

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

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés



THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de :

DOCTEUR EN SCIENCES

SPÉCIALITÉ: Génie des Procédés

Par:

Abdelghani HASSAINIA

**OBTENTION DU BIOPOLYMERE «CHITINE»
A PARTIR DU CHAMPIGNON «AGARICUS BISPORUS»:
EXTRACTION ET CARACTERISATION**

Soutenue le 24 Juin 2018 devant le jury :

Président :	Rachid MERDES	Professeur	Université 8 Mai 45, Guelma
Rapporteur :	Hamid SATHA	Professeur	Université 8 Mai 45, Guelma
Examineur :	Djafer BENACHOUR	Professeur	Université F Abbas, Sétif 1
Examineur :	Saad LAMOURI	Professeur	EMP Bordj-Elbahri, Alger
Examineur :	Oualid HAMD AOUI	Professeur	Université BM, Annaba

Année : 2018

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse s'est déroulé dans deux laboratoires à savoir :

« LSPN » : Laboratoire des Silicates, polymères, et Nanocomposites, à l'Université 8 Mai 45, Guelma, Algérie.

« LIMP » : Laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymères à l'Université Claude Bernard, Lyon 1, France.

Je tiens, tout d'abord, à remercier mon encadreur le Pr. Hamid SATHA pour m'avoir guidé, aidé et encouragé à dépasser toutes les difficultés que j'ai rencontrées dans ce travail.

Je voudrais également remercier le Pr. Laurent DAVID qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a donné des précieux conseils scientifiques, sans oublier le Pr. Stéphane Trombotto pour son apport sur les techniques d'analyses.

Je tiens également à remercier le Pr. Rachid MERDES d'avoir accepté la présidence du Jury.

Je souhaite aussi remercier les membres du jury qui ont pris la peine d'examiner ce travail à savoir : le Pr. Djafer BENACHOUR, le Pr. Saad LAMOURI et le Pr. Oualid HAMDAOUI. Leurs remarques et critiques auront sans doute un plus pour l'amélioration de la qualité de ce manuscrit.

Je voudrais adresser mes remerciements les plus affectueux à mes collègues et tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Sommaire

Résumé.....	i
Liste des figures	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des abréviations	vii
Introduction générale	1
Références bibliographiques	5

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction	8
I.1. Généralités	9
I.1.1 Chitine et Chitosane	9
I.1.2 Chitine ou chitosane ?.....	11
I.1.3 Aperçu historique.....	11
I.2. Structure physique de la chitine	12
I.3. Structure physique du chitosane.....	14
I.4. Sources de chitine et chitosane	15
I.5. Fonctionnalités de la chitine et du chitosane.....	19
I.6. Les applications de la chitine et du chitosane.....	19
I.6.1 Domaine biomédical.....	20
I.6.2 Domaine agroalimentaire.....	21
I.6.3 Domaine de l'agriculture	22
I.6.4 Domaine des matériaux.....	22
I.6.5 Domaine cosmétique.....	23
I.6.6 Domaine des traitements des eaux.....	23
I.7. La production de chitine et de ses dérivés.....	24
I.7.1 L'approche chimique.....	25
I.7.1.1 La déminéralisation	27
I.7.1.2 La déprotéinisation	28
I.7.1.3 L'étape de blanchiment	29
I.7.1.4 Préparation du chitosane	30
I.7.2 L'approche biologique	31
I.8 Les champignons comme sources de chitine et chitosane	31
I.9 Extraction de la chitine et chitosane à partir des champignons	33
I.10 Le champignon (<i>Agaricus bisporus</i>).....	34
I.11 Analyse bibliographique	35
Conclusion.....	37
Références bibliographiques	38

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Introduction	51
II.1 Matière première.....	51
II.2 Réactifs et échantillons standards.....	53
II.3 Méthodes d'extraction de la chitine et du chitosane.....	53
II.4 Méthodes de caractérisation	57
II.4.1 Spectroscopie infrarouge (FTIR)	57
II.4.1.1 Introduction	57
II.4.1.2 Principe	57
II.4.1.3 Paramètres de l'étude.....	58

II.4.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)	60
II.4.2.1 Introduction	60
II.4.2 .2 Principe.....	60
II.4.2.3 Paramètres de l'étude	62
II.4.3 Analyse de diffraction des rayons X (DRX)	62
II.4.3.1 Introduction.....	62
II.4.3.2 Principe	63
II.4.3.3 Paramètres de l'étude	64
II.4.4 Analyse thermogravimétrique (ATG)	65
II.4.4.1 Introduction.....	65
II.4.4.2 Principe.....	65
II.4.4.3 Paramètres de l'étude	66
II.4.5 Spectroscopie RMN 13C / CP-MAS.....	66
II.4.5 .1 Introduction	66
II.4.5 .2 Principe.....	67
II.4.5 .3 Polarisation croisée (CP-MAS).	70
II.4.5 .4 Paramètres de l'étude... ..	70
Conclusion.....	71
Références bibliographiques	71

CHAPITRE III : RESULTATS DE L'EXTRACTION

Introduction.....	75
III .1 Teneur en matière sèche de l' <i>A. bisporus</i>	75
III.2 Extraction de la chitine et du chitosane à partir des trois parties d' <i>A. bisporus</i>	76
III.3 Rendements massiques de la chitine dans les trois partie de l' <i>A. bisporus</i>	78
III.4. Taux de cendre.....	81
III.5. Taux d'humidité	82
III.6. L'efficacité de la déprotéinisation.....	82
III.7 Rendements massiques du chitosane dans les trois partie de l' <i>A. bisporus</i>	83
Conclusion.....	83
Références bibliographiques	84

CHAPITRE IV : CARACTERISATION

Introduction	89
IV. Caractérisation de la chitine extraite des trois parties d' <i>A. bisporus</i>	89
IV.1 Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier – FTIR.....	89
IV.2 Caractérisation approfondie de la chitine extraite du pied de l' <i>A. bisporus</i>	91
IV.2.1 Analyse de diffraction des rayons X	92
IV.2.2 Analyse thermogravimétrique (ATG)	94
IV.2.3 Analyse de spectroscopie RMN 13C /CP- MAS.....	98
Conclusion.....	101
Références bibliographiques	102
Conclusion générale	105
Annexes	107

Résumé :

La chitine a été isolée à partir de trois parties principales du champignon *Agaricus bisporus*, à savoir : Chapeau, Pied et Lamelle. La chitine a été extraite par traitement alcalin des parties du corps d'*A. Bisporus* dans une solution NaOH 1 M à 80 ° C pendant 2 h. Les trois parties lyophilisées du champignon ont été examinées par MEB et ont présenté une structure poreuse favorable à l'extraction du polysaccharide. Nous avons développé une méthode d'extraction douce afin de limiter la dégradation de la chitine. Le rendement massique d'extraction le plus élevé de la chitine a été obtenu à partir du pied (7,4% du poids sec). Pour le chapeau et lamelle, les rendements massiques de chitine étaient respectivement de 6,4% et de 5,9%. Nous avons confirmé que le chitosane natif se trouve dans l'*A. bisporus* mais avec un pourcentage négligeable.

La chitine extraite du pied était en plus caractérisée par analyse thermique (ATG), diffraction des rayons X (DRX), spectroscopie infrarouge et RMN à l'état solide ¹³C. Les résultats ont montré que la chitine extraite était sous forme alpha, avec un indice de cristallinité (I_{Cr}) de 63% et un degré d'acétylation (DA) de 70%. La présence de protéines et de glucane n'a pas été observée dans la chitine extraite.

MOTS CLÉS: Chitine, chitosane, *a. bisporus*, extraction, chapeau, pied, lamelle.

ABSTRACT

Chitin was isolated from three main body parts of the *Agaricus bisporus* mushroom, *i.e.* pileus, stipes and gills. Chitin was extracted by alkaline treatment of *A. bisporus* body parts in 1M NaOH at 80°C for 2h. The lyophilized bodies were examined by SEM and exhibited a porous structure that is favorable to polysaccharide extraction.

A mild extraction method was adopted to limit the degradation of chitin. The highest extraction yield of chitin was obtained for stipes (7.4% of dry weight). For pileus and gills, yields of chitin were 6.4% and 5.9%, respectively. we confirmed that native chitosan is found naturally in *A. bisporus* but with negligible percentage. Chitin extracted from stipes was characterized by thermal analysis, X-ray diffraction, infrared spectroscopy and solid-state ¹³C NMR. Results showed that the extracted chitin was in the alpha form, with a 63% crystalline index (CrI) and a degree of N-acetylation (DA) of 70%. The presence of proteins and glucans were not observed in the extracted chitin.

KEYWORDS: Chitin, chitosan, *a. bisporus*, extraction; pileus. stipe. gills.

ملخص :

تم عزل الكيتين من ثلاثة أجزاء رئيسية من الفطر (أغاريكوس بيسبوروس) وهي: القبة والقدم والرقائق .

تم استخراج الكيتين بواسطة المعالجة القلوية لأجزاء جسم الفطر (أغاريكوس بيسبوروس) في محلول هيدروكسيد

الصوديوم تركيزه 1 مول في اللتر لمدة 2 ساعة في درجة حرارة 80 درجة مئوية . تم فحص الأجزاء الثلاثة لمجففة

لهذا الفطر بواسطة المجهر الالكتروني حيث تبين أن بنيتهم مسامية مواتية لاستخراج السكريد. وعليه تم اعتماد طريقة

استخلاص لطيفة للحد من تدهور الكيتين المستخلص.

تم الحصول على أعلى عائد استخلاص من الكيتين في قدم الفطر (7.4% من الوزن الجاف). أما بالنسبة للقبة والرقائق

فقد بلغت نسبة الكيتين 6.4% و 5.9% على الترتيب . كما تأكد أن الكيتوزان الأصلي موجود في (أغاريكوس بيسبوروس)

ولكن بنسبة ضئيلة. وقد تم تحليل الكيتين المستخلص باستعمال التقنيات التالية التحليل الحراري، حيود الأشعة السينية،

التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء و الرنين المغناطيسي النووي للكربون 13.

وأظهرت النتائج أن الكيتين المستخلص هو من الشكل ألفا-كيتين مع مؤشر بلوري يقدر ب: 63% ودرجة أستلة (دأ) من

70%. كما انه لم نلاحظ وجود للبروتينات والجلوكان في هذا الكيتين.

الكلمات المفتاحية:

كيتين ، كيتوزان، أغاريكيس بيسبوريس ، استخلاص ، القبة ،القدم ،الرقائق.

Liste des figures

Chapitre I

Figure I.1 : Structure chimique de la chitine et du chitosane.....	10
Figure I. 2 : Production du chitosane par désacétylation de la chitine.....	10
Figure I.3 : Les liaisons hydrogènes dans la structure de la chitine.....	13
Figure I.4 : Schémas simplifiés des trois formes cristallines de la chitine	14
Figure I.5 : Sources de chitine dans la nature.....	18
Figure I.6 : Application du chitosane dans le domaine biomédical.....	20
Figure I.7 : Utilisation du chitosane comme flocculant.....	24
Figure I.8 : schéma d'un exemple de production de chitine et du chitosane	26

Chapitre II

Figure II.1 : La matière première : Champignon <i>A. bisporus</i>	51
Figure II.2 : Préparation des champignons.....	52
Figure II.3 : Les champignons d' <i>A. bisporus</i> séparé en trois parties : (1) Chapeaux; (2) Pieds ; (3) Lamelles.....	52
Figure II.4 : Lyophilisation des champignons.....	53
Figure II.5 : Etape de déproteinisation.....	55
Figure II.6 : Centrifugation	55
Figure II.7 : Schéma de principe d'un spectromètre à transformée de Fourier.....	58
Figure II.8 : Spectromètre FTIR Nicolet iS10 (ThermoFischer Scientific).....	59
Figure II.9 : Photo de la coupe d'un MEB et schéma de fonctionnement associé.....	61
Figure II.10 : Microscope électronique à balayage (MEB) (Hitachi S800).....	62
Figure II.11 : Principe de la Loi de Bragg.....	63
Figure II.12 : Diffractomètre Bruker D8.....	64
Figure II.13 : Schéma de principe de l'ATG.....	65
Figure II.14 : Dispositif d'analyse thermogravimétrique.....	66
Figure II.15 : Le moment magnétique μ	68

Figure II.16 : Orientation des moments magnétiques nucléaires.....	69
Figure II.17 : Schémas de principe du RMN ¹³ C.....	69
Figure II.18 : Dispositif d'analyse RMN ¹³ C.....	70

Chapitre III

Figure III.1 : Répartition du poids dans les trois parties du champignon <i>A. bisporus</i> (en pourcentage du poids humide).....	75
Figure III.2. Images (MEB) des microstructures : (a) chapeau, (b) pied et (c) lamelle d' <i>A. bisporus</i> après lyophilisation.....	78

Chapitre IV

Figure IV.1: spectre FTIR de (A) la chitine extraite du pied d' <i>A. bisporus</i> , (B) la chitine extraite du lamelle d' <i>A. bisporus</i> , (C) la chitine extraite du chapeau d' <i>A. bisporus</i> et (D). l'alpha chitine commerciale (DA = 87,4%).....	90
Figure IV.2. Diffractogrammes de rayons X de : (a) alpha chitine commerciale et (b) chitine extraite du pied d' <i>A. bisporus</i>	93
Figure IV. 3: Thermogrammes ATG de : (a) chitine extraite du pied d' <i>A. bisporus</i> et (b) alpha chitine commerciale.....	96
Figure IV. 4: Courbes (DTG) de: a) chitine finale extraite du pied d' <i>A. bisporus</i> ; (b) le résidu alcalin insoluble après la déprotéinisation (c) le pied brute lyophilisé.....	97
Figure IV. 5: Spectre RMN ¹³ C / CP- MAS de: (a) Béta –chitine commerciale, (b) Alpha-chitine commerciale and (c) chitine extraite du pied d' <i>A. bisporus</i>	100

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.1 : Pourcentage de chitine dans les êtres vivants marins25

Chapitre III

Tableau III.1 : Répartition de la masse dans les trois parties du champignon avant et après lyophilisation.....86

Tableau III .2 : Paramètres caractéristiques de la chitine finale90

Chapitre IV

Tableau IV.1: Bandes d'absorbtion FTIR de la chitine extraite et de la chitine standard 95

Liste des abréviations et symboles

- ATG : Analyse thermogravimétrique
- FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
- MEB : Microscopie électronique à balayage
- SEM : Scanning Electron Microscopy
- DRX : Diffraction des rayons X
- RMN ¹³C : Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13
- CP- MAS : Polarisation croisée – Rotation à l'Angle Magique
- al. : allongement
- déf. déformation
- al.sym : allongement symétrique
- al.a.sym : allongement antisymétrique
- I_{Cr} : Indice de cristallinité
- (DTG) : Courbes dérivés des thermogrammes (ATG)
- (RIA) : résidu insoluble alcalin
- GlcN: D-glucosamine
- GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine
- *A. bisporus* : Agaricus bisporus
- ATR : réfraction totale atténuée
- DRIFT : L'analyse spectroscopique par réflexion de transformée de Fourier infrarouge.
- PEG : polyéthylène glycol.
- I: spin
- μ : moment magnétique nucléaire
- γ : rapport gyromagnétique du noyau considéré.

- ν : fréquence d'émission en Hz
- δ : déplacement chimique en ppm
- ppm : partie par million
- s : seconde
- μ s : microseconde
- DA : Degré d'acétylation
- M : Molaire
- h : Heure
- ml : Millilitre
- °C : Degré Celsius
- min : Minute
- kV : kilovolt
- MHz : Mégahertz
- kHz : kilohertz

Introduction générale

« Biopolymères » est un terme couramment utilisé pour les polymères qui sont synthétisés par des organismes vivants. Les biopolymères proviennent de sources naturelles comme l'amidon la cellulose et les alginates, ils sont biologiquement renouvelables, biodégradables et biocompatibles.

La chitine et son dérivé chitosane ont reçu une attention considérable, en tant que biopolymères, en raison de leurs nombreuses applications potentielles dans l'agriculture, l'industrie alimentaire, la médecine, la fabrication du papier, l'industrie textile et les traitements des eaux. Cet intérêt est dû à leurs nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques [1-3]. La chitine et le chitosane sont tous deux des copolymères linéaires d'unités de D-glucosamine (GlcNAc) et de N-acétyl- D-glucosamine (GlcN), reliées par une liaison β ,(1→4) dans diverses proportions. Le chitosane est obtenu industriellement par désacétylation alcaline de la chitine, un polysaccharide structurel principalement présent dans les exosquelettes d'arthropodes, des endosquelettes de céphalopodes et les parois cellulaires de nombreux champignons. Actuellement, les principales sources commerciales de chitine sont les cuticules de crabe et de crevettes.

Au cours des dernières années, les besoins en chitine provenant de sources non conventionnelles telles que les insectes et les champignons, ont suscité un grand intérêt de la part des chercheurs [4,5]. En particulier, plusieurs rapports récents ont suggéré que les champignons pourraient être utilisés comme source alternative de chitine et de chitosane [6,7].

En tant que source non animale, les champignons pourraient être intéressants pour l'élaboration de biomatériaux exempts de dérivés animaux. Selon la littérature, la chitine et le chitosane produits à partir d'une source fongique présentent plusieurs avantages.

Tout d'abord, il a été démontré que la chitine et le chitosane fongique sont dépourvus de tropomyosine, de chaîne légère de myosine et d'arginine kinase, qui sont présents dans les cuticules de crustacés et qui peuvent provoquer des réactions allergiques [8]. En outre, comme les champignons présentent de faibles taux de minéraux, le processus d'extraction de la chitine nécessite des conditions plus douces par rapport aux sources actuelles de crabes et de crevettes. En conséquence, les coûts d'extraction peuvent être réduits et la dégradation de la structure chimique de la chitine native peut être limitée [9]. En plus, l'utilisation de champignons pourrait permettre la production de chitine et de chitosane avec un meilleur contrôle des propriétés physico-chimiques par rapport à la chitine et au chitosane des crustacés dont les propriétés physico-chimiques varient selon les espèces de crustacés et la période de pêche [10]. Enfin, le champignon « *Agaricus bisporus* » est abondant, facile à cultiver et à cycle de croissance rapide. Il peut donc être une bonne source alternative à la chitine commerciale. Tous ces avantages ont motivé l'intérêt pour l'extraction et la caractérisation de la chitine et du chitosane à partir du champignon *A. bisporus*.

La chitine est une composante structurelle de la paroi cellulaire des champignons des groupes taxonomiques des zygomycètes, des ascomycètes, des basidiomycètes et des deuteromycètes [11]. En ce qui concerne le chitosane, il a été trouvé naturellement dans les zygomycètes [12]. Mais sa présence dans les basidiomycètes n'a été signalée que dans quelques rapports [12].

L'*A. bisporus* (également nommé champignon blanc ou champignon de paris) appartient au groupe des basidiomycètes. C'est l'un des champignons les plus couramment consommés dans le monde [13]. Néanmoins, malgré une importante production industrielle d'*A. bisporus*, très peu d'études ont été publiées sur la teneur en chitine et chitosane dans ce champignon [10- 12]. En effet, Veter a déterminé la teneur en chitine du chapeau (6,68% p / p de matière sèche) et du pied (7,25% p / p de matière sèche) d'*A. bisporus*, sans décrire un

éventuel processus d'extraction. Cependant, le contenu de la chitine et du chitosane dans les différentes parties de ce champignon, c'est à dire le chapeau, pied et lamelle, n'a pas été étudié systématiquement [11]. L'extraction de la chitine et du chitosane d'*A.bisporus* a également été peu étudiée. Certaines études ont décrit l'extraction de la chitine à la fois du pied et du mycélium (la partie végétative) du champignon [10, 12].

En ce qui concerne le chitosane, son extraction à partir d'*A. bisporus* a donné un rendement massique négligeable (<1% p / p de matière sèche) [10,12]. De plus, la chitine extraite a été mal caractérisée en termes de paramètres structuraux (degré d'acétylation (DA)) et propriétés physico-chimiques [10, 12].

Une spécificité de la chitine présente dans *A. bisporus* est son association avec le glucane. Cependant, la preuve de la présence de ce glucane et sa quantification dans *l'A. bisporus* n'est pas bien décrite dans la littérature [12,10]. Cela est peut-être dû à la mauvaise sensibilité des techniques utilisées pour de telles déterminations (par exemple, la spectroscopie infrarouge) et la variabilité de la composition du complexe chitine / glucane avec les conditions de récolte [14].

Dans ce contexte, le but de ce travail était de proposer un protocole d'extraction chimique amélioré qui permet d'obtenir de la chitine et du chitosane à partir d'*A. bisporus*, avec un degré de pureté très élevé sans pour autant dégrader leur qualité, dans la perspective de leur utilisation dans le domaine médical. Pour arriver à cela les analyses par MEB, nous ont été de grande utilité. Ensuite, nous avons évalué dans un premier temps le rendement massique de la chitine extraite des trois parties de *l'A. bisporus*, à savoir : chapeau, pied et lamelle.

Cette étape nous a permis de déterminer que le pied recèle la teneur la plus élevée de chitine , par conséquent, il sera considéré comme source alternative. Tandis que le chitosane s'est avéré négligeable dans les trois parties. Dans une deuxième étape, nous avons

caractérisé en détails la chitine extraite du pied en combinant plusieurs techniques à savoir : FTIR, DRX, ATG et RMN ¹³C.

Enfin les propriétés physico-chimiques de la chitine déterminées par ces analyses, confirment qu'elle peut être utilisée principalement dans le domaine médical.

Le manuscrit sera présenté en quatre chapitres suivants:

Le premier chapitre a pour objectif de retracer l'état de l'art concernant la chitine et son dérivé le chitosane. Il décrit leur structure, leurs propriétés après des généralités et un rappel historique. Leurs sources et leurs principaux domaines d'applications sont présentés. Un accent particulier est porté sur les procédés d'extraction en général à partir des crustacés et spécialement à partir des champignons. Enfin, un aperçu sur le champignon *A. bisporus* et une synthèse bibliographique, y seront inclus dans ce chapitre.

Les aspects expérimentaux de ce travail, à savoir, la description du protocole d'extraction, le matériel ainsi que les différentes techniques de caractérisation utilisés sont présentés dans le deuxième chapitre.

Les résultats de l'extraction de la chitine et du chitosane à partir des trois parties du champignon *A. bisporus*, seront présentés et discutés dans le troisième chapitre.

Dans le chapitre quatre nous exposerons les résultats et discussions de la partie caractérisation de la chitine obtenue à partir des trois parties du champignon *A. bisporus* en général et en particulier celle extraite du pied.

Enfin, une conclusion générale sera présentée, ainsi que les différentes perspectives concernant ce travail.

Références bibliographiques

- [1] Ospina, Sandra, et al. "Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture." *BioMed Research International* 2014 (2014):169071-169078.
- [2] Flores, Ronny, et al. "Chitin sponge, extraction procedure from shrimp wastes using green chemistry." *Journal of Applied Polymer Science* 104.6 (2007): 3909-3916.
- [3] Chen, Cheng-Ho, et al. "Deacetylation of β -chitin. I. Influence of the deacetylation conditions." *Journal of Applied Polymer Science* 93.5 (2004): 2416-2422.
- [4] Majtán, Juraj, et al. "Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*)." *International Journal of Biological Macromolecules* 40.3 (2007): 237-241.
- [5] Draczynski, Zbigniew. "Honeybee corpses as an available source of chitin." *Journal of Applied Polymer Science* 109.3 (2008): 1974-1981.
- [6] Kleekayai, Thanyaporn, et al. "Production and characterization of chitosane obtained from *Rhizopus oryzae* grown on potato chip processing waste." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27.5 (2011): 1145-1154.
- [7] Cheng, Li-Chun, et al. "Production and isolation of chitosane from *Aspergillus terreus* and application in tin (II) adsorption." *Journal of Applied Polymer Science* 131.12 (2014).
- [8] Muñoz, Gustavo, et al. "Extraction of chitosane from *Aspergillus Niger* mycelium and synthesis of hydrogels for controlled release of betahistine." *Reactive and Functional Polymers* 91 (2015): 1-10.
- [9] Nadarajah, Kader, et al. "Production of chitosane by fungi." *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4.3 (2001): 263-265.
- [10] Wu, Tao, et al. "Chitin and chitosane value-added products from mushroom waste." *Journal of agricultural and food chemistry* 52.26 (2004): 7905-7910.

- [11] Vetter, Janos. " Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*." *Food Chemistry* 102.1 (2007): 6-9.
- [12] Di Mario, Rapana, et al. "Chitin and chitosan from Basidiomycetes." *International Journal of Biological Macromolecules* 43.1 (2008): 8-12.
- [13] Muzzarelli, Riccardo, et al. "Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial." *Carbohydrate Polymers* 87.2 (2012): 995-1012.
- [14] Hammond, John. " Changes in composition of harvested mushrooms (*Agaricus bisporus*)." *Phytochemistry* 18.3 (1979): 415-418.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Parmi les polysaccharides d'intérêt pour l'homme, la chitine et son principal dérivé, le chitosane, occupent une place de plus en plus importante. Présente dans de nombreux organismes vivants, la chitine est le polysaccharide le plus abondant après la cellulose [1,2], bien qu'une faible fraction de cette production soit réellement exploitable économiquement. La chitine et le chitosane sont, en effet, extraits commercialement des carapaces des crustacés telles que le crabe et la crevette, et l'intérêt de leur production industrielle provient de l'importante quantité de ressources naturelles produites par l'industrie de la pêche.

Depuis une vingtaine d'année, de nombreuses études ont été réalisées sur ces biopolymères et de nombreux brevets déposés, et il existe à leur sujet une abondante et récente littérature scientifique [1-4]. Ce sont deux biopolymères biodégradables et biorésorbables, deux propriétés primordiales à notre époque où la protection de l'environnement et de la santé humaine jouent un rôle important. Pratiquement, tous les domaines d'applications industrielles, de la pharmacie à l'agroalimentaire, en passant par l'environnement, l'agriculture, le textile, la papeterie et les cosmétiques, sont concernés. Parmi ces domaines, la diététique et le biomédical sont en plein essor [4].

L'objectif de ce chapitre est de décrire les principales propriétés et applications de la chitine et du chitosane. Après un rappel sur leurs sources et modes de préparation, nous insisterons sur leurs nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques et nous décrirons leurs principaux domaines d'applications.

I.1. Généralités

I.1.1. Chitine et Chitosane

La chitine est le biopolymère le plus abondant dans la nature après la cellulose [5]. C'est un polysaccharide, plus précisément un aminoglucopyranane, composé d'unités de N-acétyl D-glucosamine (GlcNAc) et de D-glucosamine (GlcN) (figure I.1), reliées par des liaisons covalentes $\beta,(1\rightarrow4)$ [6]. En raison de cette liaison spécifique, la chitine présente une structure extrêmement robuste qui entre dans la composition de la cuticule, ou exosquelette, des arthropodes (crustacés, insectes, arachnides) ainsi que dans l'endosquelette des céphalopodes (calamars, seiches). Elle est également présente dans les parois cellulaires de la plupart des champignons, de certaines levures et algues. Elle joue plusieurs rôles structurels et fonctionnels vitaux. Elle forme une barrière physique entre le corps de l'organisme et son environnement. Elle participe à sa protection contre les radiations, la chaleur, les agressions chimiques et physiques [7].

Le chitosane est le dérivé principal de la chitine. C'est un copolymère linéaire constitué d'unités D-glucosamine (GlcN) et N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées par une liaison $\beta,(1\rightarrow4)$. Il se trouve, à l'état naturel dans la paroi cellulaire de certains microorganismes (champignons, bactéries, levures et algues), mais dans des quantités relativement restreintes [8]. Au niveau industriel, il est principalement produit par désacétylation de la chitine (figure I.2). La chitine et le chitosane possèdent la même structure chimique décrite dans la figure I.1 et ne se différencient que par la fraction molaire des motifs acétylés le long de la chaîne du polymère, appelée degré d'acétylation (DA), exprimé en pourcentage.

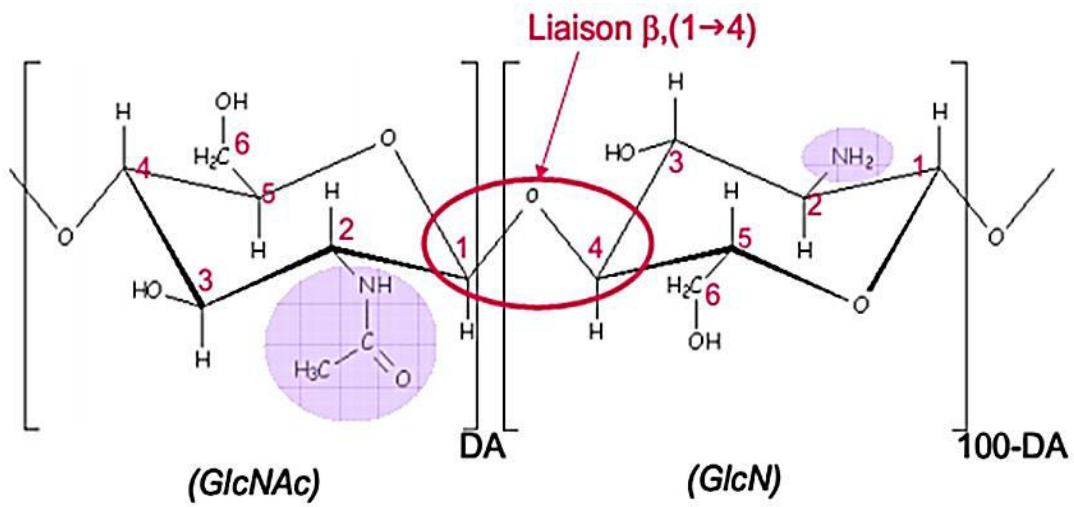


Figure I.1: Structure chimique de la chitine et du chitosane.

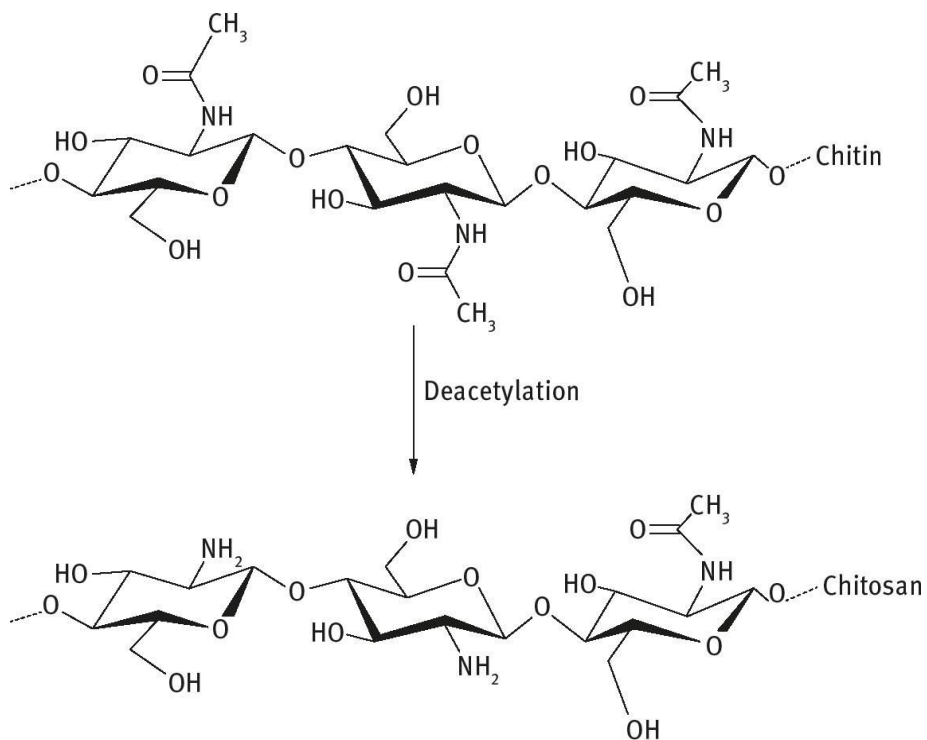


Figure I.2 : Obtention du chitosane par désacétylation de la chitine.

