**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DE MEDEA**

**FACULTE DES SCIENCES**

# Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie

**Spécialité :** Normes et contrôle de qualité

**Par :**

**MESKINE SOUAD** & **DAMECHE ISMAHAN**

**Thème :**

# Préparation d'un bioconservateur et application dans la conservation de la viande hachée fraiche

**Soutenue publiquement le : 07 / 09 / 2017.**

**Devant le jury composé de :**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Dr. Ahmedi A.** | **MCB** | **Université de Médéa** | **Présidente** |
| **Dr.Youcefe toumi KH.** | **MCB** | **Université de Médéa** | **Examinatrice** |
| **Dr. Arbia W.** | **MCB** | **Université de Médéa** | **Encadreur** |

**Année universitaire : 2016/2017**

# *Remerciement*

*De prime d'abord, je tiens à remercier le dieu clément miséricordieux de m'avoir donné la force, le courage et la patience durant m'étude pour arriver à ce jour la.*

*Comme c'est un plaisir de remercier tous ce qui à contribué à la réalisation de ce mémoire.*

*En premier lieu Je voudrais exprimer mes sincères remerciements à mes parents pour leur contribution pour chaque travail effectué.*

*Je voudrais remercier aussi mon promoteur Mm ARBIA WASSILA pour son aide, ces nombreux conseils et surtout sa disponibilité le long travail.*

*Mes vifs remerciements également aux membres des jurys nous ferons l'honneur de traiter notre mémoire.*

*Nos sincères remerciements s'adressent également à tous les enseignants de faculté des sciences de l'université de Médéa.*

*Un grand merci à tous ceux qui contribué de prés ou de loin à l'élaboration de ce Mémoire.*

***Souad et Ismahan***

# Dédicaces

*Je m'incline devant dieu tout puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes parents : Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux. Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.*

*A ma chère sœur **yamina**: était toujours avec moi et m'a aidé dans le processus de ce mémoire, pour le soutien moral qui me donne tous les jours de ma vie.*

*À mes chers frères : **Abdelkader, Ibrahim, abdenour** et **Djamel**: pour le soutien moral et matériel, l'encouragement et la confiance.*

*A toute la famille MESKINE et la famille BENLAKHDAR.*

*A mon binôme : ismahan et sa famille pour le quel je souhaite une vie pleine de joie et de réussite.*

*A tous mes enseignants : Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.*

*A tous mes amis et mes collègues : Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.*

*A tous ceux que je porte dans mon cœur.*

**SOUAD**

3DLAT.CO

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes parents pour leur amour et leur soutien.*

*A mon mari MOURAD qui était toujours à côté de moi.*

*A mes enfants : INTISAR, IBTIHAL ET RAYEN.*

*A mes frères et sœurs, surtout mon frère NOUH.*

*A toute la famille DAMACHE.*

*A mon binôme SOUAD et sa famille pour le quel je souhaite une vie pleine de joie et de réussite.*

*A mes amis et collègues.*

*A tous ceux qui ont contribué au travail de ce travail.*

*ISMAHAN*

3DLAT.CO

**الملخص**

والهدف من هذا العمل هو دراسة فعالية الكيتوزان المستخلص من الكيتين كمادة حافظة لمعالجة اللحوم الطازجة.

ونظرا للخصائص التي يتوفر عليها الكيتوزان في تشكيل الفلم الحيوي ومدى فعاليته على حفظ اللحوم الطازجة قمنا بمجموعة من التحاليل المكروبيولوجية التي اضهرت قدرت الكيتوزان على حفظ اللحم والقضاء على مجموعة من المكروبات.

وكان القصد من دمج زيت الزيتون لتعزيز الفلم الحيوي وجعله أكثركره للماء.

الكلمات المفتاحية الكيتين الكيتوزان زيت الزيتون,الفيلم الحيوي

**Résumé**

Le but de ce travail est d'étudier l'efficacité du chitosane extrait de la chitine comme conservateur pour le traitement de la viande fraîche.

En raison des caractéristiques du chitosane dans la formation du biofilm et de son efficacité dans la conservation de la viande fraîche, nous avons réalisé une série d'analyses microbiologiques qui ont démontré la capacité du chitosane à conserver la viande et à éliminer un groupe de microbes

L'incorporation de l'huile d'olive était dans le but de renforcer le biofilm et le rendre plus hydrophobe.

Mots clé : chitine, chitosane, biofilm ; huile d'olive.

**Abstract**

The purpose of this work is to study the efficay of chitosan extracted from chitin as a preservative for the treatment of fresh meat.

Because of the characteristics of chitosan in the formation of the bio-film and its effectiveness in preserving fresh meat, we have conducted a series of microbiological analyzes that demonstrated the ability of chitosan to conserve meat and eliminate a group of microbes.

The incorporation of olive oil was intended to strengthen the biofilm and make it more hydrophobic.

Keywords: chitin, chitosan, biofilm; olive oil.

## Sommaire

**Introduction générale……1**

PARTIE THEORIQUE

**Chapitre I**

**I. Le bœuf haché……..3**

**I.1.Définition……3**

**I.2.Qualité nutritionnelle du bœuf haché……..3**

**I.3. La microbiologie du bœuf haché…….....3**

**1.3.1. Flore microbienne initiale retrouvée dans le bœuf……....3**

**I.3.2. Sources de contamination……4**

**I.3.2.1.Contamination primaire ou endogène……..4**

**I.3.2.2. Contamination secondaire ou exogène……4**

**I.4. Normes microbiennes en vigueur……6**

**I.5. Bactéries pathogènes et pathogénécité……6**

**I.6. La conservation de la viande……...8**

**I.6.1.Durée de conservation du bœuf haché……..8**

**I.6.2. Méthodes de conservation ancestrales……8**

**I.6.3. Appert, 1809……8**

**I.6.4. La révolution nommée Louis Pasteur……...9**

**Chapitre II**

**II.1.Le chitosane Un nouvel antimicrobien pour la filière viande?.....10**

**II.2.Définition du chitosane……...10**

**II.3. Sources du chitosane……...11**

**II.4. Préparation du chitosane……...12**

**II.4.1.réparation des carapaces……..13**

**II.4.2. Déprotéinisation……...13**

**II.4.3. Déminéralisation……..14**

**II.4.4. Blanchiment……14**

**II.4.5. Désacétylation……..14**

**II.5. Structure chimique du chitosane……..15**

**II.6. Propriétés physico-chimiques du chitosane……16**

**II.6.1. Degré de désacétylation……...16**

**II.6.2. Masse moléculaire……16**
**II.6.3. Cristallinité……...16**
**II.6.4. Comportement du chitosane en milieu acide……16**
**II.6.5. Viscosité……18**
**II.6.6. Flexibilité……..……18**
**II.7. Propriétés de biocompatibilité du chitosane……18**
**II.7.1. Biodégradabilité……...18**
**II.7.2. Toxicité systémique…….19**
**II.7.3. Hémocompatibilité (Compatibilité sanguine)…….....19**
**II.8. Propriétés biologiques…….....20**
**II.8.1. Propriétés antibactériennes……20**
**II.8.2. Propriétés antifongiques……22**
**II.8.3. Propriétés antivirales……..23**
**II.8.4. Propriétés antitumorales…….24**
**II.8.5. Propriétés antioxydantes…….24**
**II.9. Principales applications du chitosane…….....25**
**II.9.1. Domaine agroalimentaire……25**
**II.9.2. Domaines biomédical et pharmaceutique……..26**
**II.9.3. Domaine cosmétique…….....27**
**II.9.4. Domaine agricultural……..28**
**II.9.5. Traitement des eaux……....29**
**II.9.6. Autres domaines d'applications…….30**
**II.10. Législation…….31**
**II.11. Essais sur produit carnes…….31**

PARTIE EXPERIMENTAE

**Chapitre III**

**III. Matériel et méthodes…….32**
**III.1.Objectif…….32**
**III.2.Matériels……32**
**III.2.1.Matériel biologique……32**
**III.2.1.1.La chitine…….....32**
**III.2.1.2. La viande hachée……....32**

**III.2.2.Equipements……...32**
**III.3.Préparation de chitosane……..……32**
**III.4.Les analyses physico-chimiques de chitosane préparé……..33**
**III.4.1.Test de solubilité……..…33**
**III.4.2. Détermination de la DA et DD……..33**
**III.4.3. Préparation des solutions de chitosane utilisées pour la conservation…….33**
**III.5.la conservation de viande hachée par le chitosane produit…….33**
**III.5.1.Préparation de l'échantillon……..33**
**III.5.2. Traitement des échantillons (de la viande hachée) par le chitosane et (chitosane +huile d'olive)…….....34**
**III.6. Analyses microbiologiques……...35**
**III.6.1. Préparation de la dilution mère (DM)……..35**
**III.6.2. Préparation des dilutions décimales…….....36**
**III.6.3. Recherche et dénombrement des Germes Aérobie Mésophile Totaux (GAMT)..36**
**III.6.4. Recherche des coliformes totaux et fécaux……..38**
**III.6.5. Recherche d'E. Coli……..….....39**
**III.6.6. Recherche des Staphylococcus aureus…….39**
**III.6.7. Recherche des Clostridium sulfito-réducteur ……40**
**III.6.7. Recherche des salmonelles…….40**

**Chapitre IV**

**IV. 1. Caractérisation du chitosane produit…….....42**
**IV. 1. 1. Test de solubilité…….....42**
**IV. 1. 2. Détermination du DD par spectroscopie infrarouge…….42**
**IV. 2. Analyses microbiologiques…….....42**
**IV. 2. 1. Évaluation de la contamination microbienne de la viande étudiée…….42**
**IV. 2. 1. 1. La flore mésophile totale…….42**
**IV. 2. 1. 2. Les coliformes totaux et coliformes fécaux…….43**
**IV. 2. 1. 3. La recherche de *Staphyloccus aureus,* Clostridium sulfito-réducteur et salmonelles……...…44**
**IV. 3. Analyses organoleptique…….…45**
**IV. 4. Discussion…….....45**
**Conclusion générale……49**

## Liste des figures

### Chapitre II

**Fig. II.1.** les quatre classes des biopolyméres d'origine naturelle.

**Fig. II.2.** procédé de la fabrication de chitine et chitosane (Onsoyen et Skaugrud, 1990)

**Fig. II.3.** Structure chimique de la chitine (a), du chitosane (b) (Olteanu et Enescu, 2007)

**Fig. II.3.** Structure chimique de la chitine (a), du chitosane (b) (Olteanu et Enescu, 2007)

### Chapitre III

**Fig. III.1.**Les étapes de préparation de Chitosane.

**Fig.III.2.** Teste de solubilité de chitosane

**Fig. III. 3.** Les étapes de préparation des échantillons prélèvement

**Fig.III.4.** Etapes de conservation de viande hachée par le chitosane et le mélange (chitosane + huile d'olive)

**Fig.III. 5 .**Préparation de la dilution DM

**Fig. III.6**.étapes de la préparation des dilutions décimales

**Fig.III.7.**procède de recherche et dénombrement des Germes Aérobie Mésophile Totaux (GAMT)

**Fig.III.8.**recherche de salmonelle

### Chapitre IV

**Fig. IV.1.**Variation du nombre de la flore mésophile totale en fonction du temps des échantillons témoin et traités

**Fig. IV.2.**Variation du nombre des coliformes totaux en fonction du temps des échantillons témoin et traités

**Fig. IV.3.**Variation du nombre des coliformes fécaux en fonction du temps des échantillons témoin et traités

**Fig. IV.4:**L'aspect de la viande hachée (a) sans traitement (b) avec traitement (chitosane 3%+ huile d'olive)

**Fig. IV.5.**biofilm (a)( chitosane 3%) , (b) (chitosane 3%+ huile d'olive)

## Liste des tableaux

### Chapitre I

**Tableau I.1.** Normes d'acceptabilité de la viande hachée.

### Chapitre II

**Tableau II.1.** Corrélation entre les valeurs DD et la solubilité du chitosane à pH 6 (Thanou et Junginger, 2005)

**Tableau II.2.** Concentrations minimales inhibitrices de quelques bactéries par le chitosane

**Tableau II.3.** Concentrations minimales inhibitrices de quelques moisissures par le chitosane

**Tableau II.4.** taux d'inhibition de quelques souches fongiques en fonction de la concentration du chitosane (La flamme et al. , 1999)

**Tableau II.5.** Applications du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique (Crini, 2006)

**Tableau II.6.** applications du chitosane dans le domaine de l'environnement (Gerente et al. , 2007)

**Tableau II.7.** Autres domaines d'applications du chitosane (Crini, 2006)

**Liste des abréviations**

DA : Degré d'acétylation

DD : Degré de désacétylation

DO : Densité optique

IR : Infra rouge

°C : Degré Celsius

PCA : Plate Count Agar

CF : Coliforme Fécaux

UFC : Unité Format Colonie

VRBG : Gélose glucosée au cristal violet, au rouge neutre et à la bile

VRBL : Gélose lactosée au cristal violet, au rouge neutre et à la bile

VF : Gélose Viande foie

CF : Coliforme Fécaux

ENT : Entérobactéries

FAMT : Flore Aérobie Mésophile Total

MM :masse molaire

# INTRODUCTION GENERALE

La biopréservation des aliments fait appel à des microorganismes ou à des «composés naturels» par opposition à l'utilisation de conservateurs dits «chimiques» classiquement employés dans les industries agro-alimentaires. 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.

Le chitosane répond à ces critères car c'est un biopolymère non toxique, biocompatible, bioactif et surtout biodégradable obtenu par désacétylation d'un polysaccharide très répandu dans le milieu naturel : la chitine.

La chitine est un constituant très répandu dans le milieu naturel et est considérée comme le polysaccharide le plus abondant après la cellulose. Elle représente le constituant essentiel du squelette externe des crustacés, scorpions, insectes, et de l'endosquelette des céphalopodes. Elle se trouve également dans la paroi des champignons et de certaines algues. Actuellement, la production de chitine se fait essentiellement par traitement chimique ou biotechnologique des carapaces de crevettes et de plumes de calamars.

A cause de son insolubilité dans les solutions aqueuses, la chitine est généralement utilisée pour la production de chitosane dont le degré dedésacétylation 50%. Hydrosoluble dans les solutions acides, ce polymère cationique a la capacité de chélate des composés anioniques. Les applications actuelles sont très larges puisqu'il est utilisé aussi bien pour le traitement de dépollution des eaux, en cosmétique et en nutraceutique.

Outre ces applications variées, le chitosane intéresse de plus en plus les industries alimentaires pour ses propriétés antimicrobiennes, incluant des espèces bactériennes et fongiques. L'utilisation du chitosane comme antimicrobien, notamment dans la filière viande, peut également se justifier par son pouvoir antioxydant plus récemment identifié (Saunier et al., 2010). L'attention donnée aux méthodes à petite échelle a pour but d'aider les familles à stocker leur surplus tout en gardant à l'aliment sa valeur nutritionnelle et hygiénique mais de façon économique (Benaissa, 2011).

La viande est en effet une matrice alimentaire très sensible aux phénomènes de contamination microbienne et d'oxydation. C'est dans ce contexte qu'une étude a été menée sur de la viande hachée bovine afin d'évaluer les propriétés antimicrobiennes du chitosane en matrice carnée.

Pour se faire, nous avons articulé notre travail autour de trois chapitres. Le premier est consacré à une synthèse bibliographique sur la qualité nutritionnelle, La microbiologie et la conservation de la viande hachée bovine. Dans le deuxième chapitre, on a présenté la définition, les propriétés et les applications de la chitine et le chitosane. Dans le troisième chapitre on a

Présenté le matériel et méthodes utilisés pour la réalisation de notre travail. Dans le dernier chapitre on a présenté les résultats obtenus ainsi que leur discussion et nous achevons notre étude avec une conclusion et des perspectives.



# PARTIE THEORIQUE





# CHAPITRE I



# I. Le bœuf haché

## I.1.Définition

Le bœuf haché est un aliment cru d'origine animale (ACOA). En fait, ce type d'aliment doit être de la viande de bœuf finement hachée et doit contenir au plus 30 % de gras de bœuf. C'est ainsi qu'est défini le bœuf haché dans la Loi sur les aliments et drogues administrée par Santé Canada ainsi que par la FDA américaine.

## I.2.Qualité nutritionnelle du bœuf haché

Chimiquement parlant, un muscle de bœuf maigre est constitué de 75% d'eau, de 18% de protéines, de 3% de lipides, d'environ 1% de sucres et de 3% d'autres substances (sodium, potassium, fer, zinc, thiamine, riboflavine, niacine, vitamines B6 et B12) . La viande hachée maigre doit posséder un maximum de 17% de gras, la viande hachée mi-maigre 23% et le bœuf haché normal, un maximum de 30% de matières grasses. La viande crue possède un $A_w$ de 0.99, ce qui est très favorable à la croissance de la grande majorité des microorganismes. Le pH du bœuf haché cru se situe quelque part entre 6.5 et 7.0 (Sillikeret al., 1980).

## I.3. La microbiologie du bœuf haché

### 1.3.1. Flore microbienne initiale retrouvée dans le bœuf

Il est remarqué que, chez un gros bœuf adulte et en bonne santé, les tissus qui sont destinés à être transformés en viande et autres produits carnés sont stériles (Ouattara, 1998). En outre, l'aponévrose conjonctive, sorte d'enveloppe recouvrant les muscles des carcasses, est une première barrière que traversent très difficilement les microorganismes. C'est à partir des étapes subséquentes à l'abattoir (opérations d'éviscération, de désossage-découpage, parage et tranchage) que la contamination survient et elle se poursuit au cours de toutes les étapes de transformation qui préparent la viande pour la consommation .C'est la mise en présence des tissus internes de l'animal avec l'environnement externe qui crée les contacts avec les microorganismes. La surface des carcasses forme un excellent substrat pour d'innombrable bactéries (on peut en retrouver quelques millions par centimètre carrés) et autres envahisseurs en leur fournissant de multiples substances nutritives ainsi que des valeurs de $A_w$ et de pH adéquates. Ainsi, leur multiplication se voit accélérée. Cette croissance effrénée favorise donc la détérioration des aliments et le développement de souches bactériennes pathogènes pour l'humain . Les principaux microorganismes responsables de l'altération de la viande sont les *Pseudomonas,* les *Enterobacteriaceae* et certaines espèces de bactéries lactiques

### I.3.2. Sources de contamination

La quantité de bactéries présente dans le bœuf haché dépend du niveau de contamination initial aussi bien que de différents facteurs environnementaux. Avec l'implantation du système HACCP dans l'industrie de nombreux pays, qui préconise l'anticipation et la prévention des problèmes (ICMSF, 1998 ; MFSC, 1992), les nombreuses sources de contamination de la viande sont maintenant bien documentées. Elles sont donc catégorisées en deux types.

