

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE  
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



*Département de Microbiologie*

# Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de *Master*

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

## Intitulé

*Production de la protéase alcaline par des moisissures isolées de source thermale sur milieu à base de plumes de poulet*

Soutenu par : **MACHEHALEK Faiza**

Le : **02/07/2015**

**YAKHLEF Manel**

### Jury d'évaluation :

Présidente : **Melle. ABDELAZIZ W.**

M.A. U.F.Mentouri Constantine

Rapporteur : **Melle. BELMESSIKH A.**

M.A. U.F.Mentouri Constantine

Examinatrice : **Mme. MERGOUD L.**

M.A. U.F.Mentouri Constantine

*Année universitaire 2014 - 2015*

# Remerciements

*Avant toute chose*

*Nous remercions DIEU*

*Le tout puissant, l'omniscient et le miséricordieux*

*De nous avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.*

*« Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie (RDC), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Des Frères Mentouri Constantine ».*


*Nous remercions vivement et chaleureusement Melle BELMESSIKH Aicha, Maître assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Des Frères Mentouri Constantine, pour avoir encadré et dirigé ce mémoire avec une grande rigueur scientifique.*

*On la remercie particulièrement pour sa disponibilité, ses conseils judicieux, son soutien ainsi que sa patience, qui ont contribué à la réalisation et l'accomplissement de ce travail.*

*Nous exprimons également notre vive reconnaissance à Melle ABDELAZIZ Wided, Maître assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, l'Université Des Frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Mme MERGOUD Lilia, Maître assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, l'Université Des Frères Mentouri Constantine, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire, qu'elle trouve ici nos sincères remerciements.*

*Enfin, nous remercions toute l'équipe des laboratoires de Microbiologie au (RDC), de Biochimie et de Biologie et Environnement au biopôle de Chaab-Ersass, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Des Frères Mentouri Constantine, qui nous ont accueilli et mis à notre disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce mémoire tout au long de la période de recherche. Qu'ils trouvent ici notre respect et notre reconnaissance.*



*Je remercie, tout d'abord, Dieu le tout puissant, pour  
avoir guidé mes pas vers un avenir inchaallah  
prometteur, où le travail, la persévérance et la quête du  
savoir seront ma devise.*

*Je dédie ce travail à mes chers parents :*

*A ma chère maman ...*

*Que j'adore beaucoup*

*Et à mon cher papa...*

*Que j'aime tant,*

*Sans vous, je ne serai jamais arrivée là où j'en suis.*

*A mon frère Billel et mon très cher frère Mouloud qui m'a  
toujours soutenu*

*A mon adorable encadreur : Mme Belmessikh Aicha*

*A ma chère amie : Ilhem Maamar*

*Ainsi qu'à mon cher professeur Goutel, à tous mes enseignants de  
biologie*

*Et à tous ceux que j'aime.*

*Machehalek, Faiza*

*Louange à Allah le miséricordieux*

*A mes très chers parents*

*Qui m'ont mené pas à pas à la réussite et à la concrétisation  
de mes objectifs*

*Je vous dois tout ce que je suis et tout ce que je serai...  
J'espère avoir été à la hauteur de vos espérances Nchallah.*

*A mes charmantes sœurs : Mounia et Maroua et mon  
adorable frère : Abdelhadi*

*A mes grands-parents, mes oncles et tantes, mes cousins et  
cousines, ainsi que toute la famille Yakhlef maternelle et  
paternelle.*

*A mon très chère encadreur : Mme Belmessikh Aicha*

*A tous ceux qui m'ont enseignés un jour*

*A ceux qui sont proches de mon cœur : à mes amis...*

*Et à tous ceux qui ... sont très chers*

*Je dédie ce travail*

*Yakhlef Manel*

# Table des matières

Introduction.....	1
<b>Chapitre 01 : Synthèse Bibliographique</b>	
<b>1. Les protéases.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Généralités et origine des enzymes industrielles.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Les enzymes protéolytiques.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1. Généralités.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2. Sources des protéases.....</b>	<b>5</b>
➤ <i>Protéases animales.....</i>	<i>5</i>
➤ <i>Protéases végétales.....</i>	<i>5</i>
➤ <i>Protéases microbiennes.....</i>	<i>5</i>
<b>1.2.3. Les protéases alcalines.....</b>	<b>6</b>
➤ <i>Production des protéases alcalines .....</i>	<i>6</i>
➤ <i>Augmentation du rendement de production.....</i>	<i>7</i>
<b>1.2.4. Applications des protéases alcalines.....</b>	<b>7</b>
➤ <i>Industrie du détergent.....</i>	<i>7</i>
➤ <i>Tannerie.....</i>	<i>8</i>
➤ <i>Récupération de l'argent.....</i>	<i>8</i>
➤ <i>Usages médicaux.....</i>	<i>8</i>
➤ <i>Industrie alimentaire.....</i>	<i>9</i>
➤ <i>Traitement des déchets .....</i>	<i>9</i>
➤ <i>Industrie chimique.....</i>	<i>10</i>
<b>2. Les moisissures.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Généralités.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Conditions de croissance des moisissures.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1. Sources minérales.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2. Facteurs physicochimiques.....</b>	<b>12</b>
➤ <i>Température.....</i>	<i>12</i>
➤ <i>pH.....</i>	<i>13</i>