I.1.2. Chitine ou chitosane ?

Les structures chimiques de la chitine et du chitosane se différencient seulement par la proportion des motifs acétylés le long de la chaîne. On définit ainsi le degré d'acétylation (DA) comme la fraction molaire d'unités N-acétyl-glucosamine au sein du polymère.

Il n'existe pas de définition universelle permettant de différencier la chitine du chitosane.

La limite de DA entre chitine et chitosane varie selon les auteurs. On parle de chitosane lorsque le $DA < 50\%$ et de chitine lorsque le $DA > 50\%$ [9].

Généralement, on distingue la chitine du chitosane à partir de leurs propriétés de solubilité.

La chitine ($DA > 50\%$) est insoluble en milieux aqueux et dans les solvants organiques courants. Tandis que le chitosane ($DA < 50\%$) est fortement soluble dans les acides dilués [10].

I.1.3. Aperçu historique

La Chitine a été découverte par un scientifique anglais A. Hachett [11], qui a rapporté en 1799 "un matériau particulièrement résistant aux produits chimiques habituels", mais comme il n'a pas poussé ses investigations plus loin, la découverte de la chitine est généralement attribuée à un naturaliste français de Nancy, Henri Braconnot [12], qui a identifié ce biopolymère en 1811 et lui a donné le nom de "fungine".

En 1823, en étudiant la cuticule de coléoptères, Odier [13] isolait ce même polymère et le nomma « chitine » à partir du grec « χιτών » qui veut dire tunique (enveloppe).

En 1843, Lassaigue [13] a trouvé la présence d'azote dans la chitine, en travaillant avec l'exosquelette du papillon de vers à soie, *Bombix morii*. Ensuite, Ledderhose a identifié la glucosamine et l'acide acétique comme unités structurales de la chitine en 1879, et Gilson a confirmé que la glucosamine était l'unité répétée de la chitine en 1894 [13].

Le chitosane a d'abord été obtenu à partir de la chitine par C. Rouget [14], lors de l'ébullition de la chitine dans une solution alcaline concentrée et en notant que le composé résultant était soluble dans les acides organiques. De plus, F. Seiler [14] a confirmé en 1894 que le chitosane est la forme désacétylée de la chitine et lui a donc donné son nom actuel.

La production de la chitine a débuté en 1920, mais la structure des biopolymères (chitine et chitosane) n'a été identifiée que 50 ans plus tard à travers la cristallographie et la spectroscopie infrarouge [15].

I.2. Structure physique de la chitine

La présence des groupements acétamide confère à la chitine des fonctions biologiques telles que la biodégradabilité et la biocompatibilité, ce qui fait de la chitine un matériau fonctionnel de grande importance [16]. La chitine est caractérisée par une composition similaire à celle de la cellulose. Elle possède également une grande stabilité structurale due à la présence de fortes liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires (Figure I.3). Les principales caractéristiques d'un lot de chitine sont son degré d'acétylation et sa cristallinité. Ces paramètres sont importants car ils conditionnent bon nombre de ses propriétés.

La chitine présente trois formes cristallines, α , β et γ (Figure I.4), qui diffèrent par l'arrangement de la chaîne polysaccharidique et par la disposition des liaisons hydrogène [17,18].

L'alpha-chitine est la forme la plus stable et la plus abondante, présente chez les crustacés et les champignons. Elle est caractérisée par des chaînes antiparallèles constituant une structure cristalline régulière. Les liaisons hydrogène intermoléculaires confèrent au polymère une grande stabilité vis-à-vis des solvants et des solutions aqueuses. Cependant, l'utilisation de solvants spécifiques tels que le N,N-diméthylacétamide (DMAc) contenant de 5-10 % de LiCl et des solutions à base de fluorine hexafluoroacétone et hexafluoro-2-

propanol favorise la solubilisation de l'alpha-chitine. Cette solubilité dépend également de la source du polymère [19].

Concernant la β -chitine, les macromolécules sont organisées sous un arrangement parallèle conduisant à des liaisons intermoléculaires de faible énergie. Dans ce cas les groupes N-acétyle jouent le rôle d'espaceurs, facilitant l'accès aux molécules d'eau, à des fins d'hydratation et de formation de gel [20]. En opposition avec l' α -chitine, la β -chitine a une grande affinité pour les solvants organiques et l'eau [21]. Elle se trouve essentiellement dans les épines des diatomées et l'endosquelette de seiche.

La γ -chitine a été identifiée dans les cocons des insectes [22]. Elle est principalement composée de 2 couches parallèles et 1 antiparallèle, sa force et sa résistance sont plus proches du type β , les groupes N-acétyle jouant le même rôle dans ces deux arrangements [23,24].

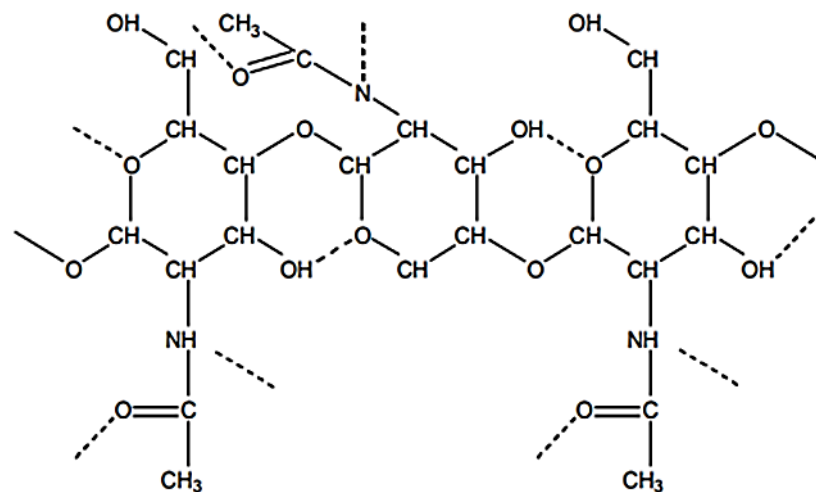


Figure I.3 : Les liaisons hydrogènes en pointillés dans la structure de la chitine.

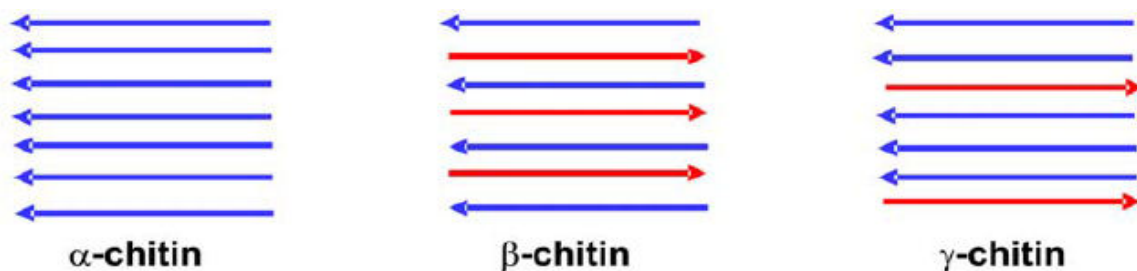


Figure I.4 Schémas simplifiés des trois formes cristallines de la chitine.

I.3. Structure physique du chitosane

La plus grande importance de la chitine par rapport au chitosane dans la nature signifie que beaucoup moins de recherches ont été effectuées sur la structure du chitosane, mais l'utilisation croissante du chitosane en tant que polymère de spécialité a suscité un intérêt accru dans ce domaine.

L'étude de la structure du chitosane est compliquée par les différentes voies possibles pour sa préparation et la variété des matériaux de départ disponibles. Comme l' α -chitine est le polymorphe le plus dominant de la chitine, elle est généralement utilisée comme matière de départ pour la désacétylation pour former du chitosane. Cependant, si de la chitine α ou β a été utilisée, il est plausible qu'elles produisent différentes structures cristallines de chitosane [25].

Quatre conformations majeures du chitosane ont été trouvées; le polymorphe le plus abondant est celui d'un cristal hydraté [26]. Dans ce polymorphe, le chitosane est conditionné de manière antiparallèle: les chaînes forment des liaisons hydrogène intermoléculaires entre les groupes hydroxyle en C6 et carbonyle des chaînes adjacentes pour former des feuilles. Comme dans la chitine, il existe également des liaisons intramoléculaires entre C3 et C5. Cette structure est stabilisée par la présence de molécules d'eau entre ces feuilles empilées, qui forment des liaisons hydrogènes avec les chaînes de chitine dans le sens A.

Cela reflète la différence majeure entre la structure du chitosane et celle de la chitine. Du fait de la désacétylation, la liaison hydrogène entre les protons amide et les groupes carbonyle dans la direction A n'est plus présente, ce qui permet aux chaînes de se séparer les unes des autres dans cette direction. Comme le réseau de liaison hydrogène n'est plus présent dans les trois directions, le chitosane est libre d'adsorber l'eau et ainsi les caractéristiques de solubilité augmentent.

En réalité, la chitine et le chitosane existent sous forme d'hétéropolymères d'unités monomères acétylées et désacétylées. Le schéma de désacétylation, qui n'est généralement pas uniforme [25], régira la structure et les propriétés du matériau, par conséquent, la détermination du DA du matériau est essentielle pour déterminer ses propriétés physiochimiques.

I.4. Sources de chitine et chitosane

Les sources de chitine sont variées dans le monde. Les arthropodes (crustacés, insectes, arachnides), comptant plus de 10^6 espèces, constituent en particulier une source abondante de ce polymère. La chitine est présente par exemple dans les crevettes, les homards, les crabes, les langoustines, les calamars, les insectes (blattes, fourmis) ou encore les algues, les levures et les champignons [27,28] (Figure I.5).

Le pourcentage de la forme α -chitine varie de 7 % chez le Barnacle (*Lepas anatifera*) à 36 % chez les écrevisses (*Astacus fluviatilis*). Parmi les céphalopodes, l'os de seiche (*Sepia officinalis*) contient 20 % de β -chitine et le calamar (*Loligo vulgaris*) 40 % [28] (Tableau 1). Chez les mollusques bivalves, l' α -chitine forme avec les protéines un complexe orienté de façon définie distribué dans l'axe et sur le bord de la coquille. La chitine joue un rôle dans des forces mécaniques servant à intégrer les régions flexibles et à coordonner le changement au cours de la formation de coquille [29].

La chitine est rencontrée dans la membrane cellulaire de champignons. Elle est organisée sous forme de microfibrilles (10-25 nm de diamètre, et 2-3 µm de longueur) aléatoirement orientées. Ce biopolymère est lié par des liaisons covalentes avec d'autres polysaccharides tels que le glucane, formant ainsi un complexe chitine-glucane [30]. Des études sur les basidiomycètes ont rapporté que la chitine constitue 8 à 19 % du mycélium, alors que le chitosane ne dépasse guère 1 % [31,32]. La chitine est présente également dans le mycélium d'ascomycète *Aspergillus niger* (42 % de chitine et 11 % de chitosane).

Chez le zygomycète, *Rhizopus oryzae*, le chitosane constitue 14 % alors que chez *Mucor rouxii* le pourcentage est variable entre 8,9 et 35 % [33, 34]. Les estimations montrent que $3,2 \times 10^4$ tonnes de chitine peuvent être produites annuellement dans la filière de la culture des champignons comestibles. Il faut retenir que la source majeure du chitosane vendu commercialement provient de la désacétylation de la chitine obtenue à partir de crustacés.

La production de la chitine (et de chitosane) provient, en effet, des crevettes et des crabes qui représentent les deux sources naturelles les plus abondantes. Ce sont donc des produits d'origine animale. Néanmoins, de nouvelles voies alternatives sont apparues comme par exemple la production de biopolymères à partir de cultures de moisissures (*Aspergillus niger*), en raison notamment des inquiétudes sanitaires liées à l'encéphalite spongiforme bovine (maladie de la vache folle). Certaines autorités de la Santé suggèrent, en effet, de ne pas utiliser des matériaux d'origine animale pour des applications biomédicales. La chitine obtenue à partir d'une source fongique bien caractérisée et produite selon un procédé standardisé pourrait être utilisée à ce propos.

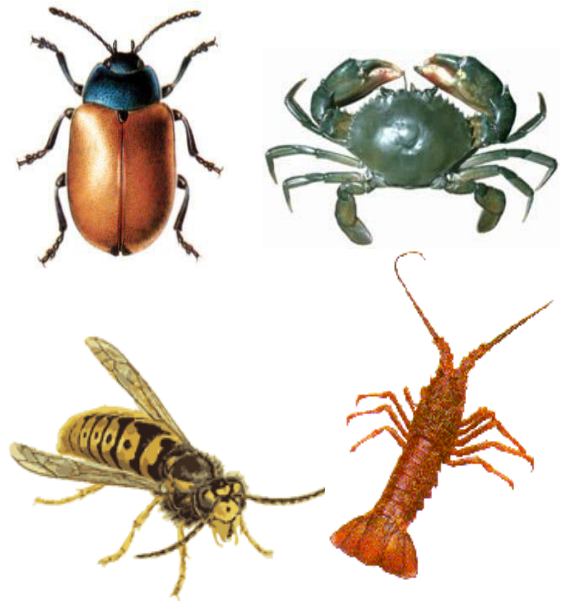
Tableau I.1 : Pourcentage de chitine dans les êtres vivants marins d'après Tolaimate et al. [28].

Sources de chitine	Type de chitine	Pourcentage de chitine
Anatife (<i>Lepas anatifera</i>)	α	7
Crabe marbré (<i>Grapsus marmoratus</i>)	α	10
Crabe rouge (<i>Portunus puber</i>)	α	10
Araignée de mer (<i>Maia squinado</i>)	α	16
Homard (<i>Homarus vulgaris</i>)	α	17
Petite cigale de mer (<i>Scyllarus arctus</i>)	α	25
Langouste (<i>Palinurus vulgaris</i>)	α	32
Ecrevisse (<i>Astacus fluviatilis</i>)	α	36
Crevette (<i>Palaemon fabricius</i>)	α	22
Mante de mer (<i>Squilla mantis</i>)	α	24
Seiche (<i>Sepia officinalis</i>)	β	20
Calamar (<i>Loligo vulgaris</i>)	β	40

Les épines de diatomées.



Exosquelettes d'arthropodes.



© John and Barbara Pheasant

Parois cellulaires des champignons
et des moisissures.



Coquillages des mollusques.

Figure I.5 : Sources de chitine dans la nature.

I.5. Fonctionnalités de la chitine et du chitosane

On a récemment rapporté que la chitine et le chitosane présentaient plusieurs propriétés telles que la biocompatibilité [35], la biodégradation [36], le pouvoir chélatant qui permet l'élimination des métaux lourds [37] et du cholestérol ou d'autres graisses [38], les comportements antimicrobiens et antioxydants [39,40],...etc.

La nature β ,(1→4) des liaisons glycosidiques confère à la chitine et au chitosane des propriétés filmogènes. En outre, ces films présentent une perméabilité importante. Compte tenu de sa structure chimique, le chitosane présente l'avantage, contrairement à la majorité des polysaccharides, de posséder un caractère polycationique dû aux groupements amino qui en solution et en milieu acide sont chargés.

De ce fait, les molécules chargées négativement peuvent interagir avec la chaîne macromoléculaire du chitosane. C'est le cas des acides gras, des impuretés présentes dans l'eau, des protéines de la peau et du cheveu par exemple...

Nous devons reconnaître que même si ces biopolymères semblent très prometteurs, jusqu'à présent, les applications réelles restent plutôt limitées. Ceci peut s'expliquer par différents aspects: la difficulté d'extraction et de purification de la chitine originale, la transformation nécessaire de la chitine en chitosane suivie de la dérivation de cette dernière pour la plupart des applications [41,42].

I.6. Les applications de la chitine et du chitosane

La chitine et le chitosane trouvent des applications importantes en mettant à profit leurs diverses propriétés spécifiques. C'est ainsi que leur utilisation dans des secteurs économiquement porteurs comme les industries alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques ou agricoles,...ect a fait l'objet de nombreux brevets.

I.6.1. Domaine biomédical

La biocompatibilité du chitosane se traduit par son antigénicité, sa non toxicité et son hémocompatibilité. Son non toxicité est illustré par une dose limite administrable par voie orale de 17 g/kg.jour. L'hémocompatibilité se manifeste par un caractère antithrombogène tout en étant un hémostatique local. Il trouve de ce fait des applications en revêtement d'objets devant être mis en contact avec le sang comme les prothèses vasculaires ou les valves cardiaques. Sa bioactivité est due principalement à son activité biostimulante qui lui donne aussi la propriété d'accélérer la cicatrisation [43]. La chitine et le chitosane entraînent une réduction de la synthèse de collagène indésirable, une augmentation du nombre d'histiocytes, une stimulation des fibroblastes qui produisent alors une quantité abondante de collagène-3, indispensable dans les phénomènes de cicatrisation Figure I.6.

Ces propriétés cicatrisantes sont utilisées pour fabriquer des fils de suture ou une peau artificielle. Cette peau aux propriétés analgésiques permet une cicatrisation des brûlures et une reconstitution de l'épiderme beaucoup plus rapide et de façon moins douloureuse qu'avec les produits utilisés habituellement. Cette peau ne présente aucun risque de rejet.

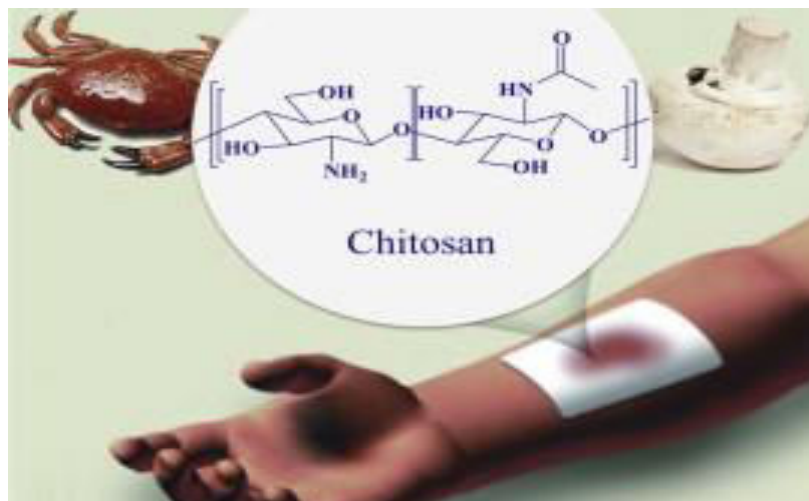


Figure I.6 : Application du chitosane dans le domaine biomédical.

En outre, des lentilles de contact à base de chitine, sont utilisées pour la cicatrisation de cornées endommagées. Le chitosane est aussi antifongique et bactériostatique. C'est un spermicide efficace et il offre de bonnes conditions d'asepsie.

D'autres applications biomédicales du chitosane ont également été étudiées, comme les substituts osseux [43,44], les interactions sanguines [43,45], les implants [46], ou les anti-inflammatoires [47-49] et médicaments anticancéreux [50]. Sa biodégradabilité est obtenue grâce à des chitosanases et chitinases présentes dans de nombreuses cellules.

De nombreux travaux ont permis d'étudier et de développer l'utilisation du chitosane comme matériau d'encapsulation de drogues ou de médicaments par exemple [43]. Cela permettrait le relargage contrôlé du médicament ou de toute autre substance (engrais...).

Le chitosane, à travers son pouvoir immunologique, peut stimuler les cellules impliquées dans la défense immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales et des agents pathogènes. Il peut aussi exercer une action hypocholestérolémiant chez les rats, qui semble due à la capacité de ce polymère à piéger les lipides. Cette propriété est largement utilisée pour la promotion des produits amaigrissants à base de chitosane.

Enfin, le chitosane s'est également montré actif contre la cryptosporidiose chez les chèvres et augmentent le gain de poids des jeunes animaux [51].

I.6.2. Domaine agroalimentaire

Dans le domaine agroalimentaire, la chitine partiellement désacétylée est utilisée d'une part pour désacidifier les extraits de café, les jus de fruits ou de légumes, et d'autre part pour conserver la nourriture du fait de sa capacité à immobiliser les cellules microbiennes ou fongiques. Grâce à sa propriété coagulante, le chitosane permet aussi au niveau des déchets alimentaires industriels de séparer des particules colloïdales et dispersées.

La chitine et le chitosane peuvent être utilisés comme agents immobilisateurs de cellules microbiennes, animales ou végétales, ou d'enzymes..., afin de clarifier les jus de fruits ou pour éliminer les composés phénoliques dans les vins par exemple.

I.6. 3. Domaine de l'agriculture

Au niveau de l'agriculture, la chitine et le chitosane sont capables de déclencher chez les plantes des mécanismes de défense contre les infections et les agressions parasitaires à des doses très faibles (de l'ordre de quelques mg par m³ d'eau) [52]. Le chitosane sert ainsi d'enrobage de semences des céréales. Il renforce par la même occasion le système racinaire et induit l'épaississement de la tige. De tels effets physiologiques ne peuvent conférer à la plante qu'une meilleure résistance lors de la germination et conduire à de meilleurs rendements lors de la période de récolte. En outre, le chitosane a une action fongicide propre.

Le chitosane a été décrit pour agir comme un éliciteur, en effet, plusieurs plantes possèdent des enzymes chitinolytiques, qui les aident à se défendre contre les agresseurs de pathogènes, tels que les champignons. L'introduction du chitosane dans le milieu de croissance stimule la production d'enzymes chitinolytiques dans les plantes, les rendant ainsi plus résistantes à leurs agresseurs naturels [53, 54].

I.6.4. Domaine des matériaux

Pendant longtemps, le chitosane en tant que matériau a été utilisé comme matière plastique pour la production de films antimicrobiens destinés à l'industrie alimentaire, c'est-à-dire l'emballage protégeant des légumes frais, des fruits ou de la viande [55].

Plusieurs tentatives de production de nouveaux matériaux biofonctionnels ont également été réalisées, tel que le greffage de dérivés esters de polyéthylène glycol (PEG) [56] ou de phosphométhylation [57,58].

Plus récemment, certaines applications nouvelles ont suscité un plus grand intérêt, parmi lesquelles l'utilisation du chitosane comme support de catalyseur présente un intérêt

particulier. En effet, cette application combine plusieurs techniques de pointe, telles que la lyophilisation [59] ou l'utilisation de CO₂ supercritique (scCO₂) [60] pour augmenter les capacités d'échange de surface et / ou l'utilisation de liquides ioniques [61,62]. Il contribue ainsi à la mise en œuvre des principes de chimie verte en minimisant la quantité de produit nécessaire - proportions catalytiques et non stœchiométriques, et utilisation de matières premières renouvelables - [53,54].

I.6.5. Domaine des cosmétiques

Dans le domaine des cosmétiques, les propriétés filmogènes et cationiques du chitosane sont exploitées dans de nombreuses crèmes ou lotions de soin pour les cheveux ou la peau. Un nombre croissant de produits à base de chitosane arrivent sur le marché. On peut citer en exemple les pommades ou les crèmes antifongiques, antidermatoses; les crèmes amincissantes où le chitosane peut servir de vecteur; les crèmes revitalisantes, raffermissantes; ou tout simplement des crèmes hydratantes. L'encapsulation est un domaine dans lequel le chitosane est dorénavant utilisé.

I.6.6. Domaine des traitements des eaux

Le pouvoir chélatant du chitosane lui permet d'éliminer les métaux lourds, même en de très faibles quantités. Ses excellentes propriétés floculantes (Figure I.7) à la fois des matières minérales et organiques, mais aussi des microorganismes, en font un matériau de choix pour le traitement des eaux usées. Il peut être utilisé aussi bien à l'état solide qu'en solution afin de complexer les ions métalliques. Cette application étant basée sur le caractère cationique du polymère, son efficacité varie selon la concentration en polymère et le pH du milieu.

Différentes techniques sont généralement appliquées aux traitements des eaux, telles que l'adsorption, la floculation ou les traitements biologiques. Le chitosane peut être utilisé à des fins d'adsorption [63,64] et de floculation [65], le fait qu'il s'agisse d'un composé

écologique, très abondant et plutôt bon marché en fait une solution de choix dans certains cas. Ainsi, le chitosane s'est avéré particulièrement efficace pour la floculation des effluents biologiques secondaires des cartonnages [65]. Malheureusement, les applications réelles dans l'industrie restent plutôt rares, car les agents floculants concurrents sont moins chers.

En effet, même si le chitosane présente de meilleures propriétés, les produits traditionnels moins chers sont suffisants pour respecter les cadres réglementaires actuels.



Figure I.7 : Utilisation du chitosane comme floculant.

I.7. La production de chitine et de ses dérivés

La chitine présente d'intéressantes caractéristiques [66] qui influencent notamment le choix des méthodes d'extraction/isolation et de purification :

- Etant un polymère poly- acétylé, la chitine est très sensible à l'hydrolyse acide [67].
- Le polymère est caractérisé par sa stabilité en milieu alcalin.
- La chitine est sensible à des températures élevées ce qui peut conduire à la dénaturer en fonction du temps ;
- Le biopolymère est doté d'une capacité de séquestrer les métaux, ce qui nécessite plusieurs lavages à l'eau déionisée [68].
- Lorsque le polymère est précipité en présence de solvants non adéquats, il y a formation de différentes substances (hydrates, alcoolates, dérivés cétoniques) [69].

L'extraction et la purification de la chitine sont non seulement importantes pour la récupération du produit désiré, mais aussi pour caractériser la teneur en chitine dans différentes sources.

Jusqu'à présent, uniquement deux approches principales pour l'extraction de la chitine ont été étudiées: l'approche chimique et biologique.

I.7.1. L'approche chimique

La chitine commerciale est extraite à partir des exosquelettes des crustacés, en particulier les crevettes et les crabes. La forme α -chitine constitue la majeure partie [70]. Le calamar représente la principale source de β -chitine [71,72]. Son extraction chimique consiste en un traitement acide pour la déminéralisation et un traitement alcalin pour la déprotéinisation. Les autres composés minoritaires sont supposés être entraînés au cours de ces deux réactions. La déminéralisation précède généralement la déprotéinisation car l'inverse aurait un impact sur le DP et le DA du polymère [73].

Entre chaque étape, le produit est rincé abondamment à l'eau déminéralisée. La figure I.8 schématise un exemple de production de chitine et de ses dérivés.

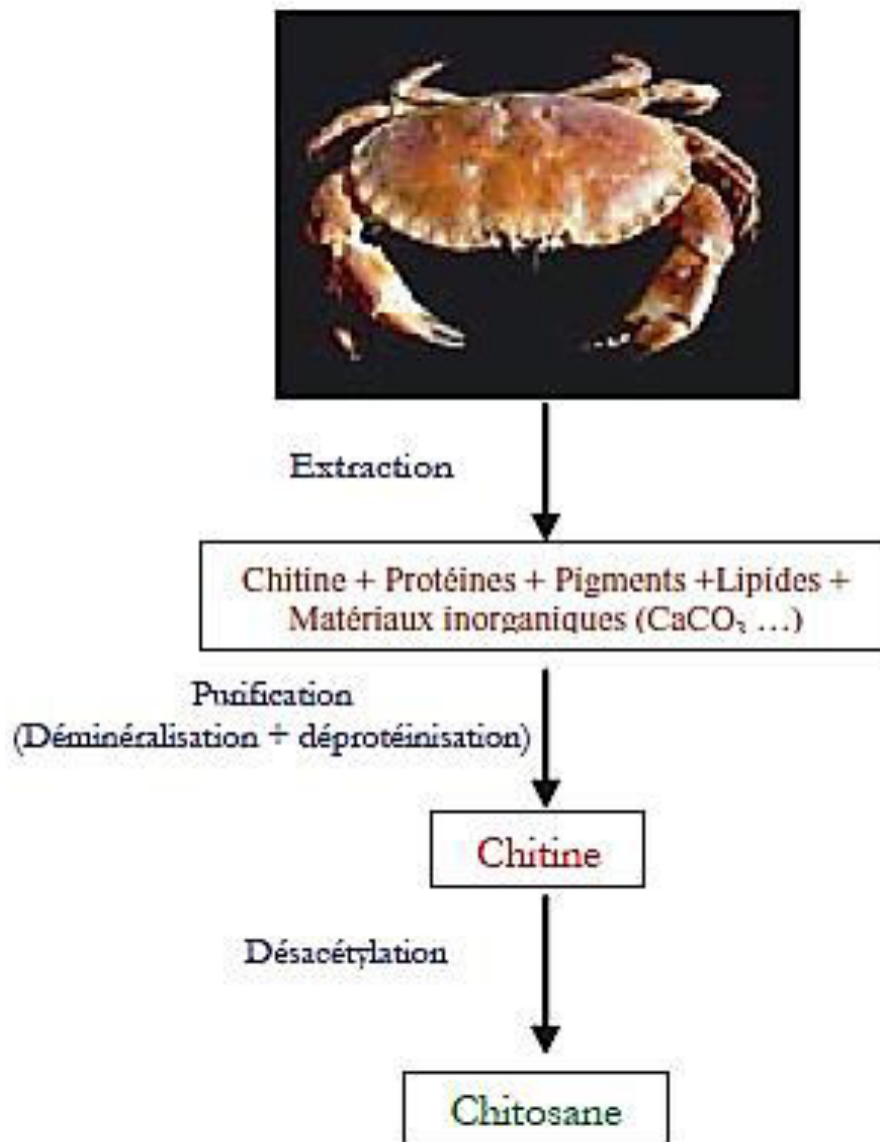


Figure I.8 : Schéma d'un exemple de production de chitine et du chitosane .

En amont, la préparation de la matière première est indispensable pour réduire les risques de dégradation de la chitine. Les modes opératoires sont propres à chaque entreprise, souvent basés sur le séchage pour éviter l'autolyse naturelle. France Chitine a fait le choix d'ensiler et de saler les carapaces de crevettes et de crabes pour les conserver.

Elles sont ensuite rincées à l'eau distillée jusqu'à obtenir la conductivité d'une eau pure, puis séchées à froid.

Enfin, elles sont cryobroyées à l'azote liquide [74]. Cette méthode permet de stocker la matière première pour l'année, ce qui minimise les variations saisonnières. De plus, les produits extraits auront une couleur plus blanche, comparé au produit obtenu après séchage au soleil.

Les rendements en chitine dépendent du choix de la matière première et des conditions du procédé d'extraction. De manière générale, à partir des ressources industriellement exploitées, le rendement est compris entre 20 et 40 % [70].

Il a été signalé que l'optimisation des conditions est fonction de la matière première [73]. Par exemple, l'étape de déminéralisation à l'HCl est accentuée lorsque l'extraction s'effectue à partir de crabe ou de homard (HCl 2 M, T_{amb} , 5 à 48 h). Au contraire, pour le bouquet ou les calmars, la concentration en acide et la durée du traitement doivent être limitées (HCl 0,6 M, T_{amb} , 2 h). Ces conditions sont liées à la quantité de carbonate de calcium présente.

Le procédé d'extraction repose sur la déminéralisation et la déprotéinisation. Pour les réaliser, de nombreuses combinaisons de concentration en réactifs, durée, température et ratio réactif/substrat ont été testés. Les entreprises privilégient la formule qui convient à leur propre cahier des charges.

