

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهينة الساحل  
Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



*Mémoire en vue de l'obtention du*  
Diplôme d'Ingénieur en Sciences de la Mer  
Option : Aquaculture

Thème :

**Mise au point d'un protocole d'extraction assistée aux  
micro-ondes du chitosane à partir de carapaces de  
crevettes**

*Présenté par :*

BELMAHDI Mossaab

CHEGGA Mohamed

Soutenu le :            devant le jury :

M. DJEGHRI  
Mme BACHARI-HOUMA  
M. BOUBECHICHE  
M. HAMDI. B

Professeur  
Professeur  
Maître Assistante A  
Professeur

Présidente  
Examinatrice  
Examineur  
Encadreur

**Promotion 2014**

## **Remerciements**

*Avant de commencer la présentation de ce travail, On profite de l'occasion pour remercier toutes les personnes qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail de fin d'étude*

*En premier lieu, On tiens à remercier ALLAH le tout puissant pour nous 'avoir donné la force et la volonté à finaliser ce travail.*

*Nous adresse mes plus vifs et chaleureux remerciements à : Madame DJEGHRI-HOCINE Baida, Professeur à l'ENSSMAL, Madame BACHARI-HOUMA Fouzia Professeur à L'ENSSMAL, Madame BOUBECHICHE.Z Maitre assistant A Maitre assistante A , pour avoir accepté de participer à ce jury de mémoire de Master. nous sommes sure que vos conseils ainsi que vos vastes connaissances scientifique Nous seront plus qu'utiles.*

*Nous remercions vivement à Monsieur HAMDI Boualem pour son encadrement, ses critiques constructives, son regard méthodique et surtout sa patience pour nos rendre plus rigoureuse.et pour son thème qui est très pertinent.*

# Sommaire

Liste des tableaux .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des Abréviations.....	III
Introduction.....	1

## Chapitre I : Revue Bibliographique

<b>I- GENERALITE SUR LA CREVETTE.....</b>	<b>13</b>
I-1 Descriptions générale (crevette cible) .....	13
I-2 Systématique.....	13
I-3 Caractères morphologique.....	14
I-4 Cuticule de la crevette .....	14
I-5 Répartition de l'espèce en Algérie .....	15
I-6 La pêche de l'espèce en l'Algérie.....	16
I-7 Evolution du marché sur les crustacés.....	16
I-8 Valorisation des déchets sur les crustacés .....	17
<b>II- GENERALITE SUR LA CREVETTE .....</b>	<b>18</b>
II-1 Historique .....	18
II-2 Définition générale .....	18
II-2-1 L'organisation de la chitine dans la cuticule de crustacés.....	19
II-2-2 Les caractéristiques biochimiques et physicochimique de la chitine et ses dérivés .....	21
II-3 Procédé d'extraction de la chitine.....	22
II.3.1 Technique chimique.....	22
II.3.1.1 Déminéralisation .....	22
II.3.1.2 Déprotéinisation .....	23
II.3.1.3. Blanchiment.....	23
II .3.2 Technique biologique .....	23

II.3.2.1 Déprotéinisation et Déminéralisation enzymatique .....	24
II.4 Le chitosane .....	25
II.4.1 Structure de chitosane .....	26
II.5 Technique de transformation de la chitine en chitosane (désacétylation) .....	27
II.5.1 La désacétylation par voie chimique .....	27
II.5.2 La désacétylation par voie biologique .....	27
II.6 Propriétés physico- chimiques de la chitine et du chitosane .....	28
II.6.1 Degré désacétylation(DA).....	28
II.6.2 Solubilité .....	28
II.6.3 Poids moléculaire.....	28
II.7 Les applications de la chitine et du chitosane .....	29

<b>Chapitre II : Matériels et méthodes</b>
--

<b>I-Introduction.....</b>	<b>33</b>
<b>II- Matériel et appareillage.....</b>	<b>33</b>
II-1 Produits chimiques et matière première utilisés.....	33
II-2 Petit matériels.....	33
II-3 Appareillage .....	34
II-4 Co-produits de crevette.....	34
II-4-1 Sources de la carapace .....	34
II-5 Prétraitement des carapaces .....	35
II-5-1 Lyophilisation .....	35
II-5-2 Broyage .....	36
II-5-3 Tamisage.....	36
<b>III- Étapes d'extraction et d'isolation de la chitine et du chitosane.....</b>	<b>37</b>
III-1 Déminéralisation.....	37
III-2 Préparation de la solution de HCl.....	37
<b>IV- Mise au point d'un système de déprotéinisation et de Desacétylation assisté par micro-onde.....</b>	<b>39</b>
<b>V Caractérisation.....</b>	<b>43</b>
V- 1 Caractérisation des carapaces de crevette broyées.....	43

V-1-1	Caractérisation physico-chimique et chimique.....	43
V-1-1-1.	Humidité.....	43
V-1-1-2.	Teneur en cendres.....	44
V-1-1-3.	Teneurs en lipides.....	44
V-2	Détermination du degré de désacétylation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) .....	45
V-2-1	Principe.....	45
V-2-2	Analyse cristallographique des échantillons chitineux.....	46
V-3	Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	46

<b>Chapitre III : Résultats et discussions</b>
--

<b>I-CARACTERISATION DE LA CARAPACE DE CERVETTES BROYEES.....</b>	<b>49</b>	
<b>II – CINETIQUE DE DEPROTENEISATION DE LA CHITINE .....</b>	<b>49</b>	
<b>III- CARACTERISATION DU CHITOSANE.....</b>	<b>50</b>	
III-1	Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage.....	50
III-2	Caractérisation par diffractométrie aux RX.....	51
III-3	Caractérisation par spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier.....	53
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>57</b>	

**I- liste des tableaux :**

Tableau I: capture de <i>Parapenaeus longirostris</i> en fonction des années.....	13
Tableau 2: sources potentielles de chitine (Tolaimate et al.,2003).....	19
Tableau 3 : Les applications de la chitine et du chitosane. (Grégorio Crini , 2007) .....	30
Tableau 4 : la partie expérimentale de la Déminéralisation.....	38
Tableau 5: la partie expérimentale de nouveau procédé déprotéinisation et désacétylation.....	42
Tableau6 : Caractéristiques de la Microscopie Electronique à Balayage (Faerber, 2004).....	47
Tableau 7: tableau représente les différentes valeurs obtenues.....	49
Tableau 8 : Indice de cristallinité des chitosanes préparés.....	53
Tableau 9 : principaux bandes IR caractéristiques du chitosane préparé.....	54

**II- liste des figures :**

Figure 01: schéma général d'une crevette en vue latérale gauche (Lucie Berger, 2009) .....	14
Figure 02 : dessin d'une coupe transversale du tégument de crustacé d'après (Valiègue J, 2001-2002).....	14
Figure 03 : dessin de coupe transversale de l'epicuticule (Valiègue J, 2001-2002).....	15
Figure 04 : Production de crevette dans le monde répartition Entre la pêche(P) et l'aquaculture (A). FAO 2006.....	17
Figure 05 : Répartition des Pénéides élevées en Aquaculture dans le monde, FAO.2010.....	17
Figure 06: Structure chimique de la chitine (Nugraha edhi suyatama, 2006).....	19
Figure 07: Niveaux hiérarchiques dans l'organisation de la cuticule de crabe <i>H. americanus</i> (Raabe, 2005).....	20
Figure 08 :Structure en «nid d'abeille» de cuticule homard CT par MEB (a) (Pillai,2009) (b) Raabe,2006).....	21
Figure 09 : Arrangement des trois formes existantes de chitine : $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ (Einbu 2007).....	21
Figure 10: structure chimique du chitosane (Nugraha edhi suyatama, 2006).....	26
Figure 11: restaurant « Dalia » (Daily Brahim, Wilaya d'Alger).....	34

Figure 12 : la crevette <i>Parapenaeus longirostris</i> .....	35
Figure 13: Lyophilisateur de laboratoire.....	36
Figure 14: Tamis en INOX de la colonne vibrante.....	38
Figure 15 : Bain marie muni d'un agitateur mécanique (déroulement de la déminéralisation).	
Figure 16 : la poudre des carapaces déminéralisées.....	39
Figure 17 : le nouveau dispositif utilisé pour la production du chitosane.....	40
Figure 18 : Extraction assistée par micro-onde.....	41
Figure 19 : le ballon en verre en dedans d'une micro-onde.....	42
Figure 20 : poudre de chitine désacétylé avec nouveau procédé.....	43
Figure 21 : taux d'élimination de l'azote pour une concentration de Na OH 1.5 N à deux Puissances 450 Watts et 600 Watts.....	49
Figure 22 : taux d'élimination de l'azote pour deux concentrations de Na OH 7.5 N et 10N à deux puissances 450 Watts et 600 Watts.....	50
Figure 23 : Observation par MEB de l'échantillon du chitosane à différents agrandissements.	
Figure 24: diffractogramme des RX des chitosanes préparés .....	51
Figure 25: spectre IR de du chitosane préparé avec du NaOH 10N à une puissance 800Watts.....	52
Figure 26 : Evolution du degré de désacétylation en fonction de la durée de contact.....	55

### III- liste des formules :

(I) Enlèvement des molécules de carbonate de calcium.....	37
(II) Equation de la dilution.....	37
(III) Equation de la teneur en l'humidité.....	44
(IV) Equation de la teneur en cendre.....	44
(V) Equation de la teneur en lipides totaux.....	45
(VI) Equation de la transmittance .....	46
(VII) Le pourcentage d'absorption.....	46
(VIII) Equation d'absorption.....	46
(VIII) Loi de Beer-Lambert.....	46
(X) Indice de cristallinité.....	53

## Des Abréviations

<u>Single/Acronyme</u>	<u>Définition</u>
AFNOR	Agence Française de NORmalisation
DD	Degré de désacétylation
DA	Degré d'acétylation
FTIR	Spectroscopie Infra Rouge à transformée de Fourier
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
DPRH	Direction de la pêche et des ressources halieutique
IR	infrarouge
RMN	résonance magnétique nucléaire
PH	Potentiel hydrogène

# Introduction

## Introduction

Avec une production totale de plus de 6 millions de tonnes, la crevette constitue le produit le plus valorisé sur le marché mondial des produits de la mer, pêche et aquaculture. Destinée en sa totalité à l'alimentation humaine, la partie comestible représente près de 60% du poids de la crevette entière. Une grande partie de la production fait alors l'objet d'une transformation industrielle telle que l'étêtage et le décorticage. Cette transformation génère des co-produits (têtes, carapaces et queues) dont le devenir pose des problèmes aux industriels. La majeure partie est rejetée, soit directement dans l'environnement, ce qui présente des risques de pollution et de santé ; soit par incinération sans récupération de chaleur. Les solutions actuelles de la gestion des déchets de crevettes issus de l'industrie agroalimentaire sont multiples. Certaines entreprises préconisent tout simplement l'enfouissement ou la calcination. Cette façon de procéder est coûteuse, car il faut souvent faire appel à une entreprise externe, et est écologiquement reprochable. Une autre façon, permettant de gérer les résidus de crevette, est leur transformation en compost. Cette façon de procéder, moins polluante, n'amène néanmoins que très peu de revenus à l'entreprise, voir aucun. La transformation des carapaces de crevettes en farine pouvant être utilisée dans l'alimentation animale est une autre méthode de recycler les rejets. Mais cette transformation est coûteuse, peu rentable et donc peu utilisée. En dernier recours, l'usine rejette ses déchets directement à la mer engendrant une pollution organique non-désirée.

La valorisation des déchets de crevette par récupération de la chitine est une autre voie qui semble être plus profitable, car ce composé peut être transformé en chitosane qui possède une bonne valeur commerciale

La chitine est une fibre naturelle qui se retrouve en grande quantité dans les déchets de biomasse marine tels les carapaces de crustacés. En Algérie, plusieurs tonnes de déchets de ce type sont générées annuellement. Dans sa forme originale, la chitine n'est d'aucune utilité. Toutefois, après transformation, elle trouve des applications intéressantes dans divers domaines tels la pharmacologie et l'environnement.

La valorisation des co-produits permettrait, en plus du respect de l'environnement, de maximiser le profit des entreprises. Elle consiste à les transformer de façon à ce qu'ils deviennent des matières premières ou des matières intermédiaires pour la production d'autres produits.

La chitine est une substance naturelle, abondante et renouvelable qui possède tous les atouts pour servir de base à une filière de diversification industrielle. Elle-même, mais surtout ses dérivés, à commencer par les chitosanes, renferment des propriétés à ce point intéressantes que d'aucuns n'ont pas hésité à présenter comme la substance du 31<sup>ème</sup> siècle. En effet, la chitine et ses dérivés sont des biopolymères naturels biodégradables, antibactériens,

antifongiques, antiviraux, non toxiques et non allergéniques. Et s'agissant des chitosanes, s'ajoutent à cette liste un effet cationique et la solubilité en système aqueux.

Malheureusement, à ce jour, la chitine et les chitosanes sont loin d'avoir tenu leurs promesses, aussi bien sur le plan commercial que sur le plan industriel, alors que semblaient se dessiner devant eux d'importants marchés dans des secteurs porteurs : médecine, alimentation, cosmétologie.

Le problème réside dans la qualité non homogène et non reproductible des chitosanes proposés.

Pour produire la chitine et le chitosane, plusieurs procédés sont utilisés à l'heure actuel :

- Procédé chimique,
- procédé biologique,...

Dans notre étude, nous comptons utiliser le procédé chimique assisté par micro-ondes. Etant donné, que nous ne disposons pas du dispositif dans notre école, notre travail consiste en premier la fabrication du système avec toutes ses composantes :

- Modification d'un four à micro-onde
- Système de réfrigération
- Réservoir d'eau avec pompe à eau

Ce système sera utilisé par la suite pour la déprotéinisation et la désacétylation de la chitine d'une manière simultanée pour l'obtention d'un chitosane avec une grande valeur ajoutée.

L'effet des micro-ondes sera testé sur la vitesse de déprotéinisation de la chitine et le degré de désacétylation.

Notre étude est composée de 03 chapitres :

Chapitre I : Recherche bibliographique sur le thème

Chapitre II : Matériel et méthodes

Chapitre II : Résultats et Discussion

# Chapitre I

## RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

### I- GENERALITE SUR LA CREVETTE :

#### I-1 Descriptions générale (crevette cible) :

*Parapeaneus longirostris* (Lucas, 1846), appartenant un grand groupe des pénéides est nommé des crevettes roses du large par la FAO, elle représente l'une de plus commune espèce de la pêche méditerranéenne (Ragonese et al, 2006 in Benkabouche, Bekadja, 2009). Sa capture au niveau mondial en fonction des années est présentée dans le tableau I

Tableau I: capture de *Parapeneus longirostris* en fonction des années

Année	Capture (tonnes)
1965	12700
1975	18099
1985	39896
1995	15833
2005	19938

*Parapeaneus longirostris* appartient, parmi les crustacés, à l'ordre des Décapodes Natania et à la famille des Pénéides, cette crevette est désignée par *deep-water pink shrimp* en Angleterre, *Gamba d'altura* en Espagne, et crevette rose du large en France. En Algérie, elle est communément appelée *crevette blanche*.