➤ <i>Humidité</i> .....	13
➤ <i>Aération</i> .....	13
➤ <i>Lumière</i> .....	13
2.2.3. Macroéléments.....	13
➤ <i>Source de carbone et d'énergie</i> .....	13
➤ <i>Source d'azote</i> .....	14
<b>3. Les plumes</b> .....	<b>15</b>
3.1. Production mondiale des volailles.....	15
3.2. Production des volailles en Algérie.....	15
3.3. Déchet de volailles.....	16
3.4. Les plumes de poulet.....	16
3.4.1. Origine.....	16
3.4.2. Structure et composition.....	17
3.4.3. Plumes et industrie des volailles .....	18
3.5. Valorisation des plumes de volaille.....	18

## **Chapitre 02 : Matériel et Méthodes**

<b>1. Présentation du travail</b> .....	<b>19</b>
<b>2. Matériel biologique</b> .....	<b>19</b>
2.1. Revivification des souches.....	19
2.2. Conservation .....	19
<b>3. Test d'activité protéolytique</b> .....	<b>20</b>
<b>4. Méthodes d'identification</b> .....	<b>20</b>
4.1. Identification macroscopique.....	20
4.2. Identification microscopique.....	21
<b>5. Méthode de fermentation</b> .....	<b>21</b>
5.1. Préparation du milieu de culture.....	21
5.1.1. Préparation des plumes.....	22
5.1.2. Milieu liquide à base de plumes.....	22
5.2. Préparation de l'inoculum.....	22
5.2.1. Préparation des suspensions sporales.....	22

5.2.2. Dénombrement des spores.....	22
5.3. Conduite de la fermentation.....	23
6. Dégradation des déchets de plumes.....	23
7. Méthode de dosage enzymatique.....	23
7.1. Principe.....	23
7.2. Réaction enzymatique.....	24
7.3. Protocole du dosage.....	24

## **Chapitre 03 : Résultats et Discussions**

1. Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	26
2. Effet de la température sur la production de protéase.....	30
3. Identification des souches sélectionnées.....	33
4. Fermentation des souches sélectionnées.....	38
4.1. Résultats du pH.....	38
4.2. Résultats de l'activité protéolytique.....	40
5. Mise en évidence du Pourcentage du poids dégradé (%).....	42
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>43</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>45</b>

## **Annexes**

## **Résumés**

## *Liste des figures*

	Pages
<b>Figure 1</b> : Schéma d'analyse d'une plume.....	17
<b>Figure 2</b> : Courbe d'étalonnage de la tyrosine.....	22
<b>Figure 3</b> : Formation d'un halo translucide au tour de la colonie.....	25
<b>Figure 4</b> : Représentation de la zone de croissance et ainsi la zone d'hydrolyse chez les 11 souches retenues.....	28
<b>Figure 5</b> : Courbes représentant l'effet de la température sur l'activité protéolytique chez les 11 souches sélectionnées.....	31
<b>Figure 6</b> : Réalisation des fermentations dans des erlenmeyers de 250 ml	38
<b>Figure 7</b> : Résultats du pH pour les souches sélectionnées après fermentation.....	38
<b>Figure 8</b> : Résultats de l'activité protéolytique pour les souches sélectionnées après fermentation.....	39
<b>Figure 9</b> : Pourcentage du poids de plumes dégradé par chaque souche sélectionnée après fermentation.....	42



## *Liste des tableaux*

	Pages
<b>Tableau 1</b> : Classification des protéases (RAO et <i>al.</i> , 1998).....	4
<b>Tableau 2</b> : Production du poulet estimée en 2012 (Source FAO-STAT).....	15
<b>Tableau 3</b> : Mise en évidence de l'activité protéolytique sur milieu sélectif (lait gélosé à 20% d'agar) chez la totalité des souches testées.....	26
<b>Tableau 4</b> : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches retenues protéolytiques.....	32
<b>Tableau 5</b> : Résultats du pH et de l'activité protéolytique après fermentation...	40

