

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

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
Ecole Nationale Polytechnique

Département de Génie de l'Environnement

Laboratoire des Biotechnologies et Génie des Procédés

THESE DE DOCTORAT
En Génie de l'Environnement

Présenté par :
Mohamed Salah Benhabiles

THEME

VALORISATION DES BIOMASSES MARINES: Carapace de Crevette et Rejet Solide de Poissonneries

Soutenu le 17 mars 2013, devant le jury composé de :

Dr E.H. BENYOUSSEF

Dr N. MAMERI

Dr N. COCHET

Dr L. DJABRI

Dr D. ABDESSAMED

Dr H. GRIB

Professeur, ENP

Professeur, ENP

Professeur, Université de Compiègne

Professeur, UMMTO

Professeur, USTHB

Maître de Conférences, ENP

Président

Directeur de thèse

Examinatrice

Examinatrice

Examineur

Examineur

Année 2013

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le Professeur Nabil Mameri, pour son encadrement, ses qualités humaines et la liberté d'action qu'il m'a accordée tout le long de mes recherches.

Je tiens à remercier le Professeur El Hadi Benyoussef, d'avoir accepté de présider le jury.

J'adresse aussi mes sincères remerciements aux :

Professeur Nelly Cochet de l'université de technologie de Compiègne (France);

Professeur Lydia Djabri de l'université de Tizi-Ouzou;

Professeur Djamel Abdessamed de l'université de Bab-Ezzouar ;

Docteur Hocine Grib de l'école polytechnique d'El-Harrach.

Je tiens à souligner la contribution de l'équipe de recherche et plus particulièrement celle du Professeur H. Lounici, Professeur N. Abdi et Dr N. Derouiche pour leur aide.

A tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail, en particulier ma femme lors de l'impression et le tirage de cette thèse ; et le Cdt Sahraoui lors de la réalisation des spectres infrarouges.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم القوقعة الخارجية للجمبري الابيض (*parapenaeus longirostris*) و النفايات الصلبة الناتجة عن تعليب الاسماك وذلك باستخراج مادة الكيتين من قوقعة الجمبري و استرجاع البروتينات باستخدام طاهرة ما فوق الترشيح عبر تركيب مزود بغشاء معدني CERAVÉR® حيث قدرت نسبة الترشيح 97 % (قوقعة الجمبري) و 90 % (نفايات السمك) ثم قمنا بتحضير مشتقان هما الكيتوزان و الكربوكسيميثيل الكيتوزان. إن الشروط المضبوطة لنزع المادة المعدنية يتم باستعمال 15 مل من محلول HCL بتركيز 1.5ننظامي لكل 1 غرام من محلول القوقعة لمدة 30 دقيقة تحت حرارة الجو. أما لنزع البروتينات ينبغي 20 مل من محلول NaOH بتركيز 2 نظامي لكل 1 غرام من مسحوق القوقعة لمدة ساعتين تحت حرارة 45°م الشروط المضبوطة لتحضير الكيتوزان يتم باستعمال 50مل من محلول NaOH بتركيز 45% لكل 1 غرام من مسحوق الكيتين لمدة 3 ساعات تحت درجة حرارة 100°م .

ثم درسنا تأثير المضاد الحيوي للبكتيري للكيتين و الكيتوزان على أربع أصناف + Gram و سبع أصناف - Gram وعلى ضوء الناتج المتحصل عليها يمكننا القول ان الكيتوزان له تأثير قاتل لجميع البكتيريا المستعملة و خاصة التي تقاوم المضاد الحيوي الكلاسيكي، ثم قمنا بتجريب مفعول الكيتوزان و الكربوكسيميثيل الكيتوزان كعامل واقى للفواكه وذلك بإتباع عدة عوامل كالثقل، الحموضة، نسبة الفيتامين س نسبة السكريات. نلاحظ تباطؤ النضج عند الطماطم المعالجة و تأخر الإلتلاف عند الفرولة المعالجة. مفتاح الكلمات: كيتين, كيتوزان, كربوكسيميثيل, كيتوزان, ما فوق الترشيح.

Résumé :

Cette étude consiste en la valorisation des carapaces de crevettes (*Parapenaeus longirostris*) et des rejets solides des poissonneries par concentration des protéines par le biais du processus d'ultrafiltration équipé d'une membrane minérale CERAVÉR®. Nous avons atteint un taux de rejet de 90% pour le rejet solide et un taux de 97% pour la carapace de crevette. Ensuite, nous avons préparé la chitine, le chitosane et le N,O-carboxyméthylchitosane par la méthode chimique. Les conditions optimales relatives à la déminéralisation sont : 15 mL d'HCl (1,5N) pour 1g de carapace pendant 30 min à température ambiante. Celles relatives à la déprotéinisation sont : 20 mL de NaOH (2N) pour 1g de carapace déminéralisée pendant 2h à 45°C. Par ailleurs, les conditions optimales lors de la transformation de la chitine en chitosane sont : 50 mL de NaOH (45%) pour 1g de chitine pendant 3h à 100°C. Nous avons, par la suite, testé l'effet antibactérien de la chitine et de son dérivé chitosane sur quatre souches à Gram positif et sept souches à Gram négatif. Les résultats ont montré un effet bactériostatique souvent plus marqué dans le cas du chitosane, en particulier, vis-à-vis des bactéries résistantes aux antibiotiques classiques. D'autre part, nous avons testé la capacité du chitosane et de son dérivé N,O-carboxyméthylchitosane à prolonger la durée de conservation des fruits à température ambiante. Pour cela, nous avons suivi l'évolution des paramètres déterminant la qualité du fruit à savoir : la perte en poids, l'acidité, la vitamine C et le taux de sucres. Les résultats ont montré un ralentissement de la maturation chez la tomate et un retardement de la sénescence chez la fraise.

Mots clés : Chitine, Chitosane, N,O-carboxyméthylchitosane, Oligomères, Ultrafiltration, Effet antibactérien, Conservation des fruits.

Abstract :

The purpose of this study is to valorize the white shrimp shell *Parapenaeus longirostris* and the fish solid waste by ultrafiltration process, equipped with mineral membrane CERAVÉR®. We obtained rejection coefficient of about 90% for fish waste, and 97% for shrimp shell waste. Moreover, this valorization consist to chemical preparation of chitin, chitosan and N,O-carboxyméthylchitosan. The optimum conditions for demineralization of shrimp waste were 1,5N HCl at ambient temperature for 30 min with a solid to solvent ratio of 1 :15 (w/v). Optimal deproteinisation involved treatment with 2N NaOH at 45°C for 2h with a solid to solvent ratio of 1 :20 (w/v). Furthermore the conversion of chitin to chitosan was performed with 45% NaOH at 100°C for 3h with a solid to solvent ratio of 1 :15 (w/v). Then, we tested the antibacterial effect of chitin and it's chitosan derivative on four Gram positive bacteria and seven Gram negative bacteria. The results showed that chitosan exhibited a greater bacteriostatic effect than chitin, in particular on bacteria which resist to classical antibiotics. Furthermore, we tested the effectiveness of chitosan and his N,O-carboxyméthylchitosan derivative to extend the shelf life of fruits stored at ambient temperature. The storage quality was studied by measuring the following parameters: weight loss, titrable acidity, reduced ascorbic acid and total sugars. The results showed the potential of using chitosan and N,O-carboxyméthylchitosan derived coatings to slow down ripening in tomatoes and to delay senescence in strawberry.

Keywords : Chitin, Chitosan, N,O-carboxyméthylchitosan, Oligomers, Ultrafiltration, Antibacterial Effect, Storage.

Sommaire

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
I Différentes voies de valorisation des co-produits de crevettes et de poissons	3
I-1 Farine et huiles	3
I-2 Hydrolysats	4
I-2-1 Autolysats	4
I-2-2 Hétérolysats	4
II Ultrafiltration	7
II-1 Définition	7
II-2 Les membranes d'ultrafiltration	9
II-2-1 Caractéristiques des membranes	9
II-2-1-1 Sélectivité d'une membrane	9
II-2-1-2 Perméabilité d'une membrane	10
II-2-1-3 Résistance d'une membrane	10
II-2-1-4 Seuil de coupure	10
II-2-2 Colmatage des membranes	11
II-2-2-1 Définition	11
II-2-2-2 Mécanisme de colmatage	12
II-2-3 Nettoyage des membranes	13
II-3 Les modèles d'ultrafiltration	14
II-3-1 Modèle du tamis moléculaire	14
II-3-2 Modèle osmotique	15
II-3-3 Modèle du film	16
II-4 Modes de fonctionnement	19
II-4-1 Mode en discontinu	19
II-4-2 Mode en continu	20
II-5 Les applications de l'ultrafiltration en industrie alimentaire	21
III Généralités sur la chitine et ses dérivés	22
III-1 Chitine	22
III-2 Chitosane	24
III-2-1 Production du chitosane	25
III-2-2 Caractérisation de la chitine et du chitosane	26
III-2-2-1 Degré de désacétylation	26
III-2-2-2 Poids moléculaire	26
III-2-2-3 Solubilité	27
III-2-3 Propriétés de la chitine et du chitosane	27
III-2-3-1 Propriétés complexantes	28
III-2-3-2 Propriétés biologiques	29

III-3	Les oligomères de la chitine et du chitosane	31
III-3-1	Obtention des chitooligosaccharides	31
III-3-1-1	Méthodes physico-chimiques	32
III-3-1-2	Méthodes enzymatiques	32
III-4	Dérivés carboxyméthylés de la chitine et du chitosane	33
III-5	Applications générales de la chitine et de ses dérivés	36
III-5-1	Le chitosane en tant que biofilm	38
III-5-1-1	Définition de l'enrobage comestible	38
III-5-1-2	Propriétés des enrobages	39
III-5-1-3	Techniques d'enrobage	40
III-5-1-4	Enrobage à base de chitosane	41

CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES

I	Récupération des protéines	42
I-1	Analyses chimiques du rejet de poissonneries	42
I-2	Concentration des protéines	42
I-2-1	Procédé d'ultrafiltration	43
I-2-1-1	Dispositif d'ultrafiltration	43
I-2-1-2	Processus d'ultrafiltration	43
II	Production de la chitine et de ses dérivés	46
II-1	Matière première	46
II-2	Extraction de la chitine	47
II-2-1	Prétraitement des carapaces de crevettes	47
II-2-2	Déminéralisation	48
II-2-3	Déprotéinisation	49
II-3	La désacétylation	49
II-3-1	Mesure des poids moléculaires de chitine et chitosane	50
II-3-2	Mesure du degré de désacétylation	52
II-4	N,O-Carboxyméthylation du chitosane	53
II-5	Production des oligomères	54
III	Activité antibactérienne de la chitine, du chitosane et de leurs oligomères	55
III-1	Microorganismes	55
III-2	Mesure de la croissance microbienne	55
III-2-1	Bactéries aérobies	55
III-2-2	Bactéries anaérobies	56
III-3	Etude de l'effet inhibiteur	56
IV	Conservation des fruits par enrobage à base de chitosane et son dérivé NOCC ..	57
IV-1	Techniques de traitement	57
IV-2	Analyses physico-chimiques	58
IV-2-1	Cas de la tomate	58
IV-2-2	Cas de la fraise	62

CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION

I	Récupération des protéines	63
I-1	Composition chimique des deux rejets	63
I-2	Procédé d'ultrafiltration	64
I-2-1	Cas du rejet liquide	64
I-2-1-1	Détermination de la perméabilité à l'eau	64
I-2-1-2	Influence des paramètres hydrodynamiques sur le flux du perméat	65
I-2-1-3	Essais de concentration	66
I-2-2	Cas du rejet liquide	68
I-2-3	Conclusion	71
II	Production de la chitine et de ses dérivés	72
II-1	Extraction de la chitine	72
II-1-1	Déminéralisation	72
II-1-2	Déprotéinisation	74
II-2	Optimisation de la désacétylation	76
II-3	Caractérisation des produits obtenus	79
II-3-1	Chitine et chitosane	79
II-3-2	N,O-Carboxyméthylchitosane (NOCC)	80
III	Effet antibactérien de la chitine, du chitosane et de leurs oligomères	81
III-1	Bactéries Gram positif	82
III-2	Bactéries Gram négatif	85
IV	Effet de l'enrobage durant la conservation des fruits à température ambiante	91
IV-1	Cas de la tomate	91
IV-1-1	Perte de poids	91
IV-1-2	Acide ascorbique réduit (AAR)	92
IV-1-3	Acidité et sucres totaux	93
IV-1-4	Conclusion	95
IV-2	Cas de la fraise	95
IV-2-1	Pourrissement des fraises	95
IV-2-2	Caractéristiques physico-chimiques	96
IV-2-2-1	Perte de poids	96
IV-2-2-2	pH, acidité et sucres totaux	97
CONCLUSION		99
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		102

ANNEXES

Liste des figures

Figure I.1	Schéma représentatif d'un processus d'hydrolyse enzymatique classique	5
Figure I.2	Principe d'ultrafiltration tangentielle	7
Figure I.3	Représentation schématique des différents mécanismes de colmatage d'une membrane d'ultrafiltration	12
Figure I.4	Représentation schématique de l'accumulation de matière le long d'une membrane	
Figure I.5	Modélisation de la polarisation de concentration	17
Figure I.6	Séparation membranaire en mode discontinu avec recirculation (en pointillé) ...	19
Figure I.7	Séparation membranaire en mode continu avec recirculation	20
Figure I.8	Comparaison des structures de la chitine (a) et du chitosane (b)	25
Figure I.9	Structures de complexes formés entre le cuivre (II) et le chitosane	28
Figure I.10	Réaction de O-Carboxyméthylation de la chitine	33
Figure I.11	Mécanisme réactionnel de la N,O-Carboxyméthylation du chitosane	34
Figure I.12	Réaction de N-Carboxyméthylation du chitosane	35
Figure I.13	Effet de l'enrobage sur les échanges gazeux	39
Figure II.1	Procédé d'ultrafiltration avec recirculation du perméat	45
Figure II.2	Procédé d'ultrafiltration sans recirculation du perméat	45
Figure II.3	Viscosimètre de type Ubbelohde	50
Figure III.1	Perméabilité à l'eau à $T = 20^{\circ}\text{C}$ et $\text{pH} = 7$	64
Figure III.2	Variation du flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la vitesse à concentration constante, $T = 20^{\circ}\text{C}$ et $\text{pH} = 7$	65
Figure III.3	Evolution du flux de perméat en fonction du temps lors de l'ultrafiltration du rejet liquide à $T = 20^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $\Delta P = 3\text{bars}$ et $U = 6\text{m/s}$	66
Figure III.4	Evolution du taux de rejet en fonction du temps lors de l'ultrafiltration du rejet liquide à $T = 20^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $\Delta P = 3\text{bars}$ et $U = 6\text{m/s}$	67

Figure III.5	Réduction de la DCO durant l'ultrafiltration du rejet liquide à $T = 20^{\circ}\text{C}$, pH = 7, $\Delta P = 3\text{bars}$ et $U = 6\text{m/s}$	68
Figure III.6	Variation des flux du solvant pure et du perméat en fonction de la pression transmembranaire ($T = 37^{\circ}\text{C}$ et $U = 6\text{ m/s}$)	69
Figure III.7	Variation du taux de rejet en fonction de la pression transmembranaire lors de l'ultrafiltration de l'hydrolysate à $T = 37^{\circ}\text{C}$, pH = 2 et $U = 6\text{ m/s}$	70
Figure III.8	Evolution du flux de perméat (■) et du taux de rejet (□) lors de l'ultrafiltration de l'hydrolysate à $T = 37^{\circ}\text{C}$, pH = 2, $\Delta P = 4\text{bars}$ et $U = 6\text{m/s}$	71
Figure III.9.a	Effet de la concentration du HCl sur la déminéralisation des carapaces de crevettes à température ambiante, carapace/acide = 1/15(g/mL) et $t = 24\text{h}$...	72
Figure III.9.b	Effet du taux de dilution sur la déminéralisation d'un gramme de carapaces de crevettes à température ambiante, [HCl] = 1,5N et $t = 1\text{h}$	73
Figure III.9.c	Evolution du taux de déminéralisation des carapaces de crevettes en fonction du temps à température ambiante, carapace/acide = 1/15 (g/L) et [HCl] = 1,5N	
Figure III.10.a	Effet de la concentration de NaOH sur la déprotéinisation des carapaces de crevettes à 25°C , carapace/soude = 1/15 (g/mL) et $t = 24\text{h}$	74
Figure III.10.b	Evolution du taux de déprotéinisation des carapaces de crevettes en fonction fonction du temps à 25°C , [NaOH]=2N et carapace/soude=1/15(g/mL)	75
Figure III.10.c	Effet de la température sur la déprotéinisation des carapaces de crevettes carapace/soude = 1/15 (g/mL), [NaOH] = 2N et $t = 2\text{h}$	75
Figure III.10.d	Effet du taux de dilution sur la déprotéinisation d'un gramme de carapaces de crevettes à 45°C , [NaOH] = 2N et $t = 2\text{h}$	76
Figure III.11.a	Effet de la concentration de NaOH sur la désacétylation $T = 90^{\circ}\text{C}$, $t = 5\text{h}$ et chitine/soude = 1/50 (g/mL)	77
Figure III.11.b	Evolution du D.D en fonction du temps à différentes températures [NaOH] = 45% et chitine/soude = 1/50 (g/mL)	77
Figure III.12	Production de la chitine et du chitosane sous les conditions optimales	78

Figure III.13	Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de <i>Staphylococcus aureu</i> ATCC 25923 (Souche sensible à la pénicilline)	82
Figure III.14	Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de <i>Staphylococcus aureu</i> ATCC 43300 (Souche résistante à la pénicilline)	83
Figure III.15	Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de <i>Bacillus subtilis</i>	84
Figure III.16	Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de <i>Bacillus cereus</i>	84
Figure III.17	Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	85
Figure III.18	Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de <i>Vibrio cholerae</i>	86
Figure III.19	Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de <i>Shigella dysenteriae</i>	87
Figure III.20	Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de <i>Bactéroide fragilis</i>	87
Figure III.21	Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	88
Figure III.22	Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de <i>Salmonella typhimurium</i>	89
Figure III.23	Evolution de la vitamine C chez la tomate stockée à 25 - 30°C	93
Figure III.24	Evolution de l'acidité chez la tomate stockée à 25 - 30°C	94
Figure III.25	Evolution de la teneur en sucres chez la tomate stockée à 25 - 30°C.....	94
Figure III.26	Evolution du taux de pourrissement des fraises stockées à 20 ± 2°C.....	96

Liste des tableaux

Tableau 1	Dimensions de différentes particules, molécules ou ions	8
Tableau 2	Sources potentielles de chitine	23
Tableau 3	Effet du D.D sur l'activité antibactérienne du chitosane	30
Tableau 4	Applications du chitosane	37
Tableau 5	Avantages et inconvénients de l'enrobage comestible	38
Tableau 6	Composition chimique de la carapace de crevette et du rejet solide de la Poissonnerie	63
Tableau 7	Caractéristiques physico-chimiques de la chitine et des chitosanes	79
Tableau 8	Variation du D.C en fonction de la quantité de CH_3COOCl	80
Tableau 9	Concentrations min. inhibitrices de la chitine, du chitosane et de leurs oligomères	81
Tableau 10	Diminution du poids de la tomate stockée à température ambiante (25-30°C)...	91
Tableau 11	Diminution du poids de la fraise stockée à température ambiante (20 ± 2°C)...	96
Tableau 12	Evolution de la qualité organoleptique de la fraise stockée à 20 ± 2°C	97

Introduction générale

1- Contexte générale de l'étude

La production de crevette (pêche et aquaculture) a été de 6 millions de tonnes en 2006, soit un peu près 5% des 110 millions de tonnes de la production mondiale de poissons (FAO, 2009). Une grande partie de ce tonnage fait l'objet d'une transformation industrielle pour être ensuite utilisée en alimentation humaine. Ces étapes de transformation génèrent une quantité importante de co-produits estimée à 50% du volume total (Je et al., 2007). Les co-produits marins sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations de transformation et sont constitués des têtes, des viscères, des arêtes et des queues de poissons. Pour les crevettes, elles engendrent la tête, la carapace et la queue. Malgré leurs qualités intrinsèques, très souvent, ces co-produits ne font l'objet d'aucun traitement spécifique et sont soit directement rejetés dans l'environnement, présentant des risques de pollution et pour la santé ; soit incinérés sans récupération de chaleur (Huong, 2009). Au regard de leur composition, ces déchets s'avèrent très riches en substances méritant d'être valorisées : on peut citer entre autres protéines, lipides, chitine, astaxanthine et éléments minéraux... (Kim et Mendis, 2006). La valorisation de ces co-produits permettrait, en plus du respect de l'environnement, de maximiser le profit des entreprises. Elle consiste à les transformer de manière à ce qu'ils deviennent des matières premières ou des matières intermédiaires pour la production d'autres produits. Compte tenu des substances qu'ils renferment, ils peuvent être utilisés pour la nutrition humaine et animale, la nutraceutique et la pharmaceutique, la cosmétique...

Du fait de leur contenance en protéines, les co-produits marins présentent une potentielle source d'acides aminés essentiels nécessaires pour le bon fonctionnement de l'organisme vivant, et de peptides à activités biologiques. Ainsi, leur valorisation constitue une voie prometteuse pour l'amélioration de la nutrition, directement par leur utilisation en alimentation humaine, ou indirectement par l'alimentation animale. Effectivement, la malnutrition constitue un problème de taille dans le monde, en particulier dans les pays en voie de développement, où les protéines d'origine animale font défaut dans la ration alimentaire.

D'autre part, les co-produits de crevettes engendrent des substances (chitine et chitosane) dotées de propriétés antimicrobiennes qui sont attrayantes, entre autres, pour la conservation des aliments. Actuellement, une petite partie des co-produits de crevettes est transformée. Ces transformations consistent principalement à la conversion en farine pour l'alimentation animale et à l'extraction de la chitine. Les recherches sont alors orientées vers des techniques adéquates et peu coûteuses permettant l'extraction de plusieurs types de substances en même temps.

2- Objectif de l'étude

L'objectif principal de cette étude est de valoriser les co-produits marins à savoir les rejets solides de poissonneries par protéolyse enzymatique et les carapaces de crevettes par traitement chimique. Cette étude se divise en trois chapitres distincts :

- Le premier chapitre est une revue de littérature qui porte, dans une première partie, sur la présentation des différentes méthodes de valorisation des co-produits de crevettes et de poissons, ensuite quelques notions de base (définitions) seront citées pour décrire le procédé d'ultrafiltration. Des notions générales sur la chitine, le chitosane et leurs dérivés seront développés dans la troisième partie. Enfin, nous citerons les secteurs d'applications qui vont être abordés lors de cette étude : activité antibactérienne de la chitine, du chitosane et de leurs dérivés, et la conservation des fruits à température ambiante par enrobage à base de ces produits.
- Le deuxième chapitre présente les expériences conduites en concentration des protéines par ultrafiltration et la production de la chitine et de ses dérivés. Les tests portant sur l'activité antibactérienne des différents produits obtenus seront effectués d'une part sur des microorganismes pathogènes et d'autre part sur des microorganismes alimentaires. Enfin, le potentiel lié à l'utilisation des dérivés de la chitine comme agent conservateur sera testé sur la tomate et la fraise.
- Le troisième chapitre consiste à l'interprétation des différents résultats obtenus.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

I DIFFERENTES VOIES DE VALORISATION DES CO-PRODUITS DE CREVETTES ET DE POISSONS

La valorisation des co-produits marins conduit à des dérivés qui sont utilisés comme matière première ou ingrédient dans d'autres domaines tels que l'agriculture, l'alimentation humaine et animale, la cosmétique, le médical ... A partir d'un même type de co-produit, il est possible d'obtenir différents produits dérivés : farine, huile, hydrolysats... (Dumay, 2006).

I – 1 Farine et huile

La production de farine et d'huile de poisson pour la nutrition animale est actuellement la plus importante valorisation des co-produits marins. Ainsi, en 2006, la production mondiale est estimée à 6 millions de tonnes pour la farine et 896.000 tonnes pour l'huile de poissons (FAO, 2009).

D'une manière générale, les farines et les huiles de poissons sont préparées à partir d'espèces de peu de valeur (anchois, sardine, hareng, ...), mais en raison de la diminution de quantités disponibles de telles espèces, les entreprises tournent vers d'autres sources telles que les co-produits. La farine de poisson est la première source de protéines utilisées pour l'alimentation des animaux d'élevage en raison de ses hautes qualités nutritives. Des études ont montré que les farines issues de rejets de poissons sont aussi efficaces que celles issues des poissons entiers pour l'élevage de crevettes (Sudaryono et al., 1996), de tambour rouge (Li et al., 2004), et de morue (Tibbets et al., 2006).

Les farines contiennent en général de 65 à 67% de protéines et un maximum de 12% de lipides. Elles sont très riches en acides aminés essentiels mais sont très peu solubles (Denes, 2006).

Du fait de leur contenance en pigments caroténoïdes, la farine de co-produits de crevettes présente un intérêt particulier dans l'élevage de salmonidés (saumons et truite). Une étude a été réalisée sur l'utilisation de farine de têtes de crevettes dans l'alimentation de dorade, montrant leur bonne digestibilité (Laining et al., 2003). En élevage porcin, les co-produits de crevettes sont moins digestes que les co-produits de poissons (Famino et al., 2006). D'une manière générale, la qualité des protéines de farine de co-produits de crevettes est inférieure à celle de poissons.

I – 2 Hydrolysats

A l'heure actuelle, des quantités considérables de matériel protéique sont perdues par les industries halieutiques. L'hydrolyse des protéines est donc une des voies privilégiées de la valorisation de ces rejets. Cette hydrolyse de protéines, qui peut se faire par voie chimique ou enzymatique, conduit à une grande variété de produits.

I-2-1 Autolysats

Les autolysats de poissons ou de co-produits de poissons sont obtenus principalement par l'action des enzymes protéolytiques endogènes, initialement présentes dans le système digestif (pepsine, trypsine, chymotrypsine) ainsi que dans le tissu musculaire (cathepsines). Les autolysats sont généralement liquides, riches en acides aminés libres et en petits peptides (Lian et al., 2005). Cependant, l'autolyse n'est jamais complète, même après des incubations de quelques mois (Roy et Durand, 1997).

Pour les co-produits de crevettes, les autolysats sont également aptes pour l'utilisation en alimentation humaine et animale (Bueno-Solano et al., 2009). Ainsi, les sauces produites par autolyse présentent une qualité élevée avec 35% d'acides aminés de plus que les sauces de poissons commerciales (Kim et al., 2003). L'autolysat de têtes de crevettes, du fait de sa teneur élevée en protéines et en acides aminés libres, peut être utilisé comme additif alimentaire (Cao et al., 2009).

I-2-2 Hétérolysats

Les hétérolysats sont des produits obtenus par l'action d'une enzyme ou d'un mélange d'enzymes additionné au milieu. Ce type d'hydrolyse enzymatique présente l'avantage de préserver la valeur nutritionnelle de la matière première et ne nécessite pas de traitement chimique pour éliminer l'agent hydrolysant, l'enzyme étant simplement inactivée par un chauffage modéré (Babu et al., 2008). Grâce à leur haute qualité nutritive, les hydrolysats de poissons sont largement utilisés en nutrition animale particulièrement en aquaculture où ils se substituent partiellement à la farine de poisson (Tang et al., 2008). D'autre part, des études ont mis en évidence une possible substitution des milieux de culture traditionnels pour les microorganismes par des hydrolysats de co-produits de poissons (Aspmo et al., 2005).

A titre d'exemple, nous présentons sur la figure I.1 un processus d'hydrolyse enzymatique des protéines de poissons (Nilsang et al., 2005) :

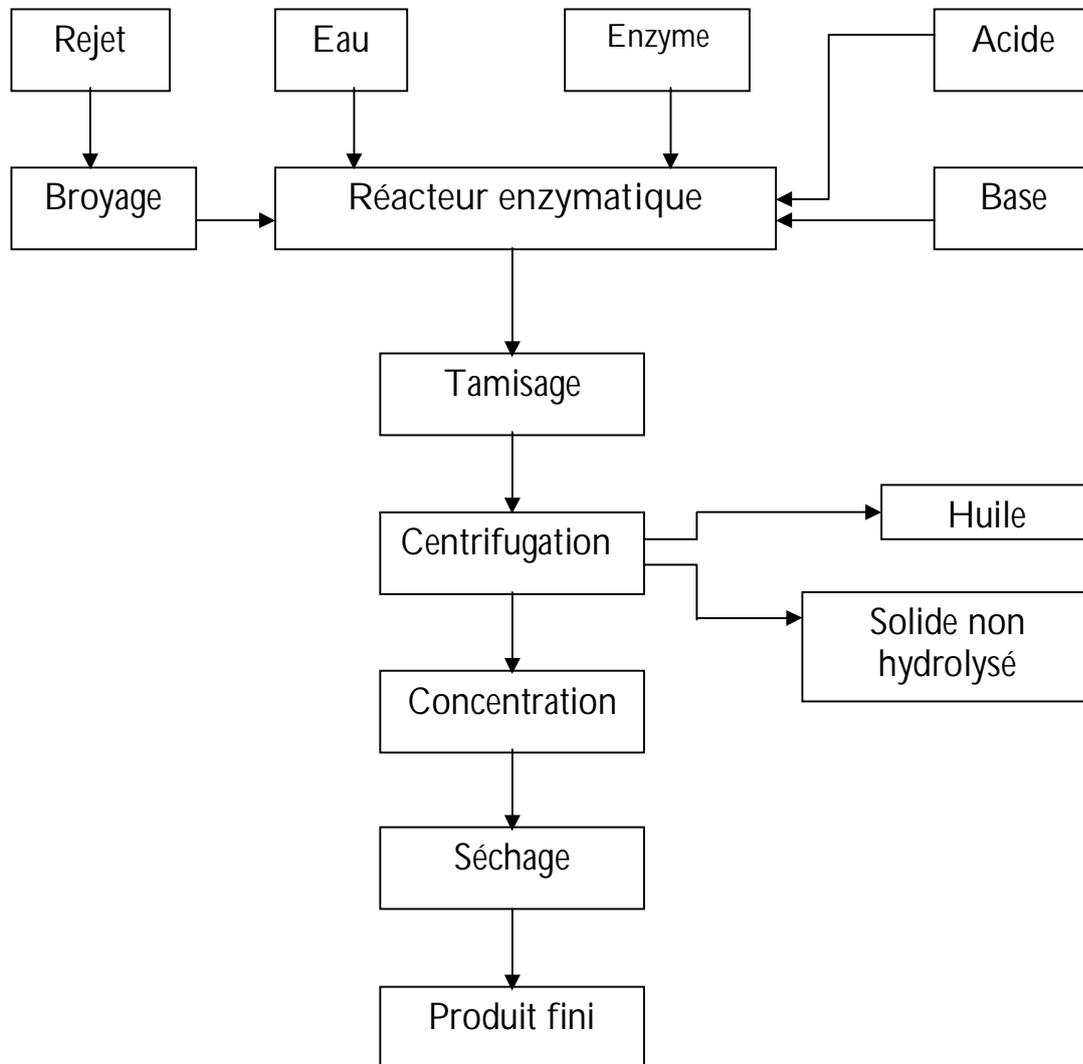


Figure I.1 Schéma représentatif d'un processus d'hydrolyse enzymatique classique.

Dans le réacteur enzymatique, le poisson broyé est mélangé avec une quantité d'eau bien déterminée et, ensuite homogénéisé par simple agitation. Le pH désiré est ajusté par ajout d'acide ou de base concentrée. A ce moment, l'enzyme est ramenée aux conditions optimales d'hydrolyse et, est ajoutée en quantité bien déterminée par rapport au mélange eau poisson. Un mixage adéquat est maintenu jusqu'à la fin de la réaction.

Quand le taux d'hydrolyse désiré est atteint, la réaction est stoppée par désactivation thermique de l'enzyme qui se fait généralement à une température comprise entre 80°C et 100°C. De plus, cette étape éliminera l'humidité et concentrera l'hydrolysât à environ 70% en solide (Mowbrey, 1988).

La réaction d'hydrolyse est suivie de l'opération de tamisage grossier qui consiste à retenir les arêtes et les écailles.

Le séchage peut avoir un large effet sur le produit final. Le séchage par pulvérisation est le meilleur choix pour ce type de produit car il minimise la perte des nutriments, augmente la réhydratation et tend à blanchir le produit. Ce type de séchage n'est, cependant, pas économique avec un liquide dont le revenu solide est moins de 30%. Il convient donc, de concentrer d'abord la fraction protéique liquide. L'étape de concentration doit aussi minimiser les pertes nutritionnelles en évitant les hautes températures et les longues durées (Vandanjon et al., 2007). Il apparaît ainsi, que l'utilisation d'une technique membranaire telle que l'ultrafiltration s'avère appropriée à l'opération de concentration.

II ULTRAFILTRATION

II – 1 Définition

L'ultrafiltration est un procédé membranaire permettant la séparation de macromolécules en phase liquide par perméation à travers une membrane semi-perméable sous l'action d'un gradient de pression. Le solvant, appelé filtrat ou **perméat**, traverse la barrière que constitue la membrane. Les substances retenues, appelées **rétenant**, sont capturées et concentrées sur la surface de la membrane, et peuvent être éliminées du module en continu ou de manière périodique. En ultrafiltration, le rétenant circule tangentiellement à la membrane.

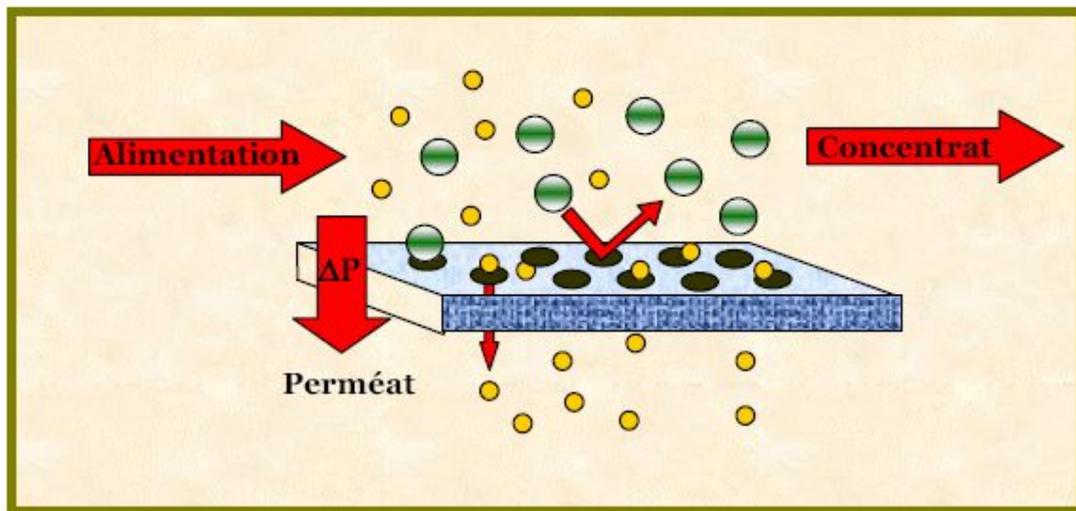


Figure I.2 Principe d'ultrafiltration tangentielle (Malleval et al., 1996).

En terme de pouvoir de séparation, l'ultrafiltration couvre une zone très large (allant de 1 nm à 100 nm) ; en deçà ou au-delà de ces limites, on entre soit dans le domaine de l'osmose inverse, soit dans celui de la microfiltration.

Tableau 1 Dimensions de différentes particules, molécules ou ions (Hagen, 1998).

Espèces	Masse molaire (g/mole)	Dimensions (nm)
Eau	18	0,2
Ions minéraux	10 à 100	0,2 à 0,4
Molécules organiques	30 à 500	0,2 à 0,8
Antibiotiques courants	300 à 1000	0,6 à 1,2
Enzyme	10^4 à 10^5	2 à 5
Protéines et polysaccharides	10^4 à 10^6	2 à 10
Virus		30 à 300
Colloïdes		100 à 1000
Emulsions d'huile		100 à 10000
Bactéries		300 à 10000
Levures et champignons		10^3 à 10000
Solides en suspension		10^4 à 100000

L'ultrafiltration industrielle permet d'atteindre trois objectifs :

1- La concentration de solutions macromoléculaires (protéines, polysaccharides ...) où le rétentat est l'objectif principal.

2- La rétention de macrosolutés nocifs (virus, bactéries, colloïdes ...) présents dans les effluents industriels. Le filtrat est dans ce cas l'objectif principal.

3- Le fractionnement des solutés de faible taille. Le filtrat et le rétentat, sont dans ce cas tous deux valorisables.

II – 2 Les membranes d’ultrafiltration

Une membrane est une interface physique, de faible épaisseur, qui contrôle le transfert d’espèces chimiques entre les deux milieux qu’elle sépare (Audinos et Isord, 1986). Il existe une grande diversité de membrane. Elles sont classées par familles, selon leur nature chimique, leur structure et leur forme liée à leur mode de fabrication. De part leur nature, les membranes sont fabriquées à partir de différents matériaux, de type organique ou minéral :

- Les **membranes organiques** sont fabriquées à partir de polymères. Les polycondensats aromatiques résistent aux fortes températures et aux pH extrêmes.
- Les **membranes minérales** sont faites de céramiques (oxyde d’aluminium, de zirconium ou de titane). Ces membranes ont une stabilité chimique, mécanique et thermique supérieures aux membranes polymériques. Elles sont très sélectives et peuvent être soumises à des nettoyages agressifs sans trop être altérées (Aptel et Buckeley, 1996).

II-2-1 Caractéristiques des membranes

Les membranes sont généralement caractérisées par leur taille des pores, leur seuil de coupure relatif à une masse moléculaire critique, leur sélectivité ainsi que leur perméabilité à l’eau pure dans des conditions standards.

II-2-1-1 Sélectivité d’une membrane

La sélectivité est une caractéristique difficile à quantifier et pourtant essentielle. C’est une caractéristique de surface de la membrane, qui détermine quels composés de la solution la traversent. Elle s’exprime par un taux de rétention R :

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_0} \quad (1)$$

Où C_0 est la concentration de l’espèce à retenir dans la solution

C_p est la concentration de la même espèce dans le perméat.

II-2-1-2 Perméabilité d'une membrane

La perméabilité (L_p) est un paramètre qui caractérise l'aisance avec laquelle l'eau traverse la membrane. La perméabilité dépend principalement de la taille des pores. De façon pratique, la perméabilité peut être définie comme étant le rapport entre le flux de perméat (J_v) et la pression transmembranaire (ΔP) :

$$L_p = \frac{J_v}{\Delta P} \quad (2)$$

Avec $\Delta P = \frac{P_1 + P_2}{2}$ (bar), où P_1 est la pression d'entrée et P_2 la pression de sortie.

En pratique, la perméabilité d'une membrane est déterminée comme la pente de la droite $J_v = f(\Delta P)$.

II-2-1-3 Résistance d'une membrane

La résistance hydraulique (R_m) d'une membrane est définie comme étant sa résistance à l'écoulement du fluide à travers cette membrane. La résistance d'une membrane est l'inverse de sa perméabilité :

$$R_m = \frac{1}{L_p} \quad (3)$$

II-2-1-4 Seuil de coupure

Le seuil de coupure (cut off en anglais) est défini comme étant la masse molaire du plus petit composé modèle retenu à 90% par la membrane (Pontié et al., 2001). Celui-ci se mesure en g/mole ou en Dalton. Le seuil de coupure est une façon pratique de caractériser les membranes, mais pas tout à fait rigoureuse d'un point de vue scientifique, car il dépend aussi des autres caractéristiques du soluté ainsi que des conditions opératoires. En effet, la forme, la structure et l'élasticité des molécules influencent aussi sur la probabilité de passage à travers les membranes (Aimar et Daufin, 2004) :

- **Influence de la forme** : c'est, par exemple, le cas des microorganismes qui ont souvent la forme d'un ellipsoïde de révolution ou de certaines protéines. Selon qu'il est plus ou moins allongé, et en fonction de l'angle sous lequel il aborde la surface de la membrane ; un ellipsoïde peut pénétrer ou non dans l'orifice des pores qu'il rencontre tout le long de sa trajectoire.
- **Influence de l'élasticité** : les particules rigides sont plus faciles à retenir que celles qui sont déformables. Ces dernières peuvent parfois passer au travers de la membrane, même si, d'un point de vue géométrique, elles ne devraient pas la franchir.
- **Influence de la structure** : c'est, par exemple, le cas des protéines qui ont des structures qui dépendent des conditions du pH, de force ionique, de concentration, etc.

C'est pour toutes ces raisons qu'il existe de grandes différences entre le seuil de coupure rapporté par les compagnies manufacturières de membranes et ceux observés dans la pratique (Anselme et Jacobs, 1996).

II-2-2 Colmatage des membranes

II-2-2-1 Définition

Le colmatage est défini comme l'accumulation de matière à la surface de la membrane (en particulier à l'entrée des pores) ou à l'intérieur des pores de membrane. Le colmatage a pour conséquence de réduire le flux d'écoulement ou d'augmenter la pression d'opération, ainsi que de modifier la sélectivité des membranes (Aimar et Sanchez, 1989).

Il est possible de classer les éléments colmatant en deux groupes :

- Les résidus solubles dans l'eau, qui peuvent être éliminés par une étape de rinçage (par exemple, les sucres). Il s'agit du colmatage réversible.
- Les résidus non solubles dans l'eau, qui forment une couche poreuse et résistante, composée principalement de protéines et des sels, ainsi que de microorganismes, colloïdes, etc. Il s'agit de colmatage irréversible nécessitant un nettoyage chimique ou enzymatique (Rabiller-Baudry et al., 2008).

II-2-2-2 Mécanisme de colmatage

Les théories les plus simples donnant une description raisonnable du phénomène de colmatage repose sur trois principaux mécanismes à savoir : accumulation/dépôt de matière par convection, l'obstruction des pores (colmatage en profondeur) et l'adsorption de molécules sur le matériau membranaire (Costa et al., 2006 ; Kim et al., 2008).

