République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE MEDEA

Faculté de la technologie
Département de Génie des Procédés et Environnement

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Génie des Procédés

Option : Bioprocédés pharmaceutiques

Thème

Valorisation d'une biomasse par des procèdes biologiques

Réalisé par :

- **Mlle. ZOUMIT Wissam**
- **Mlle. LAKHAL Soraya**

- **Président : Dr. REBOUH.S**
- **Promotrice : Dr. ARBIA. W**
- **Examinatrice : Dr. AHMEDI. A**

La soutenance aura lieu le**11/06/2017.**

Promotion : 2016/2017

Remerciements

Dieu merci pour nous avoir donné la santé, la volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé.
Ensuite nous tenons à remercier nos chers parents et toute la famille pour leur patience et encouragement à finir un chemin commencé il y'a si longtemps et pour leur amour et leur soutien tout au long de nos études.

Nous tenons à remercier M^{me} Arbia .W notre encadreur, qui nous a beaucoup aidé par ses conseils et ses critiques, sa précieuse aide dans la conduite des expériences, ainsi que son aide morale pendant toute la durée de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au Dr. Rebouh S. d'avoir accepté de présider notre jury Et au Dr. Ahmedi A. qui a accepté d'examiner notre travail et pour toute l'attention qu'ils portent à ce travail.

Nous adressons nos chaleureux remerciements à tous les Enseignants de Génie des procèdes et environnement de l'Université de Médéa, et à tous les enseignants au long de scolaires,
Toute l'équipe et les ingénieurs au niveau de hall technologique

Dédicace

A mon père miséricorde de dieu.
A ma très chère maman qui a toujours été là pour moi, et qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance, J'espère qu'elle trouvera dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.
Ames chères soeurs : Hanan, Nadjet, Aimen,Narimen
et Hamida.
Ames chers frères : Omar, Djemel
A ma chère binôme ***:*** *Wissam*

Au cœur de mes grandes-mères et mes grands-pères

A toute la famille : Lakhal et Snousi.
A mes amis : El Alia, Souade, Zineb, Mariem, Bateul, Nassima, Sihem, Nesrine, Meriem el bateul.

Sans oublier tous les amis et tous mes collègues de génie des procédés de la promotion 2016/2017

Soraya

Je dédie cette thèse……

A mes très chers parents *qui ont été toujours à coté de moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance, j'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et toute mon des amés*

A mes très chère sœurs : Hassina, Karima, Dalila

A mes très chère frères : Kamel, smail

Ames amis : Hanane, Fatiha, Hayat

A toute ma famille : Zoumit, Yahiaoui

A ma chère binôme : Soraya

A Mon fiancé : Sid-Ali

A toute et à mes vrai(e) amie(s) qui m'ont aidé par leur encouragements

Atout la promotion : Bioprocédés pharmaceutique de 2016/2017

A ceux et celles qui me connaissent et surtout qui m'aiment

Ames profonds sentiments……..

Wissam

Sommaire

Remerciement……..i
Dédicaces …….ii
Résumé…….iii
Liste des figures.....iv
Liste des tableaux……....v
Liste des Abréviations…….. ……..vi
Sommaire…….ix

Introduction générale…….....1
Chapitre I. Contexte économique
I.1. Évolution du marché des produits marins, focus sur les crustacés ……..3
I.2. Valorisation des coproduits marins : la chitine et ses dérivés…….....6
-Valorisation des coproduits de crustacés : la production de chitine ……6
I. 3. Évolution des volumes de ventes par domaine d'application ……8
Chapitre II. La chitine et le chitosane
II.1. Historique :……10
II.2. Présentation des polymères ……10
II.2.1. Définition et structure de la chitine……..10
II.2.2. Définition et structure de la chitosane ……11
II.3. Origine de la chitine et du chitosane ……..11
-Les sources d'obtention ……..11
II.4. Préparation du chitosane par désacétylation de la chitine ……13
II.5. Les propriétés de chitine et de chitosane……15
II.5.1. Les propriétés physico-chimiques ……..15
II.5.1. 2. Le degré de désacétylation (DD) ……15
II.5.1. 3. La solubilité……16
II.5.1. 4. Le poids moléculaire……16
II.5.1. 5. La viscosité……..17
II.5.1. 6. Polyélectrolyte en milieu acide……17
II.5.2.Les propriétés biologiques ……...17
II.5.2. 1. La biodégradabilité……..17
II.5.2. 2. Biocompatibilité, toxicité et stérilisation……18
II.6. Les domaines d'applications de la chitine et de ses dérivés ……18
II.6.1. Les applications dans le domaine agricole ……18

II.6.2. Les applications dans le domaine du traitement de l'eau……...19
II.6.3. Les films de chitine/chitosane…….19
II.6.4. Les produits cosmétiques ……19
II.6. 5. Les applications dans les industries alimentaires et diététiques ……20
II.6. 6. Les utilisations comme auxiliaires technologiques ……21
II.6. 7. Les limites et les risques d'allergies……21
II.6. 8. Les applications dans le domaine médical ……21
II.6. 8. 1. L'activité antimicrobienne…….21
II.6. 8. 2. L'activité cicatrisante…….22
II.6. 8. 3. L'activité de chitooligosaccharides……22
II.6. 8. 4. Le rôle de support matériel ……22
II.6. 9. Les applications en soin dentaire ou vétérinaire ……23
II.6. 10. Autres applications ……23
III. Méthodes d'extraction de la chitine et le chitosane ……25
III. 1. La méthode chimique……26
III. 2. La méthode biologique ……28
Chapitre III. Matériels et méthodes
III.1. Objectif…….29
III.2.Matériels……29
III.2.1. Matériel biologique……29
III.2.1.1. La biomasse fongique…….29
III.2.1.2. La biomasse marine……....29
III.2.1.3. Les dattes……29
III.2.2. Matériels de laboratoire……29
III. 3. Méthodes expérimentales ……...30
III. 3. 1. Préparation de la poudre de carapace…….30
III. 3. 2. Préparation de la biomasse fongique……..30
III. 3. 3. Préparations de milieux de culture……..31
III. 3. 3. 1. Préparation du PDB……..…31
III. 3. 3.2. Préparation de jus des dattes…….31
III. 3. 4. Préparation des fermentations……..…32
III. 3. 4. 1. La fermentation fongique …….32
III. 3. 4. 2. La fermentation lactique pour la récupération de la chitine…….33
III. 3. 4. 3. Extraction de la chitine et du chitosane……34

III. 4.1. Extraction de la chitine et du chitosane fongique ……34
III. 4. 2. Production du chitosane……36
III. 4.3. Caractérisation de la chitine et du chitosane……..36
III. 4. 3. 1. Test de solubilité……36
III. 4. 3. 2. Détermination de la DA et DD ……36
III. 4. 3. 3. Détermination de la viscosité et du poids moléculaire du chitosane extrait à partir de la biomasse marine……..36
III. 5. Application des chitosanes produits ……37
III. 5. 1. Préparation des films du chitosane……37
III. 5. 2. Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose…….38
Chapitre IV. Résultats et discussion
IV.1. Récupération de la chitine et le chitosane fongique ……..39
IV.1.1. La biomasse fongique……39
-Précipitation du chitosane (pour le surnageant)……..…39
IV.1.2. La désacétylation de la chitine……39
IV. 2. Récupération de la chitine à partir de la biomasse marine……41
-La désacétylation de la chitine……..…41
IV. 3.Caractérisation de la chitine et le chitosane produits……42
IV. 3. 1. Test de solubilité……42
IV. 3. 2. Détermination du DA et DD par spectroscopie infrarouge……42
IV. 3. 3. Détermination du poids moléculaire et de la viscosité du chitosane (crustacé)…….46
IV. 4. Applications……....48
IV. 4.1. Préparation des films du chitosane……..48
IV. 4. 2. Etude de l'activité antibactérienne et antifongique du chitosane préparé……..49
Conclusion générale……...…56
Annexe

Listes des figures :

Figure	Titre de la figure	page
	Chapitre I	
Fig.I.1	Répartition de la consommation moyenne de produits marins Par habitant de 2003 à2005 (FAO, 2008)	3
Fig.I.2	Secteurs approvisionnés par la production de poissons dans le monde (sauf Chine) (FAO, 2009)	4
Fig.I. 3	Production de crevettes dans le monde, répartition entre la pêche (P) et l'aquaculture (A) (FAO, 2006)	5
Fig.I.4	Répartition des pénéides élevées en aquaculture dans le monde (FAO, 2010)	6
Fig. I.5	Ventes de chitine en fonction des zones géographiques (D'après GIA, 2010)	7
Fig. I.6	Évolution des domaines d'application pour lesquels le chitosan est employé (D'après GIA, 2010)	8
	Chapitre II	
Fig. II.1	Représentation générale de la chitine comme copolymère de glucosamine et N-acétylglucosamine (Arbia,2007)	11
Fig. II.2	Structure chimique du chitosan (Moussaoui et Tifour, 2014)	11
Fig.II. 3	Préparation du chitosane et d'autres dérivés de la chitine (Kassaï, 2010)	14
Fig.II.4	Conversion de la chitine en chitosane par la désacétylation (Moussaoi et Tifour, 2014)	15
Fig. II.5	Méthode de production de la chitine et du chitosane(Kheldaoui et Bechene, 2014)	27
	Chapitre III	
Fig. III.1	Matériel de laboratoire	30
Fig.III .2	La carapace broyée	30
Fig.III. 3	Préparation de la fermentation fongique	32
Fig.III. 4	La biomasse fongique humide pendant la centrifugation	32
Fig.III. 5	Biomasse sèche et broyée	33
Fig.III. 6	Le jus de dattes après la fermentation (Kouider Ammar et Boudhiaf, 2017)	33
Fig.III. 7	Extraction de la chitine et le chitosane à partir de biomasse sèche. .(Synowieki et al Khateeb, 1997)	36
Fig.III. 8	Viscosimétrie	37
	Chapitre IV	
Fig. IV. 1	Biomasse fongique sèche récupérées avant et après broyage	39
Fig. IV. 2	Précipitation de chitosane par NaOH 30% (Synowieki et al – Khateeb, 1997)	39

Listes des figures :

Fig. IV. 3	La désacétylation de la chitine pour La biomasse fongique (Synowieki et al –Khateeb, 1997)	40
Fig. IV. 4	La chitine	41
Fig. IV. 5	La désacétylation de la chitine (Synowieki et al –Khateeb, 1997)	41
Fig. IV. 6	Spectre infrarouge de (a) la chitine fongique (Da 11%) (b) chitosane fongique issue de la désacétylation de la chitine (88%) (c) chitosane fongique issue de la précipitation (DD 99,39%) (Ouchen, Talhaoui, 2016)	44
Fig. IV. 7	Spectres infrarouge de (a) la chitine commerciale et (b) de la chitine extrait de la carapace de la crevette par fermentation lactique (Ouchen, Talhaoui, 2016)	46
Fig. IV. 8	Evolution de la viscosité réduite en fonction de la teneur en chitosane à 30°C.(Kassai, 2010)	47
Fig. IV. 9	Biofilm du chitosane fongique (solution de chitosane à 1%)	48
Fig. IV. 10	Biofilm du chitosane obtenu par la désacétylation de la chitine de crevette (solution de chitosane à 1%)	49
Fig. IV.11	Les zones d'inhibition pour chaque souche microbienne (1) Candida albicans (2) Staphylococcus aureus (G^+) (4) Pseudomonas aeruginosa (G^-) (5) E. coli (G^-) (1%, 0,5%, 0,375%, 0,25%, 0,125%).(Cheikh Touhami, 2013)	51
Fig. IV.12	Diamètre des zones d'inhibition pour chaque souche microbienne (a) Candida albicans (b) Staphylococcus aureus (G^+) (c) Pseudomonas aeruginosa (G^-) (d) E. coli (G^-) .(Cheikh Touhami, 2013)	52

Liste de tableaux

Numéro	Titre de tableau	Page
	Chapitre 1	
Tableau I.1	Production de dérivés à partir de chitine et gamme de prix (Einbu, 2007)	8
Tableau I. 2	Répartition des applications du chitosane, en tonnes (GIA, 2010)	9
	Chapitre2	
TableauII.1.	Le pourcentage de chitine chez les différents organismes (Hobel, 2004, Kurita, 2006, Crini et al , 2009 ; Jo et al , 2011)	12
Tableau II.2	Utilisations de la chitine/ chitosane en agroalimentaire (Crini, 2009)	20
Tableau II. 3	Autres dérivés applications de la chitine et de ses dérivés (Gomes-Ramirez et al, 2004)	24
	Chapitre3	
Tableau III. 1	Composition du milieu de fermentation à base de PDB (Talhaoui et Ouchen, 2016)	31
Tableau III. 2	Composition du milieu de fermentation à base de jus de dattes (Arbia er al, 2013)	31
	Chapitre4	
Tableau IV. 1	Les quantités et les rendements de la biomasse, chitine et chitosane fongiques	40
Tableau IV. 2	Les quantités et les rendements de la biomasse, chitine et chitosane fongiques	42
Tableau IV. 3	DA et DD des chitines et des chitosanes produits (berger et al, 2014)	42
Tableau IV.4	Les bandes caractéristiques de la chitine commerciale et les chitines fongiques et marines (Talhaoui et Ouchen, 2016)	45

Liste des abréviations

Abréviation (selon l'ordre alphabétique)	Signification
CHOS	Chitooligosaccharides
DA	Degré d'acétylation
DD	Degré de désacétylation
DSP	Direction de la sante publiques
IR	Infra rouge
KBr	Potassium bromide
MES	Matière en suspension
MM	Masse moléculaire
PDB	Pouillon de pomme de terre dextrose
PM	Poids moléculaire
RMN	Résonance magnétique nucléaire
UV	Ultra-visible
η	viscosité

الملخص

الغرض من هذا العمل هو استخراج الكيتين والكيتوزان من الكتلة الحيوية الفطرية (الفطريات) والكتلة الحيوية البحرية (الروبيان) من خلال الطريقة البيولوجية واستخدام اثنين من وسائط النمو، عصير البقر و عصير البطاطس ذوي التركيب الكيميائي الأمثل. العائد من استخراج كيتين من الكتلة الحيوية الفطرية هو 33٪ (الكيتوزان / الكتلة الحيوية) و من الكيتوزان التي تنتجها حذف ا لأسيتيل من الكيتين هو 7٪ (والكيتوزان / الكيتين)، فيحين أن من ال كيتوزان نقية جدا هو 1 ملغ / غرام من الكتلة الحيوية. أ ماعائدالكيتين المستخلصة من الكتلة الحيوية البحرية، ه و 25٪ في حين أن من الكيتوزان هي 17.5٪ (مقارنة الكتلة الحيوية). أظهر ت خصائص الفيزيائية أن درجة أستلة الكيتين الفطرية هي 11٪ لذلك ه ي كيتين منزوع ا لأسيتيل ، وأن درجة انزاع الاستلة هو 87.27٪ و 99.39٪ للكيتوزان والكيتوزان النقي جدا على التوالي. والكيتوزان المستخرج من هذا الكيتين المستخلصة من الكتلة الحيوية البحرية لديه درجة انتزا ع الاستلة من 92.73٪ ويبلغ وزنه الجزيئي 274 كيلو دلتن. كلا الكيتوزان التي تم الحصول عليها سمح لنا لإنتاج الأغشية الحيوية. إن دراسة نشاط مضادات الميكروبات من والكيتوزان، المستخرجة من الكتلة الحيوية البحرية، وأظهرت قوة مثبطة قليلة مع تركيز 1٪ مقابل المبيضات البيض، المكورات العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية ولكن لتأكيد نشاطها لا بد من اختبار تراكيز أعلى. ويلاحظ أن تركيز الكيتوزان الأكثر فعالية ضد الزائفة الزنجارية ه و 0.5 ٪.

كلمات البحث: الكتلة الحيوية الفطرية، والكتلة الحيوية البحرية، التخمر اللبني، الكيتين، الكيتوزان.

Résumé

Le but de ce travail est l'extraction de la chitine et le chitosane à partir d'une biomasse fongique (champignon) et la biomasse marine (carapace de crevette) par la méthode biologique et en utilisant deux milieux, le jus de datte et le jus de pomme de terre (PDB) de composition chimique optimisée. Le rendement de l'extraction de la chitine à partir de la biomasse fongique est 33% (chitine/biomasse) et celui du chitosane produit par désacétylation de la chitine extraite est de 7%(chitosane/chitine) tandis que celui du chitosane ultra pur est de 1mg/g de biomasse. Pour la chitine extraite à partir de la biomasse marine, le rendement est de 25% tandis que celui du chitosane est 17.5% (par rapport à la biomasse). La caractérisation physicochimique a montré que le DA de la chitine fongique est de 11% donc c'est une chitine désacétylée, et que le DD est de 87,27% et 99,39% pour le chitosane extrait par désacétylation et le chitosane ultra pur, respectivement. Pour le chitosane extrait à partir de la chitine de crustacé a un DD de 92.73% et un poids moléculaire de 274kDa. Les deux chitosane obtenus nous ont permis de produire des biofilms. Ainsi, l'étude de l'activité antimicrobienne du chitosane, extrait à partir de la biomasse marine, a montré un pouvoir légèrement inhibiteur avec une concentration de 1% contre *candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *E. coli* mais pour affirmer son activité il faut tester des concentrations plus élevées. Tandsique pour *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif), on remarque que la conecntration 0,5% est plus efficace.

Mots clé: biomasse fongique, biomasse marine, fermentation lactique, chitine, chitosane.

Abstract

The purpose of this work is to extract chitin and chitosan from a fungal biomass (fungus) and marine biomass (shrimp carapace) by the biological method and using two media, date juice and Potato juice (PDB) with optimized chemical composition. The yield of chitin extraction from the fungal biomass is 33% (chitin/biomass) and that of the chitosan produced by désacétylation of the extracted chitin is 7% (chitosan/chitin) while that of ultra-pure chitosan Is 1mg/g of biomass. For chitin extracted from marine biomass, the yield is 25% while that of chitosan is 17.5% (relative to biomass). The physicochemical characterization showed that the DA of the fungal chitin is 11%, so it is a déacétylase chitin, and the DD is 87.27% and 99.39% for the chitosan extracted by désacétylation and ultra-pure chitosan, respectively. For the chitosan extracted from the chitin of crustacean has a DD of 92.73% and a molecular weight of 274kDa. The two chitosanes obtained allowed us to produce biofilms. Thus, the study of the antimicrobial activity of chitosan, extracted from marine biomass, showed a slightly inhibitory power with a concentration of 1% against *candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but to confirm its activity Test higher concentrations. For *Pseudomonas aeruginosa*, we note that the 0.5% concentration is more efficient.

Key words: fungal biomass, marine biomass, lactic fermentation, chitin, chitosan

Les polysaccarides forment une vaste classe de polymères naturels, parmi lesquels certains sont très importants dans l'industrie. La chitine, bien qu'elle représente une part d'importance commerciale présentée par d'autres biopolymères tels que la cellulose, l'amidon ou les alginates. Cependant, au cours des 30 dernières années, l'effort de recherche consacré à la chitine et au chitosane s'est accru de manière exponentielle; de nombreuses potentialités d'application ont été identifiées et quelques-unes sont d'ores et déjà économiquement importantes.(Ouchen et Talhaoui, 2016)

Sa production annuelle par biosynthèse a été estimée à environ 1011 tonnes par an, ce qui fait de la chitine, l'un des composés naturels les plusabondants sur terre. Elle est le principal constituant de la cuticule d'insectesainsi que des parois cellulaires des champignons, des levures et des algues vertes. Les champignons fournissent la plusgrande quantité de chitine dans le sol (6-12% de la biomasse en chitine, qui correspond à 500à 5000 kg/ha). La chitine existe, également, dans les carapacesde crabes et de crevettes (Arbia.W, 2015).

La récupération de la chitine s'effectue habituellement par une méthode chimique utilisant de fortes concentrations d'acides et de bases. Mais le coût onéreux de cette transformation et la pollution chimique générée lors de l'extraction de la chitine limitent l'extrapolation de ce procédé à l'échelle industrielle. Pour y remédier, une méthode biologique a été développée. (Arbia.W, 2015)

En effet, l'extraction de la chitine, à partir de la biomasse marine, par voie biologique repose sur l'utilisation des bactéries lactiques. Ces bactéries ont la capacité de produire l'acide lactique pour solubiliser les minéraux et d'excréter des protéases conduisant à la déminéralisation et à la déprotéinisation, respectivement, la récupération de la chitine nécessite deux étapes : la déminéralisation et la déprotéinisation de la carapace puisque le biopolymère se trouve lié aux protéines formant ainsi une matrice protéique et renfermant des sels minéraux insolubles, principalement, les carbonates de calcium. Alors que l'extraction de la chitine à partir de la biomasse fongique nécessite la culture de cette dernière dans un milieu adéquat qui permet d'orienter le métabolisme du champignon vers la synthèse en grand pourcentage de ce biopolymère pour qu'on puisse à la fin le récupérer par des traitements acido-basiques doux. (Arbia.L, 2010)

Le chitosane, drivée principale de la chitine, est obtenu par modification chimique de la chitine récupéré. Par contre par la culture fongique on peut récupérer la chitine et un chitosane ultra pur qui peut avoir des applications importantes dans le domaine médical et pharmaceutique. (Ouchen et Talhaoui, 2016)

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.

