

PRODUCTION, EXTRACTION ET UTILISATION TECHNOLOGIQUE DE LA CHITINE
À PARTIR DE COMMUNAUTÉS MARINES

Charles Jeuniaux et Jean-Pierre Thomé

Laboratoires de morphologie, systématique et écologie animales, Institut de Zoologie,
Université de Liège, 22 quai Van Beneden, B-4020 Liège, Belgique

Mots-clés : polysaccharides, chitine, chitosane, PCB, épuration
Key words : polysaccharides, chitin, chitosan, PCB, depollution

Résumé

La production de chitine par les biocénoses marines méditerranéennes a été mesurée dans la baie de Calvi. Elle est en moyenne de $1 \text{ g m}^{-2} \text{ an}^{-1}$ pour le zooplancton comme pour les communautés benthiques pionnières sur substrats durs, à 18 m de profondeur. Les Crustacés sont les principaux producteurs de chitine. Il est aisé d'isoler la chitine de leurs cuticules et de la convertir en chitosane. Parmi les nombreuses applications industrielles du chitosane, son utilisation pour l'épuration d'eaux de surface contaminées par des polychlorobiphényles (PCB) a fait l'objet d'une attention particulière.

Abstract

**Production, extraction and the technological use of chitin obtained
from marine communities**

Chitin production by marine communities in the Mediterranean Sea was studied in Calvi Bay (Corsica). Its mean value amounted to $1 \text{ g m}^{-2} \text{ year}^{-1}$ in zooplankton as well as in benthic pioneering communities growing on rocky substrates at a depth of 18 m. Crustaceans are the main chitin producers. Chitin from cuticles can easily be extracted and chemically deacetylated into chitosan. Particular attention was paid in our laboratory to its use in the treatment of PCB-polluted natural surface water.

INTRODUCTION

La chitine est un haut polymère de la N-acétyl-D-glycosamine (en abrégé : N.AG). C'est un homoglycane linéaire, dans lequel les monomères de N.AG sont liés par des ponts β -1,4. C'est donc un polysaccharide voisin de la cellulose, mais où les unités de glucose portent un groupement acétylaminé sur le carbone 2.

Comme la cellulose, la chitine est un biopolymère très largement utilisé par les êtres vivants comme charpente squelettique. Tandis que la cellulose est l'apanage quasi exclusif et tout à fait général des végétaux verts, la distribution de la chitine est plus nuancée. Bien que la chitine soit connue depuis le début du 19^e siècle (Braconnot 1811, Odier 1823), sa localisation chez les êtres vivants n'a été à peu près correctement établie que dans les années 1960. Cela tient au fait qu'il n'y a pas de méthodes chimiques ou histochimiques vraiment spécifiques de ce polysaccharide : il fallut donc attendre les techniques de diffraction des rayons X (appliquées par Rudall 1955) et les méthodes enzymatiques basées sur l'utilisation de chitinases purifiées (Jeuniaux 1963, 1965) pour pouvoir doser et localiser la chitine de manière non équivoque chez les êtres vivants.

La chitine est présente dans la paroi cellulaire des champignons inférieurs et supérieurs, ainsi que dans les levures. On la trouve aussi chez les diatomées (Ruiz-Herrera 1978). La localisation de la biosynthèse de la chitine chez les animaux peut être présentée en termes d'évolution biochimique, le long des principales lignées du règne animal (Jeuniaux 1982). La chitine apparaît dès les Protozoaires, notamment dans le kyste des Ciliés. Elle manque chez les Éponges, mais on la trouve chez beaucoup de Cnidaires, surtout Hydrozoaires. A partir de l'apparition des animaux triblastiques, la propriété de biosynthèse de la chitine se distribue de manière très différente suivant la lignée considérée. Elle est conservée et abondamment mise à profit dans la plupart des classes de la lignée des Spiralia (ou Protostomiens), notamment chez les Bryozoaires, les Mollusques, les Annélides, les Arthropodes, qui l'utilisent comme matrice organique de leurs formations exosquelettiques : cuticules, coquilles, soies, enveloppes et supports des colonies, etc. Dans l'autre lignée, au contraire (celle des Archimérates d'Emig, des Epineuriens de Cuénot, ou des Deutérostomiens de Hyman et Barnes), la chitine manque complètement (à l'exception du cas particulier des Tuniciers). Une telle situation ne peut être interprétée que comme le résultat de la perte du gène de la chitine synthétase par les ancêtres de cette dernière lignée.