#### I.3.2.1.Contamination primaire ou endogène

L'ensemble des microorganismes qui entrent dans cette catégorie proviennent de l'animal vivant. Par exemple, immédiatement après le dépeçage du bœuf, la carcasse sera contaminée par les bactéries vivant sur la peau de l'animal ainsi que plusieurs autres provenant du sol ou de la végétation dans l'environnement du bétail et même de ses matières fécales. Plusieurs genres de bactéries psychrotrophes tels *Achromobacter, Microbacterium,Micrococcus,Flavobacterium* et *Pseudomonas* (Newtonet al., 1978) sont retrouvés sur la carcasse immédiatement après le dépeçage. Quelques espèces mésophiles appartiennent aussi de cette flore*:Staphylococcus* spp.et *Bacillus* spp.

L'éviscération est une autre source de contamination potentielle puisqu'il est fréquent de couper le tube digestif de l'animal au cours de cette manipulation. Les Enterobacteriaceae peuvent être alors mis en contact avec la viande destinée à la consommation humaine. Les autres organes internes comme les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et la vessiesont autant de sources de contamination possibles (Ouattara, 1998).

#### I.3.2.2. Contamination secondaire ou exogène

La contamination secondaire, quant à elle, est causée par les microorganismes qui sont étrangers à l'animal. C'est durant les différentes manipulations qui amènent la viande de l'abattoir aux points de vente (abattoir, coupe, transport) que les microorganismes qui souillent les lames des couteaux et les autresaccessoires (scies, gants, crochets, murs des réfrigérateurs, etc.) seront transférés à la viande. Par exemple, (Stringeret al. 1969) démontrent que les murs et les plateaux de coupe dans les salles de désossement sont
des sources de contamination potentielles de la viande. Plus tard,( Newtonet al. 1978) démontrent que le sol des réfrigérateurs est aussi une importante source de contamination. Même si la viande ne vient pas

directement en contact avec le plancher, les particules de poussières sont porteuses des différents microbes et c'est ce qui contaminera les produits carnés Afin de continuer dans cette veine, des

études furent effectuées dans différents abattoirs qui démontrent que l'air est une source de contamination. En absence de précautions, les mouvements aériens peuvent facilement transporter les bactéries d'un endroit souillé vers un lieu qui doit être normalement propre, amenant ainsi la contamination de la viande.

L'accroissement de cette contamination peut être grandement prévenue (mais non inhibée) si la température ambiante est maintenue entre 1,5°C et 5°C pour la durée des manipulations. ont démontré que la durée de conservation du bœuf haché peut être significativement augmentée si toutes les opérations se font à une température n'excédant jamais -1,7°C. Les mains souillées des travailleurs vont contribuer à l'augmentation de la flore mésophile et les équipements mal stérilisés seront responsables de l'apport de microorganismes psychrotrophes .

De plus, les endroits humides qui viennent en contact avec d'autres sources de contamination (comme le cou) sont plus fortement contaminés que les parties plus sèches, par exemple l'échiné. Les bactéries se multiplient plus rapidement lorsque le $A_w$ est élevé Si de bonnes conditions hygiéniques sont respectées pour l'ensemble de la chaîne de production, le nombre moyen de bactéries sur le bœuf sera moins de $10^3$ UFC/$cm^2$ avec une flore constituée de moins de 5% d'organismes responsables de la putréfaction de la viande. Par contre, le bœuf haché est dans une situation particulière. Il est manipulé beaucoup plus que les autres types de coupe (surlonge, filet mignon). Le hachoir, composé de plusieurs lames (autant de sources de contamination potentielles), réduit le bœuf en très petits morceaux, donc la surface d'exposition aux lames est grandement augmentée ce qui cause
une plus grande contamination. Il n'est donc pas rare d'échantillonner $10^6$-$10^7$ UFC $g^{'1}$ bactéries dans le bœuf haché (Gill et Greer, 1993).

La flore microbienne du bœuf haché, lorsque mis en vente dans les supermarchés, est fortement composée par des bactéries responsables de l'altération de la viande. Cette flore sera principalement constituée par l'espèce qui se reproduit le plus rapidement dans les conditions de conservation du bœuf. Lorsque celui-ci est conservé à l'air libre et à une température froide (environ 4°C),*Pseudomonas sp.* dominera généralement la flore microbienne, mais il y aura aussi quelques *Acinetobacter* et *Moraxella.* Les entérobactéries (anaérobes facultatifs) et *Brochothrix themosphacta* (microaérophiles) sont susceptibles d'être retrouvés si la viande est malencontreusement en contact avec ces espèces au cours des manipulations. La flore microbienne aérobique causant le périssement du bœuf assure sa croissance en utilisant les composés de faible poids moléculaire de la viande. Par exemple,*Pseudomonas* utilise le glucose. Lorsque la charge microbienne est devenue trop importante et que le glucose est entièrement

consommé,*Pseudomonas* changera de substrat et se tournera vers les acides aminés. Ce sont les produits de dégradation de ceux-ci qui causent les odeurs nauséabondes, signe que le bœuf haché est

fortement contaminé .

Si le bœuf haché est conservé sans oxygène, la flore microbienne sera modifiée. Les *Lactobacillus, Leuconostoc* et *Carnobacterium* seront les populations dominantes. Encore une fois, les entérobactéries,*Brochothrix thermosphacta* et *Shewanella putrefaciens* pourront être retrouvés. Les trois groupes dominants acidifieront le milieu jusqu'à environ pH 5 tandis que les autres, en quantité moindre, causeront l'apparition de produits de dégradation très nocifs .

### I.4. Normes microbiennes en vigueur

Des normes microbiologiques sévères servent à décider si une viande est bonne pour la consommation ou non. Ces normes, émises par le CUMAIRA (Comité sur l'uniformisation des méthodes d'analyses et l'interprétation des résultats analytiques) en 1995 à la demande du MAPAQ (Ministère de l'agriculture, des Pêcheries et de l'alimentation du Québec), sont recensées dans un recueil de méthodes microbiologiques. Le tableau 1 présente les normes relatives à la viande hachée.

**Tableau I.1.** Normes d'acceptabilité de la viande hachée.

| Bactéries | n | c | m | M |
|---|---|---|---|---|
| Numération aérobie mésophile | 5 | 3 | $1,0 \times 10^1$ | $1,0 \times 10^1$ |
| E.coli | 5 | 2 | $1,0 \times 10^2$ | $1,0 \times 10^2$ |
| S. aureus | 5 | 2 | $1,0 \times 10^3$ | $1,0 \times 10^4$ |
| Salmonella | 5 | 0 | absence | - |

**Note :**Critères exprimés en bactéries/gramme à l'exception de Salmonellaexprimé par 25 grammes.
n : nombre d'échantillons analysés
c : nombre maximal d'échantillons pouvant présenter des valeurs se situant entre m et M m :
échantillon acceptable si le résultat est égal ou inférieur à cette valeur M : seuil limite d'acceptabilité, aucun échantillon ne doit dépasser cette valeur

### I.5. Bactéries pathogènes et pathogénécité

Ce sont surtout les entérobactéries qui causent les principaux problèmes de pathogénécités. *Les Salmonella, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni, Vibrio etYersinia* sont la plupart du temps inoffensives chez l'animal, mais sources de maladies pour l'homme.

Le principal symptôme d'une infection bactérienne est sans aucun doute la diarrhée suivi d'une déshydratation. Selon la pathogénécité de la bactérie responsable de la contamination ainsi que de l'état de santé et de la résistance de l'hôte, cette diarrhée sera aiguë ou, dans les cas plus sérieux, chronique et pouvant même mener à des séquelles plus graves. Les personnes les plus à risque sont les très jeunes enfants, les gens âgés et les immunodéprimés ou les individus souffrant de certaines maladies (*cirrhose*, *hépatite*).

Les intoxications alimentaires aux *Staphylocoques* sont une des plus communes aux Etats-Unis. C'est sans doute parce que *S. aureus* est retrouvé dans le nez et la gorge, sur la peau et les cheveux de plus de 50% des humains sains mais aussi sur la peau et la fourrure des animaux, qu'une contamination croisée peut se produire assez aisément et qu'ainsi la bactérie se retrouve dans le système digestif des humains. De plus, la croissance de *S. aureus* est assurée dans les aliments riches en protéines comme les viandes et les produits carnés, la volaille, les poissons, le lait et les produits laitiers, les salades de toutes sortes et plusieurs pâtisseries . Il est important de savoir queS. aureusest un mauvais compétiteur et que cette bactérie est habituellement éliminée par la flore normale des aliments crus. De plus, l'acidité (de la mayonnaise par exemple) élimine ce pathogène. Par contre, une fois mélangée dans une salade, l'effet tampon de l'aliment annulera l'action inhibitrice d'un pH acide contre cette bactérie.S. aureus peut résister à de fortes concentrations de sel (10-20%) et de sucres (50-60%). Ce microorganisme est aussi tolérant au nitrite. Sa température optimale de croissance se situe entre 35 et 37°C, mais il peut croître à une température aussi élevée que 47.5°C et aussi faible que 6-7°C. Sa croissance est même possible à un $A_w$ de 0.86 et dans une atmosphère dont la teneur en oxygène est réduite .

D'une part, plusieurs espèces de *Staphylocoques* ont la capacité de produire des toxines thermostables (A, B, C, C2, D et E). Ces toxines sont responsables de gastroentérites sévères. D'autre part, la période d'incubation de ce pathogène est très courte variant entre 30 minutes et 8 heures après la consommation de viandes contaminées. Les principaux symptômes de l'infection sont l'apparition de nausées, des vomissements, crampes abdominales, transpiration, un pouls faible, état de choc, respiration superficielle et des températures sous la normale. La croissance d'un million de bactéries serait nécessaire à l'obtention d'une quantité de toxines suffisante pour induire les symptômes énumérés ci-haut .

## I.6. La conservation de la viande

### I.6.1.Durée de conservation du bœuf haché

Le bœuf haché frais a une durée de vie d'à peine deux jours lorsqu'il est conservé dans un réfrigérateur conventionnel et dans une atmosphère aérobique. Cette rapide détérioration est causée par les microorganismes responsables de l'altération retrouvée dans la viande de bœuf . Au Canada, le périssement des viandes occasionne des pertes économiques de l'ordre de 200 M$ aux détaillants.

Facteurs qui influencent la durée de conservation du bœuf haché

Plusieurs facteurs influencent la durée de conservation du bœuf haché. Le principal est sans doute la charge microbienne retrouvée initialement sur le morceau de viande. Plus la flore microbienne sera importante, plus courte en sera la durée de conservation (Robert et Weese, 1998). La température et l'atmosphère de conservation de la viande sont d'autres facteurs très importants à considérer.

### I.6.2. Méthodes de conservation ancestrales

Durant la préhistoire, l'espèce humaine, encore à ses premiers pas, se rapprochait plus de l'animal que de l'Homme tel qu'on le connaît maintenant. L'instinct dictait donc àcet homme primitif d'être en quête continuelle de nourriture afin d'assurer sa subsistance et celle de ses semblables. Sa principale occupation était donc de chasser ou de partir à la recherche de quelques petits fruits. Il devait manger rapidement toute sa récolte s'étant vite aperçu que les restes pourrissaient, sentaient mauvais et n'étaient plus agréables au goût dès le lendemain. Avec l'évolution de l'espèce et surtout l'avènement de l'agriculture et de la sédentarité des populations,*Homo sapiens* a dû développer différentes méthodes pour préserver les aliments.

Aucun écrit ne relate les débuts de la conservation de la viande et du poisson par fumage ou séchage solaire. Cependant, le principe de ces techniques était déjà connu lorsque le sel fut utilisé pour la première fois en 3000 av. J-C au Moyen-Orient comme méthode de conservation de la viande. Les fromages et le lait caillé virent aussi le jour. Au cours des siècles suivants, malgré tous les efforts investis dans cette optique, aucune découverte ne vint améliorer les conditions de conservation alimentaire.

### I.6.3. Appert, 1809

Pendant ce temps, la population connaissait une croissance assez impressionnante principalement due aux nombreux progrès technologiques. Les grands chefs d'états décidèrent donc de partir à la conquête de nouveaux territoires. Ces coins de pays à conquérir étant éloignés, les troupes devaient partir durant de nombreux mois, mais les moyens de conservation de la nourriture à cette époque n'étaient pas

suffisamment efficaces pour permettre de tels voyages. En 1795, le gouvernement français, face à un problème d'approvisionnement de ses troupes, pensa à récompenser l'inventeur d'une méthode permettant la conservation de la fraîcheur et des qualités nutritives de la viande et des légumes durant plusieurs mois. Nicolas Appert, un brasseur et vignoble, se demanda s'il était possible de garder la nourriture dans une bouteille comme il le faisait avec le vin. Après 15 années d'expérimentations, soit en 1809, il réussit enfin à démontrer qu'en entassant de la nourriture partiellement cuite dans des bouteilles en verre scellées par un bouchon de liège et en laissant ces bouteilles dans de l'eau bouillante durant un certain temps, il était possible de conserver cette nourriture durant de nombreuxmois. L'empereur Napoléon Bonaparte en personne lui remit le prix de 12 000 francs attribué au vainqueur. En 1810, Peter Durand, un anglais, émet un brevet en améliorant la méthode d'Appert. Son idée était simple: comme le verre est dispendieux, lourd et cassable, il doit être possible de conserver les produits alimentaires dans des récipients en étain qui sont pratiquement incassables et beaucoup moins encombrants. C'est donc ce qu'il démontra et les premières boîtes de conserve firent leur apparition (Prescottet al., 1995).

### I.6.4. La révolution nommée Louis Pasteur

C'est encore ce même gouvernement français qui demanda à Louis Pasteur (18221895) d'effectuer des recherches afin de découvrir les causes de l'altération du vin au cours de sa fermentation. Pasteur réussit à démontrer que la croissance de germes parasites lors de la fermentation du vin ou du lait occasionnent ces malencontreux problèmes. Il s'emploie donc à trouver une solution et met au point une technique permettant de réduire le niveau de contamination initial par chauffage à 55-60°C durant quelques minutes en l'absence d'oxygène. Ce sont les premiers pas de la pasteurisation ( Schwartz, 2001).

Par la suite, beaucoup de recherches furent réalisées afin de développer les innovations d'Appert et de Pasteur. L'industrialisation du cannage et les nouvelles procédures faisant appel à la température pour assurer l'innocuité des aliments comme le UHT (ultra haute température) et le HTST (high temperature short time) sont des exemples des progrès effectués dans ce domaine. La déshydratation, l'ajout de substances chimiques, l'irradiation, l'application de fortes pressions, l'inoculation des aliments par des bactéries lactiques ou leurs métabolites (par exemple les bactériocines), les enrobages à diffusion contrôlée et les emballages intelligents (emballages permettant entre autre d'enregistrer le couple temps-température durant le transport d'un aliment afin d'assurer aux consommateurs des produits de première qualité) sont des méthodes plus ou moins récentes de conservation des aliments (Ouattaraet al., 2002; Prescott et al., 1995). Récemment, beaucoup de travaux de recherches ont été effectués pour comprendre etélucider les mécanismes d'action des bactéries probiotiques qui sont non seulement utilisées pour assurer la salubrité alimentaire mais aussi afin de préserver la santé humaine.



# CHAPITRE II



## II.1.Le chitosane Un nouvel antimicrobien pour la filière viande?

La bio préservation ou bio protection est une méthode de conservation des aliments faisant appel à des micro-organismes ou à des «composes naturels» par opposition à l'utilisation de conservateurs dits «chimiques» classiquement utilisez dans les industries agroalimentaires. Comme toute autre méthode de conservation, les antimicrobiens '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 des adurées de vie.a ce jour, il existe différentes voies possibles pour la bio préservation:

- les micro-organismes tels que les bactéries lactiques;
- les bactériocines qui sont des peptides bactériens. Seule la nisine fait l'objet d'une autorisation d'utilisation limitée Dans les ecteurlaitier;
- les bactériophages: virus capables d'infester et de se multiplier dans les bactéries;
- les systèmes enzymatiques naturels tels que les systèmes lactoperoxydase;
- les composés naturels comme les épices, les huiles essentielles ou encore le chitosane. Pour limiter le développement des bactéries pathogènes et d'altération, les Américain sont recours à différentes méthodes de décontamination : acides, vapeur, bactéries lactiques,… Procédés non autorisés en Europe. L'emploi d'antimicrobiens d'origine naturelle offre donc une piste intéressante pour la filière viande en vue de maîtriser d avantage l'écosystème des produits carnés. Par ailleurs, le caractère bio source de ces composés qui répond à une attente en pleine croissance de la part des consommateurs les promet à un bel avenir .parmi les polysaccharides d'intérêt pour l'homme la chitine et ses principaux dérivés le chitosane occupent une place de plus en plus importante.

