الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement et de la Recherche Scientifique

Université Dr.YAHIA FARES de MÉDÉA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département du Génie des Procédés



PROJET DE FIN DÉTUDE

Pour l'obtention de diplôme de Master en génie des procédés

OPTION : bioprocédés pharmaceutique

THÉME :

Étude de l'influence de la supposition de milieu de culture sur le poursantage de chitine lors de la croissance d'un champignons

Préparé et présenté par

M^{elle} :MOUSSAOUI Hafidha

M^{elle} :TIFOUR Karima.

: Proposé et dirigé

M^{me} : ARBIA Wasila

2013/2014

Remerciement

Nous vais remercie aux première ment Allah qui ma donné tout le courage pour terminé ce travail.

Ce travail à été réalisé au laboratoire du hale technologie de l'université Yahia Fares de medea, A cette occasion nous vais remercie tout les travailleur de directeur jusqu'a l'agent de la porte.

Nous remercie profondément Madame ARBIA Wassila promotrice de ce travail, de m'avoir aidé et d'avoir suivi de proche mes travaux.

Nous somme sensible à l'honneur que m'ont fait monsieur abousaoud Président de juré, madame tassist examinateur et madame maàchou pour m'avoir honoré de leur présence en acceptant de juger ce travail

Enfin, à tout qui m'ont apporté leur aide, et contribué, de proche ou de loin, dans l'élaboration de ce mémoire

Dédicaces

Je dédie ce travail aux première mon a ma dieux qui donné tout le courage a tout ma vie.

A ma mère qui courage tout les années jusqu'à maintenant.

A mes frères Mohamed, Abdnnacer.

A mes sœurs Samira, Noria, Fatima Zohra, Khadija, Karima.

A mes amies on première mont a mon amie qui a très proche a mon coure cher Karima et tout sa famille surtout sa sœur Bahia, Hadjira, Touba, Cherifa, Naima.

A tout mes amies de bioprocédés pharmaceutique aux 2014.

A mon grand père et grande mère, et toutes les tantes et l'oncle.

A mes toute les familles et les amie qui connu.

hafidha

Dédicaces

Je dédie ce travail aux première mon a ma dieux qui donné tout le courage a tout ma vie.

A mon père qui a souhaité vivre pour longtemps juste pour nous voir Qu'est ce que nous allons devenir.

A celle qui m'a transmis la vie, l'amour, le courage, a toi chère maman toutes mes joies, mon amour et ma reconnaissance.

A ce qui m'a être le soutien moral pendant ce projet…… ma fiancé LBESQRI Said Ali et tout sa familles.

A mes frères Rabeh, Faysal et sa femme Ilham et sont petites familles (Abderrahmane wissale)

A mes sœurs Mahjouba, Fatiha, Nasima, Hayat et chacune a sa famille, Yasmin, Hada.

A mes amies on première mont a mon amie qui a très proche a mon coure cher Ahlem et tout sa famille surtout sa sœur Zohra. Hanane, Ratiba, Souad, Sadjia, Mahdia, Moufida, Lamia, Hadjira Djawida, Zohra.

A tout mes amies de bioprocédés pharmaceutique aux 2014.

A mon oncle Mahfoud et sa famille surtout sa petite fille nourehane. Et Mohamed.

A mes belles familles. De grande jusqu'a le petite.



Résumé

L'objectif de ce travail porte sur l'étude de l'influence de la composition du milieu de culture sur les rendements de production de la chitine et du chitosane à partir de *Fusarium culmorum*. Et on voire comment calcule le degré d'acétylation ? bien sure apartire d'une méthode spectrale (infra rouge). Pour la comparaison entre la chitine commerciale (α chitine) et la chitine qui nous avons fabriqué (β chitine).et réponde a la question qui suppose est se que cette champignon la fabriqué la chitine ou no a cette condition de milieu qui nous utilisons ?

Abstract

The objective of this work is the study of the influence of the composition of the culture medium on the production yields of chitin and chitosan from Fusarium culmorum. And how it calculates the degree or acetylation? apartire very sure of a spectral method (infrared). In comparing the commercial chitin (α chitin) and chitin that we made (β chitin) .et answer the question which is suppose is that the fungus produced no chitin or has this condition of environment that we use?

Liste des tableaux

Tableau I. 1. Les principales sources de chitine ……..... 5

Tableau II.2 : utilisation de la chitine et du chitosane dans le domaine de cosmétique……..... 8

Tableau II.1 : application industrielles de la chitine et du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique……... 14

Tableau III.3 Applications industrielles de la chitine et du chitosane dans le domaine agroalimentaire…….. 15

Tableau II.4. Applications de la chitine et du chitosane dans le domaine agricole…….. 16

Tableaux. II.5 : applications de la chitine et du chitosane dans le domaine de l'environnement……..…… 17

Tableaux II.6 : autres domaines d'applications de la chitine et du chitosane……... 18

Tableau III.1. Les différents rendements d'extraction de la chitine et du chitosane en fonction des conditions d'extraction…… 21

Tableau IV.1.1 : les matériels utilisé dans cette étude…….. 26

Tableau. IV.1.3. les produits utilisé…… 26

Tableau IV.1. La matrice de toutes les expériences…….. 29

Tableau V.1. Les quantités de la masse sèche, chitine et chitosane…….. 37

Tableau V.2. Comparaison des biomasses fongiques obtenues avec la chitine commerciale…….…… 40

Tableau V.3. Comparaison des chitines fongiques extraites avec la chitine commerciale…….. 42

La liste des figures

Figure I 1 : structure chimique de la chitine…… 4

Figure I. 2 : la structure chimique de chitosane…… 6

Figure I.3 : conversion de la chitine en chitosane par la désacétylation…….. 7

Figure I.4 : Procédé de la fabrication de la chitine, du chitosane et dérivés……... 9

Figure I.5 : les unités de répétitions structurales de la chitine et du chitosane…… 13

Figure IV.1. Préparation du milieu PDB……..... 27

Figure. IV. 2. Les flacons contenants le PDB pour la stérilisation……. 28

Figure. IV.4. l'ajout des différents composants sous agitation de milieu de culture……..... 29

Figure. IV.5. L'agitation des milieux de culture …….. 30

Figure. IV.6. la centrifugeuse……..... 30

Figure. V.1. Biomasses sèches récupérées à la fin des fermentations……..... .34

Fig. V.2. Précipitation de chitosane avec NAOH 30% (pendant une nuit)……..... 36

Figure. V.3. La biomasse fongique en fonction des expériences…….. 37

Figure. V.4. La quantité de la chitine fongique en fonction des expériences……... 38

Fig. V.5. La quantité du chitosane fongique en fonction des expériences…… 38

Fig. V. 6. Les spectres Infra- rouge des différentes biomasses fongiques…… 40

Fig. V. 7. Les spectres Infra- rouge des différentes chitines fongiques……..... 42

Fig. V. 8. Les spectres Infra- rouge de la chitine fongique (N°6) et la chitine commerciale…….. 43

Fig. V. 9. Les spectres Infra- rouge des différentes chitines fongiques obtenues par Di Mario et al. (2007) ……. 44

Fig. V. 10. Les spectres Infra- rouge des différents chitosanes fongiques……..... 45

Fig. V. 11. Les spectres Infra- rouge des chitosanes fongiques (N°1 et N°6) et le chitosane commercial……. 46

Fig. V. 12. Les spectres Infra- rouge des différents chitosanes fongiques obtenues par Di Mario et al. (2007)…… 46

SOMMAIRE

Introduction…… 1

la chitine et son dérivé…… 3

I.1. La chitine…. …… 3

I. 1. 1. Historique…… 3

I. 1. 2. Structure chimique de la chitine…… 3

I. 1. 3. Source de la chitine…… 4

I. 2. Les dérivés de la chitine : dont le plus important est le chitosane…… 5

I. 2. 1. Historique…… 5

I. 2. 2. Structure chimique du chitosane…… 6

I. 2. 5. Préparation du chitosane par désacétylation de la chitine…… 6

I. 3. Propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane…… 8

I. 3. 1. Le Degré de Désacétylation (DD) ou le Degré d'Acétylation (DA)…… 8

I. 3. 2. La masse molaire…… 9

I. 3. 3. La solubilité…… 10

I. 3. 4. La viscosité…… 10

I. 3.5. Dégradabilité …… 10

I. 3.6. Biocompatibilité, toxicité et stérilisation …… 11

I. 3. 7. Polyélectrolyte en milieu acide…… 11

I.3.8. propriétés biologiques…… 11

II. principales applications de la chitine et du chitosane…… 12

II.1 domaines biomédical et pharmaceutique…… 12

II.2.cosmétique…… 14

II.3 Agroalimentaire…… 15

II.4.Agriculture…… 16

II.5. Traitement des eaux…… 16

II.6. autres domaines d'application…… 18

III. La production de la chitine et de la chitosane……... 19

III. 1. Introduction…… 19

III. 2. La méthode chimique …… 19

III. 3. La méthode biologique …… 20

III.4. Les facteurs influençant l'extraction de chitine et le chitosane à partir des champignons……. 20

IV.1. matériels et méthodes 26

Introduction…….... 26

IV.1.1. Matériels non biologique…… 26

SOMMAIRE

IV.1. 2. Le matériel biologique…….. 26
IV.1.3. Les produits…….…….. 27
IV.2. Les méthodes…… 27
IV.2.1. Préparation des milieux de culture à base de potatoe dextrose bouillon (PDB)…… 31
IV.2.2. Extraction de la chitine et le chitosane (Synowiecki et AI-Khatib, 1997)…… 31
IV.2.2.1. Traitement de la biomasse ……. 32
IV.2.2.1.1. Traitement de la fraction insoluble pour la récupération de la chitine…… 33
IV.2.2.1.2. Traitement du surnageant pour la précipitation du chitosane…….. 34
V.2. Résultats …… 34
V. 2.1. Récupération de la biomasse : la figure ci-dessous présente les différentes biomasses …….. 34
V. 2.2. Précipitation du chitosane ……. 36
V. 2. 3. Les quantités de la biomasse, la chitine et le chitosane ……... 36
V.3. Analyse par spectroscopie Infra- rouge……. 39
V. 3. a. Analyse Infra- rouge de la biomasse fongique…… 40
V. 3. b. Analyse Infra- rouge de la chitine fongique extraite…… 41
V. 3. C. Analyse Infra- rouge du chitosane fongique…… 44
V. 4. Caractérisation de la chitine et le chitosane obtenus…… 47
Conclusion générale……... 49
Références bibliographique……... 51

Les polysaccharides jouent des rôles structuraux chez les plantes et les animaux : ils permettent la réalisation des structures constitutives de ces organismes et le stockage d'énergie chez les organismes vivants (amidon, glycogène, etc.…). D'un point de vue chimique, ce sont des biopolymères hydrophiles et stables, formés par l'enchainement de motifs similaires qui appartiennent au groupe des hydrates de carbones (sucres).

Parmi les polysaccharides d'intérêt pour l'homme, la chitine et son dérivé, le chitosane, occupent une place de plus en plus importante. Présente dans de nombreux organismes vivants, la chitine est le polysaccharide le plus abondant après la cellulose (2,3), bien qu'une faible fraction de cette production soit réellement exploitable économiquement. La chitine et le chitosane sont, en effet, extraits commercialement des carapaces des crustacés telles que le crabe et la crevette, et les champignons tels que le Levures, Ascomycètes et Pénicillium.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études ont été réalisées sur ces biopolymères et de nombreux brevets déposés, et il existe à leur sujet une abondante et récente littérature scientifique . Ce sont deux biopolymères primordiales à notre époque ou la protection de l'environnement et de la santé humaine jouent un rôle important. Pratiquement, tous les domaines d'applications industrielles, de la pharmacie à l'agroalimentaire, en passant par l'environnement, l'agriculture, le textile, la papeterie et les cosmétiques, sont concernés. Parmi ces domaines la diététique et le biomédical sont en plein essor (Shi C et al., 2006).

L'objectif de cette étude est l'extraction de la chitine et le chitosane à partir de la paroi du champignon et étudier l'influence de la composition du milieu de culture sue le rendement de ces derniers. L'intérêt de ce travail réside dans le fait qu'on va extraire un chitosane ultrapur produit d'une manière naturel par un microorganisme comparant au chitosane commercial qui est produit par une transformation chimique de la chitine des crustacés.

Ce travail a été réalisé en trois principales étapes :

Dans la première étape on a procédé par :

- La culture du champignon sur différents milieux de culture ;
- Récupération de la chitine et du chitosane et leur quantification ;
- Caractérisation par spectroscopie infrarouge des biopolymères récupérés ;

Ce mémoire s'organise en deux parties :

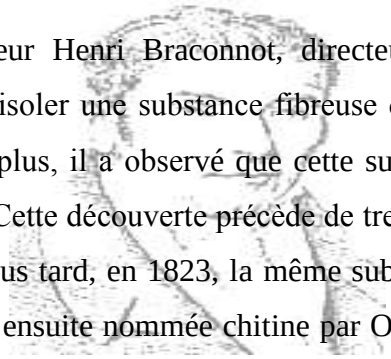
A) Partie bibliographique, divisée en trois chapitres : Chapitre 1, ou on va décrire la chitine et son dérivé le chitosane. Dans le chapitre 2 on va présenter les principales propriétés et

applications de la chitine et du chitosane et en fin dans le troisième chapitre 3 on présente les différentes méthodes d'extraction.

B) Une partie expérimentale qui comporte deux chapitres : le premier (chapitre V) dans lequel nous avons présenté le matériels utilisés, les conditions expérimentales de notre étude ainsi que les différentes méthodes d'analyse. Dans le second (chapitre VI), nous avons présenté, interprété et discuté les résultats obtenus au cours de notre travail.

I. 1. La chitine

I. 1. 1. Historique



En 1811, le professeur Henri Braconnot, directeur du jardin botanique à Nancy (France), a été le premier à isoler une substance fibreuse d'un certain type de champignon, qu'il a appelée fongine. De plus, il a observé que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses d'acides. Cette découverte précède de trente ans l'isolement de la cellulose des Plantes. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (coléoptère) et a été ensuite nommée chitine par Odier (chitine provient du mot grec "kitos" qui signifie l'enveloppe).

En 1859, le professeur 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, seulement en 1894 cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler **(**Nugraha, 2006**)**

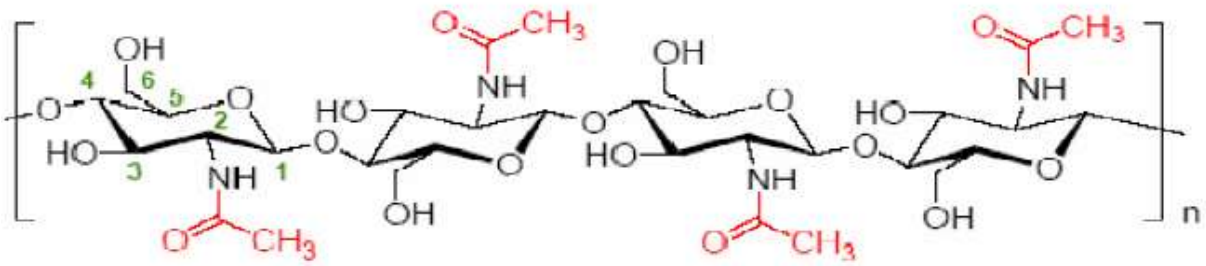
Entre 1930 et 1940, ces biopolymères ont suscité beaucoup d'intérêt dans le monde, principalement pour l'application dans le domaine médical et la purification de l'eau.