Sur le plan quantitatif, c'est chez les Arthropodes que la chitine est utilisée le plus abondamment : chez les Insectes, elle constitue 20 à 30 % du poids de la matière organique de la cuticule, et, chez les Crustacés, elle représente jusqu'à 70 % de la fraction organique de la carapace. Compte tenu de l'extraordinaire abondance actuelle des Arthropodes dans la nature, il est facile d'admettre que la chitine est, après la cellulose, le biopolymère polysaccharidique le plus répandu et le plus abondant dans la biosphère.

L'organisation supramoléculaire au sein des formations squelettiques a fait l'objet de nombreux travaux, tant en chimie qu'en morphologie ultrastructurale. On sait aujourd'hui que la chitine est toujours associée à des protéines, suivant un modèle analogue à celui de Blackwell et Weih (1980). Les protéines peuvent être éventuellement stabilisées par des ponts quinoniques covalents intermoléculaires, ou "tannage quinonique". Le degré de tannage modifie fortement la facilité avec laquelle on peut isoler la chitine de ses complexes chitinoprotéiques. Ceux-ci sont organisés en microfibrilles composites, elles-mêmes parfois associées en fibres. Dans la grande majorité des structures squelettiques étudiées jusqu'ici, les fibres ou les microfibrilles sont disposées en lits parallèles, dans lesquels la direction des fibres change avec le niveau de la strate cuticulaire.

Depuis une quinzaine d'années, on s'est beaucoup intéressé aux possibilités d'utilisation pratique d'un polymère organique aussi abondant dans la nature. C'est surtout le dérivé déacétylé de la chitine, le chitosane, qui a révélé les propriétés les plus intéressantes. Quatre conférences internationales ont été organisées depuis 1977, consacrées à la chitine, au chitosane et à leurs applications technologiques (Muzzarelli *et al.* 1978, Hirano *et al.* 1982, Muzzarelli *et al.* 1986, Škjak-Braek *et al.* 1989). Parmi les principales propriétés, relevons notamment les applications suivantes :

- dans l'industrie textile et dans la papeterie, pour l'imperméabilisation et le renforcement des fibres;
- dans l'industrie des vernis, pour le traitement des bois précieux et la formation de films protecteurs;
- dans l'industrie photographique, pour la réalisation de certains supports d'émulsion;
- dans l'industrie pharmaceutique, pour l'enrobage de médicaments destinés à franchir la barrière gastrique;
- dans l'industrie laitière, pour l'immobilisation d'enzymes, dans la fabrication des yaourts;
- en agronomie, pour l'enrobage des graines, pour l'amendement de certains sols, pour combattre certains parasites des cultures comme les Nématodes;

- en médecine, pour l'accélération de la cicatrisation des plaies, pour la formation de fils de suture (catgut) résorbables; en dentisterie; en ophtalmologie (pour la formation de lentilles de contact); en chirurgie, pour la fabrication de membranes pour rein artificiel;
- en chimie, pour la chromatographie et la fabrication de membranes filtrantes;
- enfin, pour la récupération de métaux lourds et de protéines à partir d'eau polluées et de rejets d'usines, de centrales atomiques, de brasseries, de laiteries, d'abattoirs, etc...

Plusieurs grandes firmes de produits chimiques (notamment aux U.S.A. et au Japon) offrent sur le marché différentes préparations de chitine et de chitosane, à des prix très variables, suivant leur degré de purification et leurs propriétés. A notre connaissance, deux entreprises françaises ont commencé la production et la commercialisation de tels produits.

Nous nous proposons d'examiner ici trois aspects de la production et de l'utilisation de la chitine et de ses dérivés, à savoir les modes de préparation, les possibilités d'exploitation du milieu marin comme source de chitine, et un cas particulier d'application technologique pour l'épuration d'eau contaminée.

