

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 المتعددة التقنيات

École Nationale Polytechnique

Département de Génie des Procédés et Environnement

Laboratoire de Recherche en Bioengineering et Génie des Procédés



Mémoire de Projet de Fin d'Études pour l'obtention du Diplôme
d'Ingénieur d'État en Génie des Procédés et Environnement

Intitulé

Production de biopolymère à partir d'une biomasse marine par voie microbienne

Présenté par : **SERHANE Asma**

Sous la Direction de **Mme SALAH Rym MCA**

Présenté et soutenu publiquement le 29/06/2026

Composition du jury :

Président	M. Yacine KERCHICH, Professeur, ENP
Promoteur	Mme Rym SALAH, MCA, ENP
Examineur	Mme Naima DJELLOULI, MCB, ENP

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 المتعددة التقنيات

École Nationale Polytechnique

Département de Génie des Procédés et Environnement

Laboratoire de Recherche en Bioengineering et Génie des Procédés



Mémoire de Projet de Fin d'Études pour l'obtention du Diplôme
d'Ingénieur d'État en Génie des Procédés et Environnement

Intitulé

Production de biopolymère à partir d'une biomasse marine par voie microbienne

Présenté par : **SERHANE Asma**

Sous la Direction de **Mme SALAH Rym MCA**

Présenté et soutenu publiquement le 29/06/2026

Composition du jury :

Président	M. Yacine KERCHICH, Professeur, ENP
Promoteur	Mme Rym SALAH, MCA, ENP
Examineur	Mme Naima DJELLOULI, MCB, ENP

ملخص

في إطار الانتقال نحو الاقتصاد الدائري واعتماد عمليات أكثر صديقة للبيئة، يُشكّل تثمين المنتجات الثانوية لصناعة الصيد البحري حلاً واعداً للحد من الأثر البيئي وإنتاج منتجات حيوية عالية القيمة. ومن بين هذه المنتجات الثانوية، تُعتبر قشور السرطان مصدراً رئيسياً للكيتين، وهو بوليمر حيوي طبيعي يمكن تحويله إلى كيتوزان واستخدامه في مختلف القطاعات الصناعية، بما في ذلك الصناعات الغذائية والطبية ومعالجة المياه والأدوية، نظراً لخصائصه الفيزيوكيميائية.

تركز هذه الدراسة على استخلاص الكيتين من قشور السرطان عبر التخمير باستخدام بكتيريا *Streptococcus thermophilus*، يليه تحويله إلى كيتوزان عبر التخمير باستخدام خميرة *Saccharomyces cerevisiae*. يتكون الوسط الغذائي من عصير التمر كمصدر للكربون وعصير رأس السردين كمصدر للنيتروجين. أظهرت التحاليل الكيميائية أن قشور السرطان تتكون من 29% كيتين، و25% بروتينات، و46% معادن. وقد تم استخدام الكيتين المستخلص لتحضير الكيتوزان بدرجة نزع أسيتيل تبلغ حوالي 50%.

الكلمات المفتاحية: قشور السرطان، تمر، رؤوس السردين، تخمير، *Streptococcus thermophilus*، *Saccharomyces cerevisiae*، كيتين، كيتوزان، إزالة المعادن، إزالة البروتينات، نزع الأسيتيل.

Abstract

As part of the transition towards a circular economy and the adoption of more environmentally friendly processes, valorizing by-products from the fishing industry presents a promising solution to reduce environmental impact and produce high-value bioproducts. Among these by-products, crab shells are a major source of chitin, a natural biopolymer that can be converted into chitosan and used in various industrial sectors, including agri-food, medicine, water treatment, and pharmaceuticals, owing to its physicochemical properties.

This study focuses on extracting chitin from crab shells via fermentation with the bacterium *Streptococcus thermophilus*, followed by its conversion to chitosan via fermentation with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The culture medium consists of date must as a carbon source and sardine head must as a nitrogen source. Chemical characterization revealed that crab shells are composed of 29% chitin, 25% proteins, and 46% minerals. The extracted chitin was used to prepare chitosan with an approximately 50% degree of deacetylation.

Keywords: Crab shells, dates, sardine heads, fermentation, *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, chitin, chitosan, demineralization, deproteinization, deacetylation.

Résumé

Dans le cadre de la transition vers une économie circulaire et de l'adoption de procédés plus respectueux de l'environnement, la valorisation des coproduits issus de l'industrie halieutique constitue une solution prometteuse pour réduire l'impact environnemental et produire des biomatériaux à forte valeur ajoutée. Parmi ces coproduits, les carapaces de crabes constituent une source majeure de chitine, un biopolymère naturel pouvant être transformé en chitosane et utilisé dans divers secteurs industriels, notamment l'agroalimentaire, la médecine, le traitement des eaux et la pharmacie, en raison de ses propriétés physico-chimiques.

Cette étude porte sur l'extraction de la chitine à partir des carapaces de crabe par fermentation à l'aide de la bactérie *Streptococcus thermophilus*, puis sur sa transformation en chitosane par fermentation à l'aide de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le milieu de culture est composé de moût de dattes comme source de carbone et de moût de têtes de sardine comme source d'azote. La caractérisation chimique a révélé que les carapaces de crabe sont composées de 29 % de chitine, 25 % de protéines et 46 % de minéraux. La chitine extraite a servi à la préparation d'un chitosane présentant un degré de désacétylation de l'ordre de 50 %.

Mots-clés: Carapaces de crabes, dattes, têtes de sardines, fermentation, *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, chitine, chitosane, déminéralisation, déprotéinisation, désacétylation.

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier ALLAH, le Tout-Puissant, de m'avoir donné la foi, la force et la patience pour le mener à bien.

Je tiens à remercier mes chers parents, mes sœurs et mon frère, ainsi que toute ma famille, pour leur soutien indéfectible, leurs encouragements et leur patience durant toute cette période

Je remercie également mon encadrante, Mme SALAH Rym pour son accompagnement précieux tout au long de la réalisation de ce travail. Je la remercie sincèrement pour ses conseils avisés, sa disponibilité, son soutien, ses orientations, ses encouragements et sa confiance tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur le Président du Jury, M. KERCHICH Yacine, et Mme DJELLOULI Naima, qui étaient également mes enseignants durant mon cursus, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail.

Je tiens également à remercier sincèrement M. Mohammedi ASSALI, technicien de laboratoire, pour son aide précieuse et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce travail.

J'adresse une pensée toute particulière à mes chers camarades de la promotion GPE. Merci pour ces années de partage, de solidarité et de soutien mutuel, qui ont rendu ce parcours aussi enrichissant qu'inoubliable. Les liens que nous avons tissés, les défis que nous avons relevés ensemble et les précieux souvenirs que nous avons créés resteront gravés dans ma mémoire.

Enfin, mes remerciements vont aussi à toute l'équipe qui m'a accueilli et soutenu, ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, de manière importante ou modeste, à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à moi-même pour tous les efforts que j'ai fournis tout au long de mes études

Ce parcours n'a pas toujours été facile mais j'ai fait preuve de patience, de motivation et de persévérance pour continuer et ne pas abandonner.

Il y a eu des moments de doute et de fatigue, mais j'ai toujours essayé de rester forte et de croire en mes capacités.

Aujourd'hui je suis fière du chemin que j'ai parcouru et des expériences que j'ai vécues.

À ceux qui ont illuminé mon chemin... je dédie cette réussite :

À mon cher père MESSAOUD

Celui qui je suis fière de porter le nom

Celui qui m'a appris la valeur de la persévérance, du travail noble et de marcher sur le bon chemin.

Celui qui a toujours été mon plus grand soutien et la lumière qui a guidé mes pas vers la réussite.

Toute ma gratitude et ma reconnaissance à celui dont la fierté a toujours été ma force dans la vie.

À ma chère mère GHANIA

Ma source de tendresse et de prières, celle dont le cœur prie pour moi jour et nuit.

À celle dont les yeux ont toujours veillé sur mes pas avec amour dans chaque épreuve.

Tu as toujours cru en moi, même dans mes moments de doute, et tu m'as donné la force de continuer. Tes sacrifices, ta patience et tes prières ont été ma force.

À toi, ma chère mère, tout mon amour et ma fidélité.

À mes sœurs Hadjer, Selma, Alaa et frère Abdellah

Mon soutien après DIEU, les fleurs de ma vie, mes compagnons d'enfance et les mains que je trouvais avant même de demander. Vous avez toujours été une source de force pour moi, une raison de ma persévérance dans les moments les plus difficiles. Votre présence a été une grande source de joie pour moi.

Et à toute personne qui a semé une belle parole dans mon cœur, ou soutenu un de mes pas, ou simplement dit : « Tu peux le faire »...

à vous tous, mes sincères remerciements et ma gratitude.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

INTRODUCTION GÉNÉRALE	13
-----------------------------	----

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1. Généralités sur des coproduits issus des crustacés	16
1.1. Définition et classification des coproduits marins	16
1.2. Origine et disponibilité des déchets de crustacés	16
1.3. Analyse de la consommation mondiale des crustacés	17
1.4 Enjeux environnementaux et socio-économiques associés.....	18
1.5 Stratégies de valorisation biotechnologique	19
2. Chitine	20
2.1. Définition	20
2.2. Structure chimique	21
2.2.1. Type α -chitine	21
2.2.2. Type β -chitine	22
2.2.3. Type γ	22
2.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques	23
2.3.1. Propriétés physico-chimiques	23
2.3.1.1 Teneur en azote	23
2.3.1.2 Indice de cristallinité et solubilité	23
2.3.1.3 Degrés d'acétylation et de désacétylation	23
2.3.1.4 Masse molaire.....	23
2.3.2. Propriétés biologiques.....	23
2.3.2.1 Activité antimicrobienne	24
2.3.2.2 Activité antioxydante	24
2.3.2.3 Propriétés mucoadhésives	24
2.4. Sources de chitin	24
2.4.1. Crustacés	25
2.4.2. Insectes	25
2.4.3. Champignons	25
2.4.4. Mollusques et autres organismes	26
2.5. Procédés chimiques d'extraction de la chitine	26
2.5.1. Déprotéinisation chimique	26

2.5.2. Déminéralisation chimique	26
2.5.3. Décoloration	27
2.6. Approches biotechnologiques d'extraction de la chitine	27
2.6.1. Méthode enzymatique	27
2.6.2. Méthode de fermentation	28
2.7. Comparaison des procédés chimiques et biologiques	28
2.8. Domaines d'applications	29
2.8.1. Domaine Médical	29
2.8.2. Applications environnementales	30
2.8.3. Applications agricoles	31
3. Chitosane	32
3.1. Définition	32
3.2. Structure chimique	33
3.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques	33
3.3.1. Propriétés physico-chimiques	34
3.3.1.1 Degré de désacétylation	34
3.3.1.2 Solubilité	34
3.3.1.3 Viscosité	35
3.3.1.4 Masse moléculaire	35
3.3.2 Propriétés biologiques	35
3.3.2.1 Biocompatibilité et toxicité	35
3.3.2.2 Biodégradabilité et activité biologique	36
3.4. Domaines d'application	36
3.4.1. Applications biomédicales	36
3.4.2. Applications antimicrobiennes	37
3.4.3. Applications alimentaires	37
3.4.4. Application au traitement de l'eau et à l'adsorption	37
3.4.5. Applications en biocatalyse	37
3.5. Production du chitosane	38
3.5.1. Production thermochimique du chitosane	38
3.5.2. Production enzymatique du chitosane	39

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Matériel	41
1.1. Équipement	41

1.2. Matériel biologique	42
1.2.1. Souches microbiennes	42
1.2.2. Carapaces	42
1.2.3. Dattes	42
1.2.4. Têtes de sardines	42
2. Méthodes	43
2.1. Préparation du broyat de carapaces	43
2.2. Préparation du moût de dattes	43
2.3. Préparation du moût de têtes de sardines	44
2.4. Isolement de la bactérie <i>Streptococcus thermophilus</i>	44
2.5. Préparation de l'inoculum	45
2.6. Extraction de la chitine	45
2.7. Préparation du chitosane	45
2.8. Analyse chimique des carapaces et des polymères	46
2.8.1. Détermination du pH	46
2.8.2. Mesure de la masse volumique	46
2.8.3. Détermination de la teneur en cendres	46
2.8.4. Calcul du taux de déminéralisation (%DM)	47
2.8.5. Détermination de l'azote Kjeldahl	47
2.8.5.1 Minéralisation.....	47
2.8.5.2 Distillation	48
2.8.5.3 Titration	48
2.8.6. Détermination du taux de déprotéinisation (%DP).....	48
2.8.7. Détermination du degré de désacétylation (DD).....	49
2.8.7.1 Par dosage conductimétrique	49
2.8.7.2 Par dosage pH-métrique	50

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Caractérisation chimique des carapaces de crabes	52
1.1. Mesure du pH	52
1.2. Masse volumique	52
1.3. Teneur en cendres	53
1.4. Teneur en protéines	53
2. Identification de la bactérie <i>Streptococcus thermophilus</i>	54
3. Caractérisation chimique de la chitine	55

3.1. Mesure du pH début et en fin de fermentation	55
3.2. Taux de déminéralisation et de déprotéinisation	56
4. Caractérisation chimique de la chitosane	57
4.1. Mesure du pH en début et en fin de fermentation	57
4.2. Degré de désacétylation (DD)	58
4.2.1. Dosage pH-métrique	58
4.2.2. Dosage conductimétrique	60

Chapitre 4: Étude technico-économique

1. Contexte et objectifs de l'étude	63
2. Analyse du marché	63
2.1. Marché mondial du chitosane	63
2.2. Prix de marché par grade	64
2.3. Opportunité algérienne	64
3. Procédé et résultats expérimentaux	65
4. Dimensionnement — Bilan matière annuel	65
4.1. Emprise foncière	66
4.2. Principaux équipements	66
5. Estimation du CAPEX (Investissement initial) — en DZD	66
6. Estimation de l'OPEX (Charges annuelles) — en DZD	67
7. Analyse de rentabilité préliminaire	69
8. Risques et recommandations	70
8.1. Risques principaux	70
8.2. Recommandations	70

Conclusion générale et perspectives.....	73
---	-----------

Références bibliographiques.....	76
---	-----------

Liste des tableaux

Tableau II.1: Matériels et réactifs utilisés.....	41
Tableau III.1 Caractères macroscopiques des colonies isolées	55
Tableau III.2 Valeurs du pH du milieu avant et après la fermentation permettant l'extraction de la chitine	55
Tableau III.3 Résultats des teneurs en cendres, en protéines, en azote, taux de déminéralisation et taux de déprotéinisation de la chitine	56
Tableau III.4 Valeurs du pH du milieu avant et après fermentation du chitosane	57
Tableau IV.1 : Perspectives d'évolution du marché mondial de la chitine et du chitosane et croissance des principaux segments d'application.....	63
Tableau IV.2 : Valeurs commerciales indicatives de la chitine et du chitosane selon le grade de qualité.....	64
Tableau IV.3 : Estimation des dépenses d'investissement (CAPEX) pour l'implantation d'une unité pilote de production de chitosane.....	66
Tableau IV.4 : Estimation des dépenses annuelles d'exploitation (OPEX) de l'unité de production de chitosane.....	67
Tableau IV.5 : Évaluation de la rentabilité économique du procédé de production de chitosane et analyse de sensibilité.....	68

Liste des figures

Figure I.1 : Principaux composés extraits à partir de carapaces de crustacés par des technologies non thermiques (SFE : Extraction par Fluide Supercritique ; HPE : Extraction Haute Pression ; HPP : Traitement à Haute Pression ; PEF : Champs Électriques Pulsés ; EAU : Extraction Assistée par Ultrasons)	20
Figure I.2 : Structure chimique de la chitine	21
Figure I.3 : Configurations alpha (A) et bêta (B) de la chitine	22
Figure I.4: Teneur approximative en chitine de divers organismes	26
Figure I.5 : Structure chimique du chitosane	33
Figure II.1: Pinces de crabes brutes (a), séchées (b) et broyées (c)	43
Figure II.2 : Dattes dénoyautées (a), bouillies (b) et moût de dattes filtré prêt à l'emploi (c)	44
Figure II.3 : Têtes de sardines lavées (a), bouillies (b) et moût des têtes de sardines filtré prêt à l'utilisation (c)	44
Figure II.4 : Résidus d'incinération obtenus	47
Figure III.1: Colonies de la flore lactique de yaourt après incubation.....	54
Figure III.2: Coloration de gram de la bactérie.....	55
Figure III.3 : Dosage pH-métrique du chitosane	58
Figure III. 4 : Dérivées secondes du dosage pH-métrique du chitosane	59
Figure III.5 : Dosage conductimétrique du chitosane	60
Fifure IV.1: Estimation des flux annuels de matières premières, de produits et d'effluents du procédé intégré de production de chitosane.....	66

Liste des abréviations

CAPEX : Capital Expenditure.

DA : Degré d'acétylation.

DD : Degré de désacétylation.

ETEP : Étude Techno-Economique Préliminaire.

IRTF : Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier.

MM : Masse molaire.

OPEX : Operating Expenditure.

TCAC : Taux de Croissance Annuel Composé.

Introduction

Générale

Introduction générale

La transition vers une économie circulaire et le développement de technologies durables sont aujourd'hui des défis majeurs pour les secteurs scientifique et industriel. La raréfaction des ressources fossiles, la pollution accrue et la prolifération des déchets non biodégradables soulignent l'importance de valoriser les biomasses renouvelables. Celles-ci offrent une alternative prometteuse pour réduire l'impact environnemental et favoriser une gestion durable des ressources naturelles. Dans ce cadre, l'intérêt pour les ressources marines croît, notamment en raison de leur richesse en biomolécules exploitables et de leur potentiel pour le développement de procédés de bioconversion et de bioraffinerie [1].

Parmi les ressources marines exploitables, les coproduits issus de l'industrie de la transformation des produits marins constituent une ressource importante, mais encore sous-utilisée. La pêche, l'aquaculture et la transformation industrielle des crustacés génèrent de grandes quantités de résidus organiques, tels que les carapaces, têtes, et autres fractions non consommées. Ces déchets posent aujourd'hui de graves enjeux environnementaux, en raison de leur accumulation, des coûts pour leur élimination, et des risques de pollution liés à leur forte teneur en matière organique biodégradable [2]. Cependant, ces déchets marins constituent une ressource biologique précieuse, en raison de leur richesse en composés à forte valeur ajoutée. Les carapaces de crustacés sont des matrices naturelles complexes, composées principalement de chitine, de protéines, de minéraux tels que le carbonate de calcium, ainsi que de pigments et d'autres biomolécules bioactives. La chitine, le principal polysaccharide structurant de ces carapaces, est le deuxième biopolymère naturel le plus abondant après la cellulose. La présence d'azote fixé biologiquement au sein de sa structure renforce encore l'intérêt de sa valorisation pour la fabrication de composés chimiques et de biomatériaux innovants [3].