#### I-2 Systématique

- Règne:.....Animal
- Embranchement:.....Arthropodes (Latreille, 1829)
- Sous Embranchement:..... Crustacés (Brünnich, 1772)
- Classe :.....Malacostracés (Latreille, 1802)
- Ordre :.....Décapodes (Latreille, 1802)
- Famille:..... Pénéides Rafinesque-Schmalt, 1815
- -Genre:.....Parapeneus Smith, 1885
- -Espèce:.....*Parapeneus longirostris* (Lucas,1846)

### I-3 Caractères morphologiques

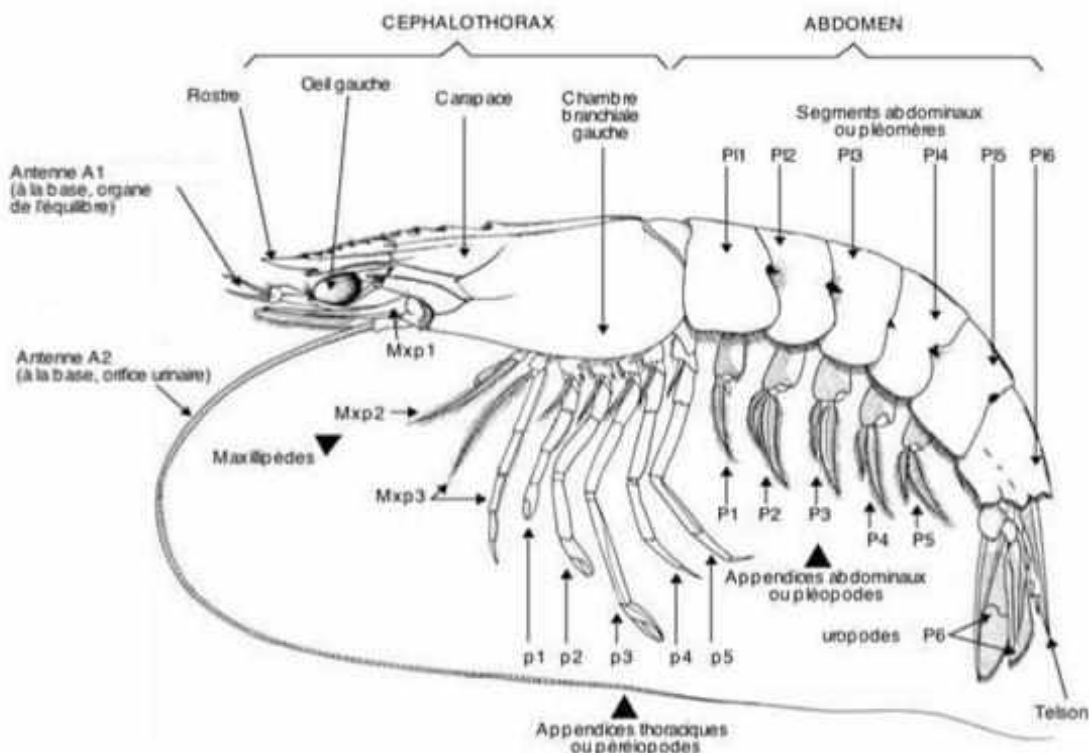


Figure 01: schéma général d'une crevette en vue latérale gauche (Lucie Berger, 2009)

### I-4 Cuticule de la crevette

Tous les Arthropodes possèdent un revêtement externe sécrété par l'épiderme, la cuticule, qui est continue et qui tapisse toutes les formations d'origine ectodermique.

La cuticule constitue soit des plaques rigides, les sclérites, soit des zones souples, les membranes articulaires, qui unissent les sclérites et permettent les mouvements. Elle comprend 2 parties distinctes (elles-mêmes subdivisées en plusieurs souches) : l'épi-cuticule et la pro-cuticule (figure 2).

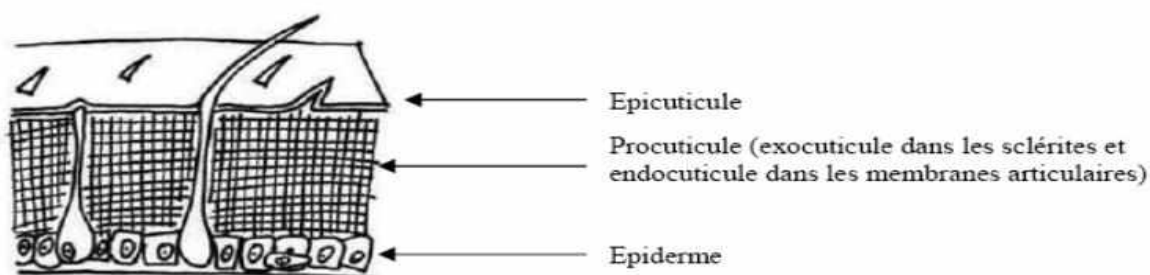


Figure 02 : dessin d'une coupe transversale du tégument de crustacé d'après (Valiergue J, 2002).

Elle est traversée par les canaux excréteurs des glandes épidermiques et par les canalicules poraires, très nombreux et très fins ( $0,1\mu\text{m}$ ) qui partent des cellules épidermiques et se ramifient en canaux ciriers dans la couche externe (figure 3)

L'épi-cuticule : elle est mince et ne renferme pas de chitine ; elle est formée de 3 couches secrétées par des types cellulaires distincts : le ciment de composition mal connue (polysaccharides et lipides) secrété par les glandes épidermiques, une couche de cires mélange de cérides et d'hydrocarbures très hydrophobes secrétés par les oenocytes grâce aux canalicules poraires et l'épi-cuticule s.s, première couche secrétée par les cellules épidermiques au moment de la mue; formée de lipoprotéines tannées (réunies par des ponts quinoniques).

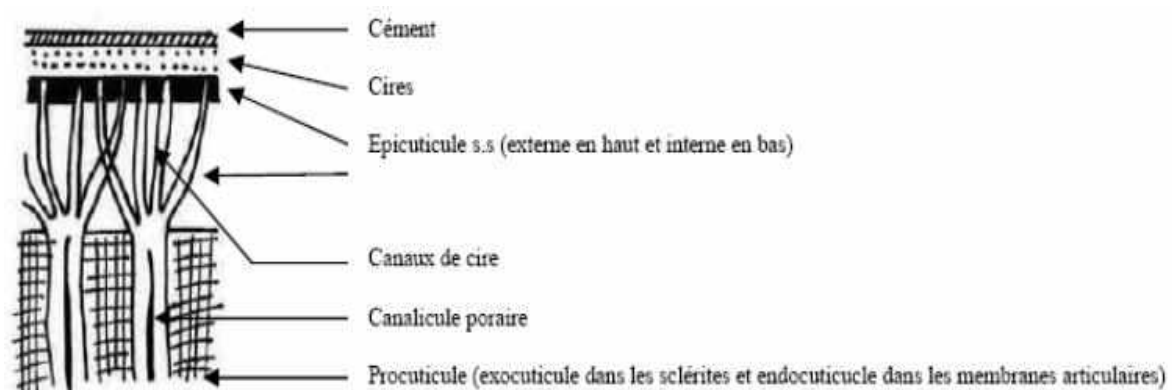


Figure 03 : dessin de coupe transversale de l'épicuticule (Valiergue J,2002).

Pro-cuticule plus épaisse, perméable, secrétée par les cellules épidermiques ; elle renferme des chaînes de chitine (polymère linéaire de (1-4)-N-acétylglucosamine, rectiligne grâce aux liaisons hydrogènes intra-chaînes), regroupées en fibrilles par des liaisons hydrogènes inter-chaînes, associées à une matrice protéique et à des sels minéraux (carbonates et phosphates de calcium ou magnésium).

Exo-cuticule rigide et colorée, présente dans les sclérites, mais absente dans les membranes articulaires ; sa rigidité est due au tannage (pontage par des quinones) des protéines de la matrice (sclérotines) et à sa minéralisation importante chez les crustacés.

Endo-cuticule souple et incolore, présente partout et seule au niveau des membranes articulaires ; sa souplesse est liée à l'absence de tannage des protéines (arthropodines) qui forment la matrice autour des fibrilles de chitine (Grassé PP et Forest J, 1994)

## I-5 Répartition de l'espèce en Algérie

*Parapenaeus longirostris* est présente sur l'ensemble des cotes algériennes entre 150 et 400 mètres avec une plus grande abondance dans la région de Bougie

(Maurin, 1962 in Mémoire Magister LHTIHET MERAH Houda), Elle est la forme la plus dominante de l'Ouest algérien entre 200 et 400 mètres de profondeur. (Gruval, 1926 in Mémoire Magister LHTIHET MERAH Houda).

### **I-6 La pêche de l'espèce en Algérie**

En Algérie, les captures des crustacés sont composées de 90 % de crevettes selon les statistiques officielles des services de pêche (DPRH, 2007 in benkabouche-bekadja et al., 2009). Si parmi les crevettes, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) prend la première place avec 76% de la production totale de crevettes (Nouar, 1985 In kabouche\_ Bekadja et al., 2009) d'autres espèces, d'après les campagnes expérimentales, effectuées en février 2003 et 2004 le long de la côte algérienne sont, par leur qualité et leur abondance susceptibles d'intérêt, c'est le cas de *Parapenaeus longirostris* (LuCO, 1846) Elle représente une des plus communes espèces de la pêcherie méditerranée (Ragonese, Bianchini, 2006 In Benkabouche- Bekadja et al 2009) sur le plan biologique et de la pêche, les travaux concernant la crevette blanche d'eau profonde, sont peu nombreux et les données sont fragmentaires.

### **I-7 Evolution du marché sur les crustacés**

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 (figure 04).

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.

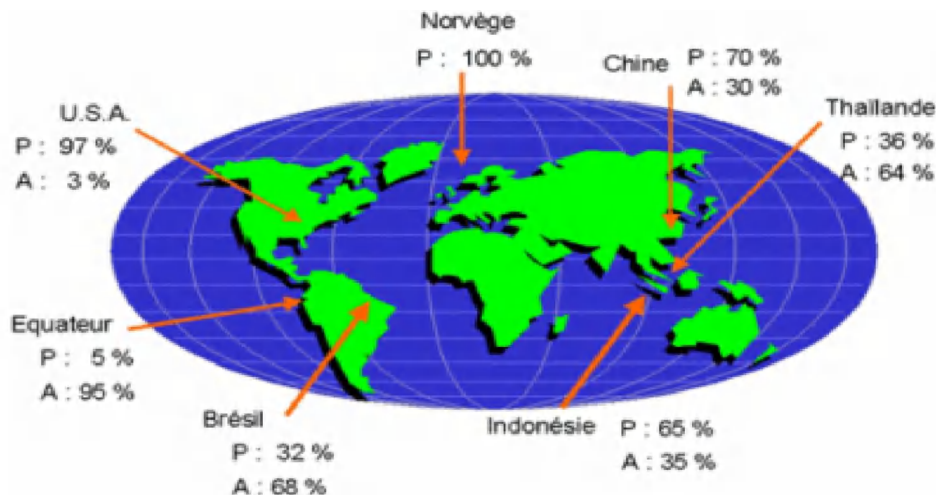


Figure 04 : Production de crevette dans le monde répartition  
 Entre la pêche(P) et l’aquaculture (A). FAO 2006

L’une des espèces de crevette les plus commercialisées est la crevette tropicale, dite crevette à patte blanches, *Penaeus vannamei*. 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 (figure 05). La consommation de *P. vannamei* est très prisée. Elle a augmenté de 58 % en Asie et de 211 % en Amérique latine entre 2001 et 2006.

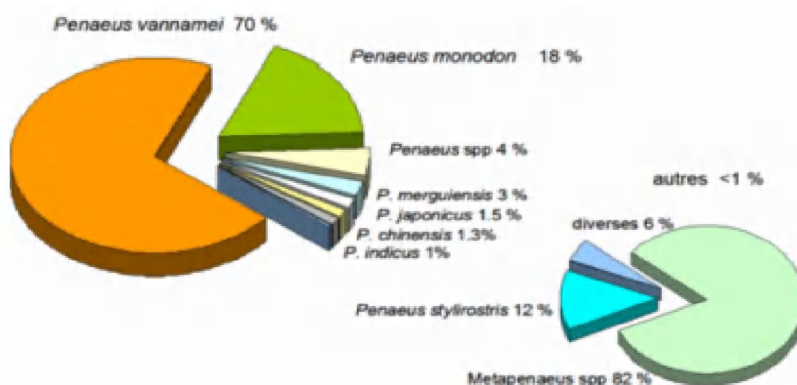


Figure 05 : Répartition des Pénéides élevées en Aquaculture dans le monde, FAO.2010

### I-8 Valorisation des déchets de crustacés

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 (le roux ,2012).

## II- GENERALITE SUR LA CHITINE

### II-1 Historique

En 1811, le professeur Henri Braconnot, directeur du jardin biologique à Nancy (France) a isolé une substance fibreuse d'un certains type de champignons. De plus, il a observé que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses acides. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (coléoptères) et a été ensuite nommé chitine (provient du mot grec «kitos» qui signifie l'enveloppe).



En 1859, Pr. C.rouget a soumet la chitine à un traitement alcalin et a observé les différentes solubilités de la chitine.la substance, résultat de 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-Sayler

Entre 1930 et 1940, ces bio-polymères 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 devers utilisation de ces deux bio-polymères sont en constante augmentation, en particulier dans le cadre de protection de l'environnement de fait de leur abondance et leur propriétés intéressantes (Roussy, 2005).

Et a partir des années 1980 qu'est née la science de la chitine et du chitosane et que par la suite de nombreux travaux ont porté ces deux molécules .....

La plupart des applications reposent sur le chitosane dont la molécule hydrosoluble et plus petite que celle de la chitine (Latrouite et al .2008)

### II-2 Définition générale

La chitine est le polysaccharide naturel le plus important dans la nature après la cellulose (Rinaudo ,2006). Est un polysaccharide linéaire formé d'unités de N-acétyl-glucosamines liées entre elle par des liens glycosidiques de type  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (crini et *al.*, 2009) (figure 06).

Elle est présentée principalement dans les coquilles de Mollusques, dans les cuticules des insectes et dans la carapace de crustacés. Associée à des protéines, la chitine a contribue a la cohésion des différentes couches qui constituent la coquille des mollusques ou la carapace des arthropodes (Tolaimate et *al.*, 2003).