Modes de préparation de la chitine et du chitosane

Au niveau industriel, la chitine est préparée à partir de déchets de carapaces de Crustacés produits par les industries alimentaires de la conserve. En effet, ces industries sont nombreuses au Japon et aux U.S.A., et les stocks de carapaces sont importants, surtout celles du gros crabe arctique *Paralithodes*, le "King Crab". La production mondiale de ces déchets est estimée à 500 000 tonnes/an (Allan *et al.* 1978). Toutefois, l'utilisation de ce type de matière première n'est pas sans inconvénients : plusieurs auteurs (Murray *et al.* 1978, Perceval 1978) constatent qu'il est difficile de maîtriser les caractéristiques et les propriétés du chitosane produit à partir de tels déchets, hétérogènes et de qualité variable, qui, de surcroît, sont très chargés en sels minéraux (CaCO_3 : jusqu'à 80 % du poids sec!).

Une firme française exploite les crabes verts, *Carcinus maenas*, récoltés par les pêcheurs au casier sur les côtes bretonnes. Ce type de matériel est plus propice, car il peut être traité dans un bon état de fraîcheur, et l'épaisseur des cuticules est moindre que dans le cas des grosses espèces arctiques employées par les firmes japonaises et américaines. Pour notre part, nous avons toujours préféré utiliser des crevettes grises (*Crangon crangon*), qu'on peut facilement obtenir à bon compte sur les côtes belges, hollandaises et irlandaises, où ces crevettes sont pêchées et font l'objet d'un épluchage industriel pour la vente.

L'isolement de la chitine consiste essentiellement en une déminéralisation des cuticules par des bains de HCl 0,5 N à température ordinaire, renouvelés jusqu'à cessation du dégagement de CO_2 , suivis de lavages à l'eau, et de déprotéinisation par traitement dans NaOH 0,5 N à 100 °C pendant 6 h. La purification de la chitine peut être poussée plus loin par oxydation ménagée par KMnO_4 à 5 % à 60 °C, suivie aussitôt d'un blanchiment par un bain dans une solution saturée de métabisulfite de sodium. Le produit pur, d'un blanc laiteux, est lavé à l'eau et à l'alcool. Il peut être pulvérisé en une suspension plus ou moins fine par un broyeur à couteaux. La chitine se présente alors comme une poudre blanche, insoluble dans l'eau, les solvants organiques, les acides et les bases dilués, même à chaud.

Cette chitine, dite "native", peut servir à la préparation d'une suspension de chitine "colloïdale". La chitine native est solubilisée dans H_2SO_4 16 N à 0 °C (glace fondante) et reprécipitée par dilution dans l'eau sous agitation mécanique énergique, puis lavée par centrifugations. Cette chitine colloïdale convient très bien comme substrat pour les dosages enzymatiques (notamment par méthode néphélométrique) et comme source de chitine pour les milieux de culture microbiologique, ou encore pour la mise en évidence sur plaque d'agar-agar (milieux gélosés à la chitine) (Jeuniaux 1958, 1959).

La préparation du chitosane consiste en une déacétylation partielle de la chitine préalablement purifiée. Cette déacétylation peut être obtenue par un traitement par KOH ou NaOH à 40 % à ébullition (soit ± 115 °C), pendant 4 à 8 heures. Il est préférable de travailler sous atmosphère inerte. Une méthode alternative (Horton *et al.*, 1965) consiste en une fusion alcaline à 180 °C pendant 30 minutes. Le chitosane ainsi préparé est insoluble dans l'eau, les alcalis et les solvants organiques, mais soluble dans la plupart des acides organiques en solution (jusqu'à 10 vol %), notamment dans l'acide acétique et l'acide formique. Il peut être séché et broyé mécaniquement en poudre.

La qualité du chitosane pour ses applications technologiques dépend de son degré de déacétylation et de son poids moléculaire. L'idéal est d'obtenir un polymère fortement déacétylé (plus de 50 % de résidus de glucosamine) mais très peu dépolymérisé. Or, l'élévation de température (ou la durée du traitement alcalin) favorise la déacétylation, mais favorise aussi la dépolymérisation. Ce mode de préparation fournit donc des chitosanes de caractéristiques différentes, qui dépendent de la source de chitine, de la taille des particules et de la durée et des modalités des traitements de déacétylation. Chaque lot de chitosane doit donc être caractérisé par son degré de déacétylation (mesuré par dosage potentiométrique, ou mieux par spectrométrie infrarouge : Sannan *et al.* 1978) et par sa viscosité intrinsèque, qui dépend directement du poids moléculaire. On mesure habituellement la viscosité d'une solution à 1 % dans HAC 1 vol %.

