

## Université Constantine 1



Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Microbiologie

### Mémoire

**En vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie**

**Option :** Biotechnologie des mycètes, fermentation et production de substances fongiques

**Intitulé**

**Contribution à la valorisation de plumes de volaille comme  
élément de milieu de fermentation fongique**

Présenté par :

Djebbar Selmane

Yousfi Billel

**Jury de soutenance :**

**Président :** Mr. DEHIMAT L

Pr. Université de Constantine 1

**Encadreur :** Mr. KACEM CHAOUICHE N

Pr. Université de Constantine 1

**Examineur :** Mlle. LAHLAH F.Z

MAA. Université de Constantine 1

**Tutrice :** Melle. AIT KAKI A

Docteur. Université de Constantine 1

Année Universitaire

2013-2014

## ***Remerciements***

*Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude avant tout au bon dieu qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.*

*Nous tenons à adresser nos remerciements les plus sincères et chaleureux à Mr KACEM CHAOUICHE N ; professeur à l'Université Constantine 1 d'avoir assuré notre encadrement.*

*Nous tenons aussi à exprimer toute notre gratitude à Mr DEHIMET L ; doyen de la faculté des sciences de la nature et de la vie pour avoir accepté la présidence de ce jury.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aussi à Mlle LAHLAH qui a acceptée d'examiner notre travail avec bienveillances et nous en sommes très honoré.*

*Egalement nous remercions Mlle AIT KAKI A pour ces conseils ; qui ont éclairé notre chemin.*

*Enfin, nous remercions toute l'équipe du laboratoire LaMyBAM et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Dédicace

*Je dédie cet événement marquant de ma vie à la mémoire de ma défunte grand-mère. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, elle apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un petit fils qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.*

*A mes tantes, et oncle (Ouarda Gamra Fatima et Yacine),*

*Pour l'affection, la tendresse et l'amour dont vous m'avez toujours entouré,*

*Pour l'encouragement sans limites que vous ne cessez de manifester.*

*Puisse le grand puissant vous donne bonne santé et longue vie.*

*A mes parents,*

*Pour vos immenses sacrifices, votre courage et surtout votre patience et votre compréhension.*

*Grâce à votre bienveillance, à vos encouragements et à votre générosité, j'ai pu terminer mes études dans l'enthousiasme.*

*Que ce travail puisse être le résultat de vos efforts et de vos sacrifices.*

*Puisse le bon dieu vous protège et vous accorde longue vie.*

*A mon frère Djallel, son épouse Bani et leurs enfants*

*A ma sœur lillia, son époux Brahim et leurs enfants*

*Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection la plus sincère.*

*A mon binôme Selmane et nos amis Walid et Abdelkader,*

*Je vous suis reconnaissant pour tous les moments de bonheur qu'on a passés,*

*Période de ma vie qui restera gravée dans ma mémoire à jamais.*

*A tous mes enseignants du primaire jusqu'à l'université.*

*A tous mes ami(e)s et tous ceux qui me sont chers.*

*A tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à l'élaboration de ce travail,*

**Billel**

## *Dédicace*

*Je remercie dieu tout puissant de m'avoir donné la force et le courage pour accomplir ce modeste travail, que je dédie :*

*A ma mère celle qui ma mit au monde, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite. Merci Maman je t'aime.*

*A mon père qui a été mon ombre durant toutes les années des études et celui qui m'a toujours pousser en avant ; à toi papa un grand merci*

*A mes très chers sœurs : ESMA et SELMA. Merci infiniment pour votre soutient*

*A mon binôme BILLEL, ainsi qu'à sa tante TATA WARDA et TONTON YACINE merci pour vos encouragement et votre soutient durant toute au long de notre formation.*

*A tous les membres de ma grande famille qui n'a pas saisi de m'encourager*

*A mes complices durant mes années d'études Abd elkader, Billel, Walid et Raouf je n'oublier jamais les bons moments que j'ai passé avec vous.*

*A tous mes enseignants de puis le primaire jusqu'à l'université*

*A tous mes ami(e)s et tous ce qui me sont chers*

*A ce qui on contribuer de près ou de loin à ce travail*

*SELMANE*



# Liste des figures

**Figure 1 :** Différentes parties de la plume.

**Figure 2 :** Oxydation des groupements thiols de 2 cystéines et la formation des groupements disulfures.

**Figure 3 :** Plumes de volailles.

**Figure 4 :** Farine de plume.

**Figure 5 :** Milieux de fermentation avec différentes concentrations en glucose.

**Figure 6 :** Aspect morphologique des souches fongiques K3 et KB sur milieu Sabouraud.

**Figure 7 :** Evaluation de l'activité kératinolytique développée par les souches *Absidia sp* (KB) et *Aspergillus sp* (K3) dans le milieu de fermentation liquide à base de farine de plume de poulet.

**Figure 8 :** Effet du pH sur l'activité kératinolytique de la souche *Absidia sp*.

**Figure 9 :** Effet de la température sur l'activité kératinolytique de la souche *Absidia sp*.

**Figure 10 :** Effet de concentration de glucose sur l'activité kératinolytique de la souche *Absidia sp*.

# Liste des tableaux

**Tableau 1** : Production du poulet estimée en 2012.

**Tableau 2** : Nombre de têtes de poulet dans les différents pays du grand Maghreb, du 2001 à 2007.

**Tableau 3** : Procédés de valorisation matière ou de valorisation organique des plumes.

**Tableau 4** : Contenu en acides aminés dans les fibres kératiniques de plumes de volailles.

**Tableau 5** : Diversité des micro-organismes kératinolytiques et certaines propriétés biochimiques de kératinases.

**Tableau 6** : Caractères morphologiques des Souches fongiques KB et K3.

**Tableau 7** : Caractères microscopique des souches K3 et KB.

## Liste des abréviations

% : pourcentage

F.A.O: Food Agriculture Organisation

E.C : Enzyme Commission

pH : potentiel hydrogène

kDa: kilo dalton

°C : degré celcusse

min : minute

Km : kilomètre

h : heure

g: gramme

CYA : Czapek Yeast Agar

rpm : rotation par minute

Mg : milligramme

Nm : nanomètre

U : unité

ml : millilitre

$A_{280}$  : absorbance a la longueur d'onde 280.

MADR : Ministère de d'Agriculture et du Développent Rural.



# Sommaire

<b>1- Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>2- Revue bibliographique.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1- Production mondiale de la volaille.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2- Production de la volaille en Algérie .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3- Déchets de volailles.....</b>	<b>5</b>
<b>2.4- Valorisation des plumes de volaille.....</b>	<b>5</b>
<b>2.5- Plumes de volaille.....</b>	<b>6</b>
<b>2.5.1- Rôle et morphologie.....</b>	<b>6</b>
<b>2.5.2- Composition de plumes de volailles.....</b>	<b>6</b>
<b>2.6- kératines.....</b>	<b>7</b>
<b>2.6.1- Généralités.....</b>	<b>7</b>
<b>2.6.2- Kératines de plumes .....</b>	<b>8</b>
<b>2.7- Kératinases.....</b>	<b>9</b>
<b>2.7.1- Source microbiennes de kératinase .....</b>	<b>9</b>
<b>2.7.1.1- Bactéries kératinolytiques.....</b>	<b>10</b>
<b>2.7.1.2- Moisissures kératinolytiques.....</b>	<b>10</b>
<b>2.7.2- Caractères moléculaires et biochimique des kératinases.....</b>	<b>11</b>
<b>2.7.2.1- Conditions physicochimiques optimales.....</b>	<b>12</b>
<b>2.7.2.2- Poids moléculaire.....</b>	<b>12</b>
<b>2.7.2.3- Substrats spécifiques.....</b>	<b>12</b>
<b>2.7.3- Applications industrielles des kératinases.....</b>	<b>12</b>

2.7.3.1- Traitement des résidus de kératine.....	13
2.7.3.2- Détergent.....	14
2.7.3.3- Dégradation des prions .....	14
2.7.3.4- Industrie du cuir.....	14
2.7.3.5- Autres applications.....	15
<b>3- Matériels et méthodes.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1- Echantillonnage .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2- Isolement des moisissures.....</b>	<b>16</b>
3.2.1- Milieu d'isolement.....	16
3.2.2- Dilutions.....	17
3.2.3- Ensemencement.....	17
<b>3.3- Purification des souches.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4- Identification des souches .....</b>	<b>18</b>
3.4.1- Identification macroscopique .....	18
3.4.2- Identification microscopique.....	18
<b>3.5- Conservation.....</b>	<b>19</b>
<b>3.6- Méthodes de fermentation.....</b>	<b>19</b>
3.6.1- Préparation de l'inoculum.....	19
3.6.2- Méthode de culture.....	19
3.6.3- Effet de la concentration de source de carbone.....	19
<b>3.7- Etude de l'activité kératinolytique.....</b>	<b>20</b>
3.7.1- Préparation des extraits enzymatiques.....	20

3.7.2- Dosage de l'activité kératinolytique.....	20
3.8- Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique.....	21
<b>4- Résultats.....</b>	<b>22</b>
4.1- Isolement des souches kératinolytiques.....	22
4.2- Identification des souches isolées.....	22
4.2.1- Identification macroscopique.....	22
4.2.2- Identification microscopique.....	23
4.3- Etude de l'activité kératinolytique produite.....	24
4.4- Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique.....	25
4.5-Effet de la concentration de source de carbone sur l'activité kératinolytique.....	26
<b>5- Discussions.....</b>	<b>27</b>
<b>6- Conclusion et perspectives.....</b>	<b>30</b>

**Résumé**

**Abstract**

**المخلص**

**Références bibliographiques**

**Annexes**

## 1- Introduction

Dans le monde, les usines de transformation de la volaille produisent des millions de tonnes de plumes par an en tant que déchets (Williams *et al.*, 1991), leur teneur en  $\beta$ -kératine est en grande partie responsable de leur haut degré de résistance aux processus de dégradation (Onifade *et al.*, 1998). La grande quantité de plumes produites et leur accumulation créent un problème d'élimination entraînant une pollution de l'environnement. Dans plusieurs pays, l'industrie utilise l'incinération pour éliminer les plumes de volaille et autres déchets. Cependant, cette méthode présente des inconvénients écologiques importants.

Par ailleurs, une utilisation actuelle de plumes de volaille consiste en leurs transformations en farine de plumes. Cette dernière englobe une protéine alimentaire digestible pour la nutrition animale, issue du traitement des plumes avec de la chaleur humide (Morris et Balloun, 1973). Ce procédé a un inconvénient, car certains acides aminés sensibles à la chaleur, tels que la méthionine, la lysine, le tryptophane, sont dégradés (Marcondes *et al.*, 2007).

Le développement des méthodes enzymatique et / ou microbiologiques pour l'hydrolyse de plumes en protéines solubles et des acides aminés est extrêmement attractive, car il offre des méthodes faciles et bon marché pour la production de substances de valeur. Ces méthodes peuvent être utilisées pour produire des acides aminés rares comme la sérine, la cystéine, et la proline (Gupta et Ramnani, 2006).

Dans la nature, les kératines sont hydrolysées par certains micro-organismes qui synthétisent les kératinases. Ces enzymes ont la capacité de dégrader la kératine native en entités peptidiques plus petites qui peuvent, ensuite, être absorbées par les cellules (Gupta et Ramnani, 2006).

