FRANÇOIS-OLIVIER MARQUIS-DUVAL

ISOLATION ET VALORISATION DES CONSTITUANTS DE LA CARAPACE DE LA CREVETTE NORDIQUE

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences et Technologie des aliments pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

DÉPARTEMENT DES ALIMENTS ET DE NUTRITION FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION UNIVERSITÉ LAVAL QUÉBEC

2008

© François-Olivier Marquis-Duval, 2008

Résumé

La chitine est le polymère le plus abondant sur Terre après la cellulose. Elle est une composante structurelle majeure de l'exosquelette des invertébrés et de la paroi cellulaire des champignons. Le chitosane, la forme désacétylée de la chitine, possède une grande variété d'activités biologiques incluant des propriétés antifongiques et antibactériennes, la stimulation des réactions de défense chez les plantes, des propriétés curatives, d'inhibition de croissance des tumeurs et des effets nutritionnels. Ses propriétés biologie, le textile et le traitement des eaux usées. Les carapaces de crevettes et de crabes sont largement utilisées comme matière première pour isoler la chitine. La préparation de la chitine provenant des carapaces de crevettes requiert la dissolution des minéraux et l'extraction des protéines et des lipides. En effet, les carapaces sont composées de protéines (~49%), de carbonate de calcium et autres sels (~36%), de lipides (~4%) et de chitine (~11%). Dans cette étude, les carapaces de crevettes utilisées étaient partiellement déprotéinées à l'aide d'enzymes.

Les coûts et la sévérité des conditions associées à l'extraction de la chitine et sa transformation en chitosane limitent actuellement sa production. Un réexamen des étapes du procédé d'extraction de la chitine, la déminéralisation et la déprotéination, avec une emphase sur la valorisation des sous-produits extraits en utilisant des conditions plus douces conduiraient à une augmentation de l'utilisation des sous-produits de la crevette réduisant ainsi le problème de gestion de ces sous-produits.

L'optimisation de la déminéralisation s'effectue avec de l'acide chlorhydrique (1N) avec un ratio soluté : solvant de 1 : 10 à température ambiante durant 10 minutes sous agitation. L'extrait minéral est composé principalement de chlorure de calcium (provenant de carbonate de calcium), mais aussi de l'acide phosphorique (provenant du phosphate tricalcique), du chlorure de magnésium (provenant du carbonate de magnésium), de chitosane (provenant de la chitine) et d'autres minéraux mineurs. Le calcium fut précipité sous forme de particules de carbonate de calcium d'un diamètre variant de 50 nm à 10 000 nm de différentes cristallinités (calcite, vatérite, aragonite ou dans un mélange de vatérite et

d'aragonite modifiée) dépendamment de la présence ou de l'absence de SDS et de sonication durant la formation des cristaux. L'étape de déprotéination fut facilitée en augmentant la température de l'extraction. L'extractabilité des protéines augmente en présence de la sonication selon l'énergie fournie et la température mais avec des effets supérieurs à plus de 55°C. Les résultats suggèrent qu'il serait possible de déprotéiner entièrement les carapaces de crevettes à une température plus basse et dans des temps plus courts avec la sonication. Les protéines ainsi extraites seront moins dénaturées que lors d'une déprotéination standard à 100°C. Cette étude montre le fort potentiel d'obtention d'une variété de produits valorisés, en plus de la chitine, provenant des carapaces de crevettes, comparativement à une extraction utilisant des conditions plus sévères.

Abstract

Chitin is the second most abundant natural polymer after cellulose, and is the major structural component of the exoskeleton of invertebrates and cell walls of fungi. Chitosan, the deacetylated form of chitin, exhibits many biological activities including antifungal, antibacterial properties, elicitation of plant defence reactions, wound-healing properties, tumour inhibition and nutritional effects. Its biological and physico-chemical properties make it an attractive biopolymer for applications in many areas such as food and agriculture, medicine, cosmetics, textiles and water treatment. Shrimp and crab shell wastes from the sea food industry are widely used for isolation of chitin. The preparation of chitin from shrimp shells, which is composed of proteins (~49%), calcium carbonate and other minerals (~36%), lipids (~4%) and chitin (~11%), involves dissolution of minerals and removals of proteins and lipids. In this study, shrimp shell was partially deproteinated by enzyme.

The costs and harsh conditions associated with extraction of chitin and its transformation to chitosan currently limit their production. A re-examination of the processing steps, demineralization and deproteination, with a focus on recovering value-added products from shrimp waste using milder conditions can contribute to increased utilization of the waste and reduce the problem of waste disposal. Thus the objectives were: to determine optimal conditions for demineralization and the composition of the mineral extract; to prepare nanoparticulated calcium carbonate from the fractionated mineral extract; and to optimize deproteination with alkaline solution at lower temperatures using sonication.

The optimization of demineralization was carried out with hydrochloric acid (1N) with a ratio solute : solvent of 1 : 10 at room temperature by agitating during 10 minutes. The mineral extract was composed principally of calcium chloride (derived from calcium cabonate in the shell); but also contained phosphoric acid (from tricalcium phophate), chitosan (from chitin), magnesium chloride (from magnesium carbonate), and other minor minerals. The calcium was precipitated as nanoparticles of calcium carbonate in sizes ranging from 50 nm to 10 000 nm in different crystalline morphologies (calcite, vaterite, aragonite or in a mixture of vaterite and modified aragonite) depending of the presence or absence of SDS and sonication during crystal formation. Deproteination step was facilitated

by increasing the temperature of extraction. Extractability of protein increased with increase in sonication energy as well as temperature but with a greater effect above 55°C. Results suggest that it may be possible to deproteinate shrimp shells at lower extraction temperatures and times with sonication. The extracted proteins appear to be less denatured compared that obtained by conventional deproteination at high temperature of about 100°C. This study shows that there is high potential for obtaining various value-added products, in addition to chitin, from shrimp waste, rather than extraction of chitin alone using harsh processing conditions.

Avant-propos

Ce mémoire présente une étude des différents composants qui forment les carapaces de crevettes et suggère différentes façons de les valoriser. La connaissance et la valorisation de ces produits devraient permettre d'extraire la chitine à moindre coût. L'utilisation de la sonochimie afin de faciliter la solubilisation des protéines et de synthétiser des nanoparticules de carbonate de calcium, y est grandement élaborée.

Ce travail n'aurait pu avoir lieu sans l'apport majeur de mon directeur de recherche, Dr Joseph Arul, du département des sciences des aliments et de nutrition, qui m'a permis d'initier ce projet avec toute la latitude désirée. Son aide et ses remarques m'ont permis d'élargir mes champs de connaissance et mon sens critique. Mes sincères remerciements vont aussi à mon co-directeur de recherche, Dr Khaled Belkacemi, du département des sols et du génie agroalimentaire, pour ses suggestions et sa grande disponibilité.

Je remercie aussi tous les professionnels qui m'ont aidé tout au long de ma maîtrise. Je remercie tout particulièrement Ronan Corcuff qui fut une ressource constante et un appui durant les moments les plus difficiles. Merci aussi à Mme Anne-Françoise Allain, Mme Diane Gagnon, M. André Ferland, M. Richard Janvier, Dr Safia Hamoudi et à M. Denis Marcotte pour leur dévouement auprès des étudiants et leur aide technique.

Merci au Dr André Bégin, du Centre de Recherche et Développement des Aliments (St-Hyacinthe, Québec) pour l'examen de ce mémoire et les corrections suggérées.

Je souligne aussi l'aide apportée par tout le personnel du laboratoire pilote que sont Mélanie Martineau, Pascal Cliche, Gaétan Desnoyers et Jocelyne Giasson. Sans leur assistance, plusieurs objectifs n'auraient pu être atteints.

Je salue aussi tous ceux qui m'ont assisté durant mes expérimentations, particulièrement Martin Cauchon, Isabelle Boily et Sindy Dessureault.

Je remercie également la compagnie ABK Gaspésie Inc. pour la préparation du chitane.

Finalement, merci à ma famille pour leur soutien et leur encouragement ainsi qu'à tous mes amis et collègues de travail.

Table des matières

١

Résumé	i
Abstract	.iii
Avant-Propos	v
Table des matières	.vi
Liste des tableauxv	iii
Liste des figuresErreur ! Signet non défin	ni.
Introduction	11
Revue de littérature	14
La chitine	14
Production de la chitine	16
Déminéralisation	16
Déprotéination	18
Valorisation des protéines	18
Valorisation du calcium	20
Sonication	23
Matériel et méthodes	29
Matériel	29
Méthodes	30
Méthodes d'analyse	30
Déminéralisation	34
Déprotéination	36
Résultats et discussion	41
Analyse du Chitane ^{PLUS}	41
Broyage	41
Déminéralisation	42
Optimisation de la déminéralisation	42
Analyse de l'extrait de déminéralisation	45
Valorisation de l'extrait de déminéralisation	50
Déprotéination	62
Optimisation de la déprotéination	62
Influence de l'ajout de traitement de sonication à la déprotéination	65
Changement de conformation de la chitine suite à la sonication	76
Conclusion	79
Bibliographie	82
Annexe 1	88
Annexe 2	89
Annexe 3	90
Annexe 4	91
Annexe 5	92
Annexe 6	93
Annexe 7	94
Annexe 8	95
Annexe 9	96

Annexe 1	10	97
Annexe 1	11	98

Liste des tableaux

Tableau 1 : Sonication dans les technologies alimentaires (Mason, 1996)27
Tableau 2 : Longueur d'onde utilisée en absorption atomique
Tableau 3 : Pourcentage des principaux éléments présents dans le chitane
Tableau 4 : Masse de chitane obtenue dans chaque plateau suite au brovage
Tableau 5 : Teneur en cendre et en calcium du résidu après 30 minutes de déminéralisation
42
Tableau 6 : Influence de la granulométrie sur la déminéralisation * 44
Tableau 7 : Pourcentage massique des atomes trouvés par EDS dans les divers précipités
de l'extrait de déminéralisation 46
Tableau 8 : Masse des différents précipités d'une solution de 100ml de déminéralisation et
leurs proportions lorsque précipités nH 11 (contenant 10 4g/100ml matière sèche)* 48
Tableau 9 · Proportions des différentes substances retrouvées dans l'extrait de
déminéralisation à pH 0.9 (contenant 6.4 g/ 100ml de matière sèche) 49
Tableau 10 : Concentrations de différents minéraux retrouvés dans l'extrait de
déminéralisation à différente nH
Tableau 11 : Synthèse de différentes analyses des cristaux de carbonate de calcium obtenus
en dispersant une solution de CaCle dans une solution de NacCO avec différents
traitements
Tablacu 12 : Deuroentagos des principeux éléments présents deus le abitane déminéralisé 62
Tableau 12 : Fourceinages des principaux elements presents dans le cinitale definiteranse 02 Tableau 12 : Évolution de l'EED à 100°C à différentes concentrations de NoOH et de KOH
Tableau 15. Evolution de l'EEF à 100 C à différences concentrations de NaOH et de KOH
Tablacy 14 : Efficiencité d'autraction des protéines après 60 minutes à 100% dans une
rabieau 14 : Efficacité d'extraction des proteines après do finindes à 100 C dans une
Solution de NaOH 2% selon le ratio solute : solvant
Tableau 15 : Synthese des différents changements subit par la cintine selon différents
Tablacu 16 - Dannées de la figure 6 - tengure en colaium des autroits de déminéralisation
rabieau 10. Donnees de la figure 6. teneurs en calcium des extraits de definiteratisation après différents temps à $25^{\circ}C$ = $35^{\circ}C$ at $45^{\circ}C$
Tablacu 17 : Données de la figure 7 : nourcentages de solide précipité de l'extrait de
déminéralisation salon la nU
Tableau 19 : Données de la figure 15 : officialité d'avtraction des protéines après 1 haure
d'autraction dens une solution NaOH 2% solon la température
Tableau 10 - Dannées de la figure 16 ainétique d'autraction des protéines à 40% 50%
Tableau 19 : Donnees de la figure 16: cinetique d'extraction des proteines a 40°C, $50°C$,
Tableau 20 : Dennées de la figure 17 : ainétique d'autreation des protéines avec seniestion
Tableau 20 : Donnees de la figure 17 : cinetique d'extraction des proteines avec sonication 24.09 c 509 c 100 c 709 c 100 c
a 40°C, 50°C, 60°C el 70°C
Tableau 21 : Donnees de la figure 18 : effet d'un traitement de sonication de différentes
durees a puissance fixe sur l'extraction des proteines
Tableau 22 : Donnees de la figure 19 : effet d'un traitement de sonication de meme duree a
differentes puissances sur l'extraction des proteines
Tableau 23 : Donnees de la figure 20 : effet d'un traitement de sonication d'une intensite
The de differentes durées et de differentes puissances sur l'extraction des proteines96
Tableau 24 : Donnees de la figure 21 : valeurs d'EEP apres sonication de différentes
puissances, temps et intensites à différentes temperatures
Tableau 25 : Donnees de la figure 22 et 25 : variation de l'effet de sonication selon la
temperature et l'energie theorique necessaire à une deproteination complète

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la chitine (1), du chitosane (2) et de la cellulose (3)15
Figure 2 : Etapes de production de la chitine à partir des carapaces de crustacés
Figure 3 : Schématisation de l'implosion asymétrique d'une bulle de cavitation sur une
surface et apparition du micro-jet. (Suslick, 1999)25
Figure 4 : Dispositif de déprotéination du chitane déminéralisé
Figure 5 : Dispositif de sonication pour la formation de CaCO3 et l'extraction des protéines40
Figure 6 : Cinétique de déminéralisation du chitane à 25°C (•), 35°C (•) et 45°C (•)
(valeurs expérimentales : annexe 2)43
Figure 7 : Précipitation des solides de l'extrait minéral de chitane en fonction du pH. (a),
Solides précipités à chaque pH; (•), Cumulatif des solides précipités. (valeurs
expérimentales : voir annexe 3)45
Figure 8 : Spectre infrarouge du précipité de l'extrait de déminéralisation obtenu entre pH
5 et pH 747
Figure 9 : Images MET du carbonate de calcium cristallisé sans traitement à 55°C (a, b)
avec un grossissement de 8 000 X (c), de 100 000 X (d) cristal de calcite isolé grossit
de 300 000 X et (e) spectre de diffraction d'électrons des cristaux55
Figure 10 : Images MET du carbonate de calcium cristallisé avec sonication à 55°C (a)
avec un grossissement de 8 000 X, (b) de 40 000 X, (c) de 100 000 X et (d) de
400 000 X et (e) spectre de diffraction d'électrons des cristaux
Figure 11 : Images MET du carbonate de calcium cristallisé avec surfactant à 55°C (a)
avec un grossissement de 8 000 X, (b) de 40 000 X, (c) de 100 000 X et (d,e) spectres
de diffraction d'électrons des cristaux
Figure 12 : Images MET du carbonate de calcium cristallisé avec sonication et surfactant à
55°C (a) avec un grossissement de 8 000 X. Grossissement des particules rondes (b)
de 40 000 X, (c) de 100 000 X et (d) spectre de diffraction d'électrons des cristaux.
Grossissement d'un amas nodulaire de bâtonnets (e) de 40 000 X (f, g) et de 100 000
X et (h) spectre de diffraction d'électrons des cristaux
Figure 13 : Spectre XRD du carbonate de calcium. a) à 55°C. b) à 55°C avec sonication. c)
à 55°C avec SDS. d) à 55°C avec SDS et sonication. Pics caractéristiques d'aragonite
(A), calcite (C) et vatérite (V)60
Figure 14 : Spectre FTIR des échantillons de carbonate de calcium synthétisés (a) sans
traitement, (b) avec ultrasons, (c) avec surfactant et (d) avec la combinaison
d'ultrasons et de surfactant
Figure 15 : Influence de la température sur l'efficacité d'extraction des proteines dans une
solution de NaOH 2% à durant 60 minutes avec un ratio soluté : solvant de 1 : 20 64
Figure 16 : Cinetique d'extraction des proteines à 40° C (\blacklozenge), 50° C (\blacksquare), 60° C (\triangle) et 70° C (\times)
sans sonication apres 10 minutes de mouillage (Valeurs experimentales : Annexe 5).66
Figure 17: Cinetique d'extraction des proteines à 40°C (\bullet), 50°C (\blacksquare), 60°C (\triangle) et 70°C (×)
avec une sonication de 100 w (60°C et 70°C) et 150 w (40°C et 50°C) après 10
Figure 18 - Effet de l'énergie de conjection d'une durée avaient de 0 à 50 minutes con lIEED
Figure 18 : Effet de l'energie de sonication d'une durée variant de 0 à 50 minutes sur l'EEP $\lambda 40\%$ (a) 50% (b) $\epsilon 0\%$ (c) $\epsilon 170\%$ (c) $\epsilon 170\%$ (c) $\epsilon 150\%$
a 40°C (\blacklozenge), 50°C (\blacksquare), 60°C (\bigtriangleup) et 70°C (\times) (Energie constante de sonication de 150 W
a 40°C et 50°C et de 100 w a 60°C et 70°C) (valeurs experimentales : Annexe /)68

Figure 19 : Effet de l'énergie de sonication sur l'EEP à 40°C (♠), 50°C (■), 60°C (△) et
70°C (×) (Temps de sonication constant de 10 minutes et puissance variant de 0 à 150
W) (Valeurs expérimentales : Annexe 8)69
Figure 20 : EEP suivant une sonication de 90 kJ répartie sur différents temps et différentes
températures (Valeurs expérimentales : Annexe 9)70
Figure 21 : Efficacité d'extraction suite à une sonication de différentes énergies à 40°C (•)
$(y=0,0532x + 43,8 R^2 = 0,96)$, à 50°C (a) $(y=0,0773x + 52,2 R^2 = 0,96)$, à 60°C (a)
$(y=0,0879x + 59,0 R^2 = 0,93)$, et à 70°C (×) $(y=0,1008x + 66,9 R^2 = 0,98)$ (Valeurs
expérimentales : Annexe 10)71
Figure 22 : Gradient de l'efficacité de l'extractabilité des protéines avec l'énergie de
sonication (kJ) en fonction de la température ($y = 0,0014x$, $R^2 = 0,98$) (Valeurs
expérimentales : Annexe 11)73
Figure 23 : Énergie de sonication théorique nécessaire à la déprotéination complète du
chitane (Valeurs expérimentales : Annexe 11)74
Figure 24 : Effet de la température d'extraction sur l'EEP sans sonication (), avec
sonication de 90 kJ (=) et avec sonication de 300 kJ (A)
Figure 25 : Cristallinité de la chitine a) sans post-traitement b) après immersion dans
l'éthanol, c) après traitement aux ultrasons d) après traitement aux ultrasons et
immersion dans l'éthanol77

Introduction

Le marché des fruits de mer est en effervescence depuis une dizaine d'années et celui de la crevette suit la tendance. Malgré les quotas imposés sur plusieurs espèces, l'aquaculture parvient à combler cette forte demande. Mais la gestion des déchets marins est problématique. Dans le cas de la crevette, c'est plus de 75% de son poids qui est rejeté, soit l'équivalant de plus de 16 000 tonnes par année au Québec seulement (MAPAQ, 2004). La gestion de ces déchets engendre des coûts qui se répercutent sur le rendement des entreprises de transformation.

