

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



Département du génie de l'environnement
Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés
(BIOGEP)

Mémoire de Magister Pour l'obtention du titre de
Magister en Génie de l'environnement
Option : Biotechnologies

THÈME :

***Mise au point et améliorations des caractéristiques
physicochimiques de films de Chitosane purs et plastifiés***

Présenté par :

M^{me} BALI FATIMA

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

Soutenu le 30 Juin 2012 devant le jury composé de :

Président :	M^f N.MAMERI	(Professeur l'ENP)
Promoteur :	M^f H.LOUNICI	(Professeur à l'Université de Bouira)
Co-Promoteur :	M^f M.S. BENHABILES	(CC à l'UMMTO)
Examineur :	M^f BEN YOUSSEF	(Professeur l'ENP)
Examineur :	M^m N.ABDI	(Professeur l'ENP)

Année de soutenance 2012

REMERCIEMENTS

- 📖 *Mes remerciements vont tout d'abord à Mr M.S Benhabiles pour son aide précieuse, ses conseils utiles et son soutien amical tout au long de ce travail.*
- 📖 *À Mr H.Lounici pour sa disponibilité et son aide précieuse.*
- 📖 *À mon oncle Noureddine qui m'a gratifié de toute son orientation et support pour l'accomplissement de ce mémoire.*
- 📖 *À mon mari, Hichem qui n'a pas hésité à m'ouvrir les portes de son laboratoire pharmaceutique, et à me fournir tout le support technique et moral nécessaire pour l'achèvement de ce projet.*
- 📖 *À tous les membres de ma belle famille qui ont été très généreux par leur soutien et support.*
- 📖 *À mon fils, Mohammed qui a vu le jour au cours de cette aventure.*

SOMMAIRE

Liste des tableaux :	7
Liste des figures :	8
ABRÉVIATIONS :	9
INTRODUCTION.....	10
<i>Introduction</i> :	1
CHAPITRE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I) Polymères Biodégradables	4
I.1. Les polymères naturels ou les biopolymères	4
I.1.1. Classification des biopolymères d'origine naturelle	4
I.1.2. Biopolymères issus d'agro-ressources :	5
I.1.2.1. Les polysaccharides	5
I.1.2.1.a. La cellulose.....	5
I.1.2.1.b. L'amidon	6
I.1.2.2. Les protéines.....	7
I.1.2.3. Lipides/grasses	7
I.1.2.4. Les polysaccharides issus du déchet industriel des produits de la mer	7
II) Les Emballages Comestibles	8
II.1. Définition du film comestible.....	8
II.2. Propriétés des enrobages comestibles.....	10
II.3. Techniques d'enrobage.....	12
II.3.1. Immersion.....	12
II.3.2. Pulvérisation	12
II.3.3. Enrobage par film tombant	12
II.4. Les différents types d'enrobages comestibles:	12
II.4.1. Les enrobages à base de polysaccharides	12
II.4.2. Enrobage à base de dérivés de cellulose.....	13

II.4.3.	Enrobage à base d'amidon et ses dérivés	13
II.4.4.	Enrobage à base d'alginate.....	14
II.4.5.	Enrobage à base de carragénine.....	14
II.4.6.	Enrobage à base de gommes arabiques	15
II.4.7.	Enrobage à base de chitosane	15
II.5.	Qualités requises et fonctions des films et enrobages comestibles.....	17
II.6.	Structure des films et enrobages comestibles	17
II.6.1.	Films et enrobages à structure homogène.....	17
Les bio-polymères polyosidiques		Erreur ! Signet non défini.
II.6.2.	Films et enrobages comestibles à structure hétérogène (films composites).....	18
III)	La Chitine et le Chitosane :	18
III.1.	La chitine :	18
III.2.	Le chitosane	21
III.3.	Caractères physico-chimiques de la chitine et du chitosane.....	21
III.3.1.	Degré de désacétylation (D.D)	21
III.3.2.	Poids moléculaire	22
III.3.3.	La Solubilité	24
III.4.	Extraction de la chitine	25
III.4.1.	Déminéralisation.....	25
III.4.2.	Déprotéinisation.....	26
III.4.3.	Décoloration	26
III.5.	Production du chitosane :	26
III.5.1.	La désacétylation :	27
III.6.	Applications générales de la chitine et du chitosane :.....	28
III.6.1.	Domaine médical :.....	28
III.6.1.1.	Traitement du cancer :	28
III.6.1.2.	Diminution du cholestérol :	29

III.6.1.3. Effet cicatrisant :.....	29
III.6.1.4. Lentilles de contact :.....	29
III.6.2. Traitement des eaux usées	29
III.6.3. Elimination des teintures :	29
III.6.4. Autres applications	30
IV) Chitosane en tant que bioemballage actif	31
IV.1. Définition des emballages actifs.....	31
IV.2. Les films d'emballages anti-microbiens.....	31
IV.2.1. Activité anti-microbienne du chitosane	31
IV.2.2. Activité Bactériostatique du chitosane	32
IV.2.3. Activité fongistatique	32
V) Fabrication du film de chitosane par voie humide (casting).....	32
V.1. Effet de la méthode de séchage	32
V.2. Effet des solvants utilisés	33
V.3. Effet du degré de désacétylation et de la masse molaire du chitosane :	33
V.4. Effet des plastifiants	34
V.4.1. Généralités sur les plastifiants	34
V.4.2. Plastification du chitosane	34
V.5. Les Critères de miscibilité des mélanges de polymères	35
V.5.1. Observation microscopique des mélanges.....	35
V.6. Les mélanges chitosane/polymères biodégradables	35
CHAPITRE II MATÉRIEL & MÉTHODES.....	37
II.1. MATÉRIEL	38
II.1.1. Matières premières :	38
II.1.2. Réactifs :	38
II.1.3. Équipements :	38
II.2. Méthode Expérimentale.....	39

II.2.1.	Mesure du poids moléculaire :.....	40
II.2.2.	Optimisation de la désacétylation de la chitine (préparation du chitosane)	42
II.2.2.1.	Variation de la concentration de soude.....	42
II.2.2.2.	Variation du temps de réaction.....	42
II.2.2.3.	Variation de la température	43
II.2.3.	Mesure du degré de désacétylation :	43
II.2.4.	Préparation des membranes de chitosane	44
II.2.4.1.	Préparation des membranes de chitosane pure :.....	44
II.2.4.2.	Préparation des membranes de chitosane plastifié :.....	45
II.2.4.2.a.	Plastification du chitosane :.....	45
II.2.4.2.b.	Choix des plastifiants	47
II.2.4.2.c.	Méthode de plastification :.....	48
II.2.5.	Méthodes d'évaluation des membranes de chitosane pure et plastifié :.....	49
II.2.5.1.	Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)	49
II.2.5.2.	Épaisseur des films	49
II.2.5.3.	Propriétés mécaniques	49
CHAPITRE III RÉSULTATS & DISCUSSION		51
III)	Résultats et discussion	52
III.1.	Caractérisation de la chitine et du chitosane :	52
III.1.1.	Le poids moléculaire.....	52
III.1.2.	Le degré de désacétylation.....	52
III.1.3.	Optimisation de la désacétylation :.....	53
III.2.	Plastification du chitosane	56
III.2.1.	Caractérisation des films :	56
III.2.1.1.	Apparence :.....	56
III.2.1.2.	Épaisseur :.....	57
III.2.1.3.	Les propriétés mécaniques :.....	57

III.2.1.4. Caractérisation des films de chitosane par MEB	59
Annexes :	61
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	63
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	64
ANNEXES.	

Liste des tableaux :

Tableau 1 Avantages et inconvénients de l'enrobage comestible [Sirisha Sonti, 2003]	10
Tableau 2. Effet des acides dilués (1%, v/v) sur les propriétés des films de chitosane	33
Tableau 3. Propriétés des plastifiants utilisés	47
Tableau 4. Épaisseurs des films de chitosane pure et plastifiés	57
Tableau 5 . Propriétés mécaniques des films de chitosane	58

Liste des figures :

Figure 1 : Polymères biodégradables potentiellement utilisés pour l’emballage comestible ou biodégradable (d’après Tharanatan, 2003)	5
Figure 2. Structure chimique de la cellulose et de la chitine.....	19
Figure 3. Structure cristalline de la chitine naturelle	20
Figure 4. Structure chimique du chitosane	21
Figure 5. Méthode classique de production du chitosane.	27
Figure 6. Viscosimètre de type Ubbelohde.....	40
Figure 7. Préparation des membranes de chitosane pure et plastifiées (a).	45
Figure 8. Spectre Infrarouge de la chitine (en vert) et du chitosane (en rouge)	53
Figure 9. Evolution du DD en fonction du temps : T= 100°C, [NaOH]=50%	54
Figure 10. Evolution du DD en fonction de la concentration en NaOH,.....	54
Figure 11. Evolution du DD en fonction de la température ;[NaOH]=50%, Temps=120min.....	55
Figure 12. Photographies de films de chitosane	56
Figure 13. Micrographes des membranes de chitosane par MEB	60
Figure 14. Évolution du DD en fonction de la concentration en NaOH,.....	61
Figure 15. Evolution du DD en fonction du temps : T= 100°C, [NaOH]=50%	62
Figure 16. Evolution du DD en fonction de la température ;[NaOH]=50%, Temps=120min.....	62

ABRÉVIATIONS :

AA : Acide Acétique.

DA : degré d'acétylation.

DD : degré de désacétylation.

GLY : Glycérol.

HR : Humidité relative.

IR-TF ou FT-IR : Infrarouge à transformée de Fourier.

MEB : Microscopie électronique à balayage.

PEG : polyéthylène glycol.

Unités et symboles :

ϵ_T : Allongement à la rupture.

σ_T : Contrainte à la rupture.

h : heure.

mmHg : millimètre mercure

j : Joules

min : minute.

V: volume.

W: masse (weight).

Tween 80: Polysorbate 80.

tpm: tour par minute.

w/v: masse par volume.

KDa : Kilo Dalton.

pH : potentiel hydrogène

INTRODUCTION

Introduction :

La conservation d'une denrée alimentaire consiste à maintenir le plus longtemps possible ses qualités hygiéniques, nutritionnelles et organoleptiques en agissant sur les divers mécanismes d'altération pour en ralentir ou en supprimer les effets (Guilbert, S et *all*; 1998). Par exemple, une limitation du flux d'oxygène arrivant au contact de l'aliment (*e.g.* lipides, vitamines, *etc.*) permet de limiter l'oxydation. De même, une limitation de l'apport d'humidité par l'air ambiant permet de garder à un aliment sec (*e.g.* gâteaux sec, biscottes, *etc.*) toutes ses qualités de texture et une limitation de la perte en eau d'un aliment humide (*e.g.* légumes et fruits, fromage, *etc.*) évitera son dessèchement et donc une perte en quantité et en qualité. Pour prolonger la durée de conservation des aliments, des protections sont donc nécessaires. Des procédés de conservation physiques et/ou chimiques (salage, séchage, appertisation, ionisation, adjonction d'agents anti-microbiens, anti-oxydants) sont donc appliqués par la suite. L'emballage préserve au mieux l'aliment des agressions microbiennes, physiques et chimiques intervenant dans l'environnement.

En ce qui nous concerne, nous nous intéresserons à valoriser les emballages biodégradables à base de Chitosane. Le chitosane est un polymère naturel dérivé de la chitine. Commercialement, la chitine et le chitosane sont obtenus à partir des carapaces de crevettes, de crabes ou de homards présents dans les déchets de l'industrie de la pêche. Le chitosane a suscité beaucoup d'attention pour sa biocompatibilité et pour ses activités bactériostatiques et fongistatiques. Ce matériau est filmogène, on peut donc fabriquer un film sans utiliser des additifs. De plus, le film de chitosane possède de bonnes propriétés barrière aux gaz et de bonnes propriétés mécaniques (sauf l'élasticité). Grâce à ces qualités, de nombreuses études ont été effectuées sur les applications du chitosane pour conserver ou pour prolonger la durée de vie de certains produits agro-alimentaires, parmi lesquels nous pouvons citer: les fruits et légumes, la viande, et les fruits de mer. Ces études montrent qu'il est possible d'utiliser le chitosane comme matériau d'emballage actif.

Toutefois, il existe des limitations pour l'utilisation du chitosane dans l'emballage. En effet, il est sensible à la vapeur d'eau en raison de sa capacité de former un grand nombre de liaisons hydrogène (deux fonctions hydroxyles et une fonction amine par motif de répétition)

et il est également dur ou cassant. Par ailleurs, du point de vue économique, le prix de ce matériau est relativement élevé malgré sa fabrication à partir de déchets industriels.

Pour pallier ces inconvénients, quelques stratégies ont été réalisées comme la modification chimique du chitosane ou l'association du chitosane avec des plastifiants hydrophile telle que le poly éthylène glycol (PEG) (Alexeev *et al*, 2000; Zhang *et al*, 2002; Kolhe et Kannan, 2003; Caner *et al*, 1998), glycerol (Butler *et al*, 1996) . Cette association a montré une voie prometteuse pour améliorer la propriété barrière à la vapeur d'eau et l'élasticité du chitosane.

Dans cette étude, nous avons utilisé trois plastifiants à savoir le PEG, le glycérol et le Tweene80 (surfactant) à différentes concentrations.

L'utilisation de ces plastifiants pourrait donc résoudre les problèmes rencontrés dans l'application du chitosane comme bio-emballage. D'une part, ils pourraient améliorer les propriétés barrière et modifier les propriétés mécaniques du chitosane et d'autre part il pourrait diminuer le prix du matériau final. De plus, nous pourrions réaliser un mélange de matériaux issus de ressources quasiment renouvelables.

CHAPITRE I
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

I) Polymères Biodégradables

Un polymère est un enchaînement de motifs simples appelés monomères qui peuvent être identiques ou non. Le nombre de motifs monomères constituant la macromolécule est appelé degré de polymérisation. La biodégradabilité d'un matériau se définit par sa capacité intrinsèque à être dégradé par une attaque microbienne. Cette attaque entraîne une simplification progressive de sa structure et sa conversion finale en CO₂, H₂O et/ou CH₄ et une nouvelle biomasse.

Selon l'origine des matières premières et des voies de synthèse, on distingue deux possibilités de production des matériaux biodégradables : la voie des polymères biodégradables issus de l'industrie pétrochimique et celle des polymères biodégradables issus des ressources renouvelables.

I.1. Les polymères naturels ou les biopolymères

Ce sont des matériaux synthétisés par les êtres vivants : végétaux, animaux et microorganismes.

La famille la plus importante est celle des polysaccharides (glucides) comme l'amidon (pomme de terre, maïs, blé, *etc.*), la cellulose (paroi cellulaire végétales), la lignine (bois) ou le chitosane (chitine crustacées). Une autre famille est constituée par les protéines qui sont issues des oléagineux (colza, tournesol, soja), des protéagineux (pois, féveroles), ou des tissus animaux (collagène, gélatine, caséine).

I.1.1. Classification des biopolymères d'origine naturelle

Les emballages comestibles ou biodégradables sont constitués de macromolécules renouvelables, appelées biopolymères, tels les polysaccharides (celluloses et dérivés, amidons et dérivés, chitine et chitosane, *etc.*), les protéines (gélatine, gluten, *etc.*), les composés lipidiques (cires, acides gras et dérivés, *etc.*) et les polyesters (poly-(3-hydroxybutyrate) (PHB) ou (poly-(3-hydroxyvalérate) (PHV), poly(acide lactique) (PLA), *etc.*

Les biopolymères d'origine naturelle potentiellement utilisés en tant que films comestibles ou biodégradables peuvent ainsi être classés comme le montre la Figure 1

I.1.2. Biopolymères issus d'agro-ressources :

Ces biopolymères, aussi appelés agro-matériaux, sont des macromolécules naturelles renouvelables et composables. Ils sont issus de plusieurs types d'agro-composés tels que les hydrocolloïdes (protéines et polysaccharides) et les lipides/acides gras. La plupart d'entre eux peuvent être mis en œuvre à l'état natif ou plastifié ou en association avec d'autres polymères. Ils sont utilisés en tant que biofilm .

I.1.2.1. Les polysaccharides

I.1.2.1.a. La cellulose

La cellulose est le biopolymère le plus abondant dans la nature. Son prix est relativement faible. Elle est principalement utilisée pour la production du papier mais aussi en tant que renfort dans les matrices polymères. La cellulose est l'élément constitutif du bois, du coton et des fibres telles que le lin, le chanvre, le jute ou la ramie. En fonction de l'origine botanique, les quantités de cellulose contenues dans la plante peuvent varier de 40 à 95% par rapport à la matière première sèche.

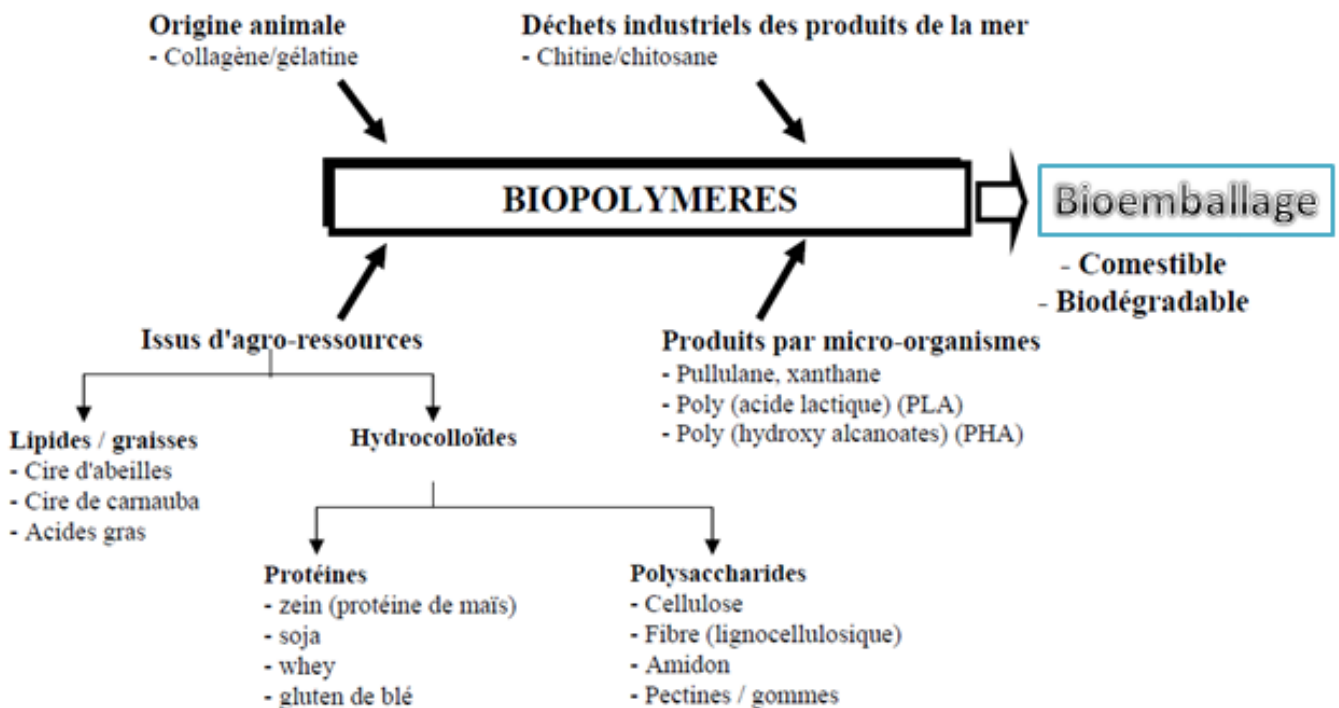


Figure 1 : Polymères biodégradables potentiellement utilisés pour l'emballage comestible ou biodégradable (d'après Tharanatan, 2003)

I.1.2.1.b. L'amidon

L'amidon est un composé glucidique bio-synthétisé il est la principale source d'énergie pour l'homme et pour la vie animale. Il représente une fraction pondérale importante dans un grand nombre de matières premières agricoles telles que les céréales (30-80% de la matière sèche), les légumineuses (25-50% de la matière sèche) et les tubercules (60-90% de la matière sèche). Son faible prix fait de l'amidon un matériau économiquement intéressant.

Les produits à base d'amidon sont tous très hydrophiles. Certaines propriétés telles que les propriétés mécaniques varient avec l'humidité relative. L'utilisation de l'amidon modifié peut permettre de donner un caractère plus hydrophobe à ces matériaux. Parmi les différentes fonctions chimiques qui peuvent substituer les groupements hydroxyle de l'amidon, les plus importantes sont les esters et les éthers.

Les propriétés filmogènes de l'amidon dépendent de la masse molaire moyenne, du rapport amylose/amylopectine et donc du ratio cristallin/amorphe (Maynard, 1999). La résistance mécanique et la propriété barrière aux gaz des films d'amidon sont modérées. L'amidon est surtout utilisé pour faire des emballages rigides et de courte durée de vie du fait de sa sensibilité à l'humidité. Les emballages à base d'amidon natif trouvent des applications en agroalimentaire (boîtes à œufs, films de paillage agricole, colle, etc.).

L'addition de plastifiants, en diminuant l'hétérogénéité du film (craquelures, pores, etc.) réduit de plus de 2/3 le coefficient de transfert aux gaz, tandis que l'addition de lipides n'induit aucun changement significatif. Pendant le stockage, les plastifiants peuvent interagir avec la matrice amidon et réorganiser l'ensemble entraînant ainsi une certaine recristallisation du film au bout de 60 jours, signe d'un début de rétrogradation, et donc de perte des propriétés filmogènes (Garcia *et al.* 2000).

