

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département de Génie de l'Environnement

Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés

MEMOIRE DE MAGISTER

Pour l'obtention du titre de

**Magister en Génie de l'Environnement**

Option : **Biotechnologies**

Thème:

***PREPARATION DE CONSERVATEURS :  
CHITOSANE ET CARBOXYMETHYLCHITOSANE A  
PARTIR D'UNE BIOMASSE MARINE***

Présenté par :

**M<sup>r</sup> TAZDAÏT DJABER**

**Ingénieur d'Etat en Génie Biologique (U.S.T.H.B)**

Soutenu le **13 Octobre 2005** devant le jury composé de :

|                       |                                   |            |           |
|-----------------------|-----------------------------------|------------|-----------|
| <b>Président :</b>    | M <sup>r</sup> R.KERBACHI         | Professeur | E.N.P     |
| <b>Promotrice :</b>   | M <sup>m</sup> D.MAMERI           | M.C.       | E.N.P     |
| <b>Co-promoteur :</b> | M <sup>r</sup> M.S. BENHABILES    | C.C.       | U.M.M.T.O |
| <b>Examineurs :</b>   | M <sup>m</sup> C. TOUIL- BOUKEFFA | Professeur | U.S.T.H.B |
|                       | M <sup>r</sup> R. BAKOUR          | Professeur | U.S.T.H.B |
|                       | M <sup>r</sup> T. AHMED ZAID      | M.C.       | E.N.P     |

ENP 10, avenue Hassen Badi, El-Harrach, Alger.

## ملخص

لقد قمنا في اطار عملنا هذا، بضبط عملية استخلاص الكيتين من بقايا الجمبري وقمنا بعد ذلك بتحضير مشتقان للكيتين هما الكيتوزان والكربوكسيميثيل الكيتوزان. ان الشروط المضبوطة لنزع البروتينات هي NaOH بتركيز 2 مول/ل وبكمية 20مل للغرام الواحد وذلك لمدة ساعتين بدرجة حرارة 45°م. أما لنزع المادة المعدنية ينبغي HCL بتركيز 1,5, 1مول/ل بكمية 10مل للغرام الواحد لمدة ساعة. ثم قمنا بتجريب مفعول المشتقين المذكورين أعلاه كعامل للطماطم وذلك باتباع عدة عوامل كاللون، وافي الحموضة، الليونة، نسبة السكريات المرجعة، نسبة الفيتامين س. نلاحظ أن الطماطم المعالجة والمخزونة تحت 20°م هي ذات نوعية أحسن من الطماطم المخزونة تحت حرارة المخبر. ال.2% CC يظهر مفعولا على مستوى اللون والليونة ولكنه لا يظهر مفعولا على تطور السكريات المرجعة والسكريات الكلية. الكلمات المفتاح: كيتين، كيتوزان، كربوكسيميثيلكيتوزان، الطماطم.

## ABSTRACT:

The aim of this work is to optimize the extraction of chitin from waste shrimp shell (*Prapenaeus longirostris*) by chemical treatment, then to prepare two derivatives: chitosan and carboxymethylchitosan. Optimal conditions for deproteinization of shrimp waste were 2N NaOH at 45°C for 2h with a solid to solvent ratio of 1:20(w/v). Optimal demineralization involved treatment with 1,5 N HCl at ambient temperature for 1h with a solid to solvent ratio of 1:10 (w/v). The effect of chitosan and carboxymethylchitosan coating at 0,5% and 2% for prolong storage life of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill) fruit stored at ambient temperature and 20°C for 30 days was investigated. The storage quality conditions including weight loss, color, texture titrable acidity, reducing sugars, total sugars and reduced ascorbic acid were tested. The results showed that the fruit coated and stored at 20°C, had better quality than that stored at ambient temperature. Fruit coated with carboxymethylchitosan at 2% had lower color, texture change. But it had non influence on change of level of both total and reducing sugars.

**Key words:** chitin, chitosan, carboxymethylchitosan, tomato, coating

## RESUME:

Nous avons entrepris dans le cadre de ce travail, l'extraction de la chitine à partir de rejets formés par des carapaces de la crevette (*Prapenaeus longirostris*), par traitement chimique. Nous avons ensuite préparé deux dérivés de la chitine : le chitosane et le carboxyméthylchitosane. Les conditions optimales relatives à la déprotéinisation sont : NaOH à 2 N, avec un rapport masse /volume de 1 :20, à 45°C pendant 2 heures. Celles relatives à la déminéralisation sont : HCl à 1,5 N à température ambiante pendant 1 heure avec un rapport masse/volume égale à 1 :10. Nous avons testé ensuite, l'effet du chitosane et du carboxyméthylchitosane sur le prolongement de la durée de conservation de la tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill), stockée à température ambiante et à 20°C. On a suivi l'évolution des paramètres de qualité suivants : la perte en poids, la couleur, la fermeté, l'acidité titrable, l'acide ascorbique réduit, les sucres réducteurs et les sucres totaux. Les résultats montrent que, les tomates traitées et stockées à 20°C, sont de meilleure qualité que celles stockées à température ambiante. Les paramètres, indice de couleur et indice de texture, évoluent lentement dans les tomates traitées avec le CC2%. Mais ce dernier, semble ne pas influencer l'évolution du taux de sucres totaux et celui des sucres réducteurs.

**Mots clés :** chitine, chitosane, carboxyméthylchitosane, tomate, conservateur.

## **REMERCIEMENTS**

*Mes remerciements iront tout d'abord à Monsieur N. MAMERI, Professeur à l'E.N.P, pour toute l'aide et les orientations judicieuses qu'il m'a apporté et pour sa grande contribution à la réalisation de ce travail.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Madame D. MAMERI, Maître de conférences à l'E.N.P, qui a bien voulu m'encadrer dans la réalisation de ce travail, et pour m'avoir fait profiter de ses conseils éclairés.*

*Je tiens à remercier Monsieur M. S. BENHABLES, chargé de cours à l'U.M.M.T.O, pour son aide précieuse, ses conseils utiles et son soutien amical tout au long de ce travail.*

*J'adresse mes remerciements à Monsieur R. KERBACHI, Professeur à l'E.N.P, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury.*

*Je remercie Madame C. Touil Boukeffa, Professeur à l'U.S.T.H.B, qui a aimablement accepté de faire partie du jury.*

*Je tiens à remercier Monsieur R. Bakour, Professeur à l'U.S.T.H.B, d'avoir accepté d'examiner mon travail.*

*Je remercie Monsieur T. AHMED ZAID, Maître de Conférences à l'E.N.P pour sa participation à ce jury.*

*Je ne saurais oublier Monsieur H. LOUNICI, Maître de Conférences à l'U.M.M.T.O, qui m'a guidé et orienté tout au long de la réalisation de ce travail.*

*A tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail, trouvent dans ces quelques lignes le témoignage de ma reconnaissance et de ma gratitude.*

## *Liste des Tableaux*

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1</b> : Quelques polymères saccharidiques communs.....  | 12 |
| <b>Tableau 2</b> : Composition des carapaces des crustacés.....  | 21 |
| <b>Tableau 3</b> : Paramètres physiques et composition chimique des carapaces de crevette<br><i>Parapenaeus longirostris</i> ..... | 62 |
| <b>Tableau 4</b> : Caractéristiques de la chitine et des chitosanes I et II.....   | 64 |

## *Liste des figures*

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Structure chimique de la D-Glucosamine et du N-Acetyl-D- Glucosamine.....                        | 6  |
| <b>Figure 2</b> : Biosynthèse de la D-Glucosamine et de la N-Acetyl-D-Glucosamin.....                              | 7  |
| <b>Figure 3</b> : Classification des glucides.....   | 8  |
| <b>Figure 4</b> : Production de la crevette entre 1988 et 2002.....  | 15 |
| <b>Figure 5</b> : Structure chimique de la chitine et de la cellulose.....   | 16 |
| <b>Figure 6</b> : Les formes polymorphiques de la chitine.....   | 17 |
| <b>Figure 7</b> : Biosynthèse de la chitine.....   | 20 |
| <b>Figure 8</b> : Structure chimique du chitosane.....   | 26 |
| <b>Figure 9</b> : Obtention du chitosane.....  | 27 |
| <b>Figure 10</b> : Réaction de O-carboxyméthylation de la chitine.....   | 30 |
| <b>Figure 11</b> : Réaction de N-carboxyméthylation du chitosane.....  | 31 |
| <b>Figure 12</b> : Viscosimètre de type Ubbelohde.....   | 50 |
| <b>Figure 13</b> : Variation de la perte de poids de la tomate durant le stockage à température<br>ambiante.....   | 67 |
| <b>Figure 14</b> : Variation de la perte de poids de la tomate durant le stockage à 20°C.....                      | 68 |
| <b>Figure 15</b> : Variation de l'indice de couleur de la tomate durant le stockage à température<br>ambiante..... | 69 |
| <b>Figure 16</b> : Variation de l'indice de couleur de la tomate durant le stockage à 20°C.....                    | 71 |
| <b>Figure 17</b> : Variation de l'indice de fermeté de la tomate durant le stockage à température<br>ambiante..... | 72 |
| <b>Figure 18</b> : Variation de l'indice de fermeté de la tomate durant le stockage à 20°C.....                    | 73 |
| <b>Figure 19</b> : Variation de l'acidité titrable de la tomate durant le stockage à température<br>ambiante.....  | 74 |
| <b>Figure 20</b> : Variation de l'acidité titrable de la tomate durant le stockage à 20°C.....                     | 75 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 21</b> : Variation de la teneur en A.A.R de la tomate durant le stockage à température ambiante.....             | 76 |
| <b>Figure 22</b> : Variation de la teneur en A.A.R de la tomate durant le stockage 20°C.....                               | 77 |
| <b>Figure 23</b> : Variation de la teneur en sucres réducteurs de la tomate durant le stockage à température ambiante..... | 78 |
| <b>Figure 24</b> : Variation de la teneur en sucres réducteurs de la tomate durant le stockage à 20°C.....                 | 79 |
| <b>Figure 25</b> :Variation de la teneur en sucres totaux de la tomate durant le stockage à température ambiante.....      | 80 |
| <b>Figure 26</b> : Variation de la teneur en sucres totaux de la tomate durant le stockage à 20°C...                       | 81 |

## *Table des matières*

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCTION</b> .....  | 1  |
| <b>I. GENERALITES</b> .....  | 4  |
| I-1 Les sucres.....  | 5  |
| I.1.1 Classification des glucides.....                                   | 5  |
| I.1.1.1 Les oses.....  | 5  |
| a) Les sucres aminés et leurs dérivés.....                               | 5  |
| b) Biosynthèse de la D-Glucosamine et de la N-Acétyl-D-Glucosamine.....  | 6  |
| I.1.1.2 Les osides.....  | 7  |
| a) Holosides .....   | 7  |
| a.1) Les oligosides ou oligosaccharides.....                             | 7  |
| a.2) Les polyosides ou polysaccharides .....                             | 7  |
| b) Les hétérosides.....  | 7  |
| b.1) Les O-hétérosides .....   | 8  |
| b.2) Les N-hétérosides.....  | 8  |
| b.3) Les C-hétérosides.....  | 8  |
| b.4) Les S-hétérosides .....   | 8  |
| I.1.1.3 Propriétés chimiques des oses.....                               | 9  |
| a) Stabilité chimique des oses .....                                     | 9  |
| a.1) En milieu acide.....  | 9  |
| a.2) En milieu alcalin.....  | 9  |
| b) Propriétés chimiques dues à la présence de la fonction carbonyle..... | 10 |
| b.1) Réduction des oses.....   | 10 |
| b.2) Oxydation des oses .....  | 10 |
| I.1.2 Etude descriptive de quelques oligosides naturels courants.....    | 11 |
| a) Le saccharose.....  | 11 |
| b) Le tréhalose.....   | 11 |
| c) Le maltose.....   | 11 |
| d) Le lactose .....  | 11 |
| I.1.3 Rappel théorique sur les polymères.....                            | 12 |
| I.1.4 Etude descriptive de quelques polymères naturels (polyosides)..... | 13 |
| I.1.4.1 Les arabanes.....  | 13 |
| I.1.4.2 Les xylanes.....   | 13 |
| I.1.4.3 L'amidon.....  | 11 |
| I.1.4.4 L'amylose.....   | 13 |
| I.1.4.5 L'amylopectine .....   | 13 |
| I.1.4.6 Le glycoène.....   | 14 |
| I.1.4.7 La cellulose.....  | 14 |
| I.1.4.8 La chitine.....  | 14 |
| a) Caractérisation de la chitine.....                                    | 15 |
| a.1) structure chimique.....   | 15 |
| a.2) Degré d'acétylation.....  | 17 |
| a.3) Solubilité.....   | 18 |
| a.4) Le poids moléculaire.....   | 19 |
| b) Biosynthèse de la chitine .....                                       | 19 |
| c) Extraction de la chitine.....   | 21 |

|   |    |
|---|----|
| c.1) Procédé chimique.....  | 22 |
| c.1.1) La déminéralisation.....   | 23 |
| c.1.2) La déprotéinisation.....   | 23 |
| c.2) Procédé biologique.....  | 24 |
| d) Dérivés de la chitine.....   | 25 |
| d.1) Le chitosane.....  | 25 |
| d.1.1) Solubilité du chitosane.....   | 27 |
| d.2) Dérivés carboxyméthylés de la chitine et du chitosane.....                           | 29 |
| e) Quelques applications de la chitine du chitosane et de leurs dérivés carboxyméthylés.. | 31 |
| e.1) Agro-alimentaire.....  | 31 |
| e.1.1) Propriétés coagulantes.....  | 31 |
| e.1.2) Immobilisation de cellules et d'enzymes.....                                       | 22 |
| e.2) Environnement.....   | 32 |
| e.2.1) Traitement des eaux usées.....   | 32 |
| e.2.2) Valorisation des déchets.....  | 33 |
| e.3) Domaine Sanitaire.....   | 33 |
| e.3.1) Propriétés cicatrisantes.....  | 33 |
| e.3.2) Propriétés immunologiques et antitumorales.....                                    | 34 |
| e.3.3) Propriétés hypocholestérolémiantes.....  | 34 |
| e.3.4) Propriété antioxydante.....  | 34 |
| e.4) Agriculture.....   | 35 |
| e.4.1) Protection des plantes, des fruits et des semences.....                            | 35 |

## **II. MATERIEL ET METHODES .....37**

|  |    |
|--|----|
| II.1 Préparation de la chitine et de ces dérivés.....                                    | 38 |
| II-1-1 Classification de l'espèce.....   | 38 |
| II.1.2 Prétraitement des carapaces.....  | 38 |
| II.1.3 Analyse physico-chimique des carapaces.....                                       | 39 |
| II.1.3.1 Le taux de cendre.....  | 39 |
| II.1.3.2 La teneur en chitine.....   | 39 |
| II.1.3.2.1 Principe de la méthode.....   | 39 |
| II.1.3.2.2 Préparation de la gamme étalon.....   | 40 |
| II.1.3.3 Teneur en protéines.....  | 41 |
| II.1.3.3.1 Rappel du principe de la méthode.....   | 41 |
| a) Minéralisation.....   | 42 |
| a.1) L'essai.....  | 42 |
| a.2) Le blanc.....   | 42 |
| b) Distillation de l'ammoniac du minéralisât.....  | 42 |
| c) Dosage de l'ammoniac distillé.....  | 42 |
| II.1.3.4 Détermination de la densité.....  | 44 |
| a) Densité apparente.....  | 44 |
| b) Densité réelle.....   | 44 |
| II.1.4 Optimisation de l'extraction de la chitine à partir des déchets de carapaces..... | 45 |
| II.1.4.1 Optimisation des conditions de la déminéralisation.....                         | 45 |
| II.1.4.2 Optimisation des conditions de la déprotéinisation.....                         | 46 |
| a) Principe de la méthode.....   | 47 |
| b) Gamme d'étalonnage.....   | 47 |
| c) Dosage des protéines.....   | 47 |

|  |           |
|--|-----------|
| II.1.4.3 Post-traitement de la chitine : décoloration et blanchiment.....                        | 48        |
| II.1.5 Préparation du chitosane.....   | 48        |
| II.1.5.1 Protocole 1.....  | 48        |
| II.1.5.2 Protocole 2.....  | 48        |
| II.1.6 Préparation du N.O- Carboxyméthyle chitosane.....   | 49        |
| II.1.7 Caractérisation des produits préparés.....  | 49        |
| II.1.7.1 Le taux de cendres.....   | 49        |
| II.1.7.2 Poids moléculaire.....  | 49        |
| a) Description.....  | 50        |
| b) Mode de remplissage.....  | 50        |
| II.1.7.3 Degré de d'acétylation (DA).....  | 52        |
| II.1.7.4 Contrôle de la qualité microbiologique des polymères préparés.....                      | 52        |
| II.1.7.5 Détermination de la densité.....  | 53        |
| II.2 Application du chitosane et de son dérivé carboxyméthylé dans la protection d'un fruit..... | 53        |
| II.2.1 Préparation des tomates.....  | 53        |
| II.2.2 Préparation des solutions de chitosane et carboxyméthylchitosane.....                     | 54        |
| II.2.3 Suivi des paramètres physico-chimiques durant le stockage.....                            | 54        |
| A) Les paramètres physiques.....   | 54        |
| A1) Le poids.....  | 54        |
| A2) L'indice de couleur.....   | 55        |
| A3) La texture : (indice de fermeté).....  | 55        |
| B) Les paramètres chimiques.....   | 55        |
| B1) Dosage de l'acidité titrable.....  | 55        |
| B2) Dosage des sucres réducteurs.....  | 55        |
| B2.1) Principe de la méthode.....  | 56        |
| B2.2) Gamme d'étalonnage.....  | 56        |
| B2.3) Dosage de l'essai.....   | 57        |
| B3) Dosage des sucres totaux.....  | 57        |
| B3.1 Principe de la méthode.....   | 57        |
| B3.2 Préparation de la gamme d'étalonnage.....   | 57        |
| B3.3 Dosage de l'essai.....  | 58        |
| B4 Dosage de l'acide ascorbique (vitamine C).....  | 58        |
| B4.1 Principe du dosage.....   | 58        |
| B4.2 Extraction de la vitamine C.....  | 59        |
| B4.3 Etalonnage du D.C.P.I.P.....  | 59        |
| B4.4 Dosage de l'essai.....  | 60        |
| B4.5 Formules littérales.....  | 60        |
| <b>III. RESULTAT ET DISCUSSION.....</b>  | <b>61</b> |
| III.1 Composition chimique des carapaces.....  | 62        |
| III.2 Optimisation de l'extraction de la chitine.....  | 63        |
| III.2.1 Optimisation des conditions de la déminéralisation.....                                  | 63        |
| III.2.2 Optimisation des conditions de la déprotéinisation.....                                  | 63        |
| III.3 Caractérisation de la chitine et des chitosanes produits.....                              | 64        |
| III.3.1 Poids moléculaire.....   | 64        |
| III.3.2 Le Degré de Déacétylation (DD).....  | 65        |
| III.3.3 La densité apparente.....  | 66        |
| III.3.4 Le taux de cendre.....   | 66        |

|   |           |
|---|-----------|
| III.3.5 La flore totale.....  | 67        |
| III.4 Application des polymères préparés dans le prolongement de la période de stockage de la tomate..... | 67        |
| III.4.1 Variation du paramètre poids durant le stockage.....  | 67        |
| III.4.2 Variation du paramètre indice de couleur durant le stockage.....                                  | 69        |
| III.4.3 Variation du paramètre indice de fermeté durant le stockage.....                                  | 72        |
| III.4.4 Variation de l'acidité titrable durant le stockage.....   | 73        |
| III.4.5 Variation de la teneur en acide ascorbique réduit durant le stockage.....                         | 75        |
| III.4.6 Variation de la teneur en sucres réducteurs durant le stockage.....                               | 77        |
| III.4.7 Variation de la teneur en sucres totaux durant le stockage.....                                   | 74        |
| <b>IV. CONCLUSION.....</b>  | <b>82</b> |
| <b>V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>  | <b>84</b> |
| <b>VI. ANNEXE.....</b>  | <b>95</b> |

L'activité humaine, particulièrement industrielle, produit des quantités phénoménales de déchets. Certains de ces déchets ont une grande valeur que la biotechnologie permet de matérialiser.

Présentant certaines particularités dans l'immense champ du secteur agroalimentaire, le secteur des produits marins englobe une quantité impressionnante de produits, de marchés et d'acteurs commerciaux et industriels. Il s'agit d'un secteur complexe et encore souvent mal appréhendé dans sa réalité statistique à l'échelle internationale. Pour ces raisons, les produits de la mer demeurent un secteur d'activité qu'il est difficile de quantifier de manière rigoureuse.

Les déchets de la production commerciale piscicole et coquillière et de la transformation des produits de la mer sont, synonymes de problème, mais ils offrent également d'excellentes possibilités d'exploitation. L'élimination de ces déchets a toujours été dispendieuse et a souvent eu un impact nuisible sur l'environnement. La pratique courante dans l'industrie de la pêche commerciale, à savoir de rejeter à la mer les prises accessoires, a également eu un impact négatif sur l'environnement. En effet, pendant longtemps, les conserveries de crustacés produisaient de grande quantité de déchets qui n'étaient pas recyclés et étaient simplement rejetés à la mer, créant de sérieux problèmes de pollution au voisinage des sites de production. D'après les données statistiques fournies par la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture), et à titre d'exemple, la production globale de crevettes, toutes espèces confondues, issues de la pêche et des élevages aquacoles, a augmenté de 4 millions de tonnes durant l'année 1999. Ce qui conduit, à une augmentation inévitable des déchets de l'industrie de la crevette, et avec elle l'augmentation des risques de pollution. Mais grâce aux progrès techniques et au développement des marchés, il est maintenant possible, de transformer ce flux de déchets en produits utiles et commercialisables.

La découverte de la chitine et de son dérivé désacétylé (chitosane) date du 18<sup>ème</sup> siècle, mais ce n'est que dans les années 1970 que ces polymères ont suscité un réel intérêt.

Dans le règne animal, la chitine est un élément structural important des téguments de certains invertébrés tels que les insectes, les mollusques, les crustacés et les nématodes. Dans le règne végétal, elle n'est signalée que dans les parois des champignons et de certaines algues chlorophycées. C'est un polymère de haut poids moléculaire, formé d'unités de N- Acétyl-Glucosamine.

Le champ d'application de la chitine et du chitosane est vaste. Ces deux polymères intéressent tout autant les industries pharmaceutique et cosmétique que l'agriculture et les industries des pâtes et papier ou du textile. Le chitosane notamment, sert à séparer des protéines, inhiber l'activité de tumeurs, contrôler le cholestérol sanguin, fabriquer de la peau artificielle ou des fils chirurgicaux biodégradables. Il entre dans la composition de crèmes hydratantes, de shampooings, de dentifrices. Il est utilisé comme agent antifongique ou de conservation.

En l'absence de données statistiques concernant la consommation, dans notre pays, de crustacés en général et celle des crevettes en particulier, on connaît mal l'impact négatif que peuvent avoir ces déchets sur notre environnement proche.

Dans cette optique, nous nous sommes attelés, dans le cadre de ce travail, à valoriser les déchets, constitués de carapaces de crevette appartenant à l'espèce *Parapenaeus longirostris* communément appelée crevette blanche, et typique de la mer méditerranée. Nous avons dans un premier temps, optimisé l'extraction de la chitine par voie chimique. Laquelle chitine, nous a servi pour préparer et caractériser deux de ces dérivés à savoir le chitosane et le carboxyméthylchitosane. Nous avons ensuite utilisés ces polymères comme agents conservateurs, dans le cadre d'une application dans le domaine agronomique visant à prolonger la durée de stockage d'un fruit. Notre choix a porté sur la tomate, car elle constitue un fruit de large consommation dans notre pays. Par ailleurs, une bonne partie de la culture de la tomate est réalisée dans le sud, son acheminement vers les régions du nord se fait par voie terrestre, ce qui requiert une durée de conservation plus importante durant le transit.

## **I-1 Les sucres :**

Tant par leur rôle métabolique que par leur rôle importance économique, les glucides constituent l'une des plus importantes classes de composés biologiques. Ce sont les corps formés en premier au cours de la photosynthèse, à partir du dioxyde de carbone et de l'eau, si bien qu'on peut les considérer comme étant actuellement à la base de tous les composés organiques du monde vivant.

De façon très générale, les glucides peuvent être définis comme des composés organiques comportant des fonctions carboxylées (aldéhydrique ou cétonique) et des fonctions alcooliques. Certains de leurs dérivés sont également porteurs de fonctions supplémentaires : acides, amines (Percheron *et al*, 1981).

Les glucides sont des composés naturels largement répandus chez tous les êtres vivants : (Louisot, 1983) (a)

- soit comme éléments de structure : cellulose des végétaux, chitine des invertébrés, ou polysaccharides des parois ectoplasmiques des bactéries ;
- soit comme réserves énergétiques : glycogène des animaux ;
- soit comme composants de métabolites fondamentaux : glucides qui rentrent dans la constitution des acides nucléiques et des coenzymes ;

### **I.1.1 Classification des glucides :**

Par complexité croissante, on distingue : (Percheron *et al*, 1981)

#### **I.1.1.1 Les oses :**

Ce sont des composés de formule brute  $C_n(H_2O)_p$ , caractérisés par la présence de :

- Une fonction carbonylée : aldéhydrique (aldoses) ou cétonique (cétoses).
- (n-1) fonction alcool.

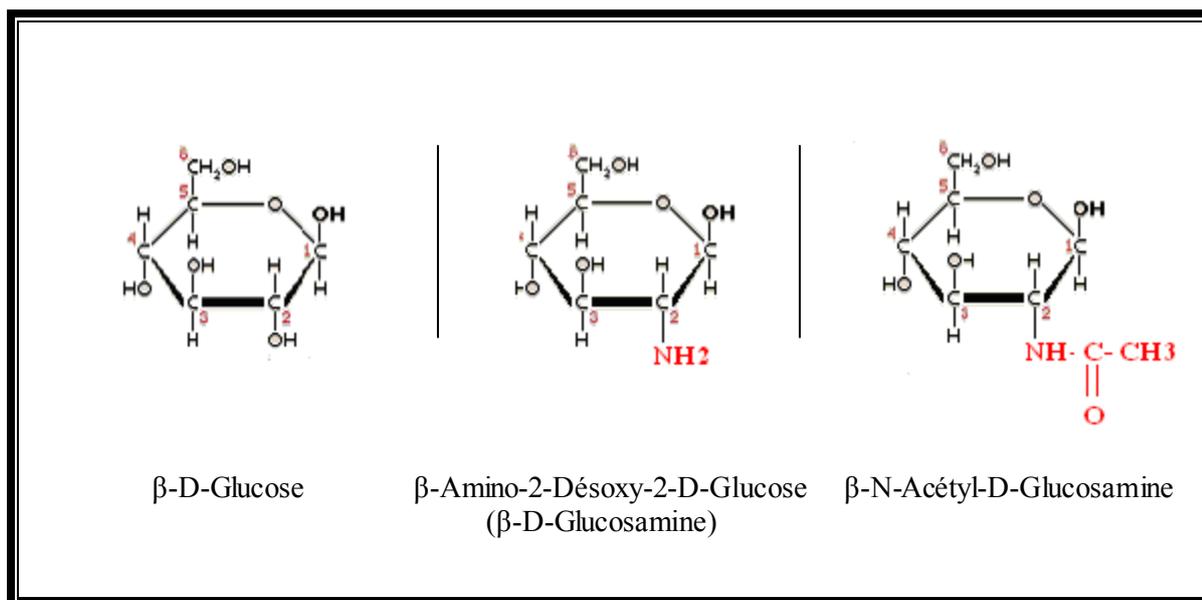
Le nombre d'atome de carbone peut s'élever jusqu'à 9.

Les oses possèdent de nombreux dérivés, parmi ces dérivés on citera à titre d'exemple :

#### **a) Les sucres aminés et leurs dérivés :**

Les sucres aminés ou (osamines), essentiellement des hexosamines, qui correspondent dans la nomenclature moderne aux 2-Amino-2-Désoxyhexoses, sont des oses dans lesquels un

hydroxyle alcoolique est remplacé par un groupement  $\text{NH}_2$ . Par exemple la D-Glucosamine correspond au D-Glucose. Les osamines sont rarement à l'état libre, mais se retrouvent sous forme combinée dans de nombreux polysaccharides ainsi que dans les glycoprotéines. Le plus souvent dans ces composés, elles sont présentes sous forme dérivé-N-acétylé. Par exemple la N-Acétyl-D-Glucosamine (Figure1).



**Figure 1 : Structure chimique de la D-Glucosamine et du N-acétyl-D-Glucosamine.**

Les sucres aminés sont caractérisés par la réaction d'Elson et Morgan (1933). En milieu alcalin, ils se cyclisent en forme furanique, qui, par élimination d'une molécule d'eau, acquiert une double liaison.

Le produit ainsi formé réagit avec le paradiméthylaminobenzaldéhyde pour donner un colorant rouge. Ils réagissent également avec le réactif à la ninhydrine (Chapeville, Clauser, 1974).

### **b) Biosynthèse de la D-Glucosamine et de la N-Acétyl-D-Glucosamine :**

Les hexosamines, spécialement la glucosamine et la galactosamine, sont synthétisées dans l'organisme à partir du D-Fructose-6-phosphate. Le donneur de groupement aminé est la glutamine.

Le plus souvent, les hexosamines sont présentes dans les structures biologiques sous forme N-acétylée.

La figure 2 schématise les étapes de cette biosynthèse (Louisot, 1983) (b).

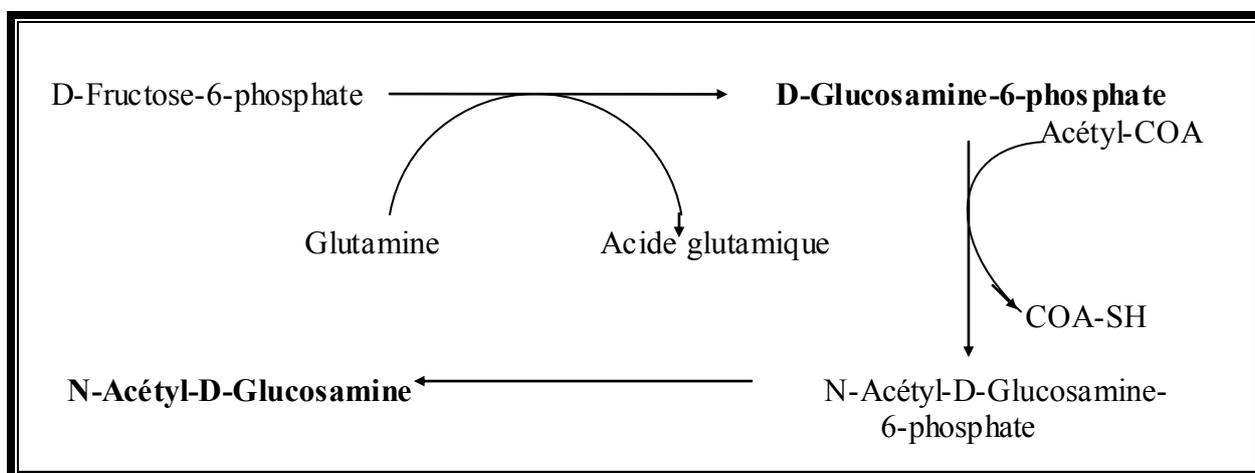


Figure 2 : Biosynthèse de la D-Glucosamine et de la N-Acétyle-D-Glucosamine.

### I.1.1.2 Les osides :

Ils résultent de la combinaison de plusieurs molécules d'oses, ou d'oses avec des composés non glucidiques, par des liaisons appelées «osidiques».

Les osides libèrent des oses par hydrolyse acide.

Ce groupe très vaste est subdivisé en :

#### a) Holosides :

Composés dont l'hydrolyse acide ne libère que des oses, et chez lesquels on distingue :

##### a.1) Les oligosides ou oligosaccharides :

Constitués par la combinaison de 2 à 10 molécules d'oses.

##### a.2) Les polysides ou polysaccharides :

Constitués par plus de 10 molécules d'oses combinés par des liaisons osidiques.