Il a toujours été difficile d'avoir des données précises concernant la quantité de chitine actuellement produite et accumulée dans différent types d'écosystème et en fin de la biosphère (Jeuniaux , 1991). Sa synthèse peut être estimée à 100 million de tonnes par an (tracey ,1957 in Bade et *al.*, 2004)

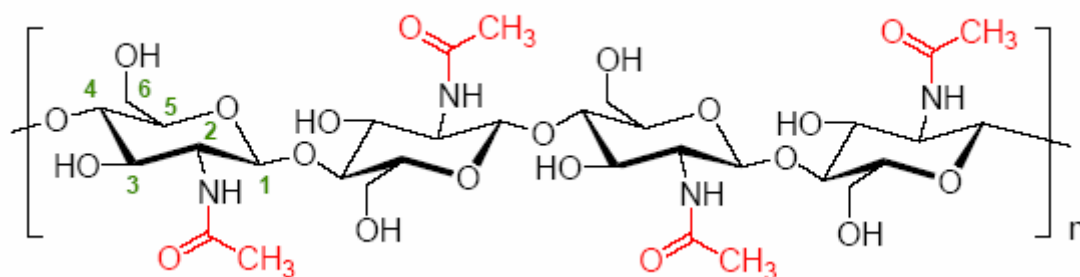


Figure 06: Structure chimique de la chitine (Nugraha edhi suyatama, 2006)

Ce polymère se trouve également dans la paroi de la plupart des champignons Et dans certaine algue chlorophycées, levure et bactérie, en plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique, le tableau 2 représente les différentes sources potentielles de la chitine (Tolaimate et *al.*, 2003)

Tableau 2: sources potentielles de chitine (Tolaimate et *al.*,2003)

Sources de chitine	Teneur en chitine(%)
Crabe marbré ( <i>Grapsus marmoratus</i> )	10
Crabe rouge ( <i>portunus puber</i> )	10
Le crabe comestible	70
Crabe araignée ( <i>Maia squinada</i> )	16
Homard sauterelle ( <i>Scyllarus arctus</i> )	25
Langouste ( <i>palinurusvulgarusrus</i> )	32
Crevette ( <i>Palaemon fabricuis</i> )	44
Seiche ( <i>sepia officinalis</i> )	20
Calmar( <i>Loligovulgarus</i> )	
Champignon	
( <i>Mucor rouxili</i> )	9,4
( <i>Aspergillus niger</i> )	42
( <i>Aspergillus phoenisis</i> )	23,7

### II-2-1 L'organisation de la chitine dans la cuticule des Crustacés

Les cuticules de crustacés sont constituées de chitine, Protéines et minéraux (essentiellement le carbonate de calcium).les proportions sont variables selon espèces.les ressources traditionnellement exploitées pour extraire la chitine, sont

composées de 15 à 40 % de chitine, 20 à 40 % de Protéines et 20 à 50 % de carbonate de calcium (en poids sec). Pour une espèce donnée, la répartition est plus stable (Bouchon, 1995).

Les trois constituants majoritaires, chitine, protéines et  $\text{CaCO}_3$ , forme un réseau dense, la chitine y joue un rôle structurels et fonctionnels vitaux. Elle forme une barrière physique entre le corps et de l'organisme et son environnement (Roer et Dillaman, 1984). Elles participent à sa protection contre les radiations, la chaleur, les agressions chimiques et physiques. Elle est également le site d'attachement des muscles et le lieu d'échange et de transport de substance, notamment l'adsorption de composés anionique. Enfin, Elle joue un rôle dans le système immunitaire (Tokura et Tamura, 2007).

La chitine forme avec les Protéines, des microfibrilles cristallines. L'élasticité de la carapace dépend du degré de liaison entre la chitine et les protéines, et de leur répartition dans la matrice. Ces protéines peuvent être arthropodines (responsable de la rigidité), des sclérotines (rôle dans la pigmentation) ou des résilines (attribuées à l'élasticité des cuticules et permet les mouvements)

On peut distinguer sept niveaux hiérarchiques qui vont être décrits ci-dessous (figure 07). Au premier niveau se trouve la structure moléculaire de la chaîne linéaire polysaccharidique de la chitine. Au second, on distingue les trois formes d'arrangement géométrique de ces chaînes, soit  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ . Au troisième niveau, 18 à 25 molécules de chitine s'assemblent en unités cristallines, étroites et longues, enveloppées de protéines. Ces nano-fibrilles ainsi obtenues mesurent 2 à 5 nm de diamètre et environ 300 nm de longueur. Elles s'assemblent ensuite en fibrilles plus importantes, de l'ordre de 50 à 300 nm de diamètre. L'espace disponible entre les fibrilles est comblé par les protéines et des minéraux, principalement le carbonate de calcium, soit sous forme cristalline (calcite), soit amorphe (Vincent, 2002 ; Raabe *et al.* 2005).

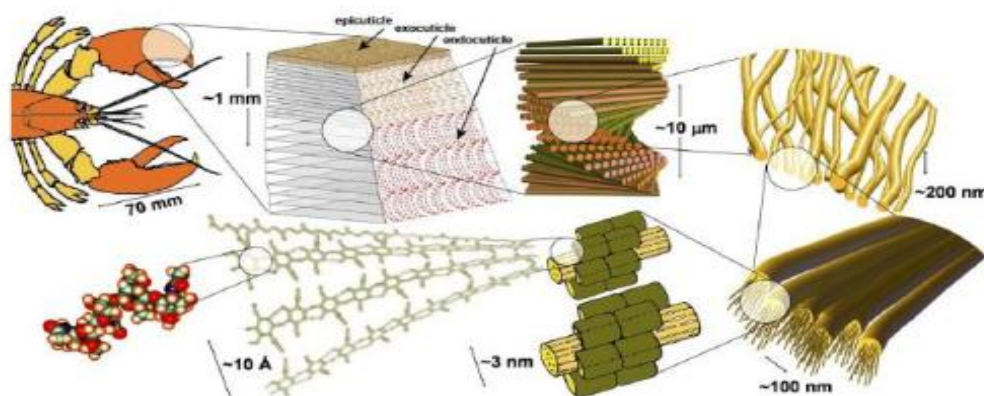


Figure 07: Niveaux hiérarchiques dans l'organisation de la cuticule de crabe *H. americanus* (Raabe, 2005).

L'observation des plans superposés de chitine-protéines permet de distinguer des perforations perpendiculaires qui constituent des pores traversés par des canaux. À cause de son aspect, cette structure est appelée « nids d'abeilles » (figure 08). Les canaux sont formés de fibres de chitine-protéines minéralisées et ils sont flexibles (Fabritius et *al.* 2009).

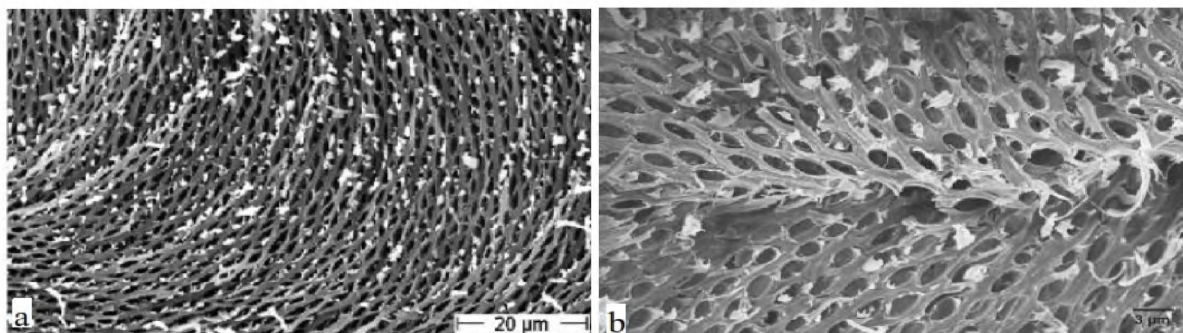


Figure 08 :Structure en «nid d'abeille» de cuticule homard CT par MEB (a) (Pillai,2009)  
(b) (Raabe,2006)

D'après l'étude de Raabe (2005), on peut distinguer deux parties dans l'organisation de la cuticule. L'exo-cuticule est caractérisée par une forte rigidité (8,5-9,5 GPa) et une forte résistance (130 à 270 MPa). L'endo-cuticule est plus désorganisée, moins rigide (3-4,5 GPa) et moins résistante (30-55 MPa).

## II-2-2 Les caractéristiques biochimiques et physicochimiques de la chitine et ses dérivés

La présence des trois arrangements  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (figure 09) varie selon le type de tissu. Elle est associée à un rôle physiologique particulier (Pillai et al. 2009). La chitine  $\alpha$  est caractérisée par des chaînes antiparallèles. À l'inverse les chaînes de la chitine  $\beta$  sont disposées en parallèle. Le troisième allomorphe,  $\gamma$  est peu courant et alternerait les arrangements parallèles et antiparallèles (Rinaudo, 2008).

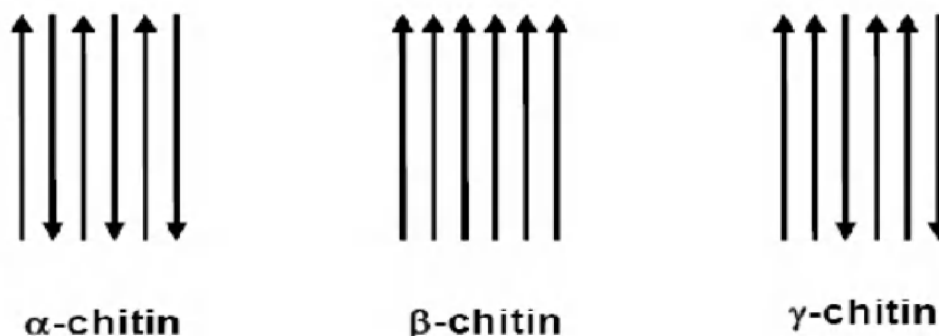


Figure 09 : Arrangement des trois formes existantes de chitine :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Einbu 2007)

La chitine  $\alpha$  est la plus courante, présente chez les Arthropodes, dont les crustacés, chez les fongiques et les levures. Elle est la forme la plus stable grâce aux liaisons hydrogènes et covalentes entre les chaînes. Les liaisons glycosidiques sont orientées selon une géométrie di-axiale, ce qui implique une position diagonale des motifs de N-acétyl-glucosamines. Ceci favorise l'association latérale de ponts hydrogènes entre chaînes et des groupes C=O aux groupes N-H (Rinaudo, 2006). Einbu (2007) note également des liaisons intramoléculaires entre le C-6 et le carbonyle, puis entre l'oxygène du cycle et le C-3 (Fig.1, p3). Par conséquent, la cristallinité de la chitine  $\alpha$  est élevée.

Au contraire, la chitine  $\beta$  est moins stable, moins cristalline et plus rare. Elle est présente dans les plumes de calmar, dans les tubes produits par des vers de la famille des pogonophores et vestimentifères, chez certaines algues et protozoaires (Rinaudo, 2006). En particulier, une forme très pure de la chitine  $\beta$  est synthétisée par la diatomée *Thalassiosira fluviatilis* (Herth, 1979). À cause de sa stabilité réduite, la chitine  $\beta$  est plus réactive que la chitine  $\alpha$ , notamment avec les solvants (Shimojoh et *al.*, 1998 ; Aranaz, 2010).

Par apport la chitine  $\gamma$ , cette forme n'a pas été complètement identifiée, un arrangement entre deux chaînes parallèle et une autre anti-parallèle a été proposé (figure :). (Rudall, 1963 in Lavall, 2007). Cependant il a toujours été suggéré que la chitine  $\gamma$  peut être interprétée comme une simple distorsion des chitines  $\alpha$  et  $\beta$  au lieu d'un polymorphe à part (Robert, 1992 in lavall, 2007).

## II-3 Procédé d'extraction de chitine

### II-3-1 Technique chimique

De nombreuses méthodes ont été développées à fin de préparer la chitine à partir de carapace de crustacés. De manière générale, elles consistent à éliminer les éléments minéraux (démminéralisation), les protéines (Déprotéinisation), et la couleur (blanchiment)

#### II-3-1-1 Démminéralisation

La démminéralisation est généralement réalisée par un traitement acide sous agitation pour solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium. Les acides les plus fréquemment utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide formique à des concentrations de 1 à 10 mol/L. La durée du traitement acide est de l'ordre de 1 à 48 heures à la température ambiante. La condition optimale est obtenue par le traitement des carapaces sèches en poudre avec HCl 1 mol/L pendant 30 minutes à la température ambiante et le rapport du solide au solvant est 1:15 (w/v), c'est-à-dire 1 g de carapaces en poudres pour 15 ml de solvant (No et *al.*,

1989). Pendant le processus de déminéralisation, des mousses indésirables peuvent se former dues à la production de dioxyde de carbone



No et *al.* (1998) ont recommandé d'utiliser une anti-mousse commerciale contenant 10% de solution de silicone active

### II-3-1-2 Déprotéinisation :

A l'état naturel, la chitine se présente en association avec les protéines (Chitino-protéine). Les protéines sont éliminées par un traitement basique en utilisant, en général, des solutions à base de NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, CaSO<sub>3</sub>, ou Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, de concentrations de 0,1 à 5 mol/L. La solution d'hydroxyde de sodium (~10 % massique) est la plus souvent utilisée pour dissoudre les protéines. La durée du traitement basique est de l'ordre de 0,5 à 72 heures à hautes températures (65-100°C). No et Meyers (1995) ont rapporté que la proportion du solide à la solution alcaline allant de 1:10 à 1:20 (w/v) est recommandée pour que l'élimination des protéines soit efficace.

### II-3-1-3 Blanchiment :

Pour les applications industrielles, la chitine obtenue à partir des ressources crustacées doit être décolorée après les traitements acide et alcalin (No et *al.*, 1989). Le pigment dans les carapaces de crustacées forme un complexe avec la chitine. Fox (1973) a détecté un dérivé de β-carotène solidement relié à la chitine de l'exosquelette des crabes rouges. Le blanchiment est souvent réalisé par un traitement avec des agents oxydants (KMnO<sub>4</sub>, NaOCl, SO<sub>2</sub>, NaHSO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ce traitement peut éliminer des traces de pigments résiduels, comme les caroténoïdes.

Durant le processus de blanchiment, le réactif utilisé ne doit pas avoir un effet sur les propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane. No et *al.* (1989) ont pu fabriquer la chitine quasiment blanche par l'extraction avec l'acétone et le séchage pendant 2 heures à la température ambiante, suivi par le blanchiment en utilisant une solution 0,315% d'hypochlorite de sodium pendant 5 minutes avec un rapport du solide au solvant (1:10, w/v). Sans l'extraction préalable par l'acétone, le blanchiment doit être effectué plus de 1 heure pour aboutir à un produit blanc acceptable commercialement.

### II-3-2 Technique biologique

De nombreuses études font part de l'intérêt de la fermentation pour traiter les coproduits de crustacés. En effet, la production de protéases exo-cellulaires par certains microorganismes, combinée à la production d'espèces ioniques acides (comme l'acide

lactique), équivaut aux conditions d'extraction de la chitine. Traditionnellement, la fermentation se déroule dans un réacteur où les conditions de température, pH, pression et agitation sont suivies. A l'issue de la fermentation, une filtration sépare deux fractions. La fraction solide est composée en majorité de chitine et la fraction liquide contient les autres constituants solubilisés. L'un des intérêts du procédé biologique résulte du potentiel de valorisation de cette dernière fraction. (Le roux ,2012)

Teng et al. (2001) rapportent que les fermentations par *Pseudomonas maltophilia*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecium*, *Pediococcus pentosaseus* et *Aspergillus oryzae*, permettaient d'extraire la chitine en préservant la longueur des chaînes du polymère. Leur travail a porté sur la comparaison entre 34 mycètes. Trois *Aspergillus niger*, 0307, 0474 et 0576, ont été sélectionnés pour leur activité protéolytique et leur composition riche en chitine. Ces microorganismes consomment les protéines libérées et abaissent le pH. La fermentation dure 4 à 7 jours, à 30 °C. Le rendement en chitine est autour de 48 % et la teneur en protéines résiduelles entre 1,6 et 3,9%. Les souches fongiques présentent l'avantage de posséder une proportion de chitine dans leur structure externe. La teneur en chitine varie de 42 % pour *Aspergillus niger* à 2,3 % pour *Saccharomyces glutara* (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). Après 14 jours de fermentation par *B. subtilis* à 30 °C, déprotéinisation et déminéralisation atteignent 86 % et 72 % respectivement, soit 6,1 % et 5,2 % de teneurs résiduelles (Sini et al., 2007).