## *Liste des abréviations*

**PDA** : Potato Dextrose Agar.

**TCA** : TriChloroacetic Acid.

**%** : Pourcentage.

**pH** : potentiel d'Hydrogène.

**°C** : Degré Celsius.

**h** : heure.

**min** : minute.

**g** : gramme.

**µg** : microgramme.

**rpm** : rotation par minute.

**U** : Unité.

**ml** : millilitre.

**L** : litre.

**nm** : nanomètre.

# *Introduction*

# Introduction

Parmi les hydrolases, les protéases sont les enzymes les plus recherchées dans la bio-industrie et l'agro-alimentaire. En effet, elles sont les plus dominantes (environ 65%) dans le marché mondial des ventes d'enzymes industrielles, qui se situent entre 50 et 60 milliards d'euros par an (SAHOO et *al.*, 2012). Toutefois, cette part d'hydrolases commercialisées est dominée par les protéases alcalines utilisées notamment dans la détergence. Ces protéases actives et stables dans des conditions de pH extrêmes, occupent approximativement 40% du marché mondial d'enzymes (GUPTA et *al.*, 2006). Elles sont ubiquistes et extraites aussi bien chez les microorganismes, que chez les animaux et les végétaux.

Dans le domaine de la biotechnologie industrielle, les microorganismes restent la source la plus importante pour la production de protéases. Chez les moisissures, le genre *Aspergillus* est le genre le plus étudié dans la production et la commercialisation de ces enzymes (POOLE et *al.*, 2009).

Aujourd'hui, les travaux de recherche sur les protéases sont de plus en plus orientés vers une recherche appliquée. Ainsi, les bioindustries sont de plus en plus exigeantes en matière de thermostabilité, de stabilité vis-à-vis des solvants organiques, des détergents et de pH alcalin. A cet effet, les moisissures thermophiles constituent une source d'enzymes supérieures aux biocatalyseurs traditionnels (BRANDELLE et *al.*, 2010). La recherche de ce type de microorganismes cible les environnements chauds tels que les sols sahariens, le compost et les sources thermales (HESS et *al.*, 2007).

Les nouvelles propriétés de ces protéases ont également révolutionné la biotechnologie avec leur exploitation dans différentes applications comme la valorisation de certains déchets kératiniques, tels que : les plumes, les poils, les sabots et les ongles (qui sont riches en kératine, en collagène, en élastine, en albumine et en acides aminés et peptides à haute valeur ajoutée) (ESSIEN et *al.*, 2009).

Dans l'industrie de volaille, le traitement typique de 400 millions de poulets dans le monde entier est réalisé à chaque semaine, avec 125 g de plumes pour chacune. En total, elle génère environ cinq millions de tonnes (GODHEJA et *al.*, 2014). Cela résulte un problème d'accumulation quotidienne de déchets, qui connaissent un processus de dégradation ralentie dans la nature.

Afin de minimiser régulièrement ce problème incontrôlable, les protéases interviennent pour transformer ces déchets en protéines alimentaires digestibles de haute valeur nutritive pour les animaux et en produits favorisant l'obtention de la biomasse microbienne et la production d'enzymes protéolytiques.

Dans ce contexte, la présente étude traite la sélection des moisissures les plus protéolytiques, afin de tester leur capacité à dégrader les plumes de poulet. Pour cela, plusieurs objectifs sont fixés, à savoir :

- ✓ Le repiquage et la purification des moisissures sur milieu PDA.
- ✓ La sélection des souches protéolytiques sur milieu au lait gélosé (à 20% d'agar) à différentes températures, suivie par leur identification.
- ✓ La production de protéase alcaline par les souches sélectionnées sur un milieu de fermentation à base de plumes de poulet.
- ✓ Enfin, le dosage de l'activité protéolytique de ces souches, dans le but de déterminer la souche la plus performante.

# *Chapitre 01*

## *Synthèse Bibliographique*

## 1. Les protéases

### 1.1. Généralités et origine des enzymes industrielles

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (de 10 000 jusqu'à 100 000 daltons), qui catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins  $10^6$  fois, par rapport à la réaction en leur absence (GRANNER, 2008). Elles sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel dans plusieurs procédés métaboliques. Autre fonction importante, les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables (MEUNIER, 1999). Elles sont à la fois spécifiques du type de réaction catalysée et d'un seul substrat ou d'un petit ensemble de substrats fortement apparentés (GRANNER, 2008).

Exigeant moins d'énergie de réaction, les enzymes sont privilégiées en industrie, car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques, et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés. Également, les enzymes présentent de nombreux avantages au niveau environnemental : biodégradabilité, faible toxicité et formation de sous-produits compatibles avec l'environnement (BARNABE, 2003).

Les enzymes industrielles sont d'origine végétale, animale ou microbienne (COULTOULY, 1991 ; MEUNIER, 1999 ; RAO et *al.*, 1998). L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. C'est pourquoi la production d'enzymes à partir de microorganismes est privilégiée par les producteurs, puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants.

Les enzymes sont divisées en plusieurs classes selon leur mode d'action spécifique. Au niveau industriel, la classe d'enzyme la plus exploitée est celle des hydrolases. Parmi ces dernières, les protéases représentent le groupe le plus connu, le plus commercialisé dans le marché mondial des enzymes et le plus utilisé en biotechnologie industrielle (POOLE et *al.*, 2009).