#### b) Les hétérosides :

Dont l'hydrolyse acide libère une ou plusieurs molécules d'oses, et une substance non glucidique appelée «aglycone».

Suivant le type de la liaison entre un ose et l'aglycone, on distingue :

**b.1) Les O-hétérosides :**

Liaison entre l'ose et une fonction alcool ou phénol de l'aglycone. Ce sont les plus fréquents, désignés le plus souvent sans autre précision sous le nom de glycosides.

**b.2) Les N-hétérosides :**

Liaison de l'ose avec un groupe azoté de l'aglycone. Les exemples les plus importants sont ceux des nucléotides des acides nucléïques.

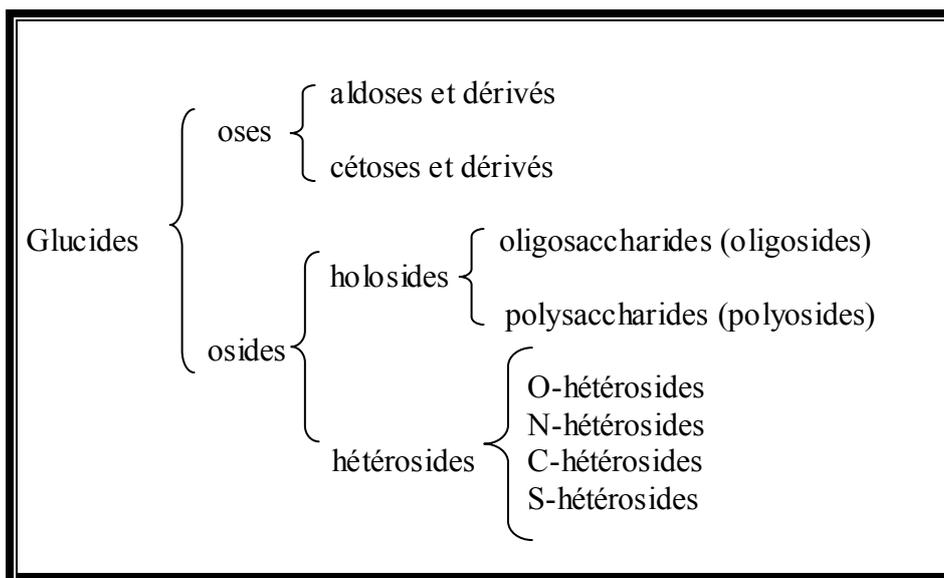
**b.3) Les C-hétérosides :**

Liaison directe entre un carbone de l'ose et un carbone de l'aglycone.

**b.4) Les S-hétérosides :**

Mettant en jeu un groupe soufré de l'aglycone, ce type d'hétéroside se rencontre chez divers végétaux.

L'ensemble de la classification est résumé sur la figure 3.



**Figure 3 : Classification des glucides.**

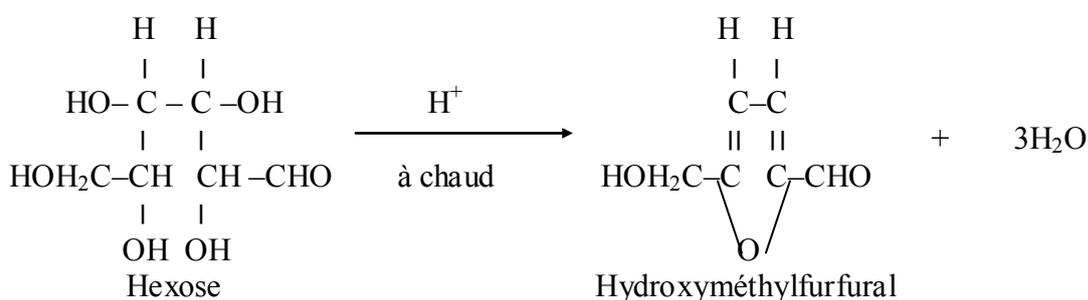
### I.1.1.3 Propriétés chimiques des oses : (Louisot, 1983) (a)

Les oses sont très solubles dans l'eau. Ils cristallisent difficilement en solution aqueuse, mais cette cristallisation est favorisée par la présence d'un alcool. Ils sont peu solubles dans l'éthanol, mais ils sont plus facilement solubles dans le méthanol et dans la pyridine. Ils n'absorbent pas dans l'ultraviolet, mais ils possèdent un spectre infrarouge caractéristique.

#### a) Stabilité chimique des oses :

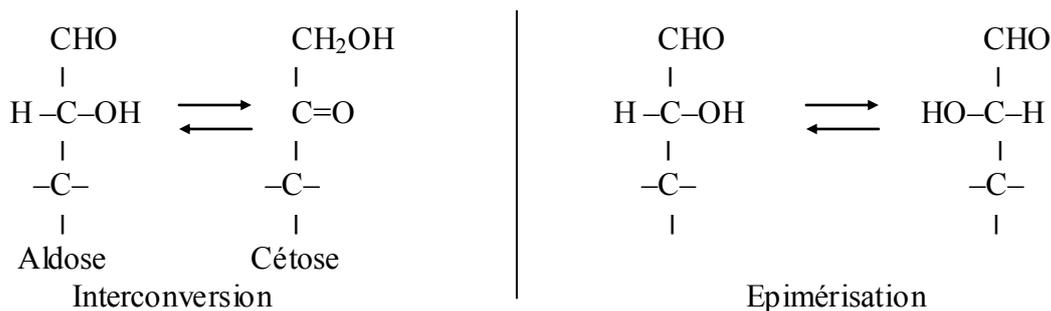
##### a.1) En milieu acide :

Les acides forts suffisamment concentrés et à chaud, sont capables de déshydrater les oses en donnant naissance à des composés hétérocycliques dérivés du furane. Les pentoses conduisent au furfural, et les hexoses à l'hydroxyméthylfurfural. Dans le cas des hexoses, on a :



##### a.2) En milieu alcalin : (Louisot, 1983) (a)

Les oses donnent à froid, en milieu alcalin, soit une interconversion, soit une épimérisation :



En milieu alcalin à chaud, la dégradation de l'ose est totale.

## **b) Propriétés chimiques dues à la présence de la fonction carbonyle :**

### **b.1) Réduction des oses :**

La réduction des oses donne des polyalcools. On peut réduire la fonction carbonyle par voie chimique :

-soit par hydrogénation catalytique, sur noir platine ou nickel Raney ;

-soit par action de l'hydrure de bore et de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) sur l'ose en solution aqueuse :

Par exemple, la réduction de la fonction carbonyle du D-glucose conduit au D-sorbitol. Ces réductions ne sont pas réversibles par voie chimique, mais elles le sont par voie enzymatique.

### **b.2) Oxydation des oses :**

Les oxydants doux, comme le brome ou l'iode en milieu alcalin, l'acide nitrique très dilué, oxydent la fonction aldéhydique des aldoses en groupement carboxylique, conduisent à la formation d'un acide aldonique. L'oxydation plus poussée des aldoses par l'acide nitrique, oxyde la fonction alcool primaire en même temps que la fonction carbonyle. On obtient ainsi des diacides, appelés acides glycariques, ou encore acides aldariques.

L'oxydation des cétooses par l'acide nitrique conduit à une coupure de la molécule. En milieu alcalin, de nombreux cations métalliques oxydent les oses (les aldoses comme les cétooses). C'est le cas de la liqueur de Fehling. Il y a oxydation de l'ose par l'oxyde cuivrique, qui se réduit à l'état d'oxyde cuivreux rouge. La réaction n'est pas stoechiométrique (Louisot, 1983) (a).

L'acide périodique,  $\text{HIO}_4$ , exerce une action oxydante fort intéressante, mise en évidence par Malaprade sur les polyols. Appliqué ensuite à de nombreux composés glucidiques ce réactif s'est révélé un outil remarquable aussi bien au plan analytique que pour l'étude des structures des glucides. D'une façon très générale, l'acide périodique oxyde les composés possédant des fonctions alcool, aldéhyde et (ou) cétone contiguës. L'oxydation

entraîne la rupture de la liaison qui unissait les carbones porteurs des fonctions subissant l'oxydation (Percheron *et al.*, 1981).

### **I.1.2 Etude descriptive de quelques oligosides naturels courants :** (Louisot, 1983) (a)

#### **a) Le saccharose :**

Très répandu dans tous les végétaux, en particulier dans la betterave et la canne à sucre, il donne par hydrolyse : glucose + fructose. Puisque le saccharose est non réducteur, les deux molécules constitutives sont donc reliées par leurs fonctions hémiacétaliques. Le saccharose est l' $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2) D-Fructofuranose.

#### **b) Le tréhalose :**

C'est le sucre des champignons et de certains insectes. Il résulte de l'union de deux molécules de glucose par leurs groupements pseudo-aldéhydiques. C'est l' $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)  $\alpha$ -D-Glucopyranose.

#### **c) Le maltose :**

Par hydrolyse, il donne deux molécules de glucose. C'est l' $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4) D-Glucopyranose. C'est le produit de la dégradation de l'amidon et du glycogène.

#### **d) Le lactose :**

C'est le sucre du lait. A l'hydrolyse, il donne une molécule de glucose et une molécule de galactose. Le lactose est le  $\beta$ -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4) D-Glucopyranose.

### I.1.3 Rappel théorique sur les polymères :

La très grande variété des systèmes polymères a amené les scientifiques et les industriels à les classer dans différentes catégories en fonction de leurs structures, de leurs natures, ou encore de leurs applications. Les polymères peuvent ainsi être d'origine naturelle (bactérienne, animale ou végétale) ou synthétique, neutres ou chargés, flexibles ou rigides. En effet, en milieu aqueux, certains polysaccharides (polymères d'origine naturelle) portent des charges positives ou négatives et deviennent ainsi des polyélectrolytes.

On peut classer les polyélectrolytes dans différentes catégories :

- Les polyélectrolytes flexibles.
- Les polyélectrolytes semi rigides ou semi flexibles.
- Les polyélectrolytes rigides.

L'existence des charges confère aux solutions de polyélectrolytes des propriétés physico-chimiques remarquables qui donnent lieu à de nombreuses applications industrielles dans l'agro-alimentaire, la médecine, les cosmétiques, l'industrie papetière ou pétrolière (Esquenet, 2003).

Le tableau suivant décrit quelques polymères communs

**Tableau 1 : Quelques polymères saccharidiques communs.**

| Polymère       | Monomère   | Liaison                        | Structure | Source                |
|----------------|--|--------------------------------|-----------|-----------------------|
| Cellulose      | Glucose  | $\beta$ (1-4)                  | rigide    | plantes, champignons  |
| Chitine        | N-acétyl-glucosamine                             | $\beta$ (1-4)                  | rigide    | insectes, champignons |
| Chitosane      | 70% glucosamine<br>30% N-acétyl- glucosamine     | $\beta$ (1-4)                  | rigide    | insectes              |
| Mannane        | Mannose  | $\beta$ (1-4)                  | flexible  | plantes               |
| Xylane         | Xylopyranose                                     | $\beta$ (1-4)                  | tordu     | plantes               |
| Peptidoclycane | 50% N-acétyl- glucosamine<br>50% acide muramique | $\beta$ (1-4)<br>$\beta$ (1-4) | rigide    | parois bactériennes   |
| Amidon         |  |                                |           | plantes               |
| Amylose        | Glucopyranose                                    | $\alpha$ (1-4)                 | flexible  |                       |
| Amylopectine   | Glucopyranose                                    |                                | flexible  |                       |

## **I.1.4 Etude descriptive de quelques polymères naturels (polyosides) :**

### **I.1.4.1 Les arabanes :**

Ce sont des constituants des pectines contenues dans les parois cellulaires des végétaux. Les arabanes n'ont pas un poids moléculaire très élevé et résultent de la condensation d'unités arabinoses, sous la forme L-arabofuranose. La liaison osidique des arabanes est une liaison  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 5).

### **I.1.4.2 Les xylanes :**

Ce sont des polyosides des végétaux. Les xylanes résultent de la combinaison d'unités d'un pentose, le xylose (ou sucre du bois), sous forme de xylopyranose, unis par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4).

### **I.1.4.3 L'amidon :**

C'est la réserve glucidique essentielle du monde végétal, ce qui explique son importance dans l'alimentation humaine. Les sources essentielles en sont les graines de céréales (blé, maïs, riz) et certains tubercules (pommes de terre). L'amidon est constitué de deux substances différentes :

- 15 à 30 % d'amylose.
- 70 à 85% d'amylopectine (ou iso amylose).

### **I.1.4.4 L'amylose :**

C'est un polymère à chaîne linéaire résultant de la condensation d'unités de D-Glucose par des liaisons osidiques  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4).

### **I.1.4.5 L'amylopectine :**

Elle est constituée de chaînes de D-Glucose unis par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), ces chaînes étant elles même ramifiées par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6).

#### **I.1.4.6 Le glycogène :**

Il a été isolé du foie par Claude Bernard en 1856. C'est l'équivalent animal de l'amidon végétal. On le trouve même chez les bactéries, les algues et les levures. Le glycogène résulte de la condensation d'unités D-Glucose par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) formant des chaînes réunies par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6).

#### **I.1.4.7 La cellulose :**

La molécule de cellulose résulte de la condensation exclusivement linéaire de plus de 10000 unités de D-Glucose, unies entre elles par des liaisons osidiques  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4).

#### **I.1.4.8 La chitine :**

La molécule de chitine fut décrite pour la première fois en 1811 par Henri Braconot, membre de l'Académie Française des Sciences, au cours de ces travaux sur les moisissures. Il obtint un produit par traitement alcalin, qu'il nomma "fungine". Odier en 1823 découvre la même substance dans la cuticule des insectes, qu'il nomma "chitine"(Kerkut, Gilbert, 1985).Le terme chitine dérive du mot grec *chiton* qui signifie enveloppe (Shahidi *et al.*, 1999). La composition chimique de la chitine fut décrite en 1878 par Ledderhose et confirmée par Gilson en 1894 (Kerkut, Gilbert, 1985).

La chitine est le deuxième biopolymère naturel le plus abondant dans la nature après la cellulose (Shahidi *et al.*, 1999 ; Weber, 2000 ; Rolland, Mumper, 2001). Sa biosynthèse annuelle d'origine marine est estimée à plus de  $10^9$  tonnes (Felt, 1999). C'est un biopolymère biodégradable et biorésorbable, deux propriétés primordiales à notre époque où la protection de l'environnement joue un rôle important. De plus, la chitine est non toxique et biocompatible (Campana, Signini, 2001). Largement présente au sein du règne animal, elle constitue le squelette polysaccharidique de plusieurs groupes : arthropodes, annélides, mollusques et coelentérés (Kerkut, Gilbert, 1985). Elle est largement extraite à partir des carapaces de crustacés comme les crabes ou les crevettes (Qaqish, Amiji, 1999 ; Mansencal, 1999), chez quelques mollusques (huîtres, krill, palourde, calmar) (Mansencal, 1999). Elle constitue un sous produit des industries poissonnières (Kim, Han, 2002 ; Jeon *et al.*, 2000). Ainsi le traitement annuel des rejets de conserveries de crustacés fournit environ 37300 tonnes de chitine de par le monde (Yang *et al.*, 2000). On la trouve également dans la paroi fongique

(Roy *et al.*, 2003 ; Bouarab, 2002) et dans le cartilage des bovins (Austin, 1977). La production, les propriétés ainsi que les applications de la chitine et de ses dérivés ont suscité un intérêt particulier dans le monde entier (Chang, Tsai, 1997).

La figure 4, donne un aperçu, concernant la production de la crevette, par pays, de 1988 à 2002 (Wai Yan Tan, Ru Lee, 2002).

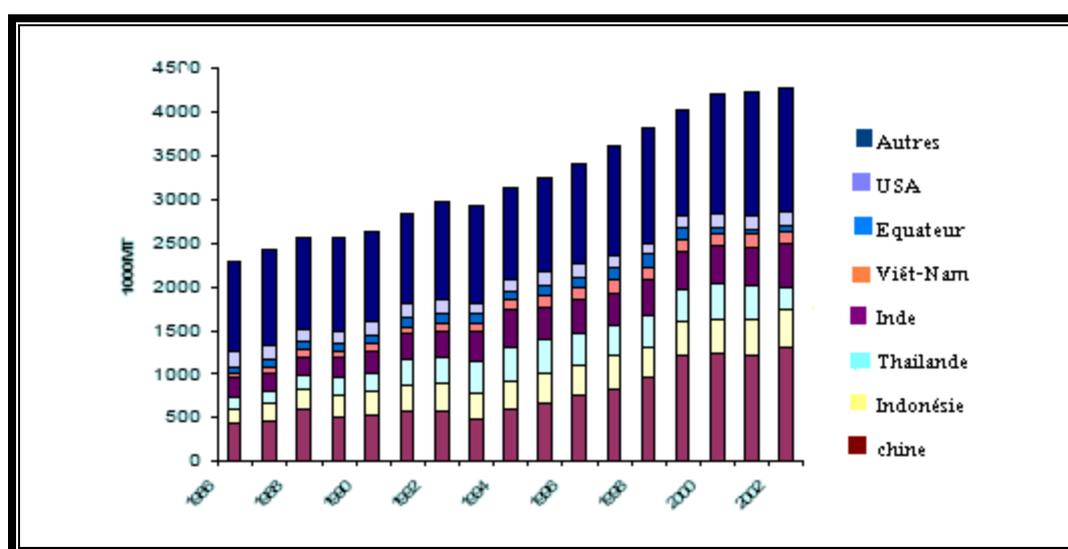


Figure 4 : Production de la crevette entre 1988 et 2002.

## a) Caractérisation de la chitine :

### a.1) structure chimique :

La chitine possède une structure chimique similaire à celle de la cellulose. La différence réside dans la substitution du groupement hydroxyle en position C<sub>2</sub> par un groupement acétamide (NHCOCH<sub>3</sub>) (Kerkut, Gilbert, 1985). Elle est donc constituée d'une chaîne linéaire d'unités N-Acétyl-Glucosamine ou (2-Acétamido-2-Deoxyglucose), les maillons étant liés entre eux par des liaisons β (1→4) glycosidiques (Gogev *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2002) ( Figure 5).

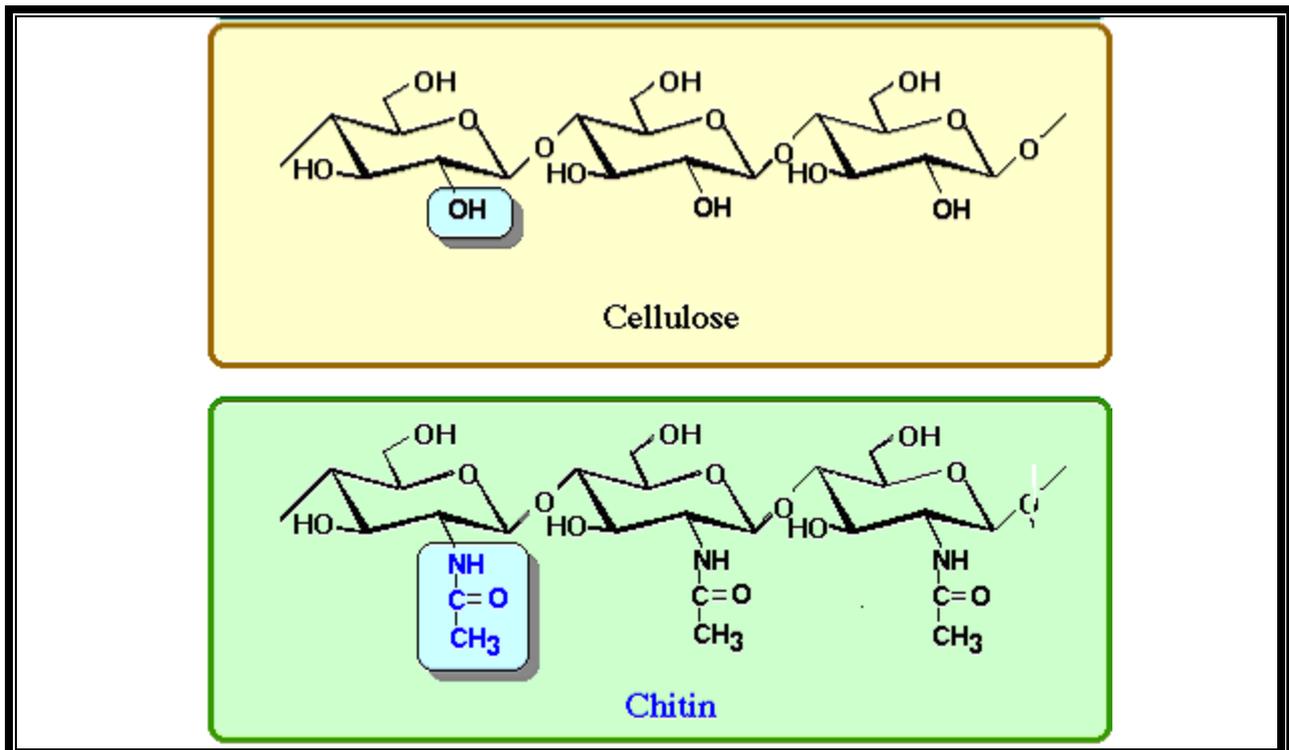


Figure 5 : Structure chimique de la chitine et de la cellulose.

La chitine est un polymère linéaire, de haut poids moléculaire et présente naturellement sous forme cristalline, c'est-à-dire constitué d'un ensemble de molécules liées entre elles par des liaisons hydrogènes et formant un réseau de fibres plus ou moins organisé (Seng, 1988). Une telle configuration, rend en général difficile sa modification chimique (Shigemasa *et al.*, 1999). Selon Muzzarelli (1977) et (Bella, 1994), la chitine se présente sous trois formes polymorphiques dues à l'association des chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Figure 6). On distingue alors :

- la chitine  $\alpha$  : c'est de loin la forme la plus abondante et la plus stable, elle fut proposée par Carlstrom, D. (1957), elle est formée de chaînes qui sont associées de manière antiparallèles (Kerkut, Gilbert, 1985). Elle est surtout retrouvée dans les cuticules des arthropodes (Jaworska *et al.*, 2003), et dans la paroi fongique (Taboada, 2003).
- La chitine  $\beta$  : elle est supposée être moins stable que la chitine  $\alpha$  et est formée de chaînes parallèles (Kerkut, Gilbert, 1985). Elle est essentiellement retrouvée dans les cocons des insectes (Merzendorfer, Zimoch, 2003) et dans les coquilles des brachiopodes et des mollusques (Falini *et al.*, 2003).

- La chitine  $\gamma$  : comparée aux chitines  $\alpha$  et  $\beta$ , la chitine  $\gamma$  est plus rare. Elle est formée à la fois de chaînes parallèles et antiparallèles (mélange de chitine  $\alpha$  et  $\beta$ ) (Kurita, 2001). On la retrouve également au même titre que la chitine  $\beta$  dans les cocons des insectes.

Dans ces structures, les chaînes sont reliées entre elles par des ponts hydrogènes reliant les groupements hydroxyles entre eux (Falini *et al.*, 2003).

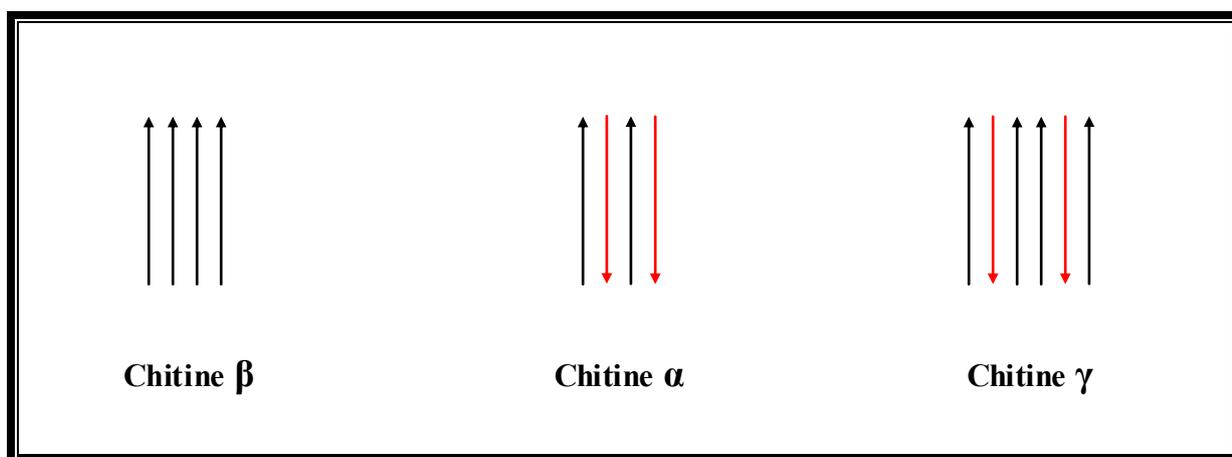


Figure 6 : Les formes polymorphiques de la chitine.

### a.2) Degré d'acétylation :

Le degré d'acétylation (DA) représente une caractéristique essentielle de la chitine. Il représente la fraction d'unité N-acétyl-glucosamine par rapport au nombre total d'unités, on déduit ainsi le degré de désacétylation (DD) qui représente la fraction d'unité glucosamine par rapport au nombre total d'unités. Le DA est relié au DD par :

$$\text{DA (\%)} = (100 - \text{DD\%})$$

Le DA de la chitine varie selon son origine et son mode d'extraction (Kurita, 2001). En effet, chez les crustacés, par exemple, au sein d'une même espèce, on peut observer des variations qualitatives et quantitatives de la chitine en fonction du stade physiologique de l'organisme ou de variations saisonnières. On parlera de chitine pour des  $\text{DA} > 50\%$  (Esquenet, 2003). Ce paramètre influe sur toutes les propriétés physico-chimiques de la chitine

(masse moléculaire, viscosité, solubilité) (Kiefer, 1999), il apparaît donc comme le plus important.

Plusieurs techniques ont été testées pour tenter de déterminer le degré d'acétylation avec une meilleure précision, mais également une plus grande simplicité d'emploi. On se limitera dans le cadre de ce travail, de citer quelques unes de ces méthodes

- La spectroscopie infrarouge (Okamoto *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2001 ; Vårum *et al.*, 1995) : Comparée aux autres méthodes, la spectroscopie IR est plus adaptée pour une caractérisation rapide, elle manque toute fois de reproductibilité (Kurita, 2001).
- La spectrophotométrie ultraviolette (Niola *et al.*, 1993 ; Ahmad Khan *et al.*, 2002).
- La titration potentiométrique (Kolodziejska, Wojtasz-Pajak, 2000 ; Kim *et al.*, 2000) : Elle est basée sur le dosage des groupements amines protonés.
- La spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (Prochazkova *et al.*, 1999 ; Lavertu *et al.*, 2003).
- L'analyse élémentaire (Niola *et al.*, 1993 ; Shepherd *et al.*, 1997) : elle concerne la détermination du taux d'azote contenu dans la chitine.

### **a.3) Solubilité :**

La chitine est une substance solide, blanchâtre, hautement hydrophobe, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques (Majeti, 2000). Cependant, elle est soluble dans quelques solvants corrosifs et toxiques tels que : les alcools chlorés, l'acide chloroacétique, l'acide formique, le chlorure de méthylène (Muzzarelli *et al.*, 2004). Elle est également soluble dans des solvants fluorés comme l'hexafluoroacétone et l'hexafluoro-2-propanol. Cependant et dans une certaine mesure sa solubilité dépend de la source d'où elle est extraite (Kurita, 2001). En 1978, Rutherford et Austin résumèrent les problèmes rencontrés dans le choix du solvant pour la chitine. Austin propose le diméthylacétamide ou encore le N-méthyl-2-pyrrolidone, ces deux derniers étant mélangés à du chlorure de lithium (Majeti, 2000). La concentration de chlorure de lithium nécessaire à la dissolution complète de la chitine doit être supérieure à 5% (Bain, 1998). Ces solvants présentent outre leur nature toxique, l'inconvénient d'être à l'origine d'hydrolyse chimique de la chaîne de chitine (Cho *et al.*, 1999).

#### **a.4) Le poids moléculaire :**

Le poids moléculaire est un paramètre important dans la caractérisation de la chitine, cependant, ce paramètre est difficile à estimer, d'une part à cause de la faible solubilité de la molécule de chitine et d'autre part, du fait que la chitine native est souvent présente sous forme de complexes chitino-protéiques ou associée à d'autres substances et qu'elle peut par ailleurs, subir une dépolymérisation durant les étapes de son extraction (Kurita, 2001).

Plusieurs méthodes sont employées dans l'estimation du poids moléculaire de la chitine, parmi elles, on citera :

- La méthode viscosimétrique (Okamoto *et al.*, 2002 ; Tsai *et al.*, 2002).
- Chromatographie liquide (Cho *et al.*, 1999).

#### **b) Biosynthèse de la chitine :**

Le mécanisme de biosynthèse de la chitine n'est pas complètement élucidé et ce malgré les nombreux efforts de recherche consentis (Imai *et al.*, 2003). La biosynthèse de la chitine suit une voie métabolique comprenant huit étapes, convertissant le tréhalose en chitine et faisant intervenir plusieurs enzymes dont la chitine synthétase (figure 5). L'étude de la voie de biosynthèse fut réalisée pour la première fois sur des extraits cellulaires de moisissures (*Neurospora crasa*). La même séquence générale de biosynthèse a été mise en évidence chez les insectes, avec en plus l'implication d'un intermédiaire de nature lipidique : le Dolichyl diphosphate-N- Acetyl Glucosamine. Chez les crustacés, l'étude de la biosynthèse a été réalisée sur des préparations microsomales de crevettes de l'espèce : *Artemia salina*, elle présente également la même séquence générale (Kerkut, Gilbert, 1985) (Figure 7).