I.7.1.1. La déminéralisation

Le traitement acide élimine les minéraux, qui passent en solution sous forme de sels. Les acides les plus utilisés à l'échelle industrielle pour la déminéralisation sont l'acide chlorhydrique, l'acide acétique, l'acide sulfurique ou encore l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) [75,76]. Pour des raisons économiques, l'acide hydrochloridrique (HCl) est privilégié.

La concentration minimale, pour mener cette étape, est déterminée par l'équation chimique (I.4) de la réaction entre l'élément minéral majoritaire, le carbonate de calcium, et le HCl. En principe, la déminéralisation est complète dès lors où les proportions sont stoechiométriques, mais dans les faits, les entreprises utilisent des solutions en excès.



Les concentrations en HCl rencontrées sont comprises 0,5 et 11 N et le ratio substrat/solvant entre 1:10 et 1:40. La déminéralisation dure entre 15 min et 48 h, de la température ambiante à 50 °C [77,78]. La réaction avec le carbonate de sodium est achevée lorsque le dégagement de CO₂ cesse.

La prolongation de la durée du traitement, une température et une solution acide trop élevée conduisent à l'hydrolyse des liaisons glycosidiques et par conséquent à la dépolymérisation de la chaîne carbonée de la chitine [79].

I.7.1.2. La déprotéinisation

La structure des cuticules des crustacés, présente une forte interaction entre les protéines et la chitine. Ceci implique des conditions drastiques pour les séparer. Un traitement basique permet d'éliminer les protéines par solubilisation. Les réactifs employés pour cette étape sont des bases fortes comme l'hydroxyde de potassium (KOH).

L'hydroxyde de sodium (NaOH) est le plus couramment utilisé, pour des raisons d'économiques. Les concentrations utilisées sont comprises entre 0,3 et 2,5 M, selon un ratio compris entre 1:10 et 1:40. La température est comprise entre 50 et 110 °C et la durée peut varier de 1 h à plus de 24 h [77,78]. Ces deux paramètres sont liés, ainsi la durée doit être augmentée si la température est baissée, et réciproquement.

L'augmentation de la concentration, de la durée et de la température de réaction, améliorent la déprotéinisation [80]. Cependant, tout comme la déminéralisation, les conditions

drastiques de la déprotéinisation modifient la structure native de la chitine. Ainsi la déprotéinisation peut s'effectuer par un traitement alcalin par la soude à 1 N à 80-85 °C [76, 81]. Cette méthode favorise l'élimination quasi complète des protéines, mais peut s'accompagner d'une réaction de désacétylation de la chitine.

Par conséquent, le choix du couple temps-température est dicté par les caractéristiques de la chitine à obtenir. Les modifications que peuvent entraîner des conditions trop drastiques concernent la perte de poids moléculaire ou l'oxydation des extrémités réductrices [82]. Après la déprotéinisation, le produit est rincé plusieurs fois afin de le neutraliser .

I.7.1.3. L'étape de blanchiment

A la fin de la phase précédente, la chitine produite provenant de seiche de forme β est blanche, alors que celle provenant de crustacés (forme α) est légèrement rose. Ces couleurs sont dues aux traces de pigments qui peuvent, à leur tour, être éliminées par une légère oxydation en présence d'un mélange H_2O_2/HCl . Afin d'éviter la formation des composés N-chlorés, il est préconisé d'utiliser des concentrations modérés de chlore [83].

Cette étape est optionnelle, elle n'est pas nécessaire si le barème temps-température penche en faveur d'une longue durée. Cependant, il est très difficile d'obtenir un produit pur à cause des fortes interactions entre la chitine, les pigments et les protéines.

Une autre cause de coloration des produits peut être la réaction de Maillard qui implique les groupes azotés et les aldéhydes [84].

Généralement, l'agent de blanchiment employé est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), dont la concentration est comprise entre 0,1 et 33 %, il peut également être mélangé avec du HCl . La durée du traitement est souvent très courte, de l'ordre de quelques minutes [78].

En effet, tout comme les deux précédentes étapes, les conditions de décoloration induisent une altération de la structure de la chitine, qui se traduit par une réduction du poids moléculaire. Les autres agents de blanchiment sont l'hypochlorite de sodium ($NaClO$), le

permanganate de potassium (KMnO_4), l'acétone, l'éthyle-acétate et l'acide oxalique, certains auteurs utilisent le peroxyde d'hydrogène pour hydrolyser le chitosane, afin d'augmenter sa solubilité, et privilégient l'éthanol pour le blanchiment [85-89].

I.7.1.4. Préparation du chitosane

Le chitosane est produit par une désacétylation de la chitine (modification chimique, réaction de dégradation) conduisant à un produit final soluble en milieu acide acétique à 5 %. Deux processus peuvent être suivis.

Le premier est décrit par Broussignac [90] et consiste à utiliser un mélange de KOH (50 %), d'éthanol (25 %) et de monoéthylèneglycol (25 %). La chitine est ajoutée progressivement tout en assurant une augmentation progressive de la température. Après la filtration, le chitosane obtenu est neutralisé par un rinçage à l'eau.

Le second processus est celui décrit par Kurita et al [72]. Il s'agit de chauffer une suspension de chitine (500 mg dans 30 ml de NaOH à 50 %) soumis à un flux d'azote et à une agitation. Le produit solide obtenu est filtré et rincé respectivement par de l'eau distillée (jusqu' à pH neutre), du méthanol et de l'acétone, puis séché pendant 12 heures à 50 °C.

Rhazi et al [91] ont montré que la source de chitine a un effet sur l'évolution et le pourcentage de N-désacétylation du chitosane produit. Selon la méthode de Broussignac [90], le temps minimal nécessaire pour obtenir un produit soluble dans 5 % d'acide acétique dépend de la source de chitine.

Dans le cas de la β -chitine obtenue à partir de seiches ou de calamars, un temps de réaction d'une heure est suffisant. Alors que dans le cas d' α -chitine obtenue à partir de calamars gris ou de cigales de mer, le temps nécessaire est approximativement de 2 à 3 heures sont également nécessaires pour celui obtenu à partir des crevettes et des écrevisses. Le produit soluble dans l'acide acétique à 5 % extrait de la chitine provenant du

de homard, du crabe rouge ou d'araignée de mer est obtenu au bout de 6 ou 7 heures de traitement.

Le principal inconvénient de l'utilisation de l'extraction chimique reste cependant son impact énergétique et environnemental dû à l'utilisation extensive de solutions acides et basiques nécessitant davantage de neutralisation et d'élimination [92].

I.7.2. L'approche biologique

Les méthodes biologiques d'extraction de la chitine ont été développées récemment [93]. Ils peuvent utiliser des enzymes purifiées [94,95] ou des microorganismes entiers [96]. Bien que plus respectueuses de l'environnement, ces méthodes restent moins efficaces.

Les principales raisons étant que : la protéine résiduelle dans la chitine produite reste souvent relativement élevée et le temps de réaction est plus long par rapport à la déprotéinisation chimique. Ces inconvénients rendent la méthode enzymatique peu susceptible d'être appliquée à l'échelle industrielle à moins que des progrès ne soient faits pour rendre le procédé plus efficace [97].

Comme les méthodes chimiques et biologiques ne sont pas totalement satisfaisantes pour l'instant, plusieurs équipes académiques et industrielles travaillent toujours à leurs améliorations. Cette étape d'extraction est, en effet, essentielle pour que la chitine et le chitosane remplissent l'énorme potentiel que ces molécules peuvent présenter.

I.8. Les champignons comme sources de chitine et chitosane

La production de chitine et de chitosane à partir des sources fongiques a fait l'objet d'une attention accrue au cours des dernières années en raison des avantages potentiels offerts par rapport aux sources actuelles de crustacés. Les sources fongiques ne tiennent pas compte des problèmes d'approvisionnement saisonnier et géographiquement limité rencontrés dans les sources des crustacés, car ils peuvent être cultivés tout au long de l'année.

En outre, les sources fongiques contiennent des niveaux plus faibles de matières inorganiques que les sources de crustacés, par conséquent, l'étape de déminéralisation observée dans l'extraction des matières chitineuses de ces sources n'est pas nécessaire.

Les sources fongiques de la chitine surmontent certains problèmes qui se présentent dans les sources de crustacés. En effet les conditions requises pour l'extraction de la chitine des sources fongiques ne sont pas aussi sévères que celles des crustacés et peuvent donner un produit plus homogène car l'étape de déminéralisation acide, qui peut affecter l'hydrolyse de la chaîne de la chitine, n'est pas nécessaire [98].

La demande accrue de chitosane en tant que biomatériau est actuellement satisfaite par la désacétylation chimique de la chitine, conduisant à des polymères chitineux de poids moléculaires variables et à des modèles d'acétylation incontrôlés, ce qui peut rendre le matériau inadapté à certaines applications biomédicales de haute valeur [99].

De plus, cette procédure n'est pas écologique car de grandes quantités de déchets alcalins contenant des concentrations élevées de sels sont produites. Les espèces fongiques contenant des niveaux naturellement élevés de chitosane, qui peuvent être extraits à haute pureté, offrent une source alternative qui n'exige pas cette étape de désacétylation [100,101].

La fermentation de champignons filamenteux pour la production de matériel chitineux peut également offrir l'opportunité de manipuler et standardiser les propriétés physiochimiques des matériaux en contrôlant les paramètres de la fermentation [98]. Par exemple, Arcidiacono et al[102] ont démontré que la modification de la composition de la culture et du pH entraînait la production de chitosane de différents poids moléculaires.

La teneur en chitine des parois cellulaires fongiques peut également être influencée par la composition et la quantité de sources de carbone et d'azote dans le milieu de croissance, l'acidité du milieu, le taux d'aération et l'âge de la culture [103]. Bien que la production de chitine et de chitosane par fermentation fongique ait un grand potentiel, actuellement les coûts

élevés des méthodes de fermentation limitent son utilisation. Cependant, compte tenu des quantités importantes de déchets fongiques accumulés dans les industries de production et de fermentation des champignons et des dépenses liées à la gestion de ces déchets, la production de produits hautement fonctionnels à valeur ajoutée peut constituer une solution rentable pour l'industrie [104].

I.9. Extraction de la chitine et chitosane à partir des champignons

Le processus d'extraction de la chitine et du chitosane, à partir de sources fongiques, est similaire à celui utilisé industriellement sauf qu'aucun traitement de déminéralisation n'est requis en raison de la faible teneur en minéraux des espèces fongiques [105].

Généralement, la procédure d'extraction comprend trois étapes: (1) un traitement alcalin pour éliminer les protéines et les polysaccharides alcalins solubles, (2) un reflux acide pour séparer la chitine et le chitosane et (3) une précipitation du chitosane dans des conditions alcalines.

L'élimination des protéines par traitement alcalin est couramment effectuée avec NaOH 1N à 95 ° C de 1 à 6 h ou à 121 ° C de 0,25 h à 1 h [106]. La séparation du chitosane par traitement acide est habituellement effectuée avec de l'acide acétique ou chlorhydrique à 2 à 10% à 95 °C pendant 3 à 14 h. Par exemple, Synowiechi et al. [86] ont utilisé 2% de NaOH à 90 ° C pendant 2 h pour le traitement alcalin et 10% d'acide acétique à 60 °C pendant 6 h pour le reflux acide pendant l'extraction de la chitine et du chitosane de *M. rouxii*.

Hu et al. [107] ont adopté l'autoclavage à 121 °C dans les traitements alcalins et acides d'*Absidia glauca* mycelia. Cependant, la température et la durée du traitement acide ont dû être réduites à 25 °C et 1 h pour éviter la dépolymérisation du chitosane lors de l'extraction des souches de zygomycètes [108].

La plupart des études dans ce domaine se concentrent sur les processus de fermentation pour produire des mycéliums fongiques pour l'extraction de la chitine et du

chitosane [109-112]. Relativement peu d'études ont porté sur les déchets fongiques provenant des fermentations industrielles ou de l'industrie des champignons [113]. Toutefois, compte tenu de la quantité de déchets accumulés pendant le traitement, l'industrie de l'acide citrique et l'industrie des champignons, en particulier les pratiques de culture d'*Agaricus bisporus*, peuvent fournir beaucoup de matières premières pour la production de chitine et de chitosane fongique.

De nombreuses espèces fongiques, y compris *Absidia glauca*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, *Gongronella butleri*, *Phycomyces blakesleeana*, *Absidia blakesleeana*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma reesei* et *Lentinus edodes* ont été étudiées pour la production de chitine et de chitosane [109-112]. Parmi toutes les espèces étudiées, la plus étudiée est *M. rouxii* [109,110,105] et les quantités de chitine et de chitosane dans son mycélium peuvent atteindre 35% du poids sec de la paroi cellulaire [105].

Le champignon blanc, *A. bisporus*, est le champignon le plus consommé aux États-Unis. Au cours des dernières années, la production a été relativement constante et les ventes ont atteint 382 millions de kilogrammes au cours de la saison 2002/2003 [114].

Les déchets accumulés pendant la production et la récolte des champignons sont principalement constitués de pieds et de champignons de dimensions et de formes irrégulières. Selon la taille de la champignonnière, la quantité de déchets varie entre 5 et 20% du volume de production. Ces déchets produisent environ 50 000 tonnes de matière par an qui n'a actuellement aucune application [114].

I.10. Le champignon (*Agaricus bisporus*)

Agaricus bisporus est une espèce de champignons basidiomycètes de la famille des *Agaricaceae*. Rare à l'état sauvage, ce champignon est cultivé sous le nom de champignon de Paris ou champignon de couche. C'est le champignon le plus cultivé en car il est simple et

rapide à cultiver. La production du champignon de Paris représente environ les trois-quarts de la production mondiale. La majorité des champignons de Paris provient de Chine.

Les champignons de Paris ont des lamelles roses lorsque le champignon est jeune, puis brun-noir à noire en vieillissant. Le chapeau est rond, d'un blanc velouté qui se tache par la suite d'ocre ou de brun. Il est attaché au pied par un voile quand il est très jeune (on n'aperçoit pas ses lamelles) puis il va s'ouvrir et libérer ainsi un petit anneau. En vieillissant, le chapeau va s'aplatir.

La partie (fruit) est composée essentiellement de :

Chapeau: de 5 à 10 cm, globuleux devenant hémisphérique, ensuite convexe puis s'aplatissant, de couleur de fond blanchâtre à brun clair, à marge excédente et plus ou moins appendiculée, recouvert de fibrilles ou squamules brunâtres à roussâtres, à marge plus claire.

Lamelles : fines et serrées, de couleur rose puis devenant brunes puis noirâtres à arêtes plus pâles en vieillissant.

Pied : trapu et ferme, plutôt court, s'épaississant vers la base, de couleur blanche devenant ochracé roussâtre vers la base [115].

I.11. Analyse bibliographique

L'analyse de la littérature concernant l'extraction de la chitine et chitosane montre les points suivants :

Malgré cette très grande diversité de sources de chitine, jusqu'à présent, uniquement la chitine extraite des sous-produits de l'industrie des mollusques et crustacés a été explorée. Il a ainsi été montré que les crustacés produisent principalement de l' α -chitine, alors que les céphalopodes produisent de la β -chitine, la teneur en chitine varie de 7 à 36% chez les crustacés et de 20 à 40% chez les céphalopodes. Cependant, nous devons reconnaître que dans cette investigation, pour 10 espèces de crustacés explorées, seuls deux représentants des

céphalopodes ont été considérés ; par conséquent, les conclusions concernant cette dernière classe peuvent être moins précises [116].

Etant donné que la chitine est présente dans tant d'espèces différentes, il serait, bien sûr, d'un très grand intérêt scientifique, de faire une comparaison entre différentes propriétés, contenus, etc. de la chitine provenant de différentes sources, mais pour l'instant les scientifiques ne pouvaient distinguer aucune caractéristique spécifique de la chitine extraite de différentes sources.

Les quelques études réalisées sur la chitine d'insectes concernaient principalement les papillons [117]. Il a ainsi été montré que les ailes de la dame peinte *Vanessa cardui* Linnaeus présentent une chitine de type α [117]. La teneur en chitine est habituellement comprise entre 5 et 40% de la masse sèche de la cuticule, les abeilles ont donc des matrices organiques avec 23-32% de chitine [118] , et les crustacés de 5- 40% [116] , et même jusqu'à 49% ont été signalés chez les calamars [119]. Elle s'est avérée être de l'ordre de 3% chez *Calanus helgolandicus* [120].

Aussi la comparaison de contenu est également confrontée à la question de l'extraction et de la caractérisation de la chitine.

En outre, la détermination de la teneur en chitine dans sa source d'origine reste un problème. En effet, aucune méthode analytique fiable n'a été rapportée jusqu'à présent, l'analyse infrarouge et la diffraction des rayons x ne permettant que des approches qualitatives et non quantitatives [121]. La seule méthode quantitative principalement utilisée jusqu'à présent est la méthode dite «extraction alcaline» [121]. Cependant, cela dépend fortement de la source et de la procédure d'extraction utilisée ; ce qui peut expliquer les différences sévères observées dans la littérature concernant certaines espèces, à savoir que la seiche ne contient que 5,8% de chitine (Hajji et al [122])et jusqu'à 20% (Rhazi et al. [116]),

tandis que Hajji et al. Ont découvert que la crevette contenait jusqu'à 37,2% de chitine. [122] et seulement 22% par Rhazi et al [116].

Concernant le champignon *A. bisporus*, il s'est avéré que, malgré son importante production mondiale, très peu d'études ont été publiées sur la teneur en chitine et chitosane dans ce champignon [114-32]. En effet, Veter a déterminé la teneur en chitine du chapeau (6,68% p / p de matière sèche) et du pied (7,25% p / p de matière sèche) d'*A. bisporus*, sans décrire un éventuel processus d'extraction. Cependant, le contenu de la chitine et du chitosane dans les différentes parties de ce champignon, c'est-à dire : chapeau, pied et lamelle, n'a pas été étudié systématiquement [31]. L'extraction de la chitine et du chitosane d'*A. bisporus* a également été peu étudiée. Certaines études ont décrit l'extraction de la chitine à la fois du pied et du mycélium (la partie végétative) du champignon [114,32].

De plus, la chitine extraite a été mal caractérisée en termes de paramètres structurels (degré d'acétylation (DA)) et propriétés physico-chimiques [114,32].

Conclusion

Cette étude bibliographique montre que la chitine est un biopolymère très répandu dans la nature. On le trouve principalement dans les exosquelettes d'arthropodes, d'insectes, des endosquelettes de céphalopodes et les parois cellulaires des champignons. Son dérivé, le chitosane est très rare à l'état naturel, sauf dans quelques espèces fongiques. Il est produit industriellement par désacétylation de la chitine. Ces deux polysaccharides possèdent de nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques qui ont reçu une attention considérable dans un large domaine d'applications.

Actuellement, la production de la chitine et chitosane provient, principalement, des crevettes et des crabes qui sont des sources animales. Cependant, plusieurs autorités sanitaires à travers le monde suggèrent, de les remplacer pour éviter certains allergies et risques pour la santé. Pour cette raison, une source fongique représente une bonne alternative.

Les études sur l'extraction de la chitine à partir des crustacés sont très abondantes, par contre, elles sont très rares sur celle obtenue à partir des champignons en général et, en particulier, l'*A. bisporus*.

Cette étude s'articule autour de cette problématique de recherche d'une nouvelle source de chitine alternative à celle des crustacés et qui sera bien caractérisée en termes de paramètres physico-chimiques .

Références bibliographiques

- [1] Rinaudo, M. "Chitin and chitosan: properties and applications." *Progress in Polymer Science* 31.7 (2006): 603-632.
- [2] Kurita, K. "Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans." *Marine Biotechnology* 8.3 (2006): 203-226.
- [3] Kumar, M. N. R. "A review of chitin and chitosan applications." *Reactive and Functional Polymers* 46.1 (2000): 1-27.
- [4] Dutta, P. K., Dutta, J., and Tripathi, V. S. "Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications." *Journal of Scientific and Industrial Research* 63 (2004):20-31.
- [5] Vincent, J. F., and Wegst, U. G. "Design and mechanical properties of insect cuticle." *Arthropod Structure and Development* 33.3 (2004): 187-199.
- [6] Berezina, N. "Production and application of chitin." *Physical Sciences Reviews* 1.9 (2016).
- [7] Roer, R., and Dillaman, R. "The structure and calcification of the crustacean cuticle." *American Zoologist* 24.4 (1984): 893-909.
- [8] Kurita, K. "Chemistry and application of chitin and chitosan." *Polymer Degradation and Stability* 59.1-3 (1998): 117-120.
- [9] Al Sagheer, F. A., et al. "Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf." *Carbohydrate Polymers* 77.2 (2009): 410-419.

- [10] Sorlier, P., et al. "Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan." *Biomacromolecules* 2.3 (2001): 765-772.
- [11] Roberts, G. A. F. "Chitin chemistry". MacMillan Press Ltd. London. (1992): 94-95.
- [12] Muzzarelli, R. A., Jeuniaux, C., and Gooday, G. W. eds. "Chitin in nature and technology". Plenum Press. New York 385 (1986).
- [13] Rouget, Ch. "Des substances amylicées dans les tissus des animaux, spécialement des Articulés (chitine)." *Comp. Rend* 48 (1859): 792-795.
- [14] Teng, D. "From chitin to chitosan." CRC Press—Taylor and Francis Group (2012): 1-37.
- [15] Winterowd, J. G., and P. A. Sandford. "Chitin and chitosan." *Food Science and Technologie* (1995): 441-441.
- [16] Muzzarelli, R. A. A. "Chitin.". Oxford: Pergamon Press (1977).
- [17] Peesan, M., Rujiravanit, R., and Supaphol, P. "Characterisation of beta-chitin/poly (vinyl alcohol) blend films." *Polymer testing* 22.4 (2003): 381-387.
- [18] Rudall, K. M., and W. Kenchington. "The chitin system." *Biological Reviews* 48.4 (1973): 597-633.
- [19] Austin, P.R. "Chitin solvents and solubility parameters." *Chitin, Chitosan, and Related Enzymes*. Academic press (1984). 227-237.
- [20] Thomas, S., et al., eds. *Handbook of biopolymer-based materials: from blends and composites to gels and complex networks*. John Wiley and Sons, 2013.
- [21] Sannan, T., Kurita, K., and Iwakura, Y. "Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility." *Macromolecular Chemistry and Physics* 177.12 (1976): 3589-3600.
- [22] Atkins, E. "Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates." *Journal of Biosciences* 8.1-2 (1985): 375-387.

- [23] Rudall, K.M. "Chitin and its association with other molecules." *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*. Vol. 28. No. 1. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 1969.
- [24] Kenchington, W. "Adaptation of insect peritrophic membranes to form cocoon fabrics." *The Insect Integument* (1976): 497-513.
- [25] Paul, W., and Sharma, C. P. "Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review." *S.T.P pharma sciences* 10.1 (2000): 5-22.
- [26] Ogawa, K., Yui, T., and Okuyama, K. "Three D structures of chitosan." *International Journal of Biological Macromolecules* 34.1-2 (2004): 1-8.
- [27] Ge, H. C., and Luo, D. K. "Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation." *Carbohydrate Research* 340.7 (2005): 1351-1356.
- [28] Tolaimate, A., et al. "Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties." *Polymer* 44.26 (2003): 7939-7952.
- [29] Aranaz, I., et al. "Functional characterization of chitin and chitosan." *Current Chemical Biology* 3.2 (2009): 203-230.
- [30] Ruiz-Herrera, J. "Fungal Cell Walls, Structure, Synthesis, and Assembly." CRC Press Inc., Florida. (1992).
- [31] Vetter, J. "Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*." *Food Chemistry* 102.1 (2007): 6-9.
- [32] Di Mario, F., et al. "Chitin and chitosan from Basidiomycetes." *International Journal of Biological Macromolecules* 43.1 (2008): 8-12.8.
- [33] Pochanavanich, P., and Suntornsuk, W. "Fungal chitosan production and its characterization." *Letters in Applied Microbiology* 35.1 (2002): 17-21.
- [34] Synowiecki, Józef, and Al-Khateeb, N. A. A. Q. "Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan." *Food Chemistry* 60.4 (1997): 605-610.

- [35] Zhu, A., and Shen, J. "Bioactivities of chitosan and its derivatives." Chitosan-based Hydrogels: Functions and Applications. CRC Press Taylor and Francis Group Boca Raton, (2012). 138-143.
- [36] Kumar, M. N. R. "A review of chitin and chitosan applications." Reactive and functional polymers 46.1 (2000): 1-27.
- [37] Shepherd, R., Reader, S., and Falshaw, A. "Chitosan functional properties." Glycoconjugate Journal 14.4 (1997): 535-542.
- [38] Koide, S. S. "Chitin-chitosan: properties, benefits and risks." Nutrition Research 18.6 (1998): 1091-1101.
- [39] Kim, K. W., and Thomas, R. L. "Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights." Food Chemistry 101.1 (2007): 308-313.
- [40] Park, P. J., Koppula, S., and Kim, S. K. "18 Antioxidative Activity of Chitosan, Chitooligosaccharides and Their Derivatives." Chitin, Chitosan, ligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications (2010): 241.
- [41] Mourya, V. K., and Inamdar, N. N. "Chitosan-modifications and applications: opportunities galore." Reactive and Functional Polymers 68.6 (2008): 1013-1051.
- [42] Lai, W. F., and Lin, M. C. M. "Chemical derivatization of chitosan for plasmid DNA delivery: present and future." Chitin, chitosan and their derivatives: biological activities and industrial applications (2010): 69-82.
- [43] Ribeiro, M. P., et al. "Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing." Wound repair and regeneration 17.6 (2009): 817-824.
- [44] Muzzarelli, R.A. "17 Chitosan Scaffolds for Bone Regeneration." Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications (2010): 223.

- [45] Kim, S. K., and Jung, W. K. "19 Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives on Human Hemostasis." *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications* (2010): 251.
- [46] Khor, E., and Lim, L. Y. "Implantable applications of chitin and chitosan." *Biomaterials* 24.13 (2003): 2339-2349.
- [47] Berthold, A., Cremer, K., and Kreuter, J. S. T. P. "Preparation and characterization of chitosan microspheres as model for anti-inflammatory drugs." *Journal of Controlled Release* 39.1 (1996): 17-25.
- [48] Senel, S., and McClure, S. J. "Potential applications of chitosan in veterinary medicine." *Advanced Drug Delivery Reviews* 56.10 (2004): 1467-1480.
- [49] Je, J. Y., and Ahn, C. B. "20 Antihypertensive Actions of Chitosan and Its Derivatives." *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications* (2010): 263.
- [50] Nam, K. S., Kim, M. K., and Shon, Y. H. "Chemopreventive effect of chitosan oligosaccharide against colon carcinogenesis." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17.9 (2007): 1546-1549.
- [51] Adjou K, et al. "Maitrise de la cryptosporidiose avec le chitosan: essi in vivo." *Proceedings: Journées nationales DTV – Nantes 2015*, pp. 377–80.
- [52] Transmo, A., Skaugrud, O., and Harman, G. E. "Use of chitin and chitosan in biological control of plants disease." *Chitin Enzymology* (1993): 265-270.
- [53] Kato J, et al. " Physiological role of chitinase and chitin-binding lectin in cucumber,in *Chitin enzymology . " Eur. Chitin Soc. (1993): 257–64.*
- [54] Lienart, Y., et al. "Tetrameters of chitin (chitosan) as elicitors in *Rubus* protoplasts." *Chitin enzymology* (1993): 271-276.

- [55] Nadarajah, K., et al. "Sorption behavior of crawfish chitosan films as affected by chitosan extraction processes." *Journal of Food Science* 71.2 (2006):33–39.
- [56] Lebouc, F., et al. "Different ways for grafting ester derivatives of poly (ethylene glycol) onto chitosan: related characteristics and potential properties." *Polymer* 46.3 (2005): 639-651.
- [57] Ruiz, Montserrat, Ana Maria Sastre, and Eric Guibal. "Palladium sorption on glutaraldehyde-cross linked chitosan." *Reactive and Functional Polymers* 45.3 (2000): 155-173.
- [58] Lebouc, F., et al. "Synthesis of phosphorus-containing chitosan derivatives." *Phosphorus, sulfur, and silicon .Taylor and Francis* 184.4 (2009): 872-889.
- [59] Jouannin, C., et al. "Highly porous catalytic materials with Pd and ionic liquid supported on chitosan." *Journal of Applied Polymer Science* 128.5 (2013): 3122-3130.
- [60] Moucel, R., et al. "Importance of the Conditioning of the Chitosan Support in a Catalyst-Containing Ionic Liquid Phase Immobilised on Chitosan: The Palladium-Catalysed Allylation Reaction Case." *Advanced Synthesis and Catalysis* 352.2-3 (2010): 433-439.
- [61] Clousier, N., et al. "Catalytic materials based on catalysts containing ionic liquid phase supported on chitosan or alginate: Importance of the support." *Comptes Rendus Chimie* 14.7-8 (2011): 680-684.
- [62] Baudoux, J., et al. "Development of new SILP catalysts using chitosan as support." *Green Chemistry* 9.12 (2007): 1346-1351.
- [63] Crini, G. "Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment." *Progress in polymer science* 30.1 (2005): 38-70.
- [64]Crini, G. "Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review." *Bioresource technology* 97.9 (2006): 1061-1085.
- [65] Renault, F., et al. "Chitosan flocculation of cardboard-mill secondary biological wastewater." *Chemical Engineering Journal*155.3 (2009): 775-783.

- [66] Austin, P.R. "Chitin solutions and purification of chitin." *Methods in Enzymology*. Vol. 161. Academic Press, (1988): 403-407.
- [67] Hu, Xianwen, et al. "Solubility and property of chitin in NaOH/urea aqueous solution." *Carbohydrate Polymers* 70.4 (2007): 451-458.
- [68] Muzzarelli RAA. "The polysaccharides." Aspinall GO, ed. New York: Academic Press (1985) 417.
- [69] Austin, P. R. "Chitin complexes with alcohols and carbonyl compounds." U.S. Patent No. 4,063,016. 13 Dec. 1977.
- [70] Minke, R. A. M., and Blackwell, J. "The structure of α -chitin." *Journal of Molecular Biology* 120.2 (1978): 167-181.
- [71] Gardner, K.H., and Blackwell, J. "Refinement of the structure of β -chitin." *Biopolymers* 14.8 (1975): 1581-1595.
- [72] Kurita, K., et al. "Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 31.2 (1993): 485-491.
- [73] Shrinivas Rao, M., et al. "Optimum parameters for production of chitin and chitosan from squilla (*S. empusa*)." *Journal of Applied Polymer science* 103.6 (2007): 3694-3700.
- [74] Percot, A., Viton, C., and Domard, A. "Characterization of shrimp shell deproteinization." *Biomacromolecules* 4.5 (2003): 1380-1385.
- [75] Shimahara, K., and Takiguchi, Y. "Preparation of crustacean chitin." *Methods in enzymology*. Vol. 161. Academic Press, 1988. 417-423.
- [76] Brine, C. J., and Austin, P. R. "Chitin isolates: species variation in residual amino acids." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 70.2 (1981): 173-178.

- [77] Tolaimate, A., et al. "Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties." *Polymer* 44.26 (2003): 7939-7952.
- [78] Shrinivas Rao, M. et al. "Optimum parameters for production of chitin and chitosan from squilla (*S. empusa*)." *Journal of applied polymer science* 103.6 (2007): 3694-3700.
- [79] Lavall, R. L., Assis, O. B., and Campana-Filho, S. P. " β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization." *Bioresource Technology* 98.13 (2007): 2465-2472.
- [80] De Holanda, H. D., and Netto, F. M. "Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis." *Journal of Food Science* 71.5 (2006).
- [81] Hackman, R. "Studies on chitin I. Enzymic degradation of chitin and chitin esters." *Australian journal of biological sciences* 7.2 (1954): 168-178.
- [82] Crini, G. "Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application." Presses Univ. Franche-Comté, (2009).
- [83] Teli, M. D., and Sheikh, J. "Extraction of chitosan from shrimp shells waste and application in antibacterial finishing of bamboo rayon." *International journal of biological macromolecules* 50.5 (2012): 1195-1200.
- [84] Einbu, A. "Characterisation of chitin and a study of its acid-catalysed hydrolysis." Trondheim, Norwegian University of Science and Technology; 2007(a) .
- [85] No, H. K., and Meyers, S. P. "Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37.3 (1989): 580-583.
- [86] Synowiecki, J., and Al-Khateeb, N.A.A.Q. "Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43(2) (2003): 145-171.