I.1.2.2. Les protéines

Les protéines comme la caséine (protéine du lait) ou encore le gluten sont également utilisées

en tant que (bio)polymères. Ces protéines interviennent dans la formulation d'adhésifs ou de peintures et sont à la base de matériaux (rigide ou souple) présentant des propriétés barrières à l'oxygène et au gaz carbonique et une sélectivité intéressante. Ainsi, la caséine a été utilisée pour la fabrication de films transparents et flexibles. La gélatine est également à la base de

films, principalement utilisés pour la fabrication de tablettes et de capsules pour l'industrie pharmaceutique

L'inconvénient majeur des polymères biodégradables à base de protéines est leur prix élevé qui restreint leur utilisation à des domaines à forte valeur ajoutée.

Parmi les protéines, le gluten a été très étudié en raison de sa disponibilité et de son prix de revient très compétitif. Dispersé dans un solvant approprié, étalé et séché, le film de gluten est transparent, rigide et insoluble dans l'eau.

I.1.2.3. Lipides/graisses

L'utilisation des lipides pour enrober les produits alimentaires a été pratiquée en Angleterre depuis le 16^{ème} siècle (Kamper et Fennema, 1984). Autrefois, les cires et les huiles étaient utilisées seules, actuellement, elles sont mélangées avec des solvants, des émulsifiants, des surfactants, des plastifiants, etc. Les composés lipidiques incluent les polyglycérides qui sont les esters du glycérol et d'acide gras et les cires qui sont les esters de longue chaîne d'alcool mono-fonctionnel et d'acide gras (Hernandez, 1994). Les lipides sont ajoutés dans un enrobage alimentaire pour améliorer les propriétés barrière à la vapeur d'eau. Cependant, le film à base de lipide pur est opaque avec des propriétés mécaniques médiocres. En plus, il est instable vis-à-vis du rancissement. Par conséquent, on utilise généralement les lipides en tant qu'additif pour améliorer les propriétés barrière des films à base de polysaccharides et de protéines.

I.1.2.4. Les polysaccharides issus du déchet industriel des produits de la mer

Pendant longtemps, ces déchets n'étaient pas recyclés et étaient simplement rejetés à la mer après décorticage, créant de sérieux problèmes de pollution au voisinage des sites de production. Donc une tentative de valorisation de ces déchets permettrait, en plus du respect

de l'environnement, d'extraire la chitine à partir des carapaces de crustacés tel que les crevettes, les crabs et les homards. La chitine est un polysaccharides naturel doté de propriétés fort avantageuse pour servir de base a une diversification industrielle.

II) Les Emballages Comestibles

II.1. Définition du film comestible

Les films et les enrobages comestibles sont utilisés traditionnellement pour améliorer l'apparence et la conservation des produits alimentaires. Les exemples les plus courants sont :

- Le pelliculage des fruits avec des cires naturelles pratiqué en Chine depuis le XIIème siècle.
- Les enrobages de chocolat sur les produits de confiserie ou de pâtisserie,
- L'enrobage de viande avec des matières grasses,
- L'emballage d'aliments divers dans un film lipoprotéique obtenu à partir du lait de soja (yuba, fukuk) pour améliorer leur aspect ou leur présentation et prolonger leur durée de conservation.

Un emballage comestible est un film, un enrobage ou une couche mince protectrice qui possède des propriétés sélectives (vis-à-vis des transferts) ou bien actives. Il fait partie intégrante de l'aliment et est consommé tel quel (Guilbert et Gontard, 1992).). Il protège le produit de l'environnement en agissant comme une barrière aux gaz, à l'humidité et aux matières grasses et permettent d'améliorer la qualité du produit en diminuant les pertes d'arômes, en préservant le goût, la texture et l'apparence.

L'enrobage idéal est celui qui permet de prolonger la durée de vie du fruit frais sans causer l'anaérobiose et favorise le maintien de la qualité du produit même après ouverture (El Ghaouth et al., 1992b). Ces emballages se présentent principalement sous deux aspects :

1. Structures indépendantes de l'aliment : films, sachets, enveloppes (peau de saucisson), barquettes (destinées à contenir des fruits ou de la viande).
2. Produits directement appliqués à l'aliment : enrobage tel que le sucre autour de l'amande dans les dragées, le chocolat autour du biscuit dans la « barre chocolatée » ou la cire de paraffine autour de certains fruits.

- L'utilisation des films comestibles dans le domaine de la conservation des produits alimentaires se pratique depuis fort longtemps. En effet, la protection contre la dessiccation de certains fruits, en particulier, les oranges et les citrons par pelliculage avec de la cire a été aussi pratiquée en Chine entre le XII^{ème} et le XIII^{ème} siècle. Bien que les chinois ne savaient pas exactement que le rôle de l'enrobage était de ralentir le taux de respiration, ils ont remarqué tout de même que la durée de vie des fruits traités était plus longue par rapport aux fruits non traités (Hyun Jin Park, 1999).

- En Angleterre, une pratique dénommée **LARDER** consistant à enrober des produits alimentaires avec de la graisse est apparue au XVI^{ème} siècle (Labuza et Contreras-Medellin, 1981).

- En 1930, des cires de paraffine ont été commercialisées sous forme de matériaux comestibles destinées à protéger les fruits frais, en particulier, les pommes et les poires contre de multiples altérations.

- En 1982, un nouveau matériau comestible, non phytotoxique, sans goût, sans odeur, efficace pour la conservation des fruits et légumes, a été commercialisé sous les deux noms suivants : Pro long et Semperfresh.

Ce matériau était un mélange complexe d'esters d'acides gras et de saccharose, de carboxyméthylcellulose, de mono et diglycérides (Hyun Jin Park, 1999).

- Récemment, de nombreux matériaux glucidiques, protidiques ou lipidiques utilisés sous différentes formes, seuls ou en mélange, ont été proposés dans la formulation d'un grand nombre de films comestibles (Baldwin et al., 1995) (**Tableau 1**).

Tableau 1 Avantages et inconvénients de l'enrobage comestible

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

II.2. Propriétés des enrobages comestibles

Bien que dans la plupart des cas, la propriété fonctionnelle la plus importante des enrobages est leur imperméabilité à la vapeur d'eau afin d'éviter la dessiccation et/ou le développement de certains microorganismes nuisibles à la qualité des aliments (Peyron, 1991). Toutefois, le dépôt d'un film protecteur à la surface du produit alimentaire permet à ce dernier de conserver son humidité et d'assurer une perméabilité sélective à certains gaz : empêcher l'oxygène de pénétrer et le gaz carbonique d'échapper.

Une faible teneur en O₂ ou une forte teneur en CO₂ réduit le taux de respiration et diminue la production d'éthylène. Ceci peut inhiber les réactions enzymatiques, et par conséquent, retarder la décoloration et le pourrissement. La durée de vie d'un fruit peut ainsi s'accroître de plusieurs semaines, car le gaz carbonique est aux fruits ce que l'oxygène est à

l'être humain et l'éthylène, hormone de croissance végétale, accélère les processus de maturation et de sénescence. (Saltveit, 1993; Agar et al., 1999).

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

Activité de l'eau

C'est la disponibilité de l'eau pour les activités microbiennes, enzymatiques ou chimiques qui détermine la durée de vie de l'aliment et qui est mesurée par l'activité de l'eau. Quelques aliments sont instables et se détériorent à de faibles taux d'humidité, par exemple, les noix. Par contre, d'autres sont très stables même à des taux d'humidité relative très élevés, par exemple, la pomme de terre (Amiali, 1999).

L'activité de l'eau (A_w) est définie par le rapport de pression de vapeur (P) à l'équilibre autour de l'aliment sur la pression de vapeur saturante (P^s) d'eau à la même température:

$$A_w = \left(\frac{P}{P^s} \right)_T$$

Structure chimique:

Les polymères polaires possèdent plusieurs ponts d'hydrogène et par conséquent présentent une grande imperméabilité aux gaz à des humidités relativement basses et une perméabilité élevée vis à vis de la vapeur d'eau. Tandis que, les polymères apolaires comme les lipides montrent un effet contraire (Amiali, 1999).

La plupart des films de polymères imperméables à l'oxygène possèdent au moins l'un des cinq groupements fonctionnels suivants : $-\text{OH}$; $-\text{CN}$; $-\text{CH}_3$; $-\text{C}_6\text{H}_5$; $-\text{COOCH}_3$.

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

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

Degré de cristallinité

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

En général, les composés ayant un haut degré de cristallinité octroient une perméabilité faible (Amiali, 1999).

II.3. Techniques d'enrobage

Les principales techniques utilisées pour former les enrobages comestibles sont les suivantes (Amiali, 1999) :

II.3.1. Immersion

Elle consiste à laver et à sécher les produits puis à les immerger dans la solution traitante.

Le temps de contact n'est pas important mais il faut s'assurer du bon mouillage de toute la surface de l'aliment. Les produits ainsi enrobés seront ensuite séchés à l'air ambiant. Cette méthode est utilisée dans le cas des produits de petite taille.

II.3.2. Pulvérisation

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

II.3.3. Enrobage par film tombant

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

II.4. Les différents types d'enrobages comestibles:

II.4.1. Les enrobages à base de polysaccharides

L'enrobage des aliments par des films comestibles est un nouveau concept dans l'industrie de la post récolte. Les films, à base de polysaccharides sont très efficaces pour la conservation des fruits et légumes. Ce sont des polymères très disponibles, peu coûteux, non toxiques et biodégradables. Ils possèdent de bonnes propriétés filmogènes et sont surtout utilisés comme agent stabilisant, épaississant et gélifiant (Glicksman, 1982). De plus, les films de polysaccharides sont clairs, résistants et flexibles. Ils ont une perméabilité sélective aux gaz (CO_2 et O_2) ce qui résulte en un ralentissement de la respiration des fruits et légumes. Ceci a pour effet d'augmenter la durée de vie sans toutefois engendrer des conditions anaérobies qui entraînent un désordre physiologique et une perte de qualité. Enfin, l'idée en

général est de créer une atmosphère modifiée dans le produit avec un emballage totalement biodégradable.

II.4.2. Enrobage à base de dérivés de cellulose

La cellulose est produite par les organismes photosynthétiques et représente la molécule biologique la plus abondante sur terre (production d'environ 50 milliards de tonnes par an).

La cellulose est un homopolymère linéaire composé d'unités de D glucopyranosyle unies par des liaisons glycosidiques β -1,4. Elle est thermostable avec une température de dégradation supérieure à 230°C.

A l'état natif la cellulose est insoluble dans l'eau du fait d'un grand nombre de liaison hydrogène intramoléculaires et d'une cristallinité élevée (Nisperos-Carriedo, 1994; Baldwan et al., 1995 ; Petersen et al., 1999). Pour améliorer sa solubilité dans l'eau et lui conférer des propriétés filmogènes, la cellulose peut être estérifiée ou étherifiée au niveau des fonctions hydroxyles libre pour aboutir a certains dérivés cellulosiques comme l'acétate de cellulose (AC), la méthylcellulose (MC) ou l'éthylcellulose (EC) et l'hydroxypropylméthyl-cellulose (HPMC). La cellulose microcristalline (MMC) est un autre dérivé cellulosique qui est obtenu par hydrolyse acide de la cellulose native.

Ces dérivés sont des polymères non ioniques ayant d'excellentes propriétés filmogènes. Ils sont disponibles commercialement.

Les films à base de cellulose modifié ont des propriétés mécaniques et barrières à la vapeur d'eau intéressantes comparées aux films synthétiques.

II.4.3. Enrobage à base d'amidon et ses dérivés

L'amidon est présent sous forme microscopique à l'intérieur des racines, des tubercules ou des grains de végétaux. La source commerciale la plus importante provient principalement de la pomme de terre, du maïs et du blé. Le chauffage d'une solution d'amidon résulte en une suspension d'hydrocolloïdes formée par deux fractions qui sont l'**Amylose** et l'**Amylopectine**.

L'amylose est un polymère linéaire composé par des monomères de glucose, variant de 200 à 3000 unités, reliés par des liaisons α -glycosydiques favorisant ainsi un arrangement hélicoïdal. Cet arrangement donne une forme assez compacte au polymère et un poids moléculaire relativement élevé : 150.000-600.000 Daltons (Nisperos-Carriedo, 1994).

L'amylopectine est de structure semblable à celle de l'amylose, la seule différence réside dans la ramification des chaînes moléculaires et par conséquent un poids moléculaire qui varie de 1 à 6 millions Daltons.

Les films d'amidon sont flexibles, transparents et possèdent d'excellentes propriétés de barrière à l'oxygène à des humidités relatives faibles. Ils sont traditionnellement utilisés pour la protection superficielle de confiseries, fruits secs et fruits séchés, permettant une réduction importante de la vitesse de rancissement, mais, une très mauvaise protection contre l'humidité (Arvanitoyannis et al., 1994).

Les films à base d'amidon riches en amylose ou à base d'amylose sont comestibles, solubles et relativement faciles à produire à très faible coût.

II.4.4. Enrobage à base d'alginate

Les alginates sont des sels d'acide alginiques de structure très semblable à celle des polysaccharides d'algues brins. Leur production commerciale est principalement obtenue à partir d'algues : *Macrocystis Purefera*.

Les acides alginiques sont des polymères de forme linéaire composés essentiellement de l'acide D-mannuronique et de l'acide L-gulonique. Les solutions d'alginate sont compatibles avec une diversité de produits tels que les agents épaississants, les résines synthétiques et les sels de métaux alcalins.

Les alginates sont ajoutés comme additifs dans les vinaigrettes, les desserts et la crème (Lundin, 1993). Comme pour la pectine, ils sont capables de former un gel en présence d'ions calcium qui sont très utiles pour la formation de films ou d'enrobage. Les films obtenus, dans ce cas, sont inodores et légèrement salés avec des performances mécaniques et protectrices médiocres. Leur application est limitée à l'amélioration de l'aspect et à la protection contre le rancissement de produits secs. Leurs propriétés filmogènes ont été mises à profit pour l'enrobage de particules de café soluble lyophilisé et pour la protection contre l'oxydation et la déshydratation des poissons frais ou surgelés (Lazarus et al., 1976; Wanstedt et al., 1981).

II.4.5. Enrobage à base de carragénine

La carragénine est extraite à partir de plusieurs espèces d'algues rouges. Les gels de carragénine sont utilisés pour la stabilité des suspensions et des émulsions. Comme il a été vérifié pour plusieurs gels de polysaccharides, la carragénine peut aussi se dessécher avant les

produits, augmentant ainsi la durée de conservation en retardant la perte d'eau de l'aliment (Lundin, 1993).

Les enrobages de carragénine sont souvent utilisés contre la croissance microbienne sur la surface des aliments ayant une activité d'eau moyenne (Torres et Karel, 1985).

L'enrobage des pamplemousses par un gel de carragénine a montré une réduction de la perte d'eau et une conservation du goût après deux semaines de stockage à 40°C (Bryan, 1972).

II.4.6. Enrobage à base de gommes arabiques

La gomme arabique est la partie sèche qui s'écoule des troncs ou branches de certains arbustes. C'est un sel de polysaccharides possédant un pH neutre ou légèrement acide qui contient des ions calcium, magnésium et potassium. Ces gommes arabiques sont constituées par des unités d'acides :

D-galactopyranosyl, L-rhamnofuranosyl, L-arabiquepyranosyl, L-arabinofuranosyl, D-glucopyranosyluronique et d'une petite quantité de protéines (2%).

Leur poids moléculaire est d'environ 6.10^5 Daltons (Prakash et al., 1990). Elles sont considérées les moins visqueuses et les plus solubles de tous les hydrocolloïdes. En effet, elles sont dissoutes dans l'eau froide ou chaude et restent insolubles dans les alcools et la plupart des solvants organiques (Nisperos-Carriedo, 1994).

Les solutions de gommes arabiques sont très utilisées comme agents stabilisants et pour l'enrobage des beignets et pâtisseries, ainsi que pour la microencapsulation d'arômes. Elles forment des films clairs, transparents, adhérents mais cassants et sensibles à l'eau. Ces films sont fréquemment utilisés en confiserie pour retarder la cristallisation du sucre et pour épaissir les bombons, les gelées, glaces et chewing gums (Fogarty, 1981).

II.4.7. Enrobage à base de chitosane

Récemment, la recherche sur le développement des films comestibles à base de polysaccharides a été orientée vers le chitosane grâce à ses propriétés filmogènes qui peuvent être mises à profit dans l'enrobage des fruits et légumes (Baldwin et al., 1995).

Le chitosane peut former un enrobage semi-perméable qui modifie l'atmosphère interne du produit. Par cet effet, il permet de prolonger la durée de conservation en diminuant le murissement et le taux de respiration. Aussi il a été remarqué qu'il peut inhiber la croissance de plusieurs genres de moisissures et de phytopathogènes et stimule le système de défense des plantes par la production de chitinases, enzymes capables de dégrader la paroi cellulaire des microorganismes (El-Ghaouth et al, 1992a). La semi-perméabilité (perméabilité sélective au dioxyde de carbone et à l'oxygène) a été exploitée par de nombreux chercheurs

pour les applications post-récolte. Par exemple, il a été constaté que l'enrobage de la fraise par des solutions de chitosane (1% et 1,5% en poids par volume), stockée à 1°C, où règne un taux d'humidité relative entre 87 et 90%, retarde le taux de brunissement enzymatique et diminue la perte d'eau (Kamonwan Chuchep et al., 2002). Des résultats semblables ont été obtenus pour la pomme (Pannisi, 1992), pour les concombres, les tomates et les poivrons (El-Ghaouth et al., 1991), pour la mandarine (Khattiya Salamat, 2002), pour la mangue (Navarat Pattanasiri, 2002)

Le chitosane est de nature hydrophile, il est donc très imperméable aux gaz contrairement à la vapeur d'eau. Il est tout de même nécessaire de connaître ces caractéristiques afin de développer des films imperméables à la vapeur d'eau et semi-perméables aux gaz (CO₂, O₂) pour un meilleur contrôle de la qualité des fruits et légumes. Pour augmenter la barrière à l'humidité, on doit incorporer dans les films de chitosane des plastifiants compatibles tels que les lipides ou autres polysaccharides (Ahmad et Khan, 1997).

Butler et ses collaborateurs (1996) ont étudié l'effet de la concentration des plastifiants (Glycérol) sur la perméabilité à l'oxygène et à la vapeur d'eau. Les résultats obtenus ont montré que l'effet de ces additifs était insignifiant sur la perméabilité à l'oxygène, tandis qu'une augmentation de la concentration du plastifiant a entraîné une diminution de la perméabilité à la vapeur d'eau.

Hoagland et Parris (1996) ont fait couler un film de pectine contenant du glycérol ou l'acide lactique sur un film de chitosane. Les films plastifiés avec du glycérol montraient une très grande imperméabilité vis à vis de la vapeur d'eau contrairement à ceux avec de l'acide lactique. De plus, tous les films avec du glycérol ou de l'acide lactique ont montré de bonnes propriétés mécaniques similaires aux films de pectine.

Certains chercheurs ont montré qu'un chitosane de poids moléculaire égal à 803 KDa permet d'obtenir des films très imperméables à la vapeur d'eau sans ajout de plastifiants, par rapport aux autres valeurs testées : 1163 KDa, 612 KDa, 421 KDa (Amiali, 1999). Alors que d'autres chercheurs se sont orientés vers les enrobages comestibles à base du N,O-carboxyméthylchitosane, grâce à ses propriétés sélectives et particulièrement à son contrôle de la perte d'eau (Nisperos et Baldwin, 1996).

II.5. Qualités requises et fonctions des films et enrobages comestibles

Plusieurs qualités sont requises pour l'utilisation des emballages comestibles. De part leur qualification, ces emballages sont comestibles et peuvent être ingérés. De ce fait, ils ne doivent présenter aucune toxicité, ils nécessitent de présenter une stabilité biochimique, microbiologique et physico-chimique supérieures à celle du produit destiné à être protégé. De plus, ils doivent avoir des propriétés sensorielles favorables ou neutres vis-à-vis de l'aliment concerné. Une résistance mécanique et une efficacité barrière élevée sont également recherchées. Enfin, étant constitué de polymères naturels (protéines, polysaccharides, lipides), d'ingrédients et d'additifs alimentaires, ils ne sont donc pas ou très peu polluants et sont facilement dégradés. Par ailleurs, des technologies d'application ou de fabrication simples à mettre en œuvre ainsi que des matières premières de faible coût sont souhaitables (Debeaufort, 1994). Enfin, d'autres propriétés fonctionnelles sont également demandées (barrière au transfert de matières, thermosoudables, pliables, imprimables, *etc.*).

Les fonctions des emballages comestibles sont variées. Ils peuvent être utilisés pour leurs propriétés barrières, c'est à dire leur sélectivité ou capacité à ralentir les transferts et migrations de diverses substances (eau, gaz, lipides, arômes, pigments, *etc.*), entre l'aliment et son environnement ou entre divers constituants d'un aliment hétérogène dans le but de prolonger la durée de conservation des produits alimentaires.

Ces emballages peuvent également présenter un rôle actif dans le sens où ils peuvent améliorer les qualités organoleptiques, biochimiques, hygiéniques, microbiologiques et/ou physico-chimiques des aliments ainsi emballés. Ce rôle consiste à servir de support pour des substances actives (médicaments, vitamines, antioxydants, antimicrobiens, *etc.*), des agents de surface (colorants, agents brillants, *etc.*), des arômes, ou encore à renforcer la structure de produits fragiles (Debeaufort, 1994).

II.6. Structure des films et enrobages comestibles

II.6.1. Films et enrobages à structure homogène

La formulation d'enrobages ou de films comestibles implique l'utilisation d'au moins un constituant capable de former une matrice ayant une cohésion et une continuité suffisante.

Il s'agit généralement de polymères ou de composés qui dans les conditions de préparation ont la propriété de former des structures continues cristallines ou amorphes.