## 1.2. Les enzymes protéolytiques

### 1.2.1. Généralités

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique.

Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires ou extracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques. Les protéases extracellulaires sont importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule (KALISZ, 1988). Ces dernières sont plus intéressantes à utiliser en industrie, car elles ne nécessitent pas d'étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Une centrifugation suffit pour les séparer des cellules.

Les protéases se différencient également selon leur mode d'action en : endopeptidases et exopeptidases.

Les deux types de protéases sont divisés en plusieurs classes et sous-classes (tableau 1).

**Tableau 1 : Classification des protéases (RAO et al., 1998).**

Type de protéase	Classes et sous-classes
<b>Exopeptidases</b>	Aminopeptidases
	-Peptidyle peptidases
	-Dipeptidyle peptidases
	-Tripeptidyle peptidases
	Carboxypeptidases
	-Sérine carboxypeptidases
	-Métallo-carboxypeptidases
	-Cystéine carboxypeptidases
	Protéases sérines
	Protéases cystéines ou protéases thiols
<b>Endopeptidases</b>	Protéases aspartiques ou protéases acides
	Métallo-protéases



### 1.2.2. Sources des protéases

Les protéases sont extraites aussi bien des plantes que des animaux ou des microorganismes (RAO *et al.*, 1998).

#### ➤ *Protéases animales*

La plupart des protéases d'origine animales sont pancréatiques. En effet, elles ont la propriété de dégrader les protéines alimentaires. Elles sont toutes synthétisées sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon autocatalytique dans des conditions bien déterminées, tels que : la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine (RAO *et al.*, 1998).

#### ➤ *Protéases végétales*

Les enzymes d'origine végétale et spécialement les protéases sont par ordre décroissante en technologie. La papaine, la bromélaïne, la kératinase et la ficine représentent quelques-unes des protéases bien connues d'origine végétale (RAO *et al.*, 1998).

#### ➤ *Protéases microbiennes*

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (SANDHYA *et al.*, 2005). Elles sont produites par une grande variété de microorganismes dont les bactéries, les actinomycètes, les moisissures et les levures (DEVI *et al.*, 2008). Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (SANDHYA *et al.*, 2005). Le grand succès des protéases microbiennes dans les systèmes biotechnologiques est attribué à la diversité biochimique très large, à la faisabilité de la culture en masse et à la facilité des manipulations génétiques (FERRERO, 2000; WU *et al.*, 2006).

Une large proportion des protéases commerciales disponibles, principalement les protéases neutres et alcalines sont dérivées des bactéries, particulièrement de souches de *Bacillus* (JOO et CHANG, 2005 ; LAXMAN *et al.*, 2005 ; SRINUBABU *et al.*, 2007). Leurs propriétés sont adaptées à l'usage dans l'industrie des détergents (RAO *et al.*, 1998).

Des protéinases à partir de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus subtilis* sont commercialement utilisées (SINSUWAN et al., 2008).

D'autre part, une grande variété des protéases est également élaborée par les moisissures (RAO et al., 1998 ; WU et al., 2006). Les enzymes d'origine fongiques sont des enzymes extracellulaires, ce qui permet une séparation du mycélium du milieu de fermentation par une simple filtration (SANDHYA et al., 2005 ; DEVI et al., 2008). En outre, ces moisissures sont des souches grasses et peuvent se développer sur des substrats moins chers (DEVI et al., 2008).

### 1.2.3. Les protéases alcalines

Les protéases alcalines sont définies comme étant des enzymes qui sont hautement actives dans une gamme de pH de neutre à alcalin (SHARMA et al., 2014). En effet, elles fonctionnent le mieux à un pH de 8 à 11, leur température optimale est d'environ 60°C, et elles ont une large spécificité de substrat (KUMAR et al., 2012).

#### ➤ Production des protéases alcalines

Dans le développement industriel des souches, le potentiel de chaque souche est un facteur principal mais pas le seul à prendre en considération. En effet, en l'absence d'un régime régulé du procédé de fabrication, il est probable d'avoir une bonne souche mais des conditions de fermentation médiocres qui font chuter la production. Il est donc nécessaire de considérer tous les paramètres nutritionnels et environnementaux durant la croissance.

De plus, des essais de fermentation doivent être réalisés a priori pour pouvoir développer un procédé à grande échelle. Ainsi il serait possible d'obtenir de nouveaux mutants plus performants sous des conditions spécifiques au procédé. Ainsi dans toute production d'enzyme, l'objectif principal est la minimisation du coût de production en optimisant le procédé de récupération après fermentation afin de maximiser la production industrielle.