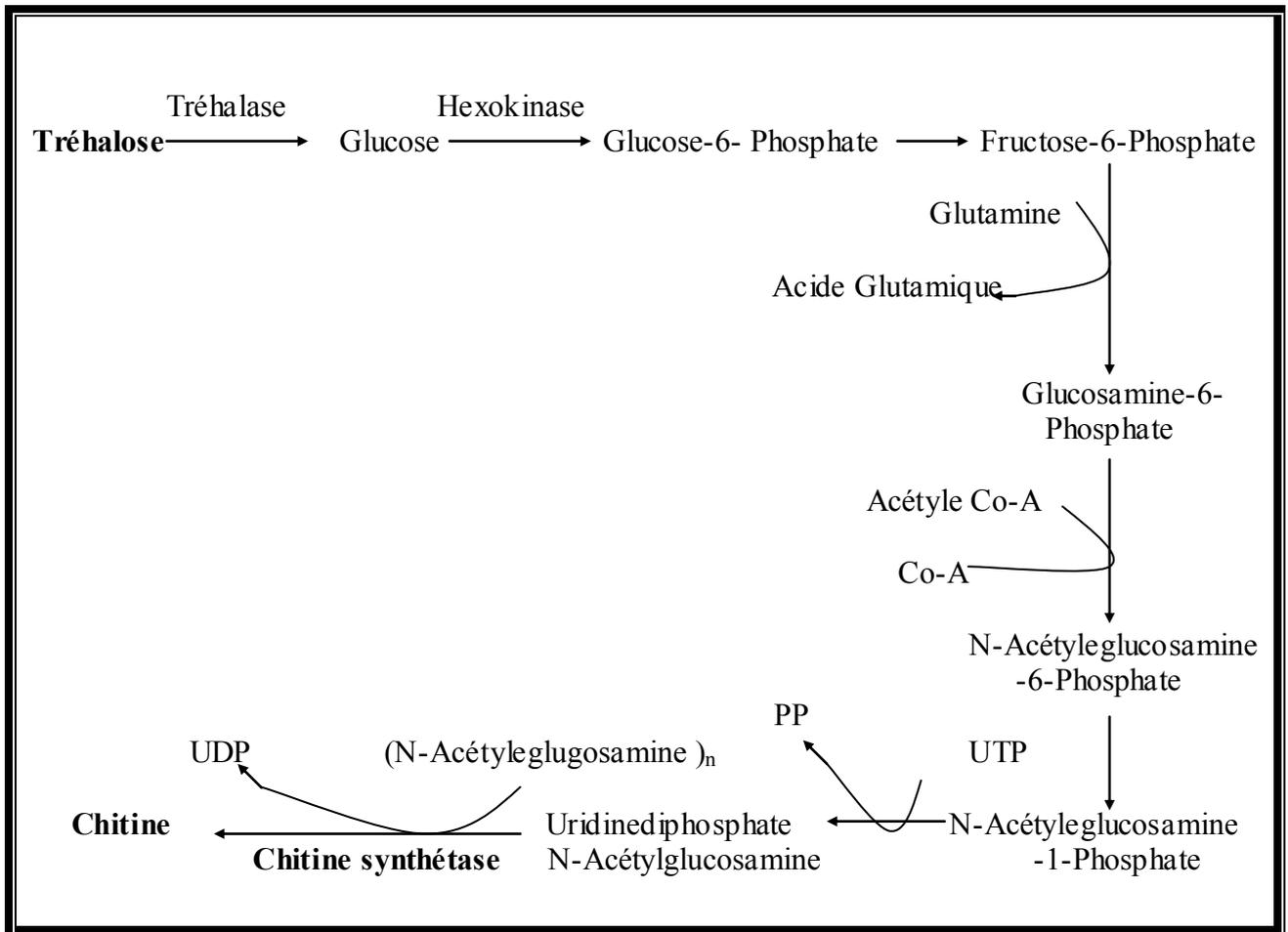


Figure 7 : Biosynthèse de la chitine

### c) Extraction de la chitine :

Bien qu'elle soit largement répandue dans la nature, la chitine n'est jamais retrouvée à l'état pur. Elle est associée à des protéines, des lipides, du calcium et autres pigments (Wai Yan Tan, Ru Lee, 2002). La conséquence est une résistance aux hydrolyses chimiques et enzymatiques (Seng, 1988). Le choix de la méthode d'obtention de la chitine est fonction de la proportion du polysaccharide contenu dans chacune des trois principales sources. Chez les insectes, la chitine constitue 1,4% du poids frais de l'animal, ce qui en explique l'absence d'exploitation. Chez les micro-organismes, le pourcentage de chitine peut atteindre plus de 20% du poids sec de la cellule. Toutefois, l'extraction à partir des micro-organismes ne s'effectue qu'à titre expérimental. Enfin, le meilleur rendement est observé chez les crustacés qui en constituent donc la principale source de chitine (Kiefer, 1999). En effet, la chitine représente 50 à 80% de la matière organique des carapaces de crustacés. (Shiau, Yu, 1998). Il a été montré que les déchets de crevettes et de crabes, contiennent 14-27% et 13-15% du poids sec en chitine respectivement (No *et al.*, 1989).

A titre indicatif, voici la composition de la carapace de quelques crustacés.

**Tableau 2 : Composition des carapaces des crustacés Kobelke, 1990 (Kiefer, 1999)**

| <b>Matières sèches</b>             |                                      |                                     |                               |                          |
|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| <b>Composition</b>                 | <b>Déchets de Corps de crevettes</b> | <b>Déchets de tête de crevettes</b> | <b>Déchets de langoustine</b> | <b>Déchets de crabes</b> |
|                                    | <b>%</b>                             | <b>%</b>                            | <b>%</b>                      | <b>%</b>                 |
| <b>Chitine</b>                     | 27                                   | 13,5-17,5                           | 11-15                         | 13-15                    |
| <b>Protéines totales</b>           | 40                                   | 29-37,5                             | 20-44                         | 30-35                    |
| <b>Libres</b>                      | 28                                   | 20-26                               |                               | 18-28                    |
| <b>Liées</b>                       | 12                                   | 9-10                                |                               | 7-12                     |
| <b>Cendres (CaCO<sub>3</sub>)</b>  | 33                                   | 25-27                               | 40                            | 50                       |
| <b>Matières solubles et autres</b> | 0                                    | 32,5                                | 4                             | 0-7                      |

Les carapaces de crustacés sont constitués essentiellement de chitine, protéines et de sel de calcium. Toutefois, une concentration relativement élevée en pigments (caroténoïdes) constitués de 49,4% d'ester d'astaxanthine, 40,3% d'astaxanthine et de 10,3% d'astacène a été rapportée dans l'étude des carapaces de langoustines (Chen, Meyers, 1982). On a par ailleurs montré que chez ces dernières, les pigments sont plus solidement liés que chez les autres crustacés (Fernandez-Kim, 2004). Ces caroténoïdes extraits avec un solvant approprié sont parfois incorporés à l'alimentation des salmonidés, afin que ceux-ci acquièrent une plus forte pigmentation. Les poissons sont incapables de synthétiser eux-mêmes ces molécules.

Les crustacés décapodes possèdent une cuticule solide, composée d'une fine épicuticule et de trois couches fibreuses formant la procuticule dont la structure consiste en un arrangement en hélice de microfibrilles de complexes protéine-chitine. Les deux couches de procuticules majeures (couche pigmentée, couche principale) sont rigidifiées grâce à une matrice de sels de calcium, principalement de calcite (Compère *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'épicuticule contient des teneurs variables en lipides sous formes de complexes lipoprotéiques.

La chitine coexiste avec des substances minérales et des protéines. Pour l'extraire, il faut donc détruire les premières par l'acide chlorhydrique et les deuxièmes par hydrolyse alcaline ; mais ces deux traitements ne sont pas sans action sur la chitine elle-même. Il est donc vraisemblable qu'on n'a jamais obtenu la chitine à l'état « pur » telle qu'elle existe dans l'animal (Loiseleur, 1963)

IL existe deux procédés permettant de préparer la chitine à partir des rejets de carapaces de crustacés (crabes, crevettes.. etc.). L'un chimique et l'autre biologique.

### **c.1) Procédé chimique :**

Les produits chimiques (acide, base) employés dans ce procédé peuvent causer une désacétylation partielle de la chitine voire son hydrolyse, rendant ainsi incompatibles les propriétés physiologiques du produit final (Andrad *et al.*, 2003).

### **c.1.1) La déminéralisation :**

L'acide chlorhydrique dilué est généralement utilisé pour la décalcification car il réagit assez rapidement avec la calcite. Cependant, il présente l'inconvénient de dégrader la chitine. Par ailleurs, on utilise l'acide sulfurique, moins corrosif que l'acide chlorhydrique, mais produisant du sulfate de calcium, insoluble dans l'eau, qui précipite de ce fait sur la surface des carapaces (Peniston, Johnson, 1978). Au cours de cette réaction le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) contenu dans les carapaces réagit avec l'acide chlorhydrique ( $\text{HCl}$ ) pour former du chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) et du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) selon la réaction suivante :



La réaction est effectuée à température ambiante. La durée de la réaction varie de 30min à deux jours voire plus, selon la méthode de préparation (Wai Yan Tan, Ru Lee, 2002). Le degré de déminéralisation dépend de la concentration de l'acide utilisé. Afin d'assurer une déminéralisation complète, la quantité d'acide doit être stœchiométriquement supérieure ou égale à la quantité de calcite contenue dans les carapaces (Wai Yan tan, Ru Lee, 2002).

### **c.1.2) La déprotéinisation :**

Les protéines sont extraites en traitant les carapaces avec de l'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ) dilué, à température élevée ( $65^\circ\text{C}$  à  $100^\circ\text{C}$ ). Le temps de réaction varie souvent (30min à 6 heures) selon la méthode de préparation. Il est par ailleurs indiqué qu'un traitement prolongé des carapaces peut provoquer une dépolymérisation du produit final (Wai Yan tan, Ru Lee, 2002).

Les étapes de préparation évoquées ci-dessus peuvent être réalisées dans n'importe quel ordre. Cependant, dans certains cas, la déprotéinisation peut précéder la déminéralisation, notamment lors d'une valorisation des protéines extraites, car la qualité du produit obtenu est optimale (Wai Yan Tan, Ru Lee, 2002).

Après déminéralisation et déprotéinisation, le produit obtenu peut subir une décoloration (extraction des pigments) par l'acétone, par le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Wai Yan tan, Ru Lee, 2002). Ou bien encore par l'acétate d'éthyle (No *et al.*, 1989). Cette

étape n'est pas obligatoire, sa réalisation dépend de la spécification du produit final (Wai Yan tan, Ru Lee, 2002).

### **c.2) Procédé biologique :**

De nouvelles méthodes d'extraction de la chitine à partir des carapaces de crustacés ont été développées, afin de palier aux inconvénients liés au traitement chimique, notamment en ce qui concerne le coût d'une part et les problèmes environnementaux qui résultent des rejets des produits chimiques corrosifs (acide et base) d'autre part (Rao *et al.*, 2000). Ces méthodes utilisent soit des microorganismes (Yang *et al.*, 2000), ou bien des enzymes protéolytiques (Synowiecki *et al.*, 2000). Dans ce dernier cas, la digestion enzymatique permet la récupération de l'hydrolysate protéique avec une meilleure composition en acides aminés (Synowiecki *et al.*, 2000). Les protéases appartenant au genre *Bacillus* sont de loin les plus employées dans ce procédé (Yang *et al.*, 2000). L'extraction de la chitine par fermentation des rejets de carapaces de crustacés utilise des bactéries lactiques comme *Bacillus plantarum*, en présence d'une source de carbone, généralement du glucose. Ces bactéries ont un métabolisme fermentaire, c'est-à-dire qu'elles dégradent partiellement la source de carbone mise à sa disposition. Elles libèrent de ce fait, des acides organiques comme l'acide lactique qui abaisse le pH du milieu, ce qui a pour effet, de supprimer la croissance des microorganismes contaminants et de déminéraliser les déchets de carapaces, avec formation de lactate de calcium, ce dernier précipite facilement et devient donc facile à retirer par simple lavage. La réaction de déprotéinisation étant par ailleurs assurée par des protéases libérées par les bactéries en phase de croissance (Rao *et al.*, 2000). Ces procédés biologiques présentent néanmoins quelques inconvénients. Par exemple : l'utilisation des enzymes protéolytiques peut se révéler coûteuse et ce, en fonction de l'enzyme utilisée. De plus, l'extraction des protéines n'est pas complète, comme c'est le cas dans le procédé chimique (Wai Yan tan, Ru Lee, 2002).

## **d) Dérivés de la chitine :**

### **d.1) Le chitosane :**

Le terme chitosane, loin de répondre à une seule et unique structure chimique bien définie, s'adresse à toute une famille de copolymères composés de N-acétyl-D-glucosamine et de D-glucosamine en proportions variables (Felt, 1999) (Figure 8) . Il est obtenu par désacétylation totale ou partielle de la chitine.

Le chitosane est isolé et identifié pour la première fois sous le nom de « chitine modifiée » en 1859 par Rouget qui, après avoir soumis la chitine à un traitement basique sous reflux avec une solution concentrée d'hydroxyde de potassium trouve que le produit ainsi obtenu possède des caractéristiques physico-chimiques bien différentes du polymère naturel dont il est issu. Trente-cinq ans plus tard Hoppe-Seyler décrit une procédure permettant d'obtenir par chauffage à 180°C de chitine d'origine animale (carapace de crabes, scorpions et araignées) un produit soluble dans l'acide acétique dilué, qu'il n'identifie pas comme étant la « chitine modifiée » découverte par Rouget et crée alors le terme de chitosane. Ce n'est qu'au siècle suivant (1934) qu'une procédure de fabrication de chitosane à partir de son parent naturel, la chitine est décrite par Rigby dans un brevet (Felt, 1999). Selon leur mode d'obtention, trois classes de chitosanes ont été proposées, à savoir, (a) les chitosanes dérivés de la chitine par désacétylation en conditions hétérogènes ou (b) en conditions homogènes et, (c) les chitosanes dérivés d'autres chitosanes par acétylation partielle, les deux premières méthodes constituant le recours le plus usité (Felt, 1999).

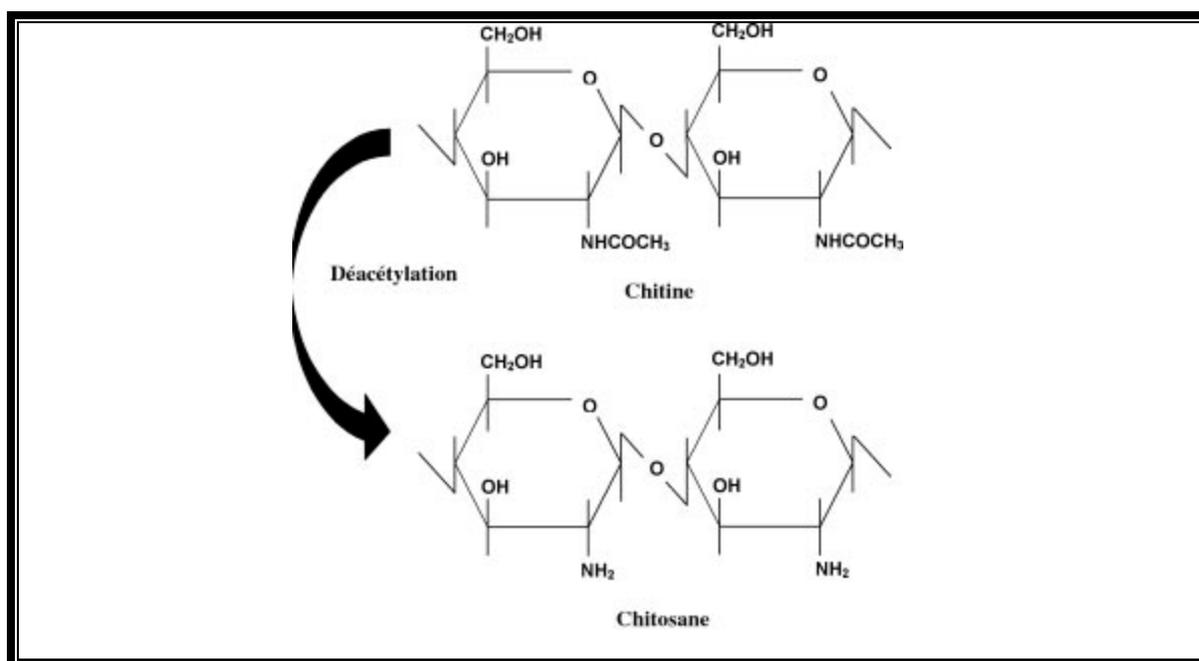


Figure 8 : Structure chimique du chitosane

Dans la nature, le chitosane est rare et n'est présent que dans les parois d'une classe particulière de champignons, les Zygomycètes (*Rhizopus*, *Mucor*, etc.) (Juang *et al.*, 2002) et chez certains insectes comme dans la paroi abdominale des reines termites (Seng, 1988). Néanmoins la majorité des chitosanes commercialisés proviennent de la désacétylation alcaline de la chitine à chaud (Fernández, Fox, 1997 ; Benesch, Tengvall, 2002). Les étapes de l'obtention du chitosane sont schématisées sur la figure 9 . On parlera de chitosane si le D.A est inférieur à 60% (David *et al.*, 2004). Ce dernier varie entre 56 à 99% avec une moyenne de 80%, sa valeur dépend de l'espèce vivante et de la méthode de préparation (Fernandez-Kim, 2004). Cette transformation génère des groupes amines (-NH<sub>2</sub>) chargés positivement et confère au chitosane une nature cationique particulièrement intéressante en milieu acide, d'autant plus que la plupart des polysaccharides de même type sont très souvent neutres ou chargés négativement (Gogev *et al.*, 2003).

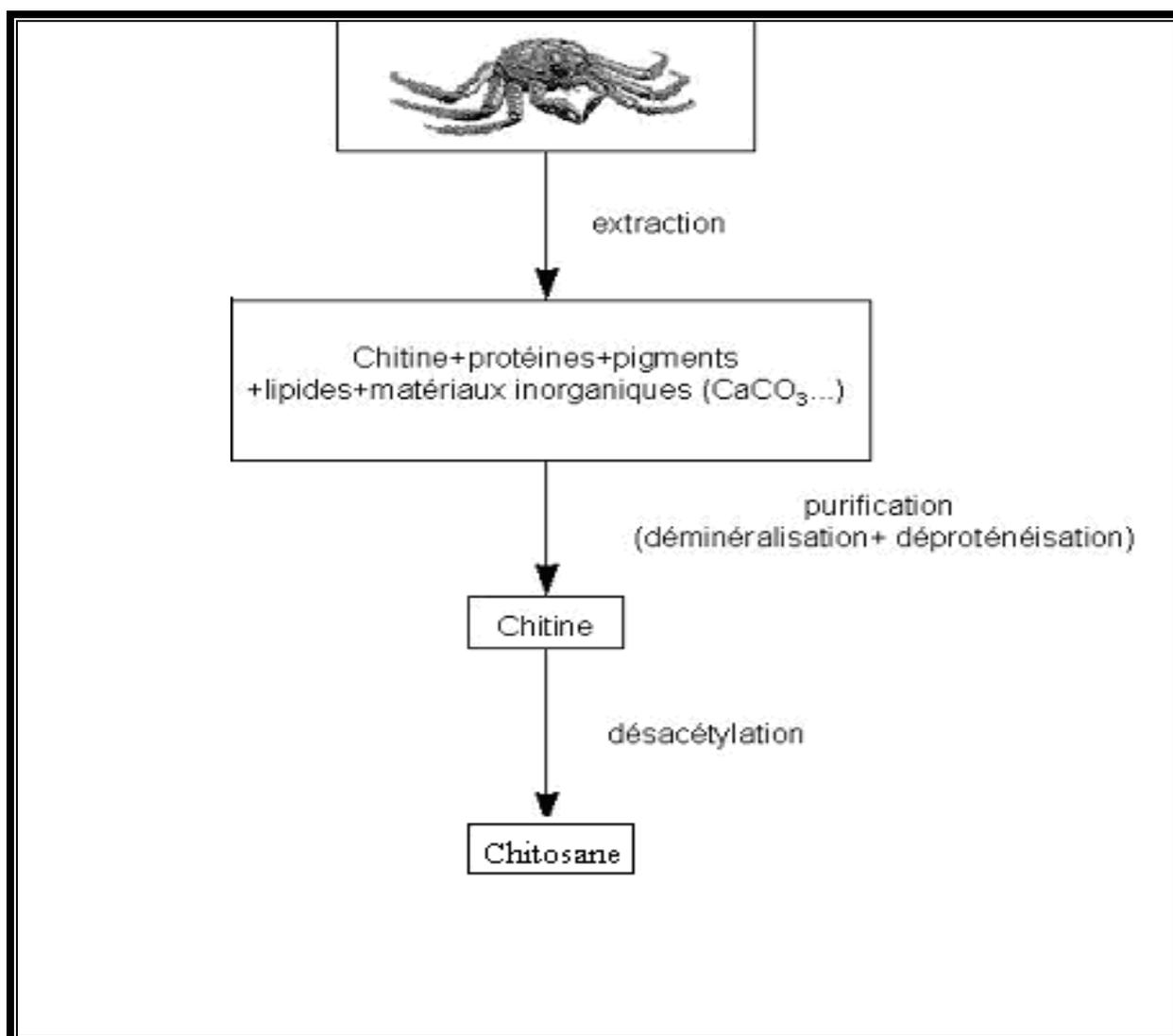


Figure 9 : Obtention du chitosane.

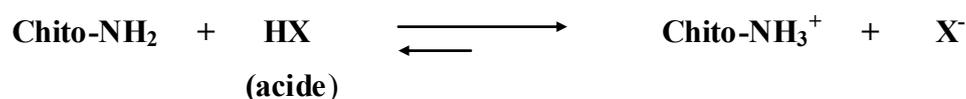
#### d.1.1) Solubilité du chitosane :

Certaines caractéristiques du chitosane ont une influence déterminante sur son caractère de solubilité et sa réactivité. C'est le cas notamment de la masse moléculaire et du degré de déacétylation qui peuvent varier suivant les types et les conditions des procédés de dépolymérisation et de déacétylation (Gogev *et al.*, 2003).

Le chitosane est typiquement insoluble dans l'eau et les solutions alcalines (Divakaran, Sivasankara Pillai, 2002). Il est cependant, soluble dans les solutions minérales ou organiques diluées, excepté dans l'acide sulfurique et à un moindre degré dans l'acide phosphorique

(Chenite *et al.*, 2001). Ainsi, le chitosane, est soluble dans les milieux aqueux en présence de faibles quantités d'acides tels que : l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide chlorhydrique à des pH inférieurs à 6,5 (Sashiwa, Shigemasa, 1999).

Le milieu acide permet de solubiliser le système grâce à l'ionisation des groupements amines en C<sub>2</sub> de l'unité D-glucosamine. En solution aqueuse, l'équilibre chimique ; qui dépend du pH ; est le suivant :



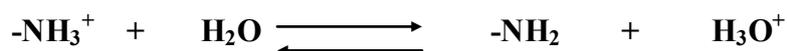
La constante de dissociation  $K_b$  de la fonction amine est obtenue à partir de l'équilibre suivant:



On écrit :

$$K_b = \frac{[-\text{NH}_3^+] [\text{OH}^-]}{[-\text{NH}_2]} \quad \text{et } \text{p}K_b = -\log K_b$$

La constante de dissociation de l'acide conjugué est obtenue à partir de l'équilibre :



On écrit :

$$K_a = \frac{[-\text{NH}_2] [\text{H}_3\text{O}^+]}{[-\text{NH}_3^+]} \quad \text{et } \text{p}K_a = -\log K_a$$

Comme pour tout polyélectrolyte, la constante de dissociation  $K_a$  du chitosane n'est pas constante, mais dépend plus particulièrement du degré de dissociation auquel il est déterminé. La variation du  $\text{p}K_a$  peut être exprimée en utilisant l'équation de Katchalsky (Montserrat, 2002).

$$pK_a = pH + \log \left( \frac{1-\alpha}{\alpha} \right) = pK_0 - \frac{\varepsilon \Delta\Psi}{K_T}$$

Avec :

$\Delta\Psi$  : différence du potentiel électrostatique entre la surface du polyion et la référence.

$\alpha$  : degré de dissociation

$K_T$  : constante de Boltzman.

$\varepsilon$  : charge de l'électron.

$pK_0$  :  $pK_a$  intrinsèque du chitosane.

Le  $pK_a$  va également dépendre du D.A. Toutefois, quelle que soit la valeur de ce dernier (comprise entre 0 et 25%), pour les poids moléculaires suffisamment élevées, on montre que la valeur limite du  $pK_a$  obtenue à un degré de dissociation égal à 1, c'est-à-dire pour un site supposé totalement isolé et non chargé et donc pour un potentiel électrostatique nul, est  $pK_0 = 6.5$  appelé  $pK_a$  intrinsèque du chitosane. La solubilité du chitosane varie donc en fonction du degré de dissociation et de la méthode de désacétylation mise en œuvre.

## **d.2) Dérivés carboxyméthylés de la chitine et du chitosane :**

L'introduction de groupes carboxyméthyles dans la chitine ou dans le chitosane conduit à la formation de dérivés anioniques (Kurita, 2001). Ces dérivés anioniques améliorent remarquablement la biodégradabilité de la chitine (Wai Yan Tan, Ru Lee, 2002) et sa solubilité dans l'eau (Fernández Monagas, 2000). La chitine devient même soluble à des pH physiologiques et légèrement basiques (Gogev *et al.*, 2003).

### **• O-carboxyméthylation de la Chitine et du chitosane :**

Cette réaction touche préférentiellement le carbone 6 des résidus glucosamines acétylés ou pas, au cours de laquelle l'hydrogène du groupe hydroxyle est remplacé par un groupe carboxyméthyle (-CH<sub>2</sub>-COOH). Comme pour la préparation de la carboxyméthyle-cellulose, la O-carboxyméthylation de la chitine ou du chitosane est réalisée en milieu alcalin en présence de l'acide monochloroacétique (Minoru *et al.*, 2002). Notons que parallèlement à cette réaction, on peut assister à une réaction de déacétylation pouvant avoir lieu en solution aqueuse fortement alcaline, aboutissant à la formation de polymères amphotères possédant à la fois des groupes carboxyméthyles et amines, et dont

le degré de déacétylation peut atteindre la valeur de 50%, selon les conditions mises en œuvre (Kurita, 2001) (Figure 10).

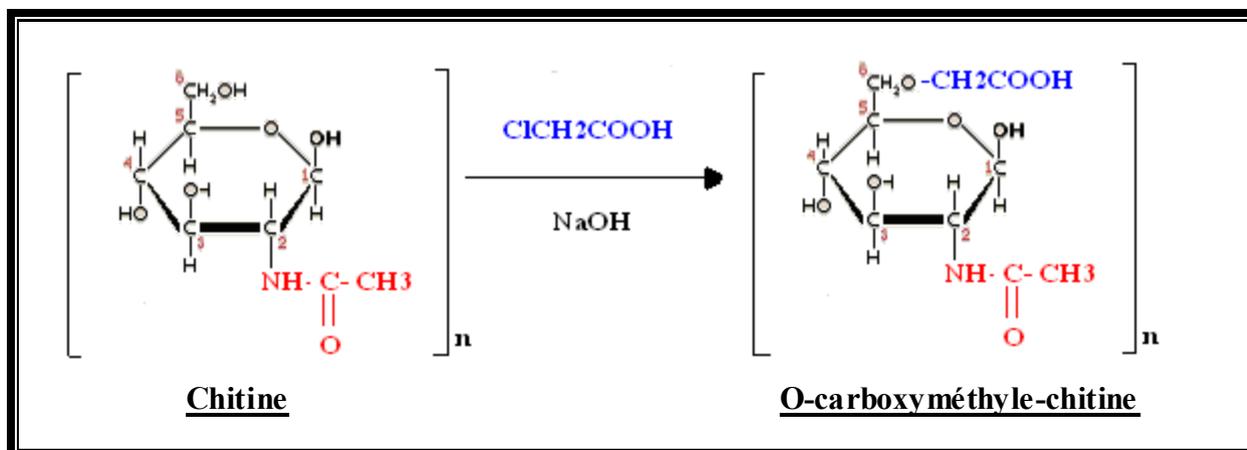


Figure 10 : Réaction de O-carboxyméthylation de la chitine.

- **N-carboxyméthylation de la chitine et du chitosane :**

Cette réaction contrairement à la précédente est régiosélective, elle touche uniquement les groupes amines de la chitine ou du chitosane. Ces derniers réagissent avec l'acide glyoxylique (OCHCOOH) en milieu acide formant la base de Schiff qui est convertie en N-carboxyméthyle chitosane par réduction au cyanoborohydrure de sodium (NaCNBH<sub>3</sub>) (Kurita, 2001) (Figure 11).

Au cours de la O-carboxyméthylation, les groupes amines du chitosane peuvent subir cette réaction dans les conditions similaires donnant lieu à la formation du N,O-carboxyméthyle-chitosane (Kurita, 2001).

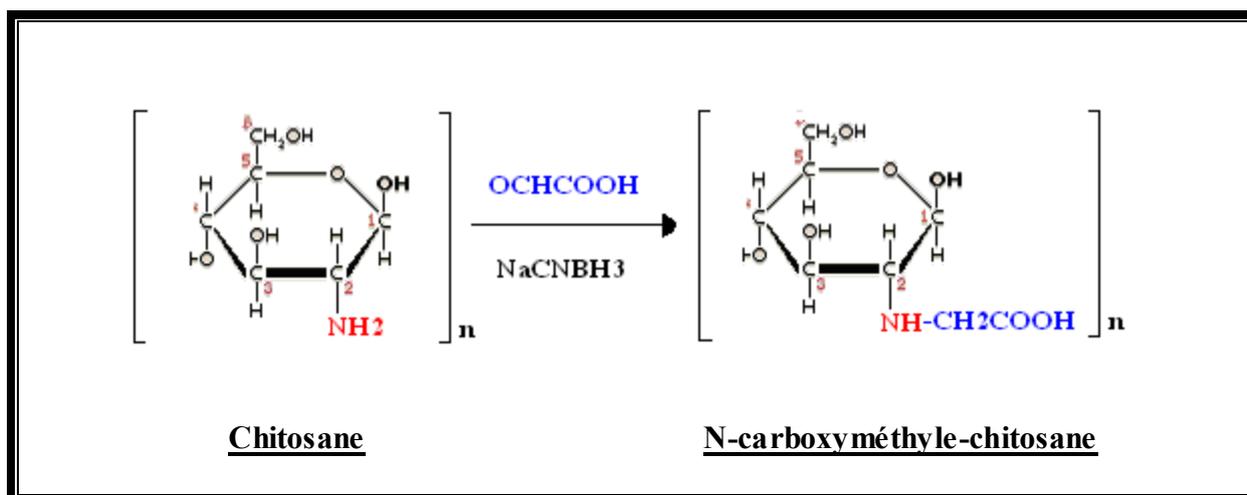


Figure 11 : Réaction de N-carboxyméthylation du chitosane.

### e) Quelques applications de la chitine du chitosane et de leurs dérivés carboxyméthylés :

Comme la chitine n'est pas soluble dans l'eau, ses applications sont limitées (Gogev *et al.*, 2003). Cependant, du fait de sa solubilité dans l'eau, le chitosane, possède de nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques intéressantes (biocompatibilité, propriétés cicatrisantes, chélatantes.....). Elles sont d'un grand intérêt pour de nombreuses applications industrielles et pharmaceutiques (Payet *et al.*, 2002).

#### e.1) Agro-alimentaire

##### e.1.1) Propriétés coagulantes :

Durant la dernière décennie, un intérêt croissant s'est manifesté pour les polyélectrolytes ayant des propriétés coagulantes. Ceux-ci permettent de séparer des particules colloïdales et dispersées dans les déchets alimentaires issus des industries de transformation. Le chitosane est particulièrement efficace et peut réduire de 70 à 98% la teneur en particules solides riches en protéines présentes dans les déchets lors de la préparation des viandes, des légumes, des fromages, et de la transformation des crevettes (Shahidi *et al.*, 1999). Cependant, même s'il est rangé parmi les meilleurs coagulants, le chitosane est fortement concurrencé par les polymères synthétiques qui occupent une grande part du marché aux U.S.A dans ce domaine

(Seng, 1988). Notons à ce propos que l'Agence américaine pour la Protection de l'environnement a donné en 1984 un agrément provisoire pour l'utilisation du chitosane comme agent coagulant dans l'eau potable, à la concentration de 10mg/l.

### **e.1.2) Immobilisation de cellules et d'enzymes :**

La chitine et le chitosane peuvent être utilisés comme agents immobilisateurs de cellules microbiennes (Seng, 1988), animales et végétales, ou d'enzymes (Mansencal, 1999 ; Jeon *et al.*, 2000). Dans le cas de l'immobilisation d'enzymes, la chitine a été utilisée pour fixer des enzymes à usage industriel telles que la papaine, la phosphatase acide, la glucose isomérase, l'uréase (Seng, 1988). Le chitosane quant à lui permet d'immobiliser l'invertase (Kiefer, 1999).

## **e.2) Environnement :**

### **e.2.1) Traitement des eaux usées :**

Les problèmes de santé liés à l'accumulation des métaux lourds et autres pesticides dans les eaux usées ont suscité une forte demande visant à traiter ces eaux avant leur rejet. A cet effet, le chitosane peut être utilisé comme agent chélateur des métaux lourds dans le traitement des eaux usées (Falini *et al.*, 2003), et les métaux précieux tel que le platine dans les effluents industriels (Planas, 2002). En effet, des études ont montré que grâce à son fort pouvoir chélateur, le chitosane fixe divers ions métalliques tels que le cuivre et le vanadium (Shahidi *et al.*, 1999). La complexation provoque la formation de liaisons de coordination entre l'ion et les groupements hydroxyles et amines de la molécule de chitosane (Kiefer, 1999).

On a utilisé la chitine, comme agent adsorbant des teintures rejetées dans les rivières par diverses industries. Pendant longtemps, ces teintures étaient considérées comme inertes et non toxiques. Elles se sont avérées par la suite nuisibles à la vie aquatique (Annadurai *et al.*, 1999).

Plus récemment, le chitosane a été utilisé comme agent dénitrifiant des eaux usées, grâce à la présence des groupes amines. Le chitosane ainsi saturé en nitrates, pourrait servir comme agent fertilisant par libération progressive des nitrites dans le sol (Jaafari *et al.*, 2001).

