéries pathogènes et altérantes a été mentionnée par plusieurs auteurs (De Martinis et al., 2001 ; Anas et al., 2008 ; Yateem et al., 2008 ; Moraes et al., 2010 ; Abrams et al., 2011 ; Castro et al., 2011).

Selon l'étude statistique, il s'est avéré que l'effet inhibiteur contre les souches pathogènes diffère très significativement ($p<0.05$) d'une souche lactique à l'autre. D'après ces résultats, la souche *Lb. Plantarum*Lbr1 (fig. 10 A) présente une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée, sur toutes les bactéries pathogènes avec des diamètres des zones d'inhibition de 15.7 à 23.83 mm de diamètre. La meilleure zone d'inhibition (23.83 mm de diamètre) a été observée pour la souche Lbr1 *Lb. plantarum* contre *Listeria monocytogenes* EU2160, tandis qu'on a noté une absence de l'effet antimicrobien contre certaines souches cible : Lbr2, Lbr8 et Lbr9(fig.10 B, fig. 11H et I) contre *Shewanella putrefaciens* EU2187,

le même effet est observé pour les souches lactiques Lbr3, Lbr8 et Lbr9 (fig. 10 C, fig. 11H et I) contre *Listeria monocytogenes* EU2160. Le plus petit diamètre d'inhibition de 1 à 2 mm étant observée pour les souches *Pediococcus pentosaceus*(Lbr8, Lbr9) (fig. 11H et I), pour *Salmonella enterica* CIP81.3 une seule souche lactique *Pediococcus pentosaceus* (Lbr9) (fig. 11 I) ne présente aucun effet antagoniste. Ammor et al. (2006) ont signalé également la résistance de *Shewanella putrefaciens* à toutes les souches lactiques testées.

La souche Lbr2 identifiée *Weissella paramesenteroïdes* (fig. 10 B) a été moins performante avec les meilleures zones d'inhibition contre les souches indicatrices de 1 à 6 mm de diamètre seulement. Concernant les souches indicatrices, *Escherichia coli* CIP76.24. S'était révélée la plus sensible avec les plus grandes zones d'inhibition en présence des bactéries est de 20 mm. De plus, il a été observé que l'effet des souches lactiques était significativement différent selon le type de Gram, il est plus important contre les bactéries indicatrices à Gram négatif que contre celles à Gram positif.

A ce propos, il est à noter que les bactériocines extraites des bactéries lactiques sont généralement dirigées vers les bactéries à Gram+ et rares sont celles qui possèdent un spectre d'action large (Atanassova et al., 2001).

Ces résultats indiquent que nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne.

Par ailleurs, les bactéries lactiques sont connues par la production d'une multitude de composés antimicrobiens : les acides organiques, les bactériocines, le diacétyle et le peroxyde d'hydrogène (Titiek et al., 1996 ; Aslam et Qazi, 2010).

Charlier et al. (2009) ont montré que *Lactococcus sp*. et *Leuconostoc sp*. présentent une inhibition à spectre élargie vis-à-vis de *St aureus* qui est induite par l'effet de l'acide lactique et des bactériocines.

La capacité inhibitrice in vitro des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes semble être une bonne propriété probiotique, comme elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires (Ammor et al., 2006).

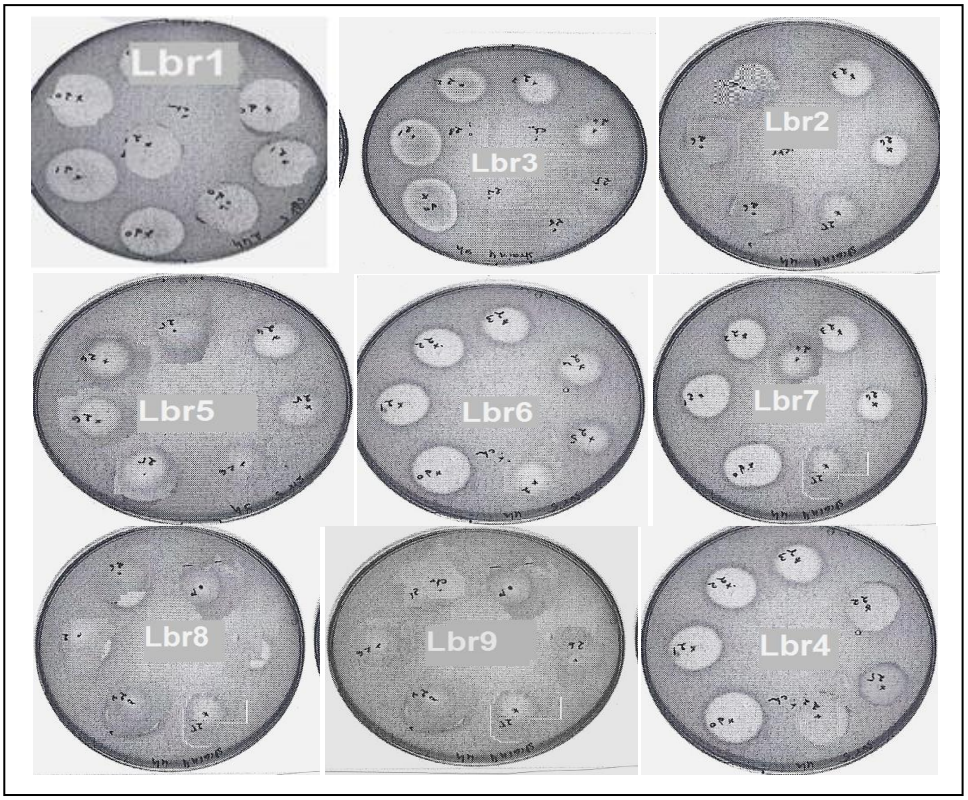


Figure 9 : Pouvoir antibactérien par la méthode des spots (spot on the lawn) des *subtilis* DSMZ10, *Escherichia coli CIP*76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Staphylococcus aureus* STRM, Listeria *monocytogenes* EU2160, *Listeria ivanovii* EU2162, durant 24h de culture à 30°C.

Tableau 11: Les moyennes des diamètres d'inhibition exprimées en millimètres obtenues pour chaque souche.

souches	Lbr1	Lbr2	Lbr3	Lbr4	Lbr5	Lbr6	Lbr7	Lbr8	Lbr9
***Bacillus subtilis* DSMZ10**	19.03±3.16	2.66±2.51	10.9±1.84	18.53±1.28	10.06±1	13.5±0.7	11.63±0.60	0.66±1.15	3.33±1.52
***Escherichia coli* CIP76.24**	20.1±1.15	6.76±0.68	19.76±1.56	21.1±1.55	10.66±1.15	14.46±1.28	11.76±2.4	2±1	2.26±2
***Salmonella enterica* CIP81.3**	21.56±3.34	3.33±3.05	5.46±4.88	19.83±1.60	7.66±3.05	10.26±1.81	7.16±1.75	2±1.73	0
***Shewanella putrefaciens* EU2187**	15.73±0.55	0	9.43±2.50	16.83±0.61	9.93±1.79	8.26±1.16	7.7±0.3	0	0
***Staphylococcus aureus* STRM**	21.16±1.44	6.66±2.08	13.53±1.28	19.43±0.83	12.5±0.86	13.9±1.76	12.9±1.01	2±2	4.06±2
***Listeria monocytogenes* EU2160**	23.83±1.04	3±2.64	0	21.76±1.96	7.66±2.08	8±2	2.33±0.57	0	0
***Listeria ivanovii* EU2162**	22.8±0.72	1±1.73	5.96±1.70	21.26±1.10	8.33±3.05	9.76±0.66	5.33±1.52	4±2	4.4±1.50

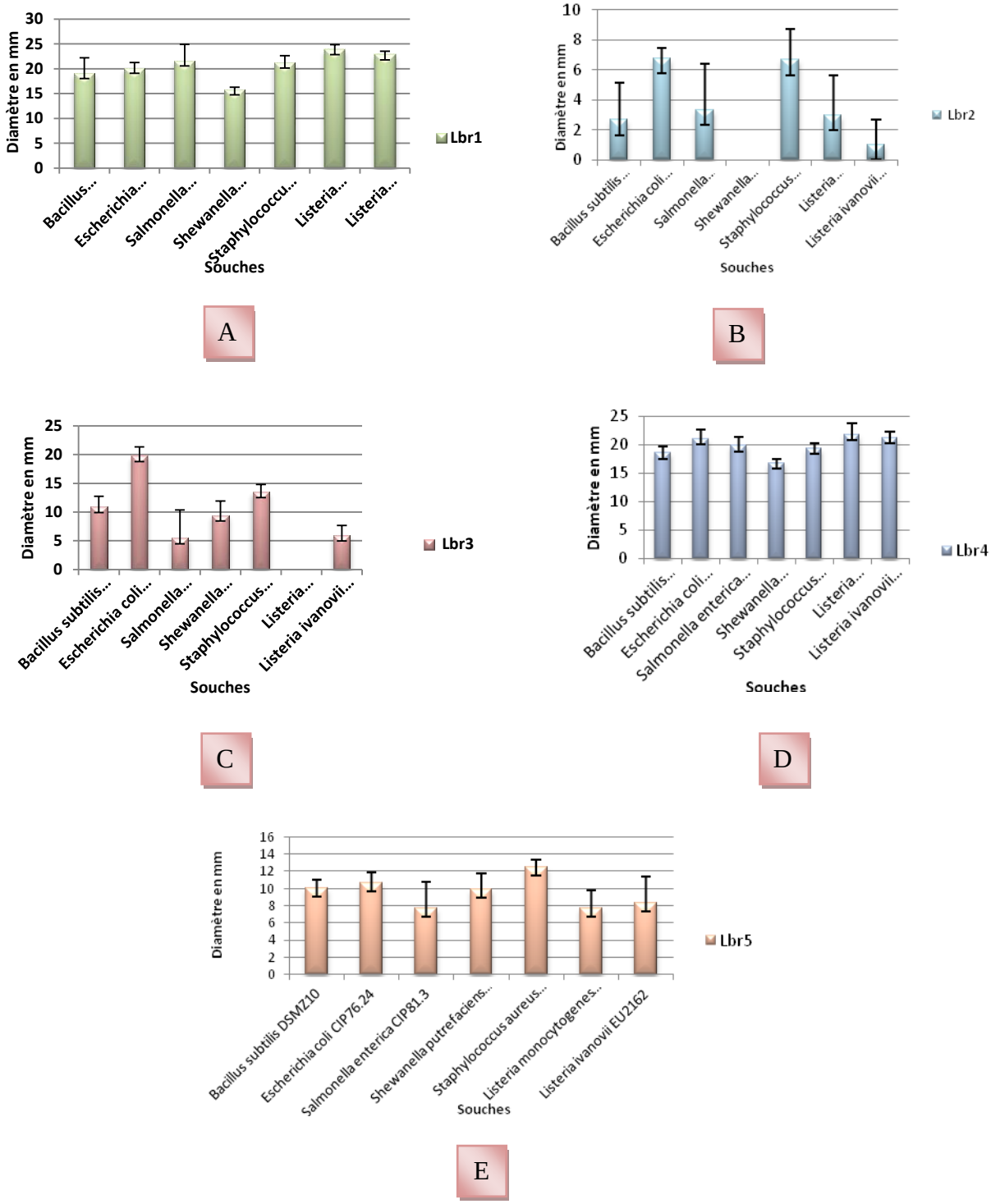


Figure 10: Spectre d'activité des la souches lactiques identifiées : **(A)** - L br1- *Lb. Plantarum,* souche psychrotrophe**. (B)** Lbr2- *Weissella paramesenteroïdes* ,souche mésophile . **(C)-** Lbr3 - *Lactobacillus gasseri,* souche mésophile**. (D)-**Lbr4- *Lb. plantarum* souche mésophile. **(E)-** Lbr5- *L brevis* , souche mésophile, vis-à-vis des souches indésirables : *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Escherichia coli CIP*76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Staphylococcus aureus* STRM Listeria *monocytogenes* EU2160, *Listeria ivanovii* EU2162 , durant 24h de culture à 30°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SD (n=3).

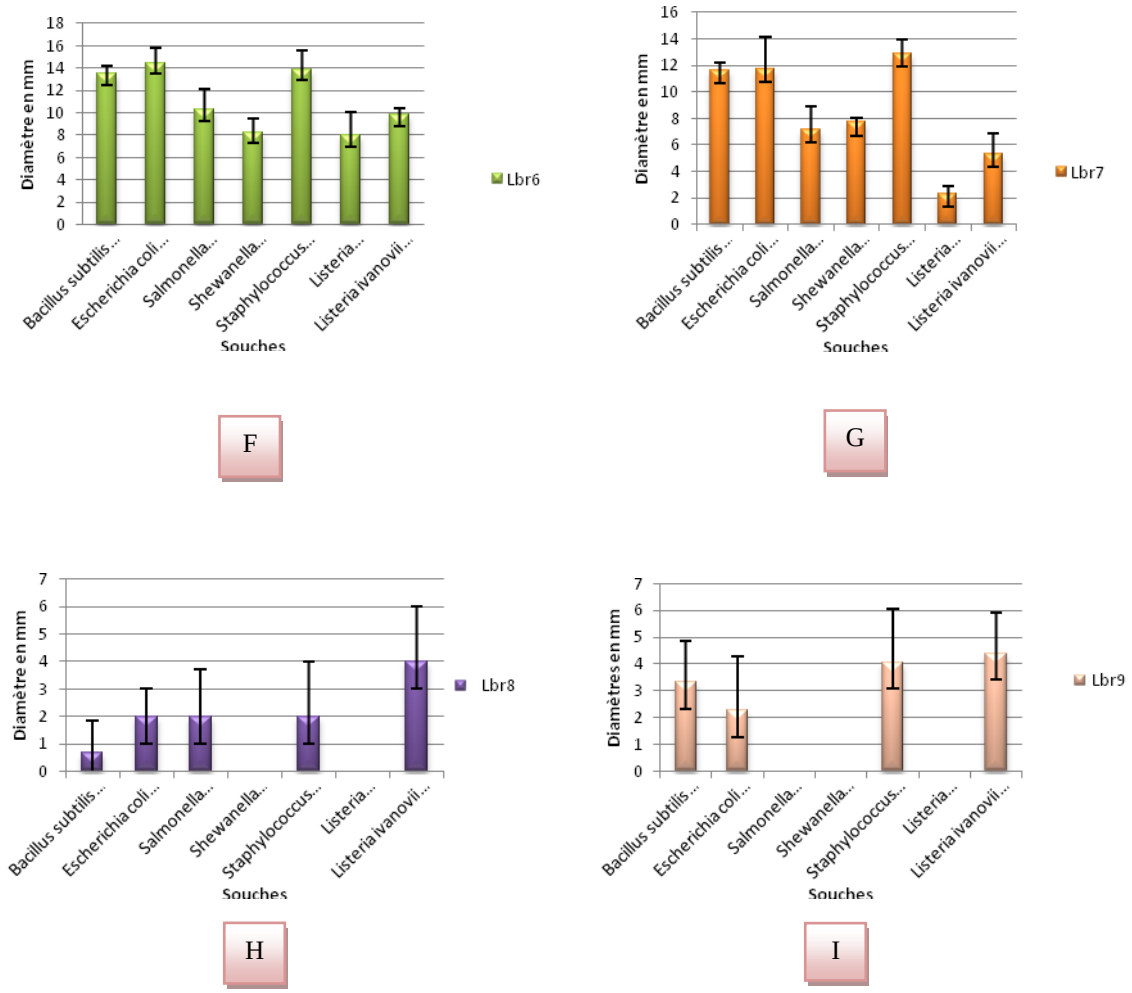


Figure 11 : Spectre d'activité des la souches lactiques identifiées : **(F)** - L br6- *L brevis*, souche mésophile**. (G)** Lbr7- *Enterococcus faecalis*,souche mésophile . **(H)-** Lbr8 - *Pediococcus pentosaceus*, souche mésophile**. (I)-**Lbr9- *Pediococcus pentosaceus* ,souche mésophile, vis-à-vis des souches indésirables : *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Escherichia coli CIP*76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Staphylococcus aureus* STRM, Listeria *monocytogenes* EU2160, *Listeria ivanovii* EU2162 , durant 24h de culture à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SD (n=3).

III.2.9. Le profil fermentaire de *Lactobacillus plantarum* Lbr1

La calibration de la plateforme HPLC a permis de déterminer les temps de rétention des différents acides organiques recherchés. Le temps de rétention est donc de 11.83 min pour l'acide lactique (fig. 13) ; 14.25 min pour l'acide acétique (fig. 14). Les quantités d'acides organiques produits au cours des fermentations ont pu être déterminées grâce aux courbes étalons (Fig. 15).

Le profil fermentaire de la souche susnommée à été réalisé et comparé au profil du milieu Elliker non inoculé (fig. 12). La souche Lbr1 *lactobacillus plantarum* ne produit que de l'acide lactique. En effet, la production d'acide lactique à 24 h est de 18 g.l-1 pour la souche Lbr1 *lactobacillus plantarum*. Au vu de ces valeurs et du fait qu'aucun autre acide organique n'aie été produit, la souche a été caractérisée comme étant homofermentaires.

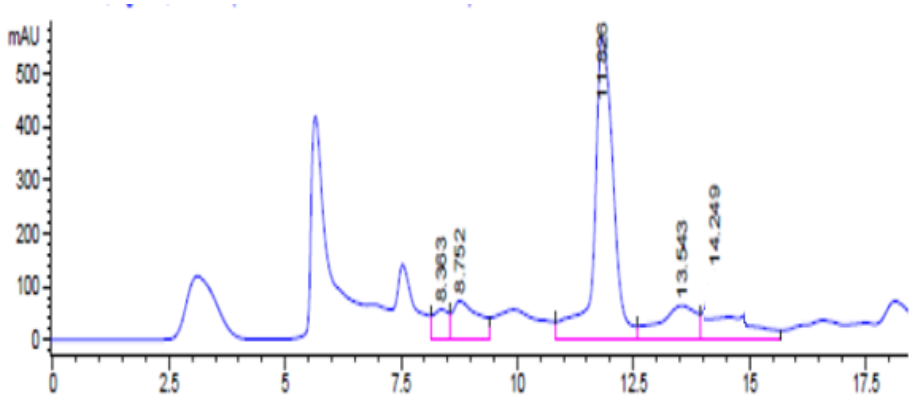


Figure 12 : Chromatogramme de l'extrait de surnageant de la souche Lbr1- *Lb.Plantarum.*

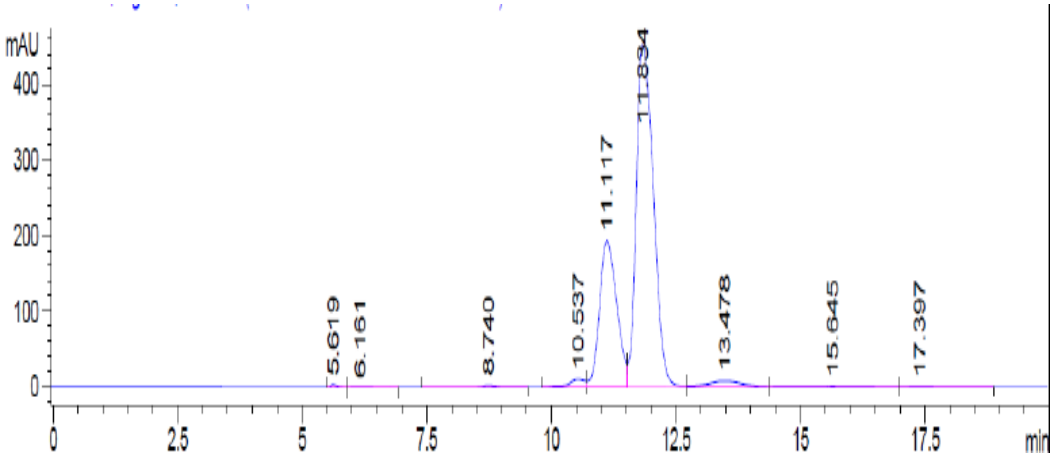


Figure 13 : Pic du standard d'acide lactique (10g/L) au temps de rétention 11.83 min.

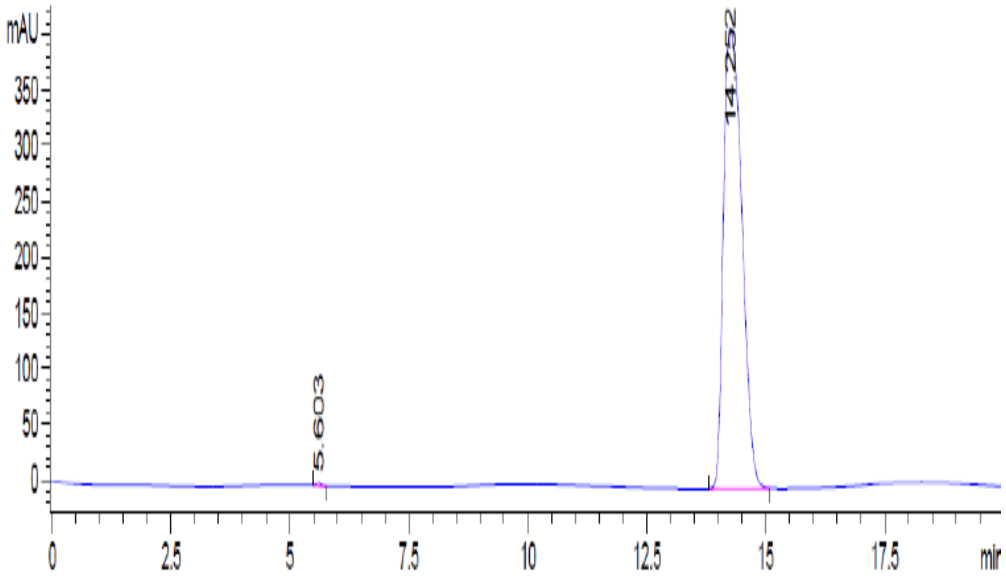
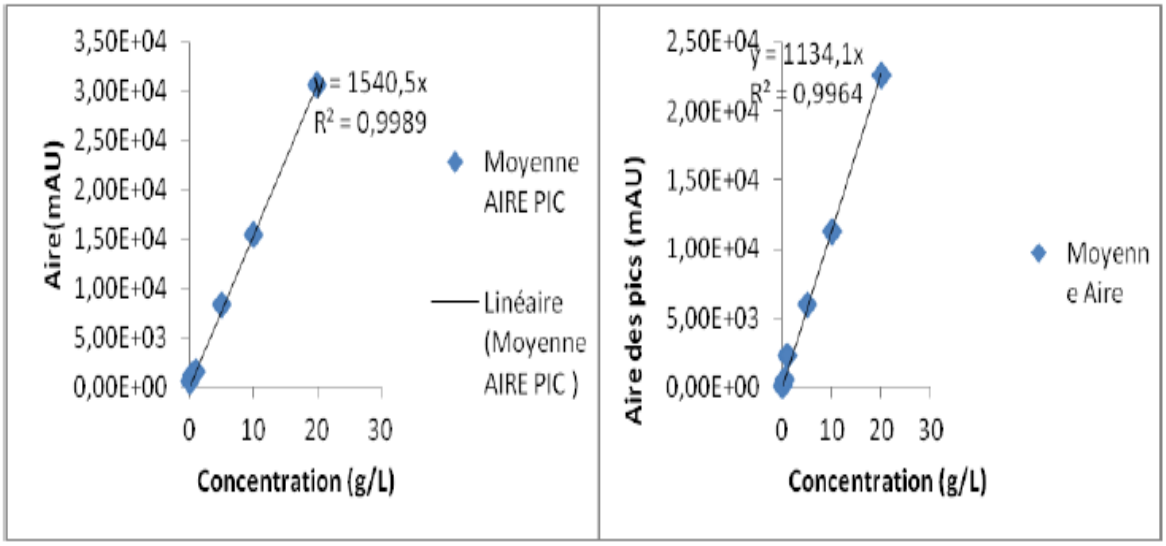


Figure 14 : Pic du standard d'acide acétique (10g/L) au temps de rétention 14.25 min



A **B**

Figure 15 : **A** : courbe étalon Acide lactique, **B :** courbe étalon acide acétique.

III.2.10. Température optimale et cinétique de production du de la substance antimicrobienne non acide (SANA1)

Les résultats obtenus montrent que la production de l'activité biologique est corrélée avec la production de la biomasse. La croissance la plus dense et la meilleure activité antimicrobienne ont été obtenues à 30°C. Cette activité optimale a été notée pour un temps d'incubation de 4h (fig. 16 et 17). L'activité reste stable entre 4 à 24 heures.

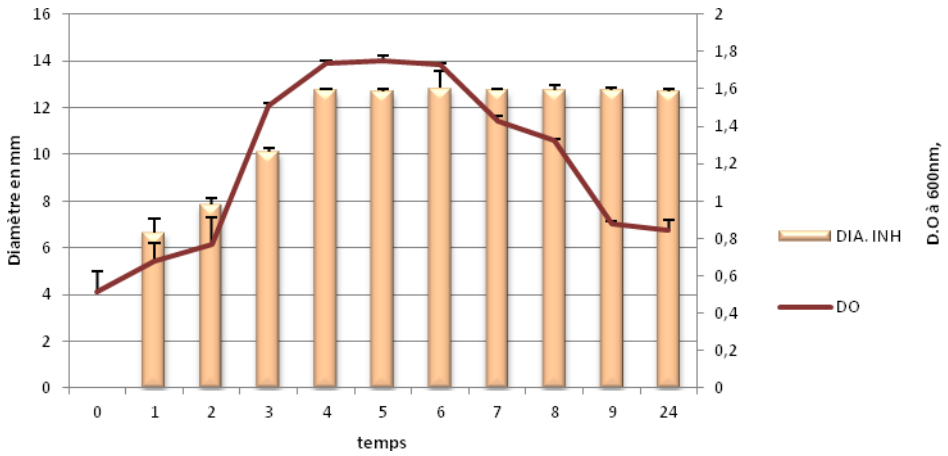


Figure 16 : (▁) Cinétiques de croissance bactérienne de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 en milieu Elliker liquide et (▪) de la substance antimicrobienne non acide (SANA1) à 30°C.

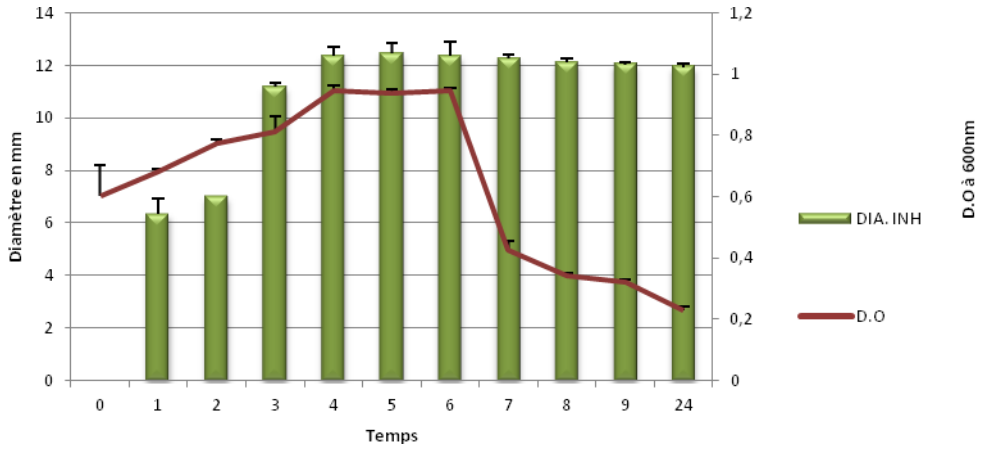


Figure 17: (▁) Cinétiques de croissance bactérienne de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 en milieu Elliker liquide et de (▪) de la substance antimicrobienne non acide (SANA1) à 8°C.

Les figures 16 et 17 précédentes nous permettent de faire les remarques suivantes :
La production du facteur protéique débute pendant la phase d'accélération pour les deux températures 8 et 30°C. Cependant l'effet inhibiteur maximum est atteint au bout de 4 heures.

Généralement, on remarque 3 à 4 phases de croissance :

- Phase d'accélération: de 0 à 1 heure d'incubation pour la température de 8°C, elle est de 0 à 2 heure pour la température de 30°C les diamètres d'inhibition varient de 6 à 7 mm pour les 8 et 30°C respectivement.
- La phase exponentielle : est atteinte au bout 2h et s'achève après 6heures d'incubation. Les diamètres d'inhibition respectifs aux températures d'incubation 8 et 30°C sont 11.16±0.15 à 12.33±0.57mm et 12.73±0.05 à 12.83 ± 0.72 mm.
- La phase stationnaire dure 2 heures, la production de SANA1 est stable, les diamètres d'inhibitions varient et ne dépassent pas les 13 mm pour les températures d'incubation 8 et 30°C.

En générale, la production de la bactériocine CHM9 est négligeable pendant les deux premières heures, celle-ci commence après 4h d'incubation. Todorov et al. (2007) ont remarqué que la production d'AMA-K se fait après 4h d'incubation.

La production de bactériocine commence au début de la phase exponentielle, atteint son maximum au début de phase stationnaire, et reste presque stable durant cette phase.

Ce résultat rejoint celui observé par Tomé et al. (2008), en effet la production de la bactériocine synthétisée par *Enterococcus faecium* ET05 a été détectée au début de la phase exponentielle (4h) et atteint son maximum à 8h d'incubation c'est-à-dire pendant la phase stationnaire.

Tous ces résultats montrent que la bactériocine produite par CHM9 est un métabolite primaire, synthétisé pendant la phase active de croissance (phase exponentielle). De nombreux auteurs, dont Todorov et al. (2007), Cocolin et al. (2007), Ghrairi et al. (2008) et Kumar et al. (2010), ont observé ce même résultat et ont indiqué que, la plupart des bactériocines sont des métabolites primaires. Néanmoins de rares bactériocines ont été décrites comme étant des métabolites secondaires, comme l'acidocine B, la production de cette bactériocine par *Lactobacillus acidophilus* M46 n'est pas liée à la croissance (Ten

Brink et al., 1994). Biswas et al. (1991) ont indiqué que la pediocine AcH est produite à 60% pendant les 4 premières heures et les 40% restants, sont synthétisés pendant les 8 heures qui suivent. Ces auteurs ont considéré que cette bactériocine est un métabolite secondaire. Les mêmes observations ont été faites par d'autres chercheurs mais, ils ont noté qu'il s'agit de métabolites primaires (De Vuyst et al., 1996 ; Todorov et Dicks, 2005 et Todorov, 2008).