- [87] Mirzadeh, H., et al. "Preparation of chitosan derived from shrimp." *Iranian Polymer Journal* 11(1) (2002): 63-68.
- [88] Xu, Y., Gallert, C., and Winter, J. "Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification." *Applied Microbiology and Biotechnology* 79.4 (2008): 687-697.
- [89] Du, Y., et al. "Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10.1 (2009): 103-107.
- [90] Broussignac, P. "Chitosan, a natural polymer not well known by the industry." *Chim. Ind. Genie Chim* 99.9 (1968): 1241-1247.
- [91] Galed, G., et al. "N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin." *Carbohydrate polymers* 62.4 (2005): 316-320.
- [92] Wang, S. L., and Chio, S. H. "Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187." *Enzyme and Microbial Technology* 22.7 (1998): 629-633.
- [93] Vázquez, José Antonio, et al. "Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: A review." *Marine drugs* 11.3 (2013): 747-774.
- [94] De Holanda, H. D., and Netto, F. M. "Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis." *Journal of Food Science* 71.5 (2006): 298-303.
- [95] Synowiecki, J., and Al-Khateeb, N.A.A.Q. "The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards." *Food chemistry* 68.2 (2000): 147-152.

- [96] Xu, Y., Gallert, C., and Winter, J. "Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification." *Applied microbiology and biotechnology* 79.4 (2008): 687-697.
- [97] Gartner, C., Peláez, C. A., and López, B. L. "Characterization of chitin and chitosan extracted from shrimp shells by two methods." *e-Polymers* 10.1 (2010):1-16
- [98] Tan, S. C, et al. "The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time." *Carbohydrate Polymers* 30.4 (1996): 239-242.
- [99] Cai, J., et al. "Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant." *Carbohydrate Polymers* 64.2 (2006): 151-157.
- [100] Yen, M. T., and Mau, J. L. "Selected physical properties of chitin prepared from shiitake stipes." *LWT-Food Science and Technology* 40.3 (2007): 558-563.
- [101] Wu, T., et al. "Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan." *Journal of agricultural and food chemistry* 53.10 (2005): 3888-3894.
- [102] Arcidiacono, S., and Kaplan, D. L. "Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions." *Biotechnology and Bioengineering* 39.3 (1992): 281-286.
- [103] Díez, B., et al. "The *nagA* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding β -N-acetylglucosaminidase." *FEMS Microbiology Letters* 242.2 (2005): 257-264.
- [104] Cai, J., et al. "Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant." *Carbohydrate Polymers* 64.2 (2006): 151-157.
- [105] Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., and Knorr, D. "Antibacterial action of chitosan." *Food Biotechnology* 6.3 (1992): 257-272.
- [106] Roberts, G. A. F. "Chitin chemistry." Macmillan Press Ltd. London, (1992).
- [107] HU, K.J., et al. "Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *absidia glauca*." *Journal of food biochemistry* 23.2 (1999): 187-196.

- [108] Tan, S.C., et al. "The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time." *Carbohydrate Polymers* 30.4 (1996): 239-242.
- [109] White, S. A., Farina, P. R., and Fulton, I. "Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*." *Applied and Environmental Microbiology* 38.2 (1979): 323-328.
- [110] Rane, K. D., and Hoover, D. G. "Production of chitosan by fungi." *Food Biotechnology* 7.1 (1993): 11-33.
- [111] Chatterjee, S., et al. "Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization." *Process Biochemistry* 40.1 (2005): 395-400.
- [112] Teng, W. L., et al. "Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi." *Carbohydrate Research* 332.3 (2001): 305-316.
- [113] Crestini, C., Kovac, B., and Giovannozzi-Sermanni, G. "Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*." *Biotechnology and bioengineering* 50.2 (1996): 207-210.
- [114] Wu, T., et al. "Chitin and chitosan value-added products from mushroom waste." *Journal of agricultural and food chemistry* 52.26 (2004): 7905-7910.
- [115] Kalač, P. "Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review." *Food chemistry* 113.1 (2009): 9-16.
- [116] Rhazi, M., et al. "Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan." *Polymer International* 49.4 (2000): 337-344.
- [117] Schiffman, J. D., and Schauer, C.L. "Solid state characterization of α -chitin from *Vanessa cardui* Linnaeus wings." *Materials Science and Engineering: C* 29.4 (2009): 1370-1374.

- [118] Nwe, N., Furuike, T., and Tamura, H. "Chitin and chitosan from terrestrial organisms." Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: Biological activities and applications. CRC Press. New York. (2010): 3-10.
- [119] Abdou, E. S., Nagy, K. S., and Elsabee, M. Z. "Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources." Bioresource Technology 99.5 (2008): 1359-1367.
- [120] Gervasi, E., Jeuniaux, C., and Dauby, P. "Production de chitine par les crustacés du zooplancton de la baie de Calvi (Corse)." Aspects récents de la biologie des crustacés. 8 (1988): 33-38.
- [121] Jeuniaux, C., Voss-Foucart, M. F., and Bussers, J. C. "La production de chitine par les crustacés dans les écosystèmes marins." Aquatic Living Resources 6.4 (1993): 331-341.
- [122] Hajji, S., et al. "Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources." International journal of biological macromolecules 65 (2014): 298-306.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

Introduction

Dans ce chapitre, nous décrivons le matériel ainsi que les différentes méthodes et techniques expérimentales qui ont été utilisés. La préparation des champignons, le protocole d'extraction, ainsi que le principe et les paramètres d'étude pour chaque technique d'analyse seront présentés à savoir : MEB, FTIR, DRX , ATG, RMN ¹³ C.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matière première

Dans cette étude, on a utilisé 1 kg de champignons frais « *A. bisporus* » qu'on a achetés auprès du supermarché Carrefour (Villeurbanne, France) avec les caractéristiques suivantes (origine: Vallée de la Loire; catégorie: 1; calibre: Moyen; N ° 790/29 et 790/27; Date d'achat: 28/10/2015) Figure II.1. Les champignons ont été lavés après élimination des souillures Figure II.2, coupés, séparés en trois parties (chapeaux, pieds et lamelles), comme indiqué sur la Figure II.3. Ensuite on les a broyés par un mixeur, congelés le même jour et lyophilisés dans un lyophilisateur « LABCONCO » Figure II. 4 avant d'autres traitements.



Figure II.1 : La matière première : Champignon *A. bisporus*



Figure II.2 : Préparation des champignons

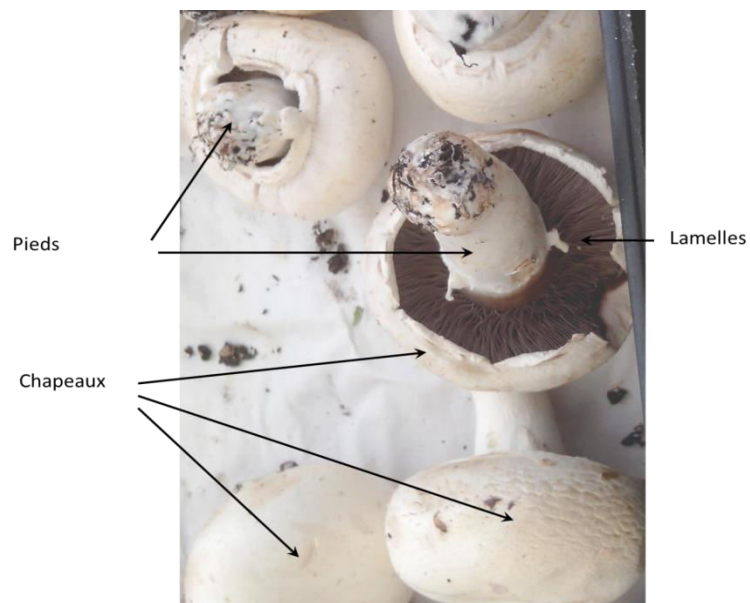


Figure.II.3 : *A. bisporus* séparé en trois parties : (1) Chapeaux; (2) Pieds ; (3) Lamelles.



Figure II.4 : Lyophilisation des champignons.

II.2. Réactifs et échantillons standards

Des échantillons standards d'alpha-chitine (DA 87%, lot n°52, à partir de l'exosquelette de crevettes) ont été fournis par Mahtani Chitosan (Veraval, Inde). Des granulés d'hydroxyde de sodium, une solution d'hydroxyde d'ammonium et de l'acide acétique glacial ont été achetés chez Acros organiques et Sigma-Aldrich. Tous les réactifs ont été utilisés à des degrés très purs. L'eau dés-ionisée a été utilisée pour la préparation des solutions aqueuses.

II.3. Méthodes d'extraction de la chitine et du chitosane

L'extraction de la chitine a été effectuée selon un protocole obtenu après modification de ce qui a déjà été signalé dans la littérature [1, 2]. Ce processus comportait les étapes suivantes résumées dans le schéma II.1.

- (i) **Déprotéinisation:** 4 g de chaque partie du champignon lyophilisé (chapeau, pied et lamelle) ont été traités avec une solution d'hydroxyde de sodium (120 ml, 1 M) à 80 °C pendant 2 h Figure II.5. Le résidu insoluble alcalin a été lavé avec de l'eau désionisée et centrifugé. Les cycles de lavage / centrifugation ont été répétés plusieurs fois jusqu'à pH neutre puis le résidu insoluble alcalin a été lyophilisé.
- (ii) **Isolation de la chitine:** 1 g du résidu insoluble alcalin a été agité dans 100 ml d'acide acétique (2%) à 95 ° C pendant 6 h. Le matériau insoluble (c'est-à-dire la chitine) a été isolé par centrifugation, dans une centrifugeuse de marque « HETTICH MIKRO 200 R » Figure II.6, avec une vitesse de rotation de 10000 G pendant 10 min. Ensuite le matériau est lavé plusieurs fois avec de l'eau désionisée jusqu'à ce que le pH devienne neutre, à la fin il est lyophilisé.
- Le rendement massique de la chitine ainsi obtenue Figure II.10 est calculé par rapport au poids sec.
- (iii) **Précipitation du chitosane :** Le chitosane a été isolé par précipitation à partir du surnageant après addition d'une solution concentrée d'hydroxyde d'ammonium (37%) jusqu'à pH 9. Le précipité a été lavé abondamment avec de l'eau désionisée jusqu'à pH 9. Le chitosane a été obtenu en poudre après lyophilisation et le rendement en masse de chitosane a été calculé par rapport au poids sec.

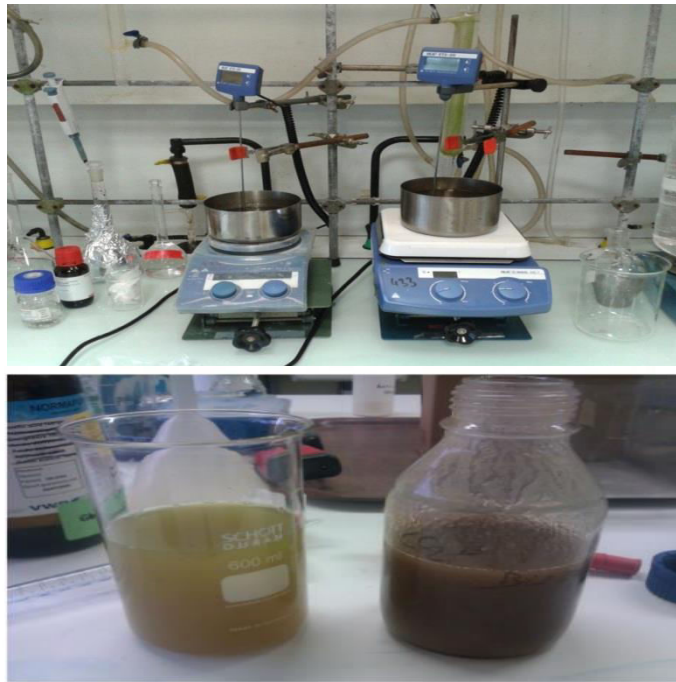


Figure II.5 : Etape de déproteinisation.



Figure II.6 : Centrifugeuse

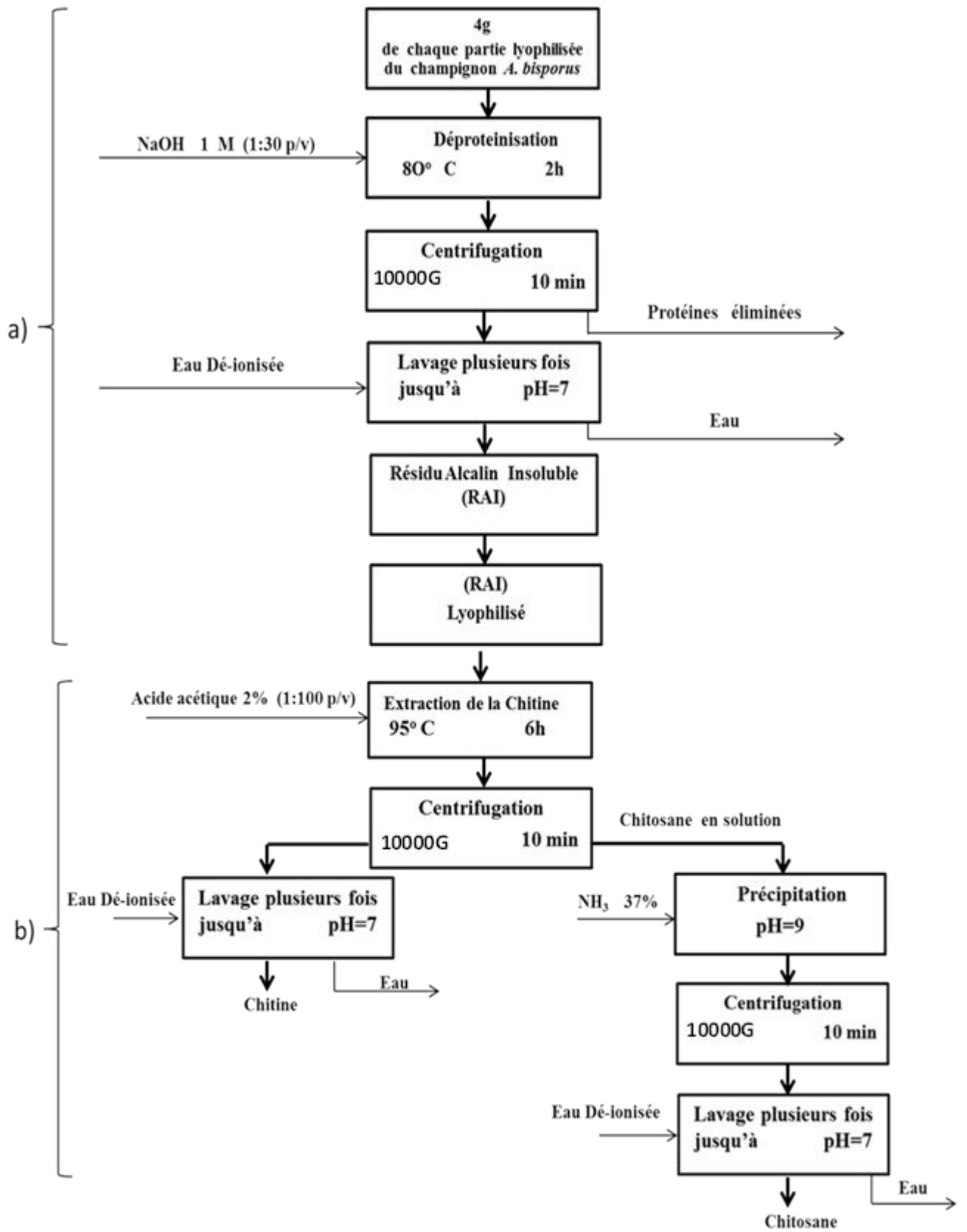


Schéma II.1 : Protocole d'extraction.

II.4. Méthodes de caractérisation

II.4.1. Spectroscopie infrarouge (FTIR)

II.4.1.1. Introduction

La spectroscopie infrarouge (IR) est l'une des techniques d'analyse les plus importantes et les plus largement utilisées par les chercheurs travaillant sur la chitine et le chitosane. C'est une technique simple à mettre en œuvre, peu coûteuse qui a l'avantage de permettre l'analyse d'échantillons à l'état solide et ne dépend pas de sa solubilité qui est un problème dans le cas de la chitine [3].

Elle est largement utilisée pour étudier la composition et la structure de la chitine, pour distinguer la forme α de la forme β [4,5], pour déterminer le degré d'acétylation [3,6] et enfin pour confirmer la pureté de la chitine extraite [7,8].

II.4.1.2. Principe

Elle est basée sur les vibrations des atomes d'une molécule. Afin d'analyser un échantillon, un faisceau de lumière infrarouge est transmis à travers celui-ci, et la quantité d'énergie absorbée à chaque longueur d'onde est enregistrée [9] Figure II.8.

L'analyse des spectres d'absorption IR permet d'avoir un aperçu sur quel type de liaisons sont présentes dans l'échantillon.

De nos jours, le spectre total est analysé par un processus d'interférence et converti en fréquence ou en nombre d'onde au moyen d'un processus mathématique connu sous le nom de transformée de Fourier. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a considérablement amélioré la qualité des spectres infrarouges et réduit au minimum le temps requis pour obtenir des données [9, 10]. Les progrès de la spectroscopie infrarouge moderne sont passés en revue dans la littérature [11,12].

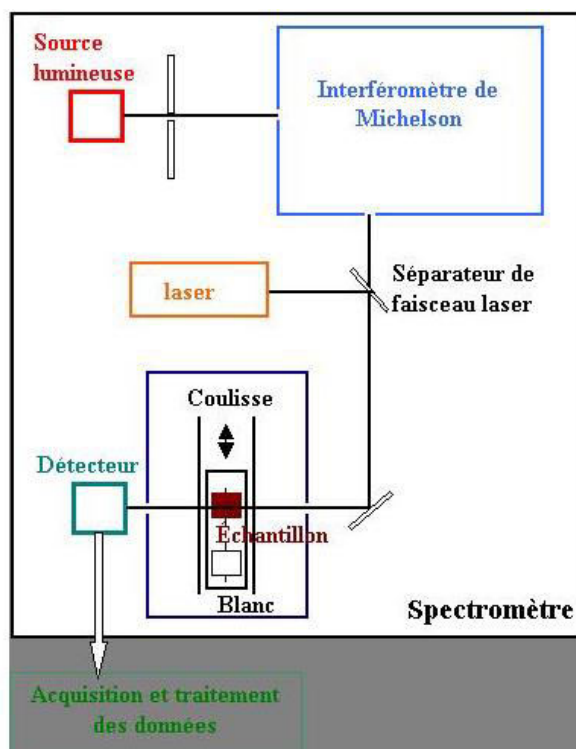


Figure II.7 : Schéma de principe d'un spectromètre (FTIR).

Les spectres FTIR sont généralement enregistrés dans l'infrarouge moyen (4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1}) avec une résolution de 4 cm^{-1} en mode d'absorbance pour 8 à 64 scans à température ambiante. Les échantillons pour l'analyse FTIR sont préparés en broyant les poudres mélangées à sec avec du KBr en poudre, souvent dans le rapport de 1: 5 (Echantillon: KBr), puis compressés pour former des disques. Les spectres sont parfois mesurés en utilisant une méthode de réfraction totale atténuée [13] (ATR) dans un spectromètre IR [14,15]. L'analyse spectroscopique par réflexion de transformée de Fourier infrarouge (DRIFT) est également appliquée [16].

II.4.1.3. Paramètres de l'étude

Les spectres FTIR de la chitine *d'A. bisporus* ont été acquis à l'aide d'un spectromètre FTIR Nicolet iS10 (ThermoFischer Scientific) figure II.9 sur l'intervalle de nombre d'onde de 4000-400 cm^{-1} . Un accessoire d'échantillonnage Gemini L'ATR intelligent a été utilisé pour collecter des spectres de réflectance totale atténuée horizontale (ATR) à l'aide d'un cristal ZnSe standard. Les échantillons ont été pressés avec un dispositif Minigrip afin d'assurer un contact uniforme entre les échantillons et le cristal ATR. Les spectres FTIR ont été enregistrés par accumulation d'au moins 64 scans, avec une résolution de 4 cm^{-1} en utilisant le logiciel OMNIC (ThermoFischer Scientific).



Figure II.8 : Spectromètre FTIR Nicolet iS10 (ThermoFischer Scientific).

Laboratoire IMP, Lyon, France.

II.4.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

II.4.2.1 Introduction

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière.

Les avantages de la microscopie électronique à balayage sont multiples. Tout d'abord, la grande profondeur de champ observable qui va de quelques centimètres à faible grandissement (X 10) à de quelques micromètres au grandissement maximum (X 100 000). Ensuite la très bonne résolution, de l'ordre du micromètre, et enfin une préparation simple des échantillons permettant une observation directe des surfaces.

Plusieurs auteurs ont utilisés la MEB pour l'étude de la micro-structure de la cuticule des crustacés [17- 20].

II.4.2 .2. Principe

Le principe du MEB consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface.

Les principaux éléments composant un Microscope Electronique à Balayage sont : une source d'électrons (canon) et un dispositif de haute tension, une colonne maintenue sous un vide secondaire, un ensemble de lentilles électroniques permettant l'obtention d'un fin faisceau, une platine permettant d'installer les échantillons, un détecteur d'électrons couplé à un amplificateur de signal et enfin un système de visualisation des images. Le fonctionnement du MEB est présenté dans la Figure II.10.

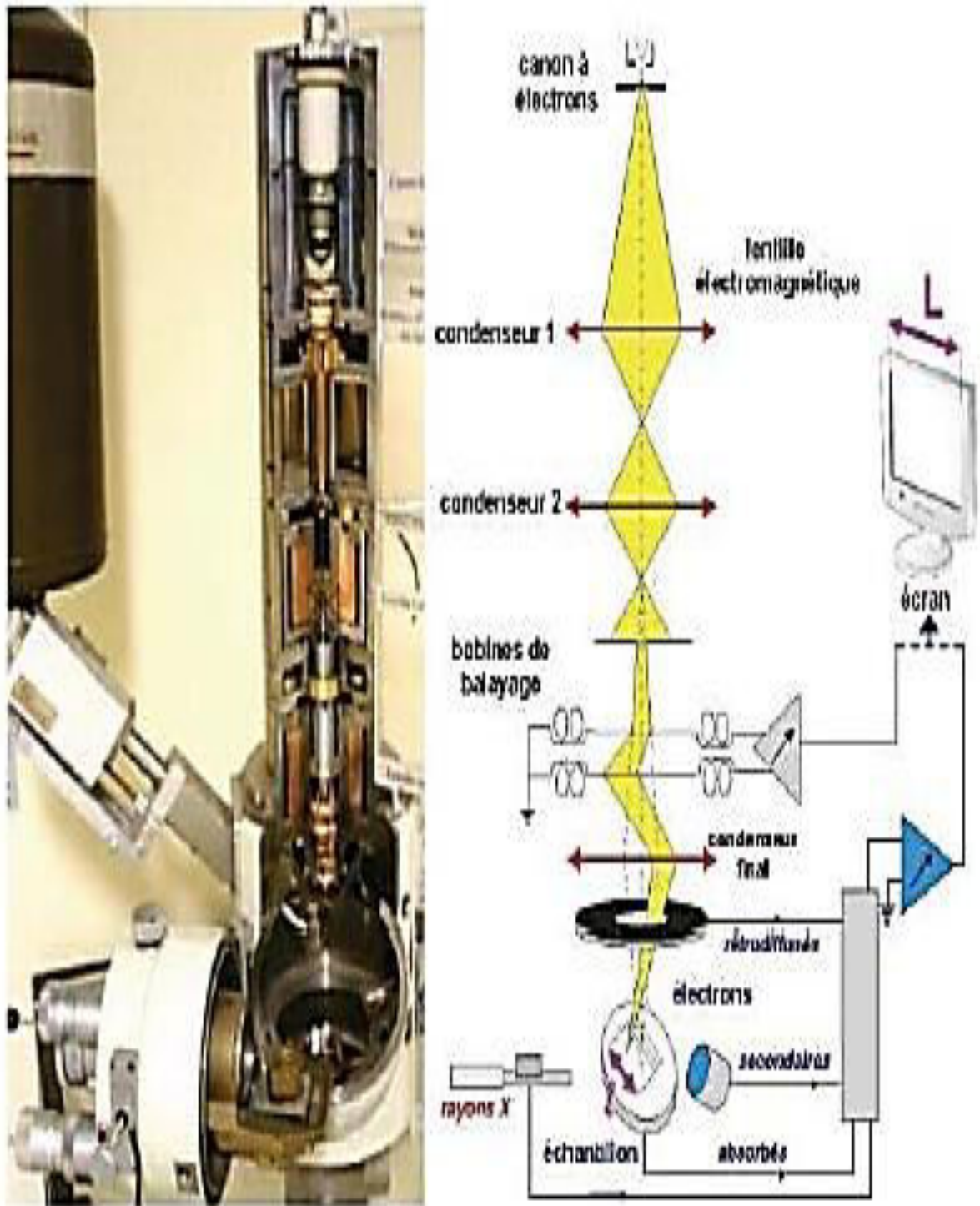


Figure II.9 : Photo de la coupe d'un MEB et schéma de fonctionnement associé, d'après [21].

II.4.2.3. Paramètres de l'étude

Pour l'observation des échantillons correspondants aux trois parties du champignon lyophilisées (chapeau, pied et lamelle), le Microscope Electronique à Balayage utilisé était un (Hitachi S800 Figure II.9. En mode vide faible à une tension d'accélération allant de 5 à 15 kV pour la prise d'images. Un grand détecteur (LFD) a été utilisé et la distance de travail était comprise entre 5 et 10 mm.



Figure II.10 : Microscope électronique à balayage (MEB) (Hitachi S800).

II.4.3 Analyse de diffraction des rayons X (DRX)

II.4.3.1 Introduction

La spectroscopie de diffraction des rayons X est incontestablement le moyen le plus largement utilisé pour caractériser la structure des matériaux [22]. Elle est ainsi un outil puissant, flexible et un excellent complément à de nombreuses techniques d'analyse telles que UV-Vis, IR, RMN. Cette technique fournit des informations sur la structure cristalline des matériaux et permet aussi de calculer leur degré de cristallinité [23, 24].

II.4.3.2. Principe

Un faisceau de rayons X incident de longueur d'onde λ ne sera réfléchi par une famille de plans d'indice de Miller (h,k,l) que dans la mesure où il rencontre ces plans sous un certain angle appelé angle de Bragg figure II.12. Les angles de Bragg sont définis par l'équation (II.1), qui les lie à la longueur d'onde des rayons X utilisés et aux distances interréticulaires de la famille de plans {h,k,l} qui diffractent ces rayons.

$$n \lambda = 2 d_{hkl} \sin \theta \quad (\text{II.1})$$

avec :

λ : la longueur d'onde du faisceau de rayons X

d : la distance inter-réticulaire

θ : l'angle d'incidence des rayons X

n : l'ordre de diffraction.

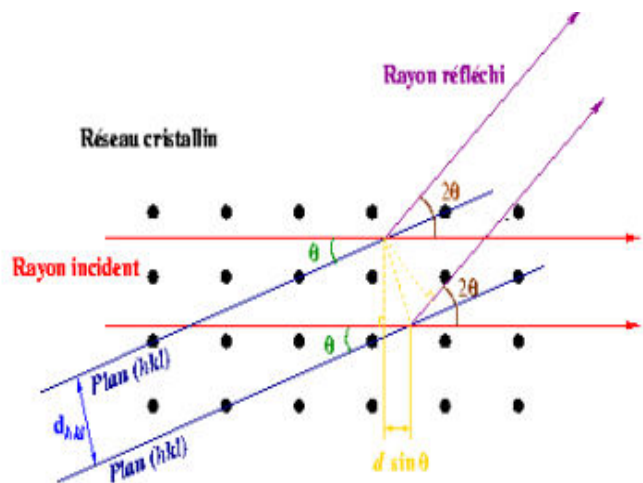


Figure II.11 : principe de la Loi de Bragg

II.4.3.3 Paramètres de l'étude

Les analyses DRX ont été effectuées avec un diffractomètre Bruker D8 (Figure II.13) sans rayonnement Ni-filtré, $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$) et d'un détecteur linéaire PSD avec une ouverture maximale de 1° . La tension entre la source et la cible est constante et égale à 40 kV et l'intensité dans le filament est de 40 mA. Les balayages ont été effectués avec un pas de $0,020^\circ$ et 0,2 s.



Figure II.12 : Diffractomètre Bruker D8

II.4.4 Analyse thermogravimétrique (ATG)

II.4.4.1 Introduction

L'analyse thermogravimétrique est une technique d'analyse thermique qui consiste à mesurer la masse d'un échantillon lorsque celui-ci est soumis à des variations de température. L'ATG permet d'observer les effets de décomposition thermique, d'évaporation, de réduction, de désorption, de sublimation, d'oxydation, d'absorption, etc. Elle permet également de qualifier la stabilité thermique des composés. Plusieurs auteurs ont utilisés cette technique pour étudier la décomposition de la chitine [25, 26] et sa stabilité thermique [27].

II.4.4.2 Principe

Le principe de cette méthode repose sur la stabilité thermique des produits figure II.14. L'appareil dispose d'une balance de grande précision. L'échantillon de quelques mg est placé dans un creuset sur la canne de mesure. La canne est placée dans un four dans lequel circule un gaz de balayage (azote, argon, air, oxygène, etc.). Le poids est mesuré régulièrement pour suivre la perte de masse en fonction de l'augmentation de la température.

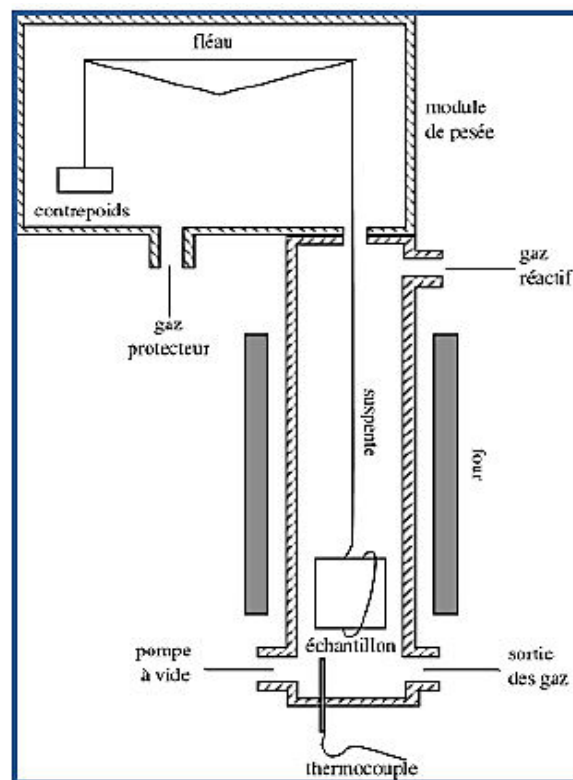


Figure II.13 : Schéma de principe de l'ATG.