Possibilités d'exploitation du milieu marin comme source de chitine

Nous venons de rappeler que les firmes qui produisent du chitosane utilisent toutes des carapaces de Crustacés comme source de chitine, ce qui ne va pas sans poser des problèmes de reproductibilité de la qualité du produit, d'élimination des déchets (énormes quantités de solutions d'HCl et de CaCl₂) et aussi d'approvisionnement.

Dans une enquête sur les sources alternatives de chitine, nous avons cherché à mesurer les biomasses de chitine disponibles dans le milieu marin, ainsi que la production de chitine par divers types de communautés ou de biocénoses marines. En effet, l'exploitation rationnelle de toute ressource naturelle renouvelable implique une bonne mesure préalable de sa production.

Le zooplancton est particulièrement digne d'attention, car il est constitué principalement de Crustacés Entomostracés (dans le cas du zooplancton de surface) ou d'Euphausiacés (dans le cas du krill), dont les cuticules sont peu calcifiées, ce qui réduit considérablement le coût et le temps de la première étape de purification de la chitine.

Pour le krill, nous avons calculé la production de chitine sur la base des données de biomasse et de production globales publiées par Lindley (1982) pour l'Atlantique Nord et l'océan Arctique. En tablant sur une proportion de chitine égale à 7,08 % du poids sec (Yanase 1975), les valeurs de biomasses de chitine correspondantes sont de 0,03 à 0,6 mg par m³ d'eau, et les valeurs de production les plus élevées sont de 0,9 mg par m³ et par an, soit, par m² de surface d'océan, environ 45 mg par m² et par an (sans tenir compte, toutefois, des exuvies qui peuvent constituer une production de chitine bien supérieure).

En regard de ces valeurs, la production du zooplancton de surface, essentiellement composé de Copépodes et de Cladocères, est nettement plus élevée. Nous l'avons mesurée dans la baie de Calvi (Corse) (Gervasi *et al.* 1988) où nous avons trouvé une production moyenne annuelle de chitine de 1 g par m² et par an (compte tenu, dans ce cas-ci, de la production d'exuvies).

Cette valeur élevée s'explique par la proportion relativement élevée de chitine chez les principales espèces de crustacés zooplanctoniques, ainsi que par la vitesse de développement de

ces organismes. Remarquons que la production de chitine n'est pas constante au cours de l'année : la période d'avril-mai connaît un pic de production très net, correspondant à 20 mg de chitine par m² et par jour, soit une biomasse disponible de 414 mg/m²

Nous avons également mesuré les biomasses et la production de chitine, toujours en baie de Calvi, par les communautés benthiques qui se développent sur substrats rocheux, en milieu infralittoral (Jeuniaux *et al.* 1986, 1988). Les biomasses moyennes de chitine de la couverture biologique (Crustacés Décapodes non compris) étaient de 0,7 g/m² pour les biocénoses photophiles, et de 0,27 g/m² pour les communautés sciaphiles. Mais les Crustacés Décapodes, à eux seuls, contribuent à la biomasse de chitine pour des valeurs du même ordre de grandeur. Pour mesurer la production de chitine par ces communautés benthiques, nous avons immergé des plaques de substrats durs, à différentes profondeurs, et nous avons mesuré la biomasse produite après diverses durées d'immersion. A 18 m de profondeur, la production de chitine était de 300 mg par m² par an pendant la première année d'immersion, et montait à 1 g par m² par an pendant la deuxième année. La production était trois fois moins importante à 37 m de profondeur. Remarquons que ces valeurs concernent la chitine produite par des organismes fixés, souvent encroûtants, en l'occurrence surtout Hydrozoaires, Bryozoaires, Mollusques. Il s'agit donc d'un matériel biologique très calcifié.