III.2.11. L'effet de la température

Dans le but d'analyser l'effet de la chaleur sur l'activité de SANA1produite par *Lactobacillus plantarum* Lbr1, Le surnageant de culture neutralisé a été soumis à différents traitement thermiques, à savoir 10, 30, 80, 100 et 121°C pendant 10 et 20 min puis, ils ont été testés par la méthode de Schillinger et Lücke (1989) avec comme témoin négatif le bouillon Elliker.

Le résultat obtenu est montré dans la figure 18 suivante :

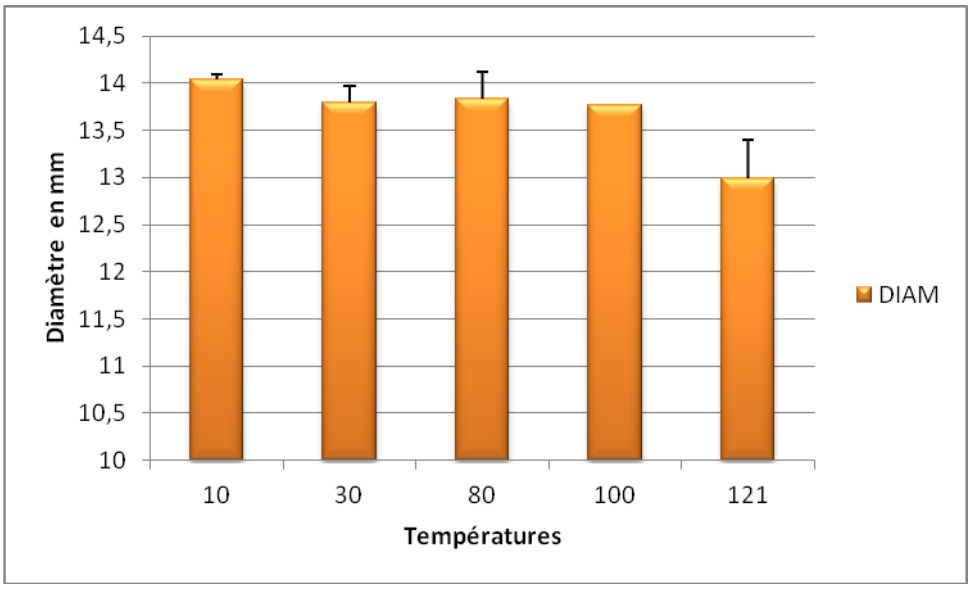


Figure 18 : Effet de différentes températures 10, 30, 80, 100 et 121 °C sur l'activité de la substance antimicrobienne non acide SANA1 de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 contre *Listeria ivanovii EU2162* ( ) (mesure du diamètre d'inhibition en mm).

On peut faire les remarques suivantes :

L'activité de la substance antimicrobienne non acide SANA1 n'est pas affectée par les traitements à 10, 30,80 et 100 °C pendant 10 et 20 min (fig. 18). Mais l'autoclavage de SANA1 a entraîné une perte partielle de son activité estimée à 15% (fig. 19). L'acidocine D20079 n'est pas sensible aux traitements thermiques à 70°C ou 100°C pendant 60min, alors que son activité est diminuée de 50% après 30 min à 120°C (Deraz et al., 2005). Les mêmes résultats ont été obtenus concernant l'activité des bactériocines AMA-K et plantaricin LR/14 qui n'est pas affectée après 20 min à 121°C (Todorov et al., 2007, Kumar Tiwari et Srivastava. 2008), alors que l'activité de la bozacine 14 et la bactériocine ST15 est complètement abolie à 121°C pendant 20 min (Ivanova et al., 2000, Kwaadsteniet et al., 2005).

L'activité inhibitrice de SANA1 a été conservée après des traitements à des températures assez élevées, comparables, à la pasteurisation (80°C pendant 20 min) et à la stérilisation du lait (100°C pendant 5 min). Nous pouvons conclure que SANA1 de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 est thermorésistant. Grace à cette caractéristique, il peut être classé soit dans la classe I ou II.

Aussi la résistance de SANA1 de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 à ces traitements (températures) est un témoin qu'elle peut présenter un grand intérêt en technologie agroalimentaire, soit au cours de la fabrication soit en étape finale de fabrication mais aussi dans la conservation des aliments.

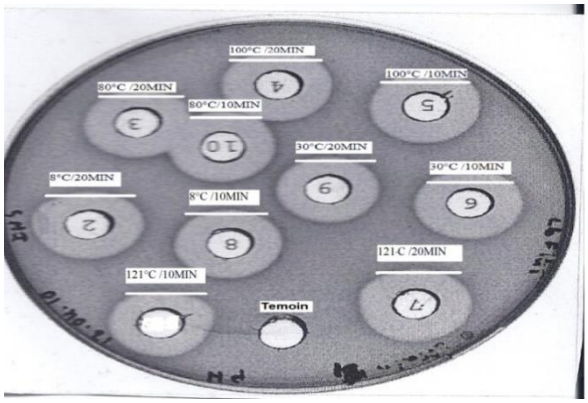


Figure 19 : Effet de la température sur l'activité inhibitrice du facteur protéique de *Lactobacillus plantarum* Lbr1 à différentes températures 8, 30, 80,100 et 121°C pendant 10 et 20 min contre *Listeria ivanovii EU2162*.

III.3.12. Confirmation de la nature protéique de SANA1

Les analyses antimicrobiennes contre les cellules indicatrices: *Listeria ivanovii* EU2162, du surnageant SANA1 (culture de 16h à 30°C), ont montré que l'activité biologique n'est pas affectée par l'addition de catalase. Ce résultat implique que l'inhibition de la croissance des cellules indicatrices n'est pas due à la production de peroxydase d'hydrogène mais elle est vraisemblablement due à la production de biomolécule(s). Par contre, le traitement du surnageant par les enzymes protéolytiques (Trypsine, Pronase E et Proteinase K) fait perdre totalement l'activité biologique, les zones d'inhibition sont affectées par les enzymes protéolytiques. Cette constatation implique que la substance antimicrobienne non acide SANA1 en question est de nature protéique. La trypsine, l'α-chymotrypsine et la pepsine sont couramment employées (Chen et Hoover, 2003).

Par comparaison au témoin figure 20, nous avons constaté également que les activités biologiques du surnageant de culture de la souche *Lb. plantarum* Lbr1 sont insensibles à l'action de la lipase et de l'amylase. Ce résultat implique que la (les) molécule(s) bioactive(s) en questions ne contiennent pas des composés lipidiques et des carbohydrates (Aktypis et al., 1998).

Nos résultats rejoignent les tests de confirmation de la nature peptidique d'une bactériocine produite par une souche de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, isolée du Boza, une boisson traditionnelle fermentée à base de céréales consommée en Turquie, est réalisée en utilisant la trypsine, la pepsine et la protéinase K (Makhloufi et al., 2011).

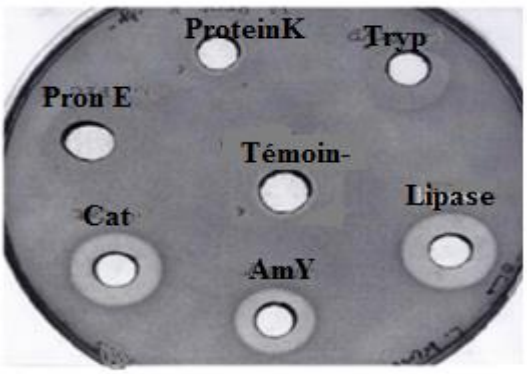


Figure 20: Effet des enzymes la trypsine, la pronase E, la protéinase K, la lipase A et a amylase à sur la biomolécule de la souche *Lb. plantarum* Lbr1.

III.2.13. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de SANA1

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont variables selon les espèces bactériennes et les souches (Ennahar et al., 2000). Les spectres d'inhibition des substances antimicrobiennes non acide s'établissent à partir des surnageants de cultures ou de préparations semi-purifiées (extraits bactériociniques). Le résultat sera, donc, représentatif de l'activité antibactérienne globale d'une souche et non de l'activité d'une seule substance antimicrobienne. Pour cette raison, lorsqu'une souche produit plusieurs bactériocines, l'interprétation du spectre d'inhibition est seulement possible si celui-ci est réalisé à partir de bactériocines purifiées (Sebti et al., 2002).

Dans notre cas, l'activité anti-*listeria* a disparu en diluant au ¼ la substance antimicrobienne SANA1. Selon le principe des dilutions critiques, les valeurs des CMI de SANA1produite par la souche est de 1785,71 U.A/ml.

Chaque bactériocine produite par une bactérie lactique se caractérise par une concentration propre à sa production dans un milieu bien défini. Cette quantification dépend de la sensibilité de la souche indicatrice utilisée dans l'essai, l'utilisation d'une souche plus sensible permet d'apprécier cette quantité à la hausse (Yanagida et al., 2005).

III.3. Conclusion

À la lumière des résultats obtenus lors de cette étude, il est permis de conclure que les crevettes disposent d'une biodiversité riche en bactéries lactiques et peuvent être une source précieuse de souches ayant des propriétés technologiques et thérapeutiques intéressantes.

Globalement, les résultats du dénombrement des bactéries lactiques ont affiché des valeurs faibles dans la majorité des échantillons de crevettes étudiés. La charge des crevettes en lactiques présumées varie entre 2 $x10^2$ à $6x10^2$UFC/g.

La sélection des bactéries lactiques s'est basée sur leur capacité de croitre à basse température 8°C. Cette aptitude a été démontrée par la souche Lbr1 c'est donc une bactérie psychotrophe. Les analyses biochimiques montrent que les bactéries lactiques isolées sont homofermentaires facultatifs.

L'outil moléculaire s'est révélé sensible et performant pour identifier les espèces. Le séquençage par la méthode moléculaire de Sanger et al. (1977) a permis l'individualisation de 3 groupes de bactéries lactiques à savoir:

Deux souches sont confirmées comme étant des *Lb. plantarum* . Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par la méthode biochimique (galeries API 50 CHL). Deux souches *Lb. brevis*, et une souche *Enterococcus faecalis*. Pour les 3 souches identifiées comme étant des *Lb. brevis* par les tests biochimiques, seulement 1 souche est confirmée par les techniques moléculaires. Les 2 souches restantes sont identifiées comme étant *Pediococcus pentosaceus*. Les 2 souches appartenant au genre *Leuconostoc* par les tests biochimiques appartiennent après identification moléculaire à *Weissella paramesenteroïdes.*

La souche *Lb. Plantarum* Lbr1 présente une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée, sur toutes les bactéries pathogènes avec des diamètres des zones d'inhibition de 15.7 à 23.83 mm de diamètre. La meilleure zone d'inhibition (23.83 mm de diamètre) a été observée pour la souche Lbr1 *Lb. plantarum* contre *Listeria monocytogenes* EU2160, tandis qu'on a noté une absence de l'effet antimicrobien contre certaines souches cible : Lbr2, Lbr8 et Lbr9 contre *Shewanella putrefaciens* EU2187, le même effet est observé pour les souches lactiques Lbr3, Lbr8 et Lbr9 contre *Listeria monocytogenes* EU2160.*des* et *Lactobacillus gasseri*.

La souche Lbr1 *lactobacillus plantarum* ne produit que de l'acide lactique. En effet, la production d'acide lactique à 24 h est de 18 $g.l^{-1}$ pour la souche Lbr1 *lactobacillus plantarum*. Au vu de ces valeurs et du fait qu'aucun autre acide organique n'a été produit, la souche a été caractérisée comme étant homofermentaires.

La production substance antimicrobiennes non acide débute pendant la phase d'accélération pour les deux températures 8 et 30°C. Cependant l'effet inhibiteur maximum est atteint au bout de 4 heures. L'activité de la bactériocine *Lactobacillus plantarum* Lbr1 n'est pas affectée par les traitements à 10, 30,80 ,100 ou 121°C pendant 10 et 20 min.

Les analyses antimicrobiennes contre les cellules indicatrices: *Listeria ivanovii* EU2162, du surnageant de culture de la souche *Lb. plantarum* Lbr1 ont montré que

l'activité biologique n'est pas affectée par l'addition de catalase. Par contre, le traitement du surnageant par les enzymes protéolytiques (Trypsine, Pronase E et Proteinase K) fait perdre totalement l'activité biologique, les zones d'inhibition sont affectées par les enzymes protéolytiques. Cette constatation implique que la SANA1 est de nature protéique. Selon le principe des dilutions critiques, les valeurs des CMI de la SANA1 de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 est de 1785,71 U.A/ml.

CHAPITRE IV :

Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette : Le chitosane.

CHAPITRE IV :

Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette : Le chitosane.

Introduction

L'activité humaine, particulièrement industrielle, produit des quantités phénoménales de déchets. Certains de ces déchets ont une grande valeur que la biotechnologie permet de matérialiser. Les déchets de la production commerciale piscicole et coquillière et de la transformation des produits de la mer sont, synonymes de problème, mais ils offrent également d'excellentes possibilités d'exploitation. L'élimination de ces déchets a toujours été dispendieuse et a souvent eu un impact nuisible sur l'environnement.

En effet, pendant longtemps, les conserveries de crustacés produisaient de grande quantité de déchets qui n'étaient pas recyclés et étaient simplement rejetés à la mer, créant de sérieux problèmes de pollution au voisinage des sites de production.

D'après les données statistiques fournies par la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture), et à titre d'exemple, la production globale de crevettes, toutes espèces confondues, issues de la pêche et des élevages aquacoles, a augmenté de 4 millions de tonnes durant l'année 1999. Ce qui conduit, à une augmentation inévitable des déchets de l'industrie de la crevette, et avec elle l'augmentation des risques de pollution. Mais grâce aux progrès techniques et au développement des marchés, il est maintenant possible, de transformer ce flux de déchets en produits utiles et commercialisables. La découverte de la chitine et de son dérivé déacétylée (chitosane) date du 18ème siècle, mais ce n'est que dans les années 1970 que ces polymères ont suscité un réel intérêt. Dans le règne animal, la chitine est un élément structural important des téguments de certains invertébrés tels que les insectes, les mollusques, les crustacés et les nématodes. Dans le règne végétal, elle n'est signalée que dans les parois des champignons et de certaines algues chlorophycées. C'est un polymère de haut poids moléculaire, formé d'unités de N- acétyl-glucosamine.

En l'absence de données statistiques concernant la consommation, dans notre pays, de crustacés en général et celle des crevettes en particulier, on connaît mal l'impact négatif que peuvent avoir ces déchets sur notre environnement proche. Dans cette optique, nous nous sommes attelés, dans le cadre de ce travail, à valoriser les déchets, constitués de carapaces de crevette. Nous avons dans un premier temps, procédé à l'extraction de la chitine par voie chimique. La quelle chitine, nous a servi pour préparer et caractériser sur un de ces dérivés à savoir le chitosane , par l'étude de son pouvoir antioxydant , son effet antimicrobien, dosage de la matière sèche, de la teneur en cendres, de la teneur en lipides , de la teneur en protéines ,ainsi que son degré de déacétylisation ,son pouvoir chélateur sur les métaux lourds ainsi que son pouvoir antimicrobien .

IV.1. Matériels et Méthodes

IV.1.1. Matériels

IV.1.1.1. Collecte des carapaces, origine

Les carapaces de crevettes ont été collectées dans des restaurants des différentes pêcheries, du port et du marché des poissons BENI SAF dans la wilaya de Tlemcen situé à l'ouest d'Algérie. Ces déchets appartiennent à plusieurs espèces de crevettes tel qu'identifiée au niveau du Laboratoire Halieutique, Faculté des Sciences Biologiques, université de Tlemcen ABOU BAKR BELKAID.

IV.1.1.2. Les souches pathogènes utilisées

Bacillus subtilis DSMZ10, *Escherichia coli* CIP76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187**,** *Listeria monocytogenes* EU2160, *Listeria ivanovii* EU2162 et *Staphylococcus aureus* résistant à la methicilline STRM utilisées lors de la présente étude ont été obtenues de divers laboratoires internationaux. Le tableau 12 décrit chacune des souches, son origine, son milieu de culture ainsi que sa température de croissance.

Chaque souche pure a été conservée individuellement dans des cryovials renfermant 1 mL de culture qui étaient maintenus à -80°C. Précédant leur utilisation, les cryovials ont été utilisés pour inoculer un volume de 9 mL de BHI pour les souches pathogènes

Staphylococcus aureus STRM souche local obtenue du laboratoire INMV Alger et isolée lors des tests de l'antibiorésistance et conservée sur TSB gélose inclinée à 4°C.

Tableau 12: Origine, milieu de culture et température de croissance des différentes souches utilisées.

Souches	Origine de la souche	Milieu de culture	Température de croissance
***Escherichia coli* CIP76.24**	CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France	BHI (Réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France	37°C
***Salmonella enterica* CIP81.3**	CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France	BHI (Réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)	37°C
***Shewanella putrefaciens* EU2187**	EU: European SEAFOOD plus collection IFREMER, Nantes, France	BHI (Réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)	20°C
***Staphylococcus aureus résistant à la* methicilline STRM**	Collection du laboratoire INMV Alger, Algérie	trypticase soy broth (TSB) (Réf .22092 Difco Laboratories, Detroit, MI)	37°C
***Listeria monocytogenes* EU2160**	EU: European SEAFOOD plus collection IFREMER, Nantes, France	BHI (Réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)	20°C

IV.1.2. Méthodes

IV.1.2.1. Réactivation des souches pathogènes

Les germes pathogènes: *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Escherichia coli* CIP76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187**,** *Staphylococcus aureus* STRM, *Listeria monocytogenes* EU2160, *et Listeria ivanovii* EU2162 ont été réactivés et cultivés sur bouillon cœur cervelle ou BHI **(**Brain-Heart-Infusion : réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France) et incubé en aérobiose aux températures d'incubation pendant 24 h. Toutes les souches ont été cultivées au moins trois fois avant l'expérience.

Le milieu Mueller-Hinton gélose molle **(**Réf : CM0405 Oxoid, Biomérieux, France) utilisé pour tester la sensibilité des germes pathogènes au chitosane extrait a partir des carapaces de crevette.

IV.1.2.2. Prétraitement des carapaces

Avant leur utilisation, les déchets de carapaces sont d'abord débarrassés de leurs antennes et autres pattes. Ils subissent ensuite un prétraitement selon Mukherjee (2001) qui consiste en un lavage énergique afin d'éliminer les résidus organiques (tissus) et bouillis pendant 1 heure. Après séchage, les carapaces subissent le *quenching* : ce traitement permet de casser la structure cristalline de la chitine contenue dans les carapaces, facilitant ainsi son extraction. Il consiste à placer les carapaces préparées dans l'étuve à 80°C, pendant 48 heures. Elles sont ensuite rapidement plongées dans un bain d'eau froide.

Figure 21: carapace de crevette après lavage pour leur utilisation.

IV.1.2.3. Extraction de la chitine

La totalité du processus permettant de passer de l'extraction de la chitine à l'obtention de chitosane est schématisée sur la figure 22. De nombreuses méthodes ont été développées, afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, elles consistent à éliminer les éléments minéraux (déminéralisation) et les protéines (déprotéinisation)

a) Déminéralisation

La déminéralisation est généralement réalisée par un traitement acide sous agitation pour solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium. Les acides les plus fréquemment utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide formique à des concentrations de 1 à 10 $mol.L^{-1}$. Le traitement acide se fait à la température ambiante. Pour notre étude la condition optimale est obtenue par le traitement des carapaces sèches en poudre avec 2M HCl (2 $mol.L^{-1}$) pendant 24H à la température ambiante et le rapport du solide au solvant est 1:15 (p/v), c'est-à-dire 1 g de carapaces en poudres pour 15 ml de solvant (No et al., 1989). Pendant le processus de déminéralisation, des mousses indésirables peuvent se former dues à la production de dioxyde de carbone.

$$[CaCO_3 + 2HCl \Rightarrow CaCl_2 + CO_2(\uparrow) + H_2O].$$

b) Déprotéinisation

Le déminéralisat ainsi obtenu est lavé avec de l'eau froide jusqu'à neutralisation du pH. A l'état naturel, la chitine se présente en association avec les protéines (Chitinoprotéine). Les protéines sont éliminées par un traitement basique à l'hydroxyde de sodium (NaOH). La concentration utilisée est de 2 M, selon un ratio de 1:10 (p/v). La température est de 60 °C et la durée peut varier de 30min à plus de 24 heures (Tolaimate et al., 2003 ; Al Sagheer et al., 2009). La chitine retenu est lavé en continu, afin d'éliminer la soude résiduelle, et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau du lavage atteigne la neutralité. La chitine ainsi obtenu est séchée à l'étuve à 80°C.

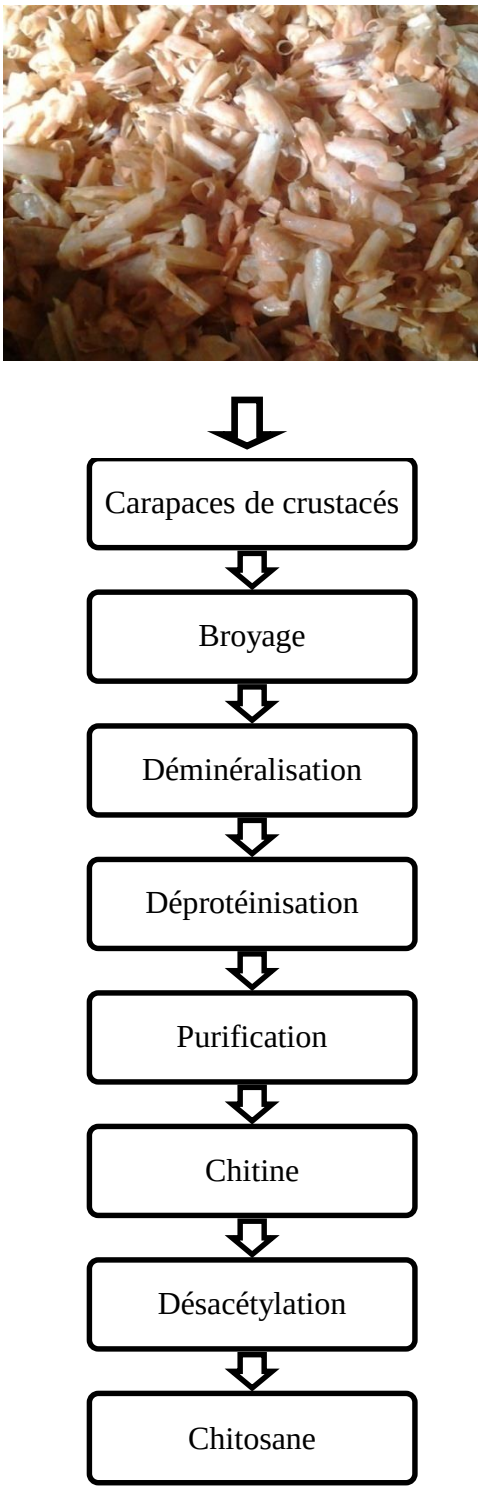


Figure 22: Procédé d'extraction de la chitine et du chitosane (Mokrani, 2012).

IV.1.2.4. Préparation du chitosane à partir de la chitine (Processus de déacétylation)

Des traitements acides et basiques sévères catalysent la déacétylation (Gizatulina, 2005) et aboutissent au chitosan (fig. 23).

Le chitosane est obtenu par déacétylation de la chitine. 10g de chitine est chauffée à 60 °C, dans une solution de NaOH concentrée à 50 %, selon un ratio (p/v) de 1:20, pendant au moins 8 heures (Chang et al., 1997 ; Jaworska et Konieczna, 2001 ; Tsai et al., 2002 ; Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). Le chitosane ainsi obtenu est filtré puis lavé en continu, afin d'éliminer la soude résiduelle, et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau du lavage atteigne la neutralité. Les chitosane produits à différents temps sont ensuite filtrés et lavés puis étuvés à 50 °C pendant 24 heures (fig. 24).

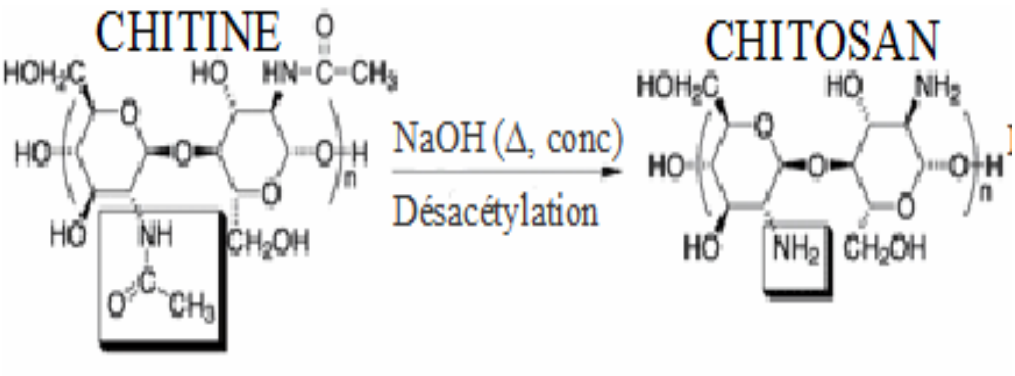


Figure 23: Schéma des réactions chimiques de déacétylation de la chitine (Gizatulina, 2005).

Figure 24 : Le chitosane après désacétylation.

IV.1.2.5. Mesure du degré déacétylation par Spectroscopie infrarouge transformation de Fourrier - FTIR

Cette technique simple à mettre en œuvre, est largement utilisée pour étudier la composition et la structure du chitosane (Duarte et al., 2002 ; Cardenas et al., 2004) et déterminer le degré de déacétylation (Einbu, 2007 ; Ng et al., 2006). Le principe de la spectroscopie infrarouge se base sur les émissions de vibrations entre deux atomes. Elles sont spécifiques à chaque environnement atomique. Ces vibrations sont identifiées selon leurs fréquences.

Le mode opératoire consiste généralement à broyer 10 g d'échantillon avec 100 mg de KBr (Fluka). Le mélange est pressé à 3000 bars pour donner de fines pastilles translucides. Celle-ci est placée dans le spectromètre (Bruker Alpha-T), sous le faisceau de rayons infrarouges. Avant d'effectuer le spectre, l'échantillon est étuvé à 80°C pendant 16 heures. Le spectre FTIR a été réalisé dans un domaine de nombre d'onde allant de 400 à 4000 cm-1. Les spectres des échantillons sont alors comparés entre eux et aux standards.

Les degrés de déacétylation obtenus à partir des absorbances des bandes à 1655et 3450 cm-1.

Le degré de déacétylation (DD) est déterminé en utilisant la formule :

$$DD\% = \%\ NH2 = [1 - (A1655 / A3450)* 1/1{,}33] *100$$

- A1655 cm -1 est l'absorbance à la longueur d'onde 1655 cm-1 (Amide I 1655 cm-1)
- A3450 cm -1 est l'absorbance à la longueur d'onde 3450 cm-1 (Hydroxyle 3450 cm-1)
- Le facteur 1.33 représente le rapport (A1655 / A3450) pour un chitosane entièrement N- acétylé.

IV.1.2.6. Mesure de la Viscosité et poids moléculaire du chitosane

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un viscosimètre de type Ubbelohde (Relative Viscometer Model Cat #9721-R56, Cannon instrument Corp., State College, PA.

USA). Le poids moléculaire moyen des polymères préparés dans le cadre de ce travail, a été déterminé à partir de l'équation de Mark-Houwink (Sabnis et Block, 2000) :

$$[\eta] = K.(M)^a \quad \text{Où}$$

[η] représente la viscosité intrinsèque du polymère, k et a sont les coefficients de Mark-Houwink dont les valeurs sont respectivement $1.31.10^{-2}$ ml/g et 0.64 pour la solution de chitosane préparée dans l'acide acétique 0.5M NaCl à 20°C et filtrée avec un millipore de 0. 45µm (Roberts, 1982).

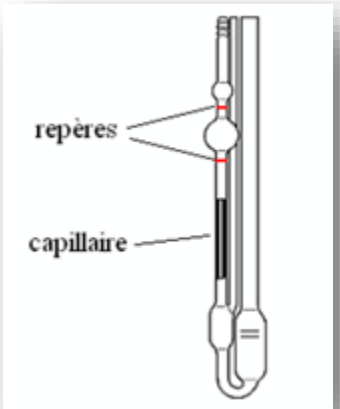


Figure 25: Viscosimètre capillaire d'Ubbelhode.

IV.1.2.7. Détermination de la matière sèche

Pour estimer la part d'eau dans un produit, 1 à 2 g d'échantillon sont prélevés et pesés dans une coupelle de poids connu. La coupelle est placée 24 h dans une étuve à 105 °C, puis pesée après 30 min de refroidissement. L'expérience est réalisée en triplicat (AOAC, 1980). La teneur en eau est déterminée dans la matière première dans le produit d'extraction chimique.

$$ES\ \% = (M_2 - M_0 / M_1 - M_0)*100$$

ES % est la part d'extrait sec, M0 le poids de la coupelle, M1 le poids humide, et M2 le poids sec final.

IV.1.2.8. Détermination de la teneur en cendres

Le principe de la détermination de la teneur en minéraux repose sur leur résistance à la chaleur. Environ 1 g d'échantillon est pesé dans une feuille de papier en aluminium de poids connu. Elle est repliée et placée au moins 5 h à 600 °C. Après refroidissement, elle est de nouveau pesée. Le poids des cendres résiduelles est assimilé à la teneur en minéraux. Chaque mesure est répétée trois fois (AOAC, 1980).

$$\text{Cendre \%} = (M_2 - M_0 / M_1 - M_0)*100$$

Cendres % est la teneur en cendres, M0 le poids du récipient, M1 et M2 sont les poids avant et après incinération respectivement.