Aujourd'hui, nous savons que la chitine et le chitosane se trouvent abondamment dans la nature et sont des ressources renouvelables, non toxique et surtout biodégradable **(**Attila et al., 2009**).** La production annuelle de chitine dans la nature est estimée à 10^9-10^{10} tonnes et actuellement elle n'est pas très exploitée et commercialisée par rapport à la cellulose **(**Ravi, 2000**).**

I. 1. 2. Structure chimique de la chitine

La chitine est un polysaccharide linéaire formé d'unités de N-acétyle-D-glucosamine reliés entre eux par une liaison du type β (1- 4) (Fig. 1). D'une manière intéressante, la formule chimique de la cellulose est très proche de celle de la chitine, le groupe C(2) hydroxyle a été remplacé par les groupements acétamide. En fait, on associe cette similarité entre la molécule de la chitine et celle de la cellulose à une fonction similaire de structure (Blackwell et al., 1973 ; Muzzarelli, 1985 et Roberts 1992).

Figure 1 : structure chimique de la chitine



Trois formes différentes ont été mises en évidences : α-, β-, et γ-chitines. L'α-chitine, présente un agencement antiparallèle des chaines. C'est la forme de la chitine, la plus abondante dans la nature (crevettes, crabes). La β-chitine présente des chaines parallèles, elle est rencontrée dans les plumes de calamar, et l'endosquelette de la seiche tandis que la γ-chitine présente le mélange de α- et β- chitines, elle est rencontrée dans les cuticules de brachiopode et les cocons des insectes (Arbia, 2010).

I. 1. 3. Source de la chitine

La chitine est le deuxième polysaccharide très abondant, dans la nature, après la cellulose, elle n'existe que sous la forme de complexe avec des protéines et des minéraux. Ce biopolymères est présent principalement dans l'exosquelette des arthropodes (crustacés), l'endosquelette des céphalopodes (calamars) et les cuticules des insectes. La chitine se trouve dans la paroi de la plupart des champignons (ascomycètes) et de certaines algues chlorophycées, levures et bactéries **(**kurita, 2006 ; Blackwell et al., 1973 ; Muzzarelli, 1985 ; Roberts, 1992 et Hudson, 2003). En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique.

Tableau 1. Les principales sources de chitine (Muzzarelli, 1985 ; No, 1997 et Desbriéres et al., 2002)

Végétaux inférieurs	**Champignons**	**Annélides**	**Mollusques**
Algues Lichen	Levures Ascomycètes Pénicillium Blastocladiacés Chytridiacés	Lombric Sangsue	Seiche Calmar

La chitine peut être extraite à partir des trois sources à savoir : les crustacés, les micro-organismes et les insectes. Cependant, la principale source de chitine exploitée commercialement demeure néanmoins les carapaces d'invertébrés marins et d'eau douce comme les crevettes, les crabes, les homards et les krill qui sont fournis en grandes quantités par l'industrie de transformation alimentaire des crustacés. Pour ces industries, les téguments sont un véritable déchet et leur utilisation est une forme de revalorisation de la biomasse.

Les champignons utilisés par l'industrie de la fermentation sont une deuxième source de chitine exploitée commercialement. Ces industries produisent, entre autres, des antibiotiques et de l'acide citrique par *Aspergillus Niger* . Dans ce cas, la chitine est extraite des parois des microorganismes après leur utilisation en fermenteur. Cependant, ils ne sont pas produits dans le commerce à grande échelle en raison des faibles rendements obtenus, à ce jour, par rapport aux autres procédés de fermentation et de la variabilité dans les propriétés physico-chimiques du biopolymère.

Les principales composantes de la paroi des champignons sont l'eau, les protéines (20% -25%), la chitine (10% -20%), le chitosane, et glucines (Mario et al. 2008).

Chez les insectes, la chitine constitue 1,4% du poids frais de l'animal, ce qui explique l'absence d'exploitation .

I. 2. Les dérivés de la chitine : dont le plus important est le **chitosane**

I. 2. 1. Historique

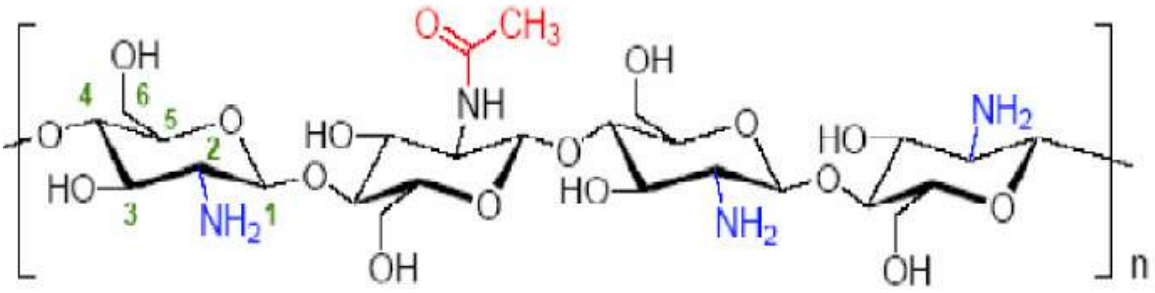
Le chitosane a été découvert en 1859 par C. Rouget en traitant la chitine avec du KOH concentré à température élevée. Le nom *chitosan* ou *chitosane*, a été proposé par Hoppe-Seyler en 1894. Il est aujourd'hui produit commercialement à partir des déchets provenant de la consommation de crustacés et de la transformation industrielle de champignons. Le degré d'acétylation (DA) des produits commerciaux varie de 60 à 100%. On peut remarquer que, tandis que la chitine est produite par un grand nombre d'organismes vivants, le chitosane n'a été observé que dans quelques micro-organismes. Il faut, suivant la source et le procédé utilisé, entre 10 kg et 25 kg de carapace pour faire 1 kg de chitosane.

I. 2. 2. Structure chimique du chitosane

Le chitosane est un polysaccharide de structure linéaire. C'est un biopolymère cationique, constitué d'unités de glucosamine partiellement acétylé **(**Austin, 1984 ; Sandford,

1989 ; sorlier et al., 2001 et Rinaudo, 2006). Le terme chitosane, loin de répondre à une seule et unique structure chimique bien définie, s'adresse à toute une famille de copolymères linéaires à arrangement aléatoire d'unités N-acétyle-D-glucosamine et de D-glucosamine en proportions variables, et liées entre elles par des liaisons β-(1- 4) (figure 2). Il est, également, habituellement utilisé pour les polymères solubles dans une solution d'acide dilué comme l'acide acétique (1%) (Rinaudo, 2006). Ce biopolymères, naturel et non toxique, est actuellement largement produit commercialement par désacétylation de la chitine, préparée à partir des déchets des carapaces de crabes et des crevettes (Blackwell et al., 1973 ; Hudson et al., 2003; Shi et al., 2006; Guibal et al., 2007).

Figure 2 : la structure chimique de chitosane



Généralement, le chitosane a trois types de groupes fonctionnels réactifs : les groupes amines sur le carbone C(2), les groupes hydroxyles primaires et secondaires sur le carbone C(3) et le carbone C(6). La nature chimique du chitosane fournit beaucoup de possibilités alternatives pour des modifications covalentes et ioniques qui permettent l'ajustement étendu des propriétés mécaniques et biologiques.

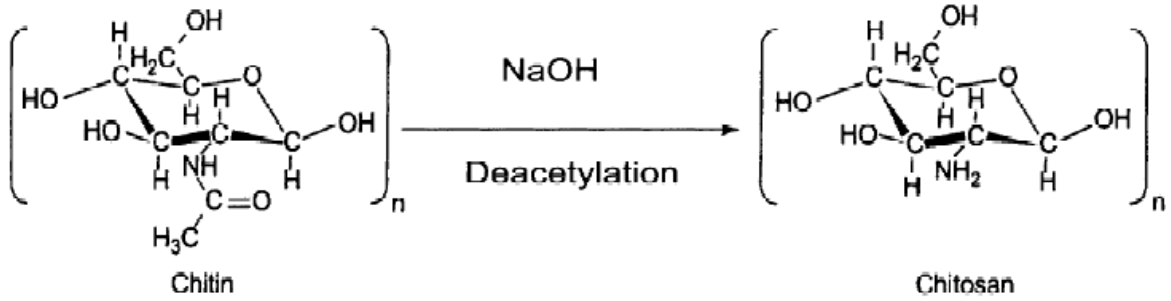
Contrairement à la chitine, le chitosane est peu répandu dans la nature. Il se trouve dans les parois d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes et chez quelques insectes.

I. 2. 5. Préparation du chitosane par désacétylation de la chitine

La désacétylation signifie l'élimination des groupements acétyles présents dans la chitine pour avoir des groupements amines. D'habitude, la chitine est partiellement désacétylée par un traitement alcalin.

La désacétylation est généralement effectuée par le traitement avec l'hydroxyde de sodium ou potassium concentré (figure 3).

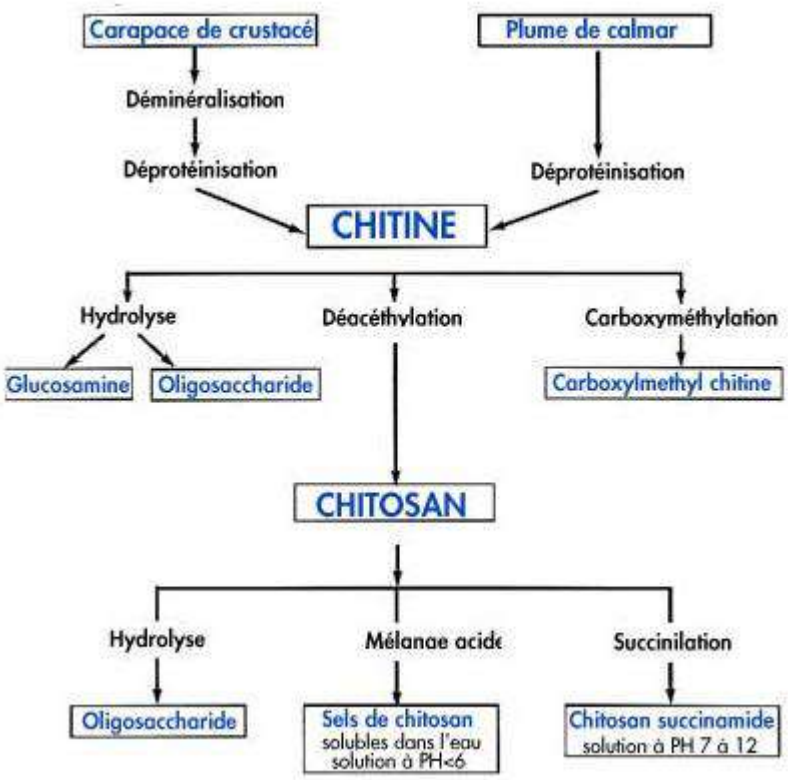
Figure 3 : conversion de la chitine en chitosane par la désacétylation



Il y a plusieurs facteurs essentiels qui affectent le rendement de désacétylation comme la température, la durée, la concentration d'alcalin, les traitements préalables pour l'obtention de la chitine, l'atmosphère (air ou azote), la quantité de chitine par rapport à la solution alcaline, densité de la chitine et la taille des particules. Compte tenu de ces paramètres, l'objectif idéal de désacétylation est de préparer un chitosane qui est non dégradé et parfaitement soluble dans l'acide dilué (acides acétique, lactique, citrique,...).

Il existe d'autres dérivés de la chitine et du chitosane qui sont formés soit par des réactions d'hydrolyse, ou par des substitutions des groupements chimiques (Figure 4).

Figure 4 : Procédé de la fabrication de la chitine, du chitosane et dérivés



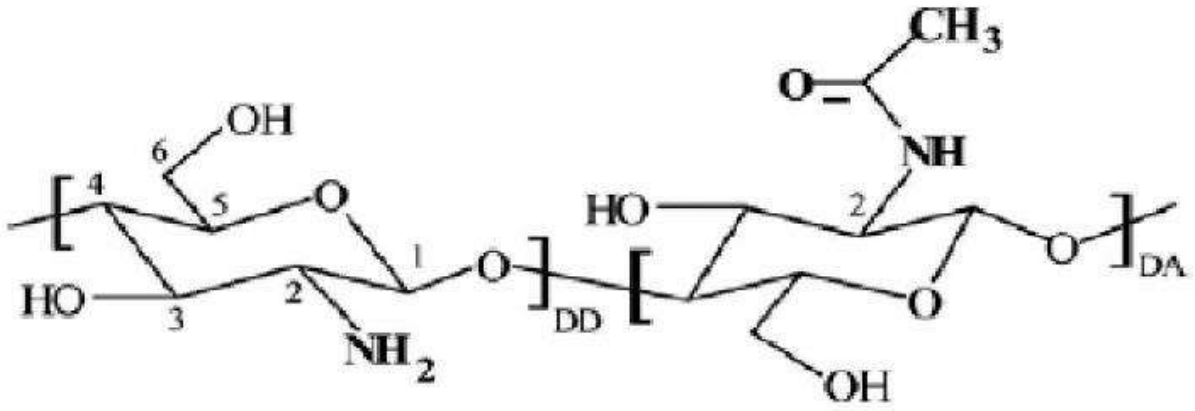
I. 3. Propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane

I. 3. 1. Le Degré de Désacétylation (DD) ou le Degré d'Acétylation (DA)

En dépit de leur désignation chimique spécifique, les noms chitine et chitosane correspondent actuellement à la même famille de polymères. Ils varient seulement sur le contenant en groupe acétyle qui est désigné par le degré d'acétylation.

Le degré d'acétylation présente le taux de groupe acétylé par rapport au groupe non acétylé (figure 5) (Roberts, 1992).

Figure 5 : les unités de répétitions structurales de la chitine et du chitosane



Le degré de désacétylation (DD) est l'un des propriétés les plus importantes du chitosane. Il influe, non seulement sur les caractéristiques chimiques et physiques, mais aussi sur la biodégradation et l'activité immunologique du chitosane (No, 1997)

De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le DA sur des échantillons solides : la spectroscopie IR à transformée de Fourier (Darmon et al., 1950 ; Shigemasa et al., 1996 ; Rinaudo, 2006). La RMN solide (Focher et al., 1992 ; Rinaudo, 2006) ou sur des échantillons en solution : dosage UV (Tan, 1998), RMN liquide (Focher et al., 1992) et titration potentiométrique (Zhang et al., 2005). Cependant, la méthode la plus simple est celle de la spectroscopie IR.