II.6.2. Films et enrobages comestibles à structure hétérogène (films composites)

Des films comestibles à base de plusieurs composants filmogènes ont été mis au point afin de tirer partie des propriétés complémentaires et limiter les inconvénients propres à chacun d'entre eux. Des mélanges de divers hydrocolloïdes tels que méthylcellulose+gluten de blé, amidon+méthylcellulose, protéine de soja+gluten de blé, amidon+caséinates de sodium ou encore blanc d'oeuf+amidon ont été proposés (Debeaufort, 1994 ; Parris et Coffin, 1997 ; Arvanitoyannais et Biliaderis, 1998, 1999 ; Were *et al.*, 1999 ; Fishaman *et al.*, 2000). Toutefois, la plupart des films composites étudiés associent plutôt une substance hydrophobe et une matrice structurée à base d'hydrocolloïdes (polysaccharides ou protéines). Les matériaux hydrophobes sont reconnus pour être les plus efficaces à ralentir les transferts de vapeur d'eau, mais ils sont rarement utilisés seuls en monocouche (Callegarin *et al.*, 1997) à cause de leurs propriétés mécaniques et sensorielles assez médiocres.

III) La Chitine et le Chitosane :

III.1. La chitine :

La chitine est, après la cellulose, le biopolymère le plus répandu dans la nature, formé d'unités N-acétyl D-glucosamine (2-acétamido-2-deoxy-D-glucosamine) liées entre elles par des ponts $\beta(1 - 4)$ (Jen-Kuo Yang *et al.*, 2000). Considérée comme le dérivé acétamide de la cellulose (Figure 2.), ce qui diffère la chitine des autres polysaccharides est la présence de l'azote sur sa chaîne polymérique pouvant atteindre un taux de 7% (Terbojevich, 2000). A l'état naturel, la molécule de la chitine présente une structure cristalline qui constitue un réseau de fibres organisées. Différents arrangements des chaînes sont possibles. Sous forme d'hélice, ces chaînes sont toutes dirigées suivant le même axe et donnent lieu à trois formes polymorphiques distinctes (Figure 3) (Kurita, 2001).

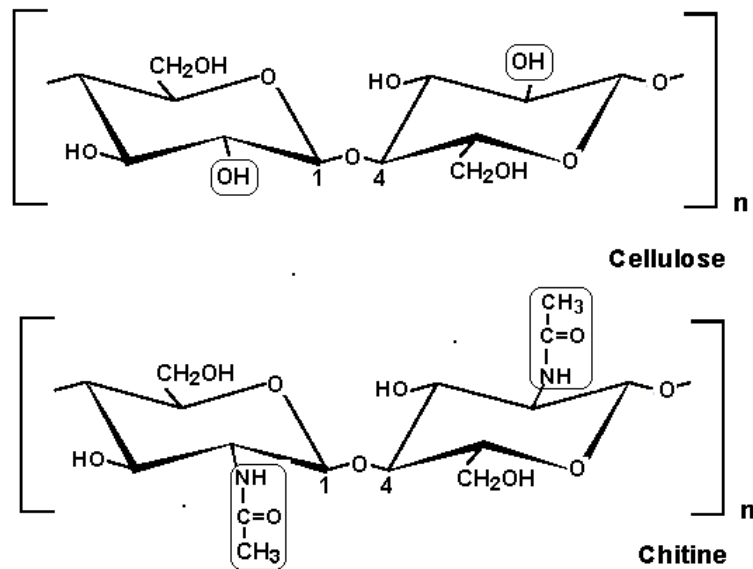


Figure 2. Structure chimique de la cellulose et de la chitine

Chitine α : c'est la forme la plus abondante, la plus stable et la plus rigide, elle est formée de chaînes qui sont disposées de façon antiparallèle qui ressemble à un ruban à l'intérieur desquelles les résidus de sucre sont fortement liés par liaison hydrogène augmentant ainsi la rigidité et la stabilité (Kerkut et Gilbert, 1985).

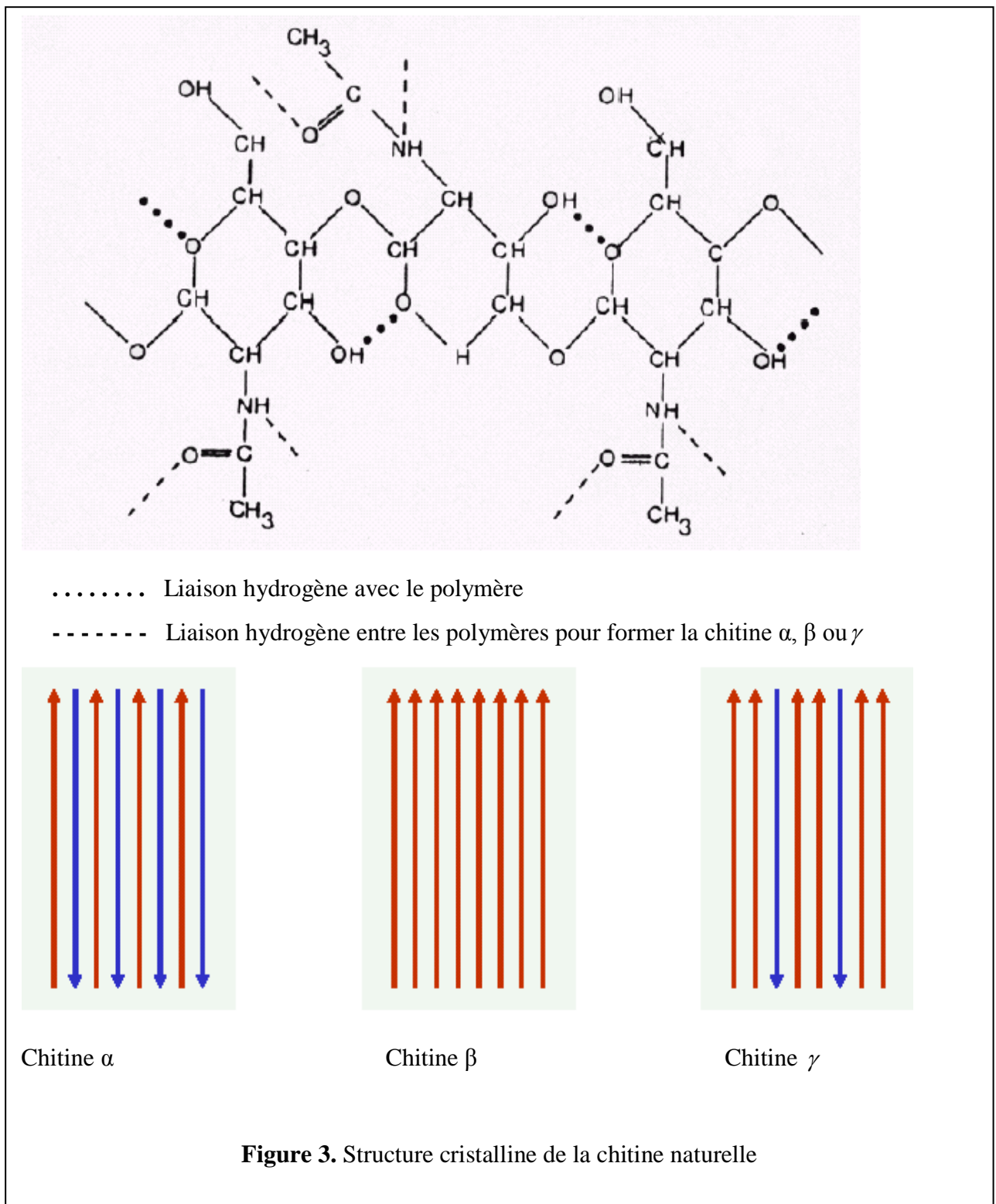
L'analyse aux RX de la chitine α met en évidence une structure cristalline de type orthorhombique (Blackwell, 1978).

Elle est surtout retrouvée dans la carapace des crustacés (crabe, crevette, homard, langoustine...), dans la coquille des mollusques, l'exosquelette des insectes et la paroi cellulaire des champignons et levures (Zhang et al., 2000).

Chitine β : elle est supposée être moins stable que la chitine α et est formée de chaînes parallèles entre elles : le groupement $-NH_2$ est aligné avec le groupement $-OH$ et le groupement $-CH_2OH$ (Shepherd et al., 1997). La chitine β cristallise dans une maille monoclinique et les ponts hydrogènes sont inexistant, ce qui lui confère des propriétés de solubilité et d'hydrophilie (formation de gels avec H_2O).

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

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



III.2. Le chitosane

La présence du chitosane dans la nature n'a été décelée qu'à partir de 1954; il est découvert dans les levures *phycomycètes blakes leeanus* (Terbojevich et Cosani, 1997). Il n'est présent que dans les parois cellulaires de certains champignons, essentiellement les *Zygomycètes* (Davies et Bartnicki, 1984) et chez quelques insectes comme dans la paroi abdominale des reines termites (Seng, 1988).

Le chitosane est un polysaccharide linéaire constitué d'unités D - glucosamine (2-amino-2-deoxy-D-glucose) liées entre elles par des ponts β (1 – 4). La structure chimique du chitosane est donc similaire à celle de la cellulose, la différence réside dans la substitution du groupe hydroxyle en position C-2 par la fonction amine (Figure 4). Enfin, le chitosane est tout simplement la forme désacétylée de la chitine ayant une teneur en azote supérieur à 7%.

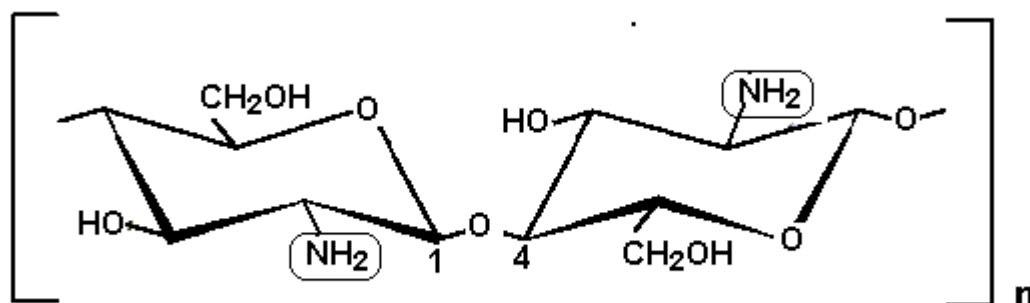


Figure 4. Structure chimique du chitosane

III.3. Caractères physico-chimiques de la chitine et du chitosane

III.3.1. Degré de désacétylation (D.D)

Au vue de sa rareté dans la nature, la chitine est devenue la source principale du chitosane. Ainsi, la majorité des chitosanes commercialisés proviennent de la désacétylation alcaline de la chitine à chaud (Fernandez et Fox, 1997).

La désacétylation est la transformation qui consiste à l'enlèvement des groupements acétyles ($-\text{COCH}_3$) pour libérer les groupes amines ($-\text{NH}_2$). Ainsi, le terme chitosane n'est pas attribuer uniquement pour définir un composé, mais plutôt pour désigner toute une famille de copolymères ayant des fractions d'unités acétylées variables qui se distingueront entre eux

par le degré de désacétylation : pourcentage des groupes amines dans la chaîne polymérique (Roberts, 1992).

Le degré de désacétylation du chitosane varie entre 56% et 99% avec une moyenne de 80% ; sa valeur dépend de l'espèce vivante et de la méthode de préparation (Fernandez-Kim, 2004).

Cependant, une limite tranchante entre la chitine et le chitosane n'a jamais été bien définie en se basant sur la valeur de ce paramètre. Certains chercheurs parlent de chitosane quand le D.D est supérieur à 50% (Esquenet, 2003). D'autres, préfèrent le terme chitosane lorsque le D.D est supérieur à 20% (David et al., 2004). Parfois, cette différence est basée sur la solubilité du chitosane et l'insolubilité de la chitine en milieu acide dilué. Enfin, l'appellation chitosane est empruntée quand la teneur en azote est supérieure à 7% en poids (Nellie Gagné, 1993).

Le degré de désacétylation est le paramètre physico-chimique le plus important qui influe les performances du chitosane dans ses diverses applications. La valeur de ce paramètre est souvent fixée selon son utilisation, par exemple, en médecine on exige un chitosane désacétylé à 100% (Baxter et al., 1992).

Plusieurs techniques ont été élaborées pour déterminer la valeur du D.D à savoir la spectrophotométrie UV, la spectroscopie I-R, la spectroscopie RMN, HPLC, la titration potentiométrique, l'analyse thermique ... (Lavertu et al., 2003).

La technique la mieux adaptée pour une caractérisation rapide du D.D est la spectroscopie IR car elle est facile et permet de travailler sur des échantillons solides.

III.3.2. Poids moléculaire

La définition du poids moléculaire des polysaccharides et la compréhension de ses conséquences sur leur comportement physico-chimique a présenté un réel défi aux chimistes durant de nombreuses années. Dans le cas de la chitine et ses dérivés, la connaissance de ce paramètre est très importante pour les utilisations industrielles et les applications dans les différents domaines de recherche (Montserrat, 2002). En effet, la conductivité, la densité, la tension de surface et la viscosité des solutions de chitosane sont significativement affectées par le poids moléculaire (Tanveer et al., 2000).

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

La valeur de ce paramètre est affectée par l'origine des deux polysaccharides et la méthode de leur préparation :

-En 1988 Wu étudia l'effet du temps de désacétylation sur la valeur du poids moléculaire et trouva une valeur moyenne qui varie de $1,46 \cdot 10^6$ Daltons pour 30min de désacétylation (NaOH 50%) à $7,2 \cdot 10^5$ Daltons après 5 heures de désacétylation.

A titre d'exemple, nous citerons quelques valeurs du poids moléculaire de chitosanes ayant des origines différentes :

* Crevette rouge (*Solenocera prominentis*) : $1,58 \cdot 10^4 - 5,12 \cdot 10^5$ Daltons (Chen et al., 1994)

* Crabe (*Chionoecetes rouge opilio*) : $5,0 \cdot 10^4 - 6,00 \cdot 10^5$ Daltons (Hwang et al., 2000)

Plusieurs méthodes ont été élaborées pour déterminer le poids moléculaire de la chitine et du chitosane telles que la viscosimétrie (Okamoto et al., 2002), la chromatographie liquide (Chen et al., 1997)... etc.

La viscosimétrie est une technique très simple, facile à réaliser et se base sur l'équation de Mark-Houwink :

$$[\eta] = k[Mv]^a$$

$[\eta]$: viscosité intrinsèque

Mv : poids moléculaire moyen viscosimétrique

k et a : paramètres caractéristiques du système polymère-solvant, à température donnée, leurs valeurs dépendent du type de solvant utilisé et de la nature du polymère considéré.

-Lee (1974) utilisa le chlorure de lithium à 5% dans le N,N diméthylacétamide comme solvant approprié pour la chitine, et obtient les valeurs suivantes :

$$k = 8,93 \cdot 10^{-4} \text{ et } a = 0,71$$

-Roberts et Domszy (1982) utilisent le chlorure de sodium dans l'acide acétique comme solvant approprié pour le chitosane, et obtiennent les valeurs suivantes :

* $k = 1,81 \cdot 10^{-3}$ et $a = 0,93 \Rightarrow$ Acide acétique (0,1M) + Chlorure de sodium (0,2M)

* $k = 3,04 \cdot 10^{-5}$ et $a = 1,26 \Rightarrow$ Acide acétique (0,1M) + Chlorure de sodium (0,02M)

III.3.3. La Solubilité

A l'état naturel, la chitine est un solide blanc, dur, inélastique et présente une structure fibreuse rigide. Ceci induit une insolubilité dans la plupart des solvants ordinaires et par conséquent, les applications d'une telle molécule seront très limitées (Cho et al. 1999).

Cependant, elle est soluble dans quelques solvants corrosifs et toxiques tels que les alcools chlorés, le chlorure de méthylène et l'acide chloroacétique (Muzzarelli, 2004). Elle est également soluble dans des solvants fluorés comme l'héxafluoroacétone et l'héxafluoro-2-propanol.

Uragami et al., (1981) ont étudié la solubilité de la chitine dans les deux mélanges suivants :

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

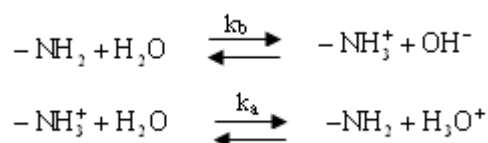
Ils remarquèrent que la concentration du chlorure de lithium nécessaire à la dissolution complète de la chitine doit être supérieure à 5%.

-Austin et al.,(1981) comparèrent l'efficacité de ces deux systèmes de solvants à des dizaines d'autres tels que les mélanges 2chloroethanol/acide chlorhydrique, 2chloroethanol/acide phosphorique, 2chloroethanol/acide sulfurique ou 2chloroethanol/acide nitrique.

Ils conclurent que DMAc/LiCl et NMP/LiCl, bien qu'ils soient très toxiques, présentaient les meilleures performances pour la solubilisation.

Le chitosane sous forme amine libre est insoluble dans l'eau, les acides concentrés, les bases et les solvants organiques (Montserrat, 2002). Cependant, il est soluble dans les acides dilués tels que l'acide chlorhydrique, l'acide formique, l'acide acétique, l'acide oxalique et l'acide lactique à $\text{pH} < 6,5$: HCl (1%) et $\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$ (1%), à $\text{pH} \approx 4$, sont utilisés comme référence (Sashiwa et Shigemasa, 1999). L'acide phosphorique, l'acide sulfurique, l'acide citrique et l'acide sébacique ne sont pas de bons solvants pour le chitosane (Kurita, 2001).

La solubilité du chitosane est due à la protonisation de ses groupements amines :



La solubilité du chitosane est aussi contrôlée par la valeur du degré de désacétylation et on estime qu'un D.D $\approx 80\%$ permet une solubilisation totale (No et al., 1995).

III.4. Extraction de la chitine

Dans la nature, la chitine n'est jamais retrouvée à l'état pur. Elle est souvent associée à des protéines, des lipides, du calcium et des pigments (Wai et Ru, 2002). Généralement, elle est sous forme de microfibrilles enfoncées dans une matrice protéique dont le diamètre varie de 2,5 à 2,8 nm. Dans les cuticules de crustacés, ces microfibrilles peuvent atteindre un diamètre de 25 nm. De tels arrangements (microfibrillaires), permettent à la chitine de s'enrouler sous forme de spirale. Ceci, n'est possible qu'après élimination de certains matériaux : le carbonate de calcium et les protéines qui emprisonnent les microfibrilles (Majeti et Kumar, 2000).

Le choix de la méthode d'obtention de la chitine est fonction de sa proportion dans chacune des 3 principales sources suivantes (Keifer, 1999) :

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

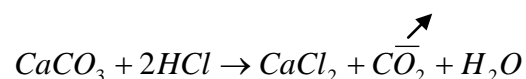
- Chez les micro-organismes, le pourcentage de chitine peut atteindre plus de 20% du poids sec de la cellule. Toute fois, l'exploitation à partir de cette source ne s'effectue qu'à titre expérimental.

- Enfin, le meilleur rendement est observé chez les crustacés qui constituent donc la source principale de chitine.

III.4.1. Déminéralisation

Les sels de calcium sont présents dans la plupart des cuticules et sont typiques des crustacés. Ce sont principalement les carbonates, sous forme de calcites dominant les propriétés mécaniques bien que leur interaction avec les composés organiques semble être peu compris (Currey et al., 1982).

L'acide chlorhydrique dilué est généralement utilisé pour la déminéralisation car il réagit assez rapidement avec la calcite (Peniston et Johnson, 1978). Au cours de cette réaction le carbonate de calcium (CaCO_3) réagit avec l'acide chlorhydrique pour former du chlorure de calcium (CaCl_2) et du dioxyde de carbone (CO_2) gazeux :



L'opération est effectuée à température ambiante, sous agitation constante durant un temps allant de 30 min à 48h selon la méthode de préparation (Wai et Lee, 2002). La teneur en cendre du solide déminéralisé est un véritable indicateur de l'efficacité du processus.

III.4.2. Déprotéinisation

Du point de vue structure chimique, la chitine est liée aux protéines par des liaisons covalentes à travers les résidus : acide aspartique et histidine pour former des complexes très stables tels que les glycoprotéines. Ainsi, la chitine sera enfoncée et stabilisée dans la matrice protéique ressemblant à une construction en béton armé (Hamodrakas et al., 2002). Pour dissoudre ces protéines, on utilise une solution alcaline diluée de 1 à 10%, à des températures élevées (65°C – 100°C). Le temps de réaction usuel varie de 30 min à 6h selon la méthode de préparation. Cependant, une désacétylation partielle durant une déprotéinisation prolongée n'est pas un désavantage si, particulièrement, la chitine obtenue sera convertie en chitosane (Montserrat, 2002).

III.4.3. Décoloration

Après déminéralisation et déprotéinisation, la chitine obtenue est souvent un solide de couleur rose témoignant de la résistance des pigments, principalement les caroténoïdes, aux deux traitements précédents. Pour aboutir à une chitine blanche avec un degré de pureté supérieur, cette dernière subira une dépigmentation par l'acétone, suivie, après séchage à température ambiante, par un blanchissement dans une solution de NaOCl (0,315% v/v) durant 5min avec un rapport solide/liquide = 1/10 (poids/volume) (No et al., 1989). Cette étape est facultative, sa réalisation dépend de la spécification du produit final. De plus, le blanchissement n'est pas trop désirable, il réduit considérablement la viscosité du produit final (Fernandez-Kim, 2004).