II.4.4.3 Paramètres de l'étude

Les analyses ATG ont été effectuées avec un analyseur thermogravimétrique Q500 (DuPont Instrument) du laboratoire (IMP, Lyon, France) Figure II.15. Des échantillons (environ 10 mg) ont été placés dans une nacelle en alumine, dans une atmosphère d'hélium de 30 ° C jusqu'à environ 800 ° C à une vitesse de chauffe de 10 ° C / min. Le taux de cendres (%) et la teneur en humidité (%) ont été déterminés à partir du thermogramme ATG à l'aide du logiciel Universal Analysis (instruments TA).



Figure II.14: Dispositif d'analyse thermogravimétrique.

II.4.5 Spectroscopie RMN ^{13}C / CP-MAS

II.4.5 .1 Introduction

La technique la plus efficace pour caractériser un biopolymère d'origine fongique est la spectroscopie RMN du carbone-13. Elle permet une analyse avec une grande précision et n'exige pas d'utiliser des échantillons solubles [28].

La RMN ^{13}C est une technique non destructive, extrêmement riche et puissante qui consiste à observer, dans un champ magnétique intense, la réponse de certains atomes à un champ radio fréquence. Elle est largement utilisée pour étudier la composition et la

structure de la chitine, pour distinguer la forme α de la forme β [28 , 29] et enfin pour confirmer la pureté de la chitine extraite [26] .

II.4.5 .2 Principe

Les noyaux sont caractérisés par un spin nucléaire et un moment magnétique nucléaire (équation II.2) qui sont tous quantifiés : ils sont équivalents à de petits aimants figure II.16.

$$\mu = \gamma I \quad (\text{II.2})$$

avec :

I: spin

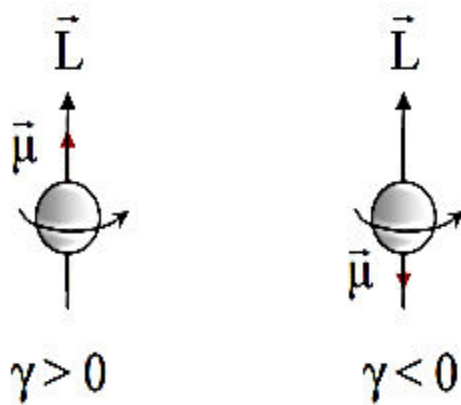
μ : moment magnétique nucléaire

γ : rapport gyromagnétique du noyau considéré

Un noyau est observable par RMN s'il présente des propriétés magnétiques caractérisées par l'existence d'un nombre de spin I non nul. Seul l'isotope ^{13}C du carbone de spin 1/2, dont l'abondance naturelle n'est que de 1,1 %, est détectable par RMN, alors que le principal isotope du carbone, ^{12}C , a un spin nul.

En l'absence de champ magnétique extérieur, tous les noyaux ont la même énergie. En présence d'un champ magnétique B_0 , les spins ont $2I+1$ niveaux d'énergie différents ce qui permet l'absorption ou l'émission d'énergie dans le domaine des radiofréquences Figure II.17.

La fréquence exacte de résonance des spins dépend essentiellement du noyau étudié et de l'intensité du champ magnétique. Elle varie légèrement en fonction de l'environnement du noyau étudié, car le nuage électronique autour de l'atome considéré constitue un écran magnétique .



$$\vec{\mu} = \gamma \vec{L}$$

γ = rapport gyromagnétique
en $\text{rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Figure II.15 : Le moment magnétique μ .

De la mesure de la constante d'écran, on peut déduire quels sont les voisins de l'atome observé. Par exemple, un carbone lié à un oxygène résonnera à une fréquence plus élevée d'un carbone lié à un silicium : la différence est de quelques centaines de Hertz, sur une valeur de quelques centaines de MHz. Pour avoir une mesure indépendante du champ magnétique, et donc de l'appareillage utilisé, on exprime cette différence en ppm, partie par millions par rapport à la valeur exacte de fréquence de résonance d'un composé de référence, le tétra méthyl silane (TMS). C'est ce petit écart qui va permettre de caractériser l'environnement des noyaux étudiés. C'est le déplacement chimique standardisé.

$$\delta = \frac{\nu_{\text{éch}} - \nu_{\text{réf}}}{\nu_{\text{réf}}} \cdot 10^6 \quad \text{en ppm}$$

Avec :

ν = fréquence d'émission en Hz

δ = déplacement chimique en ppm

Le dispositif expérimental est schématisé dans la Figure II.18. Une bobine est placée à proximité de l'échantillon. Elle émet une onde électromagnétique dont la fréquence est judicieusement choisie.

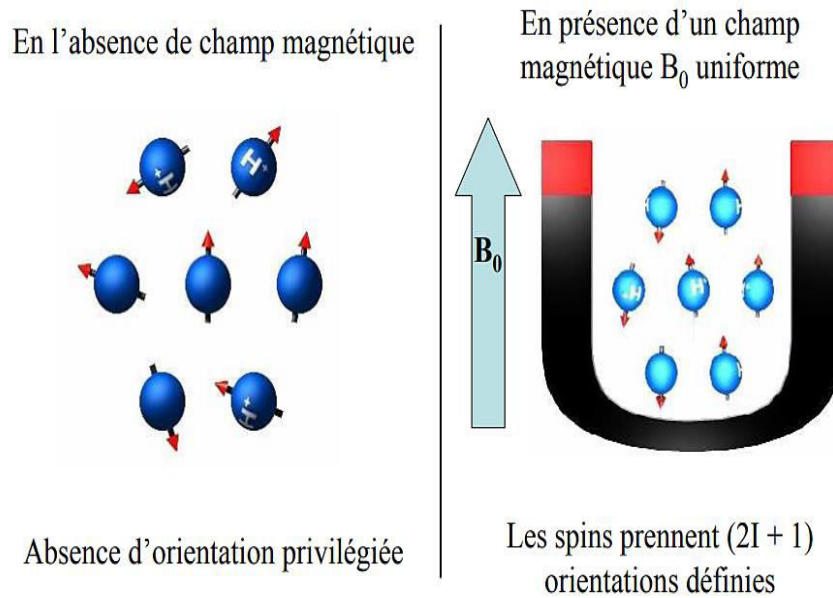


Figure II.16 : Orientation des moments magnétiques nucléaires.

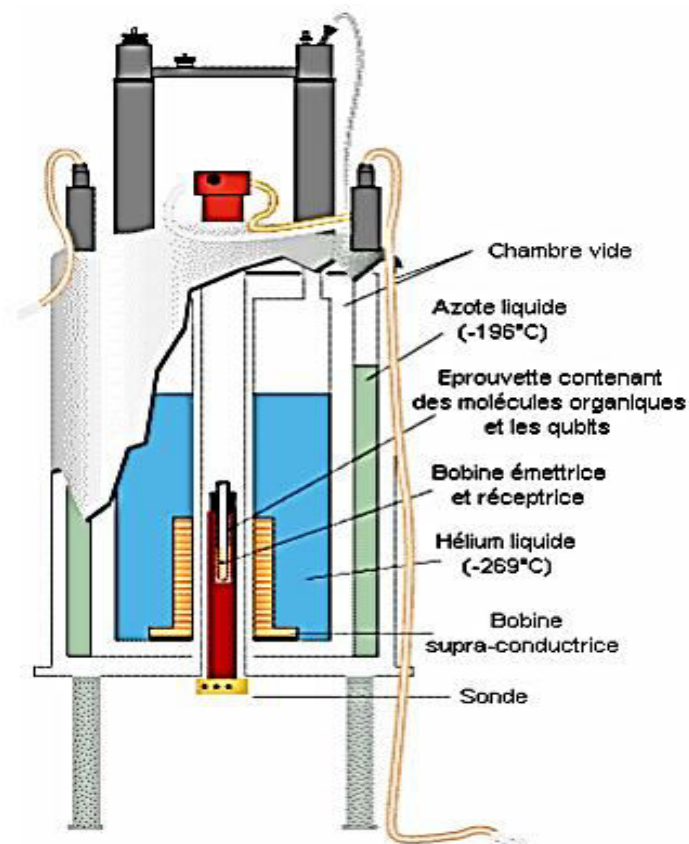


Figure II.17 : Schémas de principe du RMN ^{13}C .

II.4.5 .3. Polarisation croisée (CP-MAS).

La polarisation croisée est une technique utilisée en RMN sous rotation à l'angle magique permettant de transférer la polarisation d'un noyau I, souvent de haute sensibilité comme (^1H ou ^{19}F), vers un noyau S, souvent de plus faible sensibilité ou abondance naturelle (^{13}C ou ^{29}Si).

II.4.5 .4. Paramètres de l'étude

Les spectres RMN ^{13}C « Cross-Polarization (CP) Magic Angle Spinning (MAS) » ont été enregistrés sur un spectromètre Brüker (300 MHz). Une sonde MAS à double résonance de 4 mm a été utilisée à 75,48 MHz. Les échantillons ont été filés dans des rotors ZrO_2 à l'aide d'un taux de filage de 10 kHz. Les spectres ont été recueillis à l'aide d'une impulsion de protons de 90° de $4\ \mu\text{s}$ avec un temps de contact de $1500\ \mu\text{s}$. Le délai de recyclage était de 10 s (^1H) avec 1024 scans (^{13}C). Les déplacements chimiques sont signalés en ppm en aval de SiMe_4 référencé à 0 ppm.



Figure II.18 : Dispositif d'analyse RMN ^{13}C . Laboratoire IMP,Lyon.

Conclusion

Le matériel et les techniques expérimentales utilisés dans ce travail ont été présentés. Nous avons en particulier décrit le protocole d'extraction étape par étape. Le principe et les paramètres d'études de chaque technique d'analyse ont été également présentés.

Références bibliographiques

- [01] Wu, T., et al. "Chitin and chitosan value-added products from mushroom waste." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52.26 (2004): 7905-7910.
- [02] Synowiecki, J., and Al-Khateeb, N. A. A. Q. "Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan." *Food Chemistry* 60.4 (1997): 605-610.
- [03] Ng, C.H., et al. "Evaluation of an improved acid hydrolysis-HPLC assay for the acetyl content in chitin and chitosan." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 76.1 (2006): 155-160.
- [04] Duarte, M. L., et al. "An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy." *International Journal of Biological Macromolecules* 31.1-3 (2002): 1-8.
- [05] Cardenas, G., and Miranda, S. P. "FTIR and TGA studies of chitosan composite films." *Journal of the Chilean Chemical Society* 49.4 (2004): 291-295.
- [06] Baxter, A., et al. "Improved method for ir determination of the degree of N-acetylation of chitosan." *International journal of biological macromolecules* 14.3 (1992): 166-169.
- [07] Majtán, J., et al. "Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*)." *International journal of biological macromolecules* 40.3 (2007): 237-241.
- [08] Chaussard, G., and Domard A. "New aspects of the extraction of chitin from squid pens." *Biomacromolecules* 5.2 (2004): 559-564.

- [09] Cárdenas, G., et al. "Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ¹³C cross polarization/magic angle spinning NMR." *Journal of Applied Polymer Science* 93.4 (2004): 1876-1885.
- [10] Smith, B.C. *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC press, 2011.
- [11] Günzler, Helmut, and Hans-Ulrich Gremlich. "IR spectroscopy. An introduction." Wiley-VCH: Weinheim, Germany (2002).
- [12] Griffiths, P. R., and De Haseth, J. A. "Fourier transform infrared spectrometry." Vol. 171. John Wiley and Sons, (2007).
- [13] Thanpitcha, T., et al. "Dendritic polyaniline nanoparticles synthesized by carboxymethyl chitin templating." *European Polymer Journal* 44.11 (2008): 3423-3429.
- [14] Bourtoom, T., and Chinnan, M. S. "Preparation and properties of rice starch–chitosan blend biodegradable film." *LWT-Food Science and Technology* 41.9 (2008): 1633-1641.
- [15] Sajomsang, W., et al. "Mucoadhesive property and biocompatibility of methylated N-aryl chitosan derivatives." *Carbohydrate Polymers* 78.4 (2009): 945-952.
- [16] Urreaga, J. M., and De la Orden, M. U. "Chemical interactions and yellowing in chitosan-treated cellulose." *European Polymer Journal* 42.10 (2006): 2606-2616.
- [17] Pillai, C. K. S., Paul, W., and Sharma, C. P. "Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation." *Progress in polymer science* 34.7 (2009): 641-678.
- [18] Raabe, D., et al. "Microstructure and crystallographic texture of the chitin–protein network in the biological composite material of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*." *Materials Science and Engineering: A* 421.1-2 (2006): 143-153.
- [19] Fabritius, H.O., et al. "Influence of Structural Principles on the Mechanics of a Biological Fiber-Based Composite Material with Hierarchical Organization: The Exoskeleton of the Lobster *Homarus americanus*." *Advanced Materials* 21.4 (2009): 391-400.

- [20] Raabe, D., Sachs, C., and Romano, P. "The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material." *Acta Materialia* 53.15 (2005): 4281-4292.
- [21] Groupe G.-M. and Brisset F. *Microscopie électronique à balayage et Microanalyses*. EDP Sciences, Paris (2008).
- [22] Guo, T. "More power to X-rays: New developments in X-ray spectroscopy." *Laser and Photonics Reviews* 3.6 (2009): 591-622.
- [23] K. J. Murata, M. B. Norman, *American Journal of Science*, Vol. 276, p 112-1130, 1976.
- [24] Tong Liang, Wang Meihua, Han Sufen, Tang Mingshu, *Advances in Cement Research*, vol 9, No 34, p 55-63, 1997.
- [25] Moussout, H., et al. "Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis." *Polymer Degradation and Stability* 130 (2016): 1-9.
- [26] Paulino, A.T., et al. "Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides." *Carbohydrate Polymers* 64.1 (2006): 98-103.
- [27] Sajomsang, W., and Gonil, P. "Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs." *Materials Science and Engineering: C* 30.3 (2010): 357-363.
- [28] Tanner, S.F., et al. "High-resolution solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance study of chitin." *Macromolecules* 23.15 (1990): 3576-3583.
- [29] Cárdenas, G., et al. "Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ^{13}C cross polarization/mass angle spinning NMR." *Journal of Applied Polymer Science* 93.4 (2004): 1876-1885.

Chapitre III

RESULTATS DE L'EXTRACTION

Introduction

Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats de l'extraction de la chitine à partir des trois parties du champignon *A. bisporus*.

III .1. Teneur en matière sèche de l'*A. bisporus* :

La teneur en matière sèche est le rapport de la masse après lyophilisation (90,45g) et celle engagée avant lyophilisation (951,14 g) sa valeur calculée est de 9,51%. Elle est très proche du pourcentage donné dans la littérature concernant les champignons en général. En effet, la teneur en matière sèche des espèces fongiques en général ne dépasse pas 10% [1].

La Figure III.1 montre la répartition de la masse initialement engagée dans les trois parties du champignon (en pourcentage de poids humide). Le Tableau III.1 présente la répartition de la masse dans les trois parties du champignon avant et après lyophilisation. La masse des déchets enlevés initialement à partir de 1 Kg est de 48 ,86 g.

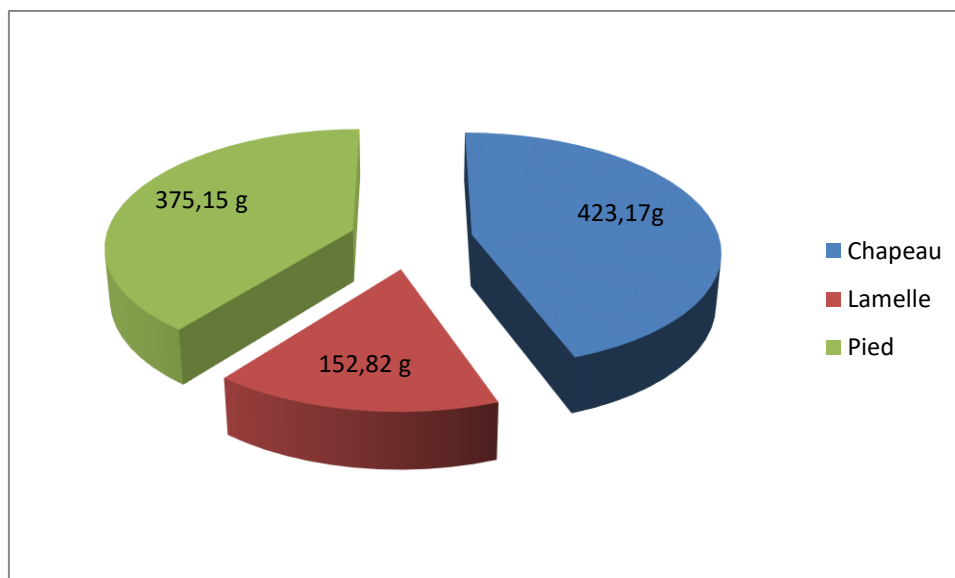


Figure III.1 : Répartition de la masse dans les trois parties du champignon.

Tableau III.1 : Répartition de la masse dans les trois parties du champignon avant et après lyophilisation.

Partie du champignon	Masse après nettoyage et découpe (g)	Masse après lyophilisation (g)
Chapeau	423,17	40,24
Lamelle	152,82	14,54
Pied	375,15	35,67
Total	951,14	90,45

III.2. Extraction de la chitine et du chitosane à partir des trois parties d'*A. bisporus*

La chitine et le chitosane ont été extraits à partir de 4 g de chaque partie du corps lyophilisé de l'*A. bisporus*, à savoir : chapeau, pied et lamelle. Ces produits ont été obtenus au moyen d'un traitement basique et acide.

Dans l'étape basique de déprotéinisation, le traitement chimique est utilisé pour détruire les liaisons chimiques covalentes entre les complexes chitine-protéine (les protéines sont liées par des liaisons covalentes à la chitine formant ainsi des complexes stables) [2, 3]. La solution alcaline d'hydroxyde de sodium permet aussi d'éliminer les faibles quantités de lipides et pigments [4, 5].

Le traitement acide a été effectué pour la séparation du chitosane (si présent) de la chitine fongique. Cette étape a également contribué à l'élimination des impuretés minérales résiduelles de la chitine [6].

L'une des difficultés associées à la préparation d'une chitine pure et qui maintient la structure macromoléculaire proche de la forme native est de minimiser la désacétylation partielle des chaînes et la dégradation provoquée par la déprotéinisation et les étapes d'hydrolyse acide pendant le processus d'extraction à partir de la matière première.

Pour résoudre ce problème, des analyses de microscopie électronique à balayage (MEB) ont été effectuées afin d'étudier la microstructure des différentes parties du corps du champignon *A. bisporus*. Les résultats de ces analyses (présentés dans la Figure III.2), montrent que les trois parties du corps présentaient une structure poreuse résultant de l'étape de lyophilisation. Cette structure est à priori favorable pour la pénétration des réactifs lors de la déprotéinisation et le traitement acide.

Ainsi, la diffusion du réactif alcalin à l'intérieur de la structure devrait favoriser un processus efficace de déprotéinisation [7]. Cela nous a guidé à modifier les protocoles signalés précédemment et à proposer des conditions d'extraction plus douces afin de minimiser la dégradation de la chitine [6, 8].

En plus de la porosité, on peut conclure à partir de ces images que les trois parties du corps de l'*A. bisporus* ont des microstructures différentes. Les chapeaux et les pieds lyophilisés étaient structurés avec des macros-pores interconnectés à la suite de la formation de cristaux de glace, ce qui a montré qu'une teneur élevée en eau entraînait une structure de réseau poreuse après la lyophilisation (Figures III.2.a et III.2.b). Cependant, les lamelles présentaient une microstructure différente avec des granules de gamme micronique, à savoir des spores qui ont une surface lisse, fixées sur une membrane poreuse.

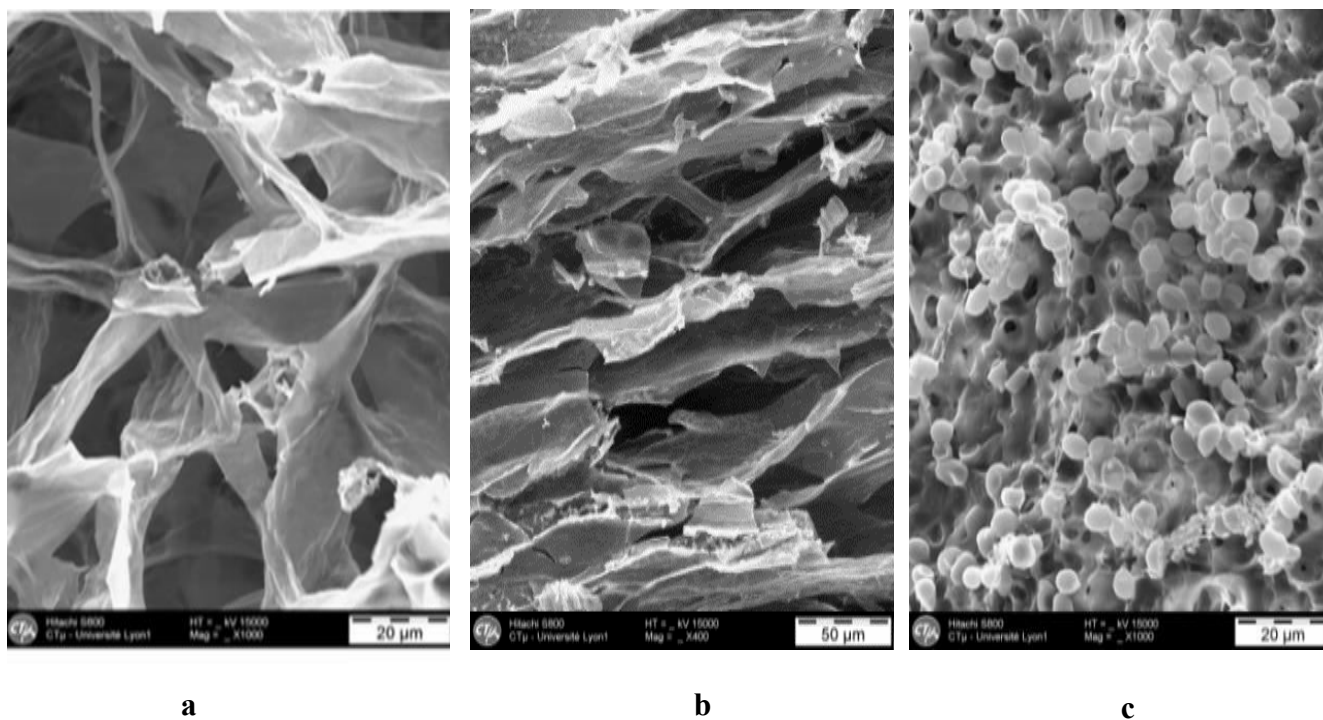


Figure III.2 : Images (MEB) des microstructures : (a) chapeau, (b) pied et (c) lamelle d'*A. bisporus* après lyophilisation.

III.3. Rendements massiques de la chitine dans les trois parties de l'*A. bisporus*

La teneur en chitine des trois parties du champignon (rendement massique en poids sec) a été déterminée à partir des différences de poids des matières premières et de la chitine obtenue après les traitements acide et alcalin. [9]. Pour chaque partie du champignon les expériences ont été répétées trois fois. Les résultats sont donnés dans le tableau III.2.

La plus forte teneur en chitine a été observée pour le pied 7,4%, tandis que la plus faible teneur en chitine a été enregistrée pour la lamelle 5,8%. Pour le chapeau la teneur en chitine était de 6,4%.

Les résultats pour le pied et chapeau sont très similaires à ceux rapportés par Vetter (7,2% et 6,6% respectivement) [10]. A noter que cet auteur n'a pas fait l'extraction de la chitine et du chitosane, mais il a plutôt déterminé, indirectement, le pourcentage de la chitine dans le pied et chapeau de l'*A. bisporus* en faisant une hydrolyse acide de la matière première ensuite une détermination du taux de glucosamine.

Pour la lamelle, aucune étude précédente n'a été faite sur cette partie du corps du champignon. Donc, par cette donnée supplémentaire, on considère ainsi qu'on a contribué à la connaissance de la distribution de la chitine dans les différentes parties de ce champignon.

Ces résultats sont aussi proches de ceux de F. Di Mario qui a isolé la chitine du mycélium d'*A.bisporus* (la partie végétative du champignon) et a trouvé une teneur de 8,5% [11]. Néanmoins, l'auteur n'a pas justifié la pureté de cette chitine par des méthodes analytiques convenables.

Par contre, Tao Wu a déterminé le rendement en chitine dans le pied d'*A. bisporus* d'une valeur de 12,44% (rendement déterminé en glucosamine après dépolymérisation et désacétylation) [6]. Cependant, cette valeur est donnée juste à titre indicatif car elle ne peut en aucun cas être comparée à celle de nos résultats pour les raisons suivantes :

Premièrement, les pieds utilisés ont été stockés dans des conditions différentes pendant 5 à 15 jours à 4 et 25 ° C et il est connu que la teneur en chitine des parois cellulaires d'*A. bisporus* augmente lors du stockage après récolte du matériau frais à température ambiante [12].

Deuxièmement, les conditions d'extraction ne sont pas les mêmes dans les deux protocoles. Il a été trouvé que la teneur en chitine varie avec le changement de la méthode d'extraction [13].

Troisièmement, l'auteur n'a utilisé aucune méthode analytique fiable pour montrer la pureté de la chitine extraite [14].

La teneur en chitine dans le pied du champignon *A.bisporus* se compare avantageusement à celle des micro-crustacés et de certains insectes. Par exemple 3% -7% chez la « daphnia magna » (espèce de micro-crustacés vivant dans les lagunes d'eaux aérées) [15], 5,3% chez les sauterelles [16], 5% pour les coléoptères [9], 6,5% pour certains invertébrés aquatiques [17].

Elle est cependant moins élevée que celle extraite des crustacés commerciaux (crabe: 13% -26%, crevette: 14% -42%) [18]. Cette différence peut être expliquée par le fait que la teneur en chitine est spécifique aux espèces, à l'âge et aux conditions environnementales où l'organisme vit [6].

La chitine extraite des crustacés, malgré sa teneur élevée, présente plusieurs inconvénients à savoir : Elle n'est pas abondante (limitée géographiquement et soumise à un approvisionnement saisonnier) [19], coûteuse et polluante pour l'environnement (l'étape de déminéralisation lors de l'extraction industrielle, consomme beaucoup d'acide chlorhydrique concentré) [20]. Ses propriétés physicochimiques sont hétérogènes et inconsistantes [21] et enfin, elle est généralement contaminée par des protéines résiduelles ce qui limite son utilisation surtout dans le domaine médical [22].

Par contre, la chitine extraite du champignon *A. bisporus* (en tant que source non animale) pourrait être intéressante pour l'élaboration de biomatériaux exempts de dérivés animaux. Selon la littérature, la chitine et le chitosane produits à partir d'une source fongique présentent plusieurs avantages.

Tout d'abord, il a été démontré que la chitine et le chitosane fongique sont dépourvus de tropomyosine, de chaîne légère de myosine et d'arginine kinase, qui sont présents dans les cuticules de crustacés et qui peuvent provoquer des réactions allergiques [22]. En outre, comme les champignons présentent de faibles taux de minéraux, le processus d'extraction de la chitine nécessite des conditions plus douces par rapport aux sources actuelles de crabes et de crevettes. En conséquence, les coûts d'extraction peuvent être réduits et la dégradation de la structure chimique de la chitine native peut être limitée [23]. En plus, l'utilisation de champignons pourrait permettre la production de chitine et de chitosane avec un meilleur contrôle des propriétés physico-chimiques par rapport à la chitine et au chitosane des crustacés dont les propriétés physico-chimiques varient selon les espèces de crustacés et la

période de récolte [6]. Enfin, le champignon *A. bisporus* est abondant, facile à cultiver et à cycle de croissance rapide.

D'après ces résultats d'extraction de la chitine à partir des différentes parties du champignon *A. bisporus*, on peut considérer le pied comme une source alternative pour la production de la chitine.

Table III.2 : Paramètres caractéristiques de la chitine finale extraite des trois parties d'*A. bisporus*.

Partie de l' <i>A. bisporus</i>	Rendement Massique (%)	Taux d'humidité (%)	Taux de Cendres (%)	DA (%) par IR
Pied	7.4 ± 1.2	7.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1	69.8
Chapeau	6.4 ± 1.4	7.7 ± 0.5	0.7 ± 0.3	66.8
Lamelle	5.9 ± 1.2	7.0 ± 0.4	3.4 ± 0.7	63.4

III.4. Taux de cendre

Le taux de cendre est un paramètre important qui influe sur la qualité de la chitine extraite. En effet, si on veut produire du chitosane à partir d'une chitine qui contient un taux élevé de cendre, la solubilité du chitosane sera affectée par la présence de cendres résiduelles, ce qui contribuera à réduire sa viscosité.

D'après la littérature, une chitine de bonne qualité devrait contenir moins de 1% de taux de cendres [24].

La chitine extraite du pied a un taux de cendre très faible 0.3 %, alors que la lamelle a un taux élevé 3.4%. Le chapeau a produit une chitine qui contient un taux de cendre de 0.7%. En comparant ces résultats avec ceux des études précédentes, il ressort que le taux de

endre de la chitine extraite du pied est bien élevé ! que celui des abeilles (9,2%), des crevettes (9,0%), des coléoptères (2,0%) et des criquets (1,6%) [9].

III.5. Taux d'humidité

Le taux d'humidité est un paramètre très critique dans la minimisation des défauts de poudres pharmaceutiques survenant pendant la compression, la consolidation et produit des changements dans les propriétés d'écoulement, en particulier après le stockage [25].

Il a été rapporté que la teneur en humidité d'une chitine commerciale varie de 7 à 11% [26]. Le tableau III.2 montre que le taux d'humidité de la chitine extraite des trois parties du champignon est pratiquement le même et il est plus élevé que celui de certaines chitines commerciales.

III.6. L'efficacité de la déprotéinisation

L'étape de déprotéinisation est une phase critique dans un protocole d'extraction. Cela est dû à la difficulté de rupture des liaisons chimiques entre la chitine et les protéines. Ceci est effectué de manière générale, en utilisant des produits chimiques qui dépolymérisent également le biopolymère. L'élimination complète des protéines est particulièrement importante pour les applications biomédicales, car certaines protéines résiduelles peuvent provoquer des réactions allergiques [27].

L'absence de protéines dans la chitine extraite des trois parties du champignon est prouvée par les analyses (FTIR, RMN ¹³ C) présentées dans le chapitre IV. Cela prouve que les conditions choisies dans l'étape de déprotéinisation étaient satisfaisantes.

III.7. Rendements massiques du chitosane dans les trois parties de l'*A. bisporus*

Le chitosane est habituellement séparé de la chitine par un traitement acide. Nous avons essayé d'isoler le chitosane par précipitation du surnageant après addition d'une solution concentrée d'hydroxyde d'ammonium [6].

L'extraction acide du chitosan à partir des trois parties du corps d'*A. bisporus* a produit une quantité très négligeable de chitosane (<1% de matière sèche). Ces résultats sont compatibles avec les travaux antérieurs rapportés par Mol et Wessels [28] qui ont constaté que la matière chitineuse dans la paroi cellulaire d'*A. bisporus* (phylum Basidiomycota) est sous forme de chitine, contrairement à *Micor. rouxii*, c'est-à-dire le phylum Zygomycota où il est présent en tant que chitosane. Aussi, Wu et al. n'ont pas trouvé de chitosane dans le pied d'*A. bisporus* [6].

D'autre part, selon F. Di Mario, seul un faible taux de chitosane (environ $1 \pm 0,12\%$ de poids sec) est présent dans le mycélium d'*A. bisporus* [11].

Conclusion

Un protocole d'extraction douce a été proposé pour l'obtention de biopolymères « Chitine et Chitosane » à partir des trois parties du champignon *A. Bisporus* à savoir : chapeau, pied, et lamelle après leur lyophilisation. Les analyses par MEB, nous ont guidé dans l'amélioration des étapes de ce protocole pour avoir un bon rapport pureté /qualité des produits, en vue de leur utilisation dans le domaine médical.