## II.2.Définition du chitosane

Le chitosane est un biopolymère de source principalement marine. En général, les biopolyméres sont une classe de polymères produits par les organismes vivants : végétaux, animaux et microorganismes. Ce sont des macromolécules biologiques biodégradables renouvelables qui sont formées par la polymérisation de molécules plus simples ou monomères reliés entre eux par des liaisons dites «covalentes ». Les polysaccharides (celluloses et dérivés, amidons et dérivés, chitine et chitosane, etc.), les protéines (gélatine, gluten, etc.), les composés lipidiques (cires, acides gras et dérivés, etc.), l'ADN et l'ARN sont tous des exemples de biopolyméres, dans lesquels les unités monomères, respectivement, sont des sucres, des acides aminés, des acides gras ou des acides nucléiques. Les biopolyméres d'origine naturelle peuvent être classés en quatre classes comme le montre la (Figure II.1) (Tharanathan, 2003).

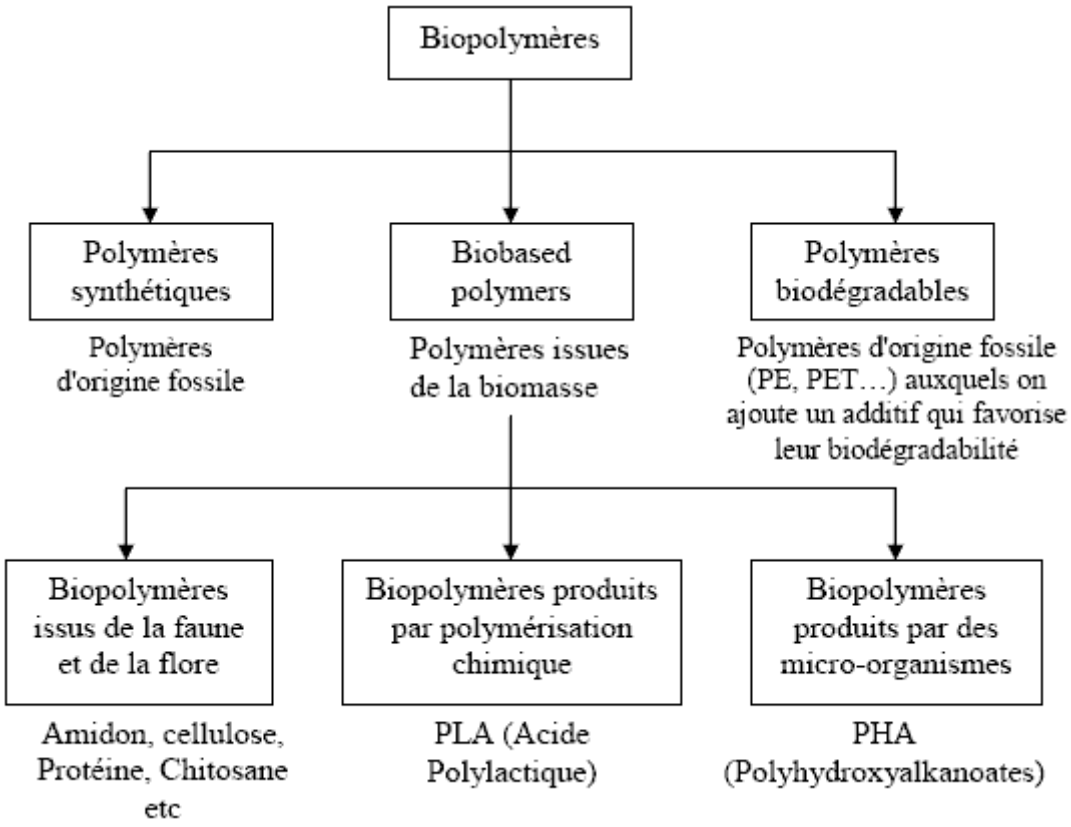



**Fig.II.1.** Organigramme des différentes familles de biopolymères

### II.3. Sources du chitosane

En 1811, le Pr. Henri Braconnot, Directeur du jardin biologique à Nancy (France) a isolé une substance fibreuse d'un certain type de champignon, qu'il a appelée "fongine". De plus, il a observé que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses acides. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (coléoptère) et a été ensuite nommée chitine (provient du mot grec "kitos" qui signifie « enveloppe ». En 1859, le Pr. C. Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a Zéine Lactosérum observé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultat du traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. Cependant, c'est seulement en 1894 que cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler. La production du chitosane a débuté en 1920, mais sa structure chimique n'a été identifiée que 50 ans plus tard grâce à la cristallographie et la spectroscopie infrarouge (Muzzarelli R.A.A et al. , 1986). Depuis quelques années, les biotechnologies marines ont suscité un intérêt croissant qui s'est notamment centré sur la chitine et ses dérivés, le chitosane étant le principal .Il s'agit donc d'une source renouvelable de matériau biodégradable. Les récents progrès réalisés dans l'étude de la fabrication du chitosane et de ses propriétés ainsi que la découverte d'un grand nombre d'applications potentielles ont favorisé cet engouement.

Le chitosane est une substance très peu répandue dans la nature. Il est rare et n'est présent que dans les parois cellulaires d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes (Rhizopus, Mucor …) de bactéries et de levures et chez certains insectes comme dans la paroi abdominale des reines termites, Il n'y a donc pas de source primaire de chitosane exploitable. La source majeure du chitosane vendu commercialement provient de la désacétylation de la chitine obtenue à partir de crustacés. La production de la chitine (et du chitosane) provient, en effet, des crevettes et des crabes qui représentent les deux sources naturelles les plus abondantes. Ce sont donc des produits d'origine animale. Néanmoins, de nouvelles voies alternatives sont apparues par exemple, la production du chitosane à partir du champignon de *Mucor rouxii*(Tayel et al., 2010), en raison notamment des inquiétudes sanitaires liées aux maladies animales.

### II.4. Préparation du chitosane

Les déchets de l'industrie des crustacés sont une source très importante de chitine et de chitosane. De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, ces méthodes consistent à éliminer les protéines (Déprotéinisation), les éléments minéraux (déminéralisation), la couleur (blanchiment) et les groupements d'acétamides (désacétylation).

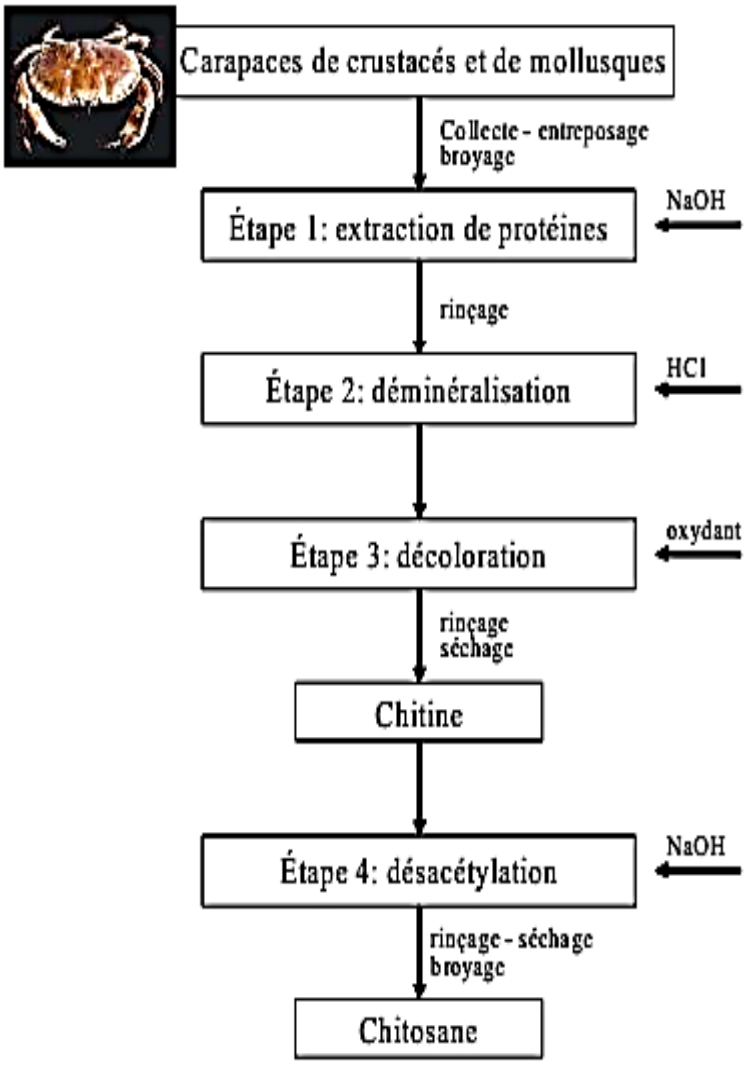



**Fig.II.2.** procédé de la fabrication de chitine et chitosane (Onsoyen et Skaugrud, 1990)

### II.4.1.réparation des carapaces

La matière première est constituée de carapaces de crevettes. La langouste ou le crabe peuvent aussi être utilisés. Dès leur récupération, les carapaces sont lavées et conservées sur de la glace (3°C). Elles sont ensuite séchées dans un flux d'air à 103 °C pendant 20 heures puis broyées de façon à obtenir des particules dont la taille est de l'ordre du millimètre. Plus les carapaces sont finement broyées, plus les réactions ultérieures seront complètes.

### II.4.2. Déprotéinisation

Les protéines, associées à la chitine, sont extraits par des solutions alcalines diluées à chaud. Cette procédure consiste à faire bouillir les copeaux de carapaces dans une solution alcaline (NaOH à 3 %) sous agitation pendant une heure. Cette Déprotéinisation peut également être accomplie par voie

enzymatique au moyen d'une protéase pendant 6 heures à 60 °C sous agitation et dans un milieu maintenu à pH 7.

### II.4.3. Déminéralisation

Les matières minérales, surtout composées de carbonate de calcium, sont éliminées par une solution d'acide chlorhydrique 1 N à température ambiante. La décalcification des carapaces se produit selon la réaction suivante (1):

$$CaCO_3 + 2\ HCl \rightarrow CaCl_2 + CO_2 + H_2O \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

Le résidu est collecté par filtration et rincé à l'eau déminéralisée. Il peut être effectué un Traitement supplémentaire à l'éthanol afin d'éliminer les composés lipidiques. Il est ensuite séché à l'étuve à 65 °C pendant 16 heures. Une telle décalcification de la chitine permet d'obtenir un produit final avec un pourcentage de matières minérales compris entre 0,6 et 0,7 %. Si cette étape de déminéralisation n'était pas réalisée, le chitosane renfermerait entre 31 et 34 % de matières minérales.

### II.4.4. Blanchiment

A la fin des deux traitements (Déprotéinisation et déminéralisation), il peut subsister une coloration due à des pigments résiduels (Rinaudo, 2006). Ainsi, une étape de décoloration est effectuée par un agent oxydant ($KMnO_4$, NaOCl ou $H_2O_2$) avec un risque de dépolymérisation et/ou d'oxydation des unités situées aux extrémités de la chaîne polymérique.

### II.4.5. Désacétylation

La désacétylation consiste en l'hydrolyse des groupements acétyles de la chitine. Le produit est introduit dans un réacteur avec une solution de NaOH à 50 % et chauffé à 145 °C- 150 °C pendant 5 à 15 minutes. La réaction est la suivante (2) :

$$\underset{\text{Chitine}}{R\text{-}NH\text{-}CO\text{-}CH_3} + N_aOH \xrightarrow{\quad\quad} \underset{\text{Chitosane}}{R\text{-}NH_2} + CH_3COON_a \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2)$$

La réaction a lieu sous atmosphère inerte (N2) et sous agitation. La quantité de soude à 50 % doit être cinq fois supérieure en poids à la quantité de chitine déterminée par mesure de la matière sèche. Le mélange bouillant est ensuite refroidi à l'eau froide. Le chitosane est collecté par filtration, lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité du mélange. Il est finalement séché dans un flux d'air chaud à 65 °C

pendant 16 heures. Le chitosane obtenu présente un degré de désacétylation d'environ 90 % (No et Meyers, 2000).

L'agressivité et le peu de maîtrise de la désacétylation de la chitine par voie chimique ont motivé l'intérêt d'explorer et de développer d'autres alternatives telle que l'utilisation d'enzymes. Il a été possible d'atteindre des degrés de désacétylation (DD) par voies enzymatiques (en utilisant la chitine désacétylase ou l'acétyle xylane estérase) comparables aux traitements basiques, soit prés de 75 % de désacétylation en 28 heures (Ayeet al. , 2006).

Cette technique est intéressante mais ne permet pas pour l'instant de développements au niveau industriel. En effet, l'utilisation d'enzymes n'est pas viable car elle représente des quantités et des coûts trop élevés.

### II.5. Structure chimique du chitosane

Le chitosane (Figure II.3) est un copolymère composé de 2-acétamido-2-désoxy-β-D glucose et de 2-amino-2-désoxy-β-D-glucose en proportions variables. En fonction du degré de désacétylation, la molécule est appelée chitine ou chitosane. La chitine, à l'état naturel, est elle-même désacétylé à 5 ou 15 % (Muzzarelli R.A.A et al. , 1986). Il est généralement admis qu'une quantité d'amine supérieure à 7 % permet de distinguer le chitosane de la chitine.

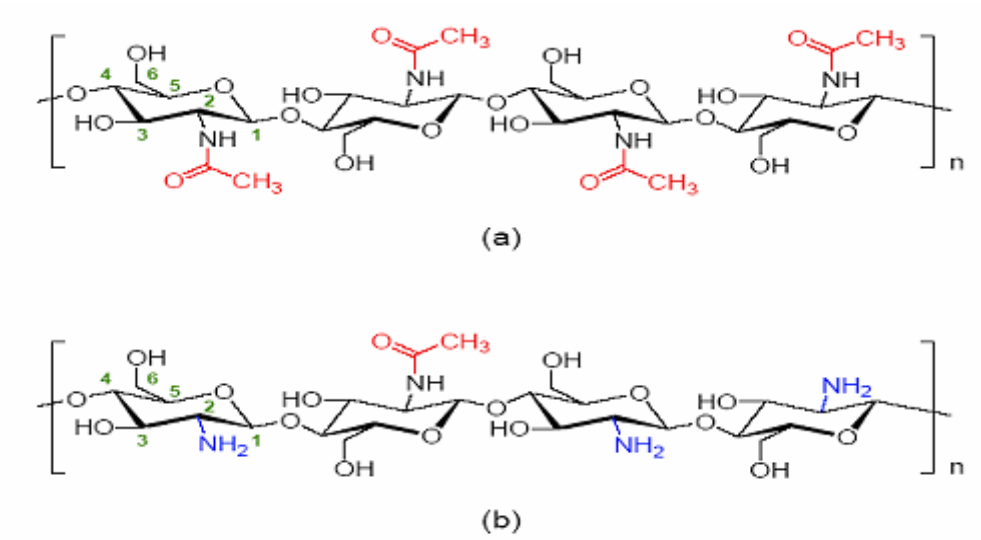



**Fig. II.3.** structure chimique de la chitine (a), du chitosane (b) (Olteanu et Enescu, 2007)

## II.6. Propriétés physico-chimiques du chitosane

### II.6.1. Degré de désacétylation

Le traitement alcalin de la chitine conduit généralement à une désacétylation partielle. Le degré de désacétylation (DD) du chitosane est extrêmement important car il influence les propriétés des chaînes macromoléculaires des polymères et leur comportement en solution comme la solubilité du chitosane, la flexibilité des chaînes macromoléculaires, la conformation du polymère et par conséquent la viscosité des solutions. De nombreuses méthodes ont été proposées pour déterminer le DD sur des échantillons solides : la spectroscopie IR , l'analyse élémentaire , la RMN du solide , ou sur des échantillons en solution : dosage UV (Louet al. , 2011), RMN du liquide .

### II.6.2. Masse moléculaire

Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire (MM) de l'ordre de 100-500 kDa. La détermination de la MM peut se faire par des mesures viscosimétriques, par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée àdifférentes techniques de détection (MALLS) (réfractométrie, microviscosimétrie, diffusion statique de la lumière multi-angle). Les masses de chitosanes dépendent, en fait, du type d'application désirée.

### II.6.3. Cristallinité

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

### II.6.4. Comportement du chitosane en milieu acide

Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques et il est une base faible présentant un pKa voisin de 6,3. Il se dissout en milieu acide par protonation des fonctions amine présentes sur la macromolécule (Sorlieret al. , 2001). En dessous de ce pKa, les groupements amines sont protonés et font du chitosane un polyélectrolyte cationique, soluble dans l'eau acidifiée . Au-dessus du pKa, les groupements amines sont déprotonés et le chitosane est insoluble dans l'eau (Figure

II.4). Le pKa du chitosane dépend du degré de neutralisation des groupes NH3+et du DD. En général, la valeur du pKa augmente quand le DD diminue (Sorlieret al. , 2001).

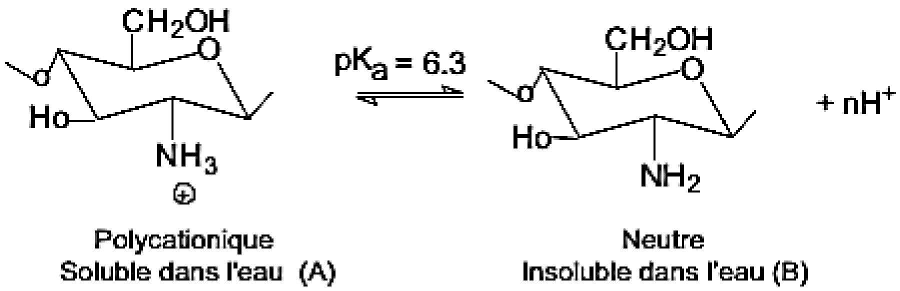



**Fig.II.4**.Structures du chitosane en milieu acide (A) et en milieu neutre (B) d'après (Vazquez-Duhaltet al. , 2001)

En général, la solubilité du chitosane dépend de la valeur de DD, de la force ionique, du pH, de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles le long de la chaîne macromoléculaire (Rinaudo, 2006). En général, un chitosane avec un DD supérieur à 70 % est utilisé pour augmenter sa solubilité. Le Tableau II.1 présente la corrélation entre les valeurs de DD et la solubilité du chitosane. De plus, la solubilité du chitosane augmente lorsque la masse molaire diminue

**Tableau II.1.** Corrélation entre les valeurs DD et la solubilité du chitosane à pH 6 (Thanou et Junginger, 2005)

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

Le chitosane est soluble dans les acides dilués grâce à la protonation de ses fonctions amines suivant l'équilibre (5) :

$$-NH_3^+ + H_2O \leftrightarrow NH_2 + H_3O^+$$

$$Ka = [-NH_2] . [H_3O^+] / [-NH_3^+] \quad \ldots\ldots(3)$$

Plus le milieu est acide, plus les groupements amines sont protonés, donc cela favorise la solubilité de chitosane. Le chitosane est, en effet, insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines concentrées ou diluées. Il est également insoluble dans les solvants purs et les acides concentrés, en raison

de l'impossibilité d'hydrater le matériau. L'acide le plus utilisé pour préparer une solution de chitosane est l'acide acétique dilué (0,1-1 %).

