

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT

THEME

Hydrolyse de la chitine protéinique et sa caractérisation

Présenté par : MAHMOUDI
MISSOUM

Hayat
Fahima

Soutenu publiquement, le 27 / juin / 2019, devant le Jury composé de :

HOCINE Smain	Pr	UMMTO	Présidente
KADOUCHE Slimane	MCA	UMMTO	Promoteur
CHEIKH Assira	MCB	UMMTO	Examinatrice
ALI Oumessad	MCB	UMMTO	Examinatrice

Promotion 2018/2019

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire Chimie de l'environnement de l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou.

Nous tenons tout d'abord à remercier Monsieur KADOUCHE Slimane, Maître de conférences Classe A à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour son encadrement, sa collaboration totale sans limites, sa patience, ses conseils très précieux et son aide, tout au long de ce travail.

Nous remercions les membres du jury qui ont acceptés d'examiner notre travail.

Nous souhaitons également adresser nos remerciements à tous les enseignants en chimie de l'environnement qui ont su nous transmettre leur savoir et qui ont contribué à notre réussite.

Nous remercions tout le personnel du laboratoire Chimie de l'environnement, nos camarades pour l'excellente ambiance de travail qu'ils ont créée et à toute la promotion chimie de l'environnement 2018/2019. Nous remercions aussi tous nos amis, qui de près ou de loin nous ont soutenues et encouragées tout au long de ces années.

Nos derniers remerciements, et non des moindres, sont destinés à nos parents, nos familles ainsi que toutes les personnes qui nous sont chères.

Liste des abréviations

DA : Degré d'Acétylation ;

DDA : Degré de Désacétylation (%) ;

PH : Potentiel Hydrogène ;

PM : Poids Moléculaire ;

MM : Masse macromoléculaire ;

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique ;

MALLS : Réfractométrie, microviscosimétrie, diffusion statique de la lumière multi-angle ;

HPLC : Haute Performance Liquide Chromatographie ;

η : viscosité intrinsèque (dL/g) ;

$\eta_{\text{réd}}$: Viscosité réduite ;

η_{rel} : Viscosité relative ;

η_{inh} : viscosité inhérente ;

C_i : Concentration de l'échantillon **i** (mg/L) ;

KDa : Kilo Dalton ;

DL : Dose Létale (g/kg/jour) ;

T : Température (°C) ;

T_{amb} : Température ambiante (°C) ;

$\mu\text{s/cm}$: Micro Siemens par centimètre ;

Chit PAB D30-T120 : Chitine Protéinique Avec Blanchiment Désacétylée en 30 minutes à 120°C ;

Chit DAB D30-T120 : Chitine Déprotéinique Avec Blanchiment Désacétylée en 30 minutes à 120°C ;

Chit PSB D30-T120 : Chitine Protéinique Sans Blanchiment Désacétylée en 30 minutes à 120°C ;

Chit DSB D30-T120 : Chitine Déprotéinique Sans Blanchiment Désacétylée en 30 minutes à 120°C ;

Chit PAB D7-T_{amb} : Chitine Protéinique Avec Blanchiment Désacétylée en 7 jours à température ambiante ;

Chit DAB D7-T_{amb} : Chitine Déprotéinique Avec Blanchiment Désacétylée en 7 jours à température ambiante ;

Chit PSB D7-T_{amb} : Chitine Protéinique Sans Blanchiment Désacétylée en 7 jours à température ambiante ;

Chit DSB D7-T_{amb} : Chitine Déprotéinique Sans Blanchiment Désacétylée en 7 jours à température ambiante ;

Liste des figures

Figure I.1 : Structure chimique de la chitine.....	4
Figure I.2 : Structure chimique du chitosane	5
Figure II.1 : Biomasse récupérée	15
Figure II.2 : Carapaces.....	15
Figure II .3 : Séchage des carapaces.....	15
Figure II.4 : Chitine brute	16
Figure II.5 : Montage de la désacétylation à T_{amb}	17
Figure II.6 : Montage de la désacétylation à $T_{120^{\circ}C}$	17
Figure II.7 : Tube à vessie	18
Figure III.1 : Chitine brute.....	20
Figure III.2 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine déprotéinée avec blanchiment et désacétylée à $T_{120^{\circ}C}$	21
Figure III.3 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine déprotéinée sans blanchiment et désacétylée à $T_{120^{\circ}C}$	21
Figure III.4 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine protéinique blanchie et désacétylée à $T_{120^{\circ}C}$	22
Figure III.5 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine protéinique non blanchie et désacétylée à $T_{120^{\circ}C}$	22
Figure III.6 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine déprotéinée avec blanchiment et désacétylée à T_{amb}	23
Figure III.7 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine déprotéinée sans blanchiment et désacétylée à T_{amb}	23
Figure III.8 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine protéinique blanchie et désacétylée à T_{amb}	24
Figure III.9 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine protéinique non blanchie et désacétylée à T_{amb}	24

Figure III.10 : Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine protéinique désacétylée avec blanchiment à 120 °C.....	27
Figure III.11: Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine déprotéinique désacétylée avec blanchiment à 120 °C.....	28
Figure III.12 : Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine protéinique désacétylée sans blanchiment à 120 °C	29
Figure III.13 : Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine déprotéinique désacétylée sans blanchiment à 120 °C	30
Figure III.14 : Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine protéinique désacétylée avec blanchiment à T_{amb}	31
Figure III.15: Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine déprotéinique désacétylée avec blanchiment à T_{amb}	32
Figure III.16: Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine protéinique désacétylée sans blanchiment à T_{amb}	33
Figure III.17 : Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine déprotéinique désacétylée sans blanchiment à T_{amb}	34

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire.....	10
Tableau I.2 : Applications du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique	10
Tableau I.3 : Applications du chitosane dans le domaine de la cosmétique	11
Tableau I.4 : Applications du chitosane dans le domaine de l'environnement	11
Tableau III.1 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine protéinique blanchie et désacétylée à T 120°C	36
Tableau III.2 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine déprotéinique blanchie et désacétylée à T120°C	36
Tableau III.3 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine protéinique non blanchie à T120°C	37
Tableau III.4 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine protéinique non blanchie et désacétylée à T _{amb}	37
Tableau III.5 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine protéinique blanchie et désacétylée à T _{amb}	38
Tableau III.6 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine déprotéinique blanchie et désacétylée à T _{amb}	38
Tableau III.7 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine protéinique non blanchie et désacétylée à T _{amb}	39
Tableau III.8 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine déprotéinique non blanchie et désacétylée à T _{amb}	39

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Etude bibliographique	3
I.1 Introduction.....	3
I.2 Généralités sur la chitine et le chitosane.....	3
I.2.1 Définitions	3
I.2.2 Structure chimique.....	4
I.2.3 Origine.....	5
I.3 Procédé d'obtention du chitosane [Onsoyen et Skaugrud, 1990].....	6
I.3.1 Valorisation de la chitine brute.....	6
I.4 Propriétés physico-chimiques	7
I.4.1 Degré de désacétylation (DDA)	7
I.4.2 Solubilité.....	7
I.4.3 Masse moléculaire	8
I.4.4 Viscosité	8
I.4.5 Cristallinité	8
I.5 Autres propriétés physico-chimiques.....	8
I.5.1 Flexibilité.....	8
I.5.2 Dégradabilité	9
I.5.3 Toxicité systémique.....	9
I.6 Principales applications du chitosane	10
I.6.1 Domaine agroalimentaire	10
I.6.2 Domaines biomédical et pharmaceutique.....	10
I.6.3 Domaine cosmétique	11
I.6.4 Traitement des eaux.....	11
I.7 Conclusion	12
Chapitre II : Extraction et caractérisation.....	14
II.1 Appareillage.....	14
II.2 Réactifs	14
II.3 Protocole d'extraction et de désacétylation	15
II.3.1 Méthodologie d'extraction de la chitine.....	15
II.3.2 Méthodologie de désacétylation de la chitine	17
II.4 Protocole de caractérisation du chitosane.....	18

II.4.1	Test de solubilité.....	18
II.4.2	Le degré de désacétylation (DDA).....	18
II.4.3	Viscosité et poids moléculaire.....	18
Chapitre III : Résultats et discussion.....		20
III.1	Obtention de la chitine et du chitosane	20
III.2	Caractérisations (Résultats et discussion)	20
III.2.1	Détermination du degré de désacétylation (DDA).....	20
III.2.2	Le poids moléculaire	35
III.3	Conclusion.....	41
Conclusion Générale		42
Références		44

Introduction Générale

Introduction générale

La pollution causée par l'ampleur de la démographie et l'industrie a atteint un seuil critique où le cycle naturel de dégradation des déchets ne répond plus. Ce n'est que récemment que la prise de conscience sur la préservation de l'environnement a relancé le débat autour de l'exigence d'utilisation des matières premières renouvelables plutôt que non renouvelables si les moyens techniques et financiers le permettent.

Concernant les déchets marins objet de notre recherche, la chitine et le chitosane (collectivement appelés substances chitineuses) sont deux exemples de biopolymères de ressources marines renouvelables qui ont suscité l'intérêt pour le développement durable. Car l'une des voies d'obtention de ces produits utiles et commercialisables est la valorisation des déchets de crustacés.

Le travail proposé est l'extraction de la chitine protéinique à partir d'une biomasse marine collectée au niveau du port d'Azeffoune, de l'hydrolyser et ensuite caractériser le chitosane obtenu. L'objectif à atteindre est d'améliorer le Protocole expérimentale en essayant de minimiser les étapes conventionnelles.

Ce mémoire est décomposé en trois chapitres. Nous récapitulons dans cette introduction les grandes lignes du plan qui sera détaillé par la suite.

Dans le premier chapitre, nous réaliserons une étude bibliographique où sera présentées essentiellement des définitions et notations de base concernant la chitine et le chitosane.

Dans le deuxième chapitre, nous décrirons d'une manière détaillée les méthodes expérimentales d'extraction et de caractérisation ainsi que le matériel utilisé.

Dans le troisième chapitre, nous allons présenter, comparer et discuter les différents résultats obtenus.

Enfin pour conclure ce travail nous donnerons une synthèse des résultats obtenus et quelques perspectives envisagées pour les travaux futurs.

Chapitre I : Etude bibliographique

*Chapitre I : Etude bibliographique***I.1 Introduction**

Les biopolymères, qui sont des polymères produits par les organismes vivants, sont d'origine naturelle. Ils sont formés par la polymérisation de molécules plus simples ou monomères reliés entre elles par des liaisons dites « covalentes ». Ces biopolymères sont des macromolécules biologiques biodégradables renouvelables.

Parmi les biopolymères, on trouve la chitine et le chitosane. Découverts au XVIII^e siècle, ils seront délaissés durant plusieurs décennies. C'est dans les années 1970 que des problèmes de pollution viendront relancer l'intérêt pour ces biopolymères. [Muzzarelli 1977 ; Robert 1992] En effet, de nouvelles expériences sont entreprises suite au rejet massif de carapaces dans les régions industrielles utilisant les crustacés. Les Etats-Unis et le Japon se lancent ainsi dans des études sur la valorisation de la chitine.

Grâce à ces études, de nouveaux dérivés de chitine et de chitosane sont découverts. La définition des propriétés et des caractéristiques de ces deux polymères est ainsi établie. Leurs applications se multiplient et concernent plusieurs domaines.

Polymères d'origine naturelle, le chitosane et la chitine sont tous deux issus du milieu marin. De par leurs rôles ainsi que leur abondance, on peut dire qu'ils sont au règne animal ce que la cellulose est au règne végétal. Dans ce chapitre, nous aborderons ainsi les généralités sur la chitine et le chitosane, en prenant soin d'insister sur leurs diverses propriétés physico-chimiques et nous verrons quels sont leurs principaux domaines d'application.

I.2 Généralités sur la chitine et le chitosane***I.2.1 Définitions******I.2.1.1 Chitine***

La chitine est un polymère de source marine. Découvert en 1811 par le chimiste français [Henrit Braconnot] qui l'a isolée à partir d'un champignon et l'appela « fungina ».

En 1823, en étudiant la cuticule de coléoptères, [August Odier] isolait ce même polymère et le nomma « chitine » à partir du grec « kitos » qui veut dire tunique (enveloppe).

1.2.1.2 Chitosane

Le chitosane a été découvert en 1859 par **[Rouget]** qui, en traitant la chitine avec de la potasse concentrée à température élevée, observa un produit soluble dans une solution aqueuse acide. Ainsi donc, le chitosane dont le nom a été proposé par **[Hoppe Seyler]** en 1894 est une chitine N-désacétylée.

1.2.2 Structure chimique

La structure des biopolymères (chitine et chitosane) n'a été identifiée que 50 ans après leur découverte, à travers la cristallographie et la spectroscopie infrarouge.