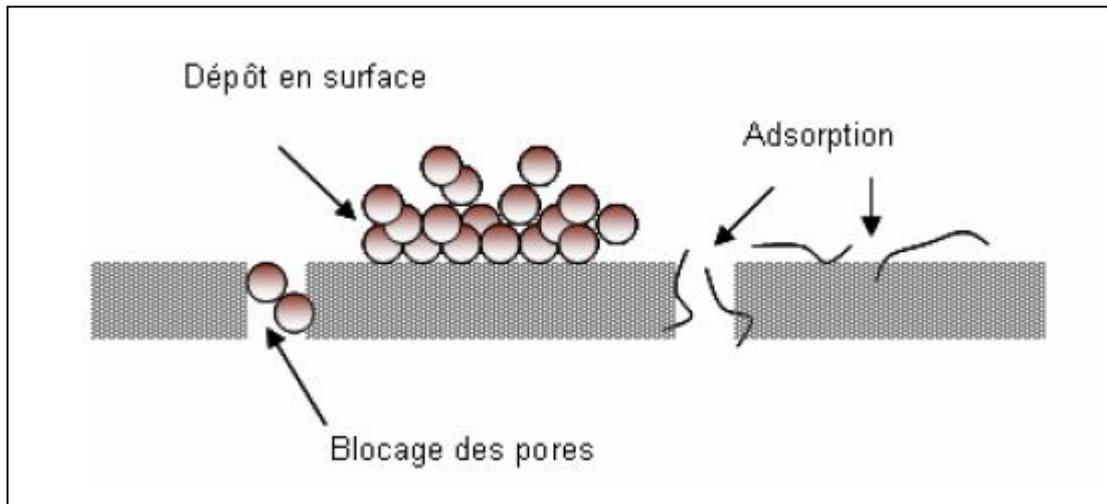


Figure I.3 Représentation schématique des différents mécanismes de colmatage d'une membrane d'ultrafiltration (Labories, 1998).

- **Dépôt de matière en surface** : Ce mécanisme intervient lorsque la solution à traiter contient des matières en suspension et/ou colloïdales. Ces matières constituent alors une couche poreuse sur laquelle peuvent s'accumuler des matières organiques. Ce type de colmatage est généralement réversible.
- **Blocage des pores** : Il s'agit de la pénétration et du blocage, partiel ou total, des pores de la membrane par des matières en suspension dont la taille est proche de celle des pores de la membrane. Un rétrolavage permet généralement d'éliminer ce type de colmatage.
- **Adsorption** : Les solutés ayant une affinité physico-chimique pour le matériau membranaire peuvent s'y adsorber. Cela entraîne une résistance supplémentaire au transfert. Ce type de colmatage est irréversible.

II-2-3 Nettoyage des membranes

Le but du nettoyage est de retrouver, par une procédure chimique, mécanique ou enzymatique, les caractéristiques initiales des membranes. Cependant, les membranes propres ne retrouvent jamais les caractéristiques qu'elles avaient lorsqu'elles étaient neuves et au fur et à mesure des nettoyages, elles ont toujours plus ou moins tendance à se dégrader.

La détermination de la nature et de la structure des éléments qui colmatent la membrane est nécessaire pour établir le choix des agents de nettoyage et des conditions opératoires les plus efficaces. Ainsi, trois types de nettoyage sont généralement pratiqués :

- **Nettoyage mécanique** (Labories, 1998)

Le principe consiste à décoller et retirer la matière accumulée sur la membrane par des forces mécaniques, d'origine hydrodynamique. La procédure généralement utilisée est le retrolavage : une partie du perméat est retournée à contre-courant à travers la membrane. Très efficace dans le cas de dépôts faiblement liés au support, ce type de nettoyage ne concerne que les configurations tubulaires ou spiralées. Toutefois il ne permet pas de se libérer totalement du nettoyage chimique, mais vise à réduire leur fréquence.

- **Nettoyage chimique** (Kuzmenko et al., 2005)

Il se compose d'une séquence de lavage acide et basique, ainsi que de phases de rinçage. La séquence de nettoyage dépend bien évidemment du contexte d'utilisation. Par exemple, pour une application de traitement du lait, où les protéines constituent le principal composant du colmatage, le traitement alcalin précèdera le nettoyage acide. Par contre, lorsque le colmatage inorganique domine, le traitement acide sera effectué en premier lieu. La durée d'une séquence de nettoyage peut aller de 30 à 60 minutes.

L'agent de nettoyage doit à la fois être efficace pour éliminer l'agent colmatant et inoffensif vis-à-vis des membranes. Par exemple, l'acide chlorhydrique n'est pas utilisable en présence d'acier inoxydable. La connaissance de la nature du matériau membranaire conduit à exclure certains réactifs et impose la limite en pH, en température, en temps de réaction et en concentration.

· Nettoyage enzymatique

Ce type de nettoyage constitue une alternative aux traitements chimiques. Il peut être appliqué dans les cas de membranes sensibles aux réactifs chimiques, au pH ou à la température élevée, ainsi que dans les cas de colmatage avancé. Bien que peu biodégradables, les enzymes requièrent des temps de traitement plus longs que les traitements chimiques et sont aussi plus coûteux. Pour ces raisons, ils sont peu adoptés.

II – 3 Les modèles d'ultrafiltration

Plusieurs théories ont été avancées pour décrire les transferts de matière à travers les membranes semi-perméables. Dans cette section sont présentés les modèles permettant d'évaluer le flux de solvant passant au travers des membranes. Notons que ces modèles ont pour but d'expliquer d'une manière relativement simple des mécanismes de base qui sont en réalité très complexes.

II-3-1 Modèle du tamis moléculaire

Cette théorie, la plus ancienne et la plus simple, consiste à considérer les membranes comme un milieu poreux constitué d'une multitude de capillaires identiques. Le flux volumétrique de solvant à travers une telle membrane peut être déterminé par la loi de Poiseuille :

$$J_v = \frac{N \cdot \pi \cdot (r_p)^4}{8 \cdot \mu \cdot e} \cdot \Delta P \quad (4)$$

Où J_v est le flux du perméat ($L / h \cdot m^2$)

r_p est le rayon moyen des pores (m)

e est l'épaisseur de la membrane (m)

N est le nombre de pores par unité de surface (m^{-2})

μ est la viscosité dynamique (Pa.s)

ΔP est la pression transmembranaire moyenne (Pa)

La dépendance à la viscosité du solvant permet en particulier d'illustrer l'influence de la température. Un accroissement de température a généralement pour effet de réduire la viscosité du solvant et donc d'augmenter le flux de perméat.

Ce modèle de base présente cependant un certain nombre de limitations, soit, en particulier, sous l'effet d'une pression élevée, la compression de la membrane peut avoir pour effet de réduire sa perméabilité.

II-3-2 Modèle osmotique

Ce modèle permet en particulier d'introduire, à travers la pression osmotique, l'influence de la concentration du rétentat en amont de la membrane : le gradient de concentration existant de part et d'autre de la membrane devient suffisamment important quand la pression augmente pour induire une différence de pression osmotique ($\Delta\pi$) non négligeable par rapport à la pression appliquée. Dans ce mode de transport, la pression appliquée (ΔP) contribue dans un premier lieu à combattre la pression osmotique, puis à générer un flux à travers la membrane (Bowen et al., 1995).

$$J_v = L_p(\Delta P - \sigma\Delta\pi) \quad (5)$$

Où σ est le coefficient de réflexion (ou de Staverman), prend en compte l'effet de la pression sur le transfert du soluté. Si $\sigma = 1$, il n'y a pas d'interaction entre le flux de solvant et le flux de soluté (cas des membranes très sélectives : $R \approx 1$).

II-3-3 Modèle du film

Le fait qu'il y ait un flux de solvant à travers la membrane et que la membrane retienne certaines espèces, entraîne leur accumulation progressive à la surface de la membrane (Fig I.4). Par conséquent, la concentration des particules au voisinage de la membrane (C_m) sera plus élevée que la concentration dans la solution (C_0). Cette différence de concentration en amont de la membrane va générer une rediffusion des macromolécules vers la solution jusqu'à atteindre un certain équilibre de telle sorte qu'il se forme à la surface de la membrane un gradient de concentration dans une couche d'épaisseur de quelques micron (δ). C'est ce que l'on appelle « couche de polarisation de concentration » (Johnson, 1986 ; Gekas et al., 1993 ; Sulaiman et al., 2001 ; Kennedy et al., 2008).

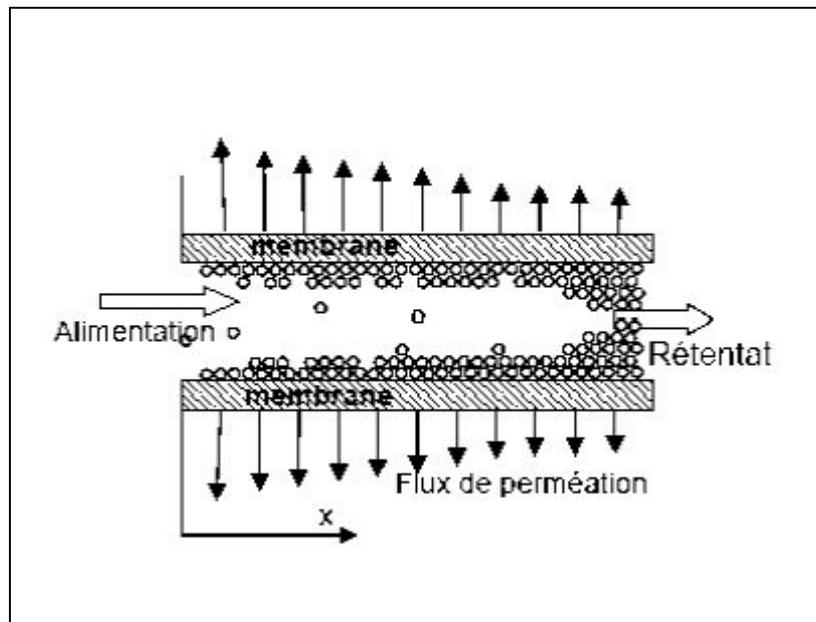


Figure I.4 Représentation schématique de l'accumulation de matière le long d'une membrane

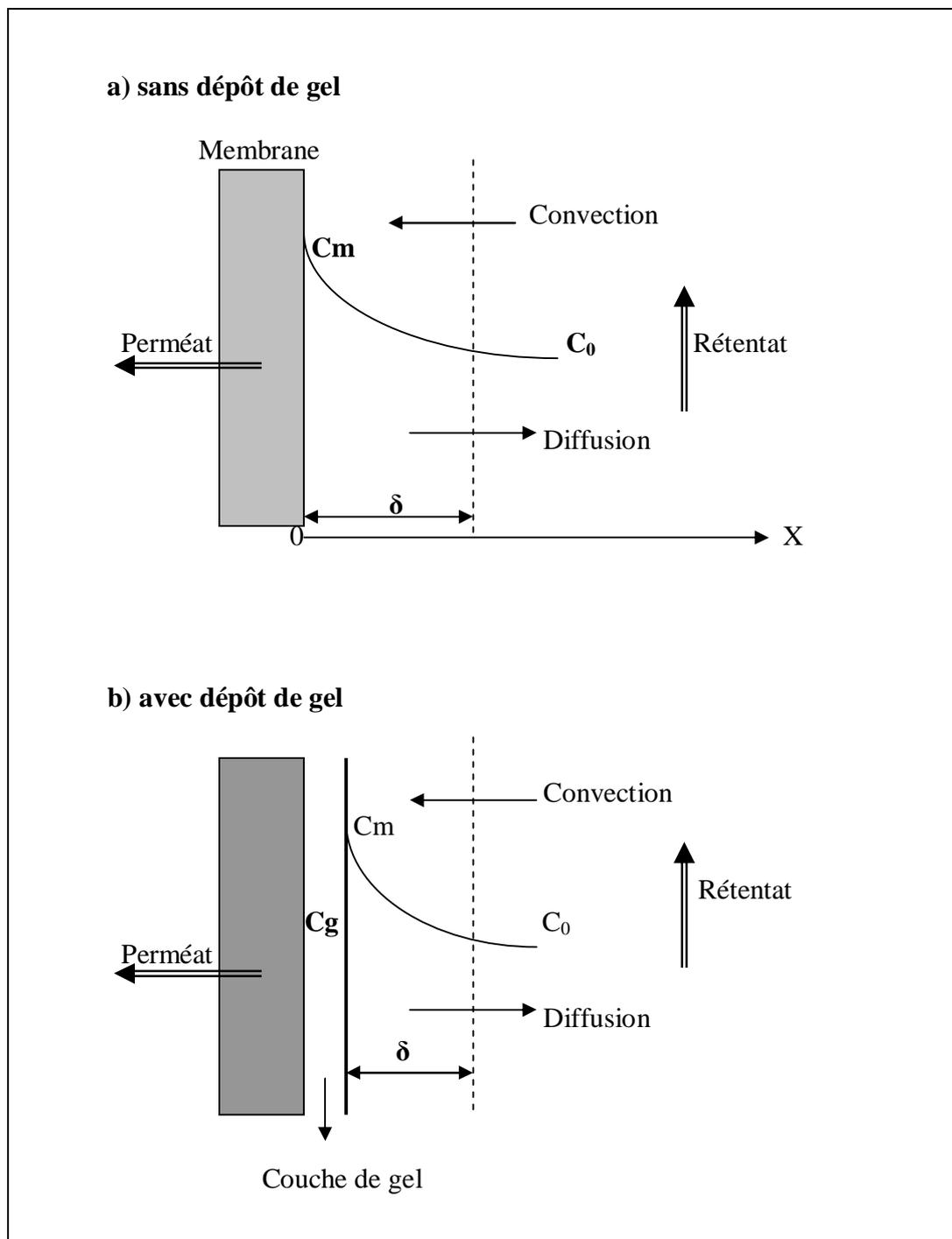


Figure I.5 Modélisation de la polarisation de concentration (Daufin et al., 1998).

En régime stationnaire, le bilan de matière relatif à l'espèce retenue, en tout point d'un plan (X,Y) perpendiculaire à la membrane permet d'écrire :

$$\left[\begin{array}{c} \text{densité du flux} \\ \text{convectif} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{densité du flux} \\ \text{diffusionnel} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{densité du flux massique} \\ \text{transféré à travers la membrane} \end{array} \right]$$

$$J_v.C(x) - D \frac{dC}{dX} = J_v.C_p \quad (6)$$

Où $C(x)$ et C_p sont respectivement les concentrations en soluté dans la couche de polarisation et dans le perméat. D est le coefficient de diffusion du soluté (m^2/s).

L'intégration de cette équation, en prenant comme conditions aux limites : $C = C_0$ pour $X = \delta$ et $C = C_m$ pour $X = 0$, permet de déterminer le flux du perméat :

$$J_v = \frac{D}{\delta} \cdot \text{Ln} \frac{C_m - C_p}{C_0 - C_p} \quad (7)$$

Où C_m est la concentration du soluté à la surface en amont de la membrane

C_0 est la concentration initiale du soluté dans la charge

δ est l'épaisseur de la couche de polarisation.

L'accumulation des macromolécules à l'interface peut entraîner la formation d'une couche de gel à la surface de la membrane lorsque $C_m = C_g$. A ce stade une élévation de pression est sans effet sur le flux de perméat (Chen et al., 1997).

Si l'on suppose que la concentration de l'espèce dans le perméat est nulle, l'équation (7) devient :

$$J_{v,\text{lim}} = \frac{D}{\delta} \text{Ln} \frac{C_g}{C_0} \quad (8)$$

Le phénomène de polarisation de concentration a pour effet d'augmenter la concentration en amont de la membrane. Ceci se traduit par une réduction de la perméabilité, et augmente le risque de colmatage de la membrane. Une bonne façon pratique de minimiser ce phénomène consiste à augmenter le champ d'écoulement tangentiel en amont de la membrane. En effet, un accroissement du débit à l'entrée de la membrane a pour effet de balayer les particules qui ont tendance à s'agglutiner sur la membrane (Rao et al., 1994).

II – 4 Modes de fonctionnement

L'ultrafiltration fonctionne en continu, en discontinu, en continu avec recyclage partiel du rétentat ou en diafiltration (Aimar et Daufin, 2004).

II-4-1 Mode en discontinu

En mode discontinu, le rétentat est renvoyé en totalité dans une cuve. Sa concentration augmente au cours du temps au fur et à mesure que le perméat s'écoule au travers de la membrane (Fig. I.6), et ceci de façon continue jusqu'à l'atteinte de la concentration désirée. Dans un montage simplifié, une seule pompe assure la circulation du rétentat. Eventuellement, une pompe de recirculation peut être utilisée afin d'accroître la vitesse à la surface de la membrane et donc de réduire les risques de colmatage.

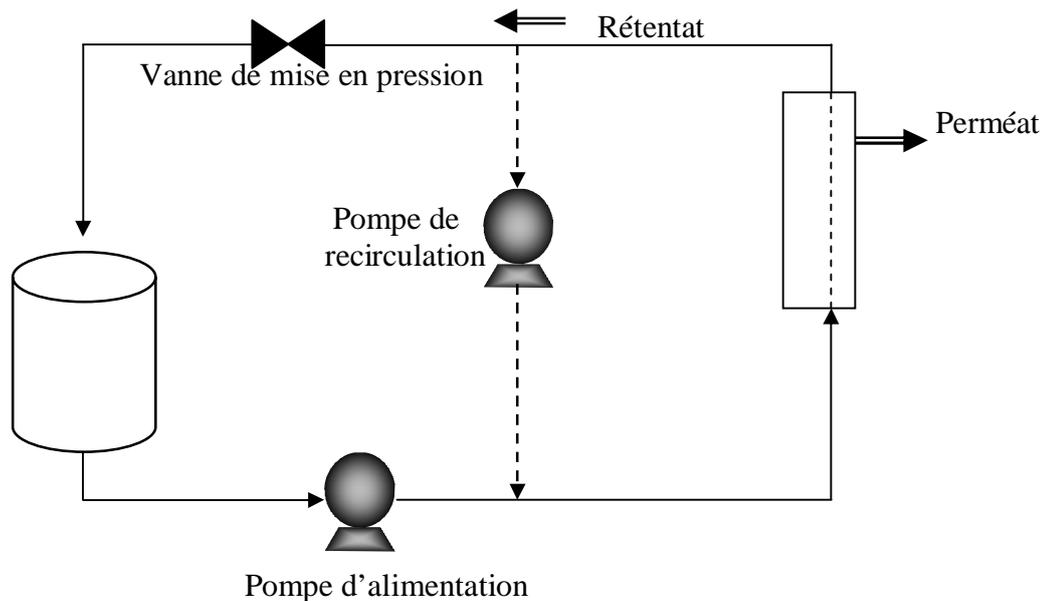


Figure I.6 Séparation membranaire en mode discontinu avec recirculation (en pointillé).

II-4-2 Mode en continu

En mode continu, une partie du rétentat est soutirée en permanence de la boucle de recirculation (Fig. I.7). Compte tenu du rapport en général faible (débit de filtrat/débit de circulation), il est indispensable d'installer une pompe de recirculation en plus de la pompe d'alimentation. Un circuit de recirculation est généralement requis pour atteindre la concentration désirée. La concentration circulante est considérée égale à la concentration au soutirage, car on considère que la boucle de recirculation est idéalement mélangée grâce à la vitesse de circulation élevée de la pompe.

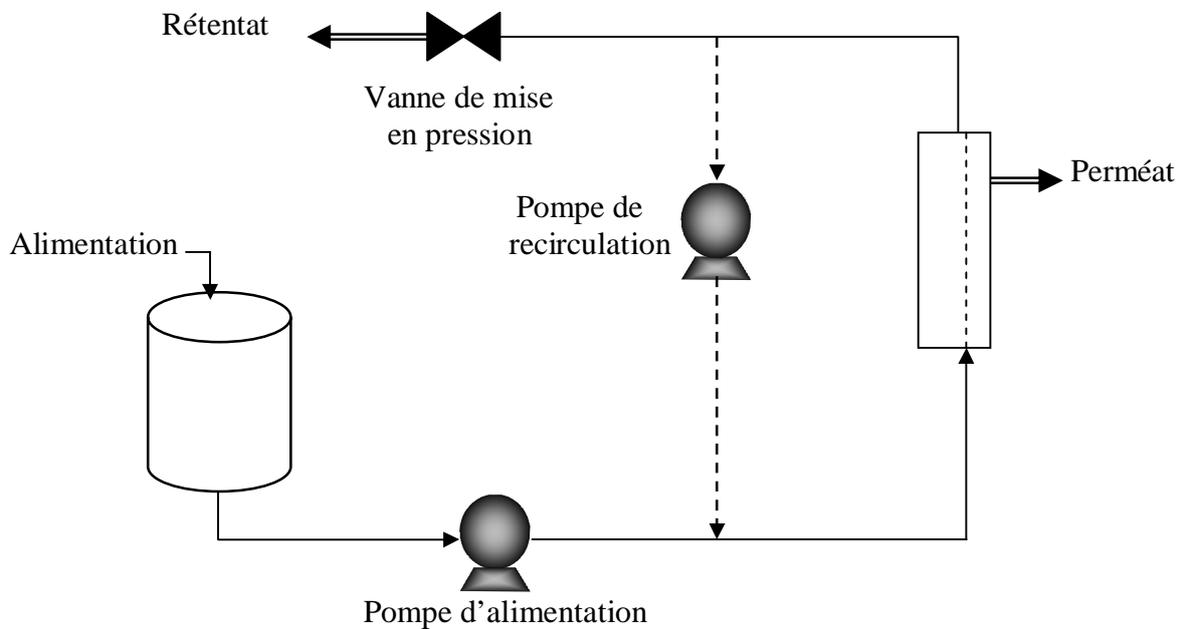


Figure I.7 Séparation membranaire en mode continu avec recirculation.

II – 5 Applications de l’ultrafiltration en industrie alimentaire

Les opérations de filtration tangentielle ont pris beaucoup d’ampleur à partir des années 80, en grande partie pour des applications dans l’industrie laitière puis pour les boissons et les bioproduits. Ces technologies ont bénéficié d’un grand succès en peu de temps pour de multiples raisons :

- Elles opèrent à basse température, d’où l’absence de dénaturation des molécules fragiles telles que les protéines, et préservation des qualités organoleptiques et nutritionnelles.
- La séparation est fondée sur des critères physiques (diamètres des pores) et ne fait pas donc intervenir de réactifs chimiques qui sont une source de pollution.
- Elles ne font pas intervenir de changement de phase ; il n’ y a donc pas d’enthalpie à fournir, ce qui permet, par rapport à l’évaporation, d’être plus économique en énergie.
- Les procédés peuvent fonctionner en continu, donc faciles à automatiser, du moins en principe. Contrairement à la filtration frontale ou à l’échange d’ions, qui sont des procédés séquentiels.

Une vue d’ensemble des principales applications de l’ultrafiltration en industrie alimentaire est présentée ci-dessous :

- Concentration de lait entier pour la fabrication de fromages
- Séparation pulpe sérum de jus d’agrumes
- Clarification et concentration des jus de fruits
- Production de jus de pomme clarifié
- Conditionnement du jus de canne
- Concentration du jus de soja
- Concentration de protéines pour la fabrication de surimi
- Concentration du sang entier d’abattoir
- Concentration du blanc d’oeufs
- Standardisation du lait en protéines
- Concentration de polysaccharides servant comme agents texturants
- Conditionnement du sirop de glucose provenant d’hydrolysat de blé

III GENERALITES SUR LA CHITINE ET SES DERIVES

III – 1 Chitine

La chitine est, après la cellulose, le polysaccharide le plus répandu dans la nature. Dans le règne animal, la chitine est un élément structurel important des téguments de certains invertébrés ; elle n'existe que sous la forme de complexes avec des protéines et des minéraux (Singh et al., 2009). Dans le règne végétal, la chitine se trouve dans la paroi de la plupart des champignons et de certaines algues chlorophycées. En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique. A l'état naturel, la molécule de la chitine présente une structure cristalline qui constitue un réseau de fibres organisées. Différents arrangements des chaînes sont possibles. Sous forme d'hélice, ces chaînes sont toutes dirigées suivant le même axe et donnent lieu à trois formes polymorphiques distinctes (Jang et al., 2004).

Chitine α : c'est la forme la plus abondante, la plus stable et la plus rigide; elle est formée de chaînes qui sont disposées de façon antiparallèle qui ressemble à un ruban à l'intérieur desquelles les résidus de sucre sont fortement liés par liaison hydrogène augmentant ainsi la rigidité et la stabilité. L'analyse aux RX de la chitine α met en évidence une structure cristalline de type orthorhombique.

Elle est surtout retrouvée dans la carapace des crustacés (crabe, crevette, homard, langoustine ...), dans la coquille des mollusques, l'exosquelette des insectes et la paroi cellulaire des champignons et levures ... (Di Mario et al., 2008)

Chitine β : elle est supposée être moins stable que la chitine α et est formée de chaînes parallèles entre elles : le groupement $-NH_2$ est aligné avec le groupement $-OH$ et le groupement $-CH_2OH$. La chitine β cristallise dans une maille monoclinique et les ponts hydrogènes sont inexistant, ce qui lui confère des propriétés de solubilité et d'hydrophilie (formation de gels avec H_2O)

Elle est retrouvée dans la carapace des brachiopodes et mollusques, dans les crochets de Calmars, dans les parois des diatomées et les tubes des pogonophores (Tomoya, 2003).

Chitine γ : c'est la forme la plus rare dans la nature; elle est composée à la fois de chaînes parallèles et antiparallèles. La chitine γ est flexible et résistante et se trouve essentiellement dans les cocons des insectes (Hans et Lars, 2003).

Bien que les sources potentielles de chitine soient très nombreuses (Tableau 2), elle est essentiellement produite aujourd'hui à partir des carapaces de crevettes. La production de chitine permet de valoriser les déchets de l'industrie agroalimentaire en évitant qu'ils soient rejetés à la mer, ce qui engendre des problèmes de pollution car les carcasses des arthropodes (crustacés, céphalopodes ...) sont très résistantes à la biodégradation (Shahidi et Abuzaytoun, 2005). Les carapaces de crustacés contiennent environ 30 – 40% de protéines, 30 – 50% de carbonate de calcium, et 20 – 30% de chitine par rapport au poids sec (Rodde et al., 2008).

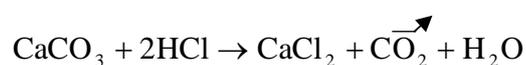
Tableau 2 Sources potentielles de chitine (Tolaimate et al., 2003).

Sources de chitine	Teneur en chitine (%)
Bernacle (<i>Lepas anatifera</i>)	7
Crabe marbré (<i>Grapus marmoratus</i>)	10
Crabe rouge (<i>Portunus puber</i>)	10
Crabe araignée (<i>Maia squinado</i>)	16
Homard (<i>Homarus vulgaris</i>)	17
Homard sauterelle (<i>Scyllarus arctus</i>)	25
Langouste (<i>Palinurus vulgaris</i>)	32
Ecrevisse (<i>Astacus fluviatilis</i>)	36
Crevette (<i>Palaemon fabricius</i>)	22
Seiche (<i>Sepia officinalis</i>)	20
Calmar (<i>Loligo vulgaris</i>)	40

De nombreuses méthodes ont été élaborées afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, elles consistent à éliminer les éléments minéraux (démminéralisation), les protéines (déprotéinisation) et la couleur (blanchiment) :

Démminéralisation

La démmnéralisation est généralement réalisée par un traitement acide sous agitation pour solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium. Les acides les plus fréquemment utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide formique à des concentrations de 1 à 10 mol/L. La durée du traitement acide est de l'ordre de 1 à 48 heures à la température ambiante (Wai et Lee, 2002 ; Zaku et al., 2011) . Pendant le processus de démmnéralisation, des mousses indésirables peuvent se former dus à la production de dioxyde de carbone :



Déprotéinisation

Du point de vue structure chimique, la chitine est liée aux protéines par des liaisons covalentes à travers les résidus : acide aspartique et histidine pour former des complexes très stables (Chitinoprotéine) (Hamodrakas et al., 2002). Pour dissoudre ces protéines, on utilise une solution alcaline diluée de 1 à 10% massique, à des températures élevées (65°C – 100°C). La durée du traitement basique est de l'ordre de 0,5 à 72 h selon la méthode de préparation.

Blanchiment

Pour les applications industrielles, la chitine obtenue à partir des ressources crustacées doit être décolorée après les traitements acide et alcalin. Fox (1973) a détecté un dérivé de carotène solidement lié à la chitine de l'exosquelette des crabes rouges.

No et al. (1989) ont pu obtenir une chitine quasiment blanche par l'extraction avec l'acétone et le séchage pendant 2 heures à la température ambiante, suivi par le blanchiment en utilisant une solution 0,315% (v/v) d'hypochlorite de sodium pendant 5 minutes avec un rapport de solide au solvant (1 :10 poids/volume). La réalisation de cette étape (Blanchiment) dépend de la spécification du produit final. De plus, le blanchiment n'est pas trop désirable car il réduit considérablement la viscosité du produit final (Fernandez-Kim, 2004).

III – 2 Chitosane

Contrairement à la chitine, le chitosane est peu répandu dans la nature; il se trouve dans certains champignons, les zygomycètes, et dans la paroi abdominale des reines de termites. Le chitosane est obtenu par N-désacétylation partielle de la molécule de chitine. Leur structure chimique, représentée sur la figure I.8, résulte de l'enchaînement d'unités de répétition N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine liées en $\beta,(1 \rightarrow 4)$. La chitine et le chitosane se différencient par la proportion des unités acétylées présentes dans le copolymère, appelée aussi le degré d'acétylation (noté DA). Bien que le terme « chitosane » soit habituellement limité à toute chitine suffisamment N-désacétylée pour être soluble en milieu acide dilué, il n'existe pas de nomenclature officielle proposant la limite précise entre les deux termes.

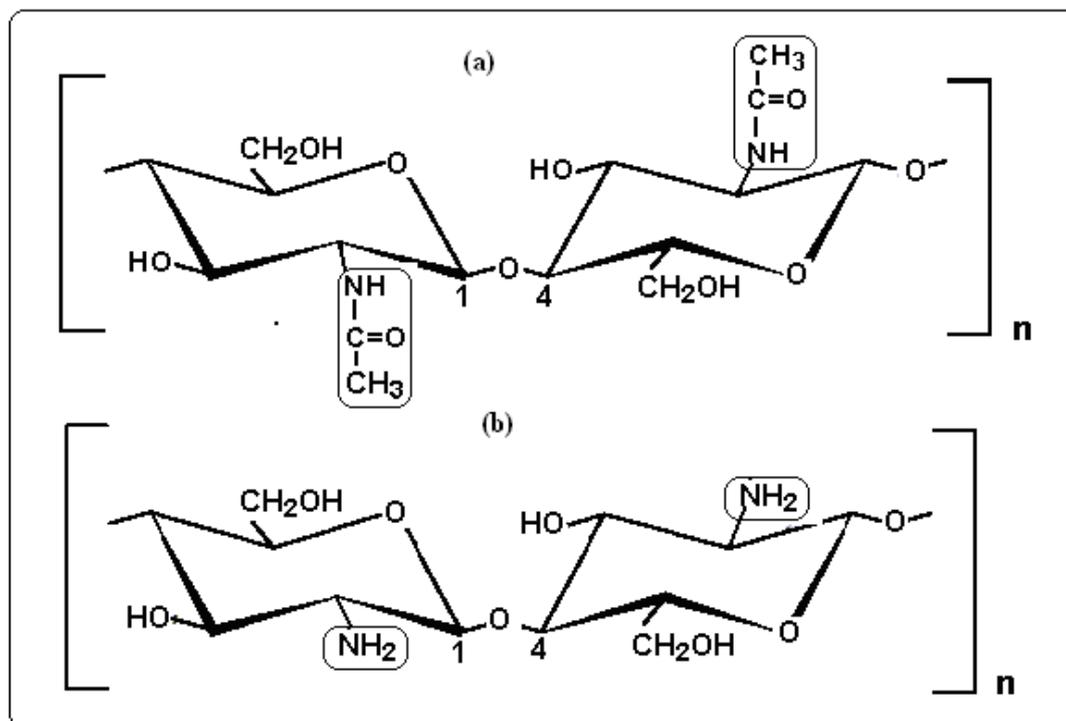


Figure I.8 Comparaison des structures de la chitine (a) et du chitosane (b).

III-2-1 Production du chitosane

Si l'extraction de la chitine est aujourd'hui facilement réalisable, l'étape la plus délicate reste la désacétylation qui consiste à l'enlèvement des groupements acétyles ($-\text{COCH}_3$) pour libérer les fonctions amines ($-\text{NH}_2$), ce qui peut entraîner une réduction excessive de longueur de chaîne du polymère. En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur l'élévation de température, il est possible d'obtenir différents chitosanes à partir d'une même chitine. Un DA inférieur à 10% est rarement atteint par un procédé simple, la désacétylation totale nécessite plusieurs étapes. L'échantillon étant soit lavé, soit dissous et reprecipité entre deux cycles.

La désacétylation est généralement effectuée par le traitement avec l'hydroxyde de sodium ou potassium concentré (40 – 50%) à une température $\geq 100^\circ\text{C}$, pendant au moins 30 minutes pour enlever certains ou tous les groupements acétyles de la chitine (No et Meyers, 1995). Il y a plusieurs facteurs essentiels qui affectent le rendement de la désacétylation comme la température, la durée, la concentration d'alcalin, les traitements préalables pour l'obtention de la chitine, la taille des particules... Compte tenu de ces paramètres, l'objectif idéal de désacétylation est de préparer un chitosane qui est non dégradé et parfaitement soluble dans les acides dilués (acide acétique, lactique, citrique...).

III-2-2 Caractérisation de la chitine et du chitosane

III-2-2-1 Degré de désacétylation

Le degré de désacétylation (noté D.D) représente la proportion d'unités D-glucosamines par rapport au nombre total d'unités glycosidiques. Ainsi, le terme chitosane n'est pas attribué uniquement pour définir un composé, mais plutôt pour désigner toute une famille de copolymères ayant des fractions d'unités acétylées variables qui se distingueront entre eux par le degré de désacétylation : pourcentage des groupements amines dans la chaîne polymérique (Roberts, 1992). Cependant, une limite tranchante entre la chitine et le chitosane n'a jamais été bien définie en se basant sur la valeur de ce paramètre. Certains chercheurs parlent de chitosane quand le D.D est supérieur à 50% (Esquenet, 2003). D'autres, préfèrent le terme chitosane lorsque le D.D est supérieur à 20% (David et al., 2004). Parfois, cette différence est basée sur la solubilité du chitosane et l'insolubilité de la chitine en milieu acide dilué. Le DD est le paramètre physico-chimique le plus important qui influe les performances du chitosane dans ses diverses applications. La valeur de ce paramètre est souvent fixée selon son utilisation, par exemple, en médecine on exige un chitosane désacétylé à 100% (Baxter et al., 1992).

De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le DD sur des échantillons solides : La spectroscopie IR (Brugnerotto, 2001), l'analyse élémentaire (Kasaai et al., 1999), la RMN solide (Heux et al., 2000), ou sur des échantillons en solution : dosage UV (Maghami et Roberts, 1988), titrage colloïdal (Chen et al., 1997), RMN liquide (Yang et Montgomery, 2000).

III-2-2-2 Poids moléculaire

La définition du poids moléculaire des polysaccharides et la compréhension de ses conséquences sur leur comportement physico-chimique présentent un réel défi aux chimistes durant de nombreuses années. Dans le cas de la chitine et ses dérivés, la connaissance de ce paramètre est très importante pour les utilisations industrielles et les applications dans les différents domaines de recherche (Montserrat, 2002). En effet, la conductivité, la densité, la tension de surface et la viscosité des solutions de chitosane sont significativement affectées par le poids moléculaire.

Pour la chitine, le poids moléculaire dépasse largement un million Daltons, tandis que pour le chitosane, il varie entre 10^5 et $1,2 \cdot 10^6$ Daltons (Li et al., 1992).

III-2-2-3 Solubilité

- Du fait de sa forte cristallinité, la chitine n'est soluble que dans des solvants peu communs, ce qui limite son utilisation. En effet, elle n'est soluble que dans quelques solvants corrosifs et toxiques tels que les alcools chlorés, l'acide chloroacétique, l'héxafluoroacétone et l'héxafluoro-2-propanol (Muzzarelli, 2004). Elle est également soluble dans les mélanges suivants : diméthylacétamide /chlorure de lithium (DMAc/LiCl)

N-methyl-2-pyrrolidone / chlorure de lithium (NMP/ LiCl)

Austin et al.(1981) comparèrent l'efficacité de ces deux systèmes de solvants à des dizaines d'autres tels que les mélanges 2chloroethanol/acide chlorhydrique, 2chloroethanol/acide phosphorique, 2chloroethanol/acide sulfurique ou 2chloroethanol/acide nitrique. Ils conclurent que DMAc/LiCl et NMP/LiCl, bien qu'ils soient très toxiques, présentaient les meilleures performances pour la solubilisation de la chitine. En particulier, à température ambiante, ces solvants ne causent ni dégradation, ni modification chimique du polymère.

- Le chitosane sous forme amine libre est insoluble dans l'eau, les acides concentrés, les bases et les solvants organiques (Montserrat, 2002). Cependant, il est soluble dans les acides dilués tels que l'acide chlorhydrique, l'acide formique, l'acide acétique, l'acide oxalique et l'acide lactique à $\text{pH} < 6,5$. L'acide phosphorique, l'acide sulfurique, l'acide citrique et l'acide sébacique ne sont pas de bons solvants pour le chitosane (Kurita, 2001). En raison de sa solubilisation en milieu acide, le chitosane se comporte comme un polyélectrolyte cationique dont les propriétés dépendent du pH du milieu. Le chitosane est cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine soit 6,3 (Peter, 1995). A un pH supérieur ($>6,5$), les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane précipite.

III-2-3 Propriétés de la chitine et du chitosane

La plupart des polysaccharides naturels tels que la cellulose, le dextran, la pectine, l'agar, l'acide alginique, l'agarose et les carragenanes sont neutres ou acides. Tandis que la chitine et le chitosane sont deux exemples de polysaccharides de forte basicité présentant de nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques intéressantes (Majeti et Kumar, 2000).

III-2-3-1 Propriétés complexantes

Le chitosane, portant un nombre important de groupements amines ($-\text{NH}_2$) sur sa chaîne polymérique, montre de fortes interactions avec les ions métalliques (Montserrat, 2002). Plusieurs facteurs affectent la formation de complexes avec le chitosane dont le pH et le degré de polymérisation, la nature du cation et enfin l'état physique du chitosane (film, fibre, gel, poudre ou solution) (Rhazi et al., 2002).

D'après Ghazi et al., (2002), le cuivre(II), cation montrant la plus grande affinité vis-à-vis du chitosane, forme à $\text{pH} > 5$ un complexe de type I et à $\text{pH} < 5.8$, un complexe de type II (Fig. I.9). Les analyses potentiométriques et spectroscopiques (UV et Dichroïsme Circulaire) ont montré la formation de complexes de type I lorsque le degré de polymérisation est inférieur à 6 et de type II pour le chitosane polymère. Ainsi, les propriétés chélatantes du chitosane sont appliquées notamment pour le traitement des eaux usées (Falini et al., 2003).

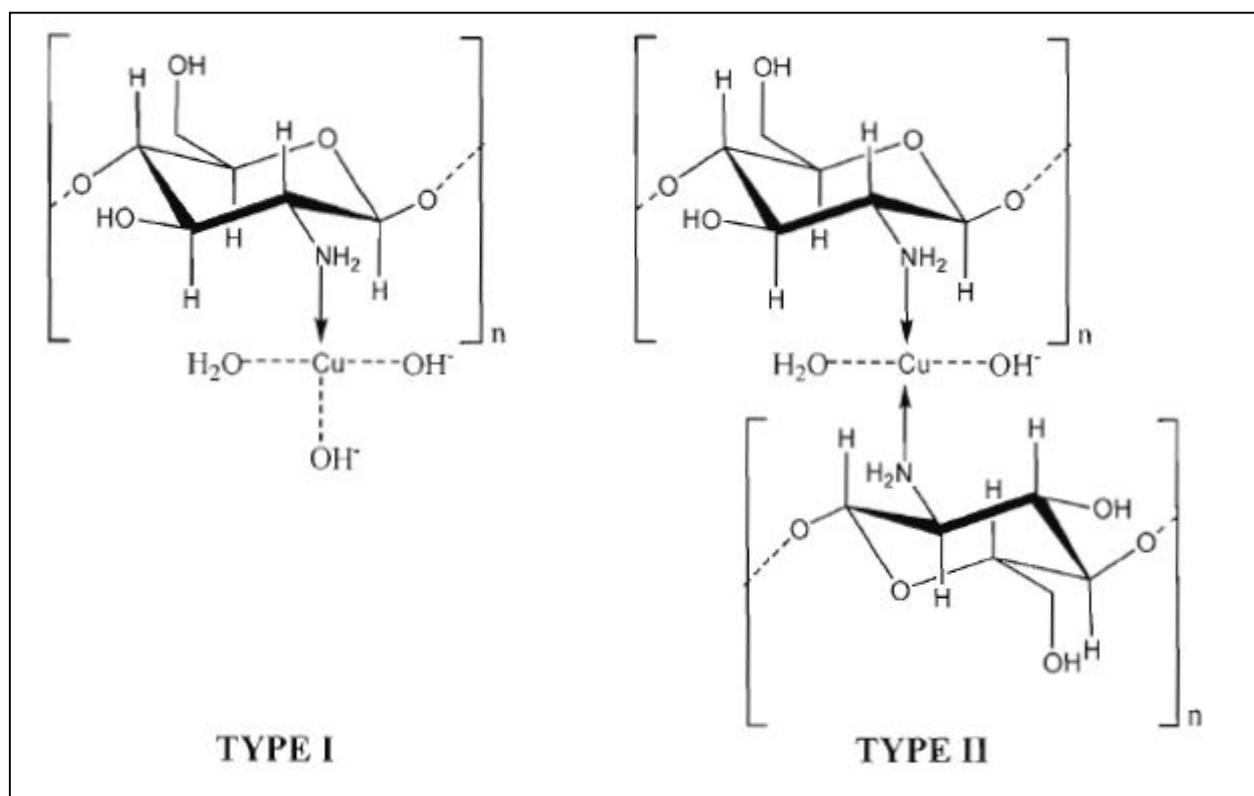


Figure I.9 Structures de complexes formés entre le cuivre (II) et le chitosane.