### **e.2.2) Valorisation des déchets :**

La majeure partie de la chitine disponible provient des carapaces de crustacés (essentiellement crevettes et crabes). Pendant longtemps, ces déchets n'étaient pas recyclés et étaient simplement rejetés à la mer après décortiquage, créant de sérieux problèmes de pollution au voisinage des sites de production. C'est le cas notamment en Alaska, en Californie et dans le Golfe du Mexique (Seng, 1988). Une étude menée par Carroad et ses collaborateurs (1982) montrait que la chitine pouvait être valorisée en la dégradant par voie enzymatique (chitinase produite par *Serratia marcescens*) suivant un procédé du type « *Single Cell Protein* ». Selon ces auteurs, le monomère de N-acétylglucosamine issu de la dégradation de la chitine est facilement utilisé comme source de carbone par la levure *Pichia kudriavetzii* à température élevée et à pH acide. La biomasse qui en résulte constitue une source de protéine pour l'alimentation animale (Cosio *et al.*, 1982).

### **e.3) Domaine Sanitaire :**

Dans le domaine médical, les utilisations potentielles de la chitine et du chitosane sont nombreuses. Certaines commencent à trouver des débouchés industriels (fils de suture, peau artificielle) alors que d'autres en sont encore au stade du laboratoire (effets immunostimulants, antitumoraux, propriétés hypocholestérolémiantes).

#### **e.3.1) Propriétés cicatrisantes :**

Les excellentes propriétés cicatrisantes de la chitine et du chitosane laissent penser que ces produits pourraient être utilisés sur des plaies à mauvaise cicatrisation (ulcères) ou à cicatrisation lente. Des tests cliniques sont en cours afin d'éprouver différentes formulations (poudre, solution d'acétate de chitosane, etc.) pour ces traitements. Un fil de suture en chitine a été mis au point (Seng, 1988).

### **e.3.2) Propriétés immunologiques et antitumorales :**

Chez les animaux, la chitine et le chitosane stimulent les cellules impliquées dans la défense immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales et des agents pathogènes. Une protection efficace par ce composé a été observée chez des souris inoculées par *Staphylococcus aureus* (Seng, 1988). Ainsi, le chitosane stimule la production d'IL1 (*interleukine1*) par les macrophages péritonéaux chez la souris (Gogev *et al.*, 2003). En outre, il a été démontré que le chitosane peut déclencher la production du TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) par les monocytes humains via les récepteurs lipopolysaccharidiques CD 14 (Gogev *et al.*, 2003). On a par ailleurs constaté un effet similaire sur le système immunitaire propre au carboxyméthylchitosane (Fernández Monagas, 2000).

### **e.3.3) Propriétés hypocholestérolémiantes :**

On a beaucoup parlé et on parle toujours beaucoup du chitosane comme additif alimentaire naturel de régime. Absorbant les graisses et les huiles, le chitosane est réputé être efficace pour baisser le taux de cholestérol et pour aider les personnes à contrôler leur poids. En effet, le chitosane possède une activité hypocholestérolémiante significative, qui a été mise en évidence dans plusieurs modèles animaux (Jeon *et al.*, 2000). Ainsi, des études ont montré les propriétés hypocholestérolémiantes du chitosane sur des rats. Des diminutions significatives (20 à 30%) du taux de cholestérol dans le plasma sont observées après absorption de chitosane sans que des effets secondaires soient observés chez les animaux (croissance, absorption des aliments). On pense que ces propriétés sont dues à la capacité du chitosane à piéger les lipides lorsque le polysaccharide à pH 6-6,5 commence à précipiter, empêchant la formation des micelles (Seng, 1988).

### **e.3.4) Propriété antioxydante :**

Récemment, l'activité antioxydante du chitosane et de ses dérivés a suscité un intérêt tout particulier de la part des chercheurs. Parmi les nombreuses formes réactives du dioxygène, l'activité chimique du radical OH est la plus importante, car il peut réagir facilement avec les biomolécules telles que les acides aminés, les protéines, ou encore l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). On a démontré que le chitosane en solution, réagit avec les radicaux OH en formant des macromolécules stables dénuées de pouvoir oxydant (Xie *et al.*, 2001).

#### **e.4) Agriculture :**

##### **e.4.1) Protection des plantes, des fruits et des semences :**

Les fruits et légumes sont des produits hautement périssables, en particulier durant le stockage qui suit la récolte, où on assiste à des pertes considérables dues aux maladies microbiennes d'origine fongique ou bactérienne, à la transpiration et à la sénescence des tissus (vieillessement des tissus). Des procédés de stockage adéquats, capable d'empêcher le mûrissement rapide des fruits et de ralentir le développement des pathogènes, peuvent prévenir ou tout au moins réduire ces pertes (Mari, Guizzardi, 1998). La méthode qui prévaut, consiste à préserver le produit dans un environnement à basse température et à un taux d'humidité élevé (El Ghaouth *et al.*, 1992). On utilise par ailleurs le conditionnement sous atmosphère modifiée qui consiste à conditionner le produit sous un film étanche contenant un mélange gazeux qui freinera l'oxydation et la détérioration du produit (Johnson, 2002). Ce conditionnement peut être conjugué avec le stockage à basse température (Drake *et al.*, 1987). Le dioxygène, le dioxyde de carbone ainsi que l'azote, sont les gaz les plus souvent utilisés. Par exemple, on utilise une concentration en dioxygène inférieure à 5% afin de réduire le taux de respiration du produit, ce qui a pour effet de prolonger sa conservation par ralentissement du métabolisme oxydatif. D'autre part, une concentration en dioxygène inférieure à 8%, réduit la production d'éthylène, qui constitue le composé clé du processus de maturation et de mûrissement des fruits et légumes (Farber *et al.*, 2003). Des concentrations élevées en dioxyde de carbone, inhibe également le processus de mûrissement des fruits (Buescher, 1979).

L'utilisation de fongicides chimiques de synthèse constitue la principale méthode de lutte contre les maladies qui touchent les fruits durant le stockage. Cependant le développement de résistances des pathogènes vis-à-vis de ces fongicides et eu égard aux problèmes de contamination des aliments causés par ces mêmes fongicides, l'idée d'utiliser des moyens de lutte biologique s'est imposée comme alternative à la lutte chimique (Yao *et al.*, 2004).

Le chitosane est utilisé comme film semi-perméable autour des tissus des plantes, il inhibe la croissance de bon nombre de champignons pathogènes (Ait Barka *et al.*, 2004). Il

inhibe ainsi la croissance de *Botrytis cinerea* et *Rhizopus stolonife*, sur les fraises et *Fusarium solani* sur les pommes (Cheah *et al.*, 1997). Le film formé par le chitosane, modifie l'atmosphère interne du tissu et freine de ce fait le processus de mûrissement du fruit (El Ghaouth *et al.*, 1992). Ainsi, la protection par le film de chitosane réduit l'incidence du pourrissement sur le poivron, du concombre et freine par ailleurs, le mûrissement de la pomme et de la tomate (Ait Barka *et al.*, 2004).

Depuis quelques années, des essais d'enrobage de semences de céréales avec du chitosane sont réalisés aux U.S.A. Une protection vis-à-vis de champignons parasites du sol a été observée au champ. Dans une région où les attaques fongiques contre les racines sont fréquentes, des rendements de récolte supérieurs de 20% ont été obtenus avec des semences enrobées, en comparaison avec des semences qui ne l'étaient pas. On a suggéré que le chitosane exerçait sur la plante des effets physiologiques tels que le renforcement du système racinaire et l'épaississement de la tige (Seng, 1988). Chez les plantes supérieures, il existe différents mécanismes de défense naturels pour lutter contre les agents pathogènes, qui sont la production entre autres, d'enzymes telles que la chitinase et la  $\beta$ -glucanase, des inhibiteurs protéasiques et les phytoalexines, qui sont des antibiotiques toxiques pour certaines bactéries et champignons pathogènes. Il a été montré, que la chitine et le chitosane sont des agents révélateurs, *elicitor* en anglais, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'induire de tels mécanismes de défense (Jeon *et al.*, 2000). En effet, certaines études menées *in vitro* avec des suspensions cellulaires végétales de chou, de haricot et de soja révèlent que le chitosane agit comme un inducteur de la formation de callose (polymère de  $\beta$ -1,3 glucane), un composé jouant un rôle dans les réactions de défense des plantes (Seng, 1988).

## II.1 Préparation de la chitine et de ses dérivés

### II-1-1 Classification de l'espèce :

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, Maurin, 2001).

D'un point de vue taxonomique cette espèce appartient au : (Jessop, 1973)

**Sous-règne Eumétazoaires** : possèdent de véritables tissus de type épithélial, nerveux, contractile, de soutien ou conjonctif ; le développement embryonnaire passe par un véritable stade gastrula avec feuillet ectodermique et endodermique.

**Embranchement Arthropoda (Les arthropodes)** : le corps est métamérisé et les segments fusionnés ou spécialisés ; appendices articulés disposés par paires segmentaires et dont la fonction est habituellement diversifiée ; présence d'un exosquelette articulé chitineux qui sert de protection de soutien et de point d'attache pour les muscles.

**Classe Crustacea** : surtout aquatiques, respiration au moyen de branchies ; exosquelette durci par imprégnation calcaire ; thorax et abdomen habituellement segmentés.

**Sous-classe Malacostraca** : la possession de huit segments thoraciques et de six abdominaux, tous porteurs d'appendices.

**Ordre Decapoda** : formes possédant dix pattes locomotrices.

### II.1.2 Prétraitement des carapaces :

Avant leur utilisation, les déchets de carapaces sont d'abord débarrassés de leurs antennes et autres pattes. Ils subissent ensuite un prétraitement selon Mukherjee (Mukherjee, 2001), 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 1 heure. Après séchage, les carapaces sont débarrassées une dernière fois d'éventuels tissus encore présents et subissent le *quenching* : ce traitement permet de casser la structure cristalline de la chitine contenue dans la carapaces, facilitant ainsi son extraction. Il consiste à placer les carapaces préparées comme indiquées 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.1.3 Analyses physico-chimiques des carapaces :**

#### **II.1.3.1 Le taux de cendre :**

Le taux de cendre est déterminé selon le protocole suivant : (Fernandez-Kim, 2004)  
Placer 2g de carapaces broyées dans un creuset en verre, préalablement chauffé pendant 15 minutes dans le four à moufle (Prolabo, modèle Volca MC18), refroidi et pesé.  
Introduire le creuset dans le four chauffé à 600°C pendant 6 heures, faire refroidir, mettre dans le dessiccateur et contrôler la constance du poids.  
Le poids de la cendre est exprimé en pourcentage par rapport au poids initial.

##### **Poids de l'essai**

$$\text{Taux de cendre (\%)} = \frac{\text{Poids de l'essai}}{\text{Poids de l'échantillon}} \times 100$$

##### **Poids de l'échantillon**

#### **II.1.3.2 La 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) (Riedel-de Haën) pendant 6 heures (Loiseleur, 1963). Comparativement à l'hydrolyse alcaline, l'hydrolyse acide est plus sensible et plus facile à mettre en œuvre (Boughedaoui, 1987). Le dosage des résidus N-acétyl glucosamines libérés est réalisé selon la méthode de Reissig (Loiseleur, 1963).

##### **II.1.3.2.1 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 condense 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 (Panreac) (réactif A) : solution 0.8 M dans le borate. Le pH est ajusté à 9,1 avec KOH (Prolabo).
- Réactif à la p-diméthylaminobenzaldéhyde (réactif B) : on dissout 10 mg de ce réactif (Fluka) dans 100 ml d'acide acétique glacial très pur (Panreac), 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.

### II.1.3.2.2 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 (Loiseleur, 1963).

La teneur des carapaces en chitine est calculée comme suit :

$$\text{La teneur en chitine (P) (\%)} = \frac{\text{g d'acétyl glucosamine}}{\text{g d'échantillon}} \times 100$$

La fraction d'azote de la chitine contenue dans 100 g de carapaces est déterminée de la manière suivante :

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

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.

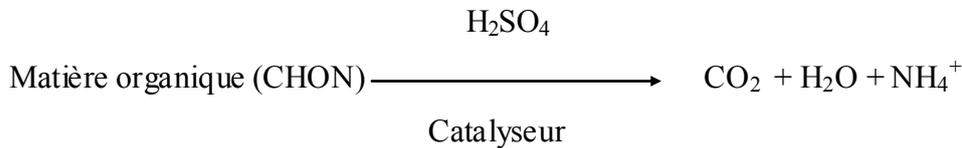
### II.1.3.3 Teneur en protéines :

La détermination de la fraction protéique des carapaces a été réalisée par la méthode de Kjeldahl.

#### II.1.3.3.1 Rappel du principe de la méthode :

La plus grande partie de l'azote des substances biologiques est contenue dans les protéines. La proportion d'azote est remarquablement constante pour un type de protéine donné (de l'ordre de 16% en masse).

- **Minéralisation** : à chaud en milieu sulfurique concentré en présence de catalyseur.



- **Déplacement de l'ammonium** :



- **Séparation de l'ammoniac** :

- Par distillation simple.
- Par entraînement à la vapeur.

- **Dosage de l'ammoniac** :

- Direct : l'ammoniac est dosé directement par un acide étalonné au fur et à mesure qu'il distille.
- En retour : l'ammoniac est recueilli dans un excès connu d'acide, on dose le reste par une base étalonnée.

**a) Minéralisation :**

Dans ce travail, la minéralisation a été réalisée de la manière suivante:

**a.1) L'essai :**

Dans un tube matra introduire :

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

**a.2) Le blanc :**

10ml 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 200ml puis complétée à 200ml avec de l'eau distillée.

**b) Distillation de l'ammoniac du minéralisât :**

Dans un ballon de distillation introduire successivement :

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

Adapter le ballon immédiatement au réfrigérant et chauffer.

Recueillir le distillat dans 20ml d'acide sulfurique de concentration connue voisine de 0.01 M.

Distiller durant 30 minutes.

**c) Dosage de l'ammoniac distillé :**

Doser l'excès d'acide sulfurique contenu dans le distillat à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire égale à 0.015 M.

**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 :

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

Dans 200ml (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 :

$$N \text{ total} = [C(NH_3) \cdot M(N) \cdot 10] \text{ g / 100 g de carapaces}$$

Avec :

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 (l).

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

V (NaOH) : volume de la solution d'hydroxyde de sodium, nécessaire à la neutralisation de l'excès d'acide sulfurique (l).

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 100 grammes 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.

### II.1.3.4 Détermination de la densité :

#### a) Densité apparente :

La densité apparente est déterminée par le rapport du poids d'un échantillon à son volume apparent. On utilise pour cela un pycnomètre de volume connu.

$$\text{Densité apparente des carapaces} = \frac{\text{Poids de carapaces broyées et séchées (g)}}{\text{Volume apparent (l)}}$$

#### b) Densité réelle :

Dans ce cas la mesure du volume est réalisée par déplacement de liquide. On utilise un pycnomètre de volume connu (50ml).

La méthode consiste à faire une mesure de quatre pesés a, b, c, d, dont on déduit le poids et le volume de l'échantillon.

On suppose, dans ce qui suit, qu'on opère sur un échantillon complètement sec.

Les quatre pesés successives concernent :

a : le pycnomètre vide.

b) le pycnomètre contenant l'échantillon à étudier (15g) séché à l'étuve et ramené à la température ambiante.

c) le pycnomètre + l'échantillon + eau.

d) le pycnomètre rempli d'eau.

On a :

$$P(\text{poids de l'échantillon}) = (b-a).$$

$$V(\text{volume de l'échantillon}) = (d-a) - (c-b).$$

$$\text{D'où : densité réelle} = \frac{(b-a)}{(b-d) - (a+c)}$$

## **II.1.4 Optimisation de l'extraction de la chitine à partir des déchets de carapaces :**

### **II.1.4.1 Optimisation des conditions de la déminéralisation :**

La déminéralisation a été réalisée, par traitement des carapaces avec de l'acide chlorhydrique. Trois paramètres ont été optimisés, dans le cadre de ce travail, à savoir : la concentration d'acide, le temps de réaction, le rapport poids/ volume, l'agitation étant maintenue constante, en utilisant un agitateur magnétique (Stuart, SB 162).

L'optimisation de chaque paramètre est réalisée en maintenant les autres paramètres constants.

#### **a) La concentration d'acide :**

Diverses concentrations d'acide ont été testées :  
0,25 , 0,5 , 0,75 , 1 , 1,25 , 1,5 et 2 M.

#### **b) Le rapport du volume d'acide au poids de carapaces (V/P) :**

Nous avons, testé également, plusieurs rapports :  
10 , 15 , 20 , 25 et 30 ml/g.

#### **c) Le temps de réaction :**

La durée de la réaction de déminéralisation a été optimisée en testant plusieurs temps de réaction :

7,5 , 15 , 22,5 , 30 , 45 , 60 , 120 et 1440 minutes (24 heures).

En fin de réaction, le surnageant est éliminé par filtration sur un tamis (Endecotts, 140 $\mu$ 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 en utilisant un pH mètre (Metrohm 691 pH Meter).

La réaction de déminéralisation est appréciée, par détermination du taux de cendres, suivant le même protocole que précédemment. En effet, plus le taux de cendres est faible, plus efficace sera la réaction de déminéralisation.

### II.1.4.2 Optimisation des conditions de la déprotéinisation :

La déprotéinisation a été accomplie en soumettant les carapaces déminéralisées suivant les conditions optimisées, à un traitement alcalin par la soude (Riedel-de Haën).

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 soude, le rapport : poids de carapaces/ volume de soude, le temps de réaction ainsi que la température. L'agitation, a été toujours maintenue constante.

- a) **La concentration de soude exprimée en molaire (M) :** 0,5 ; 1 ; 1,25 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4 ; 4,5 ; 5.
- b) **Le temps de réaction (minutes) :** 7,5 ;15 ; 30 ;45 ;60 ;90 ;120 ;180 ;240 ;360 ;1440 (24 heures).
- c) **Le rapport (V/P) :** 10 ;15 ;20 ;25 ;30 ;35 ;40 ml/g.
- d) **La température (°C) :** 18 ;25 ;30 ;35 ;40 ;45 ;50 ;55 ;60 ;65 ;70 ;75 ;80 ;85 ;90 ;95 ; 100.

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.

L'appréciation de la déprotéinisation, est rendue possible, par dosage des protéines dans le surnageant. Le contenu protéique de ce dernier, nous renseigne sur le taux de déprotéinisation.

La méthode choisie pour le dosage des protéines est la méthode Biuret (1949), qui est de loin la technique la plus généralement utilisée pour le dosage des protéines, et c'est l'une des méthodes les plus fiables, pour les solutions assez concentrées comme les milieux biologiques.

**a) Principe de la méthode :**

En milieu alcalin les ions cuivre forment avec les protéines un complexe cuivrique violet rose caractéristique des liaisons peptidiques.

Les acides aminés simples et les dipeptides ne forment pas de composé coloré en présence de  $\text{CuSO}_4$ . Deux liaisons peptidiques sont nécessaires. Le composé le plus simple qui possède cette structure est le biuret.

La coloration, c'est-à-dire la densité optique, est proportionnelle à la concentration en protéines (Chapeville, Clauser, 1974).

**b) Gamme d'étalonnage :**

A partir d'une solution de peptone (Mikrobiologie) étalon mère à 5g/l, préparer la gamme suivante :

Dans cinq tubes à essai, introduire des volumes de la solution étalon contenant : 2,4,6,8,10 mg de protéines.

Compléter chaque tube à 2 ml avec de l'eau physiologique (marque), puis ajouter 8 ml de réactif de Biuret préparé comme suit :

Sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) (Merck)..... 1,5g  
Ethyldiméthyltétracétique (EDTA) (Panreac) .....6g  
KI..... 1g  
NaCl..... 0.9g

Dissoudre dans 300ml d'eau distillée.

Ajoutez en une fois 300ml de NaOH à 2,5M, puis complétez à 1 litre.

Placez les tubes 30min à l'obscurité pour développer la coloration.

Mesurez l'absorbance à 545 nm contre un blanc, dans lequel la solution protéique est remplacée par de l'eau physiologique.

**c) Dosage des protéines :**

Procédez comme pour la gamme sur 0,5ml de la solution à doser (surnageant), éventuellement diluée pour se situer dans la gamme.

### **II.1.4.3 Post-traitement de la chitine : décoloration et blanchiment**

La décoloration ainsi que le blanchiment de la chitine extraite, ont été réalisés selon la méthode de No *et al.*, (1989), qui consiste à tremper la chitine dans un bain d'acétone (Panreac), pendant 10 minutes, au terme desquelles, elle est récupérée et séchée pendant 2 heures à température ambiante.

L'étape du blanchiment quant à elle, est réalisée, en mélangeant la chitine dépigmentée avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,315% (v/v), pendant 5 minutes avec un rapport masse/volume de (1/10). La chitine est finalement récupérée, lavée abondamment avec de l'eau du robinet, rincée avec de l'eau distillée et séchée à l'étuve à 60°C pendant 4 heures .

**II.1.5 Préparation du chitosane :** Nous avons préparé deux chitosanes suivant deux protocoles différents.

#### **II.1.5.1 Protocole 1 :**

Le chitosane a été obtenu selon la méthode de Kolodziejska, Wojtasz-Pajak, (2000), par désacétylation de la chitine extraite par une solution de soude, selon le mode opératoire suivant :

La chitine a été traitée avec une solution de soude à 50%, dont la proportion masse/volume est 1/10, la solution est agitée pendant 60 minutes à 140°C.

#### **II.1.5.2 Protocole 2 :**

Dans ce cas, le chitosane a été préparé selon la méthode de Mirzadeh *et al.*, (2002). Dont voici les étapes :

La chitine est traitée avec une solution de soude à 50%, avec une proportion d'un gramme pour 50ml, la solution est agitée pendant 3 heures à 90°C.

Au terme de la réaction, la solution est filtrée sur un 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.

### **II.1.6 Préparation du N.O Carboxyméthyle chitosane :**

Le N.O Carboxyméthyle chitosane a été préparé selon la méthode de Hayes, (1986) (Liu *et al.*, 2001). 20g de chitosane sont mélangés avec 200ml d'isopropanol sous agitation, 50,4 ml de NaOH (10M) sont alors ajoutés en six portions égales sur une période de vingt minutes. On laisse réagir pendant encore 45 minutes, avant d'ajouter 24g d'acide monochloroacétique (Panreac) en cinq portions égales à cinq minutes d'intervalles. Le mélange est chauffé pendant trois heures à 60°C, et ce avant d'incorporer 17 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7 avec de l'acide acétique glacial. Enfin, le mélange est filtré sur un tamis (140µm), lavé avec du méthanol et séché à l'étuve à 60°C.

### **II.1.7 Caractérisation des produits préparés :**

Les origines de la chitine et du chitosane étant diverses et variées, il est nécessaire de les caractériser, et notamment de déterminer entre autres le poids moléculaire moyen ainsi que le degré d'acétylation (DA).

#### **II.1.7.1 Le taux de cendres :**

Le taux de cendres a été déterminé selon la méthode de No *et al.*, (1989), citée précédemment.

#### **II.1.7.2 Poids moléculaire :**

L'utilisation de la méthode viscosimétrique nous a permis de déterminer le poids moléculaire moyen de la chitine, ainsi que celui des deux chitosanes, utilisés dans ce travail. 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 12).

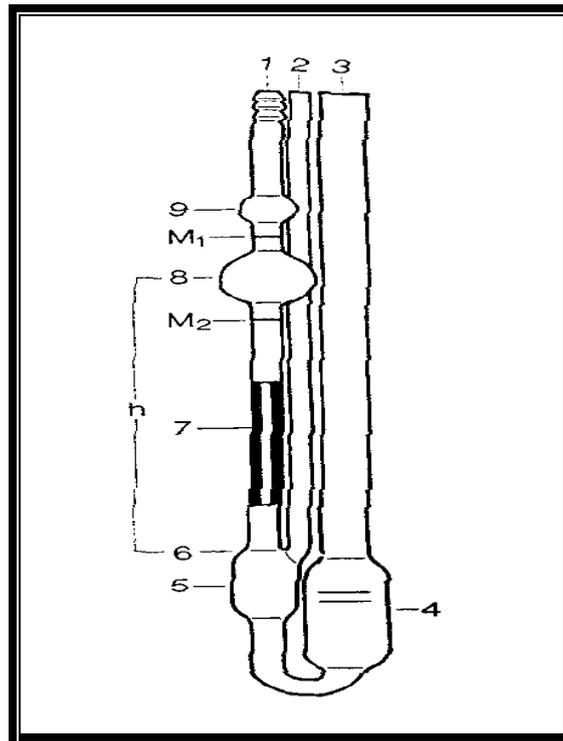


Figure 12 : Viscosimètre de type Ubbelohde.

### 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  $30^\circ$  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.

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

Nous pouvons ainsi obtenir la viscosité réduite,  $\eta_r$ , et la viscosité inhérente,  $\eta_i$ , à partir des relations suivantes :

$$\eta_r = \eta_{sp} / [C] \quad \text{avec : } \eta_{sp} = (\eta / \eta_s) - 1$$

$$\eta_i = 1/[C]. \ln (\eta / \eta_s)$$

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

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

$$\eta = k.t \quad (k : \text{constante de l'appareil, } t : \text{temps d'écoulement en seconde)}$$

$k$  peut se calculer à partir de la valeur connue de  $\eta$  (eau pure à 20°C).

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, Block, 2000) :

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

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 (Panreac), (solution à 5%). Les constantes  $K$  et  $a$  correspondantes, sont 0,24 cm<sup>3</sup>/g et 0,69 respectivement (Mirzadeh *et al.*, 2002).

Pour le chitosane, le solvant utilisé, est un mélange d'acide acétique à 0,2 N et d'acétate de sodium (Panreac) à 0,3N. Les constantes K et a relatives à ce solvant sont respectivement 0,078 cm<sup>3</sup>/g et 0,76 (Mirzadeh *et al.*, 2002).

On a préparé cinq solutions de concentrations croissantes de chaque polymère. Ces concentrations sont exprimées en g/100ml de solvant et sont : 0, 0,223 , 0,042 , 0,065, 0,081 , 0,1 . On calcule  $\eta_i$  et  $\eta_r$  pour chaque solution puis on trace les droites  $\eta_i = f([C])$  et  $\eta_r = f([C])$ .

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

### II.1.7.3 Degré d'acétylation (DA) :

Plusieurs techniques ont été décrites pour la détermination du degré d'acétylation de la chitine et du chitosane. L'utilisation de la spectrophotométrie infrarouge nous a permis de déterminer ce paramètre. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge Shimadzu 8400, d'intervalle de fréquence de 4000 cm<sup>-1</sup> – 500 cm<sup>-1</sup>. Les spectres obtenus sont présentés en annexe.

Le degré d'acétylation du chitosane a été calculé suivant la formule suivante :

$$DA = (A_{1655} / A_{3455}) \cdot 100 / 1,33$$

### II.1.7.4 Contrôle de la qualité microbiologique des polymères préparés :

Le dénombrement de la flore totale des polymères préparés a été réalisé suivant deux méthodes distinctes, il s'agit de la méthode de Mac Grady (méthode du nombre le plus probable), et celle du dénombrement sur boîtes de Pétri. Ce dénombrement vise à estimer, la période de conservation des polymères préparés. En effet, plus le degré de contamination est faible, plus la durée de conservation des polymères sera prolongée.

Concernant la première méthode, nous avons utilisé le milieu liquide de Zajic *et al.*, (1977) dont la composition figure en annexe. A partir de chaque solution mère contenant 1 g de chaque polymère, nous avons préparé cinq dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) (trois tubes par dilution). Les tubes sont laissés incuber pendant 48 heures à 30°C. La croissance bactérienne est mise en évidence par le trouble constaté dans les tubes à essai.

Concernant la méthode du dénombrement sur boîtes de Pétri, le milieu de culture utilisé, c'est le milieu solide proposé par Zajic *et al.*, (1977) (Voir annexe)

Le milieu est stérilisé par autoclavage, à 120°C pendant 20 minutes, puis coulé dans des boîtes de Pétri et refroidi. On introduit stérilement 1 gramme de chaque polymère dans 20 ml d'eau distillée stérilisée. Trois solutions filles aux dilutions suivantes :  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , sont alors préparées à partir de chaque solution mère. Un millilitre est prélevé à partir de chaque solution fille et sert à ensemercer les boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées à 30°C pendant 48 heures.

Le dénombrement de la flore totale est réalisé, d'une part, en se référant à la table de Mac Grady (voir annexe), d'autre part en comptant le nombre de colonies observées sur chaque boîte de Pétri relatives aux trois dilutions. Les résultats du dénombrement, sont la moyenne des résultats des deux méthodes de dénombrement.

#### **II.1.7.5 Détermination de la densité :**

Les densités réelle et apparente de la chitine et des chitosanes préparés, ont été déterminées de la même façon que dans la partie analyses physico-chimique des carapaces.

### **II.2 Application du chitosane et de son dérivé carboxyméthylé dans la protection d'un fruit :**

L'application menée dans le cadre de ce travail, consiste en la protection d'un fruit, la tomate en l'occurrence, par le chitosane (C) et de son dérivé carboxyméthylé (CC). Le but étant de prolonger la durée de stockage du fruit après la récolte.

#### **II.2.1 Préparation des tomates :**

La tomate qui appartient à l'espèce *Lycopersicon esculentum* Mill, a été récoltée dans une exploitation agricole située à Bordj-El-Kiffan.

Les essais ont porté sur 200 tomates matures et vertes, de tailles similaires et saines c'est-à-dire exemptes de toutes tares ou autres signes d'infections fongiques ou virales.

Avant leur traitement, les tomates sont désinfectées par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 10% pendant trois minutes, et séchées à l'air libre.

## II.2.2 Préparation des solutions de Chitosane et Carboxyméthylchitosane :

Deux solutions à 0,5% et 2% (P/V) de chaque polymère ont été préparées dans du HCl à 0,25 N. Les solutions sont centrifugées à 6000 tours/minute pendant cinq minutes afin d'éliminer les particules insolubles. Le pH est ajusté à 5,6 avec une solution de NaOH à 1N. Notons qu'à ce pH le chitosane, de pKa égale à 6,2, est chargé positivement. Il présente, de ce fait, une activité biologique maximale (El Ghaouth *et al.*, 1992).

Les solutions sont additionnées de Tween 80 (acide oléique) avec une proportion de 0,1 (v/v) qui a la propriété d'augmenter la mouillabilité des solutions.

Une solution qui sert de témoin est préparée, en mélangeant le Tween 80 toujours avec la même proportion, avec de l'eau distillée stérilisée de pH préalablement ajusté à 5,6.

Les tomates sont réparties en cinq lots comprenant chacun vingt tomates. Chaque lot est traité par immersion dans chaque solution de polymère et dans la solution témoin.

Après séchage à l'air libre, les lots sont stockés à température ambiante (30°C) pendant 30 jours.

Le même nombre de lots est préparé, dans ce cas le stockage se fait à 20°C.

## II.2.3 Suivi des paramètres physico-chimiques durant le stockage :

### A) Les paramètres physiques :

Le suivi des paramètres physiques suivants, a porté sur cinq tomates de chaque lot.

#### A1) Le poids :

Les mesures du poids sont réalisées quotidiennement. La diminution du poids, est calculée de la manière suivante :

$$T\% = P_j / P_0 \cdot 100$$

Où :  $P_j$  représente la moyenne des cinq valeurs du poids mesurées quotidiennement.

$P_0$  représente la moyenne des cinq valeurs du poids mesurées le premier jour du stockage (Jour 0)

## **A2) L'indice de couleur :**

L'appréciation de la couleur est faite visuellement, en se référant à une échelle de 1 à 6 d'après *The U.S. Department of Agriculture Visual Color Chart* (El Ghaouth *et al.*, 1992). Les chiffres indiquent les différentes teintes qu'adopte la tomate au cours du mûrissement :

**1 : vert ; 2 : vert cassé ; 3 : virage au rose (1/3) ; 4 : virage au rose (2/3) ; 5 : rouge clair ; 6 : rouge vif.**

La détermination de l'indice de couleur est effectuée tous les deux jours.