### II.6.5. Viscosité

La viscosité est une caractéristique importante du chitosane concernant son comportement en solution. Cette caractéristique est liée à la conformation des chaînes macromoléculaires en solution. La viscosité dépend, non seulement du DD, du MM, mais aussi du pH car ces deux paramètres déterminent la densité de charge sur la chaîne de polymère. Plus le pH est bas, plus la viscosité est donc forte. La viscosité augmente également avec le DD car plus le polymère est désacétylé, plus la proportion de groupements amine libres est importante et plus il est soluble. La viscosité augmente également avec la concentration et elle est fonction de la MM des chaînes macromoléculaires. Comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente.

### II.6.6. Flexibilité

Une caractéristique générale des polysaccharides est la flexibilité limitée de la chaîne macromoléculaire due à l'empêchement stérique imposée par les liaisons glycosidiques (Rinaudo, 2006). De plus, pour les polysaccharides ioniques, l'apparition d'interactions électrostatiques répulsives peut augmenter leur rigidité. Le chitosane est souvent considéré comme un copolymère cationique, linéaire et flexible. La flexibilité diminue avec le DD. En effet, les chaînes de chitosane dont le DD est égale à 85 % sont flexibles seulement pour des pH supérieurs à 3 (Pa et Yu, 2001).

## II.7. Propriétés de biocompatibilité du chitosane

La biocompatibilité d'un polymère est d'une importance fondamentale pour une utilisation thérapeutique . Le chitosane est biocompatible c'est-à-dire que sa présence dans un organisme entraîne des réactions inflammatoires et des réactions de rejet très limitées (propriétés immunologiques). Il est bio-résorbable avec des cinétiques faibles et contrôlées (Shiet al. , 2006). La biocompatibilité du chitosane est caractérisée principalement par trois propriétés : sa non toxicité, sa cytocompatibilité et son hémocompatibilité.

### II.7.1. Biodégradabilité

La biodégradation et la biorésorption du chitosane sont assurées par des enzymes qui l'hydrolysent en oligomères. Chez l'Homme et les mammifères, ce rôle est assumé principalement par des lysozymes qui dégradent les liaisons β(1-4) glycosidiques des unités N-acétylglucosamine en

des résidus N-acétylglucosamine et Dglucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme. Un chitosane de DD 50 % est ainsi facilement dégradé in vivo dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps.

La dégradation dépend de l'origine et des propriétés du polysaccharide (DD, masse molaire…) .Une étude plus approfondie a montré d'abord une augmentation de la susceptibilité enzymatique pour les DD inférieure à 50 %, puis une augmentation avec le DD, et finalement une absence de dégradation pour un chitosane de DD 97 % (Kurita et al. , 2000). Cette influence du DD est également constatée, in vitro (dégradation par des lysozymes) et in vivo (implantation sous cutanée). Un chitosane de DD 50 % semble donc permettre une dégradation optimale.

**II.7.2. Toxicité systémique**

L'innocuité du chitosane a été démontrée chez la souris, le rat et l'Homme pour des applications diététiques et cosmétiques. Dans le cas d'administration orale, la dose létale DL50dépasse les 16 g/kg/jour chez la souris, soit une dose supérieure à celle du saccharose (12 g/kg/jour). L'administration sous-cutanée de chitosane conduit à une valeur de DL50supérieure à 10 g/kg/jour chez la souris. La DL50d'applications intrapéritonéales de chitosane est de 5,2 g/kg/jour pour la souris. Globalement, pour des doses administrées adéquates, la non-toxicité du chitosane est admise (Rao et Sharma, 1997).

**II.7.3. Hémocompatibilité (Compatibilité sanguine)**

Elle correspond à la mesure du degré et de la durée des altérations de l'hémostase causée par un biomatériau. Tandis que le chitosane montre une activité hémostatique particulièrement sous forme d'un solide de haute masse, les oligomères de chitosane et le chitosane hydrolysé de faible masse molaire soluble dans l'eau ne présentent aucune activité thrombogène . Le chitosane a la capacité d'induire la formation d'un coagulat lorsqu'il est en contact avec des érythrocytes, même dans le cas du sang hépariné (Klokkevold et al. , 1999). Cet effet hémostatique du chitosane est attribué à un mécanisme indépendant de la cascade de coagulation classique. Il entraîne l'agglutination des érythrocytes de toutes les espèces, certainement en raison de ses propriétés polycationiques qui interfèrent avec la surface chargée négativement des cellules (Rao et Sharma, 1997).

L'activité du chitosane peut être modulée en modifiant chimiquement le polymère. Un effet anti-thrombogène est ainsi obtenu après N-acétylation avec de longues chaînes carbonées

**II.8. Propriétés biologiques**

Le chitosane présente l'avantage de réunir des propriétés très intéressantes. En effet, inhibe la croissance de nombreux parasites et il réduit le développement des infections : c'est un bon agent antibactérien et antifongique (Shi et al. , 2006). De plus, le chitosane a des propriétés antitumorales,

antivirales, ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables. Il augmente la vitesse de cicatrisation des plaies ouvertes et la reconstruction des tissus tout en prévenant les infections microbiennes. Enfin, le chitosane non seulement stimule la croissance cellulaire, mais il peut également être utilisé comme substrat pour la culture cellulaire (les cellules adhèrent au matériau et le colonisent) .

### II.8.1. Propriétés antibactériennes

Le mécanisme d'action du chitosane contre les bactéries 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 et les phospholipides de la membrane cellulaire qui ont une charge négative, perturbant ainsi les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur • La présence du chitosane peut aussi entraîner des déformations morphologiques au niveau de la paroi .

• L'inhibition peut aussi être due à l'enrobage des cellules microbiennes par le chitosane, éliminant ainsi tout échange avec le milieu extérieur (Muzzarelli R. A. A.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 (Choiet al. , 2001 ; Laflammeet al. , 1999).

• Formation des liaisons entre le chitosane et l'ADN des bactéries et l'inhibition de la synthèse des ARN messager (Devlieghereet al. , 2004 ; Liu X. F.et al. , 2001).

• Le chitosane peut aussi agir de façon indirecte sur les bactéries et les moisissures, et cela par complexion des métaux nécessaires pour leur croissance. Le chitosane a été étudié en termes de composés bactériostatique/bactéricide pour contrôler la croissance d'un large spectre de bactéries à Gram positif et à Gram négatif par exemple : le tableau II.2 montre les concentrations minimales inhibitrices de quelques bactéries par le chitosane (Liu X. F.et al. , 2001).

**Tableau II.2.** Concentrations minimales inhibitrices de quelques bactéries par le chitosane

| Bactéries | CMI (ppm) |
|---|---|
| *Bacillus cereus* | 1000 |
| *Agrobacterium tumefaciens* | 100 |
| *Pseudomanas* | 500 |
| *Escherchia coli* | 20 |
| *Micrococcus luteus* | 20 |
| *Staphylococcus aureus* | 20 |

En générale, l'action du chitosane sur les bactéries à Gram négatif est moins importante que celle sur les bactéries à Gram positif. Ce résultat est probablement dû à des différences dans la structure de l'enveloppe cellulaire (Li Y.et al. , 2007 ; Zhonget al. , 2008). La paroi cellulaire des bactéries Gram-négatif est constituée d'une fine couche de ptidoglycane et d'une membrane externe composée de lipopolysaccharides, de lipoprotéines et de phospholipides. Cependant, la paroi cellulaire des bactéries Gram-positif est seulement composée d'une épaisse couche de peptidoglycane sans membrane externe (Figure II.5). En raison de cette structure, la membrane externe fonctionne comme une barrière imperméable contre les macromolécules et les substances hydrophobes. Elle pourrait être responsable de la prévention de la pénétration du chitosane dans la cellule, expliquant ainsi l'activité antibactérienne plus faible sur les bactéries Gram-négatif que sur les bactéries Gram-positif .

D'après la littérature, l'activité antibactérienne est influencée par quelques facteurs (Konget al., 2010) :

- Des facteurs liés aux bactéries tels que la souche bactérienne, la phase de croissance bactérienne…
- Des facteurs liés au chitosane tels que la concentration en chitosane, son état (liquide ou solide) le pH des solutions, le solvant, la MM, le DA…
- Des facteurs liés à l'environnement tels que la température d'incubation, le temps de contact, le milieu de culture… L'influence du DA et de la masse molaire du chitosane sur la floculation de suspension d'Escherichia coli a été étudié (Strandet al. , 2001). Dans toutes les conditions utilisées, une diminution du DA conduit à une meilleure efficacité antibactérienne (Strandet al., 2001). De plus, l'efficacité antibactérienne du chitosane augmente avec l'augmentation de sa masse molaire, de son degré de désacétylation et de sa concentration (Liu L.et al. , 2000). En ce qui concerne l'influence du pH, l'activité antibactérienne du chitosane est plus efficace à pH faible. En effet, le chitosane et ses dérivés n'ont pas d'effet bactéricide à pH 7, dû à la présence d'une proportion importante de groupements amine non chargés et à la faible solubilité du chitosane . L'activité antibactérienne du chitosane est normalement évaluée en incorporant les cultures bactériennes à des solutions de chitosane à pH 5,5.

**II.8.2. Propriétés antifongiques**

Le chitosane a été étudié pour contrôler la croissance d'un large spectre de souches fongiques. Le Tableau II.3 présente des concentrations minimales inhibitrices de quelques souches fongiques par le chitosane (Liu X. F.et al ,2001).

**Tableau II.3.** Concentrations minimales inhibitrices de quelques moisissures par le chitosane

| Moisissures | CMI (ppm) |
|---|---|
| *Botrytis cinerca* | 10 |
| *Fusarium oxysporn* | 100 |
| *Piricularia oryzae* | 5000 |
| *Tichopiryton equinum* | 2500 |

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

- 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 (Rabeaet al. , 2003).

- Le chitosane agit aussi comme un agent chélatant qui forme des complexes avec les traces de métaux et inhibant ainsi la croissance des champignons et la production des toxines (Cueroet al. , 1991). Il assure aussi certains processus de la défense à l'extérieur de la cellule par exemple, il agit comme un agent absorbant d'eau et inhibe l'activité des différents enzymes .Il est trouvé que l'utilisation du chitosane à partir d'une concentration de 1 g/L réduit considérablement la croissance des souches fongiques suivante : *Cylindrocladium floridanum, Cylindrocarpon destructans*et *Fusarium oxysporum* (Laflammeet al. , 1999). Les résultats obtenus dans cette étude sont présentés dans le (Tableau II.4).

**Tableau II.4.** taux d'inhibition de quelques souches fongiques en fonction de la concentration du chitosane (La flamme et al. , 1999)

| Souches fongiques | Chitosane à 0,5 g/L | Chitosane à 1 g/L | Chitosane à 2 g/L |
|---|---|---|---|
| *Cylindrocladium floridanum* | 20 | 41 | 56 |
| *Cylinodrocarpon destructans* | 23 | 43 | 71 |
| *Fusarium oxysporum* | 25 | 53 | 55 |

D'après la littérature, le chitosane est utilisé pour empêcher la croissance de quelques souches fongiques dans les aliments par exemple :

- L'effet antifongique du chitosane sur la croissance in vitro des champignons pathogènes dans les cerises a été examiné par (El Ghaouthet al. , 1992). D'après cette étude, le chitosane (avec DA $\leq$ 7,2 %) peut diminuer la croissance radiale de Botrytis cinerea et Rhizopus stolonifer.

- L'effet de conservation du chitosane pour les produits à base du sucre, comme le kumquat confit a été étudié (Fang et al. , 1994). La croissance d'Aspergillus niger est inhibée par l'addition de chitosane (0,1 mg/mL) à une valeur de pH 5,4. Alors que pour inhiber la croissance de Aspergillus parasiticus et sa production d'aflatoxine, un minimum de 2 mg/mL de chitosane sont nécessaires.
- La concentration du chitosane de 1 g/L permet de diminuer la vitesse de croissance de Mucor racemosus et une solution 5 g/L empêche totalement le développement de trois souches de Byssochlamys sp., dans un milieu gélosé à 25 °C pendant 3 semaines.
- La présence du chitosane dans un jus de pomme (pH3,4) à des concentrations allant de 0,1 à 5 g/L inhibe la croissance de huit souches de levures à 25 °C(Fang et al. , 1994).

**II.8.3. Propriétés antivirales**

Le chitosane peut inhiber les infections virales dans différents systèmes biologiques. Il est également capable d'induire une résistance à certaines infections virales chez les cellules végétales et animales. De plus, il permet de prévenir le développement de l'infection par des bactériophages dans des cultures microbiennes infectées (Chirkov, 2002). Cette activité dépend du degré de polymérisation, le degré de N-désacétylation, la valeur de charge positive, et le caractère des modifications chimiques de la molécule. Le mécanisme de cette activité est mal compris. En générale, le chitosane peut inhiber la réplication des bactériophages par plusieurs mécanismes: (a) diminuer la viabilité des cultures de cellules bactériennes, (b) neutraliser le pouvoir infectieux de particules de phage matures dans l'inoculum et / ou des particules de phage fille, et (c) bloquer la réplication du phage virulent (Kochkina et Chirkov, 2000).

**II.8.4. Propriétés antitumorales**

L'activité antitumorale du chitosane est issue de sa structure chimique qui contient deux groupements actifs (groupements amine au niveau du C2 et groupements hydroxyles au niveau du C3 et du C6). En fait, les interactions entre les charges positives du chitosane (NH3+) et des charges négatives sur les membranes des cellules cancéreuses et les jonctions serrées augmentent la perméabilité et permettent aux médicaments adsorbés sur le chitosane de pénétrer dans les cellules cancéreuses (Schipperet al. , 1997). Pour l'activité antitumorale, le chitosane doit être soluble dans l'eau au pH physiologique avec des groupements amines protonés. Pour cela, des études récentes se sont focalisées sur amélioration de la solubilité du chitosane dans l'eau aux pH physiologiques pour être utilisé comme support pour l'administration de médicaments par voie orale tel que le 4-N,N-diméthyl aminobenzyle (Sajomsanget al. , 2008).

L'activité antitumorale du chitosane augmente avec la diminution du poids moléculaire, du degré désacétylation, de la viscosité et donc avec l'augmentation de la solubilité dans l'eau (Qin et al. 2002 ;

Vinsova et Vavrikova, 2011). De plus, les oligomères de chitosane ont également un effet antitumorale en empêchant la croissance des cellules tumorales par stimulation du système immunitaire (Tokoro Aet al. , 1988).

**II.8.5. Propriétés antioxydantes**

En raison des atomes d'hydrogène pratique des groupements amines au niveau de carbone C2 ou hydroxyles au niveau des carbones C3 et C6 du chitosane, ce biopolymère a une activité antioxydante formant des radicaux macromoléculaires . Les degrés de polymérisation et de désacétylation (DD) sont les éléments clés de l'activité antioxydantes du chitosane. En effet, le chitosane à faible poids moléculaire a une activité antioxydantes très importante en comparaison avec le chitosane à poids moléculaire élevé dans lequel les atomes d'hydrogène pratiqué sont bloqués (Pasanphanet al. , 2010). Par exemple, un poids moléculaire allant de 1 à 3 kDa et un degré de désacétylation de 90 % ont été corrélés avec une haute capacité antioxydante .

De plus, le chitosane peut être utilisé pour retarder ou prévenir l'oxydation d'autres composés, principalement les graisses (lipides), ce qui évite le rancissement de certain aliment. Des exemples peuvent être trouvés dans la littérature sur la capacité du chitosane à réduire l'oxydation lipidique dans la chair de poisson; des produits de la pêche , et dans les viandes (Kanatt et al. , 2008).

**II.9. Principales applications du chitosane**

Le chitosane est un biopolymère d'une importance croissante pour l'industrie et qui a des impacts significatifs sur la recherche et le développement dans des domaines aussi variés que la chimie, la biologie, la santé ou encore la protection de l'environnement. Ses propriétés exceptionnelles expliquent l'engouement pour cette macromolécule naturelle, extraite de carapaces de crustacés, considérée il y a encore peu comme des déchets. Il s'est avéré que ce coproduit d'origine marine, très bon marché, peut participer à l'élaboration de nombreux produits commerciaux à haute valeur ajoutée. Pratiquement, tous les domaines d'applications industrielles, de la pharmacie à l'agroalimentaire, en passant par l'environnement, l'agriculture, le textile, la papeterie et les cosmétiques, sont concernés. Parmi ces domaines, la diététique et le biomédical sont en plein essor .Nous présentons ici les plus prometteuses.