L'extraction classique de la chitine et du chitosane repose sur des procédés chimiques impliquant des traitements de déminéralisation et de déprotéinisation à l'aide d'acides et de bases concentrés, souvent à des températures élevées. Bien que ces méthodes soient efficaces pour isoler le polymère, elles présentent plusieurs limites importantes. En effet, ces traitements chimiques peuvent entraîner une dépolymérisation partielle de la chitine, ce qui affecte des propriétés essentielles telles que la masse moléculaire, la viscosité et le degré d'acétylation. De plus, ces procédés nécessitent une forte consommation d'énergie et génèrent

d'importantes quantités d'effluents chimiques potentiellement nocifs pour l'environnement [4].

Face à ces contraintes, les recherches actuelles se tournent vers des stratégies biotechnologiques plus durables et respectueuses de l'environnement. La bioextraction utilisant la fermentation microbienne, les enzymes protéolytiques, et les technologies vertes se présentent comme des alternatives prometteuses aux méthodes chimiques traditionnelles. Ces techniques contribuent à diminuer l'usage de réactifs nocifs, à réduire l'impact écologique, et à mieux préserver les propriétés structurales de la chitine extraite. Elles s'inscrivent dans une démarche globale de valorisation durable des biomasses marines et de développement d'une bioéconomie circulaire [5, 6].

L'objectif de l'étude est d'apporter une contribution à la valorisation des ressources naturelles, en recourant à un procédé écoresponsable et performant d'extraction de chitine à partir des carapaces de crabes, ainsi qu'à des déchets de dattes et à des têtes de sardines. La chitine obtenue sert à produire un biomatériau doué de nombreuses propriétés, à savoir le chitosane. Pour ce faire, la voie microbienne, économique et respectueuse de l'environnement, a été retenue.

Cette étude est structurée en quatre chapitres principaux :

1. Un premier chapitre constitue la partie bibliographique qui présente et développe les différents aspects de l'étude.
2. Un deuxième chapitre couvre la partie pratique, dans laquelle le matériel et les méthodes utilisés sont détaillés.
3. Un troisième chapitre présente les résultats obtenus ainsi que leur discussion.
4. Un quatrième chapitre présente une étude technico-économique préliminaire.

Le document se termine par une conclusion qui résume les principaux résultats et énumère quelques perspectives de recherche.

Chapitre 1 :

Revue bibliographique

1. Généralités sur des coproduits issus des crustacés

Les industries de crevettes, de crabes et d'homards génèrent chaque année des millions de tonnes de coproduits (coquilles, têtes, carapaces et viscères). Ces flux, longtemps considérés comme des déchets, sont aujourd'hui perçus comme des ressources riches en biomolécules d'intérêt [7].

1.1. Définition et classification des coproduits marins

Les coproduits issus des crustacés correspondent aux fractions non consommées générées après les opérations de transformation industrielle des crevettes, des crabes, des homards et d'autres espèces apparentées. Ils comprennent principalement les carapaces, les têtes, les pattes, les queues et les viscères [8, 9].

Ces coproduits présentent une composition biochimique particulièrement intéressante. Ils contiennent principalement de la chitine, des protéines, des minéraux (essentiellement du carbonate de calcium), des lipides et des pigments naturels, notamment l'astaxanthine. Cette richesse chimique explique leur intérêt croissant dans plusieurs secteurs industriels [10]. Ils sont perçus comme une biomasse marine prometteuse pour la valorisation, plutôt que comme de simples déchets industriels. Leur composition riche en biomolécules en fait une ressource clé pour développer des produits à forte valeur ajoutée. Des travaux récents montrent que leur exploitation s'inscrit dans une démarche d'économie circulaire, visant à réduire l'impact environnemental, et leur application dans les secteurs alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et biomédical [1].

La chitine constitue le principal polysaccharide structural de l'exosquelette des crustacés. Elle est considérée comme le deuxième biopolymère naturel le plus abondant après la cellulose. Dans la matrice de la carapace, la chitine est fortement associée aux protéines, aux minéraux et aux pigments, ce qui nécessite des traitements spécifiques pour son extraction [11].

1.2. Origine et disponibilité des déchets de crustacés

Les déchets de crustacés proviennent essentiellement de l'industrie de la transformation des produits halieutiques et aquacoles. Lors de la préparation à la consommation humaine, seules certaines parties sont retenues, tandis qu'une fraction importante est éliminée sous

forme de résidus solides [7]. La disponibilité de ces déchets dépend fortement de l'expansion mondiale des activités de pêche, en particulier de l'aquaculture. La production croissante de crevettes, de crabes et d'homards entraîne inévitablement une augmentation des déchets générés [11]. Ces coproduits sont particulièrement abondants dans les régions côtières, à proximité des unités industrielles de transformation. Leur disponibilité est généralement saisonnière, mais souvent très concentrée géographiquement, ce qui facilite leur collecte en vue d'une valorisation industrielle [12].

Les déchets de crevettes constituent la fraction la plus abondante parmi les coproduits de crustacés, en raison de leur forte place dans la production mondiale et de leur très large consommation [7].

1.3. Analyse de la consommation mondiale des crustacés

La consommation mondiale de produits aquatiques, y compris les crustacés, a connu une augmentation significative au cours des dernières décennies, atteignant des niveaux record de production, de commerce et de consommation. La majorité de la production mondiale d'animaux aquatiques est destinée à la consommation humaine, représentant environ 89 % de la production totale, ce qui souligne l'importance croissante de ces ressources pour l'alimentation mondiale. La consommation annuelle apparente mondiale d'aliments aquatiques a fortement augmenté, passant d'environ 9,1 kg par habitant en 1961 à plus de 20 kg par habitant, ce qui témoigne d'une évolution majeure des habitudes alimentaires à l'échelle mondiale. Cette croissance est liée à plusieurs facteurs, notamment l'augmentation de la population mondiale, l'amélioration des systèmes de distribution alimentaire et l'évolution des préférences en faveur de sources de protéines plus diversifiées et nutritives [13].

Le développement rapide de l'aquaculture a joué un rôle déterminant dans l'augmentation de l'offre mondiale de crustacés, compensant la stagnation ou la surexploitation de certaines ressources halieutiques naturelles. Cette augmentation s'accompagne directement d'une hausse significative des coproduits générés, notamment des carapaces et d'autres parties non consommées [11].

Les crevettes sont de loin les crustacés les plus consommés dans le monde. Leur popularité sur le marché international s'explique par leur forte acceptabilité commerciale, leur

valeur économique élevée et leur disponibilité accrue. De plus, elles sont appréciées pour leurs composés bioactifs de haute valeur, ce qui renforce leur rôle dans les industries alimentaires et nutraceutiques à l'échelle mondiale [8, 14].

Les produits aquatiques sont cruciaux pour la nutrition humaine, fournissant environ 15 % des protéines animales mondiales et apportant des nutriments essentiels tels que les acides gras oméga-3, les vitamines et les minéraux. La demande mondiale ne cesse de croître et devrait augmenter davantage au cours des prochaines décennies, ce qui nécessite une intensification durable de l'aquaculture pour répondre aux besoins alimentaires futurs [14].

1.4. Enjeux environnementaux et socio-économiques associés

L'accumulation de déchets de crustacés constitue un problème environnemental majeur, en raison de la pression exercée sur les ressources naturelles et les écosystèmes aquatiques, notamment dans les zones côtières où se concentrent les industries de transformation. Ces déchets, riches en matière organique biodégradable, se décomposent rapidement, produisant des odeurs désagréables et libérant des substances polluantes dans l'environnement. Le rejet non contrôlé de ces résidus peut accroître la charge organique des milieux aquatiques et provoquer divers phénomènes tels que l'eutrophisation, la diminution de l'oxygène dissous, la mortalité des organismes aquatiques, la production de composés toxiques et la perturbation de l'équilibre écologique des écosystèmes [15, 16].

Parallèlement, le secteur des produits aquatiques joue un rôle socio-économique crucial, en fournissant des moyens de subsistance à des millions de personnes dans le monde entier. Dans les pays en développement, environ 61,8 millions d'individus travaillent dans la pêche et l'aquaculture à l'état brut, ce qui souligne leur importance pour l'emploi et le développement économique. De plus, les produits aquatiques jouent un rôle clé dans la sécurité alimentaire mondiale en constituant une source majeure de nutriments pour des milliards de personnes, notamment dans les régions côtières et à faible revenu [13].

Cependant, la gestion et l'élimination de ces déchets représentent un coût important pour les industries de transformation des produits de la mer. La valorisation de ces déchets permet de réduire l'impact environnemental tout en générant de la valeur ajoutée, contribuant ainsi à une économie circulaire et durable dans le secteur halieutique [10, 11].

1.5. Stratégies de valorisation biotechnologique

Les coproduits de crustacés constituent une source importante de biomolécules valorisables, ce qui a conduit au développement de diverses stratégies biotechnologiques de valorisation. Parmi celles-ci, l'extraction de la chitine et du chitosane à partir des carapaces est l'une des principales. Ces biopolymères ont des propriétés biologiques et physico-chimiques intéressantes, leur permettant d'être utilisés dans les domaines médical, alimentaire, textile et environnemental. De plus, les chitooligosaccharides issus de la chitine suscitent un intérêt croissant en raison de leurs activités biologiques et de leurs applications potentielles [10].

L'extraction classique de la chitine consiste principalement en des traitements chimiques de déminéralisation et de déprotéinisation, visant à éliminer les minéraux et les protéines de la matrice des carapaces. Cependant, plusieurs méthodes biotechnologiques ont été mises au point pour réduire la dépendance aux réactifs chimiques et diminuer l'impact environnemental des procédés traditionnels. Parmi celles-ci, l'hydrolyse enzymatique et la fermentation jouent un rôle clé dans la valorisation des déchets de crustacés. Ces processus permettent de produire de la chitine, du chitosane, des peptides bioactifs, et l'astaxanthine [12, 16].

Des procédés à faible consommation d'énergie et à faible impact environnemental ont été proposés. C'est le cas de l'extraction par fluide supercritique (SFE), du traitement à haute pression (HPP), du champ électrique pulsé (PEF) et des ultrasons (US) (Figure I.1). Leur but est de réduire la durée du traitement, d'accroître le rendement, et d'améliorer la qualité et la fonctionnalité des extraits issus des sous-produits de crustacés [17].

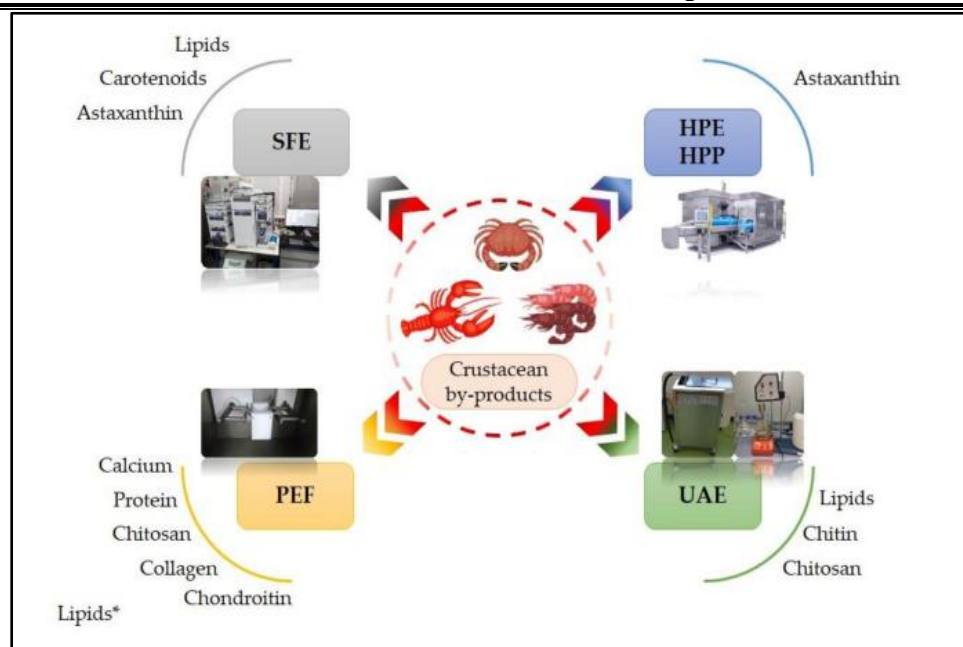


Figure I.1: Principaux composés extraits à partir de carapaces de crustacés par des technologies non thermiques (SFE : Extraction par Fluide Supercritique ; HPE : Extraction haute pression ; HPP : traitement à haute pression ; PEF : Champs électriques pulsés ; EAU : Extraction Assistée par Ultrasons) [17]

L'intégration de ces différentes approches dans des systèmes de bioconversion et de bioraffinerie permet une valorisation plus complète des déchets de crustacés. Cette stratégie vise à récupérer simultanément plusieurs composés à forte valeur ajoutée, notamment les biopolymères, les nutraceutiques, les biomatériaux, les engrais biologiques et certaines formes de bioénergie, dans une perspective d'économie circulaire et de développement durable [11].

2. Chitine

2.1. Définition

La chitine est un polysaccharide azoté naturel, considéré comme le deuxième biopolymère le plus abondant sur Terre après la cellulose [19]. Elle a été découverte pour la première fois en 1811 par H. Braconnot. Le nom de "chitine" a été attribué par A. Odier en 1823, lorsqu'il l'a identifiée dans la cuticule de l'exosquelette d'un coléoptère [19].

La chitine est un homopolymère linéaire présent dans les exosquelettes des arthropodes (comme les insectes et les crustacés), dans les parois cellulaires des champignons et des algues, ainsi que dans certaines coquilles de mollusques, où elle joue un rôle crucial dans la résistance mécanique. Elle se compose de microfibrilles associées à des protéines et des

minéraux, ce qui lui confère des propriétés telles que la biocompatibilité et la biodégradabilité, idéales pour diverses applications biomédicales [18].

2.2. Structure chimique

La chitine est un polysaccharide constitué d'unités de 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranose reliées par des liaisons β -(1 $\rightarrow$ 4). Elle ressemble chimiquement à la cellulose, mais comporte des groupes acétamides en position C-2 (Figure I.2) [20].

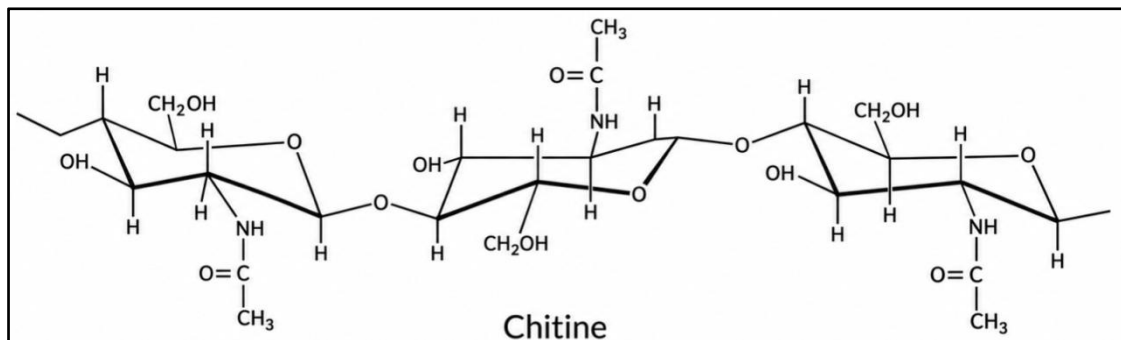


Figure I.2: Structure chimique de la chitine [21]

La structure de la chitine est fortement stabilisée par la présence de groupes acétyle, amine et hydroxyle, ainsi que par des liaisons hydrogène intermoléculaires et intramoléculaires, ce qui explique son insolubilité dans la plupart des solvants classiques [20].

La chitine native est un biopolymère semi-cristallin, organisé en régions amorphes et cristallines, stabilisées par des liaisons hydrogène et des forces de van der Waals. Les cristallites de chitine sont composées d'unités fibrillaires en forme de bâtonnets, issues de l'assemblage supramoléculaire de 19 chaînes [20].

La chitine se présente sous trois formes polymorphiques principales : α -chitine, β -chitine et γ -chitine.

2.2.1. Type α -chitine

Elle constitue la forme cristalline la plus stable et la plus répandue. Ses chaînes polymériques s'organisent de manière antiparallèle (Figure I.4), ce qui favorise la formation de liaisons hydrogène fortes. On la trouve principalement dans les carapaces de crustacés comme les crevettes, les crabes et les homards, ainsi que dans celles des coléoptères et dans les parois cellulaires des champignons [20].

2.2.2. Type β -chitine

Dans cette configuration, les chaînes polymériques sont alignées parallèlement, ce qui confère une structure plus flexible et chimiquement plus perméable que celle de l' α -chitine, augmentant ainsi sa réactivité. Elle est principalement extraite des diatomées marines, des mollusques et de certaines structures d'insectes [20].

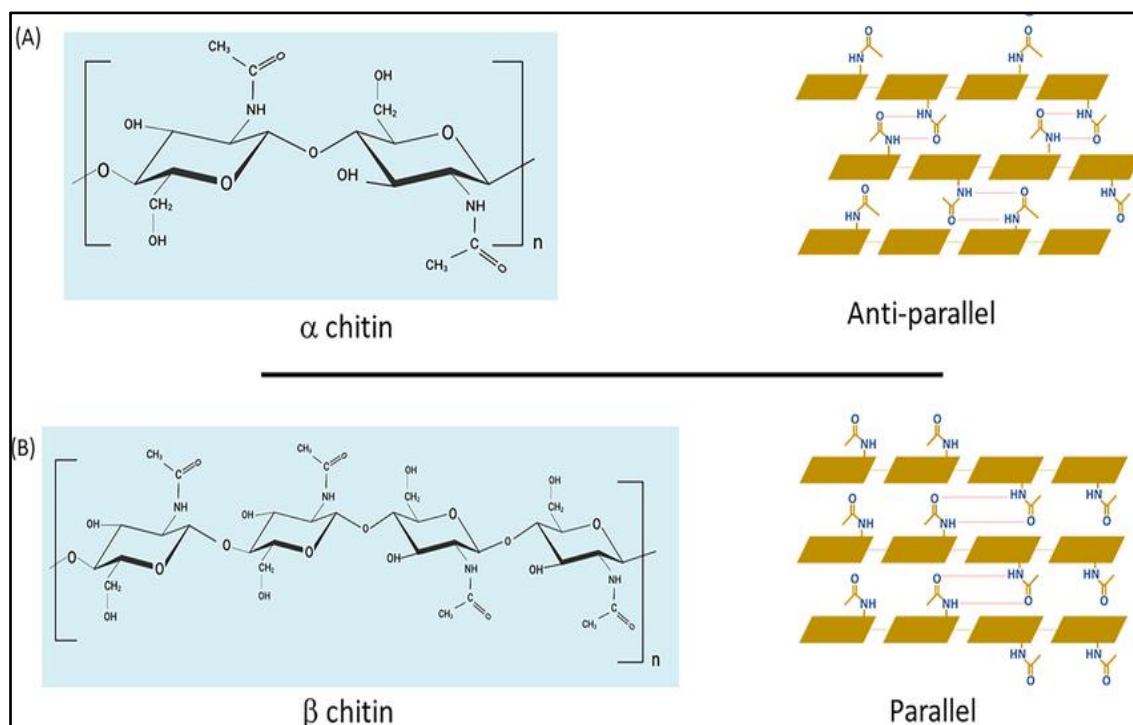


Figure I.3: Configurations alpha (A) et bêta (B) de la chitine [20, 22]

2.2.3. Type γ

Cette structure présente une organisation plus complexe, avec des chaînes polymériques alternant entre des configurations parallèles et antiparallèles. Elle est moins courante dans la nature et a notamment été observée dans certaines fibres de cocons de coléoptères [20].