Les solutions actuelles de la gestion des déchets de crevettes sont multiples (Amec, 2003). Certaines entreprises préconisent tout simplement l'enfouissement ou la calcination. Cette façon de procéder est coûteuse, car il faut souvent faire appel à une entreprise externe, et est écologiquement reprochable. Une autre façon, permettant de gérer les résidus de crevette, est leur transformation en compost. Cette façon de procéder, moins polluante, n'amène néanmoins que très peu de revenus à l'entreprise, voir aucun. La transformation des carapaces de crevettes en farine pouvant être utilisée dans l'alimentation animale est une autre méthode de recycler les rejets. Mais cette transformation est coûteuse, peu rentable et donc peu utilisée. En dernier recours, l'usine rejette ses déchets directement à la mer engendrant une pollution organique non-désirée.

La récupération de la chitine est une autre voie qui semble être plus profitable, car ce composé peut être transformé en chitosane qui possède une bonne valeur commerciale. Cette transformation s'effectue habituellement dans une solution d'hydroxyde de sodium de 40% à 50% sous pression, à des températures supérieures à 100°C (No, 1989). Mais le coût onéreux de cette transformation limite la réalisation de cette production à l'échelle industrielle. Afin de rentabiliser la transformation, deux possibilités sont offertes; il faut soit découvrir un procédé moins coûteux, soit valoriser les sous-produits de cette transformation que sont les protéines et les minéraux. De plus, il importe de bien optimiser les procédés d'extraction afin de réduire les coûts en produits chimiques. Une bonne optimisation permet aussi de pratiquer une chimie plus « verte » en abaissant la nocivité des effluents.

Les minéraux extraits lors de la déminéralisation des carapaces de crevettes pourraient être valorisés, mais très peu de recherches ont été effectuées dans ce sens. Le chlorure de calcium aqueux peut être converti en carbonate de calcium par l'ajout de carbonate de sodium. Ce sel brut de calcium possède une très faible valeur commerciale, mais la production de nanoparticules de carbonate de calcium pourrait être une alternative. Cellesci possèdent une grande surface spécifique exposée au milieu, ce qui leur confère des propriétés différentes par rapport au carbonate de calcium natif. Elles peuvent être utilisées dans plusieurs domaines comme dans l'industrie des polymères en tant d'agent de remplissage (Othmer, 2001).

Dans le contexte actuel de production de la chitine, la valorisation des protéines est limitée, car l'utilisation de températures supérieures à 60°C les dénature. Une déprotéination complète ou partielle à plus basse température est donc nécessaire afin de garder les protéines dans leur état natif. Les protéines peuvent par la suite être valorisées comme agent texturant ou hydrolysées pour en faire des exhausteurs de goût. Les protéines ainsi extraites possèdent un profil en acides aminés intéressant du point de vue nutritionnel (Synowiecki et al., 2003).

Afin de faciliter l'extraction des protéines, il importe de trouver un moyen permettant leur libération de la matrice de chitine pour qu'ils puissent se solubiliser. Pour ce faire, le solvant doit d'abord mouiller complètement la chitine afin d'obtenir un gonflement maximal de celle-ci. Les hautes températures sont couramment utilisées mais les protéines ainsi extraites sont dénaturées thermiquement diminuant ainsi leur valeur.

La sonication consiste en l'utilisation d'ultrasons dans le but de provoquer le phénomène de cavitation dans le solvant. C'est un procédé nouvellement utilisé dans le domaine alimentaire. L'implosion de la cavitation formée permet de générer à des endroits localisés une température de 5000°C et une pression de 1000 atmosphères (Mason, 1990) en plus de perturber les surfaces adjacentes par un micro-jet de haute vélocité et par l'onde de choc résultant de l'implosion (Suslick et Prince, 1990). Le phénomène facilite généralement plusieurs réactions physiques, tel que l'extraction des polysaccharides (Hromadkova et Ebringerova, 2003) et chimiques tel que la préparation de complexe carbonyle ferreux (Low, 1995) et pourrait faciliter la solubilisation des protéines des carapaces de crevettes.

Ce mémoire traite de l'optimisation de la déminéralisation et de la déprotéination du chitane, un résidu de carapaces de crevettes partiellement déprotéiné enzymatiquement, dans le but d'obtenir de la chitine de plus haut degré de pureté possible dans un court délai tout en utilisant un minimum de produits chimiques. L'utilisation de la sonication, afin de faciliter l'extraction des protéines et de synthétiser du carbonate de calcium nanoparticulaire, est aussi traitée. Une étude approfondie de chaque étape permet d'avoir une meilleure connaissance des sous-produits dans le but de les valoriser.

Revue de littérature

La chitine

La chitine est un polymère formé d'une répétition d'unités de N-acétyl-D-glucosamine. C'est le second composé organique le plus abondant, après la cellulose, sur la Terre (Muzzarelli, 1977). En fait, la seule différence entre les deux polymères au niveau moléculaire est la présence du groupement acétylamine en position -2- dans la chitine qui remplace le groupement alcool retrouvé dans la cellulose.

La présence d'un groupement amine sur les oses de la chaîne fait de la chitine et du chitosane, son produit de transformation, les seuls sucres cationiques. Le chitosane se distingue de la chitine par l'élimination du groupement acétyle (figure 1). Ce changement expose la fonction amine qui peut ainsi accepter un proton et devenir chargée positivement. Cette modification permet au chitosane d'être soluble dans des solutions de pH inférieur à 6,2. La frontière entre la chitine et le chitosane n'est pas bien définie puisque la chitine contient souvent certains groupements désacétylés et vice-versa pour le chitosane. Une des caractéristiques pour distinguer les deux polymères est le degré de désacétylation nécessaire pour permettre une solubilisation du chitosane dans une solution acide qui est autour de 50% (Lévesque, 1995). D'autres n'appellent chitosane que les polymères de chitine désacétylés à plus de 75% (Khan, 2002)

On retrouve la chitine dans les carapaces des animaux marins invertébrés, tels la crevette et le homard, les carapaces des insectes de même que dans les champignons et les levures (Rinaudo, 2006). La chitine, combinée à du carbonate de calcium et à certaines protéines, forment un exosquelette solide pour plusieurs invertébrés. Celui-ci est composé généralement de 30%-40% de protéines, de 30%-50% de carbonate de calcium et de 20%-30% de chitine sur une base sèche (Percot et al., 2002). Dans sa structure, la chitine est souvent liée aux autres constituants majeurs de la carapace, formant des liens covalents avec les protéines et une matrice complexe renfermant du carbonate et du phosphate de calcium (Muzzarelli, 1977). La présence de certains pigments, particulièrement de l'astaxanthine, donne la couleur rose-orangée des carapaces.



Figure 1 : Structure de la chitine (1), du chitosane (2) et de la cellulose (3)

La chitine se retrouve naturellement sous 3 formes polymorphes (α , β et γ) qui diffèrent selon l'arrangement des chaînes (Poirier, 2000; Rinando, 2006). La chitine- α , dont les chaînes sont antiparallèles, est la plus stable et la plus abondante dans la nature. Sa structure est formée par le repliement des chaînes de chitine sur elles-mêmes. Contrairement à la chitine- β , la chitine- α est beaucoup plus cristalline (Lavall, 2007) et présente une seconde bande amide I près de 1660 cm⁻¹ en spectroscopie infrarouge (Sun, 2006). La présence de plusieurs liens hydrogène inter-chaînes parallèles amène la formation de feuillet. D'autres liaisons hydrogènes inter-feuillets provoquent une résistance au gonflement dans l'eau. C'est cet arrangement de la chitine qui donne sa cristallinité.

La chitine est extraite de la carapace de crevettes principalement pour la transformer en chitosane. On retrouve aujourd'hui une multitude d'applications au chitosane dans plusieurs domaines. Il possède des propriétés antibactériennes et antifongiques pouvant être mises à profit tant en agriculture qu'en alimentation (No et al., 2002, Shanidi et al., 1999). Des films à base de chitosane peuvent être appliqués sur des aliments afin de préserver leur intégrité (de Britto et de Assis, 2007). Le chitosane sert aussi d'immunostimulateur, d'agent antifongique et de chélateur de métaux (Gamage et Shahidi, 2007), de gras et d'autres matières organiques (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003), éliciteur de réactions de défense chez les plantes (el-Ghaouth et al., 1994), employé dans la lutte contre le cancer (Mitra et al., 2001) pour ne nommer que ceux-ci.

Production de la chitine

La grande disponibilité des carapaces de crevettes et leur teneur élevée en chitine en font la source principale de ce produit. L'extraction de la chitine de la carapace nécessite au moins deux étapes distinctes lorsque l'on procède par méthode chimique : la déminéralisation en milieu acide et la déprotéination en milieu basique. Ces deux processus peuvent être effectués dans n'importe quel ordre, mais l'efficacité de la réaction effectuée en premier est toujours moindre. Pour obtenir un produit possédant un minimum de protéines, il est préférable de déminéraliser d'abord puis d'effectuer la déprotéination. Bien que la chitine soit résistante aux acides et aux bases, celle-ci peut être légèrement détériorée par les deux traitements (Percot et al., 2002).

Déminéralisation

La déminéralisation de la chitine s'effectue habituellement avec une solution d'acide diluée, généralement du HCl, afin de transformer les minéraux non solubles de la carapace en sels solubles. Le carbonate de calcium, principal composé minéral de la carapace, réagit avec le HCl pour former du chlorure de calcium, de l'eau et du gaz carbonique comme décrit dans la réaction suivante :

$$2 \operatorname{HCl}_{(aq)} + \operatorname{CaCO}_{3(s)} \longrightarrow \operatorname{CaCl}_{2(aq)} + \operatorname{H}_2O_{(l)} + \operatorname{CO}_{2(g)}$$

La plupart des autres minéraux présents réagissent de façon similaire et donnent des sels solubles en présence d'acide. Les sels formés peuvent être séparés de la chitine par simple filtration suivie de lavage. Une grande quantité de mousse est produite durant la déminéralisation résultant du dégagement du gaz carbonique. La vitesse d'expansion de la mousse produite dépend de la vitesse de la réaction de déminéralisation et peut conduire au débordement du milieu réactionnel. L'ajout d'un agent anti-moussant permet une libération plus constante du gaz limitant le risque de débordement de la solution (No et Hur, 1998).

Le ratio soluté : solvant optimal dépend de la concentration de l'acide utilisé, sachant qu'il faut deux molécules de HCl pour transformer une molécule de carbonate de calcium en chlorure de calcium. L'apport en acide doit nécessairement être égal ou supérieur stoechiométriquement à la quantité de minéraux présents afin d'avoir une réaction complète (Shahidi et Synowiecki., 1991). Néanmoins, les minéraux sont souvent difficiles à éliminer et l'utilisation d'un plus grand volume de solution acide ou d'une solution plus concentrée est souvent utilisée. On retrouve ainsi dans la littérature plusieurs méthodes d'optimisation de la déminéralisation, principalement l'utilisation d'une solution HCl 1N à un ratio de 1 :15 (No et Hur, 1989) et celle utilisant une solution HCl 1,5N à un ratio de 1 :10 (Lévesque, 1995).

D'autres facteurs peuvent aussi influencer la réaction dont le facteur temps-température. Une température plus élevée accélère la réaction qui nécessite donc moins de temps et permet une meilleure pénétration du solvant dans la matrice de chitine. La pénétration du solvant dans la matrice est aussi influencée par la taille des particules de chitine. Généralement, la réaction se termine avec la disparition du dégagement gazeux. (Lévesque, 1995). Suite au traitement, la poudre doit être lavée et filtrée jusqu'à l'obtention d'un résidu neutre. La neutralisation est importante, car l'acide résiduel dans la matrice sèche sera concentré et pourra endommager la chitine.

Déprotéination

La déprotéination de la chitine consiste à solubiliser les protéines présentes dans la matrice de chitine dans une solution aqueuse. Elle peut être effectuée de façon douce ou sévère. Les méthodes douces utilisent des enzymes qui dégradent les protéines en peptides solubles dans l'eau. Ces méthodes sont peu coûteuses, mais ne permettent pas l'élimination complète des protéines. L'emploi de soude à température élevée est généralement utilisé pour solubiliser une plus grande partie des protéines. Plusieurs études font état de divers protocoles afin d'optimiser le processus (Percot et al., 2002, Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). Mais aucun procédé n'est parvenu à éliminer entièrement les protéines dans une période inférieure à six heures. Dans les meilleurs cas, il reste toujours quelques résidus protéiques attachés à la chitine. Il semble que les liens entre les protéines et la chitine diffèrent d'une espèce à l'autre et que le traitement doit varier. Dans ces tests d'optimisation, seuls le temps, la température, la concentration de base et le ratio soluté : solvant de chitine sont étudiés. L'ajout de co-solutés facilitant la solubilisation des protéines, tels certains sels chaotropiques, n'est mentionné dans aucun ouvrage.

La déprotéination sous pression à plus de 100°C a été effectuée à l'aide d'un autoclave (Cho et No, 1999) et dans un cuiseur (Boucher, 1991) ce qui a permis de solubiliser les protéines en 15 et 10 minutes respectivement. La chitine obtenue était comparable à celle obtenue à pression atmosphérique en ce qui a trait à la teneur en azote et à la densité.

Valorisation des protéines

Les protéines extraites peuvent être récupérées et valorisées si les conditions utilisées ne sont pas trop sévères. Une déprotéination à haute température dénature les protéines qui perdent leurs propriétés fonctionnelles. L'utilisation d'enzymes, comme l'Alcalase®, pour déprotéiner de façon douce permet d'extraire un maximum de 90% des protéines qui peuvent être valorisées sous forme d'hydrolysat (Synowiecki et Al-Khateeb, 2000, Gildgerb et Stenberg, 2001). Ces protéines ont un bon indice en acides aminés essentiels (46%) et un coefficient d'efficacité protéique de 2,74 (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). Elles peuvent être utilisées comme agents de remplissage et comme suppléments protéiques. L'hydrolysat peut être employé comme agent flavorisant (Aye et Stevens, 2004).





Valorisation du calcium

Aucune étude ne rapporte la valorisation du chlorure de calcium extrait lors de la déminéralisation. Une façon rentable serait de le transformer sous forme de carbonate de calcium nanoparticulaire de taille inférieur à 100 nm. La transformation du chlorure de calcium en carbonate de calcium peut s'effectuer de deux façons, par carbonatation ou par échange d'ions, selon les réactions suivantes :

Carbonatation (réaction globale):

 $CaCl_{2(aq)} + CO_{2(g)} + 2 \text{ NaOH}_{(aq)} \longrightarrow CaCO_{3(s)} + 2 \text{ NaCl}_{(aq)} + H_2O_{(l)}$

Double décomposition :

 $CaCl_{2(aq)} + Na_2CO_{3(aq)} \longrightarrow CaCO_{3(s)} + 2 NaCl_{(aq)}$

Le carbonate de calcium possède 3 formes cristallines stables : la calcite, l'aragonite et la vatérite (Dupont et al., 1997). La formation de ces différentes formes dépend des conditions du milieu que sont le pH, la présence d'autres cristaux, la présence de polymères ou de surfactants, la température, la force d'agitation et la présence de gaz dissout. La plus connue est la calcite qui forme près de 4% de la croûte terrestre. Celle-ci cristallise sous forme rhomboédrique et donne des cristaux hexagonaux. C'est la forme la plus utilisée industriellement car la plus facile à obtenir. Les cristaux bruts extraient de mines sont concassés en granules de 4 cm de diamètre puis broyés dans un moulin afin de donner une poudre au diamètre variant entre 5 et 10 μ m (Kirk-Othmer, 2001). Le degré de pureté dépend surtout du gisement d'où elle est extraite et varie habituellement entr 90% et 98%. La poudre est utilisée dans la fabrication du papier, du ciment et peut être additionnée à la peinture.