Les enzymes kératinolytiques sont répandus dans la nature et sont élaborées par plusieurs micro-organismes, la plupart isolées des déchets de volaille. Ces organismes comprennent les bactéries, les actinomycètes et les champignons (Gupta et Ramnani, 2006).

C'est cette caractéristique que nous avons exploitée dans ce travail dans le but d'étudier la production de kératinase par des moisissures isolées localement de fermes de poulet, en utilisant les plumes de volaille en tant que seule source de carbone et d'azote. Pour cela nous nous sommes fixés plusieurs objectifs, réalisés en 4 étapes.

La 1<sup>ère</sup> étape est l'isolement des moisissures kératinolytiques, sur milieu sélectif à base de farine de plumes, et l'identification de ces souches.

La 2<sup>ème</sup> étape porte sur le dosage de l'activité kératinolytique des souches dans le but de sélectionner la souche la plus performante.

La 3<sup>ème</sup> étape est l'étude de l'effet de température et du pH sur l'activité kératinolytique.

La 4<sup>ème</sup> et dernière étape consiste en l'étude de l'effet d'une source de carbone sur la production de kératinase.

## 2- Revue bibliographique

### 2.1- Production mondiale de la volaille

La production et la consommation de la volaille dans le monde ont connus un développement important au cours des 30 dernières années. En effet, la chair de volaille est la deuxième viande la plus consommée au monde, avec une production en croissance permanente, qui a atteint 91,6 et 101 millions de tonnes en 2009 et 2011, respectivement. Le poulet prédomine la production mondiale de la volaille (85 % de la production totale), suivi de la dinde, le canard, les pintades, les autruches et les pigeons. Les États-Unis et la Chine sont les premiers pays producteurs du poulet, suivi du Brésil, les 27 pays de l'Union Européenne (UE), l'Inde et la Russie, comme indiqué dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Production du poulet estimée en 2012 (Source : FAOSTAT).

<b>Pays</b>	<b>Production du poulet (millions de tonnes)</b>
<b>USA</b>	<b>19.8</b>
<b>Chine</b>	<b>18.5</b>
<b>Brésil</b>	<b>13.1</b>
<b>UE 27</b>	<b>12.2</b>
<b>Inde</b>	<b>2.5</b>
<b>Russie</b>	<b>3.3</b>
<b>monde</b>	<b>104.5</b>

### 2.2- Production de la volaille en Algérie

La filière avicole en Algérie, dans la période 1962-1969, était essentiellement fermière sans organisation particulière et n'occupait qu'une place très modeste dans la structure de la ration alimentaire de l'Algérien. L'Algérie a opté, par la suite, pour la mise en place d'un circuit avicole moderne, à travers les différents plans de développement. En effet, trois périodes différentes, du point de vue organisationnel, sont distinguées, en l'occurrence: la période 1969-1979 qui constitue l'amorce du programme de développement des productions animales, dont l'aviculture ; la période 1980-1984 qui a vu la mise en place d'un programme spécial pour l'aviculture, qui est « le plan avicole », visant une réorganisation du secteur avicole ; et

la période 1985-1989 qui constitue une continuité du plan précédant avec une augmentation des objectifs de consommation (Djerou, 2006).

Ces dernières années, la filière avicole algérienne a atteint un stade de développement appréciable dans l'économie agricole. Les productions, ont atteint ainsi les 253.000 tonnes selon les statistiques de la FAO de 2011 (MADR, 2012).

L'Algérie figure dans les premières places dans l'élevage des poulets parmi les pays de la région du Grand Maghreb (tableau 2). En fait, l'Algérie représente 20 à 35% du cheptel de volaille de la région selon les espèces, avec un nombre de têtes de poulets qui a atteint 124 millions en 2007. Par ailleurs, l'Algérie a été classée ces dernières années, en deuxième position derrière le Maroc, avec un nombre de têtes de poulets atteignant 140 millions, représentant ainsi 34,71 % du cheptel de la région (Nouad, 2011).

**Tableau 2** Nombre de têtes de poulets dans les différents pays du grand Maghreb, de 2001 à 2007, selon les données statistiques de la FAO, 2007 (Nouad, 2011).

<b>Cheptel poulets – production annuelle (Nombre de têtes)</b>							
<b>(x 1000)</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>
<b>Algérie</b>	<b>110 000</b>	<b>120 000</b>	<b>125 000</b>	<b>125 000</b>	<b>125 000</b>	<b>125 000</b>	<b>124 000</b>
<b>Libye</b>	<b>25 000</b>	<b>25 000</b>	<b>25 000</b>	<b>25 000</b>	<b>25 000</b>	<b>25 000</b>	<b>25 000</b>
<b>Maroc</b>	<b>137 000</b>	<b>137 000</b>	<b>137 000</b>	<b>137 000</b>	<b>137 000</b>	<b>140 000</b>	<b>140 000</b>
<b>Mauritanie</b>	<b>4 100</b>	<b>4 200</b>	<b>4 200</b>	<b>4 200</b>	<b>4 200</b>	<b>4 200</b>	<b>4 200</b>
<b>Tunisie</b>	<b>61 417</b>	<b>62 000</b>	<b>62 000</b>	<b>64 000</b>	<b>64 000</b>	<b>62 000</b>	<b>64 000</b>
<b>Total</b>	<b>337 517</b>	<b>348 200</b>	<b>353 200</b>	<b>355 200</b>	<b>355 200</b>	<b>356 200</b>	<b>357 200</b>
<b>% Algérie</b>	<b>32.59%</b>	<b>34.46%</b>	<b>35.39%</b>	<b>35.19%</b>	<b>35.19%</b>	<b>35.09%</b>	<b>34.17%</b>

### 2.3- Déchets de volailles

L'industrie mondiale de la volaille est énorme et elle est considérée parmi les plus polluantes en raison des grandes quantités de déchets générés. En effet, la viande destinée à l'alimentation humaine ne représente que 68 à 72 % et 78 % de chaque poulet et de chaque dinde, respectivement alors que le reste devient des déchets après sa transformation (Haines, 2004). Il est à noter qu'environ 4 millions de tonnes de déchet de plumes de volaille sont produits par an dans le monde entier (Saha, 2009). Ces déchets constituent cependant, une source potentielle de biomasse valorisable en raison de leurs teneurs en matière organique et en fibres.

### 2.4- Valorisation des plumes de volaille

A l'instar de la laine et du cuir, les plumes et duvets sont des co-produits de l'industrie alimentaire. Ces deux matières naturelles ont des caractéristiques physiques spécifiques. En effet, leur pouvoir isolant et leur légèreté leur donne la propriété d'être utilisées dans de nombreuses applications courantes (Nouad, 2011).

Les plumes et duvets ne doivent donc pas, sauf cas particuliers, être considérés comme des déchets au sens habituel du terme, mais plutôt comme une matière première naturelle traditionnelle, au même titre que le cuir, la laine, les peaux de lapins. etc (Nouad, 2011).

Les procédés identifiés comme voie potentielle de valorisation matière ou de valorisation organique des plumes sont résumés dans le tableau 3.

**Tableau 3** Procédés de valorisation matière et organique des plumes. Source : (Nouad, 2011).

Valorisation matière	Valorisation organique
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extraction kératinique pour la fabrication de peinture résistante à la lumière (projet européen- Polymérisation des fibres de plumes</li> <li>- Filage de la matière kératinique (applications textiles)</li> <li>- Fabrication de textile non tissé avec nappage de plumes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fabrication d'amendement organique (compost) à partir de plumes sèches (déchets de l'industrie d'anoblissement) ou humides (déchets d'abattage d'oiseaux terrestres) ou de farines de plumes hydrolysées</li> </ul>

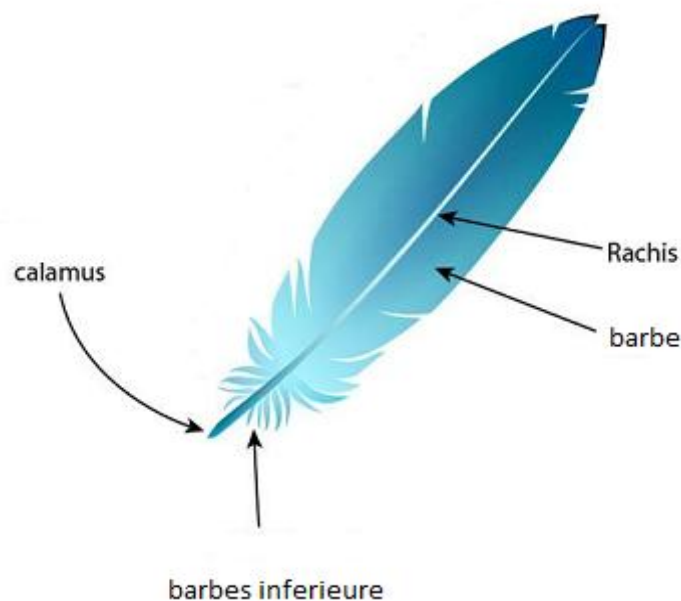


Malgré l'utilité des déchets de volaille, leurs valorisation en Algérie est inexistante (Nouad, 2011). En effet, l'industrie élimine ces déchets par les incinérer ou les jeter dans les décharges publiques, ce qui présente des risques écologiques énormes (Marcondes, 2008).

## 2.5- Plumes de volaille

### 2.5.1- Rôle et morphologie

Les plumes distinguent les oiseaux, d'autres vertébrés et jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et fonctionnels. La plupart des oiseaux adultes sont entièrement couverts par des plumes, sauf sur le bec, les yeux et les pieds. Les plumes ne confèrent pas seulement la capacité de vol, mais ils sont essentiels pour la régulation de la température, la protection, l'isolation, etc. La figure 1 illustre la morphologie des plumes qui se caractérisent par la présence d'une gaine épidermique qui se développe pour former un tube court de la base (calamus) et l'arbre principal (rachis). Les barbes s'étendent à un angle suivies par des barbules (Tseng, 2011).



**Figure 1** : Différentes parties de la plume (Saha, 2009).

## **2.5.2- Composition de plumes de volailles**

Les plumes de volailles se composent approximativement de 91% de protéines (kératine), 1% de lipides, et 8% d'eau. La séquence d'acides aminés d'une plume de volaille est très similaire à celle d'autres plumes. La séquence est composée en grande partie de la cystéine, la glycine, la proline, et la sérine, et ne contient presque aucune histidine, lysine, ou méthionine (Kannappan, 2012).

Parmi les éléments traces qu'on trouve dans les plumes, on note : le soufre (2,57%) ; le chlore (0,53%) ; le phosphore sous forme de pentoxyde (0,34%), le silicium sous forme d'acide silicique (0,22%) et le calcium sous forme d'oxyde (0,10%). Quelques légères différences peuvent exister dans la composition des plumes de divers genres de volaille. En fait, la teneur en graisse dans les plumes d'oie et le canard est supérieure à celle des plumes de poulets et de dindes (Saha, 2009).

## **2.6- kératines**

### **2.6.1- Généralités**

Les kératines sont des protéines fibreuses insolubles avec une très grande stabilité et un taux de dégradation faible (Tom sinoy *et al.*, 2011). Elles forment la plus grande partie des couches cornées de l'épiderme, et de ses appendices comme les cheveux, les poils, les ongles, les plumes, les écailles et les griffes (Jacques, 2003).