2.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques

2.3.1. Propriétés physico-chimiques

2.3.1.1. Teneur d'azote

La chitine est un polysaccharide azoté, avec une teneur en azote d'environ 6,89 %, ce qui lui confère une réactivité chimique supérieure à celle de la cellulose. Cette différence est principalement liée à la présence de groupes acétamides dans sa structure moléculaire [23].

2.3.1.2. Indice de cristallinité et la solubilité

Parmi les différentes formes cristallines de la chitine, l' α -chitine est la plus stable dans la nature, caractérisée par un arrangement antiparallèle de ses chaînes polymériques. Grâce à cette organisation cristalline, elle présente généralement un indice de cristallinité élevé, compris entre 80 et 90 %, ce qui reflète le degré d'organisation des zones cristallines du polymère et influence ses propriétés mécaniques et thermiques. Une cristallinité élevée est souvent associée à une rigidité, une stabilité thermique et une résistance mécanique accrues. En raison de sa forte cristallinité et de ses liaisons hydrogène, la chitine est insoluble dans l'eau et la plupart des solvants organiques. Elle ne se dissout que dans des systèmes spécifiques, tels que LiCl/DMAc (chlorure de lithium/N,N-diméthylacétamide) [20, 23].

2.3.1.3. Degrés d'acétylation de désacétylation

Le degré d'acétylation (DA) indique la proportion d'unités acétylées au sein de la chaîne polymérique. La transformation de la chitine en chitosane se produit généralement à un degré de désacétylation (DD) d'environ 50 % [23].

2.3.1.4. Masse moléculaire

La masse moléculaire de la chitine dépend de son origine et de la méthode d'extraction utilisée. En général, sa masse moléculaire moyenne se situe entre $0,4 \times 10^6$ et $2,5 \times 10^6$ [24].

2.3.2. Propriétés biologiques

La chitine et le chitosane ont plusieurs propriétés biologiques, notamment leur capacité à réduire le cholestérol, à favoriser la cicatrisation, à lutter contre le cancer, à agir comme antifongiques, à arrêter les saignements, à soulager la douleur, ainsi qu'à combattre les reflux acides et les ulcères, et à renforcer la réponse immunitaire. De plus, ils présentent une faible toxicité, une excellente biocompatibilité et une biodégradabilité significative [24].

2.3.2.1. Activité antimicrobienne

La chitine possède une activité antimicrobienne contre divers microorganismes, tels que les bactéries, les moisissures et les levures. Cette efficacité découle principalement de la nature polycationique du polymère, qui se lie aux surfaces cellulaires chargées négativement à pH inférieur à 6,5. Cette interaction forme une couche imperméable qui empêche l'entrée des nutriments dans les cellules microbiennes, ce qui entraîne leur mort [24].

2.3.2.2. Activité antioxydante

La chitine possède une activité antioxydante liée à sa capacité à neutraliser différentes espèces radicalaires oxygénées, telles que les radicaux alkyles, les espèces superoxydes, les radicaux hydroxyles et le DPPH. Cette activité serait associée à la capacité des groupes hydroxyle et amine à chélater les ions métalliques libres et à former des complexes stables. Les essais *in vitro* ont montré qu'un faible poids moléculaire, associé à un degré élevé de désacétylation, favorise une activité antioxydante accrue [24].

2.3.2.3. Propriétés mucoadhésives

Grâce à ses propriétés mucoadhésives, la chitine peut adhérer aux surfaces muqueuses des systèmes respiratoire et digestif. Cette capacité améliore l'efficacité de l'administration des médicaments, favorise la cicatrisation et aide à prévenir les infections en prolongeant le contact avec la muqueuse [24].

2.3.2.4. Propriétés d'amélioration de la pénétration cellulaire

La chitine stimule la perméabilité cellulaire en ouvrant les jonctions serrées de l'épithélium, ce qui réduit la résistance électrique transépithéliale. Ce processus repose sur des interactions électrostatiques entre les charges positives du chitosane et les membranes cellulaires, ce qui entraîne une réorganisation des protéines des jonctions serrées [24].

2.4. Sources de chitine

La chitine provient de différentes sources, dont les teneurs varient (Figure I.6).

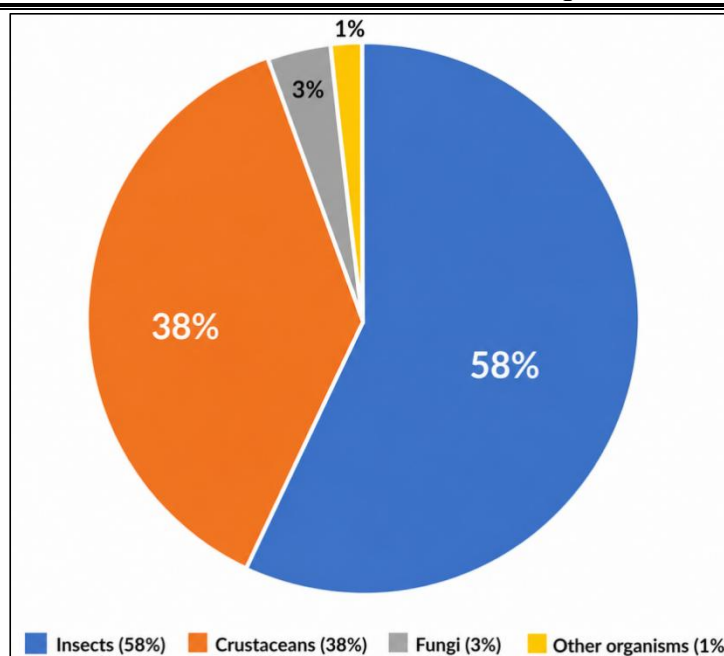


Figure I.4 : Teneur approximative en chitine provenant de diverses sources [25].

2.4.1. Crustacés

Les crustacés sont l'une des principales sources de chitine, extraite principalement des carapaces de crevettes, de crabes, d'homards et d'écrevisses. Dans ces organismes, la chitine est incorporée dans une matrice majoritairement composée de protéines et de carbonate de calcium, ce qui confère à l'exosquelette de la rigidité et de la stabilité. Les carapaces de crustacés contiennent généralement entre 6 % et 25 % de chitine en masse, ce qui en fait une ressource précieuse pour l'extraction industrielle [25].

2.4.2. Insectes

Les insectes constituent également une source majeure de chitine, présente dans l'exosquelette, les ailes, les antennes et la matrice péritrophique du tube digestif. La teneur en chitine chez les insectes varie généralement de 1,2 % à 60 % du poids sec, selon les espèces et leur stade de développement. Les principales espèces utilisées pour l'extraction de la chitine sont les coléoptères, grillons, mouches, criquets et vers de farine [25].

2.4.3. Champignons

Les champignons constituent une autre source de chitine, principalement présente dans leurs parois cellulaires. Au sein de ces organismes, la chitine est souvent liée de manière covalente aux glucanes, ce qui en complique l'extraction. Les Zygomycètes ont généralement

une teneur en chitine plus élevée que celle des autres groupes fongiques. Parmi les principales sources fongiques figurent *Mucor rouxii*, *Aspergillus niger* et *Lentinus edodes* [25].

2.4.4. Mollusques et autres organismes

La chitine se trouve également chez certains mollusques, notamment dans les structures des céphalopodes, ainsi que dans certaines éponges, nématodes et araignées [25].

2.5. Procédés chimiques d'extraction de la chitine

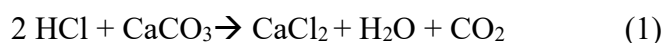
L'extraction chimique de la chitine consiste à traiter des matériaux riches en chitine à l'aide d'agents chimiques qui éliminent les protéines, les minéraux et d'autres composés, ne laissant que la chitine pure. Elle comprend généralement trois étapes : la déprotéinisation par une solution alcaline, la déminéralisation par une solution acide, puis la décoloration et la purification de la chitine [26, 27].

2.5.1. Déprotéinisation chimique

La déprotéinisation consiste à rompre les liaisons chimiques entre les protéines et la chitine, ce qui nécessite l'emploi de produits chimiques. Cependant, les conditions de réaction varient considérablement d'une étude à l'autre ; le NaOH, réactif privilégié, est utilisé à différentes températures, à différentes concentrations (de 0,125 à 5,0 M) et pendant des durées variables. Le NaOH provoque non seulement la déprotéinisation, mais aussi l'hydrolyse du biopolymère, une diminution de son poids moléculaire et une désacétylation partielle de la chitine [30]. L'utilisation d'acides et de bases fortes lors de l'extraction de la chitine augmente le coût des matériaux et réduit la pureté du produit final [26].

2.5.2. Déminéralisation chimique

La déminéralisation est un procédé visant à éliminer les minéraux, notamment le carbonate de calcium. Elle est généralement réalisée par un traitement acide utilisant l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique, l'acide nitrique, l'acide acétique ou l'acide formique ; l'acide chlorhydrique étant le plus efficace. La déminéralisation consiste en la décomposition du carbonate de calcium en chlorure de calcium, accompagnée d'un dégagement de dioxyde de carbone, comme l'indique la réaction (1) [28].



Les traitements de déminéralisation sont souvent empiriques et varient selon le degré de minéralisation de chaque source, la durée d'extraction, la température, la taille des particules, la concentration en acide et le rapport soluté/solvant. Ce rapport dépend de la concentration en HCl, car deux molécules de HCl sont nécessaires pour convertir une molécule de carbonate de calcium en chlorure de calcium. Pour que la réaction soit complète, la quantité d'acide doit correspondre à la quantité stœchiométrique de minéraux. Étant donné la difficulté à éliminer tous les minéraux en raison de l'hétérogénéité du solide, on augmente généralement le volume ou la concentration de la solution acide. La déminéralisation peut être suivie d'un titrage acidimétrique : une évolution du pH vers la neutralité indique la consommation d'acide, tandis que la persistance de l'acidité signale la fin de la réaction [29].

2.5.3. Décoloration

C'est une étape supplémentaire du processus d'extraction, réalisée lorsque l'on souhaite obtenir un produit incolore, car elle vise à éliminer les pigments d'astaxanthine et de β -carotène présents dans la matière première. Elle fait appel à des solvants organiques ou inorganiques tels que l'acétone, l'hypochlorite de sodium et le peroxyde d'hydrogène [26].

2.6. Approches biotechnologiques d'extraction de la chitine

Les méthodes biologiques d'extraction de la chitine peuvent être classées en méthodes enzymatiques et en méthodes de fermentation. Comme leur nom l'indique, les premières utilisent des enzymes, tandis que les secondes utilisent des bactéries [30].

Le procédé d'extraction biologique est devenu plus attractif grâce à l'obtention de produits de haute qualité, à un coût de production abordable et à l'absence de production d'effluents chimiques à forte concentration [26].

2.6.1. Méthode enzymatique

La méthode enzymatique d'extraction de la chitine consiste à recourir à des enzymes protéolytiques pour éliminer les protéines associées, sans dégrader la structure de la chitine. Diverses protéases, telles que la papaïne, la trypsine, la pepsine, la déolvase, l'alcalase et la pancréatine, peuvent être utilisées pour éliminer les protéines et minimiser la dépolymérisation et la désacétylation de la chitine [30].

Les méthodes enzymatiques tirent parti de la spécificité des enzymes et de conditions de réaction douces, généralement comprises entre 25 et 59 °C, pour déloger les protéines tout en

minimisant la désacétylation et les dommages à la chaîne de chitine. La durée de la réaction est comparable à celle de la déprotéinisation chimique, comprise entre 2 et 8 heures, bien que certains processus puissent durer jusqu'à 24 heures. Même avec un temps de réaction prolongé, la déprotéinisation ne dépasse rarement 90 % à l'aide de méthodes enzymatiques. Cette approche constitue une alternative écologique aux procédés chimiques classiques, en réduisant l'utilisation d'acides et de bases concentrés, ainsi que la production d'effluents chimiques, tout en produisant une chitine plus pure, mais elle reste limitée par le coût élevé des enzymes et la durée relativement longue du procédé [28].

2.6.2. Méthode de fermentation

Les méthodes de fermentation utilisées pour l'extraction de la chitine nécessitent la préparation de milieux de culture propices à la croissance des bactéries impliquées dans la fermentation. Ces milieux contiennent généralement une source de carbone que les microorganismes transforment en acides organiques, le glucose étant fréquemment utilisé dans les expériences à petite échelle. Afin de réduire les coûts de production et de valoriser divers déchets organiques, plusieurs études ont testé l'utilisation de peaux et de pulpes de fruits autoclavées comme sources de carbone pour la fermentation. Parmi les différents déchets de fruits évalués, la pulpe de raisin rouge a montré les meilleurs résultats pour l'extraction de la chitine, avec un rendement de 12,2 % de la masse initiale des carapaces de crevettes et une chitine présentant une teneur en protéines et en minéraux inférieure à celle obtenue à partir d'autres déchets de fruits [30].

L'efficacité de la fermentation par des microorganismes dépend directement des concentrations en inoculum et en glucose du milieu, du pH pendant la culture et de la durée de la fermentation. La fermentation peut être réalisée à l'aide de bactéries productrices de protéases telles que *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas maltophilia* et *Serratia marcescens* [28].

2.7. Comparaison des procédés chimiques et biologiques

Le développement de procédés écologiques pour extraire la chitine s'inscrit dans la démarche de « chimie verte », qui privilégie l'emploi de microorganismes et d'enzymes pour sa récupération. Traditionnellement, ces méthodes chimiques consomment beaucoup d'énergie et présentent plusieurs inconvénients, tels que l'augmentation des coûts de purification, la modification des propriétés physico-chimiques de la chitine extraite, ainsi que

la génération de déchets chimiques importants. La purification chimique est considérée comme dangereuse, énergivore et nuisible à l'environnement, en raison de l'usage massif d'acides minéraux et de substances caustiques. De plus, les conditions rigoureuses employées lors de l'extraction chimique entraînent une dépolymérisation partielle de la chitine, la désacétylation du polymère, et la formation d'oligomères à faible poids moléculaire, ce qui abîme la qualité du produit final et détériore également les pigments. De plus, les composants protéiques extraits après traitement chimique ne sont plus adaptés à l'alimentation animale.

Les procédés biologiques suscitent un intérêt croissant en raison de leur propreté, de leur respect de l'environnement et de leur rentabilité, tout en permettant d'obtenir de la chitine et du chitosane aux propriétés souhaitées. Une étude comparative portant sur des carapaces de crevettes a montré que l'extraction biologique surpassait la méthode chimique, car elle préserve la structure de la chitine tout en réduisant l'impact écologique. La déprotéinisation biologique des carapaces peut être réalisée grâce à des microorganismes protéolytiques. De plus, l'extraction biologique offre plusieurs avantages, tels qu'une manipulation plus facile, une consommation d'énergie moindre, une meilleure reproductibilité, une utilisation réduite de solvants et des temps de traitement plus courts [28, 29].

Malgré son caractère propre et écologique, la méthode enzymatique présente une efficacité inférieure à celle des procédés chimiques, puisque 5 à 10 % des protéines peuvent rester associées à la chitine isolée. Un traitement supplémentaire au NaOH peut alors être appliqué afin d'augmenter la pureté finale de la chitine [31].

2.8. Domaines d'applications

2.8.1. Domaine Médical

L'ingénierie tissulaire repose sur l'emploi de biomatériaux capables de créer un environnement propice à la croissance et à la régénération des cellules. Le principe consiste à utiliser des *scaffolds* tridimensionnels comme supports structuraux pour les cellules, afin de favoriser leur adhérence, leur prolifération et leur différenciation. Ces biomatériaux peuvent être modifiés en y incorporant d'autres composés, tels que des peptides, des sucres ou des polymères biodégradables, afin d'en renforcer les propriétés mécaniques et biologiques. Des recherches ont montré que les fibres hybrides à base de chitine favorisent l'adhésion et la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes, deux types cellulaires clés dans la

réparation de la peau et la réponse inflammatoire. De plus, la chitine et le chitosane sont étudiés en ingénierie nerveuse, notamment pour développer des tubes ou des gels servant de guides de régénération neuronale. Ces structures présentent des propriétés mécaniques qui permettent de soutenir les tissus tout en facilitant l'adhésion et la différenciation des neurones [32].

La chitine et ses dérivés jouent un rôle clé dans l'accélération de la cicatrisation des plaies en modulant la réponse inflammatoire en activant des médiateurs biologiques tels que l'interleukine-8, l'interleukine-1 β et les prostaglandines. Cette activité favorise les mécanismes naturels de réparation des tissus. En outre, leurs propriétés antibactériennes empêchent la croissance de bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Plusieurs études ont démontré que l'association de la chitine avec des nanoparticules d'argent renforce significativement l'activité antimicrobienne et la capacité de coagulation des pansements biologiques. Les composites d' α -chitine ou de β -chitine combinés au nano-argent présentent une bonne adhérence cellulaire, une forte activité antibactérienne et une meilleure hémostase [32].

La chitine et le chitosane jouent un rôle essentiel dans le diagnostic et le traitement du cancer, grâce aux progrès de la nanotechnologie biomédicale. De nouvelles nanoparticules à base de chitosane ont été développées pour cibler précisément les cellules tumorales. Par exemple, des nanoparticules de sulfure de zinc, fonctionnalisées avec du D-mannose et entourées de chitosane, peuvent reconnaître les cellules cancéreuses exprimant des récepteurs de mannose. Ces nanoparticules émettent une fluorescence intense, facilitant la visualisation des tissus tumoraux tout en évitant les cellules normales, qui ont peu de récepteurs de mannose. En outre, certains dérivés du chitosane présentent des propriétés antitumorales directes. La chitine sulfatée, par exemple, peut inhiber la colonisation des cellules cancéreuses pulmonaires, et cette activité s'accroît avec le degré de sulfatation du polymère [32].