Pour s'affranchir de l'influence des conditions environnementales (T° et P°), les supports (creusets) sont placés 1 heure en étuve à 105 °C, puis refroidis 30 min dans un dessiccateur avant d'être utilisés. Tous les résultats sont exprimés par rapport à la matière sèche**.**

IV.1.2.9. Dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Lowry

Ce dosage repose sur une double réaction. D'une part, un complexe cuivre-protéine est formé à partir des atomes d'azote des liaisons peptidiques, en condition alcaline. D'autre part, les ions Cu+ et certains radicaux d'acides aminés réduisent le complexe acide phosphotungstique / acide phosphomolybdique contenu dans le réactif F-C pour Folin Ciocalteau .Le produit obtenu développe une coloration bleue mesurée à 750 nm.

Environ 1 g d'échantillon est pesé dans un tube dans lequel est ajouté 10 ml de NaOH 2 M. Le tube est porté à 90 °C pendant 1 h. Après refroidissement, le contenu du tube est fractionné par centrifugation à 10 °C, pendant 10 min à 10 000 rpm. La fraction de protéines solubilisées se situe dans le filtrat, sur lequel s'effectue le dosage colorimétrique.

Au préalable, deux réactifs sont préparés à partir d'un kit Sigma. Le premier est un mélange d'une solution à 2 % de Na_2CO3 (dans du NaOH à 0.1 N), d'une solution à 1 % du $CuSO_4$ (dans de l'eau distillée) et d'une solution de $KNaC_4H_4O_6$, à 2 % (dans de l'eau distillée). Le second réactif est le réactif de Folin-Ciocalteu (F-C) à base d'acide phosphotungstique et de cuivre.

La prise d'essai pour l'échantillon ou le standard est de 0,5 ml auquel on ajoute 2.5 ml du premier mixe de réactifs. Les tubes sont agités et maintenus à température ambiante pendant 10 min. On ajoute ensuite 25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Les tubes sont nouveau agités. L'absorbance peut être lue après 30 min à température ambiante à 745 nm. L'échantillon est reproduit en triplicat.

La protéine de référence utilisée pour ces dosages est un sérum à base d'albumine bovine (BSA). La gamme étalon s'étend de 12.5 à 300 µg/ml pour nos expérimentations.

IV.1.2.10. Détermination de l'activité antioxydante du chitosane

En présence des piégeurs de radicaux libres, le DPPH. (2.2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui et al., 2006). L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Lopes-Lutz et al., 2008). Dans des tubes on introduit 2.5 ml de solution chitosane (0.1mg/ml) et 1ml de la solution méthanolique au DPPH (0.3 mM), après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

% d'inhibition des radicaux libres = [1 – (Abs $_{\text{Échantillon}}$ /Abs $_{\text{temoin}}$)] x 100 selon Yamaguchi et al. (1998)

Avec : $A_{\text{échantillon}}$=Absorbance à 517nm du mélange de 2.5ml de solution chitosane + 1ml DPPH (0.3 mM dans le méthanol et $A_{\text{témoin}}$=Absorbance à 517nm de la solution méthanolique au DPPH (0.3 mM dans le méthanol).

IV.1.2.11. Mesure du pouvoir antibactérien et du spectre d'action du chitosane par la méthode de diffusion en puits (Schillinger et Lücke (1989))

Cette méthode permet de détecter les inhibitions dues au chitosane solubilisé dans 0.5M d'acide acétique dans le milieu de culture des souches inhibitrices : *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Escherichia coli* CIP76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella*

putrefaciens EU2187**,** *Listeria monocytogenes* EU2160, *Listeria ivanovii* EU2162 et *Staphylococcus aureus* STRM.

Cette méthode consiste à couler 7 ml de milieu MH gélose molle en surfusion contenant 500 µl d'une jeune culture de la bactérie indicatrice, sur une gélose solide stérile, après solidification, des puits sont creusés à l'aide d'une cloche de Durham stérile. Un volume de solution chitosane est mis dans ces puits, après diffusion pendant une nuit à 4°C, on incube à 37°C pendant 24h. Des zones claires autours des puits indiquent le pouvoir inhibiteur du chitosane.

IV.1.2.12. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La méthode INT (Eloff, 1998) est utilisée afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) de la solution chitosane vis-à-vis des souches bactérienne inhibitrice *Staphylococcus aureus* STRM et *Escherichia coli* CIP76.24 en milieu BHIB. En utilisant les microplaques, 10 µL de piodonitrotétrazolium violet (INT) (0.4 % dans l'eau stérile) sont ajoutés dans les puits de microplaque comme indicateur de la croissance bactérienne. La microplaque est incubée à 37°C pendant 30 min à l'abri de la lumière. Le sel de tétrazolium incolore agit comme accepteur d'électrons et est réduit en un produit coloré (formazan rouge) par les microorganismes vivants. Lorsque la croissance bactérienne est inhibée, la solution dans le puits reste incolore après l'incubation avec INT.

La microplaque de 96 puits est ensuite remplie avec 75 µL de souches bactériennes cibles, à l'exception de la première colonne de puits incubée avec 75 µL de milieu BHIB correspondant au blanc, puis, des dilutions en cascade au 1:2 ont été effectuées avec la solution chitosane versée dans tous les puits de la microplaque à l'exception de la première colonne de puits qui est incubée avec 75 µL d'acide acétique (0.4 %).

Les valeurs de CMI sont enregistrées comme la concentration minimale du composé antibactérien qui inhibe complètement la croissance bactérienne visible après 16-18 h (aucun signe de croissance) (Barry, 1976). Pour la détermination de CMB, 50 µL de chaque puits sont ensemencés sur des boîtes de gélose MH et puis ces boîtes sont incubées à 37°C pendant 24-48 h. CMB est définie comme la concentration minimale du composé

antibactérien qui tue 99.9 % de cellules viables (aucune colonie n'est observée sur des boîtes de gélose MH) (Barry, 1976).

IV.1.2.13. Détermination du pouvoir d'adsorption des métaux lourds Ni, Zn, Mn par le chitosane

Préalablement à l'expérience d'adsorption, une solution synthétique de métaux lourds est préparée, et ce en diluant une masse adéquate de sel métallique Nitrate de nickel hexahydraté : Ni (NO3)2 6H2O, Nitrate de zinc hexahydraté : Zn (NO3)2, 6H2O et du Chlorure manganeux tétrahydraté MnCl2.4H2O dans un volume d'eau distillée déminéralisée. Pour ce faire pour chaque ion métallique, des solutions de concentrations de 3, 6 et 9 mg/L sont préparées, puis 50 ml de chacune des solutions préparée est mise en contact avec 50 ml l'adsorbant chitosane à la concentration de 3g/L pendant 1 heure à 28°C sous agitation à 150 tpm dans un agitateur secoueur. À la fin de l'adsorption, les concentrations à l'équilibre sont déterminées par un Spectromètre d'absorption atomique, de marque SHIMADZU AA – 6800.

IV.2. Résultats et discussion

IV.2.1. Rendements d'extraction

La maîtrise du milieu réactionnel (concentration en enzyme, pH et température) en fonction de la matière première utilisée permet de contrôler le rendement et les caractéristiques biochimiques et physico-chimiques des chitines obtenues. Théoriquement, en allongeant le temps d'hydrolyse on tend vers une réduction du degré de polymérisation.

Le rendement massique d'extraction des parties insolubles (Rdt) dépend de la nature de la matière première, de l'acide utilisé et est calculé à partir de la formule suivante :

Rdt = 100*(poids en matière insolubles séchés) / (poids en matière première sèche).

Selon le mode d'extraction, la partie insoluble contient majoritairement des chitines ainsi que des protéines et des minéraux résiduels qui n'ont pas été éliminés lors de la réaction d'hydrolyse.

Le rendement massique d'extraction de chitine est de 23,70±1,76 g/100g de carapaces soit ~24±1,8 % (p/p), Les rendements de déminéralisation et de déprotéinisation sont de l'ordre 86.38±3.62% et 9.56±6.55% respectivement, le taux de déprotéinisation est significativement inferieur au taux de déminéralisation.

Le rendement massique d'extraction du chitosane est de 14 ±1,38 g/100g soit 59,07±1,46 % (p/p). Waldeck (2006) obtient des rendements d'extraction massique pour la chitine et le chitosane de l'ordre de 27g et 16g/100g de carapaces. Selon De Hollanda et Netto (2006) les taux de rendements d'extraction sont liés à l'augmentation de la concentration, de la durée et de la température de réaction. Le rendement en chitine varie en fonction de l'espèce entre 9 à 35 % par rapport à la biomasse séchée. Cependant le rendement en chitosan est seulement de 8,5 à 19,6 % (Nadarajah et al., 2001). Les travaux de Einbu (2007) montrent des variations sensibles dans la composition des coproduits de crevettes au cours des saisons. De manière générale, à partir des ressources industriellement exploitées, le rendement est compris entre 20 et 40 % (Charoenvuttitham et al., 2006). Tolaimate et al. (2003) soulignent que l'optimisation des conditions est fonction de la matière première. Par exemple, l'étape de déminéralisation à l'HCl est accentuée lorsque l'extraction s'effectue à partir de crabe ou de homard (HCl 2 M, température ambiante, 5 à 48 h). Au contraire, pour le bouquet ou les calmars, la concentration en acide et la durée du traitement doivent être limitées (HCl 0,6 M, température ambiante, 2 h). Ces conditions sont liées à la quantité de carbonate de calcium présente.

IV.2.2. Degré de déacétylation du chitosane

La valeur relevée du degré de déacétylation(DD) est de 75% est élevée permet de procurer au chitosane une capacité de floculation et de fixation des cations métalliques très élevée (Rousy et al., 2005). Le degré de déacétylation(DD) représente la proportion d'unités amine-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités glycosidiques. Dans le cas du chitosane, le DD est supérieur à 70% pour les produits commerciaux. Cette valeur détermine également la limite de solubilité de ce polymère dans les solutions acides diluées (2<pH<6). Le DD est un paramètre structural qui influence les propriétés physico-chimiques telles que la solubilité, la charge globale et la réactivité, les propriétés mécaniques comme l'élongation à la rupture, la résistance à la traction et les propriétés

barrière. Il influence également les propriétés biologiques (Chatelet et al., 2001) comme la biocompatibilité, la biodégradabilité et l'activité biostimulante et anticholestemiante.

Le spectre obtenu du chitosane préparé est représenté par la figure 26.

Le spectre infrarouge à transformation de Fourrier – FTIR montre 16 pics correspondant aux bandes : 3430.02/cm- 3258.97/cm,3100.03/cm,2877.11/cm,2325.01/cm, 1652.30/cm,1629.99/cm, 1556.30/cm,1377.02/cm,1380.11/cm,1258.98/cm,1155.03/cm, 1168.38/cm,1009.11/cm, 951.78/cm, et 689.40/cm. Une large bande à 3100-3500 cm-1 correspondant aux vibrations d'élongation de -NH et -OH incluant les liaisons d'hydrogène. La diminution en intensité et le déplacement vers une fréquence plus élevée de cette bande dans le spectre de l'échantillon chitosane reflète une diminution des liaisons d'hydrogène. Selon Liu et al. (2009) l'intensité des pics 2877.11/cm et 2325.01/cm reflète les vibrations à d'élongation de -CH et -CH2 et diminue avec l'augmentation du degré de déacétylation (Rinaudo, 2006).

Les absorbances des pics dues aux 1377.02 et 1380.11/cm -1 -Vibration de déformation de la liaison C-H dans le groupement CH3. Les pics apparus à 1258.98/cm et 1155.03/ cm-1 correspond à la vibration de valence de la liaison C-O-C respectivement aux vibrations d'élongation de l'amide I et l'amide II (Kassai, 2008). les spectres de chitosane présente des bandes 1168.38/cm, et 1009.11/cm (qui reflète des liaisons C-OH) (Crini et al., 2008).

Le spectre du la chitosane présente des bandes dans la région spectrale 600-900 cm-1 appelée région sensible à la structure (Assaad, 2006). L'absence de ces bandes dans le spectre du chitosane) reflète le changement de la structure du polysaccharide (Shaojie et al., 2003). L'absence de pic à 1540 cm-1 selon Crini et al. (2008) est imputé à la faible ou absence des impuretés protéiques).

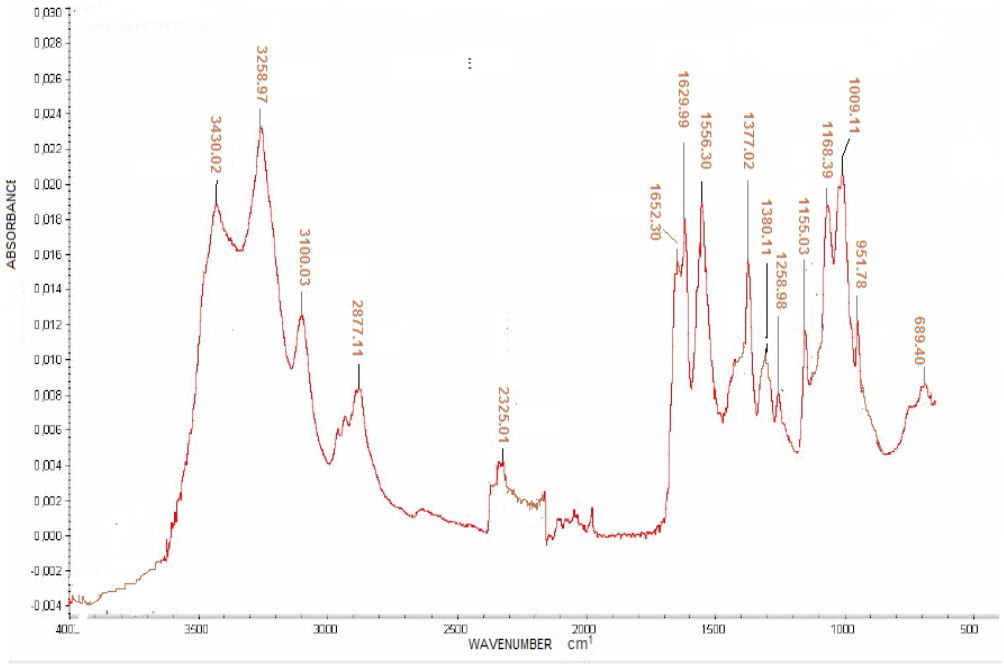


Figure 26 : Spectre Infra-Rouge du chitosane extrait.

V.2.3. Viscosité et poids moléculaire du chitosane

La viscosité et le poids moléculaire du chitosane extrait sont respectivement 119.7±0.04 mPa.s et 1414.33±16.99 kDa. La valeur du poids moléculaire (PM) d'un chitosane dépend intimement du procédé de préparation, car celui-ci peut induire une dépolymérisation des chaines macromoléculaires et/ou une dégradation lors de sa production (Crini et al., 2008). Les chaines macromoléculaires du chitosane ont généralement un PM de l'ordre de 100 à 1500 kDa (Criniet al., 2008). Ces poids déterminent l'application désirée pour le chitosane Comparé à d'autres échantillons cités dans la littérature (Gupta et Jabrail, 2006), le chitosane extrait a un poids moléculaire relativement élevés. Ceci est dû probablement au traitement doux (température de 20 et 60°C et concentration en NaOH de 50%) lors de la déacétylation de la chitine ; les paramètres température et concentration en NaOH ont une forte action sur le poids moléculaire du chitosane. L'avantage serait que ces PM un peu élevés procureraient aux chitosane un bon comportement au niveau de la floculation (Crini et al., 2008).

La viscosité du chitosane dépend : de son degré de déacétylation : plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amine libres, plus le chitosane est soluble, et plus sa viscosité est importante; de sa concentration, de la température, et le pH (Zemmouri, 2008)

Une des propriétés les plus intéressantes du chitosane, est son aptitude à former des solutions visqueuses, il pourrait donc fonctionner comme épaississant ou stabilisant. La plage de viscosité de chitosanes commerciales (1% [poids / de vol] dans l'acide acétique à 1% à 25 ° C) est de 10 à 1000 mPa.s (Kumar, 2000).

Nos résultats s'alignent avec ceux trouvées par Delerino et Cresidio (2010) le chitosane extrait par voie chimique présentait une viscosité de 112,500 mPa.s dans une autre étude de Ekkalak et Saipin (2014) trouvent que le chitosane extrait donnait une viscosité de 110.0 ± 15.1 mPa·s

IV.2.4. Caractérisation physicochimique du chitosane extrait

Le chitosane extrait, présentent une teneur en cendre de 0.34 ±0.02 g /g de chitosane, la teneur en matière sèche est de l'ordre de 0.74±0.02 g /g de chitosane (Tableau 13). La mesure du taux de cendre est un bon indicateur de l'efficacité de la déminéralisation. Un chitosane de qualité élevée devrait avoir une teneur en cendre inférieure à 1% (Fernandez-Kim, 2004). La teneur en protéine dosée par la méthode de Lowry avoisine 0.37±0.12 g. A l'état naturel, on retrouve la chitine sous la forme Chitinoprotéine (Crini et al., 2008). Les protéines sont éliminées par un traitement basique la valeur du taux de protéine trouvée indique l'efficacité de l'étape de déprotéinisation.

Les compositions déterminées par des études similaires (Shahidi et Abuzaytoun, 2005; Waldeck et al., 2012; Kurita, 2006) montrent également une grande variabilité des proportions et s'alignent avec les résultats trouvés avec des valeurs de taux de protéine ne dépassant pas les 0.4.g /g de chitosane , la teneur en taux de cendre était 0. 38 g /g de chitosane. Ces teneurs varient en fonction des espèces, de l'âge, du genre et peuvent fluctuer en fonction des saisons et des conditions environnementales (Percot et al., 2003 ; Cho et al., 1998).

Tableau 13: Caractérisation physicochimique du chitosane extrait .

Paramètres	Valeurs
Cendre	0.34±0.002g/g
Matiere sèche	0.74g/g
Protéine	0.37±0.12g/g
Viscosité	119.7±0.04 mPa.s
P.M	1414.33±16.99 kDa

IV.2.5. Pouvoir antioxydant du chitosane

La figure 27 montre une augmentation du pourcentage de réduction du DPPH proportionnelle aux concentrations du chitosane. En effet l'inhibition de ce radical atteint la valeur maximale de 62.6% avec une concentration de 2% de chitosane.

L'activité antioxydante de chitosane exprimée en EC_{50} a été déterminée graphiquement, elle est définie comme étant la concentration de l'antioxydant nécessaire pour produire ou inhiber 50% du DPPH en solution ; comme il est indique le chitosane est un excellent antioxydant naturel. Les résultats obtenus concernant l'EC50 est de 1.2% de chitosane (fig. 28).

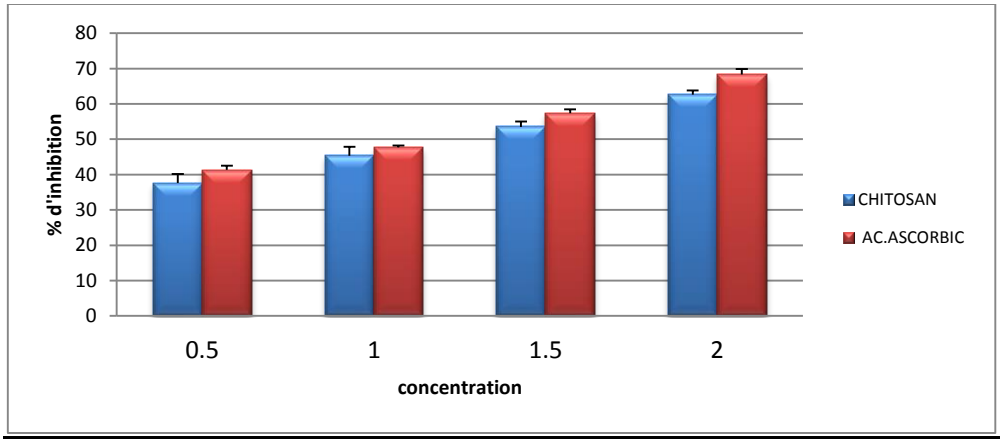


Figure 27 : Pouvoir anti-oxydante à différentes concentrations du chitosane extrait 0.5/1/1.5 et 2g/100ml et de l'acide ascorbique. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations ±SEM (n = 3).

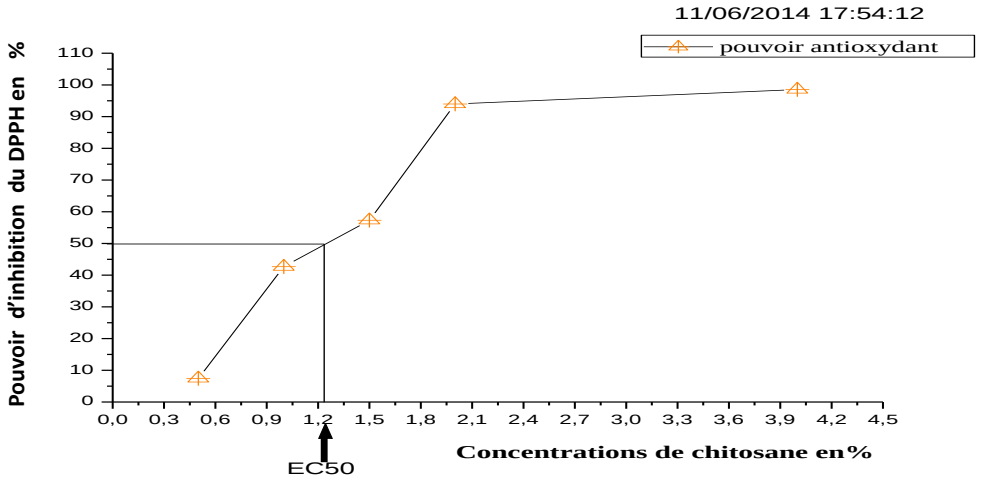


Figure 28: Concentration efficace 50% (CE_{50}) d'inhibition de l'activité anti-radicalaire du chitosane (Graphe dessiné grâce au logiciel ORGIN.8).

Notre résultat concorde avec ceux de (Kaminski et al., 2008 ; Wydro et al., 2007).Lin et Chou (2004) qui ont déterminé que l'activité antioxydant du chitosane augmente avec concentration et que l'effet de piégeage de l'acide ascorbique est plus élevé que du chitosane (Kuppusamy et Karuppaiah, 2013).

Park et al. (2004) ont suggéré que le chitosane peut éliminer divers radicaux libres par l'action de l'azote sur la C-2 position du chitosane.

L'activité de piégeage de chitosane peut être due à la réaction entre les radicaux libres et un groupe amino libre résiduel pour former des radicaux stables de macromolécules et / ou les groupes amino peuvent former des groupes ammonium pour absorber les ions d'hydrogène de la solution et ensuite réagir avec les radicaux par une réaction supplémentaire (Xie et al., 2001).

La capacité de balayage du chitosane sur des radicaux DPPH a été signalé à 5 3.5 % à la concentration de 1.5g/100 ml. L'acide ascorbique a montré une forte capacité de piégeage de l'ordre de 57.33% à la même concentration. Ainsi, le chitosane a montré une activité anti-radicalaire allants de 37.66% à 62.66 à des concentrations variables de 0.5 à 2%). Le chitosan avait une activité de piégeage évidente et fait preuve d'une inhibition dépendante de la concentration .L'effet de balayage de chitosane était 62.66% à une

concentration de 2%, tandis que l'effet de balayage de l'acide ascorbique était de 98.33% à la même concentration (Tableau 14).

Cependant, l'effet de piégeage de l'acide ascorbique (0.5 à 2%) est plus élevé que le chitosane. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin.

Tableau 14 : Pouvoir anti-oxydante à différentes concentrations du chitosane extrait 0.5, 1, 1.5et 2g/100ml.

Concentration	0.5	1	1.5	2
Chitosane	37.67±2.52	45.33±2.52	53.5±1.53	62.67±1.15
Acide ascorbique	41.33±1.15	47.67±0.58	57.33±1.15	68.33±1.53

IV.2.6. Pouvoir antibactérien du chitosane et son spectre d'action par la méthode de diffusion en puits (Schillinger et Lücke (1989))

Les résultats concernant les propriétés antibactériennes ont montré que les bactéries à Gram-positif ont été plus sensibles que celles à Gram-négatif vis-à-vis de l'action du chitosane (fig. 29 et 30), ainsi le chitosane possède une activité inhibitrice sur la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la methicilline importante, le diamètre d'inhibition est de l'ordre de 28±1mm, cette inhibition est significative entre les souches pathogènes $P<0.05$. *Escherichia coli* CIP76.24 marque un diamètre d'inhibition de 14±2mm. Bacillus subtilis DSMZ10, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Listeria monocytogenes* EU2160 donnent des diamètres d'inhibition de 15.83±1.04 ; 18.66±1.52 ; 25.66±3.05 ; 21.66±2.08 respectivement.

Plusieurs travaux de recherches ont illustré l'activité anti-bactrienne du chitosane. Ainsi, Helander et al. (2001) ont montré que l'utilisation du chitosane à forte concentration a un effet bactéricide sur des bactéries Gram négatif comme l'*Escherichia Coli* et la *Salmonella typhimurium*.

Comme on l'a déjà souligné, le chitosane, inhibe complètement la croissance du *Listeria monocytogenes* (Moller et al., 2004). L'enrobage des fruits par le chitosane a également permis l'inhibition de la croissance de la bactérie à Gram positif *Candida lambica* (Devlieghere et al., 2004)

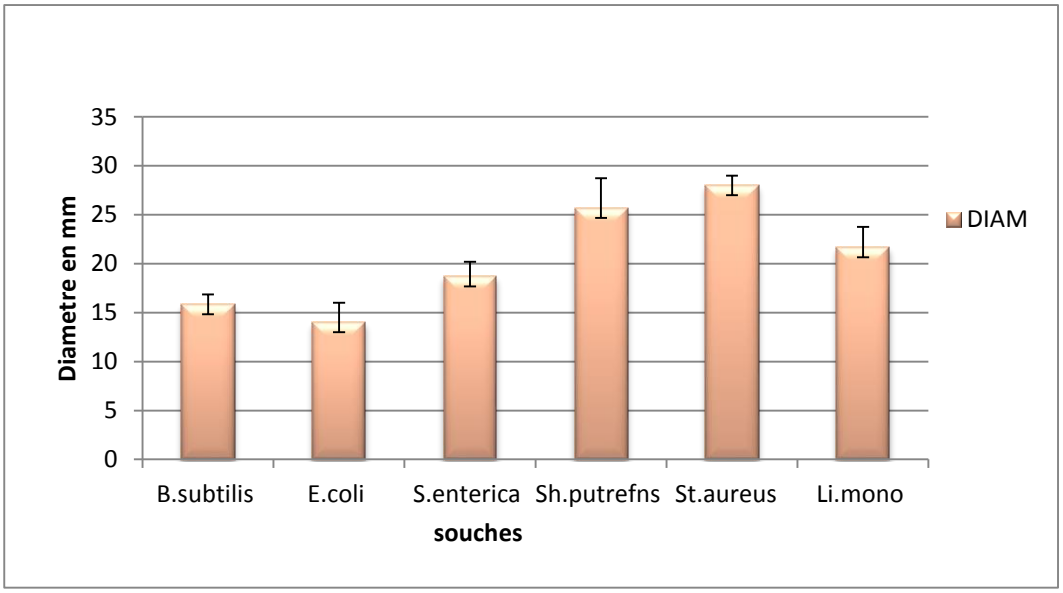


Figure 29: Pouvoir antibactérien du chitosane (diamètre d'inhibition en mm) contre *Escherichia coli* CIP76.24, *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Listeria monocytogenes* EU2160 et *Staphylococcus aureus* résistante à la methicilline. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations ± SEM (n = 3).

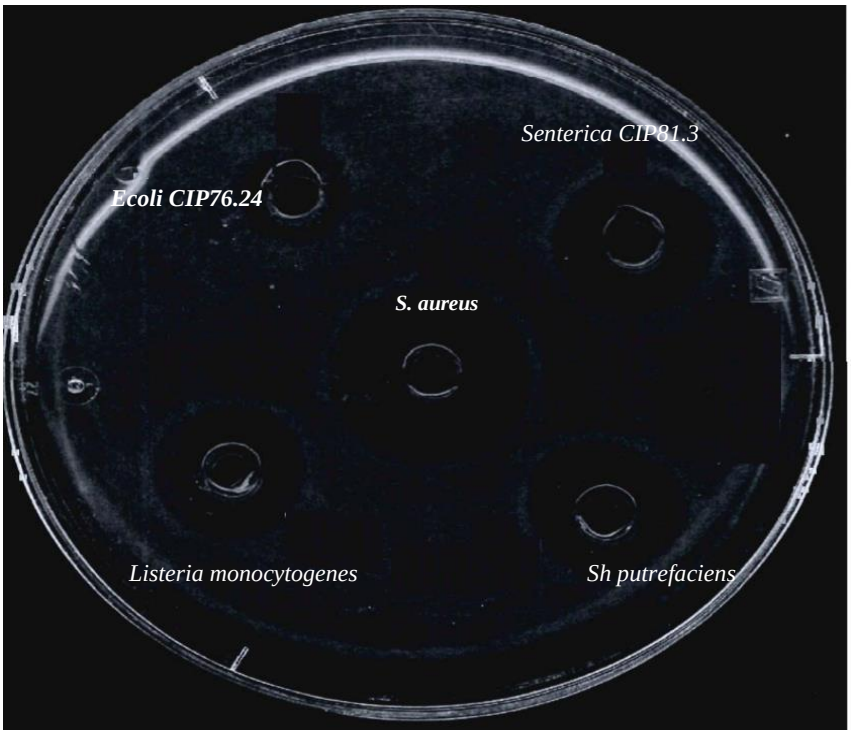


Figure 30: Pouvoir antibactérien du chitosane et son spectre d'action par la méthode de diffusion en puits contre *Escherichia coli* CIP76.24, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Listeria monocytogenes* EU2160 et *St aureus* STRM.

Le chitosane agit sur les bactéries à Gram positif et sur les bactéries à Gram négatif, cependant, son action sur ces derniers est moins important que celle qui est sur les bactéries à Gram positif (No et al., 2002 et Coma et al., 2003).

Le mécanisme d'action du chitosane contre les bactéries et les souches fongiques est jusqu'à aujourd'hui mal connu. Cependant, il existe plusieurs éléments qui peuvent expliquer cette action:

- La formation de liaisons électrostatiques entre les charges positives du chitosane (transformation des motifs NH2 du chitosane en motifs +NH3 en milieu acide) et les phospholipides de la membrane cellulaire qui ont une charge négative, perturbant ainsi les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur (Bégin et Calsteren, 1999 ; Liu et al., 2001 ; Devlieghere et al., 2004 ; Caiqun Qin et al., 2005 ; Peng et al., 2005 ; Yang et al., 2005).