Il existe deux principaux groupes de kératine, les alpha-kératines et les bêta-kératines. Bien que les deux remplissent des rôles similaires, elles diffèrent légèrement dans la structure, la composition et les propriétés. Les alpha-kératines sont légèrement basique ou neutre et ont une structure hélicoïdale droitière et les bêta-kératines sont légèrement acides et forment aussi une structure hélicoïdale droitière (Selvam et Vishnupriya, 2012).

Le rôle de la kératine est d'assurer une protection de l'animal (ou de l'Homme) contre son environnement naturel. C'est pourquoi elle montre une grande résistance aux attaques chimiques et enzymatiques. Cette résistance est due à sa forte teneur en cystéine (Jacques, 2003).

### 2.6.2- Kératines de plumes

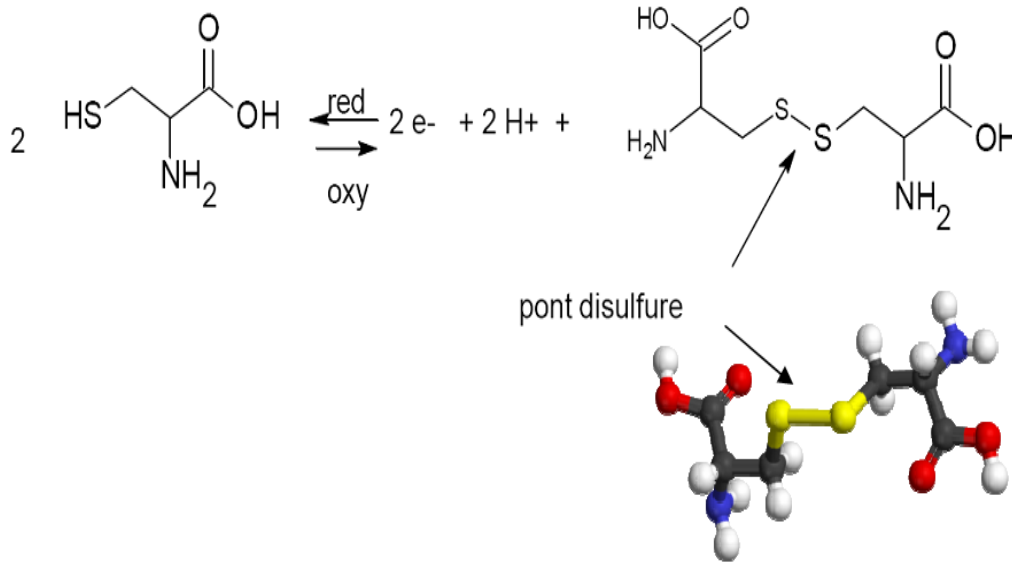
Les kératines de plumes comptent environ 20 types, dont la composition ne diffère que par quelques acides aminés. La répartition des acides aminés est fortement non uniforme, par rapport aux résidus basiques et acides. Les résidus de cystine sont concentrés dans les régions N- et C-terminales. La partie centrale est riche en résidus hydrophobes (Kannappan, 2012). Les acides aminés composants les kératines sont mentionnés dans le tableau 4.

**Tableau 4** Contenu en acides aminés des fibres kératiniques de plumes de volailles (Kannappan, 2012).

Acide aminé	Pourcentage (%)
arginine	4.30
Acide aspartique	6.00
glutamine	7.62
thréonine	4.00
serine	16.0
tyrosine	1.00
leucine	2.62
isoleucine	3.32
valine	1.61
cystine	8.85
alanine	3.44
phénylalanine	0.86
méthionine	1.02
proline	12.0
asparagine	4.00

La kératine de plume est une protéine particulière. Elle a une teneur élevée de cystéine (8.85%), un acide aminé soufré, qui est à l'origine de la formation de ponts disulfures, créant un réseau tridimensionnel compact engendrant une grande stabilité. La formation des ponts disulfures est assurée par oxydation des groupements thiols de deux cystéines appartenant à deux chaînes de kératine (figure 2) (Kannappan, 2012). La présence de ces liaisons en grand nombre confère une grande insolubilité dans les solvants classiques et une résistance aux

attaques chimiques. De ce fait, la kératine est une protéine particulière, résistante et stable (Jacques, 2003).



**Figure 2 :** Oxydation des groupements thiols de 2 cystéines et la formation des groupements disulfures (Berrada, 2007).

## 2.7- Kératinases

Les kératinases [EC 3.4.21/24/99.11] appartiennent au groupe des sérines ou metallo protéases capables de dégrader la kératine par réduction des liaisons disulfures de la kératine et la protéolyse (Gupta et Ramnani, 2006). Il s'agit d'une enzyme extracellulaire produite dans un milieu contenant des substrats kératiniques tels que les cheveux et les plumes (Selvam et Vishnupriya, 2012).

Donc les kératinases dans la nature contribuent de façon continue à l'élimination de la kératine contenue dans les déchets sous forme de poils, plumes d'oiseaux et d'animaux morts (Onifade *et al.*, 1998 ; Farag et Hassan, 2004).

### 2.7.1- Source microbiennes de kératinase

Les kératinases sont très répandues dans le monde microbien et elles peuvent être identifiées à partir des eucaryotes, bactéries et archaebactéries. Ces microorganismes ont été isolés à partir de divers environnements à savoir : les sols de l'Antarctique ; les sources chaudes et les

environnements aérobies et anaérobies. Par conséquent, les kératinases microbiennes présentent une grande diversité de leurs propriétés biochimiques et biophysiques (Saha, 2009).

### 2.7.1.1- Bactéries kératinolytiques

Chez les bactéries, la dégradation de la kératine est surtout confinée aux bactéries à Gram-positifs des genres *Bacillus*, *Lysobacter*, *Kocurica* et *Microbacterium*. Néanmoins, les bactéries du genre *Bacillus spp*, sont classées dans la littérature parmi les genres bactériens les plus importants en termes de production de kératinases. En effet, diverses souches de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* et *Bacillus cereus* ont été décrites comme kératinolytiques (Gupta et Ramnani, 2006).

Par ailleurs, un certain nombre de souches de bactéries Gram-négatif, à savoir : *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas* et *Chryseobacterium*, ont également été signalées récemment comme des souches kératinolytiques (Gupta et Ramnani, 2006).

En plus, quelques espèces thermophiles et extrémophiles appartenant aux genres *Fervidobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Bacillus* et *Nesternokia* ont également été décrites comme des producteurs de kératinase (Gupta et Ramnani, 2006).

En outre, les actinomycètes du groupe *Streptomyces*, à savoir *S. fradiae*, *S. pactum*, *S. albidoflavus*, *S. thermoviolaceus* SD8 et *S. graminofaciens*, et le groupe de Thermoactinomyces, à savoir *T. candidus*, sont communément décrit comme dégradeurs de la kératine avec une capacité d'agir sur une grande variété de substrats, y compris la kératine des cheveux, de la laine et des plume (Gupta et Ramnani, 2006).

### 2.7.1.2- Moisissures kératinolytiques

Dans les milieux naturels, les champignons kératinolytiques sont impliqués dans le recyclage du carbone, de l'azote et du soufre des kératines. Leurs présence et leurs distribution semblent dépendre de la disponibilité de la kératine, en particulier là où les humains et les animaux exercent une activité génitrice de déchets riches en kératine (Filipello, 2000). Bien avant d'être exploités en biotechnologie, certains champignons kératinolytiques ont été largement étudiés pour leurs effets pathogène dermatophytes tels que *Trichophyton microsporum*,

Bien que, certaines études sur le potentiel biotechnologique de ces genres soient disponibles, peu d'intérêt commercial leurs a été attribué en raison de leur pathogénicité (Saha, 2009).

Des kératinases présentant des propriétés biochimiques intéressantes ont été signalées à être produites par des champignons nondermatophytes à savoir : *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma*, *Doratomyces*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* et aussi *Acremonium*, *Alternaria*, *Beauveria*, *Penicillium Curvularia* (Marcondes *et al.*, 2008).

## 2.7.2- Caractères moléculaires et biochimique des kératinases

Les propriétés biochimiques et physico-chimiques des kératinases de plusieurs micro-organismes ont été largement étudiées. Ces propriétés englobent principalement le pH optimal, la température optimale et le poids moléculaire (tableau 5).

**Tableau 5** Diversité des micro-organismes kératinolytiques et certaines propriétés biochimiques de kératinases (Source : Saha, 2009).

Microorganismes	Poids moléculaire (kDa)	pH optimal	Température optimale
<i>Bacillus cereus</i>	80	8.5	50
<i>Bacillus licheniformis</i>	35	8.5	60
<i>Bacillus pumilis</i>	65	8	65
<i>Bacillus subtilis</i> KD-N2	35	8.5	55
<i>Bacillus subtilis</i> MTCC	69	6	40
<i>Fervidobacterium pennavorans</i>	130	10	80
<i>Kocuria rosea</i>	240	10	40
<i>Microbacterium sp. kr10</i>	42	7,5	50
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	18	6-9,5	40-70
<i>Aspergillus oryzae</i>	60	8	50
<i>Doratomyces microsporium</i>	30	8-9	50

### 2.7.2.1- Conditions physicochimiques optimales

Un aperçu général dans la littérature sur la stabilité du pH et de la température indique que les kératinases sont généralement actives et stables sur une large gamme de pH (5 à 13). En effet, La plus faible valeur de pH 4 a été observée dans le cas de *Streptomyces pactum DSM40530* (Bockle *et al.*, 1995), et la plus élevée, pH 13 chez *Bacillus halodurans AH-101*. Par ailleurs, la plupart des kératinases microbiennes sont des protéases alcalines ou neutres présentant un pH optimal allant de 7,5 à 9,0. Cependant, quelques kératinases possèdent un pH optimal alcalophile extrême supérieur à 12 (Selvam et Vishnupriya, 2012).

La température optimale de kératinases varie entre 30 et 80°C. En revanche, l'enzyme de *Chrysosporium keratinophilum* et de la bactérie thermophile *Fervidobacterium islandicum AW* ont montrés un niveau exceptionnellement élevé de la température optimale qui a atteint 90°C et 100°C, avec une demi-vie de 30 à 90 min, respectivement respectivement (Selvam et Vishnupriya, 2012).

### 2.7.2.2- Poids moléculaire

Les poids moléculaires des kératinases sont entre 18 et 200 kDa. À titre d'exemple *Streptomyces albidoflavus (SK 1-02)* (Chitte *et al.*, 1999) et *Fervidobacterium islandicum* (Nam *et al.*, 2002) produisent des kératinases dont les poids moléculaires équivalent à 18kDa et 200kDa respectivement. Cependant, le poids moléculaire peut dépasser les 440 kDa dans le cas de certains champignons pathogènes (Gupta et Ramnani, 2006).

### 2.7.2.3- Substrats spécifiques

Les kératinases ont une large spécificité de substrat et sont actives avec les deux substrats protéiques, solubles et insolubles. Parmi les protéines solubles, ils possèdent la capacité d'hydrolyser la caséine, la gélatine, l'albumine de sérum bovin et de l'hémoglobine, alors que parmi les protéines insolubles, elles hydrolysent des plumes, de la laine, de la soie, du collagène, de la corne, de la couche cornée, des cheveux et des ongles (Gupta et Ramnani, 2006).