La plupart des microorganismes alcalophiles produisent des protéases alcalines. De ce fait, l'intérêt est limité à ceux pouvant les sécréter à des rendements élevés. Au cours de la production industrielle des protéases alcalines, les milieux de culture synthétiques à des concentrations élevées en hydrates de carbone, en protéines, etc., sont habituellement utilisés (100-150 g (poids sec)/L).

➤ **Augmentation du rendement de production**

Dans l'optique de produire une technologie économiquement fiable, les efforts de recherche sont concentrés sur : l'amélioration des rendements d'enzyme et l'optimisation des conditions de fermentation et des milieux de culture. Egalement, l'amélioration des souches joue un rôle clé dans le développement commercial des procédés de fermentation microbienne.

Il est généralement admis que les souches sauvages produisent des quantités limitées d'enzymes d'intérêt pour être utilisées à l'échelle industrielle (GLAZER and NIKAIDO, 1995). Beaucoup d'études ont été menées afin d'améliorer le rendement en protéases alcalines. Des approches récentes font intervenir le criblage de souches hyper productrices, en recourant éventuellement au clonage, au mode fed-batch, à la fermentation en continu et à l'optimisation des milieux de culture (GUPTA et al., 2002).

#### **1.2.4. Applications des protéases alcalines**

Ces enzymes contribuent au développement de produits à hautes valeurs ajoutées en exploitant leur activité de digestion partielle. Les domaines utilisant couramment les protéases dans leurs procédés sont:

➤ **Industrie du détergent**

L'industrie des détergents est actuellement le principal consommateur d'enzymes hydrolytiques agissant en milieu alcalin. Un intérêt particulier a été accordé aux enzymes pour leur capacité à éliminer les tâches protéiques et de ce fait atteindre des bénéfices impossibles à obtenir avec des technologies conventionnelles de fabrication de détergent.

Pour qu'une enzyme soit utilisée dans une formule de détergent, il faudrait qu'elle possède deux principales qualités : elle doit être active à des pH alcalins et doit être compatible avec les différents composants des détergents. L'utilisation principale des protéases compatibles dans les détergent concerne les formulations de lessives pour linge, et aussi les formulations pour vaisselle, là où elles sont très employées (KIRK et al., 2002 ; JOO et al., 2005 ; GENCKAL, 2006 ; JAOUADI et al., 2009).

Les fournisseurs d'enzymes et les industries de détergents sont toujours à la recherche de nouvelles activités enzymatiques répondant aux besoins d'une meilleure qualité de nettoyage, de meilleures propriétés antimicrobiennes et de protection des tissus exprimées par le consommateur.

De plus, les préparations pour le nettoyage des lentilles de contact contiennent une protéase alcaline produite par une bactérie marine permettant de réaliser un nettoyage à basses températures (BEZAWADA, 2010). GUPTA et *al.*, (2002) ont rapporté que les firmes Novo Nordisk et Genencor International sont les principaux fournisseurs de protéases avec une production de plus de 95% de la production totale du marché mondial.

➤ **Tannerie**

La technique chimique pour l'épilage des peaux d'animaux produit un effluent très pollué en plus d'être couteuse et drastique. L'alternative à ce procédé est l'utilisation des enzymes protéolytiques. Cet avantage est préférentiellement possible si la protéase est active en milieu alcalin (pH 11). Il serait aussi préférable qu'elle possède des activités élastolytiques et kératinolytiques. Il a été rapporté que des protéases de certaines microorganismes de nature alcalophiles étaient performants pour accélérer l'opération d'épilage (NILEGAONKAR et *al.*, 2007).

➤ **Récupération de l'argent**

La mise en place d'un bioprocédé de récupération en continu de l'argent à partir de films de rayons X usagés en employant les protéases alcalines, a été rapportée par FUJIWARA et *al.*, (1989). En effet, ces pellicules contiennent approximativement 1.5 à 2% (p/p) d'argent dans leurs couches de gélatine.

➤ **Usages médicaux**

Les collagénases à activité protéasique sont de plus en plus utilisées en thérapie dans les formulations de médicaments.

Une nouvelle protéase semi alcaline avec une importante activité collagénolytique a été produite par *Aspergillus niger* LCF9.

L'enzyme a permis l'hydrolyse de différents types de collagènes sans libération d'acides aminés mais plutôt des peptides à faible poids moléculaire possédant un potentiel thérapeutique (BEZAWADA, 2010).

De plus, la plupart des espèces du genre *Bacillus* ont été reconnues en tant qu'organismes sans danger pour les humains (BEZAWADA, 2010) ; elles sécrètent des protéases alcalines ayant des activités fibrinolytiques et qui sont utilisées comme agent thrombolytique (KIM et *al.*, 1996 ; BEZAWADA, 2010).