I. 3. 2. La masse molaire

La seconde caractéristique importante est la masse moléculaire (MM). La chitine est soluble dans très peu de solvants. Sa masse molaire initiale est de l'ordre de 8.10^5 à 80.10^5 $g.mol^{-1}$ et elle est généralement fortement acétylée. Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire de l'ordre de 20.10^4 $g.mol^{-1}$ et un DA allant de 2 à 25%. Pour le chitosane, la masse molaire et la répartition des motifs N-acétylés le long de la chaîne sont dépendantes de la méthode de désacétylation utilisée (Rinaudo et al., 1989 ; No et al., 1997 ; Rinaudo, 2006). De plus, un enchaînement successif de plusieurs motifs N-acétylés confère au polymère un caractère plus hydrophobe, et donc des propriétés auto associatives (propriétés épaississantes et gélifiantes) et modifie sa solubilité.

I. 3. 3. La solubilité

La chitine ‘est une substance inerte, insoluble dans l’eau, et également dans la plupart des solvants, comme la cellulose (Blackwell et al., 1973; Austin, 1984 ; Muzzarelli, 1985 ; Roberts, 1992 ; Hudson. 2003; kurita, 2006). Par chauffage, la chitine se décompose vers 250°C ce qui limite son utilisation et sa valorisation. En effet, elle n'est soluble que dans le 2-hexafluoropropanol, et dans des mélanges tels que le diméthylacétamide/chlorure de lithium ou l'acide trichloroacétique/dichloroéthane Contrairement à la chitine, en revanche, sa désacétylation partielle en milieu basique permet d’obtenir le chitosane qui, lui, est soluble dans les solutions aqueuses telles que les acides faiblement dilués (0,1-1%) (Comme l’acide acétique, lactique, citrique) le chitosane est, en effet, insoluble dans les solutions alcalines concentrées ou diluées (Blackwell et al, 1973 ; Muzzarelli, 1985 ; Roberts ,1992 ; Shigemasa, 1996 ; kurita, 2006). En générale, le chitosane est parfaitement soluble à pH 3- 4.

I. 3. 4. 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).

I. 3.5. Dégradabilité

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.

I. 3.6. 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'octale à50%) du chitosane est de 18 g par Kg (valeur très proche de celle du sucre de table).

I. 3. 7. 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 protonation des 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).

I.3.8. propriétés biologiques

La chitine et le chitosane sont non toxique, biodégradables (par exemple, la chitine est hydrolysée facilement par les chitinases et le lysozyme), et surtout bioactifs ((Blackwell et al., 1973 ; Muzzarelli, 1985 ; Roberts, 1992). Le chitosane est biocompatible c'est-à-dire que sa présence dans un organisme entraine des réactions inflammatoires et des réactions de rejet très limitées (propriétés immunologiques). Il est bio-résorbable avec des cinétique faibles et contrôlées. Il ne présente aucun comportement antigénique, mais possède un caractère anti-thrombogénique et hémostatique (Muzzarelli et al 2005 Shi et al 2006). Le chitosane inhibe la croissance de nombreux parasites et il réduit le développement des infections : c'est donc un bon agent antibactérien et antifongique. De plus, il a des propriétés anti-tumorales, ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables. Il augmente la vitesse de cicatrisation des plaies ouvertes en stimulant la réponse immunitaire et la reconstruction des tissus tout en prévenant les infections microbiennes. Le chitosane est très résistant aux attaques bactériennes.

II. principales applications de la chitine et du chitosane

La chitine et surtout le chitosane trouvent des applications importantes dans différent domaines (Rauch et al, 2006 ; Muzzarelli et al 2005 ; Sandford, (2003et1989) en raison de leurs nombreuses et diverses propriétés que nous venons d'énumérer. En pratique, toutes les applications du chitosane sont intiment liées à son caractère polycationique qui est unique parmi les polyméries naturels. De nombreux brevets internationaux sur l'utilisation de la chitine et du chitosane ont été ainsi déposés ces dernières années dans des secteurs économiquement porteurs comme les industries cosmétiques, biomédicales ou alimentaires (Sandford 2003 Struszczyk 2002). C'est le domaine de la diététique qui utilise le plus de chitosane avec 1000 tonnes consommées en 2000 dans le monde (Karita 2006). Il existe actuellement un marché industriel porteur autour de la production de biopolymères à base de chitosane d'origine non animale (à partir de champignons) de haute pureté, reproductibles, hypoallergénique, particulièrement utilisés dan le domaine médical : ingénierie cellulaire, cicatrisation des plaies, support de culture, thérapie génique, cancérologie, ophtalmologie (Sandford, (2003 et 2989). Alor l'objectif de ce chapitre est de décrire les principaux domaines d'applications. Application de la chitine et du chitosane.

II.1 domaines biomédical et pharmaceutique

L'utilisation thérapeutique du chitosane est très récente (Shi et al, 2006 ; Struszczyk, 2002 ; Ravi, 2000). Jusqu'à présent, les usages industriels de ces matériaux étaient, en effet, limités à certaines industries (les cosmétique par exemple). Il semble que le chitosane soit en voie de trouver son utilité en médecine classique, notamment comme « véhicule » de médicaments et d'autres substances thérapeutique (Muzzarelli et al , 2005 ; Shi C et al , 2006 ; Sandford (2003 et 1989), et en médecine régénératrice (chirurgie reconstructrice par exemple). Il faut noter que le chitosane ultrapur utilisé dans ces domaines à un cout très élevé. Les propriétés biologique de biocompatibilité et de bioacttivité de la chitine et du chitosane sont non-toxique, biodégradable, biocompatible (hémobiocompatible, absorbable, non fermentable), bioadhésif (muco-adhésivité, formation de films biologiques), bioactif (activités antimicrobienne et antifongique, agents antiacide, antiulcére et antitumrale, propriétés anticoagulantes et anticholestérol). Permettent de nombreuses applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques (tableau III.1). La non toxicité du chitosane est illustrée par une dose limite administrable de 17g/kg par jour (Sandford , 2003).ont montré que le chitosane

peut être utilisé pour fabriquer des organes ou des tissus artificiels, notamment en raison de son potentiel anti-thrombose. Le chitosane accélère la cicatrisation des plaies (activité bio-stimulante) (Ravi , 2000 ; Muzzarelli , 2005 et Shi C et al , 2006 ;). Le chitosane diminue les risques d'hypertension et de cancer tout en stimulant les fonctions hépatique et immunitaires et en régulant le transit intestinal. C'es aussi un agent antifongique et bactériostatique, et un spermicide efficace qui offre de bonnes conditions d'asepsie. le chitosane est utilisé pour améliorer l'absorption de certains médicaments administrés par voie oculaire ou nasale, en chirurgie plastique (pansement) (Jing et al, 1997), en parodontie (rince-bouche) (Sano et al, 2003).(Kas ,1997) a montré que les gels de chitosane permettent le transport d'un grand nombre de molécule thérapeutique des plus simples telle la caféine aux plus complexes (Berger et al, 2004) .

Tableau II.1 : application industrielles de la chitine et du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique

Champ d'application	**applications**
Médecine	Accélération de la cicatrisation et de la guérison des blessures
Chirurgie reconstructrice	Traitement des lésions épidermiques
Biologie cellulaire	Pansements
	Fils de sutures chirurgicaux bio-résorbables
	Agent anticoagulant
	Agent hémostatique
	Agent anti-infectieux, antibactérien, antifongique
	Encapsulation de cellules, de facteur de croissance
	Adsorption des plaquettes (protéines)
Pharmacie	Matériel absorbable avec possibilité de contrôle de libération de principes actifs
Dermatologie	Systèmes d'administration de médicaments par voie orale, systémique ou locale (via les muqueuses, voie nasale, oculaire, transdermique ou intra-tumorale)
Ophtalmologie	Adjuvant de vaccination
	Excipient
	Crèmes de soins, produits dermatologique (traitement de l'acné)
Neutraceutique	Diminution du taux de cholestérol
	Fixateur de graisses
Chirurgie dentaire	Implants dentaires

II.2.cosmétique

Dans l'industrie des cosmétiques, les évolutions des réglementations française et européenne vis-à-vis de la santé publique et de l'environnement et la pression des consommateurs ont entraine l'intégration de substances d'origine naturelle à la fois au niveau des produits, des formulations et des procédés.ces tendances ont poussé au développement des

recherches sur les macromolécules renouvelables, d'origine végétale ou marine, dont les polysaccharides. L'industrie cosmétique s'est également intéressée à ces produits naturels car ces matières sont riches d'une infinité de molécules aux propriétés extraordinairement variées, souvent complémentaires (d'où une diminution possible du nombre d'ingrédients dans les formulations).nous présentons quelque application de se domaine au (tableau III.2).

Tableau. II.2 : utilisation de la chitine et du chitosane dans le domaine de cosmétique (Ravi , 2000)

Rétention (humidité)
Agent de liaison
Agents stabilisant (émulsion)
Agent antiallergique
Crèmes de soins, hydratantes, cicatrisantes, anti- âge (crèmes antirides)
Pommades antifongique
Lotions, shampoings, produits de rinçage
Produits déodorants
Coloration (colorants)

Le chitosane est d'un grand intérêt dans les cosmétiques en raison de ce cumul e fonctions. Compte tenu de sa structure chique, il présente l'avantage, contrairement à la majorité des produits classiques, de posséder un caractère polycationique. De ce fait, les molécules chargées négativement peuvent interagir avec la macromolécule de chitosane. C'est le cas des protéines de la peau, des lipides, des tensioactifs, des détergents et des graisses du cheveu (Rinaudo , 2006). De plus, l'adhérence au revêtement au cutané du chitosane serait supérieure à l'acide hyaluronique. (Le chitosane) se fixe sur les cheveux par un mécanisme électrostatique).La chitine et le chitosane sont également utilisés comme conservateurs antimicrobiens dans les préparations cosmétique. En effet, les utilisations répétées des produits cosmétiques et leur stockage sur une assez longue durée sont à l'origine de contamination du produit par des microorganismes. Ces microorganismes peuvent altérer la qualité du produit cosmétique et son efficacité par des changements de texture, de couleur… ou l'apparition de risques pour la santé. Par rapport aux conservateurs issus de la chimie du pétrole, susceptibles de générer des effets secondaires d'allergies (Ravi , 2000).

II.3 Agroalimentaire

Dans les industries alimentaires, l'utilisation de la chitine et le chitosane n'est pas encore généralisée, à l'exception des pays asiatique comme le Japon ou on peut trouver de nombreux produits alimentaires enrichis en chitosane. Aux Etats-Unis, le chitosane est utilisé comme ingrédient dans certaines applications et comme film comestible pour protéger les aliments.les applications de la chitine et du chitosane dans le domaine agroalimentaire sont décrites dans (le tableau III.3). (Struszczyk , 2002)

Tableau II.3 Applications industrielles de la chitine et du chitosane dans le domaine agroalimentaire.

Additifs (liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant, de conservation) (Rabea et al 2003))
Restructuration des purées de fruits, de légumes ou de viande (Tripathi 2004)
Stabilisation de la couleur et des aromes
Libération d'aromes ou de pigments (Goycoolea 2000)
Extraction du fer (mauvaise odeur dans les viandes)
Alimentation diététique (fixation du cholestérol, acides gras, mono-glycérides) (Muzzarelli 1983)

Le chitosane est également utilisé dans la fabrication des yogourts pour protéger les probiotiques (substances qui améliorent l'équilibre de la flore intestinale, contrôlent le niveau de cholestérol, et améliorent la digestion du lactose pour les personnes présentant des intolérances).En fromagerie, l'immobilisation d'enzymes permet aux fromages, qui nécessitent de longs temps d'affinage, de développer leur gout et leur arome de maturation en toute sécurité (Muzzarelli 1983).

II.4.Agriculture

Les matériaux encapsulés à base de chitine et de chitosane se retrouvent également dans des produits agricoles. Le tableau (III.4) décrire quelque application de l'agriculture. En effet, la chitine, en particulier, pourrait devenir l'engrais naturel et le pesticide du futur.

Tableau II.4. Applications de la chitine et du chitosane dans le domaine agricole.

Enrobage de semences (encapsulation)
Immobilisation cellulaire (horticulture)
Fongicide (« bio-pesticide » (Rabea et al, 2003)
Traitement des sols
Contrôle des métaux essentiels à la croissance des plantes
Augmentation des rendements (Ravi , 2000 ; Goosen , 1997 et Hadwiger et al ,1984)
Alimentation animale (Rabea et al, 2003)
vaccination animale

L'épandage de chitine et de chitosane utilisés comme fertilisants renforce également le système racinaire, favorise par la même occasion l'épaississement de la tige et améliore la résistance lors de la germination, ce qui permet un accroissement du rendement protéique des céréales (Ravi, 2000 ; Goosen, 1997 et Hadwiger et al, 1984).

II.5. Traitement des eaux

Le chitosane est un bon candidat pour des applications environnementales surtout dans le traitement des eaux usées (Gérante et al, 2007 et Peter 1995). Quelque application exprimée dans le (tableau III.5). Le chitosane peut être utilisé aussi bien à l'état solide qu'en solution. Cette application étant basée sur le caractère polycationique du polymère en milieu acide, son efficacité varie selon la concentration en polymère et le PH du milieu (Guibal, 2004 et No et al, 2000). Néanmoins, la solubilité du chitosane en milieu acide ouvre la porte, en traitement des eaux, à de nombreuses applications dans le domaine de la coagulation-floculation, de l'adsorption ou de l'ultrafiltration assistée par complexation (par exemple dans le cas de la complexation d'ions métalliques et séparation par membrane). Le chitosane peut être utilisé comme agent coagulant ou adsorbant, dans le domaine des eaux industrielles usées pour éliminer des effluents industriels les métaux (Gérante et al, 2007 et Guibal 2004), et les colorants (Crini, 2006).

Tableaux. II.5 : applications de la chitine et du chitosane dans le domaine de l'environnement.

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

II.6 autres domaines d'application

La chitine et le chitosane trouvent également des applications dans d'autres domaines. Par exemple, en chimie, ils sont utilisés en tant que super-absorbants (Goosen, 1997 et Dutkiewicz et al , 2002).le tableau suivant donne quelque application de se domaine.

Tableaux II.6 : autres domaines d'applications de la chitine et du chitosan

Domaine d'application	Exemples d'applications
Chimie	Catalyse Capteurs chimiques Films biodégradables (emballages) Super-absorbants (Goosen, 1997 ; Dutkiewicz ,2002) Séparations membranaires (filtration Osmose inverse (Struszczyk, 2002)
biotechnologie	Chromatographie (liquide, gazeuse) (Franco et al, 2001 ; Gocan 2002 et Li et al, 2006) Immobilisation des cellules et des enzymes (Wang et al, 2004 et Hudson, 1988) Matrice pour culture et régénération cellulaire Membranes

III. 1. Introduction

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

III. 2. La méthode chimique

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). Cependant, l'acide chlorhydrique (HCl) à température ambiante est le plus utilisé afin de dissoudre $CaCO_3$. Ce dernier en réagissant avec HCl donne naissance à un composé soluble ($CaCl_2$) qui sera éliminé par un simple lavage .

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 $CaHSO_3$.

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. 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.