1.2.2.1 Chitine

La chitine est un polysaccharide, caractérisée par une composition similaire à celle de la cellulose sauf que sa structure est un enchainement d'unités monomères de glucose aminé (N-acétyl- β -D-glucosamine) reliées par une liaison glycosidique (1-4) **[Black welli 1973 et Robert 1992]**. **[Figure I.1]**

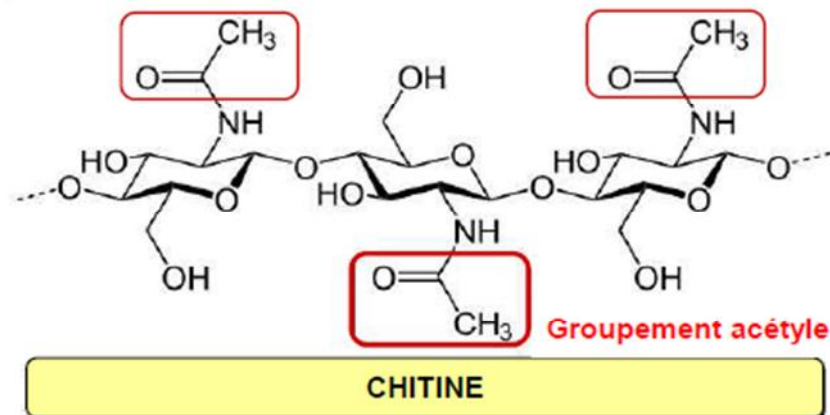


Figure I.1 : Structure chimique de la chitine

1.2.2.2 Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire formé d'une distribution statistique de deux unités monomériques (D-glucosamine) et (N-acétyl-D-glucosamine) liées en β (1-4) le long de la chaîne macromoléculaire, dont la proportion détermine le degré d'acétylation (DA). **[Figure I.2]**

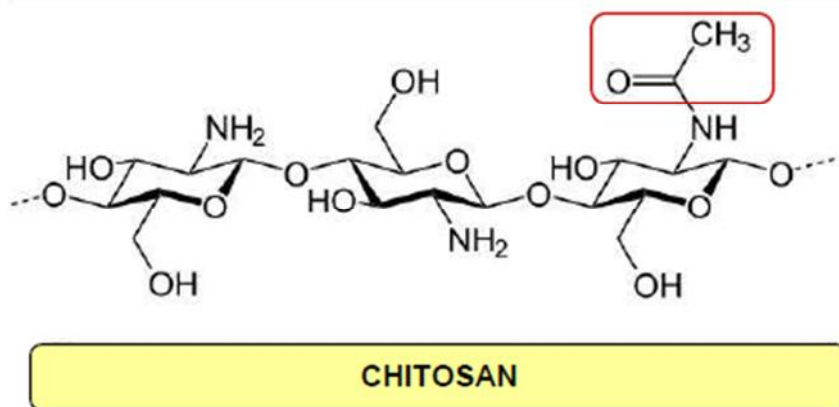


Figure I.2 : Structure chimique du chitosane

La structure chimique du chitosane est donc similaire à celle de la cellulose, la différence réside dans la substitution du groupement hydroxyle en position C-2 par la fonction amine. De même il ne diffère de la chitine que par les groupes amines ($-\text{NH}_2$) chargés positivement. Ces derniers lui confèrent une nature cationique, intéressante dans un milieu acide. Ils sont également responsables de son activité floculante. Le chitosane comporte plus d'un centre réactif, grâce à ses fonctions alcool et amine.

1.2.3 Origine

La liaison spécifique β (1 \rightarrow 4) justifie l'extrême robustesse de la structure de la chitine qui entre dans la composition de la cuticule, ou exosquelette, des arthropodes (crustacés, insectes, arachnides) ainsi que dans l'endosquelette des céphalopodes (calamars, seiches) [Blac kwell 1973 et Muzzarelli 1985]. On trouve aussi sa présence dans les parois cellulaires de la plupart des champignons ; de certaines levures ; certaines algues et même dans des fossiles de l'Eocène (il y a 25 millions d'années).

Synthétisée par des glandes spéciales (glandes à chitines) de nombreuses espèces animales ou fongiques, elle contribue au contrôle de la pression osmotique ainsi qu'au maintien de la rigidité de la cellule.

Le chitosane, quant à lui, est très peu répandu dans la nature [Desbrières, 2002]. Il n'y pas de source primaire exploitable car il n'est présent que dans les parois cellulaires d'une catégorie particulière de champignons (zygomycètes) [Davies et Bartnicki,1984], de

bactéries et de levures ou encore chez certains insectes (paroi abdominale des reines termites) [Seng, 1988]. La principale source du chitosane provient de la désacétylation de la chitine obtenue à partir de crustacés.

I.3 Procédé d'obtention du chitosane [Onsoyen et Skaugrud, 1990]

Les déchets de l'industrie de crustacés constituent une source importante de chitine et de chitosane. C'est afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes que de nombreuses méthodes ont été développées.

I.3.1 Valorisation de la chitine brute

Les méthodes d'extraction de la chitine reposent essentiellement sur la préparation des carapaces dès leur récupération. Il s'agit de les laver, les sécher puis de les broyer le plus finement possible afin d'obtenir des particules dont la taille est de l'ordre du millimètre. Les réactions ultérieures seront d'autant plus complètes que les carapaces seront finement broyées. [Aljawish, 2013]

La masse ainsi obtenue et appelée chitine brute. Puis, pour obtenir du chitosane, cette masse doit être utilisée en respectant les étapes suivantes :

o Déminéralisation

Les matières minérales, plus précisément les carbonates de calcium, sont éliminés par hydrolyse acide (solution d'acide chlorhydrique 2N) à température ambiante selon la réaction suivante :



o Déprotéinisation

Cette procédure consiste à extraire les protéines associées à la chitine par hydrolyse basique (solution d'hydroxyde de sodium 1N) à 80°C sous agitation pendant trois heures.

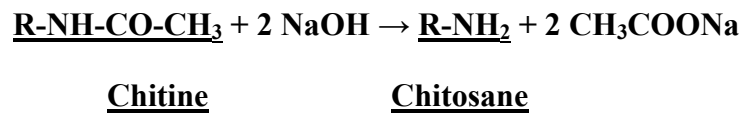
o Blanchiment

Après hydrolyse acide et basique il peut subsister une coloration due à des pigments résiduels [Rinaudo, 2006]. Ainsi, une étape de décoloration est effectuée par un agent oxydant (KMnO₄, NaOCl ou H₂O₂).

o Désacétylation de la chitine

On utilise la chitine extraite comme matière première en vue de l'obtention du chitosane. La désacétylation consiste à hydrolyser les groupements amines de la chitine [No et Meyers, 1995]. Le produit est introduit dans un réacteur avec une solution de NaOH à 35% en poids et chauffé à 120°C jusqu'à atteindre plus de 70% de désacétylation.

La réaction de désacétylation est la suivante :



I.4 Propriétés physico-chimiques

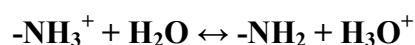
I.4.1 Degré de désacétylation (DDA)

Le DDA représente la proportion d'unités amine-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités glycosidiques [Zhang *et al*, 2005]. C'est le traitement très alcalin de la chitine qui amène à une désacétylation partielle. Ce qui rend le DDA du chitosane très important puisqu'il influe directement sur les propriétés des chaînes macromoléculaires des polymères et leur comportement en solution [Hudson et Jenkins, 2003]. Cela signifie que les propriétés physico-chimiques du chitosane sont fortement liées aux caractères polysaccharidiques des polymères.

I.4.2 Solubilité

Avec une solubilité dépendante de son DDA, le chitosane est soluble sous sa forme saline dans des milieux d'acide dilué (pH inférieur à 6-6,5). Contrairement à la chitine native qui est insoluble dans l'eau et dans la quasi-totalité des solvants organiques. [Rinaudo *et al*, 1999].

Pour préparer une solution de chitosane, l'acide le plus utilisé est l'acide acétique dilué à 1%. Sa solubilisation est générée par la protonation de ses fonctions amines selon l'équilibre suivant :



1.4.3 Masse moléculaire

Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse moléculaire (MM) de l'ordre de 100-500 kDa.

La détermination de la MM peut se faire par des mesures viscosimétriques, par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à différentes techniques de détection (MALLS) (réfractométrie, microviscosimétrie, diffusion statique de la lumière multi-angle) [Nystrometal., 1999].

Les masses du chitosane dépendent, en fait, du type d'application désirée.

1.4.4 Viscosité

La viscosité est caractéristique du chitosane seulement car la chitine est insoluble. La viscosité des solutions de chitosane est sous la dépendance de la longueur de chaîne polymère mais également du taux de désacétylation et de la nature des solvants (pH, force ionique, type et nature éventuel du mixte hydro organique, gaz dissous, etc.) [Shahidi, Abuzaytoun, 2005].

1.4.5 Cristallinité

La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles [Rinaudo, 2006].

La cristallinité est, en général, déterminée par des mesures de diffraction de rayons X [Roberts, 1992]. En fait, le chitosane est généralement une substance semi-cristalline. Il se cristallise dans le système orthorhombique et deux types de produits sont connus : le chitosane I (faible DDA, sous forme de sel) et le chitosane II (fort DDA, forme amine libre), ce dernier est le plus ordonné [Kurita, 2006].

I.5 Autres propriétés physico-chimiques

1.5.1 Flexibilité

Une caractéristique générale des polysaccharides est la flexibilité limitée de la chaîne macromoléculaire due à l'empêchement stérique imposé par les liaisons glycosidiques [Rinaudo, 2006].

De plus, pour les polysaccharides ioniques, l'apparition d'interactions électrostatiques répulsives peut augmenter leur rigidité. Le chitosane est souvent considéré comme un copolymère cationique, linéaire et flexible [Aljawish, 2013].

La flexibilité diminue avec le DDA. En effet, les chaînes de chitosane dont le DDA est égale à 85 % sont flexibles seulement pour des pH supérieurs à 3 [Pa et Yu, 2001].

1.5.2 Dégradabilité

La biodégradation du chitosane est assurée par des enzymes qui l'hydrolysent en oligomères. Chez l'homme et les mammifères, ce rôle est assumé principalement par des lysozymes [Varumetal., 1997] qui dégradent les liaisons β (1-4) glycosidiques des unités N-acétylglucosamine en des résidus N-acétylglucosamine et Dglucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme.

Ainsi, un chitosane ayant un DDA de 50% est ainsi facilement dégradé dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps [Onishiet Machida, 1999].

1.5.3 Toxicité systémique

L'innocuité du chitosane a été démontrée chez la souris, le rat et l'homme pour des applications diététiques et cosmétiques [Aljawish, (2013)].

Dans le cas d'administration orale, la dose létale DL_{50} dépasse les 16 g/kg/jour chez la souris, soit une dose supérieure à celle du saccharose (12 g/kg/jour). L'administration sous-cutanée de chitosane conduit à une valeur de DL_{50} supérieure à 10 g/kg/jour chez la souris. La DL_{50} d'applications intrapéritonéales de chitosane est de 5,2 g/kg/jour pour la souris.

Globalement, pour des doses administrées adéquates, la non-toxicité du chitosane est admise [Rao et Sharma, 1997].

I.6 Principales applications du chitosane

I.6.1 *Domaine agroalimentaire*

Les applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire sont décrites dans le Tableau suivant :

Tableau I.1 : Applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire [Crini, 2006].

Additifs (liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant, de conservation)
Clarification, désacidification et détoxification des boissons et des liquides alimentaires
Activité antibactérienne (préservation des aliments) enrobage alimentaire
Effet antioxydant (prévention de l'oxydation)
Ingrédient fonctionnel (agent fixateur, capacité prebiotique)
Formation de films (emballage)

I.6.2 *Domaines biomédical et pharmaceutique*

Tableau I.2 : Applications du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique [Crini, 2006].

Champs d'application	Applications
Médecine	Accélération de la cicatrisation et de la guérison des blessures
Chirurgie plastique	Stimulation de la régénération des tissus (prolifération des cellules)
Biologie cellulaire	Agent hémostatique, agent anti-infectieux, agent anti-tumeur, Encapsulation de cellules et de facteur de croissance...
Pharmacie	Relargage de médicaments
Ophtalmologie	Crèmes de soin, lentilles de contacts
Alicaments	Complément alimentaire (produits amaigrissants).
Dentisterie	Gel dentaire
Chirurgie dentaire	Implants dentaires

1.6.3 *Domaine cosmétique*

Tableau I.3 : Applications du chitosane dans le domaine du cosmétique [Crini, 2006]

Rétention (humidité), agent hydratant (humidifiant)
Agent anti-électrostatique (propriétés de gainage)
Agent épaississant (gélifiant), agent stabilisant (émulsion), agent de liaison
Agent antiallergique
Agent fongicide et bactéricide (propriétés antimicrobienne)
Relargage d'ingrédients, surfactant
Crèmes de soins, hydratantes, cicatrisantes, anti-âge (crèmes antirides)

1.6.4 *Traitement des eaux*

Tableau I.4 : Applications du chitosane dans le domaine de l'environnement [Gerente et al., 2007]

Champs d'application	Applications
Traitement de l'eau potable	Ingénierie de l'eau (coagulation /floculation, filtration, adsorption)
Traitement des eaux usées	Agent coagulant
Traitement des eaux de piscines	Agent chélatant de cations
Chélation de métaux lourds	Réduction des métaux toxiques et radio-isotopes
Récupération de métaux précieux	Récupération de métaux réutilisables
Filtration membranaire	Agent décolorant
Traitement des boues	Agent de déshydratation des boues

I.7 Conclusion

Le chitosane étant très peu répandu dans la nature, sa source majeure provient de la désacétylation de la chitine et sa structure chimique est similaire à celle de la cellulose, elle ne diffère de la chitine que par les groupes amines qui engendrent un changement dans les propriétés de ces matériaux, ceci se manifeste d'une part, par la solubilité du chitosane dans les acides dilués et de l'autre l'insolubilité de la chitine dans presque tous les solvants organiques.

Le chitosane possède de nombreuses qualités grâce à ses propriétés physico-chimiques, ce qui le qualifie d'être un polymère particulièrement intéressant pour une multitude d'applications.

Chapitre II : Matériels et méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

La chitine est présente dans les co-produits de crustacés sous forme de complexes, c'est pourquoi, de nombreuses méthodes ont été développées afin de l'extraire.

De manière générale, l'extraction de la chitine consiste à éliminer les protéines, les éléments minéraux et les pigments, ceci permet donc de la débarrasser des impuretés, quant à l'obtention du chitosane, cela se fait par hydrolyse basique.

Ce chapitre rassemble l'ensemble du matériel utilisé ainsi que les méthodes analytiques et expérimentales employées dans la préparation du chitosane.