2.8.2. Applications environnementales

La chitine présente un fort potentiel écologique grâce à sa biodégradabilité, sa biocompatibilité et sa forte capacité d'adsorption. Sa structure, riche en groupes aminés et en hydroxyles, lui permet d'interagir avec divers polluants organiques et inorganiques présents dans les sols et les milieux aquatiques. Sa grande surface spécifique favorise la fixation des contaminants et la formation de nanocomposites, ce qui est utile pour le traitement

environnemental. En outre, sa résistance à la dégradation microbologique et son affinité pour les métaux lourds en font un biomatériau innovant pour la dépollution de l'eau [32].

Des études ont montré que les propriétés adsorbantes de la chitine peuvent être optimisées par des modifications structurales, produisant des matériaux à forte surface spécifique et dotés de groupes fonctionnels capables de fixer efficacement les molécules de colorants. D'autres recherches ont exploré des composites combinant la chitine et l'oxyde de graphène, qui offre une grande surface d'adsorption et une hydrophilie accrue, afin d'augmenter la capacité de dépollution. La combinaison de ces deux matériaux permet d'obtenir des composites très stables et à forte capacité d'adsorption [32].

La chitine, en particulier le chitosane, est étudiée comme agent naturel de coagulation et de floculation, aidant à éliminer les ions métalliques des eaux contaminées. Ses propriétés cationiques facilitent les interactions électrostatiques et l'échange d'ions, ce qui accroît son efficacité d'adsorption des métaux lourds. Cependant, la chitine seule présente des limites mécaniques et chimiques, ce qui en limite les performances à grande échelle. Pour remédier à cela, des biocomposites associant la chitine à d'autres matériaux, tels que la bentonite, ont été développés, offrant une meilleure résistance chimique, notamment en milieu acide, ainsi qu'une capacité d'adsorption accrue [32].

Les produits pharmaceutiques sont particulièrement difficiles à traiter car ils restent biologiquement actifs même à très faibles concentrations. Pour améliorer l'adsorption de la chitine, certains chercheurs ont étudié son association avec la lignine, qui renforce la structure du biopolymère et facilite l'adsorption des molécules hydrophobes dans les eaux contaminées. Les études sur l'élimination des médicaments anti-inflammatoires ont montré que les biocomposites chitine/lignine présentent une efficacité d'adsorption satisfaisante. L'efficacité augmente avec la quantité de bioadsorbant utilisée et varie selon le pH du milieu, avec de meilleures performances dans des conditions modérément acides [32].

2.8.3. Applications agricoles

L'abus d'engrais chimiques, de pesticides et de régulateurs de croissance a provoqué divers problèmes environnementaux, tels que la baisse de la fertilité des sols, la pollution de l'eau et la diminution de la biodiversité. La chitine et ses dérivés constituent des alternatives

écologiques prometteuses pour l'agriculture, en raison de leur biodégradabilité, de leur biocompatibilité et de leur non-toxicité [32].

La chitine est essentielle à la défense des plantes contre les pathogènes, notamment les champignons. Si les plantes ne synthétisent pas directement la chitine, elles produisent des enzymes, appelées chitinases, qui dégradent la chitine des parois fongiques. Ce processus génère des fragments de chitine qui stimulent les réponses immunitaires végétales et induisent une production accrue de chitinases, renforçant ainsi la résistance des plantes aux maladies [32].

La chitine est exploitée dans la conception d'insecticides biologiques, appelés inhibiteurs de la synthèse de la chitine. Ces substances empêchent la formation de la cuticule et la mue chez les insectes nuisibles, offrant une protection des cultures tout en réduisant la dépendance aux pesticides chimiques [32].

Les dérivés de la chitine servent de stimulateurs naturels de croissance, favorisant la germination des graines, augmentant la biomasse, améliorant le rendement des cultures et stimulant l'activité des microorganismes bénéfiques dans le sol. La chitine contribue également à renforcer la fertilité des sols et à réduire certaines infections racinaires [32].

3. Chitosane

3.1. Définition

Le chitosane est un polysaccharide naturel, qui peut être obtenu par désacétylation de la chitine. Il est principalement composé d'unités de D-glucosamine. Il se caractérise par sa nature alcaline, sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et son absence de toxicité, ainsi que par ses bonnes propriétés d'hydratation et d'adsorption, ce qui en favorise l'utilisation dans plusieurs domaines tels que la médecine, l'industrie pharmaceutique, la biotechnologie et l'industrie alimentaire. Il a été découvert par Rouget en 1859, après avoir chauffé de la chitine en milieu alcalin. Plusieurs années plus tard, Hoppe-Seyler a appelé ce matériau chitosane, bien que sa structure chimique n'ait été élucidée qu'en 1950 [33, 34].

Le chitosane est peu répandu dans la nature. On le trouve au niveau de certains insectes, comme la paroi abdominale des reines des termites, et dans les parois cellulaires des zygomycètes. Pour augmenter la production naturelle de chitosane chez ces champignons, des

ajustements du milieu de culture ou même des modifications génétiques sont réalisés, notamment grâce aux avancées de la biotechnologie [35].

3.2. Structure chimique

La chitosane est constitué principalement d'unités de D-glucosamine liées entre elles par des liaisons glycosidiques β -(1 $\rightarrow$ 4) de N-acétyl-D-glucosamine [21].

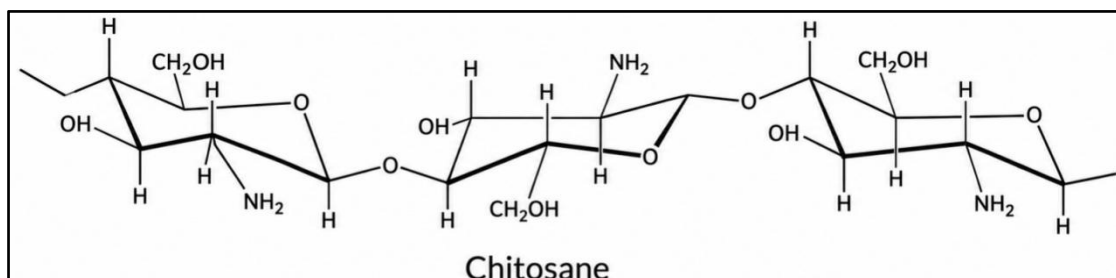


Figure I.5 : Structure chimique du chitosane [21]

Grâce à ses groupes fonctionnels actifs, tels que les groupes amine ($-\text{NH}_2$) et hydroxyles ($-\text{OH}$) présents dans sa structure, le chitosane peut être modifié chimiquement pour améliorer ses propriétés physico-chimiques et biologiques tout en préservant ses activités antibactériennes, antivirales et biologiques essentielles. Ces dérivés du chitosane sont largement utilisés pour fabriquer des nanoparticules, des hydrogels, des microsphères et des systèmes de vecteurs destinés à la préparation de médicaments aux propriétés antibactériennes, antivirales et anticancéreuses [33].

3.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques

3.3.1.1. Propriétés physico-chimiques

Le chitosane est plus soluble dans l'eau et plus chimiquement réactif que la chitine, en raison de la présence de groupes hydroxyles primaires et secondaires sur chaque unité répétitive, ainsi que d'un groupe amine sur chaque unité désacétylée. Ces groupes réactifs du chitosane sont facilement modifiables chimiquement, ce qui influe sur ses propriétés mécaniques et physiques, ce qui en fait une option intéressante pour diverses applications. La plupart des caractéristiques du chitosane dépendent de ses propriétés physicochimiques, telles que le degré de désacétylation, la solubilité, la viscosité et le poids moléculaire [36].

3.3.1.2. Degré de désacétylation

Le degré de désacétylation du chitosane est un paramètre clé qui détermine non seulement la proportion d'unités désacétylées dans la chaîne polymérique, mais aussi sa solubilité, sa viscosité, sa capacité d'échange ionique, son pouvoir de floculation et la réactivité de ses groupes amines. Une augmentation du degré de désacétylation accroît la solubilité du chitosane, ce qui peut également modifier ses propriétés antimicrobiennes [37]. Le degré de désacétylation décrit la répartition des groupes amines le long de la chaîne polymère ; il indique la fraction molaire d'unités de N-acétylglucosamine dans la chaîne [36].

Le degré de désacétylation peut être déterminé par plusieurs méthodes analytiques, telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (^1H -RMN), la titration potentiométrique, la titration acido-basique et la spectrophotométrie UV. La méthode IRTF est l'une des techniques les plus utilisées car elle est simple, rapide et accessible. Elle repose sur la mesure des bandes d'absorbance associées aux groupes amide et hydroxyle du chitosane [39]. Dans ce cas, le degré de désacétylation est calculé à partir du rapport des absorbances des bandes caractéristiques, généralement situées autour de 1655 cm^{-1} (amide I) et 3450 cm^{-1} (groupes hydroxyles) selon la formule (eq. 1) suivante [38] :

$$\text{DD}(\%) = [1 - (\frac{A_{1655}}{A_{3450}})/1,33] \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

Avec : DD : degré de désacétylation, A_{1655} : absorbance à 1655 cm^{-1} , A_{3450} : absorbance à 3450 cm^{-1}

Le degré de désacétylation indique si un polymère est de la chitine ou du chitosane. Un taux de désacétylation supérieur à 50 % indique souvent une conversion réussie de la chitine en chitosane [36]. Les chitosanes industriels présentent un degré de désacétylation compris entre 75 % et 98 % [35].

3.3.2. Solubilité

Le chitosane se dissout dans un solvant acide, mais reste insoluble dans un solvant neutre ou alcalin [36]. Sa solubilité dans les milieux aqueux acides s'explique par la présence importante de groupes $-\text{NH}_2$ protonés au sein de sa structure, étant donné que sa valeur de pKa est d'environ 6,5 [39]. La solubilité du chitosane dépend de différents facteurs, tels que le poids moléculaire, le degré d'acétylation, le pH, la température et la cristallinité du polymère.

3.3.2.1. Viscosité

La viscosité est un paramètre clé d'un point de vue technologique, car les solutions très visqueuses sont difficiles à manipuler et influencent l'applicabilité industrielle du chitosane. Elle dépend fortement du degré de désacétylation et du poids moléculaire ; ce dernier augmente avec un degré de désacétylation plus élevé mais diminue avec un poids moléculaire plus faible. La taille des particules et la durée de stockage du chitosane peuvent également jouer un rôle. Par exemple, un stockage de 24 heures entraîne une baisse d'environ 10 % de la viscosité normale du chitosane, due à la dégradation du polymère [36].

3.3.2.2. Masse moléculaire

Le poids moléculaire a un impact majeur sur les propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane. Il dépend de la matière première ainsi que des méthodes de préparation et d'extraction utilisées. Selon sa gamme de poids moléculaire, le chitosane peut être classé en faible, moyen ou haut poids moléculaire. Avec l'augmentation du poids moléculaire, le chitosane devient plus visqueux et moins soluble, ce qui peut en limiter certaines applications industrielles. En raison de sa meilleure solubilité et de sa meilleure stabilité, le chitosane de faible poids moléculaire est souvent privilégié pour des usages biologiques et industriels [36].

3.3.3. Propriétés biologiques

Depuis le début de l'étude du chitosane, ce biopolymère a été perçu comme un matériau très prometteur pour de multiples applications en raison de ses propriétés biologiques. Parmi celles-ci, il y a :

3.3.3.1. Biocompatibilité et toxicité

Le chitosane est largement étudié en raison de sa biocompatibilité et de sa faible toxicité, ce qui en facilite l'usage dans les secteurs biomédical et pharmaceutique. Sa biocompatibilité dépend principalement de critères tels que le poids moléculaire, le degré de désacétylation, la pureté et les modifications chimiques du polymère. En général, le chitosane est perçu comme non toxique et biodégradable, bien que certaines variations structurales ou formulations puissent affecter son comportement biologique [40].

3.3.3.2. Biodégradabilité et activité biologique

Le chitosane se caractérise par une biodégradabilité élevée, ce qui lui permet d'être dégradé par diverses enzymes et divers microorganismes au sein des systèmes biologiques. Cette capacité facilite son emploi dans diverses applications biomédicales, telles que les systèmes de libération contrôlée, les hydrogels et les matériaux de régénération tissulaire. De plus, le chitosane possède plusieurs activités biologiques, notamment antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires et cicatrisantes. Ces activités sont modulées par le poids moléculaire, le degré de désacétylation et les modifications chimiques du polymère [41].

3.4. Domaines d'application

Le chitosane a été utilisé dans diverses applications dans plusieurs secteurs, tels que la pharmacie, la cosmétique, le textile, l'alimentation, ainsi que l'agriculture et la protection de l'environnement (par exemple, le traitement des eaux usées) [40].

3.4.1. Applications biomédicales

Le chitosane est largement employé dans le secteur biomédical en raison de sa biocompatibilité, de sa biodégradabilité, de sa faible toxicité, de sa capacité de bioadhésion et de ses propriétés biologiques. Il est utilisé en ingénierie tissulaire pour créer des supports favorisant l'adhésion, la prolifération et la régénération cellulaires. Le chitosane participe également à la fabrication de pansements, d'hydrogels, de membranes et d'autres biomatériaux destinés à la cicatrisation. En pharmacie, il est utilisé dans des systèmes de libération contrôlée, notamment sous forme de nanoparticules, de microsphères et de gels, en raison de sa capacité à transporter et à protéger diverses molécules thérapeutiques. Ses propriétés antimicrobiennes et mucoadhésives renforcent l'utilisation dans les formulations pharmaceutiques et biomédicales [10, 41].

Les modifications chimiques du chitosane permettent de produire de nombreux dérivés fonctionnels aux propriétés améliorées. Ces dérivés sont utilisés pour fabriquer des nanoparticules, hydrogels, microsphères, micelles et autres nanomatériaux pour des applications biomédicales et pharmaceutiques. En modifiant sa structure, le chitosane voit sa solubilité, sa stabilité, sa bioactivité et ses propriétés fonctionnelles renforcées, ce qui élargit ses domaines d'utilisation dans divers secteurs technologiques et biomédicaux [43].

3.4.2. Applications antimicrobiennes

Le chitosane est largement utilisé dans divers matériaux antimicrobiens en raison de sa capacité à agir contre un large éventail de micro-organismes. Les solutions, films, revêtements et composites à base de chitosane ont démontré une efficacité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les levures, les algues et les champignons. Cette propriété antimicrobienne explique son utilisation dans les domaines biomédical, alimentaire et biotechnologique. Les matériaux à base de chitosane peuvent agir comme agents bactéricides, détruisant les microorganismes, ou comme agents bactériostatiques, empêchant leur croissance [42].

3.4.3. Applications alimentaires

Dans le secteur alimentaire, le chitosane est employé pour fabriquer des films biodégradables, des emballages actifs et des revêtements alimentaires, grâce à ses propriétés filmogènes et antimicrobiennes. Ces matériaux contribuent à préserver la fraîcheur des aliments en limitant la croissance microbienne et en ralentissant l'altération. De plus, le chitosane aide à maintenir la qualité, la stabilité des produits alimentaires et à prolonger leur durée de conservation [41].

3.4.4. Application au traitement de l'eau et à l'adsorption

Le chitosane possède d'importantes propriétés d'adsorption et de chélation, ce qui en facilite l'application dans le traitement de l'eau. Il permet d'éliminer divers contaminants, tels que les métaux lourds, les colorants, les composés organiques et d'autres polluants. Grâce à ses groupes amines et hydroxyles, le chitosane peut réagir avec diverses substances chimiques, améliorant ainsi les processus de purification et de décontamination de l'eau [41].

3.4.5. Applications en biocatalyse

Le chitosane sert de support pour immobiliser les enzymes dans la biocatalyse. Ses caractéristiques structurales et chimiques facilitent la fixation de diverses enzymes et biomolécules, tout en renforçant leur stabilité et leur activité. Les matériaux à base de chitosane utilisés dans ces systèmes enzymatiques permettent également la réutilisation des enzymes et améliorent les performances des procédés biotechnologiques [42].

3.5. Production du chitosane

Il existe actuellement deux méthodes principales pour préparer le chitosane. La première consiste à l'extraire directement des parois cellulaires des moisissures, tandis que la seconde implique la désacétylation de la chitine par des procédés thermochimiques ou enzymatiques afin d'éliminer les groupes N-acétyles.

3.5.1. Production thermochimique du chitosane

Actuellement, le chitosane est principalement produit industriellement par hydrolyse thermochimique des liaisons amides de la chitine. Les méthodes thermochimiques sont couramment utilisées en raison de leur faible coût et de leur capacité de production à grande échelle. En général, la désacétylation de la chitine peut être réalisée à l'aide d'acides ou d'alcalis. Cependant, en raison de la sensibilité des liaisons glycosidiques à l'hydrolyse acide, la désacétylation alcaline est privilégiée afin d'éviter la rupture des chaînes polymériques. Pour cela, on utilise généralement une solution concentrée de NaOH à 50 % à haute température. Certaines améliorations des méthodes classiques ont été proposées, notamment l'utilisation des micro-ondes pour accélérer la déminéralisation, la déprotéinisation et la désacétylation. Ces techniques permettent de réduire considérablement la durée du processus tout en assurant un haut degré de désacétylation. Malgré leur efficacité, ces méthodes thermochimiques présentent plusieurs inconvénients, notamment une forte consommation d'énergie et la génération de grandes quantités de déchets alcalins, responsables d'une pollution environnementale importante. Leur principal défaut est l'hydrolyse incontrôlée de la chitine lors du traitement par des solutions alcalines concentrées à haute température, susceptible d'entraîner une diminution importante du poids moléculaire du polymère. Divers paramètres influencent les propriétés du chitosane obtenu, notamment la durée du traitement, la température, la concentration et la nature de l'agent alcalin, la taille des particules, la présence d'agents réducteurs, la composition gazeuse du milieu réactionnel et la source de la matière première. Ces procédés sont difficiles à maîtriser et produisent souvent des produits hétérogènes aux propriétés physico-chimiques variables ; les groupes acétyle peuvent être distribués de manière irrégulière le long des chaînes, ce qui affecte fortement la solubilité et les propriétés du chitosane obtenu [44].

3.5.2. Production enzymatique du chitosane

L'utilisation d'enzymes évite la désacétylation irrégulière et la réduction du poids moléculaire causées par les traitements chimiques acides ou alcalins. Ces méthodes sont particulièrement attrayantes en raison de leur aspect écologique. Certaines études ont employé des chitine-déacétylases extraites de microorganismes pour désacétyler des substrats de chitine prétraités par fermentation biologique. Toutefois, les préparations enzymatiques présentent une efficacité limitée pour la désacétylation directe de la chitine native. La performance de la désacétylation enzymatique dépend fortement du type de prétraitement du substrat, avec des degrés de désacétylation généralement compris entre 62 et 79 % [44].

Chapitre 2 :

Matériel et Méthodes

Matériels et Méthodes

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire BIOGEP de l'École Nationale Polytechnique (ENP). L'étude porte sur la production de biopolymères par voie biologique. L'objectif est d'extraire la chitine à partir de carapaces de crustacés et de la désacétyler par des méthodes biologiques afin d'obtenir du chitosane.