L'aragonite est le polymorphe du carbonate de calcium formé à haute température et à haute pression, limitant sa présence à l'état naturel. Elle est stable à des conditions normales d'entreposage, mais se dégrade en calcite lorsque chauffée à plus de 400°C. Elle se présente sous forme de bâtonnets formés de cristaux orthorhombiques. Plus dense et plus résistant que la calcite, c'est la forme de carbonate de calcium possédant la plus

grande valeur. Bien que pouvant être synthétisée de plusieurs méthodes, seule la carbonatation est utilisée industriellement aux États-Unis pour sa fabrication. En fonction des méthodes utilisées, les particules formées varient de 0,03 µm à quelques microns. L'aragonite est utilisée dans l'industrie du papier comme agent d'enrobage, dans l'industrie des polymères comme agent de remplissage et dans les peintures de haute qualité.

La vatérite est la forme cristalline la moins stable et n'est généralement produite que dans des conditions de laboratoire. Elle nécessite une formation très lente des cristaux et un pH neutre de la solution. Elle se présente sous forme de « fleurs » ou de lentilles et présente un réseau cristallin hexagonal. Elle se transforme en calcite lorsque chauffée à 400°C et lorsque laissée en milieu aqueux. Elle n'est pas employée en milieu industriel vue sa rareté et son instabilité.

L'analyse des différentes structures de carbonate de calcium s'effectue essentiellement par diffraction des rayons-X (XRD), par diffraction des électrons (ED) et par spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (FTIR). (Dupont et al., 1997, Zhou et al., 2004) Le FTIR permet d'identifier les différents types de liaison à l'intérieur des cristaux. Ceux-ci varient dépendamment si l'échantillon est sous forme de calcite, d'aragonite ou de vatérite. Les analyses XRD révèlent la présence des différents plans structurels des minéraux. Les analyses ED permettent de visualiser la structure des cristaux.

La formation de nanoparticules de carbonate de calcium peut s'effectuer selon plusieurs méthodes incluant l'inhibition de la cristallisation avec différents surfactants. Certaines études ont utilisé un surfactant anionique (Wei et al., 2004), cationique (Yu-Hung et Yeh, 2002), un mélange anionique et cationique (Yu et al., 1997) ou non-ionique (Wang et al., 2003; Lee et al., 2002). La présence de surfactants dans le milieu réactionnel vient perturber la croissance des cristaux en formant une couche autour de ceux-ci. Deux solutions, l'une de CaCl₂ et une autre de Na₂CO₃, sont mélangées pour former le carbonate de calcium. Le surfactant est préalablement dispersé dans l'une des deux solutions ou dans les deux solutions. Le mélange est effectué tranquillement afin d'éviter la formation de particules amorphes ou métastables. La grosseur des particules résultantes varie de quelques nanomètres à près de 500 nanomètres dépendamment des particules formées, du

type de surfactant employé (anionique, cationique, neutre, mélange) et de la méthode utilisée (vitesse d'incorporation, température, concentration en sel des solutions). Cette façon de procéder est simple et peut facilement être transférable à grande échelle.

Une autre méthode répandue est l'utilisation d'une microémulsion d'eau dans un liquide non-polaire. Les microémulsions, contrairement aux émulsions conventionnelles, sont plus stables dans le temps puisque les micelles présentes sont de tailles plus petites. Cette particularité permet d'isoler les réactifs en faible quantité. Deux microémulsions, l'une de CaCl₂ et l'autre de Na₂CO₃ sont mélangées. Les surfactants utilisés pour la formation des microémulsions sont choisis afin de permettre une coalescence des micelles contenant des sels différents. La coalescence de deux micelles contenant respectivement du CaCl2 et du Na₂CO₃ permet de limiter la croissance des cristaux par le nombre de molécules présentes dans celles-ci (Rauscher et al., 2005). Un mélange eau-cyclohexane-Marlipal® O13/40 peut être utilisé pour créer les deux émulsions. Des particules de deux à six nanomètres sont ainsi formées. L'injection de CO2 dans une microémulsion contenant des gouttelettes d'une solution de Ca(OH)2 est une autre façon de fabriquer des nanoparticules (Karagiozov et Momchilova, 2005). La microémulsion utilisée est constituée d'une solution aqueuse alcaline et d'hexane. Cette méthode permet de former des particules de 20 nm à 30 nm. Ces façons de procéder restent cependant fastidieuses à reproduire à grande échelle, car les microémulsions sont complexes à réaliser et la production ne pourra pas se faire en continu.

La carbonatation à l'aide de CO₂ supercritique est une autre méthode de fabrication de nanoparticules (Domingo et al., 2004). Cet état de matière permet une distribution plus rapide des molécules accélérant la réaction. Cette distribution favorise davantage l'apparition de plusieurs noyaux de cristaux au détriment de leur croissance. Néanmoins, l'utilisation de cette méthode seule ne permet pas la formation de nanoparticules proprement dite, car leur taille est de l'ordre de 2000 nm. La carbonatation à l'aide de terpinol, un agent diminuant la tension superficielle des bulles de CO₂, permet de fabriquer des nanoparticules d'une grosseur variant entre 90nm et 120nm (Xiang et al., 2004).

La fabrication de nanoparticules peut aussi être effectuée à l'aide de la sonichimie (Wang et al., 2002, Mizukoshi, 2001). La sonication permet de créer à des endroits localisés une

température supérieure à 5000K et une pression supérieure à 1000 atmosphères (Mason, 1990). Dans ces conditions, les particules solides sont pulvérisées pour ne laisser que des nanoparticules. La grosseur des particules obtenues varie entre 1 nm et 20 nm. De plus, la sonication permet une accélération de la nucléation des cristaux au détriment de leur croissance (Virone et al., 2006). Cette méthode est encore très peu utilisée malgré son fort potentiel car le coût du sonicateur limite son utilisation à l'échelle industrielle.

Sonication

La sonication, décrite précédemment pour la fabrication de nanoparticules, est le terme utilisé pour décrire un phénomène de cavitation causé par des ultrasons dans un milieu liquide. Les sons sont le résultat d'une succession de hautes et de basses pressions suite à une vibration. On distingue les ultrasons des sons audibles par leurs fréquences supérieures à 16 kHz. Durant une sonication, les ultrasons sont produits par la vibration très rapide d'un corps (Suslick et Prince, 1999). Dans un milieu liquide, le son circule de la même facon que dans l'air, provoquant une compression et une expansion du liquide. Lorsque la pression négative est inférieure à la pression de vapeur du liquide, il y a cavitation. Dans un liquide pur, la tension de surface est telle qu'il faudrait une pression négative de 1000 atmosphères pour créer une bulle de cavitation (Suslick et al., 1989). Puisque les pressions négatives créées par les ultrasons ne sont que de 50 atmosphères, les bulles de cavitation ne peuvent donc apparaître que dans les creux d'énergie potentiel comme près des impuretés et des imperfections sur les parois. Dans ces conditions, le liquide se vaporise pour donner naissance à une bulle (ou cavité). Si l'intensité acoustique est trop élevée, la bulle formée sera tellement grosse qu'elle ne fera que migrer vers le haut sans être affectée par les fréquences suivantes. Avec une intensité plus basse, les bulles formées seront plus petites. Normalement, les gaz dans ces bulles devraient se redissoudre dans le liquide, mais leur absorption continue d'énergie durant l'irradiation aux ultrasons ne les fera qu'osciller. Ces gaz subiront des compressions durant les phases de haute pression et des expansions durant les phases de basse pression. Lors des hautes pressions, les bulles perdent de la matière par diffusion réduisant leur volume. À la dépression suivante, une partie de la vapeur formée et du gaz dissout diffuseront dans la cavité faisant légèrement augmenter son volume. Le taux de diffusion est toujours proportionnel à la superficie de la cavité.

Cette dernière, étant toujours plus grande lors des dépressions acoustiques que lors des compressions, permet une plus grande diffusion des gaz dans la bulle durant les basses pressions qu'à l'extérieur de la bulle lors des hautes pressions. Ce mouvement du gaz est nommé diffusion rectifiée et conduira provoquera l'augmentation du volume des bulles à chaque cycle. Ce cycle d'expansion et de contraction de répétera durant un moment (de 100 µs à 500 µs) jusqu'à ce que la bulle atteigne un diamètre critique où elle sera en résonance avec l'ultrason permettant un maximum d'absorption d'énergie. Pour une intensité acoustique de 20 kHz, ce diamètre est d'environ 170 µm (Suslick, 1999). Au diamètre de résonance, la cavité croîtra très rapidement lors de la dépression. À la compression suivante, la bulle sera trop grosse pour que les forces de tension de surface de la bulle puissent maintenir l'intégrité de celle-ci face à la pression hydrostatique. La bulle implosera et le liquide affluera dans celle-ci.

La compression du gaz et de la vapeur génère de la chaleur. Dans le cas de l'implosion d'une bulle par cavitation, la compression s'effectue dans un laps de temps très court et ne permet pas les transferts thermiques. L'implosion d'une bulle par cavitation s'effectue donc dans des conditions pratiquement adiabatiques. Durant l'implosion, les gaz se compriment en un point dans la cavité. À ce point, nommé point chaud, la compression fait augmenter la température du gaz à 5000°C et génère une pression de 1000 atmosphères (Mason, 1990). Ces conditions extrêmes ne durent qu'une fraction de seconde et n'affectent que les molécules environnantes dans un rayon d'environ 200 nm avec une perte en énergie proportionnelle à l'éloignement du point chaud.

Dans un liquide pur ou dans une solution contenant des particules plus petites que 200 µm de diamètre, l'implosion s'effectue de façon sphérique au centre de la bulle de cavitation. Les fines particules sont alors projetées les unes contres les autres par l'onde de choc de l'implosion(Doktycz et Suslick, 1990). Près d'une interface liquide-solide, où le solide mesure plus de 200 µm de diamètre, la bulle implose de façon asymétrique vers le solide. Un jet de liquide se développe à l'opposé du solide, pénètre dans la bulle pour ressortir et frapper le solide à une vélocité de 100 m/s (figure 3). Un tel impact sur le solide lui cause des dommages en creusant et en érodant sa surface. D'autres dommages au solide

subviennent suite à l'onde de choc de l'implosion (Suslick, 1989). L'importance relative des deux actions sur la détérioration du solide reste encore à déterminer.

Plusieurs facteurs affectent la sonochimie, mais les trois principaux sont la température du liquide, le type de liquide et le gaz dissout. La température du liquide influe sur la quantité de vapeur formée lors des dépressions. Plus la température est élevée, plus il y aura de vapeur formée. Ce surplus de vapeur amortit l'implosion, diminuant ses effets. Les réactions sonochimiques sont d'autant plus violentes que la température est basse.



Figure 3 : Schématisation de l'implosion asymétrique d'une bulle de cavitation sur une surface et apparition du micro-jet. (Suslick, 1999)

La tension superficielle est une propriété caractéristique à chaque liquide. Plus la tension superficielle d'un liquide est élevée et plus le seuil de cavitation l'est aussi. Une énergie plus grande est donc nécessaire pour créer le phénomène de cavitation dans l'eau comparativement à l'éthanol. La sonication pet provoquer la formation radicaux libres (H• et HO• pour l'eau). La recombinaison de ces radicaux peut former des produits toxiques limitant l'utilisation de la sonochimie (formation de Cl₂ à partir du CCl₄ par exemple).

Le type de gaz dissout influence le transfert de chaleur au liquide. Le xénon, par exemple, conduit la chaleur très médiocrement. Le transfert de chaleur lors de l'implosion sera donc pratiquement nul, concentrant la chaleur dans le point chaud. Au contraire, l'hélium permet un transfert de chaleur très efficace. Le processus d'implosion ne s'effectue alors plus dans des conditions adiabatiques, diminuant l'intensité des réactions sonochimiques.

Dans le domaine alimentaire, l'utilisation de la sonochimie n'est qu'à ses débuts, mais déjà ses applications sont très variées (Tableau1). L'augmentation de l'activité cellulaire induite par la sonication de basse puissance permet de réduire le temps de production du yogourt de 40%. De la même façon, la germination des fèves et des grains de riz a pu être accélérée. À plus haute puissance, il y a lyse des cellules. La sonication peut donc être combinée à un traitement de chaleur afin d'effectuer une pasteurisation à plus basse température. L'activité enzymatique, surtout si les enzymes sont immobilisés, est aussi accélérée avec un traitement aux ultrasons de basses puissances mais est inhibée à haute puissance. À basse puissance, les substrats seraient amenés plus rapidement à l'enzyme alors qu'à haute puissance, la conformation de l'enzyme serait affectée (Mason, 1996).

L'isolation des substances pures d'un aliment peut aussi être réalisée à l'aide de la sonication. La combinaison d'un traitement de sonication à une extraction de l'huile de soya à l'aide de solvant permet une augmentation du rendement de 50%. Les ultrasons causent l'apparition de lésions dans les flocons de soya permettant au solvant de pénétrer plus en profondeur et de solubiliser l'huile (Li et al., 2004). La combinaison d'ultrasons à l'extraction de l'hémicellulose des graines de sarrasin permet une augmentation du rendement de 50%. Cette fois encore, la sonication permet un meilleur contact entre le milieu et la substance à extraire. De plus, l'hémicellulose recueillie contenait beaucoup moins de traces de protéines lorsque l'extraction était assistée par sonication (Hromadkova

et Ebringerova, 2003). D'autres extractions de matériels ont aussi pu être améliorées avec un traitement aux ultrasons comme l'amidon et la pectine. (Wang et al.; 2003, Panchev et al., 1988)

Applications	Effet
Cellules vivantes	Stimulation de leurs activités
	Destruction sonochimique
Enzymes	Stimulation de leur activité
	Dénaturation contrôlée
Surfaces	Imprégnation accrue
	Extraction accrue
Traitement des viandes	(Favorise l'exsudation)
Cristallisation et congélation	(Favorise l'apparition de cristaux)
Émulsions	(Favorise la stabilité des émulsions)
Filtration et séchage	(Permet l'agglomération des fines particules et les maintiens en suspension)
Traitement des grains de riz	(Favorise l'hydratation)

Tableau 1 : Sonication dans les technologies alimentaires (Mason, 1996)

Dans le contexte économique actuel, les coûts de l'isolation de la chitine limitent son exploitation à grande échelle. Celle-ci requiert beaucoup d'énergie, de temps et elle génère plusieurs polluants. Les protéines extraites ont peu de valeur puisqu'elles ont été dénaturées thermiquement. Afin de rentabiliser le processus et permettre une exploitation à grande échelle de la chitine, il importe de trouver une méthode de fabrication plus douce, nécessitant moins de temps et d'énergie. Les extraits de minéraux et de protéines devraient pouvoir être valorisés afin d'amortir le coût de la production.

L'hypothèse de cette recherche est que le développement de nouvelles méthodes de déminéralisation et de déprotéination des carapaces de crevettes permettra de valoriser les sous-produits de la production de chitine tout en facilitant son extraction.

Donc, l'objectif général de cette recherche est d'isoler et de valoriser les constituants de la carapace de la crevette nordique.

Les objectifs spécifiques sont donc de:

- Déterminer les conditions optimales de déminéralisation de la chitine.
- Déterminer la composition de l'extrait de déminéralisation dans le but d'en valoriser le principal constituant, le CaCl₂.
- Former du carbonate de calcium nanoparticulaire à l'aide de surfactant et de la sonication.
- Déterminer les conditions optimales de déprotéination de la chitine avec et sans sonication.

Matériel et méthodes

Matériel

Le Chitane^{PLUS} (chitane), de même que les résidus de carapaces de crevettes brutes, proviennent de OrganicOcean, une filiale de Aqua-Biokem BSL (Rimouski, Qc). Le chitane est un résidu de crevettes partiellement déprotéiné par hydrolyse enzymatique. Il est livré sous forme de flocon d'un diamètre maximal de trois centimètres. L'acide chlorhydrique, la soude caustique et les différents sels utilisés proviennent de Fisher Scientific (Montréal, Qc).

L'ultrasonicateur provient de la compagnie Branson Ultrasonics Corporation (Danbury, CT). Le générateur est un modèle 450 Sonifier® et transforme le courant alternatif en énergie électrique de 20kHz. L'énergie électrique de haute fréquence est transformée en vibration mécanique dans le convertisseur grâce un élément piézo-électrique formé de céramique de plomb-zirconium-titane. Les vibrations sont transmises longitudinalement vers une sonde de 12mm de diamètre dont l'extrémité est interchangeable. La puissance fournie par l'appareil est déterminée selon une charte en fonction du rendement (output) et de la position du rhéostat. Les traitements sont effectués dans une cellule de verre de refroidissement Rossett à double paroi. La température de la réaction est contrôlée à l'aide d'un bain de refroidissement d'une capacité de 3 litres.

Le broyeur à disque est un modèle C/11/1 de la compagnie Glenmills (Clifton,NJ). L'analyseur d'azote est un modèle FP-528 de la compagnie LECO (Missisauga, Ont.).

Le spectromètre d'absorption atomique est un modèle A Analyst 200 de la compagnie Perkin Elmer (Waltham, MA). Le spectromètre infrarouge à transformation de Fournier est un modèle Magna-IR 560 de la compagnie Thermo-Nicolet (Madison, WI).

Le microscope électronique à balayage couplé avec un détecteur spectroscopique d'énergie dispersive (EDS) est un modèle JSM-840A de la compagnie JEOL (Tokyo, Japan). Le microscope électronique utilisé est de modèle JEOL JEM 1230 de 80 kV(Japon) muni d'une caméra Gatan DualVision pour l'analyse de la diffraction des électrons. Le système

de diffraction rayon-X est un modèle Rigaku Ultima III (Japon). La longueur d'onde de 1,5406Å est formée à partir du Cu Kα.