II.1 Appareillage

- Verrerie courante de Laboratoire (fioles, pipettes, erlenmeyers, béchers, cristallisoirs, burette, réfrigérant, ballon bicol...)
- Etuve réglable MEMMERT ;
- Paniers pour séchage ;
- Balance MILLIOT Cap = 600 g ;
- Plaque chauffante et d'agitation IKA ® RH basic 2 ;
- Thermomètre ;
- Réfrigérateur SAMSUNG ;
- Hote d'aspiration de marque BIOBASE ;
- PH-mètre HANNA INSTRUMENTS ;
- Balance analytique OHAUS ;
- Conductimètre WTW cond 1970i ;
- Broyeur de cuisine ;

II.2 Réactifs

- Acide chlorhydrique (HCl) DP 36.5-38% de SIGMA-ALDRICH ;
- Hydroxyde de Sodium (NaOH) form : Pellets DP 98-100,5 % de SIGMA-ALDRICH ;
- Acide acétique (CH₃COOH) DP 99-100% de SIGMA-ALDRICH ;
- Eau oxygéné 30V ;

II.3 Protocole d'extraction et de désacétylation

II.3.1 Méthodologie d'extraction de la chitine

II.3.1.1 Récupération et préparation des déchets de la biomasse marine

⇒ Collecte des déchets de crevettes de l'unité de conditionnement des fruits marins, située au niveau du port d'AZEFFOUN ;



Figure II.1 : biomasse récupérée

⇒ Décortication des crevettes et nettoyage des carapaces ;



Figure II.2 : Carapaces

⇒ Séchage à l'air libre (Température du laboratoire 17°C) pendant 6-8h ;



Figure II.3 : Séchage des carapaces

⇒ Séchage à l'étuve, température 80°C pendant 4h puis broyage ;



Figure II.4 : Chitine brute

II.3.1.6 Valorisation de la chitine brute

Pour avoir la chitine avec des caractéristiques semblables à celles natives, le procédé d'extraction que nous avons employé dans notre travail est axé principalement sur trois traitements :

⇒ Déminéralisation des carapaces par un traitement acide. Rapport de 1g de carapaces dans 10 mL d'HCl 2N sous agitation pendant 24h. (Selon le Protocole Conventionnel) ;

⇒ Élimination des protéines qui se fait par un traitement basique. La solution alcaline utilisée est l'hydroxyde de Sodium (NaOH 1N) à 80°C pendant 3 heures. Rapport de 1 g de carapaces dans 10 mL. (Protocole Conventionnel) ;

⇒ Blanchiment des carapaces, ce traitement consiste à éliminer les pigments incomplètement éliminés à l'aide de l'eau oxygénée pendant 30 minutes. Rapport de 1g de carapaces dans 10mL de H₂O₂ à 30V. (Protocole Conventionnel) ;

⇒ Après chacune des étapes précédemment citées, l'échantillon subit plusieurs lavages jusqu'à stabilisation du pH entre 6.5 et 7.

Afin de caractériser la chitine protéinique, les échantillons doivent être distincts selon les différentes étapes, et ce, dans le but de réaliser une étude comparative. Pour cela, nous avons effectué les échantillons suivants :

- **Echantillon 1 :** Chitine Protéinique avec blanchiment
- **Echantillon 2 :** Chitine Déprotéinique avec blanchiment
- **Echantillon 3 :** Chitine Protéinique sans blanchiment
- **Echantillon 4 :** Chitine Déprotéinique sans blanchiment

II.3.2 Méthodologie de désacétylation de la chitine

Le Suivi de la cinétique de désacétylation chimique de la chitine se fait dans un milieu fortement alcalin, soit 35% en poids en hydroxyde de sodium (NaOH) et ce à température ambiante jusqu'à avoir une chitine suffisamment désacétylée. De plus, effectuer en parallèle des désacétylations à 120°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) en variant le temps, allant d'une durée de 30minutes jusqu'à 5heures.

Rapport de 1g de chitine dans 50mL de NaOH à 35% en poids.

- ⇒ Réaliser le montage à bain de sable ;
- ⇒ Pour chaque échantillon de chitine obtenu, ramener à chaque fois la solution de NaOH à 120°C et ensuite rajouter la chitine ;
- ⇒ Considérer le temps selon la durée qui convient ;

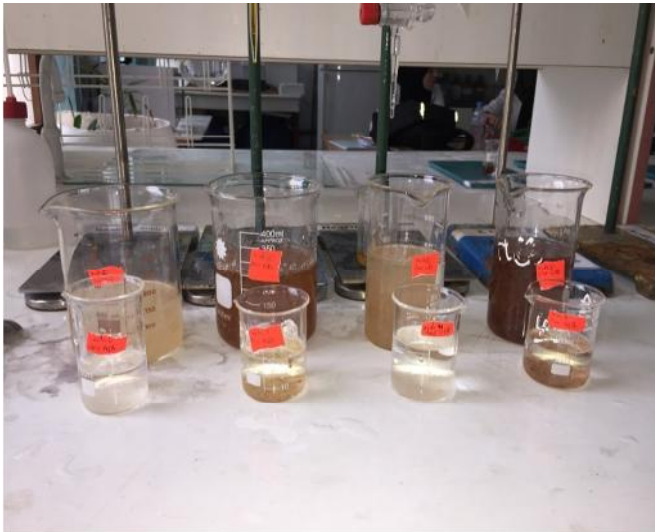


Figure II.5 : Montage de la désacétylation à T_{amb}

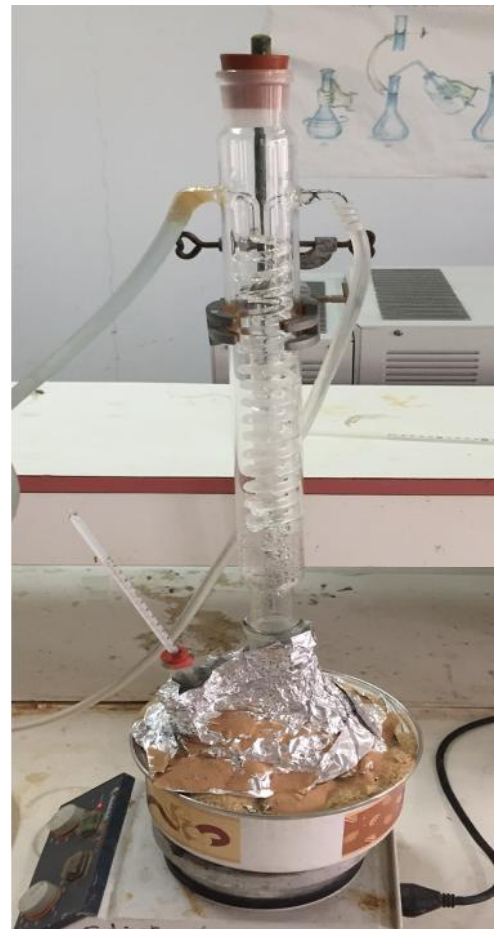


Figure II.6 : Montage de désacétylation à $T_{120^\circ\text{C}}$

⇒ Enfin de la réaction, effectuer un lavage jusqu'à stabilisation du pH, sécher par la suite l'échantillon de chitosane obtenu, et ce de même pour tout prélèvement d'échantillon produit à température ambiante.

II.4 Protocole de caractérisation du chitosane

II.4.1 Test de solubilité

Les échantillons obtenus sont solubilisés dans un milieu d'acide dilué afin de tester l'une des caractéristiques du chitosane dont la propriété est indispensable pour les applications ultérieures.

II.4.2 Le degré de désacétylation (DDA)

Pour déterminer le DDA, nous avons utilisé le dosage conductimétrique basique pour les différents échantillons en chitosane selon les étapes suivantes (Yu et al., 1999) :

- ⇒ Solubilisation de 150mg de chaque échantillon du chitosane dans 10mL de HCl 0,1N ;
- ⇒ Ajustement de chaque volume jusqu'à 200mL avec de l'eau distillée ;
- ⇒ Titrage de chaque solution avec une solution de NaOH 0,1N tout en agitant ;
- ⇒ Mesure de la conductivité après chaque ajout de 0.5mL de NaOH.

II.4.3 Viscosité et poids moléculaire

⇒ Le poids moléculaire de chaque échantillon du chitosane est calculé à partir de sa viscosité intrinsèque notée $[\eta]$.

La viscosité intrinsèque du chitosane est déterminée expérimentalement par viscosimètre capillaire en utilisant une pipette à vessie.

⇒ La méthode est basée sur la mesure du temps d'écoulement d'un même volume de solvant (1% d'acide acétique) ou de solution de chitosane contenue entre le point (a) et (b) à l'aide d'un chronomètre.

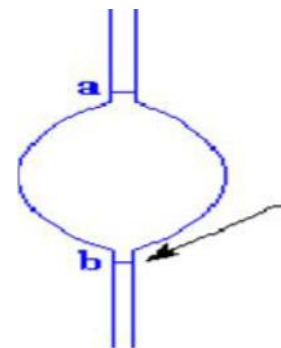


Figure II.7 : Tube à vessie

La viscosité réduite $[\eta]_{red}$ a été calculée à partir de la viscosité spécifique dont la loi est :

$$[\eta]_{sp} = \frac{t-t_0}{t_0} \quad (\text{Equation III.1})$$

Où :

t : Temps d'écoulement de la solution du chitosane de concentration C_i ;

t_0 : Temps d'écoulement du solvant seul.

La viscosité réduite est donc donnée par la relation suivante :

$$[\eta]_{red} = \frac{[\eta]_{sp}}{C_i} \quad (\text{Equation III.2})$$

Ainsi, pour différentes concentrations du chitosane (0,025; 0,05; 0,075; 0,1g/dL) on obtient différentes valeurs de viscosité réduite.

Le tracé des viscosités réduites en fonction des concentrations donne lieu à une droite dont l'ordonnée à l'origine est égale à la viscosité intrinsèque.

La viscosité intrinsèque $[\eta]$ peut être déterminée autrement par le biais de la viscosité inhérente donnée par la relation suivante :

$$[\eta]_{inh} = \frac{\ln([\eta]_{rel})}{C_i} \quad (\text{Equation III.3})$$

Avec :

$[\eta]_{rel}$: La viscosité relative (donnée par $[\eta]_{rel} = \frac{t}{t_0}$)

Ainsi, le tracé des viscosités inhérentes en fonctions des différentes concentrations du chitosane donne lieu à une droite dont l'ordonnée à l'origine est égale à la viscosité intrinsèque.

Chapitre III : Résultats et discussions

Chapitre III : Résultats et discussion

Le travail expérimental que nous avons effectué a pour but d'hydrolyser la chitine protéinique et de la caractériser. L'objectif de ce chapitre est de présenter les résultats des expériences précédemment accomplies et de les interpréter.

III.1 Obtention de la chitine et du chitosane

Après décortication des crevettes, nettoyage et broyage des carapaces nous avons pu récupérer une masse considérable de chitine brute. Cependant, lors de la déminéralisation et de la stabilisation du pH, une quantité importante a été éliminée. Ceci est relativement expliqué par le fait que la chitine brute est constituée d'un pourcentage important de minéraux.



Figure III.1 : Chitine brute

III.2 Caractérisations (Résultats et discussion)*III.2.1 Détermination du degré de désacétylation (DDA)*

En principe, la distinction entre la chitine et le chitosane est le degré de désacétylation, de ce fait, nous avons procédé à sa détermination par la méthode conductimétrique basique qui nous a permis de suivre la variation de la conductivité dont les tracés sont représentés dans les figures ci-après.

III.2.1.1 Chitosane produit à T120°C

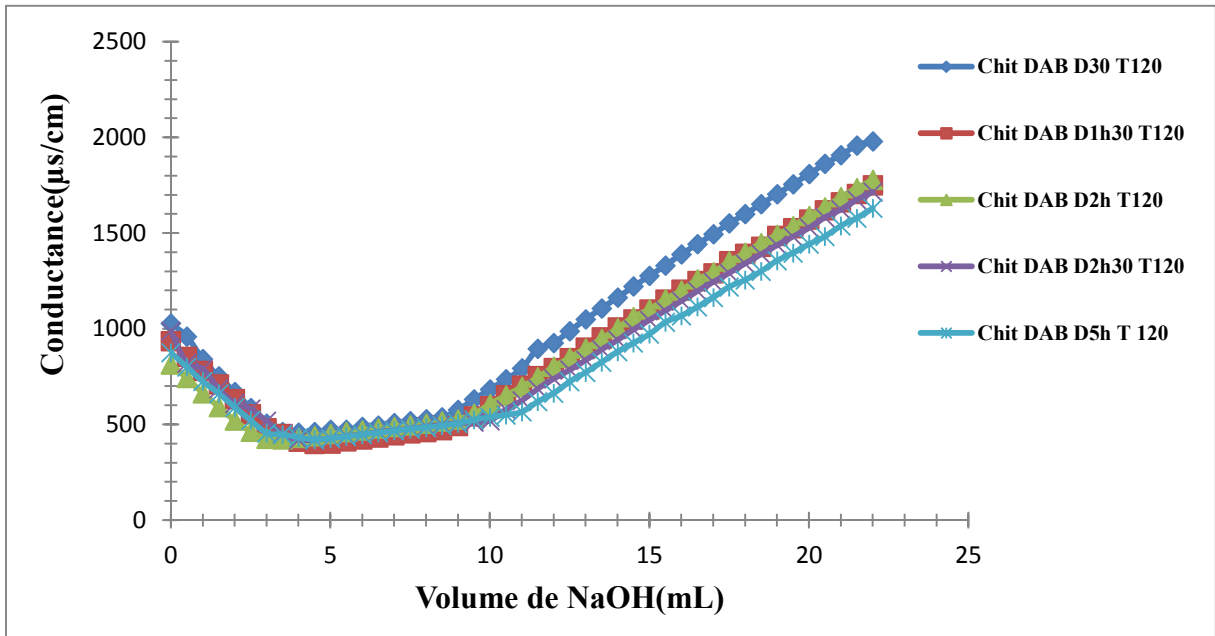


Figure III.2 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine déprotéinée avec blanchiment et désacétylée à T 120 °C