L'objectif de ce travail vise à extraire la chitine et le chitosane à partir de la paroi des biomasses marines et fongiques en utilisant des milieux de culture optimisés. La réalisation de cette étude a nécessité :

- La culture de la biomasse fongique ;
- Une fermentation lactique de la biomasse marine (carapace de crevette) pour récupérer la chitine ;
- Récupération de la chitine et du chitosane ultra pur et leur quantification ;
- Production de chitosane fongique par désacétylation de la chitine récupérée ;
- Caractérisation par spectroscopie infrarouge des biopolymères récupérés ;
- Désacétylation de la chitine pour la production de chitosane ;
- Production de biofilm par les chitosanes récupérés ;
- Essai de l'activité antimicrobienne du chitosane.

Ce mémoire comporte deux grandes parties :

- Une partie bibliographique consacrée aux les contextes économiques de la valorisation de biomasse (chapitre I) et généralités sur la chitine et le chitosane, leurs définitions, leurs propriétés, leurs différentes applications et les méthodes d'extraction à partir des différentes sources (chapitre II)
- Une partie expérimentale consacrée aux matériels et méthodes, à la discussion et l'interprétation des résultats obtenus.

I.1. Évolution du marché des produits marins, focus sur les crustacés

Le marché des produits aquatiques ne cesse d'augmenter à l'échelle internationale. La forte hausse de la demande est principalement liée à l'augmentation de la consommation humaine. Elle représentait 0,7 Kg par habitant en 1970 tandis qu'elle a atteint 7,8 Kg par habitant en 2008, soit une augmentation de 6,6 % par an (FAO, 2010).

La consommation de produits marins est inégalement répartie sur la surface de la planète, comme le montre la figure I.1 (FAO, 2008).

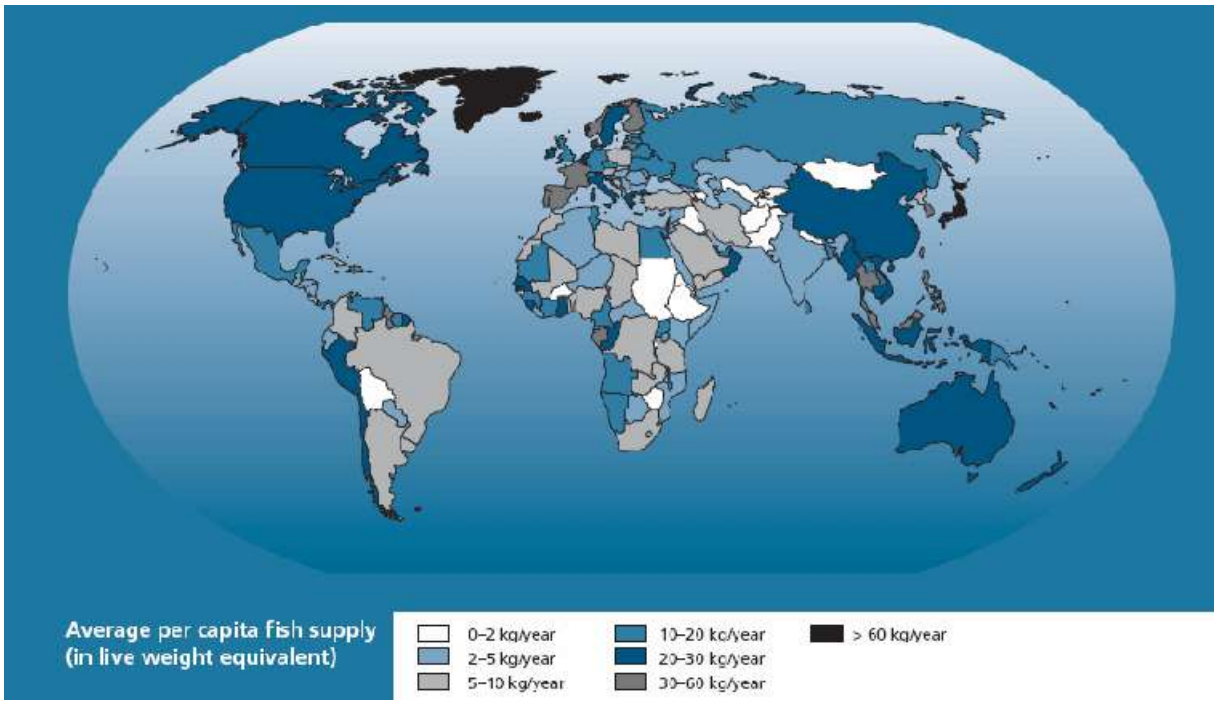


Fig. I.1. Répartition de la consommation moyenne de produits marins par habitant de 2003 à 2005 (FAO, 2008).

Cette répartition inégale est le reflet de valeurs traditionnelles et culturelles, de la disponibilité en ressources marines et de critères socio-économiques. La consommation est la plus élevée au Groenland et au Japon. Elle est la plus faible en Afrique. Elle est importante en Asie-Indonésie-Océanie, en Europe Occidentale, en Amérique du Nord, Centrale et sur la côte chilienne.

La consommation humaine de produits marins a atteint 72,1 Mt en 2006. Son augmentation suit celle de la population. Les utilisations non-alimentaires ont augmenté jusqu'à la fin des années 90 (Fig. I.2) et contribue à l'effort de pêche mondial. La principale utilisation non-alimentaire est la production de fourniture pour l'alimentation animale, notamment pour l'aquaculture.

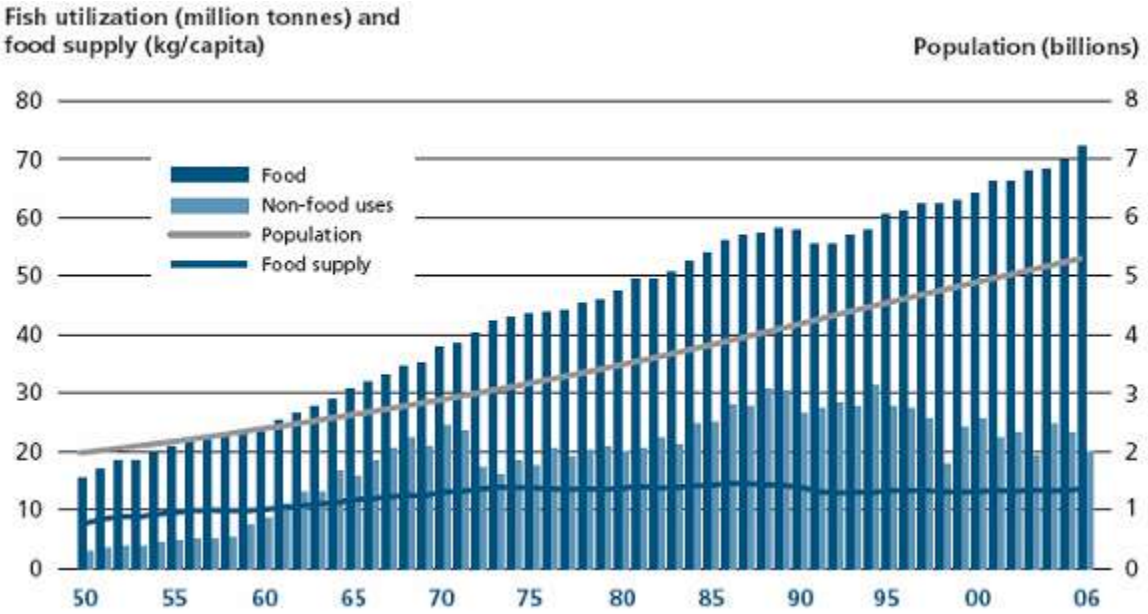


Fig.I.2. Secteurs approvisionnés par la production de poissons dans le monde (sauf Chine) (FAO, 2009)

Avant la crise de 2009, l'augmentation de la consommation était particulièrement marquée pour les crustacés, principalement la crevette. La consommation mondiale est passée de 0,4 kg/hab en 1961 à 1,6 kg/hab en 2005. Aujourd'hui, la crevette est la première valeur échangée parmi les produits marins. Sa production annuelle mondiale était estimée à plus de 6 Mt en 2005. La région Asie-Pacifique, et notamment la Chine, la Thaïlande, le Vietnam, l'Indonésie et l'Inde, est la principale productrice, totalisant près de 88 % des productions (FAO, 2009 ; Globefish, 2011). Les exportations de crevettes atteignent 14 milliards de dollars par an, soit 16 % des produits marins.

La part de l'aquaculture représente 70% de la production mondiale de crevettes et plus généralement 76% pour l'ensemble des crustacés (FAO, 2006). Cependant, la répartition entre

l'aquaculture et la pêche de crevettes est très inégale selon la région du globe (Fig.I. 3).

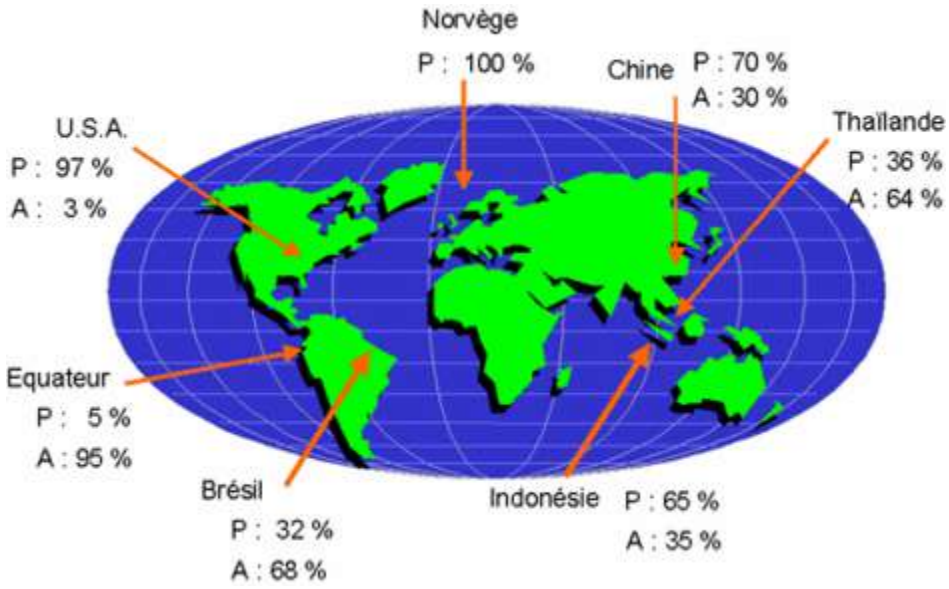


Fig.I. 3. Production de crevettes dans le monde, répartition entre la pêche (P) et l'aquaculture (A) (FAO, 2006)

Les crevettes sont généralement traitées aux métabisulfites à la sortie de l'eau, pour éviter leur dégradation et le noircissement des carapaces par oxydation (Chantereau, 1991). Elles sont vendues soit fraîches, soit congelées, cuites ou marinées. De plus, elles sont proposées entières ou décortiquées. En 2010, la plus forte augmentation était la part des crevettes cuites et décortiquées. Généralement, cette forme de produit est destinée à une post-transformation, telle que la fabrication de brochettes de la mer ou de plats préparés.

L'une des espèces de crevette les plus commercialisées est la crevette tropicale, dite crevette à patte blanches, *Penaeusvannamei*. À l'origine, elle était cultivée uniquement sur la côte Pacifique de l'Amérique latine. Depuis sa production s'est étendue. Elle a atteint 67 % de la production mondiale en 2008 (FAO, 2010), soit 70% des pénéides (Fig. I. 4). La consommation de *P. vannamei*est très prisée. Elle a augmenté de 58 % en Asie et de 21.1 % en Amérique latine entre 2001 et 2006.

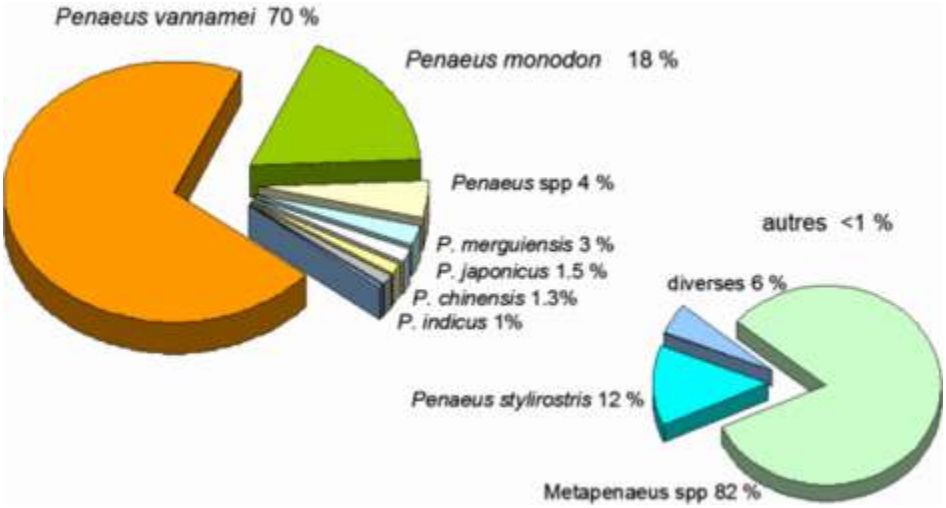


Fig.I.4. Répartition des pénéides élevées en aquaculture dans le monde, (FAO, 2010)

L'augmentation de la production des crustacés entraîne une augmentation du volume de leurs coproduits. Des plateformes de décorticage de crevettes existent notamment au Maroc et en Asie. Leur principale voie de valorisation est la production de chitine, l'un des composés majoritaires des cuticules de crustacés.

I.2. Valorisation des coproduits marins : la chitine et ses dérivés

Les coproduits marins désignent les parties (de poissons, céphalopodes, crustacés, etc.) issues d'un procédé de transformation pour la consommation humaine (filetage, éviscération, étêtage, pelage ou cuisson). Il s'agit des peaux, arêtes, têtes, queues, ou carapaces. Leur valorisation n'est pas une préoccupation récente. Ils font l'objet d'une attention particulière du fait de la valeur ajoutée qu'ils apportent aux procédés industriels classiques.

-Valorisation des coproduits de crustacés : la production de chitine

Les coproduits de crustacés représentent plus de 60% du poids frais (Wang et al., 2011). Ce volume constitue une ressource abondante de chitine. Ce polysaccharide ancien constitue l'exosquelette des crustacés. Les domaines d'applications de la chitine et de ses dérivés ne cessent de s'étendre.

La production de chitine se situe en majorité en Asie-Pacifique. Les coproduits de crustacés y sont disponibles et la législation liée au retraitement des effluents est peu contraignante. En 2004, on répertoriait 63 producteurs de chitine ayant une place importante sur le marché, dont la moitié en Asie (Montfort-Windels, 2004). Le Japon est le premier producteur (FAO, 2009).

Pour la plupart des applications, la chitine n'est pas utilisée directement. Elle est convertie, principalement en chitosane et chitooligosaccharides(Fig.I.5**)**. La production de chitine était

de l'ordre de 25 000 tonnes en 2006, dont près de 8 000 tonnes pour sa conversion en chitosane (GIA, 2010). En 2000, 10 000 tonnes de chitine étaient produites (Kurita, 2006), dont près de 6 667 T pour la fabrication de glucosamine, 2 667 T pour le chitosane et 1 000 T pour les oligosaccharides. Le marché de la chitine n'a cessé de croître comme en témoigne la figure I.5. Les ventes de chitine ont atteint près de 25 000 tonnes en 2006 (GIA, 2010).

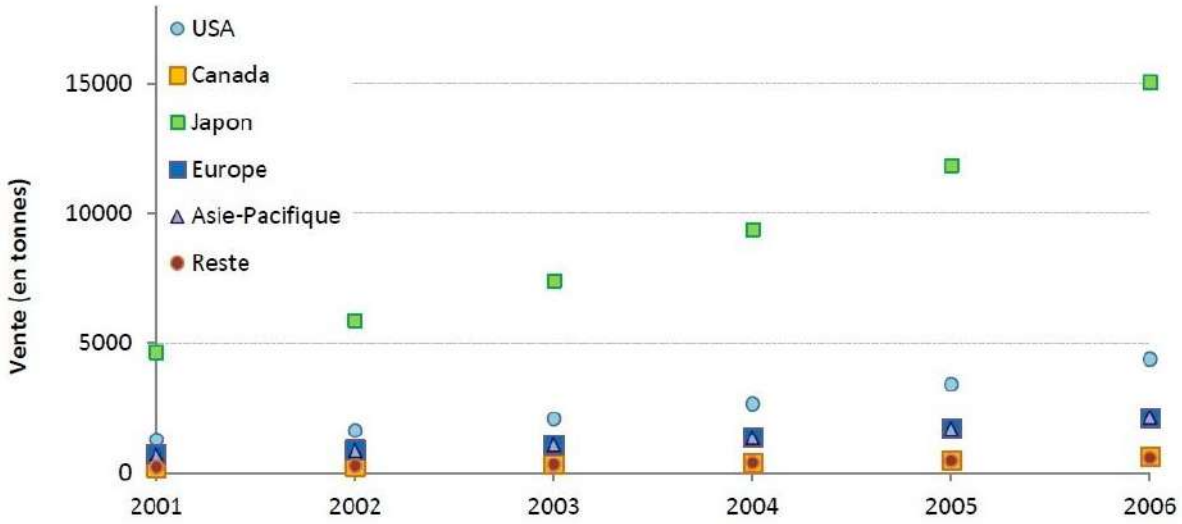


Fig. I. 5. Ventes de chitine en fonction des zones géographiques (D'après GIA, 2010)

D'après la figure I.5, le Japon domine nettement le marché de la chitine. Il participe à 61% des ventes mondiales. Les perspectives annoncées à l'horizon 2015 maintiennent globalement ces écarts entre les régions. La production de chitine atteindrait près de 63 000 tonnes (GIA, 2010).

En 2006, 60% de la chitine a été convertie en glucosamine. Ceci place la glucosamine au premier rang des volumes de ventes. Le second dérivé est le chitosane, dont la part des ventes représente près de 34%. Cependant, ces chiffres masquent des disparités régionales. Par exemple, en Asie-Pacifique la même année, la part du chitosane est supérieure à celle de la glucosamine (50% contre 46%). Au contraire, le Japon consomme 25% de chitosane contre plus de 66% de glucosamine. Les perspectives tendent vers une très légère diminution de la part des « autres dérivés » au profit de la glucosamine et du chitosan (GIA, 2010).

L'Asie produit de la chitine à un coût très compétitif. En Chine, 90% de ce coût correspond au prix des matières premières et des réactifs (CCM International, 2009). Le tableau I.1, montre les différences de prix en fonction des catégories de dérivés de chitine (Einbu, 2007a).

Tableau I. 1. Production de dérivés à partir de chitine et gamme de prix (Einbu, 2007a)

Dérivés	Production (T)	Chitine consommée	Prix du marché (USD/kg)
Glucosamine	4500	9000	7-35
chitosane	3000	4000	10-100
Oligosaccharides **N-acétylglucosamine**	500 100	1000 200	50-100 20-140

Le principal critère qui définit le prix est le taux de pureté, lui-même lié au procédé d'extraction de la chitine. Einbu (2007a) rapporte des prix bien plus élevés pour des dérivés de très forts degrés de pureté, de l'ordre de 10 000 USD/Kg pour des oligosaccharides ultra-purs et 50 000 USD/Kg pour le chitosane. Les prix de la N-acétylglucosamine obtenue par voie chimique et par voie enzymatique sont de l'ordre de 20 USD/Kg et de 100 à 140 USD/Kg respectivement.

I. 3. Évolution des volumes de ventes par domaine d'application

Le chitosane, dérivé majeur de la chitine, présente un vaste champ d'application qui s'étend de traitement des eaux usées jusqu'à la médecine et la biotechnologie.

La figure I. 6, montre que les applications du chitosane sont largement dominées par le secteur du traitement de l'eau, qui atteint plus de 4 000 tonnes consommées en 2006. Ce secteur est suivi par celui de la cosmétique, de l'agroalimentaire, du médical et de l'agrochimie. Les autres secteurs tels que la biotechnologie, la papèterie, le textile et la photographie représentent de faibles volumes de ventes. Les prévisions évolueraient peu à l'horizon 2015 (GIA, 2010).

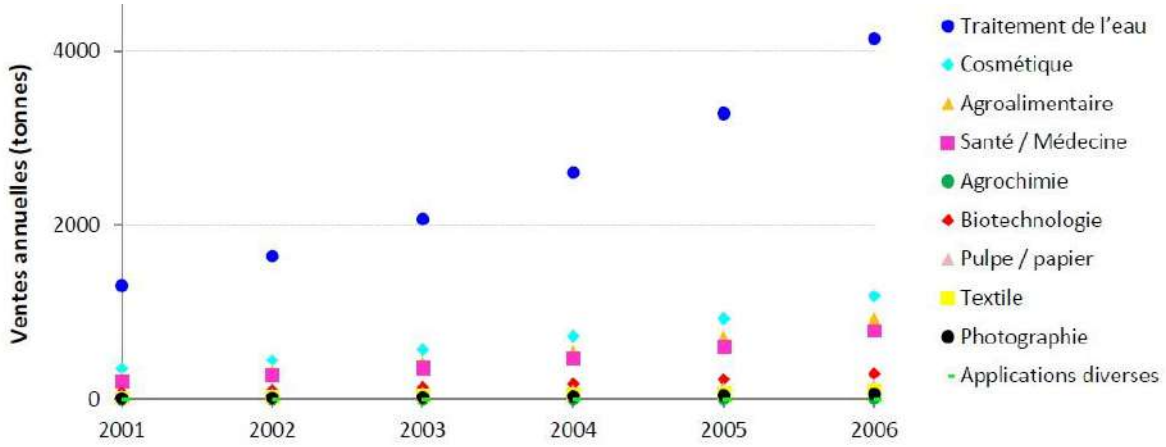


Fig. I.6.Évolution des domaines d'application pour lesquels le chitosan est employé (D'après GIA, 2010)

Le premier pays consommateur de chitosane, notamment pour le secteur du traitement de l'eau est le Japon, avec près de 3 700 t en 2006. Les pays occidentalisés, tels que les États-Unis, consomment davantage le chitosane dans les domaines de la cosmétique, de l'agroalimentaire, du médical et de la biotechnologie. La zone Asie-Pacifique est leader dans la consommation du chitosane, en agriculture/agrochimie (Tab I.2).