Méthodes

Méthodes d'analyse

Humidité

La détermination de la teneur en eau s'effectue en chauffant 3 g d'échantillon en duplicata dans un four à vide à 105°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Chaque échantillon est placé dans un creuset en porcelaine préalablement pesé. Les échantillons sont refroidis dans un dessiccateur pendant 1 heure avant d'être pesés sur une balance avec une précision de 0,1mg. La teneur en humidité est évaluée selon la formule suivante :

% Humidité = $\frac{Poids humide (g) - Poids de l'échantillon sec (g)}{Poids de l'échantillon humide (g)} x 100$ (1-1)

Teneur en cendres

La teneur en cendres est déterminée en calcinant en duplicata 3 g d'échantillon séché pendant huit heures à 500°C avec une augmentation graduelle de la température de 3°C par minutes. Chaque échantillon est placé dans un creuset en porcelaine préalablement pesé. Les échantillons calcinés sont refroidis dans un dessiccateur pendant 1 heure avant d'être pesés sur une balance avec une précision de 0,1 mg. La teneur en cendres est évaluée selon la formule suivante :

$$% Cendres = \frac{Poids \, du \, résidu \, calciné \, (g)}{Poids \, de \, l'échantillon \, sec \, (g)} \, x \, 100 \tag{1-2}$$

Teneur en minéraux

Le dosage des minéraux s'est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique selon une longueur d'onde spécifique à chacun (tableau 2).

Minéraux	Longueur
	d'onde (nm)
Ca	422,7
Co	240,7
Cr	357,9
Cu	324,8
Fe	248,3
Mg	285,2
Mn	279,5
Ni	232,0
Zn	213,9

Tableau 2 : Longueur d'onde utilisée en absorption atomique

Les échantillons sont préparés soit en dissolvant les cendres dans 10 ml de HCl 0,5N ou directement à partir de la solution de déminéralisation. Les échantillons doivent être dilués avec de l'eau afin d'obtenir des solutions d'une concentration en minéraux se situant entre 2 mg/l et 20 mg/l pour le calcium et entre 0,2 mg/l et 2 mg/l pour les autres minéraux afin de pouvoir les analyser. Pour les analyses du calcium et du magnésium, 1% d'oxyde de lanthane a dû être ajouté afin d'empêcher la précipitation des sels de phosphate lors des analyses. Les résultats sont donnés en mg/l de minéraux en solution.

Teneur en lipides

La teneur en lipides totales est déterminée par la méthode de Folch modifiée (Eymard, 2003) en duplicata. Environ 5 g d'échantillon est ajoutés à 100 ml d'une solution de chloroforme : méthanol (2 :1). L'ensemble est laissé sous agitation pendant une nuit à température de la pièce, filtré sur papier Whatman no.1 et lavé avec le mélange chloroforme : méthanol. Le filtrat est mélangé à 22 ml d'une solution contenant 0,58% de NaCl dans une ampoule à décanter et laissé reposer durant au moins 6 heures. La phase organique est prélevée, filtrée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée sous vide à 35°C. L'huile recueillie est pesée sur une balance et la teneur en lipide est déterminée avec la formule suivante :

. % Lipides = $\frac{Poids \ des \ lipides \ (g)}{Poids \ de \ l'échantillon \ (g)} x \ 100$

Teneur en protéine et en chitine

Le dosage des protéines est problématique dans le cas des composés chitineux. En effet, le groupement amine de la chitine contribue au pourcentage d'azote total venant ainsi modifier les valeurs obtenues lors d'un dosage de l'azote total. Les autres méthodes de dosage des protéines nécessitent une dissolution complète de celles-ci. Ces méthodes ne peuvent donc pas être utilisées, car certaines protéines ne peuvent être solubilisées facilement étant liées à la matrice de chitine.

La teneur en protéines et en chitine ne peut donc qu'être estimée à partir d'un dosage de l'azote selon un système à deux équations et à deux inconnus. La méthode de Dumas, via un analyseur d'azote Leco, fut privilégiée vu le nombre d'échantillons à analyser et sa simplicité d'utilisation. L'échantillon déshydraté est incinéré à 950°C en présence d'une haute concentration d'oxygène. L'azote protéique se transforme alors en N₂ ou en NO_x. Le NO_x est converti en N₂ à l'aide d'un catalyseur à base de cuivre. Le N₂ total est alors dosé par un détecteur de conductivité thermique. L'estimation de la teneur en protéines et en chitine, qui est aussi utilisée par Diaz-Rojas (2006), a été calculée en considérant une teneur en azote de 16% (p/p) pour les protéines et de 6,9% (p/p) pour la chitine.

Balance massique totale :

$$X + Y = 1 - Z$$
 (1-4)

Bilan sur l'azote :

$$B = X \times 0,069 \frac{g_{azote}}{g_{chitine}} + Y \times 0,16 \frac{g_{azote}}{g_{proteines}}$$
(1-5)

Où
$$X = \frac{g_{chitine}}{g_{\acute{e}chantillon}}, Y = \frac{g_{protéines}}{g_{\acute{e}chantillon}}, Z = \frac{g_{matière non azotée}}{g_{\acute{e}chantillon}}$$
 et $B = \frac{g_{azote}}{g_{\acute{e}chantillon}}$

En combinant les équations 1-4 et 1-5, on trouve :

$$X = \left\{ \frac{0,16(1-Z) - B}{0,16 - 0,069} \right\}$$
(1-6)
et

$$Y = \left\{ \frac{B - 0,069(1 - Z)}{0,16 - 0,069} \right\}$$
(1-7)

(1-3)

Analyses spectroscopiques infrarouge

La spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (FTIR) permet d'identifier la présence de groupements chimiques spécifiques. Les liaisons entre atomes vibrent selon une fréquence spécifique qui dépend de la masse des atomes engagés et de la rigidité relative de la liaison (Salomons et Fryhle, 2000). Ces liaisons absorbent des ondes infrarouges d'énergie spécifique selon la fréquence de leur vibration. L'analyse spectroscopique infrarouge permet d'identifier les plages de fréquence d'absorption des infrarouges d'un échantillon et de déterminer par la suite les groupes chimiques conséquents. Les analyses spectroscopiques furent utilisées pour déterminer un composé organique précipitant de l'extrait de déminéralisation du chitane et pour différencier les types de carbonate de calcium synthétisés (Xyla et Koutsoukos, 1989; Zhou, 2004). Environ 1 mg des différents échantillons anhydres fut ajouté à 100 mg de KBr. Les mélanges furent pressés à 3000 bars pour donner de fines pastilles translucides. Ces pastilles furent analysées de 4000 cm⁻¹ à 640 cm⁻¹.

Analyses DRX

La diffraction des rayons X (DRX) est utilisée dans l'étude de la cristallinité des différents matériaux. Les cristaux sont bombardés par un rayon-X monochromatique. La déviation structurée de ce rayon-X sur les cristaux permet de déterminer le taux de cristallinité, le type de cristaux et d'estimer leur taille moyenne selon l'équation de Sherrer (Martini, 2002). Des analyses DRX furent utilisées afin de déterminer la cristallinité de la chitine de même que pour déterminer les types de carbonate de calcium formés suivant différentes voies de synthèse.

Les poudres analysées étaient uniformément réparties sur une mince membrane de verre. Le balayage fut effectué de 4° à 42° de 20 pour la chitine et de 20° à 65° de 20 pour le carbonate de calcium à une vitesse de 1° par minute.

Analyses MET et diffraction d'électrons

La microscopie électronique en transmission d'électrons (MET) utilise le rayonnement des électrons pour détecter de très fines particules. Les électrons sont focalisés dans un mince faisceau qui traverse l'échantillon. Les électrons sont plus ou moins absorbés par l'échantillon et l'image qui en résulte est projetée sur un écran fluorescent. Il est aussi possible d'utiliser le comportement ondulatoire des électrons qui diffractent au contact d'un réseau cristallin pour déterminer la cristallinité d'un échantillon.

Les échantillons de carbonate de calcium furent analysés par MET et par diffraction d'électrons afin de déterminer leur forme, leur taille et leur cristallinité. Les poudres furent dispersées dans du méthanol et mises dans un bain à ultrasons durant 15 minutes. Après repos de 15 minutes, 5 microlitres de la suspension furent déposés sur une grille Nickel/Formval. Les échantillons furent observés après séchage.

Analyse EDS

Le microscope électronique à balayage permet de visualiser une structure en analysant les rayons-X émis par un échantillon suite à un bombardement d'électrons. Les rayons-X émis par l'échantillon, suite à son excitation par les électrons, sont spécifiques à chaque atome. L'analyse de ces rayons, à l'aide d'un détecteur spectroscopique d'énergie dispersive, permet d'identifier les types d'atomes présents dans une structure.

Un microscope électronique à balayage couplé à un détecteur spectroscopique d'énergie dispersive (EDS) fut utilisé dans le but d'identifier les composants de l'extrait de déminéralisation. Les extraits analysés furent recouverts d'une fine pellicule d'or et de palladium avant d'être insérés dans l'appareil et mis sous vide.

Déminéralisation

Préparation du chitane

Afin d'obtenir un produit homogène et de faciliter les traitements, le chitane fut d'abord broyé en fine poudre à l'aide d'un broyeur à disque. Le broyeur fut ajusté afin de donner la plus fine granulométrie permise par l'appareil. La poudre obtenue fut tamisée sur une tour de différents tamis 20 (850 μ m), 32 (500 μ m), 60 (250 μ m), 100 (150 μ m), 200(75 μ m), 270 (53 μ m) et 550 mesh (25 μ m) afin de déterminer sa granulométrie.

Optimisation de la déminéralisation

La déminéralisation du chitane s'effectue en le dispersant dans une solution d'acide chlorhydrique sous agitation constante. La réaction produit un violent dégagement de gaz carbonique qui doit être maîtrisé en ajoutant graduellement la poudre de chitane. Théoriquement, la réaction se termine lorsqu'il n'y a plus de dégagement gazeux. Néanmoins, la quantité d'acide doit être suffisante stéchiométriquement afin de pouvoir réagir avec tous les minéraux. Le chitane étant principalement constitué de calcium, deux équivalents molaires d'acide chlorhydrique doivent être rajoutés au minimum.

Afin d'optimiser la déminéralisation, quatre facteurs ont été étudiés; la concentration de l'acide, le ratio soluté : solvant (chitane : acide), la température et le temps d'extraction, ainsi que la grosseur des particules. Des essais ont d'abord été effectués avec différentes concentrations de HCl et différents ratios. L'effet de la température fut évalué en réalisant une cinétique d'extraction à 25°C, 35°C et 45°C. Finalement, des déminéralisations avec différentes fractions de tamisage ont permis de mesurer l'effet de la granulométrie.

Pour déterminer l'efficacité de la déminéralisation de chaque traitement, des mesures de teneur en cendre et de teneur en calcium furent effectuées sur les échantillons et/ou sur les extraits.

L'optimisation de la concentration en acide et du ratio soluté : solvant nécessaire s'est effectuée en ajoutant 5 g de chitane à des solutions d'acide chlorhydrique. La concentration et le volume de HCl, la température de la réaction, le temps de la réaction de même que la granulométrie variaient selon les tests effectués. La chitine fut filtrée et lavée sur papier Whatman #1 puis séchée à 40°C dans un four à vide jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La chitine fut ensuite calcinée pour déterminer sa teneur en cendre. Les cendres furent dissoutes dans une solution 0,1N de HCl afin de doser leur teneur en calcium par absorption atomique.

Analyse de l'extrait de déminéralisation

L'extrait brut obtenu après déminéralisation complète fut recueilli afin de déterminer son contenu. Les différentes substances dissoutes dans l'extrait furent précipitées en augmentant le pH avec, dans l'ordre, du NaOH 3%, 0,3% puis du Na₂CO₃ 3%. Le NaOH
fut employé jusqu'à pH 7 afin de ne pas produire de H₂CO₃ en solution qui nuit à la stabilisation du pH. Le Na₂CO₃ fut employé afin d'étudier des résidus précipitant lors de la synthèse de CaCO₃. Les différentes fractions extraites et résiduelles obtenues furent séchées, pesées et leur contenu fut analysé par spectroscopie infrarouge s'il s'agissait d'un composé organique et par microscopie électronique à balayage couplé à un détecteur EDS dépendamment s'il s'agissait d'un composé minéral. De plus, la teneur en Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Cr, et Ni fut déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique dans l'extrait de déminéralisation brut et après précipitation des composés majeures.

Valorisation du chlorure de calcium

L'extrait de déminéralisation peut être valorisé en précipitant le chlorure de calcium sous forme de nanoparticules de carbonate de calcium. L'extrait de calcium fut neutralisé à pH 7 et dilué 10 fois afin d'obtenir une solution de CaCl₂ de 46 mM. Une faible concentration est nécessaire afin de limiter la croissance des cristaux et leur agglomération. Un échantillon de 200 ml d'une solution de Na₂CO₃ (4,6 mM) fut précipité en y ajoutant sous forte agitation la solution de CaCl₂ à un débit de 4 ml par minute durant 5 minutes. La concentration de la solution de Na₂CO₃ fut choisie afin de réagir avec l'ensemble de CaCl₂ dispersé sans qu'il y ait de surplus. La réaction est effectuée à 55°C puisque la formation de noyau de cristaux est favorisée à plus haute température. La précipitation fut étudiée en ajoutant au processus 1,5 g de SDS à l'échantillon de 200 ml de Na₂CO₃ (4,6 mM), afin de limiter la croissance des cristaux, et en traitant la solution aux ultrasons durant l'addition à une puissance de 100 W (figure 5), afin de favoriser l'apparition de noyau. Les différentes suspensions obtenues furent centrifugées à 4250 g durant 20 minutes et lavées avec de l'eau distillée. L'analyse des cristaux fut effectuée par diffraction des rayons X, par FTIR, par MET et par diffraction des électrons.

Déprotéination

Optimisation de la déprotéination

Afin de pouvoir optimiser le processus de déprotéination, il importe d'avoir du matériel déminéralisé uniforme. Il a donc été nécessaire d'effectuer une déminéralisation à grande échelle du chitane en dispersant du chitane dans une solution acide 1N avec un ratio solutésolvant de 100 g/L durant 10 minutes à température ambiante, afin de pouvoir utiliser le même matériel pour tous les tests.

Les facteurs influençant la déprotéination sont le type et la concentration de la base utilisée dans la solution, le ratio soluté : solvant, la température et le temps de la réaction. Des tests de déprotéination ont été effectués en ne faisant varier qu'un seul des autres paramètres afin de déterminer l'influence de chacun de ceux-ci sur la solubilité des protéines. Des extractions aux concentrations de 1%, 2% et 3% ont été effectuées avec du NaOH et du KOH. Des extractions réalisées de 35°C jusqu'à 100°C ont été effectuées avec une solution de NaOH 2%.

Pour effectuer les déprotéinations avec des conditions de température constante, les solutions basiques, contenues dans des erlenmeyers, ont été préalablement chauffées à la température désirée dans le bain réactionnel. Ce bain est maintenu à une température constante en étant relié à un bain chauffant. Ce même bain repose sur une plaque agitatrice qui permet une agitation magnétique constante à raison de 250 rotations par minute. Ce montage permet d'effectuer jusqu'à six déprotéinations simultanément (figure 4). Après réaction, les solutions sont lavées, filtrées et séchées sous vide. La pureté de la chitine obtenue est déterminée en dosant son azote en triplicata à l'aide d'un analyseur d'azote. Le pourcentage de lipides est déterminé selon la méthode de Folch et la teneur en cendre, par calcination. Ces valeurs permettent de déterminer le pourcentage de protéines résiduelles selon l'équation 1-7.

Afin de faciliter l'analyse des résultats, le pourcentage de protéines fut transformé en pourcentage d'efficacité d'extraction des protéines (EEP). Le pourcentage d'EEP représente le pourcentage de protéines extraites(Y) par rapport à sa quantité de départ (Y_0). Celui-ci a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\% EEP = 100 (1 - Y/Y_0)$$
(1-8)

Où $Y = \frac{g_{protéines après extraction}}{g_{échantillon après extraction}}$ et $Y_o = \frac{g_{protéines avant extraction}}{g_{échantillon avant extraction}}$



Figure 4 : Dispositif de déprotéination du chitane déminéralisé

Influence de la sonication sur l'extraction des protéines

La déprotéination du chitane déminéralisé a été effectuée en la combinant avec un traitement de sonication. Afin de comparer l'efficacité d'un traitement par sonication, des cinétiques d'extraction des protéines ont été effectuées à 40°C, 50°C, 60°C et 70°C. Une quantité de 5g de chitane déminéralisé ont été ajouté à 200ml de solution NaOH 2% et NaCl 2% sous agitation. Des échantillonnages ont été effectués aux temps 5, 10, 15, 20, 30, 45 et 60 minutes. Ces échantillons ont été lavés et séchés sous vide à 60°C jusqu'à l'obtention d'un masse constante (24h). La teneur en azote des échantillons fut ensuite déterminée à l'aide d'un analyseur d'azote LECO afin de déterminer leur EEP.

Pour effectuer les extractions avec sonication, 200 ml d'une solution NaOH 2% et NaCl 2% dans un bécher est préchauffée à la température d'extraction. Exactement 5 g de chitine ont été ajoutés à la solution et mouillés pendant 10 minutes. La mixture est transvasée dans une cellule de verre de refroidissement Rosett à double parois reliée à un bain thermostaté. Un thermocouple dans le milieu réactionnel permet de suivre l'évolution de la température durant la réaction (figure 5). Le mélange est traité aux ultrasons d'une puissance et d'une durée variant selon le traitement. Après celui-ci, un extrait du mélange est retiré pour des fins d'analyse. Le reste est remis dans un bécher pour que le temps de contact entre la chitine et la solution soit de 60 minutes.