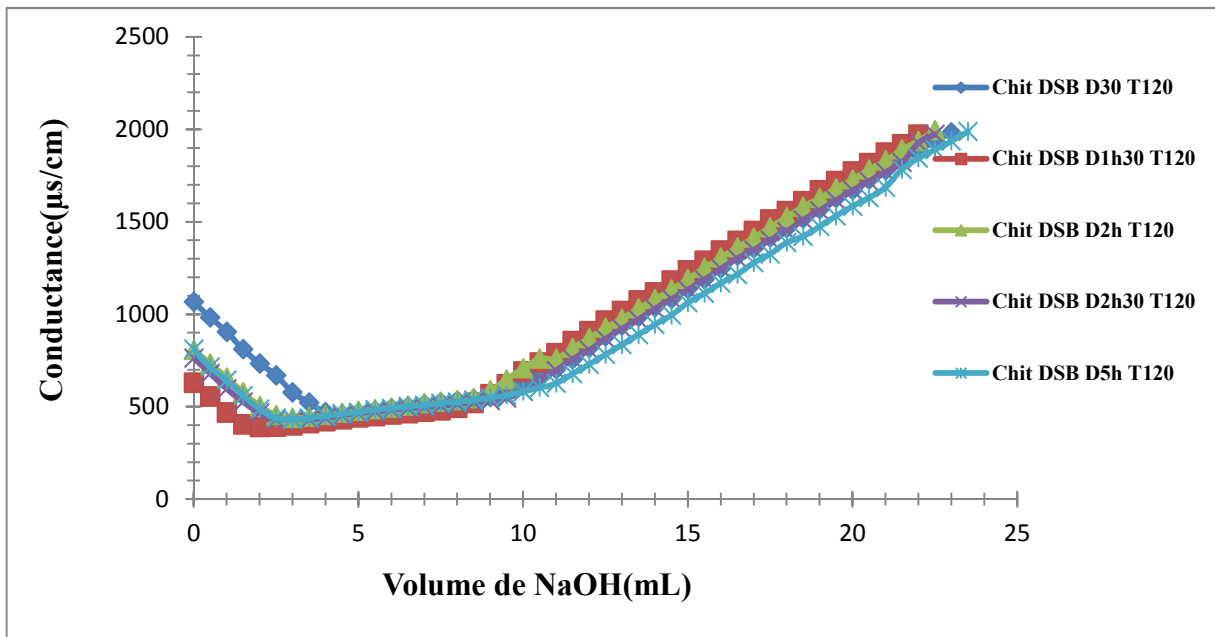


Figure III.3 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine déprotéinée sans blanchiment et désacétylée à T 120 °C

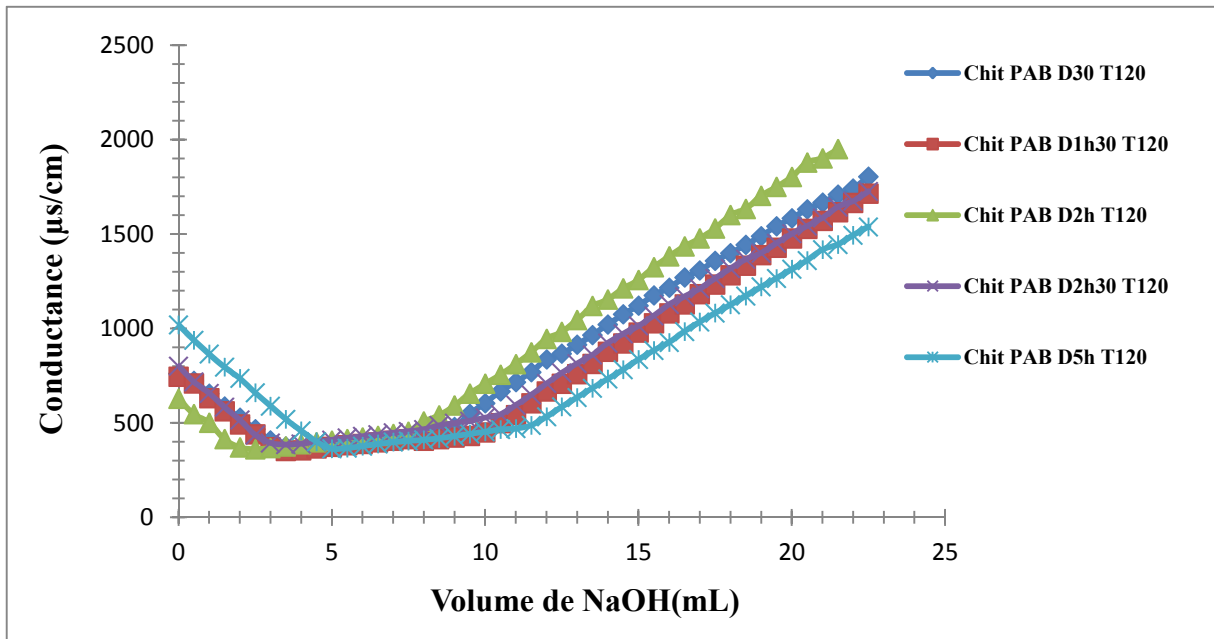


Figure III.4 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine protéinique blanchie et désacétylée à T120 °C

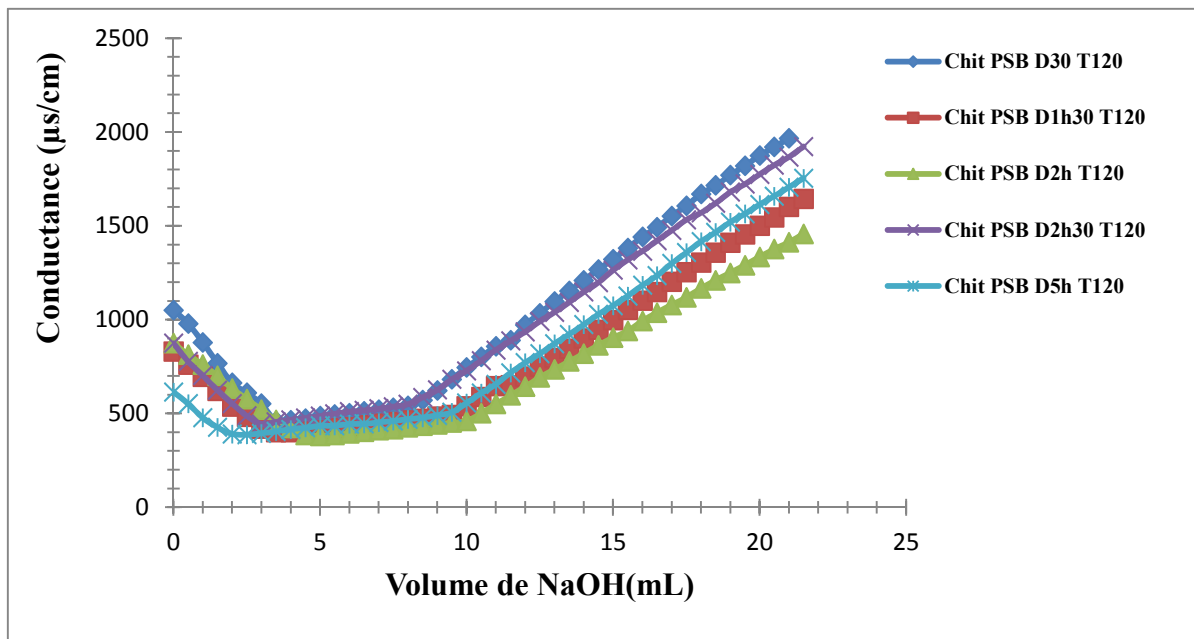


Figure III.5 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine protéinique non blanchie et désacétylée à T120 °C

III.2.1.2 Chitosane produit à T_{amb}

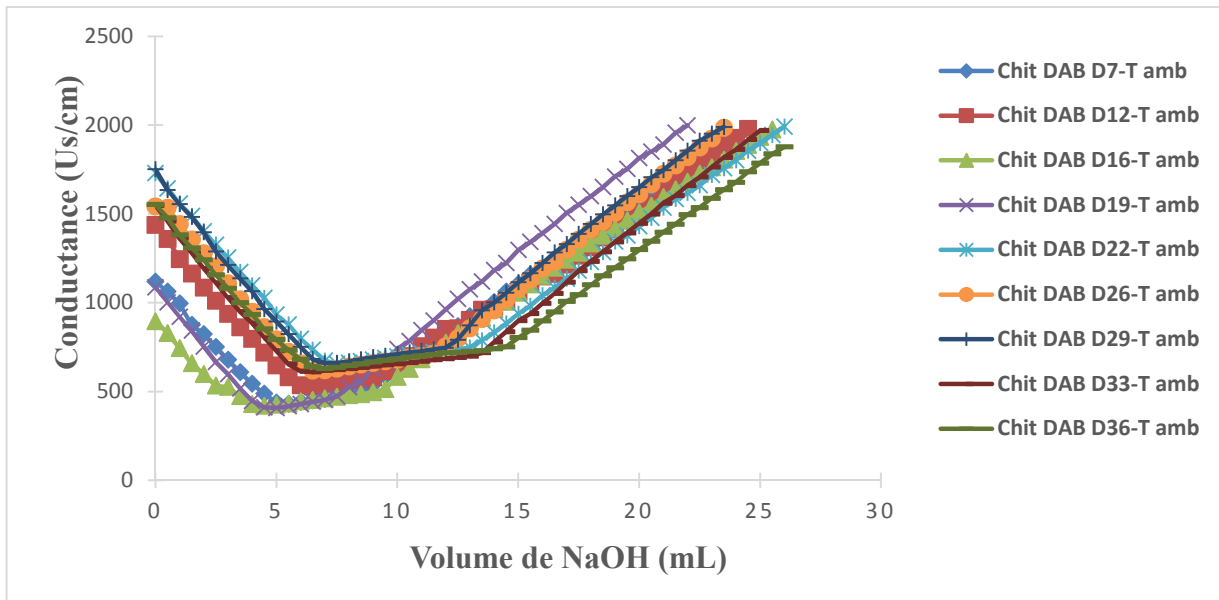


Figure III.6 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine déprotéinée avec blanchiment et désacétylée à T_{amb}

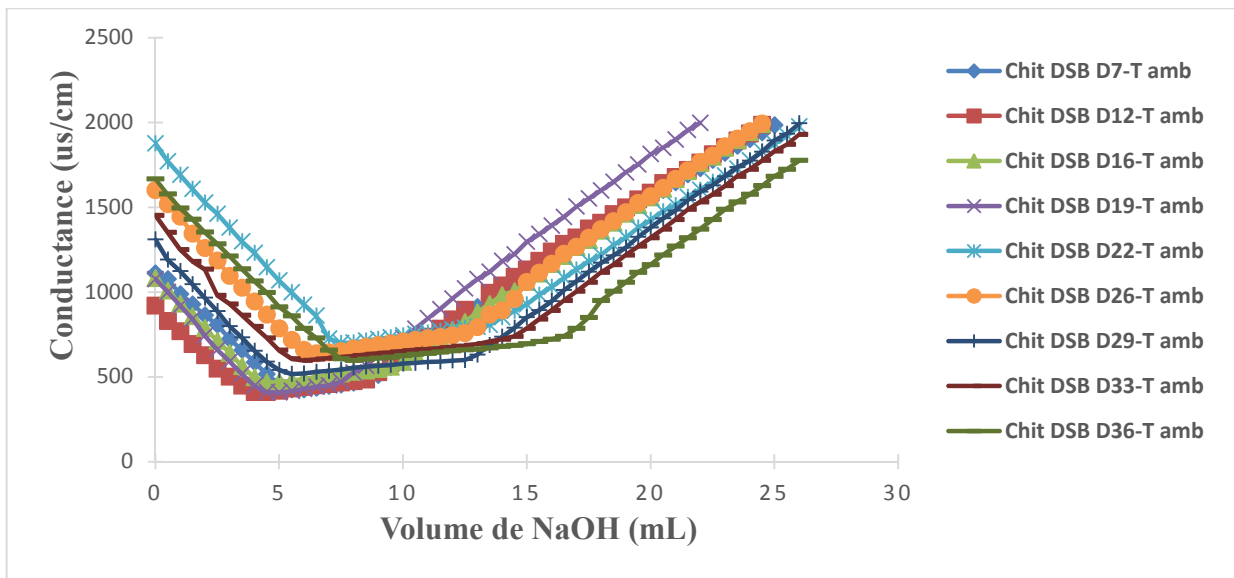


Figure III.7 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine déprotéinée sans blanchiment et désacétylée à T_{amb}

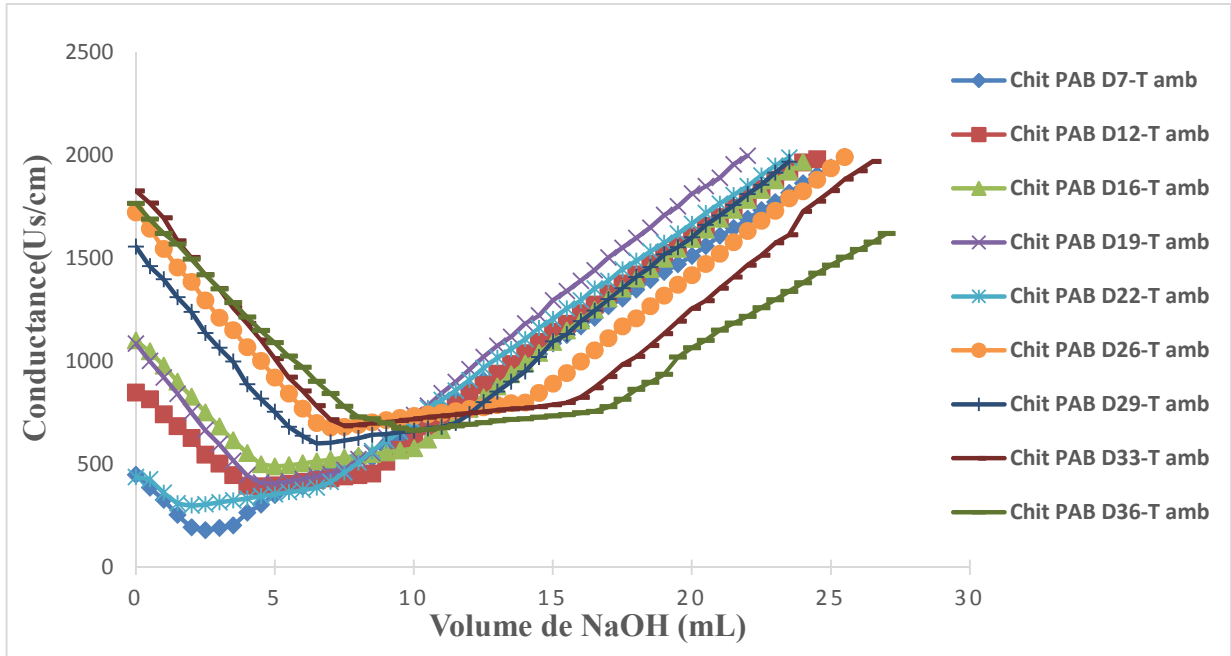


Figure III.8 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la chitine protéinique blanchie et désacétylée à T_{amb}