Tableau I. 2. Répartition des applications du chitosane, en tonnes, en 2006 (GIA, 2010)

Domain d'application	USA	Europe	Japon	Asie-pacifique	Canada	Autres	Total
Traitement de l'eau	450.3	368.6	2900.8	245.8	74.9	101.0	**4141.9**
Cosmétique	535.8	173.6	209.6	136.4	54.2	79.8	**1189.4**
Agroalimentaire	352.0	209.6	197.2	72.5	67.8	33.1	**931.9**
Santé/Médecine	306.5	84.9	156.2	200.5	31.1	13.9	**793.1**
Agrochimie	125.6	73.4	89.0	285.5	29.2	20.0	**622.7**
biotechnologie	131.2	37.1	57.5	45.2	15.8	12.1	**298.9**
Pulpe/Papier	39.1	28.9	36.1	29.6	11.2	6.8	**151.7**
Textile	23.47	17.8	25.5	19.9	6.3	4.3	**97.3**
photographie	13.04	9.1	29.7	8.9	2.9	1.7	**65.3**
Applications diverses	28.89	18.9	54.1	19.1	8.3	4.1	**133.4**
TOTAL	**2005.9**	**1021.9**	**3755.7**	**1063.1**	**301.7**	**276.8**	**8425.1**

II. La chitine et le chitosane

II. 1. Historique

En 1811, le Professeur Henri Braconnot, Directeur du jardin biologique à Nancy (France) a isolé une substance fibreuse d'un certain type de champignon. De plus, il a observé que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses d'acides. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (coléoptère) et a été ensuite nommée chitine (provient du mot grec "kitos" qui signifie l'enveloppe). En 1859, le Pr. C. Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultat du traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. Cependant, ce n'est qu'en 1894 que cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler (Nugraha, 2006)

Entre 1930 et 1940, ces biopolymères (la chitine et le chitosane) ont suscité beaucoup d'intérêt dans le monde oriental, principalement pour l'application dans le domaine médical et la purification de l'eau. Et depuis 1970, La production industrielle et l'utilisation de ces deux biopolymères sont en constante augmentation puisque nous savons qu'ils se trouvent abondamment dans la nature et sont des ressources renouvelables (Attilaet al., 2009). Actuellement, la production de la chitine et du chitosane à partir des carapaces de crabes et de crevettes, est économiquement rentable (Ravi Kumar, 2000)

II.2. Présentation des polymères

II.2.1. Définition et structure de la chitine

La chitine, poly (β-(1-4)-N-acétyl-D-glucosamine), est un polysaccharide naturel d'une importance majeure (Fig. II.1). Ce biopolymère est synthétisé par un très grand nombre d'organismes vivants; et compte tenu du montant de la chitine produite chaque année dans le monde, il est le polymère le plus abondant après la cellulose.

La chitine se produit dans la nature comme des microfibrilles cristallines ordonnées formant composants structurels dans l'exosquelette des arthropodes ou dans les parois cellulaires des champignons et des levures. Il est également produit par un certain nombre d'autres organismes vivants dans le règne végétal et animal inférieur (Arbia, 2007).

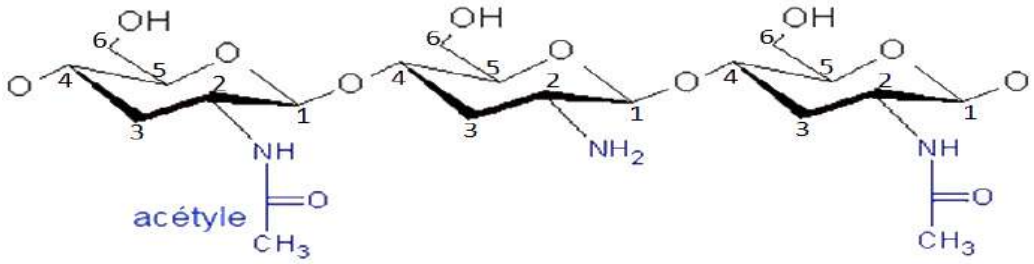


Fig. II.1. Représentation générale de la chitine comme copolymère de glucosamine et N-acétylglucosamine (Arbia, 2007).

II.2.2. Définition et structure de la chitosane

Le chitosane est un polysaccharide appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (Desbrières, 2002). Sa structure chimique idéale est un enchaînement de monomères β-D-glucosamine reliés par une liaison glycosidique (1→4). Le terme chitosane est donné à copolymère dont le DA est inférieur à 50% (Desbrières, et al., 2002).

Le chitosane (Fig.II.2), forme N-désacétylée de la chitine, est facilement soluble dans des solvants organiques dilués à pH acides (Penistonet Johnson, 1980).

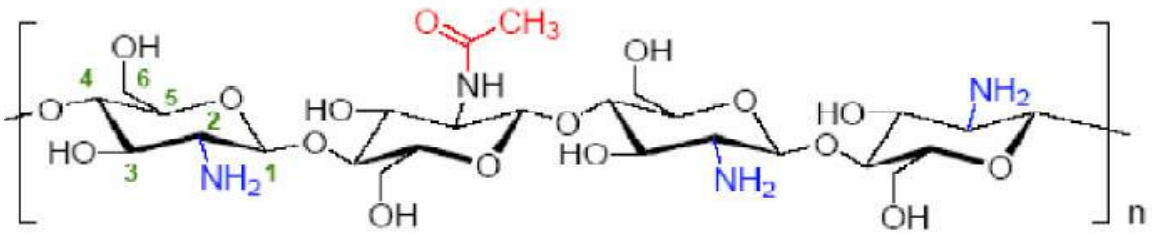


Fig. II.2. Structure chimique du chitosane(Moussaoui et Tifour, 2014).

II.3. Origine de la chitine et du chitosane

- **Les sources d'obtention**

La chitine est produite par les insectes (blattes, coléoptères, fourmis), les arachnides, (scorpions, araignées), les animaux marins (crabes, crevettes, homards, langoustines, calamars) et les champignons (basidiomycètes…) (Di Mario et al., 2007). Dans le règne animal, la chitine est un élément de soutien des téguments de certains invertébrés (insectes, crustacés, mollusques et nématodes). On la retrouve, en particulier, dans la composition deleur cuticule, et à un degré moindre au niveau de la paroi intestinale, du tube digestif,

destrachées, des tendons musculaires et du squelette interne (Nwe et al., 2011). Cette cuticule contient, également, des protéines, des lipides et du carbonate de calcium. En réalité, lesstructures chitineuses ne sont jamais constituées de chitine seule ; elle est généralementcomplexée à des protéines sous la forme de glycoprotéines, ce qui confère des propriétés de rigidité (ou de souplesse) aux cuticules. La chitine est, également, un constituant majeur desendosquelettes de céphalopodes comme les sèches et les calamars et des parois de certaines levures. Le tableau II.1, donne les principales sources de chitine.

TableauII.1. Le pourcentage de chitine chez les différents organismes (Hobel, 2004;Kurita, 2006; Crini et al., 2009; Jo et al., 2011)

organismes	**% de chitine**	**organismes**	**% de chitine**
Crustacés :		Insectes :	
Euphausiasp.And	20-30	Periplaneta (cafard)	2,0[b]
Meganyctiphanes sp.		Cleoptera (caccinelle)	18,4[a]
(Kill)		Diptera	27-35[a]
*Chionoecetes*sp, cancer sp,		Pieris (papillon)	54,8[a]
*Carcinus*sp. (crabe)	15-30	Bombyx (ver à soie)	64,0[0]
Carcinus (crabe)		Calleria (vers de cire)	44,2[a]
*Paralithodes*sp. (crabe royale)	35		33,7[a]
		Mollusques :	
*Callinectes*sp. (crabe bleu)	14	Pallourde	6,1
Crangon and *pandalus*sp (crevettes)	17-40	Coquille des huitres	3,6
		Plumes de calamar	41,0
*Penaeus*sp. (crevette)	40	Krill, carapace déprotéinisée	40,2
Crevettes d'Alsaka	69.8[2]	Champignons	
*Nephros*sp. And *Homarus* sp. (homard)	60-75	*Aspergillus niger*	42,0[c]
		Penicilliumnotatum	18,5[c]
Lepas sp.	59	*Penicilliumchrysogenum*	20,1[c]
		Sacchromycescerevisiae	2,9[c]
		Mucor rouxii	44,5
		Lactariusvellereus	19,0

a: basé sur la masse organique de la carapace; b: compare à la masse totale du cuticule; c: relative au poids sec de la paroi cellulaire.

Chez les insectes, la chitine constitue environ 1,5% de la masse fraîche de l'animal, ce qui explique que son exploitation commerciale ne soit pas envisagée (Kiefer, 1999). Chez les micro-organismes, le pourcentage de chitine peut atteindre plus de 20% de la masse fraîche de la cellule (Wu et al., 2004). Toutefois, l'extraction à partir de micro-organismes n'a, jusqu'ici, été effectuée qu'à titre expérimental. Le meilleur rendement d'extraction de la chitine est, actuellement, observé chez les crustacés qui en constituent donc la principale source au niveau industriel.

Environ 70% des pêches de capture marines sont utilisées pour la transformation et une quantité considérable de la capture traitée est éliminée sous forme de déchets. Les rejets dépassent 20 millions de tonnes par an, ce qui est l'équivalent de 25% de la production annuelle (Jo et al., 2011**)**. Chez la crevette, seulement 35% de la masse de l'animal est consommé tandis que cette proportion est d'environ 45% pour les crabes et les homards. Les déchets de crustacés sont constitués, principalement, de 30- 40% de protéines, 30- 50% décarbonate de calcium et de 20- 30% de chitine (Hobel, 2004; Kurita, 2006 ; Crini et al.,2009;Jo et al., 2011) (Tableau II. 2) avec d'autres composants tels que les lipides, les pigments (caroténoides et astaxanthine) et d'autres sels minéraux qui peuvent également être valorisés. La proportion de chitine dans les déchets de crustacés justifie donc son utilisation commerciale comme matière première pour obtenir la chitine et le chitosane.

II.4. Préparation du chitosane par désacétylation de la chitine

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré de polymérisation (DP), c'est-à-dire par le nombre d'unités qui constituent la chaîne du polymère, et par leur degré d'acétylation (DA), c'est-à-dire le pourcentage d'unités acétylées. Ces paramètres modulent par exemple la densité de charge du polymère, et donc sa solubilité et ses bio-fonctionnalités. D'autres caractéristiques sont parfois mesurées en raison de leur influence sur les propriétés du polymère, tels que l'indice de cristallinité et la poly-dispersion des unités de glucosamine (Glu) et N-acétylglucosamine (NacGlu). Les applications de la chitine et de ses dérivés sont liées à leurs propriétés et par conséquent à ces caractéristiques (Kasaai, 2010).

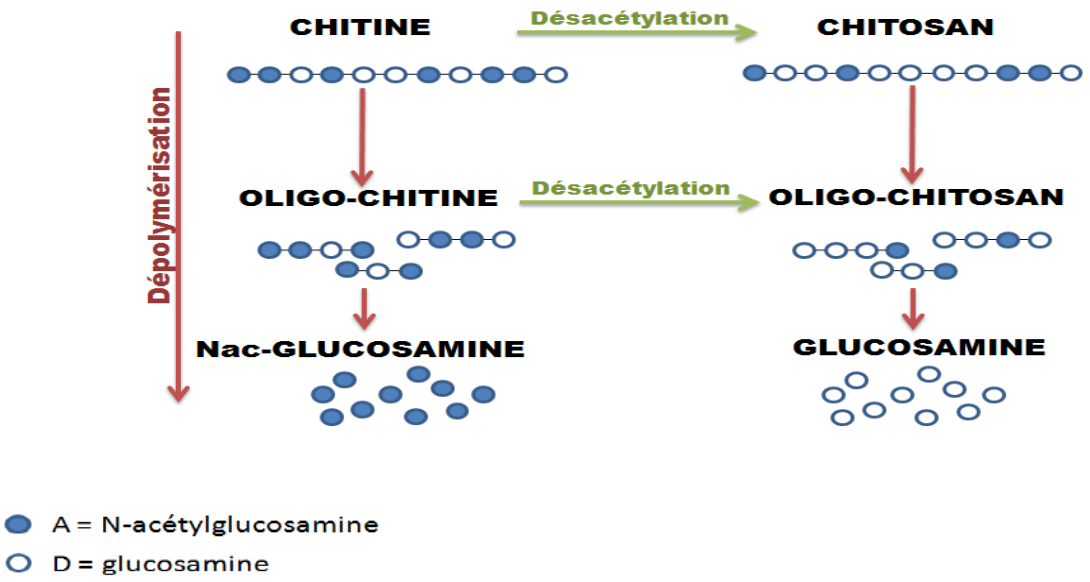


Fig. II.3. Préparation du chitosane et d'autres dérivés de la chitine (Kasaai, 2010).

Les principaux dérivés de la chitine et les mécanismes pour les produire sont schématisés dans la figure II.4. Par désacétylation, la chitine est convertie en chitosane, tandis que la dépolymérisation réduit la chitine en oligomères. Si le procédé est mené à son terme, le polymère est entièrement converti en résidus de glucosamine ou N-acétyl glucosamine. La dépolymérisation appliquée au chitosane produit des oligomères de chitosane puis des unités de glucosamine (Karine la Roux, 2012)

La désacétylation signifie l'élimination des groupements acétyles présents dans lachitine pour avoir des groupements amines. D'habitude, la chitine est partiellement désacétylée par un traitement alcalin généralement l'hydroxyde de sodium ou hydroxyde de potassium concentré (fig.II)(Moussaoui et Tifour, 2014).

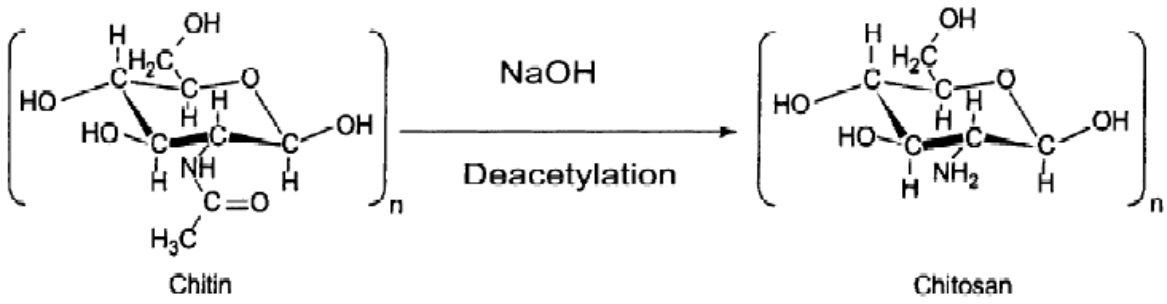


Fig.II.4 . Conversion de la chitine en chitosane par la désacétylation (Moussaoi et Tifour, 2014)

II.5. Les propriétés de chitine et de chitosane

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

II.5.1. Les propriétés physico-chimiques

Ces propriétés influencent l'utilisation industrielle de la chitine.

II.5.1. 1. Le degré d'acétylation (DA) :

C'est un des plus importantes caractéristiques de la chitine (Muzzarelli et Riccardo, 1980). Il est défini comme étant le nombre de groupe N-acétylglucosamine présent sur le polymère par rapport au nombre total d'unités (Montserrat, 2002). On parlera de chitine lorsque DA est supérieur à 70% (Kiefer, 1999). Cependant, une désacétylation peut avoir lieu au cours de l'extraction de la chitine, on parle alors du degré de

Désacétylation qui varie en fonction de l'origine et la méthode d'extraction de la chitine (Kurita, 2001).

II.5.1. 2. Le degré de désacétylation (DD) :

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

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

II.5.1. 3. La solubilité :

Malgré la similarité structurale, la chitine est insoluble dans les solvants usuellement utilisés pour la cellulose (solutions aqueuses d'hydroxyde de cuprammonium, de cupriethylènediamine et de cadoxen) (Poirier, 2000). Elle est fortement hydrophobe et insoluble dans les solvants organiques usuels à cause de sa structure cristalline (Morimoto et al., 2002). Elle se dissout dans quelques solvants corrosifs et toxiques tels que : hexafluoroisopropanol, hexafluoroacétone, chloroalcools en présence d'acides minéraux. Elle est également soluble dans l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide acétique et l'acide phosphorique à 78-97% (Yang et al., 2004). Cependant, ces solvants provoquent sa dégradation (Gagné, 1993).

Les mélanges N, N- diméthylacétamide (DMAc)/ LiCl et N- méthylpyrrolidone (NMP)/ LiCl utilisés également pour la solubilisation de la chitine furent découverts en 1977. Rutherford et Austin comparèrent l'efficacité de ces deux systèmes de solvants à plus de 200 autres systèmes potentiels. Ils conclurent que DMAc/ LiCl et NMP/ LiCl présentaient des propriétés les plus intéressantes pour la solubilisation de la chitine. A température ambiante, ces systèmes engendrent ni dégradation ni modification chimique. Une solution de chitine dans DMAc/ LiCl 5% (poids/poids) peut conserver sa viscosité initiale pendant 48 jours. Plusieurs études par RMN démontrent qu'il n'y a pas de réaction entre la chitine et DMAc/ LiCl 5%, donc il s'agit d'un vrai solvant de la chitine. On peut utiliser DMAc/ LiCl (4-9%) pour différentes méthodes de mesure de masse moléculaire (viscosimétrie, chromatographie d'exclusion stérique et diffusion de la lumière), pour la synthèse de dérivés de chitine en conditions homogènes et aussi pour la préparation de fibres, de films (Poirier, 2000) et de membrane à base de chitine pour la microencapsulation (Roderick, 1998).

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

II.5.1. 4. Le poids moléculaire :

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

II.5.1. 5. La viscosité

La viscosité du chitosane dépend du degré d'acétylation de ce polymère. Plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et par conséquent sa viscosité est plus importante. Pour déterminer la viscosité, il existe différentes méthodes. La plus employée est « la viscosimètre ».

La viscosité dépend également:

- de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration),
- de la température (elle chute lorsque la température augmente).
- du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire)(Muzzarelli, 1985; Rinaudo et al, 1989; No et al, 1997 et Hudson et al ,2003).
- et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée).

II.5.1. 6. Polyélectrolyte en milieu acide

Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques (Austin 1984 ; Rinaudo et Sandford, 1989 ; Sorlier et al, 2001).En milieu acide, il se comporte comme un polycation, à forte densité de charge. Le chitosane est une base faible de pKa voisin de 6,3- 6,7, valeurs moyennes des échantillons commerciaux. Il se dissout donc en milieu acide par protonationdes fonctions amine présentes sur la macromolécule (Sorlier et al, 2001), pour un polymère faiblement acétylé (c'est-à-dire proche de 10-15%, représentatif des échantillons commerciaux, de pKa voisin de 6,3), la plupart des groupes aminés sont protonés en milieu acide (PH <5,5). Lorsque le pH devient inférieur au pKa, le chitosane devient cationique et par conséquent soluble. Le chitosane se distingue ainsi de la cellulose par sa structure moléculaire chargée positivement. En général, la valeur du pKa augmente quand le DD diminue (No et al, 1997; sorlier et al 2001; Sandford, 2003).

II.5.2.Les propriétés biologiques

II.5.2. 1. La biodégradabilité :

La dégradation biologique de la chitine est réalisée par une série d'enzymes : chitinases, lysozyme et glucanases (Shigemasa et *al*, 1994 ; Chih-Min et al., 2002 ; Yang et al., 2004). Parmi les chitinases, les endo-chitinases (Laura et *al*, 2006) hydrolysent le polymère de façon aléatoire pour produire des dimères et des trimères de N-acétylglucosamine (NAG), tandis que les exo-chitinases (Laura et al., 2006) hydrolysent la chitine de haut poids moléculaire en produisant uniquement des dimères de NAG. Finalement,

Les N-acétylglucosaminidases aussi appelées chitobiases ou N-acétylhexoaminidases hydrolysent les dimères de NAG et parfois le NAG des extrémités non-réductrices des chaînes

de chitine pour produire des monomères de NAG (Plouffe, 1997). Le rôle des enzymes (chitinases, chitosanases ou de lysozymes) impliquées dans la lyse des polymères est double, un rôle de dégradation autolytique et morphogénétique et un rôle nutritionnel. Une grande part de cette dégradation est microbienne. Elle est conduite par des bactéries libres ou adhérentes aux parois intestinales.

II.5.2. 2. Biocompatibilité, toxicité et stérilisation

La chitine, le chitosane, leurs oligomères et monomères ne sont pas immunogènes. Ils sont biocompatibles et très bien tolérés par les tissus vivants. La DL 50 (douce l'étale à50%) du chitosane est de 18 g par Kg (valeur très proche de celle du sucre de table).Sa présence dans l'organisme vivant n'induit aucun effet néfaste à la santé du receveur (Foscolo et Phillipon, 1997 ; Bal et al, 2006).