L'effet du temps de sonication sur l'extraction a été vérifié en traitant les solutions à 100W et 150W pendant 5, 10, 15, 20, 35 et 50 minutes. Des traitements variant entre 35W et 150W pendant 10 minutes ont permis de déterminer l'influence de la puissance de sonication sur l'extraction des protéines. L'effet global de l'énergie de sonication (dose) fournie au système est déterminé en effectuant différents traitements d'extraction d'une énergie globale de 90 kJ. Tous ces traitements ont été effectués à 40°C, 50°C, 60°C, et 70°C. L'utilisation d'une température supérieure aurait pu endommager la pièce piézo-électrique. L'énergie fournie au système est calculée selon la formule :

Énergie (J) = Temps (s) x Puissance (W) (1-9)



- A : Contrôleur d'énergie de sonication
- B : Convertisseur et sonde de sonication
- C : Cellule de verre de refroidissement Rosett à double paroi
- D : Bain chauffant
- E : Thermocouple

Figure 5 : Dispositif de sonication pour la formation de CaCO3 et l'extraction des protéines

Résultats et discussion

Analyse du Chitane

L'analyse préliminaire des constituants du chitane donne les résultats présentés dans le tableau 3. Ces valeurs concordent avec celles estimées par la compagnie OrganicOcean (Annexe 1) si ce n'est qu'il y a légèrement plus de minéraux et moins de protéines.

Composant	Matière humide (g/100 g)	Matière sèche (g/ 100 g)
Humidité	6,66	
Chitine	38,7	41,5
Protéines	8,1	8,7
Lipides	1,8	1,9
Cendre	44,8	48,0
Calcium	19,3	20,7

Tableau 3 : Pourcentage des principaux éléments présents dans le chitane

Broyage

Le broyage et le tamisage du chitane ont donné des particules d'un diamètre variant majoritairement entre 25 µm et 850 µm. La distribution de la granulométrie est présentée dans le tableau 4. Seule la fraction contenant des particules entre 250 et 500 µm fut utilisée pour réaliser les différents essais d'optimisation de la déminéralisation puisqu'étant la fraction majeure.

Tami (mesh)	Diamètre (µm)	Masse (%)
20	>850	1,2
32	500-850	13,4
60	250-500	35,9
100	150-250	18,8
200	75-150	16,5
270	53-75	6,5
550	25-53	6,5
	0-25	1,2

Tableau 4 : Masse de chitane obtenue dans chaque plateau suite au broyage

Déminéralisation

Optimisation de la déminéralisation

Les 5 g de chitane utilisés pour les déminéralisations contiennent 2,24 g de minéraux, principalement du CaCO₃. Ce dernier ayant une masse molaire de 100 g/mol, la chitane contenait donc 0,0224 mole de CaCO₃. Comme il faut 2 équivalents de HCl pour que la réaction de décarbonatation soit complète, il était attendu qu'un minimum de 0,0448 mole de HCl soit nécessaire à une déminéralisation complète.

Le tableau 5 montre l'effet de la concentration en acide et du ratio soluté : solvant sur l'efficacité de la déminéralisation après 30 minutes. Un minimum de cendre est obtenu à partir du ratio 1:10 d'une solution de HCl 1N. Cette solution contient 0,05 mole de HCl. L'ajout d'un surplus d'acide n'améliore pas l'efficacité de la déminéralisation. Les cendres obtenues après extraction des minéraux ne réagirent pas en présence d'acide indiquant l'existence de minéraux résiduels ne pouvant être extraits dans un milieu acide.

deminieransation				
[HCl] (M)	Ratio (soluté : solvant))	Moles HCl	Cendres* (g /100 g)	Calcium* (g / 100 g)
0 (contrôle)	_	0	48,0	20,7
0,5	1:10	0,0250	33,1	7,83
	1:15	0,0375	10,1	3,695
1	1:10	0,0500	0,36	0,0004
	1:15	0,0750	0,52	0,0008
1,5	1:10	0,0750	0,38	0,0005
	1:15	0,1125	0,61	0,0007

Tableau 5 : Teneur en cendres et en calcium du résidu après 30 minutes de déminéralisation

*masse sèche

L'optimisation de la déminéralisation s'est poursuivie en déterminant la cinétique de déminéralisation. Celle-ci a été analysée à trois températures différentes en duplicata (température pièce, 35°C et 45°C) en ajoutant 5 g de chitane à 50 ml d'une solution HCl 1N sous agitation. Un millilitre de solution fut retiré du milieu aux temps 2, 5, 10, et 15 minutes à l'aide d'une seringue. L'échantillon fut immédiatement filtré sur de la ouate insérée dans un embout afin de séparer les particules de chitine insolubles de la solution. La ouate fut lavée avec de l'eau distillée. Le filtrat fut recueilli dans une fiole jaugée de 25 ml et complété jusqu'à la jauge avec de l'eau distillée. L'extrait fut analysé par absorption atomique afin de déterminer la quantité de calcium dissout. La figure 6 démontre qu'après 5 minutes d'extraction, la déminéralisation est complété quelque soit la température. L'arrêt du dégagement gazeux, peu de temps après l'ajout du chitane, confirme la rapidité de la réaction. Les réactions subséquentes de déminéralisation ont toutefois été d'une durée de 10 minutes afin de bien contrôler la réaction.



Figure 6 : Cinétique de déminéralisation du chitane à 25°C (◆), 35°C (▲) et 45°C (■) (valeurs expérimentales : annexe 2)

L'influence de la granulométrie des particules durant la déminéralisation a été effectuée en déminéralisant des particules de différents diamètres. Des fractions tamisées de 5 g de chitane, dont le diamètre variait de 50 μ m à 75 μ m, de 250 μ m à 500 μ m et de 500 μ m à 850 μ m, et du mélange brut furent dispersés à 50 ml de solution HCl 1N.

Le tableau 6 démontre que la granulométrie des particules est suffisamment fine pour permettre une décalcification complète quelle que soit la fraction déminéralisée puisqu'on retrouve des valeurs très faibles de teneur en cendre et en calcium par rapport à la valeur initiale.

Taille des particules de	Cendre du résidu après déminéralisation**	Calcium du résidu après déminéralisation**
chitane (µm)	(g/100g)	(g/100g)
50-75	0,53	0,0003
250-500	0,36	0,0004
500-859	0,15	0,0001
Sans tamisage	0,65	0,0003

Tableau 6 : Influence de la granulométrie sur la déminéralisation *

*Valeurs initiales de cendre et de calcium du chitane : 48,0g/100g et 20,7g/100g respectivement

**masse sèche

Ainsi, avec les particules obtenues suite au broyage, le seul paramètre qui semble influer lors de la déminéralisation est la présence d'une concentration et d'un volume d'acide suffisant pour déminéraliser l'ensemble du matériel. Contrairement à Levesque (1995), qui travaillait avec un matériel dont le diamètre minimal était de 2,0 mm et qui remarquait une influence de la température lors de la déminéralisation, ces résultats démontrent que ce paramètre n'a plus d'influence lorsque les particules sont de plus petit diamètre. Cette optimisation de la déminéralisation permet de conclure que le facteur le plus influent dans la déminéralisation est la surface de contact entre la matrice de chitine et le solvant. Plus ce rapport est grand, plus la déminéralisation est rapide, éclipsant les autres facteurs pouvant influencer la déminéralisation. La dispersion du chitane dans une solution HCl 1N avec un ratio soluté : solvant de 1 :10 durant 10 minutes à température ambiante fut donc les conditions optimales employées pour la déminéralisation à grande échelle.

Analyse de l'extrait de déminéralisation

Les composés dissous dans la solution de déminéralisation peuvent être en partie recueillis et valorisés en remontant le pH à l'aide de base. La figure 7 décrit l'évolution de la quantité de précipité en fonction du pH. La basification du milieu a été effectuée avec une solution de 3% NaOH jusqu'à pH 5 et 0,3% NaOH jusqu'à pH 7. La neutralisation s'est poursuivie avec du 3% Na₂CO₃ jusqu'à pH 10. Le NaOH a été utilisé afin qu'il n'y ait pas formation de H₂CO₃ et de CO₂ aqueux. À partir de pH 7, la dissolution du Na₂CO₃ forme des ions carbonates qui vont permettre la précipitation du calcium sous forme de carbonate de calcium. La masse des précipités fut déterminée à chaque demi-pH.



Figure 7 : Précipitation des solides de l'extrait minéral de chitane en fonction du pH. (**n**), Solides précipités à chaque pH; (**•**), Cumulatif des solides précipités. (valeurs expérimentales : voir annexe 3)

La calcination de l'ensemble des précipités donne une teneur en cendre de 91%, indiquant la présence d'un résidu non minéral. Ce résidu fut déterminé en calcinant individuellement chaque précipité. Après calcination, seul un résidu précipitant entre pH 5 et 7 présenta un caractère organique. L'analyse de l'échantillon au spectromètre infrarouge donne le spectre de la figure 8. Ce spectre montre toutes les caractéristiques du chitosane avec une bande amine à 1616 cm⁻¹ et une large bande d'élongation O-H à 4440 cm⁻¹. On présume que des molécules de chitine hydrolysée ont donc été solubilisées durant la déminéralisation pour se retrouver dans l'extrait. Le temps d'entreposage de l'extrait de déminéralisation avant analyse explique la transformation de la chitine en chitosane puisqu'un milieu acide permet la desacétylation de la chitine.

Les autres composés recueillis furent analysés par microscopie électronique à balayage couplé à un détecteur EDS. Avec les valeurs obtenues (tableau 7), il est possible de déterminer les composants minéraux précipitant à pH 4,7, 7,5 et 9,7. Le composé précipitant autour de pH 4,7 est un sel de phosphate tricalcique $Ca_3(PO_4)_2$. Il provient de la dissolution phosphate de calcium amorphe présent dans la carapace (Luquet, M., 2004). Une hausse locale du pH lors de l'ajout de la base permet l'apparition d'ion PO₄³⁻ réagit alors avec les ions Ca^{2+} présents en solution. Néanmoins, la précipitation du phosphate s'effectue généralement sous plusieurs formes différentes (Snoeyink, 1980). Ainsi, le solide obtenu n'est peut être en fait qu'un mélange de différents sel de phosphate de calcium. Le chlorure de calcium se transforme vers pH 7,5 en précipitant sous forme de carbonate de calcium suite à l'ajout d'ions carbonate provenant du carbonate de sodium. Le composé mineur précipitant à pH 9,7 est identifié comme étant du carbonate de magnésium.

	Masse* (g/100g)			
pH	Ca	Р	0	Mg
4,7	39,31	19,64	41,05	0
7,5	49,97	0	47,95	0
9,7	0	0	57,1	28,52

Tableau 7 : Pourcentage massique des atomes trouvés par EDS dans les divers précipités de l'extrait de déminéralisation

* masse sèche



Figure 8 : Spectre infrarouge du précipité de l'extrait de déminéralisation obtenu entre pH 5 et pH 7

L'ensemble des précipités représente 5,2g/100ml de la solution. La déminéralisation conduit donc à une perte de masse de 52 % du chitane. Le tableau 8 indique la masse de chaque constituant précipitant de même que celui du NaCl formé lors de la neutralisation du HCl. Avec ces données, il est possible de déterminer le pourcentage des constituants dans la solution de déminéralisation à pH 0,9 (tableau 9) selon ces réactions :

 $CaCO_3 + 2 HCl \longrightarrow CaCl_2 + H_2CO_3$ $Ca_3(PO_4)_2 + 6 HCl \longrightarrow 3 CaCl_2 + 2 H_3PO_4$ $MgCO_3 + 2 HCl \longrightarrow MgCl_2 + H_2CO_3$

La différence de masse totale entre les tableaux 8 et 9 provient de la transformation du H_3PO_4 , $CaCl_2$ et du MgCl₂ en $Ca_3(PO_4)_2$, $CaCO_3$, de MgCO₃ et de la formation de NaCl suite à la neutralisation du HCl par le NaOH et le Na₂CO₃. Ces valeurs sont confirmées par l'analyse en absorption atomique de la solution de déminéralisation pure et après précipitation partielle des composés (tableau10).

Les minéraux mineurs présents dans l'extrait de déminéralisation furent aussi détectés par absorption atomique. Ces donnés (tableau 10) montrent qu'il y a aussi précipitation du manganèse et du zinc. Ces précipitations se font respectivement à pH 5,4 et 6,2 lorsqu'effectué avec des solutions de sels purs.

Précipité	Masse (g)	Matière précipitée (g/100g de matière précipitée)	Matière sèche* (g/100g de matière sèche)
$Ca_3(PO_4)_2$	1,34	26	12
Chitosane	0,46	9	4
CaCO ₃	3,30	64	31
$MgCO_3$	0,10	2	1

Tableau 8 : Masse des différents précipités d'une solution de 100ml de déminéralisation et leurs proportions lorsque précipités pH 11 (contenant 10,4g/100ml matière sèche)*

* 52% de la matière sèche se retrouve sous forme de NaCl

	Proportion dans	
	l'extrait de	Matière sèche
	déminéralisation	(g/100g de matière)
Composés	(g/100ml)	
CaCl ₂	5,12	80
H_3PO_4	0,70	11
MgCl ₂	0,12	2
Chitosane	0,46	7

Tableau 9: Proportions des différentes substances retrouvées dans l'extrait de déminéralisation à pH 0,9 (contenant 6,4 g/ 100ml de matière sèche)

Tableau 10 : Concentrations de différents minéraux retrouvés dans l'extrait de déminéralisation à différents pH

	Concentration dans l'extrait de			
Minéraux	déminéralisation (mg/l)			
	pH 1	pH 7	pH 10	
Ca	18500	13200	0,4	
Mg	296	301	3,3	
Fe	1,5	1,1	1,0	
Cu	0,5	0,5	0,4	
Mn	1,5	0,0	0,0	
Zn	1,0	0,2	0,1	
Co	1,2	1,3	1,2	
Cr	0,3	0,3	0,4	
Ni	1,3	1,3	1,2	

Valorisation de l'extrait de déminéralisation

La fraction prédominante extraite lors de la déminéralisation, le chlorure de calcium, peut être valorisée en formant des nanoparticules de carbonate de calcium. L'ajout de carbonate de sodium à une solution de chlorure de calcium conduit spontanément à la formation de carbonate de calcium. Les cristaux de carbonate ainsi formés croissent et finissent par précipiter.

Afin d'obtenir du carbonate de calcium pur, la solution de déminéralisation fut neutralisée jusqu'à l'obtention d'un pH de 7 à l'aide de NaOH 3% et 0,3%. La solution neutralisée fut centrifugée à 4250 g durant 15 minutes afin d'éliminer les précipités. La solution obtenue fut diluée 10 fois pour obtenir une concentration de CaCl₂ de 46 mM. Une concentration plus élevé pourrait nuire à la formation de CaCO₃ nanoparticulaire en favorisant la croissance des cristaux.

Condition de cristallisation 1

Une solution de 200 ml de Na₂CO₃ à 4,6mM fut préchauffée à 55°C. La solution de CaCl₂ fut dispersée à un débit de 4 ml par minute durant 5 minutes sous forte agitation. La même expérience fut répétée dans un second temps en ajoutant 1,5g de SDS à la solution de Na₂CO₃ et, dans un tiers temps, en effectuant durant l'addition de CaCl₂ un traitement de sonication de 100 W. Une dernière expérience fut effectuée en combinant l'ajout de SDS et le traitement aux ultrasons. La température de 55°C fut employée afin de favoriser la nucléation (Johannsen, 1997) sans endommager la pièce piézo-électrique de la sonde de sonication.

Les différentes suspensions furent centrifugées à 8350 g durant 15 minutes. Les précipités furent analysés par diffraction des rayons X et des électrons, par FTIR et visualisés au MET, afin de déterminer le type de cristaux de carbonate de calcium et d'estimer leur taille.

La figure 9 montre les différentes structures observées par MET après la dispersion de la solution de $CaCl_2$ dans la solution de Na_2CO_3 sans autre traitement. La grosseur des particules formées lors de la fabrication du carbonate de calcium ne permit pas la présence d'une forte concentration de particules sur les grilles de Nickel/Formval car une bonne partie précipita durant les 15 minutes de repos lors de la préparation. Ainsi, seules les plus petites particules ont pu être visualisées. Les particules retrouvées sur les grilles de Nickel/Formval possèdent toutes un diamètre variant entre 6 μ m et 10 μ m.

Le spectre de diffraction des rayons-X du carbonate de calcium obtenu sans autre traitement est celui de la calcite avec le plan 104 bien défini à 29,4°(figure 13a) (Tang, 2007). Le spectre FTIR (figure 14a) confirme aussi la présence de calcite avec des pics d'absorption à 713 cm⁻¹, 849 cm⁻¹ 877 cm⁻¹ et à 1880 cm⁻¹ comme décrit par Xyla (1989). De même, le spectre de diffraction d'électrons (figure 9e) montre la présence de cristaux rhomboédrique concordant à la présence de cristaux de calcite (Heywood, 1991). Des particules désorganisées (figure 9b) indiquent la présence d'une certaine quantité de calcite (figure 9c).

Condition de cristallisation 2

L'ajout d'un traitement de sonication amène la formation d'aragonite comme mentionné par Zhou (2004). Les particules formées possèdent la forme de bâtonnet d'une longueur variant entre 0,5 μ m et 3 μ m et d'un diamètre variant de 0,1 μ m et 0,5 μ m (figure 10a-d).

Le spectre de diffraction des rayons-X du carbonate de calcium obtenu avec ultrasons est celui de reconnu pour l'aragonite (figure 13b) (Zhou, 2004). Le spectre FTIR (figure 14b) confirme aussi la présence de d'aragonite avec des pics d'absorption à 701 cm⁻¹, 714 cm⁻¹, 844 cm⁻¹, 854 cm⁻¹ et 1080 cm⁻¹ et 1790 cm⁻¹ (Xyla 1989, Zhou et al. 2004). De même, le spectre de diffraction d'électrons (figure 10e) montre la présence de cristaux orthorhombiques concordant à la présence de cristaux d'aragonite (Litvin, 1997).