III. 3. 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. Cette méthode est basée sur l'utilisation des bactéries lactiques et/ou des enzymes protéolytiques. Elle conduit à la formation d'une fraction liquide riche en protéines, en minéraux et en pigments et une fraction solide : la chitine.

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.

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.4. Les facteurs influençant l'extraction de chitine et le chitosane à partir des champignons

En vue d'améliorer la production microbienne, une attention a été accordée à la déterminer de l'effet des conditions de fermentation sur le rendement de production et sur les propriétés physico-chimiques de ces biopolymères.

Plusieurs travaux portant sur l'étude de l'influence de la composition des milieux de culture sur les taux de la chitine et du chitosane récupérés à partir des champignons.

L'extraction de la chitine et le chitosane à partir de différentes espèces de champignons à savoir *Agaricus bisporus*, *Auricularia auriculajudae*, *Lentinula edodes*, *Trametes*

versicolor, Armillaria mellea, pleurotus Ostreatus, Pleurotus sajorcaju, et Pleurote du panicaut (Pochanavanich et Suntrornsu, 2002; Mario et al., 2008).

Le taux de croissance du champignon dépend des conditions de culture telles que la température, la teneur en humidité, la composition du milieu de culture, le temps de récolte et surtout des espèces du champignon. Une augmentation du taux de la chitine peut être obtenue soit par augmentation de rendement de la biomasse ou par une augmentation de la teneur de la paroi cellulaire en chitine/chitosane.

A fin d'étudier l'influence des conditions et des processus d'extraction, plusieurs études ont été réalisées. (Crestini et al, 1996 ; Pochanavanich et Suntornsuk ,2002) ont utilisés NaOH 1M à 121°C pendant 0,25 heure pour la déprotéination et l'acide acétique à 2% à 95°C pendant 8-14h pour l'extraction du chitosane. Alors que (Mario et al, 2008), ont utilisé de NaOH 1M à 40°C pendant 15-17h pour la déprotéinisation et l'acide acétique à 5% à 90°C pendant 3h pour l'extraction du chitosane. Le rendement total de la chitosane obtenue varie entre 10 à 40 mg/g de biomasse sèche et celui du chitine varie de 85 à 196 mg/g de biomasse sèche.

Le tableau suivant résume l'ensemble des résultats obtenus par les études précédemment citées.

Tableau III.1. Les différents rendements d'extraction de la chitine et du chitosane en fonction des conditions d'extraction

champignon espèces	**Optimale de récolte (jours)**	**Rendement en biomasse (g / l)**	**Rendement de la chitine ou du chitosane* (mg/g de biomasse)**
L. edodes (Crestini et al. 1996	12	3	*40
Abisporus (SMR 13) (Mario et al. 2008)	21	3.5	85
A.auricula-judae (SMR 54) (Mario et al. 2008)	21	6.8	196
A.auricula (SMR 90) (Mario et al.2008)	21	3.2	101
T.versicolor (SMR 117) (Mario et al.2008)	21	4.2	131
A.mellea (SMR439) (Mario et al.2008)	21	6.4	111
P. ostreatus(SMR684) (Mario et al.2008)	21	4.9	153
P.eryngii(SMR755) (Mario et al.2008)	21	4.6	87
L.edodes no.1(Pochanavanich and Suntornsuk 2002)	9	1.4	*33
P.sajor-caju no.2(Pochanavanich and Suntornsuk 2002)	21	10	*12

En outre, (Crestini et al, 1996) ont rapporté que les rendements du chitosane, à savoir, 120 mg/l de milieu de fermentation dans des conditions de fermentation liquides et 6,18 g/kg

de milieu de fermentation dans des conditions de fermentation à l'état solide sont produits à partir du champignon *L. edodes*. Sur la base de ces données, il peut être considéré que la culture du champignon de couche sur un support solide, ce qui est la méthode de culture de champignon naturel, pourrait être la meilleure méthode de culture pour la production de la chitine et du chitosane à partir des champignons.

Sur la base de la connaissance actuelle sur ce sujet, le mycélium des champignons peut être considéré comme une source alternative pour la production de chitine et le chitosane qui être utile pour certaines applications pratiques spécifiques. Les chitosanes des champignons ont un degré de désacétylation de 70% à 90% qui dépend de l'espèce de champignons et les conditions de traitement, et le poids moléculaire moyen d'environ 1-2 $x10^5$Da (Crestini et al, 1996 ; Pochanavanich et Suntornsuk, 2002 ; Mario et al, 2008).

La production microbienne de la chitine et de chitosane a été largement étudiée, notamment, chez les Zygomycètes (Arciadiacono., 1992), qui sont connus pour contenir des quantités plus élevées en chitine et chitosane dans leurs parois cellulaires en comparaison avec d'autres classes de champignons (Shimahara et al., 1989 ; Zamani et al., 2007). Beaucoup de recherches ont été faites à l'aide de ces souches comme *Absidia coerulea* (Davoust., 1992 ; Muzzarelli et al, 1994 ; Niederhofer., 2004), *M. rouxii* (Chatterjee et al, 2005 ; Wu et al, 2005) et *R. oryzae* (suntornsuk et al, 2002 ; Yoshihara et al, 2003). Ces micro-organismes peuvent être facilement cultivés dans un milieu minimal et la chitine et le chitosane de la paroi cellulaire sont facilement récupérés.

Tan et al. (1996) ont étudié la production de chitosane par 13 souches de Zygomycètes. *Gongronella butleri* USDB 0201 a produit la plus grande quantité de chitosane extractible (93,4 mg/200 ml substrat).

La composition du milieu de culture joue un rôle très important sur la production de la chitine/chitosane. (Göksungur, 2004) a montré que la production de chitosane par fermentation *R. oryzae* dans un milieu à base de la mélasse peut être augmentée de 961 à 1109 mg/L par l'optimisation de la concentration initiale en sucre, le taux d'aération et la vitesse d'agitation.

En outre, l'étude statistique de l'influence de la nature et de la quantité des sources de carbone et d'azote à savoir le D-glucose, L-asparagine et la thiamine, réalisée par Andrade et

al. (2003) en utilisant la souche *M. javanicus* a montré que la concentration en L-asparagine avait un effet très significatif sur la production de la chitine alors que le temps d'incubation présentait un effet non significatif.

Des résultats similaires, sur l'optimisation de la production de la chitine par *C. élégans* (IFM 46109) ont été rapporté par Andrade et al., 2000. Le rendement le plus élevé de la chitine 28,8% a été obtenue avec un milieu contenant 60 g/L de D-glucose, 3 g/L de L-asparagine, et de 0,008 mg/L de thiamine. Globalement, ces résultats sont en accord avec Stamford et al. (2007) qui ont déclaré que la production de chitosane par *C. élégans* (RUU 542) est fortement dépendante des conditions de culture, y compris les milieux de culture.

Ainsi, des études réalisées par Chatterjee et al. (2005) ont montré qu'il n'existe pas de différences significatives dans le rendement de chitosane obtenus par fermentation de *M. rouxii* sur différents milieu. Cependant, il ya des variations dans leur propriétés physico-chimiques tel que la cristallinité. Ils ont constaté que le chitosane extrait à partir d'un champignon cultivé dans un milieu à base de mélasse et des sels était plus cristallin par rapport à celui extrait à partir d'un milieu à base d'extrait de levure, peptone, glucose et le bouillon de pomme de terre dextrose (PDB).

De même, Nadarajah et al. (2001) ont montré qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative observée dans le niveau de chitosane extractible obtenu à partir du mycélium de *Rhizopus* sp. cultivé dans des milieux contenant différentes concentrations de glucose dans la gamme de 1% à 5%.

Chatterjee et al., (2008) ont rapporté que les hormones de croissance des plantes améliorent la production de chitosane par *R. oryzae*. De même, l'urée est la source d'azote la plus utilisée pour induire la production de chitosane par des champignons filamenteux. La production de chitosane par *G. butleri* USDB 0201 a été stimulée lorsque de l'urée a été ajoutée au substrat solide (New et al., 2004).

En outre, (Jaworska., 2001) ont étudié l'influence des ions ferreux, des ions manganèse, des ions de cobalt, de la trypsine et de la chitine, en tant que suppléments dans le milieu de culture, sur la production de chitosane par *Absidia orchidis*. Ils ont montré que le manganèse et les ions ferreux donnent les résultats les plus significatifs alors que les ions cobalt inhibent complètement la croissance des champignons. Il semble que la production de

chitosane, formé par l'action de complexes de chitine-synthétase et de la chitine déacétylase, pouvait être régulée par la présence d'ions manganèse et ferreux dans le milieu de croissance.

Rungsardthong et al. (2006) ont montré que l'augmentation de la vitesse d'agitation améliore à la fois la croissance et la production du chitosane par *Abisidia glauca*. Une production maximale du chitosane (1,28 g/L) à 200 tours par minute contre 0,6 g/L avec une vitesse d'agitation de 100 tours par minute.

En outre, il semble qu'une bonne grande aération et agitation peuvent stimuler la production du chitosane par *A. Coerulea* en culture discontinue (Kim et al., 2001). Ceci indique que le mélange doit être suffisant pour éviter la limitation diffusionnelle des nutriments et de l'oxygène

Le pH est également un facteur important à considérer pour la production du chitosane par plusieurs champignons. Selon Kafetzopoulos et al. (1993), un pH de 4,5 est optimal pour l'activité de la chitine déacétylase de *M. rouxii*. Les résultats sont en accord avec l'étude de Kim et al. (2001), qui ont rapporté que le taux de la croissance cellulaire et la production du chitosane par *A. coerulea* ont été significativement améliorés en contrôlant le pH à 4,5, indiquant que le pH affecte à la fois la morphologie fongique et l'activité de la chitine désacétylase. De même, Amorim et al. (2001) ont rapporté que des rendements plus élevés de chitosane ont été atteints dans les 24 h de culture de *M. racemosus* et *C*. élégants à pH 3,5.

La période recommandée de fermentation varie de 1 à 21 jours selon le type de culture utilisé pour la production de chitine/chitosane et les conditions de culture (Amorim et al., 2001; Mario et al.2008). Le champignon atteint généralement leur croissance optimale au bout de 48 à72h d'incubation, tandis que la production maximale du chitosane se produit au début de la phase de croissance (Chatterjee et al., 2005 ; Tan et al., 1996). Par exemple, goosen (1997) ont obtenu des rendements de chitine et du chitosane dans le mycélium de *M. rouxii*, culture vieille de deux jours, de 8,9% et 7,3%, respectivement. Ce résultat est tout à fait différent de celle rapportée par Wu et al. (2005) qui a déterminé que la teneur totale en glucosamine dans la biomasse sèche de *M. rouxii* était 14,2% au 4ème jour et est augmentée jusqu'à 20,1% au 21ème jour à 28°C sans agitation.

La cinétique de croissance des micro-organismes et la production de chitine/chitosane sont également étudiées en utilisant d'autres champignons Mucorales cultivés par fermentation submergée. *Cunninghamella elegans* (UCP 542) semblaient atteindre la phase de croissance exponentielle tardive après seulement 48h, produisant 24.3g de biomasse sèche

/L de milieu. Les meilleurs rendements en polysaccharides sont obtenus avec 48 h de culture pour le chitosane (66 mg/g) et de 72h pour la chitine (440 mg/g) (Stamford et al., 2007).

V.1. Introduction

L'objectif de cette étude est la récupération de la chitine et du chitosane qui se trouvent au niveau de la paroi du champignon *Fusarium culmorum* en jouant sur la composition du milieu de culture.

IV.1. matériels et méthodes

IV.1.1. Matériels nonbiologique :

Matériels	La marque
Agitateur	Heidolph MRHEI-standard
Fiole (100, 250, 500,1000) ml	Erose
Pipette	Hirschman R
Eprouvette	Erose (Borosilicate. glass)
Erlenmeyer (250) ml	Approx.vol.
Centrifugeur	Hettich
Papier filtre standard	Fisherbrand
balance	DENVER instrument
autoclave	
Etuve (23°C)	
agitateur du paillasse	

IV.1. 2. Le matériel biologique

Le champignon utilisé dans ce travail est *Fusarium culmorum* fournit gracieusement par laboratoire de la phytopathologie de l'Institut National d'Agronomie, Alger.

C'est une espèce de champignon ascomycète de la famille des *Nectriaceae*, phytopathogène responsable de divers symptômes tels que fonte des semis, pourriture racinaire, fusariose de l'épi, pourriture de la tige, etc. chez de nombreuses espèces de plantes mono- et dicotylédones, en particulier chez les céréales. C'est l'un des champignons responsables de la pourriture sèche du tubercule de la pomme de terre.

IV.1.3. Les produits

Nomde produits	La marque
Agar	Fluka
Glucose	Riedel-de Haën
$Cacl_2$	Riedel-de Haën
$MgSO_4$	Riedel-de Haën
$MnSO_4$	Riedel-de Haën
$FeSO_4$. 1.5 H_2O	Riedel-de Haën
Éthanol	Theralab
Acétone	Carlo erba

IV.2. Les méthodes

IV.2.1. Préparation des milieux de pomme de terre a basse de glucose (PDB)

- Mettez 250 g de pomme de terre, épluchée et couper en morceau, dans un bicher.
- Ajoutez de l'eau distillée et laissez Bouillir pendant 20 min
- Filtrez.

Figure IV.1. Préparation du milieu PDB



- Ajoutez la quantité du glucose selon les conditions de chaque expérience.
- Ajustez le volume final avec de l'eau distillée toujours selon les conditions de chaque expérience.
- Remarque: lorsqu'on a besoin du milieu solide, on ajoute de l'agar 20 g.
- Versez dans des flacons (Fig. IV.2) et stérilisez à 120°C pendant 20 min.

Figure IV. 2. les flacons contenants le PDB pour la stérilisation



- Ensuite, on ajoute les différents composants de chaque milieu de culture en fonction des conditions de chaque expérience (voir tableau .IV.1).

- ces composants sont ensuite ajoutés, sous agitation, stérilement aux milieux de culture.

Figure IV.4. L'ajoute des différents composants sous agitation de milieu de culture



Tableau IV.1. La matrice de toutes les expériences

N°	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X9	X_{10}	X_{11}
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
9	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
10	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
11	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Signe (-) : la valeur min ; Signe (+) : la valeur max ; Signe(0) : la moyenne

X_1 : concentration initiale en source de carbone [10 ,35, 60 g/l]

X_2 : nombre de disques [3 ,5 , 7disque] en biomasse

X_3 : volume du milieu de culture [100, 300, 500 ml]

X_4 : temps d'incubation [1, 2 ,3 semaines]

X_5 : corn steep liquor (source d'azote) [0 ,0.5, 1 ml]

X_6 : $FeSO_4$ [0, 0.7, 1.4 g]

X_7 : oligochitine [0, 1, 2 ml]

X_8: $MgSO_4$, 7 H_2o [0 ,0.1, 0.2 g]

X_9 $MnSO_4$ [0, 0.02, 0.04 g]

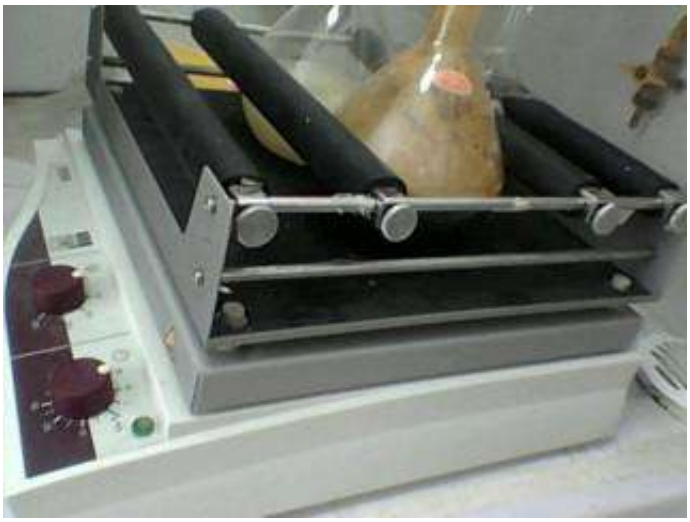
X_{10}: aspartate [0 ,1, 2 g]

X_{11}: $CaCL_2$ [0, 0.5,1 g].