**II.9.1. Domaine agroalimentaire**

Dans les industries alimentaires, l'utilisation du chitosane n'est pas encore généralisée, à l'exception des pays asiatiques comme le Japon où de nombreux produits alimentaires enrichis en chitosane (nouilles, pâte de soja) sont trouvés. Aux Etats-Unis, le chitosane est utilisé comme ingrédient fonctionnel et comme film comestible pour protéger les aliments. En Europe, la réglementation sur l'utilisation du

chitosane dans le domaine alimentaire est encore restrictive, il est utilisé comme un complément alimentaire. .

- Applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire (Crini, 2006)

-Additifs (liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant, de conservation Clarification, désacidification et détoxification on des boissons et des liquides alimentaires
-Activité antibactérienne (préservation des aliments)
- enrobage alimentaire Effet antioxydant (prévention de l'oxydation)
-Ingrédient fonctionnel (agent fixateur capacité prebiotique)
-Formation de films (emballage)

De nos jours, l'utilisation du chitosane comme un additif alimentaire la plus connue est « Fat blocker » : le chitosane inhibe la métabolisation des graisses grâce aux interactions entre ses fonctions amines et les groupements carboxyliques des lipides. De plus, le chitosane est utilisée comme un agent de conservation de fruits ou de légumes (Tripathi et Dubey, 2004). Le chitosane est également utilisé comme agent antimicrobien pour éviter la détérioration des aliments et la prolifération bactérienne, et pour éviter la mélanose des crustacés et des mollusques (Rabeaet al. , 2003). Dans l'industrie des boissons, grâce aux propriétés coagulantes du chitosane, il sert à clarifier les jus de fruits ou à diminuer les composés phénoliques dans les vins. Le chitosane est également utilisé pour désacidifier des boissons comme les bières, les jus de fruits et les vins , ou tout simplement pour purifier et clarifier des eaux et des liquides alimentaires (Konovalovaet al. , 2004). 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 (Speicieneet al. , 2007). Le chitosane peut être utilisé comme gélifiant dans des produits restructurés de viande et de poisson .
Enfin, ce biopolymère est une alternative aux emballages d'origine pétrochimique (polymères plastiques) en raison notamment de ses propriétés filmogènes . Les emballages à base de chitosane sont appelés « emballages verts ». Même si, ces emballages verts ont un certain nombre d'avantages comme la « comestibilité », (non-toxique, non métabolisé, pas de goût et pas d'odeur), ils ont quelques inconvénients tels que l'adsorption d'eau (gonflement) et des propriétés plastiques insuffisantes. Pour ces raisons, plusieurs études se sont intéressées à la modification du chitosane par voie chimique ou enzymatique (Chen H. T. et al. , 2000 ; Wuet al. , 2002).

**II.9.2. Domaines biomédical et pharmaceutique**

Les nombreuses propriétés biologiques du chitosane (biocompatibilité, bioactivité…) en font un candidat de choix pour les applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques (Tableau II.6) : agent antimicrobien, hémostatique, pansement cicatrisant… Il est également utilisé comme système de libération contrôlée d'agents thérapeutiques par voie orale, transdermique, oculaire et nasale (Chaussard G., 2002). Il présente en effet de bonnes propriétés muco-adhésives et une absence de toxicité qui le prédisposent à des utilisations en thérapie génique et pour la vaccination. Le chitosane possède un caractère hémostatique ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables .Le chitosane est un agent important en médecine classique, notamment comme «véhicule » de médicaments et d'autres substances thérapeutiques, et en médecine régénérative (chirurgie reconstructrice par exemple). Il faut noter que le chitosane utilisé dans ces domaines est ultra pur et présente par conséquent un coût très élevé. Des études récentes tendent à montrer que le chitosane exerce un effet bénéfique sur le renforcement du système immunitaire, le contrôle du niveau de cholestérol et de sucre dans le sang, et prévient le phénomène de ieillissement (Ravi Kumar, 2000). Dans de nombreuses applications, le chitosane est utilisé sous forme d'hydrogels chargés pour immobiliser des médicaments, des enzymes ou encore des substances thérapeutiques comme les vaccins, les antigènes ou gènes (Prabaharan et Mano, 2005).

**Tableau II.5.** Applications du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique (Crini, 2006)

| Champs d'application | Application |
|---|---|
| Médecine | Accélération de la cicatrisation et de la guérison des blessures. |
| Chirurgie plastique | Stimulation de la régénération des tissus (prolifération des cellules. |
| Biologie cellulaire | Agent hémostatique, agent anti-infectieux, agent anti-tumeur, encapsulation de cellules et de facteur de croissance… |
| Pharmacie | Relargage de médicaments |
| Ophtalmologie | Crèmes de soin, lentilles de contacts |
| Alicaments | Complément alimentaire (produits amaigrissants). |
| Dentisterie | Gel dentaire. |
| Chirurgie dentaire | Implants dentaires. |

### II.9.3. Domaine cosmétique

Dans l'industrie des cosmétiques, les évolutions des réglementations françaises et européenne vis-à-vis de la santé publique et de l'environnement et la pression des Consommateurs ont entraîné l'intégration de substances d'origine naturelle à la fois au niveau des produits, des formulations et des

procédés. Ces tendances ont poussé au développement des recherches sur les macromolécules renouvelables, d'origine végétale ou marine, dont les polysaccharides. L'industrie cosmétique s'est également intéressée au chitosane car il présente diverses fonctions jouant ainsi plusieurs rôles lui permettant d'être utilisés dans des formulations cosmétiques contemporaines (Tableau II.7) (Crini, 2006). En effet, le chitosane peut être utilisé à la fois comme agent hydratant, mouillant, tensioactif, épaississant, micro-encapsulant et/ou antimicrobien dans une même formulation cosmétique.

❖ Applications du chitosane dans le domaine de la cosmétique (Crini, 2006)

- Rétention (humidité),agent hydratant (humidifiant)

-Agent anti-électrostatique (propriétés de gainage)
-Agent épaississant (gélifiant),agent stabilisant (émulsion),agent de liaison
-Agent antiallergique

- Agent fongicide et bactéricide (propriétés antimicrobienne)

- Relargage d'ingrédients, surfactant

-Crèmes de soins, hydratantes, cicatrisantes, anti-âge ( crèmes antirides) Filtres solaires

Compte tenu de la structure chimique du chitosane, il présente l'avantage, contrairement à la majorité des produits classiques, de posséder un caractère polycationique. De ce fait, les molécules chargées négativement peuvent interagir avec la macromolécule de chitosane. C'est le cas des protéines de la peau, des lipides, des tensioactifs, des détergents et des graisses du cheveu (Rinaudo, 2006). De plus, comme la plupart des polysaccharides, le chitosane, en raison de la liaison glycosidique, est un polymère semi-rigide et donc un bon épaississant. En particulier, la possibilité de formation de ponts hydrogène inter-macromoléculaires augmente encore ses performances allant jusqu'à un comportement de type gel physique (Desbrières, 2002).

Le caractère cationique et l'aptitude à former un film sur les cheveux expliquent ainsi son incorporation à de nombreuses préparations (shampoings, gel, fixant. lotions er produits de rinçage). De plus, l'adhérence au revêtement cutané du chitosane serait supérieure à l'acide hyaluronique. Le chitosane i) se fixe sur les cheveux par un mécanisme électrostatique, ii) forme un film élastique protecteur à la surface du cheveu, iii) donne à la chevelure de la souplesse tout en augmentant ses propriétés mécaniques, iv)permet le maintien de l'humidité des cheveux à une faible valeur et v)et assure le maintien de la coiffure à forte humidité (Ravi Kumar, 2000).

### II.9.4. Domaine agricultural

Le chitosane peut également trouver des applications dans le domaine agricole. Les matériaux encapsulés à base de chitosane se retrouvent également dans des produits agricoles (Bautista-Banoset al. , 2006 ; Ravi Kumar, 2000) .

- Applications du chitosane dans le domaine agricole (Ravi Kumar, 2000)

-Enrobage de semences (encapsulation)

-Immobilisation cellulaire (horticulture)

-Fongicide (bio-pesticide)

-Fertilisant

-Protection des cultures

-Traitement des sols

-Contrôle des métaux essentiels à la croissance des plantes

-Alimentation animale et vaccination animale

La présence de chitosane comme fertilisant accélère la croissance des plantes et Améliore le rendement des cultures (Ravi Kumar, 2000). Le chitosane pourrait devenir l'engrais naturel et le pesticide du futur en tant que «bio-pesticide». En effet, l'enrobage de semences des céréales avec le chitosane leur permettent de résister aux attaques de champignons et de bactéries pathogènes (Rabeaet al. , 2003).

De plus, le chitosane permet de conserver les aliments pour bétail et protège les animaux Contre des problèmes bactériologiques ou viraux. Il permet également de lutter contre les infections respiratoires qui affectent les troupeaux bovins. Il peut être aussi appliqué sous forme de spray oculaire (Rabeaet al. , 2003).

### II.9.5. Traitement des eaux

Les propriétés polyélectrolytes, chélatantes et complexantes du chitosane en font un bon candidat pour des applications environnementales dans le domaine du traitement des eaux usées (Gerenteet al. , 2007) (Tableau II.9).

**Tableau II.6.** Applications du chitosane dans le domaine de l'environnement (Gerente et al. , 2007)

| Champ d'application | Application |
|---|---|
| Traitement de l'eau potable | Ingénierie de l'eau (coagulation /floculation, filtration, adsorption) |
| Traitement des eaux usées | Agent coagulant |
| Traitement des eaux de piscines | Agent chélatant de cations |
| Chélation des métaux lourds | Réduction des étaux toxiques et radio-isotopes |
| Récupération de métaux précieux | Récupération de métaux réutilisables |
| Décoloration des eaux | Enlèvement du fer et du manganèse des piscines |
| Filtration membranaire | Agent décolorant |
| Traitement des boues | Agent déshydratation des boues |

Ces applications sont basées sur le caractère polycationiques du chitosane en milieu acide et sur sa solubilité qui ouvre la porte à de nombreuses applications dans le domaine de la coagulation-floculation, de la chélation, de l'adsorption ou de l'ultrafiltration. En effet, ses groupements amines protonés en milieu acide sont capables de fixer tous les métaux de transition et les radionucléides (Domard A. et Piron E., 2000 ; Piron E. et al. , 1997). Le chitosane peut être utilisé comme agent coagulant, chélatant ou adsorbant pour complexer une large gamme de polluants comme les molécules aromatiques et phénoliques, les colorants et organiques (effluents agroalimentaires, papetiers et textiles) Une autre application récente consiste à immobiliser des microorganismes ou des boues dans des matrices polymères à base de chitosane pour traiter les eaux usées, toujours sur le même principe de l'encapsulation (Krajewska, 2005).

### II.9.6. Autres domaines d'applications

Le chitosane a trouvé des applications dans d'autres domaines. En chimie, il est utilisé en tant que super-absorbants (Dutkiewicz, 2002), phases stationnaires pour la chromatographie (Li P. et al. , 2006) et l'osmose inverse (Struszczyk, 2002) ou encore supports pour la catalyse (Guibal, 2005) ( Tableau II.10) .

**Tableau II.7.** Autres domaines d'applications du chitosane (Crini, 2006)

| Champ d'application | Exemples d'application |
|---|---|
| **Chimie** | Capteurs chimiques, films biodégradable (emballage), super absorbants |
| **Biotechnologie** | Immobilisation des cellules et des enzymes, matrice pour culture et régénération cellulaire, membranes |
| **Papeterie** | Rétention d'eau (filières papetière et textile) |
| **Textile** | Additifs pour pates à papiers, agent antibactérien |
| **Œnologie** | Clarification, désacidification et stabilisation des vins |
| **Photographie** | Films photographiques, extraction de l'argent |

### II.10. Législation

La législation relative à l'emploi du Chitosane comme agent de bio-préservation des aliments est variable en fonction des pays. Il est utilisé au Japon comme conservateur dans de nombreux produits alimentaires (Borderais et al., 2005; Roller et al., 1999) et est autorisé comme auxiliaire technologique dans la plupart des pays occidentaux (Europe, Amérique du nord, Australie, Nouvelle Zélande). Depuis 1983, la United States Food and Drug Administration USFDA) a approuvé son utilisation comme additif pour l'alimentation animale (Knorr, 1986) et récemment reconnu comme GRAS (Generally Recognised As Safe) (Anonymous, 2001). En France comme en Europe, la réglementation reste encore floue et même si le chitosane est vendu librement dans le domaine de la nutraceutique, une demande d'autorisation reste à établir pour une mise en œuvre comme additif alimentaire.

### II.11. Essais sur produit carnes

À ce jour, plusieurs équipes ont travaillé sur l'effet antimicrobien du chitosane dans des produits carnés. Après des tests préalables sur des bouillons de viande dans lesquels des inactivations complètes de E. Coli ont pu être observées (Wang, 1992), des Essai sont été réalisés sur des viandes inoculées ou non avec des flores pathogènes et/ou d'altération. Dans ces conditions, le chitosane utilisé à 1 réduit la flore bactérienne de 3log CFU/g pour la viande porcine conservéeà7°C (Sagooet al., 2002) et de 2 log CFU/g pour la viande de bœuf conservée à 4°Cependant 10jours (Darmadji et al., 1994). Le Taux de contamination des viandes au Moment de l'application du chitosane est apparu comme déterminant pour son activité. L'activité antimicrobienne du chitosane sur les levures s 'est révélée plus importante que sur les bactéries Gram+, elles-mêmes plus Sensibles que les Gram-(Sagooetal,.2002 ;Kanatt et al., 2008).

# PARTIE EXPERIMENTAE



# CHAPITRE III



# III. Matériel et méthodes

## III.1.Objectif

Le but de ce travail est d'étudier l'efficacité du chitosane comme agent de conservation, à 4°C, de la viande hachée fraiche.

## III.2.Matériels

### III.2.1.Matériel biologique

#### III.2.1.1.La chitine

Chitine à partir de coquilles de crabe.

#### III.2.1.2. La viande hachée

La viande hachée utilisée dans notre travail est d'origine bovine.

### III.2.2.Equipements

Les équipent utilisés dans ce travail sont présenté dans l'annexe.

## III.3.Préparation de chitosane

Il existe une multitude de méthodes de préparation du chitosane , en général, le chitosane est produit par une désacétylation partielle de la chitine brute dans une solution d'hydroxyde de sodium concentrée , dans ce travail on mélange 5g de chitine avec 25ml de NaOH de 40% , le contenu obtenu laisse le pendant 7 jours à 35 °C, le mélange bouillant et en suite refroidie a l'eau froid , le chitosane est collecté par filtration, lavé a l'eau distillé, jusqu'à neutralisation de mélange ( PH= 7).

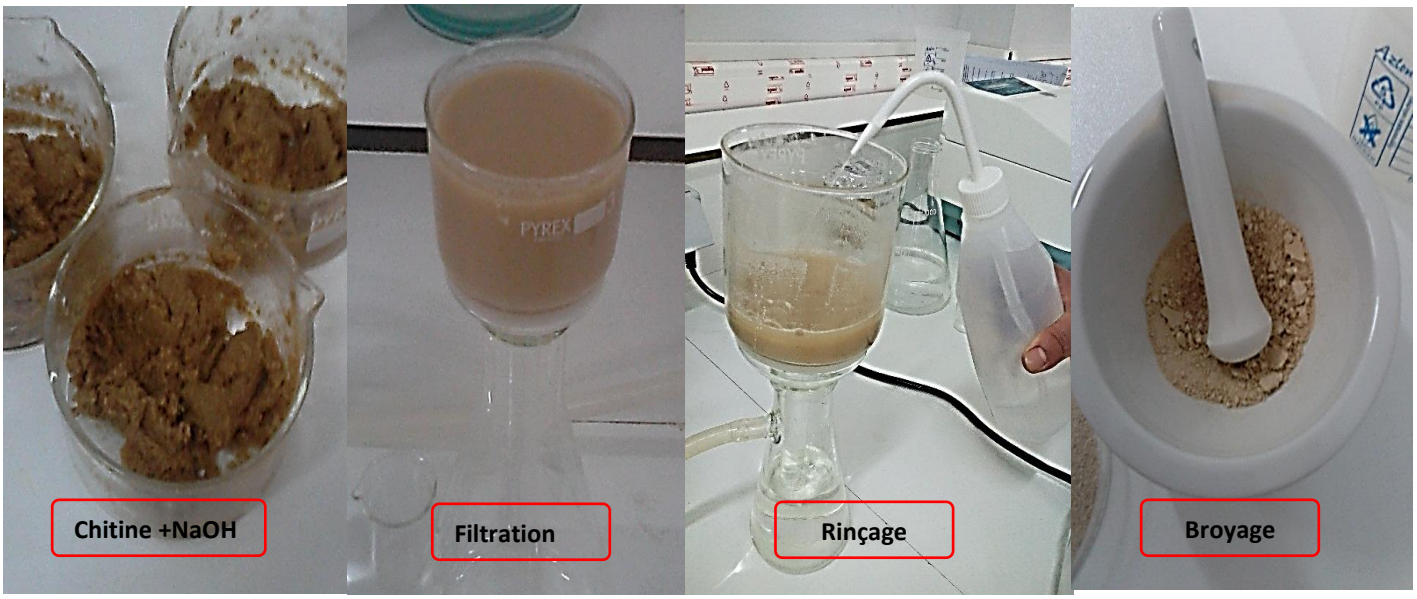



**Fig. III.1.**Les étapes de préparation de Chitosane

## III.4.Les analyses physico-chimiques de chitosane préparé

### III.4.1.Test de solubilité

- Le premier test de confirmation de la réussite de la désacétylation est le test de solubilité. Il est réalisé en faisant dissoudre 1mg du chitosane dans 100 ml d'une solution d'acide acétique à 1% (Fig. III.2)



**Fig.III.2.** Teste de solubilité de chitosane.

### III.4.2. Détermination de la DA et DD

La méthode la plus simple qui nous permet de déterminer le degré de désacétylation et le degré d'acétylation est la spectroscopie infrarouge.