- La présence du chitosane peut aussi entraîner des déformations morphologiques au niveau de la membrane cellulaire (Laflamme et al., 1999 ; 93Roller et Covill, 1999 ; Helander et al., 2001 ; Choi et al., 2001).

- L'inhibition peut aussi être due à l'enrobage des cellules microbiennes par le chitosane, éliminant ainsi tout échange avec le milieu extérieur (Muzzarelli et al., 2001).

- L'action du chitosane peut aussi se faire par formation de liaison avec les protéines et les électrolytes présents dans le cytoplasme (Laflamme et al., 1999 ; Bong kiu choi et al., 2001).

- Formation des liaisons entre le chitosane et l'ADN des bactéries et l'inhibition de la synthèse du mRNA (Devlieghere et al., 2004 ; Liu et al., 2001).

- Le chitosane peut aussi agir de façon indirecte sur les bactéries et les moisissures, et cela par complexation des métaux nécessaires pour leur croissance (Roller et Covill, 1999).

IV.2.7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) du chitosane

La CMI est la plus faible concentration d'extrait inhibant toute croissance visible après un temps d'incubation de vingt quatre heures (24h). La CMI permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes au chitosane (Kaplan, 1998). D'après les résultats obtenus pour la technique de INT, nous nous sommes intéressés à déterminer la concentration minimale inhibitrice du chitosane sur la souche pathogène *Staphylococcus aureus résistante à la* methicilline et *Escherichia coli CIP76.24.* Les CMI obtenus sont de l'ordre de 800 et 1000 ppm /ml respectivement, la concentration minimale bactéricide (CMB) pour les deux souches pathogènes sont de l'ordre de 1000 et 1200 ppm /ml respectivement.

Tableau 15 : valeurs de CMI et de CMB (ppm/mL) du chitosane à différentes concentration testés contre les souches bactériennes testées *Staphylococcus aureus résistante à la* methicilline et *Escherichia coli CIP76.24.*

	Concentration (ppm) du chitosane								
	1200	1000	800	600	400	200	100	MIC (ppm)	MCB(ppm)
Staphylococcus aureus résistante à la methicilline	-	-	+	+	+	+	+	800	1000
Escherichia coli CIP76.24	-	+	+	+	+	+	+	1000	1200

Comme le montre le tableau 15 qui présente l'inhibition de la croissance des souches bactériennes testées par le chitosane étudié à des concentrations finales allant de 100 à 1200 ppm/mL, les bactéries à Gram-négatif semblent plus résistantes que les bactéries à Gram-positif. Cette différence de sensibilité est probablement due à des différences dans la structure de l'enveloppe cellulaire entre les bactéries à Gram-négatif et celles à Gram-positif.

En effet, les bactéries à Gram-négatif sont caractérisées par une couche mince de peptidoglycane et une membrane externe composée de lipopolysaccharide (LPS) qui n'est pas présente chez les bactéries à Gram-positif typique. La couche (LPS) agit comme une barrière contre la pénétration des molécules hydrophobes (Perry et al., 2009). Dans des travaux précédents, il a été constaté que les bactéries à Gram-positif tel que *S. aureus* sont

apparues plus sensibles à l'action du chitosane par rapport à des bactéries à Gram-négatif tel que *E. coli* (Cueva et al., 2010).

No et al. (2002) a démontré l'effet du chitosane ainsi que six de ses Oligomères (avec différents poids moléculaires) sur des bactéries Gram-négatives*(Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens, Salmonella typhimurium et Vibrioparahaemolyticus*) et des bactéries Gram positives (*Listeria monocytogenes, Bacillusmegaterium, B. cereus, Staphylococcus aureus, Lactobacillus plantarum, L. brevis et L.bulgaricus*).

IV.2.8. Pouvoir chélateur du chitosane

Les résultats de l'étude de l'adsorption des trois métaux, manganèse, nickel et zinc dans des solutions (mono-composé) sur le chitosane à différentes concentrations sont résumés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Effet d'adsorption du chitosane sur les métaux lourds Mn, Zn et Ni avec des concentrations initiales en ppm 3.6 et 9.

Concentrations Avant contact en ppm	Concentrations Après contact en ppm		
	Mn	Zn	Ni
3	2.4122	1.9871	1.5433
6	4. 9544	3.2232	3.2182
9	7.7667	4.6536	4.1231

Nous constatons que l'adsorption du Mn est la plus importante et est de 80.33 ; 82.5 et 86.22% pour les concentrations de 3,6 et 9 ppm respectivement. Les taux d'élimination du Ni sont de l'ordre de 51.44 ; 53.63 et 45.77% pour les concentrations de 3.6 et 9 ppm respectivement, le taux d'adsorption du Zn est proche de celui du Ni et est de l'ordre de 66, 53,66 et 51.7 % pour les mêmes concentrations de chitosane .cette chélation s'explique par :

Les particules de chitosane, sous forme de chaînes polymériques isolées ou d'amas de macromolécules, présentent des charges électriques partielles de surface. Celles-ci leur permettent d'entrer en interaction avec diverses espèces chimiques dissoutes ou particules

dispersées dans des milieux aqueux. Ainsi, les particules de chitosane peuvent attirer des ions, des molécules et des particules de natures diverses, et bien-sûr d'autres particules de chitosane (Koide SS, 1998).

Ces interactions, dont la nature varie selon une série de variables, confèrent au chitosane une de ses plus remarquables propriétés, c'est-à-dire celle de pouvoir coaguler au contact de particules ou ions pouvant réduire sa charge de surface. Cette propriété, ajoutée à sa biodégradabilité et sa régénération, fait du chitosane le meilleur substitut aux coagulants conventionnels dérivés de l'aluminium, assez coûteux (Hernández et al., 2008), dans le traitement des eaux ou dans la récupération de matières dispersées en milieux aqueux. La plupart des particules solides en suspension dans l'eau, quelle que soit leur nature, peuvent être entraînées par décantation si le chitosane arrive à s'y adsorber ou inversement si cette adsorption conduit à réduire l'affinité de la particule pour l'eau peut constituer une solution séduisante de traitement de la turbidité et (Crini et Badot, 2008).

IV.3. Conclusion

La chitine est une fibre naturelle qui se retrouve en grande quantité dans les déchets de biomasse marine tels les carapaces de crustacés. Toutefois, après transformation, elle trouve des applications intéressantes dans divers domaines tels la pharmacologie et l'environnement.

Pour y parvenir, les déchets de carapaces sont nettoyés, séchés et broyés. La poudre obtenue est alors déminéralisée par de l'acide chlorhydrique, déprotéinisée par de l'hydroxyde de sodium. Le produit issu de ces réactions contient essentiellement de la chitine. Afin de faciliter les réactions subséquentes, cette dernière est déacétylée par de l'hydroxyde de sodium, ce qui permet d'obtenir le chitosane.

Le chitosane produit est caractérisé, plusieurs méthodes d'analyses sont nécessaires. La spectroscopie infrarouge calculer le degré de déacétylation du chitosane qui représente le pourcentage de molécules qui ont perdu leur groupement acétyle. La détermination de la masse moléculaire des produits se fait quant à elle par viscosimétrie.

Les résultats révèlent une valeur élevée du degré de déacétylation(DD) de 75% ce qui permet de procurer au chitosane une capacité de floculation et de fixation des cations métalliques très élevée.

La viscosité et le poids moléculaire du chitosane extrait sont respectivement 119.7±0.04 mPa.s et 1414.33±16.99 kDa. La valeur du poids moléculaire (PM) d'un chitosane dépend intimement du procédé de préparation, car celui-ci peut induire une dépolymérisation des chaines macromoléculaires et/ou une dégradation lors de sa production.

Le chitosane extrait, présente une teneur en matière sèche de l'ordre de 0.74±0.02g/g de chitosane. Son contenu en cendres est de 0.34g/g de chitosane et enfin le taux de protéines est de 0.37g/g de chitosane

Réduction du DPPH proportionnelle aux concentrations du chitosane en effet l'inhibition de ce radical atteint la valeur maximale de 62.6% avec une concentration de 2% de chitosane.

Le chitosane présente un effet inhibiteur prononcé contre *Staphylococcus aureus* STRM, le diamètre d'inhibition est de l'ordre de 28±1mm, pour *Escherichia coli* CIP76.24 le diamètre d'inhibition est de 14±2mm. *Bacillus subtilis* DSMZ10, *Salmonella enterica* CIP81.3, *Shewanella putrefaciens* EU2187, *Listeria monocytogenes* EU2160 marquent des diamètres d'inhibition de 15.83±1.04 ; 18.66±1.52 ; 25.66±3.05 ; 21.66±2.08 respectivement.

Les CMI obtenus sont de l'ordre de 800 et 1000 ppm /ml respectivement, la concentration minimale bactéricide (CMB) pour les deux souches pathogènes sont de l'ordre de 1000 et 1200 ppm /ml respectivement

Le chitosane présente un effet d'adsorption sur le Mn important de 80.33 ; 82.5 et 86.22% pour les concentrations de 3.6 et 9 ppm respectivement. L'élimination du Ni se fait à des taux de l'ordre de 51.44 ; 53.63 et 45.77% pour les concentrations de 3,6 et 9 ppm respectivement, pour le Zn les taux d'adsorption sont de l'ordre de 66, 53,66 et 51.7 % pour les mêmes concentrations de chitosane

CHAPITRE V :

Effet combiné du chitosane associé au facteur protéique produit par *Lactobacillus plantarum* Lbr1 sur la biopréservation de la qualité microbiologique et organoleptique de la crevette *Penaeus brasiliensis*.

CHAPITRE V : Effet combiné du chitosane associé au facteur protéique produit par *Lactobacillus plantarum* Lbr1 sur la biopréservation de la qualité microbiologique et organoleptique de la crevette *Penaeus brasiliensis.*

Introduction

Les produits de mer produits sont connus pour leur grande susceptibilité à la dégradation. Ils posent des problèmes tant hygiéniques que toxicologiques et économiques.

Différentes technologies basées sur le froid, la chaleur ou utilisant des agents chimiques de conservation ont été développées afin d'étendre la durée de conservation des produits de la pêche. De nouvelles stratégies de biopréservation utilisent les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques, particulièrement celles productrices de bactériocines (Gelman et al., 2001 ; O'Sullivan et al., 2002 ; Dortu Thonart, 2009). Cette technologie permet d'obtenir des produits de bonne qualité microbiologique, contenant moins de conservateurs chimiques.

Certaines bactériocines de bactéries lactiques ont un spectre d'inhibition assez large incluant des bactéries pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp.) d'origine alimentaire. Le chapitre I c'est intéressée de très prés l'étude de ce type d'interaction : la production de la substance antimicrobienne non acide SANA1 dotée d'un pouvoir antimicrobien fort intéressant. La conjugaison des effet antimicrobiens du chitosane et des biomolécules peuvent présenter un nouveau défit dans le domaine de la biopréservation des produits de mer.

Dans le cadre de cette thèse nous proposons d'exploiter simultanément les propriétés du chitosane extrait en tant que polymère doté de propriétés intrinsèques (Begin et Van Calsteren., 1999; Srinivasa et al., 2004) et de la substance antimicrobienne non acide (SANA1) produite par *Lactobacillus* Plantarum bactérie lactique isolée de la crevette sous forme d'un film d'enrobage bioactif pour la biopréservation de la crevette à froid.

V.1. Matériels et Méthodes

V.1.1. Matériels biologique

V.1.1.1. Le chitosane

Le présent travail, consiste à étudier nous avons étudié le pouvoir antibactérien du chitosane extrait (fig. 31) vis-à-vis des bactéries d'altération *Staphylococcus aureus* STRM.

Figure 31 : Le chitosane extrait des carapaces de crevettes.

Chitosane extrait et utilisé présente les caractérisques suivantes : Un degré désacétylation de 75% et un poids moléculaire moyen, de 1414.33±16.99 KDa. Les caractéristiques physicochimiques du chitosane extrait sont résumées dans le tableau 17.

Tableau 17 : caractérisques du chitosane extrait.

Paramètres	Valeurs
Cendre	0.34±0.002g/g
Matiere sèche	0.74g/g
Protéine	0.37±0.12g/g
Viscosité	119.7±0.04 mPa.s
P.M	1414.33±16.99 kDa

V.1.1.2. Les crevettes utilisées dans ce travail

Les crevettes sur les quelles porte la présente étude appartiennent à une seule espèce *Penaeus brasiliensis* crevette royale rose de la famille des *Penaeidae* figure 32**.**

Figure 32 : Crevette *Penaeus brasiliensis* utilisée.

Celles-ci ont été prélevées du port de pèche de Beni Saf wilaya de Tlemcen durant le mois d'avril les prélèvements étaient effectués dans des conditions maitrisées : prélèvements dans des sacs Stomacher pour limiter les risques de contamination exogène, 4°C est la température de transport des crevettes dans des boites isothermes.

V.1.1.3. La Souche pathogène

Il s'agit de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (STRM) provenant du laboratoire INMV (Institut de la Medecine Véterinaire).

Le germe pathogène *Staphylococcus aureus* (STRM) a été réactivé et cultivé sur bouillon cœur cervelle ou BHI (Brain-Heart-Infusion : réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France) et incubé en aérobiose à 37°C pendant 24 heures au moins trois fois avant l'expérience.

V.1.1.4. Milieux de culture

Tous les milieux de culture préparés sont autoclaves à 121°C pendant 15 min. Le bouillon cœur cervelle ou BHI à pH 7.4 (Brain-Heart-Infusion : réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France) est utilisé pour la revification *Staphylococcus aureus* (STRM).

Le MH à pH 7.5 (Mueller-Hinton : réf. CM0337 Oxoid, Biomérieux, France) est utilisé pour la conservation de *Staphylococcus aureus* (STRM) après revification

Le milieu Ringer "CALGON" Réf : BR0049 Oxoid, Biomérieux, France a été aussi utilisé comme diluant pour l'homogénéisation des échantillons crevettes.

Le BP (Baird Parker : réf. CM0275 Oxoid, Biomérieux, France) milieu sélectif utilisé pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus* (STRM) à 37°C pendant 24h en aérobiose.

V.1.2. Méthodes

Toutes les manipulations ont été effectué dans des conditions d'asepsie (zone et matériel stérilisé, paillasse désinfectée).

V.1.2.1. Préparation de membranes de chitosane

L'élaboration de matériaux à base de chitosane sous forme de membranes s'effectue par plusieurs méthodes, presque identiques, proposées par plusieurs chercheurs Muzarelli (1977), mais la plus employée est celle présentée par Khan et al. (2000). Nous l'avons appliquée dans notre travail en faisant évaporer une solution de chitosane et d'acide acétique étalée sur des boites de pétri.

V.1.2.2. Préparation de membranes de chitosane pur

Les membranes de chitosane pur sont fabriquées selon la procédure suivante: une solution de chitosane 1%(w/v) est préparée en solubilisant 1 g de chitosane en poudre dans 100 ml d'acide acétique 0.17 M sous agitation magnétique. La solution obtenue est coulée dans des boîtes de Pétri et séchée à la température ambiante pendant 72 heures. Les membranes formées sont démoulées.

Les membranes du chitosane pur obtenues ont une belle apparence, lisses, flexibles, durables et transparentes avec une couleur légèrement jaunâtre.

Préparation de membranes de chitosane/SANA1, une solution de chitosane 1% (w/v) est préparée à laquelle on rajoute une solution de la substance antimicrobienne non

acide SANA1 et diluée au ¼ pour obtenir une concentration d'inhibition adéquate équivalente à 1785.71 U.A/ml (CMI de SANA1 déjà étudiée), le mélange ainsi obtenue est vigoureusement agité, la solution obtenue est coulée dans des boîtes de Pétri puis séchée à la température ambiante. Les membranes formées sont démoulées et serviront à l'emballage des crevettes durant la période de conservation.

V.1.2.3. préparation des échantillons de crevettes

Une fois les crevettes réceptionnées au laboratoire elles sont lavées à l'eau distillée puis décortiquées, le céphalothorax contenant la partie la plus chargée en microorganismes est écarté de cette étude afin de maitriser les risques de contamination. Les crevettes sont ensuite pasteurisées à 72°C pendant 5min cette étape a pour but l'élimination total des contaminants exogènes. Dans des conditions d'asepsie, chaque lot contenant 200g de crevette est mis dans des boites de pétri et entreposé pendant 21 jours à 4ºC la répartition des différents lots expérimentaux est reprise dans le tableau 18 ci dessous.

V.1.2.4. Suivi de l'évolution de la charge microbienne

Le suivit de l'évolution de la charge microbienne se fait chaque semaine par le dénombrement sur milieu sélectif Parker

- Préparation de la suspension mère : 25 g de chaque échantillon ont été prélevés et broyés de manière aseptique. 225 ml d'eau peptonnée tamponnée ont été ajoutées au broyat et le mélange est homogénéisé au stomacher. A partir de cette suspension-mère des dilutions décimales ont été effectuées.
- Recherche des Staphylocoques par la technique des spots 10µl d'inoculum (échantillon et dilutions décimales) sont déposés en spot sur le milieu Baird Parker complet (réalisée en duplicata). L'incubation des milieux ensemencés a été faite à 37 °C/48H. Les colonies caractéristiques noires brillantes entourées d'halo clair ont été dénombrées. (Tous les dénombrements sont répétés 3 fois).

Tableau 18: récapitulatif des essais effectués au laboratoire.

N° de lot	Lots
CR 1	Les Crevettes sont aspergées de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* STRM.
CR 2	Les Crevettes contaminées de de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* STRM puis sont enrobées d'un biofilm Chitosane /SANA1.
CR 3	Les Crevettes sont contaminées de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* STRM puis sont aspergées 100µl de la SANA1
CR4	Les Crevettes sont aspergées de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* STRM puis sont enrobées d'un biofilm Chitosane seul

V.1.2.5. Evaluation organoleptique au cours du stockage

L'évaluation sensorielle des crevettes, effectuée sur un lot, est basée sur l'observation d'un certain nombre de caractères organoleptiques relatifs à la couleur, à l'aspect (du céphalothorax, de la carapace et de la chair), à l'étendue du noircissement et à l'odeur. Cette appréciation permet de définir le temps de rejet organoleptique qui correspond au moment où les crevettes sont jugées impropres à la consommation. En s'inspirant de la méthode décrite par Nielsen et Richelieu (1999), nous avons pu développer une échelle variante allant de 0 à 4 (0 : putréfaction avancée ; 4 : absence d'altération) pour y représenter dans un ordre décroissant d'intensité la description des divers états d'altération de chacun de ces paramètres. Aussi, nous avons attribué une note subséquente à chaque description. L'ensemble des descriptions et les notes subséquentes sont représentées dans le tableau 19.

Tableau 19 : Barème de cotation des caractéristiques organoleptiques de la crevette rose *Penaeus brasiliensis* (Nielsen et Richelieu, 1999).

Paramètres	Localisation	Description	Echelle
Couleur		Rose orange	**2**
		Légèrement rose Décoloration	**1**
		modérée	**0**
Aspect	Carapace	Résistant	**3**
		Molle	**2**
		Molle et souvent	**1**
		écrasée	**0**
	Chair	Translucide	**2**
		Légèrement opaque	**1**
		opaque	**0**
Noircissement	Carapace	Présence	**1**
		absence	**0**
	Chair	Présence	**1**
		absence	**0**
	Appendices	Présence	**1**
		absence	**0**
Odeurs		Typique de l'espèce	**4**
		Neutre	**3**
		Légère odeur de rance	2
		odeur de rance	1
		odeur de rance très prononcées associée à la putréfaction	**0**

V.2. Résultats et discussions

V.2.1. Aspect des biofilms

Les membranes du chitosane pur obtenues ont une belle apparence, lisses, flexibles, durables et transparentes avec une couleur légèrement jaunâtre (fig. 33).

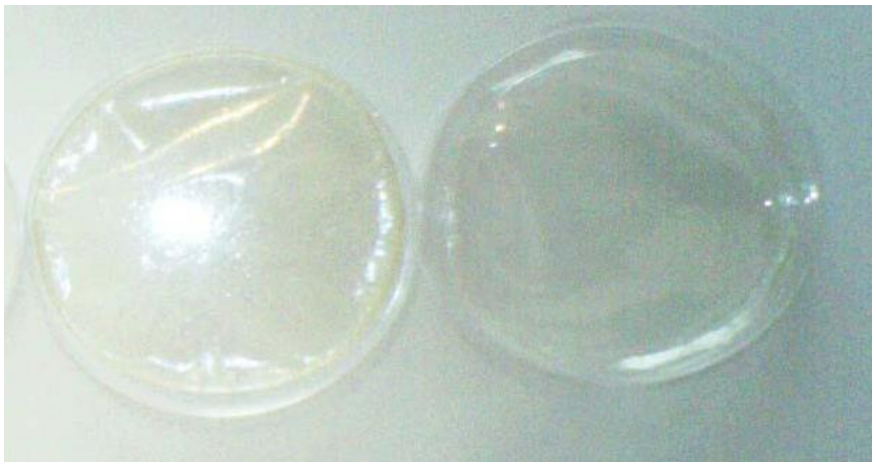


Figure 33: biofilm de chitosane à gauche et chitosane biomolécule Lbr1 à droite.

V.2.2. Suivi de l'évolution de la charge de la crevette en Staphylococcus aureus au cours du stockage à 4°C

Les résultats illustrés dans la figure 34 montrent une évolution de la charge microbienne de *Staphylococcus aureus* STRM dans le lot témoin CR1 qui passe de 10^5 à de 235 10^8 UFC/ml au 3ème. Cette évolution s'explique par le pouvoir protéolytique du germe pathogène les protéines de la crevette représentent un bon support pour sa croissance et le développement de la souche bactérienne.

Nous remarquons que l'activité antimicrobienne de *Staphylococcus aureus* STRM pour les lots de crevettes traités au chitosane CR4 diminue considérablement la charge microbienne passe de 10^5 à de 68 UFC/ml au 3ème jour et fini à 24 UFC/ml au bout du 21ème , une diminution de 99% cette observation de la charge microbienne s'applique au lot CR2 traité par le biofilm Chitosane /SANA1 la charge microbienne passe de 10^5 à j0 à 19.33 UFC/ml à j21 ; nous pensons que le chitosane agit comme agent chélateur d'anions pouvant éliminer de l'environnement bactérien certains métaux à l'état de traces indispensables à la croissance et/ou à la production de toxines (Shahidi et al., 1999). L'action antimicrobienne apparaît comme fortement dépendante des caractéristiques du chitosane utilisé (origine, degré de polymérisation, pourcentage de résidus N acétylés) et des facteurs environnementaux tels que la teneur en eau de la matrice alimentaire et surtout son pH. Dans ce contexte, l'Unité Mixte Technologique (UMT) « Génie alimentaire et

biochimique des produits carnés » associant l'Adiv, le Laboratoire de Génie chimique et biochimique (LGCB) de l'Université Blaise Pascal et l'Unité Qualité des produits animaux (QuaPA) de l'Inra, a entamé une étude de faisabilité visant à valider le potentiel du chitosane comme agent antimicrobien et antioxydant dans les viandes marinées. Dans un premier temps, des tests réalisés in vitro sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp* (Gram-), et *Listeria innocua* et *Brochothrix thermosphacta* (Gram+) ont montré qu'à partir de concentration de chitosane de l'ordre de 0.2 % on assiste à une inactivation totale ou partielle (entre 1 et 3 log CFU/mL) des souches testées (Rao et al., 2008).

Aussi la combinaison biofilm et SANA1 offre une bonne option pour la biopréservation des produits marins puisque la charge microbienne est inhibée à plus de 99% durant le stockage, cette inhibition dépend de la concentration de l'agent antimicrobien utilisé , ainsi Ye et al. (2008) obtienne une activité anti *listeria* pour la conservation du sommons par l'application d'un biofilm à base de chitosane /nisine ou chitosane /lactate de sodium.

Le lot CR3 traité par SANA1 montre des résultats très intéressants, la souche *Staphylococcus aureus* STRM est totalement inhibée au bout 14eme jour la charge microbienne passe de 10^5 UFC à j 0 à 0UFC/ml à j 14, les biomolécules agissent sur des pathogènes alimentaires tels que *Listeria monocytogenes, Bacillus sp, Micrococcus sp,* des espèces hautement pathogènes telles que *Staphylococcus aureus, Clostridium sp,* (Dortu et Tonart, 2009). Les biomolécules des bactéries lactiques exercent leur activité létale uniquement sur les bactéries à Gram positif en provoquant la lyse cellulaire.

D'après (Stiles, 1996) l'ajout de bactériocine purifiée directement sur un produit alimentaire, parfois considérée comme une forme de biopréservation et se rapproche d'avantage de l'ajout d'additifs conservateurs. A l'heure actuelle, seule la nisine est autorisée pour ce genre de traitement.

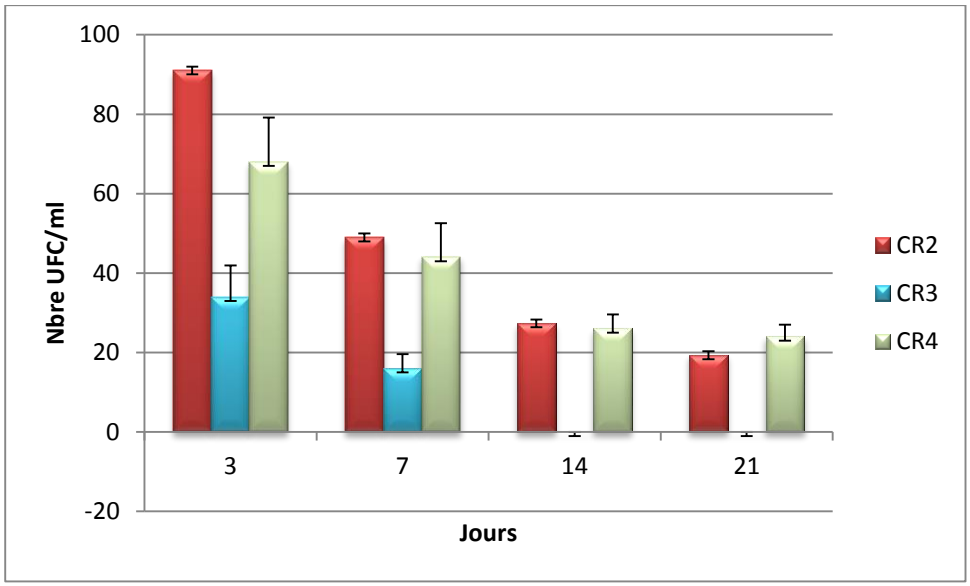


Figure 34 : Evolution de la charge microbienne de *Staphylococcus aureus* STRM au cours du stockage à 4°C CR2 : Crevettes contaminées de de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* puis sont enrobées d'un biofilm Chitosane /SANA1. CR3 : Crevettes sont contaminées de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* STRM puis sont aspergées 100µl de la SANA1. CR4 : Crevettes sont aspergées de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* STRM puis sont enrobées d'un biofilm Chitosane seul. . Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SD (n=3).

V.2.3. Évaluation organoleptique de la crevette au cours du stockage à 4ºC

L'évaluation organoleptique de la crevette au cours du stockage à 4ºC pour les différents lots se résume dans les tableaux ci après.

L'évaluation sensorielle des lots de crevettes effectuée, est basée sur l'observation d'un certain nombre de caractères organoleptiques relatifs à la couleur, à l'aspect (de la carapace et de la chair), à l'étendue du noircissement et à l'odeur. Cette appréciation permet de définir le temps de rejet organoleptique qui correspond au moment où les crevettes sont jugées impropres à la consommation.

En s'inspirant de la méthode décrite par Nielsen (1993), nous avons attribué une note subséquente à chaque description. L'ensemble des descriptions et les notes subséquentes sont représentées dans les tableaux ci dessous.

Nous remarquons que le lot CR1 contaminé par staphylocoque présente des altérations avancées dés le 3eme jour comme l'indique le tableau ci-dessous, la crevette devient impropre à la consommation.

Tableau 20 : Evaluation organoleptique du lot CR 1 : Crevettes aspergées de 100µ 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* STRM.

Paramètres	Localisation	Description	jours	Echelle
Couleur		Décoloration modérée	0-3	2
Aspect	Carapace	écrasée	0-3	0
	Chair	opaque	0-3	0
Noircissement	Carapace	Présence	0-3	0
	Chair	Présence		
	Appendices	Présence		
Odeur		odeur de rance très prononcées associée à la putréfaction	0-3	0

Les staphylocoques sont dotés d'un grand pouvoir protéolytique et possèdent une activité décarboxylase susceptible de produire des amines biogènes dans un aliment où les conditions physico-chimiques sont favorables. Les amines biogènes sont fréquemment retrouvées dans les produits alimentaires fermentés ainsi que dans les produits alimentaires non fermentés tels que les produits de la mer, Les staphylocoques peuvent posséder des activités tyrosine et histidine décarboxylase reconnues comme étant impliquées dans la production d'histamine dans les poissons (Lopez-Sabater et al., 1994 ; Gingerich et al., 1999).

L'activité inhibitrice du biofilm Chitosane /SANA1 (Tableau 21) contre *Staphylococcus aureus* STRM a été maintenue durant les 21 jours d'entreposage, les caractéristiques organoleptiques non pas subi de changement. De plus, l'utilisation du biofilm a permis une meilleure préservation de la couleur des crevettes le muscle était resté ferme nous n'avons noté aucun noircissement et donc l'activité enzymatique de la souche bactérienne était totalement inhibée. L'application du biofilm Chitosane /SANA1 n'a pas eu d'impact majeur sur les caractéristiques de la crevette. L'incorporation de la biomolécule dans une matrice de polymère pour former des films antimicrobiens qui peuvent être appliqués sur la surface de l'aliment, permettrait une libération progressive de la bactériocine à travers le film vers la surface de l'aliment et d'exploiter l'effet combiné des bactériocines et de certains polymères présentant une activité antimicrobienne naturelle.

Tableau 21 : Evaluation organoleptique du .lot CR2 : Crevettes contaminées de de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* STRM puis sont enrobées d'un biofilm Chitosane /SANA1.