III-2-3-2 Propriétés biologiques

• Biocompatibilité

Avant qu'une molécule étrangère ne soit introduite dans le corps à des fins biomédicales, elle doit faire l'objet d'essais poussés au cours desquels on s'assure que, une fois qu'elle sera introduite dans l'organisme, le système immunitaire ne l'attaquera pas pour l'éliminer. Les études portant sur la chitine et ses dérivés ont prouvé que ces biopolymères n'ont aucun caractère antigénique, et de ce fait, ils sont parfaitement compatibles avec les tissus vivants. De plus, leur caractère antithrombogène et hémostatique confirment leur possibilité d'emploi dans tous les domaines de la biologie (Chung et al., 2004; Mirzadeh et al., 2002).

• Biodégradabilité

Chitinase et chitosanase sont des enzymes naturelles capables de dégrader respectivement la chitine et le chitosane en oligomères, qui seront pris en charge par le métabolisme (Reetarani et al., 2000). La lysozyme est une enzyme que nous sécrétons au niveau des larmes, mais aussi au niveau des plaies, capable de dégrader progressivement le chitosane (Nettles, 2001).

a) Activité antibactérienne

Le mécanisme exact de l'action antimicrobienne du chitosane est encore inconnu mais certains mécanismes ont été proposés. L'activité antibactérienne du chitosane serait due essentiellement à la charge positive, portée sur le carbone-2 du résidu glucosamine à $\text{pH} < 6.0$, qui interagit avec les phospholipides membranaires chargés négativement. L'interaction crée une perturbation au niveau de la membrane avec une diminution des échanges de nutriments entre la bactérie et le milieu extérieur qui entraîne la mort cellulaire (Du et al., 2009).

De nombreuses études ont montré que l'activité antibactérienne du chitosane dépend essentiellement de son poids moléculaire et du type de bactéries étudiées : pour les bactéries Gram positif, un chitosane avec un poids moléculaire de 470 KDa est très efficace, excepté pour *Lactobacillus sp*, tandis que pour les bactéries Gram négatif, un chitosane ayant un poids moléculaire égal à 1,1 KDa est plutôt efficace (No et al., 2002).

D'autres études ont montré l'effet du degré de désacétylation (D.D) sur l'activité antibactérienne du chitosane (tableau 3).

Le mécanisme pouvant expliquer une telle action est attribué à l'interaction entre les molécules chargées positivement du chitosane et les anions situés sur la surface cellulaire changeant la perméabilité membranaire (Chung et al., 2004).

Tableau 3 Effet du D.D sur l'activité antibactérienne du chitosane (Morimoto et al., 2002).

D.D (%)	Concentration minimale inhibitrice (%)						
	Bs	Sa	Se	Pa	Ec	Kp	Pv
77	(1,0)	0,50	(1,0)	(1,0)	(1,0)	0,50	0,50
80	0,50	0,13	0,13	0,50	0,13	0,13	0,13
84	0,25	0,50	0,25	(1,0)	0,50	0,50	0,50
88	0,25	0,25	0,25	0,50	0,25	0,25	0,25
91	0,13	0,25	0,13	1,00	0,25	0,13	0,13

Bs : *Bacillus subtilis* IFO3025 ; Sa : *Staphylococcus aureus* 209-P

Se : *Staphylococcus epidermis*

Pa : *Pseudomonas aeruginosa* TMB B17 ; Ec : *Escherichia coli* K12

Kp : *Kebsiella pneumoniae* B20 ; Pv : *Proteus vulgaris* IID OXK

N.B : les parenthèses indiquent l'inefficacité à cette concentration

b) Activité antifongique

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

Le chitosane agit aussi comme un agent chélatant qui forme des complexes avec les traces de métaux et ainsi il inhibe la production des toxines et la croissance des champignons (Cuero et al., 1991). Il assure aussi certains processus de la défense à l'extérieur de la cellule; par exemple, il agit comme un agent absorbant d'eau et inhibe l'activité des différentes enzymes (ElGhaouth et al., 1992).

III – 3 Les oligomères de la chitine et du chitosane

Etant biodégradable et biocompatible, le chitosane montre un fort potentiel comme matériel bioactif, qui est toutefois limité par ses caractéristiques physico-chimiques. En effet, le chitosane n'étant soluble qu'en milieu acide, ses applications aux secteurs alimentaires et biomédical sont restreintes (Fernandes et al., 2008 ; Venkatesan et al., 2010). L'utilisation de chitosane de faible poids moléculaire (inférieur à 150 KDa) ou sous forme d'oligomères (inférieur à 10 KDa) montre un fort potentiel d'utilisation dans les milieux biologiques (Bhatt et al., 2009 ; Fernandes et al., 2010). Leur faible viscosité et leur bonne solubilité à pH neutre leur confèrent des propriétés recherchées dans différents domaines, en particulier, la nutrition et la santé (Kim et Rajapakse, 2005).

Les récentes avancées dans le domaine ont permis de mettre en évidence les effets bénéfiques des oligosaccharides notamment par leurs propriétés biologiques et physiologiques variant selon le degré de polymérisation. Diminution du taux de cholestérol sanguin, effets protecteurs contre les infections microbiennes et inhibitions de la croissance de certaines tumeurs pour n'en nommer que quelques-uns (Park et al., 2010).

III-3-1 Obtention des chitooligosaccharides

Les oligomères de chitine et de chitosane sont obtenus par des méthodes chimiques ou enzymatiques de dépolymérisation par hydrolyse des liens osidiques. Néanmoins, il n'existe pas de techniques peu coûteuses permettant la séparation des oligomères à grande échelle. On retrouve principalement les systèmes membranaires d'ultrafiltration laissant passer une taille moléculaire spécifique (ex. moins de 1 KDa) ou encore les systèmes chromatographiques de type d'exclusion moléculaire. Ces principales techniques permettent un pré-fractionnement d'oligosaccharides et non la séparation de chaque unité oligomérique (dimère, trimère, tétramère). On ne retrouve que quelques fournisseurs à travers le monde offrant une gamme de chitooligosaccharides à des degrés de polymérisation spécifiques mais leurs prix sont trop élevés pour valoriser et développer l'utilisation de ces oligomères par différentes applications.

III-3-1-1 Méthodes physico-chimiques

Les voies physico-chimiques de dépolymérisation de polysaccharides sont nombreuses. La dégradation du lien glycosidique peut se faire à l'aide de méthodes moins courantes telles que la dégradation oxydative en présence d'ions métalliques (Shirui et al., 2004), la dégradation ultrasonique (Chen et al., 2000), par irradiation gamma (Choi et al., 2002) ou par micro-ondes (Xing et al., 2005).

Plus communément, différentes dépolymérisations acides sont effectuées à l'aide d'acide chlorhydrique, d'acide nitreux, d'acide lactique ou encore d'acide fluorhydrique. L'hydrolyse acide de la liaison glycosidique a lieu par une substitution nucléophile SN1. La vitesse de réaction est proportionnelle au pH du milieu et augmente en fonction de l'acidité, de la température, du temps de réaction et du poids moléculaire initial du polysaccharide (Barreteau et al., 2006).

III-3-1-2 Méthodes enzymatiques

Les oligosaccharides peuvent être produits par biosynthèse enzymatique ou dépolymérisation enzymatique. La dépolymérisation spécifique de la chitine ou du chitosane peut s'effectuer à l'aide d'un grand nombre d'enzymes d'origine bactériennes et fongiques (Kim et al., 1998). Les chitosanases (EC 3.2.1.132) sont définies comme des enzymes catalysant l'endohydrolyse du lien glycosidique β -1,4 des résidus D-glucosamine à partir de chitosane partiellement acétylé. D'autres enzymes moins spécifiques telles que les chitinases, lysozymes, cellulases, protéases, lipases... permettent la production d'oligomères de longueurs de chaînes variables selon l'enzyme utilisée et les conditions expérimentales.

III – 4 Dérivés carboxyméthylés de la chitine et du chitosane

L'introduction du groupement carboxyméthyle ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) dans la molécule de la chitine ou du chitosane conduit à la formation de dérivés anioniques. Cette molécule est plus utile que chitine et chitosane en biologie. En se chargeant négativement, elle devient soluble dans des conditions légèrement basiques, ce qui correspond, par exemple, à un pH physiologique (Gogev et al., 2003 ; Mourya et al., 2010).

O-carboxyméthylation

La carboxyméthylation de la chitine est réalisée en milieu alcalin en présence d'acide monochloroacétique. Cette réaction a lieu préférentiellement sur le C-6 des résidus glucosamines acétylés ou pas, au cours de laquelle l'hydrogène du groupement $-\text{OH}$ est remplacé par un groupement $-\text{CH}_2\text{COOH}$. Ce résultat est confirmé par l'analyse structurale de l'unité monomérique obtenue après hydrolyse de la chaîne principale

Notons que parallèlement à la carboxyméthylation, une réaction de désacétylation peut se produire sous les conditions alcalines fortes, occasionnant ainsi la formation d'un polymère amphotère portant à la fois des groupements carboxyméthyles et des groupements amines. Un degré de désacétylation pouvant atteindre la valeur de 50% sera affiché selon les conditions mises en œuvre (Kurita, 2001).

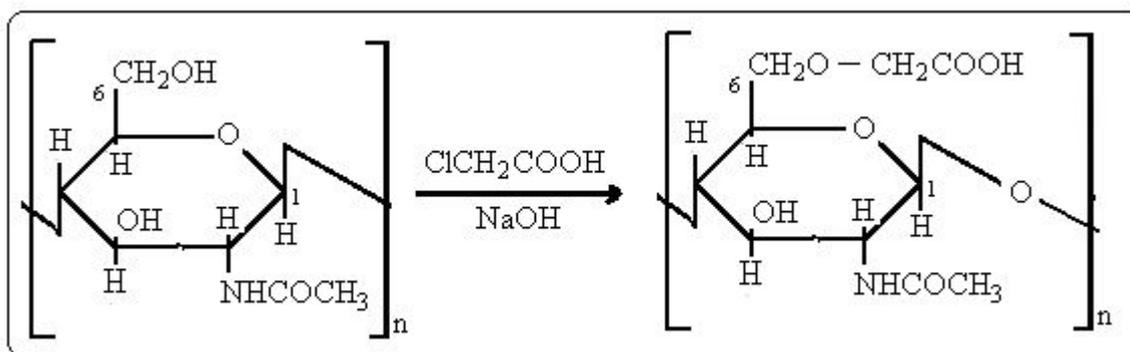


Figure I.10 Réaction de O-Carboxyméthylation de la chitine.

Le chitosane est aussi carboxyméthylé sous les mêmes conditions opératoires, mais dans ce cas, les groupements $-\text{CH}_2\text{COOH}$, en plus des $-\text{OH}$, sont introduits au niveau de la fonction amine ($-\text{NH}_2$) donnant lieu à la formation du dérivé N,O-Carboxyméthylchitosane (NOCC) selon le mécanisme réactionnel présenté ci-dessous (Miao et al., 2008) :

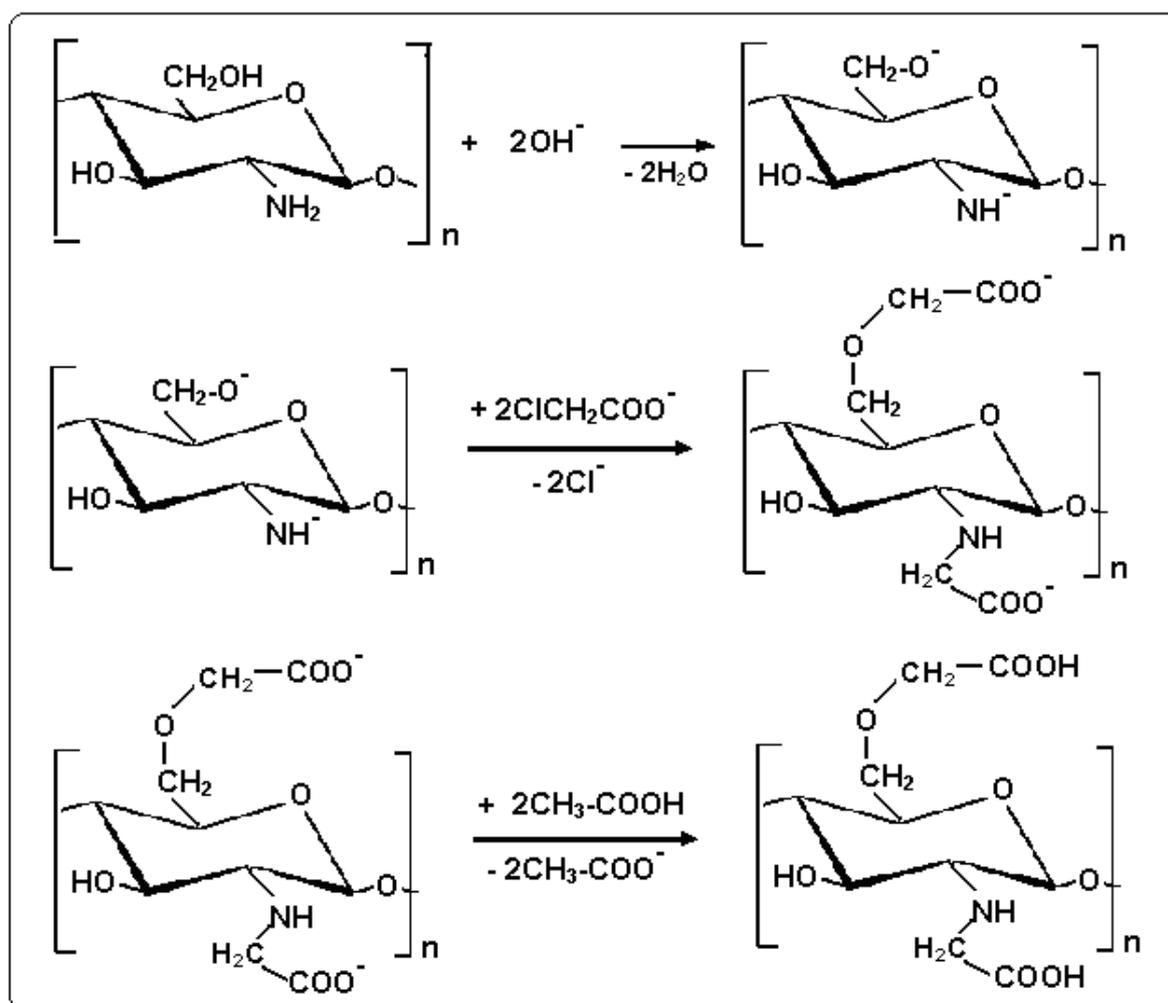


Figure I.11 Mécanisme réactionnel de la N,O-Carboxyméthylation du chitosane.

N-carboxyalkylation :

Contrairement à la carboxyméthylation, cette réaction est régiosélective et intéresse uniquement les groupements amines. Ainsi, l'alkylation réductrice est meilleure pour introduire le groupement carboxyméthyle (-CH₂COOH) dans le chitosane.

Le chitosane réagit facilement avec l'acide glyoxylique (OCHCOOH) en milieu acide pour donner la base de « **Schiff** » qui sera convertie en N-Carboxyméthylchitosane par réduction au cyanoborohydrure de sodium (NaCNBH₃) (Muzzarelli et Tanfani, 1982).

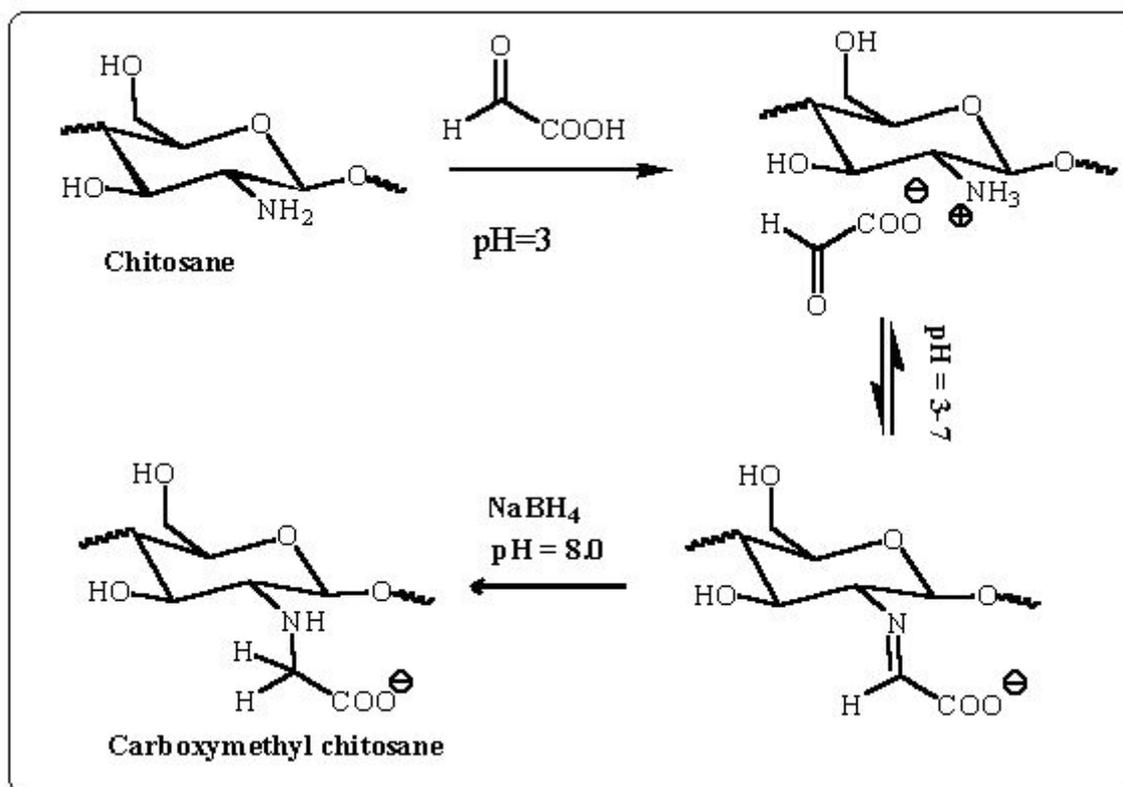


Figure I.12 Réaction de N-Carboxyméthylation du chitosane.

III – 5 Applications de la chitine et de ses dérivés

Les propriétés particulières du chitosane, essentiellement à la présence de la fonction amine portée par le carbone-2, sont de deux types :

- à pH acide, où il est soluble, le chitosane porte de nombreuses charges positives. Il est donc un bon agent de floculation et de coagulation; il peut interagir avec des molécules chargées négativement et former ainsi des complexes polyanion-polycation. Cette propriété lui ouvre de multiples applications notamment en biomédical (Pangestuti et Kim, 2010 ; Park et Kim, 2010 ; Venkatesan et al., 2010 ; Lee et al., 2009) , en biologie (Xia et al., 2010 ; Limam et al., 2011), en nutrition (Dutta et al., 2009 ; Gomez-estaca et al., 2009), en cosmétique (Zhang et al., 2010 ; Aranaz et al., 2010). Et sans doute bien d'autres domaines sont concernés par ces substances aux multiples vertus (Aranaz et al., 2009).

- à pH plus élevé (> 6,5), le chitosane perd ses charges positives, le doublet électronique de l'azote est libre. Ces doublets libres et la présence de nombreux atomes d'oxygène dans le chitosane lui permettent de se comporter comme un excellent complexant, en particulier des colorants et des métaux lourds. Il est donc utilisé pour la purification des eaux (Nghah et Fatinathan, 2008 ; Kyzas et al., 2009 ; Rafatullah et al., 2009 ; Ling et al., 2011...)

Tableau 4 Applications du chitosane (Rinaudo, 2006).

Domaines d'exploitation	Applications
Potentiel biomédical	Sutures chirurgicales Implants dentaires Peaux artificielles Reconstruction osseuses
Agriculture	Mécanisme défensif Stimule la croissance des plantes Enrobage (conservation) Libération de fertilisants et nutriments
Traitement des eaux	Polymère écologique Diminution de la turbidité Diminution des odeurs Bactéricides
Alimentaire	Hypocholestérolémiant Agent de conservation Stabilisateur Antimicrobien Enrobage des fruits et légumes
Cosmétique	Traitement de l'acné Produits hydratants Formulation de dentifrices Formulation de shampoings
Biopharmaceutique	Immunostimulants Antitumoraux Anticoagulants Bactériostatiques

III-5-1 Le chitosane en tant que biofilm

III-5-1-1 Définition de l'enrobage comestible

L'enrobage comestible peut se définir comme étant une couche fine de matériaux comestibles déposée à la surface d'un produit alimentaire. Ces matériaux comestibles font partie intégrante du produit enrobé; ils seront donc consommés en même temps que le produit et par conséquent, doivent avoir des propriétés sensorielles neutres (compatible avec le produit), pour ne pas être détectés lors de la consommation (Guilbert et al., 1997). Ils protègent le produit de l'environnement en agissant comme une barrière aux gaz, à l'humidité et aux matières grasses et permettent d'améliorer la qualité du produit en diminuant les pertes d'arômes, en préservant le goût, la texture et l'apparence.

Tableau 5 Avantages et inconvénients de l'enrobage comestible (Sonti, 2003).

Matériaux comestibles	Fruits traités	Avantages	Inconvénients
Les cires et les huiles	- Citron - Pomme - poire - Banane - Tomate	- Excellente barrière à l'humidité et aux échanges gazeux. - Bonne texture. - Prolonger la durée de vie	Parfois provoquent une respiration anaérobie.
Polysaccharides (Cellulose, amidon, alginate, pectine, gommes arabiques, carragénine, et chitosane)	- Citron - Mangue - Pomme - Poire - Banane - Fraise	- Perméabilité sélective aux gaz (CO ₂ et O ₂) sans causer l'anaérobiose - Prolonger la durée de vie - Prolonger la durée de vie - Ralentir le mûrissement - Bonne texture ... etc.	Imperméabilité minimale à la vapeur d'eau à cause de leur nature hydrophile
Protéines (Kératine, caséine, zein de maïs, gluten de blé...)	Tomate (zein de maïs)	- Excellente barrière aux échanges gazeux. - Zein de maïs est le seul enrobage imperméable à la vapeur d'eau.	Imperméabilité minimale à la vapeur d'eau.

III-5-1-2 Propriétés des enrobages

Bien que dans la plupart des cas, la propriété fonctionnelle la plus importante des enrobages est leur imperméabilité à la vapeur d'eau afin d'éviter la dessiccation et/ou le développement de certains microorganismes nuisibles à la qualité des aliments. Toutefois, le dépôt d'un film protecteur à la surface du produit alimentaire permet à ce dernier de conserver son humidité et d'assurer une perméabilité sélective à certains gaz : empêcher l'oxygène de pénétrer et le gaz carbonique d'échapper (Fig. I.13).

Une faible teneur en O_2 ou une forte teneur en CO_2 réduit le taux de respiration et diminue la production d'éthylène. Ceci peut inhiber les réactions enzymatiques, et par conséquent, retarder la décoloration et le pourrissement. La durée de vie d'un fruit peut ainsi s'accroître de plusieurs semaines, car le gaz carbonique est aux fruits ce que l'oxygène est à l'être humain et l'éthylène, hormone de croissance végétale, accélère les processus de maturation et de sénescence. (Bower et al., 2003).

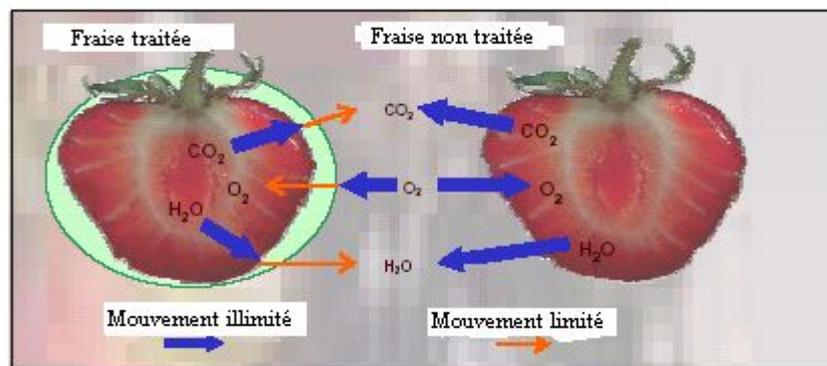


Figure I.13 Effet de l'enrobage sur les échanges gazeux.

Cependant, différents facteurs inhérents pour un polymère jouent un rôle important dans le processus de diffusion des fluides à savoir la structure chimique, le degré de cristallinité, le poids moléculaire ...etc.

· **Structure chimique**

Les polymères polaires (hydrocolloïdes) possèdent plusieurs ponts d'hydrogène et par conséquent présentent une grande imperméabilité aux gaz à des taux d'humidité relativement basses et une perméabilité élevée au passage de la vapeur d'eau. D'autre part, les polymères apolaires comme les lipides montrent un effet contraire (McHugh et Krochta, 1994). La plupart des films de polymères imperméables à l'oxygène possèdent au moins l'un des cinq groupements fonctionnels suivants : $-OH$; $-CN$; $-CH_3$; $-C_6H_5$; $-COOCH_3$.

Ces groupements se lient souvent aux molécules d'eau par des ponts d'hydrogène qui résultent d'une absorption d'eau en présence d'humidité relative élevée.

Enfin, les polymères en chaîne linéaire sont très imperméables contrairement aux chaînes renfermant de gros groupements (Ashley, 1985).

· **Degré de cristallinité**

Les structures cristallines sont extrêmement compactes et tendent à être imperméables. Des composés comme les lipides peuvent exister sous différents états cristallins qui pourront donner aux films des propriétés de barrière très variables.

En général, les composés ayant un haut degré de cristallinité octroient une perméabilité faible (Pascat, 1986).

III-5-1-3 Techniques d'enrobage

Les principales techniques utilisées pour former les enrobages et/ou les films comestibles sont les suivantes (Peressini et al., 2004) :

· **Immersion**

Elle consiste à laver et à sécher les produits puis à les immerger dans la solution traitante. Le temps de contact n'est pas important mais il faut s'assurer du bon mouillage de toute la surface de l'aliment. Les produits ainsi enrobés seront ensuite séchés à l'air ambiant. Cette méthode est utilisée dans le cas des fruits et légumes de petite taille.

· **Pulvérisation**

Les films formés par aspersion sont souvent plus uniformes et plus fins que ceux produits par immersion. Contrairement à l'immersion, la pulvérisation peut s'appliquer sur n'importe quelle taille de produits et peut être utilisée pour former un deuxième enrobage.

· **Enrobage par film tombant**

Cette technique peut être utilisée pour l'enrobage de tout genre d'aliment. Dans ce cas, le contrôle de la viscosité est la clé de réussite pour obtenir des films à une épaisseur désirée.

III-5-1-4 Enrobage à base de chitosane

Récemment, la recherche sur le développement des films comestibles à base de polysaccharides a été orientée vers le chitosane pour sa biodégradabilité en environnement, pour sa biocompatibilité et pour ses activités bactériostatiques et fongistatiques. Ce matériau est filmogène, on peut donc fabriquer un film sans utiliser des additifs. De plus, le film de chitosane est biodégradable, clair, résistant, flexible et présente une perméabilité sélective à l'oxygène et au dioxyde de carbone permettant ainsi un meilleur contrôle de l'atmosphère interne du produit durant le stockage (Kaplan et al., 1993). Toutes ces caractéristiques ont suscité un intérêt majeur pour l'utilisation du chitosane dans l'enrobage de certains produits agro-alimentaires frais afin de prolonger leur durée de conservation, parmi lesquels nous pouvons citer : les fruits et légumes (Yanti et al., 2009 ; Abbasi et al., 2009), la viande, et les fruits de mer (Fan et al., 2009 ; Rong et al., 2009 ; Ojagh et al., 2010).

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

I- RECUPERATION DES PROTEINES

L'objectif est double : valoriser un résidu protéique solide de rejet de poissonnerie et un rejet liquide issu du processus d'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes.

- Les eaux de lavage provenant du processus d'extraction de la chitine, en particulier, durant l'étape de déprotéinisation, forment un effluent très riche en protéines. Il devient alors intéressant de les récupérer et d'en faire des produits à valeur ajoutée. Dans ce sens, l'ultrafiltration est sans doute la voie la plus prometteuse ;
- En ce qui concerne le rejet solide provenant de la conserverie de Dellys (région de la Kabylie) consiste en un mélange complexe de déchets issus des chaînes de nettoyage et d'évidage de la sardine (têtes, viscères, arêtes et espèces pélagiques). Ces derniers seront collectés et transportés dans des sacs stériles sous conditions aseptiques à 4°C.

I-1 Analyses chimiques du rejet solide

Les paramètres chimiques entrepris lors de notre étude sont présentés brièvement ci-dessous :

- La teneur en eau a été déterminée par étuvage à 105°C jusqu'à constance du poids (AOAC, 1990).
- Le taux de cendres a été déterminé par incinération du résidu sec dans un four à moufle (550°C) durant 24 heures.
- La teneur en protéine du rejet solide de poissonnerie a été déterminée selon la méthode standard de Kjeldahl (AOAC, 1990).
- Le dosage des lipides est réalisé selon la méthode de Bligh et Dyer (1959) en utilisant le mélange liquide chloroforme-méthanol-eau (1:2:0,8 v/v/v).

I-2 Concentration des protéines

Notre étude consiste à produire des acides aminés et des peptides à partir du rejet solide de poissonnerie. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps hydrolysé ce dernier par une enzyme commerciale à savoir la pepsine ; provenant des laboratoires SIGMA et dont les caractéristiques sont fournies par le fabricant : pH = 2 ; T = 37°C ; A = 980 U/ mg protéine.

5 kg de rejet finement broyé sont dilués dans un égal volume d'eau. Après mélangeage, le pH du milieu est ajusté à 2 avec du HCl concentré et la température maintenue à 37°C. La solution pepsique préalablement ramenée sous les conditions optimales sera ajoutée en raison de 1% massique par rapport au poids humide du rejet. A la fin de la réaction, l'hydrolysate débarrassé des grosses fractions par tamisage, contient toujours des lipides qui seront séparés des protéines par simple centrifugation. Cependant, le couplage du réacteur enzymatique à un pilote d'ultrafiltration en vue de réaliser l'opération de concentration s'est avérée intéressante afin de rendre l'étape de séchage moins coûteuse.

I-2-1 Procédé d'ultrafiltration

I-2-1-1 Dispositif d'ultrafiltration

Le dispositif d'ultrafiltration utilisé au cours de notre étude est un pilote mixte de microfiltration et ultrafiltration : le MICROLAB 130S de la firme GAMMA FILTRATION®. Les caractéristiques générales d'une telle unité sont les suivantes :

- Température maximale : 95°C
- Pression maximale : 8 bars
- Puissance installée : 401 Kw
- Surface de membrane : 0,2 m²

La membrane d'ultrafiltration est une membrane minérale CEREVER® dont les caractéristiques sont :

- Composition : oxyde métallique à base de zircon
- Diamètre moyen des pores : 500 Å
- Gamme de pH : 0,5 – 13,5

Cette membrane, appelée aussi couche active, est liée au support de manière monolithique par frittage. Les caractéristiques d'un tel support sont :

- Composition : $\alpha\text{Al}_2\text{O}_3$
- Diamètre du canal : 4 mm
- Nombre de canaux : 19
- Longueur : 850 mm
- Pression d'éclatement : >100 bars
- Surface utile de la membrane : 0,2 m²

I-2-1-2 Processus d'ultrafiltration

Au cours des essais d'ultrafiltration deux protocoles expérimentaux ont été suivis :

- Essai à concentration constante consiste à recycler la totalité du perméat dans le bac d'alimentation (Fig. II.1). Ce test permet de déterminer les conditions opératoires optimales.
- Essai à concentration variable avec récupération du perméat (Fig. II.2) et suivi du facteur de

concentration volumique (FCV) exprimé par $FCV = \frac{V_1}{V_2}$.

a) Essai à concentration constante

Calcul de la perméabilité à l'eau

Pour le calcul de la perméabilité à l'eau de la couche active, nous avons travaillé en mode statique c'est-à-dire seule la pompe d'alimentation fonctionne :

- Remplir le bac d'alimentation d'eau en dirigeant les sorties perméat et rétentat sur la cuve.
- Mettre en marche la pompe d'alimentation.
- Pour chaque pression transmembranaire ΔP testée, effectuer un empotage, c'est-à-dire noter le temps « t » nécessaire pour remplir un volume V de perméat.
- La perméabilité de la membrane sera la pente de la courbe $J_v = f(\Delta P)$

Courbes de polarisation

- Remplir le bac d'alimentation avec la solution à traiter, en dirigeant les sorties perméat et rétentat sur la cuve.
- Mettre en marche la pompe d'alimentation, puis la pompe de recirculation.
- Fixer la vitesse de recirculation (U) à l'aide du débitmètre que l'on fait varier par la suite.
- Réaliser des empotages pour chaque pression transmembranaire (ΔP) testée.
- Les courbes de polarisation seront obtenues en traçant $J_v = f(\Delta P)$ pour chaque vitesse étudiée

Remarque : Après chaque tracé de courbe, le passage à une nouvelle vitesse de circulation doit être précédé d'une régénération de la membrane, sans quoi les résultats ne seraient plus représentatifs

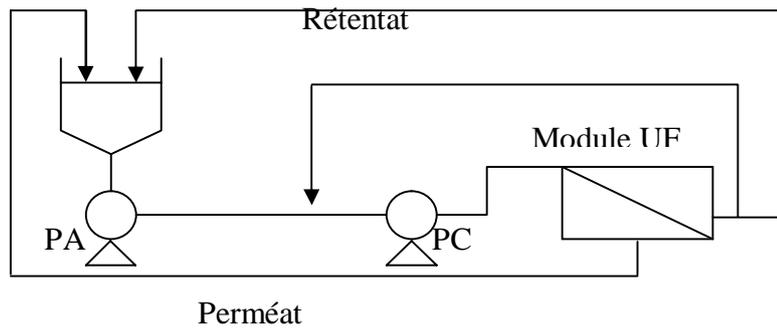


Figure II.1 Procédé d'ultrafiltration avec recirculation du perméat.

b) Essai à concentration variable

L'essai de concentration de la solution protéique dans le dispositif d'ultrafiltration sans recyclage du perméat se fait selon le protocole expérimental suivant :

- Remplir le bac d'alimentation par un volume connu de la solution protéique à traiter.
- Fixer les conditions opératoires optimales (ΔP et U).
- Réaliser des empotages à des intervalles de temps différents afin de suivre l'évolution du flux de perméat.
- Recueillir simultanément des échantillons de perméat et de rétentat afin d'évaluer le taux de rejet et le facteur de concentration.

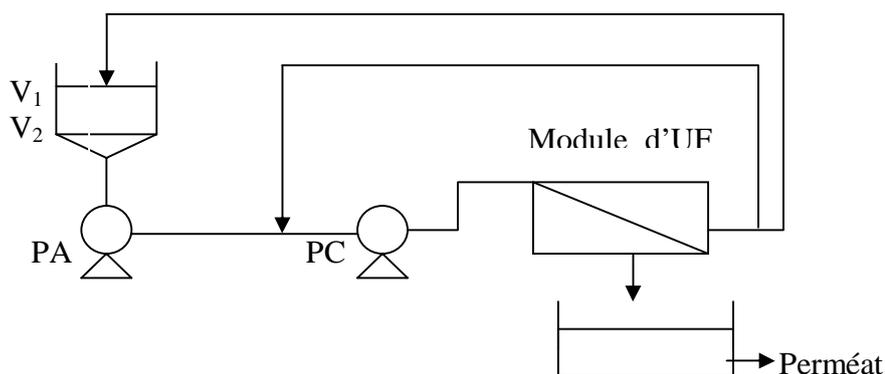


Figure II.2 Procédé d'ultrafiltration sans recirculation du perméat.

II PRODUCTION DE LA CHITINE ET DE SES DERIVES

II-1 Matière première

Les carapaces de crevettes ont été collectées dans des restaurants de la capitale. Ces déchets appartiennent à l'espèce *Parapenaeus longirostris*, identifiée au niveau du Laboratoire Halieutique, Faculté des Sciences Biologiques, U.S.T.H.B. Cette espèce est présente en abondance à différentes profondeurs de 150 à 900 m, le long du littoral algérien (Nouar et Maurin, 2001).

D'un point de vue taxonomique, cette espèce est classée comme suit (Jessop, 1973) :

- Règne : métazoaires
- Embranchement : arthropoda
- Classe : crustacea
- Ordre : decapoda
- Famille : penaeidea
- Genre : parapenaeus
- Espèce : longirostris

La teneur en eaux, le taux des cendres et le dosage des protéines ont été réalisés de la même manière que pour le rejet solide de la poissonnerie de Dellys.

Teneur en chitine

La détermination de la teneur des carapaces en chitine est réalisée par dosage des résidus N-acétyl glucosamines libérés par hydrolyse acide de la chitine, réalisée avec de l'acide chlorhydrique six fois normale (6N) au bout de 6 heures (Loiseleur, 1963). Comparativement à l'hydrolyse alcaline, l'hydrolyse acide est plus sensible et plus facile à mettre en œuvre. Le dosage des résidus N-acétyl glucosamines libérés est réalisé selon la méthode de Reissig (Loiseleur, 1963).

Principe de la méthode :

Il s'agit de la réaction de Morgan-Elson : en milieu alcalin, à chaud, les N-acétylhexosamines conduisent à des chromogènes (dérivés du furane) qui, en milieu acide, se condensent au p-diméthylaminobenzaldéhyde (réactif d'Ehrlich) conduisant à une coloration rouge violacée (Percheron et al., 1981). Cette méthode utilise deux réactifs :

- Le tetraborate de potassium (réactif A): solution 0.8 M dans le borate. Le pH est ajusté à 9,1 avec du KOH.

- Réactif à la p-diméthylaminobenzaldéhyde (réactif B) : on dissout 10 mg de ce réactif dans 100 mL d'acide acétique glacial très pur, qui contient 12,5% en volume de HCl (10N). Le réactif se conserve bien pendant un mois à +2°C. Au moment de l'usage, on le dilue avec 9 volumes d'acide acétique glacial très pur.

Préparation de la gamme étalon :

On a choisi une gamme comprise entre 0 et 8 mg d'acétyl glucosamine dans un volume d'un litre d'eau distillée. On répartit 0.5 mL de chaque solution préparée, de concentration connue, dans une série de tubes à essai. On ajoute 0,1 mL de tetraborate de potassium et on chauffe dans un bain marie (Memmert) bouillant pendant exactement trois minutes. On refroidit dans un bain d'eau froide, puis on ajoute 3 ml de réactif B. On mélange et on porte immédiatement dans un bain à 36°C. On refroidit dans un bain d'eau froide (20°C) et on lit l'absorbance à 530 nm au spectrophotomètre (Secomam, modèle Prim) après 20 minutes aussi vite que possible, l'intensité de la couleur baissant d'environ 0,5% toutes les cinq minutes après avoir atteint son maximum en 20 minutes.

La teneur des carapaces en chitine est calculée comme suit :

$$\text{Teneur en chitine (\%)} = \frac{\text{g d'acétyl glucosamine}}{\text{g d'échantillon}} \times 100 \quad (9)$$

Teneur en azote de la chitine (N chitine) en g/100 g de carapaces = P. 6,9% / 100

P étant le poids de la chitine, exprimé en gramme contenu dans 100g de carapaces.

Le facteur **6,9%** représente la proportion moyenne d'azote dans une chitine, considérée comme étant totalement acétylée.

II-2 Extraction de la chitine

II-2-1 Prétraitement des carapaces de crevettes

Avant leur utilisation, les carapaces sont d'abord débarrassées de leurs antennes et leurs pattes. Ils subissent ensuite un prétraitement qui consiste en un lavage énergique afin d'éliminer les résidus organiques (tissus) et bouillis pendant 1 heure, après quoi ils sont lavés une seconde fois et enfin séchés à l'étuve (Memmert SLE 600) à 163°C pendant 1heure. Après séchage, les carapaces sont débarrassées une dernière fois d'éventuels tissus encore présents et subissent le **quenching** (Mukherjee, 2001) : ce traitement permet de casser la structure cristalline de la chitine contenue dans la carapace, facilitant ainsi son extraction. Il consiste à placer les carapaces, préparées comme indiqué ci-dessus, dans l'étuve à 80°C,

pendant 48 heures. Elles sont ensuite rapidement plongées dans un bain froid d'acétone, contenant de la glace. Cette étape du traitement a pour but d'empêcher la recristallisation de la chitine et rend par ailleurs les carapaces plus faciles à broyer. A l'issue de ce traitement, les carapaces sont broyées à l'aide d'un moulin à café, la poudre obtenue est conservée dans des boîtes fermées hermétiquement.

II-2-2 La déminéralisation

Nous constatons lors de la représentation du protocole selon lequel est réalisée la déminéralisation, par traitement des carapaces avec l'acide chlorhydrique à température ambiante, que certains paramètres opératoires à savoir : la concentration de l'acide, le temps de réaction et le rapport solide / solvant interviennent. D'où la nécessité de mener des études qui quantifieront l'impact de chacun de ces paramètres sur le taux de déminéralisation. L'agitation étant maintenue constante en utilisant un agitateur magnétique (Stuart, SB 162).

- * **Concentration de l'acide** : les concentrations de l'acide chlorhydrique (HCl) testées sont les suivantes : 0,25 ; 0,50 ; 1,00 ; 1,25 ; 1,50 et 2,00 M.
- * **Temps de réaction** : des réactions de déminéralisation ont été réalisées en faisant varier le temps comme suite: 7,5 ; 15 ; 22,5 ; 30 ; 45 ; 60 ; 120 et 1440 minutes.
- * **Rapport du poids de carapaces au volume d'acide** : les valeurs du rapport solide / solvant qui ont été testés durant cette étape sont les suivants: 1/10 ; 1/15 ; 1/20 ; 1/25 et 1/30 g/mL.