Les spectres infrarouge ont été obtenus en effectuant un balayage de 400 à 4000 $cm^{-1}$ des chitosanes et des chitines, produits, dans des pastilles de KBr (1mg chitosane et 100 mg KBr). Les valeurs de DD et DA sont déterminées en appliquant les formules suivantes :

$$DA=[100-\frac{A1(560)}{A3(450à}\times 115] \quad \text{.....(éq. 1)}$$

$$DD=[100-\frac{\frac{A1(320)}{A1(420)}-0.38}{0.03233}] \quad \text{.....(éq. 2)}$$

### III.4.3. Préparation des solutions de chitosane utilisées pour la conservation

Dans une fiole on met 06g de chitosane dans 200ml d'acide acétique de 01%. Après dissolution on peut le utilisé comme bio- conservateur.

- pour la deuxième partie d'analyse on utilise même solution ajoutons 03ml d'huile d'olive

## III.5.la conservation de viande hachée par le chitosane produit

### III.5.1.Préparation de l'échantillon

**La pris d'essai**

L'arrêté ministériel du 27 mai 1998 du JORA, indique que l'échantillon destiné au laboratoire de microbiologie doit être constitué de 5 unités correspondant à 5 portions consommateur ou à 5 prélèvements

D'au moins 100 grammes du produit à analyser (figIII.3). Ces unités doivent être issues d'un même lot de fabrication et prélevées stérilement au hasard si possible dans 5 cartons différents. Elles doivent être conditionnées individuellement et transportées à température réglementaire jusqu'à un laboratoire accrédité, en précisant le numéro de lot.

En général, on prélève 02 fois 25g

Les premiers :Soumis à une incubation pendant 18-24h à 37°C pour la recherche des salmonelles

Les seconds :Sert à l'analyse bactériologique courante.

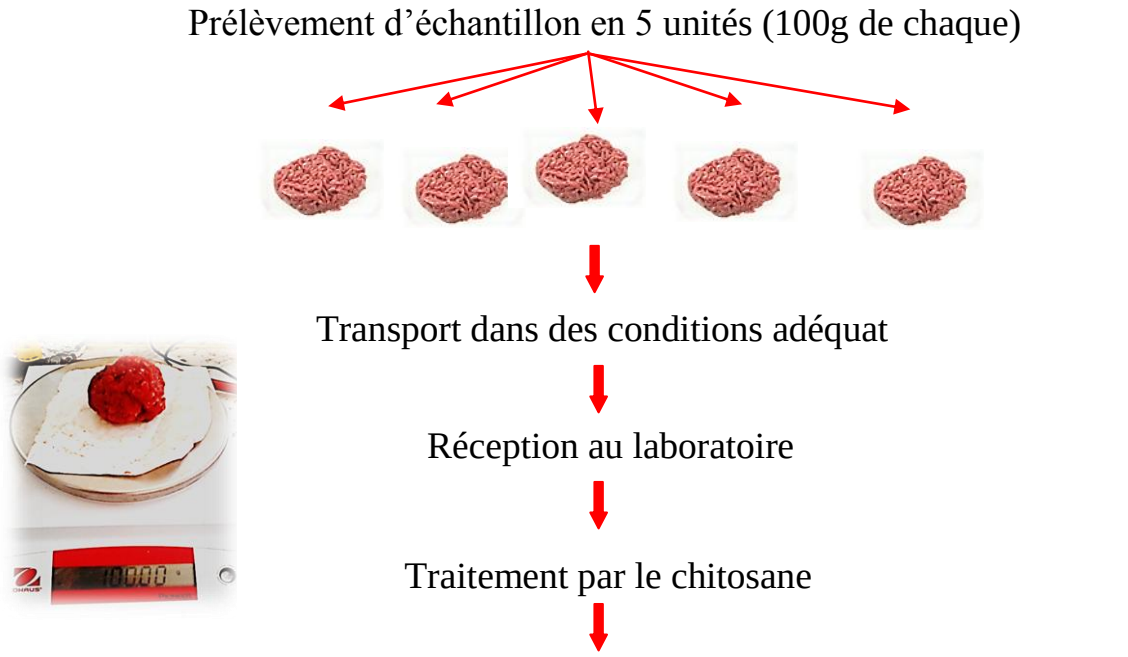



**Fig. III. 3.** Les étapes de préparation des échantillons prélèvement

### III.5.2. Traitement des échantillons (de la viande hachée) par le chitosane et (chitosane +huile d'olive)

Pour tester l'effet du chitosane et le mélange du chitosane/huile d'olive, on plonge une partie des échantillons de la viande hachée dans la solution de chitosane 3% et une autre partie dans la solution (chitosane 3% + huile d'olive) (Fig. 4). On laisse égoutter ensuite on conserve à 4°C et on effectue un contrôle microbiologique chaque 24h pendant 72h.




**Fig.III.4.** Etapes de conservation de viande hachée par le chitosane et le mélange (chitosane + huile d'olive)

### III.6. Analyses microbiologiques

Tous les échantillons traités par la solution de chitosane 3% ou le mélange (chitosane 3% +huile d'olive) vont subir les mêmes étapes de contrôle de qualité microbiologique.

### III.6.1. Préparation de la dilution mère (DM) (Fig. 5)

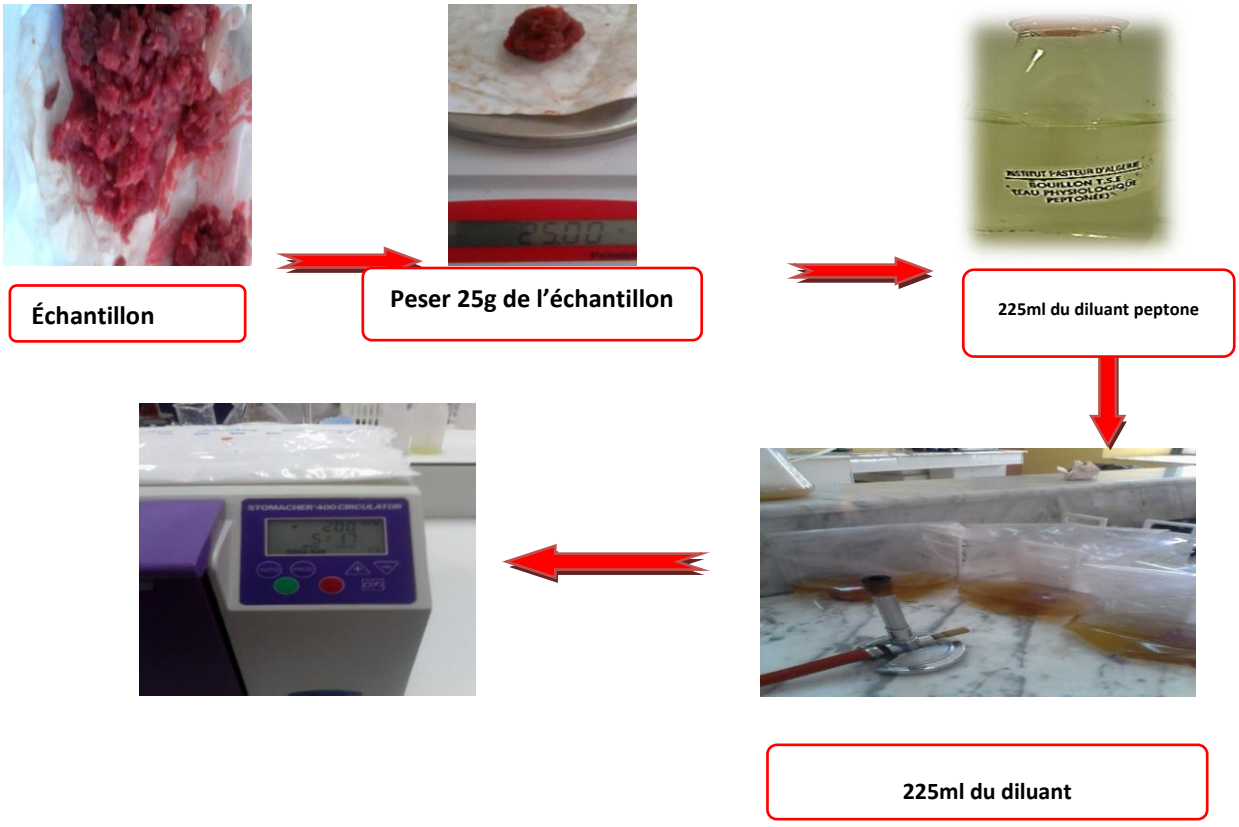



**Fig.III.5.**Préparation de la dilution DM

### III.6.2. Préparation des dilutions décimales

Prendre 1ml de la dilution mère ($10^{-1}$) avec une pipette graduée stérile, mettre la dans un tube contenant 9ml du l'eau peptonée ce qui fait la deuxième dilution à $10^{-2.}$ Reprendre 1ml de la dernière dilution, mettre la dans un autre tube qui contient aussi 9ml du l'eau peptonée pour obtenir la dilution $10^{-3}$ et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution $10^{-6}$.



**Fig. III.6**.étapes de la préparation des dilutions décimales

### III.6.3. Recherche et dénombrement des *Germes Aérobie Mésophile Totaux (GAMT)*

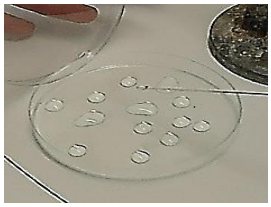
Introduire à l'aide d'une pipette 1 ml de l'échantillon, de la solution mère ou de chacune des dilutions correspondantes dans des boîtes de Pétri. Couler ensuite le Plate Count Agar liquéfié, refroidi à 46±1°C, jusqu'à obtenir une couche d'au moins 2 mm d'épaisseur. Faites des mouvements circulaires de va-et-vient en forme de 8, Laisser le milieu refroidi (solidifier). Verser ensuite la deuxième couche du milieu (environ 5ml), on le laisse refroidir. Incuber en autoclave pendant 72h à 30°C (Fig. III.7)



Milieu PCA



Fondre le milieu PCA

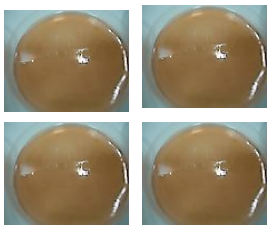




Ensemencement en masse à partir des dilutions ($10^{-1} \rightarrow 10^{-6}$)




Verser le milieu dans les boites



Boite témoin



Incubation à 35°C
de 24 à 72h

**Fig.III.7.**procède de recherche et dénombrement des Germes Aérobie Mésophile Totaux (GAMT)

- **Lecture et interprétation**

Selon la norme Française XPV08-102, chaque boite retenue devra contenir au plus 300 colonies et au moins 15 colonies. Le comptage est effectué manuellement après la période d'incubation. Le nombre de microorganismes par gramme de produit est calculé à partir des boites retenues au niveau de deux dilutions successives à l'aide de la formule suivante :

$$N = \Sigma C / (N1 + 0.1 N2) / D$$

N : le nombre de microorganismes par gramme de produit

C: la somme des colonies comptées sur les boites retenue

N 1: le nombre de boites retenues à la première dilution

N 2: le nombre de boites retenues à la deuxième dilution

D: le taux de dilution correspondant à la première dilution.

Le résultat de germes dénombrés à 30°C par g de produit est noté par un nombre compris entre 1 et 9.9 multiplié par 10n où n est la puissance appropriée de 10. Les résultats arrondis à deux chiffres significatifs après la virgule. Ils sont donnés en logarithme décimal d'unité formant colonies (LARPENT, 1997 et DUTRUC- ROSSET, 2003).

### III.6.4. Recherche des *coliformes totaux et fécaux*

- **Recherche *des coliformes totaux***

Introduire à l'aide d'une pipette 1 ml de l'échantillon, de la solution mère ou de chacune des dilutions correspondantes dans des boîtes de Pétri. Couler ensuite le VRBL, refroidi à 46±1°C, jusqu'à obtenir une couche. Faites des mouvements circulaires de va-et-vient en forme de 8. Laisser le milieu refroidi (solidifier). Incuber en autoclave pendant 24h, à 35±1°C.

- **Recherche des coliformes fécaux**

Même procédure de recherche les coliformes totaux, l'incubation à 44°C pendant 24h.

- **Lecture et interprétation**

Après la période d'incubation, les colonies rouges ayant poussées en masse dans les boites de pétri sont comptées, en retenant celles contenant entre 15 et 150 colonies au niveau de deux dilutions successives. Le nombre de microorganismes par gramme de produit est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$N = \Sigma\ C / (N\ 1 + 0.1 N\ 2) / D$$

Le nombre de germes par gramme de produit est noté par un chiffre compris entre 1 et 9.9 multiplié par 10n où n'est la puissance appropriée de 10. Les résultats sont arrondis à deux chiffres significatifs après la virgule et ils sont donnés en logarithme décimal d'unités formant colonie.

### III.6.5. Recherche *d'E. Coli*

Introduire à l'aide d'une pipette 1 ml de l'échantillon, de la solution mère ou de chacune des dilutions correspondantes dans des boîtes de Pétri. Couler ensuite le VRBG, refroidi à 46±1°C, jusqu'à obtenir une couche. Faites des mouvements circulaires de va-et-vient en forme de 8. Laisser le milieu refroidi (solidifier). Incuber en autoclave pendant 24h à 37°C.

- **Lecture et interprétation**

Calculer le nombre de microorganismes par gramme de produit à l'aide de la formule suivante:

$$N= \Sigma\ C / (N\ 1+0.1N\ 2) /D$$

Arrondir les résultats à deux chiffres significatifs après la virgule. Et les résultats sont donnés en logarithme décimal d'unités formant colonies.

### III.6.6. Recherche des *Staphylococcus aureus*

Introduire à l'aide d'une pipette 1 ml de l'échantillon, de la solution mère ou de chacune des dilutions correspondantes dans des boîtes de Pétri. Couler ensuite le milieu Baird Parker, refroidi à 46±1°C, jusqu'à obtenir une couche. Faites des mouvements circulaires de va-et-vient en forme de 8. Laisser le milieu refroidi (solidifier). Incuber en autoclave pendant 24h- 72h à 35±1°C.

- **Expression de résultats**

Le comptage des colonies caractéristiques (noires, brillantes, convexes de diamètre compris entre 0.5 et 2 mm, entourées d'une auréole claire se détachant du fond du milieu) dont la couleur est obtenu par la réduction du tellurite de potassium contenu dans le milieu par le *Staphylococcus aureus*, permet de déterminer le nombre de *Staphylococcus aureus* par gramme de produit (M C, 1995).

### III.6.7. Recherche des *Clostridium sulfito-réducteur*

Au moment de l'emploi faire fondre un flacon de la gélose VF le refroidir dans un bain d'eau à 45°C puis ajouter une ampoule de sulfate de sodium et alun de fer ammoniacal, mélanger soigneusement et aseptiquement le milieu et ainsi prêt à l'emploi, mais il faut le maintenir dans une étuve à 45°C jusqu'à moment de l'utilisation. Incuber à 46°C pendant 03 jours.

- **Lecture et interprétation des résultats**

Toute colonie noire de 0,5 mm de diamètre pouvant aller jusqu'à 5mm, poussant en masse est dénombrée. Le total des colonies par gramme de produit à analyser est déterminé (LEBRES, 2008).

### III.6.8. Recherche des *salmonelles* (Fig. 7)

- **Pré-enrichissement**

Le pré-enrichissement consiste à la préparation de la suspension mère qui constitue la dilution mère correspondante à la dilution $10^{-1}$

- **Enrichissement**

L'enrichissement est effectué sur le milieu sélectif SFB réparti à raison de100ml par flacon à simple et double concentration ; L'enrichissement proprement dit se fait donc à partir du milieu de pré-enrichissement de la façon suivante :

10ml pour le flacon SFB simple concentration : S/C ;

100ml pour flacon SFB double concentration : D/C. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h.

- **Isolement**

Chaque flacon fera l'objet d'un isolement en double (02 boites pour chaque flacon) sur le milieu gélosé Hecktoen. Toutes les boites ainsi isolées seront incubés à 37°C pendant24h.