Condition de cristallisation 3

L'ajout de SDS amène la formation d'un mélange de vatérite et de calcite ce qui concorde avec les résultats de Tang (2007). Les particules formées sont sphériques et possèdent un diamètre variant de 0,5 µm et 2 µm (figure 10a-d).

Le spectre de diffraction des rayons-X du carbonate de calcium obtenu avec SDS contient un mélange de pics de la vatérite et de pics de la calcite dont celui à 29,4° (figure 13c) et est semblable à ce que décrit Tang (2007). Le spectre FTIR (figure 14c) confirme aussi la présence d'un mélange de calcite et vatérite avec des pics d'absorption à 714 cm⁻¹, 746 cm⁻¹, 850 cm⁻¹, 877 cm⁻¹ et 1080 cm⁻¹. Néanmoins, la faible intensité des pics 714 cm⁻¹ et 850 cm⁻¹ de même que l'absence d'un pic à 1800 cm⁻¹ laisse supposer une très faible quantité de calcite. Les spectres de diffraction d'électrons (figure 11d-e) diffèrent dépendamment de l'endroit où la diffraction est effectuée. Dans la figure 11d, on retrouve deux types de diffraction. Les plus grands hexagones sont les points de diffraction de la calcite rhomboédrique alors que les plus petits sont les points de diffraction de la vatérite, hexagonale. La figure 11e ne montre que les plus petits hexagones indiquant un endroit constitué exclusivement de vatérite.

Condition de cristallisation 4

L'ajout de SDS et d'ultrasons amène la formation d'un mélange de vatérite et d'une forme d'aragonite. À notre connaissance, aucune autre étude n'a combiné ces deux facteurs. Les particules formées alors sont de deux types bien distincts. La vatérite se retrouve sous forme de sphère d'un diamètre variant entre $0,2 \ \mu m$ et $1 \ \mu m$ (figure 12a-c). L'autre type de particule se présente sous forme d'amas de quelques bâtonnets à plusieurs centaines de bâtonnets (figure 12d-f). Les bâtonnets sont d'une longueur de $0,3 \ \mu m$ et d'un diamètre de $0,05 \ \mu m$.

Le spectre de diffraction des rayons-X du carbonate de calcium obtenu avec SDS et ultrasons montrent un mélange de pics de vatérite et de pics d'aragonite (figure 13d). Par contre, le spectre FTIR (figure 14d) diffère de celui attendu. Des pics à 746 cm⁻¹, 877 cm⁻¹ confirment aussi la présence de vatérite. Des pics mineurs à 701 cm⁻¹, 714 cm⁻¹, 844 cm⁻¹

et 1790cm⁻¹ laissent supposer la présence d'aragonite mais l'absence du pic majeur à 854 cm⁻¹ indique qu'il diffère de celui obtenu en utilisant que des ultrasons. En remplacement de ce pic, on retrouve un épaulement à 868 cm⁻¹ qui n'est pas reporté dans la littérature. Ce changement de pic indique la présence d'un nouveau type de lien dans la structure cristalline.

Les spectres de diffraction d'électrons diffèrent nécessairement dépendamment du type de molécule analysé. Dans la figure 12d, on retrouve de petit hexagone ressemblant aux spectres obtenus de la vatérite en utilisant que du SDS indiquant une certaine similarité entre les deux types de particules. La figure 12h montre le spectre de diffraction des bâtonnets. Ce spectre diffère complètement du spectre de l'aragonite et ne ressemble à aucun autre spectre de carbonate de calcium relaté dans la littérature. Les bâtonnets pourraient donc être des cristaux d'aragonite dont la cristallisation fut modifiée par la présence de SDS.

En appliquant l'équation de Sherrer (Martini, 2002) aux pics de diffraction des rayon-X, il est possible d'estimer la grosseur des cristaux formant les différentes particules. Cette équation est basée sur la relation entre la largeur des pics à mi-hauteur et le diamètre des cristaux. Selon ces estimations, le diamètre des cristaux varie peu d'un traitement à un autre mis à part celui des cristaux de calcite en présence et en absence de SDS. La taille des cristaux de vatérite varie de 32 nm à 59 nm qu'ils proviennent du traitement avec SDS ou du traitement avec SDS et sonication. La taille des cristaux d'aragonite varie de 57 nm à 97 nm qu'ils proviennent du traitement avec SDS et sonication. La taille des cristaux de calcite varie de 123nm à 127nm lorsque synthétisés sans l'ajout de SDS mais diminue entre 84nm et 116 nm lorsque la synthèse est effectuée en présence de SDS. La fiabilité de l'estimation peut être déterminée en comparant la mesure d'un cristal de calcite obtenu par TEM(figure 9d) et la valeur de l'estimation.

Le tableau 11 synthétise toutes les données des différentes analyses effectuées sur les poudres de carbonate de calcium obtenues avec les différents traitements.

	Type de traitement					
Analyse		Sans autre traitement	Ajout d'ultrasons	Ajout de SDS	Ajout de SDS et d'ultrasons	Remarque
XRD	Principaux pics (Plan correspondant)	29.4°(104)	26,2°(111) 27,2°(021) 45,9°(221)	24,9° (110) 27,1° (112) 29,4° (104) 32,8° (114)	25° (110) 26,2° (111) 27,1°(021 et 112) 32,8° (114) 50,4°(118 et 132)	
	Cristaux correspondant	Calcite	Aragonite	Calcite et vatérite	Vatérite et aragonite	(Tang, 2007, Zhou, 2004,
	Taille des cristaux (nm)	123-127	57-97	Calcite :84-116 Vatérite : 38-48	Aragonite :61-93 Vatérite :32-59	Estimé avec l'équation de Sherrer (Martini, 2002)
FTIR	Principaux pics (cm ⁻¹)	1800, 877, 849, 713	1790, 1080, 854, 844, 714, 701	1090, 1080, 877, 850, 746, 714	1084, 877, 868, 853, 844, 746, 714, 701	
	Cristaux correspondant	Calcite	Aragonite	Calcite et vaterite	Vaterite, indice d'aragonite	(Xyla, 1989, Zhou, 2004)
MET	Forme des particules	Amorphe ou sous forme radiale	De bâtonnet	Sphérique	Sphérique et de bâtonnet	
	Taille des particules (µm)	6-10	0,5-3 / 0,1-0,5	0,5-2	0,2-1 (Sphère) 0,05 / 0,3 (bâtonnet)	Déterminée visuellement avec les images obtenues par MET
	Structure cristalline	Calcite Rhomboédrique	Aragonite Orthorhombique	Calcite rhomboédrique vatérite hexagonale	Hexagonale et Indéfini	(Heywood, 1991, Litvin, 1997)
	Remarque			Majoritairement composé de vatérite	Pics FTIR à 868 cm ⁻¹ et spectre de diffraction d'électron indéfini	

Tableau 11 : Synthèse de différentes analyses des cristaux de carbonate de calcium obtenus en dispersant une solution de $CaCl_2$ dans une solution de Na_2CO_3 avec différents traitements



Figure 9 : Images MET du carbonate de calcium cristallisé sans traitement à 55° C (a, b) avec un grossissement de 8 000 X (c), de 100 000 X (d) cristal de calcite isolé grossit de 300 000 X et (e) spectre de diffraction d'électrons des cristaux





<u>100</u> nm

Figure 10 : Images MET du carbonate de calcium cristallisé avec sonication à 55° C (a) avec un grossissement de 8 000 X, (b) de 40 000 X, (c) de 100 000 X et (d) de 400 000 X et (e) spectre de diffraction d'électrons des cristaux



Figure 11 : Images MET du carbonate de calcium cristallisé avec surfactant à 55°C (a) avec un grossissement de 8 000 X, (b) de 40 000 X, (c) de 100 000 X et (d,e) spectres de diffraction d'électrons des cristaux





Figure 12 : Images MET du carbonate de calcium cristallisé avec sonication et surfactant à 55° C (a) avec un grossissement de 8 000 X. Grossissement des particules rondes (b) de 40 000 X, (c) de 100 000 X et (d) spectre de diffraction d'électrons des cristaux. Grossissement d'un amas nodulaire de bâtonnets (e) de 40 000 X (f, g) et de 100 000 X et (h) spectre de diffraction d'électrons des cristaux



Figure 13 : Spectre XRD du carbonate de calcium. a) à 55°C. b) à 55°C avec sonication. c) à 55°C avec SDS. d) à 55°C avec SDS et sonication. Pics caractéristiques d'aragonite (A), calcite (C) et vatérite (V)



Figure 14 : Spectre FTIR des échantillons de carbonate de calcium synthétisés (a) sans traitement, (b) avec ultrasons, (c) avec surfactant et (d) avec la combinaison d'ultrasons et de surfactant

Déprotéination

Optimisation de la déprotéination

Avant d'effectuer l'optimisation de la déprotéination de la chitine, le matériel fut d'abord analysé afin de déterminer ses constituants (tableau 12).

Tableau 12 : Pourcentages des principaux éléments présents dans le chitane déminéralisé

Éléments	Matière sèche
	(g/100g)
Chitine	77,1
Protéines	18,3
Lipides	4,0
Cendre	0,4

Le premier paramètre analysé dans l'optimisation de la déprotéination fut l'influence du type de base et sa concentration sur l'extraction des protéines. Des extractions ont été réalisées en duplicata en utilisant des solutions de NaOH et de KOH à des concentrations de 0,5%, 1%, 2%, 3,5%. Approximativement 5 g de chitane déminéralisé fut dispersé dans 200 ml de solution basique préalablement maintenue à 100°C. Un échantillon de poudre fut extrait de chaque milieu réactionnel après 15 minutes, 30 minutes et 60 minutes. Les échantillons furent lavés, séchés et leur teneur en azote fut déterminée à l'aide d'un analyseur d'azote Leco. Les résultats, exprimés en EEP, sont présentés dans le tableau 13. Ces résultats montrent très peu de différence entre l'utilisation du NaOH et du KOH pour une même concentration. Le pH de la solution influence donc beaucoup plus l'efficacité de l'extraction que le type d'ion. Ainsi, les déprotéinations subséquentes furent effectuées qu'avec le NaOH. L'efficacité de l'extraction des protéines augmente en fonction de la concentration des bases ajoutées mais plafonne à partir de 2%. À 100°C, la vitesse de l'extraction des protéines est très rapide durant les 30 premières minutes mais diminue par la suite. Ceci s'explique par le fait que certaines protéines entrelacées au cœur de la matrice de chitine et sont protégées du solvant par les fibres de chitine limitant ainsi leur diffusion. De plus, avec cette protection, celles-ci ont pu n'avoir été que très peu affectées par l'hydrolyse enzymatique des protéines effectuée avant la réception du chitane.

Type de	Temps		Concentratio	n en base (%)
base	d'extraction	0,5	1	2	3,5
NaOH	15	49,8	65,1	67,6	75,0
Huom	30	60,8	71,6	80,3	84,6
	60	66,0	73,1	82,4	84,0
КОН	15	47,8	65,6	71,6	77,3
	30	55,5	72,2	78,8	83,2
	60	65,4	74,6	80,8	85,1

Tableau 13 : Évolution de l'EEP à 100°C à différentes concentrations de NaOH et de KOH

Une autre série d'extraction a été effectuée avec une solution de 2% NaOH en faisant varier le ratio soluté : solvant. Des tests ont été effectués en utilisant des ratios de 0,5 g, 2,5 g, 5,0 g et 10,0 g dans 200 ml à 100°C durant 1 heure (tableau 14). Les résultats démontrent qu'il n'y a pas d'influence du ratio jusqu'à l'atteinte d'un point critique entre un ratio soluté : solvant de 1 :10 et 1 :20. Un surplus de solvant ne permet donc pas une meilleure diffusion et solubilisation des protéines.

Tableau 14 : Efficacité d'extraction des protéines après 60 minutes à 100°C dans une solution de NaOH 2% selon le ratio soluté : solvant

Ratio	Efficacité
(soluté :solvant)	d'extraction (%)
1:200	83,6
1:40	81,5
1:20	82,4
1:10	62,4

Des déprotéinations ont été effectuées par la suite de 35 à 100°C par paliers de 5°C en dispersant 5 g de chitane déminéralisé à 200ml d'une solution de NaOH 2%. Les extractions ont duré 60 minutes afin de bien différencier l'effet des basses températures. Les résultats obtenus (figure 15) montrent une augmentation linéaire moyenne de 3% de l'efficacité d'extraction par palier de 5°C. Une augmentation de l'énergie thermique du système permet donc une solubilisation plus rapide des protéines. Le solvant, parvient plus facilement à pénétrer le réseau de chitine et à solubiliser les protéines.



Figure 15 : Influence de la température sur l'efficacité d'extraction des protéines dans une solution de NaOH 2% à durant 60 minutes avec un ratio soluté : solvant de 1 : 20

Influence de l'ajout de traitement de sonication à la déprotéination

Afin de déterminer l'effet d'un traitement de sonication sur la déprotéination du chitane déminéralisé, il importe de bien distinguer l'effet dû à la simple solubilisation des protéines dans un milieu de l'effet dû aux ultrasons. Des courbes de cinétiques d'extraction des protéines ont été faites après 10 minutes de mouillage, à la même température d'extraction, puisque les tests de sonication furent tous précédés de cette étape. La figure 16 montre que l'efficacité d'extraction atteint un pseudo-plateau 20 minutes après le mouillage (donc 30 minutes après avoir ajouté le chitane à la solution) où la vitesse de déprotéination s'effectue beaucoup plus lentement, et ce pour toutes les températures. Lorsqu'un traitement de sonication est appliqué après le mouillage, le plateau disparaît pour laisser place à une déprotéination linéaire (figure 17). La sonication permet donc une déprotéination plus rapide de la chitine. Les ultrasons parviennent à perturber la matrice de chitine permettant aux protéines d'être solubilisées dans la solution.

L'amélioration de la déprotéination, lorsqu'elle est assistée par un traitement aux ultrasons, peut être expliquée par les micro-jets formés lors des implosions asymétriques (figure 3) ainsi que par l'onde de choc de l'implosion. Les deux facteurs combinés perturberaient le réseau de chitine permettant au milieu alcalin d'entrer en contact avec les protéines. En s'hydratant, ces dernières gonfleraient brisant ainsi plusieurs liens non-covalents intramoléculaires et intermoléculaires (Chalikian, 2003). Ce relâchement structurel permettrait une meilleure diffusion des protéines au travers du réseau de fibres de chitine et leur solubilisation.

Afin de distinguer les effets du traitement de sonication par rapport à la durée de l'extraction, les déprotéinations assistées par sonication ayant servies à établir la cinétique d'extraction ont été poursuivies sur une plaque chauffante agitatrice, à la même température, jusqu'à ce que le temps total de mise en contact entre le chitane et le solvant soit de 60 minutes. Les valeurs d'EEP furent comparées aux valeurs obtenues après 60 minutes d'extraction sans sonication aux mêmes températures. Les résultats de ces expérimentations sont présentés dans la figure 18. On peut constater sur cette figure que l'apport en énergie de sonication appliqué au système, dû à une augmentation du temps de traitement de sonication, fait augmenter de façon linéaire l'EEP.

Dans un second temps, le chitane a été traité avec sonication pendant 10 minutes des puissances variant de 35 W à 150 W à 40°C, 50°C, 60°C et 70°C et la réaction a été poursuivie durant 60 minutes de mise en contact (figure 19). L'EEP augmente aussi dans ce cas de façon linéaire avec l'énergie de sonication donnée au système. Ces résultats démontrent que plus la puissance du traitement est élevée, meilleure est l'EEP.



Figure 16 : Cinétique d'extraction des protéines à 40°C (\blacklozenge), 50°C (\blacksquare), 60°C (\triangle) et 70°C (×) sans sonication après 10 minutes de mouillage (Valeurs expérimentales : Annexe 5)



Figure 17 : Cinétique d'extraction des protéines à 40°C (\blacklozenge), 50°C (\blacksquare), 60°C (\triangle) et 70°C (×) avec une sonication de 100 W (60°C et 70°C) et 150 W (40°C et 50°C) après 10 minutes de mouillage (Valeurs expérimentales : Annexe 6)



Figure 18 : Effet de l'énergie de sonication d'une durée variant de 0 à 50 minutes sur l'EEP à 40°C (\blacklozenge), 50°C (\blacksquare), 60°C (\triangle) et 70°C (×) (Énergie constante de sonication de 150 W à 40°C et 50°C et de 100W à 60°C et 70°C) (Valeurs expérimentales : Annexe 7)





Ainsi le temps et la puissance de sonication sont deux facteurs permettant une meilleure déprotéination. En combinant les 2 facteurs, différents tests ayant une énergie totale de 90 kJ ont été effectués (figure 20). Cette figure montre que pour une même énergie fournie au système, l'EEP est toujours le même, peu importe le temps et la puissance et ce pour toutes les températures expérimentées. Donc l'augmentation de l'EEP constatée avec l'augmentation du temps et de la puissance de sonication n'est en fait due qu'à l'augmentation globale de l'énergie de sonication fournie au système.



Figure 20 : EEP suivant une sonication de 90 kJ répartie sur différents temps et différentes températures (Valeurs expérimentales : Annexe 9)

La figure 21 montre un ensemble de traitements obtenus avec différents temps et puissances de même que les droites obtenues pour les différents traitements. Les pentes de ces droites représentent l'effet d'un apport en énergie de sonication sur l'EEP. Par exemple, à 70°C l'énergie fournit au système augmente l'EEP de 0,1%/kJ. Ces droites démontrent que même s'il y a augmentation de l'EEP pour toutes les températures, l'effet de l'énergie est plus marqué lors des traitements à haute température. Il y a synergie entre l'énergie de sonication et l'énergie thermique.