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

II.6. Les domaines d'applications de la chitine et de ses dérivés

La chitine est naturelle, non-toxique, biodégradable et versatile. Son utilisation repose principalement sur sa capacité à former des matrices et ses activités biologiques intéressantes (Goycoolea et al., 1999).

Le caractère poly-cationique de très forte densité de charge du chitosane est souvent à l'origine de ses propriétés. En effet, il favorise la formation de complexes poly-électrolytes et ainsi la capacité à former des matrices (Shahidi, 1999). De plus, les dérivés de la chitine possèdent des activités biologiques comme hypo-cholestérolémique, antioxydant, anti-tumoral, antimicrobien, anti-hypertensive, antidiabétique et favorisant le système immunitaire (Kim, 2010). Ces domaines d'application vont être détaillés ci-dessous, par ordre croissant de grade technologique.

II.6.1. Les applications dans le domaine agricole

La chitine sert de substrat aux microorganismes producteurs de chitinase et d'anthraquinone par *Morindacitrifolia*par exemple (Dornenburg et Knorr, 1994). De plus, la chitine et ses dérivés jouent un rôle d'éliciteur sur les plantes. Il consiste à favoriser la production de métabolites secondaires qui renforcent les défenses immunitaires. Les dérivés de chitine stimulent par exemple la production de l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et de la tyrosine ammonia-lyase (TAL), qui interviennent dans la synthèse de composés du système de résistance contre les pathogènes (Khan et al., 2003 ; Kim et al. 2005). Par conséquent, de meilleurs rendements de germination et de récolte sont obtenus (Crini et al. 2009 ; Rabea et al. 2003). Enfin, les produits chitineux apportent de l'azote (≈ 7 %) lorsqu'ils se décomposent, contribuant à l'enrichissement du sol et de la plante.

II.6.2. Les applications dans le domaine du traitement de l'eau

Des réductions de 70 à 98% de la teneur en MES (matière en suspension, responsable de la turbidité) et de 55 à 80% la demande chimique en oxygène (DCO) ont été observées pour le traitement des eaux usées (Jun et al., 1994) en utilisant du chitosane comme floculant.

Du fait de leur forte densité de charge, les dérivés de chitine sont capables d'interagir avec les MES, les microorganismes et les ions métalliques (Taboada, 2003 ; Cardenas, 1876). Cette propriété est utilisée pour piéger les composés dangereux, pour les éliminer ou les doser (Camci-Unal et Pohl, 2010 ; Skorik et al. 2010. Guibal et al. (1996) ont étudié l'impact des caractéristiques des dérivés du chitosan et de leur environnement (lumière, gaz) sur leur capacité d'adsorption avec les ions uranyle. Le chitosan est également employé pour recycler les effluents de l'industrie textile en retenant des pigments (Yap et al. 2008).

Le chitosan peut être utilisé de plusieurs façons, la principale étant comme floculant (Crini, 2009). Les colloïdes en suspension, les métaux lourds, les colorants des eaux de teintureries (Hsien et Rorrer, 1995) ou encore les molécules aromatiques et phénoliques (No et Meyers, 2000 ; Krajewska, 2004) s'agglomèrent avec le chitosan et les flocs sont retenus par filtration. Les flocs de chitosan réduisent de 50 % les MES (Rhee et al., 1998). Un autre mode d'action consiste à intégrer le chitosan directement dans la composition des membranes de filtration.

L'encapsulation d'enzyme par des matrices chitineuses est une piste étudiée pour le traitement de l'eau. (Miao et al. (2000) ont montré la capacité du chitosan associé à la glutaraldéhyde à immobiliser la peroxydase extraite de raifort. Cette enzyme est employée pour éliminer les phénols des effluents de raffineries (Lu et al. 2010).

II.6.3. Les films de chitine/ chitosane

Les films de chitine et de chitosan s'obtiennent par leur dissolution dans une solution acide. La teneur en humidité du polysaccharide doit être faible pour réussir le film. Du point de vue de leurs caractéristiques mécaniques, les films de chitine ne peuvent pas subir d'élongation. Ceux à base de chitosan peuvent être étirés deux fois seulement. Ces propriétés mécaniques peuvent être améliorées par modification du chitosane (par ramification) ou par des ajustements de formulation. Par exemple, le chitosane-poly (vinyl-alcool) présente une meilleure résistance mécanique, stabilité et capacité d'élongation (Nakano, 2007).

II.6.4. Les produits cosmétiques

Beaucoup d'applications dans le domaine cosmétique reposent sur ces propriétés filmogènes. Des principes actifs peuvent être piégés dans des films ou des billes de chitosan. Ces principes actifs sont libérés au contact de la peau par l'effet de la diminution du pH. Les produits le plus couramment rencontrés sont des soins pour la peau, contre l'acné et pour les

cheveux, notamment pour leur souplesse. Cette application repose sur les propriétés électrostatiques du chitosan (Rinaudo, 2006).

II.6. 5. Les applications dans les industries alimentaires et diététiques

Plusieurs propriétés de la chitine ou de ses dérivés sont exploitées dans le domaine de l'agroalimentaire (tableau II. 2).

Tableau II.2. Utilisations de la chitine/ chitosane en agroalimentaire (Crini et al. 2009)

Application	Rôle
Préservation de la qualité des aliments	Antimicrobien Antioxydant
Films comestibles	
Additif alimentaire	Structurant Texturant, émulsifiant Ajoute arome et couleur
Nutraceutique (compléments nutritifs)	Fibres Hypocholestérolémiant Contre l'intolérance au lactose
Recyclage des effluents	Réduction de l'absorption des lipides

Les films alimentaires à base de dérivés de chitine sont à la fois une barrière physique et biologique contre les flores d'altération et les contaminations extérieures. Le chitosan serait plus efficace que les CHOS dans ce domaine, cependant les études ne sont pas unanimes. Tsai et al. (2004) montrent que le chitosane a un effet inhibiteur sur des pathogènes tels que *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa et Salmonella entericaserovarTyphi*. À l'inverse, (Kittur et al. 2005 et Kumar et al. 2005) ont montré que les CHOS étaient plus actifs. (Linet al. 2009) expliquent cette contradiction par le rôle dominant du degré d'acétylation par rapport à celui du degré de polymérisation. Ceci illustre bien à quel point les caractéristiques des dérivés de la chitine influent sur leurs propriétés.

Ces films alimentaires sont également antioxydants (Jeon et al. 2002). (Kim et Thomas 2007) ont montré un résultat positif contre l'oxydation des lipides. Cette propriété est liée à la présence de deux groupes hydroxyles, Ils attirent fortement les atomes d'hydrogène en les détournant des lipides (Je et al., 2004 ; Park et al., 2004). Il estpossible de réaliser des films alimentaires comestibles grâce au chitosane (De Moura et al., 2009 ; Cardenas et al., 2008).

Le chitosan et la glucosamine sont commercialisés comme compléments alimentaires. Les propriétés revendiquées reposent sur leur pouvoir antioxydant et leur capacité à faire perdre du poids. Le chitosane agirait comme film intestinal et comme fibre. Il inhiberait l'absorption des lipides et des sucres (Ylitalo et al. 2002), ou activerait directement le déstockage des

lipides (Helgason, 2009). Les oligomères du chitosane semblent également prévenir les risques de diabète (Kumar et Tharanathan, 2004).

Les CHOS seraient également intéressants comme prébiotiques. Des résultats prometteurs ont été obtenus par (Pan et al. 2009) avec des chitooligosaccharides de 90% de DD et de 3 à 6 DP.

II.6. 6. Les utilisations comme auxiliaires technologiques

Du point de vue technique, le chitosane constitue un agent de clarification, par exemple pour l'industrie du vin (Chatterjee et al. 2004). Il permet d'éviter l'emploi du collagène, qui suscite la crainte des consommateurs depuis la crise de Creutzfeld-Jacob. Une réduction jusqu'à 95% de la turbidité a été observée après utilisation de la chitine-glucane (Kim, 2010). De plus, le rôle antioxydant des dérivés de la chitine est exploité pour stabiliser les polyphénols du vin, et ainsi préserver sa couleur et ses arômes. Ils sont employés pour capter les métaux lourds par bio-adsorption, tels que le Cadmium, le Fer et le Plomb (Bornet et Teissedre, 2008). D'autres applications existent, telles que l'utilisation du chitosan pour recouvrir des fruits et légumes après leur récolte ou lors du procédé de fabrication du café (Scheruhn, 1999).

II.6. 7. Les limites et les risques d'allergies

Des cas d'allergies ont été rapportés. Les procédés de fabrication et le degré de purification de la chitine peuvent être mis en cause puisque les allergènes incriminés seraient des agents chimiques tels que les métabisulfites, des amines biogènes ou des résidus protéiques tels que la trompomyosine (Lopata, 2010). La chitine déclenche également des réactions immunitaires qui peuvent aboutir à des réactions allergiques (Reese et al. 2007; Kim, 2012). (Néanmoins, certains auteurs, dont Muzzareli2010), revendiquent l'innocuité des compléments à base de dérivés de la chitine. De plus, le rôle du chitosan contre les inflammations liées aux réactions allergiques et à l'asthme a été décrit. L'explication de ces deux phénomènes antagonistes dépend de la taille du polymère (Brinchmann et al. 2011).

La consommation de chitosan doit également être soumise à des précautions vis-à-vis du calcium. (Liao et al.,2007) ont montré qu'il limitait l'absorption du calcium tandis que les CHOS favoriseraient le phénomène inverse, et donc renforceraient les os (Jung et al. 2006).

II.6. 8. Les applications dans le domaine médical

II.6. 8. 1. L'activité antimicrobienne

Le chitosane est antibactérien et antifongique (Hirano et Horiuchi, 1989 ; Allan et Hadwiger, 1979). Le mécanisme d'action de l'effet anti-microbiologique serait lié à la charge positiveCette activité serait favorisée lorsque la solubilité augmente (Chen et al. 1998). Le

mode d'action du chitosane repose sur son interaction avec les membranes des cellules microbiennes (Shahidi et al. 1999). Les bactéries Gram-négatifs, telles que *E. coli*, paraissent particulièrement concernées (Chung et al, 2004). Cette activité semble être favorisée par des degrés de désacétylation élevés.

II.6. 8. 2. L'activité cicatrisante

Le rôle du chitosane est avéré dans la réparation tissulaire de l'épiderme (Howling et al. 2001) et la cicatrisation (Lahiji et al., 2000). De ce fait, le chitosan est utilisé pour fabriquer des pansements et des bandages (Ribeiro, 2009). Par exemple, un mélange de chitosane et oxychitine est commercialisé comme agent de recouvrement pour les greffes, le HemCon® Bandage. Le degré de désacétylation augmentant, les performances de cicatrisation sont améliorée (Minagawa et al. 2007).

II.6. 8. 3. L'activité de chitooligosaccharides

Les chitooligosaccharides (CHOS) sont caractérisés par leur très faible longueur de chaîne, homogène ou hétérogène, d'unité de N-acétylglucosamine ou glucosamine. Selon (Zhang et al.,1999), leur DP est compris entre 3 et 10, alors que celui de la chitine peut atteindre 5 000. L'engouement récent pour les CHOS s'explique par leurs propriétés intéressantes pour le domaine médical (Aam, 2010). Depuis les années 1970, leurs activités anti-tumorales et sur la réduction des métastases ont été mises en évidence (Muzzarelli, 1977; Suzuki et al., 1986 ; Nam et al., 2007; Shen et al., 2009). L'action s'appliquerait sur le contrôle de la croissance des vaisseaux sanguins (Prashanth et al., 2005; Wu et al., 2008). Les CHOS seraient également reconnus comme anti-inflammatoires en cas d'asthme (Kim, 2010) et comme anti-ulcère (Ito, 2000). Ils sont aussi connus pour favoriser la régénération osseuse (Klokkevold et al., 1996 ; Park et al., 2008 ; Ratanavaraporn et al., 2009) et la minéralisation du tissu osseux (Jung et al., 2006; Kim et al., 2005). Ils sont également utilisés comme vecteurs de gènes (Jiang et al., 2008 ; Kumar et al., 2004 ; MacLaughlin et al., 1998) et comme inhibiteurs de la malaria (Tsai et al., 2001 ; Takeo et al., 2009 ; Langer et al., 2001). Enfin, la glucosamine est largement utilisée pour réduire les douleurs liées à l'inflammation des articulations (Crini et al. 2009).

II.6. 8. 4. Le rôle de support matériel

L'intérêt pour les nanofibres et nanoparticules à base de chitosane s'accroît en médecine. Le mécanisme d'action de l'effet anti-microbiologique serait lié à la charge positive du C-2 (Fig. II.2). Cette activité serait favorisée lorsque la solubilité augmente (Chen et al., 1998). Le mode d'action du chitosane repose sur son interaction avec les membranes des cellules microbiennes (Shahidi et al., 1999). Les bactéries Gram-négatifs, telles que *E. coli*, paraissent

particulièrement concernées (Chung et al., 2004). Cette activité semble être favorisée par des degrés de désacétylation élevés.

II.6. 9. Les applications en soin dentaire ou vétérinaire

Le chitosane intègre des pansements appliqués sur des lésions dues aux infections de la dent. Ilconstitue un bio-matériel inoffensif, anti-inflammatoire et antimicrobien (Berthold et al., 1996). Des pâtes à mâcher à base de chitosane et CHOS ont également été étudiées, pour ôter les débris alimentaires ingérés. La salive libère les chito-oligomères, activant ainsi leur rôle anti-carie (Hayashi et al., 2007).

Le chitosane est utilisé par les vétérinaires comme moyen d'administration, tel que les sprays (application par douche), implant, bain, dispositif intra-mammaires, intra-rumen et intra-utérin. Certains dérivés de la chitine sont indiqués pour favoriser la croissance et stimuler les défenses immunitaires (Kim, 2010 ; Senel et McClure, 2004).

II.6. 10. Autres applications

L'immobilisation d'enzymes dans des matrices à base de chitosane s'étend aujourd'hui à tous les domaines (Kim, 2010). Les dérivés de chitine peuvent intégrer des électrodes, des capteurs, des phases stationnaires de colonne de chromatographie, des membranes d'osmose inverse et de dialyse. Dans l'industrie du papier et de la photographie, on utilise le chitosan pour obtenir une meilleure surface et pour résister à l'humidité. Les feuilles enduites de chitosane renforcent les propriétés morphologiques, mécaniques, optiques, de vieillissement et offrent une meilleure qualité d'impression (Kim, 2010). Dans le domaine textile, des principes actifs peuvent être encapsulés dans du chitosane et imprégnés dans les tissus pour fabriquer des vêtements dits « intelligents ». Les principes actifs se diffusent progressivement sur la peau à mesure que le vêtement est porté (Crini, 2009). Le chitosane est également capable d'améliorer la force et la rigidité d'un tissu (Kim, 2010). Enfin, la chitine, comme substrat nutritif, favorise la croissance de microorganismes chitinolytiques. Cette propriété est exploitée pour améliorer des composts (De Jin et al. 2005) et comme méthode d'identification de ces microorganismes (Gomez-Ramirez et al., 2004).

Tableau II. 3. Autres applications de la chitine et de ses dérivés (Gomez-Ramirez et al., 2004)

Domaine d'application	Exemple d'application
Chitine	catalyse capteur chimiques films biodégradables (emballages) super- absorbant séparation membranaires (filtration) osmose inverse chromatographie (liquide, gazeuse) cristaux liquides
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 pâtes à papier (augmentation de la résistance du papier à la déchirure) agent antibactérien et imperméabilisant dans la filière textile nanomatériaux <<intelligent>>
Œnologie	clarification, désacidification et stabilisation des vins
Photographie	traitement préventif ou curatif des vignes films photographiques, extraction de l'argent
Autres	acoustique (membrane des haut-parleurs)

III. Méthodes d'extraction de la chitine et chitosane

La chitine provenant des carapaces des crustacés se présente sous forme de complexes protéiques enchevêtrés dans un réseau de sels minéraux principalement constitué de carbonate de calcium. Les analyses biochimiques de la matrice protéique montre la présence de protéines acides et des glycoprotéines (Hirotoshi et al, 2004). Dans le cas des champignons, la chitine et le chitosane sont complexés avec d'autres polysaccharides acides ou de glucines.

La purification complète de la chitine native nécessite l'enlèvement de quatre ensembles de constituants principaux : protéines, minéraux, lipides et pigments caroténoïdes. La présence de liaisons covalentes chitine-protéines demande généralement des processus de déprotéinisation sévères qui peuvent affecter la masse moléculaire de la chitine résultante.

Il en est de même pour les méthodes de déminéralisation en milieu acide. L'isolation de la chitine passe par deux étapes : la déminéralisation et la déprotéinisation.

-La déminéralisation

Le traitement acide élimine les minéraux, qui passent en solution sous forme de sels. Pour des raisons économiques, l'acide hydrochloridrique (HCl) est privilégié.

Ledegré de déminéralisation est un indicateur de la performance de la déminéralisation, il est définit par la formule suivante (Rao et Stevens, 2005):

$$\%DM = \frac{(AoMo)-(ArMr)}{AoMo} * 100 \quad \text{(éq.1)}$$

%DM est le degré de déminéralisation, Mo et Mr sont les masses initiale et résiduelle du produit hydrolysé, Ao et Ar les pourcentages de cendres dans le produit initial et résiduel respectivement.

-La déprotéinisation

Un traitement basique permet d'éliminer les protéines par solubilisation. Les réactifs employés pour cette étape sont des bases fortes comme l'hydroxyde de potassium (KOH). Le plus courant, pour des raisons d'économie et technique, est l'hydroxyde de sodium (NaOH).

Ledegré de déprotéinisationest un indicateur pour suivre l'efficacité de la réaction, il est définit par la formule I.6 (Rao et Stevens, 2007):

$$\%DProt = \frac{(P0\ M0)-(Pr\ Mr)}{P0\ M0} * 100 \quad \text{(éq.2)}$$

%DProt est le degré de déprotéinisation, M0 et Mr sont les masses initiale et résiduelle du produit hydrolysé, P0 et Pr sont les pourcentages de protéines dans le produit initial et résiduel respectivement.

Cette extraction peut se faire par deux méthodes : la méthode chimique et la méthode biologique.

III. 1. La méthode chimique

L'extraction chimique consiste en un traitement acide pour la déminéralisation et un traitement alcalin pour la déprotéinisation. Les autres composés minoritaires sont supposés être entrainés au cours de ces deux réactions. La déminéralisation précède généralement la déprotéinisation car l'inverse aurait un impact sur le DP et le DA du polymère (Rao et Stevens, 2007). Entre chaque étape, le produit est rincé abondamment à l'eau déminéralisée. La figure II. 6, schématise un exemple de production de chitine et de ses dérivés.

Elle fait appel à l'utilisation des acides et des bases. La solubilisation des minéraux nécessite l'utilisation d'une variété d'acides (HCl, HNO_3, H_2SO_4, CH_3COOH et HCOOH) (Jinjiang, 1996). Cependant, l'acide chlorhydrique (HCl) à forte température est le plus utilisé afin de dissoudre $CaCO_3$. Ce dernier en réagissant avec HCl donne naissance à un composé soluble (CaCl2) qui sera éliminé par un simple lavage (Fernandez-Kim, 2004) (Fig. II. 6).

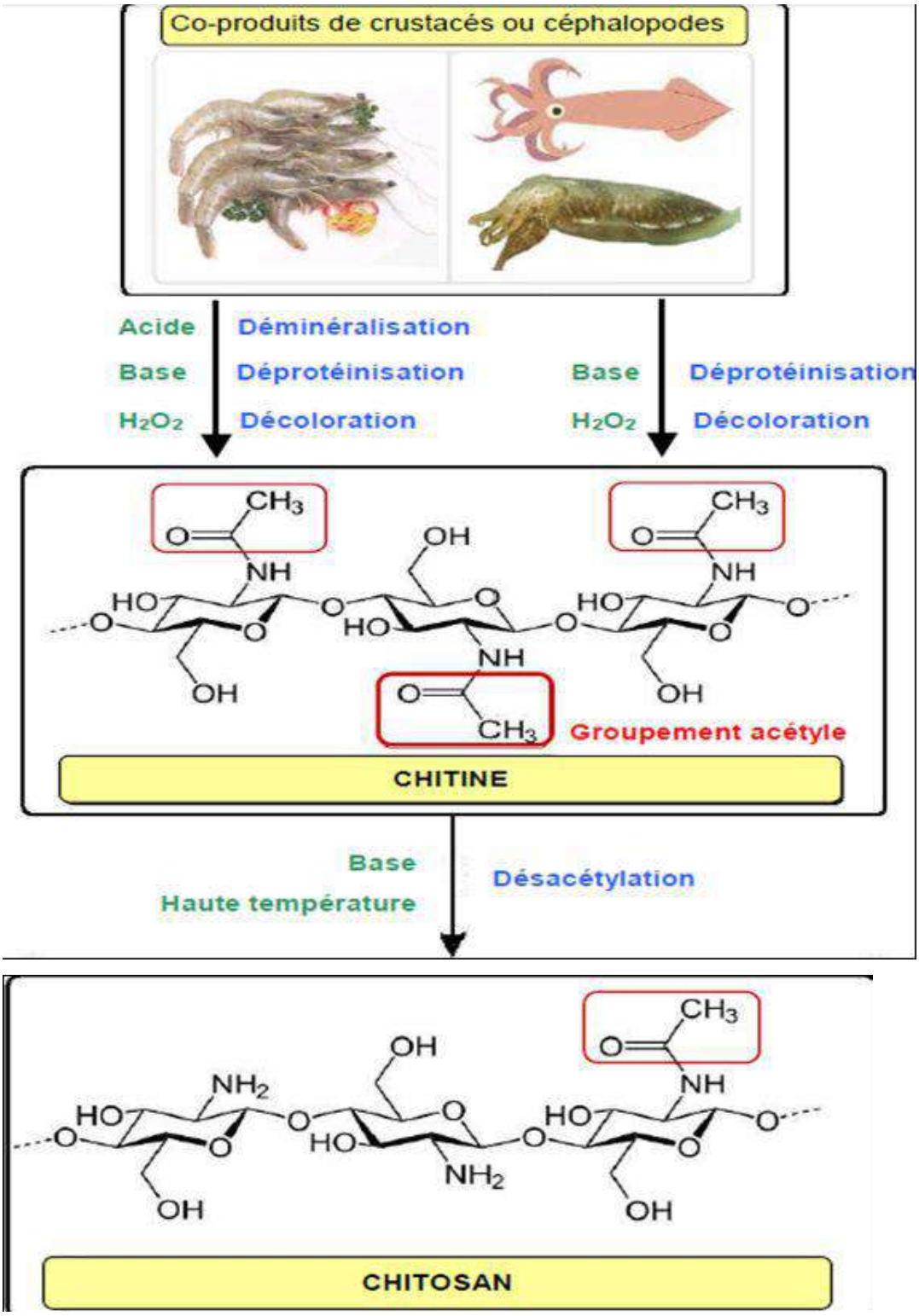


Fig. II.5. Méthode de production de la chitine et du chitosane(Kheldaoui, Bechene, 2014)

Quant à la déprotéinisation, elle nécessite un traitement basique en utilisant une des bases suivantes : Na_2CO_3, $NaHCO_3$, KOH, K_2CO_3, $Ca(OH)_2$, $NaHSO_3$ et $CaHSO_3$ (Jinjiang, 1996).