En fin de réaction, le surnageant est éliminé par filtration sur un tamis (Endecotts, 140 μ m), le culot retenu est rincé abondamment avec l'eau du robinet jusqu'à la neutralité, et ce, en contrôlant le pH de l'eau du rinçage.

La réaction de déminéralisation est appréciée par détermination du taux de cendres, plus le taux de cendres est faible, plus efficace sera la réaction de déminéralisation :

$$\text{Taux de déminéralisation(\%)} = \frac{\text{Taux de cendre initial} - \text{Taux de cendre de l'échantillon}}{\text{Taux de cendre initial}} * 100$$

II-2-3 La déprotéinisation

La déprotéinisation a été accomplie en soumettant les carapaces déminéralisées suivant les conditions optimisées, à un traitement alcalin par la soude.

On procède de la même manière que précédemment, c'est-à-dire, que chaque paramètre est optimisé en maintenant les autres paramètres de la réaction constants.

Dans ce cas, quatre paramètres ont été optimisés : la concentration de la solution alcaline, le rapport poids de carapaces/volume de soude, le temps de réaction ainsi que la température. L'agitation, a été, encore une fois, maintenue constante.

- * **Concentration de la soude** : 0,5 ; 1,0 ; 1,25 ; 1,5 ; 2,0 ; 2,5 ; 3,0 ; 3,5 ; 4,0 ; 4,5 et 5M.
- * **Temps de réaction** : 7,5 ; 15 ; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240 ; 360 et 1440 minutes.
- * **Rapport du poids de carapaces au volume de soude**: 1/10; 1/15; 1/20; 1/25 et 1/30 g/mL.
- * **Température** : 18; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80; 85; 90; 95 et 100°C.

En fin de réaction, le surnageant est récupéré à l'aide d'une seringue et transvasé dans une fiole jaugée de 50 mL, le pH est ramené à la neutralité par une solution d'acide chlorhydrique (1N) dont le volume rajouté est soigneusement noté. Le taux de déprotéinisation est évalué par quantification des protéines dans le surnageant selon la méthode de dosage de Biuret.

En ce qui concerne le culot, il subira le même traitement que l'étape précédente.

$$\text{Taux de déprotéinisation (\%)} = \frac{\text{Taux de protéines de l'échantillon}}{\text{Taux de protéines initial}} * 100$$

Le taux de protéines initial a été déterminé par la méthode standard de Kjeldahl.

II-3 **La désacétylation**

C'est l'étape la plus importante qui consiste à la transformation de la chitine en chitosane en milieu fortement alcalin. Déjà cité en bibliographie, la désacétylation est affectée par un grand nombre de facteurs. Dans notre étude, en maintenant une agitation constante, nous nous sommes intéressés à l'optimisation des paramètres suivants :

- * **Concentration de soude** : les valeurs testées sont les suivantes : 30; 35; 40; 45 et 50%.
- * **Température** : des réactions de désacétylation ont été menées en faisant varier le temps pour chaque température fixée, à savoir : 60; 80; 100 et 120°C.

* **Taux de dilution** : sous les conditions optimales, préalablement déterminées, à savoir la température et la concentration de la soude, les valeurs du rapport poids de chitine au volume de soude testées durant la désacétylation sont : 1/30; 1/40; 1/50; 1/60 et 1/80 g/mL.

Au terme de la réaction, la solution est filtrée sur tamis; le chitosane retenu est lavé en continu afin d'éliminer la soude résiduelle, et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau du lavage atteigne la neutralité. Le chitosane est rincé avec l'eau distillée puis séché à l'étuve à 80°C.

Le chitosane ainsi obtenu est purifié par dissolution dans une solution aqueuse d'acide acétique (1%) suivie par une filtration pour retenir la matière insoluble. Ensuite, le chitosane soluble sera précipité avec du NaOH (1N), lavé avec de l'eau bidistillée et enfin lyophilysé ou tout simplement séché (Kittur et al., 2002).

II-3-1 Mesure du poids moléculaire

L'utilisation de la méthode viscosimétrique nous a permis de déterminer le poids moléculaire moyen de la chitine, ainsi que celui du chitosane. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un viscosimètre de type **Ubbelohde** (Technico, ASTM D. 445) de constante $k = 0,01\text{cS/s}$.

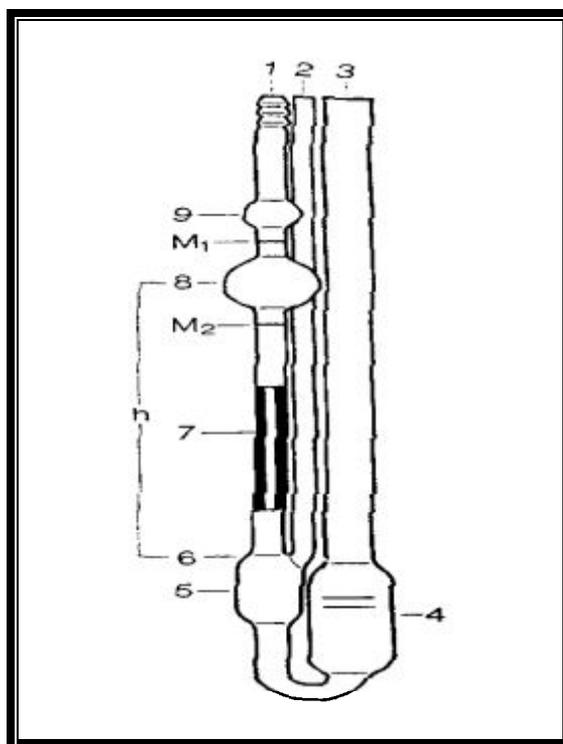


Figure II.3 Viscosimètre de type Ubbelohde.

a) Description

Le viscosimètre est constitué principalement par les trois parties tubulaires (1, 2 et 3), le tube capillaire (7) avec la sphère de mesure (8), la sphère des avant coulants (9) (pour les viscosimètres selon Ubbelohde) et le vase à niveau (5). Au-dessus et au-dessous de la sphère de mesure (8), les marques annulaires M_1 et M_2 sont imprimées sur le tube (1). Ces marques définissent le débit de l'échantillon. Le tube capillaire (7) se termine dans la partie supérieure, réalisée comme calotte sphérique (6), du vase à niveau (5). Par la surface intérieure de cette calotte sphérique (6), l'échantillon s'écoule du tube capillaire (7) sous forme d'un film mince.

b) Mode de remplissage

Pour remplir le viscosimètre, incliner celui-ci d'environ 30° sur la verticale, le réservoir (4) se trouvant en dessous du capillaire (7) ; introduire ensuite suffisamment de liquide dans le tube 3 pour amener le niveau jusqu'au trait inférieur lorsque le viscosimètre est redressé. Le volume du liquide étudié sera toujours le même. Pour faire monter le liquide dans le viscosimètre, placer un doigt sur le tube 2 et aspirer à l'aide d'une propipette par le tube 1 jusqu'à ce que le liquide atteigne le centre du réservoir (9). Débrancher alors la propipette puis retirer le doigt du tube. Mesurer le temps d'écoulement du liquide entre les repères M_1 et M_2 , à l'aide d'un chronomètre.

Remarque : Le viscosimètre sera lavé à l'eau, puis séché à l'acétone entre chaque mesure.

Nous pouvons ainsi obtenir la viscosité réduite (η_r) et la viscosité inhérente (η_i) à partir des relations suivantes :

$$\eta_r = \frac{\eta_{sp}}{[C]} \quad (10)$$

$$\eta_{sp} = \frac{\eta}{\eta_s} - 1 \quad (11)$$

$$\eta_i = \frac{1}{[C]} * Ln \frac{\eta}{\eta_s} \quad (12)$$

Où η représente la viscosité absolue de la solution de polymère (chitine ou chitosane) à la concentration $[C]$ et η_s la viscosité absolue du solvant.

Pour un même viscosimètre, la viscosité cinématique (viscosité absolue) s'exprime par la relation :

$$\eta = k.t \quad (13)$$

Où k est la constante de l'appareil qui se calcule à partir de la valeur connue de η (eau pure à 20°C), et t le temps d'écoulement en seconde.

Le poids moléculaire moyen des polymères préparés dans le cadre de ce travail, a été déterminé à partir de l'équation de Mark-Houwink (Sabnis et Block, 2000):

$$[\eta] = K.(M)^a \quad (14)$$

Où $[\eta]$ représente la viscosité intrinsèque du polymère, K et a sont des constantes qui dépendent de la température et du solvant utilisé.

Pour la chitine, le solvant utilisé est une solution de diméthylacétamide (Fluka) contenant du chlorure de lithium (solution à 5%). Les constantes K et a correspondantes sont respectivement $0,24 \text{ cm}^3/\text{g}$ et $0,69$ (Mirzadeh et al., 2002).

Pour le chitosane, le solvant utilisé est un mélange d'acide acétique à $0,2 \text{ M}$ et d'acétate de sodium à $0,3 \text{ M}$. $K = 0,078 \text{ cm}^3/\text{g}$ et $a = 0,76$ (Mirzadeh et al., 2002).

On prépare cinq solutions de concentrations croissantes de chaque polymère. Ces concentrations sont exprimées en g/100mL de solvant et sont : $0,0223$; $0,042$; $0,065$; $0,081$ et $0,1$. On calcule η_i et η_r pour chaque solution puis on trace les droites $\eta_i = f([C])$ et $\eta_r = f([C])$. On détermine l'ordonnée à l'origine pour chacune des deux droites tracées, et on calcule la moyenne des deux valeurs. La moyenne, ainsi obtenue, correspond à la viscosité intrinsèque.

Remarque : Les mesures de viscosité ont été réalisées en introduisant le viscosimètre dans un bain thermostaté (Memmert) réglé à 25°C .

II-3-2 Mesure du degré de désacétylation

Les valeurs de ce paramètre sont fortement affectées par la méthode analytique utilisée. En conséquence, la méthode de quantification du degré de désacétylation d'un échantillon de chitosane doit être fixée tout le long du processus (Tanveer et al., 2002).

Pour cela, nous avons utilisé la spectrophotométrie infrarouge, méthode relativement rapide et ne nécessitant pas la dissolution du chitosane dans les solvants aqueux.

a) Méthode

Le protocole expérimental suivi pour estimer les valeurs du D.D est en grande partie inspiré de la méthode de Sabnis et Block, citée par (Tanveer et al., 2002) :

- 40 à 60mg de chitosane et 120mg de KBr sont mélangés et réduits en poudre très fine dans un mortier à pilon.
- Environ 40 mg du mélange sera compacté avec la presse hydraulique (8tonnes) pendant 60 secondes ; les pastilles obtenues seront conditionnées dans dessiccateur avant analyse.

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR (SHIMADZU 8400) d'intervalle de fréquence $4000 \text{ cm}^{-1} - 500 \text{ cm}^{-1}$.

b) Calcul

le degré de désacétylation a été calculé en utilisant la formule de (Domszy et Roberts, 1985) :

$$D.D = 100 - \left[\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{100}{1,33} \right] \quad (15)$$

A_{1655} : absorbance de la bande Amide-I à 1655 cm^{-1} donnant la mesure des groupements N-acétyle.

A_{3450} : absorbance de la bande Hydroxyle à 3450 cm^{-1} indiquant le standard interne pour la correction.

Le facteur (1,33) indique la valeur du rapport $\frac{A_{1655}}{A_{3450}}$ pour un chitosane entièrement N-acétylé.

Ce facteur sera nul pour un chitosane complètement désacétylé.

II-4 N,O-carboxyméthylation du chitosane

La méthode de préparation du NOCC est en grande partie inspirée du protocole expérimental développé par (Fernanda et al., 2005) :

-10g de chitosane en suspension dans 100mL d'isopropanol, l'ensemble est agité à température ambiante pendant 30 minutes. 15mL de NaOH (10M) sont ajoutés en six parties égales durant un temps $t = 30\text{min}$ (on ajoutera 2,5mL de soude toutes les 5minutes). On laisse réagir pendant 45 minutes, avant d'ajouter différentes quantités d'acide monochloroacétique (dissout dans l'isopropanol), en quatre portions égales à cinq minutes d'intervalles. Ensuite, le mélange réactionnel est chauffé à 50°C pendant trois heures, au bout desquelles, 10mL d'eau distillée froide sont ajoutés et le pH sera ajusté à 7 avec de l'acide acétique glacial. Enfin, on procède au lavage du solide par filtration sur tamis (Endecotts, $140\mu\text{m}$) avec du méthanol (60%) suivi d'un séchage à 60°C .

Le degré de carboxyméthylation (D.C), dont la valeur indique le nombre de groupements carboxyméthyles par unité glucosamine, est calculé par la formule suivante (Nahalka et al., 1998) :

$$D.C = \frac{A_{1418}}{A_{1312}} \quad (16)$$

A_{1418} : Bande d'absorption caractéristique des vibrations d'élongation symétrique du groupement carboxyle (COO^-).

A_{1312} : Bande d'absorption caractéristique des vibrations de déformation du groupement $-\text{CH}_2$.

II-5 Production des oligomères

- N-acétylchito-oligosaccharides (noté NAc-COS) sont obtenus par hydrolyse de 1g de chitine dans 50mL de HCl (7N) à 70°C pendant 3 heures.
- Chito-oligosaccharides (noté COS) sont obtenus par hydrolyse de 1g de chitosane dans 50mL de HCl (6N) à 50°C pendant 3 heures.

Dans chaque cas, la réaction d'hydrolyse est arrêtée par refroidissement dans un bain glacé. Le mélange réactionnel est ensuite séché sous vide à -46°C. Les particules solides, ainsi obtenues, seront redissoutes dans 100 mL d'eau distillée et séchées à nouveau dans les mêmes conditions afin d'enlever au maximum de HCl résiduel. La solution finale est neutralisée avec du NaOH (1N) et filtrée (0,22 µm). Le filtrat est concentré par évaporation sous vide. Du méthanol (9 vol) seront additionnés à la solution pour précipiter les oligosaccharides avec un degré de polymérisation $DP \geq 8$; le méthanol est enfin évaporé (Chang et al., 2000).

III ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE LA CHITINE, DU CHITOSANE ET DE LEURS OLIGOMERES

III-1 Microorganismes

Toutes les souches bactériennes testées au cours de cette étude proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger à savoir :

* Les bactéries Gram positif

Staphylococcus aureus ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 :

Ce sont deux souches de référence (American Type Culture Collection). Les Staphylocoques sont des cocci positif non sporulés aéro-anaérobie. La première souche est sensible à la pénicilline tandis que la seconde ne l'est pas.

Bacillus subtilis et *Bacillus cereus* : Les bacillus sont des bacilles sporulés aéro-anaérobie.

* Les bactéries Gram négatif

Toutes les souches utilisées étaient des bacilles non sporulés qui se différencient par leur mode respiratoire à savoir :

Aérobic facultatif : *Escherchia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Samonella typhimurium*; *Vibrio cholerae* (sérotype ogawa); *Shigella dysenteriae*; *Enterobacter agglomerans*.

Aérobic stricte : *Provetella melaninogenica* et *Bacteroides fragilis*.

III-2 Mesure de la croissance

III-2-1 Bactéries aérobies

Pour les bactéries aérobies, nous avons utilisé de l'eau peptonée comme milieu de culture. Une préculture de la souche à étudier est préparée dans un tube à essai, en ensemençant 10 colonies dans 10mL d'eau peptonée à 37°C pendant 12 heures.

Nous ensemençons le fermenteur de 150mL avec les 10mL de préculture à 37°C, soit dans l'eau peptonée seule (contrôle), soit l'eau peptonée additionnée de chitine, de chitosane, de NAc-COS ou de COS à 0,1% (p/v).

Enfin, la croissance microbienne est mesurée par lecture de la densité optique à 640 nm toutes les 30 minutes.

III-2-2 Bactéries anaérobies

Pour les bactéries anaérobies, nous avons utilisé le bouillon T.G.Y (Trypticase-Glucose-Yeast extract) comme milieu de fermentation. Ce milieu doit être régénéré 20 minutes au bain-marie bouillant afin d'éliminer toute trace d'oxygène.

La préculture de la souche à étudier est préparée dans un tube à essai, en ensemençant 10 colonies dans 10mL de bouillon T.G.Y en anaérobiose.

La culture sera toujours réalisée dans le fermenteur et la fermentation se déroulera à l'intérieur d'une jarre qui assure une atmosphère anaérobie grâce au mélange gazeux (90% N₂ 5% CO₂ et 5% H₂) introduit après création du vide, pour extraire tout l'oxygène environnant. Un catalyseur au palladium est présent dans la jarre pour éliminer les molécules d'eau issues de la réaction de condensation d'oxygène avec l'hydrogène fourni par le mélange gazeux.

La croissance sera mesurée par lecture de la densité optique à 640nm à intervalle d'une heure afin d'éviter de fréquentes expositions à l'oxygène atmosphérique.

Remarques :

- La chitine et le chitosane doivent être autoclavés avant leur introduction dans les milieux de cultures.
- L'ouverture de la jarre doit se faire loin de toute flamme car l'hydrogène libéré est susceptible de s'enflammer.

III-3 Etude de l'effet inhibiteur

Il s'agit de déterminer la concentration minimale inhibitrice (C.M.I) par lecture de la densité optique à 640nm. Pour cela, nous avons préparé différentes concentrations de chitine, chitosane, NAc-COS et COS dans la gélose nutritive : 0,1% ; 0,08% ; 0,05% ; 0,03% ; 0,01% ; 0,006% et 0,003% (poids/volume). Ensuite, il suffit d'inoculer les boîtes de Pétri avec les souches bactériennes testées.

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la concentration minimale de la substance testée qui inhibe complètement la croissance bactérienne, après incubation à 37°C pendant 72 heures.

IV CONSERVATION DES FRUITS PAR ENROBAGE A BASE DE CHITOSANE ET DE SON DERIVE NOCC

Notre approche consiste à prolonger la durée de vie de deux fruits, la tomate et la fraise, par enrobage à base de chitosane et de son dérivé carboxyméthylé (NOCC).

Cependant, la principale difficulté rencontrée, pour déterminer la qualité d'un produit d'origine végétale, consiste à identifier les paramètres clés et à les quantifier. Il convient, alors, de définir le type d'analyse à réaliser pour mieux connaître et/ou estimer les paramètres déterminant la qualité du fruit à savoir : l'analyse sensorielle, les analyses physiques et les analyses chimiques.

Si pour certaines composantes de la qualité organoleptique, des techniques instrumentales sont corrélées à l'évaluation (sucrosité, acidité), seule l'analyse sensorielle est la façon la plus complète pour caractériser la texture du fruit. En outre, face à la lourdeur et au coût des analyses descriptives quantitatives, cette méthode ne peut pas être utilisée en routine. De même, les arômes sont impossibles à mesurer de manière simple et objective. Ils se développent à partir d'un niveau de maturité suffisant. Le seul test possible est la dégustation (Miron et al., 2002).

Dans notre cas, pour contrôler l'évolution de la qualité du fruit tout au long de la période de conservation, nous nous sommes intéressés à l'accumulation de sucres et acides en tant que composés majoritaires issus du métabolisme primaire, caractérisant la qualité gustative, et à des composés minoritaires telle que la vitamine C pour son rôle déterminant dans la valeur nutritionnelle du fruit.

IV-1 Techniques de traitement

Les solutions de chitosane utilisées ont été préparées selon le protocole expérimental cité par EL-Ghaouth et al. (1991) : x g de chitosane poudre sont dispersées dans 80 mL d'eau distillée, pour les dissoudre, on ajoute 2,5 mL de HCl (10N). Le pH du milieu est ajusté à 6,5 avec NaOH (1N) car à cette valeur de pH le chitosane sera chargé positivement et exhibera une activité biologique maximale. Enfin, on complète avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 100 mL.

En ce qui concerne les solutions du NOCC, il suffit de dissoudre la quantité désirée dans de l'eau stérile.

A chaque solution, on ajoutera du Tween 80 à raison de 0,1% (v/v) dans le but d'augmenter le taux de mouillabilité (El Ghaouth et al., 1992).

Les tomates (*Lycopersicon esculentum*) ont été récoltées au stade vert mature (le fruit a atteint sa taille finale et les graines sont à maturité), exempte de toutes tares ou autres signes d'infections fongiques ou virales. Après désinfection à l'eau de Javel (10%) pendant trois minutes suivie d'un séchage à l'air libre, chaque fruit sera entièrement trempé dans la solution polymérique à savoir le chitosane (0,5% et 2,0%) et le NOCC (0,5% et 2,0%). Enfin, les cinq lots seront stockés à température ambiante (25 – 30°C).

Les fraises (*Fragaria x ananassa*) ont été récoltées au stade rouge mature, de tailles similaires et saines. Après désinfection à l'eau de Javel (10%) et séchage à l'air libre, l'enrobage a été réalisé, comme pour la tomate, par technique d'immersion. Enfin, le stockage se fera à température ambiante variant de 18 à 22°C.

Dans ce cas, les solutions traitantes (1%) ont été préparées à partir de 3 différents chitosanes :

C1 : chitosane préparé selon la méthode classique c'est-à-dire par le biais des quatre étapes.

C2 : chitosane préparé sans l'étape de décoloration.

C3 : chitosane préparé sans l'étape de décoloration et sans l'étape de déprotéinisation.

IV-2 Analyses physico-chimiques

IV-2-1 Cas de la tomate

Tous les deux jours, on prend trois tomates de chaque lot et après un parfait broyage au mixeur, on réalisera les mesures, en duplicate, de l'acidité, des sucres et de la vitamine C.

a) Prise de poids :

Les mesures du poids sont réalisées chaque deux jours en utilisant une balance digitale.

La perte de poids, est exprimée en pourcentage de la manière suivante :

$$T(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (17)$$

B : représente la moyenne des cinq valeurs du poids mesurées chaque deux jours.

A : représente la moyenne des cinq valeurs du poids mesurées le premier jour (jour 0).

b) Dosage de l'acidité totale :

L'acidité a été déterminée selon la méthode de Brecht et al. (1976), qui consiste à titrer un échantillon de 25g de tomate triturée, par une solution de NaOH (0,1 N), jusqu'à pH = 8,1. Le volume de base versé est soigneusement noté.

L'acidité totale de l'échantillon est exprimée en milligrammes d'acide citrique par 100mL d'homogénat.

c) Dosage des sucres totaux :

Le dosage des sucres totaux a été effectué par la méthode de Dubois et al., (1956). Les termes sucres totaux ou sucres neutres sont utilisés pour désigner les monosaccharides neutres entrant dans la composition des polysaccharides.

*** Principe de la méthode**

En milieu acide, la molécule d'ose subit une déshydratation interne, avec cyclisation. Les dérivés de type furfural que l'on obtient par cyclisation de l'ose en milieu acide, le plus souvent à chaud, ont la propriété de se condenser avec des phénols, des amines cycliques ou des hétérocycles azotés : ces diverses combinaisons donnent naissance à des matières colorantes. Les différentes colorations obtenues varient avec la nature de l'ose initial (Louisot, 1983).

*** Préparation de la gamme d'étalonnage**

- Dissoudre 50mg de glucose et 50 mg de fructose dans 100 mL d'eau distillée.
- Prendre de la solution précédente 4 mL et compléter à 50 mL avec de l'eau distillée.
- Préparer une série de tubes à essai (09) dans lesquels est versé 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,9 mL de la solution fille.
- Compléter les volumes des tubes à 1 mL avec de l'eau distillée.
- Ajouter 1 mL de phénol à 5% à tous les tubes, et agiter énergiquement.
- Placer les tubes dans un bain d'eau glacée et verser 5 mL d'acide sulfurique concentré dans tous les tubes.
- Homogénéiser et laisser reposer 10 minutes.
- Porter le mélange au bain marie à 25°C pendant encore 10 minutes.
- Refroidir à la température ambiante pendant 30 minutes, et à l'obscurité.
- Lire la densité optique à 480 nm.

*** Dosage de l'essai**

On procédera de la même manière que dans le dosage des sucres réducteurs. La teneur en sucres totaux est également exprimée en g / 100g de poids frais.

d) Dosage de l'acide ascorbique (vitamine C) :

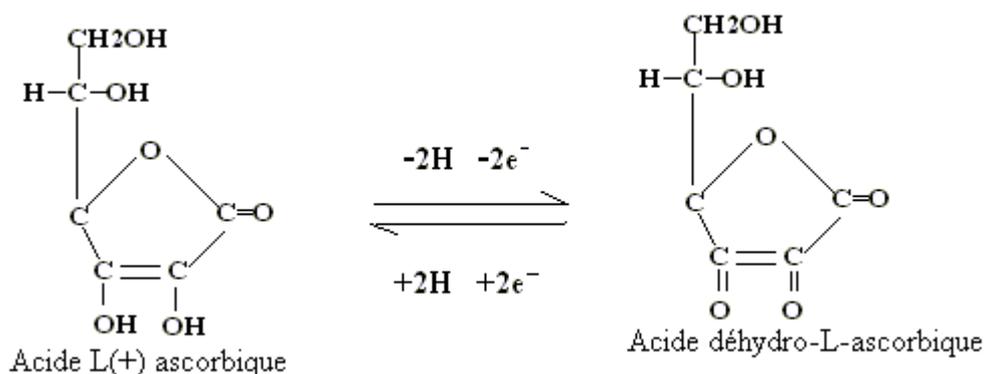
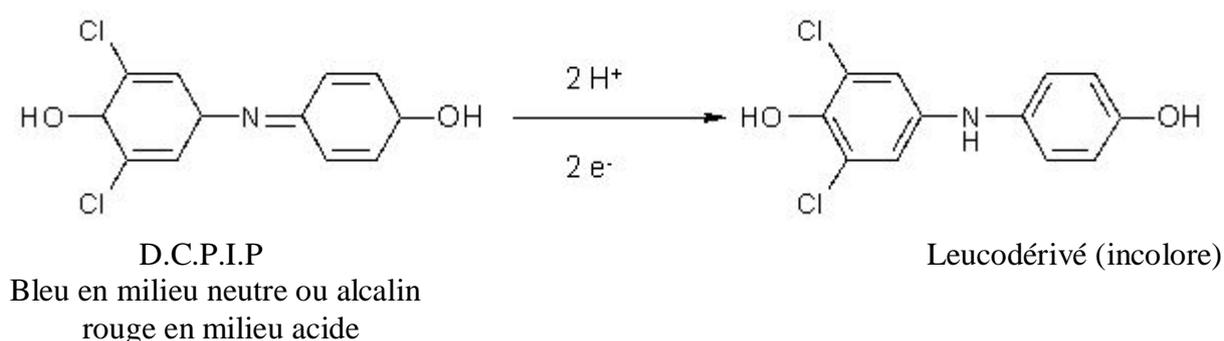
D'un point de vue classification, la vitamine C est une vitamine hydrosoluble appartenant au sous groupe C. C'est, en fait, non un acide, mais une lactone ; on dit volontiers la γ -lactone de la forme ène-diol de l'acide L (+)-2-cétogulonique.

Malgré l'absence de carboxyle, le nom d'acide ascorbique a été usuellement maintenu parce qu'un atome d'hydrogène est facilement substituable par un métal : l'hydrogène de l'hydroxyle fixé en 3. C'est donc le groupement hydroxyle fixé sur le C-3 qui est le support du caractère acide (Jorillier et al., 1962).

Les techniques de dosage de la vitamine C sont nombreuses et utilisent principalement ses propriétés réductrices, grâce au groupe ène-diol.

* **Principe du dosage**

Nous avons opté, dans le cadre de ce travail, pour le dosage par le 2,6-dichlorophénol-indophénol (D.C.P.I.P). Le dosage est basé sur l'oxydation de la vitamine C par une solution de (D.C.P.I.P) (sel de sodium dihydraté), qui est réduit en son leucodérivé, en milieu acide :



*** Extraction de la vitamine C**

La vitamine C hydrosoluble, est extraite à l'aide d'une solution d'acide métaphosphorique $(\text{HPO}_3)_n$ à 2%.

Broyez au mixeur 20g d'échantillon de tomate et 20mL d'acide métaphosphorique. Centrifugez à 3000 tours/minutes pendant 10 minutes, et transférez le surnageant dans une fiole jaugée de 50 mL. Reprenez le culot deux fois avec 10 mL d'acide métaphosphorique, agitez, centrifugez et joignez les surnageants. Ajustez la fiole.

*** Etalonnage du D.C.P.I.P**

La solution de D.C.P.I.P est étalonnée par une solution de vitamine C étalon ($C_{\text{étalon}}$) à 1,5 mmole/L. Cette solution est fragile, elle doit être préparée dans l'acide métaphosphorique pour ralentir l'oxydation. La concentration du D.C.P.I.P utilisée est de 0,5g/L.

Placez dans une fiole de 100 mL :

- 5 mL de solution étalon de vitamine C ($V_{\text{étalon}}$)
- 15 mL d'eau distillée bouillie refroidie.

Versez le D.C.P.I.P à l'aide d'une burette de 10 mL, assez vite au début puis lentement à l'approche du point d'équivalence, jusqu'à apparition d'une coloration rose pâle persistant pendant 30 secondes. Soit $V_{\text{étalon-D.C.P.I.P}}$ le volume de D.C.P.I.P versé.

*** Dosage de l'essai**

Placer dans une fiole de 100mL :

- 5ml de solution de vitamine C extraite (V_{essai}) ;
- 5ml de solution d'acide métaphosphorique à 2% ;
- 10ml d'eau distillée bouillie refroidie.

Verser le D.C.P.I.P jusqu'au virage au rose. Soit $V_{\text{essai-D.C.P.I.P}}$ le volume de D.C.P.I.P versé.

*** Formules littérales**

Le nombre d'électrons, cédés par la vitamine C, est égal au nombre d'électrons captés par le D.C.P.I.P.

$$\text{Pour l'étalon : } 2C_{\text{étalon}} \cdot V_{\text{étalon}} = 2C_{\text{D.C.P.I.P}} \cdot V_{\text{étalon-D.C.P.I.P}}$$

$$\text{Pour l'essai : } 2C_{\text{essai}} \cdot V_{\text{essai}} = 2C_{\text{D.C.P.I.P}} \cdot V_{\text{essai-D.C.P.I.P}}$$

$$\text{D'où l'on tire : } C_{\text{essai}} = C_{\text{étalon}} \cdot V_{\text{essai-D.C.P.I.P}} / V_{\text{étalon-D.C.P.I.P}}$$

La teneur en vitamine C est exprimée en mg/ 100g de poids frais.

IV-2-2 Cas de la fraise

- L'appréciation du pourrissement des fraises suite aux attaques fongiques est réalisée visuellement, chaque deux jours, sur 10 fruits de chaque traitement (y compris le lot de contrôle). Le fruit est considéré infecté (pourri) suite à l'apparition de lésion et/ou développement de moisissure en surface.

Le taux de pourrissement est exprimé en pourcentage des fruits abîmés (Hans et al., 2004).

- Les mesures du poids sont effectuées, chaque deux jours, sur les mêmes fruits utilisés pour l'appréciation du pourrissement.

- En ce qui concerne les analyses chimiques, à savoir l'acidité et la teneur en sucres, nous sommes inspirés du protocole expérimental développé par Marajaana (2002) :

· 4g de purée de fraise sont dilués dans 20mL d'eau distillée, après un parfait mélangeage, on mesure le pH à l'aide du pH-mètre (Metrohm 691). Ensuite, on neutralise la solution avec du NaOH décinormale jusqu'au pH = 8,1.

L'acidité titrable sera exprimée en pourcentage d'acide citrique : 1mL de NaOH (0,1M) équivaut à 0,0064g d'acide citrique.

· La teneur en sucres s'évalue par réfractométrie, méthode basée sur la propriété optique du Jus à dévier la lumière (réfraction plus ou moins importante en fonction du milieu plus ou moins sucré). Il existe différents types de sucres en proportions et quantités variables selon la variété : glucose, fructose, saccharose... La mesure englobe ces différents constituants. Cette mesure donnera l'indice réfractométrique (I.R), exprimé en °Brix = %sucres totaux.

CHAPITRE III

Résultats et discussion

I RECUPERATION DES PROTEINES

I-1 Composition chimique des deux rejets

Les résultats expérimentaux de l'analyse chimique des carapaces de crevettes et du rejet solide de la conserverie de Dellys sont représentés sur le tableau ci-dessous :

Tableau 6 Composition chimique de la carapace de crevette et du rejet solide de poissonnerie

Paramètre	carapace de crevette	rejet solide de la poissonnerie
Humidité	2,0%	80%
Cendres	20%	4,5%
Protéines	40%	14%
Lipides	(15%)*	1,5%
Chitine	23%	

* Corps gras et pigments

Le taux de protéines, dans le cas du rejet solide de la poissonnerie, est relativement élevé par rapport à celui cité par de nombreux chercheurs (Umeto, 1996 ; Bleustein et al., 2000 ; Nilsang et al., 2005). Ceci est dû, d'une part, à la présence de proportions comestibles dans le rejet qui est une conséquence directe de la main d'œuvre non qualifiée, et d'autre part, à la variation de la composition du poisson selon l'espèce et la saison (Mackie, 1982).

Le taux de protéines, dans le cas de la carapace de crevette blanche (*Parapenaeus Longirostris*) non seulement comparable à celui cité par différents chercheurs (Rodde et al., 2008 ; Sunita et al., 2010) ; de plus, il est si important qu'une tentative de récupération et de valorisation aboutira à des résultats qui donneront sans doute satisfaction.

En ce qui concerne la chitine, sa teneur est relativement élevée par rapport à celle donnée par la bibliographie (Tableau.2), ce qui nous encourage d'avantage à utiliser une telle matière première comme source potentielle dans la production de la chitine et de ses dérivés.

Enfin, tout ceci nous permet de conclure que la partie non comestible des crustacés et des poissons, de la crevette et de la sardine en particulier, présente une valeur nutritionnelle aussi importante que la partie comestible.

I-2 Procédé d'ultrafiltration

I-2-1 Cas du rejet liquide

Il s'agit de concentrer les protéines solubles dans les eaux de lavage générées par le processus d'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes.

I-2-1-1 Détermination de la perméabilité à l'eau

Les variations de la perméabilité à l'eau de la membrane CERAVER® avant et après le processus d'ultrafiltration sont illustrées sur la figure III.1. Les pentes des deux droites obtenues sont les valeurs des deux perméabilités à savoir :

- $L_p(0) = 302,6 \text{ L/h.m}^2\text{.bars}$: valeur de la perméabilité à l'eau avant ultrafiltration.
- $L_p(1) = 33,75 \text{ L/h.m}^2\text{.bars}$: valeur de la perméabilité à l'eau après ultrafiltration.

La diminution de la perméabilité après ultrafiltration de la solution protéique est expliquée par la réduction des rayons de pores et donc le colmatage de la membrane. Meirelles et al. (1992) ont montré que le rayon des pores d'une membrane de seuil de coupure de 40000 Da passe de 70Å à 36 Å en utilisant la BSA (Bovine Sérum Albumine).

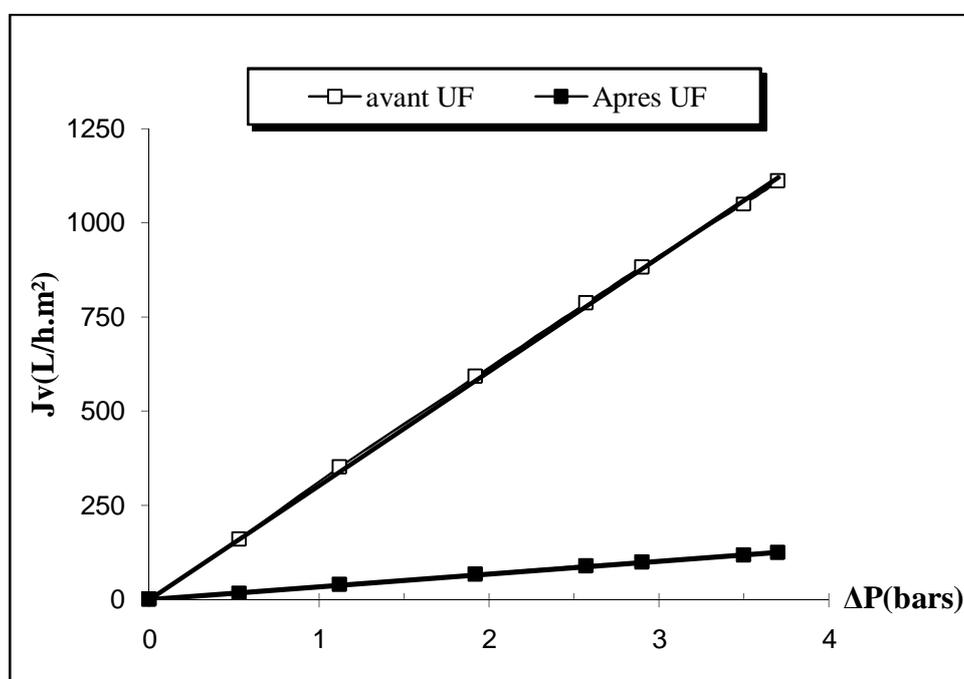


Figure III.1 Perméabilité à l'eau à $T = 20^\circ\text{C}$ et $\text{pH} = 7$.

I-2-1-2 Influence des paramètres hydrodynamiques sur le flux du perméat

A faible pression, le flux de perméat varie linéairement avec la pression transmembranaire appliquée. A partir d'un certain seuil, le flux ne varie plus linéairement avec la pression mais tend vers une limite qui dépend de la vitesse de circulation (Fig. III.2) L'atteinte d'un flux maximal, appelé « flux limite », est une conséquence de :

- L'apparition d'une couche de polarisation sur la membrane (couche active) dont l'épaisseur augmente avec l'augmentation de la pression jusqu'à formation d'une couche de gel et que toute augmentation de pression sera sans effet sur le flux du perméat. Une telle théorie a été confirmée par un grand nombre de chercheurs (Watanabi et al., 1986 ; Chen et al., 1997 ; Goosen et al., 2004 ; Walha et al., 2009 ...).

- La pression osmotique ($\Delta\pi$). En effet, si l'écart de pression (ΔP) est accru, la solution retenue en amont de la membrane se concentre et la pression osmotique croît, même en l'absence de formation de gel, et s'oppose à ΔP .

D'autre part, on constate que pour les faibles vitesses ($U=1,5\text{m/s}$ et $U=3\text{m/s}$) qu'une augmentation de la pression n'améliore pas les flux au-delà de 3bars. Aux plus fortes vitesses ($U=5\text{m/s}$ et $U=6\text{m/s}$), une amélioration des flux est observée jusqu'à 4bars. On aura donc intérêt à travailler à vitesse tangentielle élevée de façon à retarder l'apparition de la couche de polarisation. Ainsi, les conditions hydrodynamiques retenues pour la suite seront : $\Delta P = 3$ bars et $U = 6$ m/s.

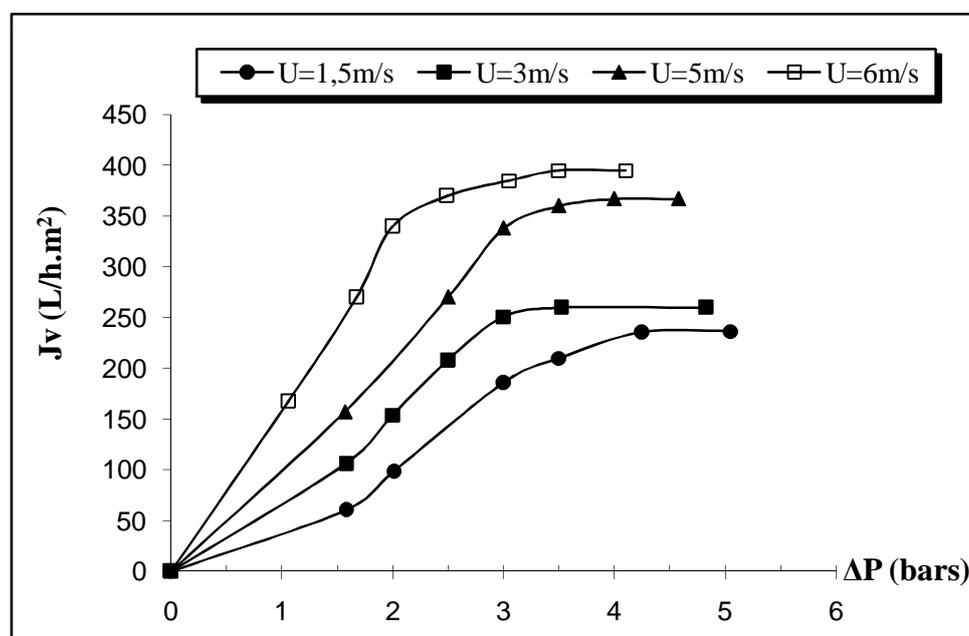


Figure III.2 Variation du flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la vitesse à concentration constante, $T = 20^\circ\text{C}$ et $\text{pH} = 7$.

I-2-1-3 Essai de concentration

La variation du flux de perméat en fonction du temps est illustré sur la Fig. III.3. On constate que ce dernier subit un abaissement de l'ordre de 58% en passant de 163 L/h.m² à 69 L/h.m² au bout de 30 min ; ce qui se traduit en parallèle par une augmentation de la concentration du rétentat.

La formation de la couche de polarisation, non seulement réduit les pores de la membrane, de plus, elle se superpose à la porosité de la membrane et c'est elle qui va assurer la rétention des protéines. En général, cette couche de polarisation laisse circuler les substances moins faciles que le sein de la solution et a souvent une perméabilité moindre que celle de la membrane.

La force motrice de transfert sert donc à vaincre, de plus que la résistance de la membrane (R_m) et la pression osmotique ($\Delta\pi$), cette résistance supplémentaire due à la polarisation de concentration.

Le taux de rejet observé R correspond à la fraction de soluté retenue par la membrane. L'évolution de ce paramètre pendant le processus d'ultrafiltration sous les conditions opératoires, préalablement choisies, est montrée sur la figure III.4. On remarque une augmentation progressive avec le temps, mais non linéaire ; pour atteindre au bout de l'opération une valeur max. de 97% en moins de 40 minutes.