III.5. Production du chitosane :

A cause de sa rareté dans la nature et du coût élevé pour l'extraire à partir des parois cellulaires de certains champignons (Iason et al., 1999), la chitine est devenue la principale source de production du chitosane à l'échelle industrielle (Benesh et Tengvall, 2002). L'obtention de la chitine à partir de sources naturelles, abondantes et renouvelables telles que les carapaces de crustacés est sans doute l'unique raison de sa réussite. Les différentes étapes de production du chitosane par voie chimique sont représentées sur la figure ci-dessous :

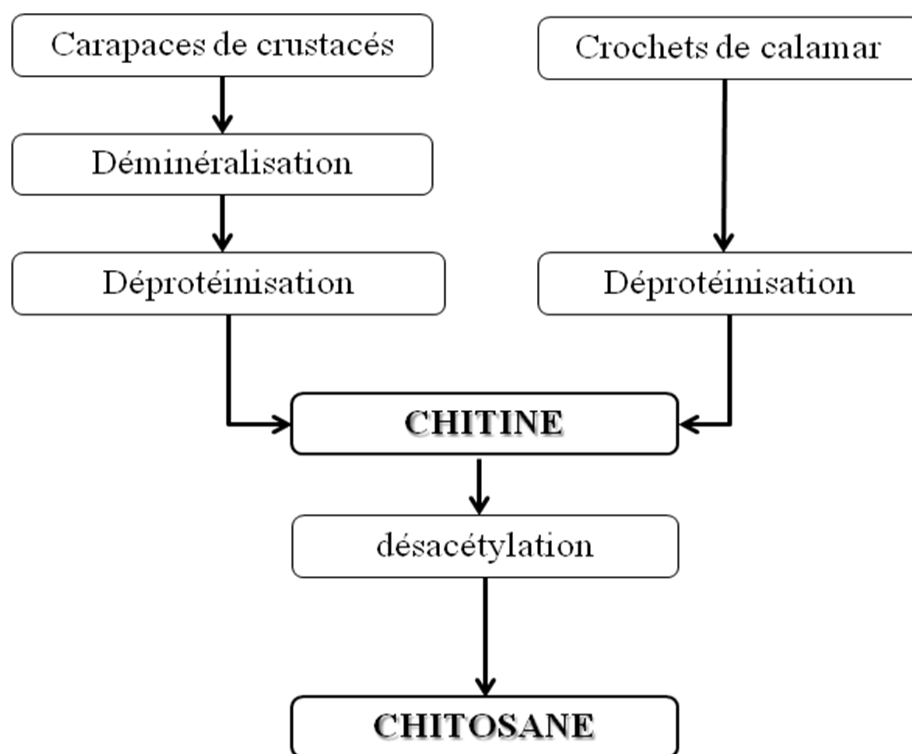
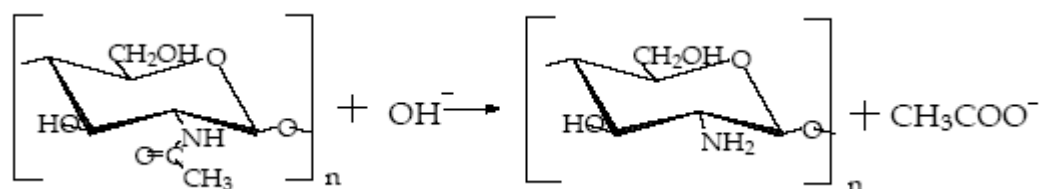


Figure 5. Méthode classique de production du chitosane.

III.5.1. La désacétylation :

La caractérisation et les propriétés du chitosane dépendent fortement de sa méthode de production (Malgorzata et al., 2003). Il est pratiquement impossible d'enlever les groupes acétyles ($-\text{COCH}_3$) en milieu acide sans la dégradation de la chaîne polymérique de la chitine (Shoban et al., 2000). Ainsi, les techniques de désacétylation font appel à des étapes d'hydrolyse basique selon la réaction chimique suivante:



La désacétylation est affecté par un grand nombre de facteurs à savoir : le temps et la température de réaction, la concentration de la solution alcaline, le rapport chitine / solution alcaline en poids par volume et la taille des particules.

Une désacétylation parfaite est celle qui permet d'obtenir un chitosane non dégradé et surtout soluble dans l'acide acétique dilué au bout d'un temps minimal (Fernandez-Kim, 2004).

- (Udomchai et al., 1998) ont réalisé la désacétylation de la chitine de crevette (*Penaeus Monodon Fabricius*) en milieu fortement alcalin (NaOH 50%) à 90°C durant des intervalles de temps compris entre 3h et 5h. Ils aboutissent à des taux de désacétylation allant de 66% à 87%.

- (Ramirez et al., 2000) ont réussi à désacétyler la chitine de langoustine à basse température (30°C), avec un rapport NaOH (50%) / Chitine = 140mL / 10g. Au bout de six jours, ils obtiennent un chitosane totalement soluble avec un très haut poids moléculaire, de qualités comparables à celles d'un chitosane commerciale (Sigma Chemical Co, St-Louis, Mo).

III.6. Applications générales de la chitine et du chitosane :

Comme la chitine est insoluble dans la plupart des solvants, ses applications sont très limitées. Le chitosane est un polysaccharide prometteur grâce à ses groupements amine libres contribuant à ses qualités biologiques et chimiques exceptionnelles. Il faut souligné que les chitosanes se distinguent entre eux essentiellement sur deux points: la longueur de leurs chaînes moléculaires et leurs degré de désacétylation (D.D). Ces caractéristiques déterminent la spécificité de chaque produit, conditionnant le domaine de leurs applications.

Dresser une liste exhaustive des applications des chitosanes et leurs dérivés relèverait de l'impossible. En effet, la médecine, l'alimentation, la nutrition, le textile, l'environnement, la cosmétologie et sans doute bien d'autres secteurs sont concernés par ces substances aux multiples vertus (Payet et al., 2002).

III.6.1. Domaine médical :

Dans le domaine médical, les utilisations potentielles de la chitine, du chitosane et de leurs dérivés sont nombreuses. Certaines commencent à trouver des débouchés industriels (fil de suture, peau artificielle, lentilles de contact ...) tandis que d'autres en sont encore au stade du laboratoire (effets immunostimulants et antitumoraux, membranes d'hémodialyse...).

III.6.1.1. Traitement du cancer :

La chitine et le chitosane conjugués au 5-fluoro-uracyl exhibent une activité antitumorale considérable. En effet, conjugués, ils sont beaucoup plus efficaces et diminuent

les effets secondaires du 5-fluoro-uracil seul. Le chitosane, soluble, est connu comme étant un agent anticancéreux (Felse et Panda, 1999).

III.6.1.2. Diminution du cholestérol :

Les chitosanes possèdent une activité hypocholestérolémiante significative. En effet, des études ont montré leur efficacité à réduire le taux de cholestérol dans le sang chez les femmes et en particulier les plus âgées (Bokura et al., 2003).

III.6.1.3. Effet cicatrisant :

Les chitosanes et leurs dérivés sont des agents de cicatrisation de blessures, brûlures et greffes. Ceci, laisse penser que ces produits pourraient être utilisés sur des plaies à mauvaise cicatrisation (ulcère) ou à cicatrisation lente.

Le caractère biodégradable du chitosane et ses dérivés les rend très intéressants pour des applications chirurgicales, comme des fils de suture dont l'atout est de résorber de façon naturelle après cicatrisation (Seng, 1988).

Leur effet coagulant et hémostatique, et leur qualité de coalescence permettent, entre autres, leur usage dans la fabrication de pansements, pommades, films et autres produits (Drohan et al., 2000 ; Okamoto et al., 2002).

III.6.1.4. Lentilles de contact :

La biocompatibilité du chitosane ainsi que ses propriétés physiques permettant d'obtenir des membranes, sont à l'origine d'applications ophtalmiques. Des lentilles à base de chitosane ont été testées : elles sont plus compatibles, permettent l'absorption de l'eau et sont perméables à l'air. Elles peuvent respirer contrairement aux lentilles synthétiques. Ainsi, elles peuvent être portées plus longtemps et comme elles sont moins chères, des modèles jetables peuvent être envisagés (Majeti et Kumar, 2000).

III.6.2. Traitement des eaux usées

Dans le secteur de la dépollution des eaux usées, la chitine et le chitosane, grâce à leur pouvoir chélateur, ont montré d'excellentes capacités de fixation des métaux lourds, tels les transuraniens, issus des rejets polluants du cycle du nucléaire et les substances organiques issues des industries agroalimentaires (Falini et al., 2003).

III.6.3. Élimination des teintures :

Des bio adsorbants naturels et abondants tels que la chitine et le chitosane sont, sans doute, appliqués avec succès pour l'élimination des teintures. En effet, l'élimination des

teintures acides des effluents de la peinture domestique se fait par adsorption à travers un mécanisme d'échange d'ions.

Des études ont montré que les particules de chitine sont très efficaces pour l'élimination des teintures phénoliques. Elles absorbent 2,45 fois plus de teintures que les sels minéraux habituellement utilisés (Annadurai et al., 1999).

III.6.4. Autres applications

En agriculture, les chitosanes servent notamment à enrober les graines d'un film protecteur contre les infections microbiennes et fongiques (Guizzardi et Marta, 1998). Ils jouent également un rôle d'accélérateur de la germination et de régulateur du développement de la plante (Bitteli et al., 2001).

L'alimentation est aussi un terrain propice à l'emploi du chitosane et de ses dérivés, notamment pour l'enrobage des fruits, légumes, viandes et autres produits périssables. Ce sont des agents conservateurs qui assurent une action protectrice contre l'oxydation, l'humidité et les attaques bactériennes (Johnson, 2002).

Un cas original de ce type d'application réside dans le prolongement de la durée de stockage de pêches, kiwi, fraises, où les films de chitosane interviennent comme des préservateurs de saveur, exhausteurs de goût et agents de texture (Shahidi et al., 1999).

Dans l'industrie cosmétique, les chitosanes, polymères naturels, offrent des avantages incontestables par rapport aux polymères synthétiques couramment utilisés. Ils permettent de former sur la peau ou les cheveux des films de meilleure stabilité à l'humidité ambiante, tout en gardant une meilleure plasticité.

Aussi les chitosanes et leurs dérivés sont employés comme agents hydratants dans les vernis à ongles et crèmes, comme déodorants ou antipelliculaires, ainsi que dans les pâtes dentifrices (Felse et Panda, 1999; Roller et Covill, 1999).

Dans le secteur textile, la chitine, le chitosane et leurs dérivés sont des agents de stabilisation des teintures et de résistance au rétrécissement. Incorporés dans les tissus, ils exercent un effet antibactérien et, donc, déodorant (Majeti et Kumar, 2000 ; Jeon et Shahidi, 2000).

Un dernier exemple, les fibres de chitine peuvent être incorporées dans le papier pour augmenter sa résistance à l'eau, sa force de tension et sa durabilité. Ceci permet de réutiliser le papier après plusieurs recyclages sans effets négatifs sur sa qualité. La chitine est facilement biodégradable par les bactéries du sol ce qui ne cause aucun danger pour notre environnement (Allan et al., 1978).

IV) Chitosane en tant que bioemballage actif

IV.1. Définition des emballages actifs

L'emballage actif a été développé dans le domaine de l'emballage agro-alimentaire en Europe depuis quelques années (Vermeiren *et al.*, 1999; De Kruijf *et al.*, 2002).

L'emballage actif est défini comme (un emballage qui offre plus qu'une simple protection. Il interagit avec l'aliment et dans certains cas répond à des changements du milieu environnant ou du produit lui-même) (Gontard, 2000). Alors que d'après le règlement du parlement européen et du Conseil N° 1935/2004 du 27 octobre 2004, les emballages actifs sont définis comme (Les matériaux et objets actifs sont destinés à prolonger la durée de conservation ou à maintenir ou à améliorer l'état de denrées alimentaires emballées). Ils sont conçus de façon à incorporer délibérément des constituants qui libèrent ou absorbent des substances dans les denrées alimentaires emballées ou dans l'environnement des denrées alimentaires. En d'autres termes, les emballages actifs agissent sur l'aliment et son environnement (Roussel, 2005)

IV.2. Les films d'emballages anti-microbiens

L'emballage antimicrobien est une forme d'emballage actif qui sert à réduire, inhiber ou retarder la croissance des microorganismes présents éventuellement dans l'aliment emballé ou dans le matériau d'emballage lui-même (Suppakul *et al.* 2003). Selon Vermeiren *et al.* (1999), les emballages antimicrobiens sont utilisés dans le domaine agro-alimentaire pour emballer la viande, le poisson, le poulet, le fromage, les fruits et légumes.

IV.2.1. Activité anti-microbienne du chitosane

Le mécanisme exact de l'action antimicrobienne du chitosane est encore inconnu mais certains mécanismes ont été proposés. L'activité antibactérienne du chitosane serait due essentiellement à la charge positive du chitosane qui interagit avec les phospholipides membranaires chargés négativement (Chen *et al.*, 1996). L'interaction crée une perturbation au niveau de la membrane avec une diminution des échanges de nutriments entre la bactérie et le milieu extérieur qui entraîne la mort cellulaire (Shahidi *et al.*, 1999). Par ailleurs, Helander *et al.* (2001) ont prouvé que la clé de l'activité antimicrobienne du chitosane provient de la charge positive des groupements amine du carbone C₂ (structure polycationique à pH < 6,3).

IV.2.2. Activité Bactériostatique du chitosane

L'efficacité antibactérienne du chitosane augmente avec l'augmentation de sa masse molaire, de son degré de désacétylation et de sa concentration employée (Liu et al., 2000). En ce qui concerne l'influence du pH, l'activité antibactérienne du chitosane est plus efficace à pH faible. En plus, Sudharsan *et al.* (1992) ont également rapporté que le chitosane et ses dérivés n'ont pas d'effet bactéricide à pH 7, dû à la présence d'une proportion importante de groupements amine non chargés et à la faible solubilité du chitosane.

IV.2.3. Activité fongistatique

L'effet antifongique du chitosane sur la croissance *in vitro* des champignons pathogènes dans les cerises a été examiné par El Ghouth *et al.* (1992). D'après cette étude, le chitosane (avec $DA \leq 7,2\%$) peut diminuer la croissance radiale de *Botrytis cinerea* et *Rhizopus stolonifer* où l'effet d'inhibition est plus fort avec la plus grande concentration employée. En outre, ces auteurs ont confirmé l'efficacité du grand nombre de groupes de charge positive.

V) Fabrication du film de chitosane par voie humide (casting)

La formation des films à base de chitosane par voie humide se fait par coacervation d'une solution filmogène. La coacervation repose sur la séparation du matériau filmogène de la phase solvant par précipitation ou par changement de phase sous l'effet du traitement thermique et de l'évaporation du solvant. La formation du film est le résultat de l'augmentation de la concentration en polymère, entraînant l'agrégation des molécules et la formation d'un réseau physique tridimensionnel. Ce procédé, parfaitement maîtrisé et appliqué en laboratoire, nécessite l'étalement de la solution filmogène en couche mince (casting). Les solvants utilisés pour le chitosane sont généralement les acides dilués (Caner *et al.*, 1998). Les propriétés des films de chitosane sont dépendantes des conditions de fabrication : solvant utilisé, température de séchage, plastifiant, conditionnement (humidité, température).

V.1.Effet de la méthode de séchage

Srinivasa *et al* (2004) ont comparé les différentes méthodes de préparation des films de chitosane en utilisant l'étuve conventionnelle (oven drying), l'étuve infra rouge à 80, 90 et 100 °C, et sans l'étuve (à la température ambiante, 27 °C). Ils ont rapporté que les propriétés mécaniques (la contrainte et l'élongation à la rupture) des films du chitosane préparés à la température ambiante sont plus performantes que celle des films préparés en étuves.

Cependant, la perméabilité à la vapeur d'eau et à l'oxygène des films préparés à la température ambiante est plus importante que celles des films préparés en étuve (température plus élevée). En effet, la cristallinité des films de chitosane préparés en étuve est plus élevée que celle des films préparés à la température ambiante.

V.2.Effet des solvants utilisés

Le chitosane est soluble dans les milieux acides dilués par protonation des groupements amine. Les acides les plus fréquemment utilisés sont l'acide acétique, l'acide formique, l'acide lactique, l'acide propionique, l'acide malique.... Caner *et al* (1998) ont étudié l'effet des solvants (acide acétique, acide formique, acide lactique et acide propionique) sur les propriétés mécaniques et barrière du chitosane. Certaines propriétés, sont présentées dans le **Tableau 2** . D'après ce tableau, nous pouvons noter que l'acide acétique est le meilleur solvant pour obtenir des films de chitosane avec de bonnes propriétés mécaniques.

Tableau 2. Effet des acides dilués (1%, v/v) sur les propriétés des films de chitosane

Type d'Acide	Élongation à la rupture (%)	Contrainte à la rupture (MPa)
Acide Acétique	32,2	22,7
Acide Formique	27,9	22,1
Acide Lactique	28,4	18,9
Acide Propionique	24,6	8,6

Les films obtenus avec l'acide acétique possèdent les propriétés barrière à la vapeur d'eau et la contrainte à la rupture plus performantes. Ainsi, l'acide acétique est utilisé comme le solvant du chitosane pour la plupart des études (Kittur *et al.*, 1998; Butler *et al.*, 1996; Wiles *et al.*, 2000; Despond *et al.*, 2001; Kam *et al.*, 1999).

V.3.Effet du degré de désacétylation et de la masse molaire du chitosane :

Chen et Hwa (1996) ont étudié l'effet des masses molaires du chitosane (240 ; 291 ; 340 ; 410 kg/mol) sur les propriétés mécaniques et barrière des films obtenus.

Ils ont rapporté que :

- plus la masse molaire du chitosane augmente, plus la contrainte à la rupture augmente,
- plus la masse molaire du chitosane augmente, plus la perméabilité à la vapeur d'eau diminue.

Autrement dit, le chitosane de forte masse molaire possède les meilleures propriétés mécaniques et barrière, comparé à celui de faible masse molaire. Ces résultats sont comparables à l'étude de Sarasam et Madihally (2005) qui ont comparé trois différentes gammes de masses molaires du chitosane (50-190 kg/mol ; 190-310 kg/mol ; > 310 kg/mol). Cette étude a montré que la résistance à la traction des films de chitosane augmente avec l'augmentation de la masse molaire.

Quant au degré de désacétylation du chitosane, Wiles et al (2000) ont étudié l'effet de trois degrés de désacétylation du chitosane (92 ; 84 ; 73 % DD) sur la perméabilité à la vapeur d'eau. Ils ont conclu qu'il n'y a pas d'effet significatif sur la perméabilité à la vapeur d'eau. Il paraît que le DD du chitosane affecte beaucoup plus les propriétés antimicrobiennes des films de chitosane que les propriétés mécaniques et barrière.

V.4.Effet des plastifiants

V.4.1. Généralités sur les plastifiants

Les plastifiants sont des additifs utilisés pour améliorer la flexibilité ou la plasticité des polymères et pour faciliter le processus de la mise en forme d'un polymère (Daniel, 1989). Certaines théories ont été proposées pour expliquer les mécanismes de l'action des plastifiants (Verrier, 2005 ; Di Gioia et Guilbert, 1999):

- a. La théorie de la lubrification postule que le plastifiant, par insertion entre deux chaînes de polymères, réduit les interactions intermoléculaires.
- b. La théorie de gels postule que la rigidité d'un polymère provient d'une structure tridimensionnelle. Le plastifiant brise un certain nombre d'interactions intermoléculaires en masquant les centres de forces attractives et en solvant les chaînes de polymères.

V.4.2. Plastification du chitosane

La plastification du chitosane n'est pas encore largement étudiée comme celles de l'amidon ou des protéines. Néanmoins, certains auteurs ont démontré l'efficacité de quelques plastifiants pour les films de chitosane :

-Des plastifiants hydrophiles : polyéthylène glycol (PEG) (Alexeev *et al*, 2000; Zhang *et al*, 2002; Kolhe et Kannan, 2003; Caner *et al*, 1998), glycérol (Butler *et al*, 1996).

-Des sucres : sorbitol et sucrose (Arvanitoyannis *et al*, 1997).

Butler *et al* (1996) ont rapporté que l'élasticité des films de chitosane plastifié avec le glycérol diminue après 12 semaines de stockage, alors que Caner *et al* (1998) ont trouvé que les films de chitosane plastifié avec le PEG sont stables jusqu'à 9 semaines. De ce fait, il est nécessaire de déterminer les taux de plastifiants et la stabilité pendant l'utilisation ou le stockage afin de connaître l'efficacité d'un plastifiant.

V.5. Les Critères de miscibilité des mélanges de polymères

Les degrés de compatibilité d'un mélange de deux polymères se présentent sous trois différents niveaux (Hallary et Monnerie, 1986) :

- les deux polymères sont non-miscibles en toute proportion, et forment deux phases distinctes dans le mélange quelle que soit la température utilisée,
- les polymères sont partiellement miscibles,
- les polymères sont totalement miscibles en toute proportion, et forment une phase unique dans le mélange.

Il existe quelques critères simples pour discuter de la compatibilité ou de l'incompatibilité des mélanges (Hallary et Monnerie, 1986). L'observation visuelle simple de l'opacité d'un film peut être révélatrice de la présence d'hétérogénéité. Toutefois, la transparence du film ne peut pas être une preuve de compatibilité puisque le phénomène de diffusion du rayonnement visible n'est perceptible que si la taille des domaines est proche de 100 nm et les indices de réfraction des deux polymères sont très différents. Ainsi, pour caractériser un mélange de polymères, il convient d'utiliser d'autres techniques qui permettent de déterminer le degré de compatibilité.

V.5.1. Observation microscopique des mélanges

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet l'observation directe de la distribution des phases et éventuellement des domaines démixés. Cette technique nécessite un bon contraste entre les différentes phases du système. L'attaque chimique d'une phase du mélange permet d'améliorer l'observation et donc l'interprétation. Cette technique est très utilisée par de nombreux auteurs pour évaluer le degré de compatibilité des mélanges de polymères.