Figure 21 : Efficacité d'extraction suite à une sonication de différentes énergies à 40°C (\bullet) (y=0,0532x + 43,8 R² = 0,96), à 50°C (**n**) (y=0,0773x + 52,2 R² = 0,96), à 60°C (Δ) (y=0,0879x + 59,0 R² = 0,93), et à 70°C (×) (y=0,1008x + 66,9 R² = 0,98) (Valeurs expérimentales : Annexe 10)
En prenant les valeurs des pentes de la figure 21 en fonction de la température correspondante, il résulte une droite linéaire passant par 0 (figure 22). Cette droite représente la variation de la différentielle de l'EEP par rapport à l'énergie à différentes températures de sonication. La pente de cette droite permet d'estimer l'effet de la sonication à différentes énergies thermiques. Par exemple, la valeur du gradient à 80°C devrait être de $0,112 \text{ kJ}^{-1}$, à 90°C, $0,126 \text{ kJ}^{-1}$ et à 100°C, $0,140 \text{ kJ}^{-1}$. En combinant ces valeurs de gradient obtenues par la droite de la figure 21 et la valeur d'EEP obtenue pour une déprotéination sans sonication à la même température (figure 15), il est possible de déterminer la quantité théorique d'énergie ultrasonique nécessaire pour obtenir une déprotéination complète. La figure 23 montre les différentes énergies nécessaires théoriquement à une déprotéination complète de 40°C à 100°C. Une inflexion de la courbe s'effectue autour de 55°C et indiquant que l'efficacité de la sonication diminue significativement en dessous de cette valeur.

Une brève étude sur les protéines recueillies après sonication démontre que celles-ci sont peu affectées par le traitement de sonication. Le point isoélectrique des protéines recueillies à 60°C avec sonication est similaire à celui des protéines recueillies après une déprotéination à 25°C, soit près de pH 6,2. Le point isoélectrique des protéines recueillies après déprotéination à 100°C est quand à lui autour de pH 1,3. La similitude entre les points isoélectriques de protéines extrait avec des ultrasons et à 25°C laisse présager très peu de changements structurels. Le changement du point isoélectrique à 100°C indique une modification structurelle des protéines provenant d'une dénaturation thermique. La sonication pourrait donc permettre de recueillir plus rapidement l'ensemble des protéines sans que celles-ci subissent une dénaturation thermique, permettant leur valorisation. Néanmoins, d'autres modifications aux protéines peuvent avoir lieu durant le traitement de sonication comme une hydrolyse partielle (Wang, 2004).



Figure 22 : Gradient de l'efficacité de l'extractabilité des protéines avec l'énergie de sonication (kJ) en fonction de la température $(y = 0,0014x, R^2 = 0,98)$ (Valeurs expérimentales : Annexe 11)



Figure 23 : Énergie de sonication théorique nécessaire à la déprotéination complète du chitane (Valeurs expérimentales : Annexe 11)

Pour résumé cette section, la figure 24 présente l'effet d'une déprotéination de 60 minutes dans une solution NaOH 2% et NaCl 2% avec des traitements de sonication, un à 90 kJ et un à 300 kJ, comparativement à une déprotéination sans sonication, selon la température d'extraction. L'effet de la température et de l'énergie de sonication est bien mis en évidence avec une augmentation linéaire de l'EEP en fonction de la température du traitement et une augmentation proportionnelle de l'EEP en fonction de l'énergie fournie.



Figure 24 : Effet de la température d'extraction sur l'EEP sans sonication (\blacklozenge), avec sonication de 90 kJ (\blacksquare) et avec sonication de 300 kJ (\blacktriangle)

Changement de conformation de la chitine suite à la sonication

La texture de la chitine se transforme après sonication. D'un état floconneux avant sonication, celle-ci se compacte et devient plus dense et plus solide, selon l'énergie de sonication fournie, après séchage. Cette transformation diminue fortement la mouillabilité de la chitine ce qui peut nuire aux réactions subséquentes qu'elle subira, comme la desacétylation menant au chitosane. En effet, la chitine obtenue suite à une sonication s'hydrate mais ne se disperse pas en solution.

Ce changement de structure peut être expliqué de deux façons; soit la sonication a amené une augmentation de la cristallinité de la chitine, augmentant ainsi sa densité., soit le dépliement des fibres de chitine, dû au gonflement de celle-ci durant la sonication, a permis une augmentation des liens hydrophobes.

Afin de déterminer les causes de ce changement, la chitine fut dispersée dans une solution d'éthanol anhydre. Les chitines sonifiées qui ont été imprégnées d'alcool ont toutes perdu leur caractère plus dense pour redevenir des flocons friables. La chitine ainsi traitée reprend, après séchage, une excellente mouillabilité et dispersabilité en solution aqueuse.

L'analyse de la cristallinité de la chitine au rayon X après traitement aux ultrasons et après immersion dans l'éthanol donne les spectres de la figure 25. L'échantillon obtenu avec traitement de sonication a été traité durant 50 minutes à 150W à 40°C. Le spectre obtenu avec traitement aux ultrasons montre très peu de différences comparativement au spectre de la même chitine sans traitement. Néanmoins, il apparait quelques nouveaux pics autour de 40°. Ces pics peuvent signifier l'apparition d'un nouvel arrangement moléculaire, mais il est aussi probable que l'échantillon ait été chélaté des microparticules d'oxyde de titane résultant de l'érosion de la sonde à cette intensité. L'ajout d'éthanol amène une diminution marquée du plan cristallin 130 ainsi que d'autres plans mineurs de la chitine non traitée et de celle traitée aux ultrasons, sans toutefois affecter les deux principaux plans cristallins, 110 et 020.

Le changement de cristallinité ne peut cependant pas expliquer le changement de texture de la chitine ayant subit un traitement de sonication seul et avec un post traitement à l'éthanol pour deux raisons. D'abord, la chitine ayant préalablement subit un prétraitement dans l'éthanol, donc ayant le plan 130 fortement détruit, gagne aussi en densité après un traitement de sonication. Le changement de cristallinité ne prévient donc pas le changement de texture. De plus, la chitine sonifiée ayant été traitée à l'éthanol pour reprendre une forme floconneuse redevient très dense lorsque réhydratée et reséchée.

Un changement de conformation et la formation de liaisons hydrophobes entre les fibres de chitine peut expliquer ce changement de densité. La sonication favoriserait la formation de liaisons hydrophobes entre les différentes fibres de chitine. L'ajout d'éthanol, moins polaire que l'eau, permettrait un relâchement de ces liens permettant à la chitine de reprendre une forme floconneuse après avoir été séchée. L'ajout d'eau à cette même chitine favorise à nouveau les liaisons hydrophobes redonnant à la chitine sa forme plus dense. Ce changement de conformation pourrait interférer avec éventuellement lors de réactions subséquentes. Ces observations sont résumées dans le tableau 15.



Figure 25 : Cristallinité de la chitine a) sans post-traitement b) après immersion dans l'éthanol, c) après traitement aux ultrasons d) après traitement aux ultrasons et immersion dans l'éthanol

Traitement	Type de particule	Modification du spectre XRD
Sans traitement	Floconneux	-
Éthanol	Floconneux	Affaissement du pic 130
Sonication	Dense	Apparition de pic autour de 40°
Éthanol suivi de sonication	Dense	Non analysé en XRD
Sonication suivi de l'éthanol	Floconneux	Affaissement du pic 130, Apparition de pic autour de 40°
Sonication suivi de l'éthanol suivi de l'eau	Dense	Non analysé en XRD

Tableau 15 : Synthèse des différents changements subit par la chitine selon différents traitements

Conclusion

L'industrie de la transformation de la crevette nordique subit actuellement les pressions de la surproduction internationale de crevette. La surproduction amène une chute des prix. Une meilleure gestion des déchets, comprenant l'extraction de la chitine dans le but d'obtenir du chitosane, permettrait une meilleure rentabilité des usines tout en diminuant leur impact environnemental. Néanmoins, cette transformation est très coûteuse limitant son exploitation. Il faut donc réduire les coûts de cette transformation et valoriser les coproduits.

Cette étude traitait de l'isolation et de la valorisation des co-produits de cette transformation sur le Chitane^{PLUS}, un résidu de carapaces de crevettes partiellement déprotéiné enzymatiquement. L'optimisation de la déminéralisation, la première étape de l'isolation de la chitine, en milieu acide fut d'abord analysée. À cette étape, les minéraux sont transformés en sels solubles. La concentration en acide, le ratio soluté : solvant, le temps et la température d'extraction de même que la granulométrie furent étudiés. Il apparaît que lorsque le chitane est finement broyée, l'optimisation de sa déminéralisation ne nécessite qu'un apport suffisant stéchiométriquement en acide afin de réagir avec l'ensemble des minéraux et permettre leur transformation en sels solubles. Les autres paramètres ne semblent pas interférer dans la déminéralisation. La déminéralisation à grande échelle fut effectuée avec de l'acide chlorhydrique 1N, un ratio soluté : solvant de 1:10, à température ambiante durant 10 minutes sous agitation constante.

Afin de valoriser l'extrait de déminéralisation, une étude de ses différents constituants fut effectuée. Les différents minéraux furent dosés dans l'extrait brut et après précipitation de constituant suite à une basification du milieu. L'extrait obtenu suite à la déminéralisation est constitué de calcium, de phosphate, de magnésium, du chitosane et de chlorure ainsi que d'autres minéraux mineurs. L'acide phosphorique précipite d'abord vers pH 4,5 en phosphate tricalcique. La déprotonation de l'hydrolysat de chitosane entre pH 5 et 7 conduit à sa précipitation. Après l'ajout de carbonate de sodium, le CaCl₂ précipite sous forme de carbonate de calcium à pH 7 et le MgCl₂ en carbonate de magnésium.

Le carbonate de calcium peut être synthétisé sous différentes formes lorsque précipité afin de donner une valeur ajoutée à l'extrait de déminéralisation. Le carbonate de calcium fut précipité à l'aide de carbonate de sodium sans autre traitement, en présence de SDS, avec sonication et en combinant les effets des ultrasons et la présence de SDS. Le carbonate de calcium précipite sous forme de particules de calcite de diamètre minimal de 6-10 μ m lorsqu'il n'y a pas d'ajout de traitement. L'ajout de SDS à la solution de carbonate de sodium amène la formation de particules de vatérite et de calcite de 0,5-2 μ m de diamètre. La présence d'ultrasons durant la dispersion conduit à la formation de bâtonnets d'aragonite de 0,5-3 μ m de longueur et de 0,1-0,5 μ m de diamètre. En combinant l'ajout de SDS et la présence d'ultrason, on obtient un mélange de vatérite de 0,2-1 μ m de diamètre et des bâtonnets d'une forme d'aragonite modifié de 0,05 μ m par 0,3 μ m.

L'optimisation de la déprotéination, la seconde étape de l'isolation de la chitine, du résidu de chitane déminéralisée fut par la suite analysée. À cette étape, les protéines sont solubilisées dans le milieu alcalin. L'effet de la concentration et du type d'alcali, du ratio soluté : solvant, la température et l'utilisation de la sonication durant le traitement furent étudiés. Il apparaît qu'une solution de NaOH 2% avec un ratio de 1 : 10 soit le plus efficace. L'efficacité de la déprotéination augmente avec la température de l'extraction. Les ultrasons accélèrent aussi la solubilisation des protéines. L'efficacité de la température du système, où il fut déterminé qu'une température supérieure à 55°C est plus efficace. Les protéines extraites à cette température sont moins sujettes aux dénaturations et pourraient être revalorisées. La chitine obtenue après sonication change de forme et augmente en densité. Ce phénomène pourrait être causé par une augmentation du nombre de liaisons hydrophobes résultant de la sonication.

Les trois composés majeurs des carapaces de crevettes peuvent donc être mis en valeur grâce à différentes méthodes d'extraction et de traitement des minéraux et des protéines. D'autres études dans ce sens devraient permettre de déterminer le type de carbonate synthétisé en combinant la sonication et le SDS, les changements apportés par la sonication à la chitine et ultimement permettre de récupérer et de valoriser la majorité des constituants de la crevette nordique. Cette étude montre le fort potentiel d'obtention d'une

variété de produits valorisés, en plus de la chitine, provenant des carapaces de chitine, comparativement à une extraction utilisant des conditions plus sévères.

Bibliographie

ţ

- AMEC Earth & Environmental Limited, Gestion des déchets des usines de transformation des produits de la mer de l'Atlantique, Rapport final, Darmouth, NE, 2003.
- Aye, K.N., Stevens, W.F., Technical note improved chitin production by pretreatment of shrimp shells, Journal of chemical technology and biotechnology, 2004, 79, 421-425.
- Boucher, R., Optimisation des étapes d'extraction de la chitine à partir des résidus de crevettes de l'espèce *Pandalus borealis*, Mémoire de maîtrise, Université Laval, 1991.
- Chalikian, T.V. Volumetric properties of protein. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2003, 32, 207-235.
- Cho,Y.I., and No, H.K. Effective Deproteinization Under Autoclaving Conditions for preparation of Chitin. Journal of Korean Society for Chitin and Chitosan. 1999. 4,3, 152-155.
- de Britto, D., de Assis, O.B.G., Systesis and mechanical properties of quaternary salts of chitosan-based films for food application, International Journal of biological macromolecules, 2007, 41 (2), 198-203
- Diaz-Rojas E.I., Argüelles-Monal W.M., Higuera-Ciapara I., Hernández J., Lizardi-Mendoza J., Goycoolea, F.M., Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste, Macromolecular Bioscience, 2006, 6, 340-347.
- Doktycz, S.J., Suslick, K.S., Interparticule collisions driven by ultrasound, Science, 1990, 247 (4946), 1067-1069.
- Domingo, C., Garcia-Carmona, J., Loste, E., Fanovish, A., Fraile, J., Gomez-Morales, J., Control of calcium carbonate morphology by precipitation of compressed and supercritical carbon dioxide media. Journal of Crystal Growth, 2004, 271, 268-273.
- Dupont, L., Portemer, F., Figlarz, M. Synthesis and study of a well crystallized CaCO₃ vaterite showing a new habitus. Journal of Material Chemistry, 7, 797-800
- Eymard, S., Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (Trachurus trachurus) : choix des procédés. Thèse de doctorat, IFREMER, Nantes, France, 2003.
- Gamage, A. Shahidi, F., Use of chitosan for the removal of metal ion contaminants and protein from water. Food Chemistry, 2007, 104 (3), 989-996.

- Ghaouth A., Arul J., Grenier J., Benhamou N., Asselin A., Belanger R. Effect of chitosan on cucumber plants : suppression of Pythium aphanidermatum and induction of defense reactions, Phytopathology, 1994, 84 (3), 313-320.
- Gildberg, A., Stenberg, E., A new process for advanced utilization of shrimp waste, Process Biochemistry, 2001, 36, 809-812.
- Heywood, B. R., Rajam, S., Mann, S., Oriented crystallization of CaCO₃, under compressed monolayers, Journal of the Chemical Society, Faraday Transformation, 1991, 87, 727-734.
- Hromadkova Z., Ebringerova A., Ultrasonic extraction of plant materials—investigation of hemicullulose release from buckwheat hulls, Ultrasonics Sonochemistry, 2003, 10, 127-133.
- Johannsen, K. Alex, T. Burwieck, H. Dorsch, T., Wichmann, K. Effect of iron and manganase ions on the crystal growth of calcium carbonate, Acta hydrochimica et hydrobiologica, 1997, 35 (4), 202-207.
- Karagiozov, C., Momchilova, D., Synthesis of nano-sized particles from metal carbonates by the method of reversed mycelles. Chemical Engineering and Processing, 2005, 44, 115-119.
- Ke Liang, B., Chang and Gengia Tsai, Response Surface Optimization and Kinetics of Isolating Chitin from Pink Shrimp (Solenocera melantho) Shell Waste, J. Agric. Food Chem., 1997, 45 (5), 1900 -1904.
- Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology. Volume 4. 5^e ed. John Wiley & Sons, 2001, New York, NY.
- Khan, T., Peh, K., Ch'ng, H.S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. Journal of Pharmaceutical Science. 2002, 5 (3), 205-212.
- Lavall, R. L., Assis, O.B.G., Campana-Filho, S.P. β-Chitin from the pens of Loligo sp.:Extraction and characterization. Bioressource Technology, 2007, 98 (13), 2465-2472.
- Lee, M.-H., Oh, S.-G., Suh, K.D., Kim, D.-G., Sohn, D., Preparation of silver nanoparticles in hexagonal phase formed by nonionic Triton X-100 surfactant. Colloids and Surfaces A: Physiocochemical and Engineering Aspects, 2002, 210, 49-60.
- Lévesque, M., Extraction de caractérisation de la chitine des résidus de la transformation industrielle des crustacés, Mémoire de maîtrise, Université Laval. 1995.