Nous pouvons comparer ces productions avec celle d'une population naturelle d'une grande espèce de Crustacé Décapode, la Langouste épineuse (*Panulirus homarus*), étudiée par Berry *et al.* (1980) sur un récif isolé de la côte du Natal. Si on tient compte de la production d'exuvies et du taux de chitine dans la cuticule, on peut calculer que la production de chitine par cette seule espèce est de 1,5 g par m² et par an.

On voit donc que le milieu marin offre diverses sources de chitine, dont la production annuelle est à peu près du même ordre de grandeur par unité de surface. Seule, la production due au krill, en Atlantique Nord du moins, est nettement moins favorable. La production de chitine par les Crustacés Décapodes est la plus élevée, mais la chitine est "contaminée" par de fortes quantités de CaCO₃. La production de chitine par le zooplancton de surface est du même ordre de grandeur et fournit des biomasses très élevées à certaines périodes de l'année. Cette source de chitine est d'autant plus intéressante qu'elle est peu minéralisée.

Application technologique à l'épuration des eaux

Chitine et chitosane possèdent des propriétés de chélation et d'adsorption qui peuvent être mises à profit pour l'épuration d'eaux polluées par des métaux lourds ou par des composés organochlorés fortement rémanents et toxiques, comme la dieldrine, le lindane ou les polychlorobiphényles (PCB). Nos essais ont porté sur un mélange de PCB couramment employé dans les transformateurs électriques : l'Arochlor 1260 (Thomé *et al.* 1985). L'adsorption de ce micropolluant sur le chitosane est rapide et efficace. Le pouvoir adsorbant du chitosane vis-à-vis des PCB ne dépend pas du degré de dépolymérisation du chitosane (mesuré par la viscosité d'une solution à 1 % dans HAC 1 vol %).

L'adsorption des PCB sur chitine et sur chitosane a été comparée à l'adsorption sur silicagel et charbon actif, réputés pour leur efficacité. La figure 1 montre la quantité de PCB adsorbée à partir de 100 ml d'une solution d'Arochlor 1260 à 0,5 µg/l, après filtration sur une colonne de 100 ou 200 mg d'adsorbant. Les résultats sont exprimés en nanogrammes de PCB fixés par g d'adsorbant, ou en "facteur de concentration". On voit que, vis-à-vis des PCB, chitosane et chitine ont des propriétés adsorbantes supérieures au silicagel C18 et au charbon actif. Les PCB fixés sur le chitosane ne sont pas liés par des liaisons covalentes fortes, car il est aisé de les éluer par quelques ml d'hexane, et ainsi de régénérer la colonne.

Nous avons voulu appliquer cette technique d'épuration d'eau en vraie grandeur et vérifier son effet sur des organismes aquatiques. Le dispositif utilisé consistait en un circuit d'eau provenant d'un étang, polluée par addition d'Arochlor 1260 en solution dans l'acétone, de manière à obtenir une concentration dans l'eau de $\pm 0,5 \mu\text{g/l}$. Un bac témoin ne recevait que l'acétone. L'eau polluée alimentait deux bassins d'élevage de Barbeaux, l'un directement (Bac B), l'autre après filtration sur colonne de chitosane (Bac C). Le débit était maintenu à 36 l/jour; la teneur en PCB de l'eau et des tissus des poissons a été analysée de jour en jour.