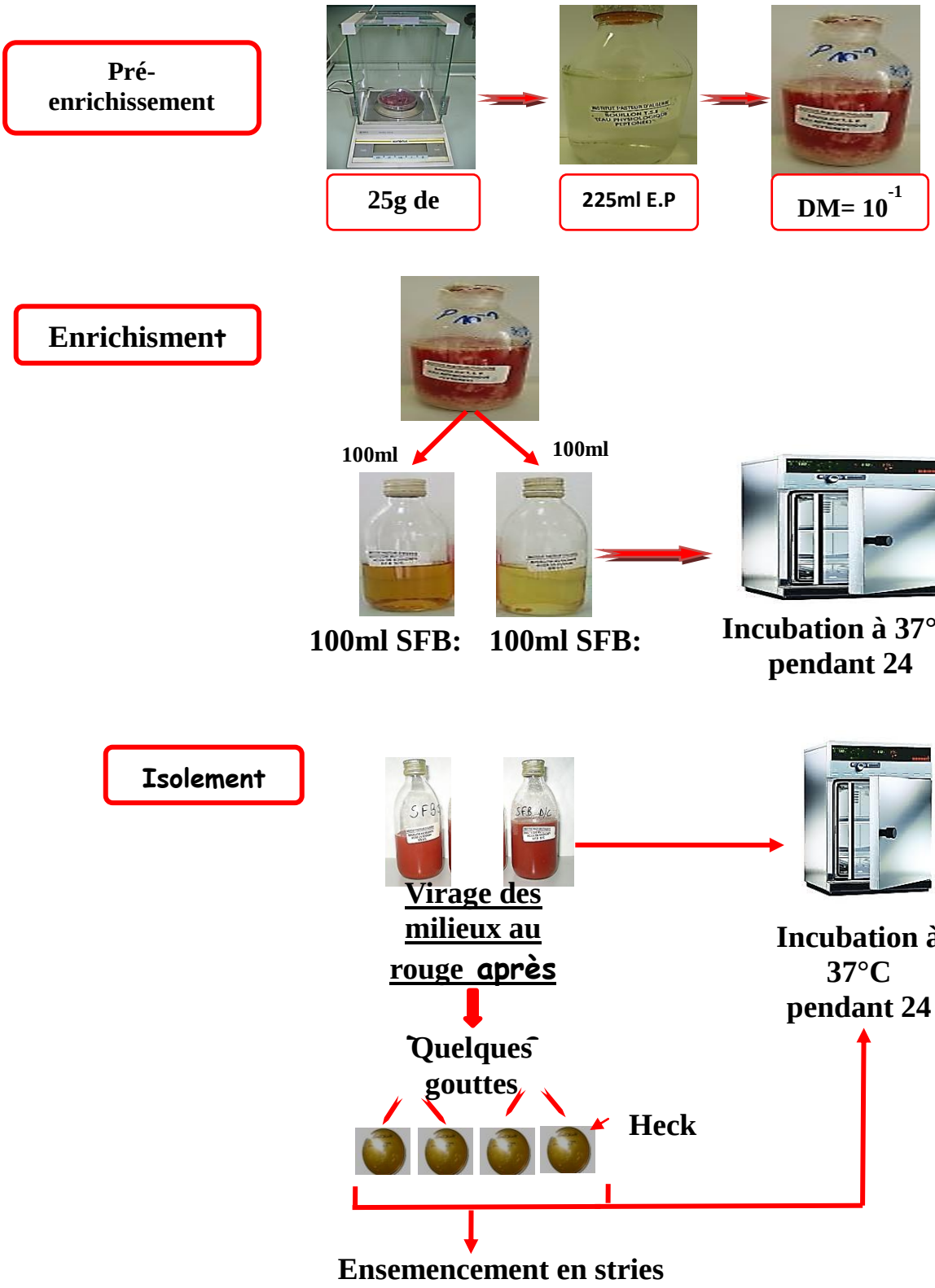



**Fig. III.8.**recherche de salmonelle



# CHAPITRE IV



## IV. 1. Caractérisation du chitosane produit

### IV. 1. 1. Test de solubilité

Le premier test réalisé pour pouvoir déterminer les polymères qui peuvent être des chitosane est le test de solubilité qui consiste à faire dissoudre 1g de la poudre traitée dans 100ml d'acide acétique à 1% (Roberts et Domszy, 1982).Ce test a montré que le chitosane produits dans notre travail est 100% solubles dans la solution d'acide acétique à 1%.

### IV. 1. 2. Détermination du DD par spectroscopie infrarouge

La méthode la plus facile qui permet de déterminer le DD est la spectroscopie infrarouge. Le calcul nous a permis d'obtenir un chitosane soluble avec un DD de 92,73%.

## IV. 2. Analyses microbiologiques

### IV. 2. 1. Évaluation de la contamination microbienne de la viande étudiée

La viande hachée bovine ayant été conservée par réfrigération, avec ou sans traitements, a fait l'objet d'un dénombrement microbien pour la recherche de la flore mésophile totale, les *coliformes totaux, les coliformes fécaux, Staphylococcus aureus, Clostridium sulfito-réducteurs et les salmonelles.*

#### IV. 2. 1. 1. La flore mésophile totale

Les résultats de l'analyse microbiologiques des échantillons témoin, traité par le chitosane (3%) et (chitosane 3% + huile d'olive) sont présentés dans la figure IV.1.

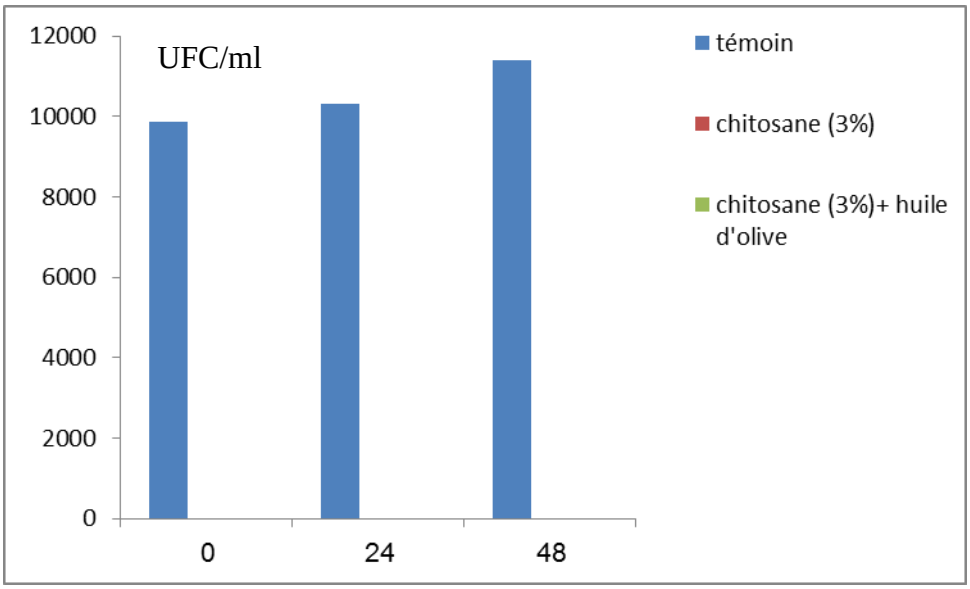



**Fig. IV.1.**Variation du nombre de la flore mésophile totale en fonction du temps des échantillons témoin et traités

Le niveau de contamination minimale de la viande hachée par la flore mésophile totale est de l'ordre de 9.88 $10^3$ UFC/g (3.99log UFC/g de viande), le premier jour. Il évolue pour atteindre un niveau de contamination maximale de 11.4 $10^3$ UFC/g (4.05log UFC/g) après 48h de conservation par réfrigération à une température de(+4°C).

Le traitement par le chitosane (3%) et la mélange (chitosane 3% + huile d'olive) a permis non seulement l'élimination de la flore initiale présente, il a inhibé la prolifération de cette flore au cours de la conservation (Fig. IV.1 ). Sachant que la norme requise est de 2 $10^5$ UFC/g (5.69log UFC/g) de viande hachée selon la norme Française (Miriam KA, 2006) et 3 $10^5$ UFC/g selon la norme algérienne.

Il est à noter que la contamination de la viande par cette flore mésophile à (+30°C) est également en rapport direct avec l'influence des conditions de transport, des manipulations diverses, de la rupture de la chaîne de froid.

### IV. 2. 1. 2. Les coliformes totaux et coliformes fécaux

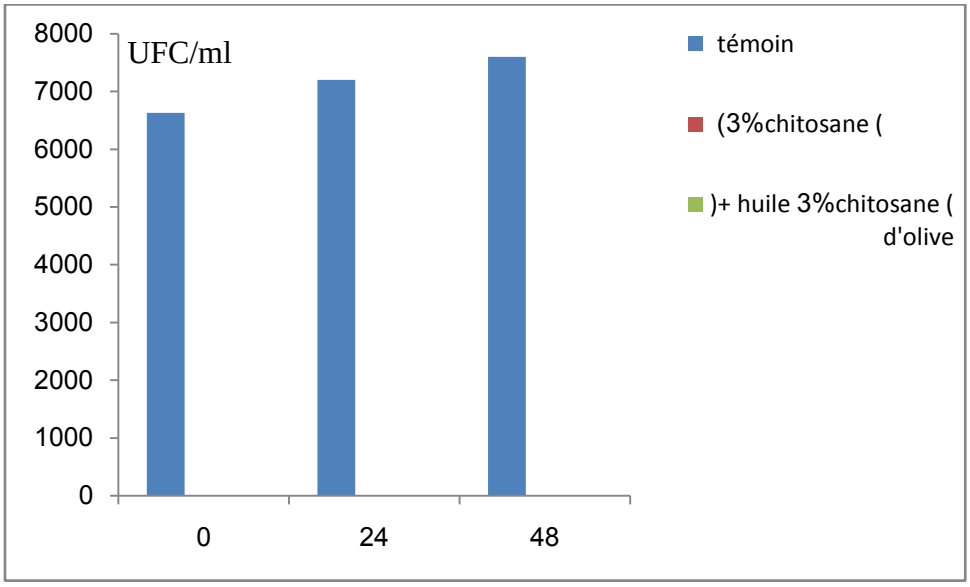



**Fig.IV.2.**Variation du nombre des coliformes totaux en fonction du temps des échantillons témoin et traités

Pour les *coliformes totaux*, dont la norme requise est de 2 log UFC/g, le niveau de contamination est de l'ordre de 6.63 $10^3$UFC/g (3.82 log UFC/g) de viande fraiche le premier jour (Fig.IV.2).

Il évolue progressivement pour atteindre un niveau de contamination maximale de 7.6 $10^3$UFC/g (3.88 log UFC/g) après 48 heures de conservation par réfrigération à une température de +4°C. Ces micro-organismes sont des témoins de contamination fécale. Ce qui confirme que l'hygiène des manipulations n'était pas satisfaisante, d'une part et d'autre part, les animaux peuvent être

mis en cause (éviscération tardive, ouverture des viscères) (Miriam KA, 2006). Cette contamination disparait dans les échantillons traités avec du chitosane 3% et (chitosane 3% + huile d'olive), respectivement (Fig.IV.2).

La recherche des *coliformes fécaux* a montré leur développement après 48h d'incubation de la viande hachée sans traitement (Fig.IV.3). Tandis que les échantillons traités par le chitosane (3%) et (chitosane (3%) + huile d'olive) sont bien protégés contre la prolifération de ces germes (Fig.IV.3).

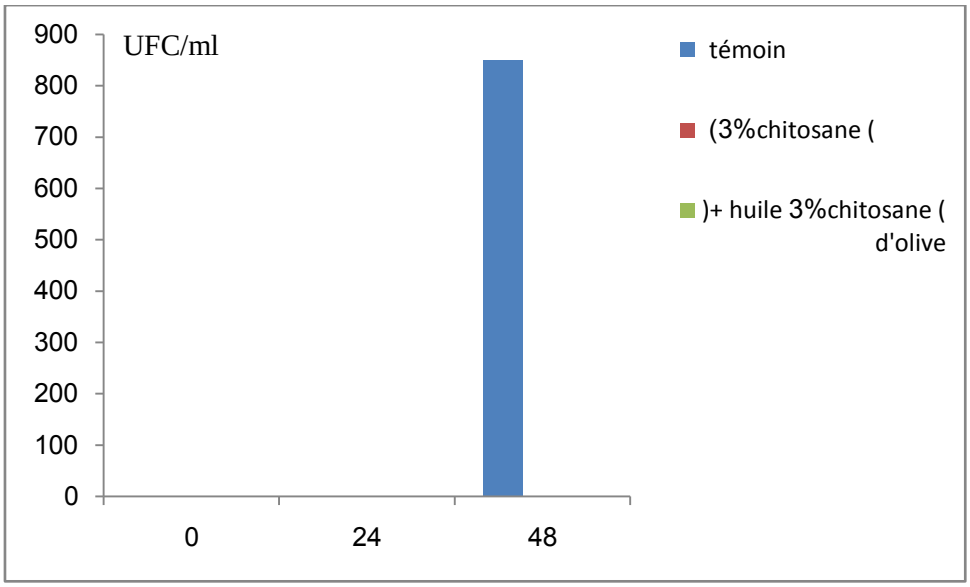



**Fig.IV.3.**Variation du nombre des coliformes fécaux en fonction du temps des échantillons témoin et traités

Bien que la majorité de ces germes soient considérés comme non pathogènes, ils peuvent dans certains cas, être responsables de troubles de gastro-entérites chez l'homme, exemple d'E. coli

### IV. 2. 1. 3. La recherche de Staphyloccus aureus, Clostridium sulfito-réducteur et salmonelles

La contamination par ces bactéries n'était pas présente dans tous les échantillons étudiés. Dans nos travaux antérieurs réalisés par Ouchen et Talhaoui (2016), on a montré que le nombre de levures, était incomptable, dans la viande fraiche au premier jour et même après conservation à 4°C. Par contre, le nombre des levures diminue à 3.6 log UFC/g dans les échantillons traités par le (chitosane 3% + huile d'olive) pour s'annuler dans les échantillons traités avec du chitosane 3%.

## IV. 3. Analyses organoleptique

L'analyse microbiologique de l'échantillon de la viande hachée non traitée a montré que la charge microbienne initialement présente à continuer sa prolifération au cours de la conservation à 4°C (Fig.IV.4), ce qui explique le changement de l'aspect et son noircissement au bout de 72h de conservation. Tandis que, les échantillons traités par le chitosane (3%) et le mélange (chitosane 3% + huile d'olive) ont été préservés contre la prolifération microbienne (Fig.IV.4) pendant toute la période de conservation (72h). En ce qui concerne l'aspect extérieur on a remarqué que les échantillons traités et non traités ont le même aspect après 24h de conservation (Fig.IV.4) après 72h de conservation, la viande hachée traitée par le chitosane et le chitosane/huile d'olive qui permet de diminuer les échanges gazeux, par apport au chitosane seul, et par conséquent l'oxydation de la myoglobine.



(a) **(b)**

**Fig. IV.4.**L'aspect de la viande hachée (a) sans traitement (b) avec traitement (chitosane 3%+ huile d'olive)

## IV. 4. Discussion

Nos résultats montrent que la qualité hygiénique de la viande hachée à l'état initial était non acceptable et déconseillé pour la conservation car on risque d'avoir une prolifération importante de la flore contaminant. Cette contamination initiale peut être due aux gestes comme fumer, se gratter, qui sont très fréquents chez les bouchers et doivent être évité. La protection des comptoirs, lors de la vente, par une matière en plastique facile à nettoyer est à encourager, alors que l'utilisation du bois est à proscrire. Le hachage se faisant à la température ambiante, le reste du hachis précédent peut évoluer en fonction de la contamination initiale, du niveau de la température

et du temps écoulé. Donc les bouchers doivent augmenter la fréquence de nettoyage des hachoirs, mais aussi utiliser des hachoirs réfrigérés.

Au terme de cette étude, l'analyse bactériologique a montré que la contamination initiale des viandes étudiées est très élevée. Ceci a entraîné une évolution rapide de la flore bactérienne qui limite le stockage réfrigéré de ces viandes de 2 à 3 jours.

La contamination par les coliformes fécaux est révélatrice de mauvaises conditions d'hygiène et particulièrement indicatrices de contaminations fécales et par conséquent de défauts survenus lors de l'éviscération ou des comportements non hygiéniques des manipulateurs, vu que les coliformes sont des bactéries saprophytes du tube digestif de l'homme (Basel et al., 1983).

L'absence totale de Staphylococcus aureus et des sulfito réducteurs dans la viande non traitée peut être expliquée par la non contamination des carcasses par ces germes après 'abattage, puisqu'ils sont d'origine exogène, souvent humaine, résultant de la manipulation de la viande par le personnel atteint de rhinopharyngite à staphylocoques, d'angine, de sinusite ou des lésions cutanées infectées aux mains. La non détection de ces germes pathogènes (Staphylococcus aureus, sulfitoréducteurs) chez les viandes traitées par les deux solutions étudiées est due au fait que le chitosane inhibe les microorganismes pathogènes.

A partir de résultat microbiologique des échantillons traités par le chitosane 3% et (chitosane 3% + huile d'olive) on distingue que la solution du chitosane forme un film qui tapisse la surface de la viande et constitue une barrière contre les attaques microbiennes et en même temps le chitosane élimine la contamination initiale de la viande. Selon Derammelaere, (2006), les conservateurs organiques servent à assurer la sécurité sanitaire et la qualité organoleptique de l'aliment tout en prolongeant sa durée de conservation. Cependant, ces agents conservateurs ne peuvent rendre sain un produit qui ne l'était pas à l'origine, ni améliorer la qualité d'un mauvais produit. Par contre

L'avantage de l'utilisation du chitosane comme conservateur est le fait qu'il possède une grande capacité de protection des aliments contre les microbes, en effet, le chitosane présente une activité antimicrobienne face aux différents groupes de microorganismes, bactéries, virus, champignons, et levures. C'est la raison pour laquelle on l'utilise comme additif de conservation afin d'éviter la détérioration des aliments et la prolifération bactérienne. Il a aussi été utilisé comme agent antimicrobien et pour éviter la mélanose ou le noircissement des crustacés et mollusques (Crini et al., 2009).

L'activité antimicrobienne du chitosane dépend de plusieurs facteurs tels le poids moléculaire, le degré de désacétylation, le pH et la température. Le mécanisme d'action antimicrobien du chitosane n'est pas encore bien connu mais différentes hypothèses ont été proposées (Ben abbou, 2009).

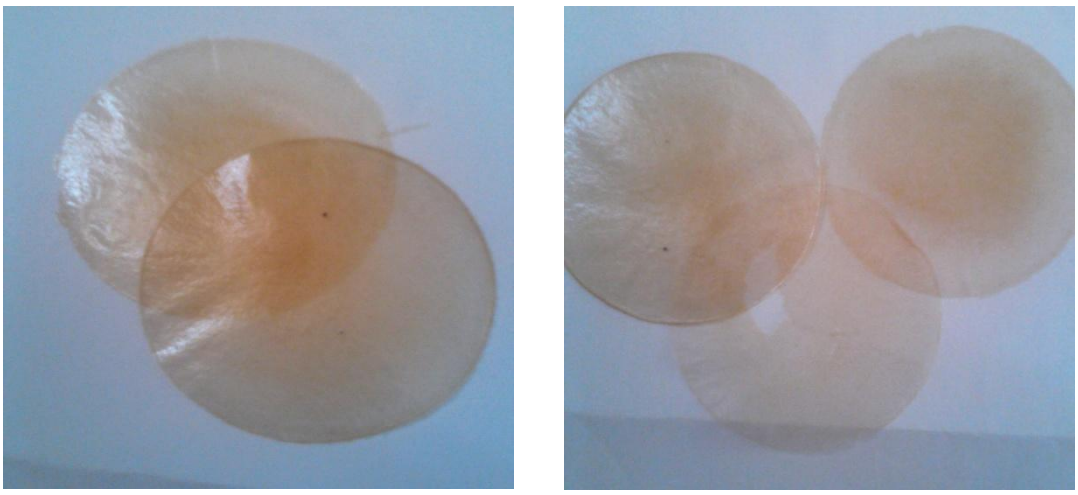
1) Les charges positives du chitosane peuvent interagir avec la charge négative des membranes de la cellule microbienne, ce qui induit la libération du matériel protéique et les autres constituants intracellulaires ;

2) À de faibles concentrations le chitosane polycationique se lie probablement à la surface des cellules chargées négativement causant ainsi leur agglomération, par contre à des concentrations élevées, le grand nombre de charges positives va donner une charge positive nette à la surface des bactéries pour les garder en suspension ;

3) Le chitosane interagit avec la membrane des cellules pour altérer sa perméabilité entravant ainsi l'entrée de certains nutriments.