Paramètres	Localisation	Description	Echelle
Couleur		**Rose orange**	**2**
Aspect	**Carapace**	**Résistant**	**3**
	Chair	**Translucide**	**2**
Noircissement	**Carapace**	**absence**	**0**
	Chair	**absence**	**0**
	Appendices	**absence**	**0**
Odeurs		**Typique de l'espèce**	4

L'approche de traitement avec la SANA1 est très prometteuse, les caractéristiques organoleptiques du produit sont préservés (Tableau 22) cette approche déjà utilisée par de nombreux auteurs et qui consiste en l'ajout de la bactériocine purifiée. L'ajout direct de bactériocines purifiées ou partiellement purifiées a donné des résultats très satisfaisants dans plusieurs types de matrices alimentaires. Parmi les bactériocines utilisées, la nisine et la pédiocine sont les deux bactériocines qui ont suscité le plus d'intérêt dans le secteur bioalimentaire.

Ces deux bactériocines agissent à de faibles concentrations sur des bactéries pathogènes ou d'altération (De Vuyst et Vandamme, 1994). Néanmoins, la nisine reste la seule bactériocine des bactéries lactiques acceptée comme agent bio-conservateur dans certaines applications alimentaires (Meghrous et al., 1997; Ross et al., 2002). Elle est utilisée comme agent de conservation dans plus de 50 pays au niveau de différents produits alimentaires (Daoudi et al., 2001).

L'ajout de la nisine dans l'emballage du saumon fumé à froid stocké à 5°C n'a pas permis l'inactivation de *L. monocytogenes* (Nilsson et al., 1997). Dans les travaux antérieurs de (Tahiri et al., 2008), l'efficacité des deux premières stratégies d'utilisation de la divergicine M35 (culture productrice, divergicine M35 pure ou sous forme de bio-ingrédient issu du surnageant de culture concentré du milieu à base d'hépatopancréas de crabe) ont été comparées sur du saumon fumé à froid entreposé pendant 21 jours à 4°C.

Un effet supérieur a été obtenu contre *L. monocytogenes* lorsque C. *divergens* M35 est ajoutée directement sur les filets de saumon comparativement à l'ajout de la divergicine pure ou sous forme de bio-ingrédient.

Tableau 22 : Evaluation organoleptique du lot CR 3 Crevettes sont contaminées de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* STRM puis sont aspergées 100µl de la SANA1.

Paramètres	Localisation	Description	Echelle
Couleur		**Rose orange**	**2**
Aspect	**Carapace**	**Résistant**	**3**
	Chair	**Translucide**	**2**
Noircissement	**Carapace**	**absence**	**0**
	Chair	**absence**	**0**
	Appendices	**absence**	**0**
Odeurs		**Typique de l'espèce**	4

L'utilisation du biofilm chitosane pour la biopréservation de la crevette est fort intéressant (Tableau 23) de part ses propriétés alimentaires biodégradables, bioactifs et comestibles est actuellement source d'innovation pour augmenter la qualité des produits frais, surgelés et transformés. Ces films permettent également de contrôler les variations physiologiques, morphologiques et physico-chimiques intervenant sur les produits alimentaires. Du fait de leurs propriétés filmogènes exceptionnelles, la chitine et le chitosane ont été utilisés avec succès comme emballage alimentaire.

Les matériaux d'emballage antimicrobiens entrent en contact avec la surface des aliments principalement dans le cas où les agents antimicrobiens sont non-volatiles. Ainsi, ils peuvent se répandre sur la surface du produit et diffuser si nécessaire. Selon Glatman et al. (2000), l'avantage des agents antimicrobiens non volatils est qu'ils peuvent être libérés à la surface de la matrice alimentaire sans que le polymère ne soit directement en contact avec le produit.

Tableau 23 : Evaluation organoleptique du .lot CR4 : Crevettes sont aspergées de 100µl à 10^5UFC/ml de *Staphylococcus aureus* STRM puis sont enrobées d'un biofilm Chitosane seul.

Paramètres	Localisation	Description	Echelle
Couleur		**Rose orange**	**2**
Aspect	**Carapace**	**Résistant**	**3**
	Chair	**Translucide**	**2**
Noircissement	**Carapace**	**absence**	**0**
	Chair	**absence**	**0**
	Appendices	**absence**	**0**
Odeurs		**Typique de l'espèce**	4

V.3. Conclusion

La biopréservation ou bioprotection est une méthode de conservation des aliments faisant appel à des micro-organismes ou à des « composés naturels » par opposition à l'utilisation de conservateurs dits « chimiques » classiquement utilisés dans les industries agroalimentaires. Comme toute autre méthode de conservation, les antimicrobiens d'origine naturelle doivent permettre de réduire/stopper la croissance de flores pathogènes ou d'altération sans pour autant compromettre les qualités organoleptiques et nutritionnelles du produit tout au long de sa durée de vie.

L'emploi d'antimicrobiens d'origine naturelle offre donc une piste intéressante pour la filière viande et poissons en vue de maîtriser davantage l'écosystème de ces produits. Par ailleurs, le caractère biosourcé de ces composés qui répond à une attente en pleine croissance de la part des consommateurs les promet à un bel avenir.

De plus, les tendances actuelles du marché forcent les producteurs à réduire substantiellement le recours à des barrières microbiologiques classiques telles le salage et les additifs chimiques en raison de leur impact négatif sur la santé du consommateur.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie de la thèse a permis d'appuyer l'hypothèse de recherche émise concernant l'exploitation simultanée des propriétés antimicrobiennes de la chitosane.

Des biomolécules produites par les bactéries lactiques et du chitosane tout en utilisant les propriétés filmogènes de ce dernier pour le développement d'un film biologiquement actif ayant un fort potentiel d'utilisation pour le contrôle de la microflore pathogène et d'altération de la crevette et par conséquent d'assurer une conservation à plus long terme du produit.

Nous avons démontré que le chitosane, la substance antimicrobienne SANA1 seules et combinés avaient une bonne activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* STRM les caractéristiques organoleptiques de la crevette n'étaient pas affectées.

Conclusion

Conclusion et perspectives

Notre étude a portée sur l'isolement, l'identification génétique des bactéries lactiques mésophiles et psychrotrophes à partir de la crevette. Les résultats de ce screening ont révélé la présence d'une souche lactique psychrotrophe pouvant se développer à 8°C. L'analyse moléculaire a mis en évidence une biodiversité des espèces lactiques isolées dont les 9 souches retenues appartiendraient aux espèces : *Lb. plantarum, Lb. Brevis, Enterococcus faecalis, Pediococcus pentosaceus, Leuconostoc et Weissella paramesenteroïdes.*

Certaines de ces souches manifestent une activité antagoniste remarquable. La souche psychrotrophe *Lb. Plantarum* Lbr1 présente une activité inhibitrice plus ou moins prononcée, sur toutes les bactéries pathogènes testées avec des diamètres des zones d'inhibition de 15.70 à 23.83 mm. La plus forte inhibition (23.83 mm de diamètre) exercée par cette souche a été celle observée contre *Listeria monocytogenes* EU2160.

Lactobacillus plantarum Lbr1 produit de l'acide lactique (18 g/L/24h) et un SANA1 relativement thermorésistant (100°C pendant 20 min).Par ailleurs, la neutralisation de l'acidité du surnageant (SANA1) de culture de cette souche suivie de l'utilisation de ce dernier dans l'inhibition de bactéries indicatrices comme *Listeria ivanovii* EU2162 a montré que le SANA1 responsable de cet effet inhibiteur était insensible à la catalase ; mais, en revanche, très sensible aux enzymes protéolytiques comme la trypsine, la pronase E et la proteinase K qui lui font totalement perdre son activité biologique. Ceci est un argument supplémentaire en faveur de la nature protéique de ce facteur. Selon le principe des dilutions critiques, la valeur de la CMI de ce SANA1 produit par la souche *Lactobacillus plantarum* Lbr1 serait de 1785,71 U.A/ mL (unité arbitraire /ml).

La deuxième partie de cette thèse a été consacrée à l'extraction d'un biopolymère, le chitosane, à partir de carapace de crevettes, à sa caractérisation physico-chimique par diverses méthodes d'analyses comme la spectroscopie infrarouge (pour le calcul de son degré de déacétylation), la viscosimétrie (pour la détermination de sa masse moléculaire) et la détermination de la composition partielle (teneur en cendres, matière sèche, protéines). Le chitosane a, également, fait l'objet d'une évaluation de son pouvoir réducteur (antioxydant), chélateur (vis-à-vis du fer, nickel et zinc) et antibactérien (vis-à-vis de bactéries Gram – et Gram+).

Les résultats obtenus ont révélé que le chitosane est déacétylée à 75%, de viscosité égale à 119.7±0.04 mPa.s et un poids moléculaire de 1414.33±16.99 kDa. Les teneurs en cendres, matière sèche et protéines du chitosane sont, respectivement de l'ordre de 0.34, 0.74 et 0.37g /g de chitosane.

Concernant les propriétés biologiques du chitosane, nous avons constaté qu'à la concentration de 2% (P/V), son pouvoir réducteur atteignait 62.6% et qu'il était dose-dépendant. Ce biopolymère possède une activité inhibitrice importante (diamètre de la zone d'inhibition = 28 mm) sur la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la methicilline. D'autres souches pathogènes ont, également, été inhibées par le chitosane : *Escherichia coli* CIP76.24 (14 mm), *Bacillus subtilis* DSMZ10 (15.83 mm), *Salmonella enterica* CIP81.3 (18.66 mm), *Shewanella putrefaciens* EU2187 (25.66 mm) et *Listeria monocytogenes* EU2160 (21.66 mm).

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du chitosane vis-à-vis des deux souches pathogènes *Staphylococcus aureus* résistante à la methicilline et *Escherichia coli* CIP76.24 obtenues sont, respectivement, de l'ordre de 800, 1000, ppm /mL, respectivement ; alors que les concentrations minimales bactéricides (CMB) pour les deux souches pathogènes sont de l'ordre de 1000 et 1200 ppm /mL, respectivement.

L'étude de l'adsorption des trois cations métalliques (manganèse, nickel et zinc) sur le chitosane utilisé à différentes concentrations (3, 6 et 9 ppm) a montré l'efficacité de celui-ci à éliminer ces métaux lourds sans qu'il y ait une relation directe entre concentration en chitosane et force de chélation.

La finalité de ce travail de thèse est, bien entendu, représentée par les observations relatives à la biopréservation à 4°C pendant 3 semaines de la crevette royale rose contaminée par *Staphylococcus aureus* STRM et traitée soit, par le surnageant à acidité neutralisée de la culture *Lb plantarum* (SANA1), soit par le chitosane, soit encore par la combinaison des deux substances.

Les observations faites à l'issue de ces essais laissent apparaître le chitosane comme très efficace dans l'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* STRM car la charge en ce pathogène dans le lot de crevettes traitées diminue de 99%. Le même effet a été observé chez les lots de crevettes traitées par le biofilm chitosane-surnageant bactérien à acidité neutralisée.

L'ensemble de ces résultats démontrent l'intérêt que revêt la valorisation et l'exploitation de déchets générés par l'industrie de décorticage des crustacés (i.e. le chitosane), ainsi que l'importance des substances sécrétées par les microorganismes bénéfiques comme les bactéries lactiques (facteurs protéiques à action très spécifique, voire même les acides organiques) dans la biopréservation des denrées alimentaires en général et des produits marins en particulier.

En outre, le chitosane est un biopolymère à multi-usage étant donné ses propriétés physico-chimiques et biologiques (chélation des métaux lourds, production de biofilms en association avec des molécules plastifiantes et antibactériennes, applications dans la conception d'emballages pour l'industrie laitière, carnée et autre…).

En perspective, ce travail devrait être poursuivi sur le plan de la purification et de la caractérisation fine (composition, séquençage, poids moléculaire) du SANA1 synthétisé par la souche psychrotrophe, *Lactobacillus plantarum*, isolée de la crevette. Il s'agira également de s'assurer de son innocuité ou de son caractère « GRAS » quant à ses interactions avec la microflore digestive. Les applications offertes par le chitosane, de par ses propriétés physico-chimiques et biologiques, devraient faire l'objet de questionnements plus approfondis quant aux retombées de son utilisation dans le domaine agro-alimentaire, pharmaceutique et environnemental.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

-A-

A.O.A.C. (1980). Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemists. Washingtin: DC.

Abgrall, B. (1988). Poissons et autres produits de la mer. *In* Microbiologie alimentaire, aspects microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Vol 1, *Tec et Doc., Ed. Lavoisier, Pari,* Pp 251-264.

Abrams, D., Barbosa, J., Albano, H., Silva, J., Gibbs, P. A., Teixeira, P. (2011). Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* strain K34 isolated from "Alheira"., *Food Control* (22): 940-946.

Agullo, E., Rodriguez, M.S., Ramos, V., Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food., *Macromol. Biosci* (3) : 521-530.

Aimin, C., Chunlin, H., Juliang, B., Tinyin, Z., Zhichao, D. (1999). Antibiotic loaded chitosan bar: An in vitro, in vivo study of a possible treatment for osteomyelitis., *Clin Orthop* (366): 239–247.

Aktypis, A., Kalantzopoulos, G ., Huis IN'T Veld, J. H. J., Ten Brink, B. (1998). Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by Streptococcus thermophilus ACA-DC 0040., *Journal of Applied Microbiology* (84) : 568–576.

Akuzawa, R. et Fox, P.F. (1998). Purification and characterization of an acid phosphatase from cell membrane fraction of*Lactococcus lactis* ssp *lactis* 303., *Food Research International* (31): 157–165.

Al Sagheer, F.A., Al-Sughayer, M.A., Muslim, S., Elsabee, M.Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf., *Carbohydr Poly*, 77(2):410-419.

Albano, C., Girão, W., Campos, A. & Pinto, T. (2007). Aves costeiras d'Icapuí. Fortaleza., Editora Fundação Brasil Cidadão, pp 70.

Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M. A. & Sinigaglia, M. (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets., Journal of Applied Microbiology (99) **:** 1294-1302.

Ammor, M.S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1-Screening and characterization of the antibacterial compound., *Food Control* (17): 454-461.

Anas, K., Jayasree, P.R., Vijayakumar, T., Manish Kumar, P.R. (2008). In vitro antibacterial activity of Psidium guajava Linn. Leaf extract on clinical isolates of multidrug resistant Staphylococcus aureus., *Indian J. Exp. Biol* (46):41-46.

Asaad, E. (2006). Etude du processus de coagulation-floculation du système montmorillonite-chitosane dans l'élimination de métaux de transition. These de Maitrise, Université du Québec.

Aslam, S. & Qazi, J.I. (2010). Isolation of Acidophilic Lactic Acid Bacteria Antagonistic to Microbial Contaminants., *Pakistan J. Zool* 42(5): 567-573.

Atanassova, V., Meindl, A. & Ring, C. (2001). Prevalence of Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham--a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR., *International Journal of Food Microbiology* (68): 105– 113.

Ayer, B., Elvan, Y., Nesrin, H. (2000). Evaluation of chitosan as potential medical iron (III) ion adsorbent., *Turk J. Med. Sci* (30): 341-348.

-B-

Bai, R., Huang, M.Y. & Jiang, Y.Y. (1988). Selective perrneabilities of chitosane acetic acid complexe membrane and chitosan - polymer complexe membranes for oxygen and carbon dioxide., *Polymer Bulletin* (20) : 83-88.

Bajaj, M., Winter, J., Gallert, C. (2011): Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from Crangon crangon shrimp waste., *Biochem. Eng. J 56*(1-2):51-62.

Bakhrouf, A., Jeddi, M., Ben Ouada, H. (1992). Essai d'identification de deux vibrions isolés dans une zone de pisciculture., *Microb. Hyg. alim* (4) : 3-6.

Balcazar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Girones, O. & Muzquiz, J. L. (2007). Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids., *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* (30) : 111-118.

Balcazar, J.L., Luna-Rojas, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic Bacillus subtilis UTM 126 against Vibrio species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (Litopenaeus vannamei)., *Curr. Microbiol* (55): 409- 412.

Barry, A. (1976). The antimicrobial susceptibility test: Principales and pratices., *Lea and Febiger* 87(3) : 388–389.

Beal, C., Skokanova, J., Latrille, E., Martin, N., Corrieu, G. (1999). Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt., *Journal of Dairy Science* (82): 673-681.

Bégin, A., Van Calsteren, M.R (1999). Antimicrobial films produced from chitosan., *International Journal of Biological Macromolecules* (26) : 63-67.

Benjakul, S., Visessanguan, W., & Srivilai, C. (2001). Porcine plasma proteins as gel enhancer in bigeye snapper (Priacanthus tayenus) surimi., *Journal of Food Biochemistry* (25) : 285–305.

Benjakul, S., Visessanguan, W., Thongkaew, C. & Tanaka, M. (2003). Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage., *Food Res. Int* (36) :787–795.

Bensaha, S. (2010). La décontamination des eaux usees sur un support naturel. Laboratoire de Chimie Inorganique et Environnement. Universite Abou Bekr Belkaid – Tlemcen. Diplome De Magister.

Berthe, F.C.J., Pernas, M., Zerabib, M., Haffner, P., Thébault, A. and Figueras, A.J. (1998). Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of the life cycle., *Diseases of Aquatic Organisms (*34) : 135-144.

Bessadok, B., Trabelsi, S., Reijbi, O. & Sadok, S. (2014). Caractérisation biochimique de la chevrette Parapenaeus longirostris: Variation mensuelle. Laboratoire Biodiversité Marine et Biotechnologie, INSTM, La Goulette.

Beverlya, R.L., Janes, M.E., Prinyawlwatkula, W., No, H.K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes., Food Microbiol* (25) : 534-537.

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., Ray, B. (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacterio cin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. - *Appl., Environ. Microbiol*. 57(4) : 1265-1267.

Brashears, M.M., Gilliland, S.E. (1995). Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of L Benito Garzón, M., R. Sánchez de Dios, and H. Sainz Ollero. 2008. Eff ects of climate change on the distribution of Iberian tree species. Applied Vegetation Science 11: 169–78 actobacillus acidophilus cells as influenced by the growth phase., *J. Dairy Sci* (78) : 2326-2335.

Brashears, M.M., Galyean, M.L., Loneragan, G.H., Mann, J.E., Killinger-Mann, K. (2003). Prevalence of Escherichia coli O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fedmicrobials., *J Food Prot* (66)**:**748-754.

Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Bouttefroy, A. & Leroi, F. (2004). Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon., *Journal of Applied Microbiology* (97) : 1029-1037.

Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Cardinal, M. & Leroi, **F**. (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon., *Int. J. Food Microbiol* 104(3): 309-324.

Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Arg UY elles-Moral, W., Desbrières, J. & Rianudo, M, (2001). Aninfrared investigation in relation with chitih and chitosan characterization., *Polymeres* (42) : 3569-3580.

-C-

Caner, C., Cansiz, O. (2007). Effectiveness of chitosan-based coating in improving shelf-life of eggs., *J. Sci. Food Agric* (87): 227–232.

Cano, D. A., Hebrok, M. & Zenker, M. (2007). Pancreatic development and disease., Gastroenterology (132) : 745-762.

Cárdenas, G., Carbrera, G., Taboada, E. & Miranda, S.P. (2004). Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD and 13C cross polarization/mass angle spinning NMR., J. Appl. Polym. Sci (93): 1876-1885.

Caroline, C., Rachel, A. & Marguerite, R. (2006). Synthèse et étude d'hydrogels thermsensibles obtenus par modification chimique contrôlée du chitosane. L'actualité chimique N° 294.

Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A., Campos, C. A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compound and study of the factors affecting bacteriocin production., *Meat Science* (87)**:** 321-329.

Centeno, J., Menendez, S., Rodriguez-Otero, J. (1996). Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's milk cheese (Northwest Spain)., *Int.J.Food Microbiol* 33 (2-3) : 307-313.

Chammas, G.I., Saliba, R. & Béal, C. (2006). Characterization of the fermented milk ―Laban‖ with sensory analysis and instrumental measurements., *J. Food Sci.* (71): S156–S162.

Chang, K.L.B., Tsai, G., Lee, J., Fu, W.R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution., *Carbohydr Res* 303(3): 327-332.

Charlier, J., De Cat, A., Forbes, A., Vercruysse, J. (2009). Measurement of antibodies to gastrointestinal nematodes and liver fluke in meat juice of beef cattle and associations with carcass parameters., *Vet. Parasitol* (166) : 235-240.

Charoenvuttitham, P., Shi, J., & Mittal, G. S. (2006). Chitin extraction from black tiger shrimp (Penaeus monodon) waste using organic acids., *Separation Science and Technology* 41 : (6) 1135-1153.

Chatelet, C., Damour, O. & Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some Biological properties of chitosan Films., *Biomater* (22) : 261-268.

Chen, M.C., Yeh, G.H.C., Chiang, B.H. (1996). Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative., *J. Food Proc Preserv* 20(5): 379 - 390.

Chen, W., Adams, R.L., Carubelli, R. & Nordquist, R.E. (1997). Laser- Photosensitizer assisted immunotherapy : Anovel modality for cancer treatment., Cancer Lett. (115) : 25-30.

Chen, Y.H., Miller, J.R., Francis, J.A., Russell, G.L. & Aires, F. (2003). Observed and modeled relationships among Arctic climate variables., *J. Geophys. Res* (108): D 24, 4799.

Chien, P. & Chou, C. (2006). Antifungal activity of chitosan and its application to control postharvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (Citrus tankan hayata)., *Journal of the Science of Food and Agriculture* (86) : 1964–1969.

Cho, Y., No, H.K. & Meyers, S.P. (1998). Physicochemical characteristics' and functional properties of various com-mercial chitin and chitosan products., *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46(9) : 3839-3843.

Choi, B. K ., Kim, KY., Yoo, Y.J., Oh, S.J., Choi, J.H., Kim, c.Y. (2001). In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against Actinobacillus actinomycetemcomitans and Streptococcus mutans., *International Journal of Antimicrobial Agents* (18) : 553-557.

Chung, T. W., Yang, J., Akaike, T., Cho, K. Y., Yah, J. W., Kim, S. I. & Cho, C. S. (2002). Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment., *Biomaterials* (23) : 2827-2834.

Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G et Fortina, M.G. (2007). Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italien goat milk. Elsevier., *Food Microbiology* (24)**:** 752-758.

Coma, V., Deschamps, A. Et Martial-Gros, A. (2003). Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer. Antimicrobial activity assessment on dairy-related contaminants., *Journal of Food Science* (68) : 2788-2792.

Coma, V., Martial-Gros, A., Garre Au, S., Copinet, A., Salin, F., Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix., *J. Food Sci* (67) : 1162-1169.

Coppola, S., Blaiotta, G. & Ercolini, D. (2008). Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods. Dairy products., L. Cocolin ., D. Ercolini., Ed. Springer, New York, pp 31–90.

Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G., villani, F. (2000). Microbial succession during repening of naples-type salami, a southern Italian fermented sausage., *Meat. Sci* (56) : 321-329.

Corsetti, A., Settanni, L. & van Sinderen, D. (2004). Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity., *J. Appl Microbiol* (96) : 521–534.

Crini, G. & Badot, P. M. (2008). Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solution by adsorption process using batch studies: A review of recent literature., *Progress in Polymer Science* (33) : 399-447.

Crini, G., Badot, P.M., Guibal, E. (2009). Chitine et Chitosane. Du polymère à l'application: Presses universitaires de Franche-Comté.

Cuero, R.G., Osuji, G. & Washington, A.N.C. (1991). N-Carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: Role of zinc., *Biotechnology Letters* 13(6):441–4.

Cueva, C., Moreno Arribas, M.V., Martin-Alvarez, P.Y., Bills, G., Vicente, M.E., Basilio, A., Riva, C.L., Requena, T., Rodriguez, J.M. and Bratolome, B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria., *Res Microbiol* (161) : 372-382.

-D-

Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P. & Leisner, J. J. (2003). Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 degrees C and 25 degrees C., *Journal of Applied Microbiology* (94): 80-89.

Daoudi, M., Bakkas, S., Culioli, G., Ortalo-Magne, A., Piovetti, L., Guiry, M.D. (2001). Acyclic diterpenes and sterols from the genera Bifurcaria and Bifurcariopsis (Cystoseiracea, Phaeophyceae)., *Biochem. System. Ecol* (29): 973-978.

Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension., *Int. Dairy J* (16) : 1058-1071.

Darmadji, P., Izumimoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation., *Meat Science* 38 (2) : 243-254.

Degnon, R. G., Dahouenon-Ahoussi, E., ADJOU, E.S., Ayikpe, O., Tossou, S., Soumanou, M.M., Sohounhloue, D.C.K. (2012). Impact des traitements post-capture sur la qualité microbiologique des crevettes (penaeus spp) du lac Ahémé au Bénin destinées à l'exportation., *Journal of Applied Biosciences.* ISSN 1997–5902. (53): 3749 – 3759.

Delerino, M.A., cresidio, S.P. (2010). Chitosane de calamar regenerateur de peau. Investigating squid pen chitosan as scar remover.

De Holanda, D.H.D. & Netto, F.M. (2006). Recovery of components from shrimp (Xiphopenaeus kroyeri) processing waste by enzymatic hydrolysis., *Journal of Food Science* 71 (5) : . 298-303.

De Giori, G.S., De Valdez, G.F., De Ruiz Holgado, P., Oliver, G. (1985). Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria., *J. Dairy. Sci* (68): 2160–2164.

De Martinis, E.C.P., Públio, M.R.P., Santarosa, P.R., Freitas, F.Z. (2001). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuumpackaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology* (32): 32-37.

De Vries, F.T., Hoffland, E., van Eekeren, N., Brussaard, L. & Bloem, J. (2006). Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management., *Soil. Biol. Biochem* (38) : 2092–2103.

De Vuyst, L. Vandamme, E.J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications., L. Vuyst ., E.J. Vandamme., ed. Blackie Academic et Professional, *London, United Kingdom*, pp 91 142.

De Vuyst, L., Callewaert, R. & Crabbé, K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *L. amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions., *Microbiology* (142): 817-827.

Degorge-Dumas, R., Goursaud, J. & Leveau, J.Y. (1986). Analyse des composes volatils du yaourt par chromatographie en phase gazeuseespace de tete (headspace), Dexheimer, E.., *Industries Alimentaires et Agricoles* (9) : 805–808.

Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C., Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques In Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Lrica, pp : 25-70.

Deraz, S., Karlsson, N.E., Hedstrom, M., Andersson, M.M, Mattiasson, B. (2005). Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus DSM20079., *J. Biotechnol* (117): 343-354.

Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables., *Food Microbiology* (21) : 703-714.

Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004). New Preservation Technologies : Possibilities and Limitations., *Int. J. Dairy* (14) : 273-285.

Devlieghere, F., Debevere, J. (2000). Influence of dissolved carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. Lebensm.-Wiss., *Technol.-Food Sci. Technol* (33) : 531-537.

Diggles, B., Carson, J., Hine, P., Hickman, R. & Tait, M. (2000). Vibrio species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (Colistium nudipinnis) and brill (C. guntheri) in New Zealand., *Aquaculture* (183) : 1–12.

Doleyres, Y., Paquin, C., Leroy, M. & Lacroix, C. (2002). *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium., *App.Microbiol. Biotechno* (60) : 168-173.

Doleyres, Y. (2003). Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées.

Dortu, C. & Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires., *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 13(1), 143-154.

Du, J., Gemma, H., Iwahori, S. (1997). Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear and kiwifruit., *J. Jpn. Soc. Hort. Sci* (66) : 15-22.

Duan, X., Chang, J. H., Ge, S., Faulkner, R. L., Kim, J. Y., Kitabatake, Y. (2007). Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain., *Cell* (130) : 1146–1158. Doi: 10.1016.

Duarte, M.L., Ferreira, M.C., Marvao, M.R., Rocha, J. (2002). An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy., *Int J Biol Macromol* 31 : (1-3): 1-8.

Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P., Dousset, X. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. Strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C., Int. J. *Food Microbiol*. (47): 33-42.

Durlu-Özkaya, F., Ayhan, K. & Vural, N. (2001). Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products., *Meat. Sci* (58): 163-166.

-E-

Earnshaw, R.G. (1992). The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease., ed. Wood B.J.B. Elsevier *Appl. Sci.* London and New York, pp : 211-232.

Edhi suyatama, N. (2006). Dévellopement de films biodégradable à base de chitosane : étude de mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation.

Eloff, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria., *Planta Medica* (64) : 711-713.

Ekkalak, P & Saipin, C. (2014). Production of High Viscosity Chitosan fromBiologically Purified Chitin Isolated by Microbial Fermentation and Deproteinization. International Journal of Polymer Science ID 162173, doi.org/10.1155,162173.

Einarsson, H. & Lauzon, H. L. (1995). Biopreservation of Brined Shrimp (*Pandalus borealis*) by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria., *Applied and Environmental Microbiology* (61) : 669-676.

Einbu, A. (2007). Characterisation of Chitin and a Study of its Acid-Catalysed Hydrolysis. Trondheim, Norwegian University of Science and Technology.

El Ghaouth, A., Anil, J., Pomampalam, R., & Boulet, M. (1991a). Chitosan coating effect on storability and quality of fiesh strawbemes., *J. Food Sci* 56 (6) : 1618-1620.

El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., & Asselin, A. (1992). Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits., *Phytopathology* (82) : 398–402.

El Ghaouth, A., Hl, J., Ponnampalam, R., & Boulet, M. (1991b). Coating to reduce water loss and maiiain quality of cucumber and bel1 pepper Fruits., *J. Food Proc. Pres* (15): 359-368.

Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L. Bozzetta, E., Goria, M., Prearo, M. & Bercovier, H. (1996). *Enteroccocus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garviae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish., *Current Microbiology* (32): 85-88.

El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T. (2011). Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods., *Trends in Food Sci. Technol.* (22): 509-516.

Eloff, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria., *Planta Medica* (64) : 711–713.

Emborg, J., Laursen, B. G., Rathjen, T. & Dalgaard, P. (2002). Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 degrees C., *Journal of Applied Microbiology* (92) : 790-799.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (2000). Class lIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity., *Fems Microbiol. Rev* (24) : 85-106.

-F-

Fernandez-Kim, S.O. (2004). Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. Dissertation, Louisiana State University: Baton Rouge, La, USA.

Franz CMAP, Holzapfel WH. (1999). Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety., *International Journal of Food Microbiology* (47): 1-24.