## **A3) La texture : (indice de fermeté)**

L'appréciation de la texture est réalisée de manière subjective, par pressage avec le doigt ce qui permet d'établir une échelle de trois points : (Worrell *et al.*, 2002).

**1 : fruit incompressible ;**

**2 : fruit spongieux (déformation réversible) ;**

**3 : fruit mou (déformation permanente)**

L'appréciation de ce paramètre se fait également tous les deux jours.

## **B) Les paramètres chimiques :**

Les mesures sont réalisées tous les deux jours, en duplicat, et portent sur les quinze tomates restantes de chaque lot.

### **B1) Dosage de l'acidité titrable :**

L'acidité a été déterminée selon la méthode de Brecht *et al.*, (1976), qui consiste à titrer un échantillon de 25 g de tomate triturée, par une solution de NaOH à 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 (El Ghaouth *et al.*, 1992).

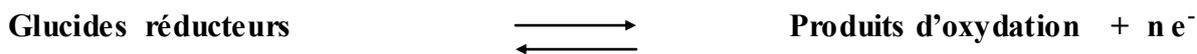
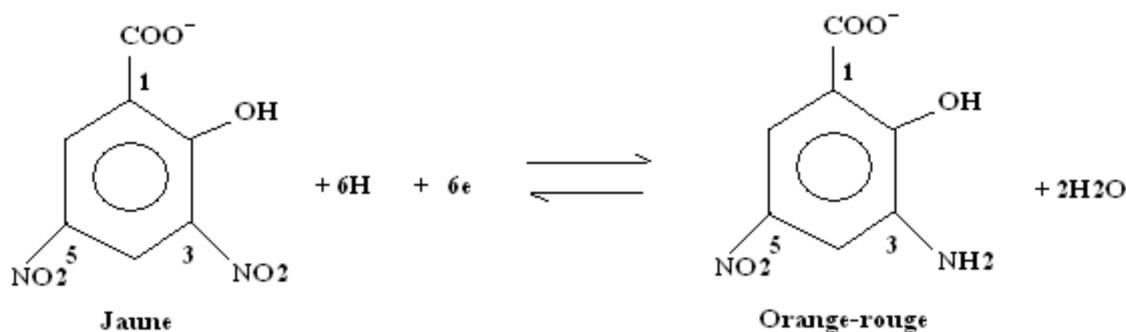
### **B2) Dosage des sucres réducteurs :**

Les sucres réducteurs sont constitués par l'ensemble des sucres à fonction cétonique ou aldéhydique.

Le dosage des sucres réducteurs a été effectué par l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS).

### B2.1) Principe de la méthode :

En milieu alcalin et à chaud, le 3,5 D.N.S jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé.



La chimie de la réaction est complexe et la réaction d'oxydoréduction avec les glucides n'est pas stoechiométrique, les courbes d'étalonnage ne passent pas toujours par l'origine.

Le réactif au DNS est un mélange de deux solutions :

Solution 1 : dissoudre 300g de tartrate de potassium dans 500ml d'eau distillée.

Solution 2 : dissoudre 10g de DNS dans 200ml de soude à 2 N.

Mélanger extemporanément les solutions 1 et 2 et compléter à 1 l avec de l'eau distillée.

### B2.2) Gamme d'étalonnage :

Dans une série de six tubes à essai :

- On introduit 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 ml de solution étalon à 0,45 en glucose.
- On complète à 1 ml avec de l'eau distillée.
- On ajoute 2ml de réactif au 3,5-dinitrosalicylate.

Tous les tubes, bouchés, sont portés au bain-marie bouillant en même temps exactement cinq minutes. Puis ils sont refroidis dans un bain d'eau glacée.

On complète chaque tube à 10ml avec de l'eau distillée. On homogénéise et on laisse reposer 15 minutes à température ambiante.

Les lectures des densités optiques sont réalisées à 540nm contre le blanc réactif.

### **B2.3) Dosage de l'essai :**

Les sucres solubles ont été extraits avec 100ml d'un mélange méthanol-eau 80 :20 (v/v), à partir d'un échantillon de 25 g de tomate broyée. Le mélange est centrifugé à 6000 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et complété à 100 ml avec de l'eau distillée. La teneur en sucres réducteurs a été exprimée en g/ 100g de poids frais.

### **B3) Dosage des sucres totaux :**

Le dosage des sucres totaux a été effectué par la méthode Dubois (1956) (Dubois *et al.*, 1956).

Les termes sucres totaux ou sucres neutres sont utilisés pour désigner les monosaccharides neutres entrant dans la composition des polysaccharides.

#### **B3.1) 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) (b).

#### **B3.2) Préparation de la gamme d'étalonnage :**

- Dissoudre 50mg de glucose et 50mg de fructose dans 100ml d'eau distillée.
- Prendre de la solution précédente 4ml et compléter à 50ml.
- 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 5ml 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.

### **B3.3) 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/ 100 g de poids frais.

### **B4) 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.

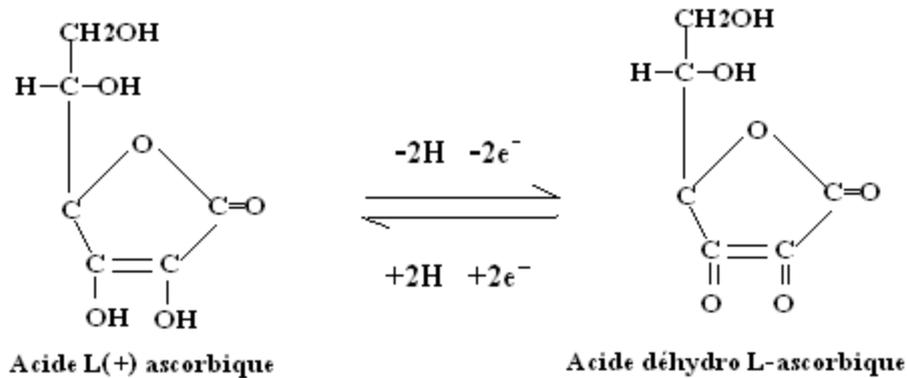
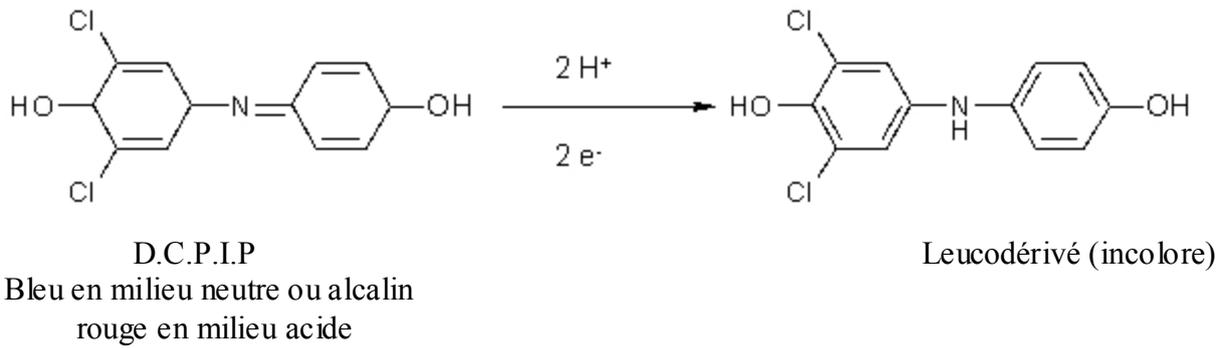
C'est, en fait, non un acide, mais une lactone ; on dit volontiers la  $\gamma$ -lactone de la forme ène-diol de l'acide L (+)-2-cétogulonique.

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.

#### **B4.1) 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 :



#### B4.2) Extraction de la vitamine C :

La vitamine C hydrosoluble, est extraite à l'aide d'une solution d'acide métaphosphorique (HPO<sub>3</sub>)<sub>n</sub> à 2%.

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

#### B4.3) 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<sub>étalon</sub>) 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 100ml :

- 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.

#### **B4.4 Dosage de l'essai :**

Placer dans une fiole de 100ml :

- 5ml de solution de vitamine C extraite ( $V_{\text{essai}}$ ) ;
- 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.

#### **B4.5 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.

### III.1 Composition chimique des carapaces :

Les résultats de l'analyse physicochimique des carapaces sont montrés dans le tableau 3 suivant :

**Tableau 3 : Paramètres physiques et composition chimique des carapaces de crevette *Parapenaeus longirostris***

| Paramètres physiques et composition chimique |        |
|--|--------|
| Densité apparente                            | 0,464  |
| Densité réelle                               | 1,33   |
| Chitine                                      | 23,7 % |
| Protéines                                    | 40,6 % |
| Cendres                                      | 20,2 % |
| Corps gras et pigments                       | 15,5 % |

Les carapaces de la crevette *Parapenaeus longirostris* est composée de 23,7 % de chitine par poids sec. Ce résultat est comparable à celui obtenu par Liang en travaillant sur l'espèce *Solenocera melantho*, qui obtient un taux de 23,3 % (Chang *et al.*, 1997) et celui obtenu par No *et al.*, (1989) chez la langoustine, qui en contient 23,6 %. Par ailleurs, Liang obtient un taux de protéines de 16,4 % et un taux de cendres de 42,4 %. No obtient des taux de protéines et de cendres de 16,9% et 63,6 % respectivement. Le taux de protéines obtenu est relativement élevé de l'ordre de 40 % et ce contrairement au taux de cendres qui est relativement faible de l'ordre de 20 %. Il existe apparemment une différence considérable dans la composition chimique des carapaces de crustacés. Cette différence est due à la variation des espèces, à l'alimentation, au stade de la mue, à l'emplacement de la pêche ou à d'autres facteurs biologiques ou environnementaux (Chang *et al.*, 1997).

## III.2 Optimisation de l'extraction de la chitine :

### III.2.1 Optimisation des conditions de la déminéralisation :

Les conditions optimales de la déminéralisation des carapaces de l'espèce *Prapenaeus longirostris* obtenues sont : concentration de HCl égale à 1,5 N, un rapport volume d'acide/ masse de l'échantillon de (15/1), temps de réaction égal à 1 heure (voir Figures en annexe). La concentration d'acide à utiliser ainsi que le temps de réaction sont légèrement supérieurs à ceux trouvés par No *et al.*, (1989) qui utilise du HCl à 1N pendant 30 minutes, en dépit de la faible teneur des carapaces étudiées en carbonate de calcium, qui semble difficile à éliminer. Ceci pourrait être imputé à un problème d'accessibilité de l'acide, nécessitant ainsi son emploi à une concentration plus importante. Sous ces conditions, la matière minérale est réduite de près de 98%, elle passe de 20,2% à 0,25%. Ce résultat est proche de celui obtenu par No *et al.*, (1989) pour la langoustine.

### III.2.2 Optimisation des conditions de la déprotéinisation :

Les conditions optimales inhérentes à la déprotéinisation sont les suivantes : pour un gramme de carapaces déminéralisé, il faut 20ml de Na OH à 2 M, pendant 2 heures à 45°C(voir Figures en annexe). Toutes ces conditions semblent avoir une incidence sur la réaction de déprotéinisation, ce n'est pas toujours le cas. En effet, l'incidence du rapport poids de l'échantillon/ volume de base est insignifiant dans la déprotéinisation des carapaces de la crevette *Solenocera melantho*. Cependant, un certain volume de base est nécessaire afin de maintenir la fluidité durant la réaction (Chang *et al.*, 1997). Trois des paramètres optimisés dans le cadre de la déprotéinisation sont différents de ceux obtenus par No *et al.*, (1989). En effet, ce dernier utilise du NaOH à 0,87N avec un rapport de 1/10 à 65°C pendant 2 heures. L'utilisation du NaOH à 2N avec un rapport masse/volume de 1/20, est justifiée si l'on tient compte de la teneur élevée des carapaces en protéines (40,6%) d'une part, et d'autre part, des liaisons type covalentes qui unissent la chitine aux protéines, exemple : liaison O-glycosidique, N-glycosidique. Le taux de protéines résiduelles obtenu est de 6%, ce taux est meilleur que celui obtenu par Chang *et al.*, (1997) chez la crevette *Solenocera melantho*. Par ailleurs, Brine (1982), en étudiant différentes espèces de crabes, indique que ce taux varie de 9 à 32% (Chang *et al.*, 1997).

### III.3 Caractérisation de la chitine et des chitosanes produits :

Sur le tableau suivant, figurent les principales caractéristiques, des polymères préparés.

**Tableau 4 : Caractéristiques de la chitine et des chitosanes I et II.**

| Polymères<br>Caractéristiques | Chitine              | Chitosane I         | Chitosane II        |
|-------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Poids moléculaire (Daltons)   | 3,38 10 <sup>5</sup> | 1,2 10 <sup>4</sup> | 1,2 10 <sup>4</sup> |
| Degré de Déacétylation (%)    | 35                   | 78                  | 77,5                |
| Densité réelle                | 0,99                 | 0,97                | 0,95                |
| Densité apparente             | 0,21                 | 0,19                | 0,17                |
| Taux de cendre (%)            | 0,22                 | 0,18                | 0,2                 |
| Flore totale (cellules/g)     | 3452                 | 3230                | 3376                |

#### III.3.1 Poids moléculaire :

Le poids moléculaire moyen de la chitine est compris entre  $1,03 \cdot 10^6$  et  $2,5 \cdot 10^6$  (Majeti *et al.*, 2000). La chitine obtenue dans le cadre de notre travail, présente une masse molaire viscosimétrique de  $3,38 \cdot 10^5$ . La chaîne de chitine peut subir une dépolymérisation durant son extraction qui implique, souvent, un double traitement, l'un acide et l'autre alcalin (Kurita, 2001). C'est ce qui pourrait expliquer la valeur relativement faible du poids moléculaire de notre chitine. De plus, toujours au cours de l'extraction, notamment durant la deprotéinisation des carapaces, la molécule de chitine peut subir une déacétylation, réduisant ainsi d'avantage son poids moléculaire (Kurita, 2001).

Le poids moléculaire (PM) du chitosane varie selon sa source, mais aussi, selon la méthode de sa préparation. Les valeurs de PM des chitosanes I et II, sont relativement faibles, comparées à ceux citées dans la littérature. En effet, le PM du chitosane est compris entre  $5 \cdot 10^4$  et  $2 \cdot 10^6$  (Chenite *et al.*, 2001). Ceci est dû au fait qu'au cours de la déacétylation alcaline, la chitine subit une dégradation, ce qui a pour effet de réduire sensiblement la taille et donc le PM du produit final (Tsai *et al.*, 2002). Dans notre cas, la chitine semble avoir subi une dégradation relativement excessive d'où les valeurs de PM obtenues.

On remarque par ailleurs, que les PM des chitosanes sont similaires. Ceci indique que, les conditions chimiques des deux méthodes testées, ont eu le même effet sur la chitine.

### III.3.2 Le Degré de Déacétylation (DD) :

Le degré de déacétylation de la chitine obtenu est relativement élevé (35%), comparé au DD de 7,5% obtenu par No *et al.*, (1989) dans son travail qui a porté sur l'étude des déchets de langoustine. Mais, identique à celui déterminé par Tsai *et al.*, (2002). Ce dernier obtient un DD de 35%, en étudiant le chitosane issu de la chitine extraite à partir des carapaces de la crevette *Solenocera melonthe*. De manière générale, le DD de la chitine est compris entre 0,05 et 0,15%, et ce, selon l'origine de la chitine et de son mode d'obtention (Kurita, 2001). Sachant que la chitine n'existe pas naturellement sous forme entièrement acétylée, et que par ailleurs, la réaction de déacétylation peut se produire durant l'extraction de la chitine (traitement alcalin), le résultat obtenu, suggère que la chitine préparée dans notre travail, aurait subi, dans une certaine mesure, une déacétylation, ce qui justifierait la valeur du DD obtenue.

Le DD des deux chitosanes obtenus lors de cette étude est de 78% pour le chitosane I et 77,5% pour le chitosane II. D'une manière générale, le DD du chitosane varie de 56 à 99%, avec une moyenne de 80% (Fernandez-Kim, 2004). On remarque que, le DD du chitosane II obtenu dans cette étude selon la méthode de Mirzadeh *et al.*, (2002), est différent de celui obtenu par ce dernier (86%), chez la crevette du Golf persique. Il en est de même pour celui du chitosane I qui diffère de celui obtenu par Kolodziejska *et al.*, (2000) selon la même méthode. En effet, Kolodziejska obtient un DD de 98% en analysant le chitosane préparé à partir de la chitine extraite du krill *Euphausia superba*. L'écart observé dans les valeurs du DD est dû à la différence d'espèce d'une part, et à la méthode analytique employée pour leur détermination, d'autre part (Ahmad Khan *et al.*, 2002). En effet, Kolodziejska *et al.*, utilisent

dans leur travail la méthode titrimétrique, alors que celle employée dans le cadre de notre travail est, rappelons-le, la spectrophotométrie infrarouge.

### **III.3.3 La densité apparente :**

D'après Brine et Austin (1981), la densité de la chitine et du chitosane commerciaux varie. Ceci peut être attribué à la différence d'espèce donc à la source et à la méthode de préparation (Fernandez-Kim, 2004). La densité apparente de la chitine extraite à partir des crevettes et des crabes est 0,06 et 0,17 respectivement, indiquant que la chitine issue de la crevette est plus poreuse que celle issue du crabe. Il en est de même pour le krill qui possède une chitine 2,6 fois plus poreuse que celle de la crevette (Fernandez-Kim, 2004). La chitine extraite dans notre travail à partir de la crevette *Parapenaeus longirostris* est peu poreuse, car elle présente une densité apparente égale à 0,21, proche de celle de la chitine de crabe.

Par ailleurs, le chitosane commercial préparé à partir des carapaces de crabes présente une densité apparente comprise entre 0,18 et 0,33. La densité des chitosanes I et II est proche de celle du chitosane de crabe, notamment celle du chitosane I. Ce qui indique que les chitosanes I et II sont, au même titre que la chitine, peu poreux.

### **III.3.4 Le taux de cendre :**

La mesure du taux de cendre est un bon indicateur de l'efficacité de la déminéralisation. La teneur du chitosane en cendre, constitue un paramètre important. En effet, certains résidus de cendre associés au chitosane peuvent affecter sa solubilité, dont la conséquence directe est la réduction de sa viscosité. Un chitosane de qualité élevée devrait avoir une teneur en cendre inférieure à 1% (Fernandez-Kim, 2004). Il en est de même pour la chitine (Mansencal, 1999). Les chitosanes I et II, présentent une teneur en cendre de 0,19% et 0,2% respectivement. La chitine quant à elle présente une teneur de 0,22%. No *et al.*, (1989) et Mirzadeh *et al.*, (2002) obtiennent des chitosanes avec des teneurs en cendre de 0,1% et 0,34% respectivement.

### III.3.5 La flore totale :

Compte tenu du caractère biodégradable des polymères de chitine et chitosane, leur durée de conservation est tributaire de leur degré de contamination. En effet, la durée de conservation sera d'autant plus réduite que le nombre de bactéries contaminantes est important.

Donc et comme il a été exposé dans la partie théorique, le nombre de bactéries constituant la flore totale retrouvée dans les biopolymères préparés, constitue un excellent indice d'appréciation de leur durée de conservation. Les biopolymères préparés dans ce travail présentent un degré de contamination proche de celui du chitosane commercialisé par *Y.B.S Corporation* qui présente un degré de contamination de 3000cellules/g.

### III.4 Application des polymères préparés dans le prolongement de la période de stockage de la tomate :

#### III.4.1 Variation du paramètre poids durant le stockage :

La perte de poids du fruit correspond en fait, à une perte en eau, qui survient tout au long de la phase du mûrissement. La variation du poids du fruit en fonction du temps est montrée sur les figures 13 et 14.

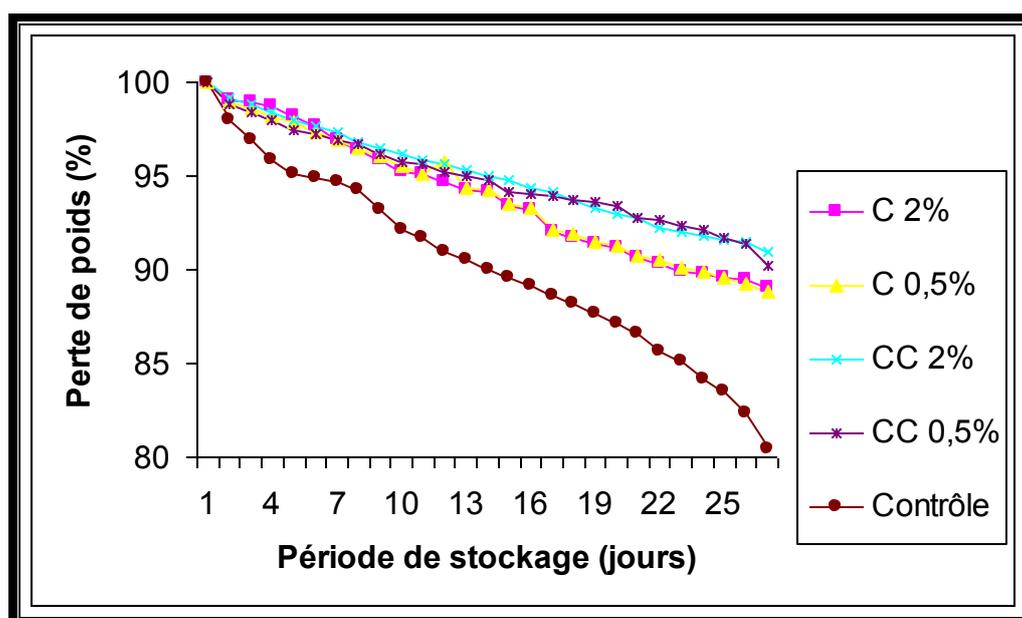


Figure13 : Variation de la perte de poids de la tomate durant le stockage à température ambiante.

L'utilisation de film protecteur de chitosane à 0,5 et 2% (C0,5% et C2%) et le carboxyméthylchitosane aux mêmes concentrations (CC 0,5% et CC2%), semble avoir un effet sur la perte de poids durant le stockage de la tomate à température ambiante, et ce par rapport au contrôle. En effet, on constate une perte de poids de près de 18,36% en 29 jours, à température ambiante pour le contrôle alors que celle-ci n'est que de 11,3%, 10,82%, 9,38% et 10,41% pour le C2%, C0,5%, CC2% et CC0,5%, respectivement, pour la même période et à la même température, soit une perte moyenne de 10,4%. L'emploi de ces biopolymères, semble réduire donc de près de 8% la perte en eau de la tomate durant son stockage. Les deux biofilms, semblent avoir un effet identique, indépendamment de leurs concentrations (différence non significative). Vasanasong *et al.*, (2002) ne constatent aucun effet sur la perte en poids, en testant le chitosane à 0,5% et 1% sur le citron, à 13°C. Salamat *et al.*, (2002) aboutissent également au même résultat en testant le chitosane à 0,5%, 0,75% et 1% sur la mandarine à différentes températures. De plus, d'après Butler *et al.*, (1996), le film de chitosane, constitue une barrière peu efficace pour la vapeur d'eau. L'effet du chitosane, constaté dans le cadre de notre travail, pourrait être imputé, à son poids moléculaire élevé. Car, Butler *et al.*, (1996) utilisent dans leur travail un chitosane de faible poids moléculaire.

Les résultats du suivi de ce même paramètre, en utilisant les biopolymères aux mêmes concentrations, durant la même période mais à 20°C, sont montrés sur la figure 14

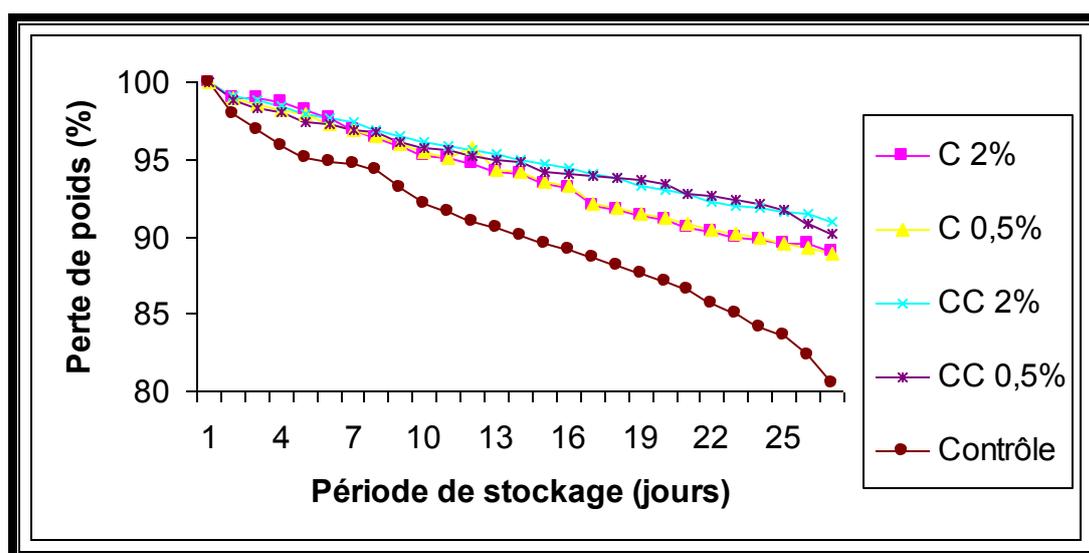


Figure14 : Variation de la perte de poids de la tomate durant le stockage à 20°C.

Ces résultats montrent une perte en eau pour le contrôle de 17,7% en 29 jours. On constate une perte de poids de 10,5%, 10,75%, 8,53% et 9,11% pour le C2%, C0,5%, CC2% et CC0,5%, respectivement, pour la même période. Soit une moyenne de 9,7%. L'emploi de ces biopolymères, semble réduire donc de 8% la perte en eau de la tomate durant son stockage, par rapport au contrôle. Cette valeur est proche de la valeur de 7,9% obtenue à température ambiante, puisque la différence n'est pas significative. Ceci indique, d'une part, que l'effet des deux biofilms aux deux concentrations testées est le même (différence non significative) et que d'autre part, la température ne semble pas influencer cet effet. Worrell *et al.*, (2002), dans leur étude qui a porté sur le fruit du pain (fruit exotique) non traités, constatent une perte en poids de 32% à température ambiante, contre 20% à 14°C ceci d'une part, et d'autre part, une faible incidence du chitosane à 1,5% sur la réduction de la perte en eau du fruit. L'absence d'influence de la température sur la perte en poids, pourrait être due à la nature du fruit. On sait que la tomate est hautement périssable, donc l'écart de température qui est de 10°C dans notre cas, n'est pas très important, pour contribuer à réduire la perte en poids.

### III.4.2 Variation du paramètre indice de couleur durant le stockage :

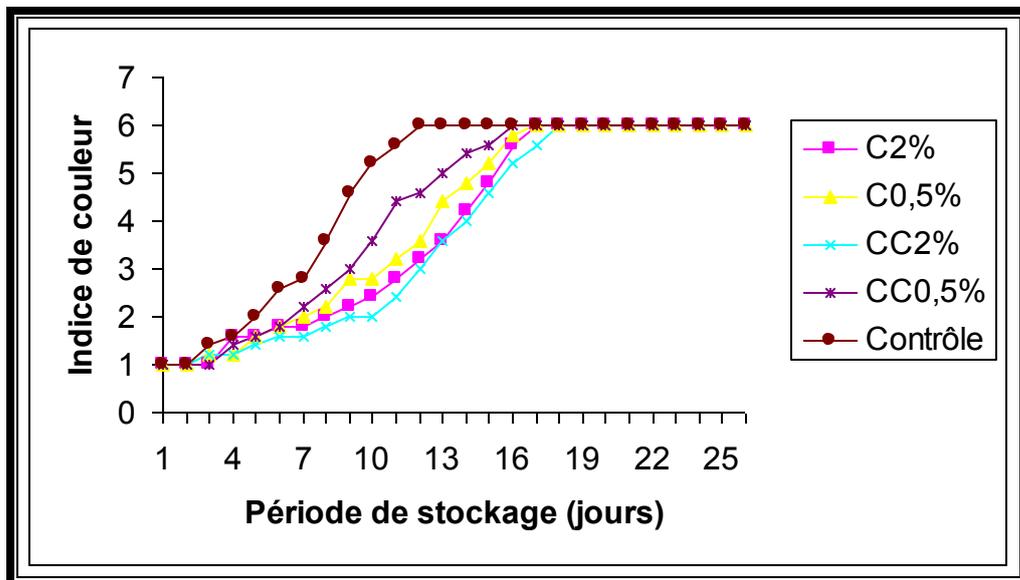


Figure 15 : Variation de l'indice de couleur de la tomate durant le stockage à température ambiante.

La couleur, est l'attribut le plus important de la qualité de la tomate. L'altération des pigments de cette dernière durant le mûrissement est à l'origine de son changement d'apparence. Les pigments responsables de la couleur rouge, que sont le lycopène et les carotènes, sont masqués par la chlorophylle durant le stade vert mature. Ils deviennent de plus en plus apparents durant le mûrissement, parallèlement à la disparition graduelle de la chlorophylle (Salunkhe *et al.*, 1974).

Le carboxyméthylchitosane et le chitosane testés aux concentrations indiquées en début de texte, affectent la couleur de la tomate, à température ambiante (Figure 15). En effet, au bout du 13<sup>ème</sup> jour de stockage, l'indice de couleur du contrôle, du C2%, C0,5%, CC2% et CC0,5% est dans l'ordre, 6(rouge), 3,2 (vert cassé), 3,6(vert cassé), 3(vert cassé) et 4,6(rose au 2/3) respectivement. Les lots de tomates couvertes par les biofilms deviennent rouges plus tardivement que le lot du contrôle. En effet, la couleur rouge est adoptée par les tomates couvertes vers le 18<sup>ème</sup> jour pour les lots traités avec le C2% et C0,5%, vers le 17<sup>ème</sup> jour pour le lot traité avec le CC0,5% et enfin vers le 20<sup>ème</sup> jour pour celui traité avec le CC2%. On constate que l'effet du carboxyméthylchitosane est meilleur que celui du chitosane. La concentration de ce dernier n'a pas d'effet sur ce paramètre, et ce contrairement à celle du carboxyméthylchitosane, dont l'effet est meilleur à la concentration de 2%, laquelle concentration permet de retarder le mûrissement de la tomate de 7 jours. El Ghaouth (1992) constate cependant, un effet significatif de la concentration du chitosane issu des carapaces de crabes sur ce paramètre : les tomates traitées avec du chitosane à 2% deviennent rouge plus tardivement que celles traitées avec du chitosane à 1%. Cette différence en matière d'effet de la concentration du chitosane sur ce paramètre, pourrait être attribuée à la source à partir de laquelle, a été extrait ce biofilm.

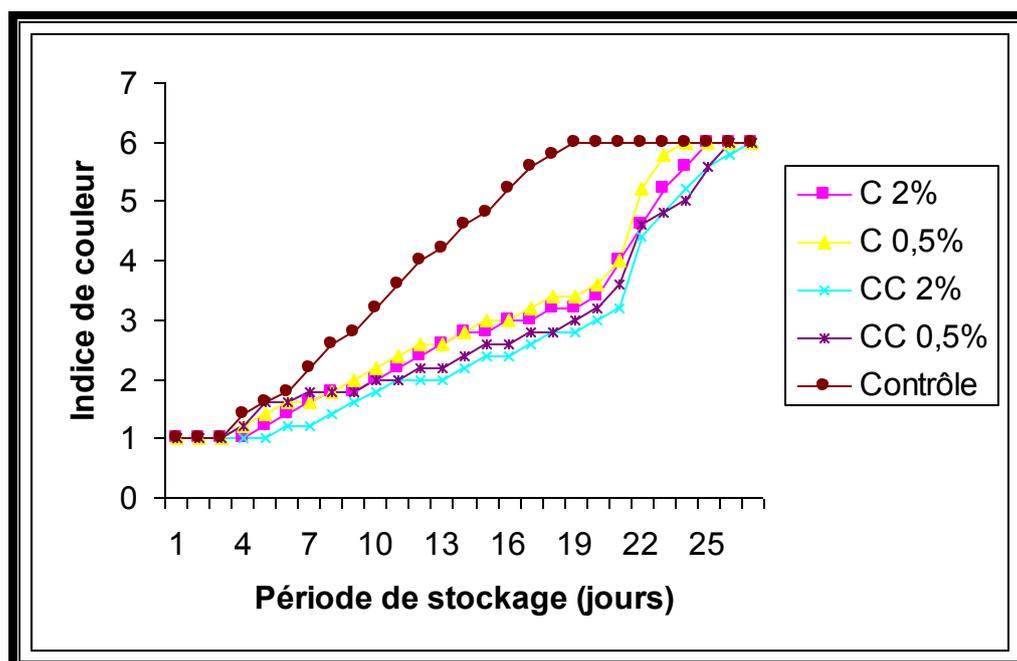


Figure 16 : Variation de l'indice de couleur de la tomate durant le stockage à 20°C.