## 2.7.3- Applications industrielles des kératinases

Les kératinases de microorganismes ont attiré beaucoup d'attention dans la dernière décennie, notamment en raison de la multitude de leurs applications industrielles telles que dans les

industries alimentaires animales, industrie des engrais, détergents, de la tannerie et l'industrie pharmaceutique (Gupta et Ramnani, 2006). En revanche, il est important de signaler que seulement les deux premiers secteurs sont actuellement exploités alors que les autres sont encore à l'échelle expérimentale (Brandelli *et al.*, 2009).

### **2.7.3.1- Traitement des résidus de kératine**

#### *- Elimination des déchets kératiniques*

Plusieurs millions de tonnes de plumes produites annuellement par l'industrie de l'élevage ce qui conduit à la pollution de l'environnement (Onifade *et al.*, 1998; Gousterova *et al.*, 2005). En effet, la structure fibreuse, insoluble et largement réticulé par du disulfure, de l'hydrogène et des liaisons hydrophobes de la  $\beta$ -kératine a donné à cette protéine une forte résistance à la dégradation par des protéases microbiennes communes, à savoir: la trypsine ; la pepsine et la papaine. Ainsi, l'importance des kératinases dans l'élimination de la pollution causée par les déchets des industries de volaille devient de plus en plus remarquable (Gousterova *et al.*, 2005).

#### *-- Farine de plume pour l'alimentation animale*

Jusqu'à ces dernières années, les plumes ont été cuites à haute température et pression et utilisées comme complément dans l'alimentation animale sous forme de farine de plumes. Le traitement hydrothermique, en plus d'être coûteux, aboutit à la destruction de certains acides aminés essentiels, à savoir : la méthionine, la lysine et le tryptophane, ce qui donne un produit à faible digestibilité (Wang et Parsons, 1997). Les inconvénients du traitement à haute température ont incités les industries de production de farine de plume à utiliser des kératinases microbiennes comme des alternatives intéressantes pour hydrolyser les plumes en aliment pour animaux riche en nutriments (Onifade *et al.*, 1998).

#### *- Farine de plume comme fertilisant*

La farine de plume concentré, riche en protéines générée pour l'alimentation des volailles peut également être appliquée à l'agriculture biologique comme engrais à libération lente d'azote.

La farine de plumes étant riche en azote (15% N), source peu coûteuse et facilement disponible sert de substitut potentiel au guano. Elle fournit non seulement de l'azote pour les plantes et favorise l'activité microbienne, mais stabilise aussi les structures du sol et augmente la capacité de rétention d'eau (Hadas et Kautsky, 1994).



### **2.7.3.2- Détergent**

Les enzymes protéolytiques ont dominées le marché des détergents depuis les temps anciens. En fait, la part d'environ 89% des enzymes détergents est celle des protéases alcalines. Néanmoins, il y a toujours un besoin pour de nouvelles enzymes avec des propriétés nouvelles qui peuvent en outre élargir le champ d'application de détergents à base d'enzymes (Gupta et Ramnani, 2006).

Les kératinases peuvent aider à éliminer des taches kératiniques qui sont souvent rencontrées dans la blanchisserie, tels que les cols de chemise, sur lequel la plupart des protéases ne parviennent pas à agir (Gupta et Ramnani, 2006).

Par ailleurs, une application étendue des kératinases dans les détergents est leurs utilisations comme additifs pour le nettoyage des canalisations bouchées par des déchets kératiniques (Frag et Hassan, 2004).

### **2.7.3.3- Dégradation des prions**

Les prions sont des particules protéiques responsables de maladies neurodégénératives appelées encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) qui incluent la maladie redoutée de la vache folle, la tremblante du mouton, le kuru et la maladie de Creutzfeld-Jakob. Ces prions ne peuvent pas être transmis par l'air ou par contact occasionnel. Ils sont transmis par contact avec les tissus infectés, des liquides corporels ou des instruments médicaux contaminés. Les kératinases semblent être les seules enzymes capables de dégrader les prions qui causent l'EST. Ainsi, elles sont utilisées dans le traitement des farines animalières et la désinfection des dispositifs médicaux (Van raamsdonk *et al.*, 2004).

### **2.7.3.4- Industrie du cuir**

Le traitement du cuir au niveau des tanneries consiste en une série d'opérations parmi lesquelles l'épilage, qui est une attaque atténuée du derme, c'est à dire du collagène, attaque qui doit être suffisamment faible pour ne pas provoquer de perte de substance (Amellal, 2007).

L'épilage alcalin est le plus souvent utilisé, il repose sur l'action des solutions alcalines sur la kératine. Elles sont généralement à base de chaux pure, soit de sulfure de sodium, soit d'un mélange de chaux et de sulfure de sodium (Amellal, 2007).

Quelques rapports indiquent que les kératinases pourraient être des agents d'épilage utiles (Allpress *et al.*, 2002; Friedrich et Kern, 2003). En effet, une kératinase de *B. subtilis* S14 (Macedo *et al.*, 2005) a été rapportée pour éliminer complètement la nécessité en sulfure de sodium toxique.

### **2.7.3.5- Autres applications**

Autres application potentielle des kératinases c'est la digestion anaérobie des déchets de volaille pour produire du gaz naturel comme combustible (Brutt et Ichida, 1999), elles peuvent aussi servir à la modification des fibres telles que la laine et la soie (Rissen et Antranikian, 2001).

Dans le domaine de la médecine et de la pharmacie elles sont employées pour l'élimination de l'acné, pour la préparation de vaccins pour la dermatophytose et comme additifs dans les agents pour éclaircir la peau car ils stimulent la dégradation de la kératine (Vignardeta *et al.*, 2001).

### **3- Matériels et méthodes**

La kératinase est une enzyme à utilisation biotechnologique intéressantes. En effet, elle peut être exploitée dans divers domaines, en l'occurrence : alimentation animale, engrais, cosmétique et pharmaceutique. Le présent travail s'inscrit dans le cadre de caractérisation de souches fongiques kératinolytiques isolées à partir du sol de ferme de poulets ; d'étude de conditions optimale de l'activité de la kératinase et l'effet d'une source de carbone sur la concentration d'enzyme produite dans des conditions de fermentation en fiole.

La partie expérimentale est réalisée au laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Constantine 1.

#### **3.1--Echantillonnage**

Ce travail porte sur la recherche de moisissures kératinolytiques pour cela l'échantillonnage est réalisé à partir d'une ferme de poulets dans la commune de BOUHATEM (70Km à l'ouest de la wilaya de Mila). Le prélèvement est réalisé dans des conditions stériles rigoureuse et récupéré dans un flacon stérile.

#### **3.2- Isolement des moisissures**

##### **3.2.1- Milieu d'isolement**

Un milieu sélectif à base de farine de plumes de volaille est employé pour l'isolement des souches kératinolytiques selon la méthode d'Anitha et Palanivelu, (2012). (Annexe 1). Les plumes (figure 3) sont fournis par un abattoir de volailles à Constantine et la farine de plume (figure 4) est préparée dans plusieurs étapes. D'abord, les plumes ont subi trois lavage, à savoir : l'eau de robinet, un détergent (chloroforme) et l'eau distillée. Ensuite, les plumes sont séchées à 50 °C pendant 72h et sont découpées en petits morceaux. Enfin, les plumes sont broyées en utilisant un mixeur et sont filtrées à travers une passoire pour éliminer les grosses particules.



**Figure 3 :** Plumes de volailles.



**Figure 4 :** Farine de plume.

### 3.2.2- Dilutions

La préparation des dilutions consiste tout d'abord à préparer la solution mère du sol en ajoutant 1g du sol à 9ml d'eau physiologique stérile (9g NaCl dans 1 litre d'eau distillée), suivi d'une agitation vigoureuse pendant 3min. La solution obtenue a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif d'1 ml de la solution précédente à 9ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-4}$  (Jerome *et al.*, 2004).

Après la préparation des dilutions, une agitation vigoureuse avec le Vortex permet l'homogénéisation des milieux. A chaque échantillon, il est attribué un code désignant son origine et son degré de dilution.

### 3.2.3- Ensemencement

0.1ml de chaque dilution indiquée est déposé sur des boites de pétri contenant le milieu d'isolement puis étalé uniformément avec un étaloir stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface du milieu. Grace à cette méthode, toutes les colonies se développent sur la surface (Tortora *et al.*, 2003). Les boites sont ensuite incubées à 30°C pendant deux semaines.

## 3.3- Purification des souches

La purification des moisissures est effectuée par pique centrale à partir des boites d'isolement, sur milieu Sabouraud (Annexe 2).

Les moisissures développées sont repiquées dans un milieu Sabouraud et sont incubées à 30°C pendant sept jours.

### **3.4- Identification des souches**

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux (identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique), rarement à des propriétés biochimiques (Botton *et al.*, 1990).

#### **3.4.1- Identification macroscopique**

L'observation des moisissures s'est réalisée sur la face et le revers de la boîte, en se basant sur la détermination de l'aspect des colonies et la forme et la couleur des spores (Botton *et al.*, 1990).

#### **3.4.2- Identification microscopique**

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les deux méthodes les plus utilisées sont celles du ruban adhésif (test du drapeau) et la méthode de lactophénol bleu de coton. Ces deux méthodes sont décrites ci-dessous.

- Ruban adhésif : un petit morceau du ruban adhésif est appliqué par la face collante sur la colonie puis déposé sur une lame porte-objet.
- Lactophénol bleu de coton : un fragment de la colonie est prélevé, à l'aide d'une anse de platine, et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant, ensuite recouvrir avec une lamelle couvre-objet qui écrase la préparation (Chabasse *et al.*, 2002).

L'observation microscopique est effectuée en microscope optique aux différents grossissements (GX 10, GX 40), et par émersion à GX 100

Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation,...) et des spores (forme, couleur, texture des parois,...) (Harrigan et McCance, 1976 ; Oteng-Gyang, 1984 ; Guiraud, 1998).

### **3.5- Conservation**

Les moisissures sont conservées par la méthode la plus simple et la plus communément utilisée au laboratoire qui consiste à repiquer ces souches à la fin de leur croissance en tubes sur gélose inclinée (Botton *et al.*, 1990), en utilisant comme milieu de conservation le CYA (Parks, 1997). (Annexe 3). Après une semaine d'incubation à 30°C, les cultures sont conservées à 4°C (Botton *et al.*, 1990).

### **3.6- Méthodes de fermentation**

La fermentation est réalisée dans un milieu liquide à base de farine de plume (Annexe 4) dans le but d'évaluer l'activité kératinolytique développée par les souches fongiques sélectionnées.

#### **3.6.1- Préparation de l'inoculum**

L'inoculum correspond à la suspension sporale de la souche fongique sélectionnée. Cette dernière est préparée par addition de 10 ml d'eau physiologique stérile aux souches cultivées sept jours sur milieu Sabouraud en boîte de Pétri. Les spores sont récupérées superficiellement en utilisant un râteau sous des conditions aseptiques. Ensuite la détermination de la concentration de la suspension sporale est effectuée par dénombrement des spores sur cellule de THOMAS.