La fermentation par bactéries lactiques est largement traitée dans la littérature (Zakaria et al. 1998 ; Khanafari et al., 2008). Rao et Stevens (2007) testent le potentiel de *Lactobacillus planturum* 541 des coproduits de crevettes. La fermentation dure 24 h et l'inoculum est fixé à 5% en w/w. Les expériences comparent la fermentation avec ou sans acide acétique ajouté à l'autolyse. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la fermentation est soutenue par l'appoint d'acide acétique ajusté à pH 6. La déprotéinisation et la déminéralisation atteignent 66 % et 63 % respectivement à partir des cuticules de crevettes, tandis qu'elles atteignent 83 % et 88 % respectivement à partir de têtes de crevettes. Cependant, les teneurs en protéines et minéraux sont initialement plus élevées dans les têtes, par conséquent le rendement en chitine est plus faible. La composition en acides aminés dans la fraction liquide a été étudiée et comparée à des références alimentaires (bœuf, poudre de lait et œufs). Rao et Stevens prouvent ainsi la haute valeur nutritive de cette fraction.

### II-3-2-1 Déprotéinisation et de déminéralisation enzymatique

Les enzymes sont largement exploitées par les industries, en particulier les protéases. Leur activité principale est la lyse des liaisons peptidiques. Elles ciblent également les liaisons esters (Bornscheuer et Kazlauskas, 2004). Dès les années 60, des investigations se sont orientées vers les protéases pour extraire la chitine, entre pH 5 et 8 (Wang et chio ,1998). Roussina a testé la déprotéinisation par la papaïne, la pepsine et la trypsine en 1968. Gagne et Simpson (1993) ont déterminé les

conditions optimales de déprotéinisation par la chymotrypsine et la papaïne, autour de pH 8 à 40 °C. A partir de coproduits de crevettes prétraités, les teneurs en protéines résiduelles sont de 1,3 % et 2,8 % respectivement.

Parmi les protéases étudiées pour leur capacité à déprotéiniser les coproduits de crustacés, les alcalases ont intéressé Synowiecki et Al-Khateeb (2000). Les conditions optimales d'activités se situent autour de pH 8,5 et 55 °C et le substrat (exosquelette de crevettes) est pré-déminéralisé. Après 4 h d'hydrolyse enzymatique et des étapes de rinçage/blanchiment, la fraction chitineuse récupérée présente des teneurs résiduelles en protéines et cendres de 4,45 % et 1,56 % respectivement.

Beaney et *al.* (2005) comparent l'extraction chimique à une extraction par fermentation lactique. A partir de ses travaux, les teneurs en protéines résiduelles sont de 2,1 % et 11,9 % par voie chimique et enzymatique respectivement, soit 5,6 fois moindre. L'élimination des minéraux est quasi-complète par la voie chimique et de 68 % par fermentation lactique. Le degré de déminéralisation semble être amélioré par la réduction des tailles. De plus, après désacétylation, le poids moléculaire et le degré d'acétylation ne présente pas de différences significatives (Beaney et *al.* 2005).

## II-4 Le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide provenant de la désacétylation de la chitine, un composé grandement similaire à la cellulose. On retrouve la chitine dans plusieurs écosystèmes puisqu'elle est une composante fondamentale de l'exosquelette des invertébrés marins (crabe, crevette, homard, etc.) et des insectes, en plus d'être une molécule structurante chez les champignons et les levures (Ruhsing Pan et *al.*, 1999). Après la cellulose, la chitine est le composé organique le plus abondant dans la nature. Au niveau de sa disponibilité, on estime à plus 150 millions de tonne la quantité de chitine pouvant être recyclée annuellement, une chitine qui provient essentiellement des usines de transformation des produits de la mer (Chavasit et Torres, 1990).

La chitine et le chitosane se différencient par la proportion des unités acétylées présentes dans le copolymère, appelée aussi le degré d'acétylation (noté DA). Bien que le terme « chitosane » soit habituellement limité à toute chitine suffisamment N-désacétylée pour être soluble en milieu acide dilué, il n'existe pas de nomenclature officielle proposant la limite précise entre les deux termes. En conséquence, nous appellerons chitosane tout échantillon avec des degrés d'acétylation résiduels (DA)  $\leq 30\%$  (Seng, 1988).

Le chitosane possède un degré d'acétylation qui varie de 5 à 30% avec un poids moléculaire entre 100 000 à 1 000 000 Da. Il peut se présenter sous forme amorphe, semi-cristalline ou cristalline. Le chitosane peut former des liaisons avec des molécules chargées négativement comme les acides gras, les acides biliaires, les phospholipides, les protéines, les polysaccharides tels que les carraghénanes, les

pectines et les alginates.... Il possède aussi des activités biologiques, notamment des activités antimicrobienne (Du *et al.*, 2009), anti-inflammatoire, anti-oxydante (Ngo *et al.*, 2009), anti-tumorale (Wang *et al.*, 2008b), immuno-modulatrice (Lee *et al.*, 2008), anti-ulcère (Rasmussen et Morrissey, 2008) ou encore anti-hypertensive (Kim *et al.*, 2008b). Le degré d'acétylation du chitosane a un rôle crucial dans sa bio-activité : plus il est acétylé, moins il possède une bio-activité (Kim *et al.*, 2008b). Le chitosane est également utilisé pour guérir les maladies rénales, et enfin, ils ont les mêmes propriétés diététiques que les fibres alimentaires solubles d'origine végétale (Rasmussen et Morrissey, 2008).

#### II-4-1 Structure du chitosane

Le terme chitosane, loin de répondre à une seule et unique structure chimique bien définie, s'adresse à toute une famille de copolymères linéaires à arrangement aléatoire d'unités N - acétyl - D - glucosamine et de D - glucosamine en proportions variables (figure 1) (Roberts,1992), et liées entre elles par des Liaisons  $\beta$  (1- 4) qui confèrent au chitosane de bonnes caractéristiques filmogènes (Caroline *et al.*2006).

Le chitosane a trois types de groupes fonctionnels réactifs, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> et C<sub>6</sub> respectivement (Figure 10). Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés intéressantes très différentes de celles de la chitine. Le chitosane, soluble dans les acides faibles, possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement (Shahidi *et al.*, 1999).

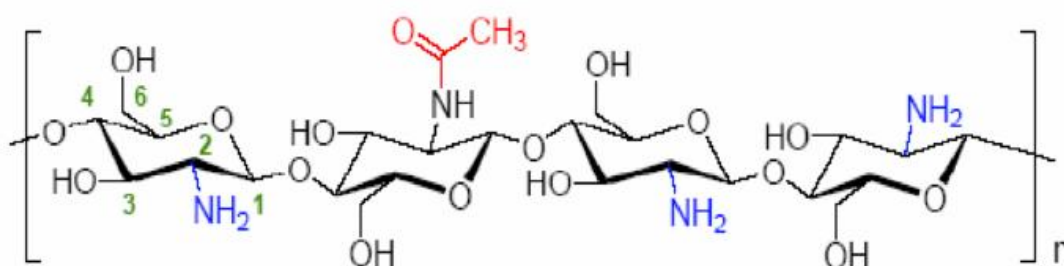


Figure 10: structure chimique du chitosane (Nugraha edhi suyatama, 2006)

## II-5 Technique de transformation de la chitine en chitosane (désacétylation) :

### II-5-1 La désacétylation par voie chimique :

L'extraction de la chitine est aujourd'hui facilement réalisable. Toutefois, l'étape la plus délicate reste la désacétylation. Elle nécessite la substitution des groupements acétyls pour Aboutir au chitosane, ce qui peut réduire la longueur de la chaîne de polymère (Crini et *al.*, 2009). En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur la température, il est possible d'obtenir différents chitosanes à partir d'une même chitine.

La désacétylation est généralement effectuée par un traitement basique avec l'hydroxyde de sodium ou potassium concentré (40 – 50 %) (Muzzarelli, 1977), à une température supérieur ou égale à 100 °C, pendant au moins 30 minutes, pour enlever certains ou tous les groupements acétyls de la chitine (No et Mayers, 1995).

La désacétylation ne peut pas être réalisée avec un réactif acide (Muzzarelli, 1977). Il y a plusieurs facteurs essentiels qui affectent le rendement de désacétylation comme la température, la durée, la concentration d'alcalin, les traitements préalable pour l'obtention de la chitine, l'atmosphère (air et l'azote), la quantité de chitine par rapport à la solution alcaline, densité de la chitine et la taille des particules (Crini et *al.*, 2009). Compte tenu de ces paramètres, l'objectif idéal de désacétylation est de préparer un chitosane parfaitement soluble dans l'acide dilué (acides acétique, lactique, citrique,...)

### II-5-2 La désacétylation par voie enzymatique

De nombreuses études traitent de la désacétylation enzymatique par l'action de chitinases ou chitosanylases. Ces enzymes sont référencées EC 3.51.41. Elles sont extraites de levures telles que *Colletotrichum lindemuthianum* ou *Mucor rouxii* ou *Aspergillus niger*, où elles participent au métabolisme des sucres (Tsigos et Bouriotis, 1995 ; Gildberg et Stenberg, 2001). Les chitinases peuvent également être extraites de l'hépatopancréas de crevettes (Esaiassen et *al.*, 1996).

La désacétylation enzymatique peut être catalysée par une chitine-désacétylase extraite de *Mucor rouxii* à pH 4,5 à 50 °C (Kafetzopoulos et al. 1993). Cette enzyme est active sur des substrats chitineux supérieurs à 4 unités et présente un degré d'activité plus élevé lorsque le substrat présente une solubilité plus élevée. Après 13 h de réaction à partir de chitosan prédésacétylé (DA=42 %), le DD est égale à 98 % (Martinou et *al.*, 1995, Martinou et *al.*, 1998).

L'un des avantages de la désacétylation enzymatique, revendiqué par rapport au traitement chimique, est sa capacité à mieux préserver le poids moléculaire initial du polymère (Martinou et *al.*, 1995; Cai et *al.*, 2006).

## II-6 Propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane :

### II-6-2 Degré d'acétylation (DA)

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré d'acétylation (DA) et par leur masse molaire, dont la détermination nécessite la mise en solution du polymère. Le degré d'acétylation présente le taux de groupe acétylé par rapport au groupe non acétylé (Figure II.12). De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le DA sur des échantillons solides: la spectroscopie IR (Brugnerotto, 2001), l'analyse élémentaire (Kasaai et *al.*, 1999), la RMN solide (Heux et *al.*, 2000), ou sur des échantillons en solution : dosage UV (Maghami et Roberts, 1988), titrage colloïdal (Chen et *al.*, 1997), RMN liquide (Yang et Montgomery, 2000).

### II-6-3 Solubilité

La chitine est soluble dans très peu de solvants. Sa masse molaire initiale est de l'ordre de 800 000 à  $10^6$  g.mol<sup>-1</sup> et elle est généralement fortement acétylée. Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire de l'ordre de 200 000 g.mol<sup>-1</sup> 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. De plus, un enchaînement successif de plusieurs motifs N-acétylés confère au polymère un caractère plus hydrophobe, et donc des propriétés auto-associatives (propriétés épaississantes et gélifiantes) et modifie sa solubilité. En raison de sa solubilisation en solution acide, le chitosane se comporte comme un polymère cationique de forte densité de charge. Ses propriétés dépendent du pH du milieu. Le chitosane est solubilisé et il devient cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6,3 (Peter, 1995). A un pH supérieur (> 6,5), les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane se précipite. Autour de pH 6, le nombre de fonctions amine libres devient suffisamment élevé pour induire une association des chaînes et la précipitation du polymère. La viscosité du chitosane en solution est influencée par différents facteurs, comme le DA, la masse molaire, la concentration, la force ionique, le pH et la température.

### II-6-3 Poids moléculaire

Le chitosane est un polymère qui peut atteindre des poids moléculaires (PM) élevés, atteignant jusqu'à 1-3 Mda dans le cas des produits obtenus par des processus contrôlés d'extraction et de désacétylation. Dans le cas du chitosane commercial pour des applications dans le domaine du traitement des eaux le poids moléculaire est généralement plus faible (compris entre 100 et 500 KDa) (Schatz et *al.*, 2003 in Crini et Badot, 2007).

## II-7 Les applications de la chitine et du chitosane

La chitine et le chitosane ont des applications étendues et très diverses comme dans industries alimentation, de textile et de produits de beauté, en plus des applications environnementales et biomédicales (Ayer et *al.*, 2000)

Les propriétés particulières du chitosane sont liées essentiellement à la présence de la fonction amine porté par le carbone 2. Elles sont de deux types :

- à pH acide, ou il est soluble, le chitosane porte de nombreuse charges positives. il est donc un bon agent de floculation et un bon agent de coagulation (Crini et *al.*, 2009).il peut interagir avec des molécules chargées négativement ( par exemple acide gras, protéines et argiles ....) (Fang et *al.*, 2001) et former ainsi des complexes polyanion-polycation , cette propriété lui ouvre de multiples applications notamment en dermo-cosmétologie : elle permet interagir de façon très intime avec les Kératines de la peau et ainsi former un film a la surface de celle-ci .

- à pH (> 6,5) le chitosane perd ses charges positives, le doublet électronique de l'azote Est libre, ces doublet libres et présence de nombreux atomes d'oxygène dans le chitosane lui permettent de se comporter comme un excellent complexant, en particulier des métaux lourd, il donc utilisé pour la purification de l'eau, Par exemple pour la récupération de métaux dans les effluents industriels.

La chitine est hydrolysée par les lysozymes ce qui n'est pas le cas de chitosane, celui- ci peut alors transiter sans adsorption dans tout l'appareil digestif, il donc utilisé comme ballast pour le transit intestinal et pour son activité hypocholestérolémiante.

Le chitosane peut donc piéger le cholestérol apporté par l'alimentation et éviter qu'il ne soit absorbé par la paroi intestinale, Par conséquent, il est de plus en plus introduit dans les produits amaigrissants (Muzzarelli , 1996).

Le chitosane et la chitine, en faible quantité (quelques mg par m<sup>3</sup> d'eau) sont capables de déclencher chez les plantes les mécanismes de défense contre les infections et les agressions parasitaires. Par ailleurs, le chitosane stimulerait la plante pour la synthèse d'agents protecteurs, et se comporterait comme un engrais en accélérant la germination et la croissance des plantes (Sandford, 1989; Hedwiger et *al.*, 1989). Le chitosane et la chitine ont montré une résistance à certains parasites, bactéries, virus ou mycoses. Ils entraînent une activation des polynucléaires et des macrophages, qui jouent un rôle important dans le mécanisme de défense de l'organisme.