Enfin, au bout de 50 minutes, le volume de la solution protéique traitée est passé de 5L à 2,1L, soit un facteur de concentration volumique (FCV) de 2,38. D'autre part, la concentration du rétentat est passé de 5g/L à 10g/L, soit un facteur de concentration (FC) de 2

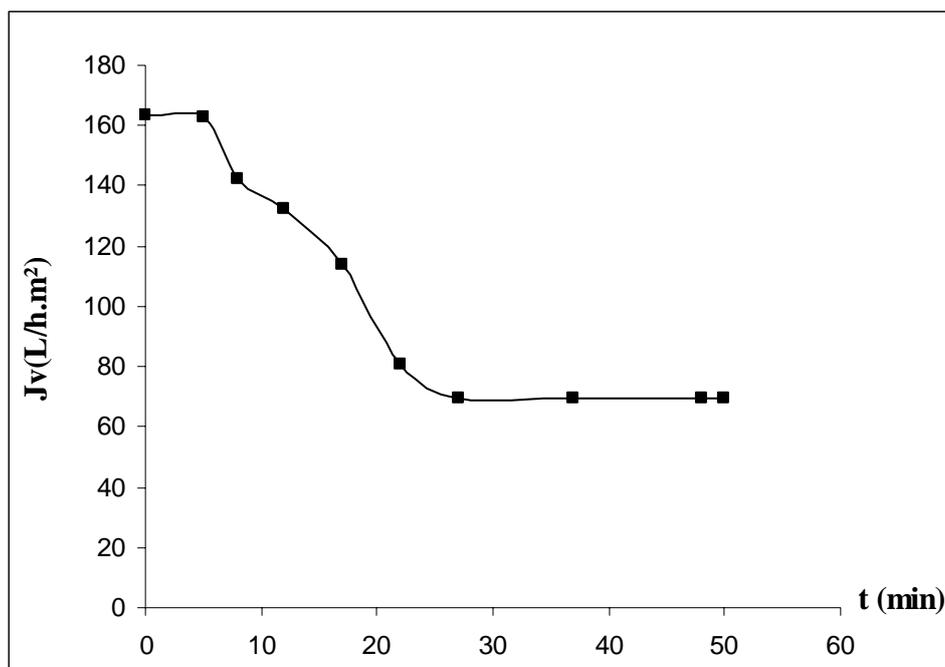


Figure III.3 Evolution du flux de perméat en fonction du temps lors de l'ultrafiltration du rejet liquide à $T = 20^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $\Delta P = 3\text{bars}$ et $U = 6\text{m/s}$.

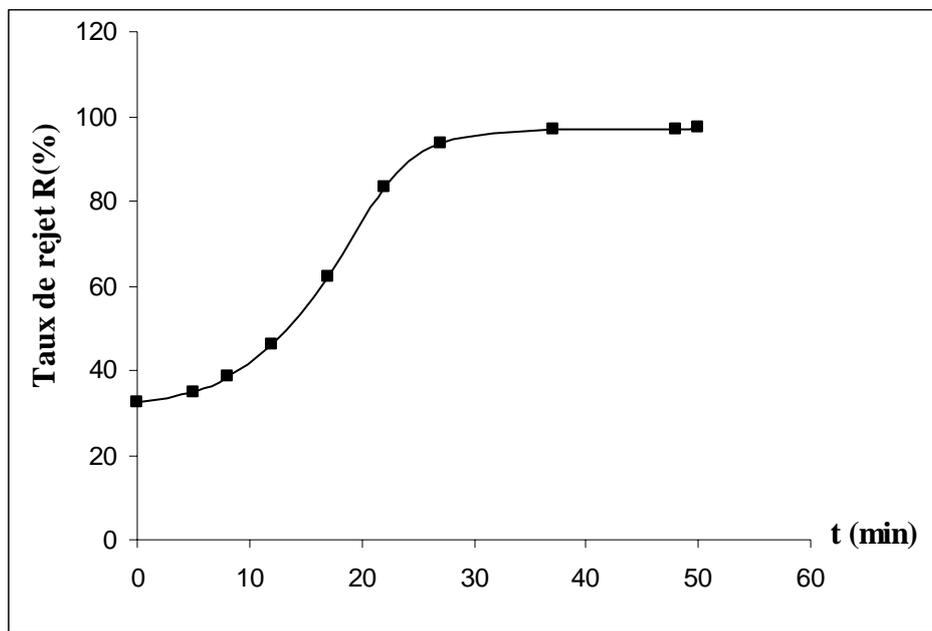


Figure III.4 Evolution du taux de rejet en fonction du temps lors de l'ultrafiltration du rejet liquide à $T = 20^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $\Delta P = 3\text{bars}$ et $U = 6\text{m/s}$.

Enfin, les performances de l'ultrafiltration en termes de dépollution montrent que cette technique permet une nette amélioration de la qualité de l'effluent à rejeter. En effet, la DCO du perméat est passé de $1550 \mu\text{g/L}$ à $200 \mu\text{g/L}$ en fin d'opération (Fig.III.5). Ce qui correspond à un taux de rétention de 87%. Des taux de rétention plus faibles (47%, 65% et 78,8%) ont été obtenus respectivement par Shiau and Chai (1999), Aloulou et al. (2006) et Ben Nasr et al. (2010). Notons que ces derniers ont travaillé sur des effluents très chargés en matière organique à savoir les eaux de lavage des huîtres, l'encre de seiche et les jus de cuisson de thon respectivement.

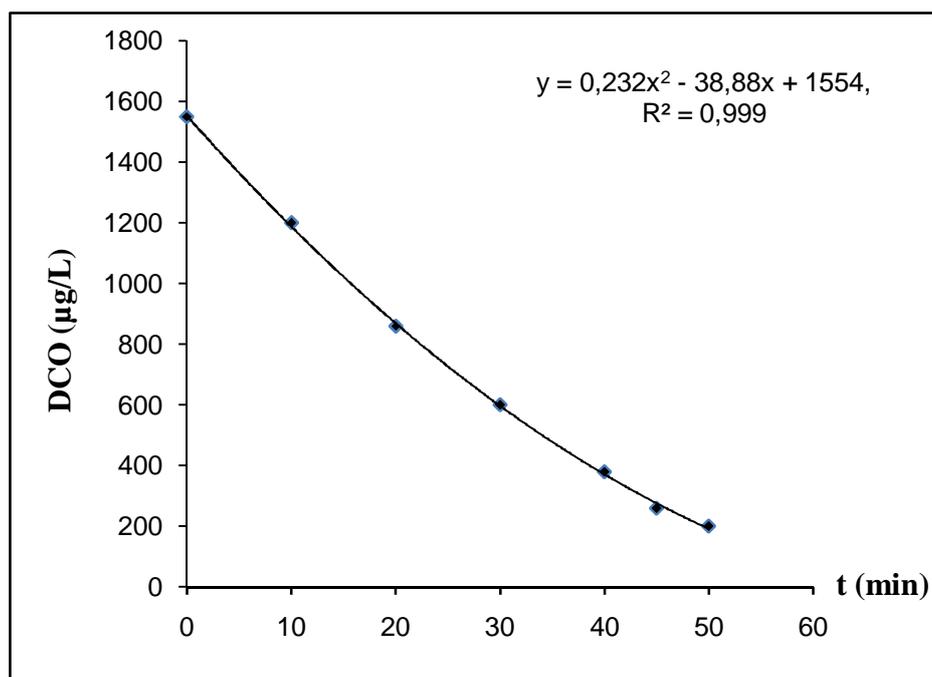


Figure III.5 Réduction de la DCO durant l'ultrafiltration du rejet liquide à $T = 20^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $\Delta P = 3\text{bars}$ et $U = 6\text{m/s}$.

I-2-2 Cas du rejet solide

Il s'agit de concentrer les protéines contenues dans le rejet de la sardine, solubilisées par hydrolyse enzymatique par le biais d'une protéase commerciale à savoir «la pepsine» sous les conditions optimales citées ultérieurement.

Les résultats obtenus (Fig. III.6) indiquent une chute importante du débit de perméat par rapport à la courbe du solvant. Cependant, au-delà d'une pression de 2bars, le flux de perméat sera indépendant de la pression transmembranaire. Ce résultat, déjà obtenu pour le rejet liquide, s'explique par la formation d'une couche dynamique (couche de polarisation) compressible et au fur et à mesure qu'on augmente la pression, la résistance au transfert du solvant à travers la membrane augmente. Ainsi, le flux du perméat max. était de l'ordre de 300 L/h.m^2 .

Pour mettre en évidence davantage les performances du processus à membrane, d'autres paramètres ont été étudiés. En constatant que le taux de rejet variait fortement avec la pression transmembranaire, R passe de 20% pour $\Delta P = 1\text{bar}$ à 90% pour $\Delta P = 4\text{bars}$ (Fig. III.7), nous avons pu conclure que la couche dynamique joue le rôle de la membrane avec une porosité qui dépend de la pression transmembranaire. Pour confirmer une telle théorie, nous avons calculé le rayon des pores après ultrafiltration en utilisant l'équation de Poiseuille :

$$L_p = \frac{N_p \cdot \pi \cdot (r_p)^4}{8 \cdot \mu \cdot e} \quad (17)$$

Si $r_p(0)$ est le rayon des pores moyen avant ultrafiltration, et que $r_p(1)$ le rayon des pores moyen après ultrafiltration, on pourra décrire l'évolution du rayon des pores en fonction des

variations de la perméabilité comme suit : $r_p(1) = r_p(0) \left(\frac{L_p(1)}{L_p(0)} \right)^{0,25}$ avec $r_p(0) = 250 \text{ \AA}$.

- $L_p(0) = 806,25 \text{ L/h.m}^2 \cdot \text{bars}$ valeur de la perméabilité à l'eau avant ultrafiltration.
- $L_p(1) = 298,75 \text{ L/h.m}^2 \cdot \text{bars}$ valeur de la perméabilité à l'eau après ultrafiltration.

$r_p(1) \approx 200 \text{ \AA}$. Même avec cette dimension, les pores ne peuvent pas arrêter les petites macromolécules telles les peptides et les acides aminés. Donc nous pouvons affirmer que la rétention s'est effectuée grâce à la formation d'une couche de gel à l'interface membrane fluide créant le phénomène de la couche dynamique qui permet d'atteindre ces taux de rejets.

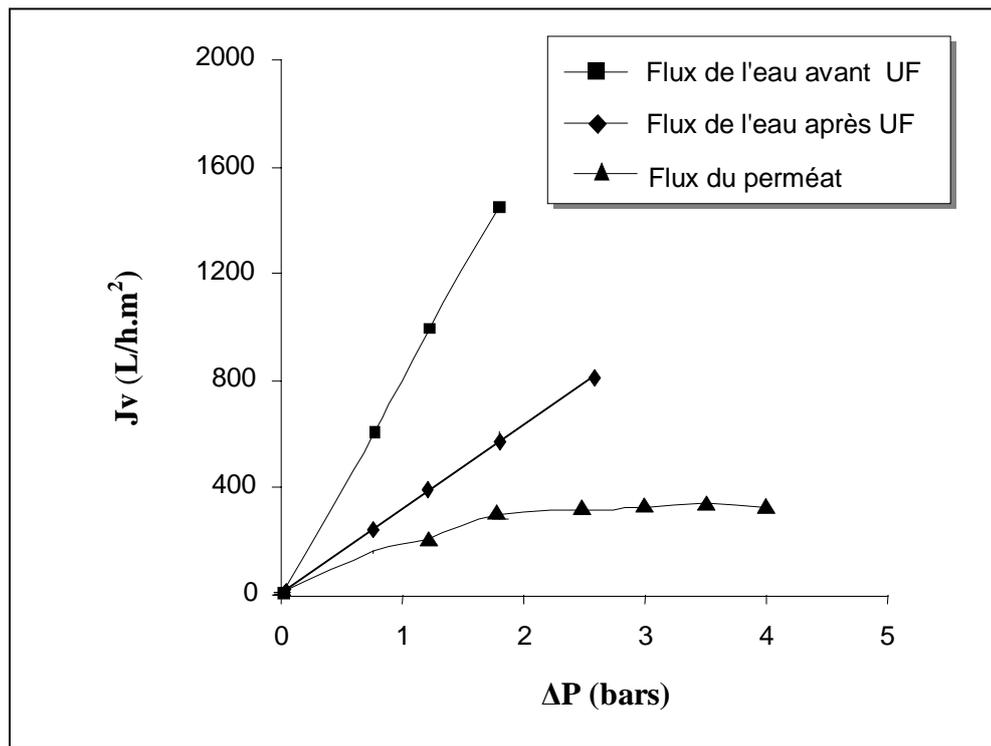


Figure III.6 Variation des flux du solvant pure et du perméat en fonction de la pression transmembranaire ($T = 37^\circ\text{C}$ et $U = 6 \text{ m/s}$).

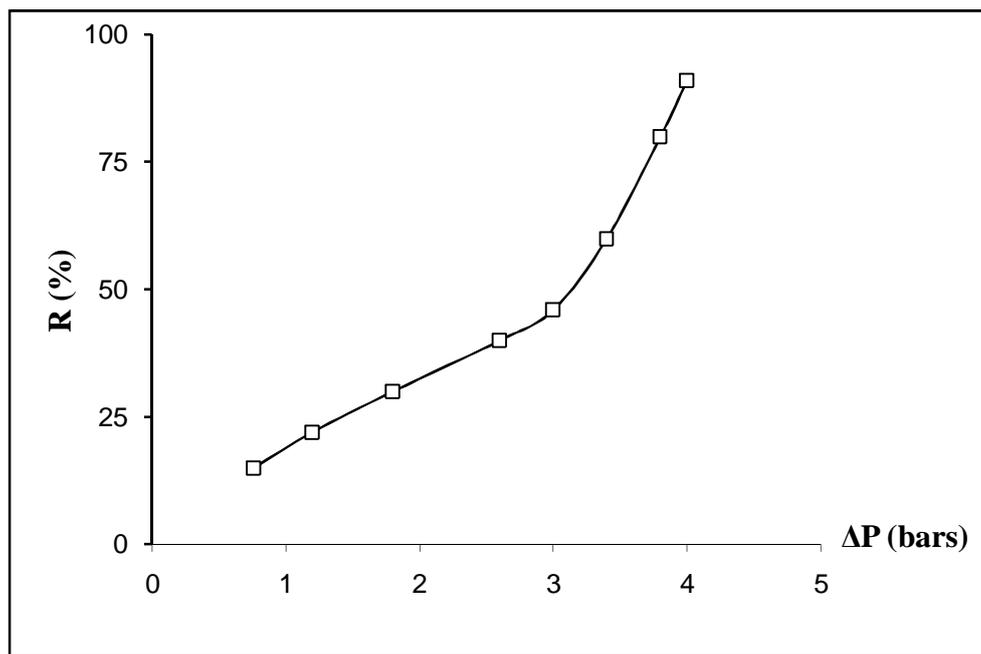


Figure III.7 Variation du taux de rejet en fonction de la pression transmembranaire lors de l'ultrafiltration de l'hydrolysate à $T = 37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 2$ et $U = 6 \text{ m/s}$.

De ces résultats, nous avons entrepris l'opération de concentration sous une pression transmembranaire $\Delta P = 4 \text{ bars}$, afin d'atteindre un taux de rejet maximal. En ce qui concerne la vitesse de circulation, elle a été fixée à 6 m/s , valeur optimale déterminée au cours de l'étude précédente (rejet liquide) et durant d'autres études menées par Mameri et al. (1996) lors d'une tentative de concentration des eaux de lavage de poissonnerie par le biais de cette unité pilote équipée du même type de membrane. Ainsi, la concentration du perméat, sous de telles conditions hydrodynamiques, montre que le flux de perméat subit un abaissement de 350 L/h.m^2 à 200 L/h.m^2 au bout de 10 minutes, suite à l'instauration du régime permanent (formation de la couche dynamique) (Fig. III.8).

D'autre part, le taux de rejet se stabilise aux environs de 83% et un facteur de concentration volumique (FCV) de 2,5 a été atteint en fin d'opération.

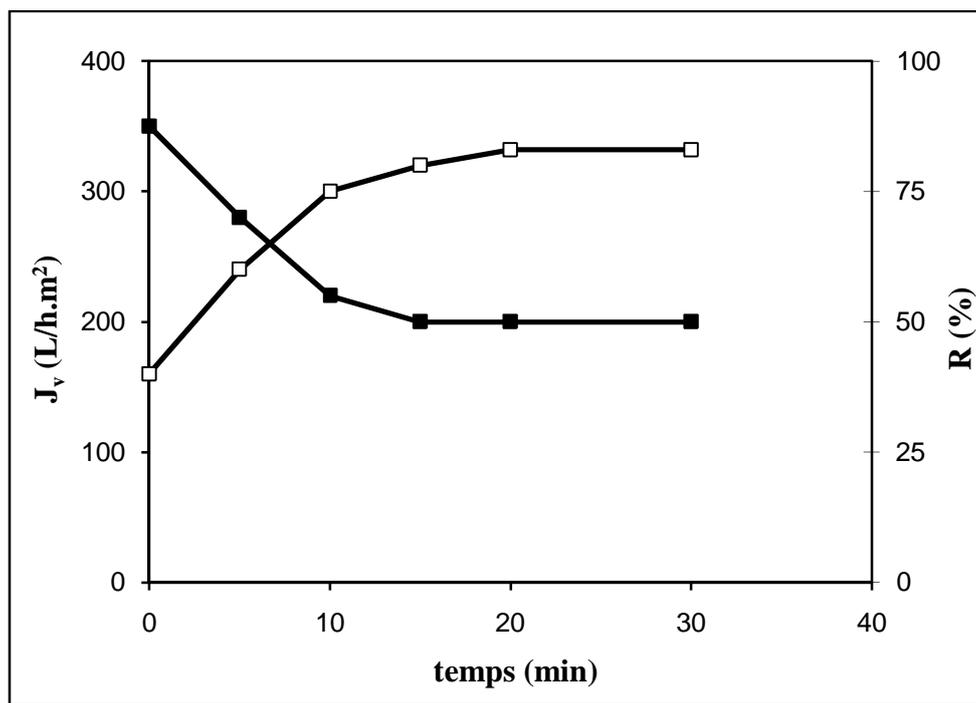


Figure III.8 Evolution du flux de perméat (■) et du taux de rejet (□) lors de l'ultrafiltration de l'hydrolysate à $T = 37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 2$, $\Delta P = 4\text{bars}$ et $U = 6\text{m/s}$.

I-2-3 Conclusion

Le verrou majeur, scientifique comme technologique, en filtration tangentielle est la maîtrise du colmatage qui contrôle les flux de perméats. Les pratiques industrielles habituelles consistent à filtrer au flux limite : flux maximum atteignable, nécessitant d'appliquer une pression élevée qui favorisent un colmatage irréversible.

Depuis quelques années, le concept de flux critique a émergé au plan théorique. Il introduit l'idée d'une frontière entre deux types de dépôts, gérables par les conditions opératoires de filtration (Field et al., 1995 ; Bacchin et al., 2006). L'un est en partie irréversible, obtenu pour un flux supérieur au flux critique et l'autre totalement réversible, obtenu pour un flux inférieur au flux critique. Cependant, une règle empirique recommande de choisir le flux de travail à 80% du flux limite (Bouzid, 2008).

II PRODUCTION DE LA CHITINE ET DE SES DERIVES

II-1 Extraction de la chitine

II -1-1 Déminéralisation

Les effets de la concentration du solvant (HCl), le rapport poids de carapace/volume d'acide et le temps de réaction sont illustrés respectivement sur les figures III.9.a, III.9.b et III.9.c. Tous ces paramètres semblent avoir une incidence sur la réaction de déminéralisation, ce n'est pas toujours le cas. En effet, l'incidence du rapport poids de carapace/volume d'acide est insignifiante. Cependant, un certain volume d'acide est nécessaire pour maintenir la fluidité durant la réaction : un rapport solide/solvant égale à 1/15 (g/mL) a été retenu. D'autre part, une concentration en HCl supérieure ou égale à 1,5N permet d'éliminer la quasi-totalité des minéraux contenus dans la carapace de l'espèce *Parapenaeus longirostris*, et par voie de conséquence, cette dernière valeur sera retenue comme condition opératoire optimale.

Enfin, l'étude cinétique permet de conclure que la déminéralisation est assez rapide comme réaction puisqu'un rendement proche de 100% est atteint au bout de 30 minutes. Sous ces conditions, la matière minérale est réduite de près de 98%, passant ainsi de 20,2% à 0,25%.

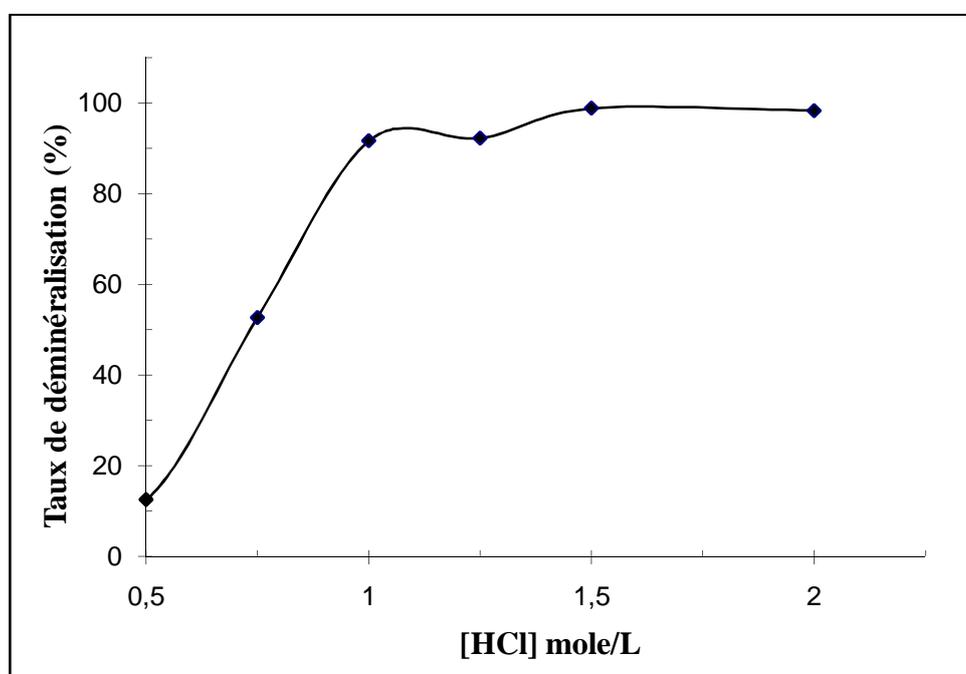


Figure III.9.a Effet de la concentration du HCl sur la déminéralisation des carapaces de crevettes à température ambiante, carapace/acide = 1/15 (g/mL) et t =24h.

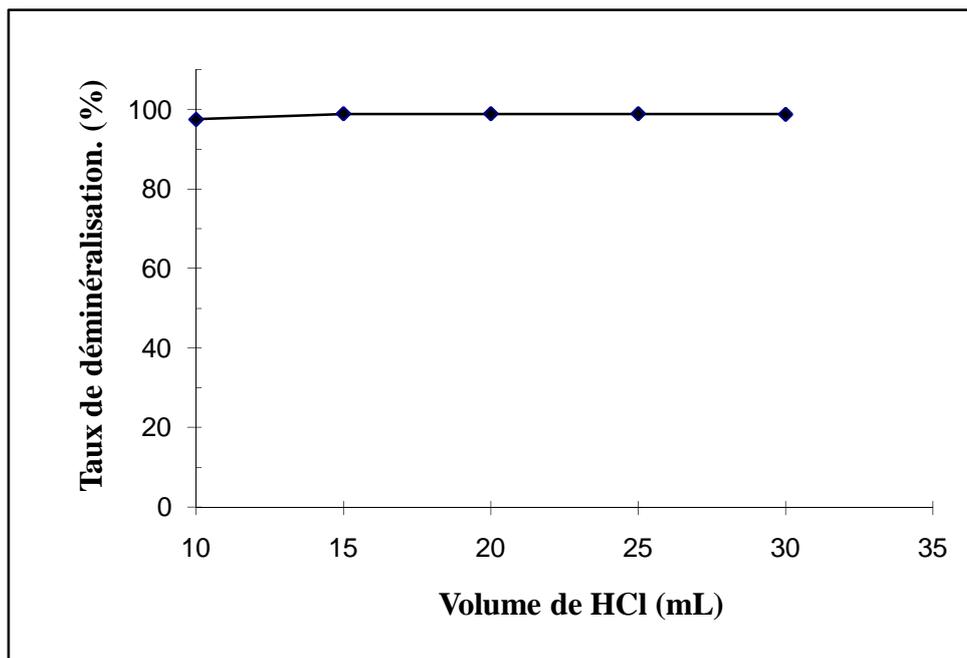


Figure III.9.b Effet du taux de dilution sur la déminéralisation d'un gramme de carapaces de crevettes à température ambiante, $[HCl] = 1,5N$ et $t = 1h$.

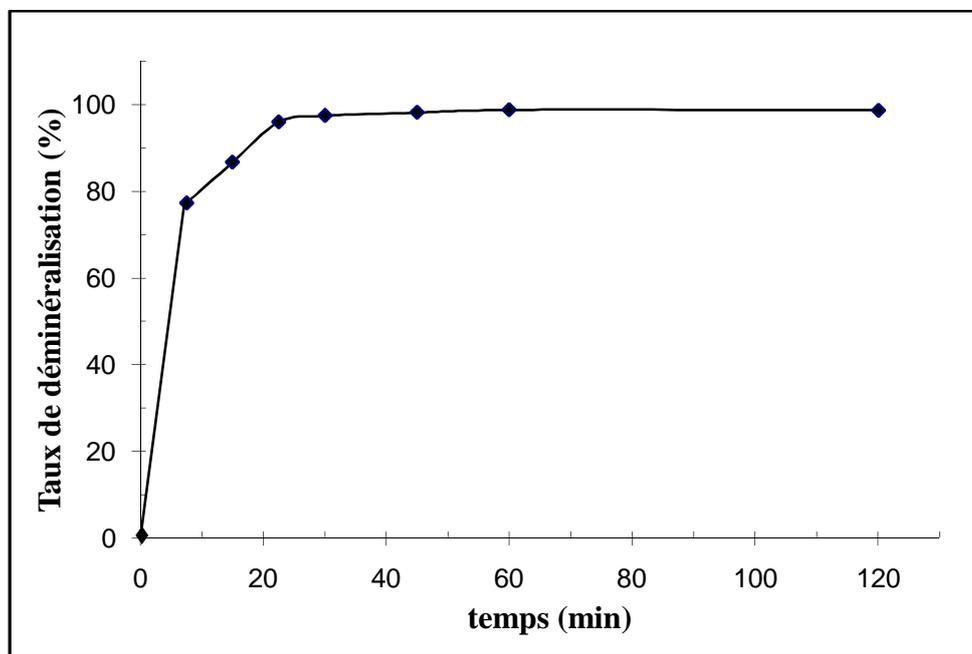


Figure III.9.c Evolution du taux de déminéralisation des carapaces de crevettes en fonction du temps à température ambiante, carapace/acide = 1/15 (g/L) et $[HCl] = 1,5N$.

II- 1-2 Déprotéinisation

L'étude de l'influence des différents paramètres sur la déprotéinisation est présentée sur les figures III.10.a, III.10.b, III.10.c et III.10.d. La température présente un effet réduit vis-à-vis de la déprotéinisation. En effet, un taux de déprotéinisation qui passe de 40% à 55% pour des températures allant de 25°C à 80°C. Il est aussi apparu qu'au-delà de 45°C, l'évolution du degré de déprotéinisation est pratiquement constante (Fig. III.10.c). Alors, cette dernière température sera retenue comme valeur optimale pour la suite. De même, nous constatons que la concentration du solvant (NaOH) et le temps de réaction présentent une faible influence durant cette étape d'extraction. En effet, les deux courbes respectives traçant les profils du taux d'élimination sont similaires, présentant chacune un palier au-delà d'une certaine valeur, considérée comme condition optimale, à savoir 2 moles/L pour la concentration du solvant et 2h pour le temps de réaction (Fig.III.10.a et Fig.III.10.b). Contrairement à la déminéralisation, le rapport poids de carapace/volume de soude apparaît comme un paramètre ayant une influence considérable sur la déprotéinisation. Nous constatons qu'un volume de 20 mL permet aux ions OH^- d'hydrolyser le maximum de protéines contenues dans 1g de carapace déminéralisée (Fig. III.10.d). Notons aussi que le taux de protéines résiduelles obtenu est de 6%. Bien que Toan (2011) a pu obtenir un résidu de protéines de 0,66% durant l'extraction de la chitine à partir de la crevette grise en réalisant un prétraitement des carapaces à l'acide salicylique, la déprotéinisation n'est jamais complète.

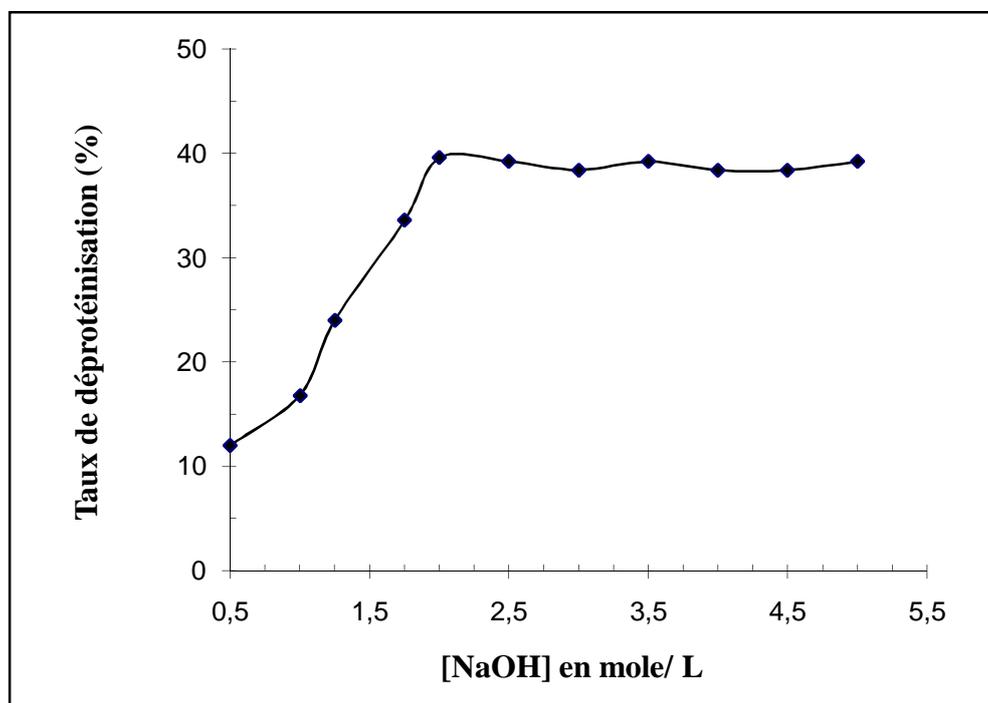


Figure III.10.a Effet de la concentration de NaOH sur la déprotéinisation des carapaces de crevettes à 25°C, carapace/soude = 1/15 (g/mL) et t = 24h.

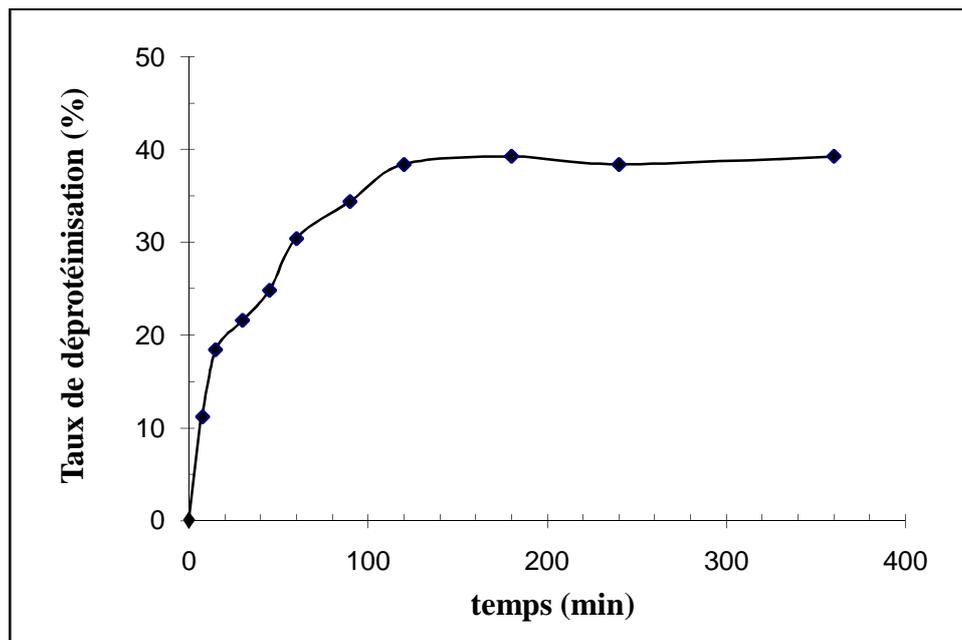


Figure III.10.b Evolution du taux de déprotéinisation des carapaces de crevettes en fonction du temps à 25°C, [NaOH] = 2N et carapace/soude = 1/15 (g/mL).

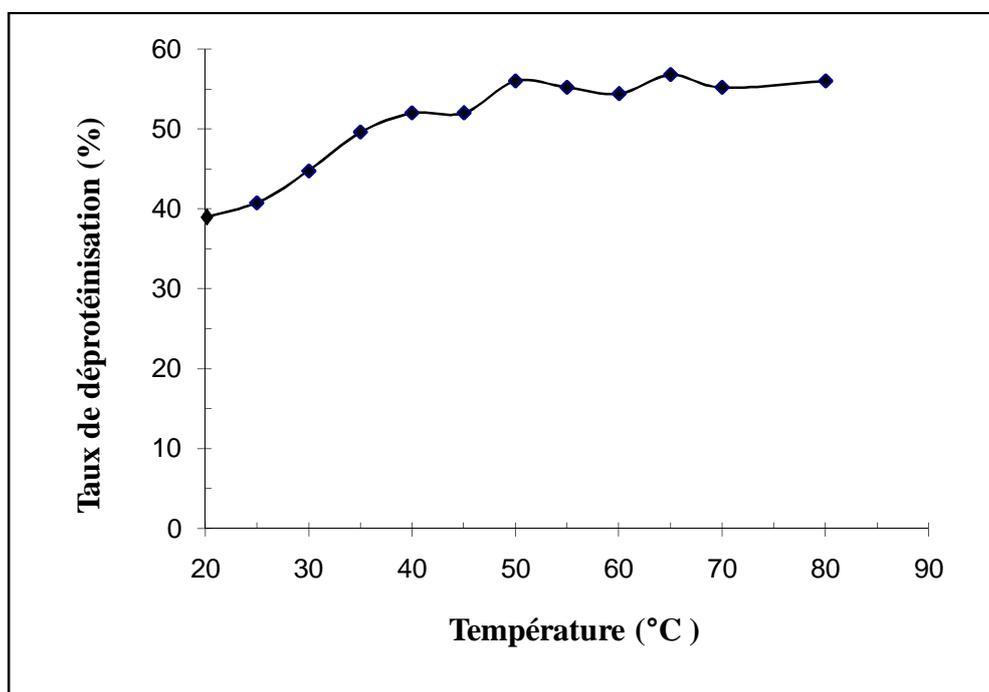


Figure III.10.c Effet de la température sur la déprotéinisation des carapaces de crevettes carapace/soude = 1/15 (g/mL), [NaOH] = 2N et t = 2h.

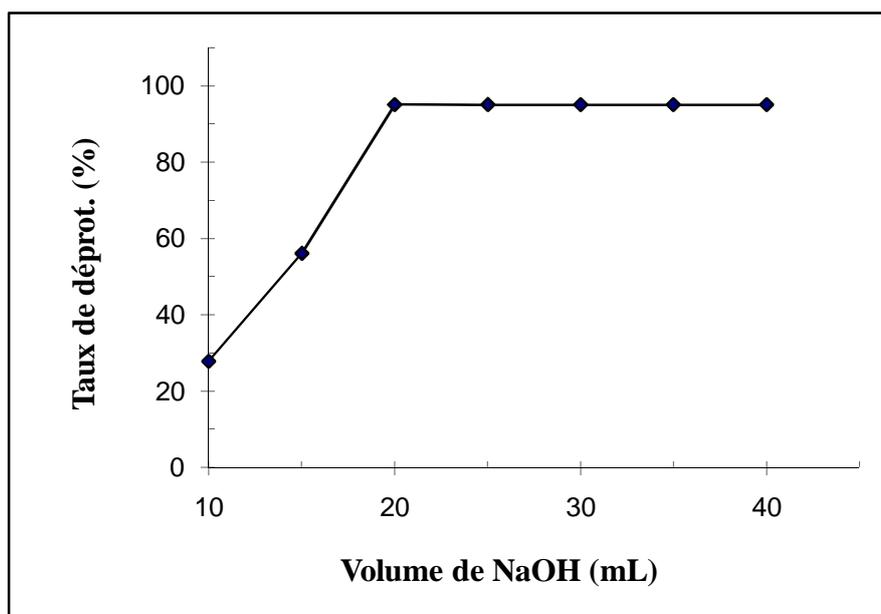


Figure III.10.d Effet du taux de dilution sur la déprotéinisation d'un gramme de carapaces de crevettes à 45°C, [NaOH] = 2N et t = 2h.

II-2 Optimisation de la désacétylation

A priori, nous constatons que le rapport poids de chitine/volume de la soude est sans effet sur la réaction de désacétylation. Cependant, nous avons entrepris le reste des manipulations en fixant la valeur de ce paramètre à 1/50 (g/mL) pour maintenir une certaine fluidité du milieu réactionnel. Tandis que les autres paramètres à savoir la concentration de soude, température et temps de réaction jouent un rôle dominant sur l'influence du taux de désacétylation. On constate que le degré de désacétylation (DD) augmente continuellement avec la quantité de NaOH (Fig.III.11.a) ; seulement, une telle augmentation reste au détriment d'une décroissance importante du poids moléculaire du chitosane obtenu.

Quant à la température, lorsque la quantité de NaOH est fixée, son élévation entraîne une augmentation continue du taux de désacétylation au détriment du coût de l'opération. Ceci s'explique par le fait qu'une élévation de température diminue la viscosité de la solution alcaline et augmente sa réactivité en intensifiant le mouvement des particules et par voie de conséquence l'augmentation de la vitesse de désacétylation. Tandis qu'à température constante, la réaction de désacétylation semble obéir à une cinétique classique. En effet, on observe une stagnation du degré de désacétylation associée sans doute à une dégradation de la chaîne polymérique. Ce phénomène a été décrit par Pawadee et al., (2003) pour un processus similaire. Notons aussi que des DD considérables sont atteints dès les premières heures, et ce pour les températures élevées (Fig.III.11.b).

En effet, nous obtenons un D.D = 61% au bout d'une heure à 60°C contre un D.D = 78% pour la même période à 120°C. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par un grand nombre de chercheurs (Zhang et al., 2005 ; Kurita, 2006 ; Viarsagh et al., 2009 ...).

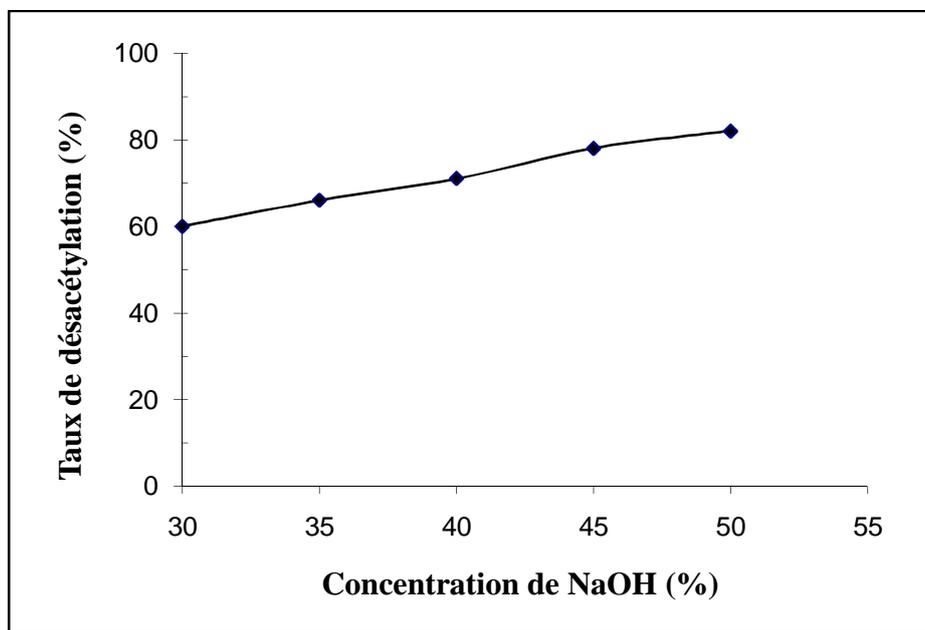


Figure III.11.a Effet de la concentration de NaOH sur la désacétylation
 $T = 90^{\circ}\text{C}$, $t = 5\text{h}$ et chitine/soude = 1/50 (g/mL).