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

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

III. 2. La méthode biologique

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

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

Dans le cas des champignons, la valorisation des biomasses fongiques provenant des industries d'antibiotique ou agro-alimentaire semble très intéressante du fait qu'elle va contribuer à l'élimination d'un déchet riche en matière organique et d'autre part récupérer les substances de hautes valeurs telles que la chitine et le chitosane.

III.1. Objectif

Le but de ce travail est la récupération de la chitine et du chitosane à partir d'une biomasse fongique et une biomasse marine

III.2.Matériels

III.2.1. Matériel biologique

III. 2. 1. 1. La biomasse fongique :utilisée dans autre travail est récupérée à partir du pain moisis.

III. 2. 1. 2. La biomasse marine:utilisée est constituée de déchets de la crevette blanche *Parapenaeus longirostris*constituée de carapaces, têtes et épines.

III. 2. 1. 3. Les dattes : dans notre travail, nous avons choisi la datte cuite pour : sa disponibilité et sa faible valeur marchande. La datte cuite communément appelé « el ghars » de fabrication algérienne, cette patte de datte a la même caractéristique que les autres variétés.

III.2.2. Matériel de laboratoire



Centrifugeuse



Autoclave.



PH mètre.



Plaque chauffante.



Agitateur de paillasse



Etuve

Figure.III.1. Matériel de laboratoire.

III. 3. Méthodes expérimentales

III. 3. 1. Préparation de la poudre de carapace

Avant leur utilisation, les carapaces des crevettes sont débarrassées de la chair, des antenneset des pattes. Les carapaces, sont ensuite bouillies dans de l'eau, pendant 1h, et ce pourenlever le maximum de tissus. Puis, elles sont séchées dans l'étuve à l'air libre.

Après séchage, les carapaces sont débarrassées d'éventuels tissus encore présents, parfrottement. En dernier, les carapaces sont broyées.

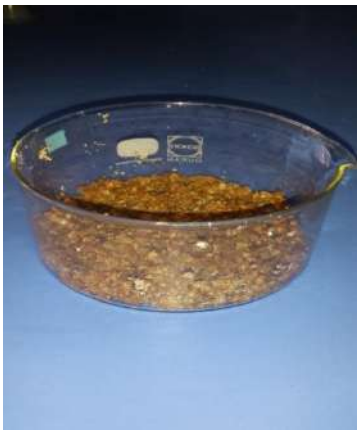


Figure.III .2. La carapace broyée.

III. 3. 2. Préparation de la biomasse fongique

- Trempez 2kg de pain moisis dans 1l d'eau de robinet ;
- Laissez macérer et décantez pendant 30mn ;
- récupérez la solution contenant les spores fongiques.
- centrifugez et ensemencez les spores dans le milieu de fermentation.

III. 3. 3. Préparations de milieux de culture

Les milieux de culture sont réalisés au laboratoire. Le milieu de base est le PDB (potato dextrose bouillon) et le jus de dattes, ensuite il sera enrichi en éléments minéraux selon des compositions précédemment déterminées.

III. 3. 3. 1. Préparation du PDB

Mettez 250 g de pomme de terre, épluchée et coupée, en morceau dans 1l d'eau distillée et laissez bouillir pendant 20 min, puis filtrez à l'aide d'une compresse, dans une fiole jaugée de 1000 ml. Ajoutez délicatement 20g du glucose et les éléments minéraux (tableau III. 1) sous agitateur après dissolution complète du glucose, ajustez le volume à 1 litre, versez dans des flacons et stérilisez à 110°C pendant 15 min.

Tableau III. 1. Composition du milieu de fermentation à base de PDB **(**Talhaoui et Ouchen, 2016).

Les composants	La quantité
Volume de milieu de culture	**784ml**
Arginine	**6g**
$Feso_4$	**0.176g**
NaCl	**0.164g**
$Cacl_2$	**0.198g**
$MgSo_4$	**0.69g**
K_2HPO4	**0.198g**

III. 3. 3. 2. Préparation de jus de dattes

Mélangez 500g de datte avec 1l de l'eau distillée. Le mélange est chauffé à 80 °C pendant 2h dans un bain marie, l'extrait de dattes est filtré afin de séparer les débris cellulosiques. Après filtration, ajoutez les éléments minéraux indiqués dans le tableau III. 2, et versez dans des flacons et stérilisez à 120°C pendant 20 min.

Tableau III. 2. Composition du milieu de fermentation à base de jus de dattes (Arbia et al., 2013)

Les composants	La quantité
Volume du milieu de culture	643.1 ml
Poudre de carapace	20g
NH_4Cl	6.8
$CaCl_2$	1.125
Tween80	2.725ml
Volume de l'inoculum (Bactérie lactique)	63.17

III. 3. 4. Préparation des fermentations

III. 3. 4. 1. La fermentation fongique

Des fioles de 1l sont remplies par 500ml de milieu PDB enrichi sont ensemencés par les spores récupérés (Fig. III.3). On ferme les fioles avec du coton cardé et du papier aluminium et on lesplace sur l'agitateur du paillasse sous agitation douce, à température ambiante pendant 16jours.



Fig.III. 3. Préparation de la fermentation fongique

- A la fin de la fermentation, on fait une centrifugation à 4000g pendant 10 min ;
- On récupère le culot (biomasse humide) par centrifugation, et on laisse sécher à température ambiante.



Fig.III. 4. La biomasse fongique humide pendant la centrifugation

- On fait un broyage manuel de la biomasse sèche en utilisant un mortier pour obtenir une poudre (Fig. III. 5).



Fig.III. 5. Biomasse sèche et broyée

III. 3. 4. 2. La fermentation lactique pour la récupération de la chitine

Des erlenmeyers de 250 ml sont remplies par 250 ml de milieu jus de dattes enrichi sont ensemencés par une bactérie lactique (Fig. III. 6). Dans le premier cycle de fermentation on a utilisé des béfidobactéries provenant d'un complément alimentaire probiotique. Un deuxième cycle de fermentation a été réalisé, pour améliorer l'extraction, en utilisant une bactérie lactique isolée par (Kouider Ammar et Boudhiaf, 2017) car elle a montré une grande aptitude à produire l'acide lactique. On ferme les erlenmeyers avec du coton cardé et du papier aluminium et on lesplace sur l'agitateur du paillasse sous agitation douce, à température ambiante pendant 5 jours.



Fig.III. 6. Le jus de dattes après la fermentation (Kouider Ammar et Boudhiaf, 2017)

III. 4. Extraction de la chitine et du chitosane

III. 4.1. Extraction de la chitine et du chitosane fongique

A la fin de la fermentation, on fait une centrifugation (4000g pour 10 min), et on récupère le culot (biomasse humide) puis on la sèche à 40°C.Pour l'extraction de la chitine et le chitosane on réalise le traitement sur la biomasse sèche suivant les étapes présentées dans la figure III. 7.

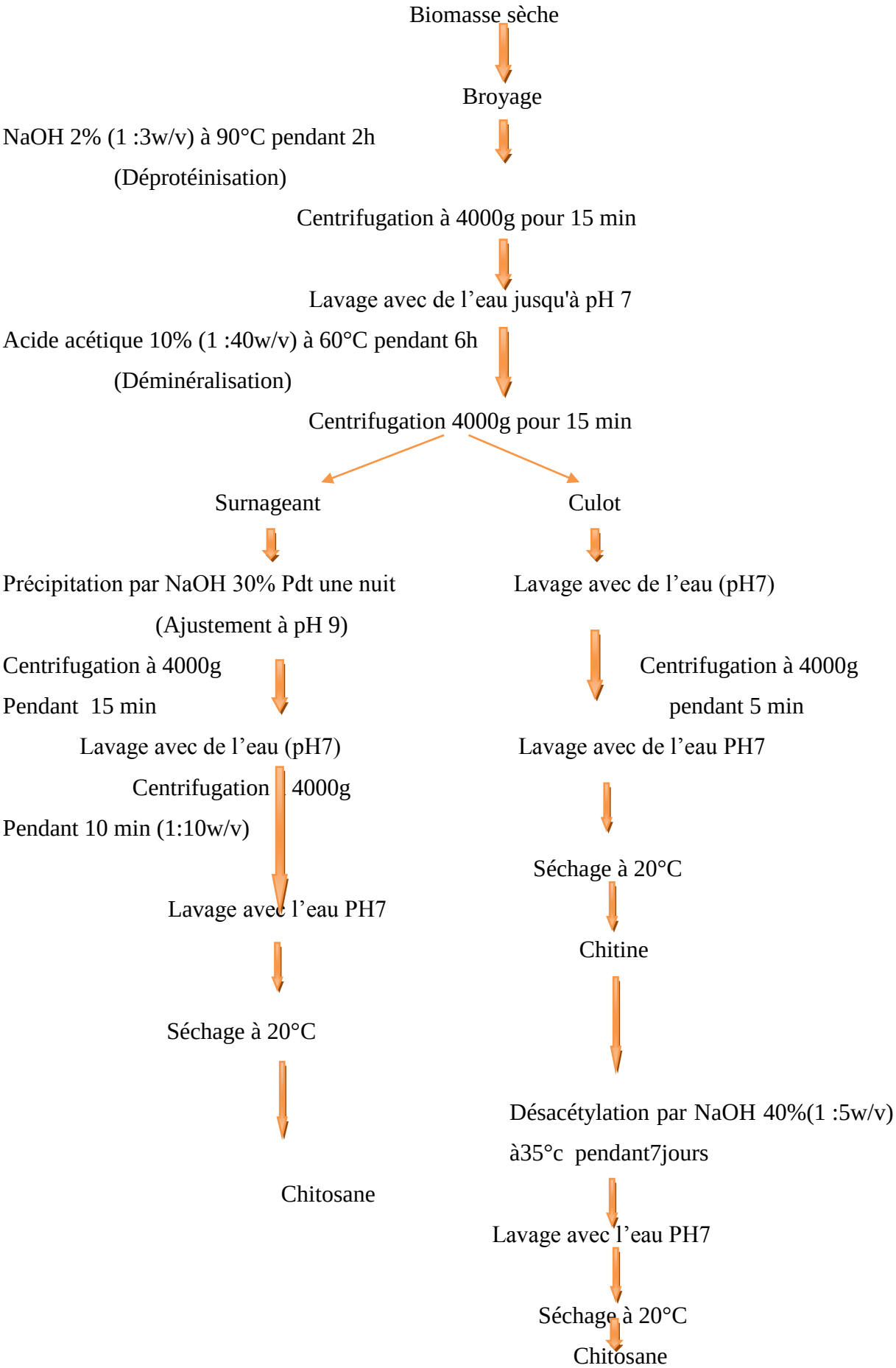

Biomasse sèche
Broyage
NaOH 2% (1 :3w/v) à 90°C pendant 2h
(Déprotéinisation)
Centrifugation à 4000g pour 15 min
Lavage avec de l'eau jusqu'à pH 7
Acide acétique 10% (1 :40w/v) à 60°C pendant 6h
(Déminéralisation)
Centrifugation 4000g pour 15 min
Surnageant
Culot
Précipitation par NaOH 30% Pdt une nuit
(Ajustement à pH 9)
Centrifugation à 4000g
Pendant 15 min
Lavage avec de l'eau (pH7)
Centrifugation à 4000g
Pendant 10 min (1:10w/v)
Lavage avec l'eau PH7
Séchage à 20°C
Chitosane
Lavage avec de l'eau (pH7)
Centrifugation à 4000g
pendant 5 min
Lavage avec de l'eau PH7
Séchage à 20°C
Chitine
Désacétylation par NaOH 40%(1 :5w/v)
à35°c pendant7jours
Lavage avec l'eau PH7
Séchage à 20°C
Chitosane

Fig.III. 7. Extraction de la chitine et le chitosane à partir de biomasse sèche.(Synowieki et al Khateeb, 1997)

III. 4.1. 1.Production du chitosane

-Après la récupération de la chitine on procède à une désacétylation par NaOH 40% pendant 7jours a température 35°C à raison de 1 :50 (w/v), pour l'obtention du chitosane ;

- Un lavage avec l'eau jusqu'à la neutralité (pH7) est effectué ;

- en fin, on fait un séchage à 20°C.

III. 4.1. 3.Caractérisation de la chitine et du chitosane

III. 4.1. 3. 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%.

III. 4.1. 3. 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 400à 4000 cm^{-1} des chitosanes et des chitines, produits, dans des pastilles de KBr (1mg chitosane ou /100 mg KBr).Les valeurs de DD et DA sont déterminées en appliquant les formules suivantes :

$$DA=[100-\frac{A1560}{A3450}\times 115] \quad \text{(éq.3)}$$

$$DD=[100-\frac{\frac{A1320}{A1420}-0.38}{0.03233}] \quad \text{(éq.4)}$$

III. 4. 1. 3.2. Détermination de la viscosité et du poids moléculaire du chitosane extrait à partir de la biomasse marine

Le poids moléculaire du chitosane est calculé à partir de sa viscosité intrinsèque notée [η] en appliquant l'équation de Marque-Houwink (Kasaai, 2007) :

$$[\eta]= KM^{a} \quad \text{(éq.5)}$$

K et a : sont des constantes ;

M : poids moléculaire (daltons) ;

La viscosité intrinsèque du chitosane est déterminée Expérimentalement par

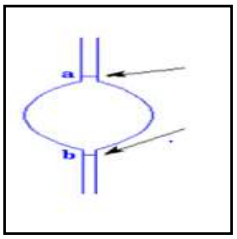


Figure.III. 8. Viscosimétrie

viscosimétrie capillaire en utilisant un tube à Vessie (figure ci-contre).

La méthode est basée sur la mesure du temps d'écoulement d'un même volume de solvant (constitué d'acide acétique à 1%) oude solution de chitosane contenu entre les deux points (a) et (b) à l'aide d'un chronomètre.Nous définissons la viscosité spécifique comme suit :

$$\eta_{sp} = \frac{t - t0}{t0} \quad \text{(éq.6)}$$

t : le temps d'écoulement de la solution de chitosane de concentration C_i

t_0 : le temps d'écoulement du solvant

En divisant cette valeur par la concentration de la solution de chitosane (g/dL), on obtient ce que nous appelons la viscosité réduit :

$$\eta_{red} = \frac{\eta sp}{Ci} \quad \text{(éq.7)}$$

Ainsi, pour différents concentration de chitosane (0,01 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,075 et 0,1g/dL) on obtient donc différentes valeurs de viscosités réduites. Le tracé des viscosités réduites en fonction des concentrations donne lieu à une droite dont l'ordonnée à l'origine est égale à la viscosité intrinsèque.

III. 5. Application des chitosanes produits

III. 5. 1. Préparation des films du chitosane

Préparez une solution de chitosane à 1% pour les deux types de chitosane en faisant dispersez 1g de poudre de chitosane dans 100ml de solution aqueuse d'acide acétique à 1% (v/v) sous agitation douce. Après dissolution complète, on a versé la solution obtenu dans une boite en plastique. Le solvant (eau/acide acétique) a été évaporé par séchage à température ambiante durant 24 à 72h.

III. 5. 2. Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose

C'est une méthode qualitative permettant de tester l'existence de l'activité antimicrobienne, qui se traduit par la formation d'une zone d'inhibition autour du disque ou le puits contenant la substance à tester.

Mode opératoire

- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur 3 colonies pures et bien isolées et les faire suspendre dans un tube contenant 3ml d'eau physiologique stérile ;

- Trompé un écouvillon stérile dans la suspension de la souche à tester ;

- Ensemencer une boite de Pétri coulée précédemment par le milieu Muller Hinton en utilisant l'écouvillon après avoir l'essorer sur la paroi de tube ;

- A l'aide de l'envers d'une pipette pasteur stérile, creusez des puits à la surface du milieu gélosé ;

- Prélevez un volume de 20µl de chaque concentration (0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 1%) et déposez la dans les puits ;

- Incubées à 37°C pendant 18- 24h.

- La lecture consiste à observer l'apparition des zones d'inhibition et mesurer les diamètres de ces zones en millimètre à l'aide d'une règle à l'extérieur de la boite.

IV.1. Récupération de la chitine et le chitosane fongique

IV.1.1. La biomasse fongique

La figure VI. 1. présentée ci-dessous présente les biomasses sèche récupérée à la fin de la fermentation.



Fig. IV.1. Biomasse fongique sèche récupérées avant et après broyage

-Précipitation du chitosane (pour le surnageant)

Le traitement de la biomasse fongique avec de l'acide acétique nous a permis, d'obtenir une fraction solide non soluble dans l'acide, constituée principalement par la chitine, et une fraction soluble dans l'acide, le chitosane. La précipitation (Fig.IV.2) peut se faire en utilisant du NaOH à 30% pendant une nuit (ajustement a pH9) (Synowieki et al –Khateeb, 1997)

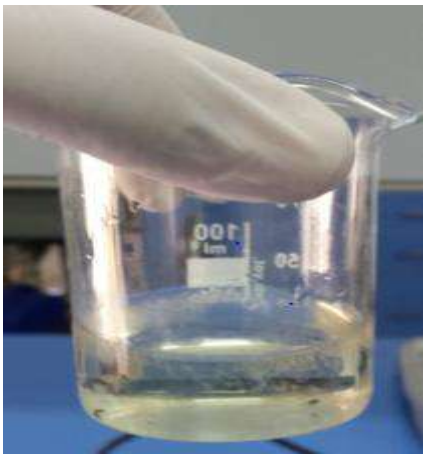


Fig. IV.2. Précipitation de chitosane par NaOH 30% (Synowieki et al –Khateeb, 1997)

IV.1.2. La désacétylation de la chitine

La Préparation du chitosane à partir de la chitine fongique est réalisée par une désacétylation naturelle en utilisant du NaOH à 40% pendant 7 jours à température de 35°C (Fig. IV. 3). (Synowieki et al –Khateeb, 1997)



Fig. IV.3. La désacétylation de la chitine pour La biomasse fongique5(Synowieki et al – Khateeb, 1997)

Les résultats, de la récupération de la biomasse, chitine et chitosane à partir de la biomasse fongique, sont présentés dans le tableau IV. 1 :

Tableau IV. 1. Les quantités et les rendements de la biomasse, chitine et chitosane fongiques

Biomasse sèche (g)	**3**
Chitine en (g)	1
Chitosane produit par désacétylation(g)	0.07
Chitosane naturel (g)	0.003
Rendement Chitine/biomasse marine(%)	33
Rendement chitosane/chitine (%)	7
Rendement chitosane ultra-pur/biomasse (%)	0.1

Le tableau IV.1, montre que la quantité de la biomasse et de la chitine sont 3g (784ml de volume) et 1g, respectivement, avec un bon rendement qui est de l'ordre de 33% comparant avec le faible rendement du chitosane naturel (0.1% par rapport à la biomasse). Cependant, il faut savoir que le chitosane naturel est produit naturellement par le champignon au niveau de sa paroi est considéré comme ultra pur et son prix peut être très élevé, il varie entre 20 et 10 000euros le kg selon ses caractéristiques, et qui trouve application dans le domaine médical et pharmaceutique, donc on peut comprendre qu'il n'est pas facilement disponible. Alors que le chitosane produit par désacétylation de la chitine a un rendement de 7% et qui est acceptable mais reste à améliorer.

IV.2. Récupération de la chitine à partir de la biomasse marine

La figure IV. 4, présente la chitine récupérée par fermentation lactique à partir de la biomasse marine sèche constituée de déchets de crevettes.



Fig. IV. 4. La chitine

-La désacétylation de la chitine

La Préparation du chitosane par désacétylation de la chitine en utilisant du NaOH à 40% pendant 7 jours à une température de 35°C. (Synowieki et al –Khateeb, 1997)



Fig. IV. 5. La désacétylation de la chitine (Synowieki et al –Khateeb, 1997)

Les quantités et les rendements de la chitine et du chitosane obtenu sont présentés dans le Tableau. IV. 2.