1. Matériel

1.1. Équipement

Le (Tableau II.1) présente les appareillages, les verreries de laboratoire ainsi les produits et les réactifs utilisés dans cette étude.

Tableau II.1: Matériels et réactifs utilisés

Appareillages	Verreries de laboratoire	Produits et Réactifs
- Agitateur magnétique. - Autoclave. - Bain-marie. - Balance analytique. - Distillateur de Kjeldahl - Etuve. - Four à moufles. - Four Pasteur. - Incubateur. - Microscope photonique. - PH-mètre.	- Anse de platine. - Barreaux magnétiques - Béchers. - Boîtes de Petri - Burette graduée - Creusets. - Erlenmeyers - Entonnoirs. - Fiole à jauge. - Flacons. - Pipettes Pasteur. - Pipettes graduée.	- Alcool. - Acide borique. - Acide chlorhydrique. - Acide sulfurique. - Eau physiologique stérile. - Eau distillée. - Fuchsine. - Gélose nutritive. - Lugol. - Peroxyde d'hydrogène. - Sodium chloride. - Violet de Gentiane.

1.2. Matériel biologique

1.2.1. Souches microbiennes

Les microorganismes utilisés dans ce travail sont *Streptococcus thermophilus* et *Saccharomyces cerevisiae*. La bactérie *Streptococcus thermophilus* a été isolée à partir d'un pot de yaourt et la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été achetée.

1.2.2. Carapaces

Les carapaces utilisées dans notre étude sont des pinces de crabes cuites récupérées dans un restaurant.

1.2.3. Dattes

Pour la préparation du milieu de culture, un moût de dattes a été obtenu à partir de rebuts de la variété Deglet-Nour.

1.2.4. Têtes de sardines

Pour la préparation du milieu de culture, un moût de têtes de sardines a été obtenu à partir des têtes de sardines proviennent d'un poissonnier d'Alger.

2. Méthodes

Les différentes préparations réalisées au cours de cette étude ont pour objectif d'obtenir les matières premières et les milieux nécessaires à la fermentation biologique des carapaces de crabes.

2.1. Préparation du broyât de carapaces

Les carapaces de crabes ont été préalablement préparées afin d'obtenir un broyât homogène, adapté aux étapes ultérieures de fermentation et d'analyse. La préparation a été réalisée selon le protocole suivant :

- Séparer les carapaces de la chair (Figure II.1).
- Laver sous l'eau courante du robinet pour éliminer les matières organiques solubles, les protéines adhérentes et les autres impuretés.
- Faire bouillir les carapaces dans de l'eau pendant 30 min pour enlever le maximum de tissus.
- Sécher dans l'étuve à 105 °C pendant 2 h.

- Laisser refroidir.
- Broyer les carapaces séchées pour obtenir des fragments de 2 à 5 mm à l'aide d'un broyeur standard.

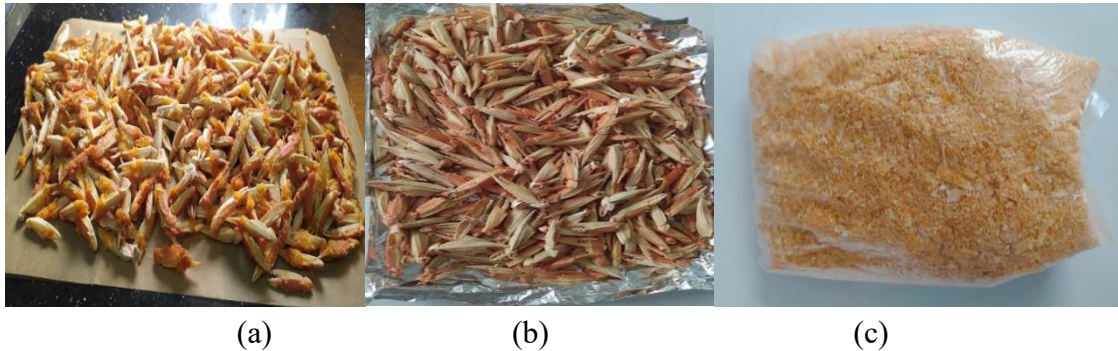


Figure II.1: Pinces de crabes brutes (a), séchées (b) et broyées (c).

2.2. Préparation du moût de dattes

Le moût de dattes a été préparé afin d'être utilisé comme source de carbone fermentescible pour la fermentation biologique. La préparation a été réalisée selon le protocole suivant :

- Laver les dattes à l'eau du robinet pour enlever toute saleté (Figure II.2).
- Dénoyer soigneusement les dattes et en séparer les parties charnues.
- Immerger les parties charnues dans de l'eau distillée chaude, à raison de 500 g de pulpe/L, pendant 45 min sous agitation continue.
- Filtrer à l'aide d'un tissu en gaze



Figure II.2: Dattes dénoyautées (a), bouillies (b) et moût de dattes filtré prêt à l'emploi (c).

2.3. Préparation du moût de têtes de sardines

Le moût de têtes de sardines a été préparé afin de servir de source d'azote et de nutriments favorisant la croissance des bactéries lactiques au cours de la fermentation biologique. La préparation a été réalisée selon les étapes suivantes :

- Enlever les têtes de sardines et les laver sous l'eau du robinet (Figure II.3).
- Additionner de l'eau à raison de 500 g de têtes/L.
- Faire bouillir les têtes pendant 30 min.
- Laisser refroidir.
- Filtrer à l'aide d'un tissu en gaze.

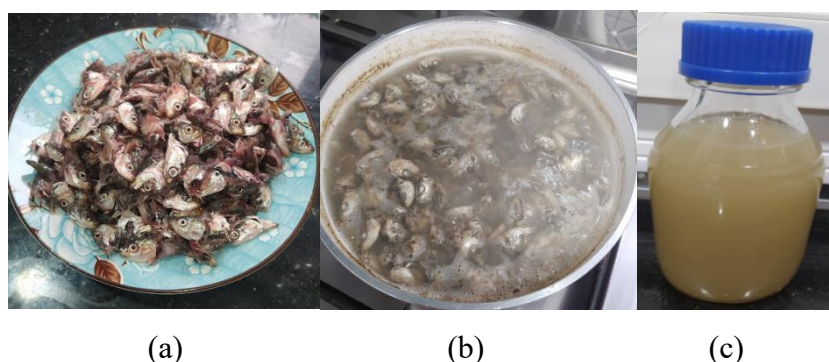


Figure II.3: Têtes de sardines lavées (a), bouillies (b) et moût des têtes de sardines filtré prêt à l'utilisation (c).

2.4. Isolement de la bactérie *Streptococcus thermophilus*

L'isolement de la bactérie *Streptococcus thermophilus* à partir du yaourt repose sur la mise en culture de la flore lactique présente dans l'échantillon sur la gélose nutritive. Les isolats obtenus sont ensuite purifiés afin d'obtenir une culture homogène, puis soumis à diverses analyses d'identification. Cette identification s'appuie sur l'observation des caractères macroscopiques et microscopiques, notamment la morphologie cellulaire et la coloration de Gram.

2.5. Préparation de l'inoculum

- Préparer une suspension bactérienne dans l'eau physiologique stérile à partir de la bactérie *Streptococcus thermophilus*.
- Couler la gélose nutritive dans des boîtes de Petri.
- Laisser solidifier sur une surface froide.

- À partir de la souche mise en suspension, prendre 0,1 ml et le déposer au centre de la gélose dans les boîtes de Petri.
- Étaler la suspension déposée.
- Incuber 24 h à 37 °C.

2.6. Extraction de la chitine

Les différentes étapes de l'extraction de la chitine par voie fermentaire sont :

- Préparer le milieu de culture en mélangeant un moût de rebuts de dattes et un moût de têtes de sardines au rapport 3/1.
- Mélanger 10 g de poudre de carapaces à 100 mL de milieu.
- Autoclaver pendant 2 h à 105 °C.
- Laisser refroidir.
- Rajouter 2 ml de l'inoculum préalablement préparé contenant les colonies bactériennes à chacun de nos flacons d'essai.
- Laisser les flacons sous agitation pendant 7 j en anaérobiose à température ambiante.

2.7. Préparation du chitosane

Dans cette étude, la chitine extraite a servi à préparer du chitosane à partir d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae*. À cet effet, le même milieu de culture que celui utilisé pour l'extraction de la chitine a été employé.

Les différentes étapes de l'extraction par voie fermentaire sont :

- Préparer le milieu de culture.
- Introduire 5 g de chitine dans le milieu de culture préparé à partir de moût de dattes et de moût de tête de sardine.
- Autoclaver pendant 2 h à 105 °C, puis laisser refroidir.
- Rajouter 2 ml de l'inoculum préalablement préparé contenant la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
- Laisser les flacons sous agitation pendant 7j en anaérobiose.
- À la fin de la fermentation, le chitosane est récupéré par filtration à parir d'une compresse, suivie d'un lavage à l'eau distillée.

2.8. Analyse chimique des carapaces et des polymères

2.8.1. Détermination du pH

Pour déterminer le pH des carapaces de la crevette étudiée, 1 g de poudre de carapaces est mélangé à 10 ml d'eau distillée sous agitation. La valeur du pH est déterminée directement à l'aide d'un pH-mètre.

Les valeurs de pH ont été déterminées au début et à la fin des cultures pour l'ensemble des essais à l'aide d'un pH-mètre.

2.8.2. Mesure de la masse volumique

La masse volumique des carapaces a été mesurée par la formule (eq. 2) suivante :

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (\text{eq. 2})$$

- ρ : la masse volumique des carapaces.
- m : la masse des carapaces.
- V : volume des carapaces.

2.8.3. Détermination de la teneur en cendres

À l'issue de chaque essai, la matière solide (carapaces) est lavée à l'eau distillée sur un filtre, puis séchée à l'étuve à 105 °C pendant 2 h avant de déterminer ses taux de déminéralisation et de déprotéinisation.

Le principe repose sur l'incinération de l'échantillon dans un four à moufle à 550 °C pendant 3 h. Les cendres brutes, composées d'éléments minéraux, constituent le résidu après calcination.

Le mode opératoire consiste en :

- Peser le creuset vide (m_0).
- Broyer soigneusement l'échantillon à analyser au hachoir.
- Introduire 1 g de l'échantillon dans le creuset. m_1 étant la masse du creuset contenant la prise d'essai.
- Introduire le creuset dans le four lorsque celui-ci a atteint 550 ± 25 °C.
- Laisser l'échantillon brûler jusqu'à ce que les cendres prennent une couleur blanc-gris clair (Figure II.4).
- Peser la masse du creuset et de son contenu (m_2).



Figure II.4 : Résidus d'incinération obtenus.

La teneur en cendres est exprimée par la formule (eq. 3) suivante :

$$\text{Cendres (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

2.8.4. Calcul du taux de déminéralisation (%DM)

Le degré de déminéralisation est un indicateur de la performance de la déminéralisation. Il est défini par la formule (eq. 4) suivante :

$$\%DM = \frac{(A_0 \times M_0) - (A_r \times M_r)}{(A_0 \times M_0)} \times 100 \quad (\text{eq. 4})$$

Où %DM est le degré de déminéralisation, M_0 et M_r sont les masses initiales et résiduelles du produit, et A_0 et A_r sont les pourcentages de cendres dans le produit initial et résiduel après traitement, respectivement [45].

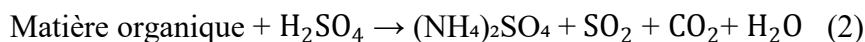
2.8.5. Détermination de l'azote Kjeldahl

La teneur en azote total des échantillons a été déterminée par la méthode de Kjeldahl conformément à la norme **ISO 1871:2009**, qui spécifie la méthode de référence pour le dosage de l'azote dans les produits alimentaires et les aliments pour animaux.

Cette méthode repose sur la transformation de l'azote organique en ion ammonium lors de la minéralisation pour estimer la teneur en protéines à l'aide d'un facteur de conversion approprié, suivie de la distillation de l'ammoniac libéré puis de son dosage par titrage. Elle comprend ainsi trois étapes principales : la minéralisation, la distillation et le titrage.

2.8.5.1. Minéralisation

Au cours de cette étape, l'azote organique est transformé en sulfate d'ammonium selon la réaction (2) :



Le mode opératoire consiste à :

- Introduire 1 g d'échantillon dans un tube de minéralisation.
- Ajouter 12 ml d'acide sulfurique concentré et 5 g de catalyseur.
- Ajouté à froid 2 mL de H₂O₂ à 30 % et laisser agir.
- Placer les matras sur le minéralisateur.
- Lancer la minéralisation pour 3 h.

2.8.5.2. Distillation

Le sulfate d'ammonium produit dans la réaction (2) réagit avec l'hydroxyde de sodium pour libérer l'ammoniac selon la réaction (3) :



Le mode opératoire consiste à :

- Introduire 20 ml de la solution d'acide borique dans un erlenmeyer.
- Ajouter 80 ml d'hydroxyde de sodium pour alcaliniser la solution.
- Ajouter 50 ml d'eau distillée.
- Procéder ensuite à la distillation du minéralisât.

2.8.5.3. Titration

L'ammoniac recueilli dans la solution d'acide borique est dosé par titrage à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 N.

La teneur en azote est exprimée par la formule (eq. 5) suivante :

$$\text{N}_2(\%) = \frac{14 \times \text{N} \times (\text{V}_2 - \text{V}_1)}{m \times 1000} \times 100 \quad (\text{eq. 5})$$

Avec :

- m : masse de la prise d'essai.
- N : titre de l'acide en normalité 0,1 N.
- V₁ : volume d'acide utilisé pour le blanc, en millilitres ;
- V₂ : volume d'acide utilisé pour la prise d'essai, en millilitres.
- 14 : masse atomique de l'azote.

La teneur en protéines totales exprimée en pourcentage par l'équation (eq. 6) :

$$\text{Protéine \%} = N_2(\%) \times 6,25 \quad (\text{eq. 6})$$

- 6,25 : valeur standard utilisée pour convertir la quantité d'azote total mesurée (N) en protéines brutes dans les matières organiques [46].

2.8.6. Détermination du taux de déprotéinisation (%DP)

Le taux de déprotéinisation est défini par la formule (eq. 7) suivante :

$$\text{DP (\%)} = \frac{(P_0 \times M_0) - (P_r \times M_r)}{(P_0 \times M_0)} \times 100 \quad (\text{eq. 7})$$

- DP (%) : degré de déprotéinisation.
- M_0 , M_r : masses initiales et résiduelles du produit, respectivement.
- P_0 et P_r : pourcentages de protéines du produit initial et du produit résiduel après traitement, respectivement [47].

2.8.7. Détermination du degré de désacétylation (DD)

Le degré de désacétylation correspond au rapport entre le nombre de groupements acétylés et celui des groupements non acétylés. Il constitue le paramètre le plus important pour confirmer que le produit préparé est bien de la chitine ou du chitosane. Plusieurs techniques permettent de déterminer le degré de désacétylation [30].

2.8.7.1. Par dosage conductimétrique

Le dosage conductimétrique consiste à mesurer la conductivité électrique de la solution de chitosane au cours de sa solubilisation, au cours d'un titrage acide-base. En effet, lorsque le chitosane est mis en solution dans une quantité excédentaire d'acide chlorhydrique, les ions H^+ se fixent sur les groupements amines libres ($-NH_2$) du chitosane pour les transformer en groupements ammonium ($-NH_3^+$), ce qui rend le chitosane soluble. Un titrage est effectué pour neutraliser la solution et en mesurer la conductivité.

Le mode opératoire peut être résumé comme suit :

- Solubiliser 0,15 g de chitosane dans 10 ml d'une solution de HCl à 0,1 N.
- Ajuster le volume de la solution à 200 ml en ajoutant de l'eau distillée.
- Titrer la solution sous agitation (250 tr/min) avec une solution de NaOH à 0,1 N.
- Mesurer la conductivité des solutions après chaque ajout de 0,5 ml de NaOH.

Le DD du chitosane est déterminé selon la formule (eq. 8) suivante :

$$\text{DD (\%)} = \frac{203.19 \times (V_2 - V_1) \times C_{\text{NaOH}}}{m + 42.03 \times (V_2 - V_1) \times C_{\text{NaOH}}} \times 100 \quad (\text{eq. 8})$$

Avec :

- C_{NaOH} : Concentration de la solution de NaOH (mol/L).
- V_1 : Volume de NaOH nécessaire pour neutraliser l'excès d'acide fort utilisé pour dissoudre le chitosane. Sur la courbe, il indique la fin de la neutralisation de l'acide libre.
- V_2 : Volume total de NaOH versé pour neutraliser à la fois l'acide en excès et les fonctions amines protonées (NH_3^+) du chitosane.
- m : masse du chitosane dissous (0,15g).
- 203 : masse moléculaire des unités acétylées (g/mol).
- 42 : différence de masse moléculaire entre des unités acétylées et non désacétylées (g/mol) [48].

2.8.7.2. Par dosage pH-métrique

Le dosage pH-métrique permet de déterminer la concentration d'une espèce chimique en solution en suivant l'évolution du pH au cours d'une réaction acido-basique, totale et rapide, entre l'espèce à titrer et l'espèce titrante.

Le mode opératoire consiste à :

- Solubiliser 0,5 g de chitosane dans 25 ml d'une solution de HCl à 0,1 N.
- Ajuster le volume de la solution à 100 ml en ajoutant de l'eau distillée.
- Titrer la solution sous agitation (250tr/min) avec une solution de NaOH à 0,05 N.
- Mesurer le pH des solutions après chaque ajout de 0,5 ml de NaOH à 0,05 N.

Le DD a été calculé selon la formule (eq. 9) suivante :

$$\text{DD (\%)} = \frac{161.16 \times C_{\text{NaOH}} \times (V_2 - V_1)}{m} \quad (\text{eq. 9})$$

Où :

- C_{NaOH} : Concentration de la solution de NaOH
- V_1 et V_2 : volumes de NaOH consommés entre les deux points d'inflexion.
- m : masse de l'échantillon, exprimée en g [49].
- 161.16: Masse molaire de l'unité désacétylée du chitosane (g/mol).

Chapitre 3 :

Résultats et discussion

1. Caractérisation chimique des carapaces de crabes

Les analyses chimiques réalisées dans ce travail sont basées sur la détermination de la teneur en cendres, la teneur en protéines, ainsi que la mesure du pH et de la masse volumique.

1.1. Mesure du pH

La valeur du pH des carapaces de crabes est de 6,26. Cette valeur de pH légèrement acide peut s'expliquer par la présence simultanée de composés minéraux de caractère basique et de matières organiques susceptibles de produire des composés légèrement acides.