V.6. Les mélanges chitosane/polymères biodégradables

Le film de chitosane, comme la plupart des films à base de polysaccharides, possède une bonne imperméabilité aux gaz mais une faible barrière à la vapeur d'eau, dû à la présence de nombreux groupes pouvant former des liaisons hydrogène dans sa structure (Olabarrieta *et al*,

2001). De plus, le film de chitosane est cassant. Ces deux points faibles du film de chitosane empêchent ses applications dans le domaine de l'emballage. Il est nécessaire donc d'améliorer l'hydrophobie et l'élasticité du chitosane sans perdre de sa biodégradabilité. Pour cela, l'association du chitosane avec d'autres polymères biodégradables est envisagée. L'objectif de ces mélanges est soit d'améliorer la résistance à la vapeur d'eau, soit d'augmenter l'élasticité du chitosane. Aucun mélange ne peut résoudre à la fois les deux points faibles du chitosane. Dans le cas des mélanges chitosane/polymères hydrophobes, on peut améliorer la résistance à la vapeur d'eau mais pas l'élasticité du chitosane. Tandis que pour les mélanges chitosane/polymères hydrophiles, on peut augmenter l'élasticité du chitosane car ces derniers jouent le rôle de plastifiants pour le chitosane, comme le PVA et le PEG. Pourtant, ils diminuent la performance de la barrière à la vapeur d'eau. Dans les mélanges avec d'autres polysaccharides, le chitosane est employé généralement pour augmenter la performance des polymères associés ou pour conférer les propriétés antimicrobiennes. Dans le cas du mélange chitosane/amidon, la présence de l'amidon permet de diminuer le prix des films obtenus.

CHAPITRE II
MATÉRIEL
&
MÉTHODES

II.1. MATÉRIEL

II.1.1. Matières premières :

Chitine commerciale: Obtenu à partir de carapaces de crabes. Fluka. Utilisé pour préparer le chitosane

Chitosane commercial : Obtenu à partir de carapaces de crabes, produit (SIGMA Aldrich). Ce chitosane a été utilisé pour synthétiser les films de chitosane.

II.1.2. Réactifs :

Polyéthylène glycol : Matière première à usage pharmaceutique, fabricant : Roquette Pharma. Poids moléculaire : 6000 g/mole.

Glycérol : réactif chimique commercial, Sigma, Poids moléculaire : 92 g/mole.

Tween 80 : réactif chimique commercial, Sigma, Poids moléculaire : 1310 g/mole.

Hydroxyde de sodium : Réactif chimique commercial, Sigma.

Acide acétique 99% : Réactif chimique commercial, Carlo Erba. (Densité à 25°C : 1.049g/mole)

Plastifiants : Glycérol (Gly), poly(éthylène glycol) (PEG) et le Tween 80 avec les caractéristiques reportées dans le TABLEAU

II.1.3. Équipements :

Etuve de sechage : Binder®

Plaque d'agitation magnétique / plaque chauffante.

Spectrophotomètre infrarouge FT-IR, Perkin Elmer™ Spectrum 100 series (Intervalle de lecture : 4000 cm⁻¹ à 450 cm⁻¹, Résolution : 0.5 cm⁻¹).

Semi-microbalance: Mettler Toledo™, Modèle : XP105 D.Range®, Précision: 0.01 mg.

Microscope électronique à balayage : L'appareillage utilisé est le microscope électronique à balayage JEOL JSM 6360 LV

Analyseuse de traction : 8ZWEICK/ROELL piloté par un logiciel TESTXTERT.

Pied à coulisse digitale : précision de 0,01 mm

II.2.Méthode Expérimentale

La chitine est le polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose. Elle représente le constituant principal des exosquelettes des crustacés tels que les crevettes, les crabes....etc. La séparation ou l'extraction de la chitine à partir des sources variées de crustacés suit généralement les mêmes procédés avec quelques variations : élimination des protéines comme première étape et élimination des sels minéraux (le carbonate de calcium est le sel dominant dans la plupart des cas) comme deuxième étape.

La chitine peut être convertie en chitosane par différents procédés: la désacétylation alcaline homogène, hétérogène et la désacétylation enzymatique, ou par d'autres nouvelles méthodes telle que la méthode TMC (Thermo-Mecano-Chemical)

Dans ce travail nous avons d'abord procédé à une optimisation de la désacétylation de la chitine par un traitement alcalin par le procédé de la désacétylation hétérogène (en faisant varier 3 paramètres de réaction : le temps, la température et la concentration de NaOH). Après cela, le DD est calculé pour chaque chitosane préparé par spectroscopie infrarouge et on les compare au degré de désacétylation du chitosane commerciale.

Dans la deuxième étape, nous procéderons à la préparation de membrane à base de chitosane pure, ainsi que des membranes de chitosane plastifié. Les plastifiants utilisés sont : le Polyéthylène Glycol (PEG), le Glycérol et le Tween 80 (ester de saccharose), et cela à différentes concentrations.

L'élaboration de matériaux à base de chitosane pur et de mélange chitosane/Pastifiants sous forme de films s'effectue par casting. L'étude bibliographique a montré que la solution aqueuse de l'acide acétique est le solvant le plus approprié pour solubiliser le chitosane. En effet, le film de chitosane avec l'acide acétique comme solvant a de bonnes propriétés mécaniques et barrière à la vapeur d'eau.

Les membranes obtenues à partir du chitosane pur et plastifié ont été caractérisées par microscopie électronique à balayage (MEB) et les propriétés mécaniques ont été étudiées pour chaque film obtenu (pure et plastifié).

II.2.1. Mesure du poids moléculaire :

L'utilisation de la méthode viscosimétrique nous a permis de déterminer le poids moléculaire moyen de la chitine commerciale, ainsi que celui du chitosane commerciale. 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 6**).

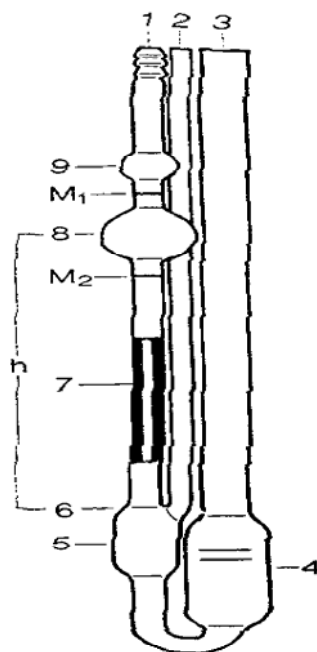


Figure 6. Viscosimètre de type Ubbelohde

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.

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

retirer le doigt du tube. Mesurer le temps d'écoulement du liquide entre les repères M_1 et M_2 , à l'aide d'un chronomètre.

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

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

$$\eta_r = \frac{\eta_{SP}}{[C]} \dots \dots \dots \text{avec} \dots \dots \dots \eta_{SP} = \frac{\eta}{\eta_s} - 1$$

$$\eta_i = \frac{1}{[C]} \times \text{Ln} \frac{\eta}{\eta_s}$$

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

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

$$\eta = k.t$$

k : constante de l'appareil et **t** : temps d'écoulement en seconde)

k peut se calculer à partir de la valeur connue de η (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 et 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 (solution à 5%). Les constantes K et a correspondantes sont respectivement 0,24 cm³/g et 0,69 (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 à 0,3N. Les constantes « K » et « a » relatives à ce solvant sont respectivement 0,078 cm³/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 : 0,0223; 0,042; 0,065; 0,081; 0,1. On calcule η_i et η_r pour chaque solution puis on trace les droites $\eta_i = f([C])$ et $\eta_r = f([C])$. On détermine l'ordonnée à l'origine pour chacune des deux droites tracées, et on calcule la moyenne des deux valeurs. La moyenne, ainsi obtenue, correspond à la viscosité intrinsèque.

II.2.2. Optimisation de la désacétylation de la chitine (préparation du chitosane)

La chitine peut être convertie en chitosane par différents procédés :

-*La désacétylation alcaline homogène* : la chitine subit un traitement alcalin à température ambiante

-*La désacétylation hétérogène* : la chitine subit un traitement alcalin avec chauffage.

-*La désacétylation enzymatique* : la chitine est convertie en chitosane par l'enzyme de la chitine désacétylase (CDA ; 3.5.1.41) qui catalyse l'hydrolyse des liaisons N-acétamides de la chitine

C'est l'étape la plus importante qui consiste à la transformation de la chitine en chitosane par traitement chimique en milieu fortement alcalin (solution de NaOH (p/v)) (Miranda et al., 2004). Déjà cité en bibliographie, la désacétylation est affectée par un grand nombre de facteurs. Dans notre étude, tout en maintenant une agitation constante, nous nous sommes intéressés à l'optimisation des paramètres suivants :

II.2.2.1. Variation de la concentration de soude :

Les valeurs testées sont les suivantes : 15, 30 et 50%. La température est maintenue à 100°C avec un temps de réaction de 120 minutes.

II.2.2.2. Variation du temps de réaction :

Des réactions de désacétylation ont été menées en faisant varier le temps entre 30, 60, 120, et 180 minutes pour une température fixe de 100°C et pour une concentration de soude à 50% .

II.2.2.3. Variation de la température :

Les valeurs testées sont : 30 ; 60 ; 100 et 130°C pour un temps de réaction fixé à 120 min et une concentration de soude à 50%.

Au terme de la réaction, la solution est filtrée sur un tamis ; le chitosane retenu est lavé en continu à l'eau distillée afin d'éliminer la soude résiduelle, et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau de lavage atteigne la neutralité. Puis séché à l'étuve à 80°C durant 48 heures

II.2.3. Mesure du degré de désacétylation :

La chitine ainsi que le chitosane ont été caractérisés par la technique de la spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed Infra Red spectroscopy). C'est l'une des techniques les plus utilisées pour l'identification des matériaux, c'est une méthode de choix pour le suivi de la conversion de la chitine en chitosane. Elle permet également via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau (Silverstein et al., 1998). En mettant en évidence l'apparition ou la disparition de certaines bandes de façon très significative au cours de la synthèse du chitosane

L'échantillon à analyser a été préparé comme suit: Nous mélangeons 2 à 3 mg de chitosane ou de chitine avec 300 mg de KBr et compressé par la suite sous une pression de 10 tonnes. Ceci permet d'obtenir une pastille prête à être analysée.

Les mesures ont été réalisées par spectrophotomètre FTIR (Perkin Elmer Spectrum 100) d'intervalle de fréquence entre 4000 cm⁻¹ et 450cm⁻¹.

Le degré de désacétylation du chitosane et de la chitine a été calculé en utilisant la formule de Lima et al., (2003) :

$$DD = 97,67 - \left[26,486 \times \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right] \text{-----(1)}$$

A₁₆₅₅ : absorbance de la bande Amide-I à 1655 cm⁻¹ donnant la mesure des groupements N-acétyle.

A₃₄₅₀ : absorbance de la bande Hydroxyle à 3450 cm⁻¹ indiquant le standard interne pour la Correction)

II.2.4. Préparation des membranes de chitosane

L'élaboration de matériaux à base de chitosane sous forme de membrane s'effectue par plusieurs méthodes, presque identiques, proposées par plusieurs chercheurs, mais la plus employée est celle présentée par Mudzareli. On ce qui nous concerne nous avons suivie celle de Miranda et al, (2004)

II.2.4.1. Préparation des membranes de chitosane pure :

Le processus de la fabrication des films (casting) est schématisé dans la **Figure 7**. Une solution de 2% (w/v) de chitosane est préparée en solubilisant 2g de chitosane en poudre dans 100 ml d'une solution d'acide acétique à 1%(v/v) sous agitation magnétique de 300 (rpm) pendant 2 heures. Ensuite 21 ml de la solution sont moulés dans des boîtes de Pétri de 10cm de diamètre et séchées à température ambiante (25°C) durant 72 heures ; les films formés sont démoulés puis stockés à 23°C et 50% HR, en humidité relative Miranda et al., (2004).

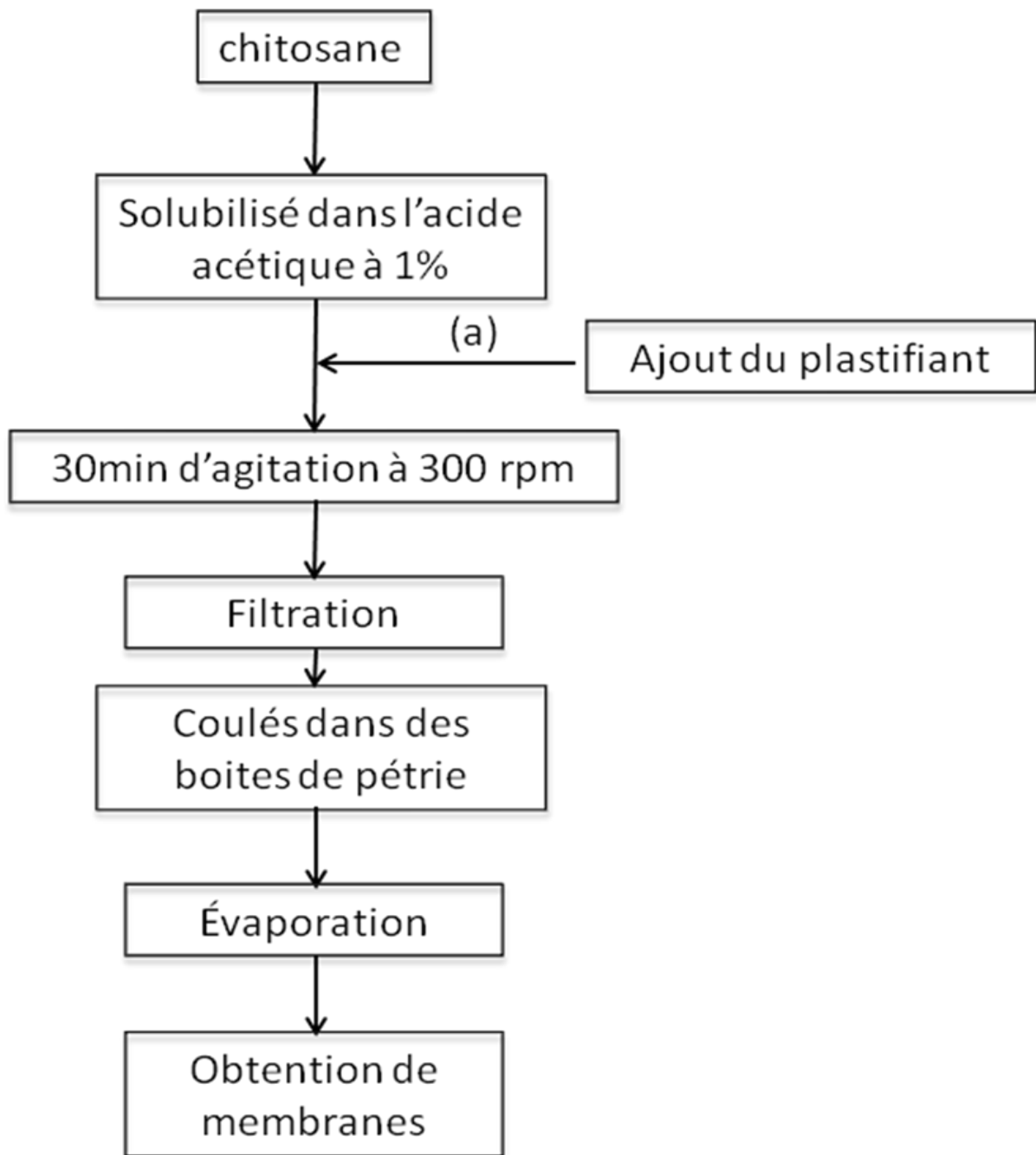


Figure 7. Préparation des membranes de chitosane pure et plastifiées (a).

II.2.4.2. Préparation des membranes de chitosane plastifié :

II.2.4.2.a. Plastification du chitosane :

L'objectif de ce travail est de déterminer les taux de plastifiant et la stabilité des matériaux plastifiés pendant l'utilisation ou pendant le stockage afin de trouver le plastifiant le plus efficace pour le chitosane

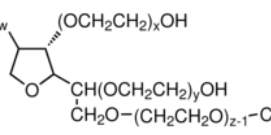
La plastification du chitosane n'est pas encore largement étudiée comme celles de l'amidon ou des protéines. Néanmoins, certains auteurs ont démontré l'efficacité de quelques plastifiants pour les films de chitosane :

Les plastifiants hydrophiles : polyéthylène glycol (PEG) (Alexeev *et al*, 2000; Zhang *et al*, 2002; Kolhe et Kannan, 2003; Caner *et al*, 1998), glycérol (Butler *et al*, 1996).

Butler *et al* (1996) ont rapporté que l'élasticité des films de chitosane plastifié avec le glycérol diminue après 12 semaines de stockage, alors que Caner *et al* (1998) ont trouvé que les films de chitosane plastifié avec le PEG sont stables jusqu'à 9 semaines. De ce fait, il est nécessaire de déterminer les taux de plastifiants et la stabilité pendant l'utilisation ou le stockage afin de connaître l'efficacité d'un plastifiant.

Les propriétés des plastifiants utilisés pour cette étude sont représentées dans le **tableau 3**.

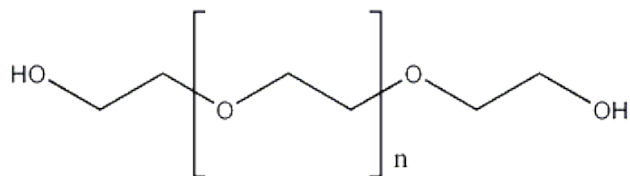
Tableau 3. Propriétés des plastifiants utilisés

	Glycérol	Poly Éthylène Glycol	Tween 80 (tensioactif)
Structure chimique	$\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	$\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$	$\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$ $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_w(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH}$  $\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{z-1}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ Sum of $w + x + y + z = 20$
Masse molaire (g/mol)	92	6000	1310
Température d'ébullition (°C)	290	-	> 100
Teneur en eau (%)	0.5	-	≤ 3
Solubilité dans l'eau	Complète	Complète	Complete

II.2.4.2.b. Choix des plastifiants

1) Le Polyéthylène glycol (PEG) :

Un polymère très répandu soluble dans l'eau, dont la formule chimique est la suivante :



C'est un polymère linéaire, neutre, inerte chimiquement, se présentant sous forme de poudre blanche, ayant une toxicité modérée et un poids moléculaires moyens compris entre 2000 et 20000.

2) Le Glycérol

Le glycérol se présente sous la forme d'un liquide transparent, visqueux, incolore, inodore, non toxique et au goût sucré.

Le glycérol peut se dissoudre dans les solvants polaires grâce à ses 3 groupements hydroxyles. Il est miscible dans l'eau et l'éthanol ; et insoluble dans le benzène, le chloroforme et le tétrachlorométhane et c'est un plastifiant et lubrifiant utilisé dans la fabrication du papier.

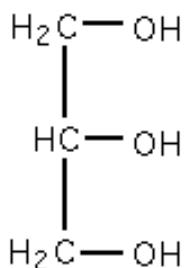


Schéma de la Formule développée du Glycérol

3) Le Tween 80 (ester de saccharose) :

C'est une molécule non ionique ne comportant aucune charge net, très fréquemment utilisée en chimie et en biologie, le Tween 80 ou ester de saccharose fait partie de la famille des *esters de sucre* ; ceux-ci sont constitués d'un groupement osidique hydrophile et d'une chaîne grasse hydrophobe. Les esters de sucre ont plusieurs avantages en tant que tensioactifs :

- matières premières peu coûteuses et renouvelables
- biodégradabilité complète en aérobiose et en anaérobiose
- molécules ne présentant ni toxicité ni caractère irritant
- absence de goût et d'odeur
- molécule non ionique
- large gamme de structures disponibles
- utilisé dans l'enrobage fruits, ils en préservent la fraîcheur et prolongent la durée de stockage

II.2.4.2.c. Méthode de plastification :

Les membranes de chitosane plastifiées sont préparées en utilisant deux plastifiants hydrophiles (polyéthylène glycol 6000 (PEG) , le glycérol (GLY) et un plastifiant à caractère hydrophobe le Tween 80 à différentes pourcentages 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6%. L'objectif est d'améliorer les propriétés mécaniques (l'élasticité) des films de chitosane et de diminuer sa perméabilité à la vapeur d'eau. Nous avons choisi ces trois substances pour leur utilisation agréée dans l'industrie agro-alimentaire, leur disponibilité, leur non toxicité et leur faible coût.

Le chitosane a été plastifié en utilisant la méthode de Miranda et al (2004). Le processus de fabrication des films est illustré dans la **Figure 7(a)**. La solution de 2 % de chitosane ou de chitosane/plastifiant a été préparée en ajoutant 2 g de chitosane en poudre + x g de plastifiant, où x est la quantité massique de plastifiant, dans 100 ml de l'acide acétique 1%, puis mélangée à l'aide d'une agitation magnétique jusqu'à l'obtention d'une solution homogène qui va être, filtré pour éliminer les impuretés et les bulles d'air à l'aide, d'un système de filtrage équipé d'une pompe sous vide. Les compositions de chitosane/plastifiant sont **2/0,6 ; 2/0,4; 2/0,2**, et **2/0,1** (w/w). Puis, 21 ml de cette solution est moulés dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre suivi par l'évaporation du solvant à la température ambiante. Les films obtenus sont stockés dans une enceinte climatique (MINDER, Allemagne) à 50 ± 5 % HR et 23 ± 2 °C.