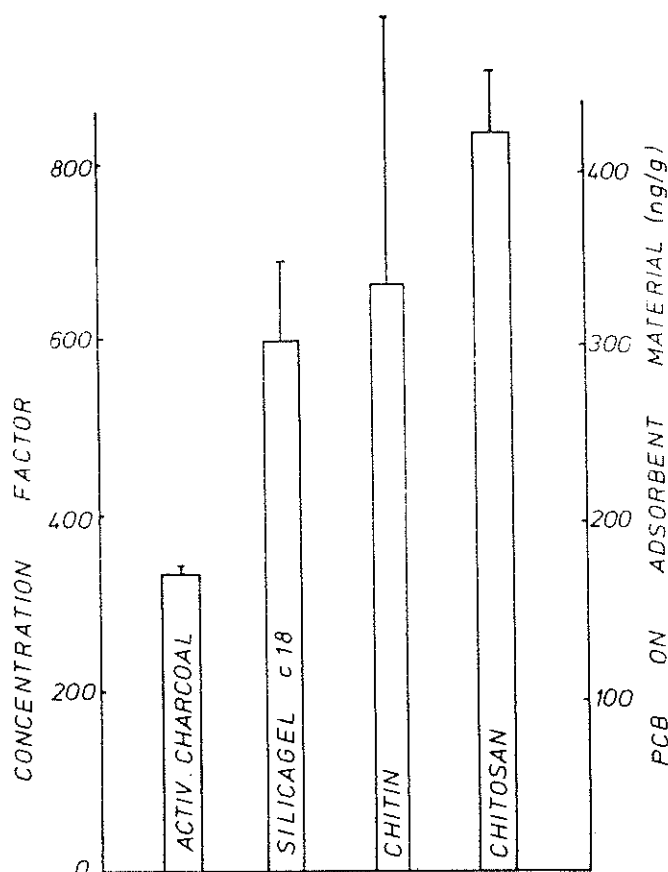


Fig. 1 - Capacités d'adsorption de différents substrats vis-à-vis des PCB en solution aqueuse ($0,5 \mu\text{g PCB/l}$).

-Adsorption efficiency of various materials in removing PCB from spiked water ($0.5 \mu\text{g PCB/l}$).

Dans le bac B, alimenté directement par l'eau contaminée, la concentration en PCB de l'eau s'est maintenue à $0,5 \mu\text{g/l}$, et la teneur en PCB des tissus des poissons s'est élevée sensiblement au-dessus de celle des témoins, jusqu'à atteindre presque $2 \mu\text{g}$ par g de tissus. Après 200 h, les poissons survivants ont montré une diminution du taux de PCB dans les tissus, résultat de la mise en route d'un processus de détoxification.

Dans le bac C, alimenté par la même eau après passage sur colonne de chitosane, la teneur en PCB de l'eau était fortement réduite, et celle des tissus des poissons restait au même niveau que celle des poissons témoins.

On peut éliminer totalement les PCB présents dans l'eau en associant le charbon actif et le chitosane en une même colonne.

CONCLUSION

Le milieu marin est une source de chitine facilement disponible, permettant la préparation et la mise sur le marché de dérivés tels que le chitosane, dont les applications technologiques

potentielles sont nombreuses et diversifiées, notamment dans le domaine médical et pour la protection de l'environnement. Les obstacles actuels à la généralisation de ces nouvelles techniques relèvent de la routine et d'une certaine méfiance vis-à-vis d'un produit nouveau dont la disponibilité sur le marché n'est pas suffisamment garantie.