Le maintien d'un pH acide constitue une condition essentielle à une déminéralisation efficace des carapaces de crustacés en vue de l'extraction de la chitine. En effet, les carapaces sont principalement composées de carbonate de calcium, dont la dissolution est favorisée en milieu acide. La diminution du pH permet ainsi la réaction entre les ions H^+ et le carbonate de calcium, entraînant sa solubilisation et sa libération sous forme de dioxyde de carbone et de sels dissous. Cette étape est indispensable pour éliminer la fraction minérale de la matrice biologique et obtenir une chitine de plus haute pureté, tout en facilitant les traitements ultérieurs de déprotéinisation et de purification. Par conséquent, le contrôle du pH constitue un paramètre clé pour optimiser le rendement et la qualité de la chitine extraite.

1.2. Masse volumique

La masse volumique apparente des carapaces de crabes broyées a été déterminée à 0,1 g/mL. Cette valeur est inférieure à celles rapportées dans la littérature pour la chitine issue de carapaces de crabes, dont la masse volumique est de 0,33 g/mL. La faible masse volumique observée traduit ainsi une structure des carapaces de crabes utilisées dans la présente étude, relativement poreuse et peu compacte.

Le calcul de la masse volumique des carapaces constitue un paramètre important pour l'évaluation de leur aptitude à l'extraction de la chitine. En effet, une faible masse volumique traduit généralement une structure moins compacte et plus poreuse, ce qui facilite la pénétration des réactifs utilisés lors des étapes de déminéralisation et de déprotéinisation. Cette meilleure diffusion des solutions acides et alcalines favorise une élimination plus efficace des composés minéraux et protéiques, ce qui conduit à une extraction de chitine de

meilleure qualité et à un rendement potentiellement plus élevé. Par conséquent, de faibles valeurs de masse volumique sont souvent considérées comme un indicateur favorable pour optimiser le procédé d'extraction de la chitine.

1.3. Teneur en cendres

La teneur en cendres des carapaces de crabes est de 45,98 %. Cette valeur est supérieure à celle rapportée par **Byun et al. (2013)** qui est de 39,85 % [50]. Elle est toutefois inférieure à 56,08 % obtenu par **d'Ewais et al. (2023)** [51], et à celles rapportées par **Youn et al. (2009)** chez le crabe *Chionoecetes opilio*, qui sont de 51,07 %, 51,67 % et 49,47 % pour les différents échantillons analysés [52].

La teneur en minéraux des carapaces de crustacés est une caractéristique variable qui dépend de nombreux facteurs biologiques et environnementaux. En effet, elle peut différer selon l'espèce considérée, la taille et l'âge des individus, ainsi que leur stade physiologique ou leur cycle de mue. De plus, des facteurs externes tels que la saison de collecte, les conditions du milieu de vie, l'alimentation ou encore la localisation géographique influencent la composition minérale des carapaces. Ces variations sont principalement dues aux fluctuations de la quantité de carbonate de calcium et d'autres sels minéraux présents dans l'exosquelette. Par conséquent, l'évaluation préalable du taux de minéraux est indispensable pour adapter les conditions de déminéralisation et optimiser le procédé d'extraction de la chitine.

1.4. Teneur en protéines

La teneur en protéines indique la proportion de composés protéiques présents dans les carapaces de crustacés, essentiels à leur rigidité et à leur résistance mécanique. Évaluer ce paramètre permet d'en connaître la composition biochimique et d'estimer la quantité de protéines à retirer lors de la déprotéinisation.

Dans cette étude, la teneur en protéines des carapaces de crabes est de 25,38 %. Ce pourcentage dépasse celui de **Youn et al. (2009)** qui a enregistré une valeur de 22,42 % [52], et celui de **Pires et al. (2017)** compris entre 13,2 % et 20,7 % [53]. Cependant, la valeur obtenue ici est inférieure à celle de **Byun et al. (2013)** qui s'élevait à environ 29,48 % [50].

2. Identification de la bactérie *Streptococcus thermophilus*

L'identification de la bactérie *Streptococcus thermophilus* a pu être réalisée en s'appuyant sur l'observation des caractères macroscopiques et microscopiques des bactéries isolées du yaourt présente dans la (figureIII.1).

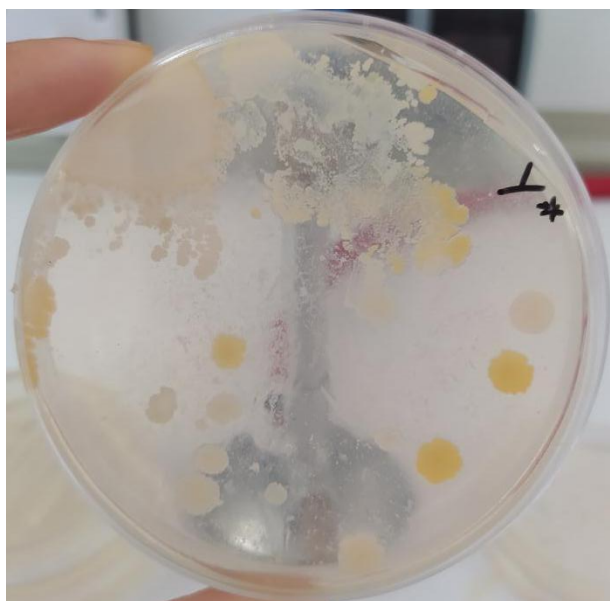


Figure III.1: Colonies de la flore lactique de yaourt après incubation

Les caractères macroscopiques des colonies sont résumés dans le tableau III.1. Ils sont typiques de la bactérie *Streptococcus thermophilus*.

Tableau III.1: Caractères macroscopiques des colonies isolées.

Forme	Colonies circulaires et régulières
Taille	De 1 à 3 mm
Surface	Lisse et brillante
Bord	Entier et bien délimité
Relief	Légèrement bombé (convexe)
Couleur	Blanc crème à blanc jaunâtre
Texture	Crémeuse

Les caractères microscopiques ont pu être observés après coloration différentielle de Gram et observation au microscope photonique présenté dans la (Figure III.2).



Figure III.2: Coloration de gram de la bactérie.

Nous avons pu constater que les bactéries étaient en forme de cocci à Gram positif disposées le plus souvent en chaînes plus ou moins longues. Aucune spore n'a pu être observée.

Ces observations orientent vers *Streptococcus thermophilus*.

3. Caractérisation chimique de la chitine

3.1. Mesure du pH début et en fin de fermentation

Les résultats des mesures de pH du milieu au début et à la fin de la fermentation sont présentés dans le (Tableau III.2).

Tableau III.2: Valeurs du pH du milieu avant et après la fermentation permettant l'extraction de la chitine.

Echantillons	Moût de dattes	Moût de têtes de sardines	Avant fermentation	En fin de fermentation
pH	5,51	6,93	6,26	5,52

Le moût de dattes présente un pH de 5,51, ce qui confirme son caractère légèrement acide. Cette valeur est légèrement supérieure à celle rapportée par **Chibi et El-hadi (2018)** comprise entre 5,06 et 5,32 [54] , mais également proche de celle obtenu par **Bouchachia (2019)** avec une valeur de 5,62 [55]. Ces différences peuvent être attribuées à la variété des dattes utilisées, à leur degré de maturité et aux conditions de préparation du moût.

Le moût de têtes de sardines présente un pH de 6,93, proche de la neutralité. Cette valeur peut s'expliquer par sa richesse en protéines et en composés azotés issus des tissus musculaires et des résidus biologiques du poisson. Ces composés confèrent au milieu une capacité tampon qui limite les variations importantes du pH.

Les résultats des mesures de pH montrent que le milieu de fermentation présentait un pH initial de 6,26, qui a diminué à 5,52 après la fermentation (Tableau III.2). Cette diminution du pH traduit l'activité métabolique des micro-organismes fermentaires, qui utilisent les substrats carbonés disponibles pour produire des acides organiques, principalement l'acide lactique, ce qui favorise la solubilisation des sels minéraux présents dans les carapaces de crabe et contribue au processus de déminéralisation.

Ces valeurs finales se situent dans l'intervalle de pH (5–6,4) favorable à l'activité protéolytique rapportée par **Sixto-Berrocal et al. (2023)** [56]. Dans ces conditions, les protéases produites par les microorganismes peuvent hydrolyser plus efficacement les protéines associées à la chitine, ce qui contribue au processus de déprotéinisation biologique.

3.2. Taux de déminéralisation et de déprotéinisation

Le tableau III.3 ci-dessous présente les résultats relatifs à la teneur en cendres et en protéines, au taux de déminéralisation et de déprotéinisation, ainsi qu'au pourcentage d'azote total à l'issue de la fermentation.

Tableau III.3: Résultats des teneurs en cendres, en protéines, en azote, du taux de déminéralisation et du taux de déprotéinisation de chitine

Echantillon	Teneur en cendres	Taux de déminéralisation	Teneur en azote	Teneur en protéines	Taux de déprotéinisation
Résultat (%)	49,27	43,61	2,4	15,14	40,36

Les taux de déminéralisation obtenus après fermentation sont de 43,61 %. Cette valeur reste inférieure à celles rapportées dans plusieurs études portant sur l'extraction biologique de la chitine à partir de carapaces de crabes. En effet, **Oh et al. (2008)** ont obtenu des taux de déminéralisation compris entre 89 et 92 % après 7 jours de fermentation par *Lactobacillus paracasei* [57], tandis que **Younes et Rinaudo (2015)** ont rapporté des taux de 80 à 83 % en

utilisant différentes souches de *Bacillus* [29]. Elles sont également inférieures aux résultats obtenus par **Castro et al. (2018)**, qui ont rapporté une déminéralisation de 99,6 % après fermentation lactique par *Lactobacillus plantarum* [27]. De même, **Younes et Rinaudo (2015)** ont obtenu des taux de déminéralisation de 80 à 83 % en utilisant différentes souches bactériennes [29].

Le taux de déprotéinisation après fermentation s'élève à 40,36 %. Ce chiffre est inférieur à celui rapporté dans plusieurs études portant sur l'extraction biochimique de la chitine à partir de carapaces de crabes. Par exemple, [57] ont atteint un taux de 95,3 % après 7 jours de fermentation avec *Lactobacillus paracasei*, tandis que [29] ont constaté des taux de 90 à 94 % en utilisant différentes souches de *Bacillus*. Ces résultats sont également plus faibles que ceux de [27], qui ont enregistré 95,3 % de déprotéinisation après fermentation lactique avec *Lactobacillus plantarum*. De plus, [29] ont rapporté des taux de 90 à 94 % en phase de déprotéinisation avec diverses souches bactériennes.

Les écarts observés entre les résultats peuvent être attribués à plusieurs facteurs, notamment à la souche microbienne utilisée, à la durée de fermentation, à la composition du milieu, ainsi qu'aux caractéristiques physico-chimiques des carapaces traitées.

4. Caractérisation chimique de la chitosane

4.1. Mesure du pH en début et en fin de fermentation

Les résultats des mesures du pH du milieu au début et à la fin de la fermentation sont représentés dans le tableau III.4 ci-dessous :

Tableau III.4: Valeurs du pH du milieu avant et après la désacétylation

Echantillon	Avant fermentation	En fin de fermentation
pH	6,01	5,89

Les résultats du pH montrent une légère variation au cours de la fermentation du chitosane. En effet, la levure *Saccharomyces cerevisiae* n'a pas tendance à acidifier le milieu.

La valeur finale de pH obtenue (5,89) est nettement supérieure à celle rapportée par **Scansani et al. (2020)**, qui ont observé un pH final de 3,22 lors de la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* et un pH final de 3,89 lors de la fermentation par la levure *Schizosaccharomyces pombe* [58].

Le pH légèrement acide obtenu est favorable à la désacétylation de la chitine. En effet, un pH trop acide peut entraîner une désacétylation incomplète, ce qui réduit les propriétés fonctionnelles et la solubilité du chitosane. Au contraire, des conditions excessivement alcalines ou maintenues trop longtemps peuvent également entraîner une dégradation partielle des chaînes macromoléculaires, ce qui affecte la masse moléculaire et certaines propriétés physico-chimiques du produit final. Ainsi, le contrôle du pH constitue un facteur essentiel pour optimiser la qualité et les performances du chitosane obtenu.

4.2. Degré de désacétylation (DD)

4.2.1. Dosage pH-métrique

Les courbes pH-métriques (Figure III.1) et les dérivées secondes (Figure III.2) sont présentées ci-contre.

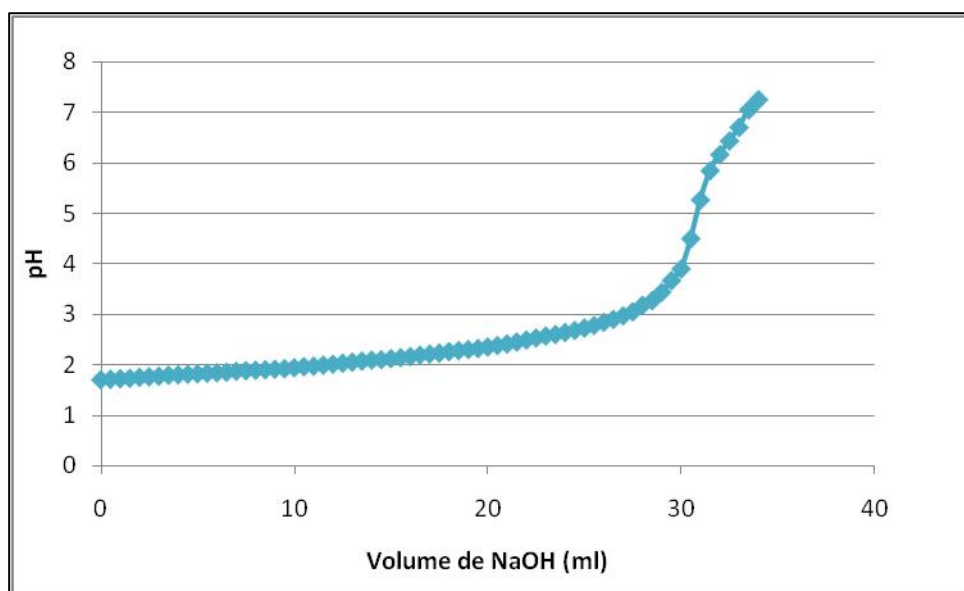


Figure III.3 : Dosage pH-métrique du chitosane

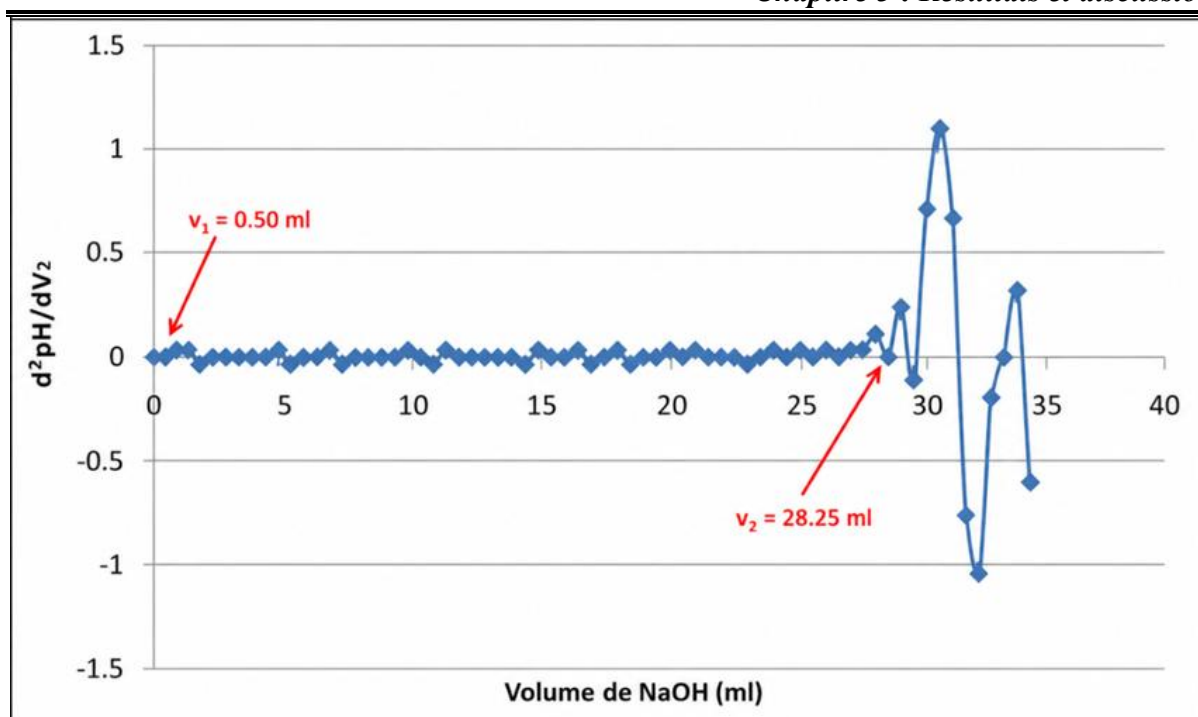


Figure III.4 : Dérivées secondes du dosage pH-métrique du chitosane

La courbe de dosage pH-métrique du chitosane (Figure III.1) présente deux points d'inflexion. Le premier point d'inflexion correspond au volume de soude nécessaire pour neutraliser l'acide HCl en excès (V_1), et le second correspond à la neutralisation de l'acidité totale du milieu (V_2). La différence de volume de NaOH entre ces deux points ($V_2 - V_1$) correspond à la quantité de NaOH nécessaire à la neutralisation des fonctions amines du chitosane. Le DDA obtenu était de 50,36 %. Il a été calculé selon l'équation (9) présentée dans la partie matériel et méthodes. Cette valeur, supérieure à 50 %, confirme la transformation de la chitine en chitosane au cours de l'étape de désacétylation effectuée par la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le DD obtenu dans la présente étude est proche de celui rapporté par **Sarbon et al. (2015)** qui a obtenu un DD de 53,4 % pour un chitosane extrait à partir des carapaces de crabes par voie chimique, en traitant la chitine avec une solution aqueuse de NaOH à 40 %, à 105 °C pendant 2 heures [59]. Cependant, elles demeurent inférieures à celles rapportées par **Yudhantara et al. (2023)** qui ont obtenu des degrés de désacétylation de 74,86 % et 68,93 %, en utilisant des carapaces de crabes crus et des carapaces de crabes cuits respectivement par une désacétylation chimique, en utilisant une solution de NaOH à 50 % [60]. De même, **Hao et al. (2021)** ont obtenu des degrés de désacétylation compris entre 62,2 % et 88,5 % pour du chitosane extrait du crabe bleu japonais *Portunus trituberculatus*, en utilisant de l'eau subcritique acidifiée [61].