Concernant les résultats des essais effectués à 20°C ( Figure 16), le temps au bout duquel les tomates acquièrent la couleur rouge, se voit prolonger de 8 jours pour le contrôle, de 10 jours, 9 jours, pour les lots traités avec le C2%, C0,5%, respectivement et 11 jours pour ceux traités avec le CC0,5% et CC2%. La température de stockage semble influencer la couleur des tomates, aussi bien celles du lot non traité, que celles des lots traitées avec les biopolymères, en retardant la survenue de la couleur rouge. On remarque que l'effet des biofilms est meilleur à cette température.

Au vu de ces résultats, l'indice de couleur ne semble pas dépendre de la concentration des biofilms.

### III.4.3 Variation du paramètre indice de fermeté durant le stockage :

Les résultats des essais effectués à température ambiante, sont consignés sur la figure 17.

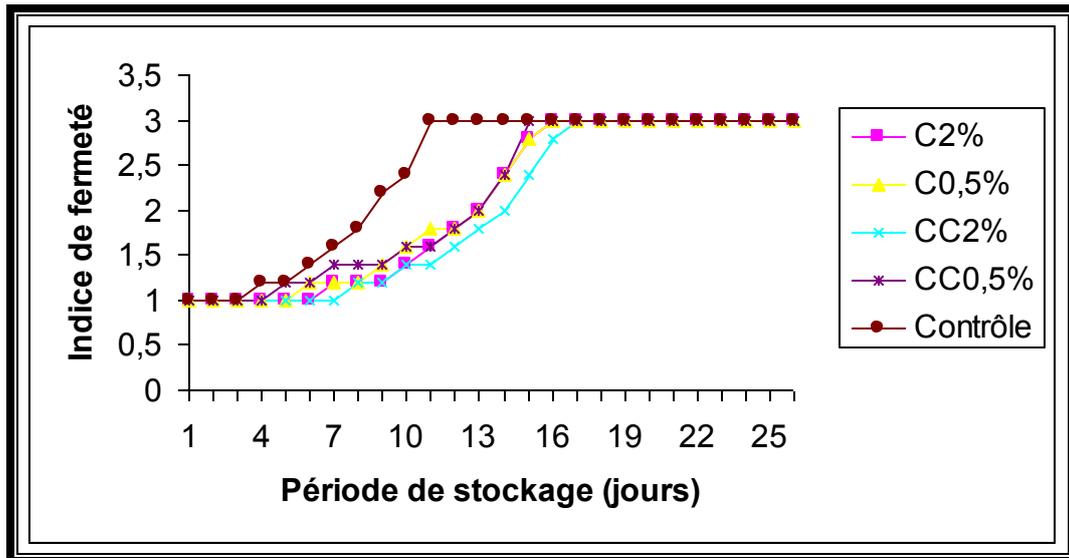


Figure 17 : Variation de l'indice de fermeté de la tomate durant le stockage à température ambiante.

A température ambiante, l'indice de fermeté de 3 (fruit mou), est atteint au bout d'une période de 11 jours de stockage pour le lot non traité, au bout de 17 jours, pour les lots traités avec le C 0,5% et C 2%, et au bout de 16 et 18 jours pour le CC 0,5% et le CC 2%, respectivement. Soit une différence par rapport au contrôle, de 5 jours pour le lot traité avec le CC 0,5%, 6 jours pour les lots traités avec le C 0,5% et C 2% et enfin 7 jours pour le lot traité avec le CC 2%. L'emploi des biofilms, semble influencer l'indice de texture, en retardant le passage du fruit d'un état de texture indéformable, à celui de texture molle. Le meilleur effet, étant obtenu avec le CC2%. Notons au passage, l'absence d'effet significatif de la concentration du chitosane, sur ce paramètre.

Par ailleurs, à 20 °C, l'évolution de ce paramètre est différente (Figure 18) .En effet, le changement de texture concernant le contrôle se produit au bout de 20 jours de stockage,

celui des lots traités avec le C 2% et C 0,5%, a lieu vers le 28<sup>ème</sup> jour, et enfin celui des lots traités avec le CC 0,5% et le CC 2%, a lieu vers le 29<sup>ème</sup> et le 31<sup>ème</sup> de stockage, respectivement. A cette température, l'effet des biofilms, semble meilleur. Worrell *et al.*, (2002), rapporte un effet très peu marqué du chitosane à 1,5%, sur la texture du fruit du pain stocké à 13°C.

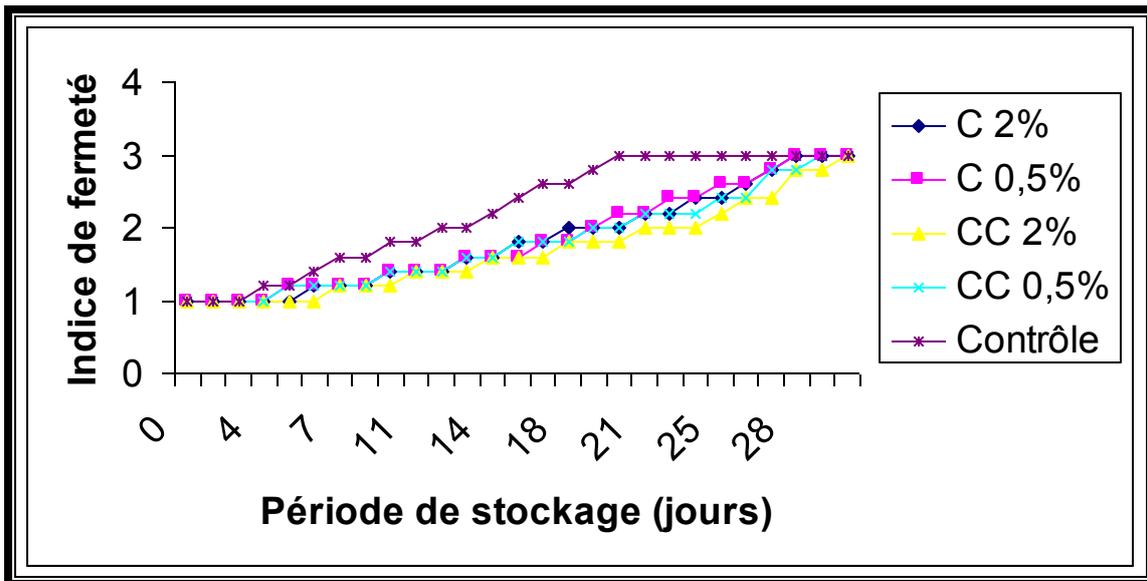
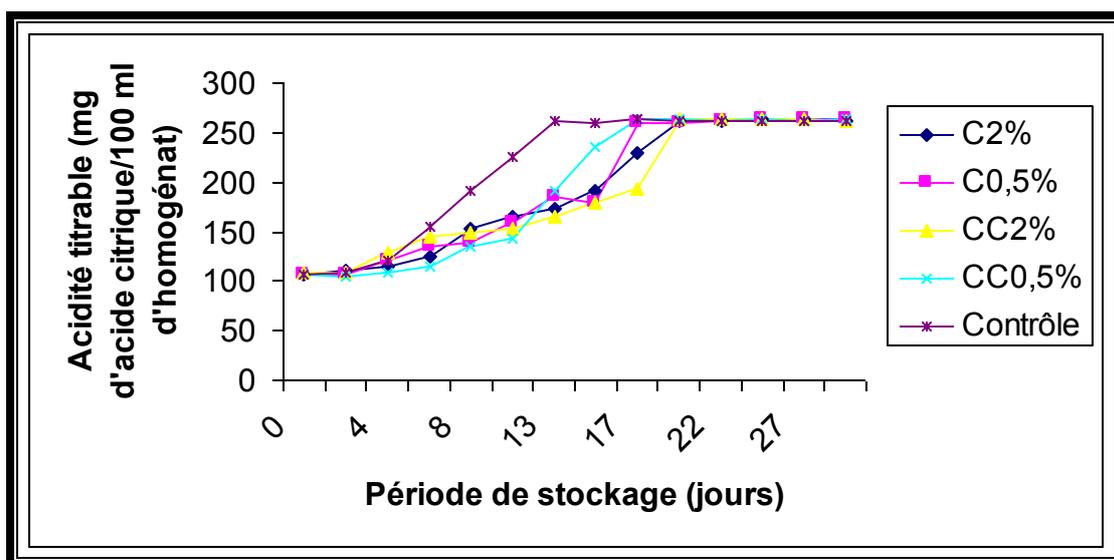


Figure 18 : Variation de l'indice de fermeté de la tomate durant le stockage à 20°C.

#### III.4.4 Variation de l'acidité titrable durant le stockage :

L'acidité titrable de la tomate mature verte, varie selon la variété. Elle est comprise entre 320 et 450 mg d'acide citrique / 100 ml d'homogénat. Celle des tomates mures, est comprise entre 410 et 550 mg d'acide citrique / 100 ml d'homogénat (Brecht *et al.*, 1976). Dans notre cas, l'acidité titrable des tomates, mesurée au stade mature vert (début de stockage), a une valeur moyenne de 107,28 mg d'acide citrique/ 100 ml d'homogénat. Elle atteint la valeur de 262,75 mg d'acide citrique / 100 ml d'homogénat au stade mûr. Ces valeurs, sont en deçà de celles de la littérature indiquées ci-dessus. Les résultats de l'évolution de ce paramètre, à température ambiante et 20°C, sont montrés sur les figures 19 et 20.



**Figure 19 : Variation de l'acidité titrable de la tomate durant le stockage à température ambiante.**

On remarque, que l'acidité titrable se stabilise autour de 262,75 mg d'acide citrique/100ml d'homogénat, au bout du 13<sup>ème</sup> jour de stockage pour le lot non traité. Cette valeur est atteinte pour les lots traités avec les biofilms, et ce, au bout de 17 jours pour le lot traité avec le C 0,5%, au bout de 15 jours pour celui traité avec le CC 0,5% et enfin, au 20<sup>ème</sup> jour de stockage pour le lot traité avec le CC 2%. Le chitosane et le carboxyméthylchitosane à 2%, semblent avoir la même incidence, sur l'évolution du paramètre étudié. De plus, cet effet est meilleur que celui exercé par ces mêmes biofilms, à la concentration de 0,5%.

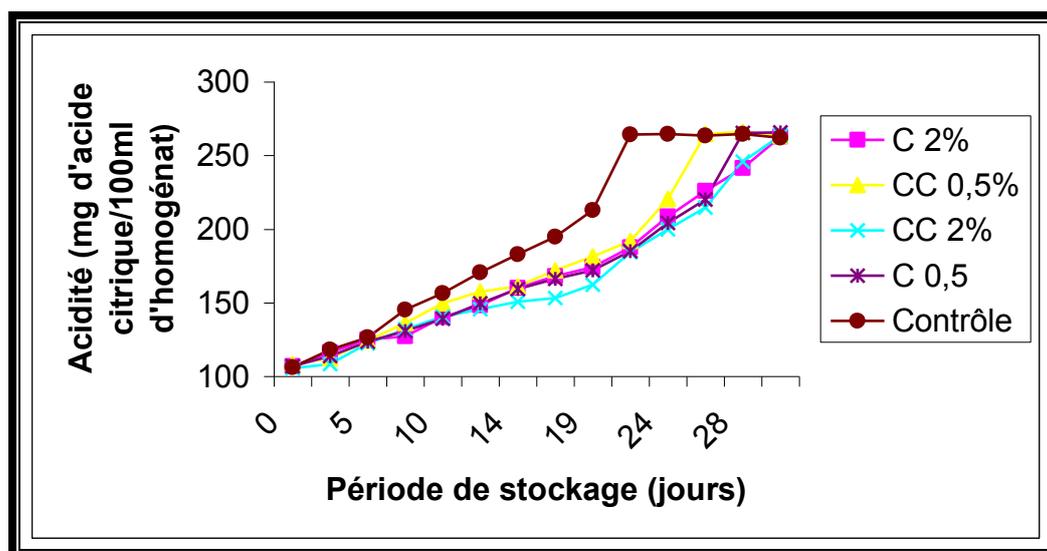


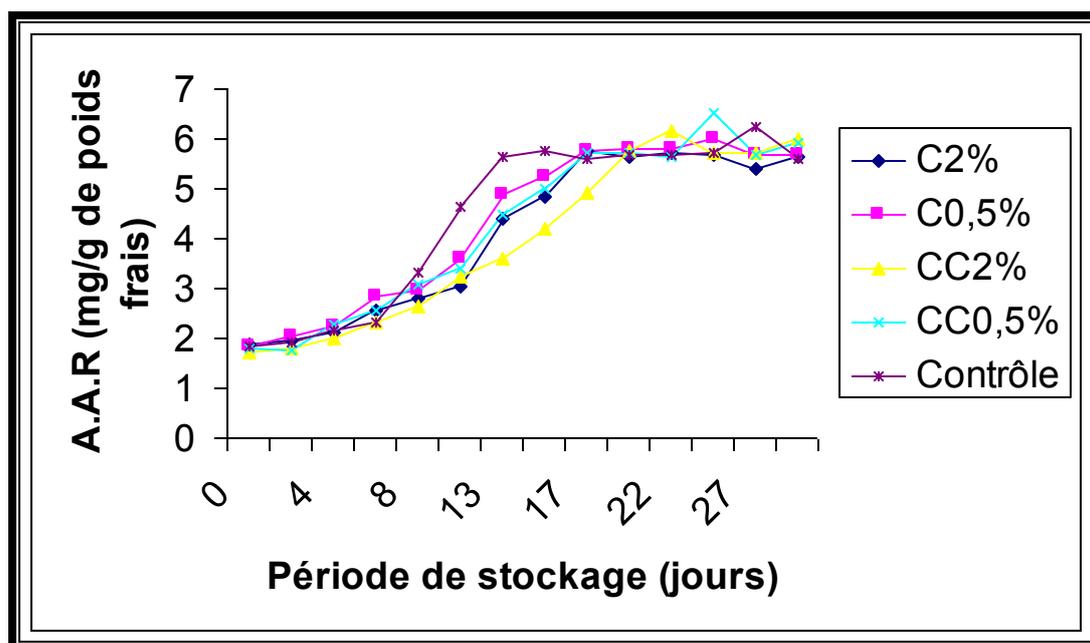
Figure 20 : Variation de l'acidité titrable de la tomate durant le stockage à 20°C.

Les résultats obtenus à 20°C, montrent que l'effet des bio films s'est amélioré. Puisque, la valeur maximale de l'acidité titrable, est atteinte au bout du 31<sup>ème</sup> jour, et ce, pour le lot traité avec le C2% et celui traité avec le CC 2%. Au bout du 28<sup>ème</sup> jour pour le lot traité avec le C 0.5% et enfin, au bout du 26<sup>ème</sup> jour, pour le lot traité avec le CC 0,5%. Notons, que le CC 2% et le C 2%, exercent le même effet à cette température, et ils demeurent par ailleurs, les meilleurs.

### III.4.5 Variation de la teneur en acide ascorbique réduit durant le stockage :

La tomate est un fruit riche en vitamine C. Sur la base du poids frais, sa teneur moyenne est de 25 mg/ 100g. Cette teneur varie avec la culture (Salunkhe *et al.*, 1974). La teneur moyenne en A.A.R des tomates vertes matures est de 8,88mg/100g de poids frais (Brecht *et al.*, 1976).

Les résultats de la variation de Acide ascorbique réduit ( l'A.A.R), des tomates traitées avec les biofilms à température ambiante sont donnés sur la figure 21.



**Figure 21 : Variation de la teneur en A.A.R de la tomate durant le stockage à température ambiante.**

La teneur en A.A.R des fruits verts matures est relativement faible par rapport à la valeur moyenne retrouvée dans la littérature. Il en est de même pour la teneur à l'état mûr qui est de 5,8mg/100g de poids frais. Watada et al., (1976) rapporte que la différence en teneur en A.A.R entre les variétés de tomates, est plus grande que celle entre les deux stades de développement, à savoir, le stade mature vert et le stade mûr (Klein, Perry, 1982).

Une teneur en A.A.R de 5,64 mg/100g de poids frais, est obtenue au bout de 13 jours de stockage pour le contrôle. Cette teneur est maximale, elle correspond à celle du fruit à l'état mûr. Cette teneur, est atteinte au bout du 17<sup>ème</sup> jour, pour le lots traités avec le CC 0,5%, C 0,5% et le C 2% et au bout du 20<sup>ème</sup> jour, pour le lot traité avec le CC 2%. Les biofilms retardent donc le mûrissement du fruit. Ce retard, par rapport au contrôle, est de 4 jours pour les lots traités avec le CC 0,5%, C 0,5% et le C 2%, et il est de 7 jours, pour le lot traité avec le CC 2%.Ce dernier, semble avoir un effet meilleur.

A 20°C, on atteint la valeur de 5,7mg/100g de poids frais, au bout de 21 jours, pour le contrôle. Soit un écart de 8 jours par rapport aux résultats à température ambiante. Par ailleurs, cette valeur est atteinte au bout du 26<sup>ème</sup> jour, pour le lot traité avec le C 0,5%, au bout de

28<sup>ème</sup> jour, pour ceux traités avec le CC 0,5% et le C 2%, et enfin, au bout du 31<sup>ème</sup> jour, pour celui traité avec le CC 2% (Figure 22). Soit, un retard par rapport au contrôle de 5 jours, pour le lot traité avec le C 0,5%, 7 jours, pour ceux traités avec le CC 0,5% et C 2% et enfin, un retard de 10 jours, pour celui traité avec le CC 2%. L'effet des biofilms, se voit donc améliorer, à cette température.

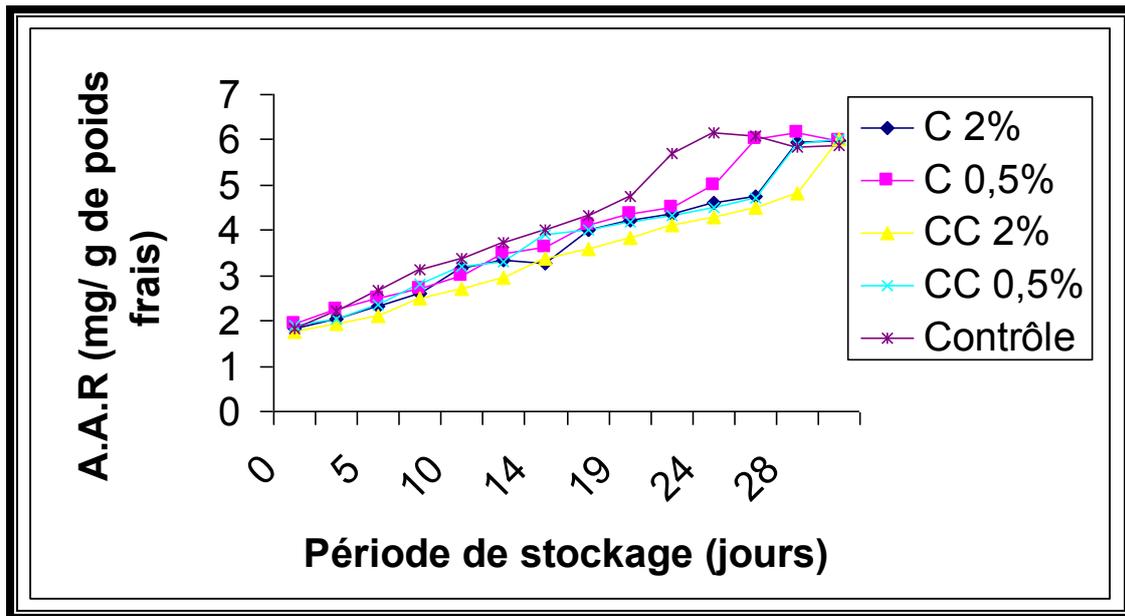


Figure 22 : Variation de la teneur en A.A.R de la tomate durant le stockage 20°C.

#### III.4.6 Variation de la teneur en sucres réducteurs durant le stockage :

La teneur en sucres réducteurs des tomates est variable, elle est comprise entre 0,2 et 23,54 g/100g de poids frais. Cette teneur dépend de la variété de tomate (Balasubramanian, 1984). Dans notre cas, la teneur des tomates en sucres réducteurs, varie au cours de leur mûrissement, à température ambiante. On passe d'une teneur moyenne de 0,5 g/100g de poids frais au stade vert mature, à 2 g/100g de poids frais au stade mûr. Cette dernière valeur, est atteinte au bout de la même période (17 jours) et ce pour tous les lots, y compris le contrôle (Figure 23). Ceci indique, que les biofilms, n'ont aucun effet sur l'évolution de la teneur des tomates en sucres réducteurs, durant le stockage.

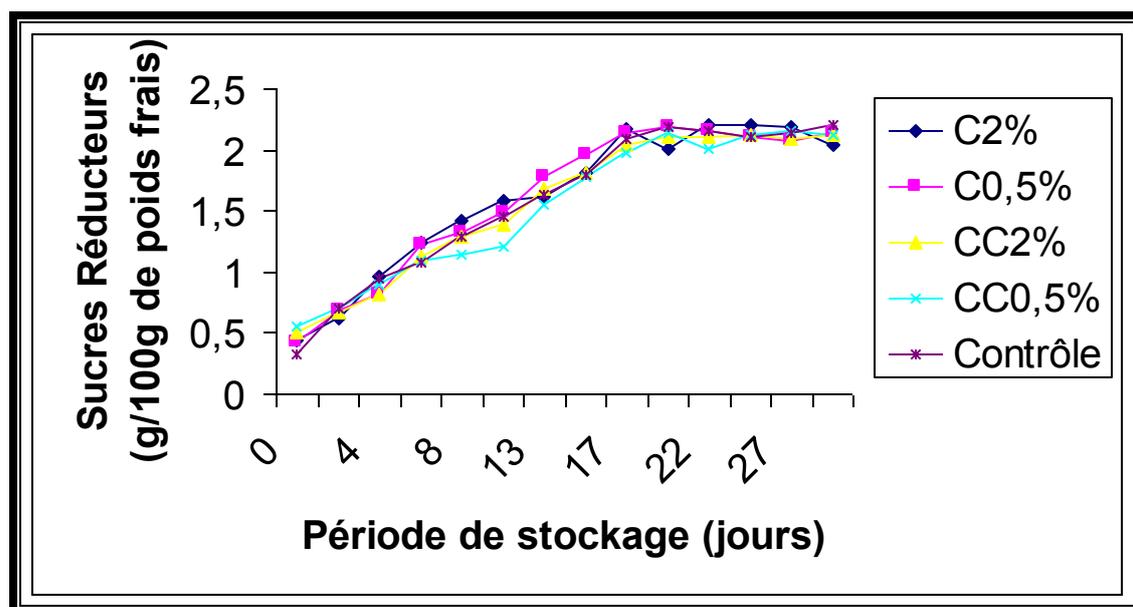


Figure 23 : Variation de la teneur en sucres réducteurs de la tomate durant le stockage à température ambiante.

Les biofilms semblent également, ne pas exercer d'effet sur l'évolution de la teneur en sucres réducteurs à 20° C. Puisque cette teneur se stabilise au bout du 21<sup>ème</sup> jour du stockage, aussi bien pour les lots traités, que pour le lot du contrôle (Figure 24). Le seul effet constaté, c'est celui de la température. En effet, la baisse de la température, a permis de retarder le mûrissement des tomates de 4 jours. Worrell *et al.*, (2002), constatent que le chitosane à 1,5%, exerce un effet sur le prolongement de la durée de stockage, à température ambiante et à 13°C, du fruit du pain. Cette différence d'effet du chitosane, est sans doute due à la différence des fruits traités d'une part, et d'autre part, à la source du chitosane, c'est-à-dire à ces propriétés physiques, notamment le DD.

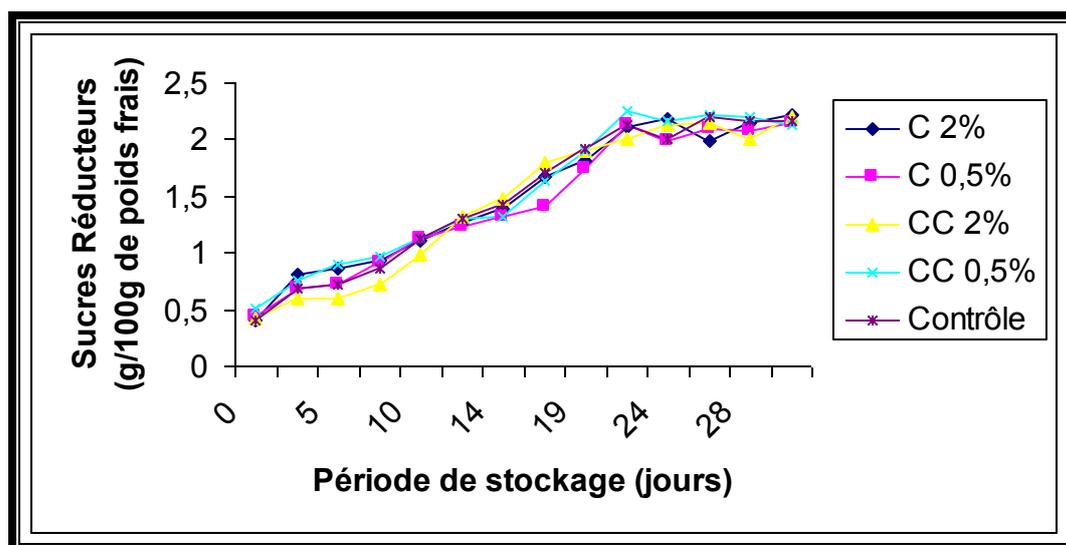
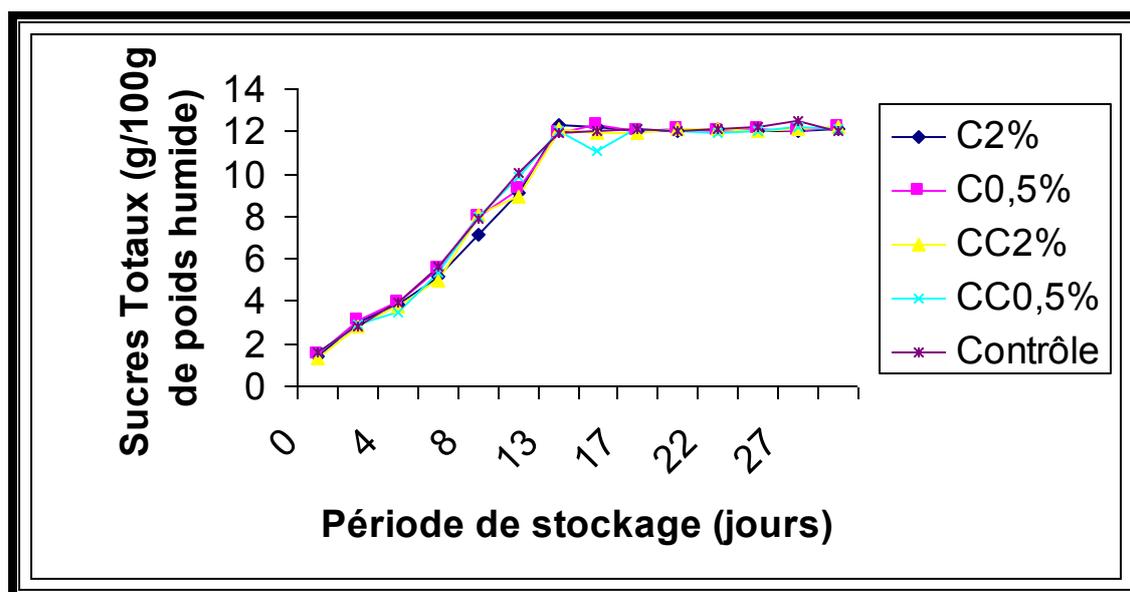


Figure 24 : Variation de la teneur en sucres réducteurs de la tomate durant le stockage à 20°C.

#### III.4.7 Variation de la teneur en sucres totaux durant le stockage :

La teneur en sucres totaux, varie durant le processus de mûrissement de la tomate. Elle passe 1,3 g/100g de poids frais au stade mature vert, à 12g/100g de poids frais, au stade mûr. Ceci, est en accord avec le résultat de Rosa (1926), qui montre que la teneur en sucres totaux de la tomate, augmente durant son stockage (Salunkhe *et al.*, 1974).

Les résultats du traitement des tomates, à température ambiante, présentés sur la figure 25, indiquent que la teneur en sucres totaux, atteint sa valeur maximale au bout de 13 jours pour le lot non traité, ainsi que pour tous les lots traités. Ceci montre, que les biofilms utilisés, ne semblent pas exercer un effet sur l'évolution de la teneur en sucres totaux, au cours du mûrissement des tomates.



**Figure 25 : Variation de la teneur en sucres totaux de la tomate durant le stockage à température ambiante.**

A 20°C, on remarque que, la valeur maximale de la teneur en sucres totaux, est atteinte après 21 jours de stockage pour le lot non traité. Il en est de même pour ce qui est des lots non traités, (Figure 26). Ce résultat différent, du moins pour ce qui est du chitosane, de celui obtenu par Worrell *et al.*, (2002). Ces derniers, notent un effet du chitosane à 1,5%, sur l'évolution de la teneur en sucres totaux du fruit du pain, stocké à température ambiante et à 13°C. Cette différence est probablement due, comme énoncé plus haut, aux caractéristiques physiques des chitosanes utilisés dans les deux cas.

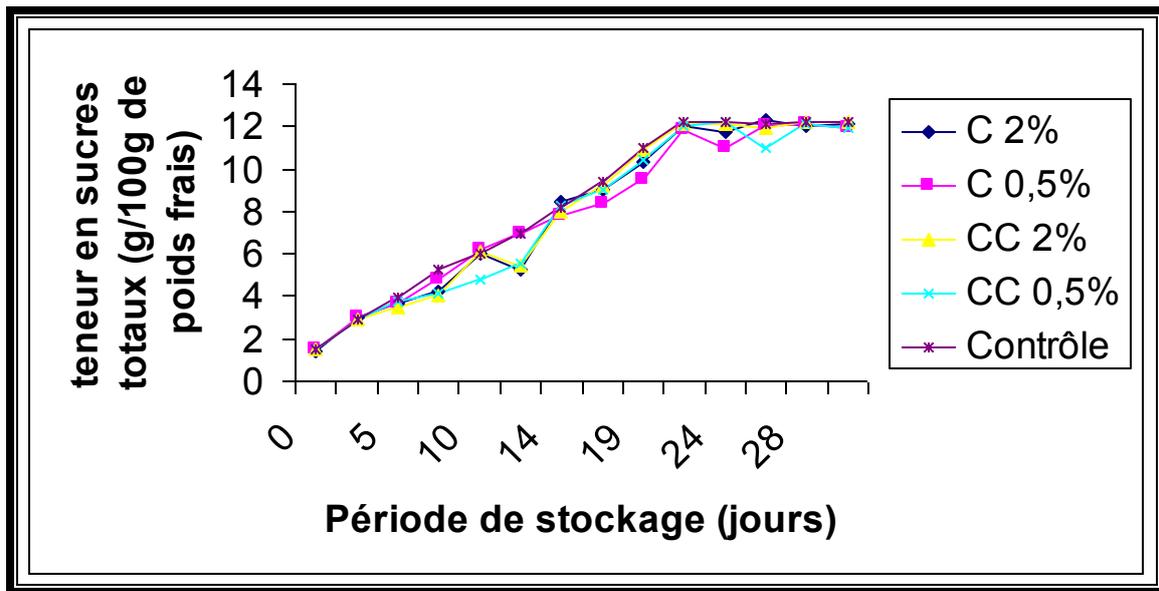


Figure 26 : Variation de la teneur en sucres totaux de la tomate durant le stockage à 20°C.