Tableau IV. 2. Les quantités et les rendements de la biomasse, chitine et chitosane fongiques

Quantité de carapace (g)	40
Rendement de chitine$_1$(%) (1ercycle de fermentation)	50
Rendement de chitine$_2$(%) (2^{éme} cycle de fermentation)	25
Rendement du chitosane/carapace (%)	17.5

Le tableau IV. 2, montre que chaque à chaque traitement, partant de la carapace brute jusqu'à le 2ème cycle de fermentation, il y a une perte de matière à 50%. A la fin on peut récupérer 25% de chitine extraite par voie biologique. On remarque également que le rendement du chitosane récupéré par désacétylation est intéressant (17,5%).

IV. 3.Caractérisation de la chitine et le chitosane produits

IV. 3. 1. Test de solubilité

Le premier test réalisé pour pouvoir déterminer les polymères qui peuvent être des chitosanes 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 les deux types de chitosane produits dans notre travail sont 100% solubles dans la solution d'acide acétique à 1%.

IV. 3. 2. Détermination du DA et DD par spectroscopie infrarouge

La méthode la plus facile qui permet de déterminer le DA et DD est la spectroscopie infrarouge. Le calcul nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau IV. 3.

Tableau IV. 3. DA et DD des chitines et des chitosanes produits

	Fongique	Crevettes
DA Chitine	**11,4%**	-
DD Chitosane produit par désacétylation (a)	**87,27%**	92,73%
DD chitosane ultra-pur (b)	**99,39%**	-

On remarque que le biopolymère obtenu après traitement de la biomasse (récupéré dans le culot) par NaOH à 90°C a un DA égale à 11,4% c'est-à-dire que c'est une chitine désacétylée, ce résultat nous permet de conclure qu'il y a eu désacétylation de la chitine et on

ne peut pas l'appeler chitosane par ce qu'elle est insoluble dans l'acide acétique 1%probablement à cause des groupements acétyles résiduels et des impuretés. La désacétylation par NaOH à 30% a donné un chitosane (a)soluble avec un DD de 87,27%.Par contre le chitosane (b) récupéré à partir de surnageant et qui a été précipité à partir de la carapace des champignons a un DD de 99,93%. Ce taux très élevé du DD est du à ce que ce chitosane est ultra pur car il est produit par une désacétylation enzymatique et naturelle au niveau de la paroi du champignon.

Des résultats similaires ont été obtenus par Berger et al. (2014), qui a extrait le chitosane à partir de la paroi de *Cunninghamellaelelgans* UCP / WFCC0542 et a présenté un DD d'environ 82,42 ± 2,0. Alors que le chitosane extrait à partir de *Fusariumoxysporum* (Khalaf, 2004) et *Fusariummoniliforme* (Omogbai et Ikenebomeh, 2013) avaient des DD de 73,4% et 75,3%, respectivement. Un autre champignon présente une valeur faible de DD, à savoir *Mucor rouxii* dont la valeur est de l'ordre de 27,3% (White et al., 1979). Alors qu'Aspergillus *Niger* a un DD élevé de 90,9 ± 2,1% (Pochanavanich et Suntornsuk, 2002).

Le tableau IV. 3, montre également que le chitosane produit par désacétylation de la chitine issu de la biomasse marine (crevette) a un DD de 92,73% et il est soluble dans une solution d'acide acétique à 1%. Sachant que la chitosane commercial a un DD de l'ordre de 81,69% puisqu'il est issu par une désacétylation agressive, à forte concentration de NaOH à haute température, d'une chitine elle-même extraite par un traitement acido-basique dans des conditions extrêmes.

L'analyse des biopolymères la chitine fongique et de la chitine issue de la biomasse marine, par spectroscopie infrarouge nous a permis d'obtenir la figure. IV. 6.

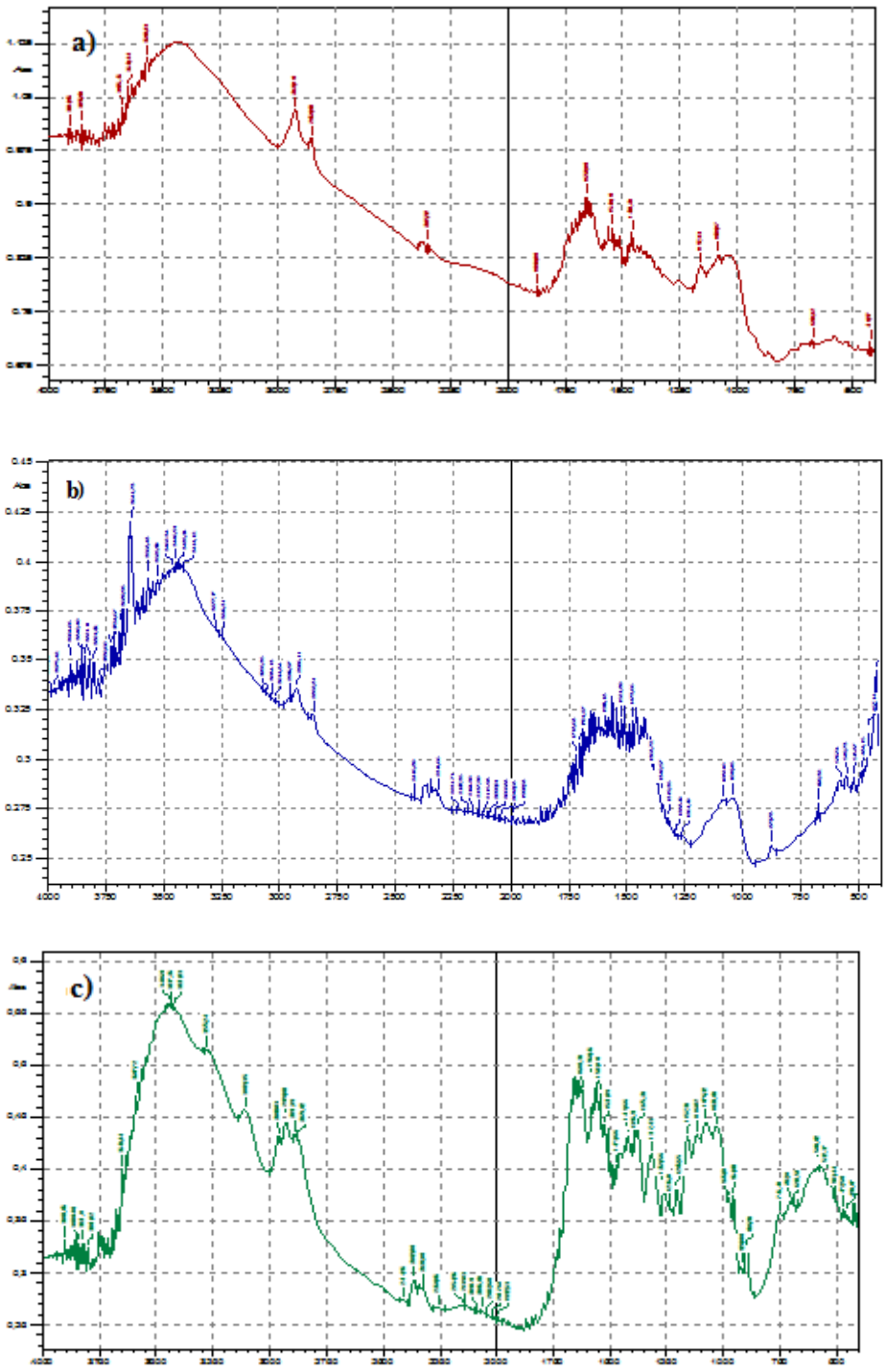


Fig. IV. 6. Spectres infrarouge de (a) la chitine fongique (DA 11%) (b) chitosane fongique issue de la désacétylation de la chitine (88%) (c)chitosane fongique issue de la précipitation (DD 99,39%) (Ouchen, Talhaoui, 2016)

L'analyse du spectre infrarouge de la chitine fongique désacétylée montre qu'il y a les pics caractéristiques de la chitine à savoir 1315.50 cm^{-1} (1319.15 cm^{-1}), 1560.46 cm^{-1} (1561.16 cm^{-1}), 1419.66 cm^{-1} (1419.66 cm^{-1}), 1627.97 cm^{-1}correspondant à la déformation axiale de

l'amide C-N; 2928.04 cm^{-1} (2924.18 cm^{-1}), attribué à la liaison C-H stretching. Donc on peut conclure que la chitine fongique présente des similitudes avec la chitine commerciale (tableau IV. 3). Ce qui explique son insolubilité.

Par contre les chitosanes (a) et (b) (Fig. IV. 6) présentent les bandes caractéristiques du chitosane à savoir une bande à 1319.35 cm^{-1}et la disparition du pic caractéristique de la chitine à 1624.12cm^{-1}.

Tableau IV.3. Les bandes caractéristiques de la chitine commerciale et les chitines fongiques et marines (Ouchen , Talhaoui, 2016)

chitine	α-chitine (commerciale)	Chitine issue de la biomasse marine (jus de dattes)	Chitine fongique (PDB)
Vibration modes	(crabe)	crevette	Champignons du pain moisi
OH out-of-plane bending	669.32	669.32	669.32
Ring stretching	688.61	-	-
CH_3	896.93	896.93	-
CO stretching	952.87	954.80	-
CO stretching	1028.09	1028.09	1028.09
Asymmetric in-phase ring stretching mode	1072.46	1076.32	1080.17
Asymmetric bridge oxygen stretching	1114.89	1116.82	-
	1157.33	1157.33	1157.33
	1205.55	1205.55	1205.55
Amide III band and CH_2 wagging	1261.49	1259.56	1249.91
CH bending and symmetric CH_3 deformation	1315.50	1317.43	1319.35
CH_2 bending and CH_3 deformation	1377.22	-	1375.29
	1419.66	1419.66	1419.66
	1465.95	-	-
Amide II band	1560.46	1560.46	1561.16
Amide I band	1624.12	1618.33	1627.97
Amide I band	1654.98	1654.98	-
	2345.52	2345.52	2345.52
CH stretching	2362.88	2370.50	2374.45
Symmetric CH_3 stretching and asymmetric CH_2 stretching	2893.32	2891.30	-
NH stretching	2928.04	2931.90	2924.18
OH stretching	3109.35	3111.23	-
	3414.12	3414.12	3414.12

La figure IV. 7, montre que le spectre infrarouge de la chitine issue de la carapace de crevette a la même allure que celle de la chitine commerciale avec apparition des pics caractéristiques

de l'α- chitine tel que : la bande correspondante à l'amide I, qui est divisée en deux pics (Lavall et al., 2007)à 1654.98 cm^{-1} et 1618.33cm^{-1} pour l'α-chitine commerciale et la chitine de la crevette de notre étude. La bande amide II est unique à 1560.46cm^{-1} pour l'α-chitine commerciale et notre échantillon (Tableau IV.3).

D'autre part, on note l'apparition de nouveaux pics à 896.93 cm-1, 1028.09 et 3109.35 cm^{-1}, 1157.33 cm^{-1}, 1261.49 cm^{-1}, 1377.22 cm^{-1}, 1560.46 cm^{-1}, correspondant à l'alpha chitine et identifiée dans le spectre de la chitine commerciale (Tableau IV.3)

.

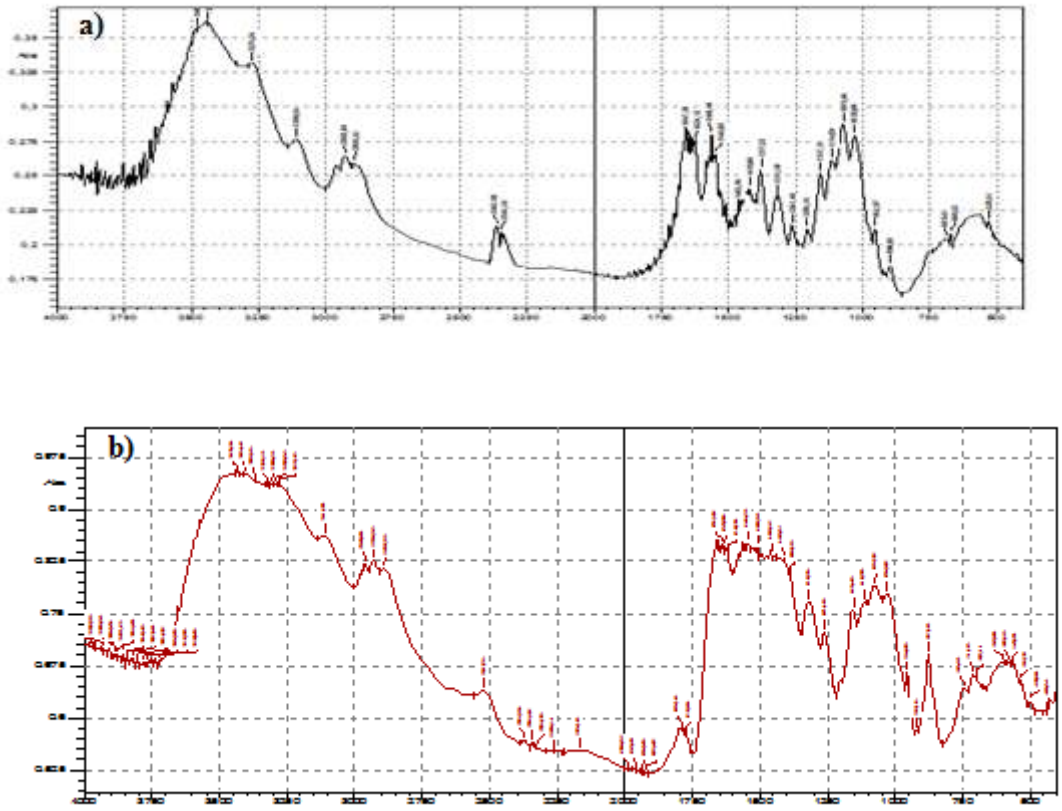


Figure IV. 7. Les spectres infrarouges de (a) la chitine commerciale et (b) de la chitine extraite de la carapace de crevette par fermentation lactique (Ouchen ,Talhaoui ,2016)

IV. 3. 3. Détermination du poids moléculaire et de la viscosité du chitosane (crustacé)

Vu la faible quantité obtenue du chitosane fongique, on n'a pas pu déterminer sa viscosité et son poids moléculaire, donc on s'est contenter seulement de ceux du chitosane obtenu par la désacétylation de la chitine de la crevette. Le poids moléculaire du chitosane a été calculé à partir de la viscosité intrinsèque notée [η] en appliquant l'équation de Marque-

Houwink (éq.5) ou k et a sont des constantes et M le poids moléculaire (Daltons) (kasaai, 2007).

$[\eta] = kM^a$…… (équ. 5)

En se référant à Rao (1993) qui a utilisé le même solvant à 30°C, nous avons adopté la valeur 0,72 pour a et $4{,}74.10^{-5}$dL/g pour k.

L'évolution de la viscosité réduite ($\eta_{réd}$(dL/g)) en fonction de la concentration duchitosane obtenu est présentée dans la figure IV. 8.

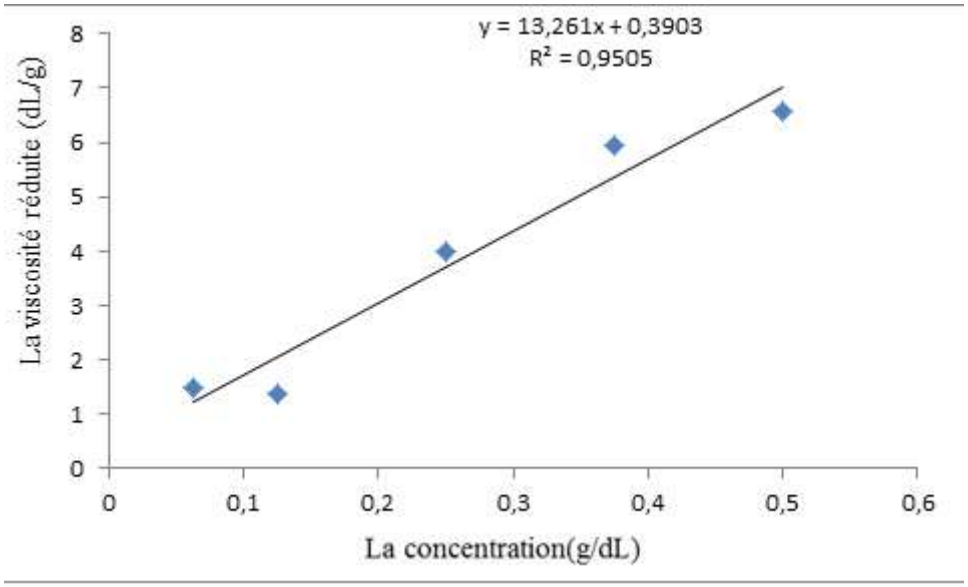


Fig. IV. 8. Evolution de la viscosité réduite en fonction de la teneur en chitosane à 30°C (Kassai, 2007)

L'ordonnée à l'origine de l'équation du graphique nous donne directement la valeur de la viscosité intrinsèque qui est de l'ordre de 0,3903dL/g. En remplaçant la valeur de la viscosité intrinsèque dans l'équation () nous obtenons le poids moléculaire de notre échantillon qui est de l'ordre de 274kDa. La valeur de poids moléculaire (PM) d'un chitosane dépend intimement du procédé de préparation, car celui-ci peut induire une dépolymérisation des chaines macromoléculaire et/ou une dégradation lors de sa production (Kaddouche, 2013). Les chaines macromoléculaires du chitosane ont généralement un PM de l'ordre de 100 à 1500 kDa (Crini et al., 2009). Ces poids déterminent l'application désirée pour le chitosane.

Comparé à d'autres échantillons cités dans la littérature (Gupta et Jabrail, 2006), cet échantillon a un poids moléculaire relativement élevé. Ce-ci est due probablement au procédé biologique de l'obtention de la chitine qui permet de préserver sa structure et ces

caractéristiques ainsi qu'au traitement de désacétylation doux (température 35°C), car le paramètre température a une forte action sur le poids moléculaire du chitosane.

IV. 4. Applications

IV. 4. 1. Préparation des films du chitosane

La capacité du chitosane de former un biofilm est une propriété très avantageuse puisque elle trouve de nombreux avantages dans tous les domaines à savoir comme un conservateur ou un emballage comestible des produits alimentaires. La figure IV. 9, montre un biofilm formé par le chitosane fongique obtenu.



Fig. IV.9. Biofilm du chitosane(a) fongique (solution de chitosane à 1%)

Les fissures au niveau du biofilm sont dus au faible volume de la solution du chitosane car la quantité obtenue était faible (0,07g), qui nous a permis de préparer 7ml seulement. Il est à noter que l'originalité de ce travail est la production d'un chitosane fongique libre et soluble c'est-à-dire que la chitine à partir duquel on a préparé ce chitosane était pure et que c'est la première fois en Algérie qu'on obtienne ce résultat car on n'a pas pu jusqu'à isolé la chitine des glucanes présents au niveau de la paroi des champignons. Tandis que la figure IV.10, montre un biofilm produit à partir de la chitine de crevette désacétylée.



Fig. IV.10. Biofilm du chitosane obtenu par la désacétylation de la chitine de crevette (solution de chitosane à 1%)

On remarque que ce dernier est transparent par rapport au premier, ceci est dû à ce que le milieu de fermentation des champignons contenait du fer, ce qui a donné cette coloration noir au chitosane isolé et sur cette coloration on va travailler dans la suite de ce projet.

IV. 4.2.Etude de l'activité antibactérienne et antifongique du chitosane préparé

La méthode des puits est la méthode choisie pour évaluer l'activité antimicrobienne du chitosane produit. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des molécules ou métabolites dans un milieu de culture solide. L'activité antimicrobienne de différentes concentrations est évaluée en fonction du diamètre (mm) des zones d'inhibition de la croissance microbienne (Cheikh Touhami, 2013).

L'estimation de l'activité antimicrobienne des biomolécules naturelles (extraits des plantes)est basée sur une échelle de mesure mise en place par Meena et Sethi, 1994 et Ela et al., 1996 (Cheikh Touhami, 2013). Ils sont classés le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 4 classes (Cheikh Touhami, 2013) :

1. Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28 mm;
2. modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 16 mm et 28 mm;

3. Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 10 mm et 16 mm;

4. Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10 mm.

Dans le cas de notre étude on a suivi la même échelle puisqu'il s'agit de biomolécule naturelle.

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne du chitosane préparé nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans la figure suivants (Fig. IV. 11 et Fig. IV. 12).