➤ **Industrie alimentaire**

Les protéases microbiennes ont beaucoup été exploitées dans l'industrie alimentaire. Ces enzymes ont été utilisées dans la préparation d'hydrolysats de protéines à haute valeur nutritionnelle. Les hydrolysats de protéines produits de la caséine, du lactosérum et de soja, jouent un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et sont employés dans les formulations des aliments hypoallergéniques pour enfants, dans les produits diététiques et pour l'enrichissement des jus de fruits et des boissons non alcoolisées (BEZAWADA, 2010 ; REDDY et *al.*, 2008).

Une élastase alcaline (TAKAGI et *al.*, 1992 ; BEZAWADA, 2010) et une protéase alcaline thermostable. WILSON et *al.*, (1992) ont montré leur efficacité dans l'attendrissage de viande (BEZAWADA, 2010). L'hydrolysats de viande produit montre d'excellentes propriétés organoleptiques et peut être utilisé en tant qu'additif aromatique dans les concentrés de soupe. Une hydrolyse d'environ 20% n'a pas montré d'amertume lorsque cette combinaison d'enzyme est utilisée.

➤ **Traitement des déchets**

Les protéases alcalines trouvent beaucoup d'applications dans le domaine de la gestion des déchets domestiques et des industries agro-alimentaires. Les protéines fibreuses de poils, de cheveux, d'ongles ou encore de plumes sont des déchets très abondants dans la nature. Ceux-ci peuvent être transformés en biomasse, en concentrés protéiques ou en acides aminés en utilisant l'action des protéases de certains microorganismes (ANWAR et SALEEMUDDIN, 1998).

Similairement, beaucoup d'autres protéases alcalines kératinolytiques ont été utilisées pour la dégradation des rejets kératineux (BEZAWADA, 2010) et en tant qu'agents épilatoires pour éliminer les restes de cheveux dans les drains sanitaires responsables de l'émission d'odeurs nauséabondes (TAKAMI et *al.*, 1992 ; BEZAWADA, 2010).

➤ **Industrie chimique**

Il est maintenant bien établi que les enzymes dans les milieux organiques rendent possible d'utiliser la biocatalyse dans le domaine de la synthèse chimique. Cependant, une conséquence majeure de cette approche est que l'activité enzymatique soit réduite sous des conditions de déshydratation assez poussée. De ce fait, il serait important de découvrir un moyen de garder l'activité enzymatique à son maximum dans un milieu organique.

Certaines études ont montré la possibilité d'utiliser la protéase alcaline pour catalyser la synthèse de peptides en milieu organique. De plus, plusieurs travaux ont été réalisés pour synthétiser des peptides par des enzymes immobilisées sur des supports insolubles (BEZAWADA, 2010).

## 2. Les moisissures

### 2.1. Généralités

Les moisissures peuvent être définies comme étant des microorganismes hétérotrophes (NICKLIN et *al.*, 2000). Ce sont des eucaryotes qui possèdent un appareil végétatif dépourvu de tiges, de racines et de feuilles appelé *thalle ou mycélium* (BOTTON et *al.*, 1990). Ce thalle détectable à l'œil nu est formé par ramification des hyphes (filaments) au cours de leur croissance sur un substrat donné. La paroi de la plupart des moisissures est composée de la chitine : un polymère formé d'unité de N-acétyl glucosamine (GUIRAUD, 1998 ; PERRY et *al.*, 2004 ; WALKER et WHITE, 2005).

Elles sont communément observées sur les déchets organiques. Ce sont des champignons pluricellulaires (filamenteux), alors que les levures sont des champignons unicellulaires (MADIGAN et MARTINKO, 2007).

Les moisissures étant qualifiées comme « *septomycètes* » lorsque des cloisons transversales s'y forment, et donne une apparence subdivisée en éléments uni ou plurinucléés. Les « *siphomycètes* » sont ceux dépourvus de cloisons et présentent un appareil végétatif formé d'une série de boyaux (LANIER, 1978).

Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores (BOURGEOIS, 1989). Elles peuvent être noires, bleues, vertes, rouges, jaunes ou brunes ; leur présence donne au mycélium un aspect poussiéreux (MADIGAN et MARTINKO, 2007).

Le mode de vie des moisissures est généralement saprophytique, celles-ci se développent aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (BOURGEOIS, 1996). Certaines sont parasites des animaux ou végétaux, d'autres sont symbiotes comme ceux des mycorhizes (LANIER, 1978).

### 2.2. Conditions de croissance des moisissures

Ces microorganismes sont chimioorganotrophes, se caractérisent par des besoins nutritionnels élémentaires (MADIGAN et MARTINKO, 2007).

### 2.2.1. Sources minérales

La présence des ions minéraux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques. Il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus ou moins différentes selon l'espèce (UCHICOBA et *al.*, 2001). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, ... (BOIRON, 1996).

### 2.2.2. Facteurs physicochimiques

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination, nous examinerons successivement quelques paramètres importants :

#### ➤ *Température*

La plupart des moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C (BOTTON et *al.*, 1999 ; JULIEN, 2002). D'autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes, se développant à basses températures (entre -5 et 10°C) tels que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*. Ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans des entrepôts frigorifiques (DAVET, 1996 ; BOTTON et *al.*, 1999).