Notons enfin que, le pourrissement des tomates stockées à température ambiante apparaît vers le 20<sup>ème</sup> jour pour le lot non traité. Vers le 24<sup>ème</sup> jour pour le C2% et C 0,5%, vers le 23<sup>ème</sup> jour pour le lot traité avec le CC 0,5% et enfin vers le 27<sup>ème</sup> jour, pour le lot traité avec le CC 2%.

A 20°C, le pourrissement survient vers le 24<sup>ème</sup> jour, pour le lot de tomates non traitées, après 30 jours de stockage pour les lots traités avec le C 2%, C0,5% et le CC 0,5%. Ce n'est qu'au 33<sup>ème</sup> jour que l'on observe un début de pourrissement, affectant le lot traité avec le CC 2%.

Ces biofilms, retardent donc la survenue du pourrissement et réduisent également son incidence. En effet, la proportion de tomates affectées par le pourrissement, du lot non traité, est plus importante que celle observée dans les lots traités avec les biofilms. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par El Ghaouth *et al.*, (1992). En effet, ces derniers, constatent un effet similaire du chitosane testé à 2% sur les tomates stockées à 20°C. D'après ces auteurs, le chitosane semble exercer un effet antifongique, contre le champignon *Botrytis cinerea*, responsable du pourrissement.

La valorisation et l'intérêt portés à ces deux biopolymères que sont la chitine et le chitosane sont récents : Ils datent d'une trentaine d'années. Les propriétés qu'ils manifestent, telles la biocompatibilité, bioactivité et biodégradabilité, ont permis d'entrevoir de nombreuses applications potentielles. Ce travail s'est organisé suivant deux axes : nous nous sommes proposés dans un premier temps d'optimiser l'extraction de la chitine à partir de déchets de carapaces de crevettes. Ces dernières, rappelant le, présentent un sérieux problème de pollution. L'analyse de leur composition chimique, indique une forte teneur en protéines de l'ordre de 40%. Ces dernières peuvent faire l'objet d'une valorisation, dans le but de les utiliser comme complément alimentaire.

Nous avons dans un deuxième temps testé le potentiel lié à l'utilisation du chitosane et de son dérivé carboxyméthylé (carboxyméthylchitosane), comme films protecteurs, pouvant prolonger la durée de stockage des fruits. Notre choix s'est porté sur la tomate. Cette étude a montré que l'utilisation du carboxyméthylchitosane à 2% et à 20°C, a permis de retarder le mûrissement de la tomate, et ce, en affectant l'évolution des paramètres physico-chimiques, révélateurs du processus de mûrissement. Il a permis ainsi, de retarder la survenue de la couleur rouge et de la texture molle de 11 jours par rapport au témoin, et de retarder par ailleurs, de 10 jours, la stabilisation de la teneur de la tomate en vitamine C. De plus, l'emploi de ce biofilm, a permis de retarder le pourrissement du fruit de 9 jours par rapport au témoin.

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

- ❖ **Ahmad Khan T., Peh K. K., Ch'ng H. S., (2002);** Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, 5(3), 205-212.
- ❖ **Ait Barka E., Eullaffroy P., Clément C., Vernet G., (2004) ;** Chitosan improves development and protects *vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*, *Plant. Cell. Rep.*, 22, 608-614.
- ❖ **Andrade V. S., Barros Neto B., Fukushima K., Campos-Takaki G. M., (2003);** Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) - A factorial study, *Revista Iberoamericana Micologia*, 20, 149-153.
- ❖ **Annadurai G., Chellapandian M., Krishnan R. V., (1999);** Adsorption of reactive dye on chitin, *Environmental Monitoring and Assessment*, 59, 111-119.
- ❖ **Austin P., R., (1977);** Solvents for and purification of chitin, United States Patent: 4,062,921.
- ❖ **Bain R., (1998);** Microencapsulation of prawn feed using chitin, Undergraduate Thesis, University of Queensland.
- ❖ **Balasubramanian T., (1984);** studies on quality and nutritional aspects of tomato, *Journal of Food Science and Technology*, 21, 419-421.
- ❖ **Bellal M., (1994);** Relation entre la structure des polymères pariétaux et la floculation des levures: *Kluyveromyces lactis*, Thèse de Doctorat d'Etat, Nancy II.
- ❖ **Benesch J., Tengvall P., (2002);** Blood protein adsorption onto chitosan, *Biomaterials*, 23, 2561-2568.
- ❖ **Bouarab K., (2002);** Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système *Chondrus crispus Acrochaete operculata*, Thèse de Doctorat, Université Paris 6.
- ❖ **Boughedaoui L., (1987) ;** Quantification de l'infection ectomycorhizienne par le dosage de la chitine fongique, *Annales de l'Institut National Agronomique (El-Harrach)* vol.11, No. 2, 21-32.

- ❖ **Brecht P. E., Keng L., Bisogni C. A., Munger H. M., (1976);** Effect of fruit portion, stage of ripeness and growth habit on chemical composition of fresh tomatoes, *Journal of Food Science*, 41, 945-948.
  
- ❖ **Buescher R. W., (1979);** Influence of carbon dioxide on postharvest ripening and deterioration of tomatoes, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 104(4), 545-547.
  
- ❖ **Butler B. L., Vergano P. J., Testin R. F., Bunn J. M., Wiles J. L., (1996);** Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage, *Journal of Food Science*, 61(5), 953-955.
  
- ❖ **Campana S. P., Signini R., (2001);** Efeito de aditivos na desacetilação de quitina, *Pómeros : Ciência Tecnologia*, vol. 11, n° 4, 169-173.
  
- ❖ **Chang K. L. B., Tsai G., (1997) ;** Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste, *J., Agric., Food, Chem.*, 45, 1900-1904.
  
- ❖ **Chapeville F., Clauser H., (1974) ;** *Biochimie, Collection Enseignement des sciences*, 17, Ed. Hermann, p. 350.
  
- ❖ **Cheah L. H., Page B. B. C., Shepherd R., (1997);** Chitosan coating for inhibition of sclerotinia rot of carrots, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 25, 89-92.
  
- ❖ **Chen H.-M., Meyers S. P., (1982);** Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process, *Journal of Food Science*, 47, 892-896.
  
- ❖ **Chenite A., Buschmann M., Wang D., Chaput C., Kandani N., (2001);** Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions, *Carbohydrate Polymers*, 46, 39-47.
  
- ❖ **Cho Y-W., Cho Y-N., Chung S-H., Yoo G., Ko S-W., (1999);** Water soluble chitin as a wound healing accelerator, *Biomaterials*, 20, 2139-2145.
  
- ❖ **Compère P., Jaspar-Versali M-F., Goffinet G., (2002);** Glycoproteins from the cuticle of the atlantic shore crab *Carcinus maenas*: I. electrophoresis and western-blot analysis by use lectins, *Biol.Bull.* 202: 61-73.

- ❖ **Cosio I. G., Fisher R. A., Carroad P. A., (1982);** Bioconversion of shellfish chitin waste: waste pre-treatment, enzyme production, process design, and economic analysis, *Journal of Food Science*, 47, 901-905.
  
- ❖ **David L., Montembault A., Vizio N., Crépet A.,** Ordering in hydrophobic biopolyelectrolyte chitosan solutions, 5<sup>th</sup> International Conference on Polymer-Solvent Complexes & Intercalates, 11-13 July 2004, Lorient, France.
  
- ❖ **Drake S. R., Fellman J. K., Nelson J. W., (1987);** Postharvest use of sucrose polyesters for extending the shelf-life of stored golden delicious apples, *Journal of Food Science*, 52(5) 1283-1285.
  
- ❖ **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.
  
- ❖ **El Ghaouth A., Ponnampalam R., Castaigne F., Arul J., (1992);** Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes, *HortScience*, 27(9), 1016-1018.
  
- ❖ **Esquenet C., (2003);** Propriétés structurales et dynamiques des solutions de polyélectrolytes 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 interactions: relevance to calcium carbonate formation in invertebrates, *Calcified Tissue International*, 75(5), 548-554.
  
- ❖ **Farber J. N., Harris L. J., Parish M. E., Beuchat L. R., Suslow T. V., Gorney J. R., Garrett E. H., Busta F. F., (2003);** Microbiological safety of controlled and modified atmosphere packaging of fresh and fresh-cut produce, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 142-160.
  
- ❖ **Felt O., (1999);** Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique, Thèse de Doctorat, Université de Genève.
  
- ❖ **Fernández M., Fox P. F., (1997);** Fractionation of cheese nitrogen using chitosan, *food Chemistry*, Vol. 58, No. 4, p. 319-322.

- ❖ **Fernández Monagas S. A., (2000);** Características hidrodinámicas de carboximetilquitina y carboximetilquitosana, *Rev. Cubana. Farm*, 34(1), 6-11.
  
- ❖ **Fernandez-Kim S.-O., (2004);** Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols, Thesis, Louisiana State University.
  
- ❖ **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.
  
- ❖ **Imai T., Watanabe T., Yui T., Sugiyama J., (2003) ;** The directionality of chitin biosynthesis : a revisit, *Biochem. J.*, 374, 755-760.
  
- ❖ **Jaafari K., Elmaleh S., Coma J., Benkhouja K., (2001);** Equilibrium and kinetics of nitrate removal by protonated cross-linked chitosan, *Water SA*, 27(1), 9-13.
  
- ❖ **Jaworska M., Sakurai K., Gaudon P., Guibal E., (2003);** Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties, *Polymer International*, 52, 198-205.
  
- ❖ **Jeon Y., J., Shahidi F., Kim S-K., (2000);** Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods, *Food Rev., int.*, 16(2), 159-176.
  
- ❖ **Jessop N. M.,(1973) ;** Biosphère écologie mécanisme de l'adaptation, éditions recherche et Marketing, p.98, 100.
  
- ❖ **Johnson H. M., (2002);** Perspectives de marché dans le secteur international du poisson et des fruits de mer, Bureau du Commissaire au développement de l'aquaculture.
  
- ❖ **Jorillier M., Polonovski M., (1962);** Traité de biochimie générale, tome II, premier fascicule, Ed. Masson, p. 327.
  
- ❖ **Juang R.-S., Wu F.-C., Tseng R.-L., (2002);** Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization, *Advances in Environmental Research*, 6, 171-177.
  
- ❖ **Kurita K., (2001);** Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, *Prog.Polym.Sci.* 26, 1921-1971.

- ❖ **Kerkut G. A., Gilbert L. I., (1985);** Comprehensive insect physiology. Biochemistry and Pharmacology, volume 3, Ed. Pergamon Press, p. 78-85.
  
- ❖ **Kiefer N.,(1999);** [www.lfrance.com/Kiefer/ES.htm](http://www.lfrance.com/Kiefer/ES.htm)
  
- ❖ **Kim S.Y., Cho S. M., Lee Y. M., Kim S. J., (2000);** Thermo- and pH-responsive behaviours of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropyl acrylamide, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 78, 1381-1391.
  
- ❖ **Kim M., Han J-S., (2002);** Evaluation of physico-chemical characteristics and microstructure of tofu containing high viscosity chitosan, International Journal of Food Science and Technology, 37(3), 277-283.
  
- ❖ **Klein B. P., Perry A. K., (1982);** Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States, Journal of Food Science, 47, 941-945.
  
- ❖ **Kolodziejska I., Wojtasz-Pajak A., (2000);** Deacetylation of chitin in a two- stage chemical and enzymatic process, Bulletin of the sea Fisheries Institute, 2(150), 15-24.
  
- ❖ **Lavertu M., Xia Z., Serreqi A. N., Berrada M., Rodrigues A., Wang D., Buschmann M. D., Gupta A., (2003);** A validated <sup>1</sup>H N.M.R. method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 32, 1149-1158.
  
- ❖ **Liu X. F., Guan Y. L., Yang D. Z., Li Z., DeYao K., (2001);** Antibacterial actions of chitosan and carboxymethylated chitosan, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 79, 1324-1335.
  
- ❖ **Loiseleur J., (1963);** Techniques de laboratoire, tome I, fascicule 2, ed. Masson. p.1311, 1355, 1356.
  
- ❖ **Louisot P., (1983);** Biochimie métabolique, volume 1, Ed. Simep sa, p. 73-75, 97, 98, 105-107. (1)
  
- ❖ **Louisot P., (1983);** Biochimie métabolique, volume 4, Ed. Simep sa, p. 807. (2)

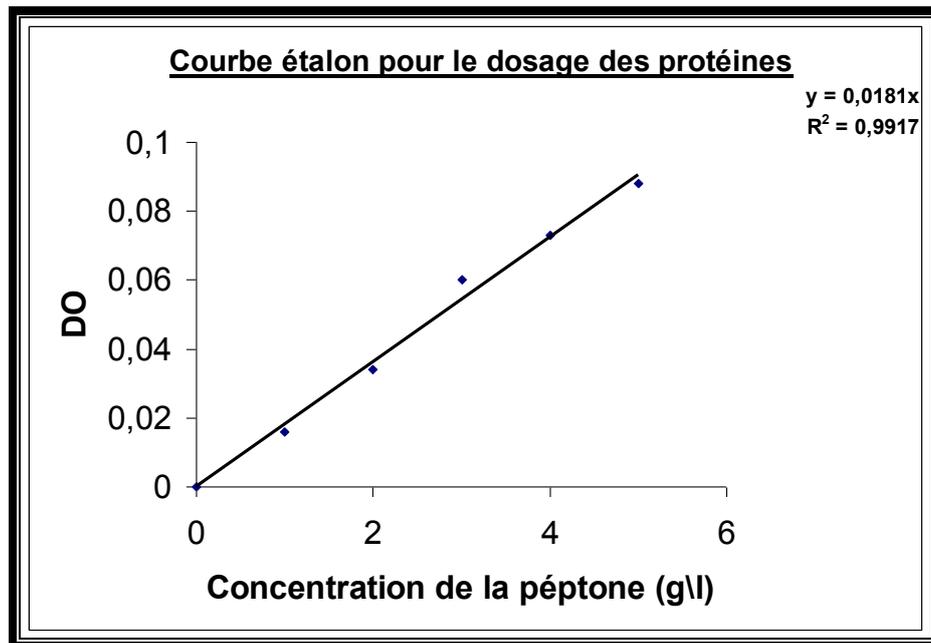
- ❖ **Majeti N. V. Ravi Kumar, (2000);** A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.
- ❖ **Mansencal R., (1999);** *Polymer Data handbook*, Ed. Oxford University Press, p.67.
- ❖ **Marta m., Guizzardi M., (1998);** The postharvest: emerging technologies for the control of fungal diseases, *Phytoparasitica*, 26(1), 59-66.
- ❖ **Merzendorfer H., Zimoch L., (2003);** Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases, *The Journal of Experimental Biology*, 206, 4393-4412.
- ❖ **Minoru M., Hyroyuki S., Yoshihiro S., (2002);** Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 14(78), 205-222.
- ❖ **Mirzadeh H., Yaghoobi N., Amanpour S., Ahmadi H., Ali Mohagheghi M., Hormozi F., (2002);** Preparation of chitosan derived from shrimp's shell of Persian gulf as blood hemostasis agent, *Iranian Polymer Journal*, 11(1), 63-68.
- ❖ **Montserrat R. P., (2002);** Development of techniques based on natural polymers for the recovery of precious metals, Thèse, Universitat Politècnica de Catalunya.
- ❖ **Mukherjee Debi P.,(2001) ;** Method for producing chitin or chitosan, United States Patent Application, 6,310,188.
- ❖ **Muzzarelli C., Francescangeli O., Tosi G., Muzzarelli R. A. A., (2004);** Susceptibility of dibutyril chitin and regenerated chitin fibres to deacetylation and depolymerization by lipases, *Carbohydrate Polymers*, 56, 137-146.
- ❖ **Niola F., Basora N., Chornet E., Vidal F., (1993) ;** A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and H.P.L.C., *Carbohydrate Research*, 238, 1-9.
- ❖ **No H. K., Meyers S. P., Lee K. S., (1989);** Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 37, No.3, 575-579.
- ❖ **Nouar A., Maurin C., (2001);** Nature of and typical populations on the characteristics facies of substratum of *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) along the Algerian coast, *Crustaceana* 74(2), 129-135.

- ❖ **Okamoto Y., Kawakami K., Miyatake K., Morimoto M., Shigemasa Y., Minami S., (2002)**, Analgesic effects of chitin and chitosan, *Carbohydrate Polymers*, 49, 249-252.
  
- ❖ **Payet L., Ponton A., Agnely F., Colinart P., Grossiord J. L.,(2002)**; Caractérisation rhéologique de la gélification d'alginate et de chitosane: effet de la température, *Rhéologie*, 2, 46-51.
  
- ❖ **Peniston Q. P., Johnson E. L., (1978)**; Process for demineralization of crustacean shells, United States Patent, 4,066,735.
  
- ❖ **Percheron F., Perlès R., Foglietti M-J., (1981)** ; Abrégé de biochimie générale, Tome 2, Ed. Masson, p. 31-33, 52,53, 62, 63.
  
- ❖ **Planas M. R., (2002)**; Development of techniques based on natural polymers for the recovery of precious metals, thesis, Universitat Politècnica de Catalunya.
  
- ❖ **Prochazkova S., Vårum K. M., Østgaard K., (1999)**; Quantitative determination of chitosan by ninhydrin, *Carbohydrate Polymers*, 38, 115-122.
  
- ❖ **Qaqish R., B., Amiji, M., M., (1999)**; Synthesis of fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan-mucin interactions, *Carbohydrate Polymers*, 38, 99-107.
  
- ❖ **Rao M. S., Muñoz J., Stevens W. F., (2000)**; Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 808-813.
  
- ❖ **Ravi D., Sivasankara Pillai V. N., (2002)** ; Flocculation of river silt using chitosan, *Water Research*, 36, 2414-2418.
  
- ❖ **Rolland A., Mumper R. J., (2001)**; Chitosan related compositions and methods for delivery of nucleic acids and oligonucleotides into a cell, United States Patent, 6,184,037.
  
- ❖ **Roy I., Mondal K., Gupta M. N., (2003)**; Accelerating enzymatic hydrolysis of chitin by microwave pre-treatment, *Biotechnol. Prog.*, 19, 1648-1653.

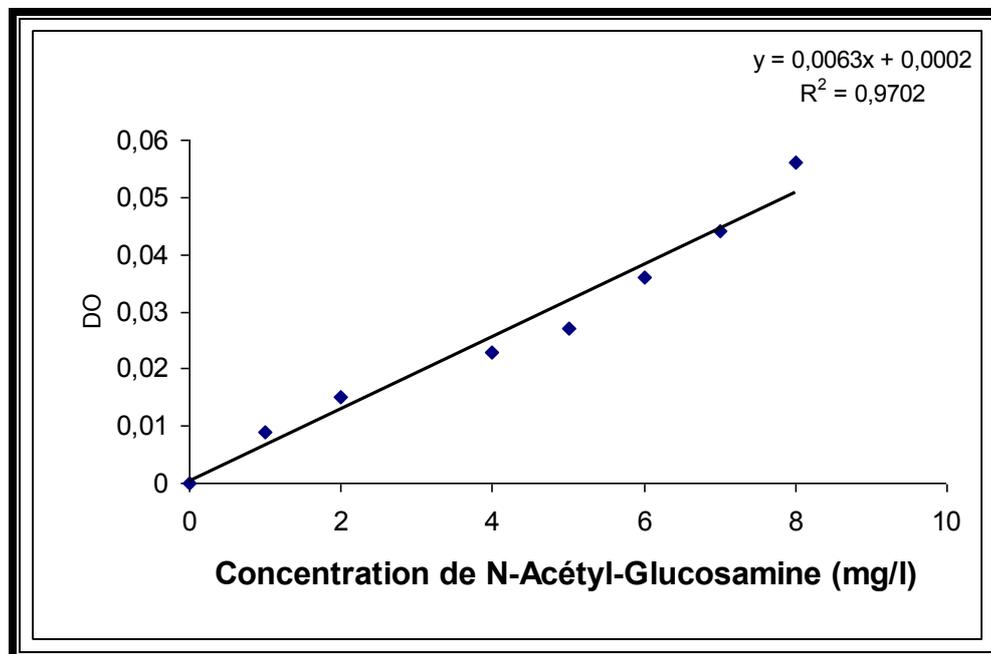
- ❖ **Sabnis S., Block L. H., (2000);** Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems I. Molecular modifications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 181-186.
  
- ❖ **Sagoo S., Board R., Roller S., (2002);** Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products, *Food Microbiology*, 19, 175-182.
  
- ❖ **Salamat K., Wongs-aree C., Kanlayanarat S., (2002);** Effects of chitosan coating on quality of “Sai-Namphaung” mandarin under low temperature storage, *The 5<sup>th</sup> Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium and Exhibition*, March 13-15, Bangkok, Thailand, pp. 512-516.
  
- ❖ **Salunkhe D. K., Jadhav S. J., Yu M. H., (1974);** Quality and nutritional composition of tomato fruit as influenced by certain biochemical and physiological changes, *Qual. Plant.*, XXIV, ½ : 85-113.
  
- ❖ **Sashiwa H., Shigemasa Y., (1999);** Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of *N*-acylated or *N*-alkylated partially deacetylated chitins, *Carbohydrate Polymers*, 39, 127-138.
  
- ❖ **Seng J.-M.,** Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie, *Biofutur*- septembre 1988, p. 40-44.
  
- ❖ **Shahidi F., Arachchi J. K. V., Jeon Y.-J., (1999);** Food applications of chitin and chitosans, *Trends in Food science and Technology*, 10, 37-51.
  
- ❖ **Shepherd R., Reader S., Falshaw A., (1997);** Chitosan functional properties, *Glycoconjugate Journal*, 14, 535-542.
  
- ❖ **Shiau S.-Y., Yu Y.-P., (1998);** Chitin but not chitosan supplementation enhances growth of grass shrimp, *Penaeus monodon*, *The Journal of Nutrition*, 128 (5), 908-912.
  
- ❖ **Shigemasa Y., Usui H., Morimoto M., Saimoto H., Okamoto Y., Minami S., Sashiwa H., (1999);** Chemical modification of chitin and chitosan 1: preparation of partially deacetylated chitin derivatives via a ring-opening reaction with cyclic acid anhydrides in lithium chloride/ *N,N*-dimethylacetamide, *Carbohydrate Polymers*, 39, 237-243.

- ❖ **Synowiecki J., Ali Abdul Quawi Al-Khateeb N., (2000);** The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards, Food Chemistry, 68, 147-152.
  
- ❖ **Taboada E., Cabrera G., Cardenas G., (2003);** Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions, Journal of the Chilean Chemical Society, 48(1), 7-12.
  
- ❖ **Tsai G-J., Su W-H., Chen, H-C., Pan C-L., (2002);** Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation, Fisheries Science, 68, 170-177.
  
- ❖ **Vårum K. M., Egelandsdal B., Ellekjær M. R., (1995);** Characterization of partially N-acetylated chitosans by near infra-red spectroscopy, Carbohydrate Polymers, 28, 187-193.
  
- ❖ **Vasanasong P., Wongs-aree C., Kanlayanarat S., (2002);** Effect of chitosan coating, gibberlic acid and modified atmosphere condition for prolong storage life of lime (*Citrus anrantifolia* Swingle), The 5<sup>th</sup> Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium and Exhibition, March 13-15, Bangkok, Thailand, pp. 517-520.
  
- ❖ **Xie W., Xu P., Liu Q., (2001);** Antioxidant Activity of Water-Soluble Chitosan Derivatives, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 11, 1699-1701.
  
- ❖ **Wai Yan Tan E., Ru Lee V., (2002);** Enzymatic hydrolysis of prawn shell waste for the purification of chitin, Department of Chemical Engineering, Loughborough University.
  
- ❖ **Wang S-L., Hsiao W-J., Chang W-T., (2002);** Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by (*Monascus purpureus* CCRC31499) in a shrimp and crab shell powder medium, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2249-2255.
  
- ❖ **Weber C. J., (2000);** Biobased packaging materials for the food industry, Foodstuffs Packaging Biopolymers.
  
- ❖ **Worrell D. B., Carrington C. M. S., Huber D. J., (2002);** The use of low temperature and coatings to maintain storage quality of breadfruit, *Artocarpus altilis* (Parks.) Fosb, Postharvest Biology and Technology, 25, 33-40.

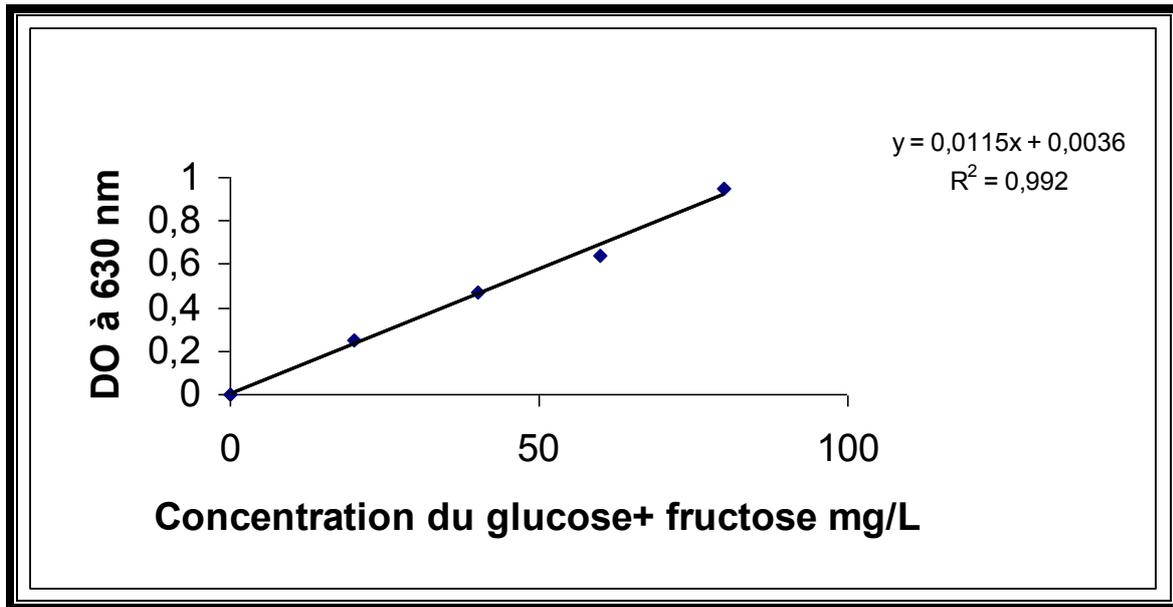
- ❖ **Yang J-K., Shih I-L., Tzeng Y-M., Wang S-L., (2000);** Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 406-413.
  
- ❖ **Yao H., Tian S., Wang Y., (2004);** Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears, *International Journal of Food Microbiology*, 93, 297-304.
  
- ❖ **Zajic J.E., Guignard H., Gerson D.F., (1977);** Emulsifying and surface active agent from, *Corynebacterium hydrocarboclastus*. *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1285 – 1301.



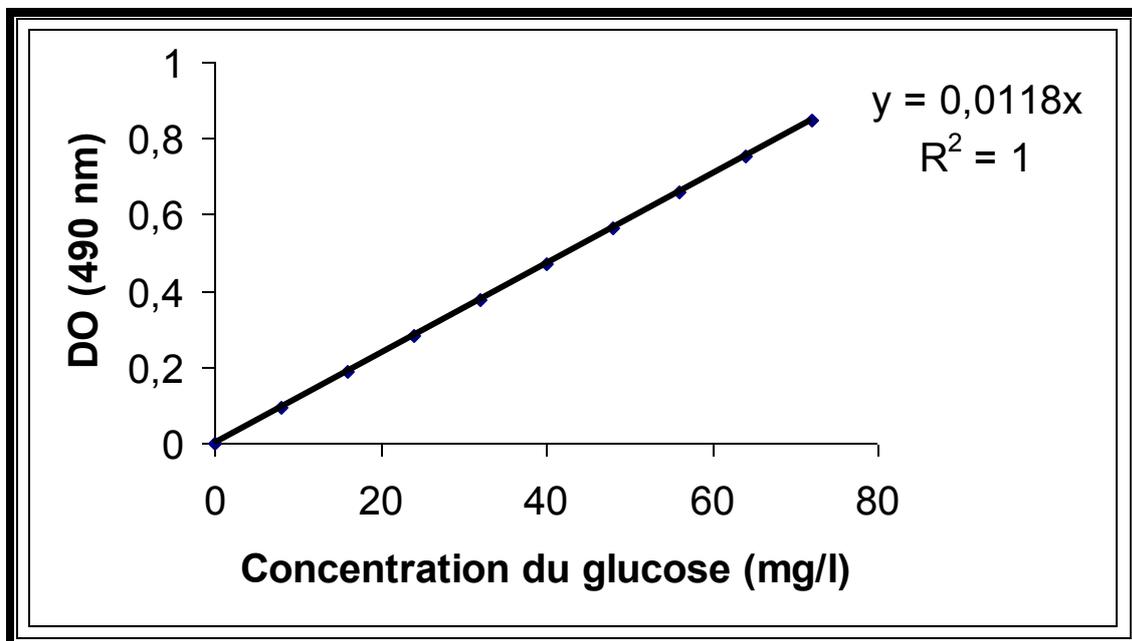
**Courbe étalon pour le dosage des protéines.**



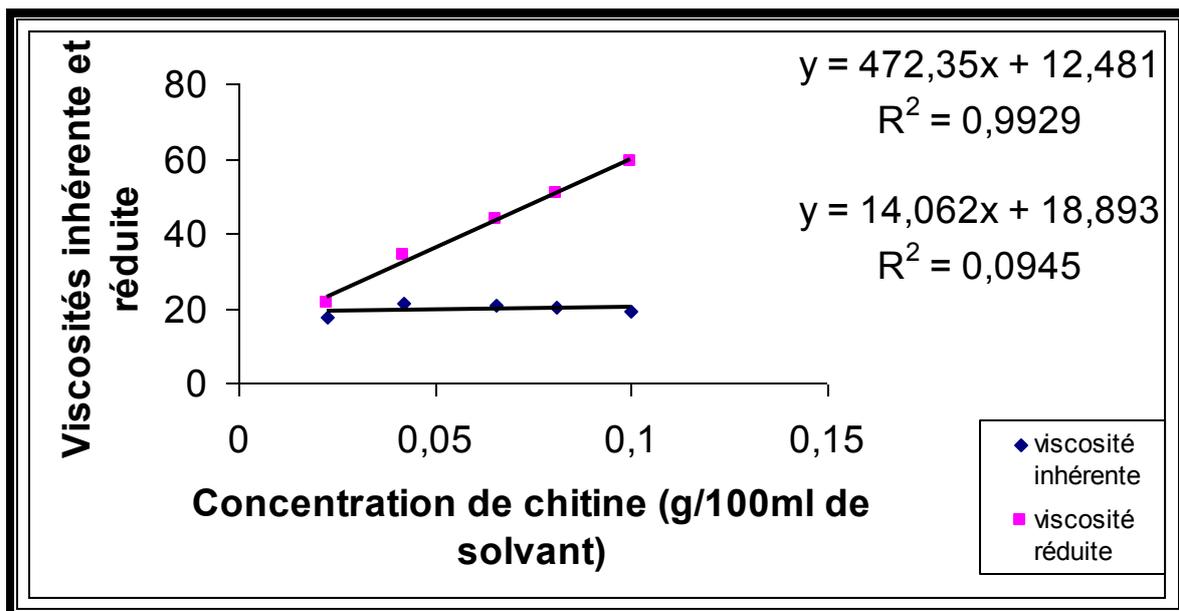
**Courbe étalon pour le dosage du N-acétylglucosamine.**



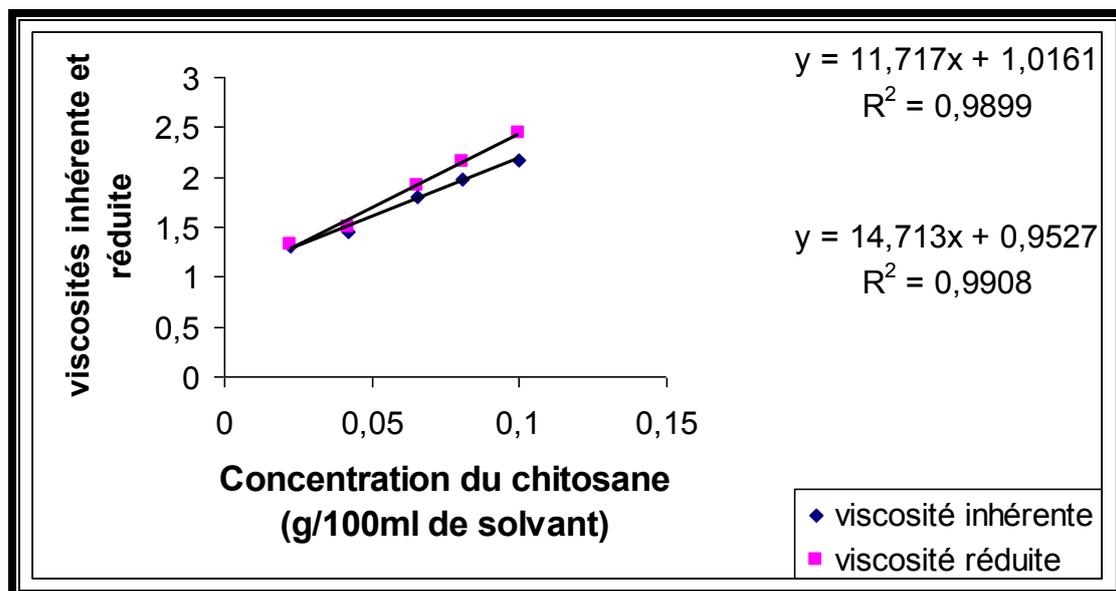
**Courbe étalon pour le dosage des sucres totaux.**



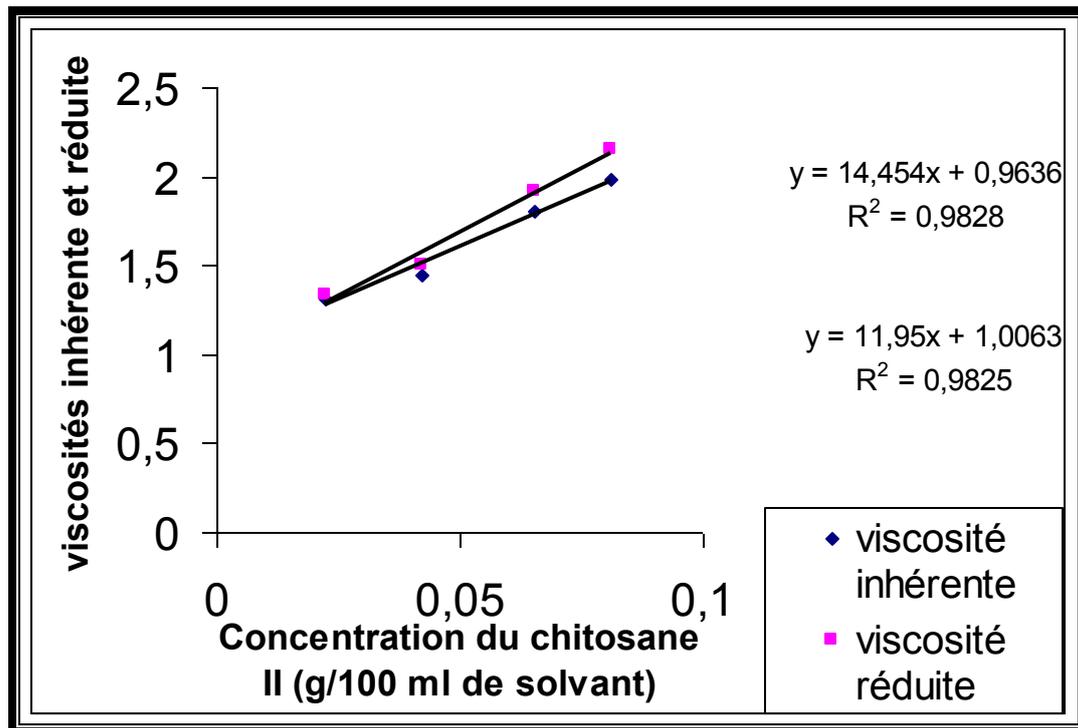
**Courbe étalon pour le dosage des sucres réducteurs.**



Variation de la viscosité réduite  $\eta_r$  et la viscosité inhérente  $\eta_i$  de la chitine en fonction de sa concentration.