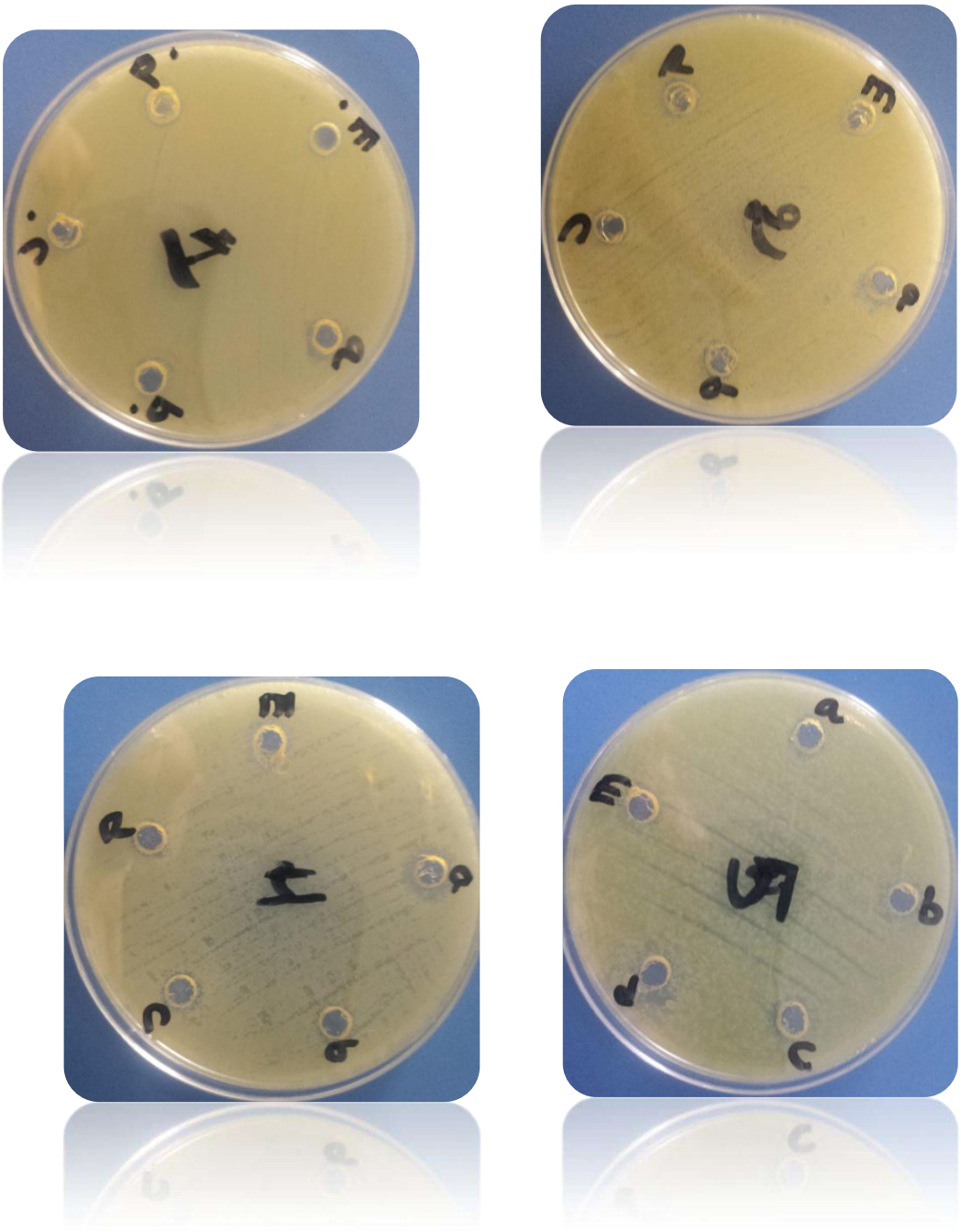


Fig. IV. 11. Les zones d'inhibition pour chaque souche microbienne (1) *Candida albicans* (2) *Staphylococcus aureus* (G^+) (4) *Pseudomonas aeruginosa* (G^-) (5) *E. coli* (G^-) (a=1%, b=0,5%, c=0,375%, d=0,25%, e=0,125%) .(Cheikh Touhami, 2013)

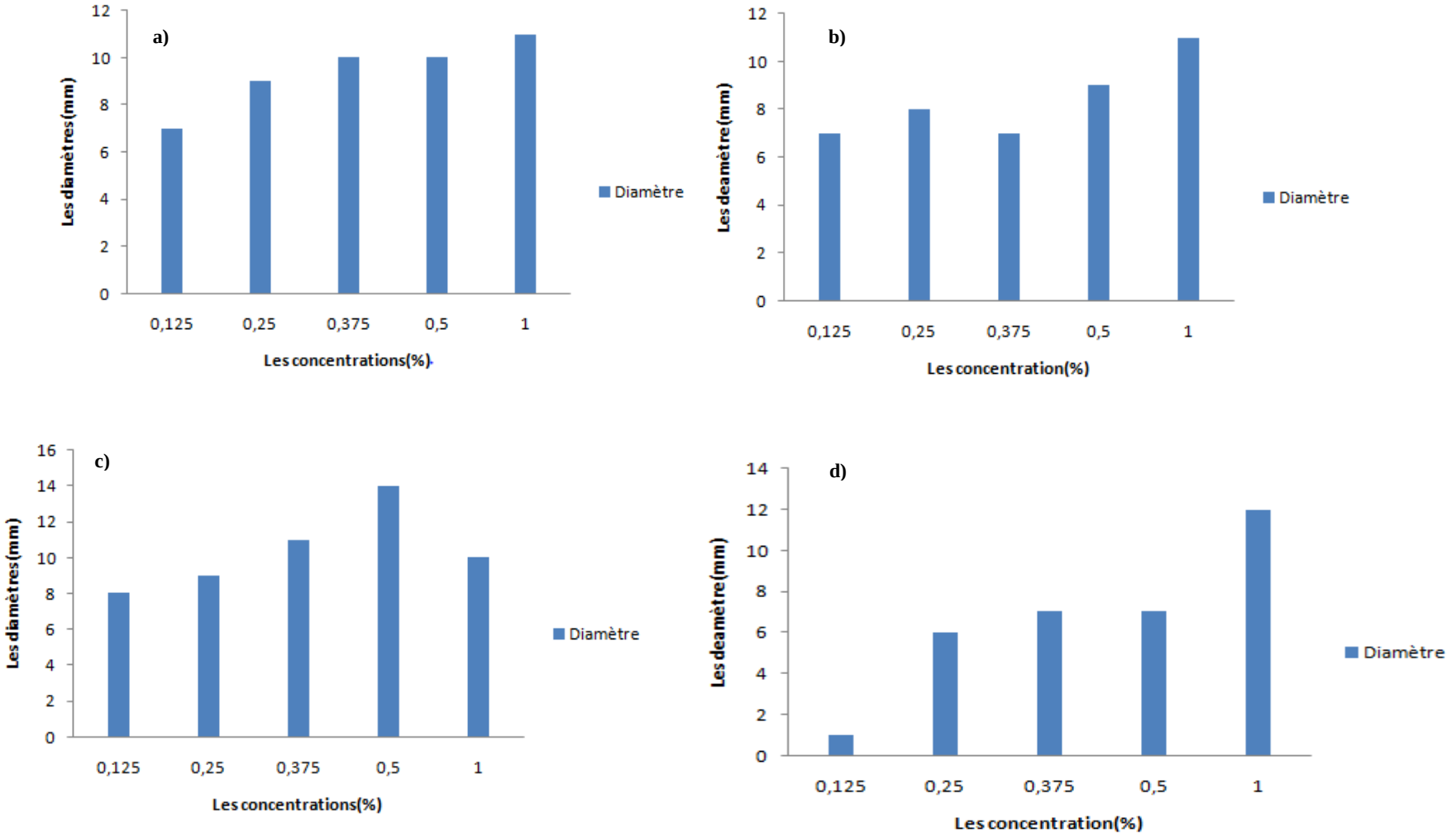


Fig. IV.12. Diamètre des zones d'inhibition pour chaque souche microbienne (a) *Candida albicans*(b) *Staphylococcus aureus* (G^+)(c) *Pseudomonas aeruginosa*(G^-)(c) *E. coli*(G^-)%).(Cheikh Touhami, 2013)

.

La figure IV. 12, montre que pour *Candida albicans, Staphylococcus aureus*(Gram positif),la concentration 1% donne le plus grand diamètre d'inhibition qui est de 11mm pour les deux premières et pour 12 mm pour *E. coli* (Gram négatif)donc selon les critères de classification choisi on peut dire que dans nos conditions de travail, le chitosane est légèrement inhibiteur de ces trois germes mais pour affirmer son activité il faut tester des concentrations plus élevées.Tandsique pour *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif), on remarque que la conecntration 0,5% est plus efficace et donne une zone d'inhibition de 14mm.

Il a été montré que le chitosane possède une activité antimicrobienne qui dépend de plusieurs facteurs à savoir le poids moléculaire, le pH, la température et : le degré de désacétylation.

Le mécanisme exact de l'action antimicrobienne du chitosane est encore inconnu mais certains mécanismes ont été proposés. L'activité antibactérienne du chitosane serait due essentiellement à la charge positive du chitosane qui interagit avec les phospholipides membranaires chargés négativement (Chen et al.,1996). L'interaction crée une perturbation au niveau de la membrane avec une diminution des échanges de nutriments entre la bactérie et le milieu extérieur qui entraîne la mort cellulaire (Shahidi et al.,1999). Par ailleurs, Helander et al. (2001) ont prouvé que la clé de l'activité antimicrobienne du chitosane provient de la charge positive des groupements amine du carbone C_2 (structure polycationique à pH < 6,3). Le même résultat a été montré par Tsai et Su (1999) pour lesquels le mécanisme d'action antimicrobienne de chitosane est dû aux interactions entre les cations du chitosane et les anions à la surface des bactéries qui modifient la perméabilité de la membrane cellulaire. De plus, le chitosane semblerait interférer et perturber la synthèse des ARN messagers en interaction avec l'ADN (Shahidi et al.,1999 ; Liu et al.,2000).

De plus, à 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 (Sudarshan et al., 1992).

Wang (1992) a observé que la concentration allant de 1 à 1,5 % de chitosane peut inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* après deux jours en incubation dans un milieu de pH 5,5 et 6,5. Ceci corrobore avec notre résultat ou on a trouvé une inhibition à une concentration de 1% et qui peut être amélioré en allant au-delà de cette concentration. De plus, Chang et al., (1989) ont trouvé que la concentration de chitosane ≥ 0,5% était suffisante pour obtenir l'inactivation complète *de S. aureus*. Les mêmes conclusions sont obtenues par

Darmadji et Izumoto (1994), qui ont étudié l'effet antimicrobien du chitosane sur la conservation de la viande.

Simpson et al.(1997) ont étudié, par ailleurs, l'effet antimicrobien des différentes cultures des bactéries présentes dans les crevettes brutes, avec différentes concentrations de chitosane. D'après leur étude, une quantité minimale de 0,02% de chitosane est nécessaire pour avoir l'effet bactéricide contre *Bacillus cereus*. Le même résultat a été obtenu par Chang et al. (1989).

De nombreuses études ont aussi montré l'effet du chitosane sur l'inhibition d'*Escherichia coli*. Wang (1992) a observé l'inactivation complète après deux jours en incubation avec 0,5 ou 1% (w/v) de chitosane dans un bouillon de viande à pH 5,5. Il a aussi rapporté que l'inactivation complète peut être atteinte après le premier jour avec une concentration de chitosane supérieure à 1% (w/v) en bouillon de viande. Alors que, Darmadji et Izumimoto (1994) et Simpson et al (1997) ont rapporté qu'une concentration ≥0,1 % doit être utilisée pour inhiber la croissance d'*Escherichia coli*. Ces différents résultats seraient dus aux différents degrés d'acétylation du chitosane employé.

L'étude de l'inhibition de la croissance de bactérie Gram négatif (*E. coli)* par le chitosane de différents poids moléculaire par Zheng et Zhu (2003), a montré que l'activité inhibitrice du chitosane augmente avec la diminution du poids moléculaire du chitosane tandisque cette activité anti- Gram-positif (*S. aureus*) augmente avec l'augmentation du poids moléculaire du chitosane. Ceci corrobore, également, avec nos résultats ou on a remarqué que la concentration 0,25% (fig. IV. 11) et 274kDa, a donné la zone d'inhibition la plus importante et qui peut augmenter plus en réduisant le poids moléculaire du chitosane (Benabbou, 2009).

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

Le chitosane agit aussi comme un agent chélatant qui forme des complexes avec les traces de métaux et ainsi il inhibe la production des toxines et la croissance des champignons (Cuero et al, 1991).

Liu et al. (2000) ont rapporté que l'efficacité antibactérienne du chitosane augmente avec l'augmentation de sa masse molaire, de son degré de désacétylation et de sa concentration employée. En ce qui concerne l'influence du pH, l'activité antibactérienne du chitosane est plus efficace à pH faible. En plus, Sudharsan et al. (1992) ont également rapporté que 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.

Il semble qu'il y ait une corrélation entre les propriétés physico-chimiques du chitosane et de ses dérivés avec l'activité antimicrobienne. Shin et al. (2001) ont trouvé que 0,5% du chitosane avec la masse molaire de 100 et 210 kDa inhibe effectivement *Staphylococcus aureus,* alors que 1,0 % est nécessaire avec le chitosane de masse molaire 1,8 kDa. Ce résultat est en accord avec Liu et al (2001) qui ont montré que l'activité antimicrobienne du chitosane augmente pour la gamme des masses molaires allant de 5 à 91,6 kDa. Cependant, pour la gamme des hautes masses molaires (de 91,6 à 1080 kDa), l'activité antimicrobienne diminue avec l'augmentation de la masse molaire. Par ailleurs, Ouattara et al.(2000) ont aussi rapporté que le chitosane ayant la masse molaire de 1671 – 1106 kDa est moins efficace que celui de 470- 746 kDa. Normalement, l'activité antimicrobienne du chitosane est plus efficace avec l'augmentation de masse molaire d'où un nombre de groupements amine plus important. Par contre, il est possible que la solubilité du chitosane diminue avec l'augmentation de masse molaire. No et al (2002) ont également noté que l'activité antimicrobienne du chitosane varie en fonction de ses masses molaires et des bactéries cibles.

L'effet antifongique du chitosane sur la croissance in vitro des champignons pathogènes dans les cerises a été examiné par El Ghouth et al.(1992). D'après cette étude, le chitosane (avec DA≤ 7,2%) peut diminuer la croissance radiale de *Botrytis cinerea* et *Rhizopusstolonifer* où l'effet d'inhibition est plus fort avec la plus grande concentration employée. En outre, ces auteurs ont confirmé l'efficacité du grand nombre de groupes de charge positive.

L'étude de Costa et al., (2014) sur l'influence du chitosane sur la formation du biofilm par *candida albicans,* a montré que le chitosane est capable d'inhiber la croissance de la forme planctonique (libre) de cette levure à une concentration de 0,1% (1mg/ml) pour un chitosane de haut poids moléculaire et de 0,3% (3mg/ml) pour un chitosane de faible poids moléculaire.

L'objectif de notre travail était de récupérer la chitine, le chitosane et le chitosane ultra-pur à partir d'une biomasse fongique et la chitine et le chitosane à partir d'une biomasse marine (la carapace de crevette). En utilisant le jus de datte et PDB, supplémentés, comme milieux de fermentation optimisés.

Le traitement acido-basique de 3g de biomasse fongique sèche obtenu par la culture d'une biomasse fongique récupérée à partir du pain moisis a permis de récupérer 33% de chitine par rapport à la biomasse initiale. La désacétylation de cette chitine a permis d'obtenir 7% de chitosane tandis que le rendement du chitosane ultra-pur est de 1(mg/g de biomasse fongique).

La fermentation lactique de la poudre de carapace de crevette dans un milieu à base de jus de dattes a été réalisée deux fois en utilisant deux ferments différents. Le premier était constitué de bifodobactéries (1^{er} cycle) et a permis d'obtenir 50% de chitine par rapport à la biomasse initiale. Le deuxième traitement réalisé par une souche isolée au laboratoire à partir du lait de vache *Lb. delbruckeii* sp *lactis* ($2^{ème}$ cycle) a permis d'obtenir 25% de chitine (par rapport à la biomasse initiale). La désacétylation de cette chitine a donné 17.5% de chitosane (par rapport à la biomasse initiale).

La caractérisation physico-chimique des chitines et chitosanes produits et/ou récupérés a montré que :

1- pour la biomasse fongique :

- DA de la chitine fongique est de 11% ;
- DD du chitosane obtenu par désacétylation de la chitine est de 87,27% ;
- DD du chitosane ultr-pur est de 99,39%.

2- pour la biomasse marine

- DA de la chitine est de
- DD du chitosane est de 92,73% et de poids moléculaire de 274 kDa.

Leurs solubilité dans la solution aqueuse d'acide acétique (1%) nous a permis d'obtenir des biofilms qui peuvent être amélioré et utiliser comme bioemballage biodégradable et comestible dans l'industrie agroalimentaire.

On a également testé le pouvoir antimicrobien du chitosane qui a montré une légère inhibition à une concentration de 1% de *Staphylococcus aureus, Candida albicans* et *E. coli*. Tandis que pour *Pseudomonas aeruginosa* une concentration de 0.5% était efficace pour donner une certaine inhibition de ce germe pathogène.

En perspective, on propose de

- améliorer la production de chitosane ultra-pur à partir de la biomasse fongique ;

- développer et caractériser les biofilms du chitosane ;
- faire une application dans le domaine agroalimentaire.

- Aam BB, Heggs et EB, Norberg AL, Sørlie M, Vårum KM, Eijsink VGH: Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Mar Drugs,* 2010, 8(5):1482-1517.
- Arbia W, Mémoire Magister ; Production de la chitine par voie fermentaire à partir d'une biomasse marine (2007)
- Arbia W, Etude de l'optimisation de la récupération de la chitine par fermentation de déchets marins, 2015.
- Arbia L, Contribution à l'étude de la déminéralisation et la déprotéinisation de la carapace de la crevette par voie fermentaire, 2010.
- Attila E. Pavlath, Dominic W.S. Wong and George H. Robertson: chitosan preparation, structure, and properties, 2009.
- Berthold A, Cremer K, Kreuter J: Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti inflammatory drugs. *Journal of Controlled Release,* 1996, 39(1):17-25.
- Bornet A, Teissedre PL: Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *Eur Food ResTechnol,* 2008, 226(4):681-689.
- Brinchmann BC, Bayat M, Brogger T, Muttuvelu DV, Tjonneland A, Sigsgaard T: A possible role of chitin in the pathogenesis of asthma and allergy. *Ann AgrEnv Med,* 2011, 18(1):7-12.
- Camci-Unal G, Pohl NLB: Thermodynamics of binding interactions between divalent copper and chitin fragments by isothermal titration calorimetry (ITC). *CarbohydrPolym,* 2010, 81(1):8-13.
- Cárdenas G, Orlando P, Edelio T: Synthesis and applications of chitosan mercaptanes as heavy metal retention agent. *Int J BiolMacromol,* 2001, 28(2):167-174.
- CCM-International: Benchmarking on Chitin Production in China China*Chemicals Market Iternational Limited*, 2009: 44.
- Chantereau P: Traitement des crevettes contre le noircissement: Mise au point d'une ligne de traitement. In.: Archimer, 1991: 16.
- Chen CS, Liau WY, Tsai GJ: Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *J Food Prot.,* 1998, 61(9):1124-1128.

- Chen, M.C., Yeh, G.H.C., Chiang, B.H., 1996, Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. J. Food Process Preserv. 20, 379-390.
- Chih- Min Wen, Chien- Sheng Tseng, Chih- Yu Cheng and Yaw- Kuen Li, 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. Biotechnol. Appl. Biochem. 35, 213-219.
- Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HI, Wu JCG, Lin JG: Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *ActaPharmacol Sin*, 2004, 25(7):932-936.
- Costa Eduardo, Sara Silva, FreniTavaria and Manuela Pintado , 2014. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Chitosan on the Oral Pathogen *Candida albicans* .Pathogens 2014, 3, 908-919; doi:10.3390/ pathogens3040908.
- Crini G, Badot PM, Guibal E: Chitine et Chitosane. Du polymère à l'application: Presses universitaires de Franche-Comté; 2009.
- Crini G., E. Guibal, M. Morcellet, G. Torri, P.M. Badot (2009) Chitine et chitosane.
- De Moura MR, Aouada FA, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH, Krochta JM, Mattoso LHC: Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *J Food Eng*, 2009, 92(4):448-453.
- DesbrièresJ.ActuChim 11/12 (2002) 39.
- Einbu A: Characterisation of Chitin and a Study of its Acid-Catalysed Hydrolysis. Trondheim, NorwegianUniversity of Science and Technology; 2007(a).
- El- Ghaout A., Arul J., Asselin A., Benhamou N, 1992.Antifungal activity of chitosan on two post- harvest pathogen of strawberry fruits. Phytopath ; 82, 398-402.
- FAO: Global study of shrimp fisheries. In: *Fisheries Technical Paper*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United States; 2008: 359
- FAO: Production des pénéides - Répartition de la production aquacole mondiale, 2010.
- FAO: Production mondiale - Ratio pêche/aquaculture : exemple des crevettes, 2006.
- FAO: SOFIA - The state of world fisheries and aquaculture, I*n.* Rome: Food and Agriculcuture Organization of the United Nations; 2008: 196
- FAO: SOFIA - The state of world fisheries and aquaculture. In. Rome: Food and Agriculcuture Organization of the United Nations; 2010: 218

- Fernandez- Kim S. O., 2004.Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. Thesis of the Louisiana State University
- Gagne N, Simpson B.K., Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnology,* 1993, 7:253-263.
- Gagné Nellie, 1993, Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid. Master of Sciences. McGill University, Montreal.
- GIA: CHITINE ET CHITOSAN. Un Rapport De Gestion Stratégique Global. *Global IndustryAnalysts*; MCP-2039, 2010: 230.
- GLOBEFISH: Shrimp - August 2011.
- Gomez Ramirez M, Rojas Avelizapa LI, Rojas Avelizapa NG, Cruz Camarillo R: Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of microbiologicalmethods,* 2004, 56(2):213-219.
- Goycoolea FM, Arguelles-Monal W, Peniche C, Higuera-Ciapara I: Effect of chitosan on the gelation of kappa-carrageenan under various salt conditions. Amsterdam: Elsevier Science Bv; 1999.
- Guibal E, Roussy J, LeCloirec P: Photochemical reaction of uranium with glucosamine, acetylglucosamine and related polymers: Chitin and chitosan. *Water SA,* 1996, 22(1):19-26.
- Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Yamaguchi K, Ishizaki T, Nakamura T, Sato M: Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. *Arch Oral Biol,* 2007, 52(3):290-294.
- Helgason T, Gislason J, McClements DJ, Kristbergsson K, Weiss J: Influence of molecular character of chitosan on the adsorption of chitosan to oil droplet interfaces in an in vitro digestion model. *Food hydrocolloids,* 2009, 23(8):2243-2253.
- Hirano S, Horiuchi K: Chitin gels. *Int J BiolMacromol*1989, 11(4):253-254.
- Hobel C. F. V. (2004) Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods, PhD thesis, University of Iceland.
- Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ: The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials,* 2001, 22(22):2959-2966.