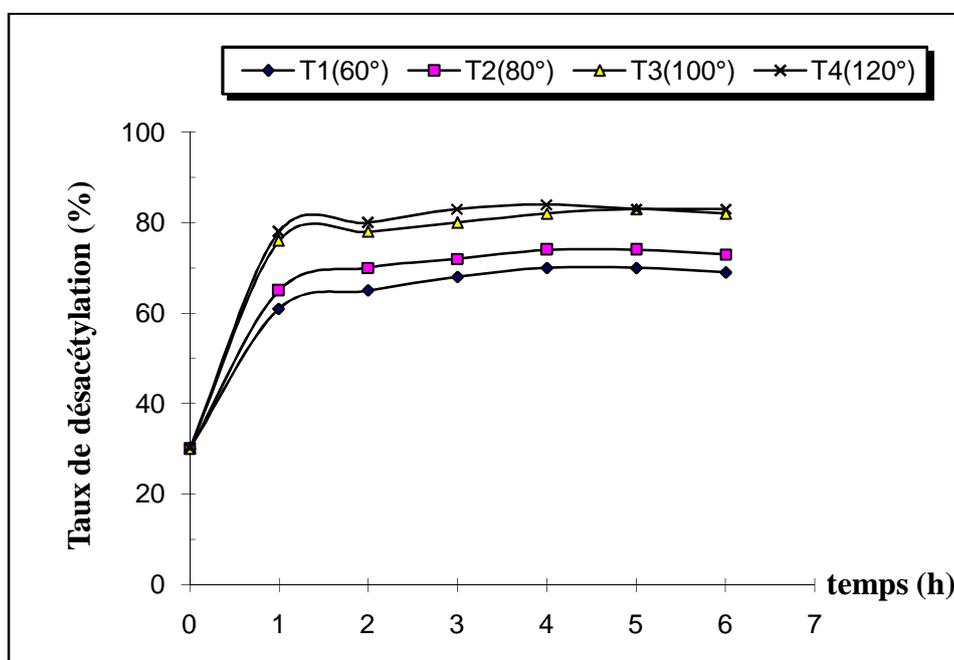


Figure III.11.b Evolution du D.D en fonction du temps à différentes températures
 $[\text{NaOH}] = 45\%$ et chitine/soude = 1/50 (g/mL).

Enfin, de l'ensemble de ces résultats, il a été déterminé des conditions optimales pour chaque étape que nous présenterons sur la figure III.12.

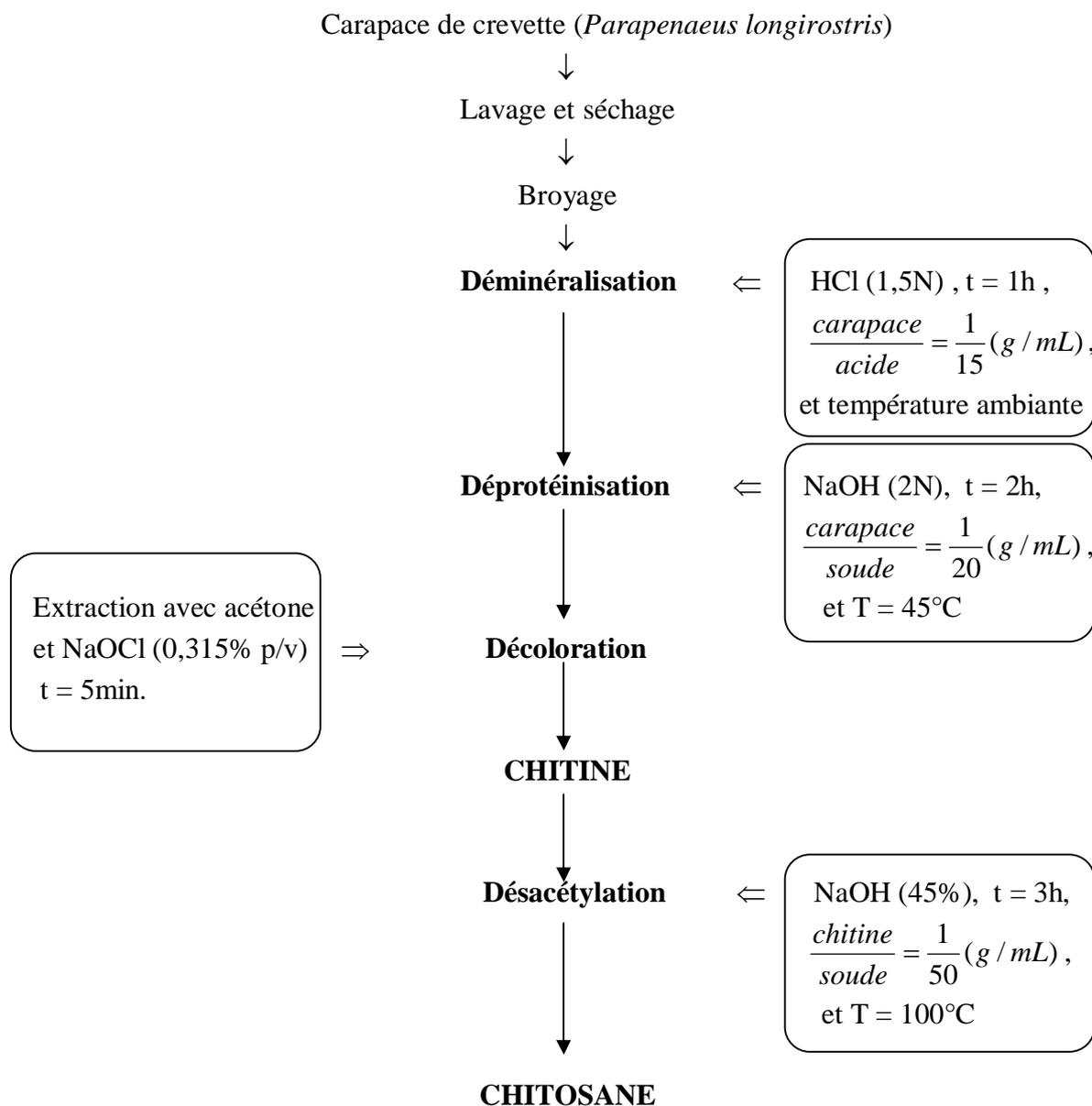


Figure III.12 Production de la chitine et du chitosane sous les conditions optimales.

II-3 Caractérisation des produits obtenus

II-3-1 Chitine et chitosanes

Les principales caractéristiques physico-chimiques de la chitine et des chitosanes préparés à partir des carapaces de crevettes blanches (*Parapenaeus Longirostris*) sont reportées sur le tableau ci-dessous :

Tableau 7 Caractéristiques physico-chimiques de la chitine et des chitosanes.

Paramètre	Chitine	Chitosane C1	Chitosane C2	Chitosane C3
Couleur	Blanche	Blanche	Jaune pâle	Jaune pâle
Cendres	0,20	0,18	0,22	0,26
Protéines	3,10	1,08	1,04	1,12
Poids moléculaire	350. kDa	12 kDa	371 kDa	383 kDa
D.D (%)	30	85	79	76,5

C1 : chitosane préparé selon la méthode classique c'est-à-dire par le biais des quatre étapes.

C2 : chitosane préparé sans l'étape de décoloration.

C3 : chitosane préparé sans l'étape de décoloration et sans l'étape de déprotéinisation.

En comparant les poids moléculaires des trois chitosanes, préparés à partir des carapaces de crevettes blanches (*Parapenaeus Longirostris*), il est évident que l'étape de décoloration dégrade la chaîne polymérique de façon plus marquée que la déprotéinisation. En effet, le chitosane C2, préparé sans l'étape de décoloration, possède un poids moléculaire (371 KDa) très supérieur à celui du chitosane C1 (12 KDa) ayant subi toutes les étapes durant sa préparation, mais inférieur à celui du chitosane C3 (383 KDa) n'ayant subi ni décoloration, ni déprotéinisation. Tandis que la valeur du DD la plus élevée est celle du chitosane C1. Enfin, ces deux étapes (décoloration et déprotéinisation) n'affectent pas les autres paramètres physico-chimiques à savoir le taux de cendres et la teneur en protéines.

II-3-2 N,O-Carboxyméthylchitosane (NOCC)

La carboxyméthylation du chitosane est une réaction chimique très complexe qui nécessite plusieurs étapes pour permettre la fixation du groupement carboxyméthyle (CH_2COOH) sur la chaîne polymérique du chitosane. Ceci est mis en évidence par l'apparition des deux pics à $1562,2 \text{ cm}^{-1}$ et $1417,6 \text{ cm}^{-1}$ (voir annexe), caractéristiques des deux bandes d'absorption respectives du groupement carboxyle $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ et $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$. Tandis que la quantification de ce groupement est rendue possible par le calcul du degré de carboxyméthylation (D.C). Cependant, la valeur de ce paramètre dépend de la quantité d'acide monochloroacétique (CH_3COOCl) utilisée. En effet, nous avons constaté qu'au fur et à mesure qu'on augmente la quantité de CH_3COOCl , le degré de carboxyméthylation (D.C) augmente jusqu'à atteindre une valeur limite au voisinage de 1,70 (Tableau 8). Ainsi, 4g de CH_3COOCl ont été retenus comme quantité optimale. Des résultats similaires ont été obtenus par Poliang et ses collaborateurs (Fernanda et al., 2005) qui ont pu atteindre un degré de carboxyméthylation égal à 1,57 en utilisant 4g de CH_3COOCl pour 10g de chitosane de crabe ($M_v = 10^6$ Daltons, D.D = 95%).

Tableau 8 Variation du degré de carboxyméthylation (D.C) en fonction de la quantité de l'acide monochloroacétique (CH_3COOCl).

Chitosane C1	CH_3COOCl	D.C
10 g	1g	0,94
10 g	2g	1,20
10 g	3g	1,60
10 g	4g	1,70
10 g	5g	1,71

III EFFET ANTIBACTERIEN DE LA CHITINE, DU CHITOSANE ET DE LEURS OLIGOMERES

Les concentrations minimales inhibitrices (C.M.I) de la chitine, du chitosane et de leurs oligomères vis-à-vis des différentes souches bactériennes étudiées sont reportées sur le tableau ci-dessous :

Tableau 9 Concentrations min. inhibitrices de la chitine, du chitosane et de leurs oligomères.

Souches testées	Chitine	Chitosane	NAc-COS	COS
<i>Escherichia coli</i>	0,01	0,01	0,003	0,003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pas d'inhibition	0,05	0,003	0,003
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	0,03	0,03	0,003	0,003
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	0,03	0,03	0,003	0,003
<i>Salmonella typhimurium</i>	Pas d'inhibition	Pas d'inhibition	0,003	0,003
<i>Bacillus subtilis</i>	0,03	0,01	0,003	0,003
<i>Bacillus cereus</i>	0,03	0,01	0,003	0,003
<i>Vibrio cholerae</i>	0,01	0,01	0,003	0,003
<i>Shigella dysenteriae</i>	0,01	0,01	0,003	0,003
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,01	0,01	0,003	0,003
<i>Provetella melanin ogenica</i>	Pas d'inhibition	0,01	0,003	0,003
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,006	0,006	0,003	0,003

Les résultats obtenus montrent que NAc-COS et COS ont des valeurs de CMI très faibles (0,003%) par rapport à la chitine et le chitosane, indiquant ainsi leur forte activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les souches étudiées. Tandis que les CMI de la chitine et de son dérivé le chitosane dépendent des microorganismes testés. Pour la chitine, les CMI varient entre 0,006% et 0,01% excepté pour *P.aeruginosa*, *S. typhimurium* et *P. melaninogenica* (>0,1%). Pour le chitosane, elles sont aussi comprises entre 0,006% et 0,01% excepté pour *P. aeruginosa* (0,05%) et *S.typhimurium* (>0,1%). En effet, des études theurapetiques ont montré que la bactérie *P.aeruginosa* possède une résistance intrinsèque vis-à-vis d'un grand nombre d'antibiotiques (Beck et al., 1988).

III-1 Bactéries Gram positif

L'effet antibactérien de la chitine, du chitosane et de leurs oligomères, à 0,1% (p/v), a été évalué en fonction du taux de croissance des colonies microbiennes présentes initialement dans le milieu de culture, et ceci est rendu possible par simple lecture de la densité optique (DO) à 640 nm.

En ce qui concerne les deux souches de *staphylococcus aureus* (Fig III.13 et Fig.III.14), nous remarquons que chitine et chitosane présentent un effet inhibiteur similaire tout le long de la période d'incubation (0 – 6h). Une phase exponentielle plus lente par rapport au milieu témoin et la phase stationnaire est atteinte au bout de 4h, alors que pour le témoin, cette dernière est atteinte au bout de 2h. Une DO max. de 0,4 ($1,2 \cdot 10^8$ cellules/mL) pour le témoin et 0,25 ($0,7 \cdot 10^8$ cellules/mL) pour chitine et chitosane. Ce résultat semble être en parfait accord avec les travaux menés par Gerasimenko et ses collaborateurs (2004) qui ont montré qu'un chitosane de même poids moléculaire que le notre (12KDa) était plus efficace vis-à-vis de *staphylococcus aureus* qu'un chitosane de poids moléculaire égal à 27KDa.

D'autre part, les oligomères (NAc-COS et COS) détruisent la quasi-totalité des microbes après 1h 30min d'incubation. Des résultats similaires ont été obtenus par Fernandes et al., (2008) pour la même souche bactérienne avec un COS à 0,5% (p/v).

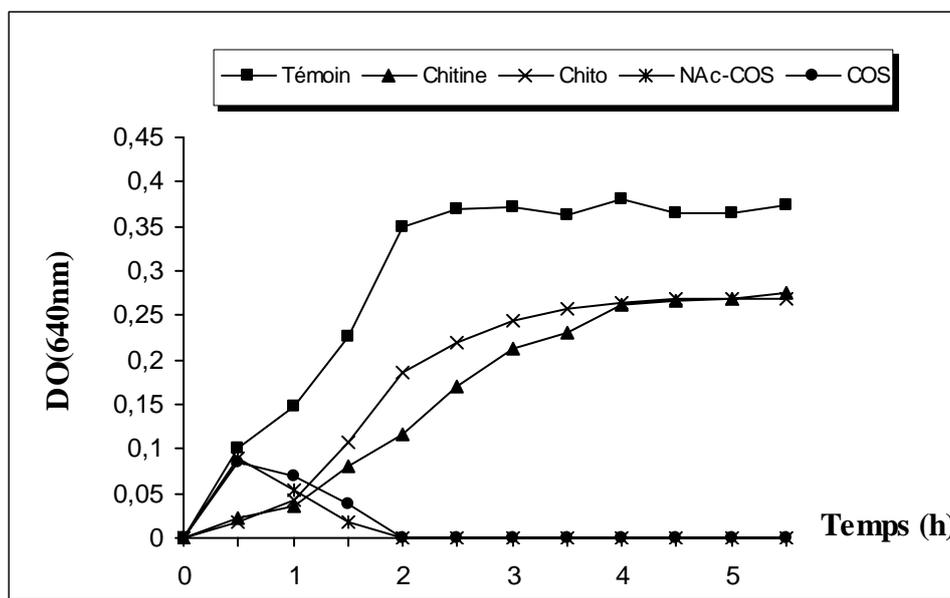


Figure III.13 Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Souche sensible à la pénicilline).

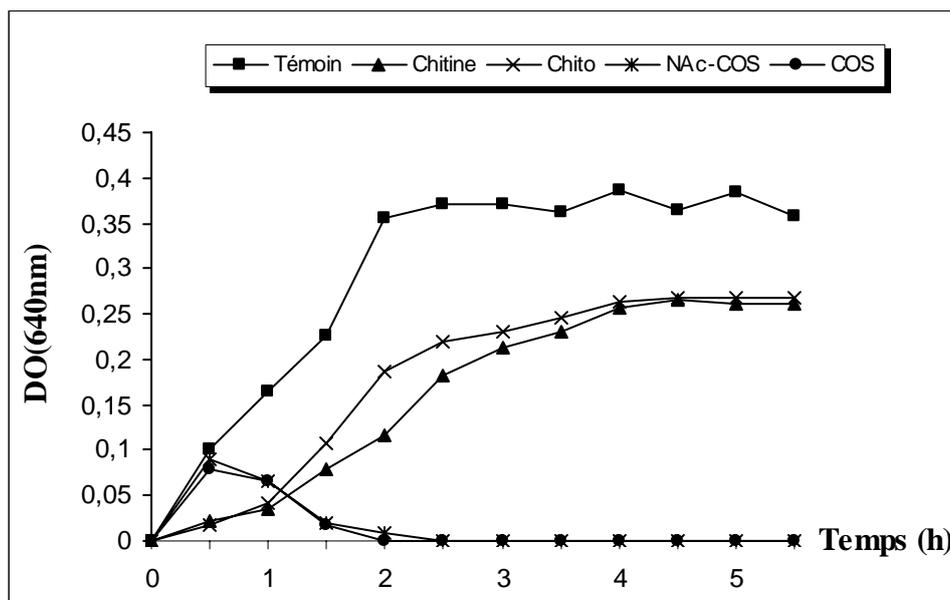


Figure III.14 Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de *Staphylococcus aureu* ATCC 43300 (Souche résistante à la pénicilline).

Les figures III.15 et III.16 montrent qu'un traitement avec NAc-COS et COS inhibe complètement la croissance des *B. subtilis* et *B. cereus* après un temps d'incubation de 2h 30min. Par contre, la chitine et le chitosane ralentissent la croissance microbienne. Pour le chitosane, la densité optique max. atteinte au bout de 4h 30min est de l'ordre de 0,113 ($0,37 \cdot 10^8$ cellules/mL) contre une densité optique max. de 0,341 ($1,023 \cdot 10^8$ cellules/mL) pour le contrôle. Pour la chitine, DOmax est 0,264 ($0,792 \cdot 10^8$ cellules/mL) et 0,22 ($0,66 \cdot 10^8$ cellules/mL) pour *B. subtilis* et *B. cereus* respectivement. En termes d'efficacité, dans le cas du chitosane, la concentration microbienne à diminuer de 64% pour les deux souches étudiées, alors que dans le cas de la chitine, la diminution est de 22,5% et 35% pour *B. subtilis* et *B. cereus* respectivement. No et al., (2002) ont montré que l'activité antibactérienne du chitosane vis-à-vis de *Bacillus sp* augmente avec la décroissance de la viscosité du polymère.

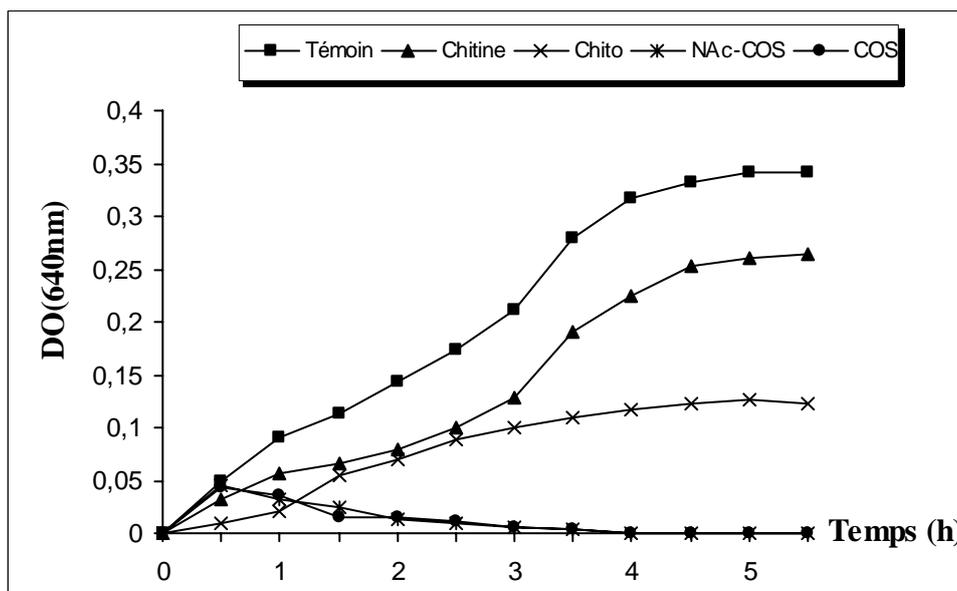


Figure III.15 Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de *Bacillus subtilis*.

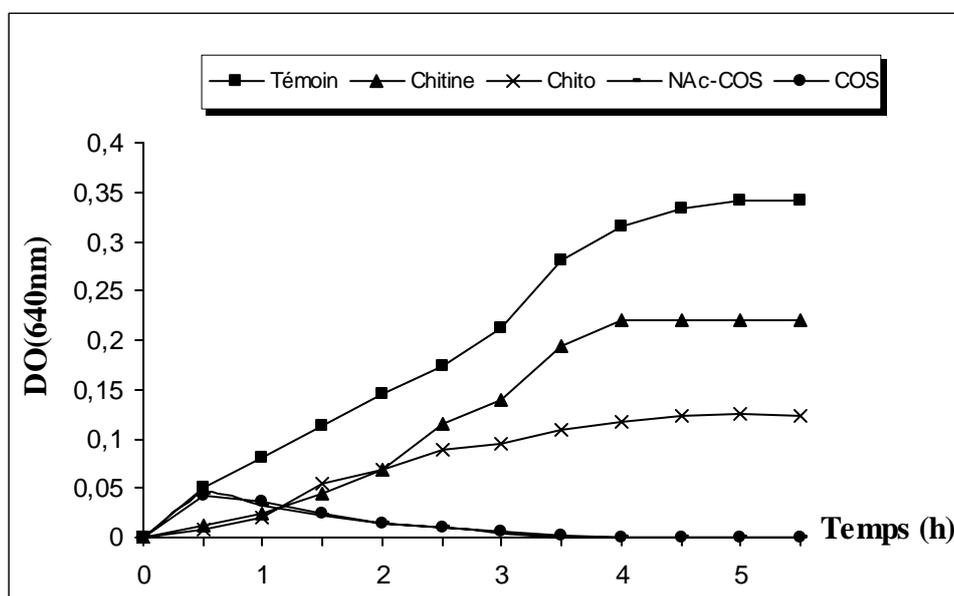


Figure III.16 Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de *Bacillus cereus*.

III-2 Bactéries Gram négatif

Les activités antibactériennes de la chitine, du chitosane et de leurs oligomères vis-à-vis d'*E.coli* sont illustrés sur la figure III.17. Le nombre de bactéries augmente rapidement dans le milieu de contrôle et la phase stationnaire est atteinte au bout de 2h. Alors que la croissance microbienne devient lente quand le milieu d'incubation contient de la chitine ou du chitosane. De plus, on remarque que les deux polymères ont des effets antibactériens identiques et le taux d'élimination est de 31,3% après 4h d'incubation. D'autres résultats ont montré que le chitosane n'est capable d'inhiber la croissance d'*E.coli* qu'à forte dose (Zhang et al., 2004 ; Liu et al., 2006 ; Tipparat et Orphan, 2008).

NAC-COS et COS semblent avoir un effet antibactérien remarquable vis-à-vis d'*E.coli*. En effet, ils éliminent toute la population initiale dans le milieu de culture au bout de 2h d'incubation. Des résultats similaires ont été obtenus par Li et al., (2010) qui ont montré qu'un COS de poids moléculaire 3KDa était plus efficace, vis-à-vis d'*E.coli*, qu'un chitosane de poids moléculaire 50KDa à une concentration de 0,5% (p/v).

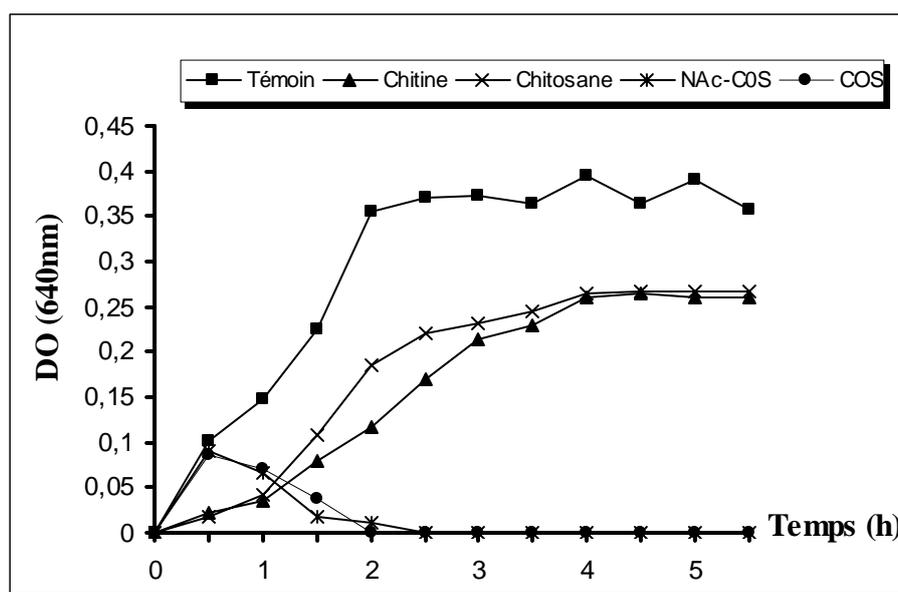


Figure III.17 Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance d' *Escherichia coli* ATCC 25922.

Les activités antibactériennes de la chitine, du chitosane et de leurs oligomères vis-à-vis de *V. cholerae*, *S. dysenteriae* et *Bactéroïde fragilis* sont illustrées sur les figures III.18 , III.19 et III.20. En se basant sur les valeurs des densités optiques, il apparaît nettement que la chitine et le chitosane ont des effets d'inhibition similaires vis-à-vis des trois souches citées plus haut. Par rapport au témoin, la concentration microbienne décroît de 56,7% et 63% pour la chitine et le chitosane respectivement vis-à-vis de *V. cholerae* ; 51% et 62% pour la chitine et le chitosane respectivement vis-à-vis de *S. dysenteriae* ; et de 80% pour les deux polymères vis-à-vis de *Bactéroïde fragilis*.

Cependant, NAc-COS et COS sont très efficaces vis-à-vis des trois souches testées. Un temps d'incubation de 1h 30min à 2h est largement suffisant à ces deux oligomères pour éliminer la quasitotalité des populations de *V. cholerae* et *Bactéroïde fragilis*. Tandis que pour *Shigella dysenteriae*, le temps nécessaire pour les éliminer est de 1h.30min dans le cas de COS et 2h.30min dans le cas de NAc-COS.

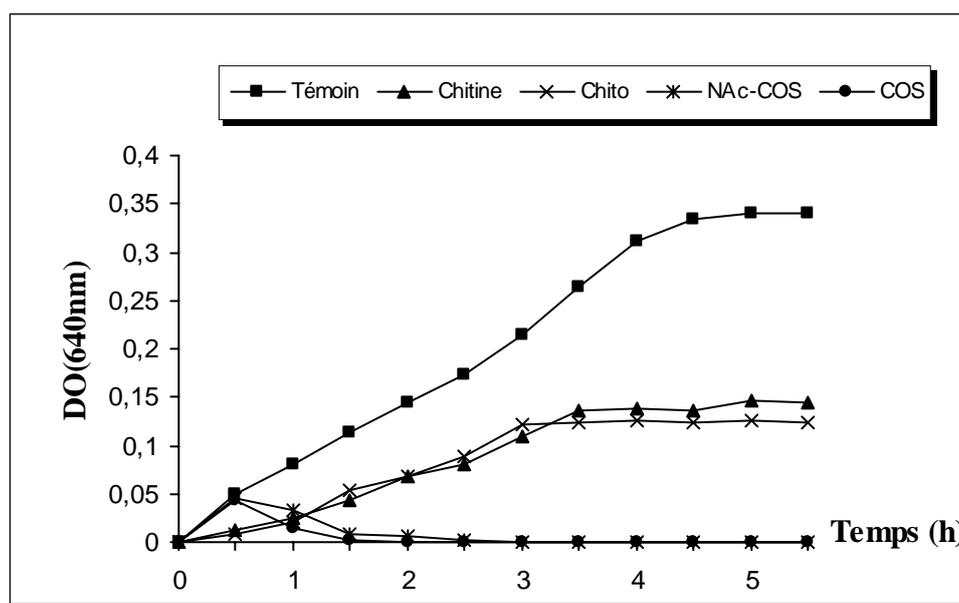


Figure III.18 Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de *Vibrio cholerae*.

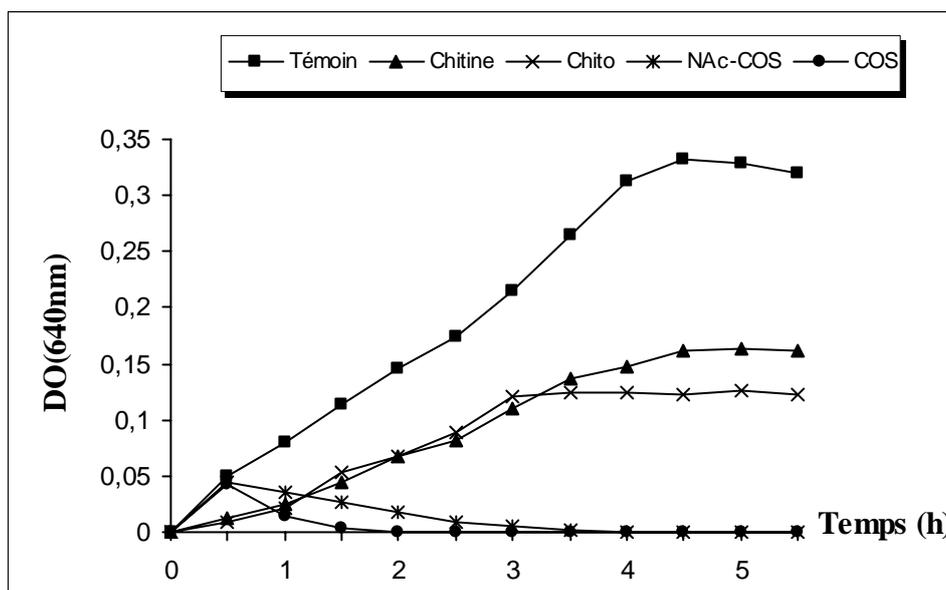


Figure III.19 Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de *Shigella dysenteriae*.

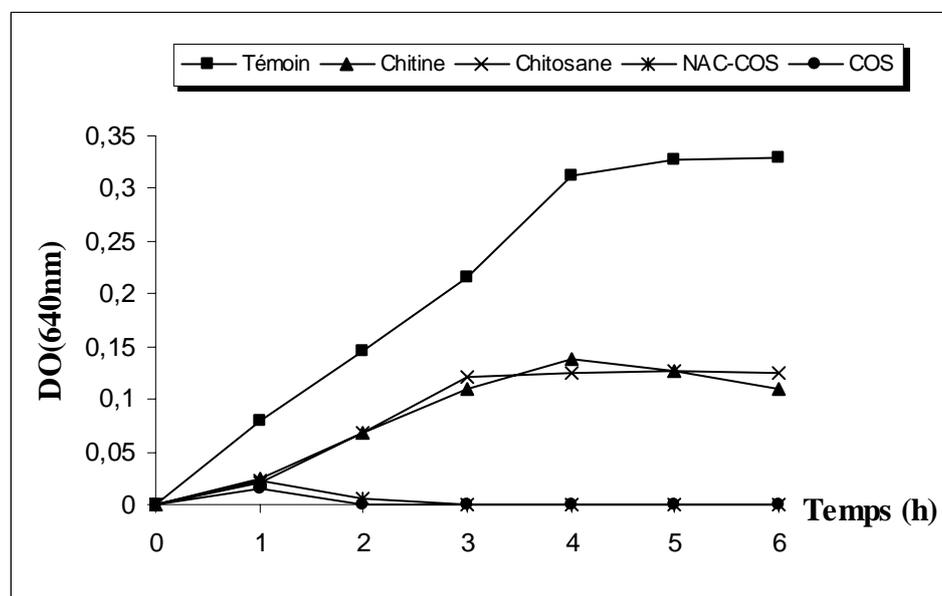


Figure III.20 Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de *Bactéroïde fragilis*.

Les effets antibactériens de la chitine, du chitosane et de leurs oligomères vis-à-vis de *P. aeruginosa* sont illustrés sur la figure III.21. On remarque que la croissance microbienne, en présence du chitosane, est très faible par rapport au témoin indiquant ainsi l'efficacité de ce polysaccharide. Par contre, la chitine est sans effet vis-à-vis des deux souches testées. Jeon et al., (2001) ont reporté que le chitosane était plus efficace vis-à-vis d'*E. coli* que *P. aeruginosa* à une concentration de 0,06%. Ce résultat est légèrement différent du nôtre. De plus, le COS exhibe un effet bactéricide supérieur à celui de NAc-COS. Ceci est en parfait accord avec les études menées par Bhatt et ses collaborateurs (2009) pour un COS de poids moléculaire compris entre 1 et 10 KDa et un degré de désacétylation compris entre 77% et 82%.

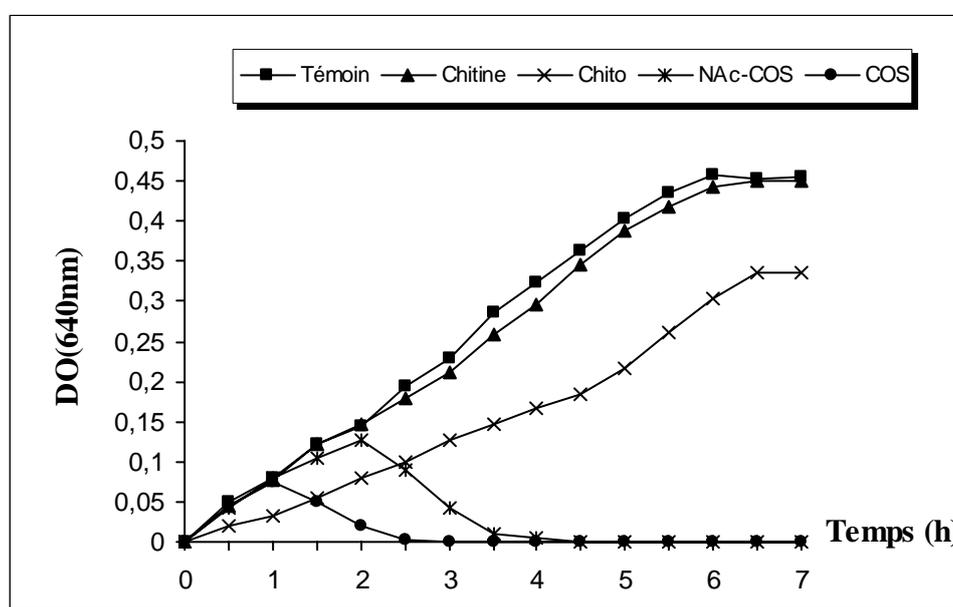


Figure III.21 Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Enfin, l'inefficacité de la chitine et de son dérivé chitosane vis-à-vis de *salmonella typhimurium* est montrée sur la figure III.22. Contrairement à leurs oligomères qui exhibent un effet antibactérien important, en particulier le COS. En effet, l'inhibition totale de la souche testée est atteinte au bout de 6h et 3h d'incubation pour NAc-COS et COS respectivement.

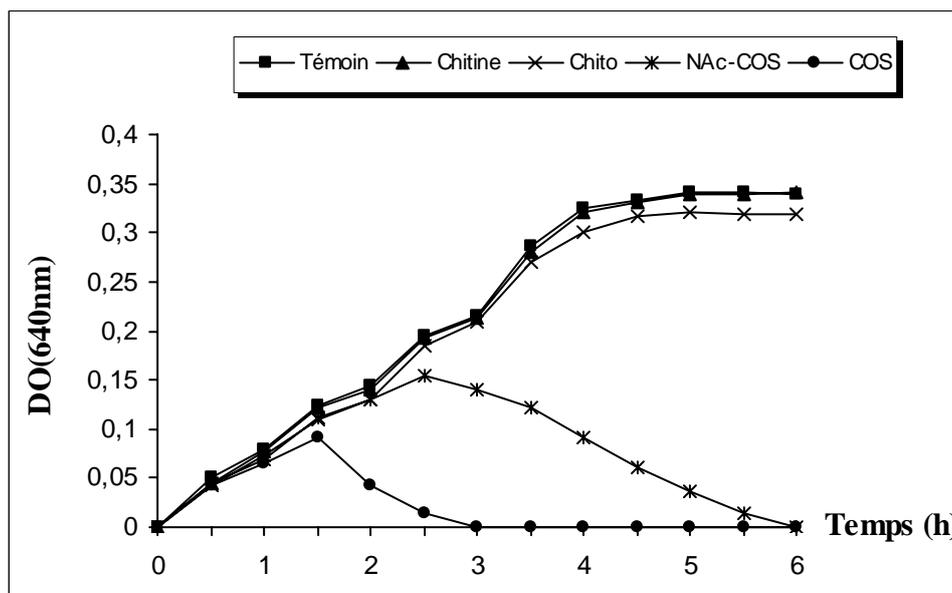


Figure III.22 Effet de la chitine, chitosane et de leurs oligomères sur la croissance de *Salmonella typhimurium*.

Interprétation des résultats

En se basant sur les différentes courbes, nous pouvons qualifier la chitine et le chitosane d'agents bactériostatiques plutôt que bactéricides. D'où, le mécanisme suggéré est que la chitine et le chitosane inhibent la croissance des bactéries en agissant comme un agent chélateur sur les métaux, les oligomères ou les nutriments essentiels à la croissance microbienne. Seulement, dans notre cas, la concentration des deux polymères (0,1% p/v) dans le milieu de culture était insuffisante pour supprimer la quasitotalité des microorganismes. Par conséquent, les survivants ont pu se reproduire dans de telles conditions.

Bien que la chitine exhibe une activité antibactérienne vis-à-vis de la majorité des souches testées, elle reste moins prononcée que celle du chitosane ; en particulier, dans le cas des Gram négatif. Ceci s'explique par la présence d'un nombre important de NH_3^+ sur la chaîne polymérique du chitosane pouvant ainsi interagir avec les résidus négatifs présents sur les surfaces cellulaires. De même, un chitosane à faible poids moléculaire est caractérisé par une bonne flexibilité de sa chaîne polymérique favorisant la formation de liaisons avec les surfaces cellulaires (Wu et al., 2006). Sachant que le nombre de NH_3^+ augmente avec le DD, ce qui justifie l'effet antibactérien de la chitine. En effet, la chitine, préparée dans notre étude, est caractérisée par un DD de 30% rendant ainsi le tiers de la molécule chargée positivement en milieu acide. De plus, le « Quenching », qui est une étape simple durant l'extraction de la chitine, a permis de diminuer la cristallinité de la chitine et d'augmenter la flexibilité de ses chaînes polymériques.

Au contraire, les oligomères à savoir le NAc-COS et le COS peuvent être qualifiés d'agent bactéricide. Dans ce cas, les courtes chaînes moléculaires sont capables de pénétrer à l'intérieur des parois cellulaires. En effet, Liu et al., (2007) ; Rafaat et al., (2008) ont pu confirmer la présence des oligomères de chitosane (COS) à l'intérieur d'E. coli à l'aide d'un microscope équipé de rayons laser.

Enfin, Les quatre souches bactériennes Gram positif testées ont été sensibles à la chitine et au chitosane. Ce qui n'était pas le cas des souches Gram négatif. En effet, les bactéries Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet biocide du chitosane (Sagoo et al., 2002). Ceci est peut être dû au fait que les bactéries Gram négatif ont une structure de paroi plus compliquée : une paroi formée d'une couche épaisse de peptidoglycanes et d'une enveloppe externe constituée de lipopolysaccharides, de lipoprotéines et de phospholipides, ce qui constitue une barrière potentielle vis-à-vis des molécules à haut poids moléculaires. Quant aux bactéries Gram positif, elles possèdent une paroi formée d'une couche de peptidoglycanes en réseau avec une abondance de pores, ce qui permet la pénétration des molécules sans difficulté (Xie et al., 2002).

IV EFFET DE L'ENROBAGE DURANT LA CONSERVATION DES FRUITS

IV-1 Cas de la tomate

IV-1-1 Perte de poids

La perte de poids chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*) durant la période de conservation à température ambiante (25 – 30°C) est illustrée sur le tableau ci-dessous :

Tableau 10 Diminution du poids de la tomate stockée à température ambiante (25 – 30°C).

Jour	C1 (2%)	C1 (0,5%)	NOCC (2%)	NOCC (0,5%)	Contrôle
7	6%	7%	5%	6%	9%
15	9%	8%	7%	7%	13%
22	11%	10%	9%	10%	17%
29	12%	11%	10%	11%	19%

L'utilisation du film protecteur à base de chitosane et de son dérivé NOCC à différentes concentrations semble avoir un effet positif sur la perte d'eau chez la tomate stockée à température ambiante, et ce par rapport au contrôle. En effet, on enregistre une chute de poids de 19% en 29 jours pour le lot de contrôle alors que celle-ci n'est que de 12%, 11%, 10% et 11% chez la tomate traitée avec du chitosane (2%), chitosane (0,5%), NOCC (2%) et NOCC (0,5%) respectivement, durant la même période de stockage et à la même température. Il apparaît ainsi un gain en poids de l'ordre de 10% avec un écart type de 1%.

De plus, les modifications texturales après récolte est une conséquence directe de la perte de poids chez les fruits et légumes et en particulier la tomate (Moretti et al., 2002).

La fermeté

La texture d'un fruit est un critère complexe qui fait intervenir les caractéristiques physico-chimiques des tissus. Elles est modulée par l'état de la paroi cellulaire, l'adhésion entre les cellules et la turgescence des cellules. La désorganisation des parois cellulaires durant la maturation se traduit essentiellement par le ramollissement des fruits. Dans le cas de la tomate, les principales modifications sont dues aux fortes pertes en galactose, à une solubilisation et une dépolymérisation des pectines modérées (Brummell, 2006). En effet, au moment de la maturation, on constate un ramollissement des tissus. Les tomates traitées restent fermes pratiquement durant toute la période de conservation, alors que les témoins commencent à s'amollir à partir de 10 jours.

La coloration

Parmi les changements biochimiques se répercutant sur l'apparence du fruit, le changement de couleur, suite à la dégradation de la chlorophylle et à l'accumulation de caroténoïdes après transformation des chloroplastes en chromoplastes, constitue un bon indicateur de l'état de maturation chez la tomate (Shuch et al., 1989).

En effet, la chlorophylle disparaît plus rapidement (4 jours) chez les témoins que chez les tomates traitées (10 jours). En système témoin, les tomates virent rapidement de la couleur jaune à la couleur orangée et au bout de 10 jours la quasi-totalité des tomates sont soit de couleur orangée soit de couleur rouge. Avec l'enrobage, pour les quatre solutions testées, les tomates ne changent pratiquement pas de couleur. Elles restent jaunes en majorité durant 20 jours de conservation.