- On ferme les erlenmeyer ou les fioles avec du coton cardé et du papier aliminium et on les place sur l'agitateur du paillasse pendant le temps nécessaire pour chaque expérience

.

Figure IV.5. L'agitation des milieux de culture



- A la fin de la fermentation, on faite une centrifugation (60 RPM*100 pondant 10 min).

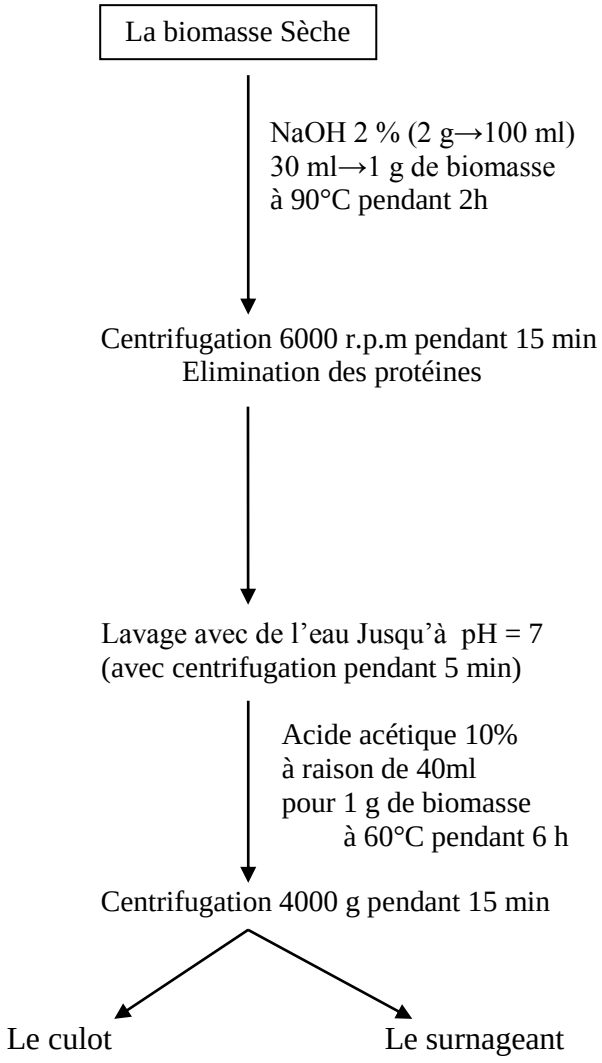
Figure IV.6. La centrifugeuse



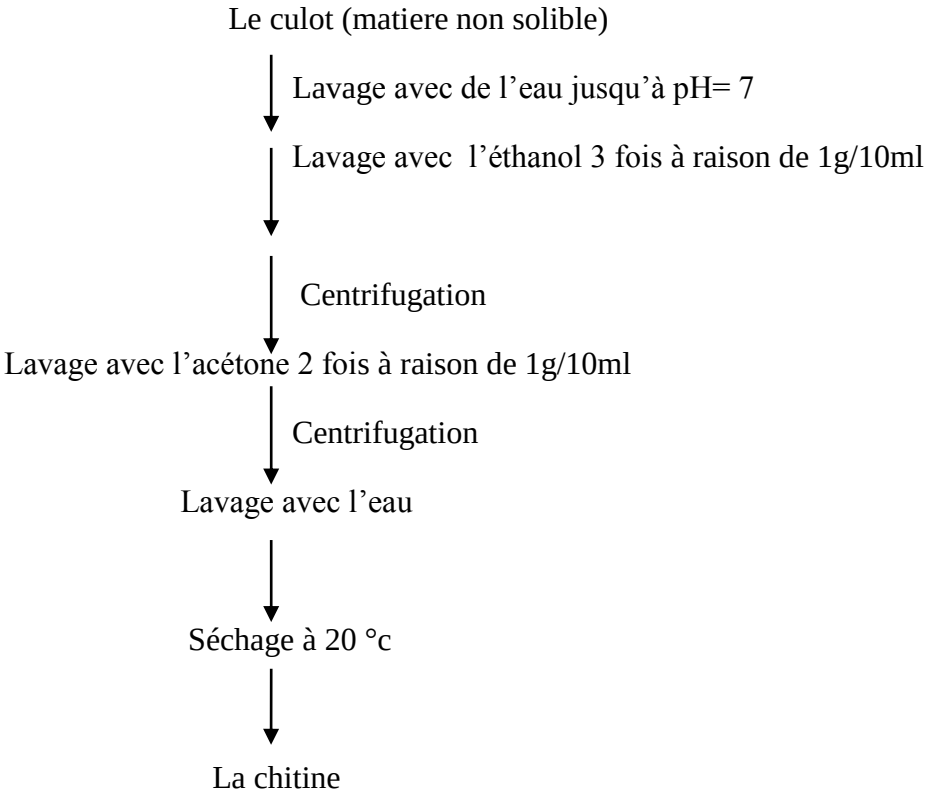
- On récupère le culot (biomasse humide) avec un papier filtre, on sèche à température ambiante.
- On fait un broyage manuel de la biomasse sèche en utilisant un mortier pour obtenir une poudre.

IV.2.2. Extraction de la chitine et le chitosane (Synowiecki et AI-Khatib, 1997)

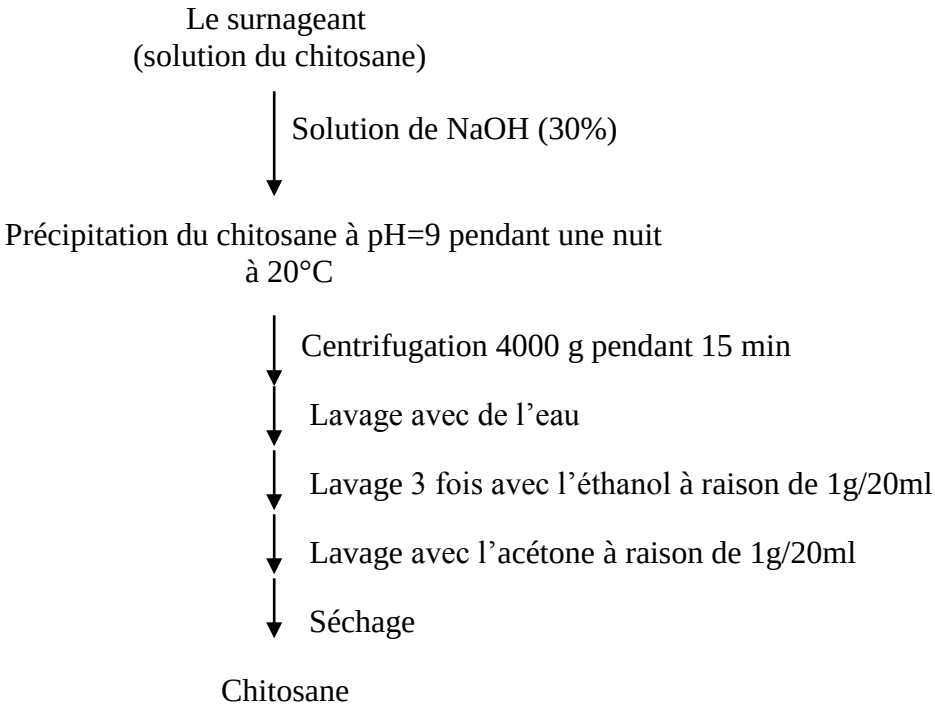
IV.2.2.1. Traitement de la biomasse : le traitement réalisé sur la biomasse sèche est présenté dans la figure ci-dessous.



IV.2.2.1.1. Traitement de la fraction insoluble pour la récupération de la chitine:



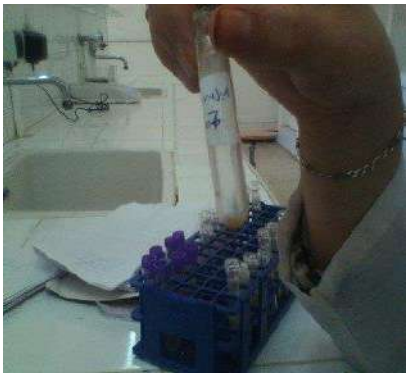
IV.2.2.1.2. Traitement du surnageant pour la précipitation du chitosane



V.2. Résultats

V. 2.1. Récupération de la biomasse : la figure ci-dessous présente les différentes biomasses obtenues après séchage.

Figure. V.1. Biomasses sèches récupérées à la fin des fermentations



éxpe : 1



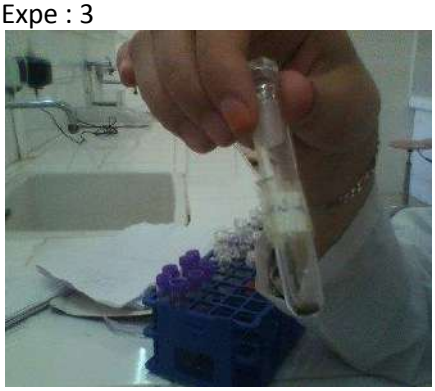
Expe : 2



Expe : 3



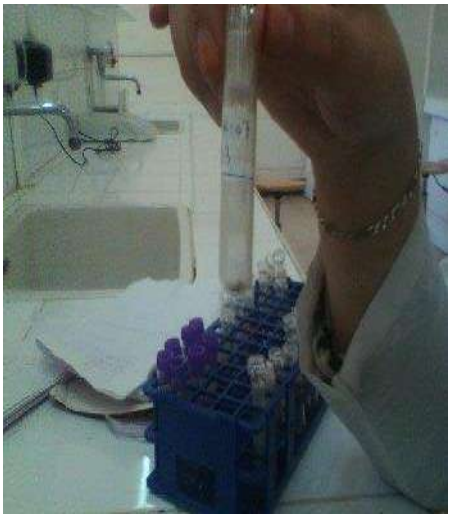
Expe : 4



Expe : 5



Expe : 6



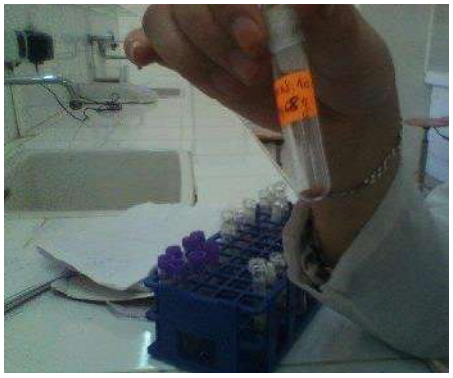
Expe : 7



Expe : 8



Expe : 9



Expe : 10



Expe11



Expe : 12



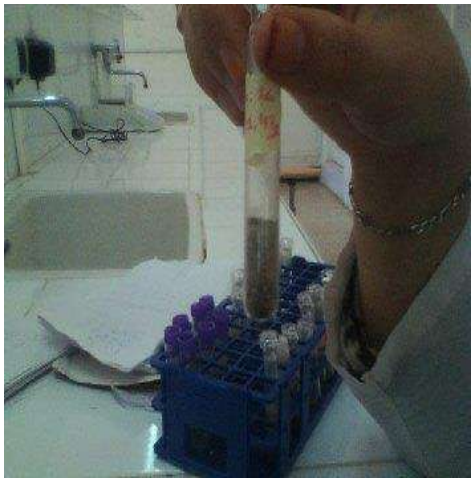
Expe : 13



Expe : 14



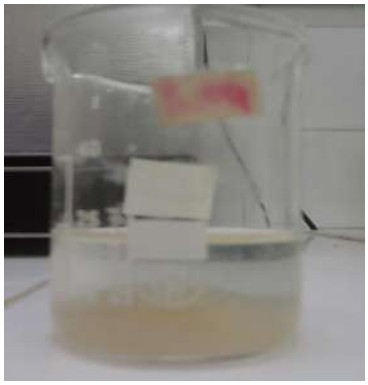
Expe : 15



Expe : 16

V. 2.2. Précipitation du chitosane : la figure ci-dessous montre la précipitation du chitosane

Fig. V.2. Précipitation de chitosane avec NAOH 30% (pendant une nuit)



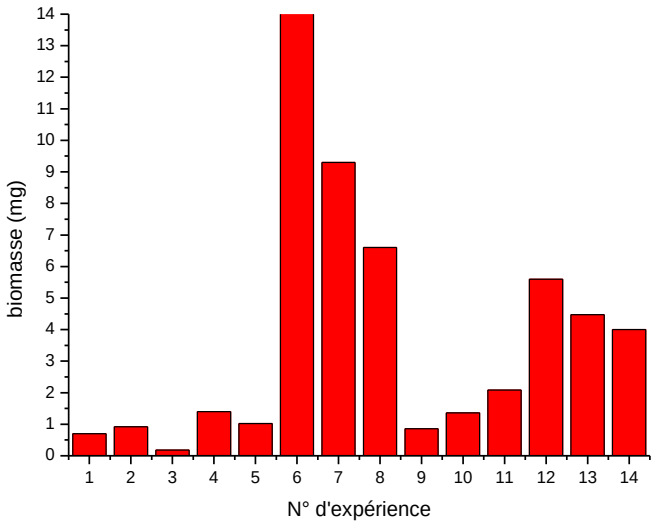
V. 2. 3. Les quantités de la biomasse, la chitine et le chitosane : Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant

Tableau V.1. Les quantités de la masse sèche, chitine et chitosane

N° expériences	La masse Sèche de biomasse (g)	Chitine (mg)	Chitosane (mg)
1	0,7	3.65	0.13
2	0,92	13.2	0
3	0,18	3.33	0.52
4	1,4	1.39	0
5	1,02	11.12	13.26
6	14,9	9.56	30
7	9,3	22.5	3.12
8	6,6	3.92	12.88
9	0,86	3.12	0.40
10	1,36	4.21	0.66
11	2,08	8.67	0.33
12	5,6	4.05	0.26
13	4,47	40.88	2.72
14	4	41.65	4.40

Le tableau V.1 montre que les quantités de la biomasse, de la chitine et du chitosane varient en fonction de la composition du milieu de culture. La figure V.1 montre que l'expérience N°6 a donné la plus grande quantité de biomasse (14,9 g/l) suivi par l'expérience N°7 (9,3 g/l) et l'expérience N°8 (6,6 g/l). L'expérience N°12 a donné 5,6 g/l.