Dans le domaine des cosmétiques, les propriétés filmogènes et cationiques du chitosane sont exploitées dans de nombreuses crèmes ou lotions de soin pour les cheveux ou la peau (Lang et Clausen, 1989). On le trouve par exemple dans des crèmes antifongiques, amincissantes, hydratantes. Le tableau présente quelque application de la chitine du chitosane

Tableau 3 : Les applications de la chitine et du chitosane. (Grégorio Crini , 2007)

Domaines	Applications
Agriculture	Protection des plantes ; augmentation des rendements de récolte (réduction de la croissance des mycètes phytopathologique) ; enduit de graine et d'engrais ; traitement du sol.
La technologie biomédicale	Activités biologiques (antifongique, antimicrobien, anti-infectieux) ; agent anti-tumoral; effet hémostatique ; augmentation de la coagulation du sang; favorisation de la croissance du tissu ; stimulation de la prolifération des cellules ; artificielle ; fils de suture bandage, peau ophtalmologie ; lentilles de contact.
La biotechnologie	immobilisation des cellules et des enzymes; matériaux stimulants de cellules; matrice pour l'affinité ou les membranes.
La chimie industrielle	Purification d'eau (chélation des métaux) ; technologie de l'eau (floculation, absorption) ; traitement des boues; membranes d'osmose inverse, membranes de filtration; séparation des gaz ; production de films d'emballage biodégradables ; la catalyse.
Cosmétique et toilerie	Les laques pour les cheveux ; lotion; crème pour le corps et les mains; shampooing; crèmes hydratantes
L'industrie alimentaire	Régime alimentaire et fibre diététique ; activité hypocholestérolémie (liaison cholestérol, acides gras et mono glycérides); la conservation des nourritures de la détérioration microbienne ; la bioconversion pour la production de produits alimentaires a valeur additionnée; rétablissement des déchets de la transformation des produits alimentaires ; clarification et désacidification des jus de fruit et des boissons; agent émulsionnant; stabilisant de couleur ; additives alimentaires des animaux,
Pharmaceutique	commandes de micro capsules (formant des gelés des capsules avec des polymères anioniques) ; des médicaments, libération transporteur a contrôlée ; produits

---

	dermatologiques (traitement de l'acné).
Autres	textile (propriétés anti- bactériennes) ; pulpe et papier (résistance au mouillage) ; œnologie (clarification, désacidification) ; dentisterie (implants dentaires) ; photographie (papier)

# Chapitre II

# MATERIELS ET METHODES

## I-INTRODUCTION

Dans ce travail, nous avons précédé d'abord à l'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes en suivant des étapes principales: élimination des protéines et élimination des sels minéraux.

Après déminéralisation, nous avons passé à la désacétylation de la chitine par un traitement alcalin pour obtenir le chitosane. Le produit, ainsi obtenu, est caractérisé par la Spectroscopie Infra Rouge (IR), par diffractométrie des RX, par analyse CNO et par **microscopie**.

Dans cette étude, nous avons fixés des objectifs qui consistent :

- La mise au point d'une nouvelle méthode basée sur l'effet des micro-ondes pour une augmentation du rendement de la transformation de la chitine en chitosane avec une cinétique rapide de désacétylation.
- A obtenir de la chitine par voie chimique à partir des déchets de crevette,
- A obtenir différents chitosanes par désacétylation chimique de la chitine dans des conditions respectueuses de l'environnement (Température, concentration modérées en réactifs).
- Caractérisation des différents chitosanes afin de déterminer le chitosane ayant des propriétés d'une bonne matière première pour les produits pharmaceutiques et cosmétique.

## II- Matériel et appareillage :

### II-1 Produits chimiques et matière première utilisés :

- Carapace de crevette Prétraité
- Acide chlorhydrique (HCl)
- Hydroxyde de sodium (NaOH)
- Nitrate d'Argent (Ag NO<sub>3</sub>)
- L'eau distillé

### II-2 Petit matériels :

- Tamis

- Verrerie de laboratoire : entonnoirs, éprouvettes, fioles, boîtes de pétries, bocal, ballon, béchers,
- pissettes, spatules.

### II-3 Appareillage :

- Balance analytique de précision 0,1mg de marque ( )
- Etuve ( )
- pH mètre (type de HANNA)
- Lyophilisateur (CHRIST)
- Bain marie (modèle Memmeret SV 1422)
- Micro-ondes modifiée (Sam Sung)
- Agitateur ( )
- Spectrophotomètre Infrarouge

### II-4 Co-produits de crevette :

#### II-4-1 Sources de la carapace

Les déchets de crevettes (céphalothorax +carapace de l'abdomen) qui vont servir de matière première pour l'isolation de la chitine, ont été récoltés de plusieurs sources différentes : trois restaurants (Dely Ibrahim (Figure 1), Ben Aknoun et Bab Ezzouar). Les crevettes ont été généralement pêchées dans la zone Algéroise.



Figure 11: restaurant « Dalia » (Daily Brahim, Wilaya d'Alger)

Ces déchets appartiennent à l'espèce *Parapenaeus longirostris* (figure : 2), très abondante Sur nos côtes, elle est appelé communément crevette blanche en Algérie .



Figure 12 : la crevette *Parapenaeus longirostris*

## II-5 Prétraitement des carapaces :

La quantité des déchets récupérés a subi un prétraitement par lavage à eau du robinet et eau distillée pour éliminer certains déchets (liquide jaune, le sang, les débris epicuticule).

Après lavage, les carapaces sont conservées dans des sacs en plastique dans le congélateur à -20°C.

### II-5-1 Lyophilisation :

La lyophilisation est reconnue comme étant la méthode de séchage le plus efficace au monde, car elle permet d'éliminer, par procédé physique appelé sublimation, presque la totalité de l'eau (sauf l'eau intracellulaire) contenue dans la boîte sans abimer ses caractéristiques physico-chimiques (figure : 3).

Les carapaces de crevette, déjà congelées, sont mises dans des sachets, et placées dans les étages du lyophilisateur. Une fois la cloche posée, une pompe sous vide va aspirer la totalité de l'air et de ce fait un vide très puissant va se créer, transformant ainsi la glace contenue dans les carapaces à une forme gazeuse sans passé à l'état liquide (sublimation).



Figure 13: Lyophilisateur de laboratoire

### II-5-2 Broyage :

Après avoir récupéré soigneusement les carapaces sèches de lyophilisateur, ces dernière ont été transformé en poudre a l'aide un broyeur a couteau très puissant, la vitesse et le temps ont été contrôlés lors de l'opération de broyage dans le but d'avoir une granulométrie très fine.

### II-5-3 Tamisage :

Le tamisage est un procédé qui permet d'avoir des échantillons séparées à différentes fractions granulométriques. La poudre obtenue par broyage est ainsi traité a l'aide d'une colonne vibrante munie des tamis (figure 4) de différents dimensions : 250 $\mu$ m, 200  $\mu$ m, 125  $\mu$ m, 100  $\mu$ m, 80  $\mu$ m, 60  $\mu$ m, 40  $\mu$ m, dont les dimensions de maillage sont de type AFNOR.



Figure 4: Tamis en INOX de la colonne vibrante.

### III- Étapes d'extraction et d'isolation de la chitine et du chitosane

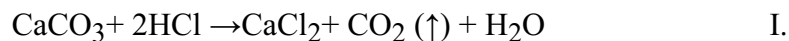
Dans le but d'obtenir la chitine et le chitosane avec nouveau procédé basé sur l'effet à micro-onde, 03 étapes ont été réalisées au laboratoire :

- Déminéralisation.
- Déprotéinisation par micro onde.
- Desacétylation par micro onde.

#### III-1 Déminéralisation :

La déminéralisation est généralement réalisée par un traitement acide sous agitation pour solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium. Les acides les plus fréquemment utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide formique à des concentrations de 1 à 10 mol/L (No *et al.*, 1989)

L'objectif de cette étape est d'éliminer toute les sels minéraux qui se trouvent dans la carapace de crevette. Pour cela, nous avons utilisé l'acide chlorhydrique HCl qui réagit rapidement avec le carbonate de calcium pour donner du chlorure de calcium qui est éliminé par l'eau distillée selon réaction suivante :



Dans ce travail, le procédé de la déminéralisation a été réalisé à l'aide d'un bocal de 1l en verre qui contient le mélange acide-carapace. Ce bocal est placé dans un Bain Marie sous agitation (480 tr/min) (figure 5). Les conditions expérimentales sont présentées dans le tableau 1.

#### III-2 Préparation de la solution de HCl

Nous avons, en premier, préparé une solution mère de HCl de 1 M. A partir de cette solution, nous avons procédé à des dilutions en utilisant la formule suivante :

$$C_m V_m = C_f V_f \quad \text{II}$$

-  $C_m$  : Concentration de la solution mère (mg/l).

-  $V_m$  : Volume à prendre à partir de la solution mère (ml)

-  $C_f$  : Concentration de la solution fille (mg/l)

-  $V_f$  : Volume finale de la solution fille (ml)

Tableau 4 : la partie expérimentale de la Déminéralisation

Granulométrie ( $\mu\text{m}$ )	Concentration HCL (N)	Rapport (liquide / solide) (g /ml)	La température ( $^{\circ}\text{C}$ )	Temps (h)
100	01	(1 /10)	50	06

La réaction a été faite à l'aide d'un minéralisateur en fonction de temps, ce dernier est un dispositif regroupant :

- ❖ Bocal : qui contient la poudre et l'acide chlorhydrique.
- ❖ Bain marie : qui permet de chauffer et de stabiliser la température de la réaction.
- ❖ Agitateur : mélanger la solution qui est dans le bocal.



Figure 15 : Bain marie muni d'un agitateur mécanique (déroulement de la déminéralisation).

Après 6 heures, les sels formés sont séparés de la poudre par filtration à l'aide d'un tamis granulométrique ( $40 \mu\text{m}$ ), suivi par plusieurs lavage avec l'eau distillé et mesuré avec un PH mètres jusqu'à l'obtention de la neutralisation, cette dernière est importante, car l'acide résiduel dans la solution pourra endommager la chitine .

Nous avons utiliser une autre méthode pour confirmer l'élimination de HCl. Cette méthode est basé par l'ajout de quelque goutte de Nitrate d'argent ( $\text{Ag NO}_3$ ) dans l'eau distillé qui a été utilisé pour le lavage.

- S'il y a un précipité dans l'eau donc l'étape de neutralisation n'est pas complètement terminée.
- S'il n'y a aucun changement dans la couleur de l'eau, cela confirme la disparition des ions chlorure.

La poudre qui est récupérée est mise en séchage à l'étuve à une température de 40°C, après 72h dans l'étuve on obtient une poudre fine (figure 6).



Figure 16 : la poudre des carapaces déminéralisées.

#### **IV- Mise au point d'un système de déprotéinisation et de Desacétylation assisté par micro-onde.**

Pour augmenter la vitesse de déprotéinisation et le taux de desacétylation, nous avons mis au point au laboratoire de recherche de Conservation et Valorisation des Ressources Marines un système d'extraction basé sur l'effet des micro-ondes

Dans une réaction chimique, les micro-ondes vont activer directement les ions ainsi que la plupart des molécules qui possèdent un moment dipolaire. Étant donné que le transfert d'énergie entre les micro-ondes et les molécules est extrêmement rapide (de l'ordre de la nanoseconde), les molécules de réactif ou de solvant sont incapables de relaxer complètement (de l'ordre du dixième de microseconde) et d'atteindre l'équilibre thermique. Cela crée ainsi un *état hors-équilibre* qui se traduit par une température instantanée ( $T_i$ ) des molécules. Cette température n'est pas directement mesurable, mais est bien plus grande que celle mesurée (celle du solvant,  $T_s$ ). La synthèse assistée par micro-ondes a trouvé ses premières applications en chimie organique, où certaines réactions se sont révélées 1 000 fois plus rapides avec un chauffage micro-ondes qu'avec un chauffage traditionnel (bain d'huile, plaque chauffante, etc). Depuis 2000, les travaux se multiplient également dans le domaine de la synthèse de matériaux et nanomatériaux par chauffage micro-ondes. Des travaux sont

également en cours sur la digestion assistée par micro-ondes de protéines, avant un traitement au spectromètre de masse servant à les identifier. La digestion des protéines par la trypsine est une opération longue et le passage au four à micro-ondes pendant cette phase permet de la raccourcir considérablement (5 minutes au lieu de 16 heures). Cette technique n'a été testée que sur des protéines connues et n'est peut-être pas applicable à tous les échantillons.

A l'état naturel, on retrouve la chitine sous la forme Chitinoprotéine (Crini et al., 2009). Les protéines sont éliminées par un traitement basique en utilisant des solutions à base de NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaSO<sub>3</sub>, ou Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Crini et al., 2009). La solution d'hydroxyde de sodium (-10 % massique), avec une proportion du solide à la solution alcaline allant de 1:10 à 1:20 (m/v) est plus efficace pour dissoudre des protéines. La durée du traitement basique est de l'ordre de 0,5 à 72 heures, à hautes températures (65 - 100 °C) (Crini et al., 2009).

La désacétylation est généralement effectuée par un traitement basique avec l'hydroxyde de sodium ou potassium concentré (40 - 50 %) à une température supérieur ou égale à 100 °C, pendant au moins 30 minutes, pour enlever certains ou tous les groupements acétyle de la chitine (No et Meyers, 1995).

Le nouveau procédé de production du chitosane qu'on a utilisé regroupe les deux étapes (déprotéinisation et désacétylation) à une seule étape dans lequel on a utilisé un dispositif composé d'une micro-onde modifiée, un système de refroidissement posé en dessus, un réservoir avec une pompe d'eau servant de système de refroidissement (figure 7).

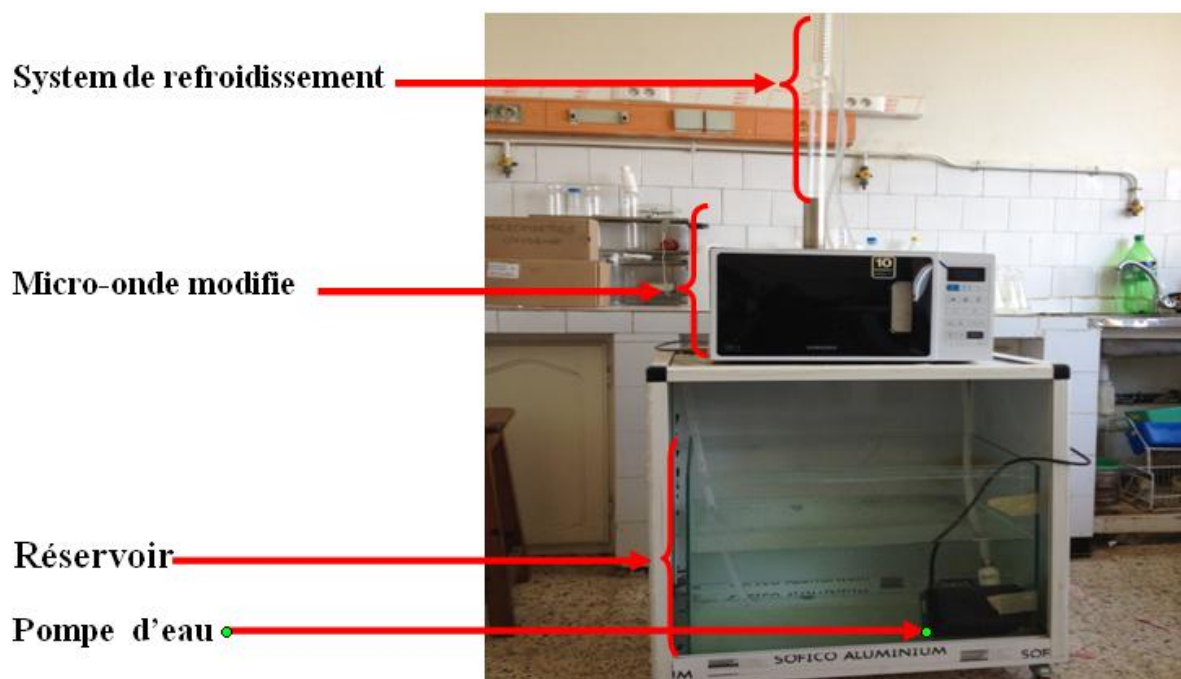


Figure 17 : le nouveau dispositif utilisé pour la production du chitosane.