II.2.5. Méthodes d'évaluation des membranes de chitosane pure et plastifié :

II.2.5.1. Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)

C'est la méthode la plus directe pour observer des domaines démixés, celle qui permet la mesure précise des dimensions des différentes phases. Cependant, elle n'est efficace que s'il y a un contraste nécessaire à l'observation et donc à l'interprétation. Son principe ressemble à celui de la microscopie optique en lumière directe. Lorsque le faisceau d'électrons est focalisé sur l'échantillon, une partie des électrons le traverse et le reste est réémis. Le résultat est une représentation en pseudo tridimensionnel de la surface de l'objet étudié. Cette technique a été utilisée pour observer la compatibilité chitosane-PEG ; chitosane-GLY ; chitosane-Tween 80 dans les films plastifié et le film de chitosane non plastifié.

-L'appareillage utilisé est le microscope électronique à balayage JEOL JSM 6360 LV. Les micrographies ont été obtenues en appliquant un voltage de 5 kV avec un grossissement $\times 250$ en suivant la méthode de Olabarrieta *et al.* (2001).

II.2.5.2. Épaisseur des films

-L'épaisseur des films a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse digitale en 5 points différents sur chaque film avec une précision de 0,01 mm.

II.2.5.3. Propriétés mécaniques

La caractérisation mécanique des films a été effectuée en traction sur des rubans découpés à partir des films de chitosane (Pure et plastifiée). Le ruban a une géométrie utile de

70 x 10 x 0.06 mm (longueur x largeur x épaisseur), cette épaisseur varie pour chaque film de chitosane pure ou bien plastifié. Les films sont conditionnés à une humidité relative et une température : 23°C ; 58% HR pendant 24 heures avant les tests. Ils sont testés à l'aide d'une machine de traction 8ZWEICK/ROELL piloté par un logiciel TESTXTERT. La vitesse de traction est fixée à 2 mm/minute. (Miranda et al.,2004)

CHAPITRE III
RÉSULTATS
&
DISCUSSION

III) Résultats et discussion

III.1. Caractérisation de la chitine et du chitosane :

III.1.1. Le poids moléculaire

Le poids moléculaire moyen de la chitine est compris entre $1,03 \times 10^6$ et $2,5 \times 10^6$ Daltons (Majeti et al., 2000). La chitine commerciale utilisée dans le cadre de notre travail, présente un poids moléculaire de 740 KDa. 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).

Le poids moléculaire du chitosane est compris entre 5×10^4 et 2×10^6 Daltons (Chenite et al., 2001).

Le poids moléculaire du chitosane commerciale utilisé pour la fabrication des films de chitosane, présente un poids moléculaire considérable de 470 KDa.

III.1.2. Le degré de désacétylation

Les spectres infrarouges de la chitine et du chitosane commerciale sont représentés sur la **figure 8**.

Ces spectres sont similaires à ceux publiés dans la littérature (Bough et al., 2004 ; Rinaudo., 2006).

Les absorbances aux fréquences théoriques 1655 cm^{-1} et 3450 cm^{-1} sont responsables de la détermination du degré de désacétylation (Sabnis et Block., 1997). Le rapport d'absorbance (A_{1655} / A_{3450}) donne des meilleurs résultats pour les DD inférieurs à 97% (Kurita, 2001 ; Lima et Airoidi, 2003).

Les fréquences que nous avons obtenues pour le chitosane commerciale est de 1628 cm^{-1} pour la fonction carbonyle représenté par l'amide (I) et 3430 cm^{-1} pour la fonction hydroxyle (-OH), ses résultats sont proche des fréquences théoriques. En se basant sur les valeurs d'absorbance des deux bandes, l'équation (1) nous a permis d'obtenir un degré de désacétylation du chitosane égale à 81% ., D'une manière générale, le DD du chitosane varie de 56 à 99% avec une moyenne de 80% (Fernandez-Kim, 2004).

Pour la chitine commerciale, les fréquences obtenues sont : 1648 cm^{-1} pour la fonction amide I et 3430 cm^{-1} pour le groupe hydroxyle qui sont aussi proches des valeurs théoriques. On obtient un degré de désacétylation de (35%) cette valeur est relativement élevée, cela suggère que la chitine commerciale aurait subi, dans une certaine mesure lors de son extraction, une désacétylation, ce qui justifierait la valeur du DD obtenu.

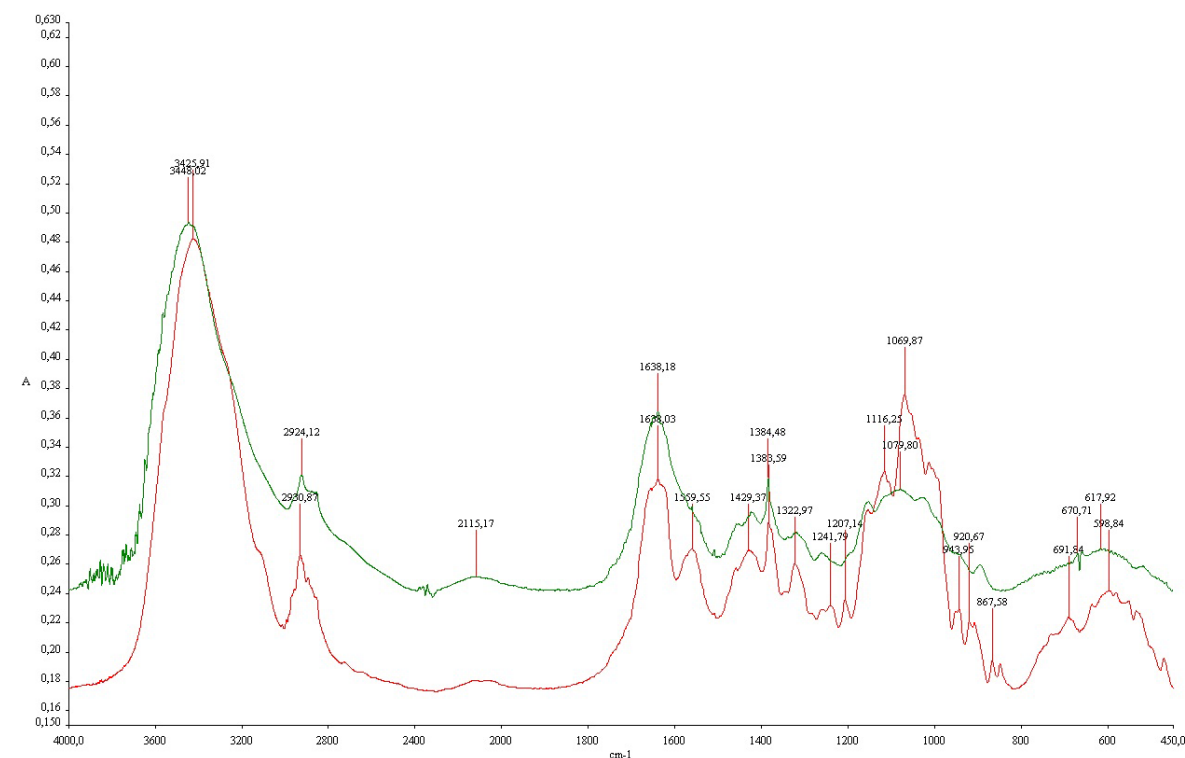


Figure 8. Spectre Infrarouge de la chitine (en vert) et du chitosane (en rouge)

III.1.3. Optimisation de la désacétylation :

On a calculé le degré de désacétylation Pour les différents chitosanes obtenus après traitement de la chitine commerciale en faisant varier les paramètres de réaction et en les comparant au chitosane commercial. Les résultats obtenus sont représentés dans les histogrammes suivants.

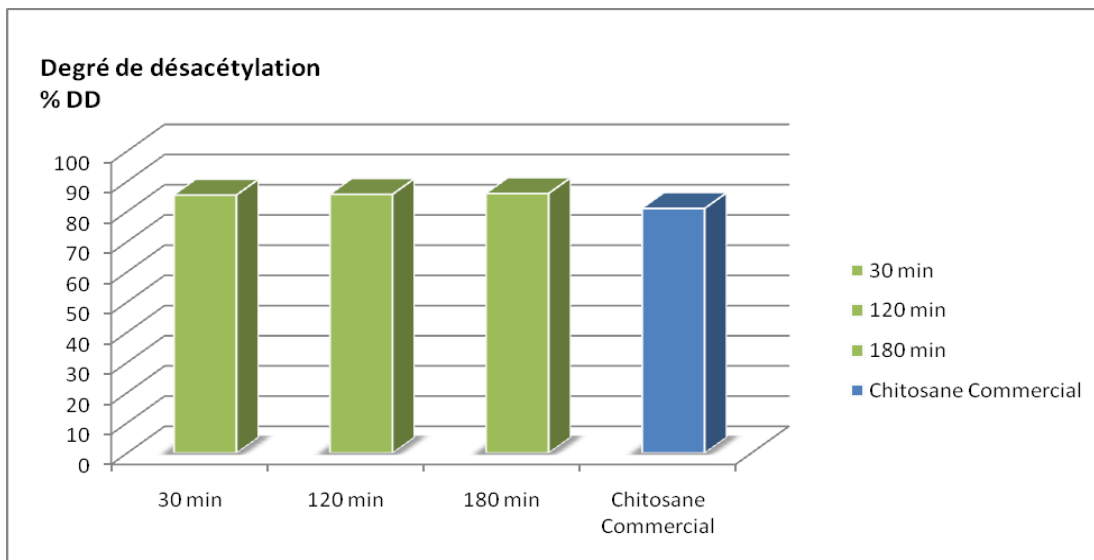


Figure 9. Evolution du DD en fonction du temps : T= 100°C, [NaOH]=50%

D'après les résultats obtenus dans la (figure 9) on constate que le degré de désacétylation du chitosane préparé a atteint un taux de désacétylation considérable DD=84,82% , et cela dès les premières 30 min de la réaction et cela pour une température de 100°C, au-delà de ce temps on observe une stagnation du degré de désacétylation qui variera très faiblement cela est sans doute associée à une dégradation de la chaîne polymérique .

On peut déduire de ces résultats que : 30 min de réaction, 50% de NaOH ont permis d'avoir un degré de désacétylation relativement élevé(DD=84,82) comparable à celui du chitosane commerciale(DD=81%).

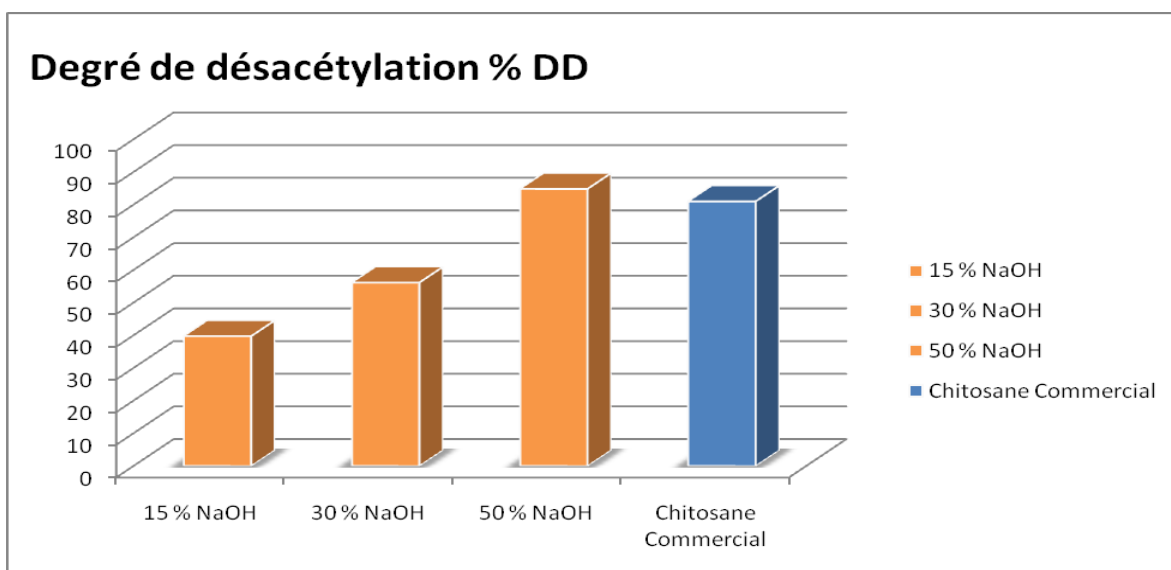


Figure 10. Evolution du DD en fonction de la concentration en NaOH, T=100°C, Temps = 120 min

Nous avons constaté par contre que la variation de la concentration de soude, joue un rôle dominant sur l'influence du taux de désacétylation pour le chitosane préparé (**Figure.10**). On remarque que le degré de désacétylation augmente continuellement avec la quantité de NaOH qui atteint sa plus grande valeur pour une concentration de soude de 50%, où le DD =84,82% .

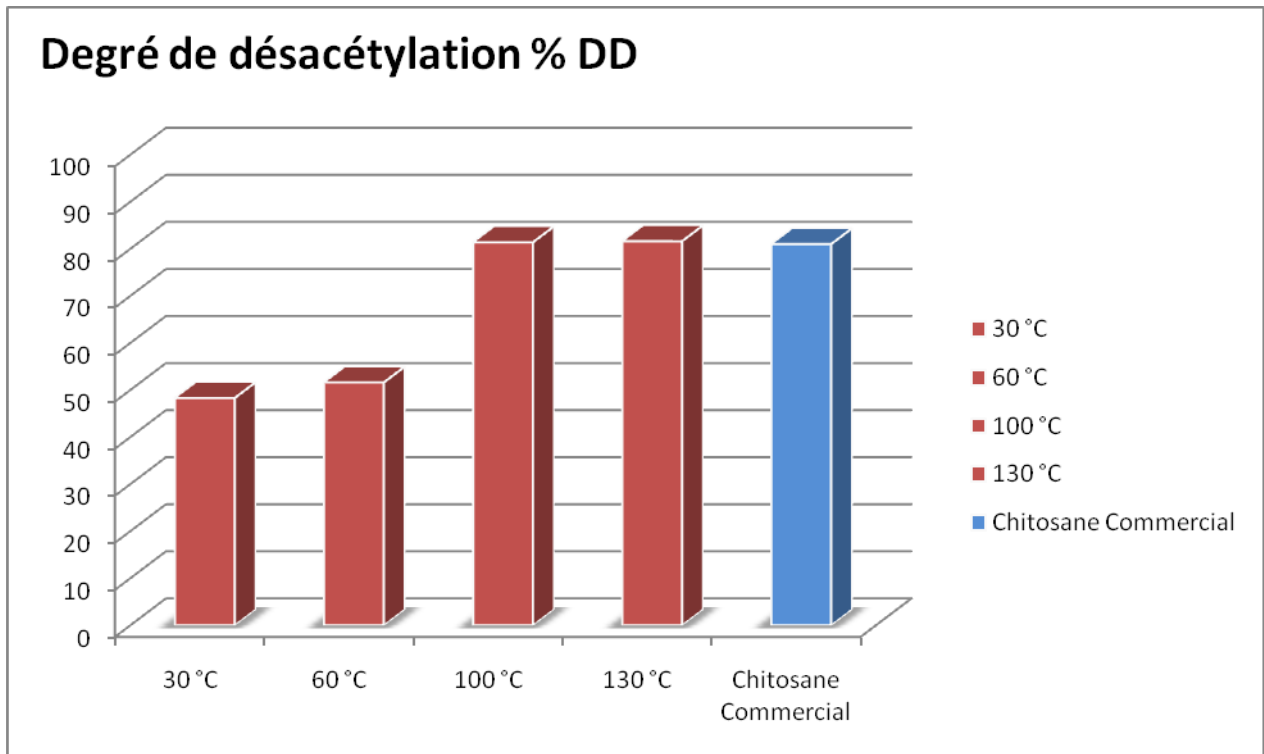


Figure 11. Evolution du DD en fonction de la température ; [NaOH]=50%, Temps=120min

Quant à la température, lorsque la quantité de NaOH et le temps sont fixés, son élévation entraîne une augmentation continue du taux de désacétylation du chitosane préparé au détriment du coût de l'opération qui atteint un degré de désacétylation proche DD=81,61% pour une température de 130°C. Ceci s'explique par le fait qu'une élévation de la température diminue la viscosité de la solution alcaline et augmente sa réactivité en intensifiant le mouvement des particules.

On peut déduire de ces résultats que : 30 min de réaction, 50% de NaOH et une température de 100°C ont permis d'obtenir un degré de désacétylation relativement élevé (DD=84,82) comparable à celui du chitosane commercial (DD=81%). Cela permet au

chitosane d'être très soluble dans la solution d'acide acétique pour la formation des films et d'avoir l'effet antibactérien car on obtient un DD élevé. (Wiles et al., 2000)

III.2. Plastification du chitosane :

Les études bibliographiques ont montré qu'il est nécessaire de plastifier le chitosane afin d'améliorer son élasticité en évitant au film de se casser pendant son application comme décrit par (Garcia *et al* 1998). De plus, la nature du plastifiant et sa teneur sont des facteurs importants dans l'application du chitosane en tant qu'enrobage ou film comestible. Ainsi, l'objectif de ce travail est de déterminer les taux de plastifiants et leur stabilité afin de trouver le plastifiant le plus efficace pour le chitosane.

III.2.1. Caractérisation des films :

III.2.1.1. Apparence :

Les solutions de chitosane préparées avec ou sans plastifiant sont transparentes et sans bulles d'air.

Les films de chitosane obtenus sont transparents, compacts avec une surface lisse sans pores ni fissures (**figure 12**) et ils sont faciles à démouler de la boîte à pétrie après séchage, semblables aux films de chitosane obtenus par Wong et al., (1992).

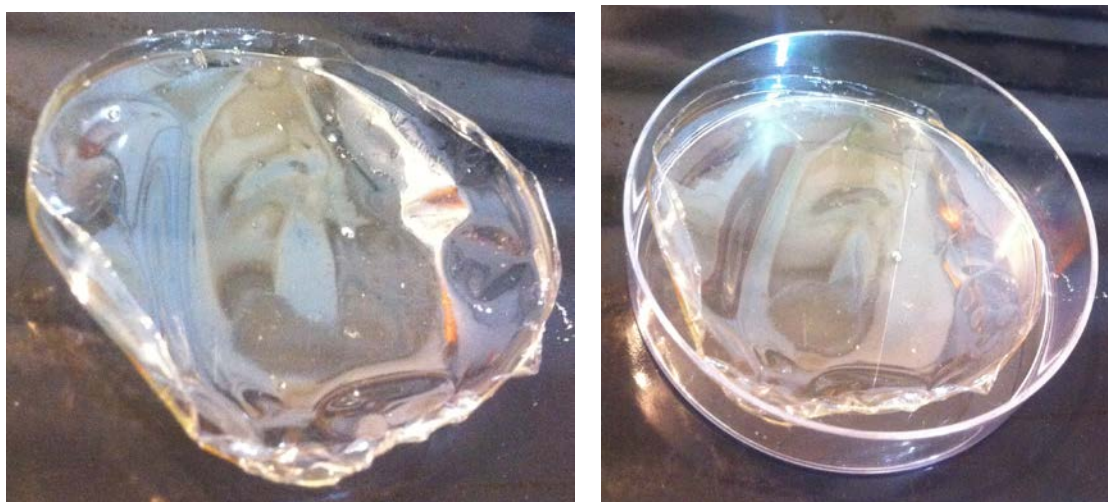


Figure 12. Photographies de films de chitosane

III.2.1.2. Épaisseur :

Le **tableau 4** montre que l'épaisseur des films de chitosane augmente quand certains composants sont ajoutés, la plus faible étant pour les films de chitosane à 2% et la plus élevée pour le film de chitosane à 0,6% de Tween 80, on observe que l'épaisseur augmente entre 20% à 70% selon le plastifiant et la concentration utilisée.

Tableau 4. Épaisseurs des films de chitosane pure et plastifiés

Films	Épaisseur en mm
2% Chitosan	0,05
2% Chitosan + 0.1% PEG	0,067
2% Chitosan+ 0.2% PEG	0,070
2% Chitosan+ 0.4% PEG	0,070
2% Chitosan + 0.6% PEG	0,075
2% Chitosan + 0.1% Glycerol	0,060
2% Chitosan + 0.2% Glycerol	0,065
2% Chitosan + 0.4% Glycerol	0,075
2% Chitosan + 0.6% Glycerol	0,080
2% Chitosan + 0.1% Tween 80	0,070
2% Chitosan+ 0.2% Tween 80	0,077
2% Chitosan + 0.4% Tween 80	0,080
2% Chitosan + 0.6% Tween 80	0,085

III.2.1.3. Les propriétés mécaniques :

Les propriétés mécaniques des différents films de chitosane (avec et sans ajout de plastifiants) sont présentées sur le **tableau 5**.

Tableau 5 . Propriétés mécaniques des films de chitosane

Films	Force de traction (N)	Allongement à la rupture (%)
2% Chitosane	25,39	5,39
2% Chitosane + 0.1% PEG	19,29	5,24
2% Chitosane + 0.2% PEG	20,92	9,59
2% Chitosane + 0.4% PEG	21,96	8,45
2% Chitosane + 0.6% PEG	22,31	9,25
2% Chitosane + 0.1% Glycerol	25,69	6,70
2% Chitosane + 0.2% Glycerol	24,20	10,76
2% Chitosane + 0.4% Glycerol	26,81	13,65
2% Chitosane + 0.1% Tween 80	24,52	5,69
2% Chitosane + 0.2% Tween 80	23,67	5,42
2% Chitosane + 0.4% Tween 80	21,41	4,18
2% Chitosane+0,6% Tween80	17,46	1,29

La force à la rupture la plus faible est observée pour les films de chitosane plastifier avec 0,6% de Tween 80 et la plus élevée pour le glycérol 0,4%.

Cette force de traction des films plastifié avec le Tween 80 diminue avec l'augmentation de la concentration du plastifiant qui donne des films fragile et cassant (phénomène d'anti plastification) pare rapport au film de chitosane pure. Cela peut être expliqué par la nature amphiphile du Tween 80 qui contient une chaîne hydrophile (polaire) et une chaîne hydrophobe apolaire. Cette chaîne apolaire va diminuer l'élasticité du film (déjà citée dans le chapitre I).