L'étape de lyophilisation était complète, pour preuve le taux de la matière sèche qui n'a pas dépassé 10 % prévu pour les champignons.

L'absence de protéines dans la chitine extraite des trois parties du champignon prouvent que les conditions choisies dans l'étape de déprotéinisation étaient satisfaisantes.

Les résultats de l'extraction montrent que le pied du champignon recèle la teneur la plus élevée de chitine (7,4%) avec un taux d'humidité acceptable ainsi qu'un taux de cendre très faible par rapport à la chitine commerciale.

La teneur en chitine dans le pied du champignon *A.bisporus* est meilleure à celle des micro-crustacés et de certains insectes. Elle est cependant moins élevée que celle extraite des crustacés commerciaux. Cet inconvénient, peut être compensé par le fait que le champignon *A. bisporus* est abondant, facile à cultiver et à cycle de croissance rapide.

Par conséquent, le pied du champignon *A. bisporus* sera considéré comme source alternative pour la production de ce biopolymère par rapport à la chitine commerciale extraite des crustacés.

Pour le chitosane, la teneur s'est avérée négligeable dans les trois parties du champignon. Donc, on pourra envisager comme perspectives la production de ce biopolymère par désacétylation de la chitine obtenue.

Références bibliographiques

- [1] Morais, M. H., et al. "Note. Production of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) on lignocellulosic residues/Nota. Cultivo del hongo shiitake (*Lentinus edodes*) en residuos lignocelulósicos." *Food Science and Technology International* 6.2 (2000): 123-128.
- [2] Nakagawa, Y.S., et al. "A small lytic polysaccharide monooxygenase from *Streptomyces griseus* targeting α -and β -chitin." *The FEBS journal* 282.6 (2015): 1065-1079.
- [3] Hamodrakas, Stavros J., Judith H. Willis, and Vassiliki A. Iconomidou. "A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins." *Insect biochemistry and molecular biology* 32.11 (2002): 1577-1583.
- [4] Kaya, Murat, et al. "Differentiations of chitin content and surface morphologies of chitins extracted from male and female grasshopper species." *PloS one* 10.1 (2015): e0115531.

- [5] Blackwell, J., and M. A. Weih. "Structure of chitin-protein complexes: ovipositor of the ichneumon fly *Megarhyssa*." *Journal of molecular biology* 137.1 (1980): 49-60.
- [6] Wu, T., et al. "Chitin and chitosan value-added products from mushroom waste." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52.26 (2004): 7905-7910.
- [7] Cárdenas, G., et al. "Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ¹³C cross polarization/mass angle spinning NMR." *Journal of Applied Polymer Science* 93.4 (2004): 1876-1885.
- [8] Synowiecki, J., and Al-Khateeb, N. A. A. Q. "Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan." *Food Chemistry* 60.4 (1997): 605-610.
- [9] Marei, N.H., et al. "Isolation and characterization of chitosan from different local insects in Egypt." *International journal of biological macromolecules* 82 (2016): 871-877.
- [10] Vetter, J. "Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*." *Food Chemistry* 102.1 (2007): 6-9.
- [11] Di Mario, F., et al. "Chitin and chitosan from Basidiomycetes." *International Journal of Biological Macromolecules* 43.1 (2008): 8-12.
- [12] Hammond, J.W. "Changes in composition of harvested mushrooms (*Agaricus bisporus*)." *Phytochemistry* 18.3 (1979): 415-418.
- [13] Ibitoye, E. B., et al. "Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan isolated from house cricket." *Biomedical Materials* 13.2 (2018): 025009.
- [14] Kaya, M., et al. "Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee." *Carbohydrate polymers* 132 (2015): 9-16.
- [15] Cauchie, H. M., et al. "*Daphnia magna* Straus living in an aerated sewage lagoon as a source of chitin: ecological aspects." *Belgian Journal of Zoology (Belgium)* (1995).
- [16] Kaya, Murat, et al. "Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species." *International journal of biological macromolecules* 72 (2015): 797-805.

- [17] Kaya, Murat, et al. "Extraction and characterization of α -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates." *Food biophysics* 9.2 (2014): 145-157.
- [18] Synowiecki, J, and Al-Khateeb, N. A. "Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives." (2003): 145-171.
- [19] Ospina, Sandra, et al. "Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture." *BioMed Research International* 2014 (2014):169071-169078.
- [20] Teng, Wee L., et al. "Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi." *Carbohydrate research* 332.3 (2001): 305-316.
- [21] Kleekayai, T., and Suntornsuk, W. "Production and characterization of chitosan obtained from *Rhizopus oryzae* grown on potato chip processing waste." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27.5 (2011): 1145-1154.
- [22] Muñoz, Gustavo, et al. "Extraction of chitosane from *Aspergillus Niger* mycelium and synthesis of hydrogels for controlled release of betahistine." *Reactive and Functional Polymers* 91 (2015): 1-10.
- [23] Nadarajah, Kader, et al. "Production of chitosane by fungi." *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4.3 (2001): 263-265.
- [24] Nessa, F., et al. "A process for the preparation of chitin and chitosan from prawn shell waste." *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* 45.4 (2010): 323-330.
- [25] Nokhodchi, A. L. I., et al. "The effect of moisture on the heckel and energy analysis of hydroxypropylmethylcellulose 2208 (HPMC K4M)." *Journal of pharmacy and pharmacology* 48.11 (1996): 1122-1127.
- [26] Fini, Adamo, and Isabella Orienti. "The role of chitosan in drug delivery." *American Journal of Drug Delivery* 1.1 (2003): 43-59.

[27] Younes, Islem, and Marguerite Rinaudo. "Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications." *Marine drugs* 13.3 (2015): 1133-1174.

[28] Mol, P. C., and Wessels, J. G. H. "Differences in wall structure between substrate hyphae and hyphae of fruit-body stipes in *Agaricus bisporus*." *Mycological Research* 94.4 (1990): 472-479.

Chapitre IV

CARACTERISATION

Introduction

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats de la caractérisation de la chitine extraite à partir des trois parties des champignons. Ensuite, une attention particulière sera accordée à la chitine obtenue à partir du pied du champignon car elle est considérée comme source alternative.

IV. Caractérisation de la chitine extraite des trois parties d'*A. bisporus*

IV.1. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier – FTIR

Les spectres infrarouge de la chitine extraite à partir du pied de l'*A. bisporus* (Figure IV.1a), du lamelle (figure IV.1b) et du chapeau (Figure IV.1c) sont similaires au spectre de l'alpha-chitine commerciale (figure IV.1d) et au spectre de l'alpha-chitine rapporté dans la littérature [1,2]. Les chitines α et β peuvent être distinguées par spectroscopie FTIR par les modes de vibration de l'amide I dans la région spectrale 1660-1620 cm^{-1} . Dans l' α -chitine, deux absorptions sont observées à environ 1660 et 1627 cm^{-1} et dans la β -chitine, une seule bande est présente à 1656 cm^{-1} [1].

Ainsi, les deux pics vers 1652 et 1622 cm^{-1} observés dans le spectre FT-IR (Figure IV.1a ,b, c, flèches) prouvent que la chitine extraite du pied, du lamelle et du chapeau est de type alpha-chitine [2].

L'absence des pics d'absorption à 1540 cm^{-1} et à 1700-1740 cm^{-1} attribués aux protéines, confirme que la chitine extraite des trois parties de l' *A. bisporus* est exempte de protéines et, par voie de conséquence, l'étape de déprotéinisation choisie était suffisante [3, 4]. Les principales bandes d'absorptions observées par la spectroscopie FTIR et qui ont été attribuées selon la littérature sont détaillées dans le tableau IV.1 [1, 2, 5].

Le DA (degré de N-acétylation) de la chitine à partir des trois parties du corps est donné dans le tableau III.2. Il a été calculé à partir de l'équation (IV.1) selon la méthode de Baxter et al. [6].

$$DA = \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \quad (\text{IV.1})$$

où A_{1655} et A_{3450} sont l'absorbance à 1655 et 3450 cm^{-1} des groupes amide I et hydroxyle respectivement.

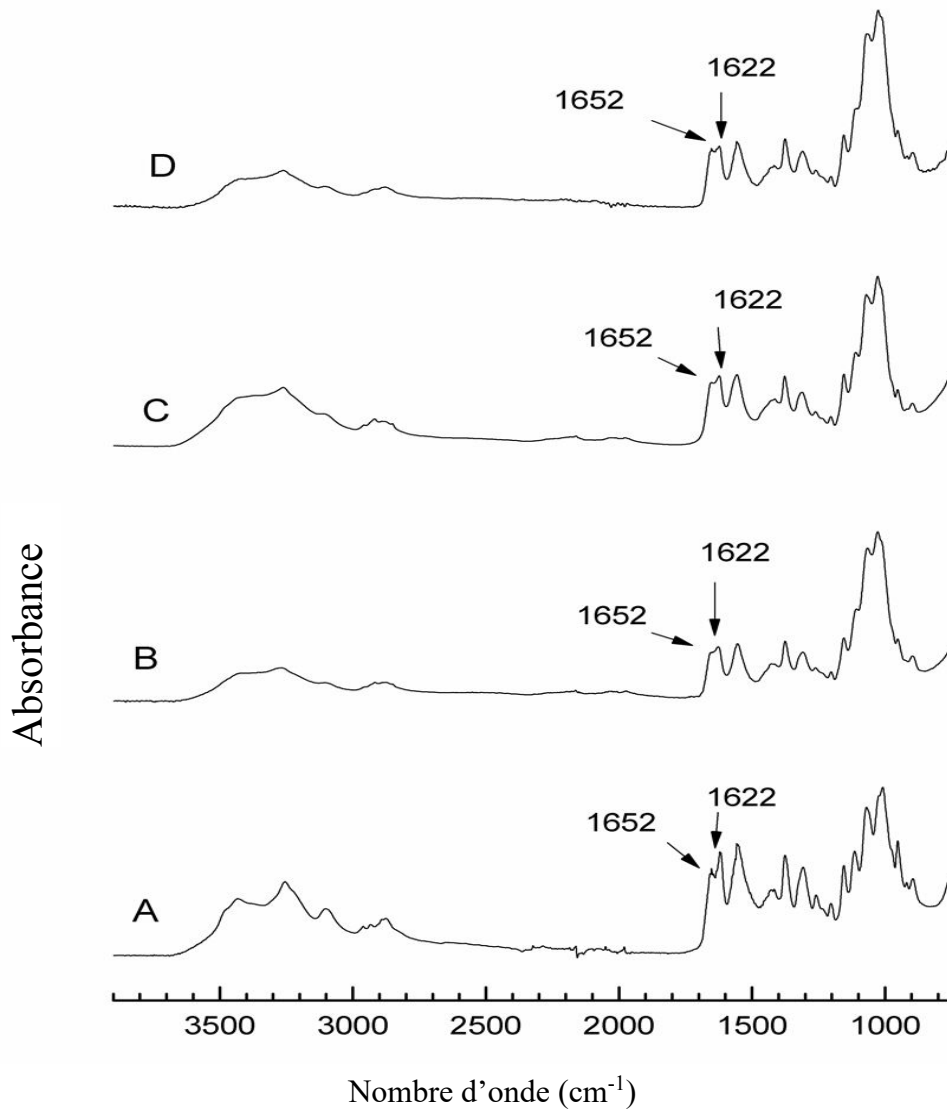


Figure IV.1: Spectres FTIR de (A) la chitine extraite du pied d'*A. bisporus*, (B) la chitine extraite du lamelle d' *A. bisporus*, (C) la chitine extraite du chapeau d' *A. bisporus* et (D). l'alpha chitine commerciale (DA = 87,4%).

Tableau IV.1 : Bandes d'absorption FTIR de la chitine extraite et de la chitine standard.

N°	Type de vibration	Absorption alpha Chitine standard (cm ⁻¹)	Absorption <i>Chitine du Pied d'A.bisporus</i> (cm ⁻¹)	Absorption <i>Chitine du Lamelle d'A.bisporus</i> (cm ⁻¹)	Absorption <i>Chitine du Chapeau d'A.bisporus</i> (cm ⁻¹)
01	al. OH	3428	3427	3426	3425
02	al.a.sym NH	3254	3267	3266	3267
03	al.sym NH	3100	3104	3107	3103
04	al.sym CH ₃	2960	2950	2952	2951
05	al.sym CH ₂	2932	2914	2917	2917
06	Al. CH ₃	2876	2876	2874	2878
07	bande Amide I	1652	1655	1655	1655
08		1622	1625	1626	1626
09	bande Amide II	1556	1555	1553	1554
10	déf.CH ₂	1428	1427	1426	1427
11	bande Amide III	1376	1375	1375	1375
12	déf. CH et déf.sym CH ₃	1308	1309	1308	1309
13	déf. NH	1260	1261	1261	1261
14	déf. OH et al.sym C-O	1207	1203	1203	1203
15	al.C-O	1156	1156	1154	1154
16	al.a.sym C-O-C du cycle	1114	1109	1108	1107
17	al.CO	1069	1066	1066	1066
18	CO stretching	1008	1026	1026	1026
19	CH ₃	952	952	952	952
20	Vibration du cycle	895	895	896	897

IV.2. Caractérisation approfondie de la chitine extraite du pied de l'*A. bisporus*

Les résultats de l'extraction (chapitre III) ont montré que le pourcentage de chitine le plus élevé se trouve dans le pied du champignon *A. bisporus*. Par conséquent cette partie du champignon sera considérée comme source alternative de chitine.

Pour cette raison nous avons approfondi nos analyses uniquement sur la chitine extraite du pied, dans l'objectif de sa valorisation dans le domaine médical qui exige une grande pureté de ce produit, surtout l'absence des protéines. Dans ce qui suit, cette chitine va être caractérisée par les techniques d'analyses suivantes : La diffraction des rayons X, la thermogravimétrie et la spectroscopie de la RMN ¹³ C à l'état solide.

IV.2.1. Analyse de diffraction des rayons X

Le diagramme de diffraction des rayons X de la chitine extraite à partir du pied d'*A. bisporus* (Figure IV.2b) montre huit pics de diffraction à 2θ : $9,1^\circ$, $12,7^\circ$, $19,3^\circ$, $20,7^\circ$, $23,2^\circ$, $26,3^\circ$, 32° et 39° correspondant aux plans (020), (101), (110), (120), (101), (130), (013) et (210), respectivement. L'alpha chitine commerciale présente sur son diagramme (Figure IV.2 a), les mêmes pics de diffraction, tous représentatifs de l'alpha chitine [2, 7, 8, 9,10].

Donc, d'après les deux diagrammes, on peut conclure clairement que notre chitine est de la forme alpha. Ceci, confirme bien les résultats déjà obtenus par l'analyse infrarouge.

Ainsi, les différences structurelles entre la chitine commerciale et celle extraite du pied d'*A. bisporus* reposent principalement sur leurs rapports de cristallinité. En effet, les indices de cristallinité (I_{Cr}) de l'alpha chitine commerciale et de la chitine extraite du pied d'*A. bisporus* ont été évalués respectivement à 88,1% et 63,2% selon l'équation (IV.2) [10]:

$$I_{Cr} = \left[\frac{(I_{110} - I_{am})}{I_{110}} \right] \times 100 \quad (IV.2)$$

Avec :

- I_{110} est l'intensité maximale à $2\theta \cong 20^\circ$ correspondant au plan (110).
- I_{am} est l'intensité de la diffraction amorphe à $2\theta \cong 16^\circ$.

Ce résultat est cohérent avec la valeur du DA de la chitine du pied d'*A. bisporus*, soit plus faible (DA = 69,85%) que l'alpha chitine commerciale (DA = 87%). Il est connu que la cristallinité de la chitine diminue avec la diminution de DA [10].

Dans cette étude, la valeur I_{Cr} de la chitine du pied d'*A. bisporus* était proche de celle des chitines fongiques rapportées dans la littérature ($I_{Cr} = 58,5\%$) [11]. De plus, en utilisant la formule de Sherrer (3), la taille apparente L_{hkl} des cristallites dans la direction perpendiculaire au plan du réseau lié au pic cristallin (020) était calculée de $L_{hkl} = 5,9 \text{ \AA}$, selon l'équation (IV.3) [9].

$$L_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cdot \cos(\theta)} \quad (\text{IV.3})$$

où

$K=0.9$

β : est la largeur à mi-hauteur du pic lié au plan (hkl).

θ : est l'angle du pic de diffraction .

λ : est la longueur d'onde incidente.

La présence du glucane n'est pas observée, car il n'y a pas de pic à $2\theta = 6^\circ$, ce qui est généralement décrit dans les glucanes purs solides [12].

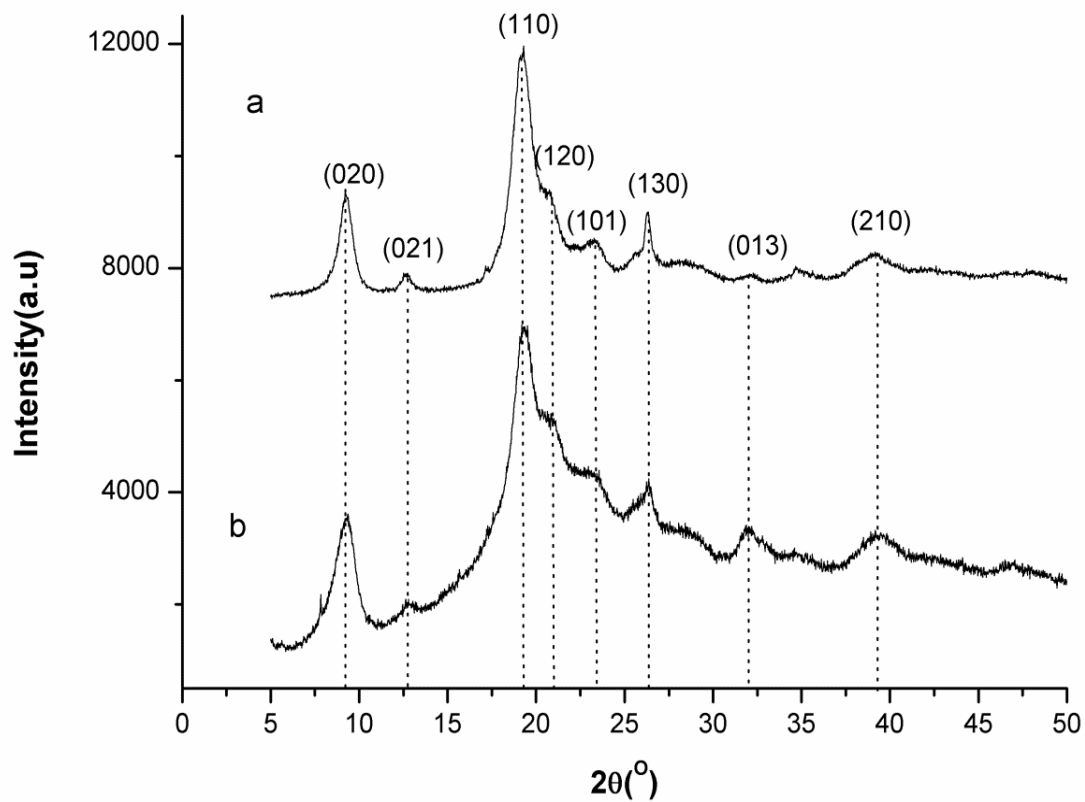


Figure IV.2 : Diffractogrammes de rayons X de : (a) alpha chitine commerciale et (b) chitine extraite du pied d'*A. bisporus*.

IV.2.2. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les analyses thermogravimétriques de la chitine extraite à partir du pied d'*A. bisporus* et de l'alpha chitine commerciale sont données dans la figure IV.3. Les deux thermogrammes sont assez similaires et présentent trois étapes de décomposition qui ont été décrites dans des études antérieures [13]. Tout d'abord, dans l'intervalle entre 30 ° C et 100 ° C, une perte de poids de 7,75% et de 4,75% pour la chitine extraite à partir du pied d'*A. bisporus* et l'alpha chitine commerciale respectivement, est attribuée à l'évaporation de l'eau. La deuxième perte de poids observée entre 200 ° C et 400 ° C (respectivement 63,37% et 65,87% pour la chitine isolée du pied et commerciale) pourrait être attribuée à la dégradation des chaînes de chitine comme l'ont rapporté Paulino et al [14]. La troisième étape se situant entre 400° et 600 ° C (avec une perte de poids de 25,6% et 28,7%) est attribuée à la dégradation thermique du cycle pyranose et à la décomposition du carbone résiduel.

Une étude précédente sur l'extraction de la chitine à partir du champignon « *Ganoderma lucidum* » a également révélé des pertes de poids en trois étapes, ce qui est cohérent avec les résultats de notre travail [15].

En exploitant la courbe de la dérivée de la perte de masse (figure IV.4), on a constaté que le maximum du pic pour la chitine extraite à partir du pied d'*A. bisporus* a été observé à 309 ° C alors que celui de l'alpha chitine commerciale extraite de crevette est rapporté par la littérature vers 335 °C.

Ces résultats indiquent que la chitine du pied d'*A. bisporus* présentait une stabilité thermique plus faible que celle de l'alpha-chitine commerciale provenant des crevettes.

Ceci est dû à la différence de leur degré d'acétylation DA (69,85% et 87%, respectivement), l'indice de cristallinité I_{Cr} (63,21% et 88,10%, respectivement) et peut-être la taille des grains et la porosité. Il a été signalé que la stabilité thermique et la cristallinité diminuent avec la diminution de DA [10]. Il semble qu'une plus faible

stabilité thermique soit une caractéristique spécifique de la chitine extraite des champignons. En effet, des résultats similaires ont été obtenus par Yen et Mau, qui ont utilisé l'analyse DSC et ont observé que la dégradation de la chitine extraite du pied du champignon Shiitake « *Lentinula edodes* » s'est produite approximativement à 248 ° C [16]. En outre, l'alpha chitine obtenue à partir du champignon « *Ganoderma lucidum* » a une stabilité thermique plus faible, car son pic de dégradation a été observé à 313 ° C [15].

Lors de la comparaison de la teneur en cendres de la chitine extraite des trois parties d'*A. bisporus* (tableau III.2), on a constaté que la chitine du pied contient le plus faible taux de cendres (0,32%) alors que la chitine extraite du lamelle avait une teneur plus élevée (3,34%), ce qui signifie que cette dernière contient plus de minéraux.

Ce résultat est en accord avec ce qui a été rapporté par N. Chernov, qui a constaté que les différentes parties morphologiques de l'*A. bisporus* diffèrent dans leur composition chimique, y compris la partie minérale [17].

Les courbes dérivées des thermogrammes (DTG) sont indiquées pour le pied lyophilisé (Figure IV. 4 c), le résidu insoluble alcalin (RIA) du pied (après déprotéinisation) (Figure IV. 4 b) et la chitine du pied d'*A. bisporus* (produit final après lavage et lyophilisation) (Figure IV. 4 a). Les deux pics apparaissant à 180 ° C et 249 ° C (flèches, Figure IV. 4 c) correspondent à la dégradation des protéines, des lipides et des pigments dans la matière première séchée [7]. De tels pics de dégradation sont absents à la fois dans la courbe (DTG) du résidu insoluble alcalin (RIA) et dans la chitine du pied d'*A. bisporus*.

De tels résultats ATG sont à nouveau révélateurs d'une étape de déprotéinisation efficace. L'ATG nous a permis également de déterminer la teneur en cendres qui était de 5,1% dans la matière première est devenue 0,32% dans la chitine finale, c'est-à-dire que l'étape d'hydrolyse acide a fortement diminué la teneur en minéraux.

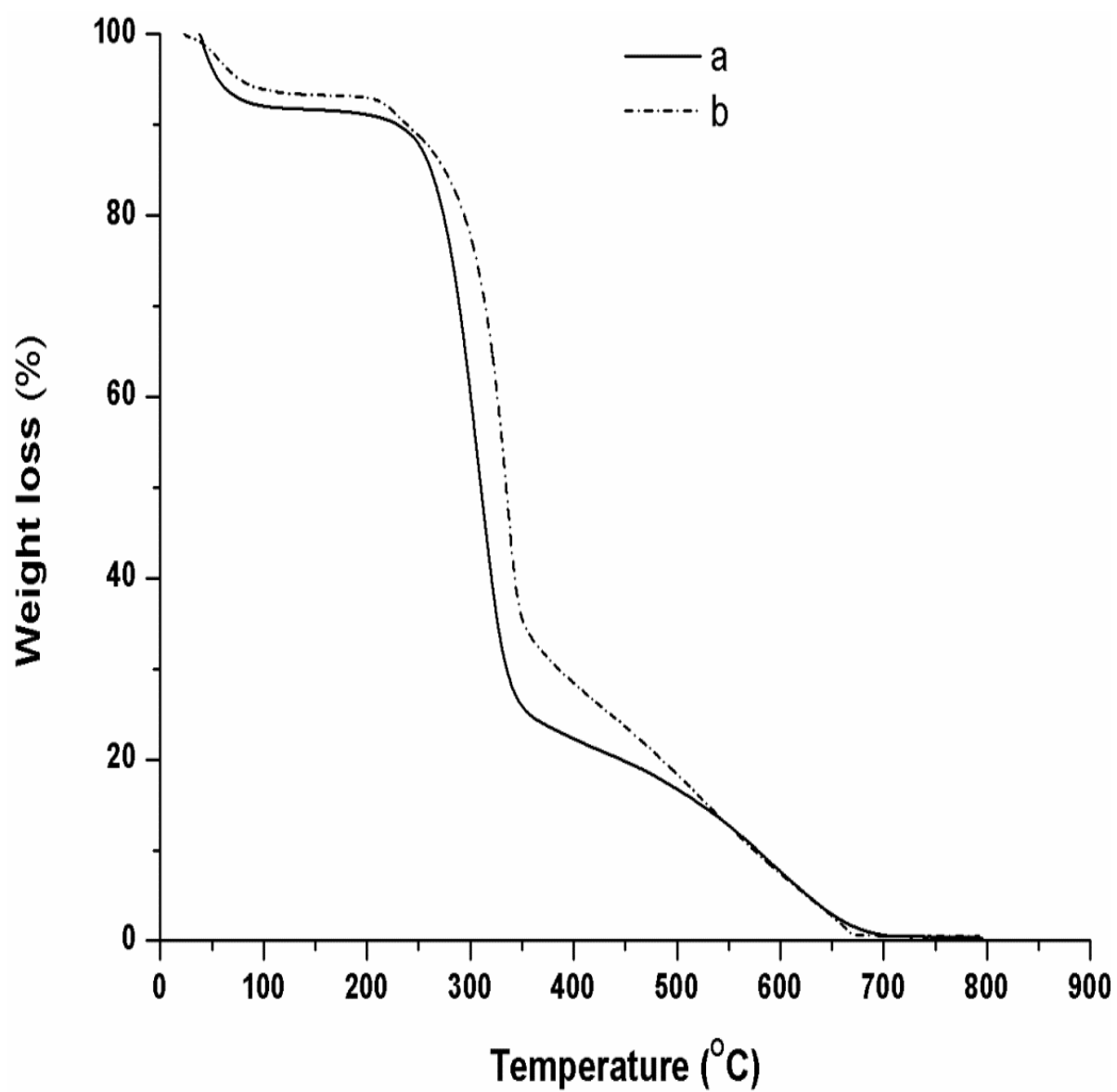


Figure IV. 3: Thermogrammes ATG de : (a) chitine extraite du pied d'*A. bisporus* et (b) alpha chitine commerciale.

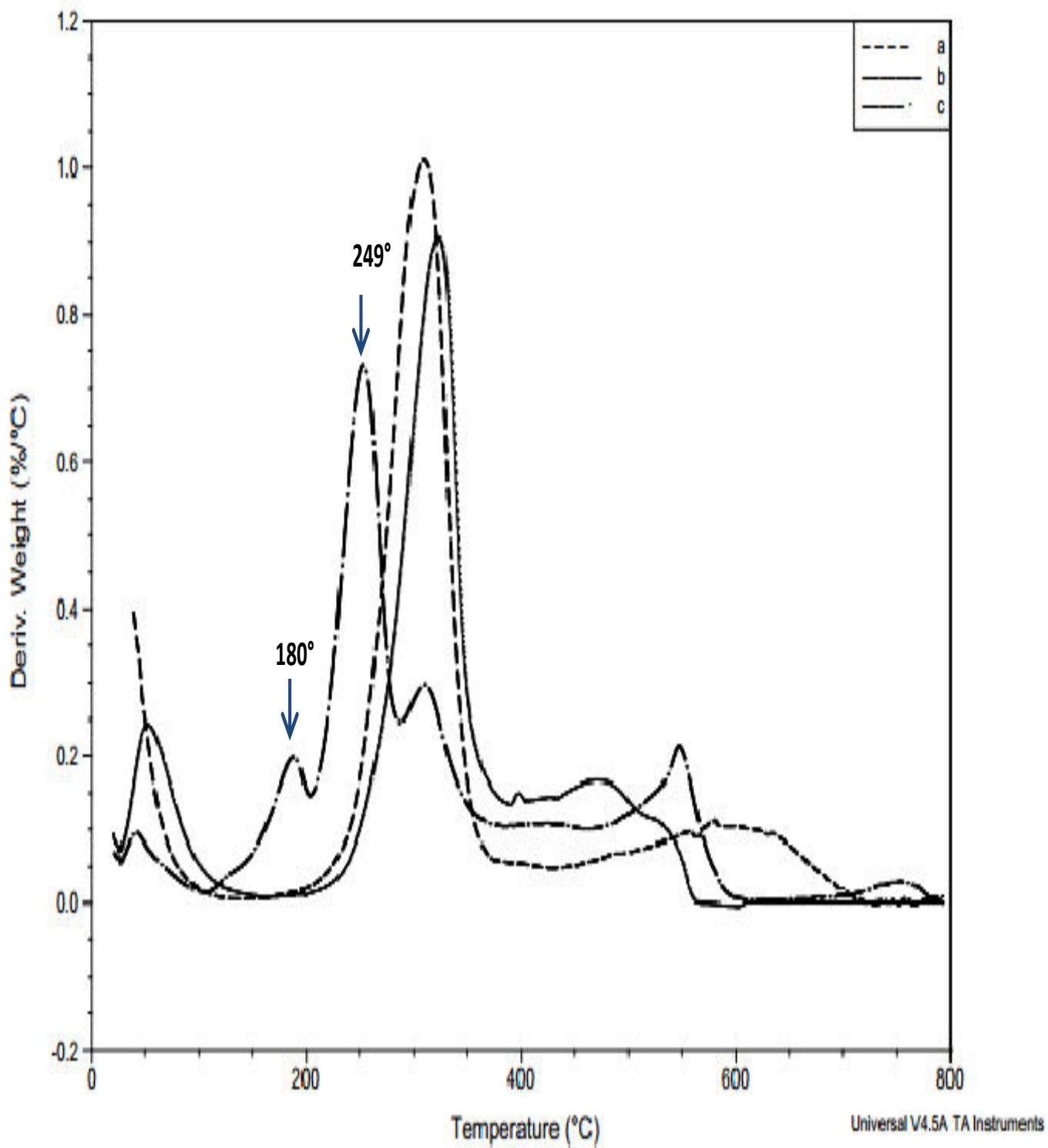


Figure IV.4 : Courbes (DTG) de: a) chitine finale extraite du pied d'*A. bisporus*; (b) résidu alcalin insoluble après la déprotéinisation (c) pied brut lyophilisé.