#### **3.6.2- Méthode de culture**

Des erlenmeyers de 250ml contenant 100ml de milieu de fermentation sont stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15min. Ensuite chaque erlenmeyer est inoculée par une suspension sporale de  $10^8$  spores /ml et incubée dans un bain marie agité à 28°C 180rpm.

#### **3.6.3- Effet de la concentration de source de carbone**

Afin d'étudier l'effet de la concentration de la source de carbone sur l'activité kératinolytique de la souche sélectionnée, des concentrations progressives de glucose sont ajoutées (0.5%, 1%, 1.5%, 2%) en milieu de fermentation (figure 5). Le pH du milieu est ajusté à 6. Il est à rappeler qu'une culture sans glucose est réalisée pour établir l'étude comparative.

Le milieu est reparti dans des erlenmeyers de 100ml, contenant 50ml du milieu de fermentation. La préparation est stérilisée par la suite à l'autoclave à 121°C pendant 15min.

puis, chaque erlenmeyer est inoculée par une suspension sporale de  $10^8$  spores /ml et sont enfin incubées dans un bain marie agitateur à  $28^{\circ}\text{C}$  180 rpm pendant huit jours.



**Figure 5** : Milieux de fermentation avec différentes concentrations en glucose.

### 3.7- Etude de l'activité kératinolytique

#### 3.7.1- Préparation des extraits enzymatiques

Chaque 24h, des prélèvements sont effectués dans des conditions d'aseptise. Cette étape est suivie par une centrifugation de 10min à 6000rpm. Le surnageant contenant l'enzyme est dilué à  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ .

#### 3.7.2- Dosage de l'activité kératinolytique

L'activité kératinolytique est dosée selon la même méthode décrite par Hard *et al.* (2011) avec quelques petites modifications.

La farine de plume est utilisée comme substrat et le mélange réactionnel est préparé comme suit : 20 mg de farine de plume + 3,8 ml du tampon TRIS HCL 0.1M pH 8 + 0.2 ml de l'extrait enzymatique.

Après agitation, le mélange est incubé à  $37^{\circ}\text{C}$  au bain marie pendant 1 heure. La réaction est ensuite arrêtée par la mise de la préparation dans un bain de glace pendant 10min, puis filtrée sur papier Whatman n° 1.

Le blanc est préparé exactement de la même façon du mélange réactionnel excepté l'incubation au bain marie.

L'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 280 nm ( $A_{280}$ ), en utilisant un spectrophotomètre. L'activité kératinolytique est exprimée comme une unité enzymatique (U/ml) correspondant à une augmentation de la valeur d'absorbance par 0.1 par minute et elle est calculée selon l'équation suivante :

$$U=4 \times n \times A_{280} / (0.1 \times 60)$$

Où  $n$  : facteur de dilution ; 4 : volume finale de réaction (ml) ; 60 : temps d'incubation (min).

### **3.8- Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique**

L'effet du pH et de la température sur l'activité kératinolytique est déterminé lors de la huitième journée en utilisant la même méthode de dosage enzymatique.

L'activité est étudiée dans un intervalle de pH de 6 à 9 et la température optimale est quand a elle déterminée par l'incubation dans de différentes températures (30°C, 40°C, 50°C, 60°C et 70°C).



## 4- résultats

### 4.1- Isolement des souches kératinolytiques

L'isolement des souches microbiennes kératinolytiques sur milieu à base de farine de plume a permis l'obtention de cinq souches bactériennes et deux souches fongiques. Comme le présent travail s'inscrit dans le cadre d'étude des moisissures kératinolytiques, seulement les deux souches fongiques sont récupérées et purifiées sur milieu Sabouraud, pour réaliser le reste de l'expérimentation.

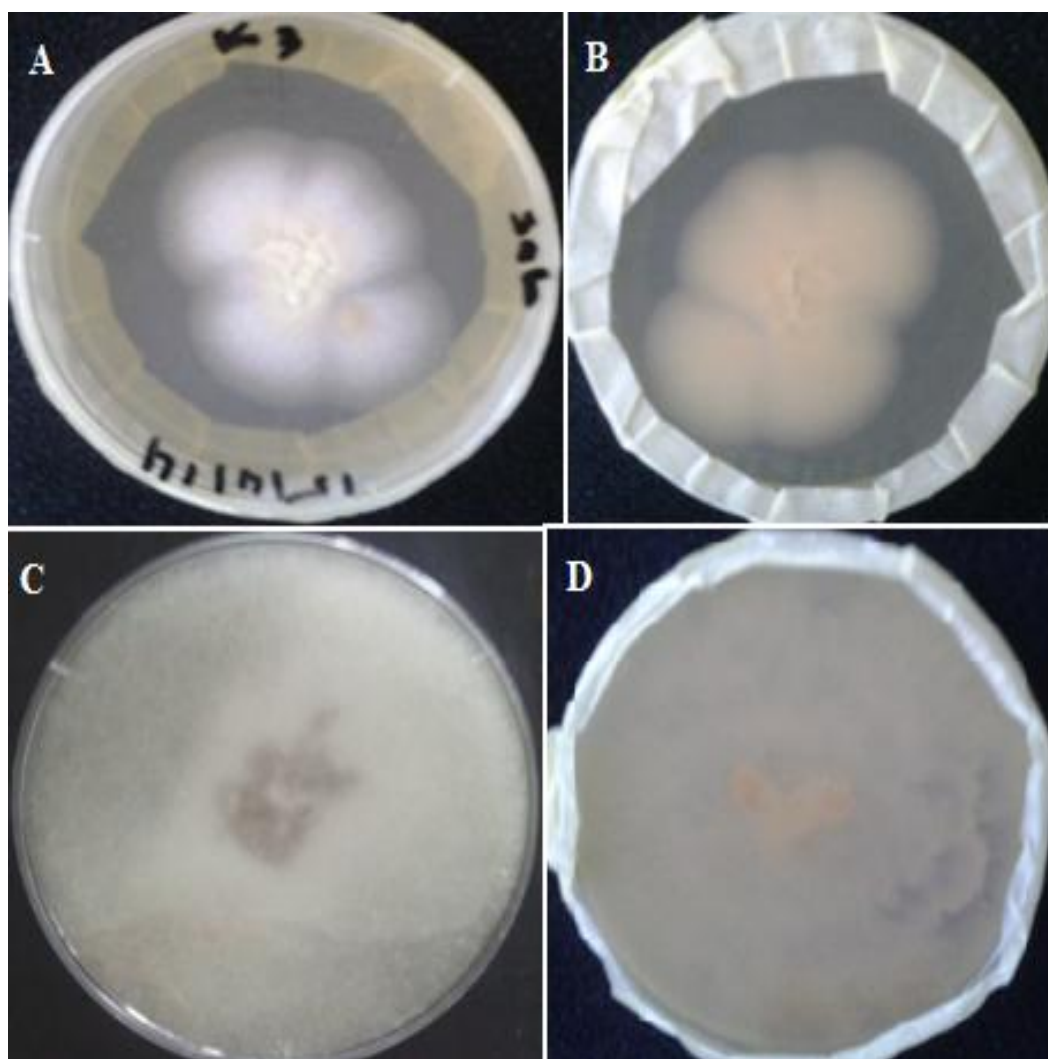
### 4.2- Identification des souches isolées

#### 4.2.1- Identification macroscopique

Les caractères macroscopiques des deux moisissures isolées (KB et K3) sont étudiés sur milieu Sabouraud, l'un des milieux les plus fréquemment utilisés (Botton *et al.*, 1990). Le tableau 6 résume l'aspect macroscopique des mycéliums, la texture, la couleur du mycélium et du contour et la couleur du revers des boîtes. Par ailleurs, la figure 5 illustre la morphologie des souches fongiques obtenues.

**Tableau 6** Caractères morphologiques des Souches fongiques KB et K3

souches	Formes du mycélium	Couleur du mycélium et du contour	Texture	couleur du revers
KB	circulaire qui envahit toute la boîte	Blanc au départ, gris en vieillissant	filamenteuse	incolore
K3	Circulaire à développement faible sur milieu Sabouraud	jaune au centre, blanc à l'extrémité	Granuleuse	brun





**Figure 6 :** Aspect morphologique des souches fongiques K3 et KB sur milieu Sabouraud. A-face de la souche K3 ; B-revers de la souche K3 ; C- face de la souche KB ; D- revers de la souche KB.

#### 4.2.2- Identification microscopique

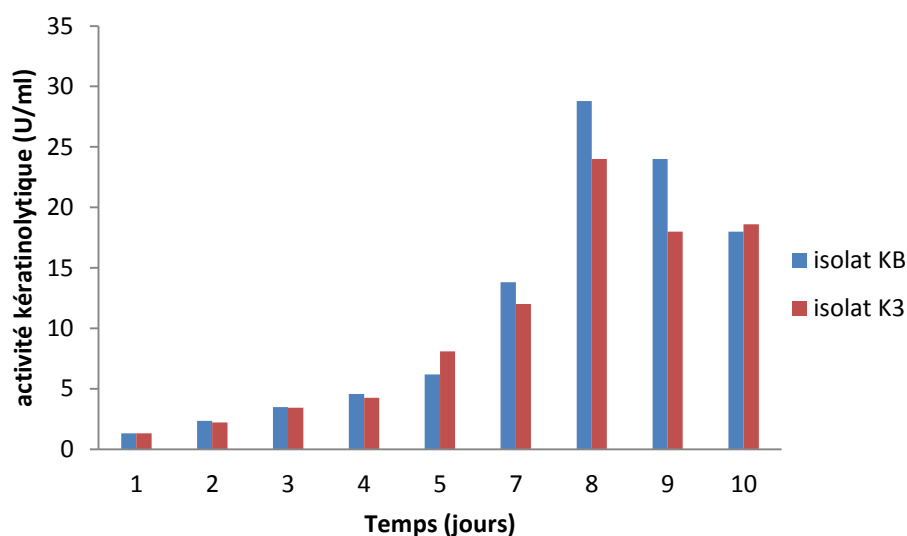
L'observation microscopique a permis l'identification présomptive des genres des deux souches kératinolytiques isolées en les comparant aux genres fongiques précédâmes décrits dans la littérature, comme mentionné dans le tableau 7. L'analyse des résultats obtenus nous a permis de constater que la souche KB appartient au genre *Absidia* et la souche K3 appartient au genre *Aspergillus* (Botton *et al.*, 1990 ; Chabasse *et al.*, 2002).