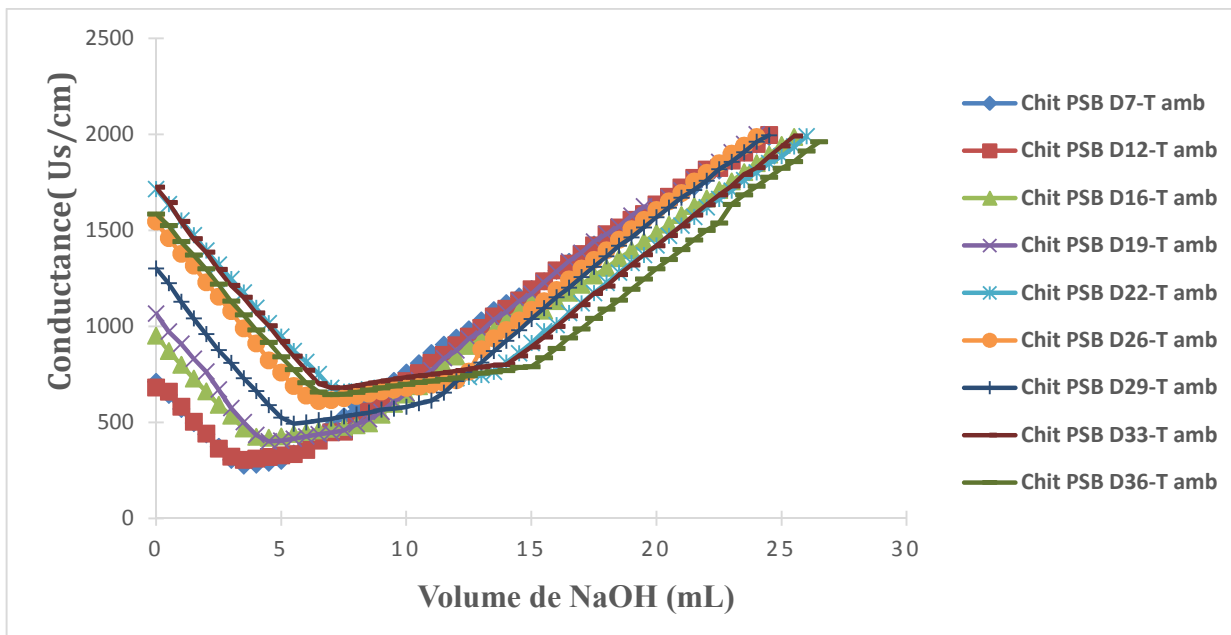


Figure III.9 : Dosage conductimétrique basique des échantillons de la Chitine protéinique non blanchie et désacétylée à T_{amb}

Les courbes précédentes du dosage conductimétrique basique, présentent deux points d'inflexion.

La différence du volume de NaOH entre ces deux points correspond à la quantité d'acide(HCl) nécessaire pour protoner les groupements aminés de chaque échantillon [De Alvarenga et al, 2010].

Compte tenu de la présence de deux points d'inflexion, les courbes tracées présentes trois phases :

- **Phase 1** : Abaissement de la conductivité jusqu'au point correspondant au volume V_1 car les ions H^+ de l'acide chlorhydrique sont neutralisés par les ions OH^- provenant de la solution de NaOH ;
- **Phase 2** : Pseudo-équilibre des valeurs de conductivité malgré l'ajout de mêmes quantités de NaOH et ce, jusqu'au point correspondant au volume V_2 . Cela est dû à la neutralisation des groupements protonés du chitosane ($-NH_3^+$) vers ($-NH_2$) ;
- **Phase 3** : Accroissement de la conductivité dû à la présence en excès des ions OH^- provenant de la solution de NaOH.

A partir des graphes, la formule ci-contre nous a permis de calculer les différents DDA

$$DDA = \left(\frac{203(V_2 - V_1)N}{m + 42(V_2 - V_1)N} \right) \times 100 \quad \text{(Equation III.4)}$$

Avec :

N : Normalité de NaOH (mol/L) ;

V_1 et **V_2** sont les volumes équivalents en NaOH ;

m : Masse de l'échantillon en mg ;

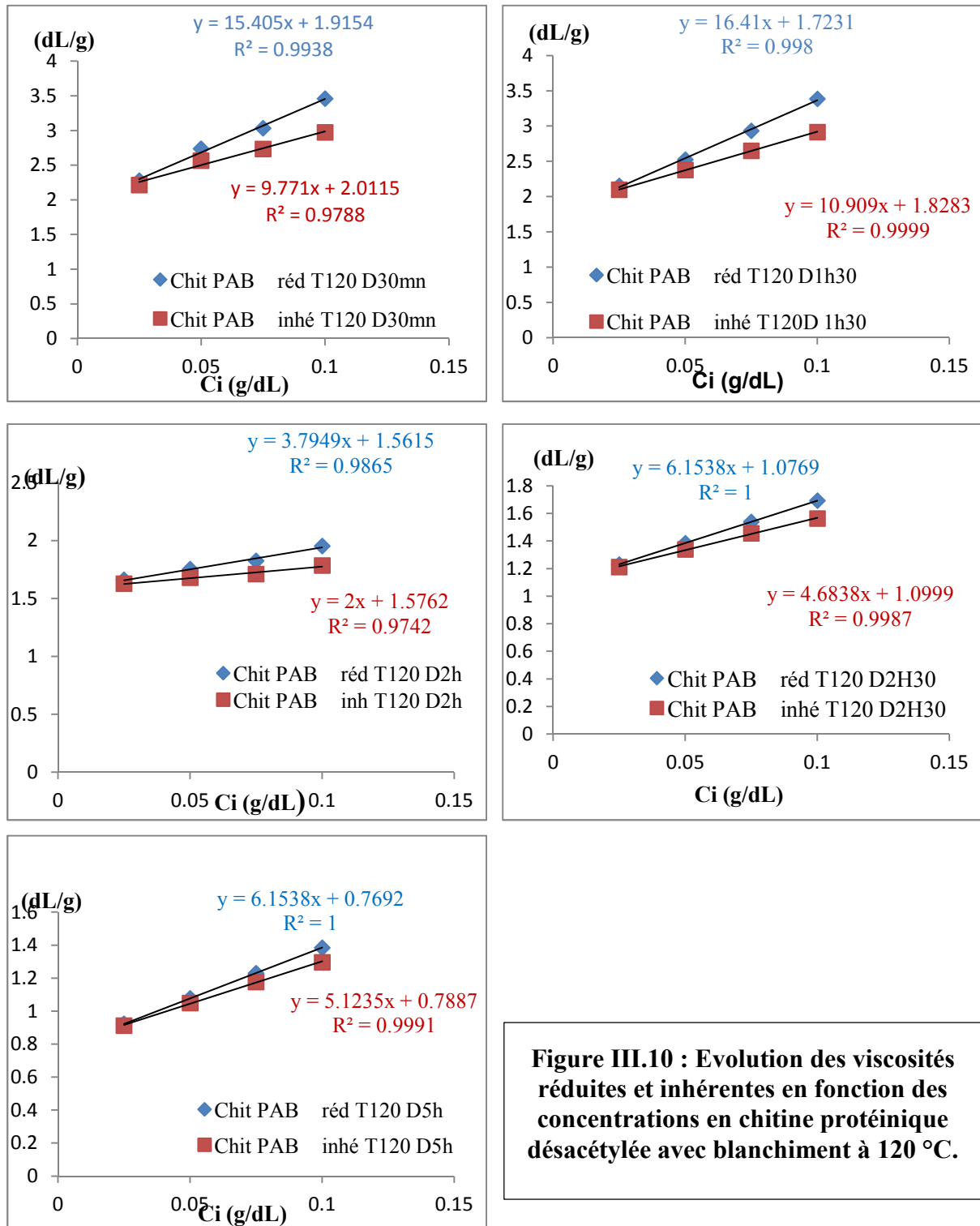
203 : Masse moléculaire du monomère acétylé ;

42 : Différence entre la masse moléculaire du monomère acétylé et du monomère désacétylé.

Les différents DDA des échantillons sont représentés dans les tableaux ultérieurs.

Les figures suivantes représentent les viscosités réduites et inhérentes des différents échantillons en fonction de leurs concentrations :

III.2.1.3 Chitosane produit à T120°C



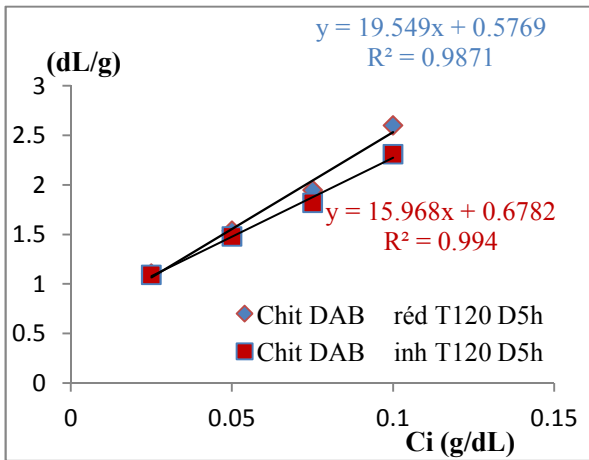
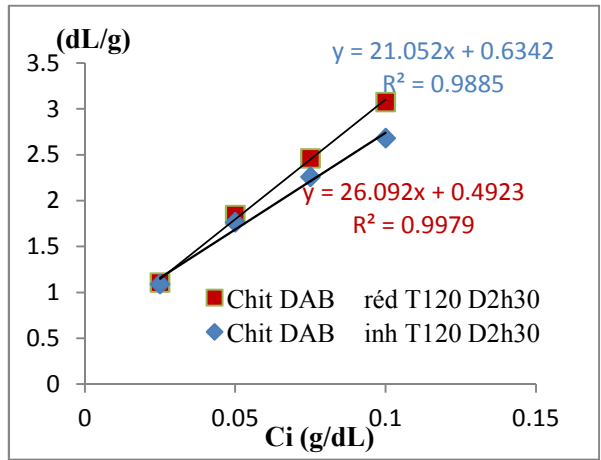
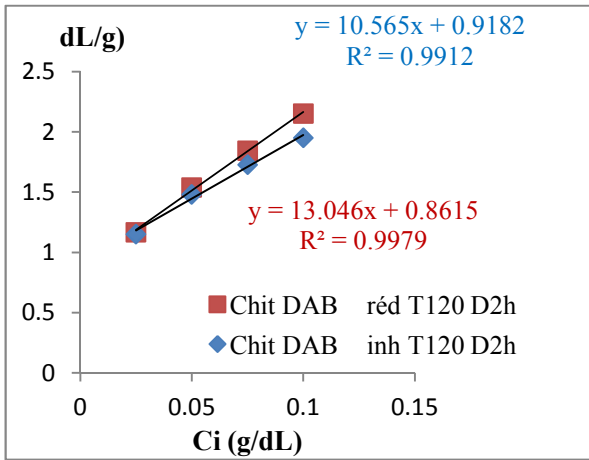
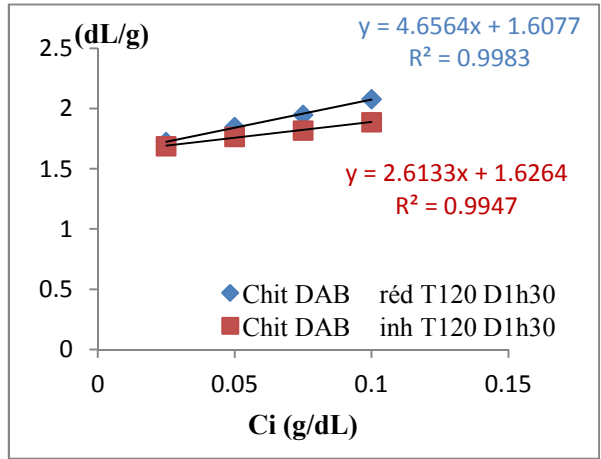
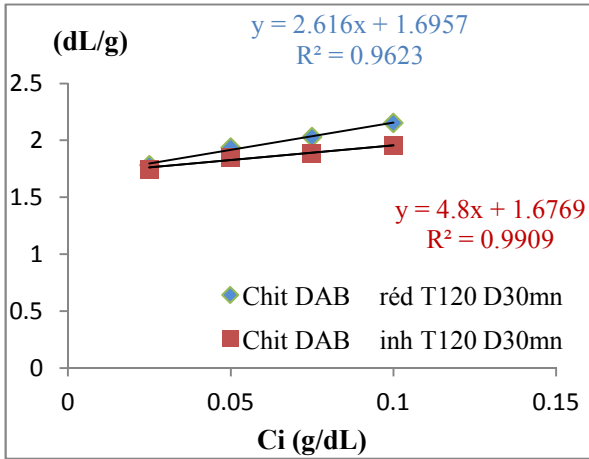


Figure III.11: Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine déprotéinée avec blanchiment à 120 °C.