Variation de la viscosité réduite  $\eta_r$  et la viscosité inhérente  $\eta_i$  du Chitosane I en fonction de sa concentration.



**Variation de la viscosité réduite  $\eta_r$  et la viscosité inhérente  $\eta_i$  du Chitosane II en fonction de sa concentration.**

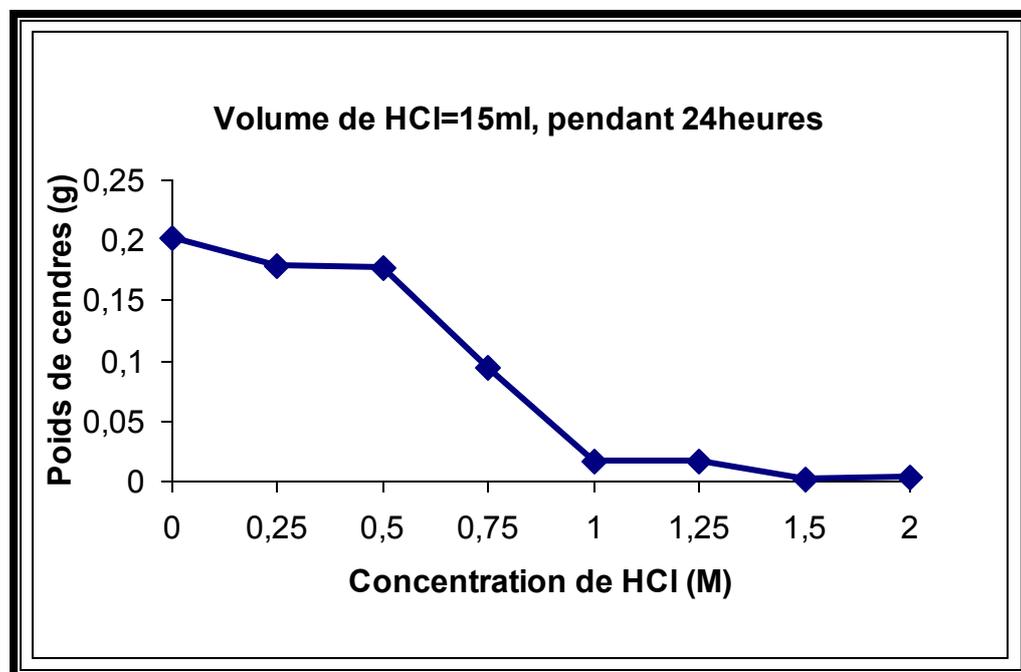
**Tableau de Mac Grady (3 tubes par dilution)**

| Nombre caractéristique | Nombre de cellules | Nombre caractéristique | Nombre de cellules | Nombre caractéristique | Nombre de cellules |
|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| 000                    | 0,0                | 201                    | 1,4                | 302                    | 6,5                |
| 001                    | 0,3                | 202                    | 2,0                | 310                    | 4,5                |
| 010                    | 0,3                | 210                    | 1,5                | 311                    | 7,5                |
| 011                    | 0,6                | 211                    | 2,0                | 312                    | 11,5               |
| 020                    | 0,6                | 212                    | 3,0                | 313                    | 16,0               |
| 100                    | 0,4                | 220                    | 2,0                | 320                    | 9,5                |
| 101                    | 0,7                | 221                    | 3,0                | 321                    | 15,0               |
| 102                    | 1,1                | 222                    | 3,5                | 322                    | 20,0               |
| 110                    | 0,7                | 223                    | 4,0                | 323                    | 30,0               |
| 111                    | 1,1                | 230                    | 3,0                | 330                    | 25,0               |
| 120                    | 1,1                | 231                    | 3,5                | 331                    | 45,0               |
| 121                    | 1,5                | 232                    | 4,0                | 332                    | 110,0              |
| 130                    | 1,6                | 300                    | 2,5                | 333                    | 140,0              |
| 200                    | 0,9                | 301                    | 4,0                |                        |                    |

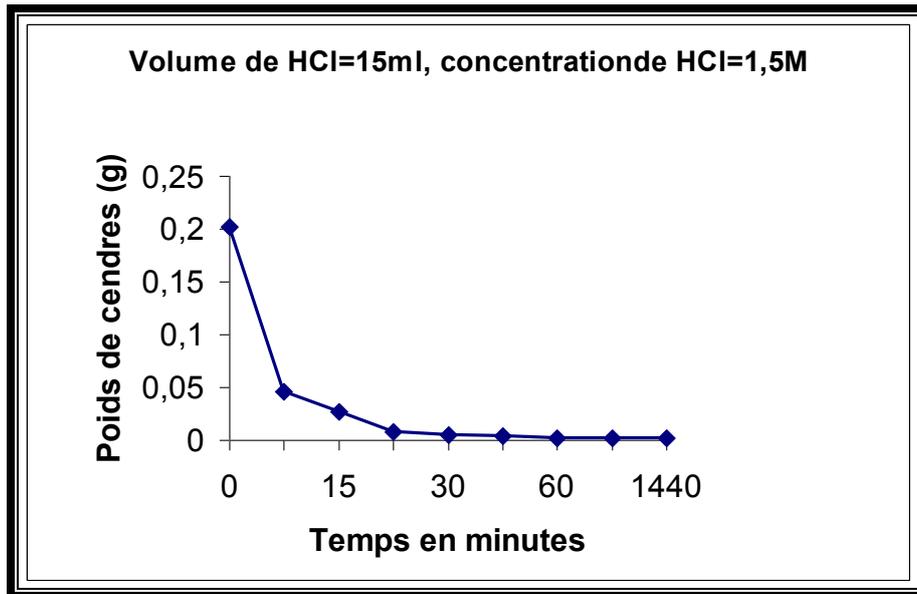
**Milieu de culture proposé par Zajic et al., (1977), de composition suivante :**

|                   |           |         |
|-------------------|-----------|---------|
| $K_2HPO_4$        | (MERCK)   | 5 g     |
| $KH_2PO_4$        | (MERCK)   | 2 g     |
| $MgSO_4$          | (PROLABO) | 2 g     |
| NaCl              | (MERCK)   | 0,1 g   |
| $NaNO_3$          | (PROLABO) | 5 g     |
| Glucose           | (PROLABO) | 15 g    |
| Extrait de levure | (MERCK)   | 3 g     |
| Agar-Agar         |           | 18 g    |
| Eau distillée     |           | 1 litre |

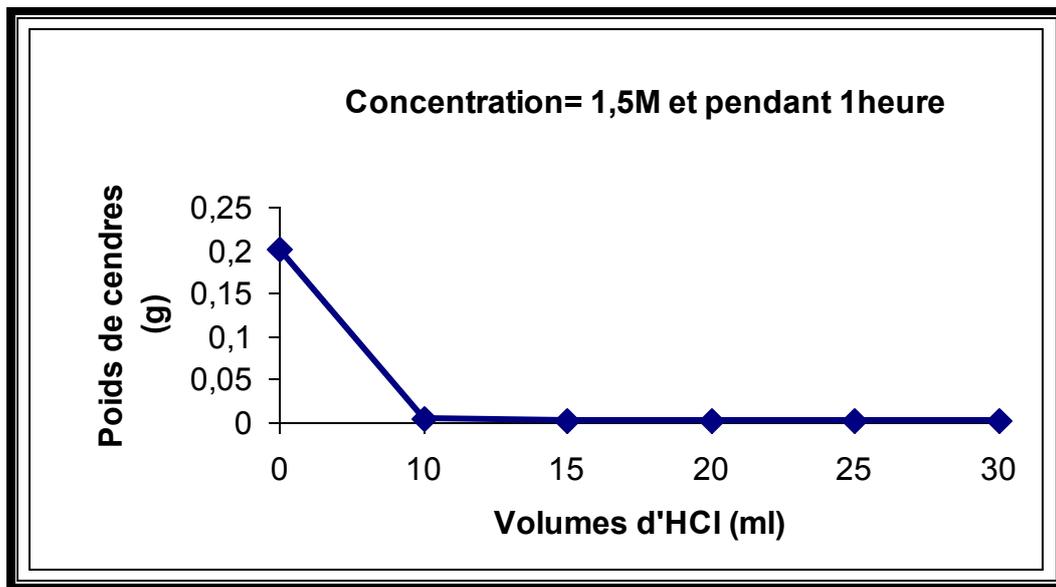
Le milieu liquide est préparé sans l'ajout d'Agar-Agar.



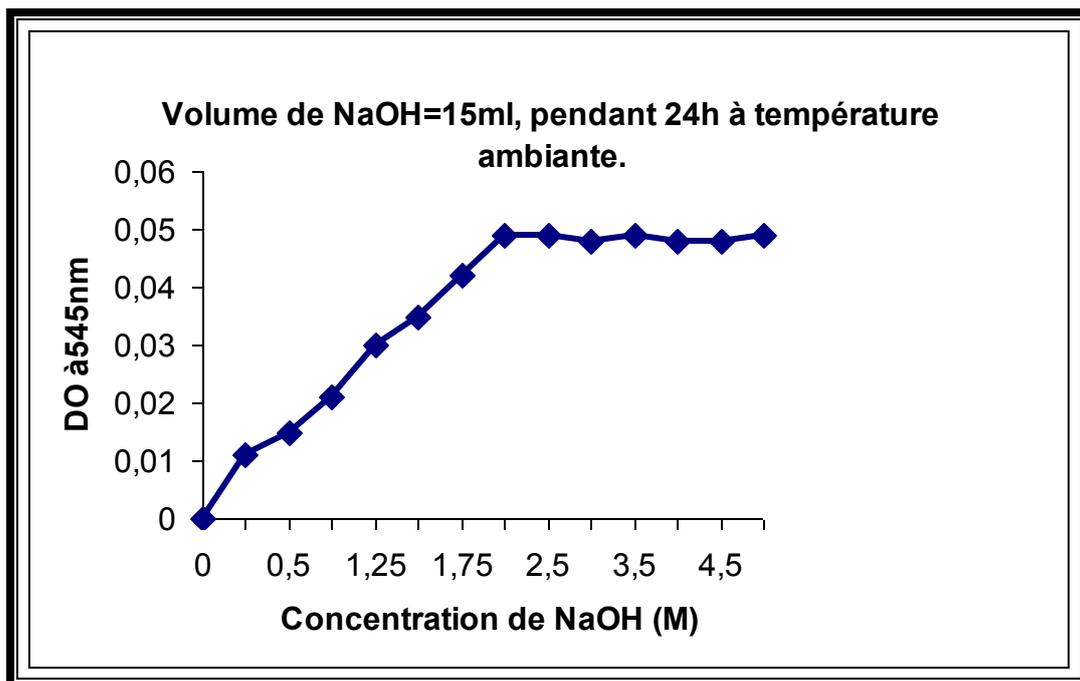
**Optimisation de la concentration de HCl.**



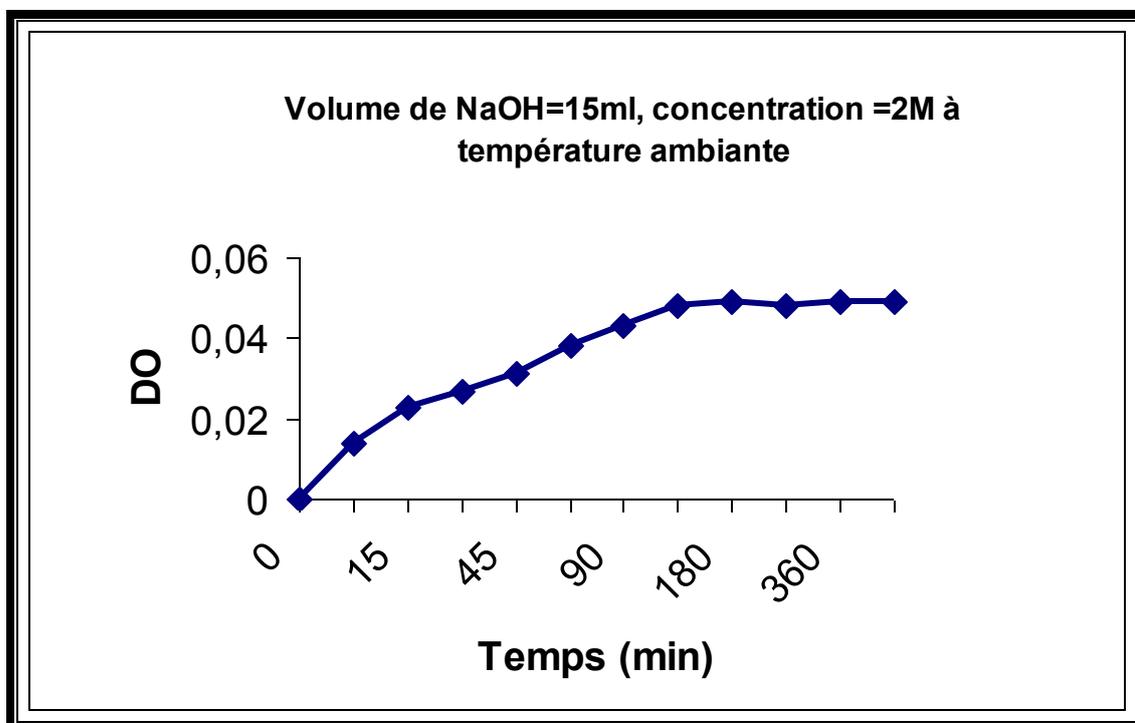
**Optimisation de la durée de déminéralisation.**



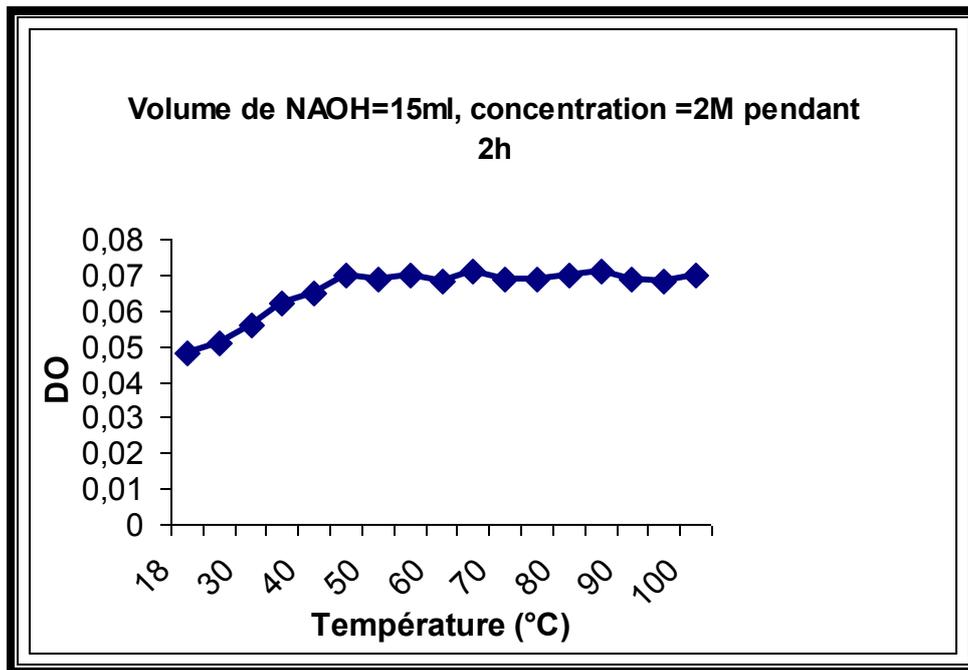
**Optimisation du volume de HCl.**



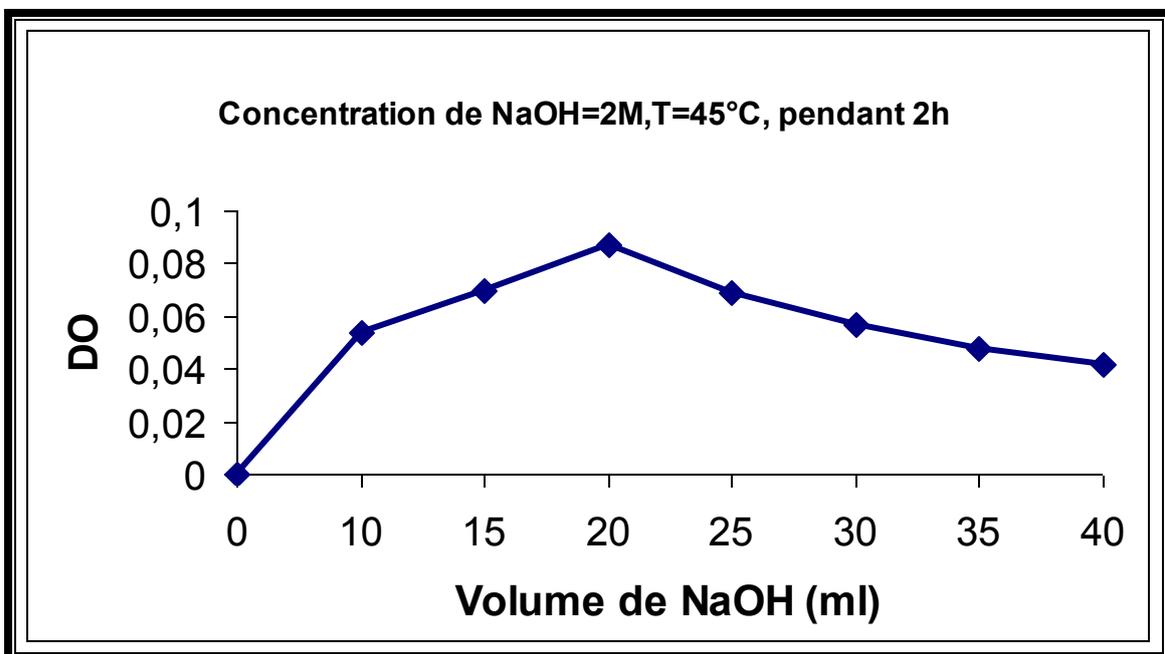
**Optimisation de la concentration de NaOH.**



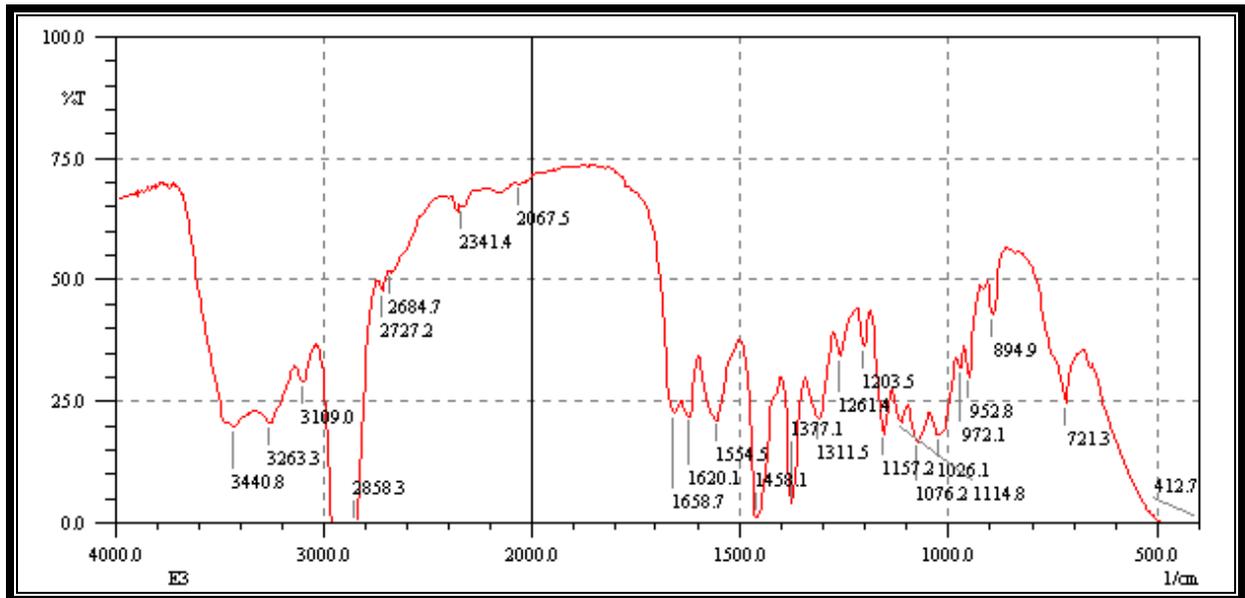
**Optimisation de la durée de déprotéinisation.**



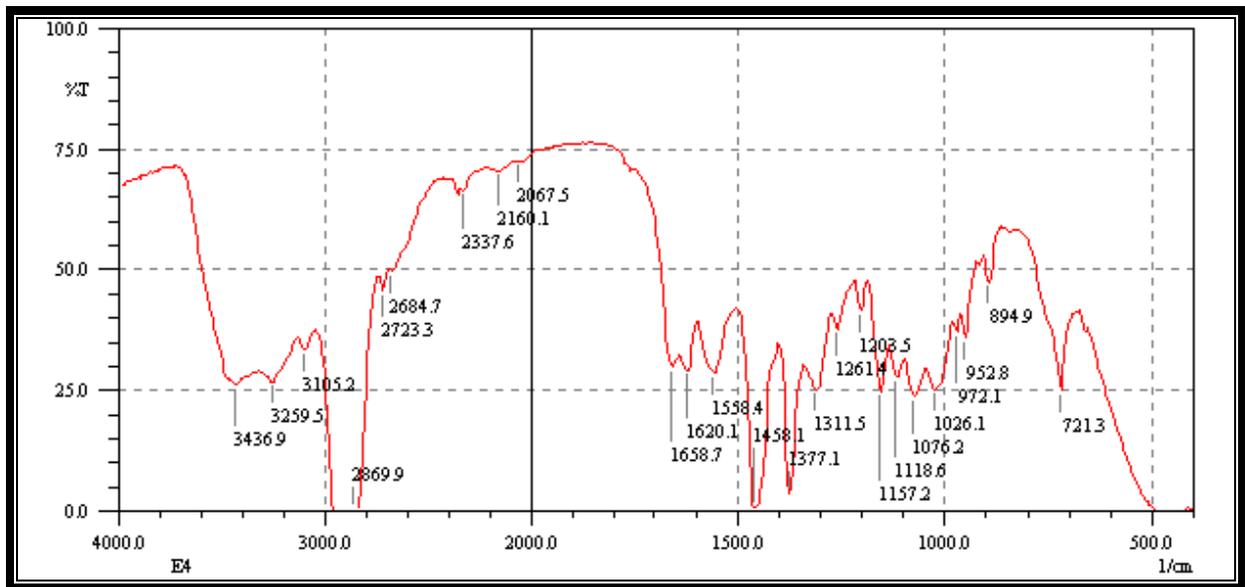
Optimisation de la température de déprotéinisation.



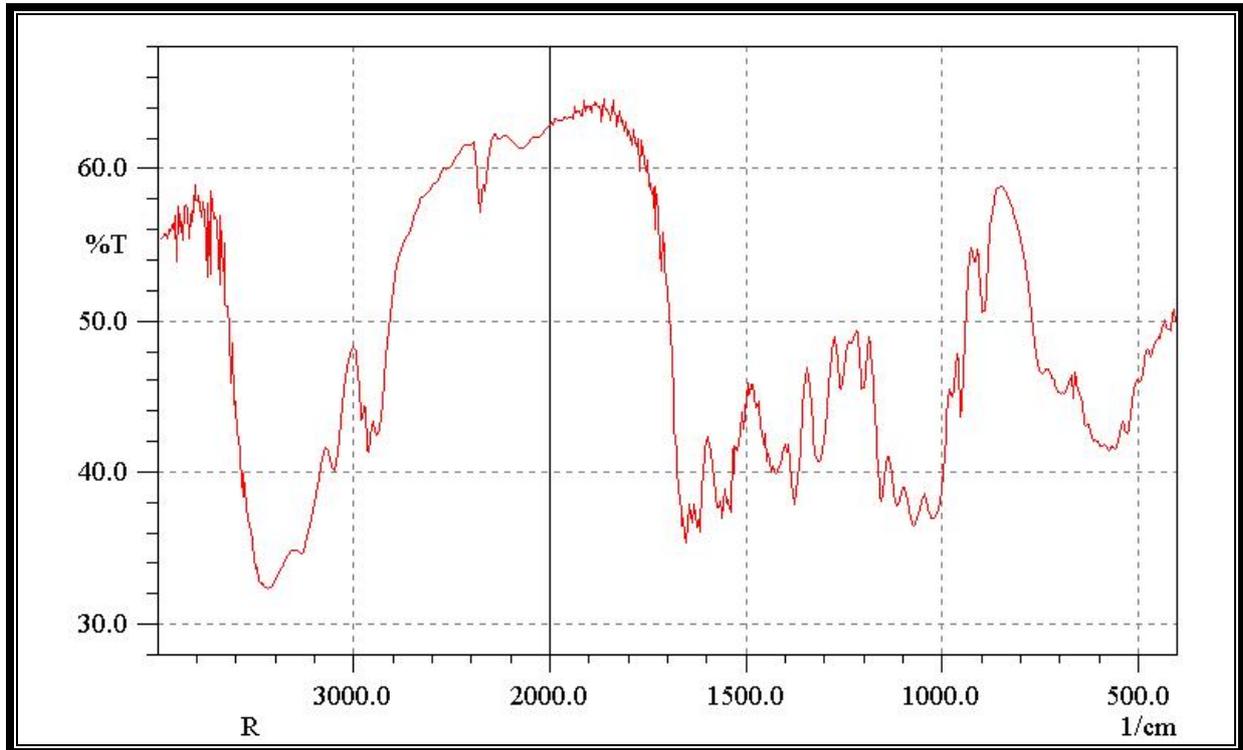
Optimisation du volume de NaOH



**Spectre Infrarouge du Chitosane I.**



**Spectre Infrarouge du Chitosane II.**



**Spectre Infrarouge de la chitine.**



**Carapaces de la crevette *Parapenaeus longirostris*.**



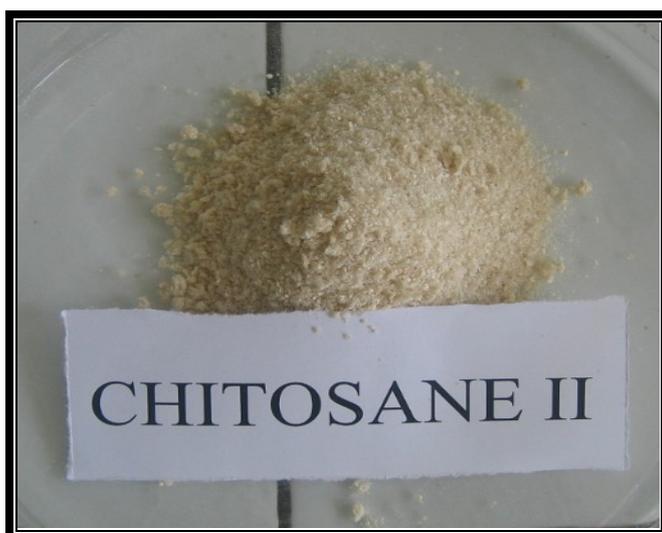
**Carapaces broyées de la crevette *Parapenaeus longirostris*.**



**Chitine préparée à partir des carapaces de la crevette *Parapenaeus longirostris*.**



**Chitosane I.**



**Chitosane II.**



**Aspect des tomates traitées avec les biofilms et celles du contrôle après 13 jours de stockage à température ambiante.**



**Aspect des tomates traitées avec les biofilms et celles du contrôle après 20 jours de stockage à 20°C.**