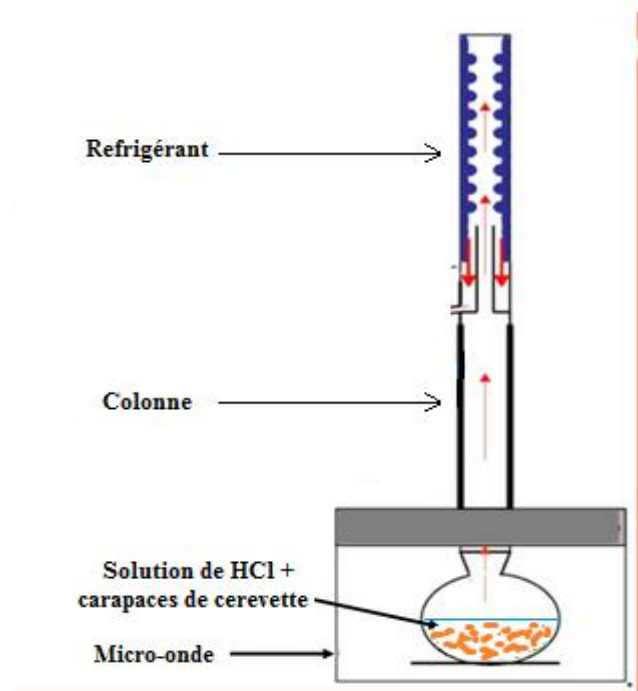


Figure 18 : Extraction assistée par micro-onde

**Le système est composé :**

- **Micro-ondes** : permettant de chauffer et en même temps de contrôler la température de la réaction.
- **Système de refroidissement** : pour refroidir le système.
- **Ballon** : qui contient le mélange du solide (poudre) et du liquide (solution de NaOH).
- **Réservoir** : qui contient d'eau.
- **Système de pompage** : pomper l'eau vers le système de refroidissement.
- **Thermomètre** : contrôler la température.



Figure 19 : le ballon en verre en dedans d'une micro-onde.

Au cours de notre étude, nous avons fait varier 03 paramètres : la concentration de la soude, la puissance du four à micro-ondes et la durée de contact. Le tableau ci-dessous résume les expériences réalisées

Tableau 5: la partie expérimentale de nouveau procédé déprotéinisation et désacétylation

Concentration de Na OH	Echantillon	puissance	Temps (min)	Masse (v/w) (1g/10ml)
1,5N	1	450	5	2
	2	450	10	2
	3	450	15	2
	4	450	20	2
1,5N	1	600	5	1
	2	600	10	1
	3	600	15	1
	4	600	20	1
7,5N	1	600	5	1
	2	600	10	1
	3	600	15	1
	4	600	20	1
10N	1	800	5	1
	2	800	10	1
	3	800	15	1
	4	800	20	1

Après ces deux étapes fondamentales, la chitine désacétylée obtenue est rincée plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à la stabilisation du pH de la solution issue du rinçage puis séchée à 40°C pendant 72 heures. Pour obtenir des poudres sèches (figure9), qui représente toutes les échantillons de nouveaux procédés.



Figure 20 : poudre de chitine désacétylé avec nouveau procédé

Il ya plusieurs facteurs essentiels qui affectent le rendement de desacétylation

- La température.
- La durée de contact.
- La concentration du milieu.
- Le traitement préalable pour l'obtention la poudre déminéralisé.
- La puissance de l'appareil.
- La taille des particules.

## V Caractérisation

### V- 1 Caractérisation des carapaces de crevette broyées

#### V-1-1 *Caractérisation physico-chimique et chimique*

##### V-1-1-1. *Humidité*

La détermination de la teneur en eau s'effectue en chauffant 2 g d'échantillon de carapaces broyées en duplicata dans une étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Chaque échantillon est placé dans un creuset en porcelaine préalablement pesé. Les échantillons sont

refroidis dans un dessiccateur pendant 1 heure avant d'être pesés sur une balance avec une précision de 0,1 mg.

$$\% \text{ Humidité} = ((M_o - M) / M_o) \times 100 \quad (\text{III}).$$

$M_o$  : masse de carapaces humide

$M$  : masse de carapace sèche

#### ***V-1-1-2. Teneur en cendres***

La teneur en cendres est déterminée en calcinant en duplicata 2 g d'échantillon séché pendant huit heures à 500°C. Chaque échantillon est placé dans un creuset en porcelaine préalablement pesé.

Les échantillons calcinés sont refroidis dans un dessiccateur pendant 1 heure de temps avant d'être pesés sur une balance avec une précision de 0,1 mg. La teneur en cendres est évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{ Cendres} = \frac{P_{\text{calciné}}}{P_{\text{sec}}} \times 100 \dots \dots \dots (\text{IV}).$$

$P_{\text{calciné}}$  : Poids de l'échantillon calciné (g).

$P_{\text{sec}}$  : Poids de l'échantillon sec (g).

#### ***V-1-1-3. Teneurs en lipides***

La teneur en lipides totaux a été déterminée par la méthode de Folch modifiée (Eymard, 2003) en duplicata. Environ 5 g d'échantillon est ajoutés à 100 ml d'une solution de chloroforme : méthanol (2 :1). L'ensemble est laissé sous agitation pendant une nuit à température de la pièce, filtré sur papier Whatman no.1 et lavé avec le mélange chloroforme : méthanol. Le filtrat est mélangé à 22 ml d'une solution contenant 0,58% de NaCl dans une ampoule à décanter et laissé reposer durant au moins 6 heures. La phase organique est prélevée, filtrée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée sous vide à 35°C. L'huile recueillie est pesée sur une balance et la teneur en lipide est déterminée avec la formule suivante :

$$\% \text{ lipides} = (P_L/P_{\text{éch}}) \times 100 \dots\dots\dots (V)$$

$P_L$  : Poids des lipides extraits

$P_{\text{éch}}$  : Poids de l'échantillon

## **V-2 Détermination du degré de désacétylation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)**

Le degré de désacétylation (noté DDA dans la suite) est le pourcentage d'unités 2-cétamido-2-déoxy-glucopyranose de la chitine de départ, qui après désacétylation, sont des unités 2-amino-2-déoxy-glucopyranose. Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le DDA du chitosane. Les plus utilisées sont les méthodes basées sur l'électrochimie, la RMN, la spectrophotométrie UV (Brugnerotto, 2001). La limite de ces techniques est la solubilité des matériaux en milieu aqueux. Pour pallier à cet inconvénient, on peut utiliser la RMN du solide qui ne permet de déterminer le DDA que dans un domaine limité ou la spectroscopie infrarouge qui permet la caractérisation des échantillons quel que soit leur DDA. C'est cette dernière technique que nous avons utilisé pour caractériser les échantillons de chitosane.

### **V-2-1 Principe**

Le principe de la spectroscopie d'absorption atomique repose sur les étapes suivantes décrites par Galez, 2011 (Galez, 2011) :

Le faisceau lumineux tombe issu de sa source (lampe) tombe sur une flamme ou un four en graphite dans lequel se trouvent les atomes « cible ». Malgré la température élevée, la très grande majorité de ceux-ci sont restés à l'état fondamental. Sous l'effet du rayonnement et puisque la condition de résonance est remplie, des atomes passent de l'état fondamental à un état excité ; une partie du rayonnement est ainsi absorbé.

Le monochromateur sert à sélectionner une bande de longueur d'onde ou d'énergie au centre de laquelle se trouve la raie avec laquelle on veut travailler. Sa présence est indispensable puisque l'on peut être amené à changer de raie caractéristique pour un même élément ou à analyser un autre élément ; bien sûr, il faut, dans ce dernier cas, changer la source lumineuse. Compte tenu des longueurs d'onde et des énergies mises en jeu (voir Tableau 1), les éléments principaux des monochromateurs sont des réseaux (Galez, 2011).

Enfin un détecteur, le plus souvent un tube photomultiplicateur, mesure l'intensité transmise. Le principe de l'analyse quantitative est exactement le même que pour la spectrométrie UV/visible ou la spectrométrie infrarouge. On mesure l'intensité transmise avec échantillon,  $I$ , sans échantillon (solvant seul),  $I_0$  et on définit les grandeurs suivantes :

$$\text{La transmittance : } T = I/I_0 \quad (\text{VI})$$

$$\text{Le pourcentage d'absorption : } \%A = 100 - \%T \quad (\text{VII})$$

$$\text{L'absorbance : } A = \log(I_0/I) \quad (\text{VIII})$$

L'absorbance est la grandeur la plus utile puisqu'elle est proportionnelle à la concentration en espèce absorbante dans le domaine de validité de la loi de Beer-Lambert :

$$A = K \times l \times C \quad (\text{VIII})$$

$k$  est le coefficient d'absorption qui est une constante pour une espèce absorbante et une transition données,  $l$  est la longueur du trajet optique dans la zone où se trouve l'espèce absorbante (longueur de la flamme ou du four en graphite) et  $C$  la concentration en espèce absorbante.

## V-2 Analyse cristallographique des échantillons chitineux

La diffraction des rayons X (DRX) est utilisée dans l'étude de la cristallinité des différents matériaux. Les cristaux sont bombardés par un rayon-X monochromatique. La déviation structurée de ce rayon-X sur les cristaux permet de déterminer le taux de cristallinité, le type de cristaux et d'estimer leur taille moyenne.

L'analyse de la cristallinité des échantillons chitineux de la chitine extraite, chitosane a été réalisée.

## V-3 Microscopie Electronique à Balayage (MEB).

La microscopie électronique à balayage est une technique qui permet d'obtenir des images de surfaces de pratiquement tous les matériaux solides, à des échelles allant de celle de la loupe (x10) à celle du microscope électronique en transmission (x500.000 ou plus). Ces images frappent en premier par le rendu très parlant du relief et la grande profondeur de champ (Faerber, 2004).

Equipé de détecteurs appropriés, le MEB (Microscope Electronique à Balayage) permet de faire entre autres de la microanalyse X, analyse élémentaire locale.

Les principales caractéristiques de la microscopie électronique à balayage sont regroupées dans le tableau qui suit :

**Tableau 6 :** Caractéristiques de la Microscopie Electronique à Balayage (Faerber, 2004).

	<i>MEB</i>
<i>Informations principales</i>	-Morphologie -Effet de relief -Profondeur de champs -Grandissement de 10× à 500.000× -Imagerie de la répartition de l'inhomogénéité de composition sans identification de l'élément.
<i>Informations absentes</i>	Pas d'informations structurales autres que les formes cristallines « macroscopiques ».
<i>Résolution latérale</i>	1,2nm ultime jusqu'à 10 à 50nm en pratique. Dépendant de l'énergie du courant et du type de MEB (Source optique, détection).

# Chapitre III

## RESULTATS ET DISCUSSION

### I- CARACTERISATION DE LA CARAPACE DE CERVETTES BROYEES

Dans le tableau 7, nous avons rassemblé les valeurs obtenus pour le taux en cendres contenues, l'humidité et le taux en lipide.

Tableau 7: tableau représente les différentes valeurs obtenues

Paramètre	Matière humide
Taux de cendre (%)	45,54
Humidité (%)	7,12
Taux de lipide	1,6

### II – CINETIQUE DE DEPROTENEISATION DE LA CHITINE

La cinétique de déprotéinisation de la chitine a été suivi par l'analyse de l'azote en utilisant la balance analytique. Nous constatons que la déprotéinisation dépend de la contraction de la soude, de la durée de contact et de la puissance des micro-ondes.

Il est à noter que la cinétique est très rapide qui est due à l'effet des micro-ondes.

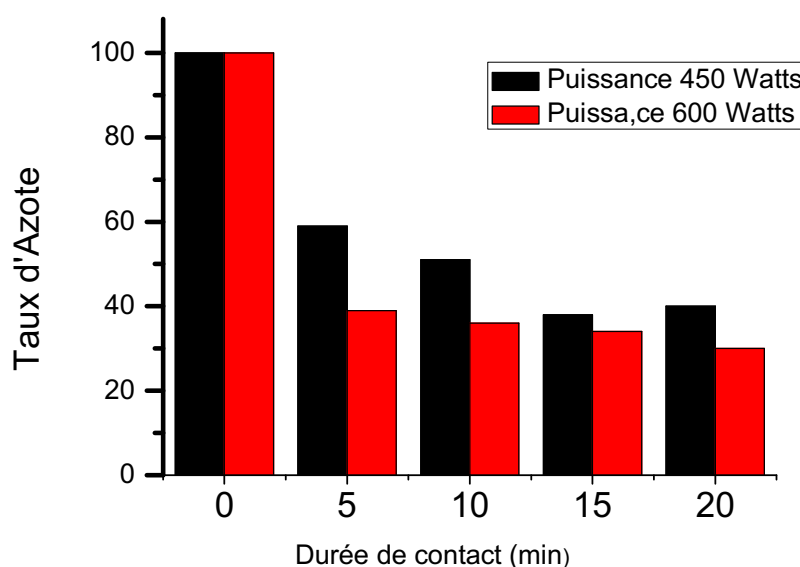


Figure 21 : taux d'élimination de l'azote pour une concentration de NaOH 1.5 N à deux puissances 450 Watts et 600 Watts.