IV.2.3 Analyse par spectroscopie RMN ¹³C /CP- MAS

Selon la littérature on peut distinguer par RMN ¹³C entre l' α et la β -chitine. la différence réside dans le déplacement chimique du C-5 et C-3 dans la D-glucosamine, se présentant sous la forme de deux pics à 75,2 ppm et 73,1 ppm, respectivement pour l' α -chitine et apparaissant comme un seul pic à 73 ppm dans la β -chitine [1,3].

Le spectre RMN ¹³C/ CP- MAS de la chitine extraite du pied d' *A. bisporus* est donné dans la (figure IV. 5C), avec attribution des différents pics à leur carbone correspondant .Ce spectre montre des pics similaires à ceux de l'alpha-chitine commerciale (figure IV. 5B). Les signaux ont été attribués selon Majtan et al. et consistent en huit résonances du carbone des unités D-glucosamine et N-acétyle D-glucosamine [3].

Le groupe CH₃ de la partie acétyle a donné un signal à 22,4 ppm, tandis que son groupe carbonyle a produit un pic à 173,5 ppm. Les signaux pour C-5 (75,2 ppm) et C-3 (73,1 ppm) sont clairement séparés en deux, de la même manière que ceux de l' α -chitine signalée par d'autres auteurs [1,3]. Dans le spectre de la β -chitine commerciale (figure IV. 5A), un seul signal apparaît à 73 ppm et a été assigné à la fois au C-3 et C-5 comme indiqué dans l'étude précédente [1].

Encore une fois, cela suggère que la chitine extraite du pied d' *A. bisporus* est de la forme alpha chitine et confirme ainsi les résultats déjà obtenus par analyse infrarouge et diffraction des rayons x.

L'efficacité de notre protocole d'extraction est prouvé par RMN ¹³C dans la mesure où l'élimination des protéines était complète. Ceci est confirmé sur le spectre par l'absence des pics à 174, 146 et 117 ppm [14].

Le petit pic (*) est probablement dû à la présence d'impureté selon des études précédentes [3,1,14].

Enfin, Cette technique nous a permis de se prononcer sur l'absence du glucane dans la chitine extraite du pied du champignon. En effet, les deux pics caractéristiques du glucane correspondants au C-4 à 68,5 ppm et C-3 à 85,7 [12,18] n'apparaissent pas sur le spectre de la chitine extraite du pied de l'*A. bisporus*. Par conséquent, celle-ci est dépourvue de glucane.

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence du glucane dans notre chitine extraite du d'*A. bisporus* [17,19,20, 21].

Le glucane a été solubilisé par la solution d'hydroxyde de sodium et a été ainsi éliminé dans l'étape de la déprotéinisation, puisque celui-ci est connu être soluble dans les solutions alcalines [9]. Un tel résultat est en accord avec les travaux de Mendoza, Manzi et al, qui ont rapporté que l'*A. bisporus* (champignon entier) contient une quantité de glucane (1,4 mg/100g), tandis que *Pleurotus ostreatus* et *Boletus edulis* contiennent des quantités plus élevées [21, 20]. Selon d'autres auteurs, cette différence est associée au type de nutrition des champignons. Les espèces saprotrophiques (ex: *A. bisporus*) synthétisent plus de chitine et moins de glucane que celles du bois (comme *Pleurotus ostreatus*) qui synthétise plus de glucane et moins de chitine [17].

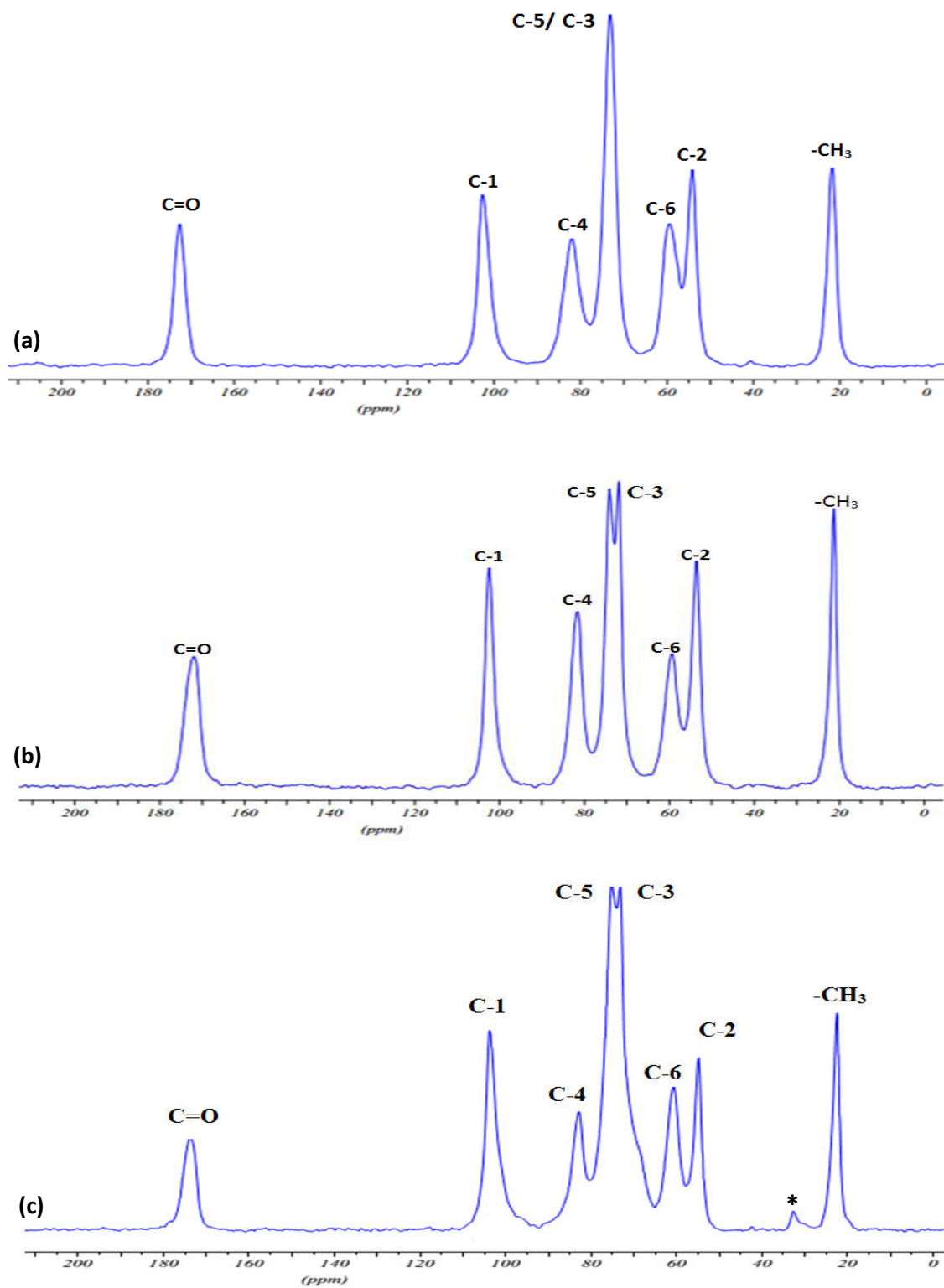


Figure IV.5 : Spectres RMN $^{13}\text{C}/\text{CP-MAS}$ de : (a) Béta –chitine commerciale, (b) Alpha-chitine commerciale and (c) chitine extraite du pied d' *A. bisporus* .

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré dans un premier temps que la chitine extraite des trois parties du champignon est une chitine de type alpha.

Ensuite nous avons caractérisé en détail la chitine extraite du pied en combinant plusieurs techniques à savoir : FTIR, DRX, ATG et RMN ¹³C.

Ces analyses approfondies nous en permis de confirmé que la chitine isolée du pied d'*A. Bisporus* est de la forme alpha –chitine et qu'elle présente des propriétés prometteuses à savoir : faible taux de cendres, élimination complète des protéines, absence de glucane, humidité inférieure à 10%, DA proche de 70%. De tels paramètres la prédestinent à être utilisée à des fins biomédicales.

En outre, la chitine avec sa faible cristallinité (I_{Cr}) de 63% est souhaitable dans les applications d'adsorption, en particulier en traitement des eaux pour l'élimination des métaux lourds.

Références bibliographiques

- [1] Cárdenas, G., et al. "Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ^{13}C cross polarization/mass angle spinning NMR." *Journal of Applied Polymer Science* 93.4 (2004): 1876-1885.
- [02] Kaya, M., et al. "Extraction and characterization of α -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates." *Food Biophysics* 9.2 (2014): 145-157.
- [03] Majtán, J., et al. "Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*)." *International Journal of Biological Macromolecules* 40.3 (2007): 237-241.
- [04] Chaussard, G., and Domard, A. "New aspects of the extraction of chitin from squid pens." *Biomacromolecules* 5.2 (2004): 559-564.
- [05] Kaya, M., et al. "Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*)." *Materials Science and Engineering: C* 45 (2014): 72-81.
- [06] Baxter, A., et al. "Improved method for ir determination of the degree of N-acetylation of chitosan." *International journal of biological macromolecules* 14.3 (1992): 166-169.
- [07] Abdel-Rahman, R.M., et al. "Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity." *International Journal of Biological Macromolecules* 80 (2015): 107-120.
- [08] Cortizo, M. S., Berghoff, C. F., and Alessandrini, J. L. "Characterization of chitin from *Illex argentinus* squid pen." *Carbohydrate polymers* 74.1 (2008): 10-15.
- [09] Al Sagheer, F. A., et al. "Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf." *Carbohydrate Polymers* 77.2 (2009): 410-419.
- [10] Sajomsang, W., and Gonil, P. "Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs." *Materials Science and Engineering: C* 30.3 (2010): 357-363.

- [11] Kaya, M., et al. "First chitin extraction from *Plumatella repens* (Bryozoa) with comparison to chitins of insect and fungal origin." *International journal of biological macromolecules* 79 (2015): 126-132.
- [12] Farinha, I., et al. "Chitin–glucan complex production by *Komagataella pastoris*: downstream optimization and product characterization." *Carbohydrate polymers* 130 (2015): 455-464.
- [13] Moussout, H., et al. "Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis." *Polymer Degradation and Stability* 130 (2016): 1-9.
- [14] Paulino, A.T., et al. "Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides." *Carbohydrate Polymers* 64.1 (2006): 98-103.
- [15] Ospina Álvarez, S. P., et al. "Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture." *BioMed research international* 2014 (2014): 169071-169078
- [16] Yen, M. T., and Mau, J. L.. "Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes." *LWT-Food Science and Technology* 40.3 (2007): 472-479.
- [17] CHERNO, N., OSOLINA, S., and NIKITINA, A. "Chemical composition of *Agaricus Bisporus* and *Pleurotus Ostreatus*." *Food and Environment Safety Journal* 12.4 (2016):291-299.
- [18] Roca, C., et al. "Production of yeast chitin–glucan complex from biodiesel industry byproduct." *Process biochemistry* 47.11 (2012): 1670-1675.
- [19] Kim, Y.T., et al. "Structural characterization of β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucans using NMR spectroscopy." *Carbohydrate research* 328.3 (2000): 331-341.

[20] Mendoza, C. G., Leal, J. A., and Novaes-Ledieu, M. "Studies of the spore walls of *Agaricus bisporus* and *Agaricus campestris*." *Canadian journal of microbiology* 25.1 (1979): 32-39.

[21] Manzi, P., Aguzzi, A., and Pizzoferrato, L. "Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy." *Food chemistry* 73.3 (2001): 321-325.

CONCLUSION GENERALE

Actuellement, la production de la chitine et du chitosane provient, principalement, des crevettes et des crabes qui sont donc des produits d'origine animale. Néanmoins, en raison notamment des inquiétudes sanitaires liées à l'encéphalite spongiforme bovine (maladie de la vache folle), certaines autorités de la Santé à travers le monde suggèrent, en effet, de ne pas utiliser des biomatériaux d'origine animale pour des applications médicales.

Donc une chitine obtenue à partir d'une source fongique bien caractérisée et produite selon un procédé standardisé pourrait être utilisée à ce propos.

Notre travail s'inscrit dans le contexte de cette problématique de recherche d'une nouvelle source de chitine alternative à celle des crustacés. Pour cela, le champignon *A. bisporus* a été choisi pour son abondance et son cycle de croissance rapide.

Un protocole d'extraction douce a été proposé pour l'obtention de biopolymères « Chitine et Chitosane » à partir des trois parties du champignon *A. Bisporus* à savoir : chapeau, pied, et lamelle après leur lyophilisation. Les analyses par MEB, nous ont guidé dans l'amélioration des étapes de ce protocole pour avoir un bon rapport pureté /qualité des produits, afin de leur utilisation dans le domaine médical.

Les résultats de l'extraction montrent que le pied du champignon recèle la teneur la plus élevée de chitine (7,4%) et , par conséquent, il sera considéré comme source alternative pour la production de ce biopolymère par rapport à la chitine commerciale extraite des crustacés. Pour le chitosane, la teneur s'est avérée négligeable dans les trois parties du champignon. Donc, on pourra envisager comme perspectives la production de ce biopolymère par désacétylation de la chitine obtenue.

Nous avons aussi caractérisé en détail la chitine extraite du pied en combinant plusieurs techniques à savoir : FTIR, DRX, ATG et RMN ¹³C .

Ces analyses approfondies nous en permis de connaitre que la chitine isolée du pied d'*A. Bisporus* est de la forme alpha –chitine et qu'elle présente des propriétés prometteuses à savoir : faible taux de cendres, élimination complète des protéines, absence de glucane, humidité inférieure à 10%, DA proche de 70%. De tels paramètres la prédestinent à être utilisée à des fins biomédicales.

En outre, la chitine avec sa cristallinité (ICr) de 63% est souhaitable dans les applications d'adsorption, en particulier en traitement des eaux pour l'élimination des métaux lourds.

Lorsque les technologies permettant d'obtenir une bonne qualité de chitine à partir du champignon *A. bisporus* entier seront développées, il faut veiller à éliminer les lamelles, car ce sont des parties morphologiques qui contiennent une plus grande quantité de minéraux.

Enfin, sachant que les déchets accumulés lors de la production de champignons consistent principalement en pieds d'*A. Bisporus*, cette partie du corps peut être valorisée comme source abondante et prometteuse de chitine et de chitosane.

ANNEXES

Glossaire

1. Antibactérien : prévenant ou combattant les bactéries, l'infection bactérienne.
2. Antifongique : qui détruit les champignons microscopiques (moisissures) ou empêche leur développement.
3. Antimicrobien : prévenant ou combattant l'infection microbienne (bactéries, champignons).
4. Autolyse naturelle : Activité des enzymes endogènes.
5. Biocompatible : compatible avec un organisme vivant.
6. Biodégradable : susceptible d'être décomposé par des organismes vivants.
7. Biomasse : matière organique pouvant devenir une source d'énergie.
8. Biopolymère : un terme couramment utilisé pour les polymères qui sont synthétisés par des organismes vivants.
9. Céphalopode : animal de la classe des mollusques.
10. Chitine : substance organique et l'un des principaux composants de l'exosquelette des insectes et autres arthropodes (crustacés, arachnides,...).
11. Degré de désacétylation (DDA) : rapport entre le nombre de motifs comportant un groupement acétyle sur le nombre de motifs dans la molécule.
12. Diététique : science de l'hygiène alimentaire ; ensemble des règles à suivre pour une alimentation équilibrée.
13. Exosquelette : squelette externe servant à protéger un animal. Beaucoup d'invertébrés comme les insectes, les crustacés ou les mollusques possèdent un exosquelette.
14. Glucosamine : glucide dont la structure est basée sur celle du glucose. C'est également un composant important de plusieurs polysaccharides, notamment la chitine, constituant majeur de la carapace des arthropodes.

15. Polysaccharides : polymères. Parmi les plus répandus du règne végétal, il y a la cellulose et l'amidon, tous deux polymères du glucose.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomacChitin from *Agaricus bisporus*: Extraction and characterizationAbdelghani Hassainia^a, Hamid Satha^a, Sami Boufi^{b,*}^a Laboratory of Silicates, Polymers and Nanocomposites, University of 8 Mai 1945, BP 401, 24000 Guelma, Algeria^b University of Sfax, Faculty of Science-LMSE, 3000 Sfax, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2017

Received in revised form

19 November 2017

Accepted 28 November 2017

Available online xxx

Keywords:

Chitin

Chitosan

A. bisporus

Extraction

Pileus

Stipes

Gills

ABSTRACT

Chitin was isolated from three main fruit body parts of the *Agaricus bisporus* mushroom, i.e. pileus, stipes and gills. Chitin was extracted by alkaline treatment of *A. bisporus* fruit body parts in 1 M NaOH at 80 °C for 2 h. The lyophilized fruit bodies were examined by SEM and exhibited a porous structure that is favorable to polysaccharide extraction. A mild extraction method was adopted to limit the degradation of chitin. The highest extraction yield of chitin was obtained for stipes (7.4% of dry weight). For pileus and gills, yields of chitin were 6.4% and 5.9%, respectively. Chitin extracted from stipes was characterized by thermal analysis, X-ray diffraction, infrared spectroscopy and solid-state ¹³C NMR. Results showed that the extracted chitin was in the alpha form, with a 63% crystalline index (CrI) and a degree of N-acetylation (DA) of 70%. The presence of proteins and glucans were not observed in the extracted chitin.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chitin and its derivative chitosan have received considerable attention as functional biomaterials in a wide range of potential applications in food, agriculture, medicine, pharmaceuticals, cosmetics, paper making and water purification. This interest is due to their numerous physico-chemical and biological properties [1–3]. Chitin and chitosan are both linear copolymers of β-(1→4)-linked D-glucosamine (GlcN) and N-acetyl D-glucosamine (GlcNAc) units in various proportions and sequences. Chitosan is currently produced by alkaline N-deacetylation of chitin, a structural polysaccharide mainly present in arthropod exoskeletons, cephalopod endoskeletons and cell walls of many fungi. The main commercial sources of chitin are crab and shrimp shells. Recently, the needs of chitin from unconventional sources such as insects and fungi with higher purity has gained an increasing interest [4,5]. In particular, recent publications have proposed that mushrooms can be used as an alternative source for chitin and chitosan [6,7]. As non-animal source, fungi could be of interest for the extraction of biopolymer free of animal-based derivatives. According to the literature, chitin and chitosan extracted from a fungal source have several advantages. Firstly, it has been shown that fungal chitin and chitosan

are free of tropomyosin, myosin light chain and arginine kinase, which are present in crustacean cuticles and is likely to cause allergic responses [8]. In addition, as fungi contain a low level of mineral impurities associated with chitin, the extraction process of chitin required milder conditions compared to exoskeleton sources. As a result, the extraction costs can be reduced and the degradation of the chemical structure of the native chitin can be limited [9]. Finally, the use of fungi could allow the production of chitin and chitosan with a better control of the physico-chemical properties compared to crustacean chitin and chitosan whose physico-chemical properties are known to vary according to the crustacean species and the harvesting period [10].

Finally, *A. bisporus* is abundant, easy to grow and with fast growing cycle, so it may be a good alternative to commercial chitin. All of these benefits motivated the interest in the extraction and characterization of chitin and chitosan from *A. bisporus*.

Chitin is a structural component of the cell wall of fungi from taxonomical groups of zygomycetes, ascomycetes, basidiomycetes and deuteromycetes [11]. Chitosan, it was found naturally in zygomycetes [12]. But its presence in Basidiomycetes was only reported in a few reports [12]. *A. bisporus* (also named white button mushroom) belongs to the group of basidiomycetes and is one of the most widely consumed mushroom worldwide [13]. Nevertheless, despite an important industrial production of *A. bisporus*, to our knowledge, few studies were published concerning the extraction and characterization of chitin and chitosan from this mushroom

* Corresponding author.

E-mail addresses: sami.boufi@fss.rnu.tn, sami.boufi@yahoo.com (S. Boufi).

[10–12]. Vetter has determined the content of chitin in pileus (6.68% w/w of dry material) and stipes (7.25% w/w of dry material) of *A. bisporus*, without describing a possible extraction process. However, the content of chitin and chitosan in the different fruit body parts, i.e. pileus, gills and stipes, was not studied systematically [11]. The extraction of chitin and chitosan from *A. bisporus* was also scarcely investigated. Some studies have described the extraction of chitin from both the stipe and the mycelium (the vegetative part) of the mushroom [10,12]. Concerning chitosan, its extraction from *A. bisporus* led to negligible yields (<1% w/w of dry material) [12,10]. Additionally, extracted chitin and chitosan were poorly characterized in terms of structural parameters (degree of N-acetylation (DA) and physico-chemical properties [12,10].

A specificity of the chitin present in *A. bisporus* is its association with β -(1 \rightarrow 3) glucans. However, the evidence of the presence of such glucans and their quantification is not well described in the literature [12,10]. This may result from the poor sensitivity of the techniques used for such determinations (e.g. infrared spectroscopy) and the variability of the composition of the chitin/glucan complex with the harvesting conditions [14].

In this context, the aim of this work was to propose an improved chemical process for the extraction of chitin and chitosan from *A. bisporus*. For that purpose, the yield of chitin extracted from main fruit body parts of *A. bisporus*, pileus, stipes and gills was evaluated and the physico-chemical properties of chitin extracted were fully investigated using FTIR, NMR and molecular weight evaluation.

2. Methods and materials

2.1. Mushroom organism

1 kg of fresh mushrooms (white *A. bisporus*) were commercial product purchased from the supermarket Carrefour with the following characteristics (origin: Loire Valley; category: 1; caliber: Medium; N° 790/29 and 790/27; Date of purchase: 28/10/2015). Mushrooms were washed, cut, separated into three parts (pileus, stipes and gills) as shown in (Fig. 1), frozen the same day and lyophilized before further treatments.

2.2. Reagents and control samples

Standard samples of alpha-chitin (DA 87%, batch n°52, from shrimp shells) were supplied by Mahtani Chitosan (Veraval, India). Sodium hydroxide pellets, ammonium hydroxide solution (28–30% w/w) and glacial acetic acid were purchased from Acros organics or Sigma-Aldrich. All reagents were used in highly pure grades. Deionized water was used for the preparation of aqueous solutions.

2.3. Chitin and chitosan extraction

The extraction of chitin was performed according to a modified process [10,15] involving different steps depicted in Scheme. S1.

2.4. (i) Deproteinization reaction

4 g of each lyophilized body part (pileus, stipes and gills) (Fig. 1) were treated with sodium hydroxide solution (120 mL, 1 M) at 80 °C for 2 h. The alkali insoluble residue was washed with deionized water and centrifuged. Washing/centrifugation cycles were repeated several times until neutral pH then the alkali insoluble residue was lyophilized.

2.5. (ii) Isolation of chitin and chitosan

1 g of the alkali insoluble residue was stirred in 100 mL acetic acid (2% v/v) at 95 °C for 6 h. The insoluble material (i.e. chitin) was

isolated by centrifugation, washed several times with deionized water until neutral pH then lyophilized. Chitin was obtained as a powder and its mass yield was calculated by weighting. Chitosan was isolated by precipitation from the supernatant after addition of concentrated ammonium hydroxide solution (37%) until pH9. The precipitate was abundantly washed with deionized water until pH 9. Chitosan was obtained as powder after lyophilisation and the mass yield of chitosan was calculated by weighting.

2.6. Characterization methods

2.6.1. Scanning electron microscopy (SEM)

Samples corresponding to the three lyophilized body parts (pileus, stipes and gills) were observed on a field emission gun SEM (Hitachi S800) on low vacuum mode at a tension ranging from 5 to 15 kV. A large field detector (LFD) was used and the working distance was ranging from 5 to 10 mm.

2.6.2. Infrared spectroscopy (FTIR)

FTIR spectra of chitins from *A. bisporus* were acquired using a Nicolet iS10 FTIR spectrometer (ThermoFischer Scientific) over the wavenumber range of 4000–500 cm⁻¹. A Gemini sampling accessory Smart iTR was used to collect horizontal attenuated total reflectance (ATR) spectra using a standard ZnSe crystal. Samples were pressed with a Minigrip device so as to assure uniform contact between samples and the ATR crystal. FTIR spectra were recorded by accumulation of at least 64 scans, with a resolution of 4 cm⁻¹ using the OMNIC software (ThermoFischer Scientific).

2.6.3. X-ray diffractometry (XRD)

XRD analyzes were performed from 5° to 50° using a Bruker D8 advance diffractometer without Ni-filtered, CuK α radiation (λ = 1.542 Å). The diffractometer was operated at 40 kV and 40 mA with 1° diverging and receiving slits and the scans were carried out with a step size of 0.020° and a step time of 0.2 s.

2.6.4. Thermogravimetry (TGA)

TGA analyzes were performed with a TGAQ500 thermogravimetric analyzer (DuPont Instrument). Samples (about 10 mg) were heated in open alumina pans, in helium atmosphere from 30 °C up to about 800 °C at a heating rate of 10 °C/min. Ash content (%) and moisture content (%) were determined from the TGA thermogram using Universal Analysis software (TA instruments).

2.6.5. CP/MAS ¹³C-NMR spectroscopy

Cross-Polarization (CP) Magic Angle Spinning (MAS) ¹³C-NMR spectra were recorded on a Bruker Avance II spectrometer (300 MHz). A 4 mm double resonance MAS probe was employed at 75.48 MHz. Samples were spun in ZrO₂ rotors using a spinning rate of 10 kHz. Spectra were collected using a 90° proton pulse of 4 μ s with a contact time of 1500 μ s. The recycle delay was 10 s (¹H) with 1024 scans (¹³C). Chemical shifts are reported in ppm downfield from SiMe₄ referenced at 0.0 ppm.

3. Results and discussion

3.1. Extraction of chitin and chitosan from the three body part of *A. bisporus*

Chitin and Chitosan were extracted from 4 g of each three lyophilized body part of *A. bisporus* namely pileus, stipes and gills. Products were obtained by means of alkaline and acid treatment. The basic alkaline step of the treatment removed proteins and lipids. An additional acidic treatment stage was carried out for the separation of chitosan (if present) from the fungal chitin. This step

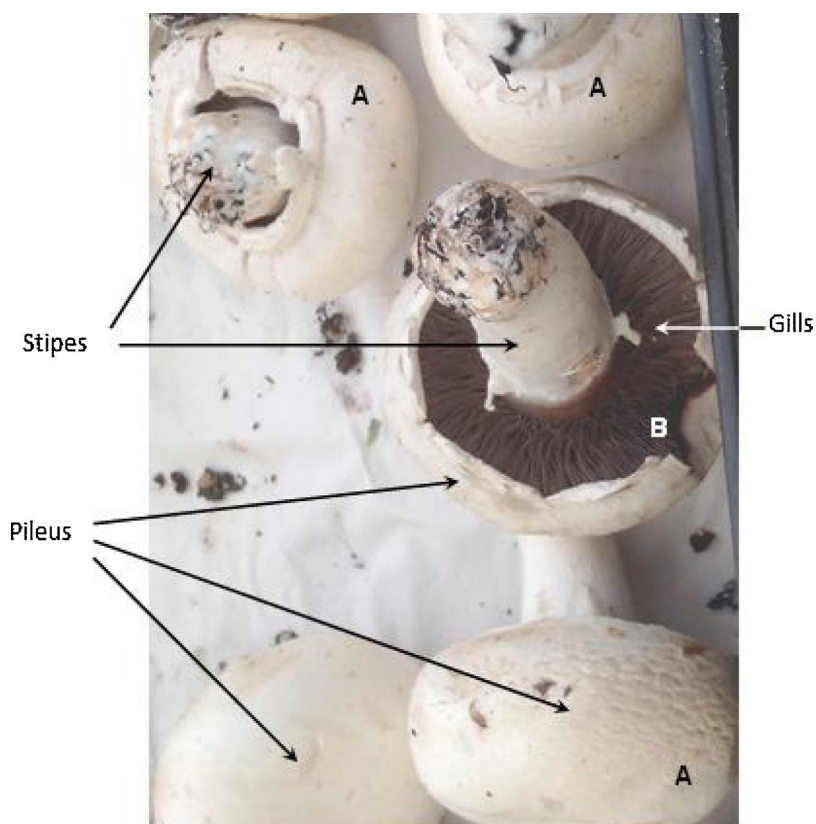


Fig. 1. Body parts of the mushroom *A. bisporus*, mailemy stipes, pileus and gills. In immature fungi (A), an inner veil is present protecting the gills. After maturation, the pileus extends and the inner veil opens to show the gills (B) for the liberation of spores.

Table 1
Characterization parameters of final chitin extracted from body parts of *A. bisporus*.

Body part of <i>A. bisporus</i>	Mass yield (%)	Residual water content (%)	Ash content (%)	DA (%) by IR
Stipes	7.4 ± 1.2	7.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1	69.8
Pileus	6.4 ± 1.4	7.7 ± 0.5	0.7 ± 0.3	66.8
Gills	5.9 ± 1.2	7.0 ± 0.4	3.4 ± 0.7	63.4

also contributed to the removal of residual mineral impurities from chitin [10].

One of the problems associated with the production of pure chitin keeping the macromolecular structure close to the native form is to minimize the partial deacetylation of the chains and the degradation caused by the deproteinization and acid hydrolysis steps during the extraction process. To address this issue, scanning electron microscopy (SEM) analyses were performed in order to investigate the microstructure of the different body parts of *A. bisporus* mushrooms. (Fig. 2) shows that the three body parts exhibited a porous structure resulting from the lyophilization step. This porous structure is expected to facilitate the accessibility of the reagents to the inner structure favoring an effective deproteinization or deacetylation process [16]. For this reason, a milder extraction process was adopted, in terms of NaOH concentration order to minimize the degradation of chitin [10,15].

Besides porosity, it can be concluded from these pictures that the three body parts of *A. bisporus* have different microstructures. In fact, lyophilized pileus and stipes were structured with interconnected macropores as a result of ice crystal formation, which illustrated that high water content probably resulted in highly opened network structure after freeze drying. See (Fig. 2a and b). However, gills exhibited a different microstructure with micron-range granules namely spores which have smooth surface, attached on a porous hymenium membrane.

3.2. Mass yields of chitin and chitosan in the three body part of *A. bisporus*

(Table 1) shows that the yield of chitin in dry weight of *A. bisporus* stipe was higher than the other body parts of this mushroom. The content of chitin in stipes and pileus was 7.4% and 6.4%, respectively, which is quite similar to those reported by Vetter et al. (about 7.2% and 6.6% respectively) [11]. For gills, our evaluation yields 5.8% which has not been reported so far. Similar chitin content 8.5% was found by F. Di Mario who isolated chitin from the mycelium of *A. bisporus* [12]. On the other hand, Tao Wu reported a chitin yield in *A. bisporus* stipes as 12.44% (yield determined as glucosamine after depolymerization and deacetylation) [10]. However, this value is not directly comparable with our results because the used stipes were stored in different conditions during 5 to 15 days at 4 and 25 °C and content of cell walls of *A. bisporus* increased after post harvesting storage of fresh material at room temperature [14].

From Table 1 the physico-chemical properties of chitin extracted from the three body parts of *A. bisporus* can be compared. The DA of stipes chitin is the highest (69.8%), while gills chitin has the lower DA. Ash content for stipes and pileus was negligible. However, gills chitin had the highest content of minerals (3.34%).