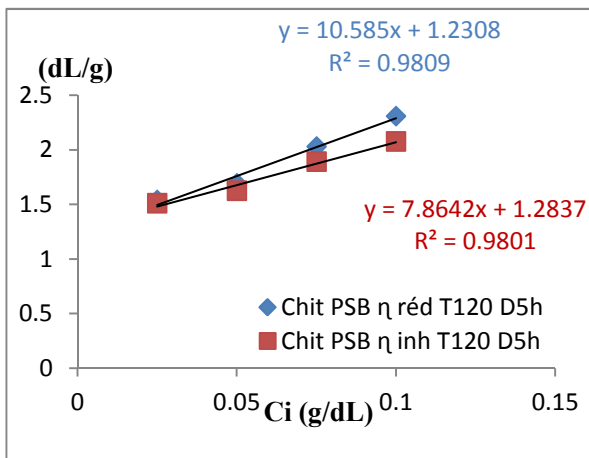
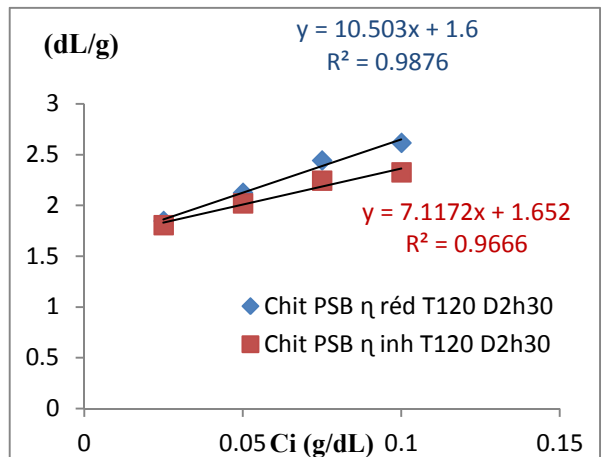
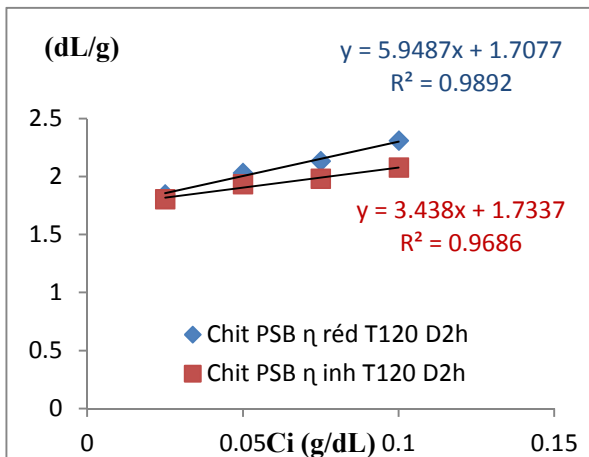
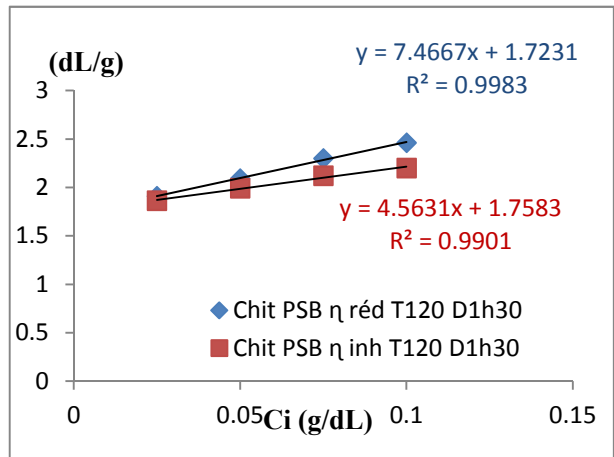
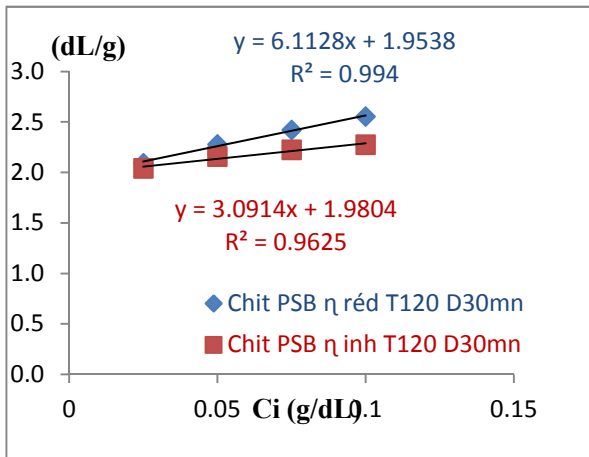


Figure III.12 : Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine protéinique désacétylée sans blanchiment à 120 °C.

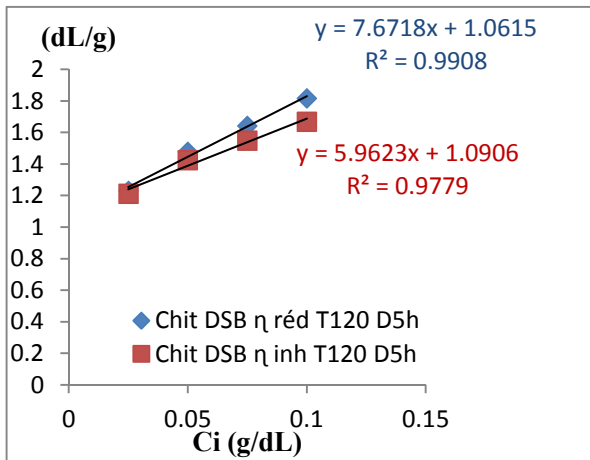
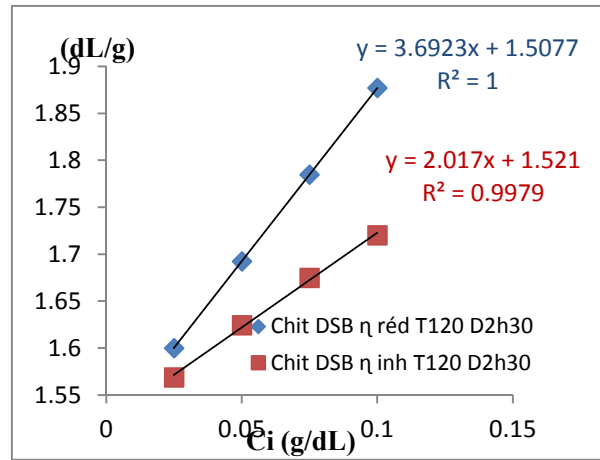
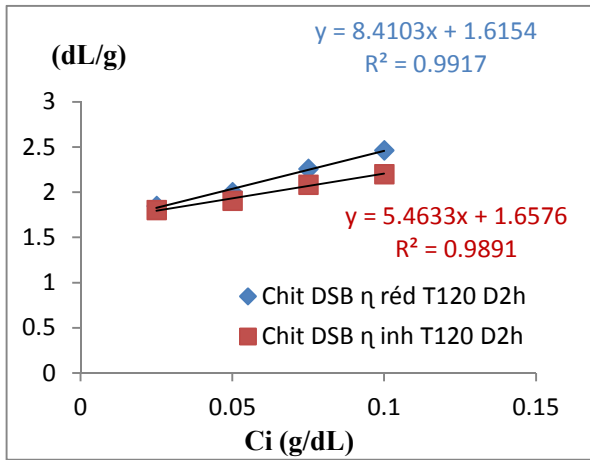
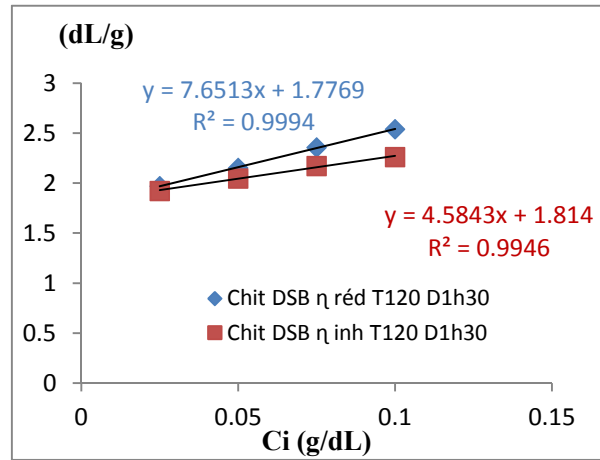
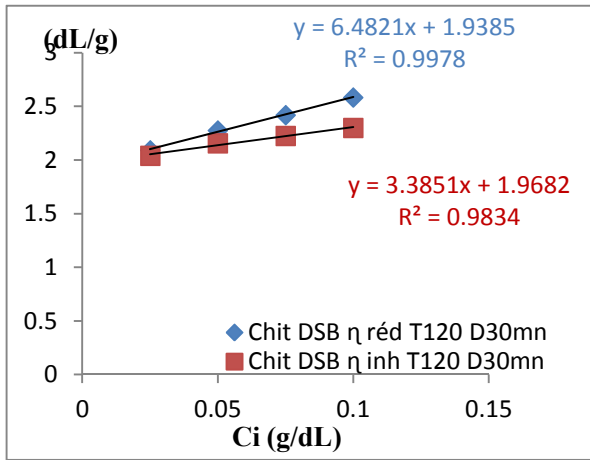


Figure III.13 : Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine déprotéinée désacétylée sans blanchiment à 120 °C.

III.2.1.4 Chitosane produit à T_{amb}

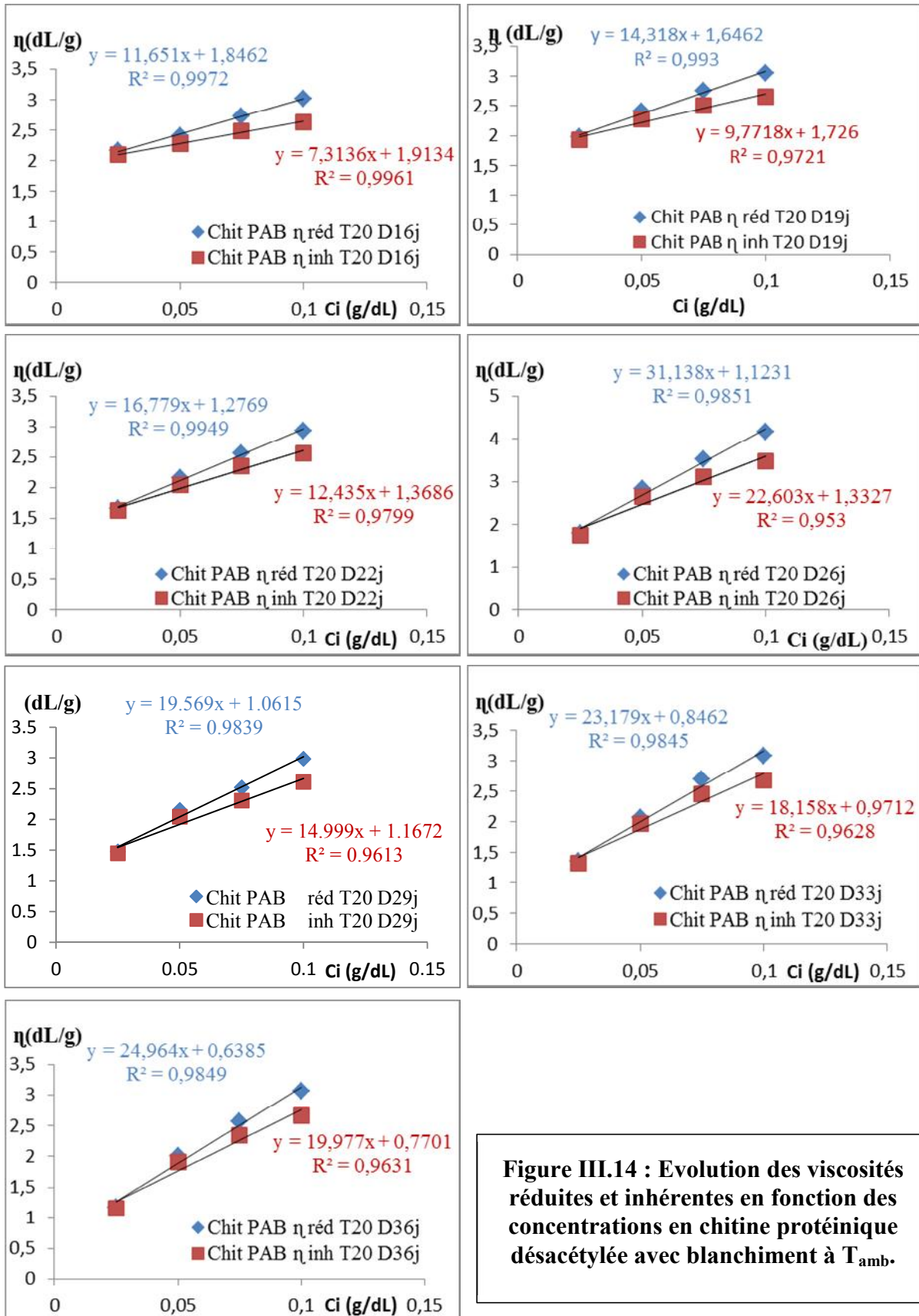
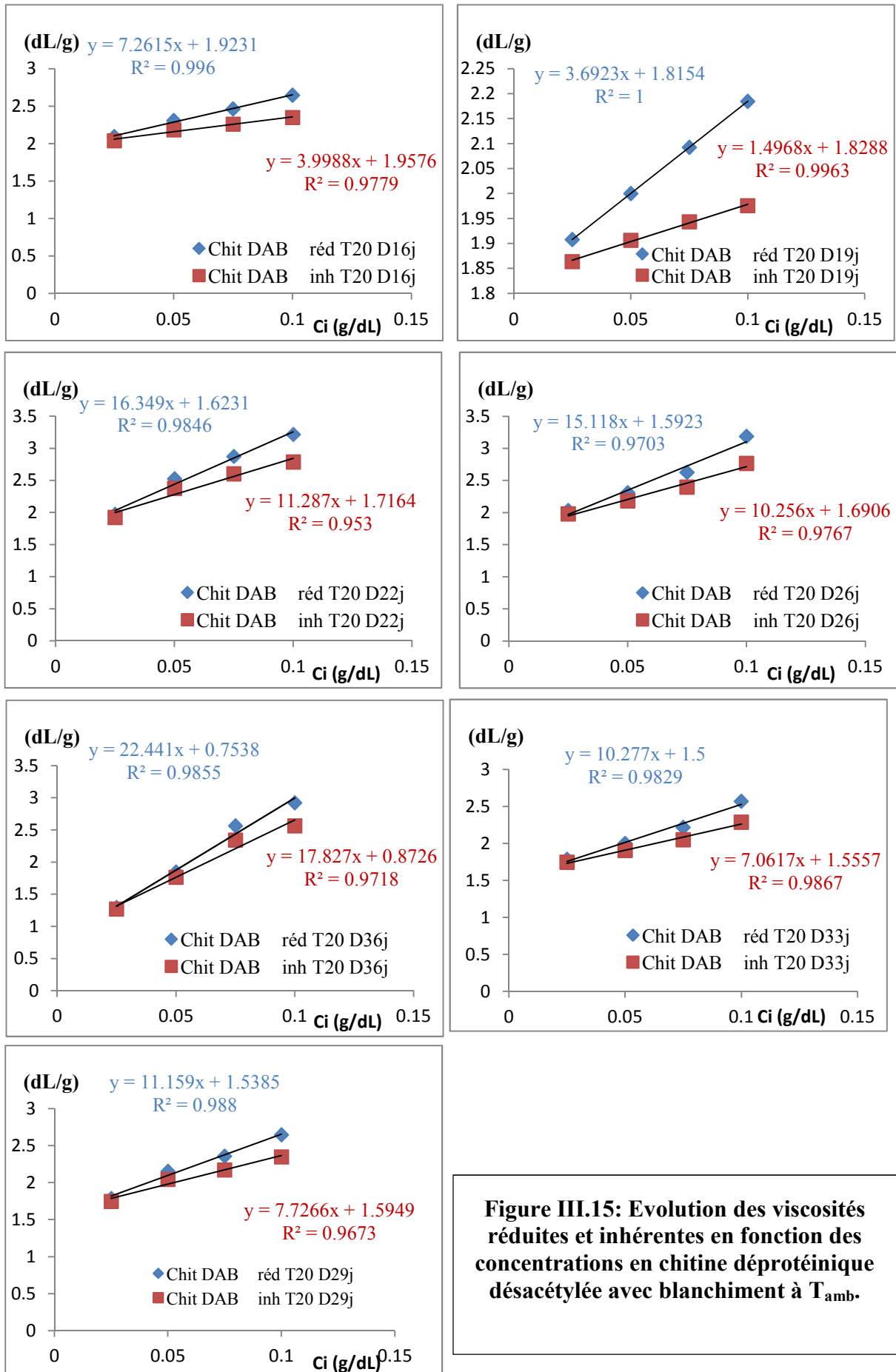


Figure III.14 : Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine protéinique désacétylée avec blanchiment à T_{amb} .