**Tableau 7** Caractères microscopique des souches K3 et KB.

Souches	Aspect microscopique obtenu (G X100)	Caractères microscopiques
K3		<ul style="list-style-type: none"> <li>-Filaments septés</li> <li>-Conidiophores longs</li> <li>-Vésicules sphériques</li> <li>-Phialides portées par des métules</li> <li>-Conidies globuleuse</li> </ul>
KB		<ul style="list-style-type: none"> <li>-Filaments larges non septés.</li> <li>-Spores cylindriques</li> <li>-Apophyses bien développées (en forme d'entonnoir).</li> </ul>

### 4.3- Etude de l'activité kératinolytique produite

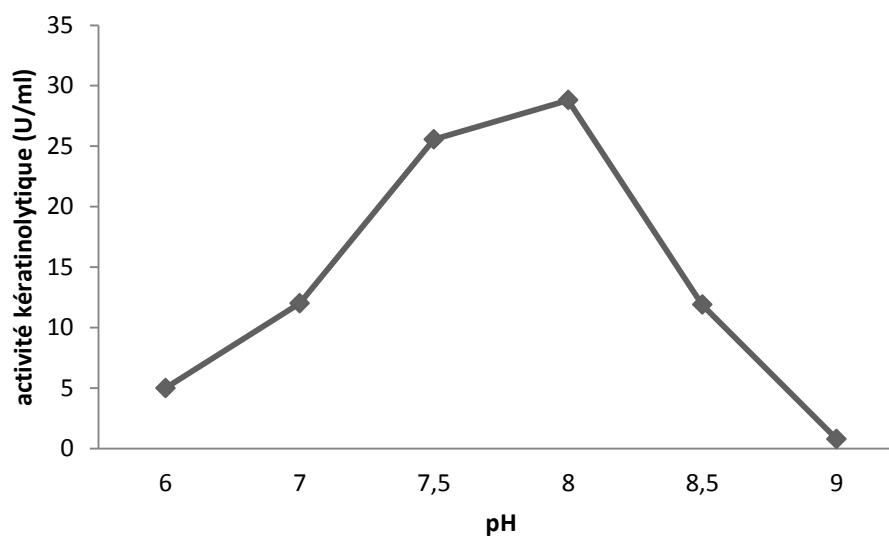
L'activité kératinolytique testée dans le milieu de fermentation liquide à base de farine de plume a montré que cette dernière augmente au cours du temps chez les deux souches KB et K3 avec un optimum observé au cours du huitième jour. La meilleure activité kératinolytique est observée chez la souche *Absidia sp* (KB), raison pour laquelle elle a été sélectionnée pour la suite du travail (figure 7).



**Figure 7 :** Evaluation de l'activité kératinolytique développée par les souches *Absidia sp* (KB) et *Aspergillus sp* (K3) dans le milieu de fermentation liquide à base de farine de plume de poulet.

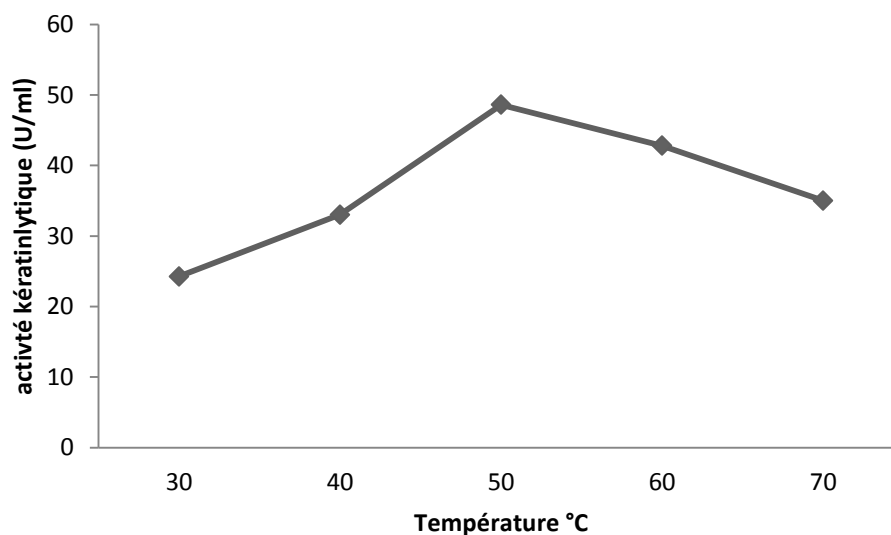
#### 4.4- Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique

L'activité kératinolytique maximale de l'enzyme a été observée dans un intervalle de pH qui varie entre 7.5 et 8 atteignant ainsi, 28.8 U/ml dans le pH 8. La figure 8 montre l'évolution de l'activité kératinolytique dans des différentes valeurs de pH.



**Figure 8 :** Effet du pH sur l'activité kératinolytique de la souche *Absidia sp*.

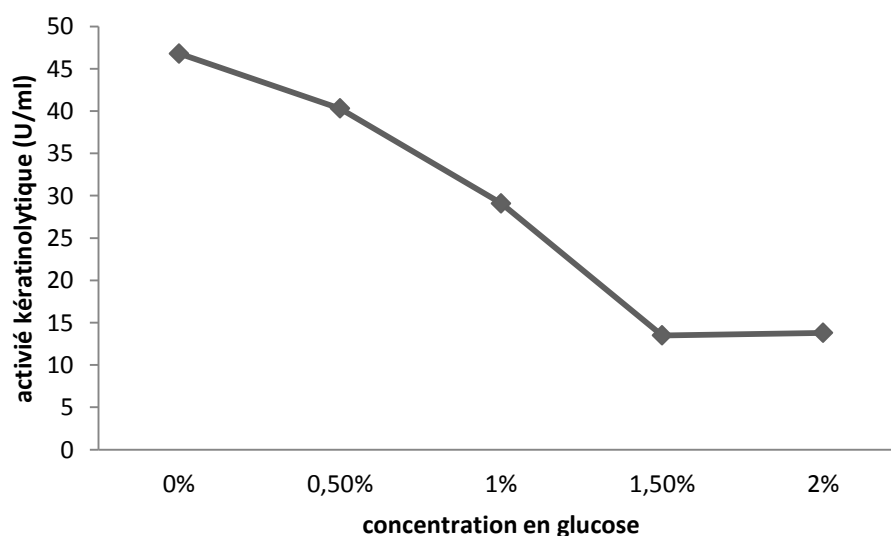
Par ailleurs, la souche *Absidia sp* montre une activité kératinolytique optimale dans une température de 50°C. La figure 9 montre l'évolution de l'activité kératinolytique dans différentes valeurs de températures.



**Figure 9** : Effet de la température sur l'activité kératinolytique de la souche *Absidia sp*.

#### 4.5- Effet de la concentration de source de carbone sur l'activité kératinolytique

L'activité kératinolytique est inversement proportionnelle à la concentration du glucose et au-delà de la concentration 1,5% l'activité se stabilise à 13.8 U /ml (figure 10)



**Figure 10** : Effet de concentration de glucose sur l'activité kératinolytique de la souche *Absidia sp*.

## 5- Discussions

Les usines de transformation de volaille produisent une grande quantité de plumes comme déchets, atteignant des millions de tonnes par an, avec un impact potentiel sur l'environnement (Anitha et Palanivelu, 2012). Les plumes sont principalement constituées de kératine, une protéine insoluble qui ne peut être digérée que par des kératinases microbiennes (Anitha et Palanivelu, 2012). Ces dernières ont de multiples applications dans le secteur industriel et médical.

Le présent travail porte sur l'identification des souches fongiques kératinolytiques et la caractérisation de la kératinase qu'elles produisent.

Le choix du site de prélèvement qui correspond au sol d'une ferme de poulet est choisi par rapport aux recherches menées par Deivasigamani et Alagappan (2007); Awasthi et Kushwaha (2011); Anitha et Palanivelu (2012). Il est ainsi important de signaler que les fermes de poulets constituent un milieu idéal riche en microorganismes kératinolytiques en raison de présence de déchets de plume mélangés au sol.

L'isolement des microorganismes sur milieu solide à base de farine de plumes, comme seule source de carbone et d'azote a permis la sélection des souches kératinolytiques bactériennes et fongiques.

Le développement de l'activité kératinolytique par des bactéries et moisissures a largement été décrit dans la littérature (Saha, 2009; Hard *et al.*, 2011; Anitha et Palanivelu, 2012).

Le travail s'est principalement focalisé sur les deux moisissures kératinolytiques K3 et KB. La souche K3 s'est avérée après étude des caractères cultureux et morphologiques être probablement une souche du genre *Aspergillus* (Botton *et al.*, 1990; Chabasse *et al.*, 2002). Ce genre est commun et plusieurs études se sont axées sur le potentiel kératinolytique et la caractérisation des enzymes secrétées par les espèces de ce genre (Kim, 2003; Farag et Hassan, 2004; Kim, 2007; Awasthi et Kushwaha, 2011). Par ailleurs, la souche KB appartient à famille des mucorales. Cette dernière comprend les genres *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor* et *Absidia*. Les *Absidia* se distinguent des autres genres précédemment cités par leur apophyse bien développée en forme d'entonnoir (Chabasse *et al.*, 2002). C'est sur cette caractéristique qu'il s'est établi que l'isolat KB est probablement *Absidia sp.* il est intéressant de noter que les espèces appartenant à la famille des mucorales tel que *Mucor sp* (Kim, 2003) et *Rhizopus sp.* (Gampa *et al.*, 2013) sont largement étudiés pour leurs effets kératinolytiques, néanmoins,

---

**selon nos connaissances, les membres du genre *Absidia* sont étudiés pour la première fois pour leur capacité kératinolytique dans le présent travail.**

Les souches *Aspergillus sp.* K3 et *Absidia sp.* KB ont gardées leurs capacités d'hydrolyser la kératine en milieu de fermentation liquide, contenant la farine de plume de poulets comme seule source de carbone et d'azote. En effet, au bout du 8<sup>ème</sup> jour de culture, il s'est avéré que les deux souches développent une activité kératinolytique importante, atteignant, 24 U/ml et 28.8 U/ml pour K3 et KB, respectivement, avec une activité meilleure détectée chez la souche KB sélectionnée pour effectuer le reste du travail expérimental.

Il faut noter que la comparaison des performances de dégradation de la kératine avec d'autres recherches est difficile, en raison de la multitude de méthodes de dosage et de substrats spécifiques utilisés (Gupta et Ramnani, 2006). Pour cela, la méthode décrite par Hard *et al.* (2011) a été utilisée pour le dosage de l'activité enzymatique.

L'activité enzymatique développée par *Absidia sp* est bien classée en comparaison à d'autres travaux. En effet, elle est plus importante dans le cas de *Chrysosporium tropicum* NFCCI 1884 (24.69±2.11 U/ml), *Fusarium culmorum* GPCK 3204 (22.91±0.86 U/ml) et *Alternaria alternata* NFCCI 1878 (20.8±3.69). Par ailleurs, elle est moins importante, comme il est le cas d'*Acremonium chrysogenum* NFCCI 1883 (45.11±1.59 U/ml) *Scopulariopsis stercoraria* NFCCI 1885 (34.6±3.69 U/ml) (Awasthi et Kushwaha, 2011).

La deuxième partie consistant à la détermination des conditions physicochimiques (pH et température) optimales de l'activité de l'enzyme produite par la souche *Absidia sp*, a montré que le pH optimal se situe à pH8.

Ce résultat est conforme aux études réalisées auparavant par Farag et Hassan, (2004) ; Kim, (2007) ; Kumar *et al.* (2008). Il est à noter que généralement les kératinases sont décrites comme des enzymes alcalines ou neutres avec un optimum de pH compris entre 7,5 et 9. (Selvam et Vishnupriya, 2012).

Pour l'étude de l'effet de température sur l'activité kératinolytique, la température optimale est de 50°C, les kératinases en provenance d'autres champignons ou bactéries tels que *Trichoderma atroviride*. (Weary et Canby, 1969) *Doratomyces microsporus* (Evans et Hose, 1975) *Aspergillus oryzae*, (Adinarayan *et al.*, 2003), *Bacillus licheniformis* (Kumar *et al.*, 2012) ont également montrées des températures optimales similaires. Par ailleurs, la plupart

des protéases kératinolytiques ont en général des températures optimales comprises entre 50 ° C et 55 ° C (Ramnani et Gupta, 2004).