Fig. V.3. La biomasse fongique en fonction des expériences

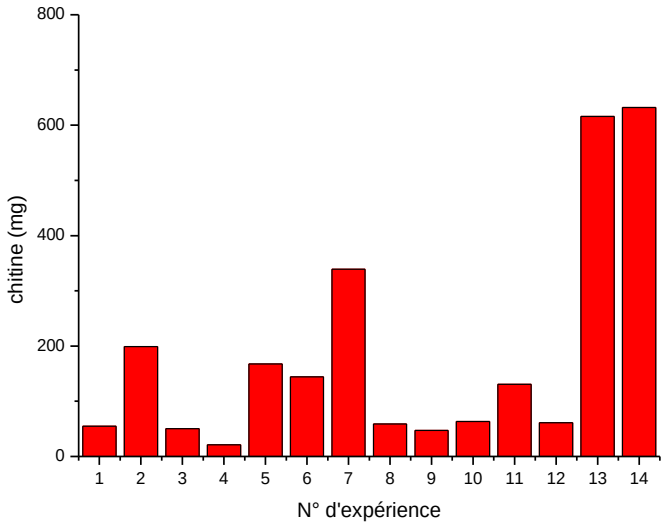


On remarque également que l'expérience N° 13 et N°14 ont donné presque les mêmes quantités de biomasse 4,47 g/l et 4 g/l, respectivement. Ces résultats sont peut être dû à la

composition du milieu de culture (Di Mario et al., 2007) de l'expérience N°6 ($FeSo_4$, oligochitine, $MnSo_4$, aspartate, $CaCl_2$) qui a favorisé la production de la biomasse.

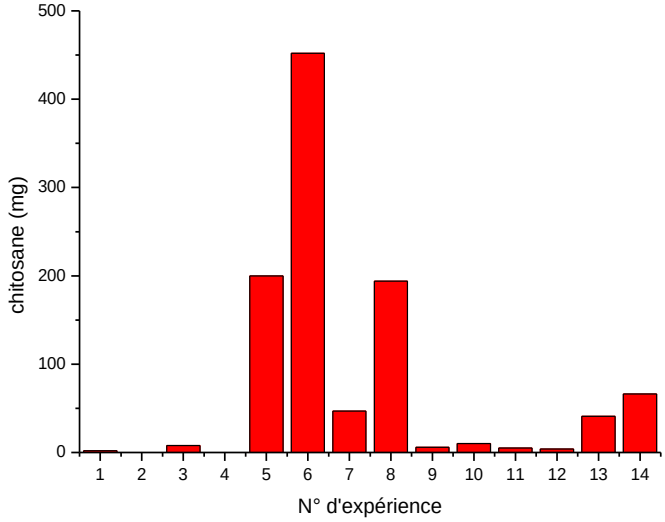
La figure V. 3 présente la quantité de la chitine fongique en fonction des expériences. On remarque que les expériences N° 13 et N°14 ont donné les plus grandes quantités de la chitine 616 mg/l et 632 mg/l, respectivement.

Fig. V.4. La quantité de la chitine fongique en fonction des expériences



On remarque également que les expériences N°7 et N°2 ont donné des quantités de l'ordre de 339 mg/l et 199 mg/l, respectivement.

Fig. V.5. La quantité du chitosane fongique en fonction des expériences



La figure V.5 montre que l'expérience N°6 ($FeSo_4$, oligochitine, $MnSo_4$, aspartate, $CaCl_2$) a donné la plus grande quantité du chitosane de l'ordre de 452 mg/l. On remarque également que les expériences N°5 et N°8 ont donné 199,8mg/l et 194 mg/l, respectivement.

Nos résultats corroborent avec ceux de Hu et al. (2004) qui ont obtenu des quantités du chitosane allant de 8 mg/l en utilisant le champignon *Ashbya gossypii* jusqu'à 646 mg/l en utilisant *A. glauca* (+).

Selon Jaworska et al. (2001), il y a peu de composants qui peuvent influencer l'activité de la chitine synthétase et de la chitine désacétylase. Parmi eux on cite les ions manganèse, ferreux.

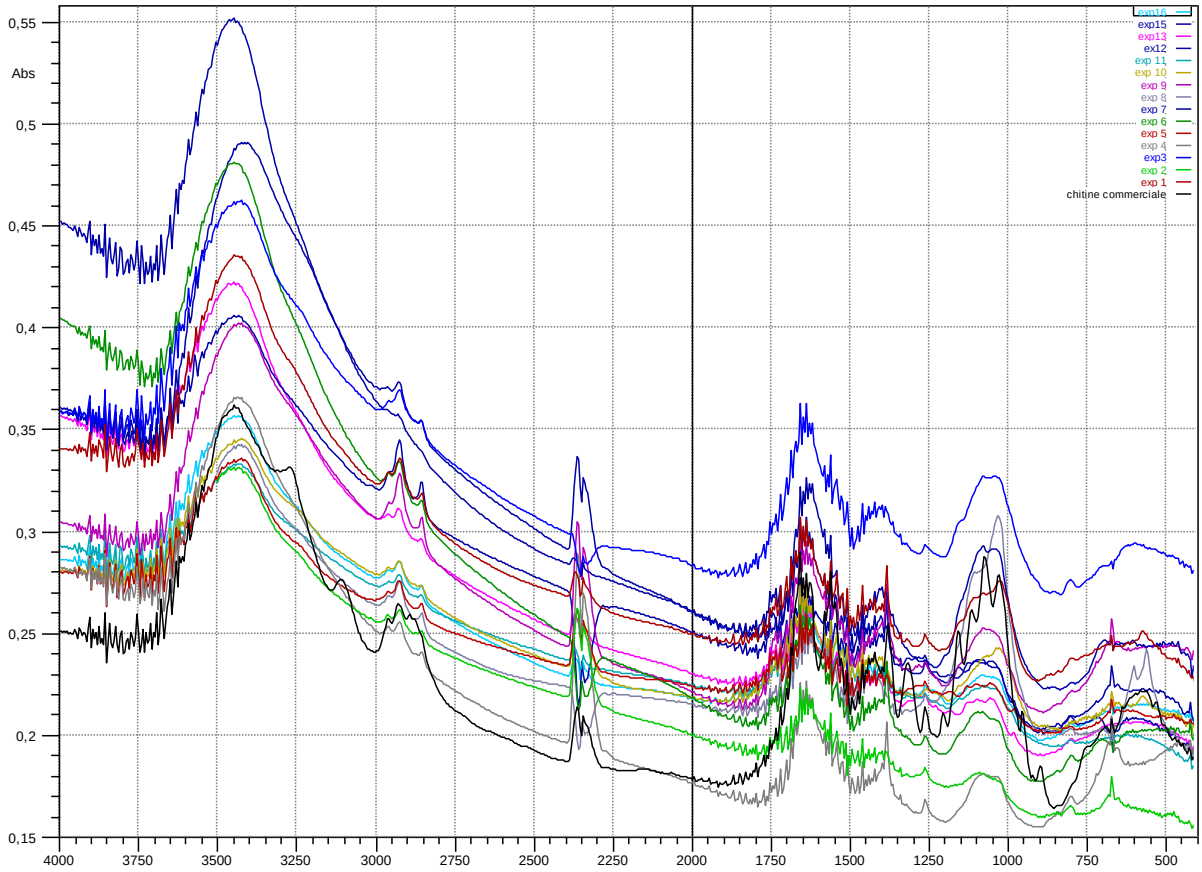
Dans notre travail, la plus grande quantité du chitosane est obtenue dans les conditions de l'expérience N°6 qui contient 0.04 g de $MnSO_4$, 1.4 g de $FeSO_4$ avec un temps d'incubation de 3 semaines ce qui a permis l'augmentation de la biomasse et par conséquent l'augmentation de la quantité du chitosane récupéré dans le milieu.

V.3. Analyse par spectroscopie Infra- rouge

Les techniques de spectroscopie Infra- rouge sont utilisées pour la détermination des groupements fonctionnels permettant de figurer la structure. Chaque liaison présente des vibrations caractéristiques de fréquences bien déterminées. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'une spectroscopie Infra- rouge de type Matison Genes, au niveau du laboratoire d'analyse physico-chimique du Hall de technologie, sur des pastilles de bromure de potassium KBr contenant la biomasse, la chitine et le chitosane. Les spectres obtenus sont présentés ci-dessous.

V. 3. a. Analyse Infra- rouge de la biomasse fongique

Fig. V. 6. Les spectres Infra- rouge des différentes biomasses fongiques



La comparaison des spectres infrarouge des biomasses fongiques (Fig. V. 6) montre l'existence de fluctuations et des différences au niveau des pics d'absorption. Ceci est du à la différence de composition des milieux de culture.

Ainsi la comparaison des différents spectres précédemment cité avec celui de la chitine commerciale (des crabes) (Fig. V.6) nous a permis d'obtenir les résultats présentés sur le tableau V. 2.

Tableau V. 2. Comparaison des biomasses fongiques obtenues avec la chitine commerciale

Chitine commercial	Ex 1	Ex 2	Ex 3	Ex 4	Ex 5	Ex 6	Ex 7	Ex 8	Ex 9	Ex 10	Ex 11	Ex 12	Ex 13	Ex 14
3414.12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3275.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-
3109.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2928.04	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	*	*	-	*
2893.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2534.55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2362.88	-	-	-	-	*	-	*	-	-	-	-	*		-
2345.52	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	*	-	-
1654.98	*	*	*	-	*	*	*	*	*	*	-	-	-	*
1560.46	-	*	-	-	*	-	-	-	-	*	-	-	-	*
1465.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*
1419.66	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	*	*	-	-
952.87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pour nos échantillons, on remarque l'apparition d'une bande à 1654,98 cm^{-1}, pour toutes les biomasses sauf N° 4, 11, 12 et 13, qui correspond à la liaison (C=O) caractéristique de la bande I des amides et un pic à environ 1560,46 cm^{-1}, au niveau des biomasses N° 2, 5, 10 et 13, qui correspond à la liaison (N-H) caractéristique de la bande II des amides.

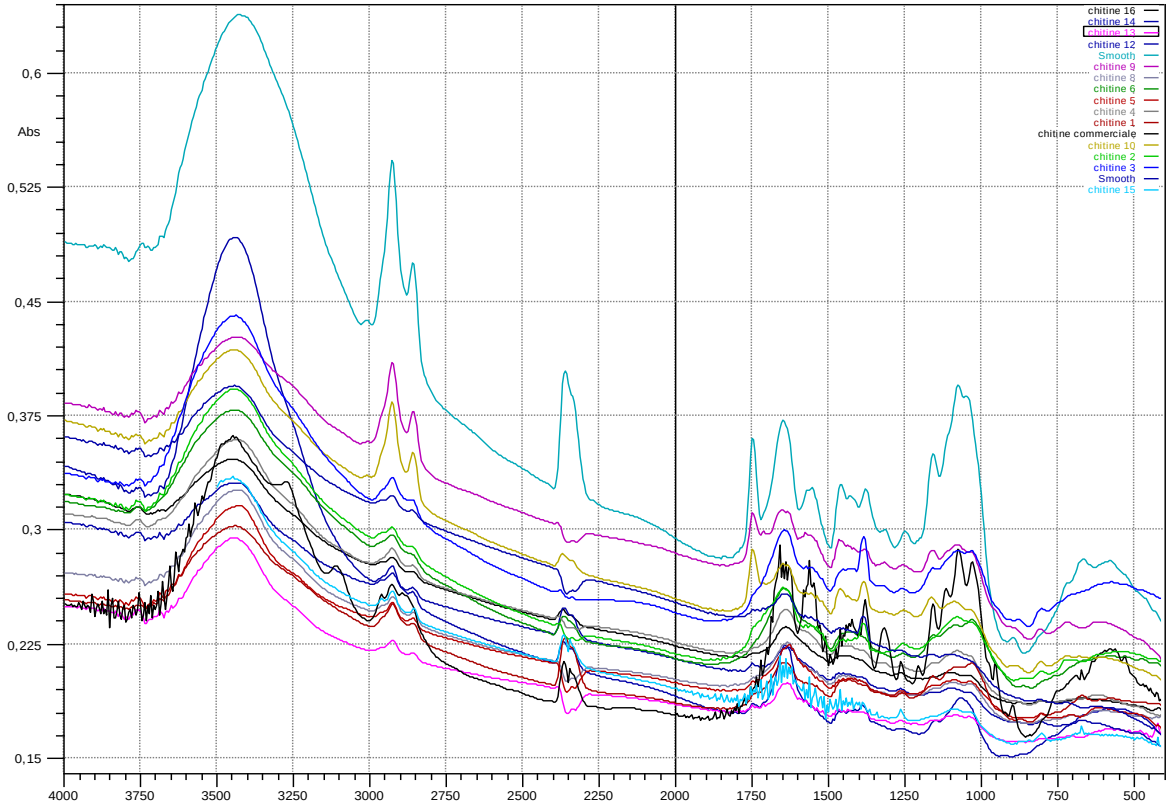
On note, également, l'apparition d'un pic à 2928 cm^{-1}, dans toutes les biomasses sauf N° 7 et 13, qui correspond à une liaison C-H, cette bande est comprise entre 3000 et 2840cm^{-1} selon Zerarka (1994).

L'étude par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de la carapace de la crevette *Parapenaeus longirostris* montre la présence des bandes caractéristiques de la calcite à 2522,7 cm^{-1}, 1458,1 cm^{-1}, 875,6 cm^{-1} et 709,8 cm^{-1}.

Ce résultat montre bien l'importance de l'utilisation de la biomasse fongique car l'absence de calcite nous permet d'éliminer l'étape de déminéralisation qui nécessite un traitement acide du matériau brut en utilisant de grands volume et de forte concentration d'acide tel que HCl qui peut être nuisible pour l'environnement ainsi qu'il contribue à l'augmentation du prix de reviens de la chitine.

V. 3. b. Analyse Infra- rouge de la chitine fongique extraite

Fig. V. 7. Les spectres Infra- rouge des différentes chitines fongiques



L'analyse spectroscopique des chitines récupérées à partir des biomasses cultivées sur les différents milieux de culture montre la présence de différence entre les chitines obtenues.