Seulement quelques espèces de mycètes sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au-dessus de 50°C). En effet, les mycètes thermophiles ont une température de croissance minimale inférieure à 20°C et maximale supérieure à 50°C (BROCK, 1995). *Aspergillus fumigatus* en est un bon exemple (BOTTON et *al.*, 1999 ; NICHLIN et *al.*, 2000).

Par ailleurs, TANSEY et BROCK (1978) ont répertorié 30 espèces fongiques croient à des températures élevées modérément (60°C à 62°C).



➤ **pH**

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5-8.0 (BOTTON et al., 1999), bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH. *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* et *Aspergillus oryzae*, ont une tendance à croître dans des milieux légèrement acides (URBANEK et al., 1984 ; DELGADO et al., 2002).

➤ **Humidité**

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes. Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation (DAVET, 1996).

➤ **Aération**

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeurs comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (BOURGEOIS, 1989 ; BOTTON et al., 1999).

➤ **Lumière**

La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (BOTTON et al., 1999). Les radiations du spectre visible (380 - 720 nm) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation.

### 2.2.3. Macroéléments

➤ **Source de carbone et d'énergie**

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (BOIRON, 1996 ; NICKLIN et al., 2000).

Certaines d'entre elles produisent des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acides gras qui peuvent être assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol (BOIRON, 1996).

➤ *Source d'azote*

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sels ( $\text{NH}_4^+$ ), dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrates, acides aminés, protéines).

L'ammoniaque est transformée en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (BOIRON, 1996). Alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (PUNT et *al.*, 2000).

### 3. Les plumes

#### 3.1. Production mondiale de la volaille

Au cours des 30 dernières années, la production et la consommation de la volaille dans le monde ont connus un développement important. En effet, la chair de volaille est la deuxième viande la plus consommée au monde, avec une production en croissance permanente, qui a pu atteindre 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 *Etats-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 2.

**Tableau 2** : Production du poulet estimée en 2012 (Source FAO-STAT).

Pays	Production du poulet (million de tonnes)
USA	19.8
Chine	18.5
Brésil	13.1
UE 27	12.2
Inde	2.5
Russie	3.3
Monde	104.5

#### 3.2. Production des volailles en Algérie

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 (DIARRA, 2014).

Parmi les pays de la région du *Grand Maghreb*, l'*Algérie* figure dans les premières places dans l'élevage des poulets. Elle représente 20 à 35% du cheptel de volaille de la région selon les espèces, avec un nombre de têtes de poulets de 124 millions en 2007. Par ailleurs, l'*Algérie* a été classée ces dernières années, en deuxième position derrière le Maroc, avec un nombre de tête de poulets atteignant 140 millions, représentant ainsi 34,71% du cheptel de la région (DIARRA, 2014).

### 3.3. Déchet de volailles

L'industrie mondiale de la volaille est énorme, 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% de chaque poulet respectivement, alors que le reste devient des déchets après sa transformation (HAINES, 2004 ; DIARRA, 2014). Il est à noter qu'environ 4 millions de tonnes de déchets de plumes de volaille, sont produits par an dans le monde entier (SAHA, 2009 ; DIARRA, 2014).

Ces déchets constituent cependant, une source potentielle de biomasse valorisable, en raison de leurs teneurs en matière organique et en fibres.

### 3.4. Les plumes de poulet

#### 3.4.1. Origine

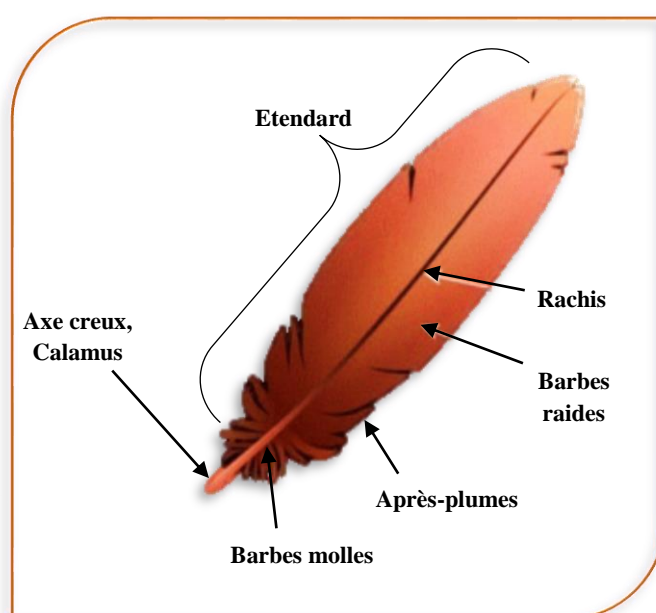
Les plumes proviennent des volailles, ce sont des coproduits naturels de l'industrie alimentaire présentant des caractéristiques physiques spécifiques, tel qu'un pouvoir isolant et une légèreté, surtout utilisées dans l'industrie de textile.