Enfin, pour ce qui concerne l'effet de la concentration du glucose sur la production d'enzyme, les résultats montrent que l'ajout du glucose au milieu de fermentation a un effet inhibiteur sur la production de la kératinase. Ceci est conforme avec les résultats obtenus par Kim *et al.* (2001) Suntornsuk et Suntornsuk. (2003) ; Brandelli. (2007). En outre, l'addition d'une autre source de carbone à la kératine est décrite comme inhibitrice de la synthèse de kératinase, chose due à la répression du catabolisme (Santos *et al.*, 1996 ; Bernal *et al.*, 2003 ; Thys *et al.*, 2004).



## 6- Conclusion et perspectives

L'industrie des volailles a connu un développement très considérable ces dernières années, générant des millions de tonnes de plumes comme déchets. Ces derniers sont en majeure partie composés de kératine, une protéine très résistante et stable, et sont difficiles à dégrader. Par conséquent, ils sont jetés aux décharges publiques ou incinérés ce qui provoque des problèmes environnementaux. Pour remédier à ce problème certaines industries ont mis au point des procédés d'élimination des déchets en les valorisant par voie microbienne, ce qui permet de générer des farines de plumes riches en acides aminés qui peuvent être utilisées comme aliment pour les animaux et/ou comme engrais d'un côté et de la kératinase à intérêt pharmaceutique et cosmétique d'un autre côté.

Dans ce contexte, le présent travail a pour principaux objectifs : une contribution à la valorisation des plumes de volailles comme élément de fermentation fongique pour la production de kératinase, et l'étude des conditions physico-chimiques optimales de cette enzyme. L'étude de l'activité enzymatique des moisissures isolées à partir d'une culture submergée à base de farine de plumes a permis de sélectionner une souche fongique performante développant une activité kératinolytique qui a atteint 28.8 U/ml au bout du 8<sup>ème</sup> jour. L'identification morphologique et microscopique a permis de constater que cette souche KB est probablement un *Absidia sp.* Il est important de signaler qu'en comparaison aux études de la littérature, la souche KB est considérée performante dans la production de la kératinase.

Au terme de cette ébauche, nous avons jugé utile de se fixer certains points comme perspectives :

- L'identification moléculaire complète de la moisissure *Absidia sp.*
- L'optimisation de milieu de fermentation.
- L'étude approfondie de l'enzyme et son mécanisme d'action.
- L'étude de la production de l'enzyme à l'échelle industrielle, dans les différents domaines.

## Résumé

Le présent travail porte sur une contribution à la valorisation des plumes de volailles par voie microbiologique, en utilisant des souches fongiques isolées à partir du sol d'une ferme de poulets ; pour la production de kératinase, une enzyme d'intérêt industriel, à savoir : alimentation animale, industrie pharmaceutique et cosmétique. En effet, l'étude s'est focalisée après l'isolement des souches fongiques kératinolytiques sur la caractérisation de la production de kératinase en milieu de fermentation liquide, à l'échelle laboratoire et les conditions physico-chimiques optimales de cette enzyme. L'isolement a permis d'obtenir deux moisissures kératinolytiques. L'identification présomptive basée sur l'étude macroscopique et microscopique a montré que ces deux isolats appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Absidia*. Ces deux souches sont cultivées en milieu submergé où la seule source de carbone et de nitrogène est la farine de plume et la production de l'enzyme est estimée par le dosage de l'activité kératinolytique. Les résultats obtenus ont révélé qu'*Absidia sp.* a donné une meilleure activité atteignant 28,8 U/ml au bout du huitième jour de fermentation. L'étude des optima de pH et de température d'incubation a montré que la kératinase produite par *Absidia sp.* a un pH optimum égal à pH8 et une température optimale de 50°C. Enfin l'étude de l'effet de différentes concentrations du glucose montre que ce dernier a un effet inhibiteur sur la production de kératinase.

**Mots clés :** plume de volailles, valorisation de déchets, *Absidia sp.*, *Aspergillus sp.*, fermentation, kératinase, activité kératinolytique.

## Abstract

This work focuses on a contribution to the enhancement of poultry feathers microbiologically, using fungal strains isolated from soil of a chicken farm; for the production of keratinase, an enzyme of industrial interest, namely, feed, pharmaceutical and cosmetic industry. Indeed, the study focused after the isolation of keratinolytic fungal strains on the characterization of keratinase production in liquid fermentation medium at laboratory scale and optimal physicochemical conditions of this enzyme. Isolation yielded two keratinolytic molds. Presumptive identification based on macroscopic and microscopic study showed that these two isolates belong to the genera *Aspergillus* and *Absidia*. Both strains are cultivated in submerged medium or the sole source of carbon and nitrogen is feather meal and the production of the enzyme is estimated by assaying the keratinolytic activity. The results obtained revealed that '*Absidia sp.* gave better activity reached 28.8 U / ml after the eighth day of fermentation. Study of optimum pH and temperature of incubation showed that the *Absidia sp* keratinase produced have a pH optimum pH 8 and a temperature optimum of 50 ° C. Finally, the study of the effect of different concentrations of glucose shows that it has an inhibitory effect on the production of keratinase.

**Keywords:** chicken feather, recovery of waste, *Absidia sp*, *Aspergillus sp*, fermentation, keratinase, keratinolytic activity.

## ملخص

يركز هذا العمل على المساهمة في تثمين ريش الدواجن بطريقة ميكروبيولوجية، وذلك باستخدام عينات فطرية معزولة من تربة مزرعة دجاج بغرض انتاج الكيراتيناز، انزيم ذو استعمالات صناعية متعددة نذكر منها: صناعة الأعلاف، الصناعات الدوائية و مستحضرات التجميل. في الواقع، ركزت الدراسة بعد عزل عينات فطرية كراتينية على دراسة إنتاج الكيراتيناز في وسط تخمر سائل على مستوى المخبر ومن ثم تحديد الظروف الفيزيوكيميائية المثلى لهذا الإنزيم. العزل أسفر عن الحصول على اثنين من الأعدان الكيراتينية. أظهرت اختبارات التشخيص الأولية الماكروسكوبية و الميكروسكوبية أن العينتان تنتميان الى الجنسين: *Absidia* و *Aspergillus*

تم زرع كل من السلالتين في وسط سائل حيث أن المصدر الوحيد للكربون و النيتروجين هو مسحوق ريش الدجاج. انتاج الأنزيم يقدر عن طريق معايرة النشاط الأنزيمي. النتائج المتحصل عليها أظهرت أن العينة *Absidia* أعطت أفضل نشاط بعد ثمانية أيام من التخمير ب 28.8 وحدة/مل كما أظهرت دراسة درجة الحموضة و درجة حرارة الحضان المثليين أن pH الأمثل للأنزيم هو 8 pH و درجة حرارة الحضان المثلى هي 50°. دراسة تأثير تراكيز مختلفة من الغلوكوز على النشاط الأنزيمي بينت أن هذا الأخير له تأثير كاجح على انتاج الكيراتيناز.

**الكلمات المفتاحية:** ريش الدواجن، تثمين النفايات. *Aspergillus sp*، *Absidia sp*، التخمير، الكيراتيناز،

Activité kératinolytique

## Références Bibliographiques

**ADINARAYAN, K ; ELLAIAH, P ; and PRASAD, DS.** AAPS Pharm Sci Tech. *Purification and partial characterization of thermos table serine alkaline protease from a newly isolated Bacillus subtilis PE-II.* 2003. 4. p1-11.

**ALGERIE, MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DU DEVELOPEMENT RURAL.** *Avant-projet d'une charte de qualité et pacte de croissance encadrant et engageant les activités des professionnels de la filière avicole pour la structuration et la modernisation de l'aviculture nationale.* Algerie. 2012. 17p.

**ALLPRESS , JD; MOUNTAIN, G; GOWLAND, PC.** Letters in Applied Microbiology. *Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from Lysobacter NCIMB 9497.* 2002. **34.** p373-342.

**AMELLAL, Tisseem.** *Impacts des rejets de la tannerie megissrie mega de Batna sur oued el gourzi.* Thèse de Magister en chimie. Université 20 Août 55 Skikda : Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénieur. 2007. 122p.

**ANITHA, TS; PALANIVELU, P.** International Journal of Research in Biological Sciences. *Production and characterization of keratinolytic protease(s) from the fungus, Aspergillus parasiticus.* 2012. 2. **2.** p87-93.

**AWASTHI, P; KUSHWAHA, RKS.** International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. *Keratinase Activity of Some Hyphomycetous Fungi from Dropped Off Chicken Feathers.* 2011. 2. **6.** p 1745-1750.

**BERRADA, SAÏD.** Les Principaux Produits Capillaires Composition et Propriétés. Academie De Montpellier. France. 2007. 23p.

**BERNAL, C; VIDAL, L; VALDIVIESO, E; COELLO, N.** World J Microbiol Biotechnol. *Keratinolytic activity of Kocuria rosea.* 2003. 19. p255-261.

**BOCKLE, B; GALUNSKY, B ;MULLER, R.** Appl Environ Microbiol. *Characterization of a keratinolytic serine proteinase from Streptomyces pactum DSM 40530.* 1995. 61. p3705–3710.

**BRANDELLI, A.** Food Bioprocess Technol. *Bacterial keratinases: Useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond.* 2007. 1. p105-116.

- BRANDELLI, A; DAROIT, DJ; RIFFEL, A.** Appl Microbiol Biotechnol. *Biochemical features of microbial keartinases and their production and applications.* 2009. 85. p1735-1750.
- BRUTT, EH; ICHIDA, JM.** *Keratinase produced by Bacillus licheni-formis.* 1999. US Patent 5,877,000.
- CAI, CG ; LOU, BG ; ZHENG, XD.** Journal of Zhejiang university science B. *Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of Bacillus subtilis.* 200. 9. 1. p60-67.
- CHITTE, RR; NALAWADE, VK; DEY, S.** Lett Appl Microbiol. *Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic Streptomyces thermo-violaceus strain SD8.* 1999. 28. p131–136.
- CHOI, JM; NELSON, PV.** J Am Hort Sci. *Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources. II. Using poultry feathers.* 1996. 121. 4. p634-638.
- DEIVASIGAMANI, B; ALAGAPPAN, KM. J.** Environ. Biol. *Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins.* 2007. 29. 6. p933 – 936.
- DEYDIER, E; GUILLET, R; SARDA, S; SHARROCK, P.** J Hazard Mater. *Physical and chemical characterization of crude meat and bone meal combustion residue : “waste or raw material”* 2005. 121. p141–148.
- DJEROU, Zouhir.** *Influence des conditions d'élevage sur les performances chez le poulet de chair.* Thèse de Magister en médecine vétérinaire. El-khroub : Département des sciences vétérinaires. 2006. 112p.
- EVANS, EGV; HOSE, H.** Sabouraudia . *In vitro degradation of human hair nu Hendersonula toruloidea.* 1975. 13. p323-328.
- FAOSTAT.** (2012). <http://faostat.fao.org/> . consulter le 28/03/2014.
- FARAG, AM; HASSAN, MA.** Enzyme and Microbial Technolog. *Purification, characterization and immobilization of a keratinase from Aspergillus oryzae.* 2004. 34. p85-93.
- FILIPELLO, V M.** *Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates.* In: Kushwaha RKS, Guarro J (eds) *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi.* Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao. 2000. p86-92.
- FRIEDRICH, J; KERN, S.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. *Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease Of Doratomyces microspores.* 2003. 21. p35-37.
- GAMPA, RH; MUSTAFA, SM; SRIHARI, G.** journal of microbiology research. *Studies on kératinase producing fungi isolated from poultry waste and their enzymatic activity.* 2013. 3. 4. p148-151.