Frehaut, G. (2002). Un procédé "propre" de production du chitosane. Bulletin Électronique (BE) Allemagne, pp 121.

-G-

Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation., *Int J Food Microbiol* (120) : 51-70 .

Garcia Fontan, M.C., Lorenzo, J.M., Parada, A., Franco, I. & Carballo, J. (2007). Microbiological Roller, S., Covill, N., 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice characteristics of androlla, a Spani.., *Int. J. Food Microbiol* (47) : 67–77.

Gelman, A., Drabkin, V. & Glatman, L. (2001). Evaluation of lactic acid bacteria, isolated from lightly preserved fish products, as starter cultures for new fish-based food products., *Innovative Food Sci. Emerging Technol* (1) : 219-226.

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G. & Georgakis, S.A. (2007). Effect of Rosemary extract, chitosan and α-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C., *Meat Science* (76): 172-181.

Ghalfi, H., Allaoui, A., Destain J., Benkerroum, N. & Thonart, P. (2006). Bacteriocin activity by L. curvatus CWBI-B28 to inactivate Listeria monocytogenes in cold-smoked salmon during 4 degrees C storage., *J. Food Protect* (69): 1066-1071.

Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J. M., Manai, M. (2008). Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese., *Food Cont* (19): 162-169.

Gilliland, S.E., Lara, R.C. (1988). Influence of storage at freezing and subsequent refrigeration temperatures on b-galactosidase activity of Lactobacillus acidophilus., *Appl. Environ. Microbiol* (54): 898-902.

Gilliland, S.E. (1985). Concentrated starter culture. In Bacterial starter cultures for foods., *S.E. Gilliland., Ed.. CRC Press*, Inc. Boca Raton USA, pp: 145-157.

Gingerich, T.M., Lorca, T., Flick, G.J., Pierson, M.D. & McNair, H.M. (1999). Biogenic amine survey and organoleptic changes in fresh, stored, and temperature-abused blue®sh (Pomatomus saltatrix)., *Journal of Food Protection* (62) : 1033-1037.

Gizatulina, G.A., Chebotok, E.N, Novikov, V.Y., Konovalova, I.N. (2005). Kinetics of Acid Hydrolysis of Acetylglucosamine., *Russian Journal of Applied Chemistry* 78(5): 791-793.

Glatman, L., Drabkin, V. Gelman, A. (2000). Using lactic acid bacteria for developing novel fish food products., *J. Sci. Food Agric* (80) : 375-380.

Goarant, C. & Merien, F. (2006). Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry., *Journal of Microbiological Methods* (67) : 27-35.

Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B. & Montero, P. (2005). Extraction of Gelatin from Fish Skins by High Pressure treatment., *Food Hydrocoloidl* (19) : 923-928.

Goore Bi, G. (1998). Contribution à l'étude des crevettes d'eau douce de la Côte d'Ivoire : systématique biologique et analyse socio- économique de la pêche de Macrobrachium vollenhovenii (Herklots, 1857) et

Macrobrachium macrobrachion (Herklots, 1851) du bassin de la Bia. PhD Dissertation, Université de Cocody Côte d'Ivoire.

Gram, L., Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products., *Int. J. Food Microbiol* (33) : 121-137.

Grégorio, C., Pierre-Marie, B. (2007). Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies, Prog. Polym. Sci.

Guerzoni, M.E., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., Gianotti, A., Lanciotti, R. (2007). *Generation* of aroma compounds in sourdough: Effects of stress exposure and *lactobacilli-yeasts* interactions., *Food Microbiol* 24(2):*139-48.*

Guillouard, I., Lim, E.M., Guchte, M.V., Grimaldi, C., Penaud, S., Maguin, E. (2004). Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*., *Lait* (84): 1-6.

Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill C. & Ross, P. (2005). A review: microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food., *J. Appl. Microbiol* **(**98) : 1316-1325.

Gupta, K. C., Jabrail, F. H. (2006). Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres., *Carbohydrate Polymers* 66 (1) : 43–54.

-H-

Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y. & Hoshino, T. (2004). Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish., *Aquaculture (*234) : 335- 346.

Han, J.H. (2000). Antimicrobial food packaging., *Food Technol* (54): 56–65.

Helander, I.M., Nurmiaho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria., *International Journal of Food Microbiology* (71): 235-244.

Helander, I.M., Wright, V.A., and Mattila-Sandholm, T.M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria., Trends in Food Science and Technology (8): 146-150.

Helinck, S., Le Bars, D., Moreau, D. & Yvon, M. (2004). Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compound from amino acids., *Appl Environ Microbiol* (70) : 3855 3861.

Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M.G., Méndez-Montealvo, M.G, Sánchez-Rivera, M.M., Bello-Pérez, L.A. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of Rhizopus stolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill., *Carbohydr. Polym* 73(4): 541-547.

Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Versali, M.F. & Rinaudo, M. (2000). Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan., *Biomacromol* (1**)** : 746-751.

Hirano, S., & Nagano, N. (1989). Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens., *Agricultural and Biological Chemistry* (53) : 3065–3066.

Hirano, S., Sato, N., Yoshida, S. & Kitagawa, A. (1987). Chemical modification of chitin and chitosan, and their novel modification. In Industrial polysaccharides., M. Yalpani ., ed. Elsevier, New York, p163.

Holzapfel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes., *Int J Food Microbiol* (*24)*: 343-362.

Hosokawa, Y., Matsumoto, A., Oka, J., Itakura, H., & Yamaguchi, K. (1990). Isolation and characterization of a cDNA for rat liver cysteine dioxygenase., *Biochem. Biophys. Res. Commun* (168) : 473–478.

Houtsma, P.C., Dewit, J.C., Rombouts, F.M. (1993). Minimum inhibitory concentration (Mic) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meatproducts., *Int. J. Food Microbiol* (20) : 247-257.

Huang, K., Ferrin-O'Connell, I., Zhang, W., Leonard, G.A, O'Shea, E.K, Quiocho, F.A. (2007). Structure of the Pho85-Pho80 CDK-cyclin complex of the phosphate-responsive signal transduction pathway., *Mol Cell* 28 (4): 614-23.

Huang, H., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., & S. V. Madihally. (2005). In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering., *Biomaterials* 26 (36) : 7616–7627.

Huber, T., Faulkner, G., & Hugenholtz, P. (2004). Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments., *Bioinformatics* (20): 2317-2319.

Huys, Q.J., Ahrens, M.B., Paninski, L. (2006). Efficient estimation of detailed single-neuron models., *J. Neurophysiol* (96) : 872-90.

-I-

Ivanova, I., P. Kabadjova, A. Pantev, S. Danova, X. Dousset, (2000). Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin Substance produced by Lactoccous lactis subsp. lactis b14 isolated from Boza-Bulgarian traditional cereal beverage., *Biocatalysis* 41(6): 47-53.

-J-

Jaworska, M.M., Konieczna, E. (2001). Influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus Absidia orchidis., *Appl Microbiol Biotechnol* 56 (1-2): 220-224.

Jeon, Y.J., Park, P.J. & Kim, S.K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydr Polymer (44) : 71-76.

Jeon, Y.J., Kamil, J., Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod., *J. Agr. Food Chem* (50) : 5167-5178.

Jiang, Y., Li, Y. (2001). Effect of chitosan coating on postharvest life and quality of longa fruit., *Food Chem* (73) : 139-143.

Joborn, A., Dorsch, M., Olsson, J. C., Westerdahl, A. & Kjelleberg, S. (1999). *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*)., *International Journal of Systematic Bacteriology* (49) : 1891-1898.

Jung, G.Y., Park, Y.J., Han, J.S. (2010). Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation., *J. Mater Sci: Mater Med* (21): 1649-54.

-K-

Kachanechai, T., Jantawat, P., & Pichyangkura, R. (2008). The influence of chitosan on physico-chemical properties of chicken salt-soluble protein gel., *Food Hydrocoll* (22): 74–83.

Kaminski, W., Tomczak, E. & Jaros, K. (2008). Interactions of Metal Ions Sorbed on Chitosan Beads., *Desalination* (218) : 281-286.

Kamiyama, K., Onishi, H., Machida, Y. (1999). Biodisposition characteristics of n-succinyl-chitosan and glycol-chitosan in normal and tumor bearing mice. Biol Pharm bull, 22(2), 179–86.

Kanatt, S.R, Chander, R, Sharma, A. (2008b). Chitosan glucose complex– A novel food preservative, Food Chem.106. 521- 528.

Kanatt, S.R, Chander, R, Sharma, A. (2008b). Chitosan glucose complex– A novel food preservative., *Food Chem* (106): 521- 528.

Kanatt, S.R., chander, R., sharma, A. (2008a). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products., *Food Chem* (107): 845-852.

Kanauchi, O., Deuchi, K., Imasato, Y., Shizukuishi., M. (1995). E Kobayashi., *Biosci Biotechnol Biochem* 59 (1995) : 786.

Kaplan, D. L. (1998). Introduction to biopolymers from renewable resource. Biopolymers from Renewable Resources. MA, USA: Springer-Verlag Berlin Heiderberg New York.

Kasaai, M. R., Arul, J., Chin, S.L. & Charlet, G. (1999). The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. J. Photochem. Photobiol., A: Chem., 120, 201- Kanauchi O, K Deuchi, Y Imasato, M Shizukuishi, E Kobayashi., *Biosci Biotechnol Biochem* 59 (1995) : 786- 205.

Kataoka, J., Ishizaki, S. & Tanaka, M. (1998). Effects of chitosan on gelling properties of low quality surimi., *Journal of Muscle Foods* (9) : 209-220.

Katla, T., Moretro, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L., Naterstad, K. (2001).Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P andlor live *Lactobacillus sakei* cultures., *Food Microbiol* (18) : 431-439.

Khan, M.A., GUL, B., AND, D., WEBER, J. (2000). Germination responses of Salicornia rubra to temperature and salinity., *Journal of Arid Environments* (45): 207–214.

Kim, I. K., Kim, M. K., Kim, J. H., Yim, H. S., Cha, S. S., & Kang, S. O. (2007). High resolution crystal structure of PedB: a structural basis for the classification of pediocin-like immunity proteins., *BMC Struct. Biol* (***7)***: 35.

Kim, K.W., & Thomas, R.L. (2007). Antioxidant role of chitosan in a cooked cod (Godus morhua) model

Kim, K.W. & Thomas, R.L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. Food Chemistry. (101) 308-313.system., *Journal of Food Lipids* (9) : 57-64.

Kim, S. H., No, H. K., & Prinyawiwatkul, W. (2007). Effect of molecular weight, type of chitosan, and chitosan solution pH on the self-life and quality of coated eggs., *Journal of Food Science* (72) : 44–48.

Klaenhammer, T .R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria., Biochimie (70) : 337-349.

Klaenhammer, T. R (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria., FEMS Microbiology Reviews (12) : 39-86.

Koide, S.S. (1998). Chitin-chitosan: properties, benefits and risks., *Nutr Res* 18(6):1091-1101.

Konovalova, I.N., Novikov, V.Y., Stepanova, N.V. & Reut, K.V. (2004). Recovery of lipids from aqueous dispersions with chitosan solutions., *Russian Journal of Applied Chemistry* (77) : 254-259.

Koonse, B., Burkhardt, W., Chirtel, S. & Hoskin, G.P. (2005). Salmonella and the sanitary quality of aquacultured shrimp., *J. Food Prot* 68 (12): 2527-2532.

Kumar, G., Karthik, L. & Rao, K.V.B. (2010). Antimicrobial Activity of Latex of Calotropis Gigantea Against Pathogenic Microorganisms., *An In Vitro Study Pharmacologyonline* (3): 155-163.

Kumar, M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications., React. Funct. Polym 46 (1): 1-27.

Kuppusamy, S.K. & Karuppaiah, J. (2013). In Vitro evaluation of free radical scavenging activity of chitosan., International Journal of Pharmacy & Life Sciences. ISSN: 0976-7126.

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

Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H., Dicks, L.M.T., (2005) Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Grampositive and Gram-negative bacteria., *Int. J. Food Microbiol* (105) : 433-444.

-L-

Laflamme, P., Benhamou, N., Bussières, G., Dessureault, M. (1999). Differentiel effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries., *Canadian Journal of Botany* (77) : 1460-1468.

Laursen, B. G., Leisner, J. J. & Dalgaard, P. (2006). *Carnobacterium* species : effect of metabolic activity and interaction with *Brochotrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (54) : 3604-3611.

Lee, H.W., Park, Y.S., Jung, J.S. & Shin, W.S. (2002) Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the Bifidobacterium bifidium and Lactobacillus sp., *Anaerobe* (8) : 319-324.

Leeuwenhoek, A.V. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria., *Oct* 70(2-4):331-45.

Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology., *International Journal of Food Microbiology* (55) : 181–186.

Leroi, F., Arbey, N., Joffraud, J. J. & Chevalier, F. (1996). Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon., *International Journal of Food Science and Technology* (31) : 497-504.

Lestaevel, P., Houpert, P., Bussy, C. (2005). The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium, Toxicology, 212: 219-226.

Li, B., Kennedy, J.F., Peng, J.L., Yie, X., Xie, B.J. (2006). Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film., *Carbohydr. Polym* (65) : 488-494.

Li, Y., Yin, H., Wang, Q., Zhao, X. M., Du, Y. G., & Li, F. L. (2009). Oligochitosan induced Brassica napus L. production of NO and H2O2 and their physiological function., *Carbohydrate Polymers* (75) : 612–617.

Lin, H. Y., & Chou, C.C. (2004). Antioxidative activities of water soluble disaccharides of chitosan derivatives., *Food Research International* (37) : 883 - 889.

Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.1. (1990). Antagonistic activities of lactic-acid bacteria in food and feed fermentations., *Fems Microbiol. Rev* (87) : 149-163.

Liston, J. (1980). Microbiology in fishery science. *In* Advances in Fishery Science and Technology. J.J. Connell., Ed. Fishing News Books, Farnham, England, pp : 138-157.

Liu, J., Zhang, J. & Xia, W. (2008). Hypocholesterolaemic Effects of Different Chitosan Samples In vitro And In vivo., *Food Chem* (107): 419-425.

Liu, L., Li, S., Garreau, H. & Vert, M. (2000). Selective enzymatic degradations of poly (Llactide) and poly (-caprolactone) blend films., *Biomacromolecules* (1) : 350-359.

Liu, A.R., Chen, S.C., Lin, X.M., Wu, S.Y., Xu, T., Cai, F.M., Raesh, J. (2010). Endophytic Pestalotiopsis species spp. associated with plants of Palmae, *Rhizophoraceae, Planchonellae* and *Podocarpaceae* in Hainan, China. *Afr,. J. Microbiol. Res* (4): 2661-2669.

Liu, X. F., Guan, Y. L., Yang, D. Z., Li, Z., & Yao, K. D. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan., *Journal of Applied Polymer Science* (79) : 1324 1335.

Liu, Y., Sheng, Z., Liu, H., Wen, D., He, Q., Wang, S., Shao, W., Jiang, R.J., An, S., Sun, Y., Bendena, W.G., Wang, J., Gilbert, L.I., Wilson, T.G., Song, Q., Li, S. (2009). Juvenile hormone counteracts the bHLH-PAS transcription factors MET and GCE to prevent caspase dependent programmed cell death in Drosophila.

Lopez-Lutz, D., Alviano, D.S, Alviano, C.S, Kolodziejczyk, P.P (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils., *Phytochemistry* (69): 1732-1738.

López-Sabater, E. I., Rodríguez-Jerez, J.J., Roig-Saguës, A. X., Mora-Ventura, M. T. (1994). Bacteriological quality of tune fish (Thunnus thynnus) destined for canning: effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level., *Journal of Food Protection* 57(4) : .318-323.

Luchansky, J.B. & Call, J.E. (2004). Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of L. monocytogenes inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters., J. Food Prot (67) : 1017-1021.

-M-

Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S. (2006). Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal* 7(1): 3-8.

Maghami, G. G., & Roberts, G. A. F. (1988). Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Die Makromolekulare Chemie*, 189 (1), 195-200.

Mahdi, S.S., Hassan, G.I., Samoon, S.A., Rather, H.A., Showkat, A. D. & Zehra, B. (2010). Bio-fertilizers In organic agriculture., *journal of phytology*. ISSN: 2075-6240. 2(10): 42-54.

Majeti, N.V ., Kumar, R. (2000)., *A review of chitin and chitosan applications* (46) :1–27.

Makhloufi, K.M. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Biochimie. Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. France, pp 200.

Mao, L., & Wu, T. (2007). Gelling properties and lipid oxidation of kamabako gels from grass carp (Ctenopharyngodon idellus) influenced by chitosan., *Journal of Food Engineering* (82) : 128-134.

Mauguin, S. & Novel, G. (1994). Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood., *Journal of Applied Bacteriology* (76) : 616-625.

Meghrous, J., Lacroix, C., Bouksaïm, M., LaPointe, G., Simard, R.E. (1997). Note : Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lc. lactis spp. lactis biovar., Diacetylactis* UL719. *J. Appl. Microbiol* (83) : 133-138.

Minami, M., Inoue, M., Wei, S., Takeda, K., Matsumoto, M., Kishimoto, T. & Akira, S. (1996). STAT3 activation is a critical step in gp130- mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (93) : 3963-3966.

Mohamed Hatha, A. A., Maqbool, T.K. & Suresh Kumar, S. (2003). Microbial quality of shrimp products of export trade produced from aquacultured shrimp., *Int. J. Food Microbiol* (82): 213-221.

Mokrani, N. (2012). Préparation et étude du comportement de membranes biopolymères alginate de sodium/chitosane.

Möller, H., Grelier, S., Pardon, P. & Coma, V. (2004). Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC-based films., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(21): 6585-6591.

Moraes, M. P., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential., *Food Sci.Technol (43):* 1320-1324.

Moreno, D.A., Ilic, N., Poulev, A. & Raskin, I. (2006). Effects of arachis hypogaea nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters., *Life Sci* (78): 2797-2803.

Herrero, P., Martinez-Campa, C., Moreno, F. (2001). Imaging and mapping protein-binding sites on DNA regulatory regions with atomic force microscop*y., Biochem Biophys Res Commun* 280(1):151-7.

Mukherjee, D. P. (2001). Method for producing chitin or chitosan, United States Patent Application (6) : 310-188.

Mussatto, S.I, Mancilha, I.M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review., *Carbohydr Polym* (68):587–97.

Muzzareli, R.A. A , C. Muzzarelli, R. Tarsi, M. Miliani, F. Gabbanelli, M. Cartolari (2001). Fungistatic Activity of modified chitosans against Saprolegnia parasitica ., *Biomacromolecules* (2) : 165-169.

Muzzarelli, R.A.A. (1977). Chitin. Pergamon Press, Oxford, Great Britain, 1-309.

-N-

Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O., Pearlman, A.L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex., *Nat Neurosci* (4):143–150.

Ng, C.H., Hein, S., Chandrkrachang, S., Stevens, W.F. (2006). Evaluation of an improved acid hydrolysis-HPLC assay for the acetyl content in chitin and chitosan., *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 76B(1):155-160.

Nielsen, J.C, Richelieu, M. (1999). Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by Oenococcus oeni., *Appl Environ Microbiol* (65):740-745.

Nilsson, L., Huss, H.H. & Gram, L. (1999). Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora., *Journal of Food Protection (*62): 336-342.

Nilsson, L., Huss, H.H., Gram, L. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on coldsmoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere., *Int. J. Food Microbiol* (38) : 217-227.

Nilsson, L., Ng, Y.Y., Christiansen, J.N., Jorgensen, B.L., Grotinum, D., Gram, L. (2004). The contribution of bacteriocin to inhibition of *L. monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *J. Appl. Microbio.* (96) : 133-143.

NO, H. K, Meyers, S. P, & Lee. (1989). Isolation and characterization of chitin from crawash shell waste., *Journal of agricultural and food chimistry* (37) : 575-579.

No, H.K., Meyers, S.P. (1995). Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan-A Review., *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 4(2) : 27-52.

No, H. K., Lee, K. S. & Meyers, S. P. (2000). Correlation between physical chemical characteristics and binding capacity of chitosan products., *J. Food Sci* (65): 1134-1137.

No, H. K., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers, S.P. (2002**)**. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights., *International Journal of Food Microbiology* (74) : 65-72.

No, H.K., Prinyawiwatkul, W., Meyers, S.P. (2005). Comparison of shelf life of eggs coated with chitosans prepared under various deproteinization and demineralization times., J Food Sci (70):S377–82.

NWE, N. & STEVENS, W.F. (2002). Production of fungal chitosane by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction., *Biotechnol. Lett* (24) : 131-134.

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

-O-

Oanh Truong, T., Hausler, R., Monette, F. et Niquette, P. (2007). Valorisation des résidus industriels de pêches pour la transformation de chitosane par technique hydrothermo-chimique. Revue des sciences de l'eau ., *Journal of Water Science* 20 (3) : 253-262.

Olivares, M., Dı´az-Ropero, M.P., Go´mez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J.A., Martin, R., Rodriguez, J.M. (2006a). Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714, enhances the intestinal function of healthy adults., *Int J Food Microbiol* (107) : 104–111.

Olivares, M., Dı´az-Ropero, M.P., Go´mez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J.A., Martin, R., Rodriguez, J.M. (2006b). The consumption of two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714, boost the immune system of healthy humans., *Int Microbiol* (9) : 47–52.

Ostlie, H. M.; Treimo, J. & Narvhus, J.A. (2005). Effect of Temperature on Growth and Metabolism of Probiotic Bacteria in Milk. International Dairy Journal. ISSN 0958–6946, 15 (10) : 989–997.

O'Sullivan, L., Ross, R.P. & Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality., *Biochimie* (84) : 593-604.

Oszmianski, J. and Wojdylo, A. (2007). Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice., *European Food Research and Technology* (224) : 755-762.

Ott, R., Vije, T., Ten Brink, B., Mont, B. et Konings, W.N. (1997). Energy metabolism in *strepto*coccus *cremoris* during lactose starvation., *Archives of Microbiolo* (141): 348-352.

Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.P., Begin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms., Int. J. Food. Microbiol (37):155-162.

Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A., Holley, R.A. (2000 a). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan., *Int. J. Food Microbiol* (62) : 139-148.

Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Begin, A., Holley, R.A. (2000b). Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films.. *1. Food Sci* (65): 768-773.

-P-

Paradossi, G., Chiessi, E., Venanzi, M., Pispisa, B., Palleschi, A. (1992). Branched-chain analogues of linear polysaccharides: A spectroscopic and conformational investigation of chitosan derivatives., *Int. J. Biol. Macromol* (14) : 73-80.

Parente, E., Ricciardi, A., Addario, G. (1994). Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41(4) : 388-394.

Park, P.J., Je, J.Y., Byun, H.G., Moon, S.H., Kim, S.K.. (2004). Antimicrobien activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights., *J. Microbiol. Biotechnol* (14) : 317-323.

Pejic, S., Todorovic, A., Stojiljkovic, V., Kasapovic, J., Pajovic, S.B. (2009). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in endometrium of patients with polyps, myoma, hyperplasia and adenocarcinoma., *Reproductive Biology and Endocrinology* (7) : 149.

Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O. (2001). Identifies keratinocyte stem cells., Proc *Natl Acad Sci USA* (98):3156-3161.

Pelletier, A., Lemire, I., Sygusch, J., Chornet, E. & Overend, R. P. (1990). Chitin/Chitosan transformation by thermo-mechano-chemical treatment including characterization by enzymatic depolymerization., *Biotechnology and Bioengineering* (36) : 310- 315.

Peng, Y., Han, B., Liu, W., Xu, X. (2005). Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan., *Carbohydrate research* (340) : 1846-1851.

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

Pérez-Mateos. (2007). Les applications alimentaires du chitosane et dérivés. Instituto del Frío (CSIC), José Antonio Novais, 10, E28040 Madrid, Spain.

Perry, C.C., Weatherly, M., Beale, T. and Randriamahefa, A. (2009). Atomic force microscopy study of the antimicrobial activity of aqueous garlic versus ampicillin against Escherichia coli and Staphylococcus aureus., *Journal of the Science of Food and Agriculture* (89) :958-964.

Peter, M.G. (1995). Applications and environmental aspects of chitin and chitosan., *J.M.S.-Pure Appl. Chem* A(32) : 629-640.

Petry, S., Furlana, S., Waghornec, E., Saulnierd, L., Cerning, J., Maguin, E. (2003). Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides., *FEMS Microbiology Letter* (221): 285-291.

Pilet, M.F., Dousset, X., Barré, R., Novel, G., Desmazeaud, M. & Piard, J.-C. (1995). Evidence for Two Bacteriocins Produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* Isolated from Fish and Active Against Listeria monocytogenes., *Journal of Food Protection* (58) : 256-262.

Plonski, B.A., Luong, H.V. & Brown, E.J. (1990). Arsenic sorption by chitosan and chitin deacetylase production by *Mucor ruoxii*., *Biorecovery* (1) : 239-253.

Polak-Berecka, M., Wasko, A. &Koston, D. (2009) Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of Lactobacillus rhamnosus against some food spoilage microorganisms., *Annales UMCS sec. C (Biol)* (64) : 15–24.

Pranoto, Y., Rakshit, S.K., Salokhe, V.M. (2005). Enhancing antimicrobial actlvlty of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin., *Lwt-Food Sci. Tech* (38) : 859-865.

Pucci, P., Malorni, A., Marino, G., Metafora, S., Esposito, C. & Porta, R. (1988). Biochem. Biophys. Res., *Commun* (154) : 735-740.

-R-

Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagge, G. & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action., *Biomacromolecules* (4) : 1457-1465.

Rafalimanana, T. (2003). Les crevettes pénéides exploitées sur la côte Ouest de Madagascar: Variabilités spatio-temporelles des paramètres biologiques et dynamiques des populations. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Rennes, pp 261.

Rantsiou, K., Cocolin, L. (2006). New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review., *International Journal of Food Microbiology* 108 (2) : 255–267.

Rao, M.S., Chander, R., Sharma, A. (2008). Synergistic effect of chitooligosaccharides and lysozyme for meat preservation., *LWT-Food Sci. Technol* (41) : 1995-2001.

Rao, B., Shibata, Y., Strahl, B.D., Lieb, J.D. (2005). Dimethylation of histone H3 at lysine 36 demarcates regulatory and nonregulatory chromatin genome-wide., *Mol. Cell. Biol* (25) : 9447–9459.

Rao, S.B. and Sharma, C.P. (1997). Use of chitosane as biomaterial : Studies on its safety and haemostatic potential., *Journal of Biomedical Materials Research* A(34) : 21-28.

Rebecchi, A, Crivori, S, Sarra, P.G, Cocconcelli, P.S. (1998). Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation., *J. Appl Microbiol* (84):1043-1049.

Requena, V., Dı´az, F., Villena, A., Vidal, L., Pe´rez de Vargas, I. (1991). Histoenzymatic study of the neurons in the visual sector of the thalamic reticular nucleus in the adult rat., *J. Hirnforsch* (32) : 459–467.

Requena, V., Villena, A., Dı´az, F., Gonza´lez, F., Rı´us, F., Pe´rez de Vargas, I. (1996). The effect of ageing on neurones in the visual sector of the thalamic reticular nucleus. Mech. Ageing Dev. 89, 185–193. Richardson, A., The relationship between aging and protein synthesis. In: Florini, J., Ed. CRC Handbook of Biochemistry in Aging. CRC Press, Boca Raton, FL, pp : 79–191.

Richard, C., Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H. & Drider, D. (2003). Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action., *Letters in Applied Microbiology* (36) : 288-292.

Riley, M. A. et Chavan, M. A. (2007). Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and application., *Prog. Polym. Sci* (31) *:* 603–632.

Ringø, E. & Gatesoupe, F.-J. (1998). Lactic acid bacteria in fish : a review., *Aquaculture* (160) :177-203.

Ringø, E. & Strom, E. (1994). Microflora of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.); gastrointestinal microflora of free-living fish, and effect of diet and salinity on the intestinal microflora., *Aquaculture and Fishery Management (*25) : 623-629.

Ringø, E., Bendiksen, H. R., Wesmajervi, M. S., Olsen, R. E., Jansen, P. A. & Mikkelsen, H. (2000). Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)., *Journal of Applied Microbiology* (89) : 317-322.

Ringo, E., Bendiksen, H.R., Gausen, S.J., Sundsfjord, A. & Olsen, R.E. (1998). The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia Arctic char, *Salvenius alpinus* (L.). *Journal of Applied Microbiology* (85) **:** 855-864.

Ringo, E., Olsen, R. E., Overli, O. & Lovik, F. (1997). Effect of dominance hierarchy formation on aerobic microbiota associated with epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.)., *Aquaculture Research* (28) : 901- 904.

Ringo, E., Wesmajervi, M. S., Bendiksen, H. R., Berg, A., Olsen, R. E., Johnsen, T., Mikkelsen, H., Seppola, M., Strom, E. & Holzapfel, W. (2001). Identification and characterization of Carnobacteria isolated from fish intestine., *Systematic and Applied Microbiology* (24) : 183-191.

Roberts, G. A. F. (1992). Chitin chemistry., *London: Macmillan.*

Rodgers, S. (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – a review., *Trends Food Sci Technol* (12) : 276-284.

Rodgers, S., Peiris, P. & Casadei, G. (2003). Inhibition of nonproteolytic *Clostridium botulinum* with lactic acid bacteria and their bacteriocins at refrigeration temperatures., *Journal of Food Protection* (66) : 674-678.

Rodríguez, M.S., Ramos, V., Agulló, E. (2003). Antimicrobial Action of Chitosan against Spoilage Organisms in Precooked Pizza., *J Food Sci* 68 (1):271-274.

Rodríguez, J. M., Martínez, M., & IKok, J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria., *Crit Rev Food Sci Nutr* (*42)*: 91-121.

Rodríguez-Marí, A., Yan, Y.L., Bremiller, R.A., Wilson, C., Cañestro, C., & Postlethwait, J.H. (2005). Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Mullerian hormone (amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development., *Gene Expr. Patterns* 5(5):655-667.

Roller, S., & Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice., *International Journal of Food Microbiology* (47) : 67–77.

Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M., Fletcher, H. (2002). Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages., *Meat Sci* (62) : 165-177.

Ross R. P., Morgan S & Hill D. (2002). Preservation and fermentation : past, present and future., *Int. J. Food. Microbiol* (79): 3-16.