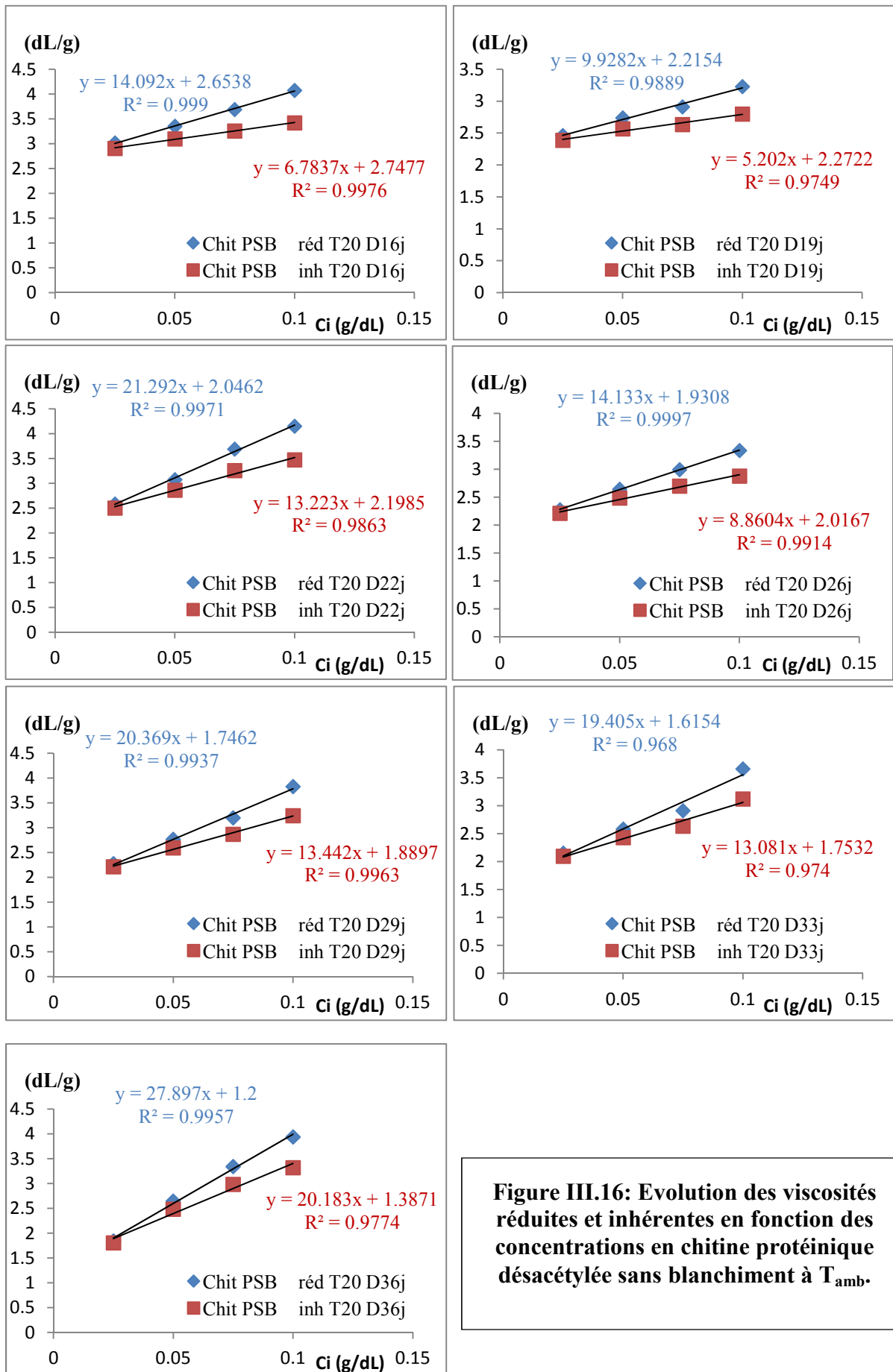


Figure III.16: Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine protéinique désacétylée sans blanchiment à T_{amb} .

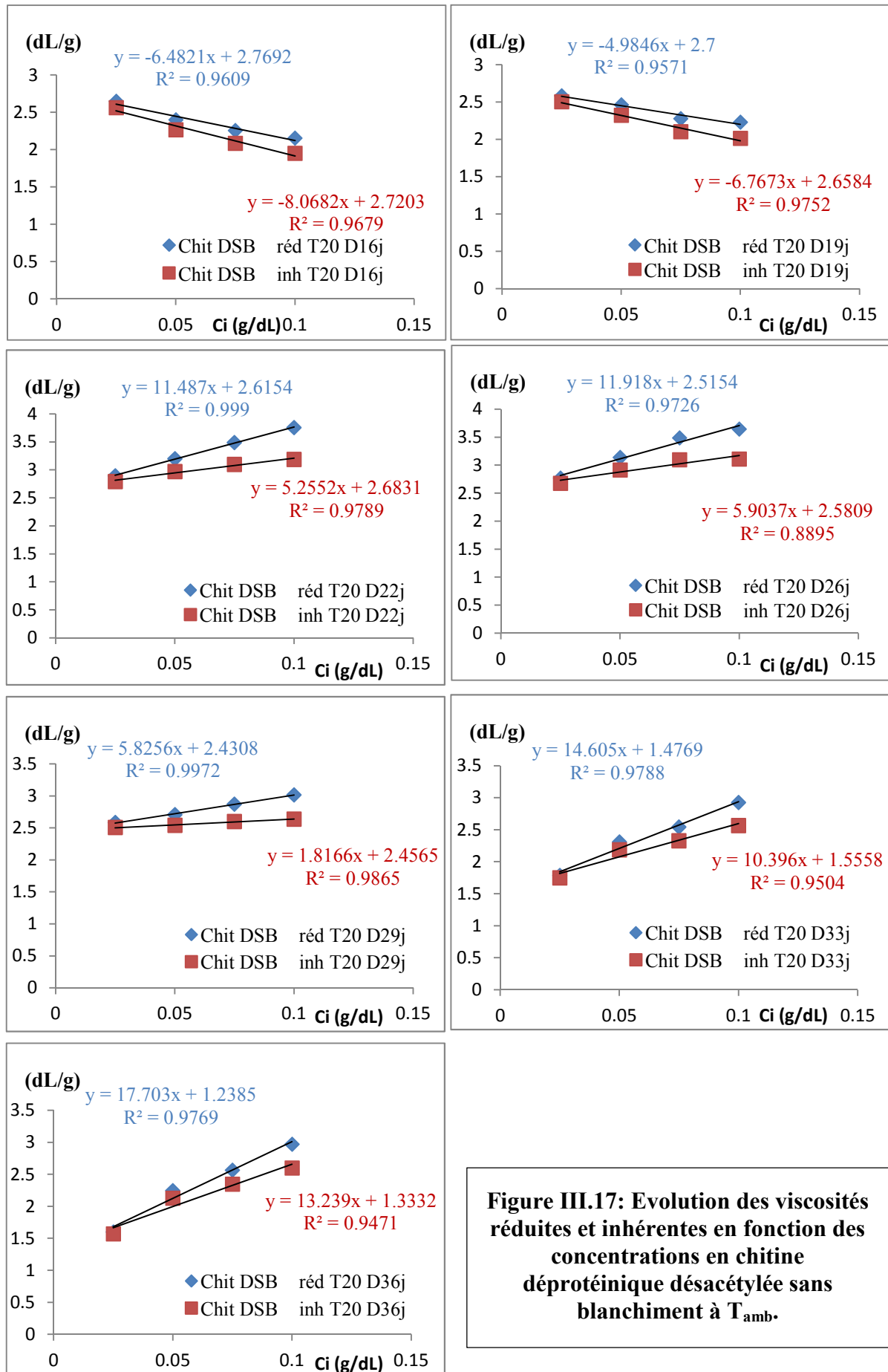


Figure III.17: Evolution des viscosités réduites et inhérentes en fonction des concentrations en chitine déprotéinée désacétylée sans blanchiment à T_{amb} .

Le tracé des viscosités inhérentes et réduites en fonction des différentes concentrations massiques en chitosane donne lieu à des droites dont les ordonnées à l'origine se rapprochent. La moyenne de ces deux valeurs donne les viscosités intrinsèques considérées pour nos échantillons afin de calculer le poids moléculaire.

On constate que plus le temps de désacétylation est important plus le fluide est liquide. La viscosité dépend donc essentiellement du DDA.

III.2.2 Le poids moléculaire

Le poids moléculaire de chaque échantillon du chitosane est calculé à partir de sa Viscosité intrinsèque notée $[\eta]$ en appliquant l'équation de Marke-Houwink [Kasaai, 2007] :

$$[\eta] = k \times M^a \quad \text{(Equation III.5)}$$

Où :

M : Poids moléculaire (Daltons) ;

k et **a** : Paramètres qui dépendent essentiellement du solvant utilisé.

D'après [Rao, 1993], qui a utilisé le même solvant :

$$a = 0.72 \quad k = 4.74 \times 10^{-5} \text{ dL/g [Kasaai, 2007].}$$

Compte tenu de la diversité des paramètres à déterminer dans cette caractérisation, les résultats sont représentés sous forme de tableaux où, chacun convient à l'échantillon approprié.

Tableau III.1 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine protéinique blanchie et désacétylée à T 120°C.

Echantillons	Solubilité dans CH ₃ COOH à 1%	Viscosité intrinsèque [η] (dL/g)	Poids moléculaire (KDa) (±80)	DDA % (±1)
Chit PAB D30mn-T120	Soluble	1.9635	2587	74
Chit PAB D1h30-T120	Soluble	1.7757	2250	79
Chit PAB D2h-T120	Soluble	1.5689	1895	79
Chit PAB D2h30-T120	Soluble	1.0884	1140	83
Chit PAB D5h-T120	Soluble	0.7790	716	88

Tableau III.2 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine déprotéinique blanchie et désacétylée à T120°C.

Echantillons	Solubilité dans CH ₃ COOH à 1%	Viscosité intrinsèque [η] (dL/g)	Poids moléculaire (KDa) (±80)	DDA % (±1)
Chit DAB D30mn-T120	Soluble	1.6863	2094	69
Chit DAB D1h30-T120	Soluble	1.6171	1976	74
Chit DAB D2h-T120	Soluble	0.8899	862	79
Chit DAB D2h30-T120	Soluble	0.5633	457	83
Chit DAB D5h-T120	Soluble	0.6276	531	92

Tableau III.3 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine protéinique non blanchie à T120°C.

Echantillons	Solubilité dans CH ₃ COOH à 1%	Viscosité intrinsèque [η] (dL/g)	Poids moléculaire (KDa) (±80)	DDA % (±1)
Chit PSB D30mn-T120	Soluble	1.9671	2594	64
Chit PSB D1h30-T120	Soluble	1.7407	2189	83
Chit PSB D2h-T120	Soluble	1.7207	2154	88
Chit PSB D2h30-T120	Soluble	1.626	1991	89
Chit PSB D5h-T120	Soluble	1.2573	1393	93

Tableau III.4 : Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine protéinique non blanchie et désacétylée à T120°C.

Echantillons	Solubilité dans CH ₃ COOH à 1%	Viscosité intrinsèque [η] (dL/g)	Poids moléculaire (KDa) (±80)	DDA % (±1)
Chit DSB D30mn-T120	Soluble	1.9535	2569	74
Chit DSB D1h30-T120	Soluble	1.7956	2285	79
Chit DSB D2h-T120	Soluble	1.6365	2009	83
Chit DSB D2h30-T120	Soluble	1.5144	1804	88
Chit DSB D5h-T120	Soluble	1.5761	471	97

Tableau III.5: Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine protéinique blanchie et désacétylée à T_{amb} .

Echantillons	Solubilité dans le CH_3COOH	Viscosité intrinsèque [] (dL/g)	Poids moléculaire (KDa) (± 80)	DDA % (± 1)
Chit PAB D7- T_{amb}	Insoluble	/	/	52
Chit PAB D12- T_{amb}	Soluble	/	/	59
Chit PAB D16- T_{amb}	Soluble	1.8798	2435	64
Chit PAB D19- T_{amb}	Soluble	1.6861	2094	73
Chit PAB D22- T_{amb}	Soluble	1.3228	1495	74
Chit PAB D26- T_{amb}	Soluble	1.2279	1348	79
Chit PAB D29- T_{amb}	Soluble	1.1144	1178	83
Chit PAB D33- T_{amb}	Soluble	0.9087	887	88
Chit PAB D36- T_{amb}	Soluble	0.7043	623	92

Tableau III.6: Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine déprotéinique blanchie et désacétylée à T_{amb} .