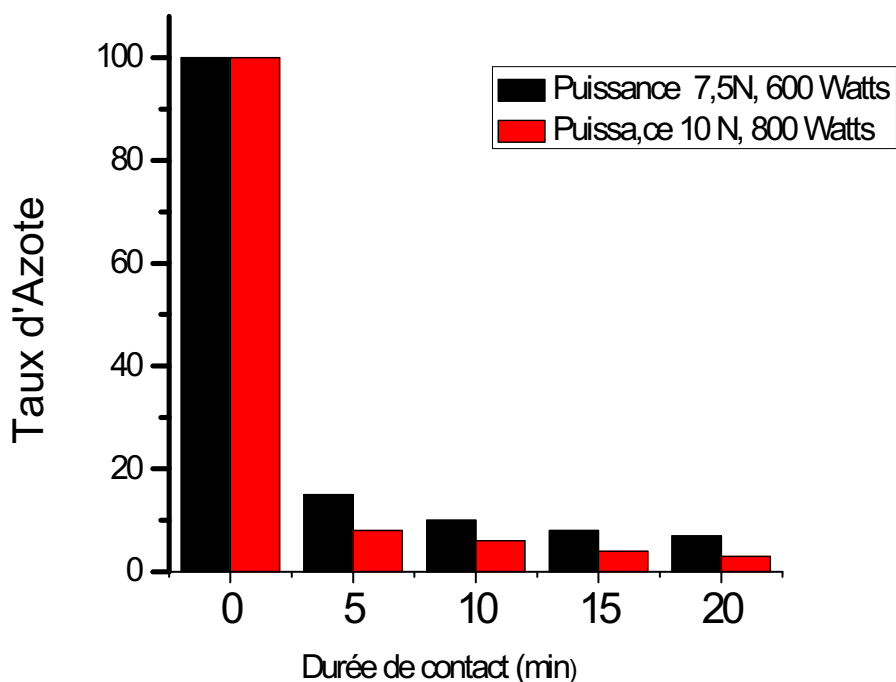


Figure 22 : taux d'élimination de l'azote pour deux concentrations de NaOH 7.5 N et 10N à deux puissances 450 Watts et 600 Watts.

### III- CARACTERISATION DU CHITOSANE

#### III-1 Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage

Les images de la figure montrent la morphologie du chitosane à différents agrandissements. La morphologie du chitosane est formée de feuillets déposés les uns sur les autres.

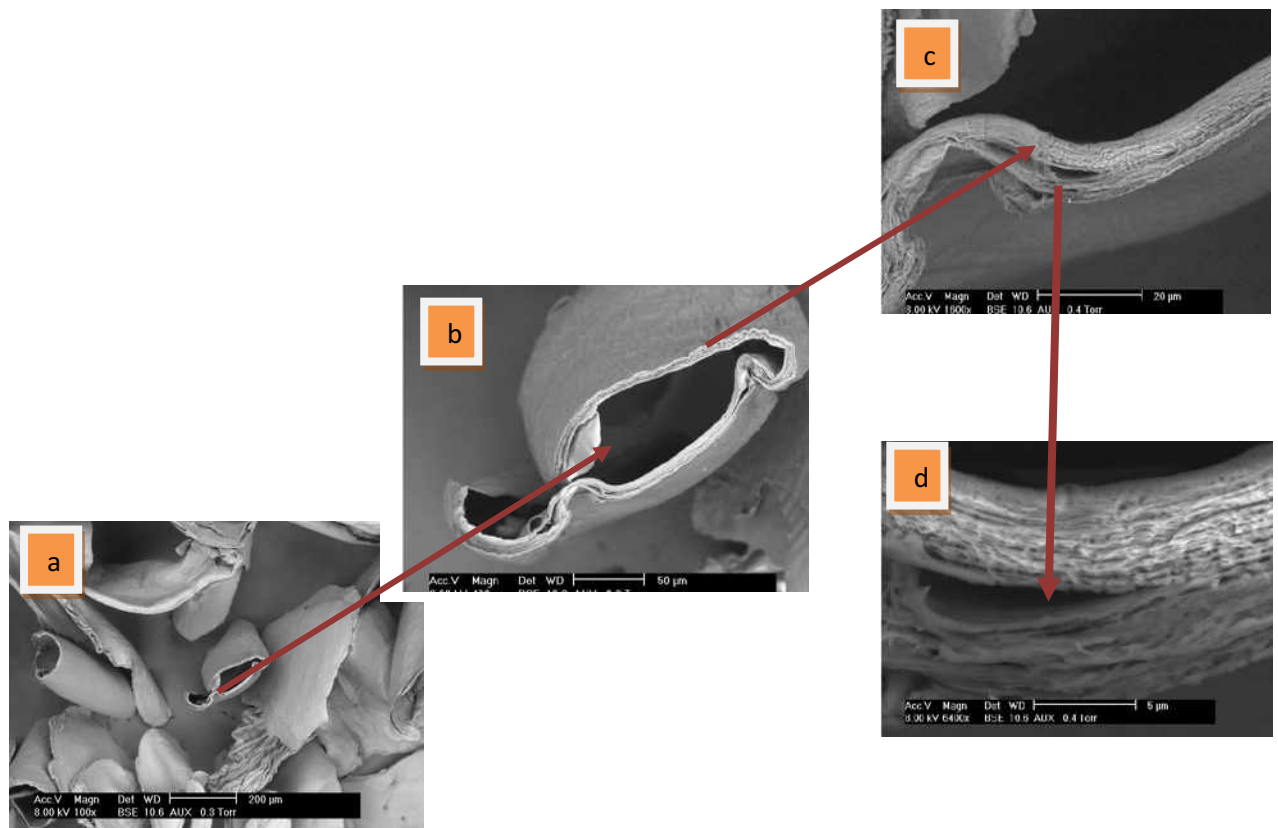


Figure 23 : Observation par MEB de l'échantillon du chitosane à différents agrandissements.

L'observation MEB (figure 20) montre que le chitosane est constitué des pores réguliers. Ils sont situés sur des plans superposés et permettent de distinguer des perforations perpendiculaires qui constituent des ouvertures traversées par des canaux. À cause de son aspect, cette structure est appelée « nids d'abeilles ». Les canaux sont formés de fibres composés de biopolymères.

### III-2- Caractérisation par diffractométrie aux RX

La figure représente deux diffractogrammes du chitosane obtenu par extraction assistée par les micro-ondes pour deux puissances.

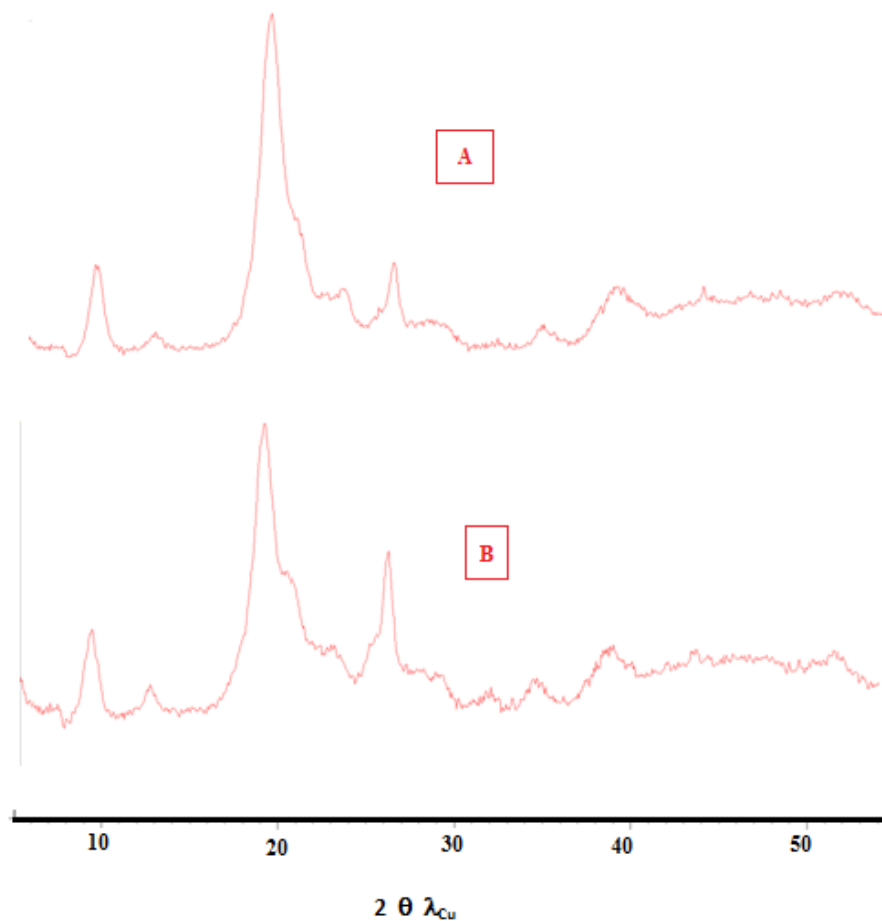


Figure 23: diffractogramme des RX des chitosanes préparés

Nous constatons que le chitosane diffracte les RX et donne l'objet à plusieurs raies caractéristiques du produit cristalline pures. Globalement, les diffractogrammes sont caractérisés par 05 raies à  $9^\circ$ ,  $12,5^\circ$ ,  $19^\circ$ ,  $21^\circ$  et  $26^\circ$  correspondantes aux distances interitriculaires 20, 110, 120, 101 et 130 . Ces résultats sont conformes aux travaux de Zhang *et al.*, (Zhang *et al.*, 2005).

Selon Gardner et Blackwell (Gardner et Blackwell, 1975), le degré de cristanillité ou indice de cristallinité de la chitine et du biopolymère du chitosane est donné par la relation suivante :

$$(\%) \text{ IC} = \frac{(I_2 - I_1)}{I_2} \times 100 \quad (\text{X})$$

Où :

- IC : Indice de cristallinité
- $I_2$  : Intensité de la raie à  $19^\circ$
- $I_1$  : Intensité de la raie à  $9^\circ$

Tableau 8 : Indice de cristallinité des chitosanes préparés.

	Chitosane A	Chitosane B
Indice de cristallinité (IC)	54,17	47,63

### III-3 Caractérisation par spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier

Cette méthode de caractérisation du chitosane par IR est basée sur la relation entre la valeur de l'absorbance (A) de l'amide primaire à  $1655 \text{ cm}^{-1}$  et celle de l'hydroxyle à  $3450 \text{ cm}^{-1}$ . Le degré de désacétylation (DD) a été calculé par l'équation (BAXTER *et al.*, 1992; KHAN *et al.*, 2002; TOKURA et NISHI, 1994).

$$\text{DD}\% = 100 - \left[ \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) * 115 \right]$$

La figure montre un spectre type d'IR d'un chitosane préparé à la concentration de NaOH 10 N à une puissance de 800 Watts.

L'attribution de principales bandes pour cet échantillon est donnée par le tableau 9.

Tableau 9 : principaux bandes IR caractéristiques du chitosane préparé.

Bandes, $\text{cm}^{-1}$	Attribution
3446, 3265	$\nu\text{OH}$ et $\nu\text{NH}$
2962, 2926, 2885	$\nu\text{C-H}$
1660	$\nu\text{C=O}$
1560, 1625	$\delta\text{N-H}$
1421	$\nu\text{C-H}$
1378, 1317	$\nu_{\text{CH}_3}$ et $\nu_{\text{CH}_2}$
1259, 1203	Aucune attribution
1115	$\nu\text{C-O-C}$
1027, 1072	$\nu\text{C-OH}$

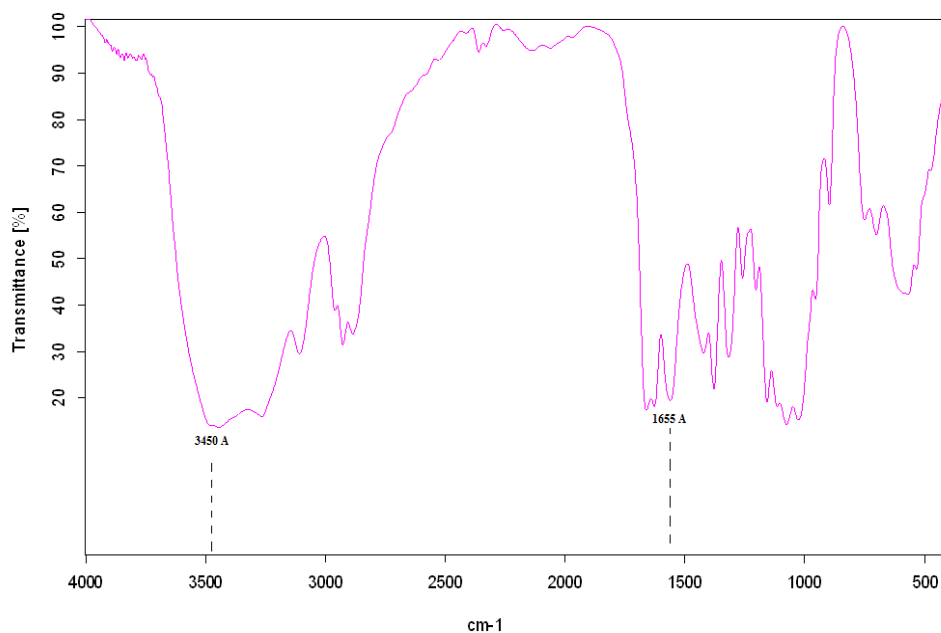


Figure 24 : spectre IR de du chitosane préparé avec du NaOH 10N à une puissance 800Watts

Sur la figure (25), nous avons représenté le degré de désacétylation de la chitine en fonction de la durée de contact pour deux concentrations de NaOH différentes (7,5 N et 10N).

Nous constatons que le degré de désacétylation dépend de la concentration de NaOH et de la durée de contact. On peut affirmer que, plus la concentration est élevée, plus le DD est

important, atteignant 90 %. De plus, il est important de noter que les micro-ondes ont comme effet d'augmenter la cinétique de désacétylation

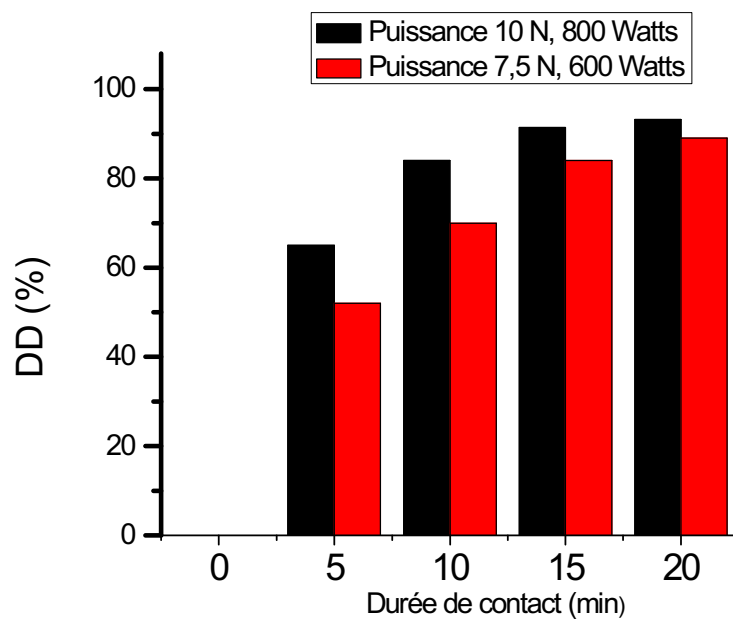


Figure 25 : Evolution du degré de désacétylation en fonction de la durée de contact.

# Conclusion

## CONCLUSION

Ce présent travail consiste à l'application d'une nouvelle procédure expérimentale pour l'extraction et l'isolation de biopolymères chitineux (chitine et chitosane) à partir des carapaces de crevette et d'autre part.

Pour y parvenir, nous avons réussi à mettre au point dispositif expérimental basé sur l'effet à micro-onde avec tous les moyens d'extraction, de chauffage et de refroidissement.