Le glycérol 0,4% montre la plus grande valeur de l'allongement à la rupture est 150 % plus élevé que celle du chitosane non plastifié.ces résultats concordent avec ceux obtenu par Miranda et al (2004).

Pour les films plastifiés avec le PEG, on remarque aussi que l'allongement à la rupture est 40% fois plus élevé que celle du témoin.

Ce qui nous amène à dire que le Glycérol est le plastifiant le plus efficace pour le chitosane. En effet il a présenté un meilleur résultat que le Tween 80 et le PEG pour augmenter son élasticité. Cela est probablement dû à la nature hydrophile du glycérol (présence de trois fonctions hydroxyle -OH). Certaines théories ont été proposées pour expliquer les mécanismes de l'action des plastifiants (Verrier, 2005 ; Di Gioia et Guilbert, 1999) :

Théorie de la lubrification : qui postule que le plastifiant par insertion entre deux chaînes de polymères, réduit les interactions intermoléculaires et par conséquent on peut déduire que la plastification du chitosane avec le glycérol et le PEG a permis de faciliter les mouvements de la chaîne polymérique du chitosane ce qui favorisera l'allongement des films de chitosane qui atteindront la plus grande valeur pour le Glycérol 0,4%. (Guilbert, Cuq., 1998 ; Zhong et al., 2007).

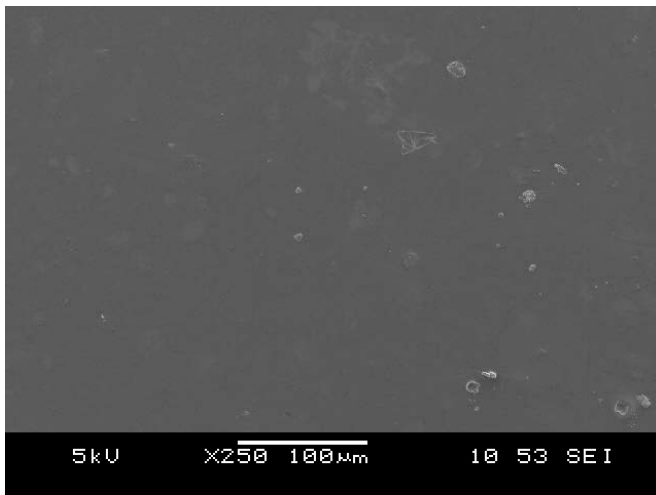
III.2.1.4. Caractérisation des films de chitosane par MEB

Les micrographes des surfaces des films de chitosane pur et plastifié avec le Gly (0,6%) ; PEG (0,6%) et Tween 80 (0,6%) sont représentés sur la **figure 12**.

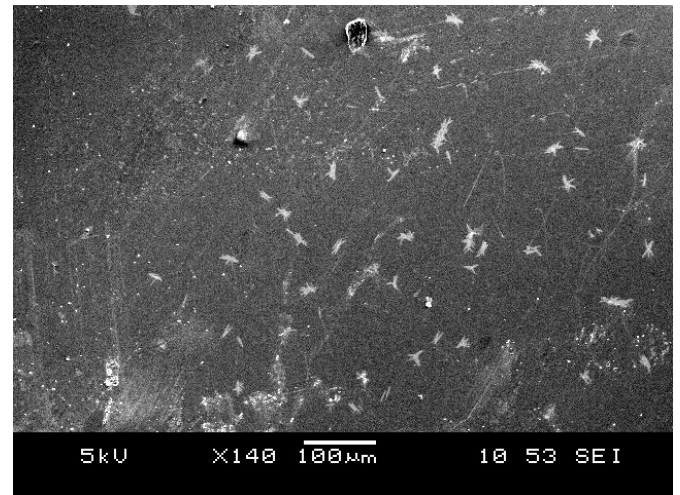
Les films de chitosane pur et plastifié avec le Tween 80 montrent une surface homogène et régulière dépourvue de micro pores (distribution uniforme des molécules de chitosane et de Tween 80) contrairement au chitosane plastifié avec le glycérol et le PEG où on observe des petites particules qui sont dispersées dans la matrice cela est peut-être dû à une mauvaise homogénéisation lors de la préparation des solutions de chitosane plastifié. Car ce-ci n'est pas en accord avec les résultats obtenus pour les tests de traction qui montrent que c'est le glycérol et le PEG qui sont les meilleurs plastifiants pour le chitosane. Et donc qu'il devrait y avoir une bonne complexation. Car le glycérol et le PEG contiennent des fonctions hydroxyle qui peuvent interagir avec les groupements fonctionnels du chitosane (-OH et -NH₂).

La formation d'un mélange homogène entre le chitosane et le Tween 80 est probablement dû à l'interaction des groupements fonctionnels de ces deux composés (la fonction -OH et -NH₂) dans le chitosane et la fonction (-OH) pour le Tween 80. Ceci nous permet de conclure qu'il y a une bonne complexation entre le chitosane et le Tween 80,

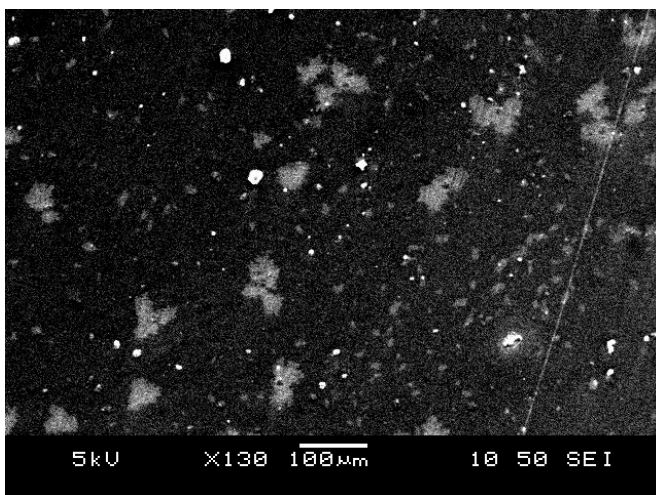
mais ne nous permet pas de dire que ce dernier est un bon plastifiant pour le chitosane.(allongement a la rupture le plus faible pour le Tween 80 à 0,6% ; voir les résultats des tests mécanique cité au préalable).



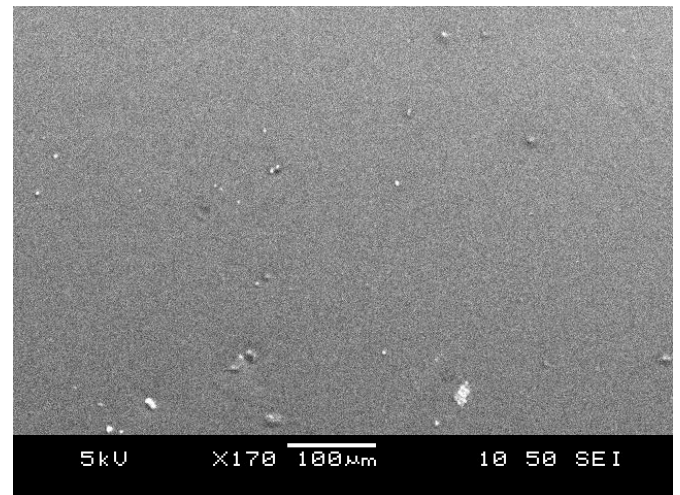
Film de Chitosane pur



Film de chitosane et glycérol



Film de chitosane et PEG



Film de chitosane et de Tween 80

Figure 13. Micrographes des membranes de chitosane par MEB

Annexes :

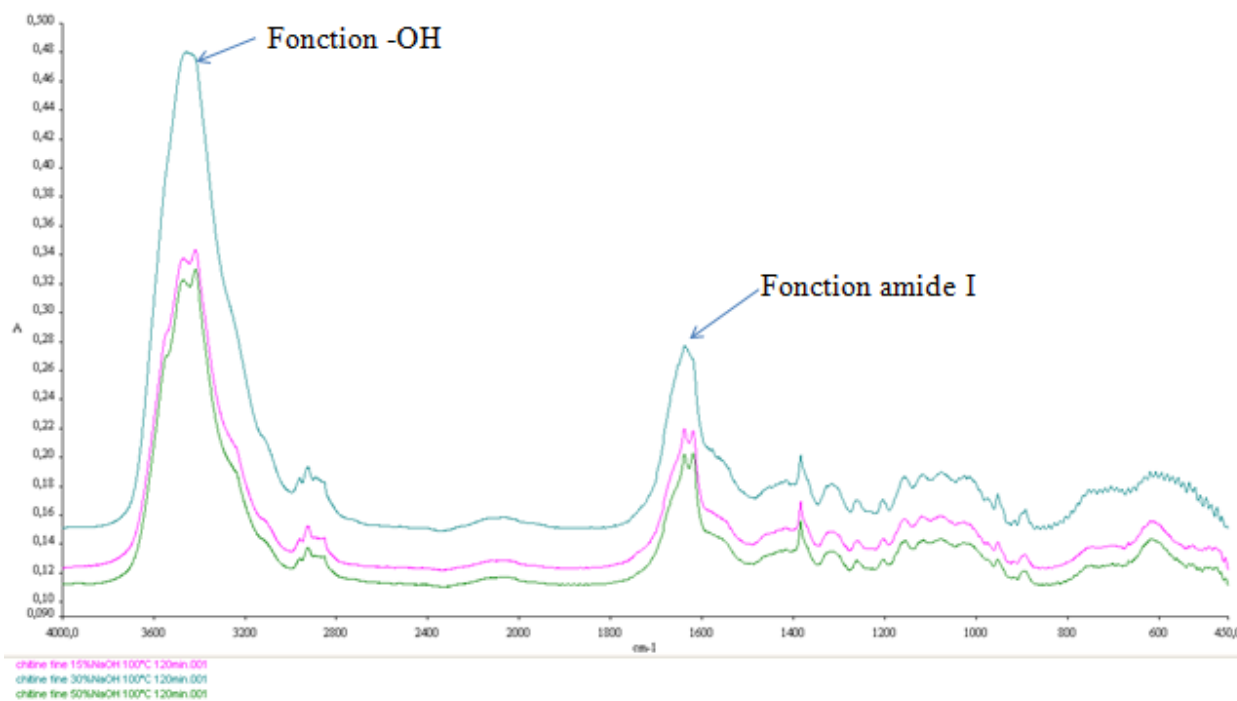


Figure 14. Évolution du DD en fonction de la concentration en NaOH,

T=100°C, Temps = 120 min

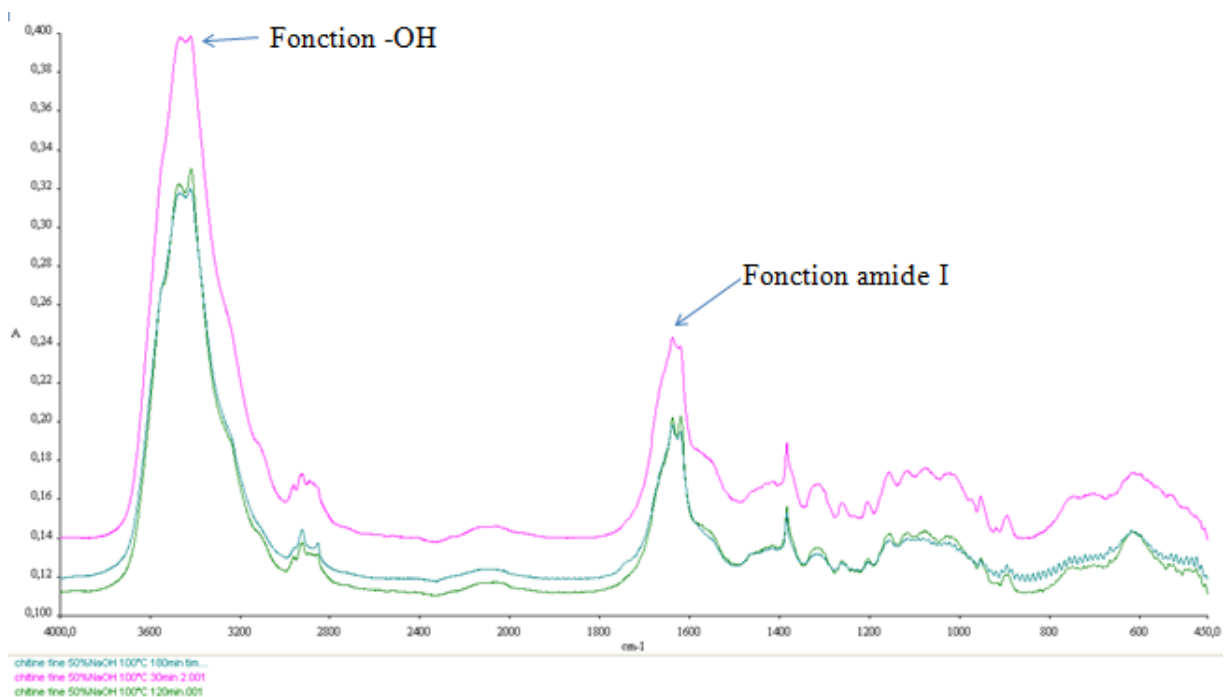


Figure 15. Evolution du DD en fonction du temps : T= 100°C, [NaOH]=50%

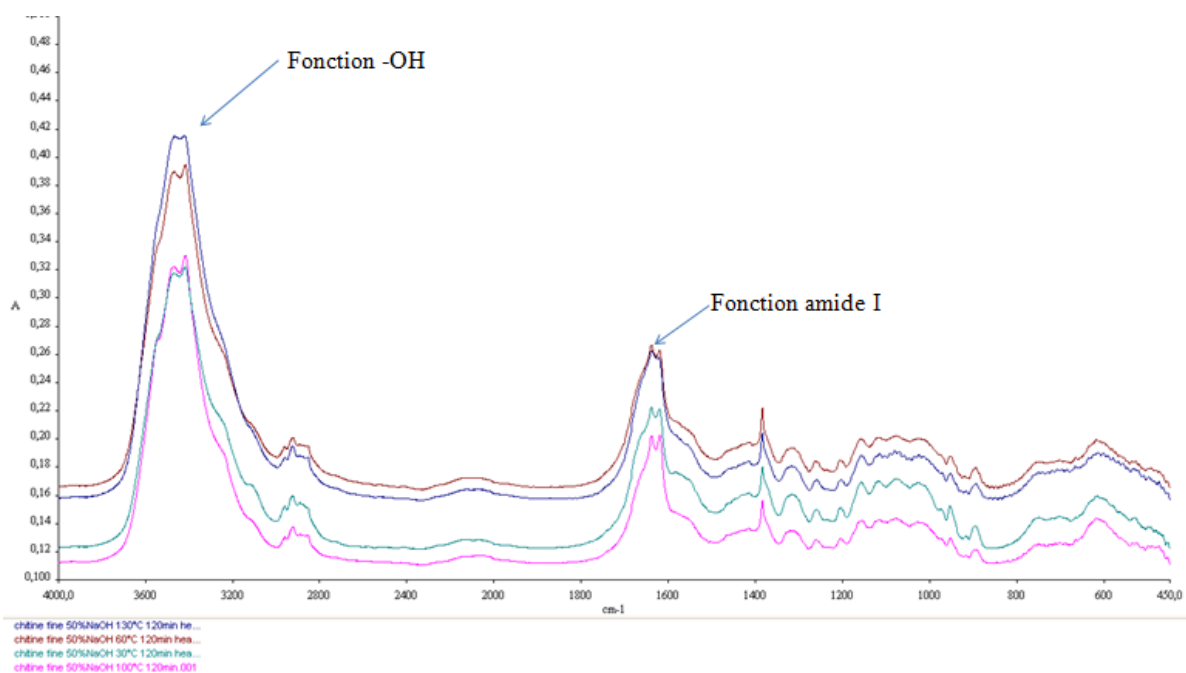


Figure 16. Evolution du DD en fonction de la température ;[NaOH]=50%, Temps=120min

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif général de notre travail était à l'origine de valoriser des sous produits marins (Carapaces de Crabs), en vue de les utiliser pour la conservation des produits agroalimentaire.

Le chitosane obtenu par cette voie possède un degré de désacétylation élevé (84%) ce qui nous a permis d'obtenir des membranes (films) et de les utiliser en tant qu'emballage biodégradable.

Ce matériau est bien connu pour ces propriétés filmogène et antimicrobienne, mais il présente l'inconvénient d'être sensible à l'humidité et cassant, limitant ses applications dans le domaine de l'emballage.

L'objectif de notre étude était d'améliorer la résistance à l'eau et l'élasticité des membranes de chitosane en le plastifiant avec deux plastifiants hydrophile : le Glycérol, le PEG et un plastifiant à caractère hydrophobe : le Tween 80.

Le Glycérol et le PEG peuvent améliorer la ductilité du chitosane quelque soit la quantité du plastifiant sauf pour le Tween 80, qui a clairement montré un phénomène d'anti plastification, d'après les résultats obtenus pour les tests de traction.

Les travaux de cette étude sont loin d'être terminés et plusieurs aspects doivent être approfondis :

- La perméabilité de l'eau pour les films de chitosane pur et plastifiés (application sur des fruits et légumes frais).

- étudier la complexation entre le chitosane et les différents plastifiants par spectroscopie Infra rouge, pour démontrer si il y'a présence d'interactions spécifiques.

- étudier l'activité microbienne des chitosane pur et plastifiés qui pourra être diminué ou neutraliser par l'ajout de plastifiant.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Ahmad M., And Khan I.**; Effects of waxing and cellophane lining on chemical quality indices of citrus; *Plant Foods for Human Nutrition*; Vol.37 (1987): 47 – 57.
- **Alexeev et al, 2000; Zhang et al, 2002; Kolhe et Kannan, 2003; Caner et al, 1998**), glycerol (Butler et al, 1996).
- **Alexeev, V.L.**; Kelberg, E.A.; Evmenenko, G.A. 2000. Improvement of mechanical properties of chitosan films by the addition of poly(ethylene oxide). *Polym. Engineer. Sci.* 40, 1211-1215.
- **Amiali Malek**; Caractérisation des films de chitosane par la perméabilité à la vapeur d'eau et aux gaz (CO₂, O₂); Thèse de doctorat; Université Laval; Avril 1999.
- **Appendini, P.**, and J. Hotchkiss. 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.*, 3, 113-126.
- **Arvanitoyannis I.**, Biliaderis C.G. (1998). Physical properties of polyolplasticized edible blends made from sodium caseinate and soluble starch blends. *Food Chem.*, 62(3), 333-342.
- **Arvanitoyannis I.**, Biliaderis C.G. (1999). Physical properties of polyolplasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. *Carbohydr. Polym.*, 38, 47-58.
- **Arvanitoyannis, I.**, I. Kolokuris, A. Nakayama, N. Yamamoto and S. Aiba (1997) Physico-chemical studies of chitosan-poly(vinyl alcohol) blends plasticized with sorbitol and sucrose. *Carbohydr. Polym.*, 34, 9-19.
- **Baldwin E.A., Nisperos-Carriedo M.O., and Baker R.A.**; Use of edible coating to preserve quality of lightly processed products; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; Vol.35, N°6 (1995): 509 – 524.
- **Barron C.**, Varoquaux P., Guilbert S., Gouble B. (2000). Modified atmosphere packaging of cultivated mushroom (*Agaricus Bisporus L.*) with hydrophilic films. *J. Food Sci.*
- **Butler, B.L.**, P.J. Vergano, R.F. Bunn, and J.L. Wiles. 1996. Mechanical and Barrier Properties of Edible Chitosan Films as Affected by Composition and Storage. *J. Food Sci.*, 61, 953-955.
- **Callegarin F.**, Quezada-Gallo J.A., Debeaufort F., Voilley A. (1997). Lipids and biopackaging. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74(10), 1183-1192.
- **Caner, C.**, P.J. Vergano and J.L. Wiles. 1998. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. *J. Food Sci.*, 63, 1049-1053.

- **Caner, C., P.J. Vergano and J.L. Wiles.** 1998. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. *J. Food Sci.*, 63, 1049-1053.
- **Chen, R.H. and H. Hwa.** 1996. Effects of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydr. Polym.*, 29, 353-358.
- **Chen, R.H. and H. Hwa.** 1996. Effects of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydr. Polym.*, 29, 353-358.
- **Daniels, C.A.** 1989. *Polymers: Structure and Properties*; Technomic: Lancaster, Pennsylvania, p.21-27.
- **Debeaufort F.** (1994). Etude des Transferts de Matière au Travers de Films d'emballages – Perméation de l'eau et de substances d'arôme en relation avec les propriétés physicochimiques de films comestibles. Thèse de doctorat, ENSBANA, Université de Bourgogne, France.
- **Despond, S., E. Espuche, and A. Domard.** 2001. Water sorption and permeation in chitosan films: Relation between gas permeability and relative humidity. *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.*, 39, 3114-3127.
- **El Ghaouth A., Arul J., Grenier J., and Asselin A.;** Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits; *Phytopathology*; Vol.82, N°4 (1992a): 398 – 402.
- **El Ghaouth A., Arul J., Ponnampalam R., and Casteigne F.;** Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes; *Horticulture Science*; Vol.27, N°9 (1992b): 1016 – 1018.
- **El Ghaouth A., Arul J., Ponnampalam R.;** Coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits; *J. Food. Proc. Pres.*; Vol.15 (1991): 359 -368.
- **El Ghaouth, A., J. Arul, A. Asselin, and N. Benhamou.** 1992. Antifungal activity of chitosane on two post-harvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathol.* 82, 398-402.
- **Fishman M.L., Coffin D.R., Konstance R.P., Onwulata C.I.** (2000) Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol. *Carbohydr. Polym.*, 41, 317-325.
- **Fogarty D.;** No longer a raw deal; *Food. Flavor. Ingrid. Proc. Pack.*; Vol.10, N°7 (1988): 25-32.
- **Glicksman M.;** *Food hydrocolloids*; Boca Raton; F L: CRC Press. Inc.; Vol.1 (1982):86 – 90.
- **Gontard, N.** 2000. *Les Emballages Actifs*. Tec et Doc, Lavoisier, Paris.
- **Guilbert S., Gontard N.** (1992). Le concept de l'emballage comestible. AGORAL, 5ème Rencontres Technologiques et Scientifiques des industries Alimentaires, Pont à Mousson, France, 166-191.