Chitosan is commonly separated from chitin by aqueous acidic treatment. We tried to isolate chitosan by precipitation from the supernatant after addition of concentrated ammonium hydroxide

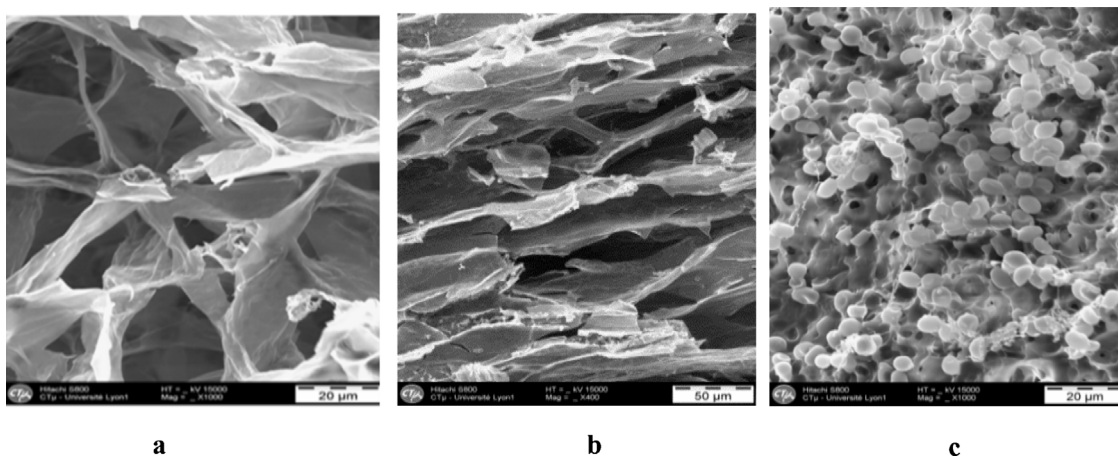


Fig. 2. Microstructure SEM photographs of (a) pileus, (b) stipes and (c) gills from *A. bisporus* after lyophilization.

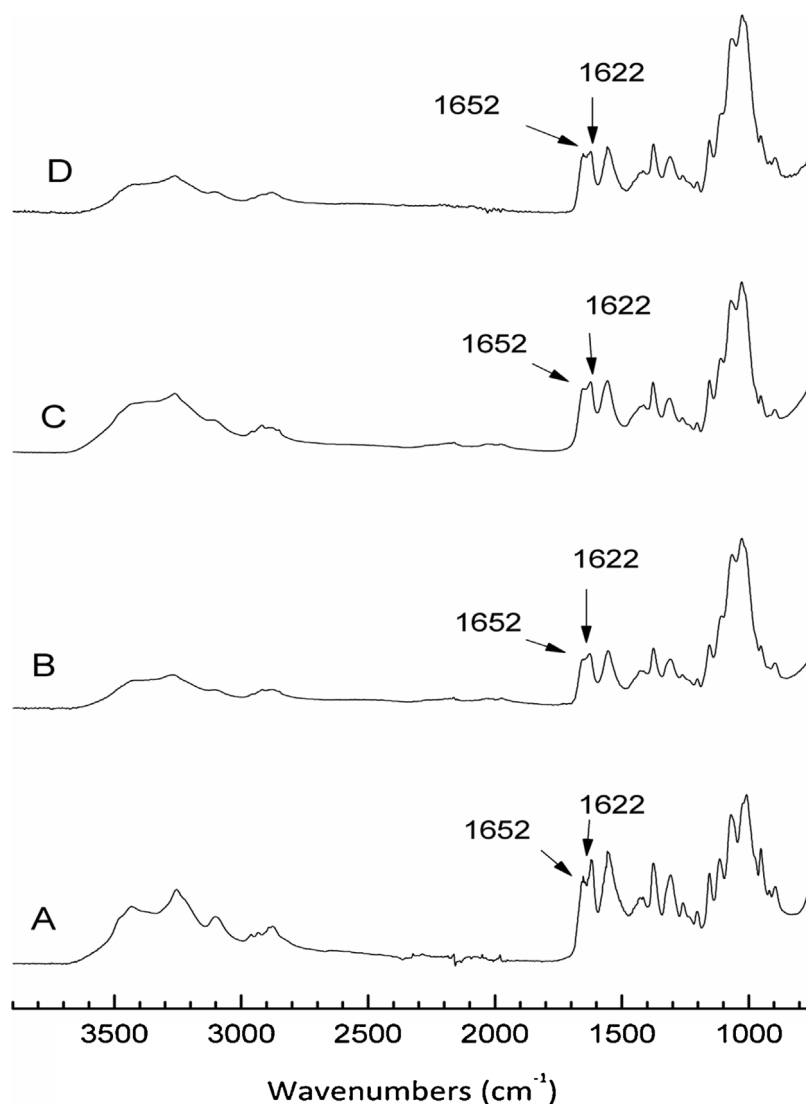


Fig. 3. FTIR spectra of (A) commercially available alpha chitin (DA = 87.4%), (B) chitin extracted from the *A. bisporus* pileus, (C) chitin extracted from *A. bisporus* gills and (D) chitin extracted from *A. bisporus* stipes.

solution. Acid extraction of the three body part of *A. bisporus* did not yield significant amount of chitosan. These results are consistent with previous works reported by Mol and Wessels who found that

chitinous material in the cell wall of *A. bisporus* (phylum Basidiomycota) is in the form of chitin, contrarily to *Micor.rouxii* i.e. phylum Zygomycota where it is present as chitosan [17]. In addition, Wu

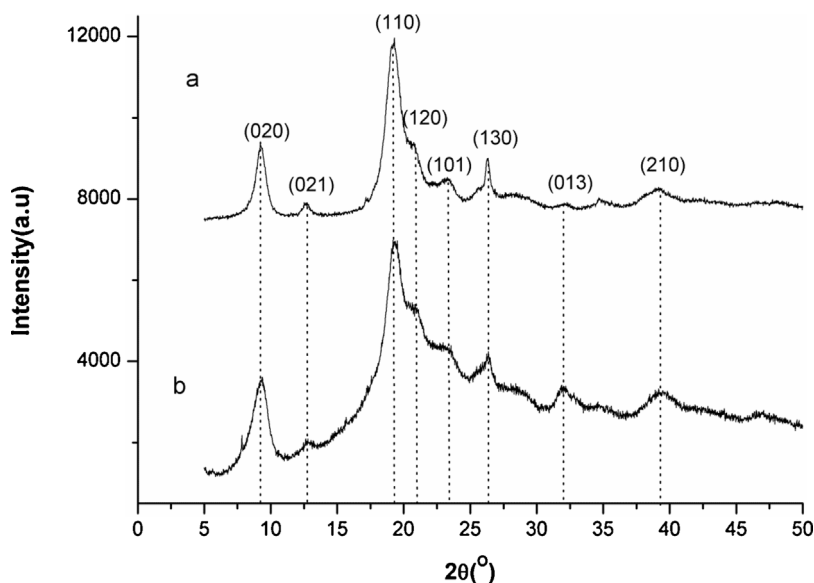


Fig. 4. X-ray diffractograms of (a) commercial alpha chitin and (b) chitin extracted from the *A. bisporus* stipes.

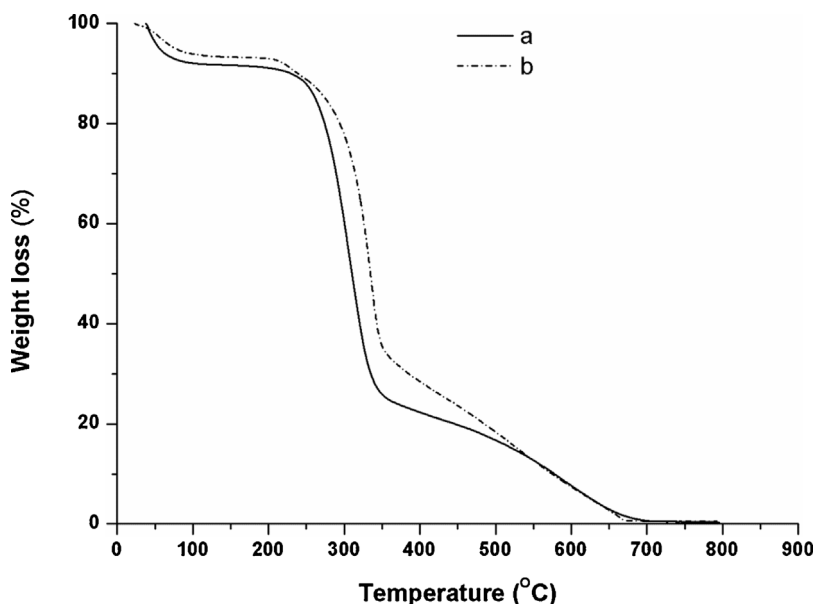


Fig. 5. TGA thermograms of (a) final chitin extracted from stipe and (b) standard alpha chitin.

et al. did not find chitosan in stipes of *A. bisporus* [10]. On the other hand, according to F. Di Mario, only a low yield of chitosan (about $1 \pm 0,12\%$ of dry weight) is present in the mycelium of *A. bisporus* [12].

Given the low amount of chitosan extracted from *A. bisporus*, their physicochemical properties were not investigated in the present work

3.3. Characterization of chitin extracted from the three body part of *A. bisporus*

3.3.1. FTIR spectroscopy analysis

Infrared spectra of chitin from *A. bisporus* stipes (Fig. 3a), gills (Fig. 3b) and pileus (Fig. 3c) are similar to commercially α -chitin (Fig. 3d) and to α -chitin spectra reported in literature [16,18]. The α and β -chitins can be distinguished by FTIR spectroscopy through the vibration modes of amide I in the spectral region $1660\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$. In α -chitin, two absorptions are observed at

about 1660 and 1627 cm^{-1} and in the β -chitin only one band is present at 1656 cm^{-1} [16]. Accordingly, the two peaks around 1652 and 1622 cm^{-1} observed in FT-IR spectrum (Fig. 3, arrows) evidence that chitin from stipes gills and pileus is in alpha crystalline form. The lack of the absorption peaks at 1540 cm^{-1} and at $1700\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$ assigned to the stretching vibrations in protein confirms that the extracted chitin is protein free [4,19]. The main bands observed by FTIR spectroscopy which were assigned according to literature are detailed in Table S1 [16,18,20].

The DA (degree of N-acetylation) of chitin from the three body parts is given in Table 1. It was calculated from Eq. (1) according to method of Baxter *et al.* [21].

$$DA = \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \quad (1)$$

where A_{1655} and A_{3450} were the absorbance at 1655 and 3450 cm^{-1} of the amide I and hydroxyl groups, respectively.

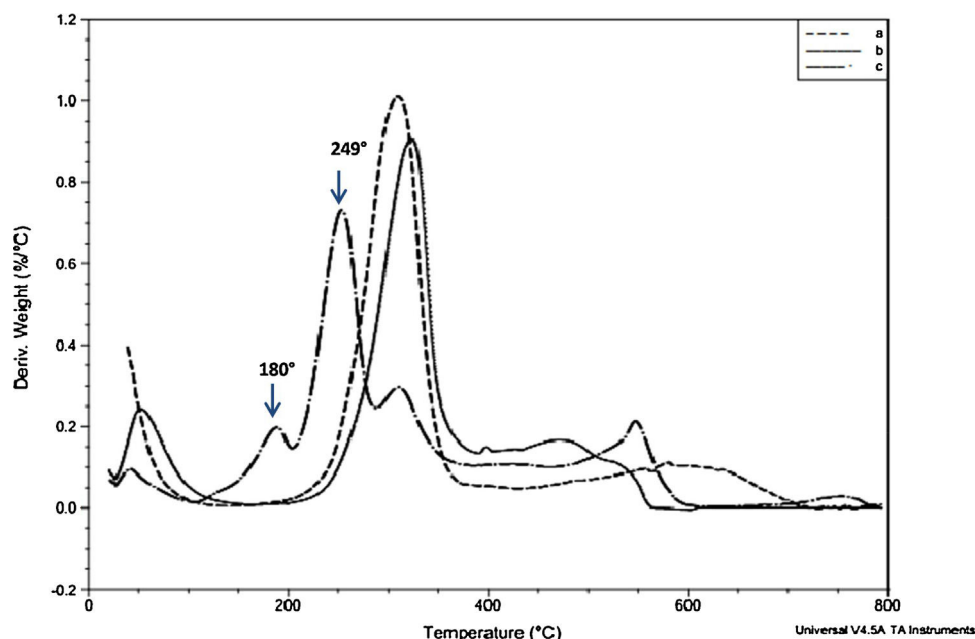


Fig. 6. DTG curves of: (a) final chitin extracted from *A. bisporus* stipes; (b) the alkali insoluble material after the stipe deproteinization and (c) raw lyophilized stipes.

Chitin from the body part with the higher content *i.e* from the stipes was further investigated using X-ray diffraction, thermogravimetry and solid-state ^{13}C NMR spectroscopy analyses.

3.3.2. X-ray diffraction analysis

The X-ray diffraction pattern of chitin extracted from *A. bisporus* stipe (Fig. 4b) shows eight diffraction peaks at 2θ : 9.1° , 12.7° , 19.3° , 20.7° , 23.2° , 26.3° , 32° and 39° corresponding to the (020), (101), (110), (120), (101), (130), (013) and (210) family planes respectively. Commercial available alpha chitin displayed the same reflections (Fig. 4a), all representative of the alpha allomorph [18,22,23,24,25]. Thus, the structural differences between commercial and *A. bisporus* chitin lies mainly on their crystallinity ratios. In fact, the crystalline indexes (CrI) of the commercial alpha chitin and chitin from *A. bisporus* stipe were evaluated as 88.1% and 63.2% respectively, according to [25]:

$$\text{CrI} = \left[\frac{(I_{110} - I_{\text{am}})}{I_{110}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Where I_{110} is the maximum intensity at $2\theta \cong 20^\circ$ corresponding to the (110) planes and I_{am} is the intensity of amorphous diffraction at $2\theta \cong 16^\circ$. This result is consistent with the DA values of *A. bisporus* stipe chitin, that is lower (DA = 69.85%) than commercial alpha chitin (DA ~ 85–90%). It is known that the crystallinity of chitin decrease with decreasing DA [25]. In this study, the CrI value of *A. bisporus* stipes chitin was close to that of fungal chitins reported in literature (CrI = 58.5%) [26]. Moreover, using the Sherrer's formula (3), The apparent size L_{hkl} of crystallites in the direction perpendicular to the lattice planes related to the (020) crystalline peaks were calculated to be $L_{hkl} = 5.9 \text{ \AA}$, according to [24].

$$L_{hkl} = \frac{K \lambda}{\beta \cdot \cos(\theta)} \quad (3)$$

Where β is the width at half height of a peak related to (hkl) lattice planes; $K = 0.9$, 2θ is the diffraction angle of the hkl reflection and λ is the incident wavelength.

The presence of crystalline β -glucan is not observed, because there is no peak at $2\theta = 6^\circ$, which is usually described in solid pure β -glucans [27].

3.3.3. Thermogravimetric analysis (TGA)

The thermogravimetric analyses of *A. bisporus* stipe chitin and commercial alpha chitin are given on (Fig. 5). Both thermograms were quite similar and exhibited three decomposition steps as described previously [28]. First, in the interval between 30°C and 100°C , a weight loss of 7.75% and 4.75% for *A. bisporus* stipes chitin and commercial alpha chitin respectively, is attributed to water evaporation. The second weight loss observed between 200°C and 400°C (63.37% and 65.87% for isolated and commercial chitin respectively), could be assigned to the degradation of the chitin chains as reported by Paulino et al. [29]. The third step occurring in the range of 400 to 600°C (with 25.6% and 28.7% weight loss) is attributed to thermal degradation of pyranose ring and the decomposition of the residual carbon.

Previous study also revealed weight losses in alpha chitin isolated from *Ganoderma lucidum* mushroom in three steps which is consistent with this work [1]. The temperature of the second peak maximum was observed to be 309°C for isolated *A. bisporus* stipe chitin and 335°C for commercial alpha chitin from shrimp (Fig. 5).

From TGA's result it can be seen that chitin from the *A. bisporus* stipes exhibited lower thermal stability than that of commercial alpha chitin from shrimp. This is due to the difference in their degree of acetylation DA (69.85% and 87%, respectively), crystalline index CrI (63.21% and 88.10%, respectively) and possibly size of the grains and porosity. It was reported that thermal property and crystallinity decreased with decreasing DA [25]. It seems that lower thermal stability is specific feature of chitin extracted from mushrooms. Indeed, similar result was obtained by Yen and Mau, who used DSC analysis and observed that the degradation of chitin from shiitake (*Lentinula edodes*) stipes occurred approximately at 248°C [31]. Also, alpha chitin obtained from *Ganoderma lucidum* fungus has lower thermal stability, since its second degradation peak was found to be 313°C [1].

When comparing ash content of chitin isolated from the three body parts of *A. bisporus* (Table 1), it can be seen that stipes chitin contains the lower yield of ash (0.32%) while gills chitin had the higher content (3.34%), which means that the latest contains more minerals.

This result is in good agreement with what was reported by N.Cherno, who found that the different morphological parts of *A.*

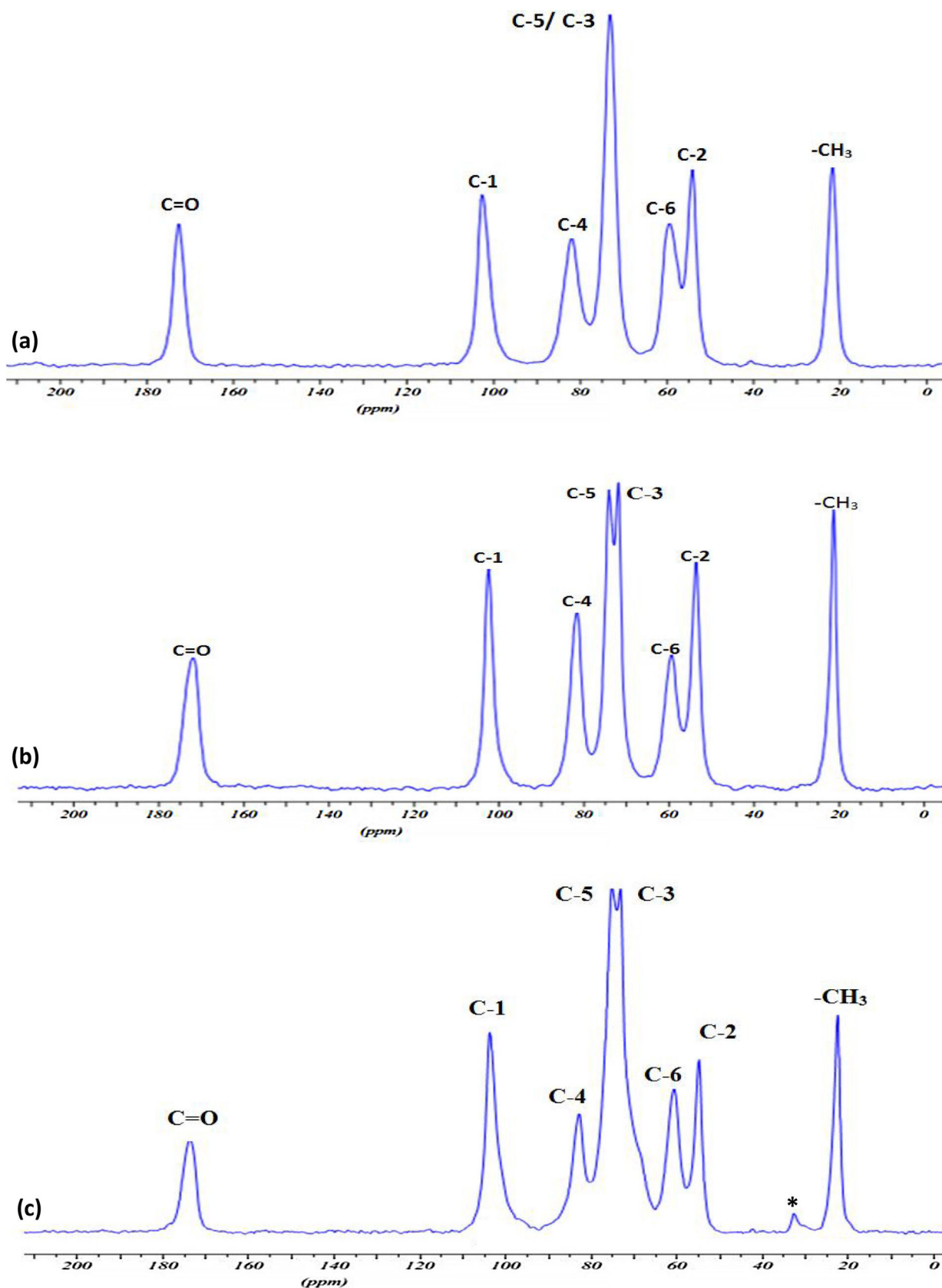


Fig. 7. CP/MAS ^{13}C -NMR spectra of (a) commercial beta-chitin, (b) commercial alpha-chitin and (c) chitin extracted from the *A. bisporus* stipes (* this peak is likely due to the presence of impurities according to previous studies [4,16,29]).

bisporus differ in their chemical composition including the mineral part [30]. The derivative curves of thermograms (DTG) are shown for lyophilized stipes (Fig. 6c), alkaline insoluble residue (AIR) from stipes (after deproteinization) (Fig. 6b) and chitin from *A. bisporus* stipes (final product after washing and freeze drying) (Fig. 6a). The two peaks appearing at 180 °C and 249 °C (Fig. 6c arrows) may correspond to the degradation of proteins, lipids and pigments in the dried material [22]. Such degradation peaks are absent in both DTG curve of AIR and *A. bisporus* stipe chitin. The TGA data are indicative of efficient deproteinization step, and the strong decrease of the ash content passing from 5.1% in the raw material to 0.32% in the final chitin is indicative of the efficient demineralization after the acid treatment.

3.3.4. CP/MAS ¹³C-NMR spectroscopy analysis

The spectrum of CP/MAS ¹³C-NMR of the *A. bisporus* stipe chitin is given in (Fig. 7C), with assignment of the different peak to their corresponding carbon. The spectra showed the same peaks as those observed in commercial α-chitin (Fig. 7B), which is further supported the FTIR data. The difference between the α and β-chitin lies in chemical shift of C-5 and C-3 in the D-glucosamine, being in the form of two peaks at 75.2 ppm and 73.1 ppm, respectively for α-chitin and appearing as a single peak at 73 ppm in β-chitin [16,4].

The CH₃ group of the acetyl moiety gave a signal at 22.4 ppm, while its carbonyl group produced a peak at 173.5 ppm. The signals for C-5 (75.2 ppm) and C-3 (73.1 ppm) are clearly separated into two signals, similarly to the α-chitin reported by other authors [16,4]. In the commercial β-chitin spectrum (Fig. 7A), only one signal appears at 73 ppm and was assigned to both C-3 and C-5 as indicated in previous study [16]. The NMR analysis further supports that *A. bisporus* stipes chitin is in the alpha form. Extraction efficiency of proteins is confirmed by the absence of the peaks at 174, 146, and 117 ppm [29].

Moreover, the absence of peaks at C-4 at 68.5 ppm and C-3 at 85.7 is indicative of the absence of any bound glucan [27,32], as has been suggested from FTIR analysis. The CP-MAS spectrum confirmed also the absence of bound glucan. The absence of glucan is probably explained by its dissolution during the alkaline treatment and during the deproteinization step, since beta glucan is soluble in alkaline solution [33]. Such result is in good agreement with the works of Mendoza and Manzi et al., where *A. bisporus* (whole mushroom) contains a low amount of beta-glucan (1.4 mg/100 g), while *Pleurotus ostreatus* and *Boletus edulis* contain higher amounts [34,35]. According to other authors, this difference is associated with the mushroom nutrition type. Saprotrophic species (ex: *A. bisporus*) synthesize more chitin and less glucan than wood-rotting ones (like *Pleurotus ostreatus*) which synthesize more glucan and less chitin [30].

4. Conclusion

A mild extraction treatment was used to obtain chitin from freeze-dried *A. bisporus* pileus, gills and stipes. The chitin from stipes with the highest yield (around 7.4%) was characterized by XRD, TGA, FTIR, NMR. The FTIR and NMR analysis confirmed that chitin was in the form of α-chitin, with a DA around 70% and was free of any bound glucan. These properties are beneficial for biomedical applications.

The gills were shown to contain the highest mineral content (about 3.4% w/w in DW) and the three body part of *A. bisporus* the content of chitosan was quite low (around 1%). Moreover, if we consider that a high fraction of waste generated during mushroom production consists mainly of *A. bisporus* stipe, this resource might

be an interesting feedstock for the production of high purity chitin using a mild alkaline extraction.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.172>.

References

- [1] S.P. OspinaÁlvarez, D.A. RamírezCadavid, D.M. Escobar Sierra, C.P. Ossa Orozco, D.F. RojasVahos, P. Zapata Ocampo, L. Atehortúa, Comparison of Extraction Methods of Chitin. From *Ganoderma lucidum* Mushroom Obtained in Submerged Culture, *BioMed. Res. Int.* (2014), <https://doi.org/10.1155/2014/169071>.
- [2] R. Flores, S. Barrera-Rodríguez, K. Shirai, C. Durán-de-Bazúa, Chitinsponge, extraction procedure from shrimp wastes using green chemistry, *J. Appl. Polym. Sci.* 104 (6) (2007) 3909–3916.
- [3] C.H. Chen, F.Y. Wang, Z.P. Ou, Deacetylation of β-chitin. I. Influence of the deacetylation conditions, *J. Appl. Polym. Sci.* 93 (5) (2004) 2416–2422.
- [4] J. Majtán, K. Bíliková, O. Markovič, J. Gróf, G. Kogan, J. Šimúth, Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*), *Int. J. Biol. Macromol.* 40 (3) (2007) 237–241.
- [5] Z. Draczynski, Honeybee corpses as an available source of chitin, *J. Appl. Polym. Sci.* 109 (3) (2008) 1974–1981.
- [6] T. Kleekayai, W. Suntornsuk, Production and characterization of chitosan obtained from *Rhizopusoryzae* grown on potato chip processing waste, *W. J. Microbiol. Biotech.* 27 (5) (2011) 1145–1154.
- [7] L.C. Cheng, T.S. Wu, J.W. Wang, S.H. Wu, M.H. Chung, Y.M. Kuo, C.H. Tsai, Production and isolation of chitosan from *Aspergillus terreus* and application in tin (II) adsorption, *J. Appl. Polym. Sci.* 131 (12) (2014).
- [8] G. Muñoz, C. Valencia, N. Valderruten, E. Ruiz-Durántez, F. Zuluaga, Extraction of chitosan from *Aspergillus niger* mycelium and synthesis of hydrogels for controlled release of betahistine, *React. Funct. Polym.* 9 (1) (2015) 1–10.
- [9] K. Nadarajah, J. Kader, M. Mazmira, D.C. Paul, Production of chitosan by fungi, *Pakistan. J. Biol. Sci.* 4 (3) (2001) 263–265.
- [10] T. Wu, S. Zivanovic, F.A. Draughon, C.E. Sams, Chitin and chitosan value-added products from mushroom waste, *J. Agr. Food. Chem.* 52 (26) (2004) 7905–7910.
- [11] J. Vetter, Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*, *J. Food. Chem.* 102 (1) (2007) 6–9.
- [12] F. Di Mario, P. Rapana, U. Tomati, E. Galli, Chitin and chitosan from Basidiomycetes, *Int. J. Biol. Macromol.* 43 (1) (2008) 8–12.
- [13] R.A. Muzzarelli, J. Boudrant, D. Meyer, N. Manno, M. DeMarchis, M.G. Paoletti, Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial, *Carbohydr. Polym.* 87 (2) (2012) 995–1012.
- [14] J.B. Hammond, Changes in composition of harvested mushrooms (*Agaricus bisporus*), *J. B. Phytochemistry.* 18 (3) (1979) 415–418.
- [15] J. Synowiecki, N.A.A.Q. Al-Khateeb, Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan, *Food. Chem.* 60 (4) (1997) 605–610.
- [16] G. Cárdenas, G. Cabrera, E. Taboada, S.P. Miranda, Chitin characterization by SEM FTIR, XRD, and ¹³C cross polarization/mass angle spinning NMR, *J. Appl. Polym. Sci.* 93 (4) (2004) 1876–1885.
- [17] P.C. Mol, J.G.H. Wessels, Differences in wall structure between substrate hyphae and hyphae of fruit-body stipes in *Agaricus bisporus*, *Mycol. Res.* 94 (4) (1990) 472–479.
- [18] M. Kaya, T. Baran, A. Mentes, M. Asaroglu, G. Sezen, K.O. Tozak, Extraction and characterization of α-chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates, *Food. Biophysics.* 9 (2) (2014) 45–157.
- [19] G. Chaussard, A. Domard, New aspects of the extraction of chitin from squid pens, *Biomacromolecules* 5 (2) (2004) 559–564.
- [20] M. Kaya, T. Baran, S. Erdoğan, A. Menteş, M.A. Özusağlam, Y.S. Çakmak, Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*), *Mater. Sci. Eng. C.* 45 (2014) 72–81.
- [21] A. Baxter, M. Dillon, K.A. Taylor, G.A. Roberts, Improved method for ir determination of the degree of N-acetylation of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 14 (3) (1992) 166–169.
- [22] R. M. Abdel-Rahman, R. Hrdina, A.M. Abdel-Mohsen, M.M. Fouda, A.Y. Soliman, F.K. Mohamed, T.D. Pinto, Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity, *Int. J. Biol. Macromol.* 80 (2015) 107–120.
- [23] M.S. Cortizo, C.F. Berghoff, J.L. Alessandrini, Characterization of chitin from *Illex argentinus* squid pen, *Carbohydr. Polym.* 74 (1) (2008) 10–15.

- [24] F.A. Al Sagheer, M.A. Al-Sughayer, S. Muslim, M.Z. Elsabee, Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf, *Carbohydr. Polym.* 77 (2) (2009) 410–419.
- [25] W. Sajomsang, P. Gonil, Preparation and characterization of α -chitin from cicadasloughs, *Mater. Sci. Eng: C* 30 (3) (2010) 357–363.
- [26] M. Kaya, V. Baublys, I. Šatkauskienė, B. Akyuz, E. Bulut, V. Tubelytė, First chitin extraction from *Plumatellarepens* (Bryozoa) with comparison to chitins of insect and fungal origin, *Int. J. Biol. Macromol.* 79 (2015) 126–132.
- [27] I. Farinha, P. Duarte, A. Pimentel, E. Plotnikova, L. Chagas, M.A. Reis, Chitin–glucan complex production by *Komagataella pastoris*: downstream optimization and product characterization, *Carbohydr. Polym.* 130 (2015) 455–464.
- [28] H. Moussout, H. Ahlafi, M. Aazza, M. Bourakhouadar, Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis, *Polym. Degrad. Stabil.* 130 (2016) 1–9.
- [29] A.T. Paulino, J.I. Simionato, J.C. Garcia, J. Nozaki, Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides, *Carbohydr. Polym.* 64 (1) (2006) 98–103.
- [30] N. CHERNO, S. OSOLINA, A. NIKITINA, Chemical Composition of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus Ostreatus* Fruiting Bodies and Their Morphological Parts, *Food. Env. Saf* 12 (4) (2016).
- [31] M.T. Yen, J.L. Mau, Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes, *LWT-FOOD. SCI. TECHNOL.* 40 (3) (2007) 472–479.
- [32] C. Roca, B. Chagas, I. Farinha, F. Freitas, L. Mafra, F. Aguiar, M.A. Reis, Production of yeast chitin–glucan complex from biodiesel industry byproduct, *Process Biochem* 47 (11) (2012) 1670–1675.
- [33] Y.T. Kim, E.H. Kim, C. Cheong, D.L. Williams, C.W. Kim, S.T. Lim, Structural characterization of β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucans using NMR spectroscopy, *Carbohydr. Res* 328 (3) (2000) 331–341.
- [34] C.G. Mendoza, J.A. Leal, M. Novaes-Ledieu, Studies of the spore walls of *Agaricus bisporus* and *Agaricus campestris*, *Can J Microbiol.* 25 (1) (1979) 32–39.
- [35] P. Manzi, A. Aguzzi, L. Pizzoferrato, Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy, *Food. Chem.* 73 (3) (2001) 321–325.