Echantillons	Solubilité dans le CH_3COOH	Viscosité intrinsèque [] (dL/g)	Poids moléculaire (KDa) (± 80)	DDA % (± 1)
Chit DAB D7- T_{amb}	Insoluble	/	/	48
Chit DAB D12- T_{amb}	Insoluble	/	/	48
Chit DAB D16- T_{amb}	Soluble	1.9404	2545	69
Chit DAB D19- T_{amb}	Soluble	1.8221	2332	76
Chit DAB D22- T_{amb}	Soluble	1.6698	2066	79
Chit DAB D26- T_{amb}	Soluble	1.6415	2017	81
Chit DAB D29- T_{amb}	Soluble	1.5667	1891	83
Chit DAB D33- T_{amb}	Soluble	1.5250	1821	88
Chit DAB D36- T_{amb}	Soluble	0.8132	761	92

Tableau III.7: Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine protéinique non blanchie et désacétylée à T_{amb} .

Echantillons	Solubilité dans le CH_3COOH	Viscosité intrinsèque [η] (dL/g)	Poids moléculaire (KDa) (± 80)	DDA % (± 1)
Chit PSB D7- T_{amb}	Soluble	/	/	66
Chit PSB D12- T_{amb}	Soluble	/	/	66
Chit PSB D16- T_{amb}	Soluble	2.7008	4029	67
Chit PSB D19- T_{amb}	Soluble	2.2438	3114	71
Chit PSB D22- T_{amb}	Soluble	2.1224	2883	79
Chit PSB D26- T_{amb}	Soluble	1.9738	2606	80
Chit PSB D29- T_{amb}	Soluble	1.8180	2325	83
Chit PSB D33- T_{amb}	Soluble	1.6843	2091	88
Chit PSB D36- T_{amb}	Soluble	1.2936	1449	97

Tableau III.8: Viscosité intrinsèque, poids moléculaire, DDA et solubilité des échantillons de la chitine déprotéinique non blanchie et désacétylée à T_{amb} .

Echantillons	Solubilité dans le CH_3COOH	Viscosité intrinsèque [η] (dL/g)	Poids moléculaire (KDa) (± 80)	DDA % (± 1)
Chit DSB D7- T_{amb}	Insoluble	/	/	54
Chit DSB D12- T_{amb}	Soluble	/	/	64
Chit DSB D16- T_{amb}	Soluble	2.7448	4120	69
Chit DSB D19- T_{amb}	Soluble	2.6750	3975	76
Chit DSB D22- T_{amb}	Soluble	2.6493	3922	79
Chit DSB D26- T_{amb}	Soluble	2.5482	3716	88
Chit DSB D29- T_{amb}	Soluble	2.4437	3506	92
Chit DSB D33- T_{amb}	Soluble	1.5164	1807	97
Chit DSB D36- T_{amb}	Soluble	1.2859	1437	99

✓ Le degré de désacétylation

On constate que le DDA varie progressivement en fonction du temps de désacétylation. Cependant, les DDA obtenus non seulement à 120°C mais aussi à T_{amb} diffèrent d'un échantillon à un autre.

Variation du DDA des chitosanes obtenus à 120°C

- De 74 à 88% pour le chitosane issu de la chitine protéinique avec blanchiment ;
- De 69 à 92% pour le chitosane issu de la chitine déprotéinique avec blanchiment ;
- De 64 à 93% pour le chitosane issu de la chitine protéinique sans blanchiment ;
- De 74 à 97% pour le chitosane issu de la chitine déprotéinique sans blanchiment.

Variation du DDA des chitosanes obtenus à T_{amb}

- De 52 à 92% pour le chitosane issu de la chitine protéinique avec blanchiment ;
- De 48 à 92% pour le chitosane issu de la chitine déprotéinique avec blanchiment ;
- De 66 à 97% pour le chitosane issu de la chitine protéinique sans blanchiment ;
- De 54 à 99% pour le chitosane issu de la chitine déprotéinique sans blanchiment.

La chitine obtenue avec l'étape de déprotéinisation est légèrement plus désacétylée à celle obtenue sans déprotéinisation.

Les échantillons de chitine auxquels nous n'avons pas fait l'étape de blanchiment présentent des DDA plus remarquables.

En résumé, le degré de désacétylation est suffisamment élevé dans tous les cas précités.

✓ La solubilité

La solubilité étant purement spécifique au chitosane, elle a été observée dans presque la totalité des échantillons caractérisés, autant dire que les seuls chitosanes insolubles sont ceux produits à température ambiante pendant les 7 premiers jours de l'hydrolyse et dont les DDA ne dépassent pas 60%. Ainsi donc, l'équilibre de solubilisation ne se produit pas en raison de l'inanité de l'hydrolyse des groupements amines de la chitine.

✓ La viscosité

La viscosité est la grandeur qui nous a conduit à déterminer le poids moléculaire. D'après les résultats obtenus, la viscosité diminue en fonction du temps de réaction. C'est-à-dire plus le DDA est important plus le fluide est liquide.

✓ Le poids moléculaire

Le poids moléculaire est relatif au DDA, à la viscosité et au temps, plus ce dernier augmente, plus le PM diminue.

Lors de la désacétylation à 120°C, le chitosane issu de la chitine non déprotéinée possède un poids moléculaire plus important à celui issu de la chitine déprotéinée. Et encore plus élevé lorsque le blanchiment n'est pas effectué.

Quant à la désacétylation produite à T_{amb} , les chaînes macromoléculaires atteignent des masses élevées à savoir 2000 à 4000 kDa. Comme il a été démontré auparavant par [KADOUCHE, S 2013], [TEZKRATT et BIR, 2018] la température élevée influe sur la longueur des chaînes macromoléculaires par rupture de liaisons.

III.3 Conclusion

Nous avons procédé dans ce travail à la synthèse du chitosane en réduisant les étapes du protocole conventionnel et nous avons abouti à des résultats meilleurs concernant le degré de désacétylation qui avoisine les 95% et la masse des chaînes macromoléculaires qui atteint 4000 kDa.

A première vue, la désacétylation à température élevée nous a permis de produire en peu de temps un chitosane à faible degré d'acétylation et un poids moléculaire considérable, mais à bien considérer les choses, il s'est avéré (comparant au cas où la température est basse) que ce paramètre influe véritablement la dégradation du chitosane, d'où la diminution de son poids moléculaire.

Au terme de ce chapitre, nous avons su optimiser le processus de désacétylation en réduisant ses étapes tout en ayant des résultats prometteurs et économiquement intéressants.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Rappelons que l'objectif principal de ce travail concernait l'hydrolyse de la chitine protéinique et sa caractérisation. L'étude s'intègre dans le cadre de la préservation de l'environnement et du développement du secteur économique car elle contribue, d'une part, à la valorisation des déchets des sous-produits marins plus particulièrement les carapaces de crustacés (ressource naturelle renouvelable). D'autre part, à l'optimisation du processus d'obtention du chitosane en réduisant les dépenses énergétiques au minimum.

Il en ressort de la caractérisation des différents échantillons étudiés les observations et conclusions suivantes :

- ✓ Solubilisation en milieu acide dilué de tous les chitosanes obtenus ;
- ✓ DDA de 74 à 88% pour le chitosane issu à 120°C de la chitine protéinique blanchie et de 64 à 93% pour celle non blanchie ;
- ✓ DDA allant jusqu'à 92% pour le chitosane issu à T_{amb} de la chitine protéinique blanchie et 97% pour celle non blanchie ;
- ✓ Le poids moléculaire de la chitine protéinique désacétylée à 120°C, est plus important (2587- 2594 kDa) à celle déprotéinée (2094- 2569 kDa) quel que soit avec ou sans l'étape de blanchiment.
- ✓ Quant à la désacétylation à T_{amb} les masses de chaînes macromoléculaires sont légèrement plus supérieures pour le chitosane net (sans protéines) que celui déprotéiné, on peut dire ainsi, que la température ambiante favorise la désacétylation.

De manière générale, l'expérimentation menée nous a permis d'obtenir un chitosane aux caractères souhaités en réduisant étape/coût/temps ce qui constitue l'objectif principal des industriels.

Pour conclure, on peut dire que les résultats de notre étude peuvent être qualifiés de très importants pour synthétiser le biopolymère chitosane présentant des propriétés fonctionnelles intéressantes tel que le pouvoir coagulant/floculant indispensable pour le traitement des eaux.

Comme perspectives à nos recherches, il est important de procéder à l'analyse du taux de protéines dans chacun des échantillons de chitine extraite. En effet, la déprotéinisation se faisant par le même réactif, la comparaison entre l'analyse du taux de protéines avant et après la désacétylation nous indique si l'hydrolyse permettrait d'éliminer une quantité importante de protéines.

Références Bibliographiques

Références

- Aljawish A, (2013). Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères.
- Austin P.R. (1984). Chitin solution and purification of chitin. *Method Enzymol.* 163, 403-407
- Blackwell J, (1973). Chitin in: *Biopolymers*. Walton AG Blackwell J. Eds. New York: Academic press 474.
- Braconnot H., (1992). *Ann; Chim; Paris* 79(1811)265.
- Brugnerotto. J; Desbrières. J; Roberts G; Rinaudo. M., Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. *Polymer*, 42 (25), 9921-9927. 2001
- C. Gérente, (2007). VKC. Lee, P. Leclercq, G. McKay. *Critical Rev Environ Scitechnol.*
- Crini G. (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technology.* (97) 1061-1085.
- 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.
- De Alvarenga, E.S., Oliveira, C.P., Bellato, C.R., 2010. «An approach to understanding the deacetylation degree of chitosane». *Carbohydrate Polymères* 80,1155-1160
- Heux L, Brugnerotto J, Desbrieres J, Versali M F, et Rinaudo M, (2000). Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromol*, 1, 746-751.
- Hudson, S.M., Jenkins, D.W.N., 2003. *Chitin and Chitisan in: EPST*. Mark HF, ed. New York: Wiley, 569.
- Kadouche S, (2013). Utilisation des biomatériaux dans le traitement des eaux ; Thèse de Doctorat ; Université Mouloud MAMMERI, Tizi-Ouzou.
- Kasaai, M. R., (2007). «Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data». *Carbohydrate Polymers*, 68, 477-488.
- Kasaai, M. R., J. Arul, S. L. Chin et G. Charlet. 1999. The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. *J. Photochem. Photobiol, A: Chem.*, 120, 201-205.
- Kurita K. (2006). Chitin and chitosan: Function albiopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology.* (8) 203-226.
- Maghami, G. G., and G. A. F. Roberts. 1988. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Die Makromolekulare Chemie*, 189 (1), 195-200.

Références Bibliographiques

- Muzzarelli R A A, (1977). Chitin. Oxford: Pergamompress.
- No, H, K, and Meyers, S.P, (1995). Preparation and characterization of chitin and chitosan. A review. *J. Aquatic Food Prod. Tech.*, 4, 27-52.
- Nystrom B., Kjaniksen A.L. and Iversen C. (1999). Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. *Advances in Colloid and Interface Science*. (79) 81-103.
- Onishi H. and Machida Y. (1999). Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*. (20) 175-182.
- Onsoyen, E. Et Skaugrud, O. (1990). Metal Recovery Using Chitosan, *Journal of Chemical Technolony et Biotechnolony*, 49(2), 395-404. *pharmaceuticalscience*, 3(3), H. S3003-3371. Paramètres agronomiques. Vecteur environnement, 40(4): 48-52.
- Pa J.H. and Yu T.L. (2001). Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics*. (202) 985-991.
- Rao, D.G., 1993. Studies on viscosity-molecular weight relationship of chitosan solutions. *Journal of Food Science and Technology*, 30(1), 66-67.
- Rao S.B. and Sharma C.P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research*. (34) 21-28.
- Rinaudo M, Pavlov G, Desbrières J. (1999). Influenced of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polym*; 40: 7029-7032.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
- Roberts G.A.F. (1992). Chitin chemistry. *London : Macmillan Press*.
- Seng, J.-M. (1988). Chitine, chitosane et dérivés : de nouvelles perspectives pour L'industrie. *Biofutur*, 9, 40-44.
- Shahidi F. and Abuzaytoun R. (2005). Chitin, chitosane, and co-products: chemistry, productions, application, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res.*, 49, 93-135.
- Tezkratt, A. et Bir, I. (2018). Optimisation des paramètres de l'obtention du chitosane et ses applications dans le traitement des eaux de lavage de la station de potabilisation TAKSEBT.
- Varum K.M., Myhr M.M., Hjerde R.J.N. and Smidsrud O. (1997). *In vitro* degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate Research*. (299) 99-101.

Résumé

L'objectif de notre travail est la valorisation des déchets de sous-produits marins (carapaces de crevettes) en vue d'optimiser la production du chitosane par déminéralisation, déprotéinisation, blanchissement puis désacétylation à 45% de NaOH en poids pendant 6 heures à 140⁰C. Par contre la désacétylation a été effectuée à 35% de NaOH en poids, à T_{amb} et 120⁰C. Ces conditions ont permis d'avoir des chitosanes aux différents DDA, caractérisés avec des PM élevés. De plus, l'élimination de l'étape de déprotéinisation a abouti à des chitosanes de meilleures caractéristiques qu'avec déprotéinisation.

Mots clés : Valorisation des déchets, carapaces de crevettes, optimisation, chitosane,

Abstract

The objective of our work is the recovery of marine by-products waste (shrimp shells) in order to optimize the production of chitosan by demineralization, deproteinization, bleaching and deacetylation to 45% NaOH by weight for 6 hours at 140°C. However, the deacetylation was carried out at 35% NaOH by weight, at T_{amb} and 120°C. These conditions allowed to have chitosans with different DDA, characterized with high PM. In addition, the elimination of the deproteinization step resulted in chitosans of better characteristics than with deproteinization one.

Keywords: Waste recovery, shrimp shells, optimization, chitosan,