IV-1-2 Acide ascorbique réduit (AAR)

La teneur en AAR chez la tomate dépend de sa nature, de son origine et varie de 10,2 à 25,3mg/100g de fruit (Barth et al., 1993). Dans notre cas, la teneur en AAR était très faible (5,7mg/100g), ceci est sans doute une conséquence des conditions de croissance, des faibles pluies et des expositions excessives au soleil. La vitamine C est facilement oxydable par l'oxygène, la lumière, la chaleur, le pH alcalin ... (Gautier et al., 2009). Cependant, l'utilisation du film protecteur sur la surface du fruit permet d'éviter son oxydation en empêchant le transfert du gaz entre l'atmosphère et la surface du fruit. De plus, la forte teneur en CO₂ à l'intérieur du fruit peut inhiber l'accumulation de l'acide ascorbique réduit (Palop et al., 2010). En effet, la teneur en AAR croît rapidement pour le lot de contrôle, et une nette différence apparaît pour le NOCC (2%) et le chitosane (2%) à partir du 10^{ème} jour de stockage (Fig.III.23). Pour les autres solutions traitantes, au vu de l'erreur expérimentale de détermination de l'AAR, elles apparaissent peu efficaces.

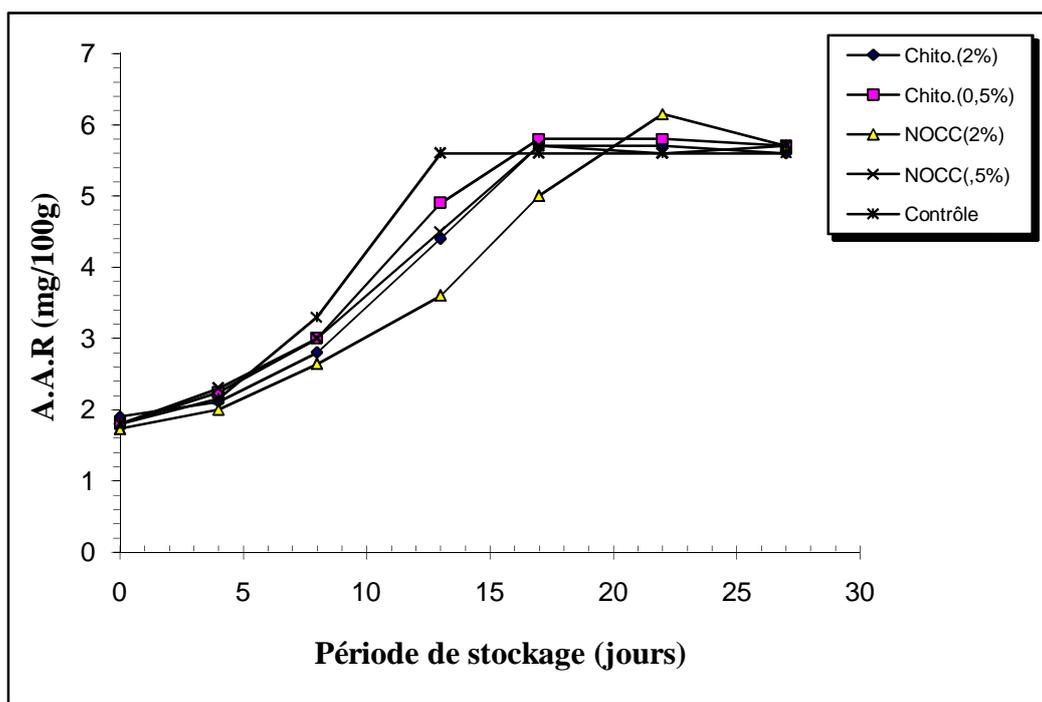


Figure III.23 Evolution de la vitamine C chez la tomate stockée à T = 25 - 30°C.

IV-1-3 Acidité et sucres totaux

On constate que l'acidité se stabilise autour de 262 mg d'acide citrique / 100 mL d'homogénat au bout de 13 jours pour le système témoin. Cette valeur est aussi atteinte pour les tomates enrobées, et ce, au bout de 17 jours pour le lot traité avec le chitosane (0,5%), au bout de 15 jours pour celui traité avec le NOCC (0,5%) et enfin, au 20^{ème} jour de conservation pour le lot traité avec le NOCC (2%) et le chitosane à la même concentration (Fig.III.24).

La teneur en sucres, chez la tomate, augmente au cours de la maturation suite à la dégradation de l'amidon sous l'action de l'amylase. Un deuxième constituant des parois cellulaires est hydrolysé : l'hémicellulose. Elle intervient aussi dans la fermeté du fruit mais son hydrolyse en sucres simples donne au fruit sa saveur sucrée (Chaib, 2007).

Dans notre cas, la teneur en sucres totaux a augmentée de 1,3g/100g de matière fraîche, au stade mature vert, à 12g/100g de matière fraîche, au stade mûr (Fig. III.25). Il apparaît que la transformation de l'amidon en sucres solubles (glucose, fructose, ...) est retardée de 5 jours environ pour le lot traité avec le NOCC (2%) par rapport aux autres solutions traitantes et de 10 jours par rapport au système témoin.

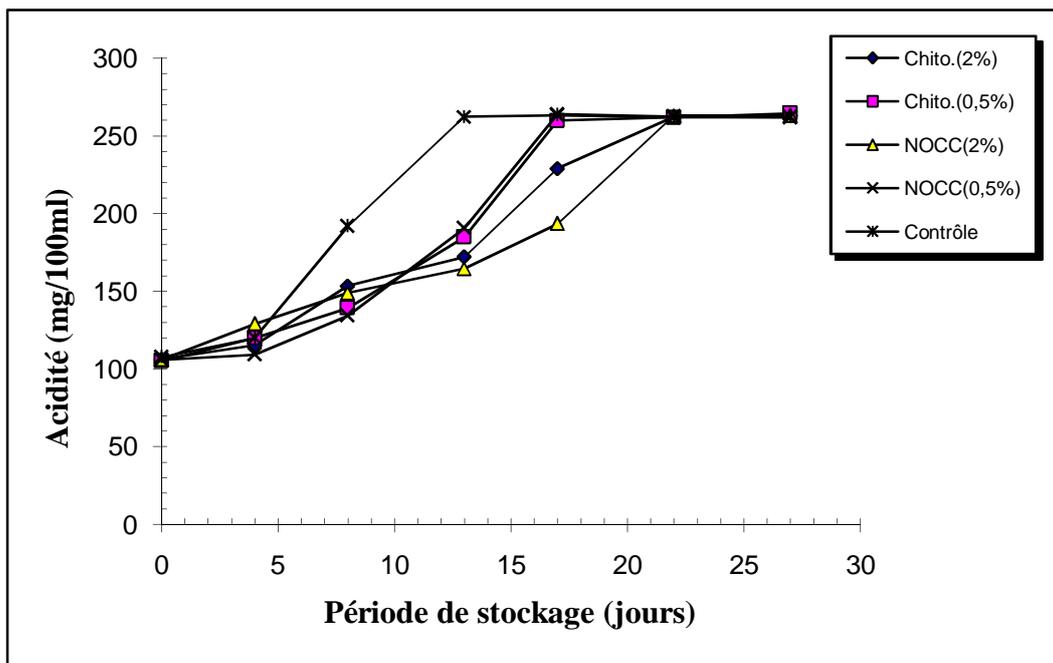


Figure III.24 Evolution de l'acidité chez la tomate stockée à T = 25 - 30°C.

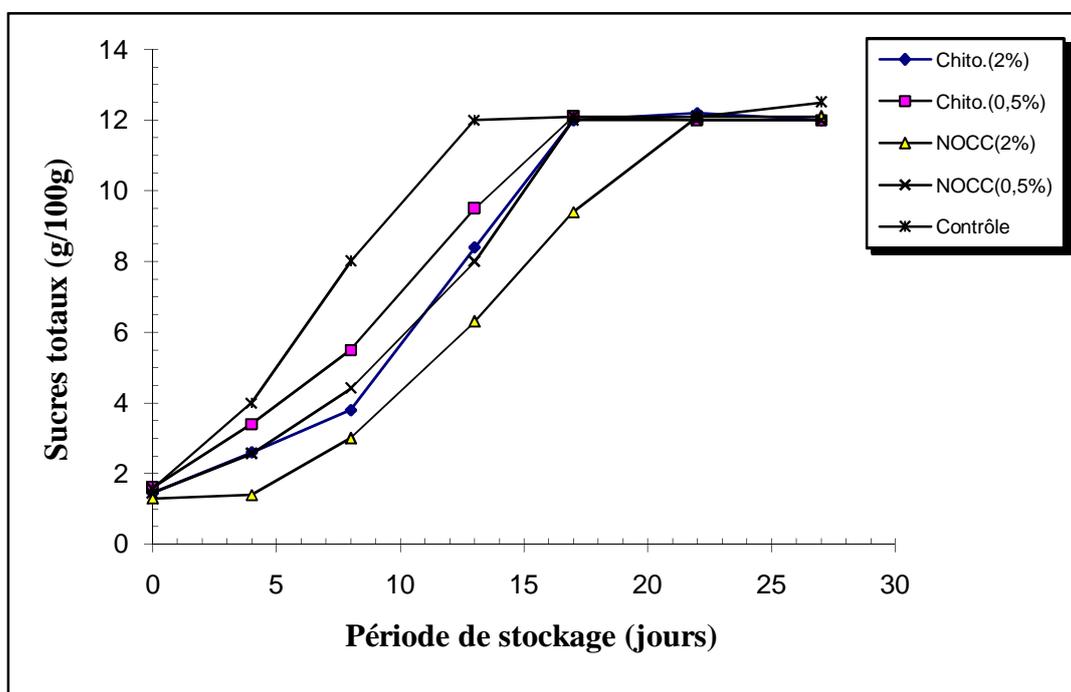


Figure III.25 Evolution de la teneur en sucres chez la tomate stockée à T = 25 - 30°C.

IV-1-4 Conclusion

Ainsi, il est clair que l'enrobage de la tomate par du NOCC (2%) et/ou le chitosane (2%) a permis une extension de sa durée de vie. Les performances obtenues avec le chitosane (2%) à prolonger de 10 jours la durée de stockage permet de le considérer comme le meilleur conservateur d'un point de vue économique au vu que pour le NOCC (2%) la durée d'extension est au maximum de 12 jours. Mais l'obtention de ce dernier nécessite une étape supplémentaire de désacétylation qui augmentera le prix de revient de l'agent conservateur.

IV- 2 Cas de la fraise

IV-2-1 Pourrissement des fraises

L'évolution du taux de pourrissement des fraises stockées à température ambiante (18 – 22°C) est illustrée sur la figure III.26. L'apparition de la moisissure sur les fruits non traités commence dès le troisième jour de stockage et atteint 40% au bout de 6 jours. Alors qu'on note aucun signe d'infection pour les fruits traités par C2(1%) et C3(1%) durant la même période ; à l'exception du lot traité par le chitosane C1 (1%) où le taux d'infection est de 20%. Cependant, la meilleure protection a été obtenue dans le cas des fruits enrobés par le C3(1%) dont le taux de pourrissement est seulement de 30% à la fin de la période de stockage contre 40%, 50% et 100% pour les lots traités avec le C1(1%), C2(1%) et le lot de contrôle respectivement. Ainsi, Il apparaît que l'enrobage à base de chitosane permet de retarder le pourrissement de la fraise. Toutefois, l'effet du poids moléculaire du chitosane sur son activité antimicrobienne est étudié par de nombreux chercheurs (Zheng et Zhu, 2003 ; Liu et al., 2006 ; Colla et al., 2006...).

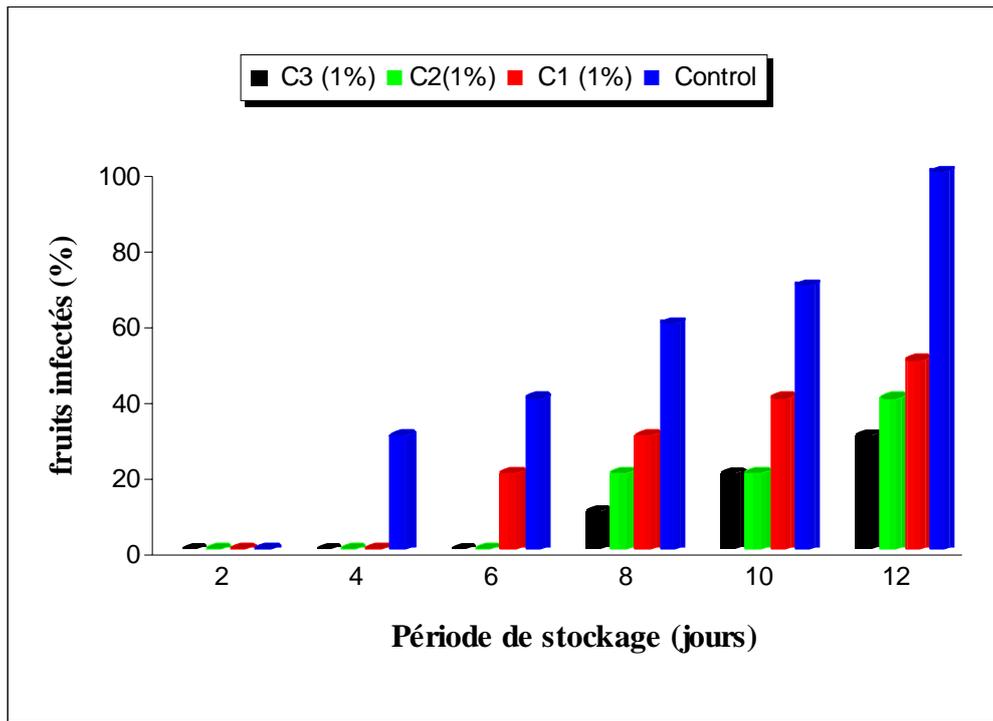


Figure III.26 Evolution du taux de pourrissement des fraises stockées à T = 18 – 22°C.

IV-2-2 Caractéristiques physico-chimiques

IV-2-2-1 Perte de poids

La diminution du poids de la fraise (*Fragaria ananassa*) tout au long de la période de conservation à température ambiante (18 – 22°C) est illustrée sur le tableau ci-dessous :

Tableau 11 Diminution du poids de la fraise stockée à température ambiante (18 – 22°C).

Jour	C1 (1%)	C2(1%)	C3 (1%)	Contrôle
2	13%	10%	09%	20%
4	15%	13%	12%	26%
6	17%	15%	15%	31%
8	20%	18%	17%	34%
10	22%	20%	19%	38%
12	24%	20%	20%	40%

Tout d'abord, faisons remarquer que l'importante perte d'eau enregistrée durant les deux premiers jours de stockage s'est effectuée plus exactement au début du processus : pendant le séchage de la fraise à l'air libre, entre la désinfection à l'eau de Javel et l'enrobage. La chute était environ de 10%, et ce pour l'ensemble des lots. Ceci est sans doute une conséquence de la structure externe du fruit. En effet, la perte d'eau est fonction de la structure végétale : la présence de stomates, de lenticelles et de craquelure favorisent l'évaporation, ce qui fait que la fraise est une espèce végétale très sensible au flétrissement, et sa conservation au froid est réalisée de préférence sans lavage préalable à l'eau. Au contraire l'évaporation tend à diminuer avec l'épaisseur de l'épiderme, cas de la tomate (Mathooko, 2003).

Arrivons au 12^{ème} jour de stockage, la perte de poids est de 40% pour le lot de contrôle et de 24% pour le lot traité avec le C1(1%) contre une perte de 20% pour les deux autres lots. Ce résultat est donc encourageant dans le cas de la fraise qui est un fruit non climatérique dont le principal moyen de lutte contre la sénescence consiste à éviter les pertes d'eau (Alexander et al., 2002).

IV-2-2-2 pH, acidité et sucres totaux

Les analyses chimiques effectuées durant toute la période de stockage de la fraise à température ambiante ($20\pm 2^\circ\text{C}$) ont montré que la teneur en sucres et le taux d'acidité évoluent presque de la même manière, et ce, pour l'ensemble des lots étudiés (Tableau 12).

Tableau 12 Evolution de la qualité organoleptique de la fraise stockée à $T = 18 - 22^\circ\text{C}$.

Jour	C1 (1%)	C2 (1%)	C3 (1%)	Contrôle
Acidité titrable (% acide citrique)				
0	1,03	1,02	1,04	1,04
4	1,05	1,05	1,06	0,98
8	1,04	1,04	1,03	0,95
12	1,01	1,01	1,02	0,91
Teneur en sucres (°Brix)				
0	7,6	7,7	7,5	7,6
4	7,3	7,7	7,6	8,8
8	8,1	7,9	7,8	10,4
12	7,1	8,1	7,9	13,1

Pour chaque produit ont été établis les domaines dans lesquels la qualité gustative est jugée satisfaisante. Dans le cas de la fraise, ces valeurs limites sont :

- pH = 3,27 – 3,86
- Acidité = 0,58 – 1,35 g/100g
- Sucres = 8,0 – 11,5% (°Brix)
- Sucres/Acidité = 8,25 – 13,79

Les variations du pH étaient insignifiantes chez les fraises enrobées durant toute la période de stockage. D'autre part, nous avons enregistré de faibles augmentations de pH pour le lot de contrôle. Ceci est en parfait accord avec les résultats obtenus par Nunes et al. (2006) qui ont montré que le pH chez la fraise augmente significativement pendant sa maturation (en plein champ). Tandis que chez la fraise mûre les variations du pH sont très faibles.

Le rapport sucres / acidité détermine le caractère doux, équilibré ou acidulé du fruit. Il constitue également un indicateur de la maturité. Au début de stockage, ce rapport était minimal en raison d'un contenu en sucres relativement faible, ce qui rend le fruit aigre.

Ensuite, pour le lot de contrôle, l'acidité a diminué régulièrement, indiquant la dégradation des acides durant le cycle de Krebs. Tandis que pour les fraises traitées, on enregistre une légère augmentation du taux d'acidité durant les quatre premiers jours de stockage. Ce qui correspond sans doute à une formation d'acides, ceci est possible lors d'une élévation de la teneur en CO₂ et une diminution de la teneur en O₂ pouvant ainsi affecter le système d'enzymes glycolytiques (Bitencourt de souza et al., 1999).

Par contre, la teneur en sucres a augmenté régulièrement pour l'ensemble des lots avec une vitesse plus marquée pour celle du contrôle qui atteint un rapport sucres/acidité égale à 14,4 le 12^{ème} jour, indiquant un fruit trop mûr avec un manque de saveur caractéristique. Bref, notre but n'est pas d'améliorer le goût du fruit, mais plutôt de prolonger sa durée de vie après récolte, en particulier à température ambiante.

Retarder la sénescence, c'est aussi empêcher l'augmentation du taux de sucres et la diminution de l'acidité. Ceci est rendu possible par enrobage de la fraise à base de polysaccharides à savoir le chitosane. Au vu de ces résultats, et ceux obtenus avec la tomate, le chitosane, préparé à partir des carapaces de la crevette blanche (*Parapenaeus Longirostris*), semble être un agent conservateur efficace.

Conclusion générale

L'objectif assigné à ces travaux est de présenter les valorisations possibles des sous-produits de l'industrie halieutique, en particulier, les constituants prépondérants telles que les protéines et la chitine. En effet, notre étude a révélé, d'une part, que la carapace de la crevette blanche (*Parapenaeus longirostris*) est composée de 23% de chitine, 40% de protéines, 20% de minéraux et les 15% restants représentent les corps gras, les pigments et autres. D'autre part, le rejet solide de poissonneries (sardine) est composé de 14% de protéines et 1,5% de lipides.

L'essai de concentration des protéines par le biais du processus d'ultrafiltration à l'échelle pilote : le MICROLAB 130S de la firme GAMMA FILTRATION®, équipé d'une membrane minérale CEREVER®, a abouti à un taux de rejet de 97% dans le cas des protéines issues des eaux de lavage lors de la déprotéinisation des carapaces de crevettes en opérant sous une pression de 3bars et une vitesse tangentielle de 6 m/s. Pour le rejet solide des poissonneries, le taux de rejet atteint était de 90% sous une pression de 4 bars et la vitesse tangentielle $U=6$ m/s. Il est donc suggéré de réaliser un séchage de l'hydrolysate par une méthode adéquate (pulvérisation ou autre) et par la suite testé sa valeur nutritionnelle sur des batteries d'animaux en plein croissance afin d'estimer réellement l'impact de notre produit sur l'alimentation animale.

L'optimisation des conditions opératoires lors de la production de la chitine et de ses dérivés sont les suivantes : un taux de déminéralisation maximal de 98% est atteint au bout d'une demi-heure en utilisant 15mL d'HCl à 1,5N par gramme de carapaces. Tandis que 95% de déprotéinisation sont atteints au bout de deux heures en utilisant 20ml de NaOH à 2N par gramme de carapace déminéralisée à la température $T = 45^{\circ}\text{C}$.

Par ailleurs, les conditions opératoires optimales durant la désacétylation ont été choisies en tenant compte d'une bonne solubilisation du chitosane obtenu. Cependant, en faisant réagir 1g de chitine dans 50mL de soude concentré sous une température de 100°C , nous avons pu atteindre un degré de désacétylation moyen égal à 80% et un poids moléculaire qui varie avec la méthode de production, allant de 12 KDa pour un chitosane préparé selon la méthode classique, jusqu'à 383 KDa pour un chitosane préparé sans l'étape de décoloration et sans l'étape de déprotéinisation.

Lors de la carboxyméthylation du chitosane, un degré de substitution égal à 1,70 indiquant le nombre de groupements carboxyméthyles par unité glucosamine, a été obtenu en faisant réagir 10g de chitosane avec 4g d'acide monochloroacétique en milieu fortement alcalin.

Notre étude a démontré, que la chitine et le chitosane avaient un effet bactériostatique souvent plus marqué dans le cas du chitosane, en particulier, vis-à-vis des bactéries résistantes aux antibiotiques classiques. Alors que leurs oligomères respectifs NAc-COS et COS étaient plutôt qualifiés d'agents bactéricides. Cependant, la mise au point d'une nouvelle méthode préparative pourrait permettre la valorisation de ces deux oligomères ainsi que leurs effets bénéfiques. Il serait aussi intéressant d'élargir la gamme de microorganismes testés et de déceler le mécanisme exact de fonctionnement de ces deux polymères et leurs oligomères sur les cellules microbiennes.

Nous avons, dans un dernier temps, testé le potentiel lié à l'utilisation du chitosane et de son dérivé carboxyméthylé (NOCC), comme films protecteurs, pouvant prolonger la durée de stockage des fruits. Cette expérience a révélé que l'utilisation de ces deux polymères a permis de ralentir le mûrissement de la tomate et de retarder le pourrissement de la fraise. Ainsi, l'enrobage des tomates par le chitosane (2%) et le NOCC (2%) à température ambiante (25 – 30°C) a retardé la survenue de la couleur rouge de 10 jours et 12 jours respectivement. Un tel traitement a également ralenti l'augmentation des solides solubles et l'acidité titrable.

La fermeté des fraises, qui est un paramètre important dans l'évaluation de la sénescence de ce fruit, s'est mieux maintenue dans les fruits traités. Ce traitement a également un effet sur l'augmentation de la teneur en sucres solubles et sur la diminution de l'acidité titrable observées chez les fraises non traitées.

Il est, enfin, nécessaire d'effectuer des tests supplémentaires portant sur la perméabilité sélective du biofilm aux gaz par exemple, et d'entamer des études de faisabilité, sur le plan économique, pour envisager son utilisation à l'échelle industrielle.

Pourtant, à ce jour, la chitine et le chitosane sont loin d'avoir tenu leurs promesses, aussi bien sur le plan commercial que sur le plan industriel, alors que semblaient se dessiner devant eux d'importants marchés dans des secteurs prometteurs : médecine, alimentation, cosmétologie ... Enfin, si les débouchés sont nombreux, les applications ne se trouvent qu'au stade de la recherche et de la pré-industrialisation car le développement d'une telle technologie est forcément lié à la capacité d'amortir les coûts de production par la valorisation d'autres composants de la carapace tels que les protéines qui possèdent d'excellentes qualités nutritives, ainsi que les constituants minoritaires tels que les caroténoïdes, la fraction aromatique et certaines enzymes.

Références bibliographiques

- Abbasi N.A., Iqbal Z., Maqboul M., Hafiz I.A. (2009) Postharvest quality of mango fruit as affected by chitosan coating. *Pak. J. Bot.*, 41 (1) 343 – 357.
- Aimar P., Sanchez V. (1989) Le colmatage des membranes d'ultrafiltration et de microfiltration. *J. Food Chem. Biotech.* 44, 203 – 213.
- Aimar P. et Daufin G. (2004) Séparation par membrane dans l'industrie alimentaire. Technique. de l'Ingénieur . F3250.
- Alexander L., Grierson D. (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening; *J. of Experim. Bot.*, 53 (20), 2039 – 2965.
- Aloulou I., Walba K., Ben Amar R., Jaouen P. (2006) Etude préliminaire du traitement d'effluents contenant de l'encre de seiche par centrifugation et procédés à membranes. *Rev. Sci. Eau*, 19, 383 – 392.
- Anselme C., Jacobs E.P. (1996) Ultrafiltration, in : Water treatment membrane process, Chapitre 10, McGraw Hill.
- Aptel P.H., Buckeley C.A. (1996) Categories of membrane operations, in : Water treatment membrane process, Chapitre 2, McGraw Hill.
- AOAC (1990) Official method of analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Miralle B., Acosta N., and Heras A., (2009) Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chem. Biolo.*, 2009, 3, 203 – 230
- Aranaz I., Harris R., and Panos R., (2010) Chitosan amphiphilic derivatives, Chemistry and applications. *Current Chem. Biolog.*, 3, 203 – 230.
- Ashley R.J. (1985) Permeability and plastic packaging in: polymer permeability. J. Comyn. (Ed) Elsevier *Appl. Sci. Publ.* New York, 267 – 307.
- Aspino S.I., Horn S.J., Eijsink V.G.H. (2005) Enzymatic hydrolysis of atlantic cod (*Gadus morhua*) viscera. *Process Biochem.* 40, 1957 – 1966.
- Audinos R. et Isoard P. (1986) Glossaire des termes techniques des procédés à membrane. Société Française de filtration.
- Austin P.R. (1988) Chitin solutions and purification of chitin. *Method Enzymol.* 161, 403 – 407.
- Babu C.M., Charkabarti R., Sambasivarao S. (2008) Enzymatic isolation of carotenoïd-protein complex from shrimp waste and its use as a source of carotenoïds. *Food Sci. Tech.* 41, 227 – 235.
- Bacchin P., Aimar P., Field R.W. (2006) Critical and sustainable fluxes: theory experiments and applications. *J. Memb. Sci.*, 281, 42 – 69.
- Barth M.M., Kerbel E.L., Perry A.K. and Schmith S.S., (1993) Modified atmosphere packaging affects ascorbic acid, enzyme activity and market quality of Broccoli. *J. Food Sc.*, 56, 140 – 143.
- Barreteau H., Dellatre C., Michaud P. (2006) Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Tech. Biotech.*, 44, 323 – 333.
- Baxter A., Dillon M., Taylor K.D.A., Roberts G.A.F. (1992) Improved method for IR determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* , 14 , 166 – 169.

- Bhatt L.R.; B.M., Kim; S.-M., Nam; G.-S., Oh; K.Y., Chai (2009) Antimicrobial activity of water soluble chitosan oligomers with different molecular weights. *J. Chitin Chitosan*, 14 (4) 179 – 181.
- Beck W.T., Cirtain M.C., Glover C.J., Felsted R.L., Safa A.R. (1988) Effects of indole alkaloids on multidrug resistance and labeling of P. glycoprotein by a photoaffinity of vinblastine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 153, 959 – 966.
- Ben nasr A., Walha K., Jaouen P. (2010) Performances des procédés membranaires pour le traitement d'un jus de caisson de thon, *J. de la société Chim. Tunis.*, 12, 89 – 95.
- Bitencourt de Souza A.L., Silvana de Paula Q.S., Chitarra M.I.F., Chitarra A.B., (1999) Postharvest application of CaCl₂ in strawberry fruits : evaluation of fruit quality and postharvest life. *Ciênc. agrotec. Lavras*, 23(4), 841 – 848.
- Bleustin C.B., Senett M., Kung R.T., Felsen D., and Stewart R.B. (2000) Differential scanning calorimetry of albumin solders: interspecies differences and fatty acid binding effects on protein denaturation, *lasers in surg. and med.*, 27, 465 – 470.
- Bligh E.G., and Dyer W.J.A., “ A rapid method of total lipid extraction and purification”, *Canadian J. Biochem. Phys.*, 1959, 37, 911 – 917.
- Bouzid H. (2008) Rôle de la physico-chimie sur les flux limites et critiques en UF, nanofiltration et OI. Application à des effluents laitiers modèles. Thèse de doctorat, Univ. RennesI, France.
- Bowen W.R. and Jenner F. (1995) Dynamic ultrafiltration model for charged colloidal dispersion: a wigne-seize cell approach. *Chem. Eng. Sci.*, 50, 1707 – 1736.
- Bower J.H., Biasi W.V., Mitcham E.J. (2003) Effect of ethylene and 1-MCP on the quality and storage life of strawberries. *Posthar. Biol. Tech.*, 28, 417 – 423.
- Brecht P.E., Keng L., Biosogni C.A., Munger H.M. (1976) Effect of fruit portion stage of ripeness and growth habit on chemical composition of fresh tomatoes. *J. Food Sci.*, 41, 945 – 948.
- Brummell D. A. (2006) Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.*, 33, 103 – 119.
- Bueno-Solano C., Lopez-Cervantes J., Campas-Baypoll O.N., Lauterio-Garcia R., Sanchez-Machado D.I. (2009) Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chem.*, 112, 671 – 675.
- Cao W., Zhang C., Hong P., Ji H., Zhang J. (2009) Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the resulting hydrolysate. *LWT. Food Sci. Tech.*, 244 – 249.
- Chang K.L.B., Tsai G., (1997) Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste; *J. of Agric. Food Chem.*, 45, 1900 – 1904.
- Chang K.L.B., Lee J., Fu W-R. (2000) HPLC Analysis of N-acetyl-chito-oligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin. *J. Food Drug Anal.*, 8 (2) 75 – 83.
- Chaib J. (2007) Caractérisation des déterminants génétiques et moléculaires de composantes de la texture du fruit de tomate. Thèse de doctorat , Ecole Nation. Sup. Agro. de Montpellier.
- Chen V., Fane A. G., Wenten G. (1997) Particle deposition during membrane filtration of colloids: transition between concentration polarization and cake formation. *J. Memb. Sci.* 125, 109 – 122.
- Chen R.H., Chen J.S. (2000) Changes of polydispersity and limiting molecular weight of ultrasound-treated. *Adv. In Chitin Sci.*, 4, 361 – 366.
- Chung Y.C., Ping S.Y., Chang C.C., and Lee J.G. (2004) Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 25 (7) , 932 – 936.

- Choi B.K., Kim K.Y., Yoo Y.J., Choi J.H., Kim C.Y. (2001) In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int. J. of Antimicrob. Agents*, 18, 553 – 557.
- Colla E., Sobral P.J.A., Menegalli F.C. (2006) *Amaranthus crueutus* flour edible films –Influence of stearic acid addition, plasticizer concentration and the emulsion stirring speed on water vapour permeability and mechanical properties. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 249 – 254.
- Costa A.R., Pinto M.N., Elimelech M. (2006) Mechanism of colloidal natural organic matter fouling in ultrafiltration. *J. of Membrane Sci.*, 281, 716 – 725.
- Cuero R.G., Osuji G., Whashington A. (1991) N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. *Biotech. Lett.*, 13, 441 – 444.
- David L., Moutembault A., Vizio N., Crèpet A. (2004) Ordering in hydrophobic bioelectrolyte chitosan solutions. 5th International Conference on Polymer-Solvent; Complexes & Intercolates. 11 - 13 July 2004, Lorient. France.
- Denes A. (2006) Etude compare de l'effet de deux proteases sur la production d'hydrolysats dotes d'activités antioxydante et antiradicalaire. Mémoire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.
- Di-Mario F., Rapana P., Tomati U., Galli E. (2008) Chitin and chitosan from basidiomycetes. *Int. J. Biol. Macrom.*, 43 , 8 – 12.
- Domszy J.G., Roberts G.A.F. (1985) Evaluation of infrared spectroscopie techniques for analyzing chitosan. *Makromol. Chem.*,186, 1671 – 1677.
- Du Y., Zhao Y., Dai S., Yang B. (2009) Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Inn. Food Emerg. Tech.*, In Press, Corrected Proof.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F.(1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28 (3) 350 – 356.
- Dumay J. (2006) Extraction de lipids en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration : application à la valorisation de co-produits de poisson *Sardina pilchardus*. Thèse de doctorat, Université de Nante.
- Dutta P.K., Tripathi S., Mehrotra G.K. and Dutta J. (2009) Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem.*, 114, 1173 – 1182.
- El Ghaouth A., Arul J., Ponnampalam R. (1991) Coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. *J. Food. Proc. Pres.*, 15, 359 -368.
- El Ghaouth A., Arul J., Ponnampalam R., and Casteigne F. (1992) Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *Horti. Sc.*, 27 (9) 1016 – 1018.
- Esquenet C., (2003) Propriétés structurales et dynamiques des solutions de poly électrolytes rigides et semi-rigides et de polysaccharides associatifs. Thèse de doctorat; Université Joseph Fourier; Grenoble I.
- Falini G., Weiner S., Addadi L. (2003) Chitin-silk fibroin interaction : relevance to calcium carbonate formation of invertebrates. *Calcified Tissue Int.*, 75 (5) 548 – 554.
- Famino A.O., Susenbeth A., Sudekum K.H. (2006) Protein utilisation, lysine bioavaibility and nutrient digestibility of shrimp meal in growing pigs. *Anim. Feed Sci. and Tech.*, 129, 196 – 209.
- Fan W., Sun J., Chen Y., Qiu J., Zhang Y., Chi Y. (2009) Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chem.*, 115 (1) 66 – 70.

- FAO 2009. The state of world fisheries and aquaculture 2008. in: F.F.a.A. Department (Ed). Rome.
- Fernandez-Kim S. O. (2004) Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols, Thesis, Louisiana State University.
- Fernandes J.C.; F.K., Tavaría ; J.C., Soares ; O.S., Ramos ; M.J., Monteiro; M.E., Pintado; F.X., Malcata (2008) Antimicrobial effects of chitosans and chitoooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiol.*, 25, 922 – 928.
- Fernandes S.P., Solar C., Laganon J.M., Ocio M.J. (2010) Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella spp.* In laboratory media and in fish soup. *Int. J. of Food Microbiol.*, 137, 287 – 294.
- Fernanda R. De Abreu, Sergio P. Campana-Filho K. (2005) Preparation and characterization of carboxymethylchitosan polimeros. *Ciência Tech.*, 5 (2) 79 – 83.
- Field R.W., Wu D. Howell J.A., Gupta B.B. (1995) Critical flux concept for microfiltration fouling. *J. Memb. Sci.*, 100, 259 – 272.
- Fox D.L. (1973) Chitin-bound keto-caratenoïds in a crustacean carapace. *Comp. Biochem. Physiol.*, 44, p.953
- Gautier H., Massot C., Stevens R., Génard M. (2009) Regulation of tomato fruit ascorbate content is more highly dependent on fruit irradiance than leaf irradiance. *Annals of Botany*, 103, 495 – 504.
- Gekas V., Aimar P., Lafaille J., Sanchez V. (1993) A simulation study of the adsorption-concentration polarization interplay in protein ultrafiltration. *Chem. Eng. Sci.*, 48, 2755 – 2765.
- Gerasimenko D.V., Avdienko I.D., Bannikova G.E., Zueva O.Y., Varlamov V.P. (2004) Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Appl. Bioch. and Microbiol.*, 40 (3) 253 – 257.
- Gogev S. Versali M.F., Thiry E. (2003) Les chitosanes-nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux. *Ann. Méd. Vét.*, 147, 343 – 350.
- Gomes-Estaca J., Lopez de Lacey A., Lopez-Caballero M.G., Montero P. (2009) Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan. *J. of Aquatic Food Product Tech.*, 18 (1) 46 – 52.
- Goosen M.F.A., Sablani S., Al-Hinai H., Al-Belushi R., and Jackson D. (2004) Fouling of reverse osmosis and ultrafiltration membranes: a critical review. *Separat. Sci. and Tech.*, 2004 (39) 1 – 37.
- Guilbert S., Cuq B. And Gontard N. (1997) Recent innovation in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Add. and Contaminat.*, 14, 741 – 751.
- Hagen K. (1998) Removal of particles, bacteria and parasites with ultrafiltration for drinking water treatment. *Desal.*, 119, 85 – 91.
- Hans C., Zhao Y., Leonard S.W., Traber M.G. (2004) Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria xananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*), *Postharvest Biol. & Tech.*, 33, 67 – 78.
- Hamodrakas S.J., Willis J.H. (2002) A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins; *Insect. Biochem. and Molec. Biol.*, 32 , 1577 – 1583.
- Hans M., and Lars Z. (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthase and chitinases. *J. of Experim. Biol.*, 206, 4393 – 4412.
- Heux L., Brugnerotto J., Desbrières J., Versali M.F., Rinaudo M. (2000) Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromol.*, 1, 746 – 757.

- Huong N.T.M. (2009) Valorisation de matières premières marines de faible valeur ajoutée: application aux co-produits de thon. Thèse de doctorat en biotechnologie, Université de Nante.
- Jang M.K., Kong B.G., Jeong Y.I., Lee C.H. (2004) Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitine and γ -chitin separated from natural resources. *J. Polym. Sci.*, 42, 3423 – 3432.
- Je J., and Kim S. (2006) Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6629 – 6633.
- Je J.Y., Qian Z.J., Kim S.K. (2007) Purification and characterization of an antioxydant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.*, 42, 840 – 846.
- Jeon Y., Park P., Kim S.K. (2001) Antimicrobial effects of chitooligosaccharides produced by bioreactor; *Carboh. Polym.*, 44, 71 – 76.
- Jessop N.M. (1973) Biosphère écologie mécanisme de l'adaptation. Edition recherche et Marketing , 98 – 100.
- Johson G. (1986) Transport phenomena in ultrafiltration membrane selectivity and boundary layer phenomena. *Pure Appl. Chem.*, 58, 1647 – 1656.
- Jorillier M., Polonovski M.; *Traité de biochimie générale; Tome II ; Ed. Masson (1962).*
- Kaplan D.L., Mayer J.M., Ball D., Allen A., Stenhouse P. (1993) Fundamentals of biodegradable polymers. *Tech. Pub.*, 1 – 42.
- Kasaai M.R., Arul J., Chin S.L., Charlet G. (1999) The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. *J. Photochem. Photobiol., A. Chem.*, 120, 201 – 205.
- Kennedy M.D., Kamany J., Amy G. (2008) Colloidal organic matter fouling of UF membrane : role of natural organic matter & size. *Desal.*, 220, 200 – 213.
- Kim S.Y., Shon D.H., Lee K.H. (1998) Purification and characteristics of two types of chitosanases from *Aspergillus fumigatus* KH-54. *J. Microb. Biotech.*, 8, 568 – 574.
- Kim J.S., Shahidi F., Heu M.S. (2003) Characteristics of salt-fermented sauces from shrimp processing by-products. *J. Agr. Food Chem.*, 51, 784 – 792.
- Kim S.K. and Rajapakse N. (2005) Enzymatic production and biological activities of chitooligosaccharides (COS) : A review, *Carboh. Polym.*, 62 (4) 357 – 368.
- Kim S.K., and Mendis E., (2006) Bioactive compounds from marine processing by-products, A review, *Food Res. Intern.*, 39, 383 – 393.
- Kim J.S., Cai Z., Benjamin M.M. (2008) Effects of adsorbents on membrane fouling by natural organic matter. *J. Memb. Sci.*, 310, 356 – 364.
- Kumirska J., Czerwicka M., Kaczynski Z., Bychowski A., Stepnowski P. (2010) Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Mar. Drugs*, 8, 1567 – 1636.
- Kurita K. (2001) Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.*, 26, 1921 – 1971.
- Kurita K. (2006) Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar. Biotechnol.*, 8, 203 – 226.
- Kuzmenko D., Arkhangelsky E., Belfer S., Freger V., Gitis V. (2005) Chemical cleaning of UF membrane fouled by BSA. *Desal.*, 179, 323 – 333.

- Kyzas G.Z. and Lazaridis N.K. (2009) Reactive and basic dyes removal by sorption onto chitosan derivatives. *J. Colloids Interface Sci.*, 331, 32 – 39.
- Labories S. (1998) Décolmatage de membranes d'ultrafiltration par un écoulement intermittent gaz-liquide-Application à la production d'eau potable. Thèse INSA de Toulouse.
- Laining A., Rachmansyah, Ahmad T., Williams K. (2006) Apparent digestibility of selected feed ingredients for humpback grouper. *Crom. Altiv. Aquac.*, 218, 529 – 538.
- Lee B.C., Kim M.S., Choi S.H., Kim T.S. (2009) In vitro and in vivo antimicrobial activity of water-soluble chitooligosaccharides against *Vibrio vulnificus*. *Int. J. of Molcul. Med.*, 24, 327 – 333.
- Li Q. , Dunn E.T., Grandmaison E.W., Goosen M.F.A.(1992) Applications and properties of chitosan. *J. Bioact. and Compat. Polym.*, 7 , 370 – 397.
- Li P., Wang X., Hardy R.W., Galin D.M. (2004) Nutritional value of fisheries by-catch and by-products meals in the diet of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquac.*, 236, 485 – 496.
- Li X.-F., X.-Q., Feng S., Yang (2010) A mechanism of antibacterial activity of chitosan against Gram-negative bacteria. *Chines J. of Polym. Sci.*, 31 (13) 148 – 153.
- Lian P.Z., Lee C.M., Park E. (2005) Characterization of squid-processing byproducts hydrolysate and its potential as aquaculture feed ingredient. *J. Agr. Food Chem.*, 53, 5587 – 5592.
- Limam Z., Selmi S., Sadok S., El-abed A. (2011) Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: Biological and physico-chemical properties. *Afri. J. of Biotech.*, 10 (4) 640 – 647.
- Ling S.L.Y., Yee C.Y., Eng H.S. (2011) Removal of a cationic dye using deacetylated chitin (chitosan). 11 (8) 1445 – 1448.
- Liu X., Yun L., Dong Z., Kang D. (2001) Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.*, 79 (7) 1324 – 1335.
- Liu N.; X.-G., Chen; H.-J., Park; C.-G., Liu; X.-H., Meng; L.-J., Yu (2006) Effect of Mv and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carboh. polym.*, 64, 60 – 65.
- Loiseleur J. (1963) Techniques de laboratoire. Tome I; Fascicule 2; Ed. Masson.
- Louisot P. (1983) Biochimie métabolique. Volume 1; Ed. Simpson .
- Mackie I.M., (1982) Fish protein hydrolysates, *Proc. Biochem.*, 26 – 29.
- Maghami G.C. and Roberts G.A.F. (1988) Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Die Makromol. Chem.*, 189 (1) 195 – 200.
- Majeti N. V., Kumar R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reac. and Funct. Polym.*, 46, 1 – 27.
- Malleval J., Odendaal P.E., Wiesner M.R. (1996) The emergence of membranes in water and waste water treatment, In : Water treatment membrane process, Chapitre1, Mc Graw Hill.
- Marjaana S. (2002) Effects of prefreezing treatments on the structure of strawberries and jams; Thesis; Helsinki University.
- Mameri N., Abdesmed D., Belhocine D., Lounici H., Gavach C., J.Sandeaux and R. Sandeaux. (1996) Treatment of fishery washing waters by ultrafiltration. *J. Chem. Biotech.*, 1996, 67, 169-175.