- Hsien TY, Rorrer GL: Effects of acylation and cross-linking on the material properties and Cadmium ion adsorption capacity of porous chitosan beads. *Sep SciTechnol,* 1995, 30(12):2455-2475.
- Hudson S.M, Jenkins D.W., 2003. Chitin and chitosan in: E.P.S.T. Mark H.F, ed. New York Wiley 569.
- Ito M, Ban A, Ishihara M: Anti-ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats. *Japanese Journal of Pharmacology,* 2000, 82(3):218-225.
- Je JY, Park PJ, Kim SK: Free radical scavenging properties of hetero-chitooligosaccharides using an ESR spectroscopy. *Food ChemToxicol,* 2004, 42(3):381-387
- Jeon YJ, Kamil J, Shahidi F: Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *J Agric Food Chem,* 2002, 50(18):5167-5178.
- Jiang HL, Kim TH, Kim YK, Park IY, Cho MH, Cho CS: Efficient gene delivery using chitosan-polyethylenimine hybrid systems. *Biomed Mater,* 2008, 3(2).
- Jo G. H., R.D. Park, W.J. Jung (2011) Enzymatic production of chitin from crustacean shell waste IN *chitin chitosan, oligosaccharides and their Derivatives*, Se-Kwon Kim, CRC Press Taylor & Francis Group; pp. 37-43.
- Jun HK, Kim JS, No HK, Meyers SP: Chitosan as a coagulant for recovery of proteinaceous solids from tofu waste-water. *J Agric Food Chem,* 1994, 42(8):1834-1838.
- Jung WK, Moon SH, Kim SK: Effect of chitooligosaccharides on calcium bioavailability and bone strength in ovariectomized rats. *Life Sci,* 2006, 78(9):970-976.
- Kasaai MR: Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *J Agric Food Chem,* 2009, 57(5):1667-1676.
- Karine le Roux, Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *penaeus vannamei* . caractérisation des produits et optimisation du procédé, 2012.
- Khan W, Prithiviraj B, Smith DL: Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology,* 2003, 160(8):859-863.

- Kim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC: Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (Ocimumbasilicum L.). *J Agric Food Chem,* 2005, 53(9):3696-3701.
- Kim KW, Thomas RL: Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chem,* 20Kittur FS, Kumar ABV, Varadaraj MC, Tharanathan RN: Chitooligosaccharides - preparation with the aid of pectinase isozyme from Aspergillusniger and their antibacterial activity. *Carbohydr Res,* 2005, 340(6):1239-1245 07, 101(1):308-313.
- Kim SK, Park PJ, Jung WK, Byun HG, Mendis E, Cho YI: Inhibitory activity of phosphorylated chitooligosaccharides on the formation of calcium phosphate. *CarbohydrPolym,* 2005, 60(4):483-487.
- Kim S-K: Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications: CRC Press; 2010.
- Kim S-K: Chitosan and fish collagen as biomaterials for regenerative medecine - Biocompatibility and allergy. In: *Advances in Food and Nutrition Research Volume 65 Marine Medicinal Foods: Implications and Applications - Animals and Microbes.* Edited by Kim S-K : Elsevier; 2012.
- Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW: Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *J Periodont,* 1996, 67(11):1170-117.
- Krajewska B: Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme MicrobTechnol,* 2004, 35(2-3):126-139.
- Kumar ABV, Varadara MC, Gowda LR, Tharanathan RN: Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against Bacillus cereus and Escherichia coli. *Biochem J,* 2005, 391:167-175.
- Kurita K: Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol,* 2006, 8(3):203-226 nzymes and bioactive materials. *CarbohydrPolym,* 2011, 84(2):732-742.
- Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG: Chitosan supports the expression of extracellulaire matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes . J Biomed Mater Res ,2000, 51(4):586-595.

- Langer RC, Vinetz JM: Plasmodium ookinete-secreted chitinase and parasite penetration of the mosquito peritrophic matrix. *Trends Parasitol,* 2001, 17(6):269-272.
- Laura Ramírez- Coutiño, Maríadel Carmen Marín- Cervantes, Sergio Huerta, Sergio Revah and KeikoShirai, 2006.Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using*Lecanicilliumfungicola*chitinases. ProcessBiochemistry, 41, 1106-1110.
- Liao FH, Shieh MJ, Chang NC, Chien YW: Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients. *Nutrition Research,* 2007, 27(3):146-151.
- Lin SB, Chen SH, Peng KC: Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of beta-chitosan in a Trichodermaharzianumchitinase-hydrolysing process. *J Sci Food Agric*, 2009, 89(2):238-244.
- Liu, H., Du, Y., Wang, X., Sun, L., 2004, Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. Int J Food Microbiol. 95, 147-155.
- Lopata AL, O'Hehir RE, Lehrer SB: Shellfish allergy. *Clinical & Experimental Allergy,* 2010, 40(6):850-858.
- Lu LM, Zhang L, Zhang XB, Wu ZS, Huan SY, Shen GL, Yu RQ: A MgO Nanoparticles Composite Matrix-Based Electrochemical Biosensor for Hydrogen Peroxide with High Sensitivity. *Electroanalysis*, 2010, 22(4):471-477.
- MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang JJ, Tagliaferri JM, Gill I, Hinchcliffe M, Rolland AP: Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release,* 1998, 56(1-3):259-272.
- Majeti N. V. Ravi Kumar, 2000. A review of chitin and chitosan applications. React. &Func. Poly. 46, 1-27.
- Miao YQ, Tan SN: Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of peroxidase in chitosan matrix crosslinked with glutaraldehyde. *Analyst,* 2000, 125(9):1591-1594.
- Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S, Okamoto Y: Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *CarbohydrPolym*2007, 67(4):640-644.
- Monfort-Windels F: La chitine, matériau de demain. CRIF-WTMC; 2004:

- Montserrat R. P., 2002.Developpement of techniques based on natural polymers for the recovery of precious metals. Memdria present a daperoptaralgrau de doctor en cienciesquimiques- Meniciodoctor Europeu.
- Morimoto M., Saimoto H. and Yoshihiro S., 2002. Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification. Trends in Glycosc. andGlycotechno., 14 (78), 205-222.
- Moussaoui et Taifour : Etude de l'influence de la supposition de milieu de culture sur le pourcentage de chitine lors de la croissance d'un champignon ; 2014.
- Mrunal R. T., 2004. Synthesis and antibacterial assessment of water- soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality. Doctor of philosophy. Louisiana State University
- Muzzarelli A. A. Riccardo, 1980. Immobilzation of enzymes on chitin and chitosan. Enzyme Microb. Technol., 2, 177- 184.
- Muzzarelli RA: Chitin; Chitosan: PergamonPress; 1977.
- Nakano Y, Bin Y, Bando M, Nakashima T, Okuno T, Kurosu H, Matsuo M: Structure and mechanical properties of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend films. *Macromolecularsymposia,* 2007, 258:63-81.
- Nam K-S, Kim M-K, Shon Y-H: Chemopreventive effect of chitosan oligosaccharide against colon carcinogenesis. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2007, 17(9):1546-1549.
- No H.K., Meyers S.P., 1997. Preparation of chitin and chitosan in: chitin Handbook
- No HK, Meyers SP: Application of chitosan for treatment of wastewaters. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* New York: Springer-Verlag; 2000: 1-27.
- No, H.K., Park, N~Y., Lee, S.H., Meyers, S.P., 2002, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. Int1 Food Microbiol. 74, 65.
- NugrahaEdhiSuyatama, Développement de films biodégradables à base de chitosane:
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Begin, A., Holley, R.A., 2000, Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. 1. Food Sci 65, 768-773.

- Pan XD, Chen FQ, Wu TX, Tang HG, Zhao ZY: Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel. *J Zhejiang Univ-SCI B*, 2009, 10(4):258-263.
- Park KM, Joung YK, Park KD, Lee SY, Lee MC: RGD-conjugated chitosan-Pluronic hydrogels as a cell supported scaffold for articular cartilage regeneration. *MacromolRes*2008, 16(6):517-523.
- Park PJ, Je JY, Kim SK: Free radical scavenging activities of differently deacetylatedchitosans using an ESR spectrometer. *CarbohydrPolym*, 2004, 55(1):17-224.

- Plouffe B., 1997.Production de chitosanases modulaires munies d'un site d'attachement à la cellulose et étude de leur activité en bioréacteur. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.
- Prashanth KVH, Tharanathan RN: Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis. *Biochimicaetbiophysicaacta-general subjects*, 2005, 1722(1):22-29.
- Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W: Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 2003, 4(6):1457-1465.
- -RajâaBenabbou , 2009, Developpment Et Caracterisation De Films Antimicrobiens Pour La Biopréservation Des Produits Marins Prêts A Consommer. Thèse De Doctorat. Université Laval Québec.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV: Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *MicrobiolMolBiol Rev*,2000, 62(3):597-635.
- Rao MS, Nyein KA, Trung TS, Stevens WF: Optimum parameters for production of chitin and chitosan from squilla (*S. empusa*). *J ApplPolymSci*, 2007, 103(6):3694-3700.
- Ratanavaraporn J, Kanokpanont S, Tabata Y, Damrongsakkul S: Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharide films. *CarbohydrPolym*, 2009, 78(4):873-878.
- Ravi Kumar, Chitin and chitosan applications. M.N.V. React. Function. Polym, 46 (2000) 1-27.

- Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, Locksley RM: Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*, 2007, 447(7140):92-U97-92-U97.
- Rhee JS, Jung MW, Paeng KJ: Evaluation of chitin and chitosan as a sorbent for the preconcentration of phenol and chlorophenols in water. *Anal Sci*, 1998, 14(6):1089-1092
- Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, Silva JC, Borges JP, Pires E, Chaves P *et al*: Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *WoundRepairRegen*, 2009, 17(6):817-824.
- Rinaudo M., Domard A., 1989. Solution properties of chitosan in: chitin and chitosan. Rinaudo M: Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 2006, 31(7):603-632.
- Roberts, G.A.F., and Domszy, J.G. « Determination of the viscornetric constantsfor chitosan », Int. J. Biol. Macromol., vol 4, n°6, 1982, p: *374-377.*
- Roderick Bain, 1998. Microencapsulation of prawn feed using chitin. Undergraduatethesis. University of Queensland.
- Scheruhn E, Wille P, Knorr D: Studies of acid binding properties of chitosan in coffee beverages. *Nahr-Food*, 1999, 43(2):100-104.
- Senel S, McClure SJ: Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug DeliveryReviews*, 2004, 56(10):1467-1480.
- Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ: Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food SciTechnol*, 1999, 10(2):37-51.
- Shen KT, Chen MH, Chan HY, Jeng JH, Wang YJ: Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food ChemToxicol*, 2009, 47(8):1864-1871.
- Shigemasa Y., Saito K., Sashiwa H. and Saimoto H., 1994. Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. Int. J. Biol. Macromol., 16 (1) : 43-49.
- Shin H. P., Lee J-H. and Hong K. L., 2000. Purification and characterization of chitinase from a Marine Bacterium, *Vibrio sp. 98CJ11027*. The J. of Microbiol., 38 (4), 224- 229. 80-
- Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D., 1992, Antibacterial action of chitosan. Food Biotechnol. 6, 257-272.

- Skorik YA, Pestov AV, Yatluk YG: Evaluation of various chitin-glucan derivatives from
- Sorlier P., Denuziére A., viton C., Domard A., 2001. Biomacromolecules 2-765.Sandford P.A., 2003. Commercial sources of chitin and chitosan and their utilizationin Advances in chitin science.varum K.M., Domard A., Smidsrodo, eds. Trondheim N.T.N.U 6-35.
- Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S, Suzuki M: Antitumor effect of hexa-N-Acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr Res*, 1986, 151:403-408.
- Suzuki S., Watanabe T., Mikami T. and Suzuki M., 1990.Proccedings of the 5th International Conference on chitin and chitosan, USA, 96- 105.
- Synowiecki Joseph and Nadia Ali Abdul Quawi Al Khateeb, 1997.Food Chemistry, 60, 605
- Taboada E, Cabrera G, Cardenas G: Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. *J ChilChem Soc*, 2003, 48(1):7-12.
- Talhaoui t Ouchen, 2016. Contribution à l'étude de l'influence de la composition de milieu de culture sur la quantité et la quantité de la chitine et du chitosane et essai de biopréservation de la viande hachée fraiche.
- Wang S-L, Liang T-W, Yen Y-H: Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of .incomplète
- Wu T, Zivanovic S: Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *CarbohydrPolym*, 2008, 73(2):248-253.
- Wu T., Svetlana Zivanivic, F. Ann Draughon, Carl E. Sams (2004) Chitin and chitosanvalue-added products from mushroom waste. Journal of agricultural and foodchemistry, 52,7905- 7910
- Yang Y- P., Xu X- H., Chen H- F., 2004.Treatment of chitin-producing wastewater by micro- electrolysis- contact oxidization. Journal of Zhejiang University Science. 5 (4): 436- 440.
- Yap J, Isa MH, Kutty SRM: Removal of colour from textile wastewater using oil palm ash. 2008.
- Ylitalo R, Lehtinen S, Wuolijoki E, Ylitalo P, Lehtimaki T: Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. *Arzneimittelforschung*, 2002, 52(1):1-7.

- Zhang H, Du YG, Yu XJ, Mitsutomi M, Aiba S: Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. *CarbohydrRes*, 1999, 320(3-4):257-260.
- Zheng, L.Y., Zhu, J.A.F., 2003, Study on antimictobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydr. Polym. 54, 527-530.



Fig. 1. Milieu de culture (jus de dattes) après la stérilisation



Fig. 2.Milieu de culture (PDB) après l'ajout des ingrédients

Les équipements utilisés dans ce travail

- ✓ Bain-marie,
- ✓ Agitateurs de paillasse,
- ✓ pH-mètre,
- ✓ Spectrophotomètre UV –Visible,
- ✓ Balance
- ✓ Autoclave
- ✓ Centrifugeuse.
- ✓ Etuve.
- ✓ Bec Bunsen
- ✓ Plaque chauffante
- ✓ Viscosimètre

Petits matériels et Verreries

Tubes à essai, fioles jaugées, pipettes, les erlenmeyers, éprouvettes, cristallisoir, lesbéchers, entonnoir, pipettes graduées, pipette pasteur, flacons de 180ml, mortier, spatule, chronomètre. pro-pipette, boites pétris,portoirs

- La figure IV.4 montre que donné la quantité de chitosane récupérée de la chitine à partir (culot) et La quantité du chitosane précipitée à partir de la solution d'acide acétique en utilisant du NaOH à 30%, nous a permis de tracer l'histogramme présenté sur la figure1.

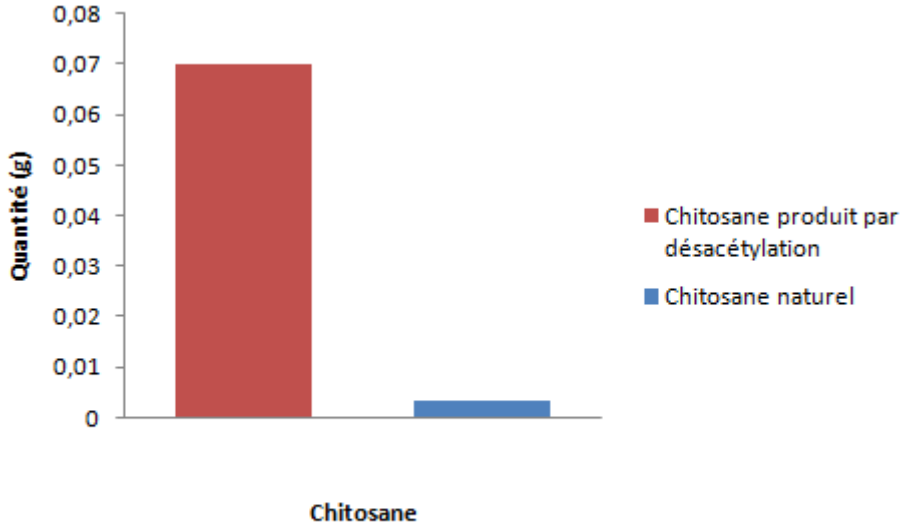


Fig.1. La quantité de chitosane obtenu par désacétylation et par précipitation (chitosane naturel)

- Le calcul de rendement de récupération du chitosane par apport à la biomasse sèche, nous a permis de tracer l'histogramme présenté dans la figure2.

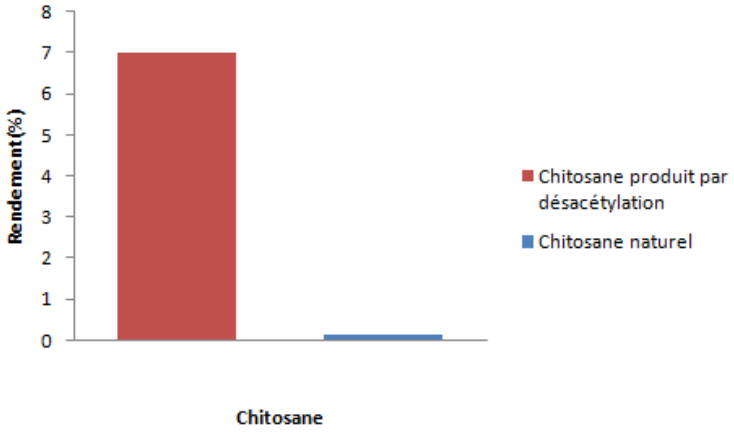


Fig.2. Rendements du chitosane récupéré par apport à la biomasse sèche

La figure3, montre la quantité de chitine récupérée à partir la fermentation de carapace

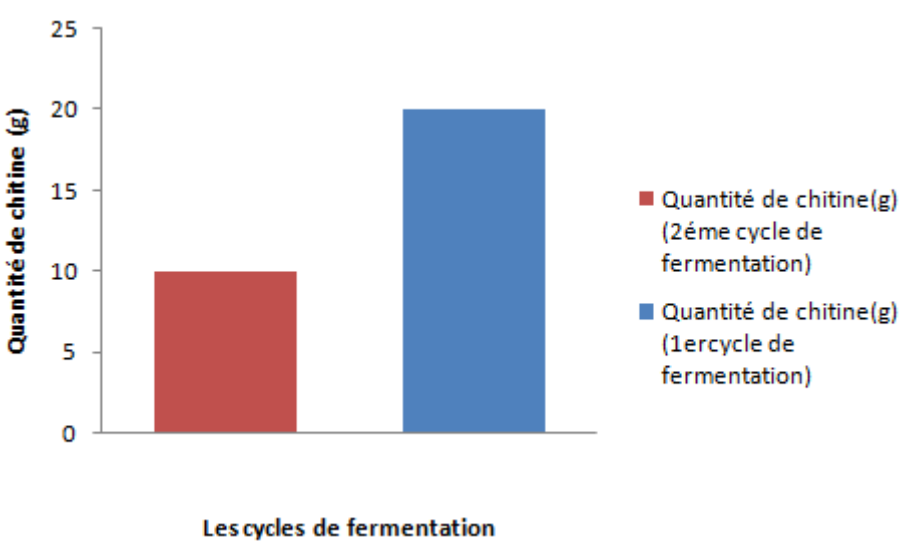


Fig. 3. La quantité de chitine en fonction des cycles de fermentation

Le calcul du rendement de récupération de la chitine de deux cycles par apport à la quantité de carapace, nous a permis d'obtenir le résultat présenté dans la figure 4.

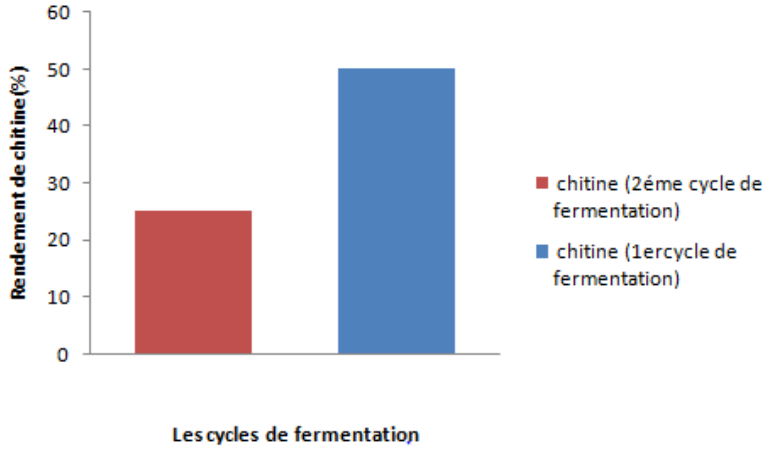


Fig. 4. Rendements de chitine récupérée par apport à la biomasse de carapace

.