Ross, J., Jiang, H., Kanost, M.R., Wang, Y. (2003). Serine proteases and their homologs in the Drosophila melanogaster genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships.

Ross, R.P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future., *Int J Food Microbiol* (*79)*: 3-16.

Roussy, J., Vooren, M.V., Dempsey, B.A., Guibal, E. (2005). Influence of chitosane characteristics on the coagulation and the floculation of bentonite suspensions., *Water Research* (39) : 3247-3258.

Rudi, K., Maugesten, T., Hannevik, S. E. & Nissen, H. (2004). Explorative multivariate analyses of 16S rRNA gene data from microbial communities in modified-atmosphere-packed salmon and coalfish., *Applied and Environmental Microbiology* (70) : 5010-5018.

Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Perez-Nevado, F., Córdoba, Mde G. (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages dry-fermented sausages., *Meat Science* (80): 715–721.

-S-

Sabnis, S. & Block, L.H. (2000). Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems - I. Molecular modifications.. *International Journal of Biological Macromolecules* (27): 181-186.

Sanders, M.E & Klaenhammer, T.R. (2001). The scientific basis of Lactobacillus acidophilus NCFM® functionality as a probiotic., *J. Dairy Sci* (84):319-331.

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B.G., Brown, N.L. (1977). Coulson A.R., Fiddes C.A., Hutchison C.A., Slocombe P.M., *Smith M., Nature* (265) : 687-695.

Sarela, T., Kokkonen, J. & Koivisto, M. (2005). Macronutrient and energy contents oh human milk fractions during the firdt six months of lactation., *ACTA Paediatrica* (94) : 1176-1181.

Shahidi, F., Abuzaytoun, R. (2005) Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. Adv Food Nutr. 49: 93.

Shahidi, F., Kamil, J., Arachchi, V., Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans., *Trends in Food Science & Technology* (10) : 37-51.

Shaojie, L., S. Xuefeng, C. Deyong, C. Yiping & Y. Kangde. (2003). Preparation of water-soluble chitosan., *Journal of Applied Polymer Science* 91 (6) : 3497 - 3503.

Schillinger, U., Lucke, F. (1989). Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat., *Appl.Environ.Microbiol* (55) : 1901-1906.

Schiraldi, D., Zhou, C. & Zawod Zinski, T. (2006). Model studies of Perfuorinated PEM Membrane Degradation, 23 nd ACS Meeting, San Francisco, CA.

Schrøder, K., Clausen, E., Sandberg, A.M. and Raa, J. (1980). Psychrotrophic *Lactobacillus plantarum* from fish and its ability to produce antibiotic substances. *In* Advances in fish Science and Technology. *J.J. Connell., Ed. Fishing news books, Farnham, Surrey, England.* pp : 480-483.

Sebti, I. & Coma, V. (2002). Active edible polysaccharide coating and interaction between solution coating compounds., *Carbohydrate Polymers* (49) : 138-144.

Seppola, M., Olsen, R.E., Sandaker, E., Kanapathippillai, P., P., Holzapfel, W. & Ringo, E. (2006) Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing of Carnobacteria isolated from hindgut chamber and large intestine of Atlantic cod (Gadus morhua I.)., *Systematic and Applied Microbiology* (29): 131-137.

Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans., *Trends in Food science and Technology* (10) : 37-51.

Shahidi, F., Abuzaytoun, R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry,productions, applications, and health effects. Adv., *Food Nutr. Res* (49): 93-135.

Shahidi, F., Kamil, J., Jeon, Y.J. & Kim, S.K. (2002). Antioxidant role of chitosan in cooked cod (Gadus morhua) model system., *Journal oh Food Lipids* (9) : 57-64.

Smit, F. J., Thome, J. R., & Meyer, J. P. (2002). "Heat Transfer Coefficients During Condensation of the Zeotropic Refrigerant Mixture HCFC-22/HCFC-142b., *ASME J. Heat Transfer* 124(6): 1137-1146.

Somashekar, D., Joseph, R. (1996). Chitosanases properties andapplication: a review., *Bioresource Technol* (55): 35-45.

Sonnenburg Ratsch, G ., Schafer, C . & Scholk, B. (2006). Large scale multiple kernel learning.,² Journal of Machine Learning Research 7(1):1531–1565.

Spagna, G., RN Barbagallo, R.N., Pifferi, P.G. (2000). *J. Agric Food Chem* (48) : 4619.

Speiciene, V., Guilmineau, F., Kulozik, U., Leskauskaite, D. (2007) ., Food Chem (102) : 1048.

Spinnler, H., Tognoni, G. (1987). Standardizzazione e taratura italiana di test neuropsicologici., *Ital J. Neurol Sci suppl* 8 (6): 1–120.

Spinnler, H. E. & Corrieu, G. (1989). Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *Journal of Dairy Research* 56, 755-764.

Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Kumar, K.R., Tharanathan, R.N. (2004). Properties of chitosan films prepared under different drying conditions., J. Food Eng (63) : 79-85.

Stekelenburg, F.K., Kant-Muermans, M.L.T. (2001). Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sens ory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes,. Int. J. Food Microbiol* (66) : 197-203.

Stiles M.E. et Holzapfel W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy., *Int. J. Food Microbiol* (36) : 1-29.

Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria., *Ant.Van LeeuwJO*: 331-345.

Strand, S. P., Vandvik, M. S., Varum, K. J. & Ostgaard, K. (2001). Screening of chitosans and conditions for bacterial floculation., *Biomacromolecules* (2): 126-133.

Strøm, E. & Olafsen, J.A. (1990). The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing. *In* : Microbiology in Poecilotherms. *R. Lèsel., Ed. Elsevier, Amsterdam,* pp : 181-185.

Su, H.K., Hong, K.N., Prinyawiwatkul, W. (2007). Effect of molecular weight, type of chitosane, and chitosane solution PH on the shelf-life and quality of coated eggs. Journal of Food Science (72) : SO44-SO48.

Suyatama, N.E. (2006). Dévellopement de films biodégradable à base de chitosane : étude de mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation.

Synowiecki, J., Al-Khateeb, N. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43 (2) : 145-171.

-T-

Tagg, J.R. & Mc Given, A.R. (1971). Assay system for bacteriocins., *Applied Microbiol* (21): 943-943.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. & Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria., *Bacteriological Review* (40) : 722-756.

Tahiri, L., Desbiens, M., Kheadr, E., Lacroix, C., Fliss, L. (2008). Comparaison of different strategies for the application of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* during storage of cold-smoked wild salmon. Food Microbiol. (Accepted).

Tahiri. I., Desbiens. M., Kheadr. E., Lacroix. C., Fliss. I. (2009). Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of Listeria monocytogenes in coldsmoked wild salmon., *Food Microbiology* (26): 783-793.

Tamura, H., Kitta, K., Shibamoto, T. (1991). Formation of reactive aldehydes from fattyacids in a *Fe2+j* H20 2 oxidation system., *J. Agr. Food Cheille* (39) : 439-442.

Tan, D.X., Chen, L.D., Poeggeler, B., Manchester, L.C., Reiter, R.J. (1993). Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger., *J. Endocrine* (1): 57–60.

Taniguchi, S., Yamase, T., Kobayashi, K., Takayamagi, R., Haji, M., Uneda, F. & Nawata, H. (1994). Catechol estrogens for the cu2+ catalysed oxidation of low or high density lipoproteins antioxidative effects of steroids on lipoproteins., *J. Endocrine* (41) : 605-611.

Ten Brink, B., Minekus, M., van der Vossen, J.M., Leer, R.J., Huis, J.H.J. (1994). Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B., a novel bacteriocin produced by L. acidophilus M46., *J Appl Bacteriol* (77): 140 – 8.

Thiboutot, H., Dako, E., El-Soda, M., Vuillemard, J. C., Power, N. & Simard, R. E. (1995). Influence of heat and freeze shocking on the autolysis and peptidase activities of *Lactobacillus casei*., *Milchwissenschaft* (50) : 448-452.

Thonart, P. & Hiligsmann S. (2009). Identification of newly isolated lactobacilli from stomach mucus of lamb., *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae* (55): 64-72.

Titiek, F.D., Endang, S.R., Djoko, W. & Slamet, S. (1996). Antimicrobial substance produced by lactobacillus sp. TGR-2 isoleted from Growol. Indonesian., *Food Nutr. Prog* 3(2) : 29-34.

Tiwari, S.K. & Srivastava, S. (2008). Characterization of a bacteriocin from Lactobacillus plantarum strain LR/14., *Food Biotechnology* (22): 241-267.

Todorov, S. D., Koep, K. S. C., Van Reenen, C. A., Hoffman, L. C., Slinde, E. & Dicks, L. M. (2007). Production of salami from beef, horse, mutton, Blesbok (Damaliscus dorcas phillipsi) and Springbok (Antidorcas marsuplialis) with bacteriocinogenic strains of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus curvatus., *Meat Science* (77) : 405-412.

Todorov, S.D., Botes, M., Guigas C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M.B., Holzapfel, W.H., Dicks, L.M.T. (2008). Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria., *J.Appl. Microbiol* (104) : 465-477.

Todorov, S., Dicks, L. (2005). Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria., Enz. Microbial.Technol (36) : 318–326.

Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M. & Alagui, A. (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties, *Polymer.* PISSN 0032-3861. (44): 7939–7952.

Tomé, E., Pereira, C.V., Lopes, C.L., Gibbs, P.A. & Teisciera, P.C. (2008). In vitro tests of suitability of bacteria, as potential biopréservation cultures in vacuum-packaged coldsmoked salmon. Elsevier., *Food Control* (19): 535-543.

Truong, T.O., Hausler, R., Monette, F. & Niquette, P. (2007). Valorisation des résidus industriels de pêches pour la transformation de chitosane par technique hydrothermo-chimique. Revue des sciences de l'eau ., *Journal of Water Science* 20 (3) :53-262.

Tsai, G.J., Su, W.H., Chen, H.C., Pan, C.L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation., *Fish. Sci.* (68) : 170-177.

Tsai, G.J. & Su, W.H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*., *J. Food Prot* 62(3): 239-243.

Tsai, J. L., Knutson, B. & Fung, H. H. (2006). Cultural variation in affect valuation., Journal of Personality and Social Psychology (90) :288 –307.

Tual, C., Espuche, E., Escoubes, M. & Domard, A. (2000). Transport properties of chitosan membranes: Influence of crosslinking. DOI: 10.1002/(SICI) 1099.

-V-

Valenti, W.C, Franceschini-Vicentini, I.B., Pezzato, L.E. (2003). The potential for Macrobrachium amazonicum culture. World Aquaculture Salvador. Book of Abstracts., World Aquaculture Society, Salvador, p 804.

Vermeiren, L., Devlieghere, F. & Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products., *Int. J. Food Microbiol* 96**(**2) : 149-164.

Vescovo, M., Gianluigi, S. & Zacconi, C. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon., *Food Microbiology* (23) : 689-693.

Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H. (2004b). In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus., *FEMS Microbiology Letters* (231) : 145–152.

Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., Hecht, T. (2004a). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus., *Journal of Fish Diseases* (27) : 319–326.

-W-

Waldeck, J., Daum, G., Bisping, B. & Meinhardt, F. (2006)., *Appl. Env. Microbiol* 72 : (12), 7879-7885.

Waldeck, W., Heidenreich, E., Mueller, G., Wiessler, M., Tóth, K., Braun, K. (2012) . ROS-mediated killing efficiency with visible light of bacteria carrying different red fluorochrome proteins., *J Photochem Photobiol B* (109): 28–33.

Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A. & Collins, M.D. (1990) 16S rRNA sequence determination for members of the genus Carnobacterium and related lactic acid bacteria and description of Vagococcus salmoninarum sp. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology* (40): 224-230.

Wang, W. & D. Xu. (1994). Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degree of deacetylation., *Int. J. Biol. Macromol* 16 (3) : 149-1 52.

Wessels, S. & Huss, H. H. (1996). Suitability of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products., *Food Microbiology* (13) : 323- 332.

Wibowo, S., Velazquez, G., Savant, V., Torres, J.A. (2007). Effect of chitosan type on protein and water recovery efficiency from surimi wash water treated with chitosan-alginate complexes., Bioresour Technol 98(3):539-45.

Wibowo, S., G.Velazquez, V. Savant &J.A. (2005). Torres Surimi wash water treatment for proteinrecovery: effect of chitosan–alginate complex concentration and treatment time on protein adsorption Biores., *Tech* 96 (6): 665-671.

Wijaya, A., Neudeker, C., Holzapfel, W. & Franz, C. (2006). Influence of bacteriocin-producing Enterococcus faecalis BFE 1071 on Lactobacillus spp. in the rat gastrointestinal tract. In: Proceedings of Food Micro, August 2006, University of Bologna, Bologna, Italy, 124.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers., *Nucleic Acids Res* (18): 6531-6535.

Wydro, P., Krajewska, B., Hac-Wydro, K. (2007). Chitosan as a lipid binder: a langmuir monolayer study of chitosan-lipid interactions., Biomacromolecules (3): 2611–2617. DOI: 10.1021/bm700453x.

-X-

Xie, W., Xu, P. & Liu, Q. (2001). Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (11): 1699-1701.

Xing, J., Hedges, D.J., Han, K., Walker, J. A., .Batzer, A.M. (2005). A mobile element based phylogeny of Old World monkeys., *Mol. Phylogenet. Evol*. (37): 872–880.

-Y-

Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., Terao, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1,-diphenyl-2-picrylhydrazyl., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. (62): 1201– 1204.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N. and Montville, T. J. (2003). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi., *Journal of Food Protection* (66) : 1420-1425.

Yanagida, F., Chen, Y.S., Onda, T. & Shinohara, T. (2005) Durancin L28-1A, a new bacteriocin from Enterococcus durans L28-1, isolated from soil., *Lett Appl Microbiol* (40) : 430–435.

Yang, P., Wei, H., Huang, H.L., Baum, B.A., Hu, Y.X., Kattawar, G.W., Mishchenko, M.I. & Fu, Q. (2005). Scattering and absorption property database for nonspherical ice particles in the near- through far-infrared spectral region. *Appl. Opt.* (44) : 5512-5523. DOI:10.1364/AO.44.005512.

Yang, B.Y. & Montgomery, R. (2000). Degree of acetylation of heteropolysaccharides., *Carbohydr. Res* (323) : 156-162.

Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk., *Int. J. Dairy Sci.* (3): 194-199.

Ye, C., Bai, X., Zhang, J., Jing, H., Zheng, H., Cui, Z., Zhang, S., Jing, D., Xu, Y., Xiong, Y., Zho, A., Luo, X., Sun, Q., Gottschalk, M. & Xu, J. (2008). Spread of streptococcus suis sequence type 7, China., *Emerging. Infect. Dis* (14) : 787-791.

Ye, M., Neetoo, H., Chen, H. (2008). Effectiveness of chitosan-coated plastic films incorporating antimicrobials in inhibition of Listeria monocytogenes on coldsmoked salmon., *Int. J. Food Microbiol* (127) : 235-240.

Yen, M.T., Tseng, Y.H., Li, R.C., Mau, J.L. (2007). Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes., *LWT-Food Sci. Technol* (40) : 255–261.

Ylitalo, R., Lehtinen, S., Wuolijoki, E., Ylitalo, P., Lehtimaki T. (2002). Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. *Arzneimittelforschung*, 52(1): 1-7.

Young, D. H. & Kauss, H. (1983). Release of calcium from suspension-cultured Glycine max cells by chitosan. other polycations and polyamines in relation to effects on membrane permeability. Plant Physiology 73, 698-702.

Young, D. H ; Khole, H. & Kauss, H. (1982). Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured Glycine max and Phaseolus vulgaris cells. Plant Physiology 70. 1449-1454.

-Z-

Zemmouri, H. (2008). Utilisation du chitosane comme agent floculant dans le traitement des eaux. Mémoire de Magister, Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des procédés, Ecole Nationale polytechnique, Alger, Algérie.

Zhang, D., Quantick, P.C. (1997). Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (Litchi chinensis Sonn) fruit. *Postharvest Biol. Technol*. 12: 195-202.

Zheng, L.Y. & Zhu, J.F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr Polymer* 54, 527-530.

Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S.,, Zhu, Y.,, Siuzdak, G., Hans, R., Lingxun, D. & Ding, S. (2009). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins, Cell Stem Cell, doi:10.1016/j.stem .04.005.

Zohuriaan-Mehr, J., M. (2005). Advance in chitin and chitosan modification through draft copolymerization, Iranian polymer journal 14 (3) 235-265.

Publications

International Journal of Science and Research (IJSR)
ISSN (Online): 2319-7064
Impact Factor (2012): 3.358

Extraction, Physicochemical Characterization and in Vitro Antioxidative Potential of Chitosan in Shrimp Shell Waste from Beni Saf Sea, Algeria

Fatma Youcefi[1, 2] And Ali Riazi[2]

[1]Département d'agronomie, Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen, 13000, - Algeria.

[2]Laboratoire des Microorganismes bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé « LMBAFS », Département de Biotechnologie, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem 27000 – Algeria; was

Abstract: ***Chitin and its deacetylated derivative chitosan are natural polymers, they are oligosaccharides from exoskeleton, of crustaceans, insect shells and cell walls of fungi. The present study was undertaken to study the physiochemical parameters and theantioxidant activity from shrimp shell waste ; The intrinsic viscosity of chitosan with a molecular weight are*** **119.7±0.04 mPa.s** ***and*** **1414.33±16.99 kDa** ***respectively, the percent of Ash 0,345±0,040 %, moisture is 2,98 ±0,13 % , and protein is 0.3 ±0,041 %. The DPPH radical scavenging potential of chitosan ranged from 37.66% to 62.66% at varying concentrations (0.5 to 2%) chitosan produced was also characterized with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).***

Keywords: Shrimp shells, FTIR spectroscopy, molecular weight, deacetylation degree, antioxydant activity

1. Introduction

Among the novel families of biological macromolecules, whose relevance is becoming increasingly evident, are chitin and its main derivative, chitosan. Chitosan is one of the most important derivatives of chitin, which is the second most abundant natural biopolymer found on earth after cellulose**,** and is a major component of the shells of crustaceans such as shrimps and crabs. Chitosan can be obtained by N-deacytlation of chitin and it is a co-polymer of glucosamine and N-acetylyglucosamine unit linked by 1-4 glucostatic bond (figure 1) [1]. Chitosan is a fibre like cellulose but unlike plant fibers, it possesses some unique properties including the ability to form films, optical structural characteristics, and much more. Chitosan is the biopolymer that has received much research interests due to their numerous potential applications in agriculture, food industry, biomedicine, paper making and textile industry. Recently, the antioxidant activity of chitosan and its derivatives attracted an increased attention [2]. The current research is to prepare chitosan from shrimp shell waste and to study the physiochemical parameters and characterized by biological activities such as antioxidative activities. FTIR spectra were also established for chitosan.

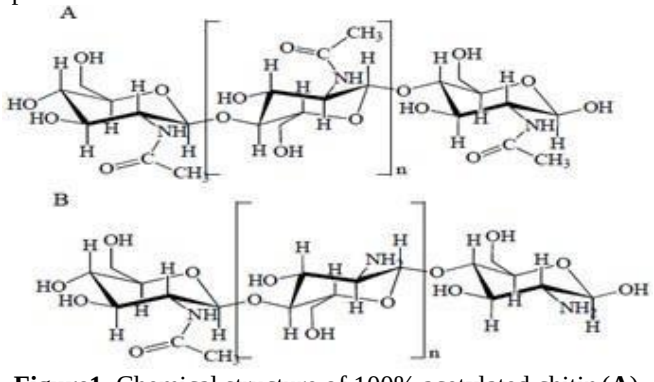


Figure1. Chemical structure of 100% acetylated chitin (**A**) and chitosan (**B**)

2. Materials and Methods

Chemicals acetic acid, hydro chloric acid and sodium hydroxide and all the other chemicals and reagents are purchased from Sigma Chemical Co.

Chitin and chitosan preparation

Sourcing and collection of samples

Shrimp shells were collected at BENI SAF fish market at Tlemcen in Algeria . For this research, shells were collected, in a stomacher bag and transported to the laboratory for preparation. The shells were scraped free of loose tissue, washed and dried at room temperature, for 10 days until it was well dried and crispy, and grounded to pass through a 0.5-0.8 mm sieve. Then they were subjected to demineralization, deproteinization and deacetylation.

Demineralization

Demineralization was carried out in 2M HCl, at ratio 1:15 (w/v)), at room temperature, stirred constantly overnight It was observed that the emission of CO2 gas depends upon the mineral content. The sample was then washed thoroughly with tap water several times to neutrality. The chitin was dried at ambient temperature (30 ± 2°C). The dried chitin was pulverised into powder using a dry Grinder

Deproteinization

Dried shell waste was washed with tap water and deproteinised by boiling in 3% aqueous sodium hydroxide for 15 min, after chitin was carried out using 2M NaOH at ratio 1:10 NaOH at 60 °C. The treatment was repeated several times. The absence of proteins was indicated by the absence of color of the medium at the last treatment, which was left overnight. Then the resulting solution was washed with water to neutrality. The purified chitin was dried at 50 °C to constant weight.

Licensed Under Creative Commons Attribution CC BY

Deacetylation of chitin

The chitin (10 g) was put into 50% NaOH at ratio 1:20 at 60°C for 8 h to prepare crude chitosan. After filtration, the residue was drained off and washed with tap water to neutrality. The crude chitosan was obtained by drying in an air oven at 50°C overnight. The chitosan was derived as a white powder.

Measurement of degree of N-deacetylation

The samples of chitin and chitosan produced were characterized by Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy (Bruker Alpha-T) in the range of 400 to 4000 per cm. Samples of chitin and chitosan (10g) were mixed with 100 g of dried potassium bromide (KBr) and compressed to prepare a salt discs (10 mm diameter) . The disks were conditioned in a desiccator placed in an oven at 80°C for 16 hr before analysis for reading the spectrum.

The absorbances at 1655 and 3450 cm^{-1} were used to calculate the DD according to the following equation **[3]**:

$$DD = 100 - \frac{\frac{A1655cm^{-1}}{A3450cm^{-1}}}{1,33} \times 100 \quad (a)$$

Where DD is deacetylation degree; *A*1655cm-^{1} and *A*3450cm-^{1} are absolute heights of absorption bands of amide and hydroxyl groups. The factor 1.33 denoted the value of the ratio of *A*1655 / *A*3450 for fully Nacetylated chitosan.

Viscosity and Molecular Weight measurements

For the determination of viscosity-average molecular weight the chitosan was dissolved in a mixture of 0.5 M acetic acid with 0.5 M Sodium acetate buffer , Ubbelohde capillary viscometer (Relative Viscometer Model Cat #9721-R56, Cannon instrument Corp., State College, PA. USA) was used to determine intrinsic viscosity in a constant-temperature water bath at 25 ± 0.01 ◦C in triplicate. The viscosity-average molecular weights of chitosan were calculated using the classical Mark-Houwink equation $[\eta]=KM^{a}$ Where [η] is the intrinsic viscosity of the depolymerized chitosan, K and a are constants for given solute–solvent system and temperature **[4]** .Before charging the chitosan solution into the viscometer, the solution should be filtered using hydrophilic membrane filter of 0.45 micron size.

Moisture determination

Moisture content of the sample was determined by gravitational method **[5].**The water mass was the difference between the weights of the wet and oven dry samples expressed in percentage

$$\%\,\text{Moisture content} = \frac{\text{Wet weight (g)} - \text{Dry weight}}{\text{Wet weight (g)}} \times 100$$

Ash Content

Chitosan ash content was determined by combustion using a constant weight crucible **[6].** The crucible was repeatedly placed into an oven at 550 °C ± 20 °C for 30 min and then removed, cooling for 30 min in dessicator, and then weighed until a constant weight .To determine the ash value of chitosan 2.0 g of chitosan sample was combusted in the constant weight crucible in an oven at 550 °C ± 20 °C for 3 h until constant weight is achieved. Ash is then calculated in %.

$$\%\text{Ash} = \frac{\text{Weight of residue (g)}}{\text{Sample Weight (g)}} \times 100$$

Protein content

The protein content in the chitosan sample was determineted using Lowry method **[7]** with bovin serum albumin (BSA). Chitosan sample solution concentration was 10 mg/mL in 0.1 M acetic acid for the protein assay. The solutions were filtred and aliquot 5ml of waste water stored for protein analysis , from waste water 0,2 ml were taken and read at 750 nm UV-visible spectrophotometer (Model : Pd-303s Company : Apel, Japan) after adding the lowry solution .

Antioxidant Determination Assay

The free radical scavenging effect of chitosan at different concentrations 0.5, 1, 1.5 and 2 % (w/v) was estimated using the modified method described by Blois (1958) **[8]** .The chitosan sample (1 mL) was added into the 1 mL of 0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO). The mixture was shaken and incubated for 30 min in the dark at room temperature and the absorbance was then measured at 517nm using an UV-visible spectrophotometer (Model : Pd-303s Company: Apel, Japan) Ascorbic acid, were used as standard.

DPPH radical-scavenging activity was calculated as follows:

$$\text{Scavenging activity} = \frac{\text{Abs of control} _ \text{Abs of Radical- sample}}{\text{Abs of control}} \times 100$$

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using ANOVA analysis (StatBox logiciel, GrimmerSoft; version 6.4, France). Comparisons were made using Student–Newman–Keuls test for multiple comparisons. A $P<0.05$ was considered statistically significant. All data presented are mean values of triplicates obtained from three separate runs (n = 5).

3. Results and Discussion

Degree of Deacetylation (DD)

The degree of deacetylation (DD) was calculated by using the equation **(a)** and FT-IR (infrared spectroscopic analysis) of the prepared chitosan**.** The DD is an important parameter affecting solubility, chemical reactivity, and biodegradability. Depending on the source and preparation

Licensed Under Creative Commons Attribution CC BY

procedure, DD may range from 30% to 95% **[9].** This study revealed that, DD of the prepared chitosan is 75%. It is rare that the production of chitosan with 100% degree of deacetylation is achievable. Therefore, commercial chitosan with various degree of deacetylation in the range of 75–85% is commonly found.

FT-IR spectral analysis

The FT-IR spectrum of the chitosan sample from the shell recorded 16 peaks in the range of 689.40/cm and 3430.02 /cm (Figure 2). The FT-IR spectra of shell extracted chitosan showing the absorbance band at 3430.02cm- 3258.97/cm, 3100.03/cm, 2877.11/ cm, 2325.01 /cm, 1168.38/cm,1652.30/cm,1629.99/cm, 1556.30/cm, 1377.02/cm,1380.11/cm,1258.98/cm,1155.03/cm, 1009.11/cm, 951.78/cm, and 689.40/cm. The region between 3000/cm and 3500/cm indicates the hydroxyl stretching vibration. This band is broad because of the hydrogen bonds.The peak at 2877.11/cm represents the characteristic -CH- stretching vibrations. The OH band overlaps the stretching band of NH. Another significant change is observed in the region from 1000 cm-1 to 1200cm-1. In this region chitosan presents a broad band centered it 1155.03/cm associated with the stretching of C=O. It is also observed It is interesting that the absorption peak of chitosan at1629.99cm-1 corresponding to the chitosan NH2 band , and the band at 1652.30 cm-1 corresponds to the amide I stretching of C = O.

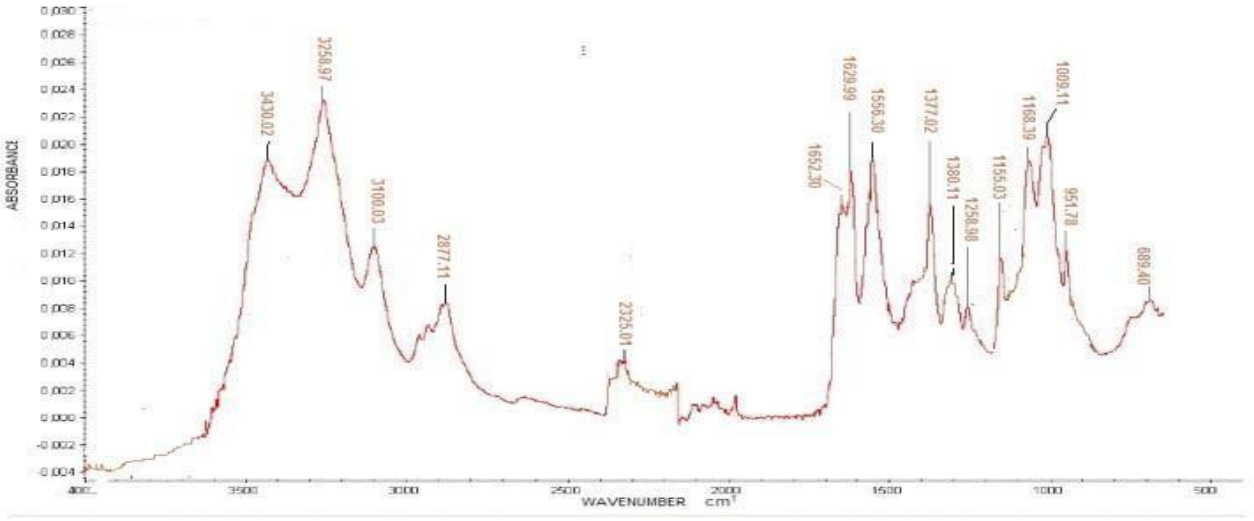


Figure 2: FTIR of prepared chitosan

Viscosity and Molecular Weight measurements

Average molecular weights of chitosan were calculated from measured intrinsic viscosities using the classical Mark-Houwink relationship $[\eta]=KM^a$ The molecular weight of chitosan in this study was found to be 1414.33±16.99 kDa Da this indicated that the quality of the chitosan used in the present work was good, this value was relatively same of chitosan from crab shells reported in the literature **[10].** The intrinsic viscosity of chitosan with a molecular weight of 1414.33±16.99 kDa was 119.7±0.04 mPa.s this is acceptable, however, since the molecular weight of chitosan depends on such factors as source of raw material and method of preparation the chitosan viscosity is considerably affected by physical treatments (grinding, heating, autoclaving, ultrasonicating, but not freezing) and chemical treatments. Viscosity is an important factor in the conventional determination of molecular weight of chitosan and its commercial applications. High viscosity chitosan has various applications, for example, as an emulsifying agent, or dietary ingredient, for metal reduction, and drug delivery **[11]**

Ash content

The prepared chitosan had an ash content of 0,345±0,040/g of chitosan as shown in Table 1 below; the ash content in chitosan is an important parameter that affects its solubility, viscosity and also other important characteristics **[12].** Low ash content was achieved because shrimps do not have high calcium carbonate in their shells.