4.2.2. Dosage conductimétrique

La courbe du dosage conductimétrique du chitosane est représentée dans la figure ci-dessous (Figure III.3):

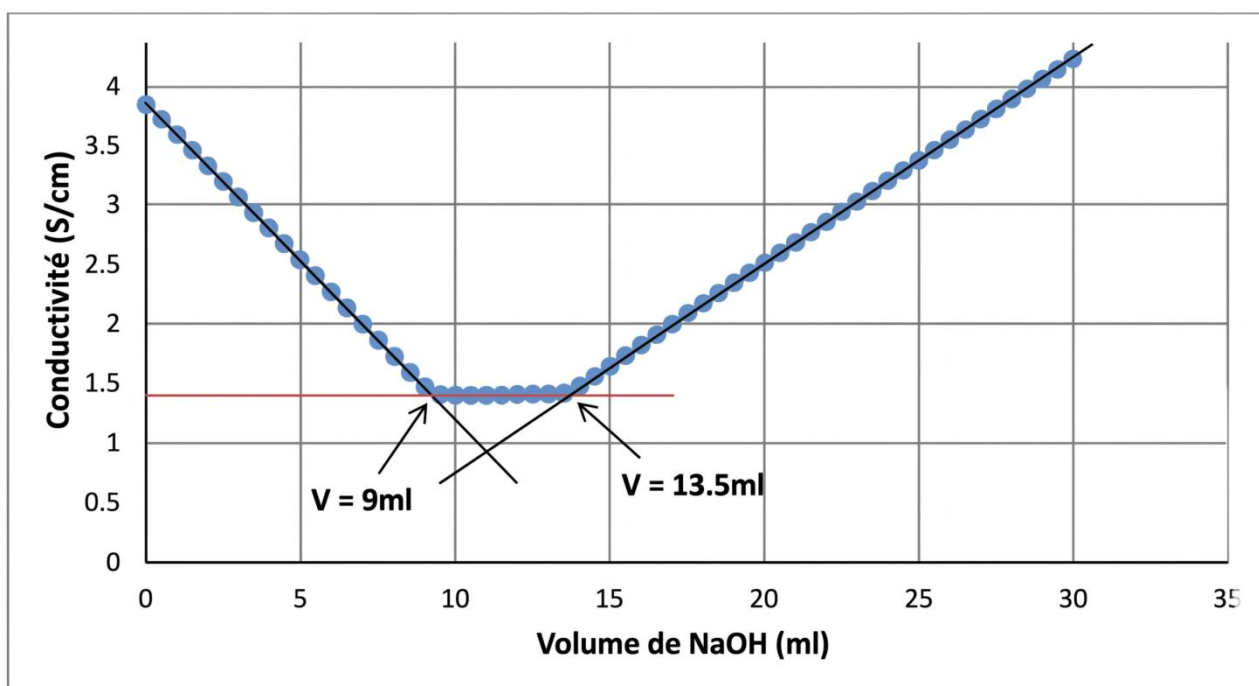


Figure III.5 : Dosage conductimétrique du chitosane

La courbe montre deux points d'inflexion, correspondant à la différence de volume de NaOH entre ces points, ainsi qu'à la quantité de HCl requise pour dissoudre le chitosane. Le calcul du DDA par dosage conductimétrique a été réalisé selon l'équation (8), décrite dans la section matériel et méthodes.

Le degré de désacétylation obtenu par dosage conductimétrique est de 54,08 %. Cette valeur, supérieure à 50 %, confirme la conversion de la chitine en chitosane.

Cette valeur est inférieure à celle trouvées par **Narudin et al. (2022)**, qui ont obtenu un degré de désacétylation entre 70 % et 90 % pour un chitosane extrait de déchets de carapaces de crabes utilisant la souche *Lactobacillus plantarum* [62]. Elle est également moindre que celle de **Sixto-Berrocal et al. (2023)**, qui était d'environ 81,23 % pour un chitosane extrait à partir de carapaces de crevettes en utilisant *Serratia marcescens* B742, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, et *Rhizopus japonicus* M193 [56]. De plus, elle est inférieure à celles obtenues par **Zhang et al. (2017)**, qui ont atteint un DDA supérieur à 78 % après fermentation de carapaces de crevettes avec *Lactobacillus delbrueckii* et *Bifidobacterium*

lactis, suivie d'une désacétylation enzymatique par des enzymes produites par *Aspergillus niger* [63].

Chapitre 4: Étude techno-économique

1. Contexte et objectifs de l'étude

L'étude Technico-Économique Préliminaire (ETEP) analyse la viabilité économique de la production industrielle de chitine et de chitosane à partir de carapaces de crabe, en recourant à une méthode biologique évitant les traitements chimiques intensifs couramment utilisés.

Cette étude est positionnée comme une analyse d'une unité pilote de démonstration, en cohérence avec la disponibilité réelle et limitée des carapaces de crabe en Algérie. La capacité retenue est de 5 tonnes de carapaces sèches par an, correspondant à la borne haute estimée des ressources mobilisables dans le contexte algérien actuel.

La capacité de 5 t/an de carapaces sèches est estimée à partir de deux sources combinées :

- **Pêche côtière artisanale** : captures accidentelles de crabes dans les chaluts et casiers, multi-ports (Béjaïa, Annaba, Jijel, Oran, Mostaganem). Estimation : 2–3 t/an de carapaces récupérables sous réserve d'une collecte organisée.
- **Crabe congelé importé** : consommé dans les grandes surfaces (Label'Vie, Uno) et quelques restaurants de standing. Produit de niche à faibles volumes. Estimation : 1–2 t/an de carapaces générées, actuellement non valorisées.
- **Total combiné** : ~3–5 t/an. La borne haute de 5 t/an est retenue, conditionnée à la mise en place d'une filière de collecte organisée multi-sources.

2. Analyse du marché

2.1. Marché mondial du chitosane

Le chitosane, un biopolymère en forte expansion mondiale, devrait atteindre un marché d'une valeur comprise entre 2,2 et 2,8 milliards USD en 2024. D'ici 2030-2033, sa valeur pourrait atteindre 4–7 milliards USD, avec un taux de croissance annuel moyen (TCAC) de 10 à 14 %. Ces chiffres sont détaillés dans le tableau VI.1.

Tableau VI.1 : Perspectives d'évolution du marché mondial de la chitine et du chitosane et croissance des principaux segments d'application.

Indicateur	2024	2030 (proj.)	TCAC
Marché mondial chitosane	~2,2–2,8 Mrd USD	~4,1–6,9 Mrd USD	~10–14 %/an
Marché mondial chitine	~1,3 Mrd USD	~2,9 Mrd USD (2034)	~8,4 %/an
Segment eau/traitement	33 % du marché	Dominant	14–16 %/an
Segment pharma/biomédical	31 % du marché	Croissance forte	15–17 %/an

Taux de change retenu : 1 USD = 135 DZD (juin 2026)

2.2. Prix de marché par grade

Le procédé microbien sélectionné, avec un DDA de 50 %, classe le produit comme industriel ou agricole. Les prix exprimés en dinars algériens sont présentés dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2 : Valeurs commerciales indicatives de la chitine et du chitosane selon le grade de qualité.

Grade	Prix bas (DZD/kg)	Prix haut (DZD/kg)	Remarques
Industriel / Agriculture	675 – 2 025	3 375	Traitement eau, agrochimie
Alimentaire	2 700 – 5 400	10 800	Conservateur, stabilisant
Pharmaceutique / Médical	6 750 – 13 500	40 500+	Libération de médicaments, pansements
Chitine brute	405 – 1 350	2 700	Intermédiaire

2.3. Opportunité algérienne

L'Algérie possède un potentiel important pour ce type de valorisation qui peut être résumé comme suit :

- Aucun producteur local de chitosane n'a été identifié. C'est un marché entièrement importé, principalement issu d'Asie.
- Le chitosane présente un fort potentiel sur le marché agricole en Algérie, pouvant servir de biostimulant et d'antifongique, notamment dans le maraîchage et l'arboriculture.
- Le chitosane offre un grand potentiel dans le secteur du traitement des eaux, qui se développe grâce aux programmes nationaux d'assainissement.
- Le chitosane a un avantage concurrentiel en Algérie puisque les coûts sont faibles grâce à l'utilisation de matières premières locales, sans droits de douane sur le marché national.

3. Procédé et résultats expérimentaux

- Réception et préparation : lavage, séchage (105°C, 2 h), broyage (fragments 2–5 mm).
- Préparation des moûts : extraction chaude dattes (500 g/L, 45min) + cuisson têtes sardines (500 g/L, 30 min), filtration.
- Fermentation lactique (*Streptococcus thermophilus*) : déprotéinisation + déminéralisation des carapaces, obtention de chitine.
- Fermentation par levure (*Saccharomyces cerevisiae*) : désacétylation biologique de la chitine, obtention de chitosane.
- Récupération & purification : filtration, lavages successifs, séchage, conditionnement.
- Contrôle qualité : pH, teneur en cendres, teneur en protéine, degré de désacétylation.

4. Dimensionnement — Bilan matière annuel

Base de calcul : 100 t de carapaces sèches/an. Taux d'utilisation des équipements : 80 % (300 jours/an, 2 équipes/jour). Le bilan de matière est représenté dans la figure IV.1

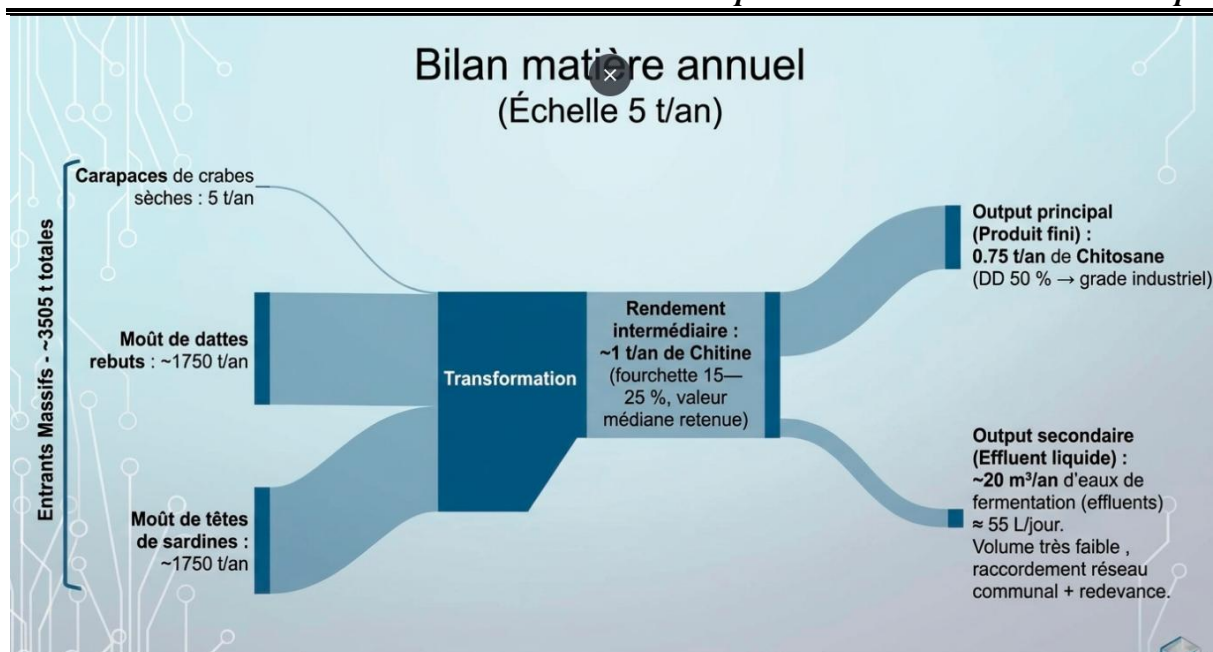


Figure IV.1: Estimation des flux annuels de matières premières, de produits et d'effluents du procédé intégré de production de chitosane.

4.1. Emprise foncière

Surface couverte nécessaire : environ 80–100 m² (atelier process + stockage + laboratoire). Terrain global recommandé : 200–300 m². L'unité pilote est dimensionnée pour opérer avec une équipe de 3 personnes.

4.2. Principaux équipements

- Fermenteurs inox 200 L (×2) : fermentation lactique *Streptococcus thermophilus*. Cycle de 7 jours, ~43 batches/an avec chevauchement des deux cuves.
- Fermenteur inox 100 L (×1) : désacétylation *Saccharomyces cerevisiae*. Intégré dans le cycle de 7 jours total.
- Autoclave : stérilisation des milieux et du matériel avant chaque batch.
- Broyeur semi-industriel (20–50 kg/h) : préparation des carapaces.
- Filtre-pressé + sécheur : récupération et mise en forme du produit fini.

5. Estimation du CAPEX (Investissement initial) — en DZD

Tous les montants sont en Dinars Algériens. Les équipements sont dimensionnés pour une unité pilote de 5 t/an de carapaces. Une marge de 10 % est appliquée pour imprévus et frais d'installation.

Tableau IV.3 : Estimation des dépenses d'investissement (CAPEX) pour l'implantation d'une unité pilote de production de chitosane.

Poste d'investissement	Description / Qté	Montant (DZD)
GÉNIE CIVIL & INFRASTRUCTURE		
Bâtiment production + stockage (60 m²)	Construction légère	2 700 000
Laboratoire contrôle qualité (20 m²)	Aménagement	800 000
Réseaux divers (eau, électricité, évacuation)	Forfait	600 000
ÉQUIPEMENTS PROCESS		
Broyeur semi-industriel (20–50 kg/h)	1 unité	400 000
Étuve (105°C)	2 unités	280 000
Fermenteur inox 200 L (fermentation lactique – <i>Streptococcus thermophilus</i>)	1 unités	540 000
Fermenteur inox 100 L (désacétylation – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1 unité	405 000
Autoclave (stérilisation milieux et matériel)	1 unité	324 000
Filtre-presse / centrifugeuse de laboratoire	1 unité	270 000
Sécheur / étuve de finition produit fini	1 unité	350 000
Agitateurs, pompes, tuyauteries, vannes	Forfait	350 000
ÉQUIPEMENTS LABORATOIRE		
Balance analytique	1 unité	80 000
pH-mètre + conductimètre	1 jeu	60 000
Appareil de Kjeldahl	1 unité	180 000
Four à moufle	1 unité	120 000
Consommables et verrerie laboratoire	Forfait	80 000
IMPRÉVUS & FRAIS D'INGÉNIERIE (10 %)		

Imprévus, frais d'ingénierie, formation initiale	~10 % du total	834 700
TOTAL CAPEX ESTIMÉ		8 347 000 DZD

6. Estimation de l'OPEX (Charges annuelles) — en DZD

Les charges opérationnelles annuelles comprennent les matières premières, la main-d'œuvre, l'énergie, la maintenance et l'amortissement linéaire sur 10 ans.

Tableau IV.4 : Estimation des dépenses annuelles d'exploitation (OPEX) de l'unité de production de chitosane.

Poste de charge opérationnelle	Base / Qté	Montant/an (DZD)
MATIÈRES PREMIÈRES		
Carapaces de crabe (collecte + transport multi-sources)	5 000 kg × 15 DZD/kg	1 000 000
Dattes (rebuts)	1 750 kg × 10 DZD/kg	350 000
Têtes de sardines (résidus de conserverie)	1 750 kg × 5 DZD/kg	175 000
Réactifs chimiques (HCl, NaOH, H ₂ O ₂ , acide borique...)	Forfait annuel	700 000
Milieux de culture, souches, consommables microbiologie	Forfait annuel	350 000
MAIN-D'ŒUVRE		
Ingénieur / Responsable pilote (1 poste)	1 × 120 000 DZD/mois	1 440 000
Technicien process/labo (1 poste)	1 × 60 000 DZD/mois	720 000
Opérateur polyvalent (1 poste)	1 × 50 000 DZD/mois	600 000
ÉNERGIE & UTILITÉS		
Électricité (étuve, fermenteurs, broyeur, labo)	~15 MWh/an × 5 000 DZD	75 000
Eau process + redevance assainissement communal	~20 m ³ /an	8 000
MAINTENANCE & AMORTISSEMENT		

Maintenance préventive des équipements (3 % CAPEX)	$3 \% \times 8\,887\,000$	266 610
Amortissement linéaire (10 ans)	$8\,887\,000 / 10$	888 700
AUTRES CHARGES		
Assurances, frais généraux, loyer foncier	Forfait	120 000
Transport et distribution du produit fini	Forfait	60 000
TOTAL OPEX ANNUEL ESTIMÉ		4 479 560 DZD

7. Analyse de rentabilité préliminaire

Sur la base de 750 kg/an de chitosane grade industriel (DD 65–78 %) au prix de 2 025 DZD/kg. Tous les montants sont en DZD.

Tableau IV.5 : Évaluation de la rentabilité économique du procédé de production de chitosane et analyse de sensibilité.

Indicateur financier	Valeur estimée
Production chitosane / an	~750 kg/an
Prix de vente retenu (grade industriel)	2 025 DZD/kg (= 15 USD/kg $\times$ 135)
Chiffre d'affaires brut annuel	$750\text{ kg} \times 2\,025 = 1\,518\,750\text{ DZD}$
OPEX cash (hors amortissement)	3 590 860 DZD/an
Marge brute opérationnelle (EBE)	– 2 072 110 DZD DZD/an
ANALYSE DE SENSIBILITÉ	
Scénario 1 : grade alimentaire (DD > 85 %, 5 400 DZD/kg)	CA $\rightarrow$ 4 050 000 DZD. EBE $\rightarrow$ + 259 140 DZD. Légèrement positif.
Scénario 2 : réduction MO (1 seul technicien polyvalent)	Économie 2 160 000 DZD/an. EBE $\rightarrow$ - 1 112 110 DZD.
Scénario 3 : valorisation chitine brute en parallèle (1 000 kg $\times$ 810 DZD/kg)	Revenu complémentaire 810 000 DZD. CA total $\rightarrow$ 2 328 750 DZD.
Seuil de rentabilité (avec MO actuelle, grade industriel)	~2 390 kg chitosane/an $\rightarrow$ nécessite ~16 t carapaces/an

8. Risques et recommandations

8.1. Risques principaux

- **Approvisionnement en carapaces** : la production algérienne de crustacés est limitée (~2 200 t/an). Des accords formels avec les coopératives de pêche (Béjaïa, Annaba, Oran, Jijel) sont indispensables avant tout investissement.
- **Variabilité du DDA selon les lots** : la teneur en chitine varie en fonction de l'espèce, de la saison et de la fraîcheur des carapaces. Protocole de contrôle qualité entrée-matière obligatoire.
- **Contamination microbiologique** : les fermenteurs et les milieux doivent être rigoureusement stérilisés à chaque cycle batch. Point critique du procédé à l'échelle industrielle.
- **Compétition import** : le chitosane asiatique est importé à bas prix. L'avantage compétitif algérien repose uniquement sur les coûts locaux de matières premières et l'absence de frais de douane sur le marché national.
- **Rentabilité limitée à 5 t/an** : le modèle économique de l'unité pilote dépend de la valorisation du grade alimentaire ou d'une augmentation de la capacité.
- **Réglementation** : il n'existe aucune norme algérienne spécifique concernant le chitosane alimentaire/pharmaceutique. Il faut limiter le démarrage au marché industriel/agricole (moins contraignant).