- Li H., Pordesimo L., Weiss J., High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans, Food Research International, 2004, 37, 731–738.
- Litvin, A.L., Kaplan, D.L., Sung, C. Microstructure of aragonite grown at an air-liquid interface, Journal of Materials Science, 1997, 32, 2233-2236.
- Low, C. Ultrasound in synthesis: natural products and supersonic reaction?, Ultrasonics Sonochemistry, 1995, 2 (2), 153-163.
- Luquet, M., Marin, F., Biomineralisations in crustaceans, Compte Rendu Pelevol, 2004, 515-534.
- MAPAQ 2004, http://www.mapaq.gouv.qc.ca/Fr/Peche/Profil/pecheaquaculture/peche.
- Martini, S., Herrera, M.L., X-Ray diffraction and crystal size, JAOCS, 2002, 79 (3), 315-316.
- Mason, T.J., Chemistry with ultrasound, Elsevier Science Publishers LTD, New York, NY, 1990.
- Mason, T.J., Paniwnyk L., Lorimer J.P., The use of ultrasound in food technology, Ultrasonics Sonochemistry, 1996, 3, S253-S260.
- Meier, W., Nanostructure synthesis using surfactants and copolymers. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 1999, 4, 6-14.
- Mizukoshi, Y., Takagi, E., Okuno, O., Oshiba, R., Maeda, Y., Nagata, T., Preparation of platinum nanoparticles by sonochemical reduction of the Pt(IV) ions: role of surfactants. Ultrasonics Sonochemistry, 2001, 8, 1-6.
- Mitra. S., Gaur, U., Ghosh, P.C., Maitra, A.N., Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. Journal of Controlled Release, 2001, 74 (1-3), 317-323.
- Muzzarelli, R.A.A., Chitin, Pergamom, Oxford, 1977.
- No, H.K., Hur, E.Y. Control of Foam Formation by Antifoam during Demineralization of Crustacean Shell in Preparation of Chitin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998. 46, 9. 3844-3846.
- No, H.K., Meyers, S.P., Lee, K.S., Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. Journal of Agriculture and Food Chemistery, 1989, 37 (3), 575-579.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers, S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. International Journal of Food Microbiology. 2002, 74, 65-72.

- Panchev I.N., Kritchev N.A., Kratchnov, C.G. Improving pectin technology II: Extraction using ultrasonic treatment. International, Journal of Food Science and Technology, 1988, 23 (4), 337-341.
- Percot, A., Viton, C., Domard, A., Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells, Biomacromolecules, 2002, 4 (1), 12-18.
- Percot, A., Viton, C., Domard, A., Characterization of shrimp shell deproteinization, Biomacromolecules, 2003, 4 (5), 1380-1385.
- Poirier, M. Fractionnement et caractérisation de la chitine dans le système N,Ndimethylacétamide *l* chlorure de lithium, Mémoire de maîtrise, Université Laval, 2000.
- Rauscher, F., Veit, P., Sundmacher, K., Analysis of a technical-grade w/o-microemulsion and its application for the precipitation of calcium carbonate nanoparticles, 2005, 254, 183-191.
- Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science. 2006, 31, 603-632.
- Shanidi, F. Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J. Food applications of chitin and chitosans. Food Science and Technology, 1999, 10, 37-51.
- Shahidi, F. and Synowiecki, J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (Chinoecetes opilio) and shrimp (Pandalus borealis) processing discards. J. Agric. Food Chem. 1991, 39, 1527-1532.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Olsen, B.J., Klenk, D.C., Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, 1985, 150, 76-85.

Snoeyink, V.L., Jenkins, D., Water Chemistry, É-U.A, 1980, p.298-305.

Solomons, G., Fryhle, C., Chimie Organique, Edition Modulo, 2000, p.67-71.

Sun, L., Du, Y., Yang, J., Shi, X., Li, J., Wang, X., Kennedy, J.F., Conversion of crystal structure of the chitin to facilitate preparation of a 6-carboxychitin with moisture absorption-retention abilities. Carbohydrate Polymers, 2006, 27 (2), 168-175.

Suslick, K.S., The chemical effects of ultrasound, Scientific American, 1989, 2, 80-86.

Suslick, K.S., Prince G.J., Application of ultrasound to material chemistry, Annual Review of Materials Science, 1999, 29, 295-326.

- Synowiecki, J., Al-Khateeb, N., The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards, Food Chemistry, 2000, 68, 147-152.
- Synowiecki, J., Al-Khateeb, N., Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2003, 43 (2), 145-171.
- Tang, Y. Du, B., Li, L. Yang, J. Zhang, Y., Effect of Tx-100-SDS on crystal growth of calcium carbonate in reverse microemulsion solution. Chinese Science Bulletin, 2007, 52, 78-83.
- Tharanathan, R. N., Kittur, F.S., Chitin The undisputed biomolecule of great potentiel. Critical Review in Food Science and Nutrition, 2003, 43 (1), 61-87.
- Virone, C., Kramer, H.J.M., van Rosmalen, G.M., Stoop, A.H., Bakker, T.W., Primary nucleation induced by ultrasonic cavitation. Journal of Crystal Growth, 2006, 294, 9-15.
- Wang, H., Xu, S., Zhao, X.-N., Zhu, J.-J., Xin, X.-Q., Sonochemical synthesis of sizecontrolled mercury selenide nanoparticles. Materials Science and Engineering B, 2002, 96, 60-64.
- Wang L., Wang, Y.J., Application of high-intensity ultrasound and surfactants in rice starch isolation, Cereal chemistry, 2004, 81 (1), 140-144.
- Wang, W., Liu, Z., Zheng, C., Xu, C., Liu, Y., Wang, G., Synthesis of CdS nanoparticles by a novel and simple one-step solid-state reaction in the presence of a nonionic surfactant. Materials Letters, 2003, 57, 2755-2760.
- Wei, H., Shen, Q., Zhao, Y., Wang, D., Xu, D., Crystallization habit of calcium carbonate in the presence of sodium dodecyl sulfate and/or polyrrolidone. Journal of Crystal Growth, 2004, 260, 511-516.
- Xiang, L., Xiang, Y., Wen, Y., Wei, F., Formation of CaCO₃ nanoparticles in the presence of terpinol. Materials Letters, 2004, 58, 959-965.
- Xyla, A.G., Koutsoukos, P.G., Quantitative analysis of calcium carbonate polymorphs by infrared spectroscopy, Journal of chemical society, Faraday Transactions I, 1989, 85, 3165-3172.
- Yu, W.L., Pei, J., Huang, W. Zhao, G.X., Formation of CdS nanoparticles in mixed cationic-anionic surfactant vesicle system. Materials Chemistery and Physics, 1997, 49, 87-97.

- Yu-Hung, C., Yeh, C.-S., Laser ablation method: use of surfactants to form the dispersed Ag nanoparticles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect, 2002, 197, 133-139.
- Zhou, G.-T., Yu, J.C., Wang, X.-C., Zhang, L.-Z., Sonochemical synthesis of aragonitetype calcium carbonate with different morphologies. New journal of chemistry, 2004, 28, 1027-1031.



CHITANEPLUS (CHITINE MINÉRALE)

CHITANEPLUS

La région du Golfe Saint-Laurent est un lieu privilégié pour la pêche commerciale de la crevette nordique (*Pandalus borealis*). AQUA-BIOKEM BSL utilise un procédé biochimique unique de production de chitine minérale à partir de co-produits de la première transformation de la crevette nordique. Le CHITANE^{PUIS} est obtenu par hydrolyse enzymatique de la matière première, séparation solide-liquide et sèchage.

Le CHITANE^{PLUS} est principalement constitué de chitine, de carbonate de calcium et de protéines. La chitine est un polymère linéaire constitué d'unités (β -(1->4)-2-acétamido-2-deoxy-Dglucopyranose. C'est le polymère naturel le plus abondant après la cellulose. Cet important constituant de la carapace des crustacés est non toxique, non allergène et biodégradable. Le CHITANE^{PLUS} est riche en carbonate de calcium et contient une quantité impressionnante d'oligo-éléments. Les protéines résiduelles possédent un prôfil équilibré d'acides aminés.

UTILISATIONS

Agriculture et horticulture organique

Fertilisant naturel.

Immunostimulant.

Favorise la production de chitinases dans les sols (action antifongique indirecte).

Nutrition animale

Source intéressante de calcium, de phosphore et d'oligo-éléments. Source d'acides aminés essentiels.

Source de fibres alimentaires insolubles favorisant l'amélioration de la digestion.

Intermédiaire de production

Production de chitine purifiée, de chitosane et de glucosamine.

STOCKAGE

Conserver à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité.

CONDITIONNEMENT

Sacs de polyéthylène (1 - 5 kg) Barils de carton (10 - 20 kg)

COMPOSITION	
Matière sèche	> 90 %
Densité apparente	0,3 g / ml
Matière organique	60 - 67 %
Chitine	30 - 45 %
Lipides	0,5 - 3,0 %
Protéines	18 - 35 %
Matière minérale	33 - 40 %
Calcium (Ca)	16 - 21 %
Cuivre (Cu)	0,001 - 0,004 %
Magnésium (Mg)	0,5 - 1,0 %
Phosphore (P)	2,5 - 3,5 %
Potassium (K)	0,02 - 0,1 %
Sodium (Na)	0,06 - 0,2 %
Zinc (Zn)	0,002 - 0,005 %
Arsenic (As)	< 6 ppm
Cadmium (Cd)	< 1,0 ppm
Mercure (Hg)	< 0,5 ppm
Plomb (Pb)	< 0,5 ppm

NOTE

Les informations contenues dans cette fiche sont correctes au meilleur de nos connaissances à la date mentionnée et ne comportent aucune garantie. Mise à jour: 30 mai 2004.

ORGANICOCEAN est une marque de commerce déposée par AQUA-BIOKEM BSL 300 Allée des Ursulines Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1 Tél.: 418-723-1986 poste 1408 Fax: 418-724-1843

tamma (min)	Teneur en	calcium démin	éralisé (%)
temps (mm)	25°C	35°C	45°C
0	0,00	0,00	0,00
2	90,29	97,47	92,67
5	98,33	99,67	98,80
10	99,84	100,31	102,04
15	97,11	97,40	101,17
30	102,49	100,11	99,72

Tableau 16 : Données de la figure 6 : teneurs en calcium des extraits de déminéralisation après différents temps à 25°C, 35°C et 45°C

	% de solide	% de solide
рн	précipité absolu	précipité relatif
4,0	0	0
4,5	0,0272	0,0272
5,0	1,4316	1,4044
5,5	1,6624	0,2308
6,0	1,7856	0,1232
6,5	1,8264	0,0408
7,0	1,8404	0,014
7,5	2,0684	0,228
8,0	4,2788	2,2104
8,5	4,772	0,4932
9,0	5,028	0,256
9,5	5,036	0,008
10,0	5,132	0,096
10,5	5,134	0,002

Tableau 17 : Données de la figure 7 : pourcentages de solide précipité de l'extrait de déminéralisation selon le pH

Tableau 18 : Données de la figure 15 : efficacité d'extraction des protéines après 1 heure d'extraction dans une solution NaOH 2% selon la température

T (°C)	% azote	% EEP
35	7,557	42,9
40	7,530	45,2
45	7,466	48,9
50	7,418	51,3
55	7,362	56,9
60	7,316	58,3
65	7,260	62,7
70	7,206	65,4
75	7,173	68,5
80	7,143	70,5
85	7,086	74,3
90	7,054	76,4
95	7,017	78,9
100	6,964	82,4

Température	Temps après mouillage	% azote	% EEP
	(min)		
40°C	0	7,941	23,87
	5	7,82	31,29
	10	7,753	35,40
	20	7,659	41,17
	35	7,628	43,07
	50	7,602	44,66
50°C	0	7,832	30,55
	5	7,75	35,58
	10	7,68	39,88
	20	7,58	46,01
	35	7,52	49,69
	50	7,48	52,15
60°C	0	7,68	39,88
	5	7,6	44,79
	10	7,527	49,26
	20	7,468	52,88
	35	7,402	56,93
	50	7,369	58,96
70°C	0	7,626	43,19
	5	7,467	52,94
	10	7,423	55,64
	20	7,366	59,14
	35	7,29	63,80
	50	7,25	66,26

Tableau 19 : Données de la figure 16: cinétique d'extraction des protéines à 40°C, 50°C, 60°C et 70°C.

Tableau 20 : Données de la figure 17 : cinétique d'extraction des protéines avec sonication à 40°C, 50°C, 60°C et 70°C

					70°C								60°C						50°C						40°C		Température	
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	(W)	sonication	Puissance de
50 50	. 20	15	10	5	0	50	35	30	20	15	10	5	0	50	35	20	10	5	0	50	35	20	10	5	0	sonication	d'extraction avec	Temps
7,020 6,750	7,150	7,204	7,287	7,389	7,626	6,850	7,052	7,087	7,263	7,289	7,348	7,511	7,680	6,920	7,221	7,420	7,570	7,659	7,832	7,185	7,400	7,563	7,652	7,740	7,941	A MENTA	% azote	
80,37 96,93	72,39	69,11	64,02	57,73	43,19	90,80	78,40	76,26	65,46	63,87	60,28	50,25	39,88	86,50	68,04	55,83	46,63	41,17	30,55	70,28	57,06	47,09	41,60	36,20	23,87		% FFP	

Tableau 21 : Données de la figure 18 : effet d'un traitement de sonication de différentes durées à puissance fixe sur l'extraction des protéines

						70°C								60°C						50°C						40°C	Température	
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	(W)	Phissance
50	35	20	15	10	5	0	50	35	30	20	15	10	5	0	50	35	20	10	5	0	50	35	20	10	5	0	(min)	Temns
300	210	120	90	60	30	0	300	210	180	120	90	60	30	0	450	315	180	90	45	0	450	315	180	90	45	0	(kJ)	Intensité
6,742	6,915	7,026	7,064	7,128	7,204	7,250	6,854	7,084	7,115	7,156	7,202	7,217	7,302	7,369	6,878	7,153	7,265	7,389	7,459	7,480	7,185	7,293	7,467	7,529	7,584	7,602	% azote	
97,42	86,80	80,02	77,67	73,74	69,08	66,26	90,53	76,44	74,54	72,02	69,20	68,28	63,07	58,96	89,08	72,21	65,32	57,76	53,44	52,15	70,28	63,62	52,94	49,13	45,77	44,66	% EEP	

	Puissance (W)	Temps (min)	Énergie (kJ)	% azote	% EEP
40°C	0	10	0	7,602	44,66
	50	10	30	7,590	45,40
	100	10	60	7,560	47,24
	150	10	90	7,529	49,14
50°C	0	10	0	7,480	52,15
	35	10	21	7,456	53,63
	50	10	30	7,439	54,67
	75	10	45	7,403	56,90
	100	10	60	7,394	57,40
	125	10	75	7,378	58,38
	150	10	90	7,362	59,39
60°C	0	10	0	7,369	58,96
	50	10	30	7,302	63,07
	100	10	60	7,217	68,28
	150	10	90	7,193	69,75
70°C	0	10	0	7,250	66,26
	50	10	30	7,204	69,08
	100	10	60	7,150	72,39
	150	10	90	7,057	78,10

.

Tableau 22 : Données de la figure 19 : effet d'un traitement de sonication de même durée à différentes puissances sur l'extraction des protéines

		-			-
Température	Puissance (W)	Temps (min)	Énergie (kJ)	% azote	% EEP
40°C	150	10	90	7,691	49,14
	100	20	90	7,684	49,72
	50	30	90	7,691	49,17
	37.5	40	90	7,670	50,80
	30	50	90	7,681	49,94
50°C	150	10	90	7,519	62,39
	100	20	90	7,513	62,88
	50	30	90	7,512	62,94
	37.5	40	90	7,524	62,02
	30	50	90	7,517	62,58
60°C	150	. 10	90	7,442	68,34
	100	20	90	7,426	69,53
	50	30	90	7,478	65,55
	37.5	40	90	7,441	68,40
	30	50	90	7,444	68,18
70°C	150	10	90	7,315	78,10
	100	20	90	7,314	78,13
	50	30	90	7,326	77,24
	37.5	40	90	7,330	76,93
	30	50	90	7,310	78,47

Tableau 23 : Données de la figure 20 : effet d'un traitement de sonication d'une intensité fixe de différentes durées et de différentes puissances sur l'extraction des protéines

70°C	60°C	50°C		Température 40°C
0 50 100 100 150 100	0 50 100 100 100 100	0 150 135 140 150 150 150	50 150 150 150 150	Puissance (W) 0
0 10 10 10 50	$\begin{array}{c} 0 \\ 10 \\ 20 \\ 10 \\ 30 \\ 30 \\ 30 \\ 50 \\ 50 \\ 50 \end{array}$	0 5 10 20 20 35 50	10 5 10 20 35 50	Temps (min) 0
300 300 300	0 30 60 90 108 180 180 225 225 300	0 90 121,5 126 156 180 315 450	30 45 90 180 315 450	Énergie (kJ) 0
7,250 7,204 7,128 7,150 7,064 7,064 6,964 6,742	7,369 7,302 7,217 7,281 7,281 7,202 7,180 7,115 7,115 7,084 6,979 6,854	7,480 7,459 7,389 7,344 7,388 7,307 7,265 7,153 6,878	7,590 7,584 7,560 7,529 7,400 7,400 7,185	% azote
66,26 69,08 73,74 72,39 77,67 78,10 83,80 97,42	58,96 63,07 68,28 64,36 69,20 70,55 72,33 74,54 76,44 82,88 90,53	52,15 53,44 57,76 60,52 57,79 62,76 62,76 65,32 72,21 89,08	45,40 45,77 47,24 49,14 57,06 57,06 70,28	% EEP 44.66

Tableau 24 : Données de la figure 21 : valeurs d'EEP après sonication de différentes puissances, temps et intensités à différentes températures

Température (°C)	% d'EEP après 1 heure sans sonification	Gradient de l'EEP par kJ (%) (réelle/ <i>estimée</i>)*	Énergie nécessaire à la déprotéination complète (kJ) (réelle/ <i>estimée</i>)*
40	45,2	0,053	1051
50	51,3	0,077	652
60	58,3	0,088	464
70	65,4	0,101	328
80	70,5	. 0,112	263
90	76,4	0,126	187
100	82,4	0,140	125

Tableau 25 : Données de la figure 22 et 23 : variation de l'effet de sonication selon la température et l'énergie théorique nécessaire à une déprotéination complète

* valeur estimée obtenue selon l'équation x=0,0014T