Références bibliographiques

- Allan G.G., Fox J.R. & Kong N., 1978.- Marine polymers : part 8 : A critical evaluation of the potential sources of chitin and chitosan. In : (Muzzarelli R.A.A. & Pariser E.R.eds.), *Proceed. First Internat. Conf. Chitin/Chitosan.* : 68-78.- MIT Sea Grant Program, 78.7, Massachusetts.
- Berry P.F. & Smale M.J., 1980.- An estimate of production and consumption rates in the spiny lobster *Panulirus homarus* on a shallow littoral reef off the Natal Coast, South Africa.- *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 2 : 337-343.
- Braconnot H., 1811.- Recherches analytiques sur la nature des champignons.- *Ann. Chim.*, 79 : 265-304.
- Gervasi E., Jeuniaux Ch. & Dauby P., 1988.- Production de chitine par les crustacés du zooplancton de la baie de Calvi (Corse). In : *Aspects récents de la Biologie des Crustacés.*- IFREMER ed., Brest (France) : 33-38.
- Hirano S. & Tokura S., 1982.- *Chitin and chitosan.* Japanese Soc. for Chitin/Chitosan, Tottori, Japan, 254 p.
- Horton D. & Lineback D.R., 1965.- N-deacetylation : chitosan from chitin.- *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5 : 403-406.
- Jeuniaux Ch., 1958.- Recherches sur les chitinases. I : dosage néphélométrique et production de chitinase par des Streptomycètes.- *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, 56 : 408-427.
- Jeuniaux Ch., 1959.- Recherches sur les chitinases. II : purification de la chitinase d'un Streptomycète, et séparation électrophorétique de principes chitinolytiques distincts.- *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, 57 : 597-617.
- Jeuniaux Ch., 1963.- *Chitine et chitinolyse, un chapitre de la biologie moléculaire.* Paris : Masson, 181 p.
- Jeuniaux Ch., 1965.- Chitine et phylogénie : application d'une méthode enzymatique de dosage de la chitine.- *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 : 2267-2278.
- Jeuniaux Ch., 1982.- La chitine dans le règne animal.- *Bull. Soc. Zool. France*, 107 : 363-386.
- Jeuniaux Ch., Bussers J.C., Voss-Foucart, M.F. & Poulícek M., 1986.- Chitin production by animals and natural communities in marine environment. In : (Muzzarelli, Jeuniaux & Gooday, eds.) *Chitin in Nature and Technology.*- Plenum Press, N.Y. : 515-522.
- Jeuniaux Ch., Voss-Foucart M.F., Gervasi E., Bussers J.C. & Poulícek M., 1988.- Biomasse et production de chitine par des biocénoses benthiques et planctoniques de la baie de Calvi.- *Bull. Soc. R. Sci. Liège*, 57 : 287-299.
- Lindley J.A., 1982.- Continuous plankton records : geographical variations in numerical abundance, biomass and production of Euphausiids in the North Atlantic Ocean and the North Sea.- *Mar. Biol.*, 71 : 7-10.
- Murray A.E. and Hattis D., 1978.- Approaches to a practical assessment of supply and demand for chitin products in the United States. In : (Muzzarelli R.A.A. & Pariser E.R.eds.) *Proceed. First Internat. Conf. Chitin/Chitosan.* : 30-44.- MIT Sea Grant Program, 78.7, Cambridge (Mass.).
- Muzzarelli R.A.A. & Pariser E.R., 1978.- Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan. MIT Sea Grant Report 78.7, Cambridge (Mass.), 652 p.
- Muzzarelli R.A.A., Jeuniaux Ch. & Gooday G., 1986.- *Chitin in Nature and Technology.*- Plenum Press, N.Y., 583 p.
- Odier A., 1823.- Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des Insectes.- *Mém. Soc. Hist. Nat. Paris*, 1 : 29-42.
- Perceval P.M., 1978.- The economics of chitin recovery and production. In : (Muzzarelli R.A.A. & Pariser E.R. eds.) *Proceed. First Internat. Conf. Chitin/Chitosan.*- MIT Sea Grant Program, 78.7, Cambridge (Mass.).
- Rudall K.M., 1955.- The distribution of collagen and chitin.- *Symposia Soc. Exper. Biol.*, 9 : 49-71.

- Ruiz-Herrera J., 1978.-** The distribution and quantitative importance of chitin in fungi. *In* : (Muzzarelli R.A.A. & Pariser E.R. eds.) *Proceed. First Internat. Conf. Chitin/Chitosan* : 11-21.- MIT Sea Grant Report, 78.7, Cambridge (Mass.).
- Sannan T., Kurita K., Ogura K. & Iwakura Y., 1978.-** Studies on chitin : 7. I.R.Spectroscopic determination of degree of deacetylation.- *Polymer*, 19 : 458-459.
- Skjak-Braek G., Anthonsen Th. & Sandford P., 1989.-** *Chitin and chitosan* (Proceed. 4th intern. Conf. Chitin and Chitosan, Trondheim, 1988). Elsevier, London and N.Y., 835 p.
- Thomé J.P. & Van Daele Y., 1985.-** Adsorption of polychlorinated biphenyls (PCB) on chitosan and application to decontamination of polluted stream waters. *In* : (Muzzarelli R.A.A., Jeuniaux Ch. & Gooday G. eds.) *Chitin in Nature and Technology*.- Plenum Press, N.Y. : 551-554.
- Yanase M., 1975.-** Chemical composition of the exoskeleton of Antarctic Krill.- *Bull. Tokai Reg. Fish Res. Lab.*, 83 : 1-6.