L'incorporation de l'huile d'olive était dans le but de renforcer le biofilm et le rendre plus hydrophobe (Fig**.** IV.5).Cependant, l'analyse microbiologique seulement n'était pas suffisante pour répondre à ce qu'on cherchait et pour ce faire d'autres tests doivent être effectués sur le biofilm lui-même pour pouvoir répondre à la problématique posée. La seule observation qu'on a pu tirer, à part la qualité hygiénique, est la préservation, partielle, de la qualité organoleptique de la viande hachée qui a perdu son apparence à la fin de la manipulation (72h à 4°C).

Nos résultats corroborent avec ceux Saunier et al. (2010), qui ont utilisé le chitosane (DD 75-85%) solubilisé dans une solution acidifiée (2% d'acide acétique) à une concentration de 9%, à une concentration finale dans la viande de 2%. Le chitosane et la viande hachée ont été mélangés afin d'obtenir une mêlée la plus homogène possible. Les steaks ont été formés et conditionnés individuellement sous atmosphère protectrice (30%CO2 et 70%O2) puis conservés à 4°C. Des analyses microbiologiques et physico-chimiques ont montré une réduction pour l'ensemble des flores recherchées (flore totale, flore lactique, Pseudomonas, Brochothrix).



(a) (b)

**Fig. IV.5.**biofilm (a)( chitosane 3%) , (b) (chitosane 3%+ huile d'olive)

Dans le travail réalisé par Benaissa (2011), on a montré que l'utilisation des solutions d'acides organiques (citrique 1% et lactique 4%) à des concentrations répandant à la réglementation appliquée comme conservateurs des viandes cameline et ovine réfrigérées, contribue non seulement à la prolongation de leur durées de conservation mais aussi à la préservation de leur qualité nutritionnelle.

# CONCLUSION GENERALE

## Conclusion général

Le but de ce travail est d'étudier l'efficacité du chitosane comme agent de conservation de la viande hachée fraiche.

L'analyse physique et chimique du chitosane a démontré que le chitosane est 100% solubles dans la solution d'acide acétique à 1% et qui présente un DD de 92,73%.

Le niveau de contamination minimale de la viande hachée par la flore mésophile totale est de l'ordre de 9.88 $10^3$ UFC/g, le premier jour. Il évoluepour atteindre un niveau de contamination maximale de 11.4 $10^3$ UFC/g après 48h de conservation par réfrigération à une température de (+4°C).

Le traitement par le chitosane (3%) et la mélange (chitosane 3% + huile d'olive) a permis non seulement l'élimination de la flore initiale présente, il a inhibé la prolifération de cette flore au cours de la conservation

Pour les coliformes totaux, le niveau de contamination est de l'ordre de 6.63 103UFC/g de viande fraiche le premier jour. Il évolue progressivement pour atteindre un niveau de contamination maximale de 7.6 103UFC/g après 48 heures de conservation par réfrigération à une température de +4°C. Cette contamination disparait dans les échantillons traités avec du chitosane 3% et (chitosane 3% + huile d'olive), respectivement. Tandis que les échantillons traités par le chitosane (3%) et (chitosane (3%) + huile d'olive) sont bien protégés contre la prolifération de ces germes.

Le nombre de levures était incomptable, dans la viande fraiche au premier jour et même après conservation à 4°C. Par contre, le nombre des levures diminue à 3.6 log UFC/g dans les échantillons traités par le (chitosane 3% + huile d'olive) pour s'annuler dans les échantillons traités avec du chitosane 3%.

L'incorporation de l'huile d'olive était dans le but de renforcer le biofilm et le rendre plus hydrophobe

A partir de résultat microbiologique des échantillons traités par le chitosane 3% et (chitosane3% + huile d'olive) on conclure que la solution du chitosane forme un film qui tapisse la surface de la viande et constitue une barrière contre les attaques microbiennes et en même temps le chitosane élimine la contamination initiale de la viande.

Sur la base des résultats obtenus et grâce aux propriétés antimicrobiennes du chitosane, le chitosane apparait comme une solution possible pour augmenter le niveau de sécurité alimentaire ou pour remplacer les conservateurs traditionnels.

# ANNEXES

.+

Les équipent utilisés dans ce travail sont présenté

| Les équipements utilisés dans ce travail | Les verreries |
|---|---|
| PH-mètre<br>Spectrophotomètre IR<br>Balance<br>Etuve<br>Plaque chauffante<br>Bain-marie<br>Bec bunsen<br>Agitateur de pillasse<br>Autoclave<br>Estomaquer | Tubes à essais<br>Pipettes<br>Fioles jaugées<br>Pipettes<br>Eprouvette<br>Les erlenmeyers<br>Cristallisoir<br>Béchers<br>Entonnoirs<br>Pipettes graduées<br>Les flacons<br>Mortier<br>Spatule<br>Boites pétrie |

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bacon A., Makin J., Sizer P.J., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M., Illum L., Chatfield S. and Roberts M. (2000). Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. Infection and Immunity. (68) 5764-5770.

Bautista-Banos S., Hernandez-Lauzardo A.N., Velazquez-del Valle M.G., HernandezLopez M., Barka E.A., Bosquez-Molina E. and Wilson C.L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection. (25) 108-118.

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

Chen H.T., Kumar G., Harris M.T., Smith P.J. and Payne G.F. (2000). Enzymatic grafting of hexyloxyphenol onto chitosan to alter surface and rheological properties. Biotechnology and Bioengineering.(70) 564-573

Chirkov S.N. (2002). The antiviral activity of chitosan (review). Applied Biochemistry and Microbiology.(38) 1-8.

Coma V., Deschamps A. and 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.

Crini G. (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. Bioresource Technology.(97) 1061-1085.

Cuero R.G., Osuji G. and Washington A. (1991). N-Carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. Biotechnology Letters. (13) 441-444.

Desbrières J. (2002). Chitin and chitosan. Chitine et chitosane.39-44.

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

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

Domard A. and Piron E. (2000). Recent approach of metal binding by chitosan and derivatives. Advances in Chitin science. (4) 295-301.

Dutkiewicz J.K. (2002). Superabsorbent materials from shellfish waste - A review. Journal of Biomedical Materials Research. (63) 373-381.

El Ghaouth A., Arul J., Asselin A. and Benhamou N. (1992). Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in Rhizopus stolonifer . Mycological Research.(96) 769-779.

Fang S.W., Li C.F. and Shih D.E.F. (1994). Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied Kumquat. J. Food Protect. (56) 136-140.

Gerente C., Lee V.K.C., Le Cloirec P. and McKay G. (2007). Application of chitosan for the removal of metals from wastewaters by adsorption - Mechanisms and models review. Critical Reviews in Environmental Science and Techn ology. (37) 41-127.

Kaminski W., Tomczak E. and Jaros K. (2008). Interactions of metal ions sorbed on chitosan beads. Desalination. (218) 281-286.

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

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

Kim K.W. and Thomas R.L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. Food Chemistry.(101) 308-313.

Kim S.K. and Rajapakse N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. Carbohydrate Polymers. (62) 357-368.

Klokkevold P.R., Fukayama H., Sung E.C. and Bertolami C.N. (1999). The effect of chitosan (poly-n-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. (57) 49-52.

Kochkina Z.M. and Chirkov S.N. (2000). Influence of chitosan derivatives on the development of phage infection in theBacillus thuringiensisculture. Microbiology.(69) 217-219.

Kong M., Chen X.G., Xing K. and Park H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. International Journal of Food Microbiology. (144) 51-63.

Konovalova I.N., Novikov V.Y., Stepanova N.V. and Reut K.V. (2004). Recovery of lipids from aqueous dispersions with chitosan solutions. Russian Journal of Applied Chemistry.(77) 254-259.

Krajewska B. (2005). Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. Separation and Purification Technology. (41) 305-312.

Kurita K., Kaji Y., Mori T. and Nishiyama Y. (2000). Enzymatic degradation of chitin: Susceptibility and the influence of deacetylation. Carbohydrate Polymers. (42) 19-21.
Kurita K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. Marine Biotechnology.(8) 203-226.

Laflamme P., Benhamou N., Bussiares G. and Dessureault M. (1999). Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. Canadian Journal of Botany. (77) 1460-1468.

Lee K.Y., Ha W.S. and Park W.H. (1995). Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. Biomaterials.(16) 1211-1216.

Li Y., Chen X.G., Liu N., Liu C.S., Liu C.G., Meng X.H., Yu L.J. and Kenendy J.F.(2007). Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. Carbohydrate Polymers. (67) 227-232.

Liu L., Li S., Garreau H. and Vert M. (2000). Selective enzymatic degradations of poly (Llactide) and poly(-caprolactone) blend films. Biomacromolecules.(1) 350-359.

Liu W.G. and De Yao K. (2002). Chitosan and its derivatives - a promising non-viral vector for gene transfection. Journal of Controlled Release. (83) 1-11.

Liu X.F., Guan Y.L., Yang D.Z., Li Z. and Yao K.D. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. Journal of Applied Polymer Science. (79) 1324-1335.

Lou M.M., Zhu B., Muhammad I., Li B., Xie G.L., Wang Y.L., Li H.Y. and Sun G.C. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen Burkholderia seminalis. Carbohydrate Research. (346) 1294-1301.

Malette W.G. and Quigley H.J. (1985). Method of achieving hemostasis, inhibiting fibroplasia, and promoting regeneration in a tissuewound. Brevet USA n°US4532134.

Manda K., Hammer E., Mikolasch A., Gordes D., Thurow K. and Schauer F. (2006). Laccase-induced derivatization of unprotected aminoacid L-tryptophan by coupling with phydroquinone 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide. Amino Acids. (31) 409-419.
Mao L.C. and Wu T. (2007). Gelling properties and lipid oxidation of kamaboko gels from grass carp (Ctenopharyngodon idellus) influenced bychitosan. Journal of Food Engineering. (82) 128-134.

Muzzareli R. A. A. (1996). Chitosan-based dietary foods. Carbohydrate polymers. (29) 309-316.

Muzzarelli R.A.A., Jeuniaux C. and Gooday G.W. (1986). Chitin in Nature and Technalogy. New York: Plenum Publishing Corporation.

Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Tarsi R., MilianiM., Gabbanelli F. and Cartolari M. (2001). Fungistatic activity of modified chitosans against Saprolegnia parasitica . Biomacromolecules.(2) 165-169.

NEWTON, K. G., J. C. L. Harrison et A. M. Wauters. 1978. Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. Journal of Applied Bacteriology. vol. 45. p. 75-82.

Norsker M., Jensen M. and Adler-Nissen J. (2000). Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. Food Hydrocolloids. (14) 237-243.

Nystrom B., Kjaniksen A.L. and Iversen C. (1999). Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. Advances in Colloid and Interface Science. (79) 81-103.

Olteanu C.E. and Enescu D. (2007). Chitosan involved tissue engineering and regenerative medicine. Romanian Biotechnological Letters.(12) 3217-3233.

Olteanu C.E. and Enescu D. (2007). Chitosan involved tissue engineering and regenerative medicine. Romanian Biotechnological Letters.(12) 3217-3233.

Onishi H. and Machida Y. (1999). Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. Biomaterials.(20) 175-182.

Onsoyen E. and Skaugrud O. (1990). Metal recovery using chitosan. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. (49) 395-404.

Oszmianski J. and Lee C.Y. (1990). Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (38) 1202-1204.

OUATTARA, B. 1998. « Développement d'un emballage antimicrobien pour les viandes et les produits carnés ». Thèse présentée pour l'obtention d'un grade de Ph.D. en Science et Technologie des aliments à l'Université Laval, Québec, Canada, p. 1-50.

OUATTARA, B., M. Giroux, W. Smoragiewicz, L. Saucier et M. Lacroix. 2002. Combined

effect of y-iiradiation, ascorbic acid and èdible coating on the improvement of microbial and biochemical characteristic of ground beef. Journal of Food Protection, vol. 65. p. 981-987.

Pa J.H. and Yu T.L. (2001). Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions. Macromolecular Chemistry and Physics. (202) 985-991.

Prabaharan M. and Mano J.F. (2005). Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. Drug Delivery.(12) 41-57.

Qin C.Q., Du Y.M., Xiao L., Li Z. and Gao X.H. (2002). Enzymic preparation of watersoluble chitosan and their antitumor activity. International Journal of Biological Macromolecules.(31) 111-117.

Rabea E.I., Badawy M.E.T., Stevens C.V., Smagghe G. and Steurbaut W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. Biomacromolecules. (4) 1457-1465.

Rao S.B. and Sharma C.P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. Journal of Biomedical Materials Research. (34) 21-28.

Ratajska M. and Boryniec S. (1998). Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. Reactive and Functional Polymers. (38) 35-49.

Ravi Kumar M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers. (46) 1-27.

Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science (Oxford). (31) 603-632.

Roberts G.A.F. (1992). Chitin chemistry. London: Macmillan Press.

Rodraguez Couto S. and Toca Herrera J.L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. Biotechnology Advances. (24) 500-513.

Roller S. and Covill N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratorymedia and

apple juice. International Journal of Food Microbiology. (47) 67-77.

Sajomsang W., Tantayanon S., Tangpasuthadol V. and Daly W.H. (2008). Synthesis of methylated chitosan containing aromatic moieties: Chemo selectivity and effect on molecular weight. Carbohydrate Polymers. (72) 740-750

Schipper N.G.M., Olsson S., Hoogstraate J.A., deBoer A.G., Varum K.M. and Artursson P. (1997). Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs .2. Mechanism of absorption enhancement. Pharmaceutical Research. (14) 923-929.

Shepherd R., Reader S. and Falshaw A. (1997). Chitosan functional properties. Glycoconjugate Journal. (14) 535-542.

Shi C., Zhu Y., Ran X., Wang M., Su Y. and Cheng T. (2006). Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. Journal of Surgical Research. (133) 185-192.

Sorlier P., Denuziare A., Viton C. and Domard A. (2001). Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. Biomacromolecules. (2) 765-772.

Speiciene V., Guilmineau F., Kulozik U. and Leskauskaite D. (2007). The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins. Food Chemistry.(102) 1048-1054.

Strand S.P., Vandvik M.S., Varum K.M. and Ostgaard K. (2001). Screening of chitosans and conditions for bacterial flocculation. Biomacromolecules.(2) 126-133.

Strauss G. and Gibson S.M. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. Food Hydrocolloids. (18) 81-89.

Struszczyk M.H. (2002). Chitin and chitosan - Part II. Applications of chitosan. Polimery.

(47) 396-403.

Sudarshan N.R., Hoover D.G. and Knorr D. (1992). Antibacterial action of chitosan. Food Biotechnology. (6) 257-272

Tayel A.A., Moussa S., Opwis K., Knittel D., Schollmeyer E. and Nickisch-Hartfiel A. (2010). Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. International Journal of Biological Macromolecules.(47) 10-14

Thanou M. and Junginger H. (2005). Pharmaceutical applications of chitosan and derivativesz in: Polysccharide, Structural diversity and functional versatility New York : Marcel Dekker 2ed.661-670.

Tharanathan R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. Trends in Food Science and Technology.(14) 71-78.

Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S and M S. (1988). Growthinhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. (36 ) 784–790.

Tomihata K. and Ikada Y. (1997). In vitroand in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. Biomaterials.(18) 567-575.

Tripathi P. and Dubey N.K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology. (32) 235-245.

Ueno H., Mori T. and Fujinaga T. (2001). Topical formulations and wound healing applications of chitosan. Advanced Drug Delivery Reviews. (52) 105-115.

Varum K.M., Myhr M.M., Hjerde R.J.N. and Smidsra¸d O. (1997). In vitrodegradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. Carbohydrate Research. (299) 99-101.

Vazquez-Duhalt R., Tinoco R., D'Antonio P., Topoleski L.D.T. and Payne G.F. (2001). Enzyme conjugation to the polysaccharide chitosan: Smart biocatalysts and biocatalytic hydrogels. Bioconjugate Chemistry.(12) 301-306.

Vinsova J. and Vavrikova E. (2011). Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities - a Review. Current Pharmaceutical Design. (17) 3596-3607.

Wang C.L., Zhao M., Li D.B., Cui D.Z., Lu L. and Wei X.D. (2010). Isolation and characterization of a novel Bacillus subtilisWD23 exhibiting laccase activity from forest soil. African Journal of Biotechnology.(9) 5496-5502.

Wong K.K.Y. and Mansfield S.D. (1999). Enzymatic processing for pulp and paper manufacture - a review. Appita Journal. (52) 409-418.

Yang L.Q., Yang B., Zeng D., Wang D., Wang Y. and Zhang L.M. (2011). Formation and properties of a novel complex composed of an amylose-grafted chitosan derivative and singlewalled carbon nanotubes. Carbohydrate Polymers. (85) 845-853.

Zhong Z., Xing R., Liu S., Wang L., Cai S. and Li P. (2008). Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. Carbohydrate Research.(343) 566-570.