- **Guilbert, S., Cuq, B. (1998).** Les Films et Enrobages Comestibles. In : L'emballage des denrées alimentaires de grande consommation ; Multon J.L., Bureau G. (Eds.), Technique & Documentation, Lavoisier, Paris, 472-530.
- **Helander, I.M., E.-L. Nurmiaho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, and S. Roller. 2001.** Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microb.*, 71, 235-244.
- **Hoagland P. D. and Parris N.;** Chitosan / Pectin laminated films; *J. Agric. Food. Chem.*; Vol.44 (1996): 162 – 167.
- **Hyun Jin Park;** Development of advanced edible coatings for fruits; *Trends in Food Science & Technology*; Vol.10 (1999): 254 – 260.
- **Kam, H.-M, E. Khor, and L.-Y. Lim. 1999.** Storage of Partially Deacetylated Chitosan Films. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)*, 48, 881–888.
- **Kamonwan Cucheep, H. Gemma, Sirichai Kanlayanarat;** Effects of acid-soluble chitosan on quality of harvested strawberry; The 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium; Bangkok; Thailand; March 13 – 15 (2002): 495 – 499.
- **Kamper S.L., Fennema O. (1985).** Use of an edible film to maintain water vapor gradients in food. *J. Food Sci.*, 50, 382-384.
- **Kamper, S.L. and O. Fennema. 1984.** Water vapor permeability of an edible, fatty acid, bilayer film. *J. Food Sci.*, 49, 1478-1485.
- **Kanig J.L., Goodman H.;** Evaluation procedures for film-forming materials used in pharmaceutical applications; *J. Pharm. Sci.*; Vol.51 (1962): 77 – 83.
- **Khattiya Salamat, Chalerm Chai Wongs-aree, Sirichai Kanlayanarat;** Effects of chitosan coating on quality of Mandarin under low temperature storage; The 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium; Bangkok; Thailand; March 13 – 15 (2002): 512 – 516.
- **Kittur, F.S., Kumar, K.R. and Tharanathan, R.N. (1998)** Functional Packaging Properties of Chitosan Films. *Z. Lebensm. Unters Forsch. A.*, 206, 44-47.
- **Kolhe, P., and R. M. Kannan. 2003.** Improvement in ductility of chitosan through blending and copolymerization with PEG: FTIR investigation of molecular interactions. *Biomacromol.*, 4, 173-180.
- **Krochta J.M. (1992).** Control of mass transfer in food with edible coatings and films. In : *Advances in Food Engineerin"*, Singh R.P., Wirakartakusumah M.A., (Eds), CRC Press, Boca Raton, 517.
- **Krumel K. L., Lindsay T. A.;** Non ionic cellulose ethers; *Food Tech.*; Vol.30, N°4 (1976):

36 – 43.

- **Labuza T. P., and Contreras-Medellin;** Prediction of moisture protection requirements for foods; *Cereal Foods World.*; Vol.26 (1981): 335 – 343.
- **Lazarus C.R., West R.L., Oblinger J.L., Palmer A.Z.;** Evaluation of a calcium alginate coating and protective plastic wrapping for the control of lamb carcass shrinkage; *J. Food Sci.*; Vol.14 (1976): 639 – 641.
- **Liu, L., S. Li, H. Garreau, and M. Vert.** 2000. Selective enzymatic degradations of poly(L-lactide) and poly(ϵ -caprolactone) blend films. *Biomacromol.*, 1, 350-359.
- **Lodovico di Gioia and Stéphane Guilbert.** Amphiphilic plasticizers. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1254-1261 (1999).
- **Lundin L.;** Binary polysaccharide system and phase separation mechanism; A literature review; N°591 (1993): Swedish Institute for Food and Biotechnology.
- **Maynard, F.** 1999. Edible film and method. European Patent 0935921.
- **Navarat Pattanasiri, Sirichai Kanlayanarat, Khin Lay Kyu;** Effects of chitosan coatings on storage life of mango; The 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium; Bangkok; Thailand; March 13 – 15 (2002): 505 – 511.
- **Nelson K. L., Fennema O. R.;** Methylcellulose films to prevent lipid migration in confectionary products; *J. Food Sci.*; Vol.56, N°2 (1991): 504 – 509.
- **Nisperos M. O., and Baldwin E.;** Edible coating for whole and minimally processed fruits and vegetables; *Food Australia*; Vol.48, N°1 (1996): 27 – 31.
- **Nisperos-Carriedo M. O.;** Edible coating and films based on polysaccharides; Technomic Publishing Company; (1994): 305 – 335.
- **Pannisi E.;** Sealed in edible film; *Sci. News*; Vol.141 (1992): 12 – 14.
- **Parris N., Coffin, D.R.,** (1997). Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic zein films. *J. Agric. Food Chem.*, 45(5), 1596-1599.
- **Ravi Kumar, M.N.V.** 2000. A review of chitin and chitosan applications. *React. Function. Polym.*, 46, 1-27.
- **Roussel, E.** 2005. "Emballages Actifs: Quelles sont les utilisations possibles " Proceeding des Journées de l'Emballage, à Reims, le 21-22 juin 2005.
- **Sarasam, A and S. V. Madihally.** 2005. Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomater.*, 26, 5500–5508.
- **Seng, J.-M.** 1988. Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur*, 9, 40-44.

- **Shahidi, F., J.K.V. Arachi and Y.J. Jeon.** 1999. Food applications of chitin and chitosans. Trends Food Sci. Tech., 10, 37-51.
- **Sirisha Sonti;** Consumer perception and application of edible coating on fresh-cut fruits and vegetables; Thesis; Louisiana State University; May 2003.
- **Srinivasa, P.C., M.N. Ramesh, K.R. Kumar, and R.N. Tharanathan.** 2004. Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. J. Food Eng. 63, 79-85.
- **Sudharshan, N.R., D.G. Hoover and D. Knorr.** 1992. Antimicrobial action of chitosan. Food Biotechnol., 6, 257-272.
- **Suppakul, P., J. Miltz, K. Sonneveld, & S.W. Bigger.** 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. J. Food Sci., 68, 408–420.
- **Tharanathan, R.N.** 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. Trends Food Sci. Tech., 14, 71-78.
- **Torres J. A. and Karel M.;** Microbial stabilisation of intermediate moisture food surface; J. Food. Proc. Vol.9 (1985): 107 – 118.
- **Vermeiren, L., F. Devlieghere, M. van Beest, N. de Kruijf, and J. Debevere.** 1999. Developments in the active packaging of foods. Trends Food Sci. Tech., 10, 77-86.
- **Verrier, P.** 2005. Plastifiants. Technique de l'Ingenieurs, A 3 231 p.11.
- **Were L., Hettiarachchy N.S., Coleman M.** (1999). Properties of cysteine-added soy proteinwheat gluten films. J. Food Sci., 64(3), 514-518.
- **Wiles, J.L., P.J. Vergano, F.H. Bunn, and R.F. Testin.** 2000. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. J. Food Sci., 65, 1175-1179.
- **Wong D.S., Camirand W.M., Pavlath A.E.** (1994). Development of edible coatings for minimally processed fruits and vegetables. In : Edible Coatings and Films to Improve Food Quality. Krochta J.M., Baldwin E.A., Nisperos-Carriedo M.O. (Eds.), Technomic Publishing Company, Lancaster, 65-88.
- **Zhang, M.; Li, X.H.; Gong, Y.D.; Zhao, N.M.; Zhang, X.F.** 2002. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. Biomat., 23, 2641-2648.
- **Jen-Kuo Yang, Ing-Lung Shih, Yew-Min Tzeng, San-Lang Wang;** Production and purification of protease from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes; Enzyme and Microbial Technology; N°26 (2000): 406 – 413.
- **Terbojevich M. and R.A.A. Muzzarelli;** Chitosan. In G. Phillips and P. Williams, Handbook of Hydrocolloids; Woodhead, Cambridge, UK (2000): 367 – 378.

- **Kurita Keisuke**; Controlled functionalization of the polysaccharide chitin; Prog. Polym. Sci.; Vol.26 (2001): 1921 – 1971.
- **Kerkut G.A., Gilbert L.I.**; Comprehensive insect physiology; Biochemistry and Pharmacology; Ed. Pergamon., Vol.3 (1985): 78 – 85.
- **Blackwell J.**; Structure of alpha-chitin; J. Mol. Biol.; Vol.120 (1978):167 -181.
- **Jen-Kuo Yang, Ing-Lung Shih, Yew-Min Tzeng, San-Lang Wang**; Production and purification of protease from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes; Enzyme and Microbial Technology; N°26 (2000): 406 – 413.
- **Shepherd R., Reader S., Falshaw A.**; Chitosan functional properties; Glycoconjugate Journal; N°14 (1997): 535 – 542.
- **Imai Tomoya, Watanabe Takeshi, Yui Toshifumi, Sugiyama Junji**; The directionality of chitin biosynthesis: arevisited; Biochem. J.; N°374 (2003): 755 – 760.
- **Hans Merzendorfer and Lars Zimoch**; Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthase and chitinases; Journal of Experimental Biology; N°206 (2003): 4393 – 4412.
- **Terbojevich M. and Cosani A.**; Molecular weight determination of chitin and chitosan; in R.A.A. Muzzarelli and M.G.Peters (eds) chitin handbook; Atec; Grottammare; Italy (1997) : 87 – 101.
- **Davies L.L., and Bartnicki-Garcia S.**; Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*; Biochemistry; Vol.23, N°6 (1984): 1065 – 1073.
- **Seng J.M.**; Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie; Biofutur (1988) : 40 – 44.
- **Fernandez M., Fox P.F.**; Fractionation of cheese nitrogen using chitosan; Food Chemistry; Vol.58, N°4 (1997): 319 – 322.
- **Roberts G.A.**; Chitin chemistry; Macmillan Press Ltd; London, (1992).
- **Fernandez-Kim S. O.**; Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols, Thesis, Louisiana State University (2004).
- **Esquenet C.**; Propriétés structurales et dynamiques des solutions de poly électrolytes rigides et semi-rigides et de polysaccharides associatifs; Thèse de doctorat; Université Joseph Fourier; Grenoble I (2003).
- **David L., Moutembault A., Vizio N., Crèpet A.**; Ordering in hydrophobic bioelectrolyte chitosan solutions; 5th International Conference on Polymer-Solvent; Complexes &

Intercolates; 11 - 13 July 2004; Lorient; France.

- **Nellie Gagné**; Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid; Master of Science; Mc Gill University ; Montreal (1993).
- **Baxter A., Dillon M., Taylor K.D.A., Roberts G.A.F.**; Improved method for IR determination of the degree of N-acetylation of chitosan; Int. J. Biol. Macromol.; Vol.14 (1992):166 – 169.
- **Lavertu M., Serreqi A.N. , Berrada M. , Rodrigues A. , Wang D., Buschmann M.D.**; A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; Vol.32 (2003): 1149 – 1158.
- **Montserrat Ruiz Planas**; Development of techniques based on natural polymers for the recovery of precious metals; Thesis; Universitat Polyècnica de Catalunya; Abril 2002.
- **Tanveer Ahmad Khan, Kok Khiang Peh, Hung Seng Ch'ng**; Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods; J. Pharmaceut. Sci.; Vol.5, N°3 (2002): 205 – 212.
- **Wu A.C.M.**; Determination of molecular-weight distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography; Methods Enzymol.; Vol.161(1988):447 – 452.
- **Li Q. , Dunn E.T., Grandmaison E.W. and Goosen M.F.A.**; Applications and properties of chitosan; J. Bioactive and Compatible Polym.; Vol.7 (1992): 370 – 397.
- **Chen R.H., Jeun Hwang Lin and Toshiro Tsaih**; Effect of urea on the conformation and chain flexibility of chitosan molecules with various degree of deacetylation; Journal of Marine Science and Technology; Vol.2, N°1 (1994): 1 – 7.
- **Hwang K. T. and Park H. J.**; Controlled Molecular weight and degree of deacetylation of chitosan crabs (*Chionoecetes rouge Opilio*) University of Kore; (2000): 136 – 701.
- **Okamoto Y., Kawakami K., Miyatake K., Morimoto M., Shigemasa Y., Minami S.**; Analgesic effects of chitin and chitosan; Carbohydrate Polymers; N°49 (2002): 249 – 252.
- **Chen R. H., Chang J. R., and Shyur J. S.**; Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan; Carbohydr. Res.; N°299 (1997): 287 – 294.
- **Roberts G.A.F., Domszy J.G.**; Determination of the viscometric constants for chitosan; Int. J. Biol. Macromol.; Vol.4 (1982): 374 – 377.
- **Cho Y-W, Cho Y-N, Chung S-H, Hoo G., Ko S-W**; Water soluble chitin as wound healing accelerator; Biomaterials; N°20 (1999): 2139 – 2145.

- **Muzzarelli C., Francescangeli O., Tosi G., Muzzarelli R.A.A.;** Susceptibility of dibutryl chitin and regenerated chitin fibres to deacylation and depolymerization by lipases; Carbohydrate Polymers; N°56 (2004): 137 – 146.
- **Sashiwa H., Shigemasa Y.;** Chemical modification of chitin and chitosan 2 : preparation and water property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins; Carbohydrate Polymers; N°39 (1999): 127 – 138.
- **No H.K., Lee M.Y.;** Isolation of chitin from crab shell waste; Journal Korean Soc. Food Nutrition; Vol.24, N°1 (1995): 105 – 113.
- **Wai Yan Tan E., Ru Lee V.;** Enzymatic hydrolysis of prawn shell waste for the purification of chitin; Department of Chemical Engineering; Lough borough University. (2002).
- **Majeti N. V., Ravi Kumar;** A review of chitin and chitosan applications; Reactive and Functional Polymers; N°46 (2000): 1 – 27.
- **Miranda S.P., Garcia, O; Lara. Sagarhon.V, Cardenas.G,** Water vapor permeability and mechanical properties of chitosane composite films. J.Chem.Soc ; 49 (2004) p173-178.
- **Kiefer K.** (1999): [www.Ifrance.com / Kiefer / ES.htm](http://www.Ifrance.com/Kiefer/ES.htm).
- **Currey J. D., Nash A.;** Calcified cuticle in the stomatopod smashing limb; J.Mater. Sci.; Vol.17 (1982): 1939 – 1944.
- **Peniston Q.P., Johnson E.L.;** Process for demineralisation of crustaceans shells; United States Patent; (1978); 4,066,735.
- **No H.K., Meyers S.P., and Lee K.S.;** Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste; Journal of Agricultural and Food Chemistry; Vol.37, N°3 (1989): 575 – 579.
- **Malgorzata Jaworska, Kensuke Sakurai, Pierre Gaudon and Eric Guibal;** Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties; Polym. Int.; Vol.52 (2003): 198 – 205.
- **Udomchai Chinadit, Piyabut Wanichopngpan, Ng Chuen How and Willem F. Stevens;** Chemical deacetylation of shrimp chitin in different conditions; The 3rd Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium, Keelung, Taiwan, R.O.C, September 8 – 10 (1998): 165 – 168.
- **Payet L., Ponton A., Agnely F., Colinart P., Grossiord J.L.;** Caractérisation rhéologique de la gélification d'alginate et de chitosane: effet de la température; Rhéologie; N°2 (2002): 46 – 51.
- **Felse P.A., Panda T.;** Studies on applications of chitin and its derivatives; Bioprocess Engineering; N°20 (1999): 505 – 512.
- **Seng J.M.;** Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie; Biofutur

(1988) : 40 – 44.

- **Majeti N. V.**, Ravi Kumar; A review of chitin and chitosan applications; Reactive and Functional Polymers; N°46 (2000): 1 – 27.
- **Annadurai G., Chellapandian M., Krishnan M.R.V.**; Adsorption of reactive dye on chitin. Environmental Monitoring and Assessment; Vol.59 (1999): 111 – 119.
- **Guizzardi M., Marta M.**; The postharvest: emerging technologies for the control of fungal diseases; Phytoparasitica; Vol.26, N°1 (1998): 59 – 66.
- **Bitteli Marco, Flury Markus, Campbell Gaylon S., Nichols Everett J.**; Reduction of transpiration through foliar application of chitosan; Agricultural and Forest Meteorology; Vol.107 (2001):167 – 175.
- **Roller S., Covill N.**; The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice; International Journal of Food Microbiology; Vol.47 (1999): 67 – 77.
- **Jeon Y-J, Shahidi F., Kim S-K**; Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods; Food Rev. Int.; Vol.16 (2000): 159 – 176.
- **Benesh J., Tengvall P.**; Blood protein adsorption onto chitosan; Biomaterials; Vol.23 (2002) : 2561 – 2568.
- **Olabarrieta, I., D. Forsström, U.W. Gedde and M.S. Hedenqvist** (2001) Transport properties of chitosan and whey blended with poly(ϵ -caprolactone) assessed by standard permeability measurements and microcalorimetry. Polym., 42, 4401-4408.
- **Hallary J.L., Monnerie L.** 1986. Techniques physico-chimiques d'étude des mélanges de polymères, dans " Initiation à la chimie et à la physico-chimie macromoléculaires – Mélanges de polymères". Eds GFP, Strasbourg (France).
- **Ashley, R. J.** 1985. Permeability and plastic packaging in : Polymer Permeability, J.Comyn .(Ed), Elsevier Applied Science Publishers, New York, pp. 267-307.
- **Bryan, D. S.** US Patent, 3,707,383.26 décembre, 1972.
- **Fogarty, D.** 1988. No longer a raw Deal. Food, Flavor, Ingred. Proc. Pack., 10 (7) :25.
- **Zhang M., Haga A., Sekiguchi H., Hirano S.**; Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia; International Journal of Biological Macromolecules; N°27 (2000): 99 – 105.
- **Allan G.G., Fox G.R., and Crosby G.D.**; Fibre-water interaction paper; Making Trans. Symp.; Vol.2 (1998): 765 – 778.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم المنتجات الفرعية للقطاع البحري (القوقعة الخارجية لحيوان السرطان)، و ذلك بظبط عملية إستخلاص الكيتوزان من الكيتين . إنَّ الشروط المظبوطة هي : إستعمال 100مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيزه 50% لكل 1 غرام من مسحوق الكيتين لمدة 30 دقيقة تحت درجة حرارة تتراوح ما بين 100م° و 130م°. بعد ذلك قُمنَا بصنع أغشية من كيتوزان صافي و آخر أُظيف له مواد لتحسين المرونة (غليسيرول ، بولي إيثيلان غليكول و توين 80)، والتي سُنستعمل كواقى للمواد الزراعية.

قُمنَا بعد ذلك بتجريب خاصية المرونة لكل الأغشية التي صنعناها. نلاحظ هن النتائج أن البولي إيثيلان غليكول و الغليسيرول قد حسنوا مرونة أغشية الكيتوزان مهما كان تركيزهما، أما بالنسبة للتوين 80 فلم نلاحظ أيّ تحسين من طرفه.

النتائج المحصلة بإستعمال جهاز MEB تُبيّن لنا أنه حصل تكامل بين الكيتوزان و التوين 80 م لم يحصل تكامل بين الكيتوزان و الغليسيرول و لا بين الكيتوزان و البولي إيثيلان غليكول.

كلمات المفتاح: كيتين، كيتوزان، غشاء الكيتوزان، السمك، الخاصية الميكانيكية

Résumé :

L'objectif général de se travail est de valoriser des sous produits marin (carapaces de crabes), en vue de les utiliser pour la conservation des produits agro alimentaire.

Nous avons préparé le chitosane et les conditions optimales relative a la désacétylation de la chitine sont : 100 ml de NaOH à 50% pour 1g de chitine pendant 30 min entre 100°C-130°C.

Nous avons par la suite fabriqué des membranes à base de chitosane pur et plastifié avec le Glycérol, le Polyéthylène glycol et le Tweene80 à différentes concentrations.

Des tests de traction ont été évalué pour ces films, d'après les résultats obtenus on remarque que le polyéthylène glycol et le glycérol ont considérablement amélioré la ductilité des films de chitosane quelque soit la quantité du plastifiant sauf pout le Tween 80 qui à clairement montré un phénomène d'anti plastification.

Les résultats obtenus par le MEB montrent qu'il y'a une bonne complexation entre le chitosane et le tween 80 mais pas avec le chitosane/glycérol et le chitosane/PEG.

Mots clés :chitine , chitosane ,films de chitosane ,épaisseur, propriétés mécanique

Abstract :

The purpose of this study is to valorise the fish solid waste (crab's shells) in order to use them as packaging for food processing industry.

The conversion of chitin to chitosane was performed with 50% NaOH for 30 min with a solid to solvent ratio of 1g : 100 ml. Then, we prepare the chitosane films, based on pur chitosan and plasticised chitosane with different concentrations of Polyethylen Glyco, Glycerol and Twenn 80. The traction tests were evaluated for the films. The results shows that the chitosane films with Polyethylen Glyco and Glycerol have an best elongation even the concentration of the plasticizer, while the chitosane films with Tween 80 shows the lowest percentage of elongation.

The results obtained by MEB shows a good complexation with chitosane and tween 80, but not with chitosane and Glycerol, neither for chitosane and polyethylen glycol.

Key words chitine,;chitosane, chitosan films,thickness,mechanical properties.