Moisture content

The moisture content of chitosan obtained from shrimp shells was measured to be 0.74g/g of chitosan as shown in Table 1, which is in agreement with other authors who reported moisture content in the range of 7-13% obtained from different species **[13].**

Residual protein content

Protein assay results showed that residual protein content of chitosan ranges from 0.3 ±0,041 /g of chitosan The protein content in a sample depends on the source of the sample and, especially, on the method of preparation. . In the presence of NaOH the amide is hydrolyzed and the protein content in the chitin product is reduced. Chitin occurs naturally in association with protein (Chitinoprotein). Some of this protein can be extracted by mild methods, but other portion is not readily extracted, suggesting strong covalent bonding to chitin **[14].** Deproteination with NaOH get a low protein content.

Licensed Under Creative Commons Attribution CC BY

Table 1: Physicochemical and functional properties of chitosan

Parameter	***Result***
Degree of Deacetylation (DD)	75%.
Viscosity	119.7±0.04 Pa.s
Molecular Weight	1414.33±16.99 kDa
Ash	0,345±0,040g/g
Moisture	0.74g/g
Residual protein	0.3 ±0,041 g/g

Scavenging ability on DPPH radicals

The scavenging ability of chitosan from on DPPH radicals was reported at 62.66 %at 2%. Ascorbic acid showed moderate scavenging abilities of 68.33%. Thus the antioxidant activity of chitosan was found to be a moderate scavenger for DPPH radicals. The DPPH radical scavenging potential of chitosan ranged from 37.66% to 62.66% at varying concentrations (0.5 to 2%). Ascorbic acid was used on standard (Figure 3). It is generally considered that the inhibition of lipid peroxidation by an antioxidant can be explained by various mechanisms. One is the free radical-scavenging activity. Park, Je, and Kim (2004) **[15]** suggested that chitosan may eliminate various free radicals by the action of nitrogen on the C-2 position of the chitosan.

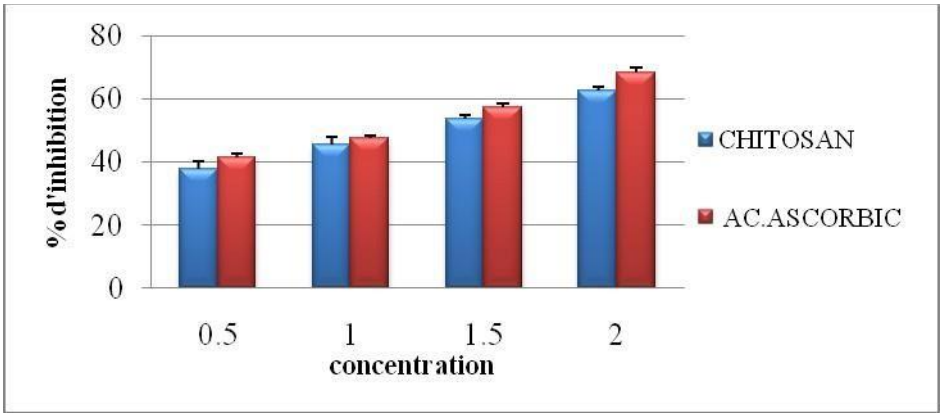


Figure 3: 1-1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging activity of chitosan.

4. Conclusion

Conclusion In this study chitosan has been successfully prepared from shrimp shell waste. By employing FTIR spestroscopy, all functional groups in chitosan macromolecules are elucidated characterization of the prepared chitosan showed that it can be used commercially. Antioxidative properties of the chitosan extract is of great interest in food industry, since it possible use as natural additives emerged from a grow-ing tendency to replace synthetic antioxidants by natural ones.

5. Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

[1] V. Mohanasrinivasan, Mudit Mishra, Jeny Singh Paliwal,Suneet Kr. Singh,E. Selvarajan, V. Suganthi,C. Subathra Devi (2013). Studies on heavy metal removal efficiency and antibacterial activity of chitosan prepared from shrimp shell waste. 3 Biotech. doi 10. 1007/s13205-013-0140-6.

[2] Russell G.Shar (2013). A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. , 3, 757-793; doi:10.3390/ agronomy3040757

[3] Md Rabiul Hussain, Murshid Iman and Tarun K. Maji Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan and Their effect on the Release Behavior of Essential Oil from Chitosan and Chitosan-Gelatin Complex Microcapsules. International Journal of Advanced Engineering Applications, Vol.6, Iss.4, pp.4-12

[4] A. Sionkowska, A. Płanecka, K. Lewandowska, B. Kaczmarek, P. Szarszewska. (2013). Influence of uv-irradiation on molecular weight of chitosan. Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its ..., Volume XVIII,

[5] M. Mahdy Samar M.H. El-Kalyoubi, M.M. Khalaf, M.M. Abd El-Razik (2013). Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. Annals of Agricultural Sciences. Volume 58, Issue 1, Pages 33–41

[6] Abdulwadud Abdulkarim1, Muhammed Tijani Isa, Surajudeen Abdulsalam, Abubakar Jaju Muhammad, Alewo Opuada Ameh. (2013). Extraction and Characterisation of Chitin and Chitosan from Mussel Shell. Civil and Environmental ResearchVol.3, No.2, 201

[7] Peck Loo Kiew and Mashitah Mat Don. (2013). Modified Lowry's Method for Acid and Pepsin Soluble Collagen Measurement from Clarias Species Muscles. 2:678. doi:10.4172/scientificreports.678

[8] Blois, M. S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1190–1200.

[9] Martino AD, Sittinger M, Risbud MV (2005) Chitosan: a versatile biopolymer for orthopedic tissue engineering. Biomaterials 26:5983–5990.

[10] Ekkalak Ploydee and Saipin Chaiyanan. (2014). Production of High Viscosity Chitosan fromBiologically Purified Chitin Isolated by Microbial Fermentation and Deproteinization. International

Licensed Under Creative Commons Attribution CC BY

Journal of Polymer Science ID 162173, doi.org/10.1155/2014/162173
[11] Arcidiacono, S. and Kaplan, D.L. (1992) Molecular weight distribution of chitosan isolated from Mucor rouxii under different culture and processing conditions. Biotechnology Bioengineering 39, 281–286.
[12] Hackmam R. Chitin III. Adsorption of proteins to Chitin. Aus J Biol Sci (1955); 8: 530-6.
[13] Peter Micheal Oduor-Odute, Marcin H. Struszczyk, Martin G. Peter.(2005) Characterization of Chitosan frm Bowfly Larvae and Some Crustacean Species From Kenyan Marine Waters Prepared Under Different Conditions. Western Indian Ocean J. Mari. Sci. Vol 4,No 1. pp. 99-107
[14] Islam MM, Masum SM, Rahman MM, Ashraful M, Molla I, Shaikh AA, Roy SK (2011) Preparation of chitosan from shrimp shell and investigation of its properties. Int J Basic Appl Sci 11(1): 116–130.
[15] Park, P. J., Je, J. Y., & Kim, S. W. (2004). Free radical scavenging activities of different deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. Carbohydrate Polymer, 55, 17–22.

Licensed Under Creative Commons Attribution CC BY

Available online at http://www.journalcra.com

International Journal of Current Research
Vol. 7, Issue, 01, pp.11240-11244, January, 2015

INTERNATIONAL JOURNAL OF CURRENT RESEARCH

ISSN: 0975-833X

RESEARCH ARTICLE

EXTRACTION, PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION, STUDY OF HEAVY METAL Mn2+ ADSORPTION AND IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CHITOSAN IN SHRIMP SHELL WASTE FROM BENI SAF SEA, ALGERIA AGAINST METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS

[1,2,*]Fatma Youcefi and [2]Ali Riazi

[1]Department of Agronomy, University Abou Bakr Belkaid, Tlemcen, 13000, Algeria
[2]Laboratory beneficial microorganisms, the Functional Foods and Health, « LMBAFS », Department of Biotechnology, University Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem 27000–Algeria

ARTICLE INFO

Article History:
Received 14th October, 2014
Received in revised form
17th November, 2014

Accepted 05th December, 2014
Published online 23rd January, 2015

Key words:
Shrimp Shells,
Chitosan, Demineralization,
Deprotenization,
Deacetylation,
FTIR Spectroscopy,
Molecular Weight,
Antimicrobial Activity,
Heavy Metal,

ABSTRACT

Antimicrobial properties of chitosan extracted from shrimp processing waste were determined against one gram-positive bacterium methicillin-resistant Staphylococcus aureus in vitro. The antimicrobial activities of chitosan were explored by calculation of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) in media supplemented with 200, 400, 600, 800and 1000 ppm chitosan solution. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the prepared chitosan was 800 and 1000 ppm for both bacterial strains. These results indicate that chitosan from shrimp processing waste could be used as an effective antibacterial agent in the food industry. The ability of chitosan as an adsorbent for Mn (II) ions in aqueous solution was studied. Our results show that the adsorption process is concentration-driven with high capacity of chitosan for the adsorption of these metal ions. At initial manganese concentrations of 3, 6 and 9 mg/L, the adsorbed manganese ion concentrations are 2.4122, 4. 9544, and 7.7667mg/L, respectively. chitosan produced was also characterized with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).

Copyright © 2015 Fatma Youcefi and Ali Riazi. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

Chitosan is a natural nontoxic biopolymer produced by the deacetylation of chitin, a major component of the shells of crustaceans such as crab, shrimp, and crawfish. Currently, chitosan has received extensive attention for its variable applications in the biomedical, food, and chemical industries (Mohanasrinivasan et al., 2013). Chitosan can be obtained by N-deacytlation of chitin and it is a co-polymer of glucosamine and N-acetylyglucosamine unit linked by 1-4 glucostatic bond (Figure 1) (Mohanasrinivasan et al., 2013). Much of the commercial interest in chitosan and its derivatives during the last two decades arises from the fact that they combine several favorable biological characteristics, including biodegradability, biocompatibility and non-toxicity; properties which render natural polymers superior over present-day synthetic polymers (Russell and Shar, 2013).

*Corresponding author: [1,2]Fatma Youcefi,
[1]Department of Agronomy, University Abou Bakr Belkaid, Tlemcen, 13000, Algeria.
[2]Laboratory beneficial microorganisms, the Functional Foods and Health, « LMBAFS », Department of Biotechnology, University Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem 27000–Algeria.

The current research is to prepare chitosan from shrimp shell waste and to study the physiochemical parameters and characterized by biological activities such as antimicrobial properties of chitosan, obtained from shrimp shell waste. FTIR spectra were also established for chitosan. The affinity of chitosan for manganese was studied using $MnCl_2.4H_2O$ solution as the heavy metal solution containing Mn (II) ions.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals acetic acid, hydro chloric acid and sodium hydroxide and all the other chemicals and reagents are purchased from Sigma Chemical Co.

Chitin and chitosan preparation

Sourcing and collection of samples

Shrimp shells were collected at BENI SAF fish market at Tlemcen in Algeria. For this research, shells were collected, in a stomacher bag and transported to the laboratory for preparation. The shells were scraped free of loose tissue, washed and dried at room temperature, for 10 days until it was

International Journal of Current Research, Vol. 7, Issue, 01, pp.11240-11244, January, 2015

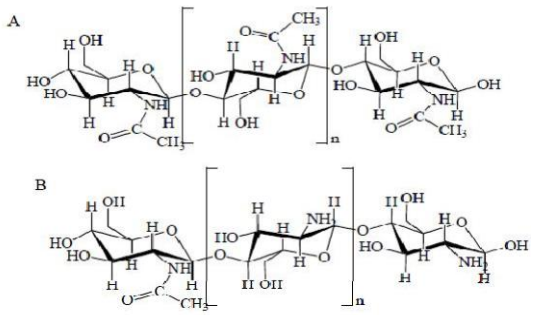


Figure 1. Chemical structure of 100% acetylated chitin (A) and chitosan (B)

well dried and crispy, grounded to pass through a 0. 5-0.8 mm sieve. Then they were subjected to demineralization, deproteinization and deacetylation

Demineralization

Demineralization was carried out in 2M HCl, at ratio 1:15 (w/v)), at room temperature, stirred constantly overnight It was observed that the emission of CO_2 gas depends upon the mineral content. The sample was then washed thoroughly with tap water several times to neutrality. The chitin was dried at ambient temperature (30 ± 2°C). The dried chitin was pulverised into powder using a dry Grinder

Deproteinization

Dried shell waste was washed with tap water and deproteinised by boiling in 3% aqueous sodium hydroxide for 15 min, after chitin was carried out using 2M NaOH at ratio 1:10 NaOH at 60 °C. The treatment was repeated several times. The absence of proteins was indicated by the absence of color of the medium at the last treatment, which was left overnight. Then the resulting solution was washed with water to neutrality. The purified chitin was dried at 50 °C to constant weight.

Deacetylation of chitin

The chitin (10 g) was put into 50% NaOH at ratio 1:20 at 60°C for 8 h to prepare crude chitosan. After filtration, the residue was drained off and washed with tap water to neutrality. The crude chitosan was obtained by drying in an air oven at 50°C overnight. The chitosan was derived as a white powder.

Measurement of degree of N-deacetylation

The samples of chitin and chitosan produced were characterized by Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy (Bruker Alpha-T) in the range of 400 to 4000 per cm. Samples of chitin and chitosan (10g) were mixed with 100 g of dried potassium bromide (KBr) and compressed to prepare a salt discs (10 mm diameter). The disks were conditioned in a desiccator placed in an oven at 80°C for 16 hr before analysis for reading the spectrum. The absorbances at 1655 and 3450 cm^{-1} were used to calculate the DD according to the following equation (Md Rabiul Hussain, et al., 1978)

$$DD = 100 - \frac{\frac{A1655cm^{-1}}{A3450cm^{-1}}}{1,33} \times 100 \quad (a).$$

Where DD is deacetylation degree; A 1655cm^{-1} and A 3450cm^{-1} are absolute heights of absorption bands of amide and hydroxyl groups. The factor 1.33 denoted the value of the ratio of A1655 / A3450 for fully Nacetylated chitosan.

Micro organisms

Bacterial culture of methicillin-resistant Staphylococcus aureus used in the present studies which is commonly associated with food product as a result of human handling (Kunin, 1987) was obtained from local hospitals. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus was pre-cultured into trypticase soy broth (TSB) (Difco Laboratories, Detroit, MI) containing 0.6 % (w/v) yeast extract (TSBYE) (Difco) at 37 °C for 24 h. The culture was kept refrigerated on tryptose soy agar slants during the experiment.

Determination of antibacterial activity

Bacterial inoculums were prepared by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. Bacterial cultures were emulsified in normal saline and turbidity was matched with 0.5 McFarland turbidity standards. The agar cup method (Barry, 1980) was followed to investigate the antibacterial activity of the preparations. 0.1 mL of TSBYE broth culture of the test organism were firmly seeded over the Mueller-Hinton Agar (MHA) plates. Wells of 6 mm diameter was punched over the agar plates using a sterile cork borer. The bottoms of the wells were sealed by pouring 80 µL of molten MHA into the scooped out wells. Five different concentrations (200, 400, 600, 800 and 1000 ppm) were used to evaluate the effects of concentration of chitosan against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. The same volume of water was added to the control group. These samples were added at initial of cultivation. Using a micropipette, solutions was added to different wells in the plate. These plates were then kept at low temperature (4ºC) for 2-4 hours and incubated at 37 ºC for 24 hours. After the incubation period formation of zones around the wells, confirms the antibacterial activity of the respective preparations.

Determination of MIC and MBC

Serial two-fold dilutions of the antimicrobial agent were prepared in the appropriate culture medium in sterile 96-well round-bottom polystyrene microtiter plates (Greiner Bio-One GmbH). Liquid culture of the test strain methicillin-resistant Staphylococcus aureus was inoculated from an overnight culture (5% [vol/vol]), and allowed to grow in the respective broth in a rotary incubator at 37°C. The MIC was read as the least concentration of the antimicrobial agent resulting in the complete inhibition of visible bacterial growth after 24 - 48 h of incubation at 37°C. Antibacterial activities were also expressed as the MBC (minimum bactericidal concentration), defined as the lowest concentration of the antimicrobial agent reducing the bacterial inoculum by ≥ 99.9% within 24 h. The MBC was assigned by estimating the viable count in 20-µl aliquots from each well of the microtiter plates showing absence of growth.

Sorption of manganese ions on chitosan

20mg/L manganese solution was prepared by dissolving 8.99 mg analytical grade $MnCl_2.4H_2O$ powder in distilled water, contaminated water for treatment using chitosan.

International Journal of Current Research, Vol. 7, Issue, 01, pp.11240-11244, January, 2015

This solution was kept as stock solution and 3, 6 and 9 mg/L solutions were prepared by diluting stock solution. 50ml of 3mg/L $MnCl_2$ solution was taken and 50mg of chitosan was added. Then the mixture was continuously stirred using magnetic stirrer for 1 hours at room temperature (28^oC), after that solution was filtered using Whatman filter paper no 2 and 3mg/l $MnCl_2$ solution were analyzed using atomic adsorption spectroscopy to determine amount of manganese absorbed by chitosan. The same steps were repeated to the other dilute solutions.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using ANOVA analysis (StatBox logiciel, GrimmerSoft; version 6.4, France). Comparisons were made using Student–Newman–Keuls test for multiple comparisons. A $P<0.05$ was considered statistically significant. All data presented are mean values of triplicates obtained from three separate runs (n = 5).

RESULTS AND DISCUSSION

Degree of Deacetylation (DD)

The degree of deacetylation (DD) was calculated by using the equation (a) and FT-IR (infrared spectroscopic analysis) of the prepared chitosan. The DD is an important parameter affecting solubility, chemical reactivity, and biodegradability. Depending on the source and preparation procedure, DD may range from 30% to 95% (Abdulwadud Abdulkarim1 et al., 2013). This study revealed that, DD of the prepared chitosan is 75%. It is rare that the production of chitosan with 100% degree of deacetylation is achievable. Therefore, commercial chitosan with various degree of deacetylation in the range of 75–85% is commonly found.

FT-IR spectral analysis

The FT-IR spectrum of the chitosan sample from the shell recorded 16 peaks in the range of 689.40/cm and 3430.02 /cm (Figure 2). The FT-IR spectra of shell extracted chitosan showing the absorbance band at 3430.02cm- 3258.97/cm, 3100.03/cm,2877.11/cm,2325.01/cm, 1652.30/cm,1629.99/cm, 1556.30/cm,1377.02/cm,1380.11/cm,1258.98/cm,1155.03/ cm, 1168.38/cm,1009.11/cm, 951.78/cm, and 689.40/cm.

The region between 3000/cm and 3500/cm indicates the hydroxyl stretching vibration. This band is broad because of the hydrogen bonds.The peak at 2877.11/cm represents the characteristic -CH- stretching vibrations. The OH band overlaps the stretching band of NH. Another significant change is observed in the region from 1000 cm-1 to 1200cm-1.

In this region chitosan presents a broad band centered it 1155.03/cm associated with the stretching of C=O. It is also observed It is interesting that the absorption peak of chitosan at1629.99cm-1 corresponding to the chitosan NH_2 band , and the band at 1652.30 cm-1 corresponds to the amide I stretching of C = O. The extensive use of antimicrobial agents and the evolutionary antimicrobial resistance strategies of bacteria have resulted in the global increase of nosocomial infections making it necessary to embark on a continued search for new antimicrobial compounds. The antimicrobial activity of chitosan has been recognized and is considered to be one of the most important properties, corresponding directly to their possible biological applications. Chitosan had broad spectrum antimicrobial effects. This study has been conducted to assess inhibitory effects of chitosan in terms of MIC and MBC. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) is the lowest concentration of antibiotic required to kill 99% of the germ.

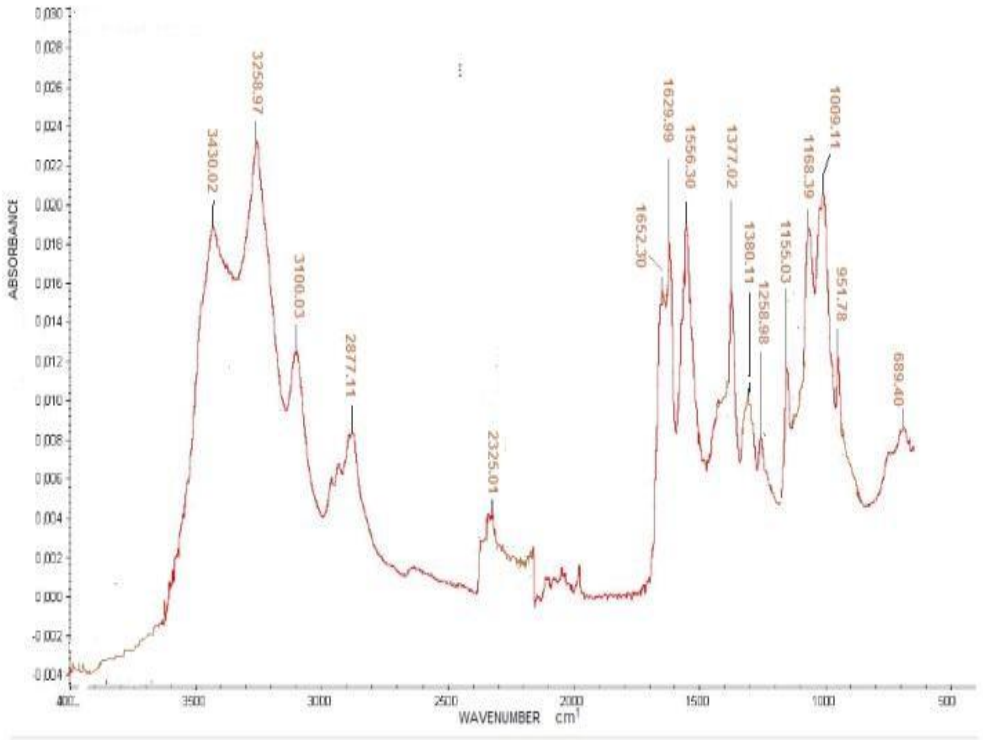


Figure 2. FTIR of prepared chitosan

International Journal of Current Research, Vol. 7, Issue, 01, pp.11240-11244, January, 2015

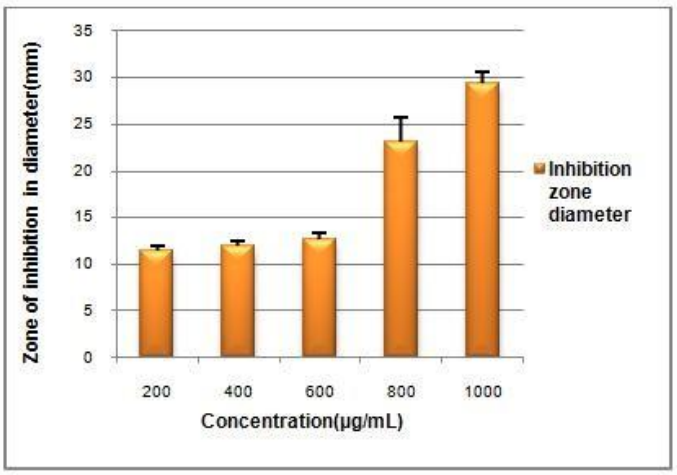


Figure 3. Antimicrobial activity and zone of inhibition of chitosan (mm) SD (n=5)

Effect of chitosan obtained from the shrimp shells was evaluated against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and the results are presented in Table 1.

Table 1. MIC and MBC of prepared chitosan against methicillin-resistant staphylococcus aureus

	Concentration(ppm) growth in peptone broth							
	1200	1000	800	600	400	200	MIC (ppm)	MBC (ppm)
methicillin-resistant staphylococcus aureus	-	-	+	+	+	+	800	1000

Table 2. amount of manganese adsorbed after adding 50mg of chitosan with 28º C and pH=5.4 (atomic absorption method)

TotalMn2+inoriginalsolution(ppm)	TotalMn2+afteradditionofchitosan(ppm)(adsorb)
3	2.4122
6	4. 9544
9	7.7667

As shown in Figure 1 chitosan markedly inhibited the growth of methicillin-resistant Staphylococcus aureus,. The activity increased with increasing concentration of chitosan. The inhibition zone diameter for methicillin-resistant Staphylococcus aureus was in the range of 11-29mm, the highest antibacterial activity against the strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus was 29 mm with 1000 µg/mL chitosan. The MBC and MIC values of chitosan was measured by macro and micro broth dilution techniques and results are presented in Table 1. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) is the lowest concentration of antibiotic required to kill 99% of the germ. Not as commonly seen as the Minimum inhibitory Concentration (MIC). It can be determined from broth dilution MIC tests by sub culturing to agar media without antibiotics. Antimicrobials are usually regarded as bactericidal if the MBC is no more than four times the MIC (Jones et al., 1985). According to previous studies (Blois Jia et al., 2001) the antibacterial activity of chitosanmay result from its polycationic structure due to the protonation of –NH2 on the C-2 position of the Dglucosamine repeat unit. Positively charged chitosan can bind to bacterial cell surface which is negatively charged and disrupt the normal functions of the membrane by promoting the leakage of intracellular components or by inhibiting the transport of nutrients into cells (Helander et al., 2001), (Rhoades and Roller, 2000).

This electrostatic interaction results in twofold interference: by promoting changes in the properties of membrane wall permeability, thus incite internal osmotic imbalances and consequently restrain the growth of microorganisms (Shahidi et al., 1999) and by the hydrolysis of the peptidoglycans in the microorganism wall, leading to the leakage of intracellular electrolytes such as potassium ions and other low molecular weight proteinaceous constituents (e.g. proteins, nucleic acids, glucose, and lactate dehydrogenase) (Chen et al., 1998), (Papineau, 1991). Visual confirmation of an effective membrane lyses been also reported on gram-negative and gram-positive bacteria (Chung and Chen, 2008). Since such mechanism is based on electrostatic interaction, it suggests that the greater the number of catonized amines, the higher will be the antibacterial action (Másson et al., 2008).

Sorption of manganese ions on chitosan

During recent years, heavy metal pollution of the aquatic environment has become a worldwide problem because most of them have toxic effects on organisms. Both essential and non-essential heavy metals have a particular significance in human health when used for drinking purpose.

The concentration of manganese was recorded in in original solution ranging from 3,6 and 9 ppm. After Chitosan–sand treatment, metal concentration ranged from 2.4122, 4.9544 and 7.7667ppm respectively. The efficiency of Mn 2+ removal was 80.40, 82.57and 86.29 %. The highest efficiency rate was found with concentration of manganese 3 ppm (Table 2).

Conclusion

Conclusion In this study chitosan has been successfully prepared from shrimp shell waste. By employing FTIR spestroscopy, all functional groups in chitosan macromolecules are elucidated characterization of the prepared chitosan showed that it can be used commercially. chitosan from shrimp shell waste have excellent antibacterial activity against gram- gram-positive bacterium methicillin-resistant Staphylococcus aureus.

Chitosan could be a good source of drugs that may be used against bacterial infection. The study indicated that Removal rate of metal is excellent Chitosan based adsorbent may offer an alternative to traditional treatment methods. The unique properties of Chitosan together with availability, makes Chitosan an exciting and promising agent for the purification of surface water for household drinking purpose

International Journal of Current Research, Vol. 7, Issue, 01, pp.11240-11244, January, 2015

REFERENCES

Abdulwadud Abdulkarim1, Muhammed Tijani Isa, Surajudeen Abdulsalam, Abubakar Jaju Muhammad, Alewo Opuada Ameh, 2013. Extraction and Characterisation of Chitin and Chitosan from Mussel Shell. Civil and Environmental Research, Vol.3, No.2, 201

Barry, A.L. 1980. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media. In: Antibiotics in laboratory medicine. Lorin V (eds), Williams Wilkins Co. Baltimore: USA, 1-23.

BloisJia, Z. S., Shen, D. F. and Xu, W. L. 2001. Synthesis and antibacterial activities ofquaternary ammonium salt of chitosan. Carbohydrate Research, 333, 1–6.

Chen, C.S., Liau, W.Y. and Tsai, G.J. 1998. J Food Prot., 61:1124-1128.

Chung, Y.C. and Chen, C.Y. 2008. Bioresource Technol, 99:2806-2814.

Hayes, E.R. and Davies, D.H. Characterization of chitosan. II: The determination of the degree of acetylation of chitosan and chitin. In Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan; Muzzarelli, R.A.A. and Pariser. E.R. (Eds.), 1978. p.406-415. MIT Sea Grant Program, Cambridge, MA. Martino, A.D.; Sittinger, M.; Risbud, M.V., Biomaterials, 2005, 26, 5983–5990.

Helander, I. M., Nurmiaho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J. and Roller, S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. International Journal of Food Microbiology, 71, 235–244.

Jones, N.R., Barry, L.A., Gavan, L.T., Washington, ii J.A. 1985. Susceptibility tests: Microdilution and macrodilution broth procedures. In Manual of Clinical Microbiology (Lennette EH, Bellows A, Hausler WJ Jr and Shadomy HJ eds), 4th edn, 972-976, American Society of Microbiology, Washington DC.

Kunin, C.M., 1987. Detection, Prevention and Management of Urinary Tract Infections; Lea and Febiger: Philadelphia, Chapter 4, 245

Másson, M., Holappa, J., Hjálmarsdóttir, M., Rúnarsson, Ö.V., Nevalainen, T. and Järvinen, T. 2008. Carbohyd Polym, 74: 566-571

Mohanasrinivasan, V., Mudit Mishra, Jeny Singh Paliwal, Suneet Kr. Singh, E., Selvarajan, V., Suganthi, C. and Subathra Devi, 2013. Studies on heavy metal removal efficiency and antibacterial activity of chitosan prepared from shrimp shell waste. 3 Biotech. doi 10. 1007/s13205-013-0140-6.

Papineau, A.M., Hoover, D.G., Knorr, D. and Farkas, D.F. 1991. Food Biotechnol., 5:45-57

Rhoades, J. and Roller, S. 2000. Appl. Environ. Microbiol., 66, 80–86.

Russell G.Shar 2013. A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. , 3, 757-793; doi:10.3390/ agronomy3040757.

****