Tableau V. 3. Comparaison des chitines fongiques extraites avec la chitine commerciale

Chitine commercial	Ex 1	Ex 2	Ex 3	Ex 4	Ex 5	Ex 6	Ex 7	Ex 8	Ex 9	Ex 10	Ex 11	Ex 12	Ex 13	Ex 14
3414.12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3275.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-
3109.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2928.04	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	*	*	-	*
2893.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2534.55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2362.88	-	-	-	-	*	-	*	-	-	-	-	*		-
2345.52	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	*	-	-
1654.98	*	*	*	-	*	*	*	*	*	*	-	-	-	*
1560.46	-	*	-	-	*	-	-	-	-	*	-	-	-	*
1465.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*
1419.66	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	*	*	-	-
952.87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

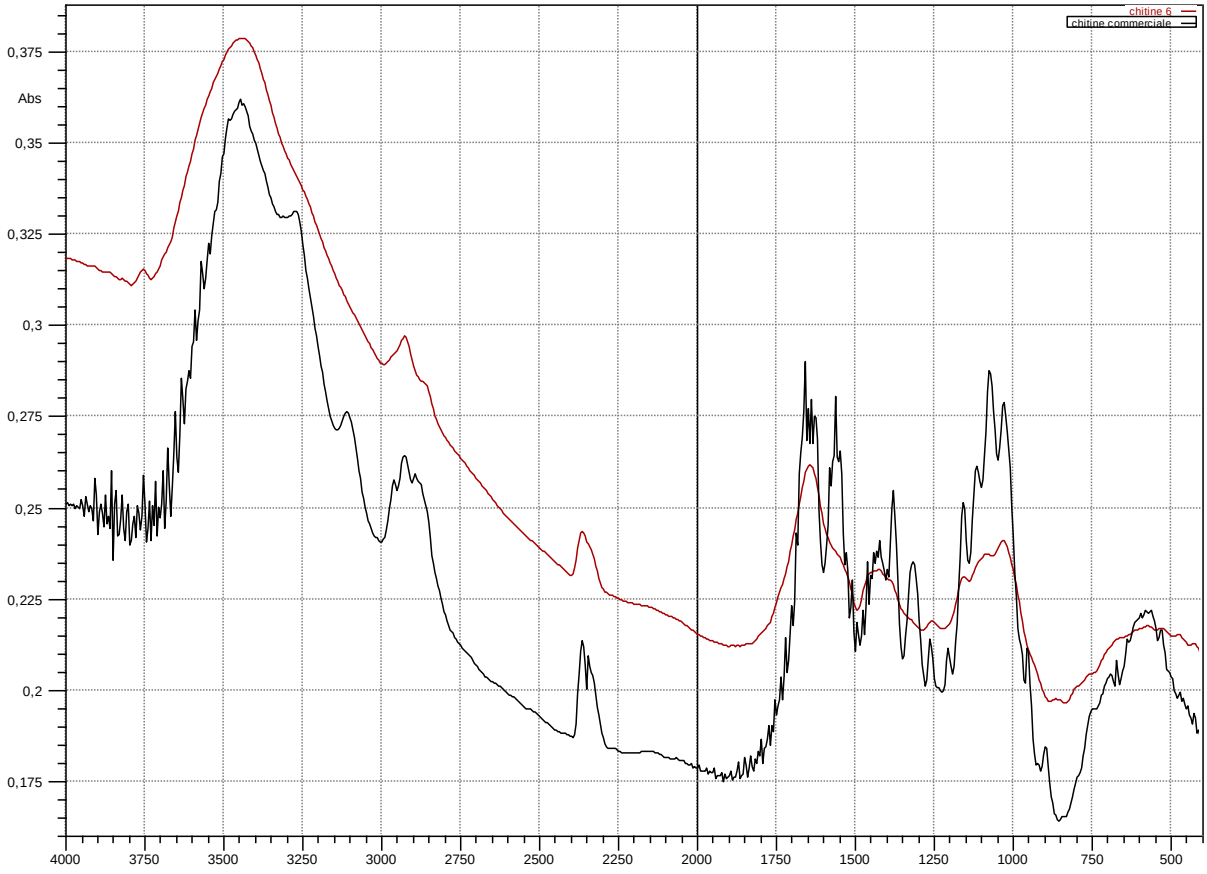
(*) ; les bands qui sont les même, (-) ; les bande qui sont n'est pas les mêmes

Selon la bibliographie, les pics caractéristiques de l'α-chitine sont, amide I 1660 cm^{-1}

[C=O], amide II : 1550 cm^{-1} [NH].

La différence entre l'α-chitine et la β-chitine réside dans la bande correspondante à l'amide I, qui est divisée soit en deux pics à 1654 et 1627 cm^{-1} pour l'α-chitine (Lavall et al., 2007), soit en un seul pic à 1654 cm^{-1} pour la β-chitine. La bande de l'amide II est unique est à 1556 cm^{-1} pour l'α-chitine et à 1560 cm^{-1} pour la β-chitine (Rinaudo, 2006).

Fig. V. 8. Les spectres Infra- rouge de la chitine fongique (N°13 et 14) et la chitine commerciale

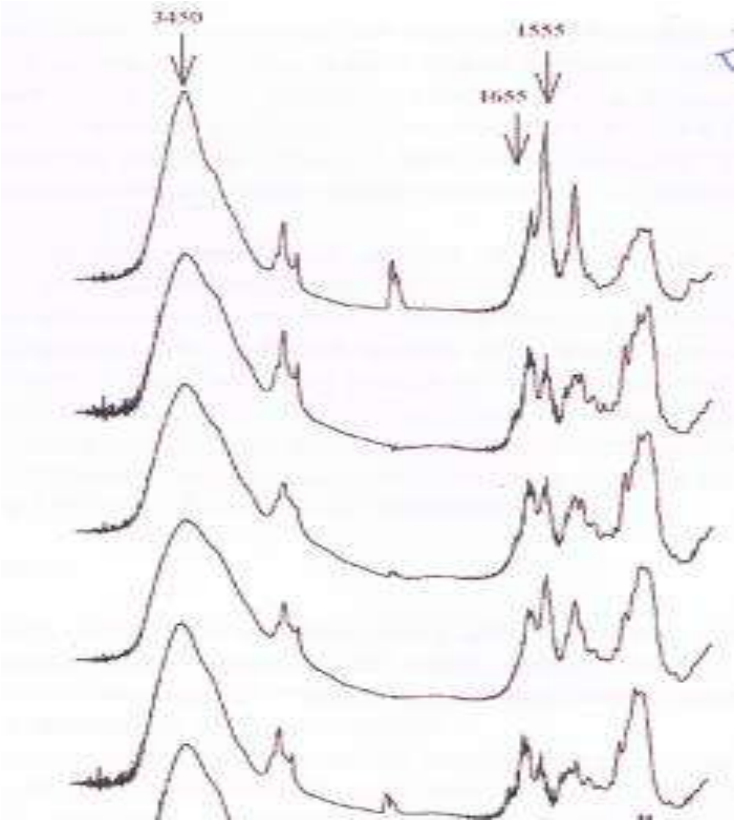


La comparaison des spectres infrarouge de différentes chitines fongiques montrent une similarité avec le spectre de la chitine commerciale (Fig. V. 7). On remarque que les spectres des chitines N°2, N°5, N°10 et N°14 sont caractérisés par des bandes d'absorption à 1654 et 1560cm^{-1}. On remarque également l'absence des deux pics caractéristiques de l'α-chitine à 3275 et 3109 (liaison amide NH) chez toutes les chitines fongiques (β-chitine).

Selon Crini et al. 2009, l'absence de pic à 1540 cm^{-1} montre l'absence des impuretés protéiques ce qui représente la grande pureté de la chitine récupérée.

Ainsi les chitines obtenues dans notre travail présentent une similarité avec les résultats obtenus par Di Mario et coll. 2007 (Fig. V. 9)

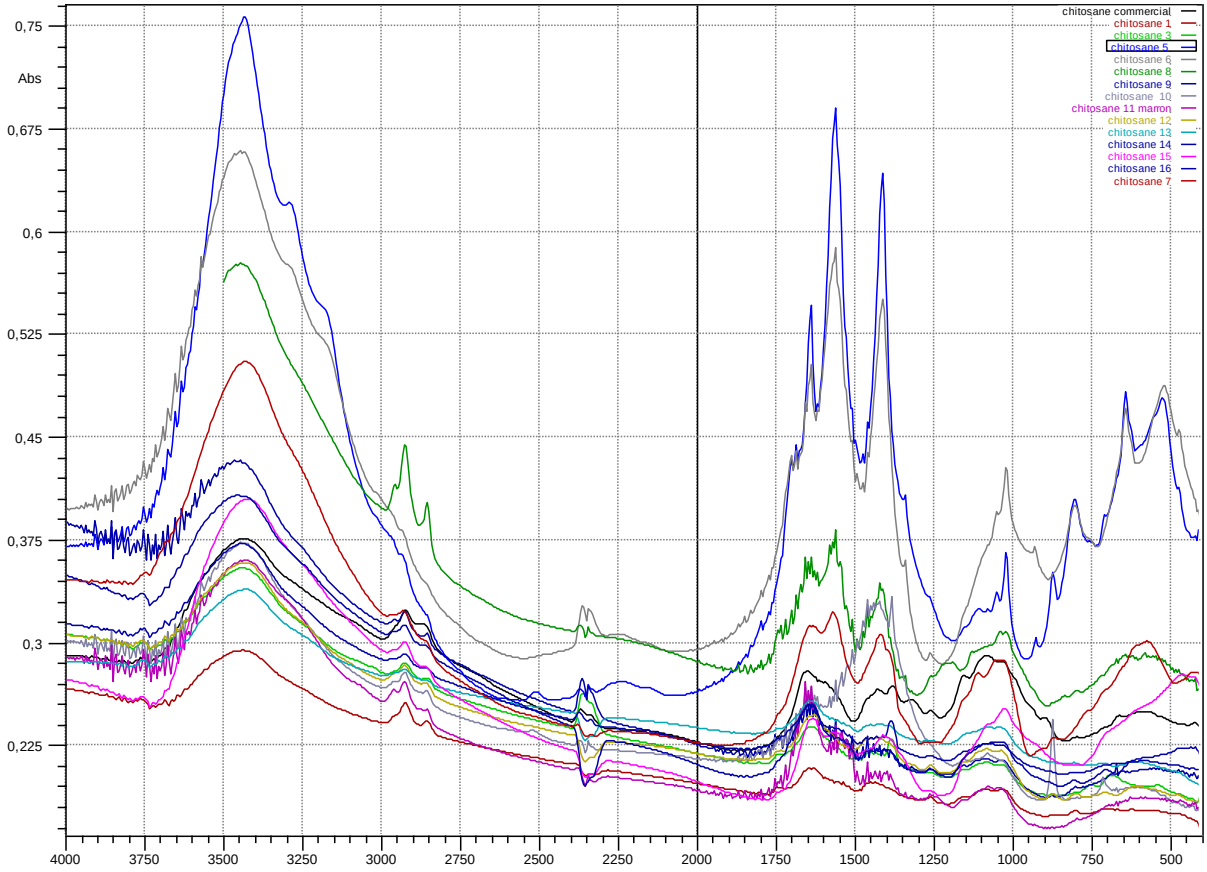
Fig. V. 9. Les spectres Infra- rouge des différentes chitines fongiques obtenues par Di Mario et al. (2007)



V. 3. b. Analyse Infra- rouge du chitosane fongique

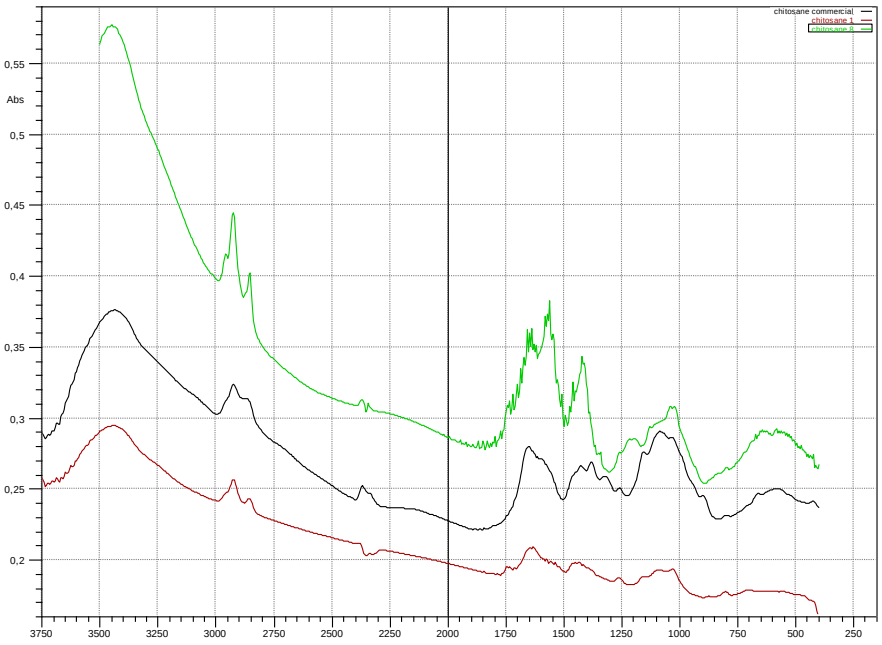
L'analyse par spectroscopie infrarouge des chitosanes récupérés à partir des biomasses fongiques cultivées au cours de notre travail nous a permis d'obtenir la figure V. 10.

Fig. V. 10. Les spectres Infra- rouge des différents chitosanes fongiques



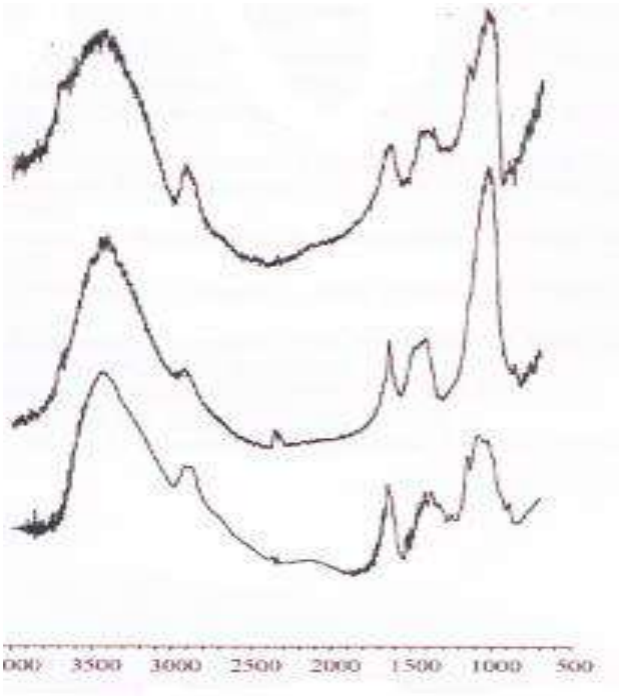
La comparaison de ces spectres avec celui du chitosane commerciale a montré une similarité plus importante entre le chitosane commerciale et la chitosane obtenu à partir des biomasses N° 1 et N° 8 (Fig.V.10).

Fig. V. 11. Les spectres Infra- rouge des chitosanes fongiques (N°1 et N°8) et le chitosane commercial



On remarque que les chitosanes obtenus lors de ce travail ressemblent à ceux obtenus par Di Mario et son équipe (Fig. V. 12).