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

Après isolation des biopolymères, ces produits ont été caractérisés sur le plan morphologique, structural, textural et chimique par les techniques suivantes : Spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier (FTIR), la Diffractométrie des RX (DRX), la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) FTIR, DRX, MEB.

En conclusion, la valorisation des exosquelettes de crevettes blanche par extraction du chitosane selon la technique hydrothermochimique proposée en deux étapes permet de diminuer le temps de production d'au moins quatre fois par rapport à la technique classique en trois étapes (trois à quatre jours). De plus, la consommation de produits chimiques de digestion et d'énergie est aussi diminuée significativement. Le chitosane obtenu par cette technique en deux étapes est de bonne qualité. En effet, le degré de desacetylation est supérieur à 90 % dans les conditions optimales pour la déproteination et la desacetylation simultanée. Cette technique présente l'intérêt d'être plus simple et plus sécuritaire. Elle permettrait de produire un chitosane avec une moins grande empreinte écologique.

# Références bibliographiques

- AYER , B . YILMAZ, E . HASIR, Nesrin.** (2000) . Evaluation of chitosan as potential medical iron (III) ion adsorbent , Turk J Med Sci 30.pp 341-348.
- BEANEY, P. LIZARDI-MENDOZA, J. HEALY, M.** (2005). Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *J Chem Tech Biotechnol*, 80(2):pp 145-150.
- BHENKABOUCHE-BEKADJA,I. MOUFFOK ,S .KERRAZ,A .BOUTIBA ,Z .**(2009). Etude Préliminaire sur la Biologie et la Dynamique des populations de la Crevette Profonde *Parapenaeus Longirostris* (LUCAS ,1846) de la Façade Maritime Oranaise .*European Journal of Science Research* Vol 36 (1) ,pp 134 144.
- BORNSCHEUER UT, KAZLAUSKAS RJ .**(1995). Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew Chem-Int Edit* 2004, 43(45):pp 6032-6040.
- BOUCHON S .**(2006).Chitine, chitosan et dérivés : intérêt pharmaceutique et cosmétique. Université de Nantes, Faculté de Pharmacie.
- BRUGNEROTTO, J., J. LIZARDI, F.M. GOYCOOLEA, and M. RINAUDO.** (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polym.*, 42, pp 3569-3580.
- CAI J, YANG J, DU Y, FAN L, QIU Y, LI J, KENNEDY JF.**(2006). Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant. *Carbohydr Polym* ,64(2):pp 151-157.
- CAROLINE Creuzet, Rachel AUZELYVELTY et Marguerite RINAUDO:** Synthèse et étude d'hydrogels thermosensibles obtenus par modification chimique contrôlée du chitosane. *L'actualité chimique* N° 294- février 2006.
- CHANTEREAU P .**(1991).Traitement des crevettes contre le noircissement: Mise au point d'une ligne de traitement. In. *Archimer* .p16.
- CHAVASIT, V. et TOREES, J.A.** (1990). Chitosan-polyacrylic acid: mechanism of complex formation and potential industrial applications. *Biotechnol. Prog.*, 6. pp 2-6.
- CHEN, R.H., J. R. CHANG, and J. S. SHYUR.** (1997). Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *Carbohydr. Res.*, 299, pp 287-294.
- CRINI, G. GUIBAL, E. MORCELLET, M. TORRI, G. & BADOT , P.-M.** (2009).« Chitine et chitosane. Préparation, propriétés et principales applications». Dans G. Crini, P.-M. Badot, & E. Guibal (Éds.), *Chitine et chitosane. Du biopolymère à l'application*). Presses universitaires de Franche-comté. pp. 19-54.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUEQ

---

**DU, y. zHAO, y. Dai , s. YANG, b.** (2009). Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative food science & emerging technologies*, in press, corrected proof.

**EINBU A, VARUM KM.** (2007). Depolymerization and de-N-acetylation of chitin oligomers in hydrochloric acid. *Biomacromolecules*, , 8(1):pp 309-314 .

**ESAIASSEN, M. MYRNES ,B. OLSEN, RL .** (1996). Isolation and substrate specificities of five chitinases from the Hepatopancreas of Northern shrimp, *Pandalus borealis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, , 113(4).pp717-723.

**FAO:** Production mondiale - Ratio pêche/aquaculture : exemple des crevettes, 2006  
[<http://aquaculture.ifremer.fr/Statistiques-mondiales/Stats-crustaces/Production-mondiale>]

**FAO:** SOFIA - The state of world fisheries and aquaculture, In. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2008.p 196 .

**FAO:** SOFIA - The state of world fisheries and aquaculture. In. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2010: p 218.

**FABRITIUS, H-O. SACHS, C. TRIGUERO, PR. RAABE, D.** (2009). Influence of Structural Principles on the Mechanics of a Biological Fiber-Based Composite Material with Hierarchical Organization: The Exoskeleton of the Lobster *Homarus americanus*. *Advanced Materials*, 21(4).pp 391-400.

**FANG,N. CHAN,V. MAO,H.Q. & LEONG, K. W.**( 2001). Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromol.*, 2.pp1 161-1168.

**GAGNE, N. SIMPSON, BK.**(1993). Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnology*,7. pp 253-263.

**GILBERG, A. STENBERG, E.** (2011). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochem*,2001, 36(8-9):809-812  
GLOBEFISH: Shrimp - August [<http://www.globefish.org/shrimp-august-2011.html>]

**GRASSE, PP . FOREST , J .** (1994 ). *Traité de zoologie : anatomie, systématique, biologie ; Tome VII : Crustacés, fascicule 1 : morphologie, physiologie, reproduction, embryologie ; Editions Masson; p917 .*

**GREGORIO CRINI , Pierre-Marie BADOT.** (2007). Application of chitosan , a natural aminopolysaccharide , far dye removal from aqueous solution by adsorption processes using batch studies ,*Prog .polym .Sci.*

**HERTH, W. BARTHLOTT, W.** (1979) . Site of Beta-Chitin Fibril Formation in Centric Diatoms. 1.Pores and Fibril Formation. *Journal of Ultrastructure Research*, 68(1). pp 6-15.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUEQ

---

**JAOUEN , D .** (1994). chitine , Chitosane et Dérivés , PhD thèse en pharmacie ,Université d'angers, Angers (France ) .

**JEUNIAUX ,C .VOSS-FOUCART ,M,F.**(1991). Chitine biomas and production in the marine environment .*Biochemical Systematics and Ecology* ,19,No 5. pp 347-356.

**KAFETZOPOULOS ,D. MARTINO, A. BOURTIOTIS, V.** Bioconversion of Chitin to Chitosan - Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(7). pp 2564-2568.

**KARINE LE ROUX .**( 2012). Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*. Caractérisations des produits et optimisation du procédé. Université de Nantes .p 41.

**KASAAI, M. R., J. Arul, S. L. Chin et G. Charlet.** (1999). The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, 120. pp 201-205.

**KHANAFARI ,A. MARANDI ,R. SANATEI, S .**( 2008). Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iran J Environ Health Sci Eng* , 5(1).pp 19-24.

**KIM, s.k. RAJAPAKSE , n. SHAHIDI, f.** (2008b). Production of bioactive chitosan oligosaccharides and their potential use as nutraceuticals. in: c.s. barrow, f (ed.) marine nutraceuticals and functional foods. nutraceutical science and technology, new york, pp. 183-196.

**LANG, G., CLAUSENI, T.** (1989). The use of chitosan in cosmetics. In: Skjak-Braek, G., Thorleif Anthosen, T., Standford, P. (Eds.), *Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications*. Elsevier Applied Science, London and New York . pp 139–147.

**LATROUITE, D . BARABAROUX, O. MRIZUR, Y ; PATROIS, J.** (2008). Trésors de la mer : les crustacés. Ed : quae , Ed : neva.p103.

**LAVALL,R-I.ODILIO, B.G.ASSIS . Sérgio P.Compana –Filho.,** (2007).B-chitin from the pens of *Loligo* sp.:Extraction and characterization .*Bioresource Technology* ,98 ,pp 2465-2472.

**LEE, c.g. DA SILVA , c.a. LEE, j-y. hartl, d. elias, j.a.,** (2008). chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *current opinion in immunology*, 20, pp 684-689.

**LUCIE Berger**-établissement scolaire de Strasbourg [en ligne] ; adresse URL : [http://www.lucieberger.org/Option\\_Sciences\\_2e/Option\\_sciences\\_2e\\_JCP/Zoologie/13%20Crevette/Crevette.jpg](http://www.lucieberger.org/Option_Sciences_2e/Option_sciences_2e_JCP/Zoologie/13%20Crevette/Crevette.jpg) (page consultée le 19 juillet 2009).

**MAGHAMI , G. G., and G. A. F. ROBERTS.** (1988). Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Die Makromolekulare Chemie*, 189 (1), pp 195-200.

- MARTINO A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V.**( 1995). Chitin Deacetylation by Enzymatic Means -Monitoring of Deacetylation process. *Carbohydr Res* , 273(2):pp 235-242.
- MARTINO ,A. BOURIOTIS ,V. STOKKE, BT. VARUM, KM:** (1998). Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on partially N-acetylated chitosans. *Carbohydr Res* , 311(1-2).pp 71-78.
- MOKRANI .** (2012) .Préparation et étude de comportement de membrane biopolymères Alginate de sodium / chitosane .faculté des sciences de ingénieur, UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES. p30.
- MUZZARELLI, R.A.A.** (1977). Chitin; Pergamon: Oxford..
- MUZZARELLI, R.A.A.**(1996).Chitosan-based dietary foods. *Carbohydr. Polym.*, 29, 309-316.
- NGO, d.-n. IEE, s.-h. KIM, m.-m. KIM, s.-k..** (2009). production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in raw 264.7 cells. *journal of functional foods*, 1. pp188-198.
- NO, H.K., S.P. MEYERS, and K.S. LEE.** (1989). Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *J. Agric. Food Chem.*, 37. pp 575-579.
- NO, H.K. and MEYRES, S.P.** (1995). Preparation and characterization of chitin and chitosan. A review. *J. Aquatic Food Prod. Tech.*, 4, pp 27-52.
- NO HK, HUR EY.** (1998). Control of foam formation by antifoam during demineralization of crustacean shell in preparation of chitin. *J Agric Food Chem* , 46(9): pp 3844-3846.
- NOUAR, A.,** (1885). Contribution à l'étude de la crevette *Peneide Parapenaeus Logirostris* ( Lucas ,1985 ) dans la région d'Alger :Ecologie ,Biologie et exploitation .
- NUGRAHA EDHI Suyatama .**( juin 2006). développement de films biodégradables a base de chitosane: études du mélange chitosane/Pla, de la plastification et de la comptabilisation. Thèse de doctorat, université de Reims,.
- PETER, M.G.** (1995). Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J.M.S.- Pure Appl. Chem.* A32, pp 629-640.
- PILLAI, CKS. PAUL, W. SHARMA, CP.** (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci* , 34(7).pp 641-678.
- Raabe D, Sachs C, Romano P:** (2005) The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. *Acta Mater* , 53(15):pp 4281-4292.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUEQ

---

**RAO, MS. YEIN, KA. TRUNG ,TS. STEVENSt, WF.** (2007). Optimum parameters for production of chitin and chitosan from squilla (*S. empusa*). *J Appl Polym Sci*, , 103(6): PP 3694-3700.

**RASMUSSEN, r.s.m** .(2008). chitin and chitosan. in: c.s. barrow, f. (ed.) marine nutraceuticals and functional foods. nutraceutical science and technology, new york, pp. 155-182.

**RINAUDO, M.** (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7). pp 603-632.

**RINAUDO M.** (2008).Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym Int*, 57(3):pp 397-430.

**ROER , R. Dillaman, R.** (1984) The Structure and Calcification of the Crustacean Cuticle. *American Zoologist*, , 24 (4):pp 893-909.

**ROBERTS , G.A.F.** (1992) . Structure of chitin and chitosan. In: Chitin chemistry, edited by G.A.F. Roberts. Mac Millan Press. Houndmills. pp. I-53.

**ROUSSY . J, Vooren .M. V, Dembsey . B. A, Guibal , E.** (2005) . “influence of chitosane characteristics on the coagulation and of flocculation of bentonite suspension” . *water research* 39.pp 3247 -3258 .

**RUSHING Pan, J., C. HUANG , S. CHEN et Y.C. CHUNG.** (1999). Evaluation of a modified chitosan biopolymer for coagulation of colloidal particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng.Asp.* 147 (3) . pp 359-364.

**SANDROFD, P.** (1989). Chitosan: commercial uses and potential applications. In: Skjak-Braek, G., Anthosen, T., Standford, P. (Eds.), Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications. Elsevier Applied Science, New York. pp. 51–69.

**SINI, TK. Santhosh S, Mathew PT.**( 2007). Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydr Res*, , 342(16):pp 2423-2429.

**SENG, J.-M.** (1988). Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur*, ,9 . pp 40-44.

**SHAHIDI, F., J.K.V. Arachi and Y.J. Jeon.** (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Tech.*, 10. pp 37-51.

**SHIMOJOH M, Fukushima K, Kurita K:** (1998) Low-molecular-weight chitosans derived from beta-chitin: preparation, molecular characteristics and aggregation activity. *Carbohydr Polym*, , 35(3-4). pp 223-231.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUEQ

---

**SYNOWIECHI J, AL-KHATEEB, NA.**(2003). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr*, , 43(2). pp 145-171.

**SYNOWIECKI J, AL-KHATEEB N.** (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chem*, , 68(2) .pp 147-152.

**TENG WL, KHOR E, TAN TK, LIM LY, TAN SC.** (2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydr Res*, 332(3):pp 305-316.

**TOLIMATE, A., J. DESBRIERES , M. RHAZI and A. ALAGYUI.** (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polym.*, 44, pp 7939-7952.

**Tsigos ,I. Martinou ,A. Kafetzopoulos, D . Bouriotis, V.**(2000). Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol*, , 18(7): pp 305-312.

**TOKURA, S. TAMURA , H.**(2007). Chitin and Chitosan. In: *Comprehensive Glycoscience*. Edited by Johannes PK. Oxford: Elsevier. pp 449-475.

**VALIERGUE, J .**(2001). Cours sur les crustacés ; classe préparatoire aux écoles nationales vétérinaires ; Marmilhat .

**VINCENT, JFV.** (2002). Arthropod cuticle: a natural composite shell system. *Compos Pt A- Appl Sci Manuf*, , 33(10). pp 1311-1315

**WANG, SL; CHIO, SH.** (1998 ) .Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Enzyme Microb Technol*, , 22(7):pp 629-633.

**WANG, S.l. IIN, H.t. IANG, T.w. CHEN, Y.z. YEN, Y.h.; GUO, S.p.** (2008) b.reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. *bioresource technology*, 99, pp 4386- 4393.

**WANG S-L, LIANG T-W, Yen Y-H.** (2011).Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydr Polym*, , 84(2).pp 732-742.

**YANG,B.Y. & MONTGOMERY,R.** (2000).Degree of acetylation of heteropolysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 323. pp 156-162.

**ZAKARIA Z, HALL GM, SHAMA G.** (1998). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochem* , 33(1).pp 1-6 .