8.2. Recommandations

- Signer des accords de collecte avec les coopératives de pêche des ports de Béjaïa, Annaba, Jijel, Oran et Mostaganem avant tout démarrage.
- Établir des partenariats avec les restaurants et grandes surfaces important du crabe congelé pour récupérer les carapaces après consommation.
- Optimiser le DD au-delà de 80 % pour accéder au grade alimentaire (prix $\times 2,7$) sans investissement supplémentaire.
- Valoriser les sous-produits : hydrolysats protéiques des têtes de sardines comme engrais organique liquide — revenu complémentaire non inclus dans cette ETEP.
- Explorer les dispositifs de financement algériens : ANDPME, ANSEJ, fonds d'investissement verts, pour réduire la mise de fonds propres.

- Traitement des effluents : à 55 L/jour, le raccordement au réseau communal est suffisant et économiquement justifié. Prévoir une neutralisation du pH avant rejet (pH entre 6,5 et 8,5 selon la réglementation algérienne).
- Prévoir une phase d'extension (phase 2) intégrant les carapaces de crevettes comme MP complémentaire — ressource bien plus disponible en Algérie — pour atteindre la rentabilité.

Le procédé de production de chitosane par fermentation microbienne (*Streptococcus thermophilus* + *Saccharomyces cerevisiae*) à partir de carapaces de crabe algériennes est techniquement valide et économiquement cohérent dans le contexte d'une unité pilote de démonstration algérienne.

La capacité retenue de 5 tonnes de carapaces/an — correspondant à la borne haute estimée des ressources mobilisables (pêche côtière artisanale + crabe congelé importé) — produit environ 750 kg/an de chitosane grade industriel (DD 65–78 %) pour une durée de fermentation de 7 jours par batch (~43 cycles/an).

L'investissement initial (CAPEX) est estimé à **8 347 000 DZD** (~62 600 USD) pour une unité de taille pilote. Les charges opérationnelles annuelles s'élèvent à ~4 479 560 DZD/an. À ce stade et en grade industriel, l'unité n'est pas autonome financièrement : sa vocation est la validation technique du procédé et la démonstration de faisabilité à l'échelle semi-industrielle.

La rentabilité sera conditionnée soit à l'optimisation du DD au-delà de 80 % (grade alimentaire, CA multiplié par 2,7), soit à l'augmentation de la capacité via une filière d'approvisionnement structurée intégrant les carapaces de crevettes comme matière première complémentaire.

Conclusion générale et perspectives

Face aux défis environnementaux actuels et à la transition progressive des industries vers des procédés plus durables, la valorisation des coproduits marins apparaît comme une solution prometteuse pour réduire les déchets et générer de la valeur. Dans cette optique, les carapaces de crabe, riches en chitine, constituent une ressource renouvelable pouvant être transformée en chitosane, un biopolymère de plus en plus utilisé dans divers secteurs industriels.

Ce travail a évalué la faisabilité d'extraire la chitine des carapaces de crabe par fermentation, puis de la transformer en chitosane. La pureté de la chitine a été estimée en mesurant les taux de déminéralisation et de déprotéinisation après fermentation, tandis que le chitosane a été caractérisé par son taux de désacétylation. Cette approche permet non seulement de réduire les déchets, mais aussi de valoriser des sous-produits en matériaux à forte valeur ajoutée, offrant ainsi d'importants bénéfices économiques et environnementaux.

Les résultats obtenus ont mis en évidence l'efficacité de l'approche biologique adoptée pour la valorisation des carapaces de crabes. La fermentation a permis une réduction significative de la fraction minérale et protéique de la matière première conduisant à l'obtention d'une chitine qui peut être convertie en chitosane. Le degré de désacétylation obtenu confirme la transformation de la chitine en chitosane.

Cette étude met en évidence le potentiel de la voie biologique comme une alternative plus écologique aux procédés chimiques traditionnels pour produire la chitine et le chitosane. Des recherches supplémentaires visant à optimiser les paramètres de fonctionnement et à analyser en détail les biopolymères produits pourraient ouvrir de nouvelles possibilités dans les secteurs biomédical, pharmaceutique, agroalimentaire et environnemental.

Au terme de cette étude, plusieurs perspectives peuvent être envisagées afin d'améliorer les performances du procédé et de favoriser la valorisation industrielle des biopolymères obtenus :

- Optimiser les paramètres de fermentation, notamment le rapport moût de dattes/moût de têtes de sardines, la durée d'incubation, la température et la concentration de l'inoculum, afin d'améliorer les rendements d'extraction de la chitine et du chitosane.
- Étudier l'influence de différentes souches microbiennes, sur les caractéristiques du chitosane produit.
- Réaliser une caractérisation plus approfondie des biopolymères obtenus au moyen de techniques analytiques complémentaires, telles que l'IRTF, la diffraction des rayons X (DRX), la microscopie électronique à balayage (MEB) et l'analyse thermogravimétrique (ATG).
- Étudier la possibilité de transposer ce procédé à plus grande échelle afin de développer une filière de valorisation durable des coproduits marins et agroalimentaires, en accord avec les principes de l'économie circulaire et du développement durable.

Références

bibliographiques

- [1]: Azelee, N. I. W., Dahiya, D., Ayothiraman, S., Noor, N. M., Abd Rasid, Z. I., Ramli, A. N. M., Ravindrah, B., Iwuchukwu, F.U., Selvasembian, R. (2023). Sustainable valorization approaches on crustacean wastes for the extraction of chitin, bioactive compounds and their applications-A review. *International journal of biological macromolecules*, 253, 126492.
- [2]: Xie, S. (2026). Transforming seafood processing residues into a circular blue bioeconomy: modern advances, integrated pathways and industrial translation. *Food Chemistry*, 149479.
- [3]: Korampattu, L., Ghosh, N., & Dhepe, P. L. (2024). Shell waste valorization to chemicals: methods and progress. *Green Chemistry*, 26(10), 5601-5634.
- [4]: Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2013). Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3), 14-14.
- [5]: Lakshmi, D. S., Ravindran, L., Mary, P. M., Rathika, G., Sreekala, M. S., & Munisamy, S. (2024). Valorization of crustacean shells: preparation, characterization, and chemical modification of nano-chitin biopolymer membrane for application in water purification. *Waste and Biomass Valorization*, 15(11), 6067-6090.
- [6]: Rossi, N., Grosso, C., & Delerue-Matos, C. (2024). Shrimp waste upcycling: unveiling the potential of polysaccharides, proteins, carotenoids, and fatty acids with emphasis on extraction techniques and bioactive properties. *Marine Drugs*, 22(4), 153.
- [7]: FAO (2016). La Situation Mondiale des Pêches et de L'aquaculture.
- [8]: Zhang, Z., Ma, Z., Song, L., & Farag, M. A. (2024). Maximizing crustaceans (shrimp, crab, and lobster) by-products value for optimum valorization practices: A comparative review of their active ingredients, extraction, bioprocesses and applications. *Journal of Advanced Research*, 57, 59-76.
- [9]: Saravanan, A., Kumar, P., Yuvaraj, D., Jeevanantham, S., Aishwaria, P., Gnanasri, P., Gopinath, M., & Rangasamy, G. (2023). A review on extraction of polysaccharides from crustacean wastes and their environmental applications. *Environmental research*, 115306 .
- [10]: Hamed, I., Özogul, F., & Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in food science & technology*, 48, 40-50.
- [11]: Vidal, J. L., Jin, T., Lam, E., Kerton, F., & Moores, A. (2022). Blue is the new green: Valorization of crustacean waste. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 100330.

- [12]: Xia, F. L. W., Supri, S., Djamaludin, H., Nurdiani, R., Seng, L. L., Yin, K. W., & Rovina, K. (2024). Turning waste into value: Extraction and effective valorization strategies of seafood by-products. *Waste Management Bulletin*, 2(3), 84-100.
- [13]: FAO. 2020. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture.
- [14]: Mutalipassi, M., Esposito, R., Ruocco, N., Viel, T., Costantini, M., & Zupo, V. (2021). Bioactive compounds of nutraceutical value from fishery and aquaculture discards. *Foods*, 10(7), 1495.
- [15]: Topić Popović, N., Lorencin, V., Strunjak-Perović, I., & Čož-Rakovac, R. (2023). Shell waste management and utilization: mitigating organic pollution and enhancing sustainability. *Applied Sciences*, 13(1), 623.
- [16]: Nag, M., Lahiri, D., Dey, A., Sarkar, T., Pati, S., Joshi, S., Bunawan, H., Mohammed, A., Edinur, H., Ghosh, S., & Ray, R. (2022). Seafood Discards: A Potent Source of Enzymes and Biomacromolecules With Nutritional and Nutraceutical Significance. *Frontiers in Nutrition*, 9.
- [17]: De Aguiar Saldanha Pinheiro, A. C., Martí-Quijal, F. J., Barba, F. J., Tappi, S., & Rocculi, P. (2021). Innovative non-thermal technologies for recovery and valorization of value-added products from crustacean processing by-products—An opportunity for a circular economy approach. *Foods*, 10(9), 2030.
- [18]: Oroian, C., Balint, C., Popescu, M., Bora, F. D., I. Valentin Petrescu-Mag, & Rusu, T. (2025). Overview: chitin as a shared structural hallmark of fungi and insects. In *ELBA Bioflux* 17(1), 54–55.
- [19]: Ahmad, S. I., Ahmad, R., Khan, M. S., Kant, R., Shahid, S., Gautam, L., & Hassan, M. I. (2020). Chitin and its derivatives: Structural properties and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 526-539.
- [20]: Hou, J., Aydemir, B. E., & Dumanli, A. G. (2021). Understanding the structural diversity of chitins as a versatile biomaterial. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 379(2206).
- [21]: Annouar, S., Soufiane, A., & Mountadar, M. (2005). Étude de la dénitratisation par des adsorbats naturels (chitine et chitosane). *Environnement, Ingénierie & Développement*, 37, 34-42.
- [22]: Elsayed Mahmoud, D., & Billa, N. (2024). Physicochemical modifications in microwave-irradiated chitosan: biopharmaceutical and medical applications. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 35(6), 898-915.

- [23]: Mohan, K., Muralisankar, T., Jayakumar, R., & Rajeevgandhi, C. (2021). A study on structural comparisons of α -chitin extracted from marine crustacean shell waste. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100037.
- [24]: Casadidio, C., Peregrina, D. V., Gigliobianco, M. R., Deng, S., Censi, R., & Di Martino, P. (2019). Chitin and chitosans: Characteristics, eco-friendly processes, and applications in cosmetic science. *Marine drugs*, 17(6), 369.
- [25]: Izadi, H., Asadi, H., & Bemani, M. (2025). Chitin: A comparison between its main sources. *Frontiers in Materials*, 12, 1537067.
- [26]: Santos, V. P., Marques, N. S., Maia, P. C., Lima, M. A. B. D., Franco, L. D. O., & Campos-Takaki, G. M. D. (2020). Seafood waste as attractive source of chitin and chitosan production and their applications. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4290.
- [27]: Castro, R., Guerrero-Legarreta, I., & Bórquez, R. (2018). Chitin extraction from *Allopetrolisthes punctatus* crab using lactic fermentation. *Biotechnology Reports*, 20, e00287.
- [28]: Yadav, M., Goswami, P., Paritosh, K., Kumar, M., Pareek, N., & Vivekanand, V. (2019). Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1), 8.
- [29]: Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*, 13(3), 1133-1174.
- [30]: Kozma, M., Acharya, B., & Bissessur, R. (2022). Chitin, chitosan, and nanochitin: extraction, synthesis, and applications. *Polymers*, 14(19), 3989.
- [31]: Schmitz, C., González Auza, L., Koberidze, D., Rasche, S., Fischer, R., & Bortesi, L. (2019). Conversion of chitin to defined chitosan oligomers: Current status and future prospects. *Marine drugs*, 17(8), 452.
- [32]: Dave, U., Somanader, E., Baharlouei, P., Pham, L., & Rahman, M. A. (2021). Applications of Chitin in Medical, Environmental, and Agricultural Industries. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(11), 1173.
- [33]: Wang, W., Meng, Q., Li, Q., Liu, J., Zhou, M., Jin, Z., & Zhao, K. (2020). Chitosan derivatives and their application in biomedicine. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 487.
- [34]: Jiménez-Gómez, C. P., & Cecilia, J. A. (2020). Chitosan: a natural biopolymer with a wide and varied range of applications. *Molecules*, 25(17), 3981.
- [35]: Desbrieres, J. (2002). Chitine et chitosane. *Actualité Chimique*, (11/12), 39-44.

- [36]: Alemu, D., Getachew, E., & Mondal, A. K. (2023). Study on the Physicochemical Properties of Chitosan and their Applications in the Biomedical Sector. *International Journal of Polymer Science*, 2023(1), 5025341.
- [37]: Dutta, J. (2022). A facile approach for the determination of degree of deacetylation of chitosan using acid-base titration. *Heliyon*, 8(7).
- [38]: Abo Elsoud, M. M., Mohamed, S. S., Selim, M. S., & Sidkey, N. M. (2023). Characterization and optimization of chitosan production by *Aspergillus terreus*. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 48(1), 93-106.
- [39]: Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*, 13(19), 3256.
- [40]: Bellich, B., D'Agostino, I., Semeraro, S., Gamini, A., & Cesàro, A. (2016). "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans. *Marine Drugs*, 14(5), 99.
- [41]: Chicea, D., & Nicolae-Maranciuc, A. (2024). A review of chitosan-based materials for biomedical, food, and water treatment applications. *Materials*, 17(23), 5770.
- [42]: Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*, 13(19), 3256.
- [43]: Brasselet, C., Pierre, G., Dubessay, P., Dols-Lafargue, M., Coulon, J., Maupeu, J., Vallet-Courbin, A., de Baynast, H., Doco, T., Michaud, P., & Delattre, C. (2019). Modification of Chitosan for the Generation of Functional Derivatives. *Applied Sciences*, 9(7), 1321.
- [44]: Kaczmarek, M. B., Struszczyk-Swita, K., Li, X., Szczesna-Antczak, M., & Daroch, M. (2019). Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 243.1
- [45]: Rao, M. S., & Stevens, W. F. (2005). Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 80(9), 1080-1087.
- [46]: Vallejo-Domínguez, D., Rubio-Rosas, E., Aguila-Almanza, E., Hernández-Cocoletzi, H., Ramos-Cassellis, M. E., Luna-Guevara, M. L., Rambabu K, Manickam S., Siti Halimatul Munawaroh H., & Show, P. L. (2021). Ultrasound in the deproteinization process for chitin and chitosan production. *Ultrasonics Sonochemistry*, 72, 105417.

- [47] : Xie, J., Xie, W., Yu, J., Xin, R., Shi, Z., Song, L., & Yang, X. (2021). Extraction of chitin from shrimp shell by successive two-step fermentation of *Exiguobacterium profundum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 677126
- [48]: Dos Santos, Z. M., Caroni, A. L. P. F., Pereira, M. R., Da Silva, D. R., & Fonseca, J. L. C. (2009). Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. *Carbohydrate research*, 344(18), 2591-2595.
- [49]: Amamou, O., Kefil, S., Denis, J. P., Boubaker, T., & Cardinal, S. (2024). Revisiting the determination of the degree of deacetylation using potentiometric titration: a new equation for modified chitosan. *Molecules*, 29(13), 2962.
- [50]: Byun, S. M., No, H. K., Hong, J. H., Lee, S. I., & Prinyawiwatukul, W. (2013). Comparison of physicochemical, binding, antioxidant and antibacterial properties of chitosans prepared from ground and entire crab leg shells. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(1), 136-142.
- [51]: Ewais, A., Saber, R. A., Abdel Ghany, A., Sharaf, A., & Sitohy, M. (2023). High quality, low molecular weight shrimp and crab chitosans obtained by short-time holistic high-power microwave technology. *SN Applied Sciences*, 5(12), 365.
- [52]: Youn, D. K., No, H. K., & Prinyawiwatukul, W. (2009). Physicochemical and functional properties of chitosans prepared from shells of crabs harvested in three different years. *Carbohydrate Polymers*, 78(1), 41-45.
- [53]: Pires, C., Marques, A., Carvalho, M. L., & Batista, I. (2017). Chemical characterization of *Cancer pagurus*, *Maja squinado*, *Necora puber* and *Carcinus maenas* shells. *Journal of Poultry, Fisheries and Wildlife Sciences*, 5(1), 1-6.
- [54]: Chibi, S., & El-hadi, D. (2018). La bio-production de l'éthanol à partir de déchets de dattes: effet de l'incorporation des cendres du noyau de deglet-nour sur le rendement. *Agrobiologia*, 8(1), 685-694.
- [55]: Bouchachia, S. (2019). Valorization of Date Waste: Comparative Study between the Dry Variety of Dates Mech-Degla and the Must of Fermentation. *Journal of Advanced Research in Science and Technology*, 6(2), 1078-1089.
- [56]: Sixto-Berrocal, A. M., Vázquez-Aldana, M., Miranda-Castro, S. P., Martínez-Trujillo, M. A., & Cruz-Díaz, M. R. (2023). Chitin/chitosan extraction from shrimp shell waste by a completely biotechnological process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 230, 123204.

- [57]: Oh, K. T., Kim, Y. J., Van Nguyen, N., Jung, W. J., & Park, R. D. (2008). Effect of crab shell size on bio-demineralization with lactic acid-producing bacterium, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(5), 566-570.
- [58]: Scansani, S., Rauhut, D., Brezina, S., Semmler, H., & Benito, S. (2020). The impact of chitosan on the chemical composition of wines fermented with *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods*, 9(10), 1423.
- [59]: Sarbon, N. M., Sandanamsamy, S., Kamaruzaman, S. F. S., & Ahmad, F. (2015). Chitosan extracted from mud crab (*Scylla olivacea*) shells: physicochemical and antioxidant properties. *Journal of food science and technology*, 52(7), 4266-4275.
- [60]: Yudhantara, S. M., Sugiyo, W., & Buanasari, B. (2023). Perbandingan kualitas kitosan pada limbah cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) rebus dan mentah ditinjau dari% n-deasetilasi. *Jurnal Farmasi & Sains Indonesia*, 6(2), 200-204.
- [61]: Hao, G., Hu, Y., Shi, L., Chen, J., Cui, A., Weng, W., & Osako, K. (2021). Physicochemical characteristics of chitosan from swimming crab (*Portunus trituberculatus*) shells prepared by subcritical water pretreatment. *Scientific Reports*, 11(1), 1646.
- [62]: Narudin, N. A. H., Rosman, N. A., Shahrin, E. W. E., Sofyan, N., Hanif Mahadi, A., Kusrini, E., & Usman, A. (2022). Extraction, characterization, and kinetics of N-deacetylation of chitin obtained from mud crab shells. *Polymers and Polymer Composites*, 30, 09673911221109611.
- [63]: Zhang, H., Yun, S., Song, L., Zhang, Y., & Zhao, Y. (2017). The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 334-339.