- Massot C., Stevens R., Génard M., Gautier H., (2010) Fluctuations in sugar content are not determinant in explaining variations in vitaminC in tomato fruit. *Plant Phys. Biochem.*, 48, 751 – 757.
- Mathooko F. M, (2003) Comparaison du conditionnement en atmosphère modifiée sous conditions environnantes et de conservation à basse température pour la qualité du fruit de tomate. *Afric. J. of Food, Agric., Nutr. Develop.*, 3 (2) 5 – 10.
- Meireles M., Aimer P., Sanchez V., (1992) Les techniques à membrane : micro et ultrafiltration. Le technoscope de biofutur. N° 111.
- Mia J., Chen G., Gao C., Dong S. (2008) Preparation and characterization of NOCC/Polysulfone composite nanofiltration membrane crosslinked with epichlorohydrin. *Desal.*, 223, 147 – 156.
- Miron D., Petreikov M., Carmi N., Sten S., Levin I., Grant D., Schaffer A.A. (2002) Sucrose uptake invertase localization and gene expression in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* and the sucrose-accumulating. *Physiol. Plant.*, 115, 35 – 47.
- Mirzadeh H.; N., Yaghobi; S., Amanpour; H., Ahmadi; M.A., Mohaghebi; F., Hormozi (2002) Preparation of chitosan derived from shrimp shell of Persian Gulf as blood haemostasis agents. *Iranian Polym. J.*, 11, 63 – 68.
- Moneruzzaman K.M., Hossain A.B.M.S., Sani W., and Alenazi M., (2009) Effect of harvesting and storage conditions on the post harvest quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Aust. J. of Crop Sc.*, 3 (2) 113 – 121.
- Montserrat R. P. (2002) Development of techniques based on natural polymers for the recovery of precious metals. Thesis, Universitat Politècnica de Catalunya.
- Moretti C.L., Alessandra L., Marouelli W.A., Washington L. C. S. (2002) 1-Methycyclopropene delays tomato fruit ripening. *Hort. Brasil.*, 20 (4) 659 – 663.
- Morimoto M., Saimoto H., Shigemasa Y. (2002) Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification; *Trends in Glycosci. and Glycotech.*, 14 (78) 205 – 222.
- Mourya V.K., Inamdar N., Tiwari A. (2010) Carboxymethyl chitosan and its applications. *Adv. Mat. Lett.*, 1 (1) 11 – 33.
- Mowbray C.J. (1988) Processing and Quality Assessment of Soluble Prepared From Dog-Fish Processing Waste. *J. of Agri. and Food Chem.*, 36, 1329 – 1333.
- Mukherjee D. P.; Method for producing chitin and chitosan; United States Patent Application; 6,310,188.
- Muzzarelli R.A.A., Tanfani O. (1982) N-(O-Carboxybenzyl) chitosan, N-carboxymethylchitosan and dithiocarbamate chitosan: New chelating derivatives of chitosan. *Pure & Appl. Chem.*, 54 (11) 2141 – 2150.
- Muzzarelli C., Tosi G., Muzzarelli R.A.A., (2004) Susceptibility of dibutyl chitin and regenerated chitin fibres to deacetylation and depolymerisation by lipases. *Carboh. Polym.*, 56, 137 – 146.
- Nahalka J., Nahalkova J., Gemeiner P., Blanarik P. (1998) *Biotechnol. Letters*, 20, 841 – 845.
- Nettles D.L. (2001) Evaluation of chitosan as a cell scaffolding material for cartilage tissue engineering. Master of sci. Mississippi State University.
- Ngah W.S.W. and Fatinathan S. (2008) Adsorption of Cu(II) ions in aqueous solution using chitosan beads, chitosan-GLA beads and chitosan-alginate beads. *Chem. Eng. J.*, 143, 62 – 72.

- Nilsang S., Lertsiri S., Assarang A. (2005) Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *J. of Food Eng.*, 70 (4) 571 – 578.
- No H.K., Meyers S.P., and Lee K.S. (1989) Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *J. of Agric. and Food Chem.*, 37(3) 575 – 579.
- No H.K., Meyers S.P. (1995) Isolation of chitin from crab shell waste. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24 (1) 105 – 113.
- No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Hwang H.J., Meyers S.P. (2002) Antibacterial activities of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from Tofu. *J. of Food Sci.*, 67 (4) 1511 – 1514.
- Nouar A. and Maurin C. (2001) Nature of and typical populations on the characteristic facieses of substratum of *Parapenaeus Longirostris* along the Algerian coast. *Crust.*, 74, 2, 129 – 135.
- Nunes M.C.N., Brecht J.K., Morais A.M.B., Sargent S.A. (2006) Physico-chemical changes during strawberry development in the field compared with those that occur in harvest fruit during storage. *J. Sci. Food*, 86, 180 – 190.
- Ojagh S.M., Rezaei M., Razari S.H., Hosseini S.M.H. (2010) Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem.*, 120 (1) 193 – 198.
- Palop S., Köstelki M., Escriva M., Estere M.J. (2010) Ascorbic acid in tomatoes during refrigeration storage with absorbing sheet of ethylene. *Food Innov.*, 1 – 10.
- Pangestuti R. and Kim S.K. (2010) Neuroprotective properties of chitosan and its derivatives; *Mar. Drugs*, 8, 2117 – 2128.
- Park B.K. and Kim M.M. (2010) Application of chitin and its derivatives in biological medicine. *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 5152 – 5161.
- Pascat B. (1986) Study of some factors affecting permeability. *Appl. Sci. Pub.*, 2 – 24.
- Pawadee M., Malinee P., Pothsree T., Junya (2003) Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carboh. Polym.*, 52, 119 – 123.
- Peressini D., Bravin B., Sensidoni A. (2004) Tensile properties, water permeabilities and solubilities of starch-methylcellulose-based edible films. *Ital. J. Food Sci.*, 1 (16) 5 – 12.
- Peter M.G. (1995) Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J. M. S.-Pure Appl. Chem.*, A32, 629 – 640.
- Peyron A. (1991) L'emballage et les produits filmogènes: un nouveau mode d'emballage dans la viande carné., 12 (2) Avril 1991.
- Picot L., Ravaller R., Fouchereau-péron M., Vandanjon L., Bourseau P.(2010) Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *J. of Food and Agric.*, 90(11) 1819 – 1826.
- Pontié M. et coll. (2001) Les techniques séparatives à membranes – théories, applications et perspectives. Paris : Union Int. Pour les Appl. de l'électricité, pp. 212.
- Raafat D. and Sahi H.G. (2009) Chitosan and its antimicrobial potential-a critical literature survey. *Microb. Biotech.*, 2(2), 186 – 201.
- Rabea E.I., Badawy M.E., Stevens C.V., Steurbaut W. (2003) Chitosan as antimicrobial agent: application and mode of action. *Biomacro.*, 4, 1457 – 1465.

- Rabiller-Baudry M., Bégoïn L., Delaunay D., Chaufer B. (2008) A dual approach of membrane cleaning based on physico-chemistry and hydrodynamics. Application to PES membrane of dairy industry. *Chem. Eng. Proc.*, 47, 267 – 275.
- Rafatullah M., Sulaiman O., Hashim R. (2009) Adsorption of copper (II), chromium (III), nickel (II) and lead (II) ions from aqueous solutions by meranti sawdust. *J. Hazard Mat.*, 170, 969 – 977.
- Rao H.G.R., Grandison A.S., Lewis M.J. (1994) Flux pattern and fouling of membranes during UF of some dairy products. *J. Sci Food Agric.*, 66, 563-571.
- Rhazi M., Desbrières J., Tolaimate A., Rinaudo M. (2002) Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers. *Polym.*, 43, 1267 – 1276.
- Rinaudo M. (2006) Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 31 (7) 603 – 632.
- Reetarani S. P., Ghormade V., Deshpande M.V. (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enz. and Microbial. Tech.*, 26, 473 – 483.
- Roberts G.A. (1992) Chitin chemistry. Macmillan Press Ltd; London.
- Rodde R.H., Einbu A., Varum K.M. (2008) A seasonal study of chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from Northern shrimp (*P. Borealis*), *Carboh. Polym.*, 71(3) 383 – 393.
- Rong C., Qi L., Bang-zhong Y., Lan Z. (2009) Combined effect of ozonated water and chitosan on the shelf-life of pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Inn. Food and Emerging Tech.*, 11 (1) 108 – 112.
- Sabnis S., Block L.H. (1997) Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-acetylation of chitosan. *Polym. Bull.*, 39, 67 – 71.
- Sabnis S. and Block L.H. (2000) Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems I. Molecular modifications. *Int. J. of Biol. Macromol.*, 27, 181 – 186.
- Sagoo S., Board R., Roller S. (2002) Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. *Food Microbiol.*, 19, 175 – 182.
- Shahidi F. and Abuzaytoun R. (2005) Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res.*, 49, 93 – 135.
- Shahidi F. (2007) Chitin and chitosan from marine by-products. In: Maximising the value of marine by-products, Shahidi F. Ed. *Woodhead Pub.*, 304 – 373.
- Shiau C-Y. and Chai T-J. (1999) Protein recovered from oyster wash water by UF and their utilization as oyster sauce through fermentation. *J. Mar. Sci. Tech.*, 7 (2) 110 – 116.
- Shirui M., Shuai X., Unger F., Simon M., Kissel D. (2004) The depolymerisation of chitosan : effects on physico-chemical and biological properties. *Int. J. of Pharm.*, 281, 45 – 54.
- Schuch W., Bird C.R., Roy J., Smith C.J.S., Watson C.F., Morris P.C., Gray J.E., Arnold C., Seymour G.B., Tucker G.A., Grierson D. (1989) Control and manipulation of gene expression during tomato fruit ripening. *Plant Mol. Biol.*, 13 , 303 – 311.
- Singh J., Dutta P.K., Dutta J., Hunt A.J., Clark J.H. (2009) Preparation and properties of highly soluble chitosan-L- glutamic acid aerogel derivative. *Carboh. Polym.*, 76, 188 – 195.
- Sonti S. (2003) Consumer perception and application of edible coating on fresh-cut fruits and vegetables. Thesis; Louisiana State University.
- Souleyre E.J.F., Iannetta P.P.M., Ross H.A., Viola R., Taylor M.A., Davies H.V. (2004) Starch metabolism in developing strawberry (*Fragaria xananassa*) fruits. *Pysiol. Plant*, 121, 369 – 376.

- Sudaryono A., Tsvetnenko E., Evans L.H. (1996) Digestibility studies on fisheries by-product based diets for *Penaeus monodon*. *Aquac.*, 143, 331 – 340.
- Sulaiman M.Z., Sulaiman N.M., Beicha A. (2001) Prediction of dynamic permeate flux during cross-flow UF of polyethylene glycol using concentration polarization-gel layer model. *J. Memb. Sci.*, 189, 151 – 165.
- Sunita D. and Anard Ganesh E. (2010) Extraction of chitin from trash crab (*Padoph thalmsuigil*) by an eccentric method. *J. of Biol. and Sc.*, 2(1), 72 – 75.
- Tang H.G., Wu T.X., Zhao Z.Y., Pan X.D. (2008) Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) *Zhejiang Univ. Sci. B.*, 9, 684 – 690.
- Tanveer A. K., Peh K.K., Hung S. C. (2002) Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J. Pharm. Sci.*, 5 (3) 205 – 212.
- Tibbets S.M., Milley J.E., Lall S.P. (2006) Apparent protein and energy digestibility of common and alternative feed ingredients by atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquac.*, 261, 1314 – 1327.
- Tipparat H. and Oraphan R. (2008) Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosan prepared from carapace of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Sci. Technol.*, 30, 1 – 9.
- Toan N.V. (2011) Improved chitin and chitosan production from black tiger shrimp shells using salicylic acid pre-treatment. *Biomat. J.*, 3, 1 – 3.
- Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., and Alagui A. (2003) Contribution to the preparation of chitins and chitosan with controlled physico-chemical properties. *Polym.*, 44, 7939 – 7952.
- Tomoya I., Watanabe T., Toshifumi Y., Jung S. (2003) The directionality of chitin biosynthesis : a revisited. *Biochem. J.*, 374, 755 – 760.
- Umetsu S. (1996) Modified method of estimation of fish muscle protein by biuret method. *Bull. Jap. Soc. Fish.*, 32, 427 – 435.
- Vandanjon L., Johanson R., Derouiniot M., Jaouen P., Bourseau P. (2007) Concentration and purification by UF of marine peptides solutions. *J. Food Eng.*, 83, 581 – 589.
- Venkatesan S., Pangestuti R., Qian Z.-J., Kim Se-K. (2010) Biocompatibility and alkaline phosphate activity of phosphorylated chitooligosaccharides on the osteosarcoma MG63 cell line. *J. Funct. Biomater.*, 1, 3 – 13.
- Viarsagh M.S., Janmaleki M., Masoumi J. (2009) Chitosan preparation from Persian gulf shrimp shells and investigating the effect of time on the degree of deacetylation. *J. of Param. Sc.*, 1(2), 1 – 7.
- Walha K., Ben Amar R., Bourseau P., (2009) Nanofiltration of concentrated and salted tuna cooking juices. *Proc. Safety and Env. Prot.*, 87, 331 – 335.
- Watanabe A., Ohtani T., Horirita H., Ohya H. and Kimura S.(1986) Recovery of soluble proteins from fish filly processing with self rejection dynamic membrane. *Food Eng. And Proc. Appl.*, 2, 225 – 336.
- Wai Y. T. E. and Lee R.V.(2002) Enzymatic hydrolysis of prawn shell waste for the purification of chitin. Department of Chemical Engineering; Loughborough University.
- Wu X.Y., Zeng Q.Z., Mo S.F., Ruan Z. (2006) Antibacterial activities of chitosan with different degree of deacetylation and molecular masses. *J. South China Univ. Tech.*, 34, 58 – 62.
- Xia W., Liu P., Zhang J., Chen J. (2010) Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydroll.*, 1 – 10.

- Xie W., Xu P., Wang W., Liu Q. (2002) Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. *Carboh. Polym.*, 50, 35 – 40.
- Xing R., Liu S., Guoz Z. (2005) Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. *Bioorg. Med. Chem.*, 13 (5) 1573 – 1577.
- Yang B.Y. and Montgomery R. (2000) Degree of acetylation of heteropolysaccharides. *Carboh. Res.*, 323, 156 – 162.
- Yanti S.D., Nugroto P.T., Aprisa R., Mulyana E. (2009) The potential of chitosan as alternative biopesticide for postharvest plants. *As. J. Food Ag-Ind.*, 241 – 248.
- Zaku S.G., Emmanuel S.A., Aguzue O.C., and Thomas S.A., (2011) Extraction and characterization of chitin, a functional biopolymer obtained from scales of common carps fish (*Cyprinus carpio*) *J. of Food Sci.*, 5(8) , 478 – 483.
- Zhang H., Oh M., Allen C., Kumachera E. (2004) Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. *Biomacrom.*, 5, 2461 – 2468.
- Zhang J., Xia W., Liu P., Cheng Q., and Bo L., (2010) Chitosan modification and pharmaceutical-biomedical applications. *Mar. Drug*, 8, 1962 – 1987.
- Zhang Y., Xue C., Xue Y., Gao R., Zhang X. (2005) Determination of degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydr. Res.*, 340, 1914 – 1917.
- Zheng L.Y. and Zhu J.F. (2003) Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carboh. Polym.*, 54, 527 – 530.

Publications

M.S Benhabiles, N. Abdi, N. Drouiche, H. Lounici, A. Pauss, M.F.A. Goosen, N. Mameri.

Fish protein hydrolysate production from solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. *Materials Science and Engineering C* 32 (2012) 922 – 928.

M.S Benhabiles, R.Salah, N. Drouiche, H. Lounici, M.F.A. Goosen, N. Mameri.

Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids* 29 (2012) 48 – 56.

M.S Benhabiles, N. Abdi, N. Drouiche, H. Lounici, A. Pauss, M.F.A. Goosen, N. Mameri.

Protein recovery by ultrafiltration during isolation of chitin from shrimp shells *Parapenaeus Longirostris*. *Food Hydrocolloids* 32 (2013) 28 – 34.

Annexes

Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl

1- Minéralisation

* **L'essai :** Dans un tube matras, on introduit :

- 2g de carapaces broyées (p)
- 10 mL d'acide sulfurique concentré à 98% (Prolabo)
- une pointe de spatule de catalyseur de minéralisation

* **Le blanc :**

- 10 mL d'acide sulfurique additionnés de catalyseur. La minéralisation est accomplie à 100°C pendant 30 minutes ensuite à 300°C pendant 2 heures.

Après minéralisation, le minéralisât est transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 200 mL puis complétée à 200 mL avec de l'eau distillée.

2- Distillation et dosage de l'ammoniac

Dans un ballon de distillation, on introduit successivement :

- 20 mL de minéralisât dilué
- 100 mL d'eau distillée
- quelques gouttes de phénophtaléine
- 10 mL de lessive de soude

Adapter le ballon immédiatement au réfrigérant et chauffer. Recueillir le distillat dans 20 mL d'acide sulfurique de concentration connue voisine de 0,01M. Distiller durant 30min.

Doser l'excès d'acide sulfurique contenu dans le distillat à l'aide de NaOH (0,015 M).

3- Calculs

Au point d'équivalence le nombre de moles d'ions H^+ captés par les bases (NaOH, NH_3) est égal au nombre de moles d'ions H^+ cédés par l'acide (H_2SO_4), on écrit :

$$C_{NH_3} = \frac{[2 C_{H_2SO_4} \cdot V_{H_2SO_4}] - [C_{NaOH} \cdot V_{NaOH}]}{V_{NH_3} \text{ (minéralisât)}} \quad (\text{mole/l})$$

Dans 200 mL (donc dans 2g de carapaces) on a :

$$N \text{ total} = [C_{NH_3} \cdot M_N \cdot 0,1] \text{ g / g de carapaces}$$

Et dans 100g de carapaces on a :

$$N \text{ total} = [C_{NH_3} \cdot M_N \cdot 10] \text{ g / 100 g de carapaces}$$

N total : teneur en azote des carapaces.

C_{NH_3} : concentration molaire d'ammoniac (mole/L).

$C_{H_2SO_4}$: concentration molaire de l'acide sulfurique (mole/L).

$V_{H_2SO_4}$: volume de l'acide sulfurique exprimé en litre.

C_{NaOH} : concentration molaire de la solution d'hydroxyde de sodium (mole/l).

V_{NaOH} : volume de la solution d'hydroxyde de sodium (en litre), nécessaire à la neutralisation de l'excès d'acide sulfurique.

M_N : masse molaire de l'azote, égale à 14 g/mole.

L'azote protéique est déterminé comme suit : $N \text{ protéines} = (N \text{ total} - N \text{ chitine})$

La teneur des protéines en gramme dans 100grammes de carapaces est déterminée comme suit :

$$\text{Teneur en protéines en g dans 100g de carapaces} = (N \text{ protéines} / 0,16)$$

Le facteur **0,16** représente la fraction moyenne d'azote dans les protéines.

Dosage de la matière grasse du poisson

1- Extraction selon la méthode de Bligh et Dyer

Depuis 1959, cette méthode est utilisée pour extraire la totalité des lipides polaires et apolaires des tissus animaux :

Environ 0,5 à 1g d'échantillon lyophilisé sont pesés directement dans des tubes à centrifuger de 50 mL (préalablement grillés au four à 450°C) et 4 mL d'eau sont ajoutés pour réhydrater la prise d'essai. Ceci aurait pour effet d'éviter la perte de triglycérides observée pour des échantillons lyophilisés non réhydratés. L'extraction est réalisée par un mélange ternaire eau : méthanol : chloroforme monophasique, dans les proportions 0,8 : 2 : 1 (v/v/v) ce qui est obtenu par addition de 10 mL de méthanol et de 5 mL de chloroforme. On agite pendant 2 min. On ajoute ensuite 5 mL de chloroforme puis 5 mL d'eau, chacun de ces ajouts étant suivi d'une période d'agitation de 30s. Les trois solvants sont alors dans les proportions 0,9 : 1 : 1 (v/v/v) et on obtient un mélange diphasique ; la phase chloroformique contient les lipides purifiés et la phase eau-méthanol contient les matières organiques co-extraites.

Après centrifugation (10 min, 3000 trs), le chloroforme est récupéré à l'aide d'une pipette pasteur. La phase chloroformique est recueillie dans un ballon de verre de 50 mL préalablement grillé et taré. La phase eau-méthanol est rincée deux fois par 10 mL de chloroforme qui est transféré dans le ballon de verre comme précédemment.

2- Quantification

Le solvant d'extraction est évaporé sous vide. Les ballons sont placés dans une étuve à 60°C pendant 20 min, mis à refroidir au dessiccateur pendant 20 min également et pesés pour la détermination gravimétrique des lipides totaux ; cette dernière série d'opérations est répétée jusqu'à poids constant (dans la plupart des cas deux pesées suffisent). Le résultat sera exprimé en pourcentage (%) de la matière humide.

Dosage des protéines par la méthode de Biuret

1- Courbe d'étalonnage

Nous avons utilisé un sérum de BSA (bovin sérum albumine) de concentration $C_0 = 1\text{g/L}$. On réalise à l'aide d'eau distillée plusieurs dilutions :

1/10 ; 1/20 ; 1/30 ; 1/90 soit 0,1g/L ; 0,2g/L ; 0,9g/L

Dans une série de tubes à essais, nous introduisons 1 mL de chaque dilution et 4 mL du réactif de Cornall. Le témoin ou le blanc est réalisé avec 1 mL d'eau distillée et 4 mL du réactif de Cornall. Les tubes sont bien mélangés et placés à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante pour développer la réaction. Une fois que la coloration est stable, nous réalisons la lecture de la densité optique (DO) de chaque tube contre le blanc à **540 nm**.

2-Dosage des protéines

Diluer l'échantillon à doser au 1/10^{ème} pour être toujours dans la marge d'application de la loi. On prélève 1 mL au quel on ajoute 4 mL du réactif de Cornall, mélanger et mettre à l'obscurité pendant 30 min. Ensuite lire la DO à 540 nm.

La concentration en protéines est déduite de la courbe d'étalonnage.

3-Réactif de Cornall

- Dissoudre 1,5g de sulfate de cuivre penta hydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dans 250 mL d'eau distillée.
- Dissoudre 6g de tartrate double de sodium et de potassium dans 250 mL d'eau distillée
- Dissoudre 30g de soude caustique analytique dans 300 mL d'eau distillée
- Faire le mélange de ces trois solutions et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée
- Ce réactif est très sensible à la lumière, ceci dit, il doit être mis à l'obscurité dans un flacon soigneusement bouché

Dosage de la demande chimique en oxygène (DCO)

1-Appareillage

- Spectrophotomètre UV – visible
- Cellule de mesure en quartz

2-Préparation du réactif de digestion

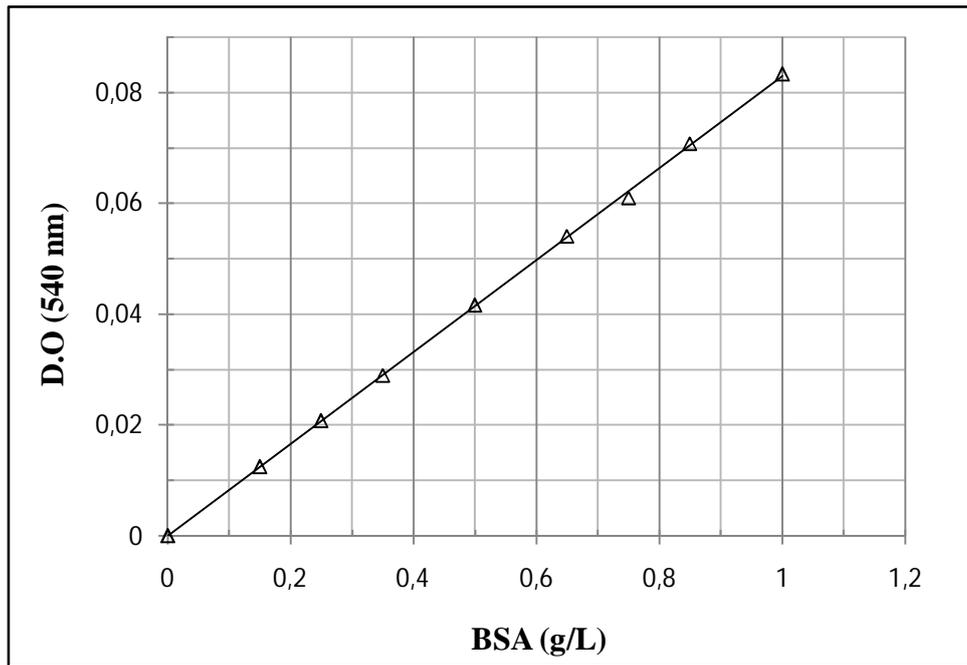
- Dissoudre 10,216g de K_2CrO_7 , préalablement chauffé à $103^\circ C$ pendant 2h, dans 500 mL d'eau distillée
- Ajouter 167 mL de H_2SO_4 concentré + 33,3g de $HgSO_4$, dissoudre à température ambiante puis diluer à 1000 mL

3- Préparation du réactif d'acide sulfurique

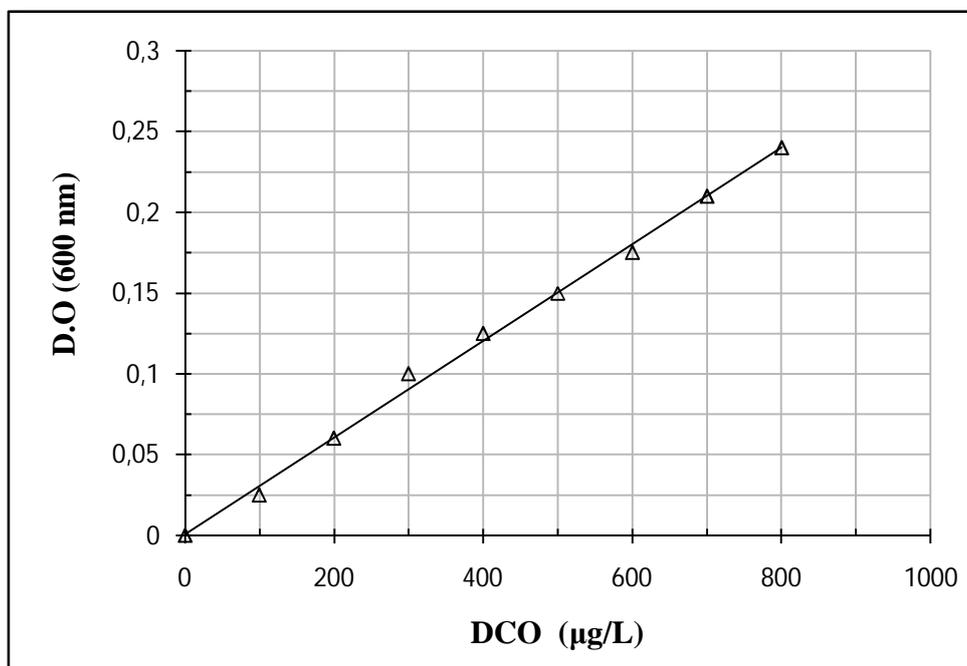
Ajouter Ag_2SO_4 technique à H_2SO_4 concentré avec un taux de 5,5g de Ag_2SO_4 par litre de H_2SO_4 et attendre la dissolution.

4- Mode opératoire

- Prendre 2 ml du réactif de digestion, ajouter 1 ml du réactif d'acide sulfurique dans des tubes spécifiques, les fermer immédiatement après les avoirs bien mélangés, car la réaction est exothermique.
- Ajouter 2 ml de l'échantillon à analyser, fermer et agiter
- Positionner les tubes dans le bloc chauffant préalablement chauffé, régler le minuteur à 120 min
- Sortir les tubes du bloc après 2h, laisser refroidir
- Effectuer la lecture au spectrophotomètre à **600 nm**
- La valeur de la DCO est déduite de la courbe d'étalonnage

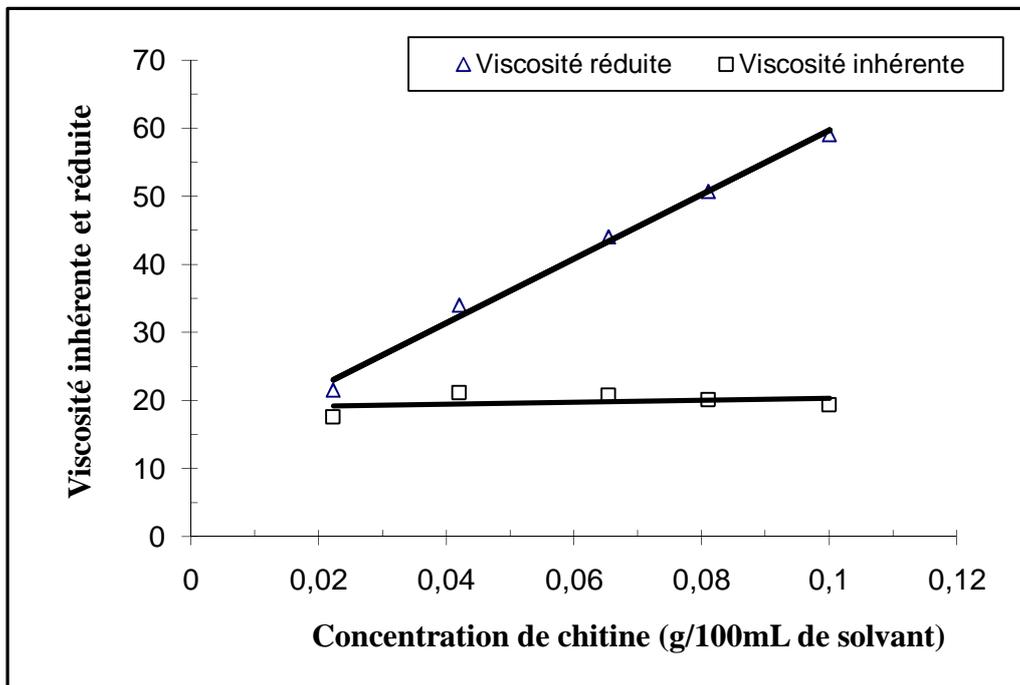


Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de BIURET



Courbe d'étalonnage pour le dosage de la DCO

Poids moléculaire viscosimétrique de la chitine



On détermine les ordonnées à l'origine pour chacune des deux droites :

- Pour la viscosité réduite : $y = 12,481$
- Pour la viscosité inhérente : $y = 18,893$

En calculant la moyenne de ces deux valeurs, on obtient la viscosité intrinsèque: $\eta_{\text{intr}} = 15,687$

Le poids moléculaire moyen sera calculé par l'équation de Mark-Howink :

$$\eta_{\text{int}} = K \cdot M^a$$

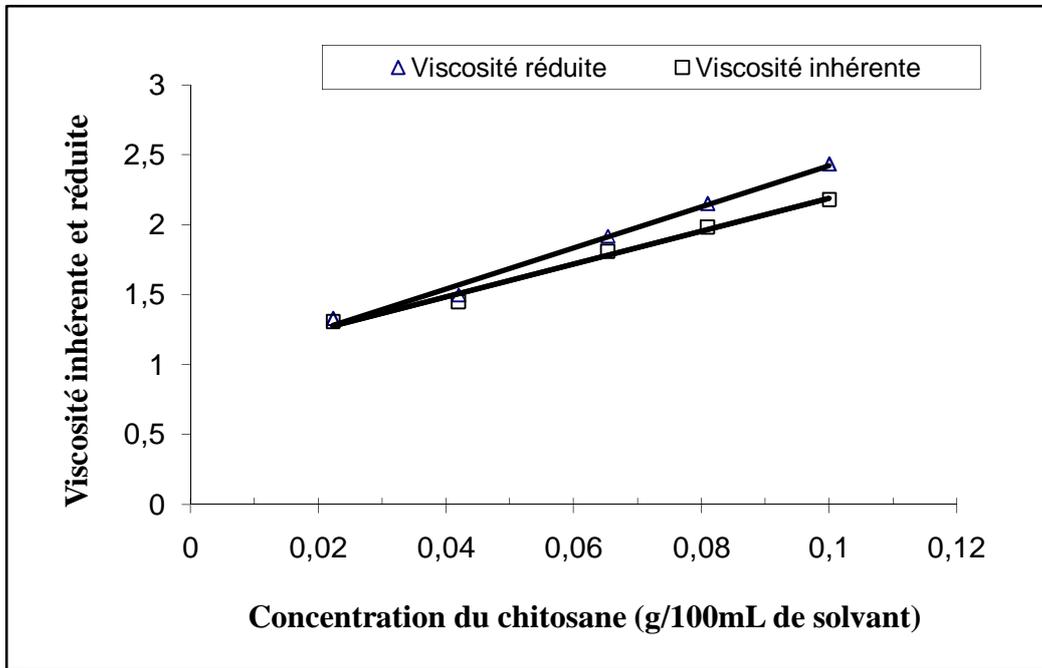
K et a sont des constantes qui dépendent de la température et du solvant, pour la chitine dissoute dans le mélange Diméthyl-acétamide/Chlorure de lithium on a :

$$K = 0,24 \text{ cm}^3/\text{g} \quad \text{et} \quad a = 0,69$$

Enfin, le poids moléculaire moyen de la chitine préparée à partir des carapaces de la crevette blanche (*Parapenaeus Longirostris*) sera :

$$M(\text{chitine}) = 338424,517 \approx 338000 \text{ Dalton}$$

Poids moléculaire viscosimétrique du chitosane



On détermine les ordonnées à l'origine pour chacune des deux droites :

- Pour la viscosité réduite : $y = 1,0161$
- Pour la viscosité inhérente : $y = 0,9527$

En calculant la moyenne de ces deux valeurs, on obtient la viscosité intrinsèque: $\eta_{\text{intr}} = \mathbf{0,9844}$

Le poids moléculaire moyen sera calculé par l'équation de Mark-Howink :

$$\eta_{\text{int}} = K \cdot M^a$$

K et a sont des constantes qui dépendent de la température et du solvant, pour le chitosane dissout dans le mélange Acide acétique (0,2N) / Acétate de sodium (0,3N), on a :

$$K = 0,078 \text{ cm}^3/\text{g} \quad \text{et} \quad a = 0,76$$

Enfin, le poids moléculaire moyen du chitosane préparé à partir des carapaces de la crevette blanche (*Parapenaeus Longirostris*) sera :

$$M(\text{chitosane}) \approx \mathbf{12000 \text{ Dalton}}$$

Milieux de cultures utilisés

Eau peptonnée

- Peptone trypsique 4,5g
- NaCl 1,5g
- Eau distillée 300 mL

Verser délicatement la peptone et le sel dans l'eau à 80°C

Agiter jusqu'à dissolution complète

Compléter avec l'eau distillée la solution à 300 mL

Ajuster le pH à **7,6**

Filtrer sur papier dur

Bouillon T.G.V

- Trypticase 30g/L
- Extrait de levure 20g/L
- Glucose 5 g/L
- Chlorhydrate de cystéine 1g/L
-

pH final = 7,0 – 7,4

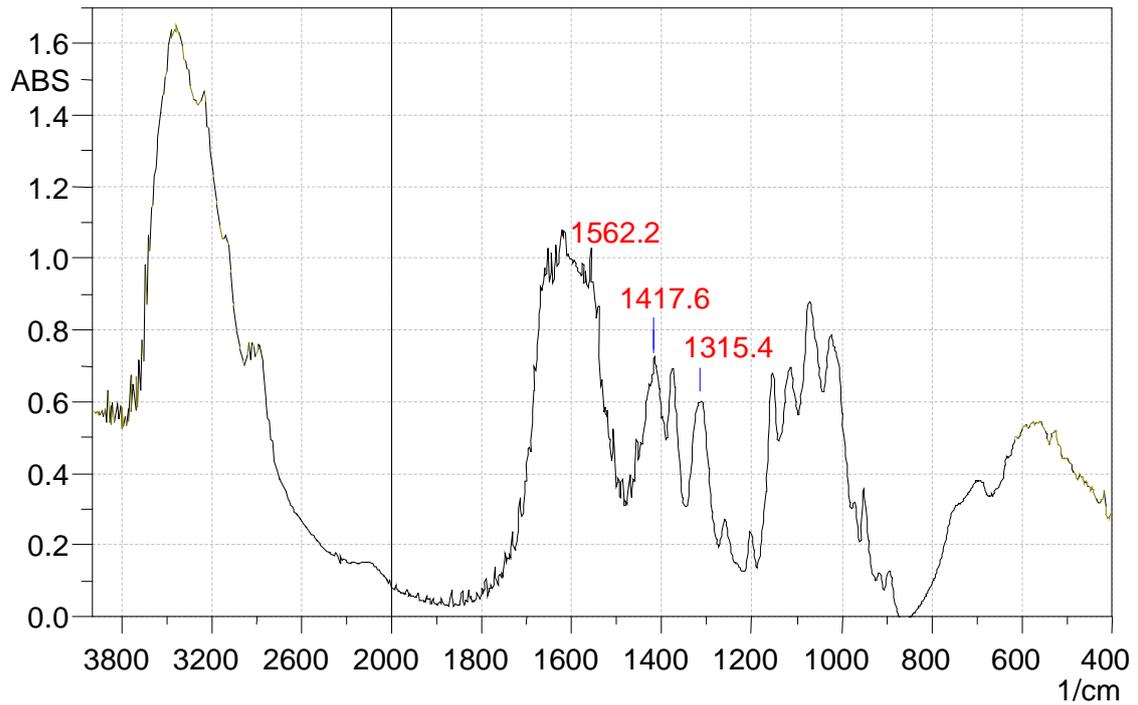
Répartition dans des tubes à essais à raison de 10 mL par litre

Gélose nutritive

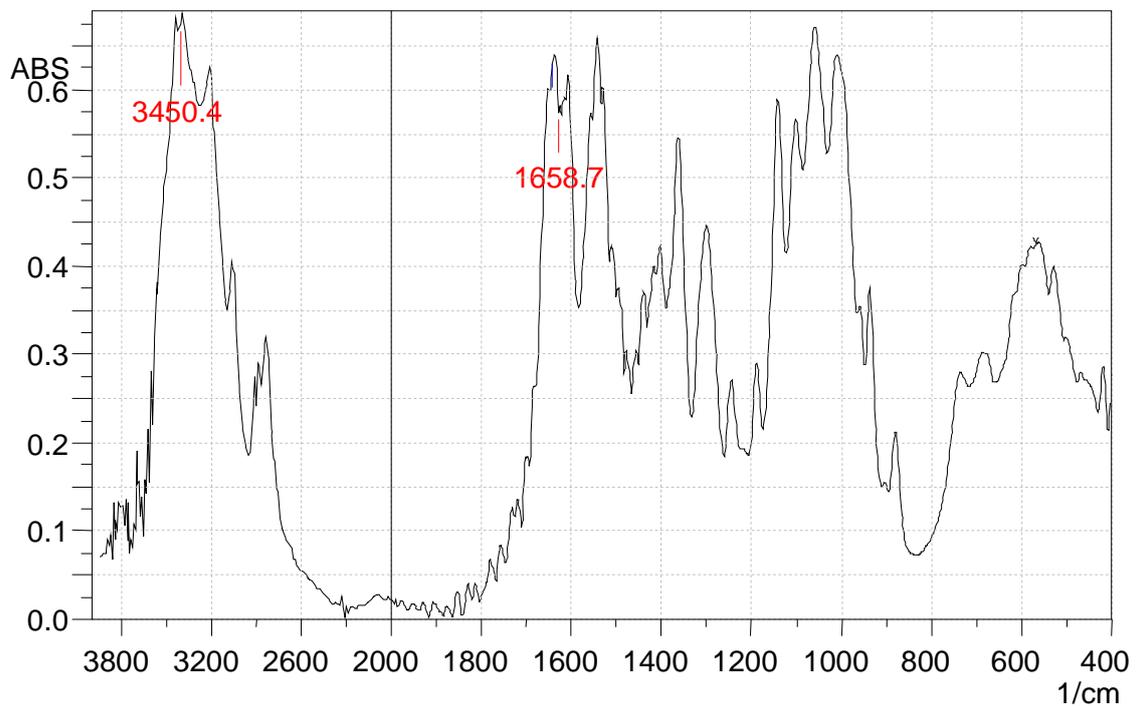
- KHPO₄ 5 g
- KH₂PO₄ 2 g
- MgSO₄ 2 g
- NaCl 0,1g
- NaNO₃ 5 g
- Glucose 15g
- Extrait de levure 3 g
- Eau distillée 1 L

Le pH est ajusté à **7,0**

(a)



(b)



Spectre IR du N,O-Carboxyméthylchitosane (a) et du chitosane (b) préparés à partir de carapaces de crevettes blanches (*P.Longirostris*)