- GOUSTEROVA, A; BRAIKOVA, D; GOSHEV, I; CHRISTOV, P; TISHINOV, K; VASILEVA-TONKOVA, E; HAERTLE, T; NEDKOV, P.** Letters in Applied Microbiology. *Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis.* 2005. 40. p335-340.
- GUPTA, R; BEG, QK, LORENZ,P.** Appl Microbiol Biotechnol. *Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications.* 2002. 59. p15-32.
- GUPTA, R ; RAMNANI, P.** Appl Microbiol Biotechnol. *Microbial keratinases and their prospective applications: an overview.* 2006. 70. p21-33.
- HADAS, A ; KAUTSKY, L.** Fertil Res. *Feather meal, a semi slow release nitrogen fertilizer for organic farming.*1994. 38. p165-170.
- HAINES, Roland J.** *Ferme à la fourchette une stratégie intégrale pour la salubrité des viandes en ontario.* Toronto, Imprimeur de la Reine pour l'Ontario, 2004. 654p. ISBN : 0-7794- 6428- 1.
- HARD, SM ; BAJAJ, IB ; SINGHAL, RS.** Agriculture Food and Analytical Bacteriology. *Optimization of fermentative production of kératinase from Bacillus subtilis NCIM 2724.* 2011. 1. 1. p54-65.
- JACQUES, Christophe.** *Etude de la valorisation des déchets d'origine kératinique par voie thermo-mécano-chimique en vue de l'obtention de filaments continus : cas spécifique de la laine.* Thèse de doctorat en Sciences des Agroressources. Toulouse : L'institut national polytechnique de Toulouse. 2003. 279p.
- KANNAPPAN, S; BAAHRATHI, D.** Journal of textile and apparel, technology and management. *Exploration on amino acid content and morphological structure in chicken feather fiber.* 2012. 7. 3. p1-6.
- KIM, JD.** Mycobiology. *Keratinolytic Activity of Five Aspergillus Species Isolated from Poultry Farming Soil in Korea.* 2003. 31. 3. p157-161.
- KIM, JD.** Mycobiology. *Purification and characterization of a kératinase from a feather-degrading-fungus, Aspergillus flavus strain K-03.* 2007. 35. 4. p219-225.
- KIM, JM; LIM, WJ; SUH, HJ.** Process Biochem. *Feather-degrading Bacillus species from poultry waste.* 2001. 37. p287-291.
- KUMAR, AG; SWARNALATHA, S; GAYATHRI, S; NAGESH, N; SEKARAN, G. J** Appl Microbiol. *Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine kératinase by the newly isolated Bacillus pumilus.* 2008. 104. p411-419.
- KUMAR, JM; LAKSHMI, A; SANGEETHA RANI, V; SAILAJA, B.** journal of research in biology. *Isolation and characterization of feather degrading bacteria from poultry waste.* 2012. 2. 7. p676-682.

**LANGEVELD, JPM; WANG, JJ; VAN DE WIEL, DFM; SHIH, GC; GARSSSEN, GJ; BOSSERS, A; SHIH, JCH.** The Journal of Infectious Diseases. *Enzymatic Degradation of Prion Protein in Brain Stem from Infected Cattle and Sheep*. 2003. 188. p1782-1789.

**MACEDO, AJ; BEYS DA SILVA, WO; GAVA, R; DRIEMEIER, D; PEGAS HENRIQUES, JA; TERMIGNON, C.** Applied and environmental microbiology. *Novel Keratinase from Bacillus subtilis S14 Exhibiting Remarkable Dehairing Capabilities*. 2005. 71. 1. p594-596.

**MARCONDES, NR; TAIRA, CL; VANDRESEN, DC; SVIDZINSKI, TIE; KADOWAKI, MK; PERALTA, RM.** Microbial Ecology. *New Feather-Degrading Filamentous Fungi*. 2008. 56. 1. p13-17.

**MORRIS, WC; BALLOUN, SL.** Poultry Sci. *Effect of processing methods on utilization of feather meal by broiler chicks*. 1973. 52. p858–866.

**NAM, GW; LEE, DW; LEE, HS, LEE, NJ ; KIM, BC; CHOE, EA; HWANG, JK; SUHARTONO, MT; PYUN, YR.** Arch Microbiol. *Native feather degradation by Fervidobacterium islandicum AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe*. 2002. 178. p538–547.

**ONIFADE , AA ; A1-SANE, NA ; AI-MUSALLAM, AA ; AL-ZARBAN, S.** Bioresource Technology. *A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources*. 1998. 66. p1-11.

**RAMNANI, P; GUPTA, R.** Biotechnol Appl Biochem. *Optimization of medium composition for keratinase production on feather by Bacillus licheniformis RGI using statistical methods involving response surface methodology*. 2004. 40. p191-196.

**RIESSEN, S; ANTRANIKIAN, G.** Extremophiles. *Isolation of Thermoanaerobacter keratinophilus sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity*. 2001. 5. p399-408.

**SAHA, Subhasish.** *Exploration of Keratinolytic Actinobacteria for the Bioconversion of Poultry Feather Waste into Poultry Feed Supplement*. Thèse de doctorat en microbiologie. Inde : Bharathiadasan university. 2009. 142p.

**SANTOS, RMDB ; FIRMINO, AAP ; FELIX , CR.** Curr Microbiol. *Keratinolytic activity of Aspergillus fumigatus Fresenius*. 1996. 33. p364-370.



- SELVAM, K; VISHNUPRIYA, B.** International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. *Biochemical and Molecular Characterization of Microbial Keratinase and Its Remarkable Applications*. 2012. 3. 2. P267-275.
- SUNTORNSUK, W; SUNTORNSUK, L.** Bioresour. Technol. *Feather degradation by Bacillus species FK 46 in submerged cultivation*. 2003. 86. P239-243.
- TOM SINOY, ES ; CHAVAN, PB ; PATRE, PR.** Technical and non-technical journal. *Isolation and Identification of Feather Degradable Microorganism*. 2011. 2. 3. P128-136.
- THYS, RCS; LUCAS, FS; RIFFEL, A; HEEB, P; BRANDELLI, A.** Lett Appl Microbiol. *Characterization of a protease of a feather-degrading Microbacterium species*. 2004. 39. p181–186.
- TSENG, Fan-chen j.** *Biofibre Production from Chicken Feather*. These de master en Engineering in Materials and Process Engineering. New Zealand : The University of Waikato. 2011. 107p.
- VAN RAAMSDONK , LWD; VANCUTSEM, J; ZEGRES, J; FRICK, G; JORGENSON, J; PINCKAERS, V; BOSCH, J; PARADIES-SEVERIN, I.** Biotechnol. Agron. Soc. Environ. *The microscopic detection of animal proteins in feeds*. 2004. 8. 4. p241-247.
- VIGNARDETA, C ; GUILLAUME, YC ; MICHEL , L ; FRIEDRICH, J; MILLET, J.** International Journal of Pharmaceutics. *Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design*. 2001. 224. p115-122.
- WANG, X; PARSONS, CM.** Poultry Sci. *Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meals*. 1997. 76. p491-496.
- WEARY, PE; CANBY, CM.** J Invest Dermatol. *Further observation on the keratinolytic activity of Trichophyton schoenleini and T. rubrum*. 1969. 53. p58-63.
- WILLIAMS, CM; LEE, CG; GARLICH, JD; SHIH, JCH.** Poult Sci. *Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate as a feed protein*. 1991.70. p85–94.

## ANNEXES

### **ANNEXE 01 : milieu d'isolement (Anitha et Palanivelu, 2012).**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0.4g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.3g

NaCl : 5g

Farine de plume : 10g

Agar : 15g

Eau distillé : 1000ml

Le pH du milieu est ajusté à pH 6.

### **ANNEXE02 : milieu de Sabouraud (Botton *et al.*, 1990).**

Peptone : 10g

Glucose : 40g

Agar : 15g

pH : 5.5

### **ANNEXE 03 : milieu CYA (Parks, 1997).**

NaNO<sub>3</sub> : 3g

MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : 0.5g

KCl : 0.5g

FrSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : 0.01

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1g

Saccharose : 30g

Agar : 15g

Extrait de levure : 5g

**ANNEXE 04 : milieu de fermentation à base de la farine de plume  
(Marcondes *et al.*, 2007)**

MgSO<sub>4</sub> : 0.5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1.0 g

KH<sub>2</sub>P04 : 0.46g

Farine de plume : 10g

Eau distillé : 1000ml

pH finale : 6

<b>Djebbar Selmane</b> <b>Yousfi Billel</b>	Date de soutenance : 26 juin 2014
--	-----------------------------------

**Thème : Contribution à la valorisation de plumes de volaille  
comme élément de milieu de fermentation fongique.**

**Résumé**

Le présent travail porte sur une contribution à la valorisation des plumes de volailles par voie microbiologique, en utilisant des souches fongiques isolées à partir du sol d'une ferme de poulets ; pour la production de kératinase, une enzyme d'intérêt industriel, à savoir : alimentation animale, industrie pharmaceutique et cosmétique. En effet, l'étude s'est focalisée après l'isolement des souches fongiques kératinolytiques sur la caractérisation de la production de kératinase en milieu de fermentation liquide, à l'échelle laboratoire et les conditions physico-chimiques optimales de cette enzyme. L'isolement a permis d'obtenir deux moisissures kératinolytique. L'identification présomptive basée sur l'étude macroscopique et microscopique a montré que ces deux isolats appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Absidia*. Ces deux souches sont cultivées en milieu submergé ou la seule source de carbone et de nitrogène est la farine de plume. La production de l'enzyme est estimée par le dosage de l'activité kératinolytique. Les résultats obtenus ont révélé qu'*Absidia sp.* a donné une meilleure activité atteignant 28,8 U/ml au bout du huitième jour de fermentation. L'étude des optima de pH et de température d'incubation a montré que la kératinase produite par *Absidia sp.* a un pH optimum égal à pH8 et une température optimale de 50°C. Enfin l'étude de l'effet de différentes concentrations du glucose montre que ce dernier a un effet inhibiteur sur la production de kératinase.

**Mots clés :** plumes de volaille, valorisation des déchets, fermentation, *Absidia sp.*, *Aspergillus sp.*, kératinase, activité kératinolytique.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, UC-1.

Devant le jury :

Président de jury : Mr. DEHIMAT L

Pr. Université de Constantine 1

Encadreur: Mr. KACEM CHAOUCHE N.

Pr. Université de Constantine 1

Examineur : Mlle LAHLAH F.Z

MAA. Université de Constantine 1

Tutrice Mlle AIT KAKI A

Docteur. Université de Constantine 1