Fig. V. 12. Les spectres Infra- rouge des différents chitosanes fongiques obtenues par Di Mario et al. (2007)



V. 4. Caractérisation de la chitine et le chitosane obtenus

Les principales caractéristiques de la chitine et le chitosane son le degré d'acétylation (DA) pour la chitine, le degré de désacétylation (DD) pour le chitosne, le poids moléculaire (PM) et le degré de cristallinité. Dans notre travail, on a pu faire seulement le DA et le DD. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

- **Détermination de la DA et DD :**

$$\boldsymbol{DD\%=100-[(\frac{A1560}{A3450}) * 115]}$$

$$\boldsymbol{DA\% = [100 - \frac{\frac{A1320}{A1420} - 0.38}{0.03233}]}$$

Tableau V.3.1 : caractéristique de chitine et chitosane

chitine	DA	Chitosane	DD
1	64,66	1	82,83
2	80,56		
3	80,65	3	82,45
4	78,5		
5	87,04	5	93,11
6	79,25	6	82,7
7	81,41	7	88,16
8	82,73	8	87,78
9	76,37	9	92,86
10	79,8	10	83,99
11	68,93	11	83,66
12	76,75	12	83,7
13	77,02	13	82,25
14	51,02 (53,66)	14	82,74
15	74,82	15	82,37
16	77,84	16	83,22
Chitine commercial	92,38		
Chitosane commercial	DD 81,69		

On remarque que le DA des β-chitines obtenus varie entre 64 et 80%, alors que celui de l'α-chitine (commerciale) est de l'ordre de 92%. Ceci est du peut être au degré de pureté des β-chitines obtenues qui peuvent être liés au des polysaccharides acides et qui représente la

fraction insoluble dans NaOH (Di Mario et al., 2007). Ce qui nécessite peut être un autre traitement pour bien purifier la chitine.

Concernant le chitosane, on remarque que le DD varie entre 82% et 93% (Ex N°5) alors que celui du chitosane commercial est de l'ordre de 81%.

Le taux élevé de DD obtenu avec le chitosane récupéré à partir de la biomasse N°5, est peut être dû à la présence des ions manganèse qui ont joué le rôle d'activateur de l'enzyme chitine désacétylase. Ce résultat nous laisse suggérer que l'augmentation du taux du chitosane est dû non seulement à l'augmentation de la biomasse favorisée par la composition du milieu et le temps d'incubation mais aussi à la présence des ions activateur de la chitine désacétylase qui peut conduire à l'augmentation du taux de chitosane au niveau de la paroi cellulaire du champignon.

L'objectif de ce travail porte sur l'étude de l'influence de la composition du milieu de culture sur les rendements de production de la chitine et du chitosane à partir de *Fusarium culmorum*.

L'utilisation du PDB (bouillon à base de pomme de terre) modifié nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- Le rendement le plus élevé en biomasse (14,9 g/l) a été obtenu avec l'expérience N°6.
- Le rendement le plus élevé en chitine 616 mg/l et 632 mg/l est obtenu avec les expériences N° 13 et N°14, respectivement.
- Le rendement le plus élevé en chitosane (452 mg/l) est obtenu avec l'expérience N°6.

Ces résultats sont peut être dû à la composition du milieu de culture de l'expérience N°6 ($FeSo_4$, oligochitine, $MnSo_4$, aspartate, $CaCl_2$) qui a favorisé la production de la biomasse, grace à la présence des ions Mn^{2+} et Fe^{2+}.

L'analyse de la biomasse, de la chitine et du chitosane fongiques obtenus lors de notre travail a montré que :

- Comparant avec la biomasse marine provenant des crustacés, la biomasse fongique ne contient pas beaucoup de minéraux ce qui réduit les étapes d'extraction de la chitine en éliminant la déminéralisation par un acide fort ce qui peur réduire le prix de reviens de l'extraction.
- La comparaison du spectre de la chitine fongique (β-chitine) avec celui de la chitine commerciale des crabes (α-chitine), nous a permis d'observer une grande similarité entre les deux surtout qu'on a pu remarqué l'apparition des pics caractéristiques de la chitine à 1654 et $1560cm^{-1}$. Comme on a noté l'absence des deux pics caractéristiques de l'α-chitine à 3275 et 3109 (liaison amide NH) chez toutes les chitines fongiques (β-chitine).
- En ce qui concerne le chitosane, la comparaison de ce dernier avec le chitosane commercial a montré une grande similarité entre les deux.

La caractérisation physico-chimique de la chitine et du chitosane obtenus a montré que DA des β-chitines obtenus varie entre 64 et 80%, alors que celui de l'α-chitine (commerciale) est de l'ordre de 92%.

Concernant le chitosane, on remarque que le DD varie entre 82% et 93% (Ex N°5) alors que celui du chitosane commercial est de l'ordre de 81%.

Le taux élevé de DD obtenu avec le chitosane récupéré à partir de la biomasse N°5, est peut être dû à la présence des ions manganèse qui ont joué le rôle d'activateur de l'enzyme chitine désacétylase.

Ce résultat nous laisse suggérer que l'augmentation du taux du chitosane est dû non seulement à l'augmentation de la biomasse favorisée par la composition du milieu et le temps d'incubation mais aussi à la présence des ions activateur de la chitine désacétylase qui peut conduire à l'augmentation du taux de chitosane au niveau de la paroi cellulaire du champignon.

En perspective on propose :

- de faire des études plus approfondies a fin de bien comprendre l'influence réelle de la composition du milieu de culture sur les rendements de la chitine et du chitosane au niveau de la paroi des champignons ;
- faire une modélisation et optimisation de la production de chitine et du chitosane ;
- faire une application simple pour comparer l'efficacité du chitosane fongique par apport au chitosane des crustacés.

Amorim R.V.S., Souza W., Fukushima K. and G.M. Campos-Takaki., 2001. Faster production by Mucoralean strains in submerged culture. Brazilian Journal of Microbiology 32:20-23.

Andrade, V.S., Neto B.B., Souza W., and G.M. Campos-Takaki., 2000. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella élégans*. Canadian Journal of Microbiology 46:1042-1045.

Andrade V.S., Neto B.B., Fukushima K., and G.M. Campos-Takaki., 2003. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by Mucor circinelloides (Mucor javanicus IFO 4570)-A factorial study. Revista iberoamericana de Micologia 20:149-153.

Arcidiacono S. and D.L.Kaplan., 1992. Molecular weight distribution of chitosan isolated from Mucor rouxii under different culture and processing conditions. Biotechnology and bioengineering 39:281-286.

Attila E. Pavlath, Domenic W.S. Wong and George H. Robertson: chitosan (préparation, structure, and Propretés), (2009).

Austin P.R. Chitin solvents and solubility parameters in: chitin and chitosan and related enzymes. Zikakis J.P, ed. Orlando: Academic Press (1984) 227.

Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Peppas N.A., Gurny R. Eur J pharm Biopharm 57(2004) 19.

Blackwell J. chitin in biopolymers. Walton A.G., Blackwell J., eds. New York academic press (1973) 474.

Campos-Takaki G.M., 2005. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In P.M. Dutta (ed), chitin and chitosan Opportunities and Challenges, pp. 69-94. midnapore, India SSM International Publication.

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

Chatterjee S., Chatterjee S., Chartterjee B.P., and A.K Guha., 2008. Enhancement of growth and chitosan production by Rhizopus oryzae in whey medium by plant growth hormones. international journal of Biological Macromolecules 42:120-126.

Crini G. Bioresour Technol 97 (2006) 1061.

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

Darmon S.E., Rudall K.M .Disc Faraday Sok 9 (1950)251.

*D*avoust N., and G. Hansson., 1992. Identifying the conditions for development of beneficial mycelium morphology for chitosan-producing Absidia spp. In submersed cultures. Applied Microbiology and Biotechnology 36:618-620.

Desbriéres J., 2002. actu chim 11/12- 39.

Dutkiewicz J.K., 2002. J Biomedical Mat Res 63- 373.

Focher B., Naggi A., Torri G ., Cosani A .,Terbojevich M.,1992. Carbohydr polym 17- 97.

Franco P., Senso A., Oliveros L., Minguillon C., 2001. J Chromatogr 906- 155.

Gérente C., Lee V.K.C., Le cloirec P., McKay G., 2007. Critical Rev Environ Sci Technol 37 - 41.

Gocan S. J., 2002. Chromatographic Sci 40- 538.

Göksungur Y., 2004. Optimization of the production of chitosan from beet molasses by reponse surface methodology. Journal of chemical Technology and Biotechnology 79:974-981.

Goosen M.F.A., 1997 Applications of chitin and chitosan. Lancaster: Technomic Publishing .

Goycoolea F.M., 2000 . Argüelles-Monal W., Peniche C., Higuera-Ciapara I. Chitin and chitosan-Develop-ments in food science in Novel macromolecules in food systems.

Doxastakis G., Kiosseoglou V., eds., 2000 Amsterdam Elsevier 41 - 265.

Guibal E., 2004 sep Purif Technol 38 - 43.

Hadwiger L.A., Fristensky B., Riggleman R.C., 1984 Chitosan a natural regulator in plant-fungal pathogen interactions, increases crop yields in: Chitin, chitosan, and related enzymes. Zikakis JP, ed. Orlando: Academic Press . 291.

Hudson S.M., Smith C., 1988. In Biopolymers from Renewable Resources. Kaplan D.L,ed. Springer- Verlag. 115.

Hudson S.M, Jenkins D.W., 2003. Chitin and chitosan in: E.P.S.T. Mark H.F, ed. New York Wiley 569.

Jaworska, M.M., and E. Konieczna., 2001. The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus Absidia orchidis. Applied Microbiology and Biotechnology 56:220-224.

Jing S.B., Li. L., Ji. D., Takiguchi Y., Yamaguchi T.,1997. J Pharm Pharmacol 49- 721.

Kafetzopoulos D., Martinou A., and V. Bouriotis., 1993. Bioconversion of chitin to chitosan Purification and characterization of chitin déacétylase from Mucor *rouxii* Proceedings of the National Academy of Sciences 90:2564-2568.

Kas S. J., 1997. Microencapsulation 14- 689.

Kim W.J., Lee W.G., Theodore K., and H.M. Chang., 2001. Optimization of culture conditions and continuous production of chitosan by the fungi, Absidia coerulea. Biotechnology and Bioprocess Engineering 6:6-10.

kurita k., 2006. marine biotechnol 8- 203.

Li P., Zhang J., Wang A., 2006 Prog Chem 18 - 467.

Mario F.D., Rapana P., Tomati U., and E. Galli., 2008. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. International Journal of Biological Macromolecules 43:8-12.

Muzzarelli R.A.A., 1983. Carbohydr Polym 3 - 53.

*Muzzarelli R.A.A., 1985. Chitin in the polysaccharides Aspinall GO, ed. London Academic press 3 - 417.

Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., 2005. chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences in: polysacharides I. structure, characterization and use. Springer. Adv polym Sci 186- 151.

Nadarajah K., Kader J., Mazmira M., and D.C.Paul., 2001. Production of chitosan by fungi. Pakistan Journal of Biological Sciences 4:263-265.

Niederhofer A. and B. W.Müller., 2004. A method for direct preparation of chitosan with low molecular weight from fungi. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57:1001-105.

New N. and W.F. Stevens., 2004. Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation. Process Biochemistry 39:1639-1642.

No H.K., Meyers S.P., 1997. Preparation of chitin and chitosan in: chitin Handbook.

Muzzarelli R.A.A., 1983 Carbohydr Polym 3- 53.

*Muzzarelli R.A.A., 1985 Chitin in: the polysaccharides.Aspinall GO, ed. London: Academic press 3- 417.

No H.K., Meyers S.P., 2000. Rev Environ Contam Toxicol 163 - 1.

Nugraha Edhi Suyatama., 2006. Développement de films biodégradables à base de chitosane: Études du mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation. Thèse de Doctorat, Université de Reims.

Peter M.G. J.M.S., 1995. Pure Appl Chem 32 - 629.

Pochanavanich P., and W Suntornsuk., 2002. Fungal chitosan production and characterization. Letters in Applied Microbiology 35:17-21.

Rabea E.I., Badawy M.E.T., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W., 2003. Biomacromolecules 4- 1457.

Rauch F., Dornish M., 2006. chitosan in: An introduction to biomaterials. Guelcher S.A, Hollinger JO. eds. CRC press 14 - 249.

Ravi Kumar M.N.V., 2000. A review of chitin and chitosan applications, React. Funct, Pol. 46 (1): 1-27.

Rinaudo M., Domard A., 1989. Solution properties of chitosan in: chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. Skjak-Brack G., Anthonsen T., Sandford P.A. eds. London and New York: Elsevier 71.

Rinaudo m., 2006. prog polym sci 31- 603.

Roberts G.A.F., 1992. Chitin chemistry. London: MacMillan .

Rouget C., 1859. Des substances amylacées dans le tissue des animaux, spécialement les articules (chitine). Compte rendus 48.

Rungsardthong V., Wongvuttanakul N., Kongpien N., and P. Chotiwaranon., 2006. Application of fungal chitosan for clarification of apple juice. Process Biochemystry 41:589-593.

Sandford P.A., 1989. Chitosan commercial uses and potentials in: chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. Skjak-braek G, Anthonsen T, sand- ford PA, eds. London and New York Elsevier 51.

Sandford P.A., 2003. Commercial sources of chitin and chitosan and their utilization in: Advances in chitin science.varum K.M., Domard A., Smidsrodo, eds. Trondheim N.T.N.U 6-35.

Sano H., Shibasaki K., 2003. Bull Tokyo Dent Coll 44- 9.

Shi C., zhu Y., Ran X., Wang M., su Y., cheng T.J., 2006. surgical Research 133 - 185.

Shigemasa Y., Matsuura H., Sashiwa H., Saimoto H., 1996. Int Biol Macromol 18 - 237.

Shimahara K., Takiguchi Y., Kobayashi T., Uda K., and T.Sannan., 1989. Screening of mucoraceae strains suitable for chitosan production. In G Skjak-Brack., T. Anthonsen, and P Sandford (eds)., Chitin and chitosan p.p.171-178. London,U.K: Elsevier Applied Science.

Sorlier P., Denuziére A., viton C., Domard A., 2001. Biomacromolecules 2- 765.

Stamford T.C.M., Stamford T.L.M., Stamford N.P., Neto B.B., and G.M.Campos-Takaki., 2007. Growth of Cunninghamella élégans UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. Electronic Journal of Biotechnology 1:61-68.

Struszczyk M.H., 2002. Polimery 47 - 316.

Suntornsuk W., Pochanavanich P., and L. Suntornsuk., 2002. Fungal chitosan production on food processing by- products. Process Biochemistry 37:727-729.

Tan S.C., Tan T.K., Wong S.M., and E Khor., 1996. The chitosan yield of Zygomycetes at their optimum harvest time. Carbohydrate Polymers 30:239-242.

Tripathi P., Dubey N.K., 2004. Postharvest Biol Technol 32 - 235.

Wu T., Zivanovic S., Draughon F.A., Canway W.S., and C.E.Sams., 2005. Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:3888-3894.

Yoshihara K., Shinohara Y., Hirotsu T., and K Izumori., 2003. Chitosan productivity enhancement in Rhizopus oryzae YPF-61 A by D-Psicose. Journal of Bioscience and Bioengineering 95:293-297.

Zamani A., Edebo L., Sjostrom B., and M.J.Taherzadeh., 2007. Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of Zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. Biomacromolecules 8:3786-3790.

Zhang Y., Xue C., Xue Y., Gao R., Zhang X., 2005.Carbohydr Res 340 - 1914.