Les plumes ne doivent pas, sauf exception, être considérées comme déchets mais plutôt comme une matière première naturelle traditionnelle. Elles sont des sous-produits d'activités parmi lesquels on distingue deux catégories :

- Les plumes et duvets neuves provenant de l'élevage et de l'abattage des palmipèdes ou oiseaux terrestres.
- Les plumes de récupération provenant des articles textiles contenant des plumes.

### 3.4.2. Structure et Composition

La plume est composée d'un axe central nommé le rachis, creux à sa base et plein dans sa partie principale. Elle porte des barbes, insérées en deux séries de part et d'autre de l'axe dans un seul plan et enchevêtrées par des barbules perpendiculaires, qui ne peuvent pas être observées à l'œil nu. Ces derniers sont accrochées les unes aux autres grâce à des crochets (FAKHFAKH-ZOUARI N, 2010) qui les tiennent (figure 1). Cette plume est très riche en acides aminés.



**Figure 1 :** Schéma d'analyse d'une plume.

La plume est générée en grandes quantités comme sous-produit dans l'industrie des volailles à l'échelle mondiale. Elle est considérée comme une très riche source de protéines surtout la  $\beta$ - kératine (protéine fibreuse insoluble) qui constitue 91% de la plume (GODHEJA et *al.*, 2014). La présence de la kératine rend la plume récalcitrante à la plupart des protéases communes comme la trypsine, la pepsine et la papaïne, ce qui ralentit son processus de dégradation dans la nature.

De plus, ces plumes possèdent une partie non protéique qui inclut des pigments, des minéraux, des polysaccharides, des nucléotides, de l'acide urique, du glucose et du ribose (GROSSR, 1956).

### 3.4.3. Plumes et industrie des volailles

La majeure partie des déchets de plumes est mal recyclée dans l'environnement et a utilité limitée en raison de la nature chimique de la kératine non réactive. Classiquement, ces déchets ont été convertis en compléments alimentaires, résultant dans l'alimentation une mauvaise qualité qui est non viable économiquement. Ainsi, le recyclage de ce sous-produit est ni rentable, ni écologique. L'élimination de ces déchets est un problème environnemental mondial entraînant une pollution de l'air et de métré ressources en eau. Au cours des dernières années, Les plumes traitées avec une protéase (la kératinase) microbienne attire une grande attention dans plusieurs applications (GODHEJA et *al.*, 2014).

La kératine est hautement résistante à l'hydrolyse, sa durabilité est due à la liaison de chaînes de polypeptide étroitement emballées. Toutefois, les champignons kératinophiles ont souvent été isolés du sol, où ils colonisent divers phanères, les dégradent et ajoutent le contenu minéral dans le sol.

Les plumes d'oiseaux sont les substrats les plus appropriés pour la survie de beaucoup de champignons dans la nature. Ces derniers pourraient minimiser les problèmes de réglementation de l'accumulation incontrôlée des déchets de plumes.

### 3.5. Valorisation des plumes de volaille

A l'instar de la laine et du cuir, les plumes et duvets sont des coproduits 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 ; DIARRA, 2014).

Donc, les plumes ne doivent pas, sauf cas particulier, 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 (NOUAD, 2011 ; DIARRA, 2014), etc.

# *Chapitre 02*

## *Matériel et Méthodes*

## 1. Présentation du travail

Notre travail de recherche a été réalisé entre Février et Juin 2015 au niveau du Laboratoire de Microbiologie RDC, en collaboration avec les laboratoires de Biochimie et de Biologie et Environnement au Biopôle de *Chaab-Ersass*, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université *Des Frères Mentouri Constantine*.

Le travail a été réparti sur trois parties successives, à savoir :

- La mise en évidence de l'activité protéolytique des moisissures thermophiles sur milieu sélectif (lait gélosé à 20% d'agar) à différentes températures.
- L'identification des moisissures sélectionnées.
- La production de la protéase alcaline par ces souches fongiques identifiées sur milieu à base de plumes de poulet.

## 2. Matériel biologique

Les vingt-deux souches de moisissures utilisées dans ce travail ont été isolées à partir de deux sites différents du sol de «*Hammam Debagh*», *Guelma, Algérie* par AMOURA et BAZ (2014).

### 2.1. Revivification des souches

Elle a été réalisée par prélèvement de quelques spores ou un fragment mycélien à partir des tubes PDA inclinés (annexe 1) de chaque souche, que l'on transfère sur le même milieu coulé dans des boîtes de Pétri sous les conditions d'asepsie. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours.

### 2.2. Conservation

Les souches fongiques purifiées (revivifiées) sont conservées par la méthode la plus simple et la plus utilisée au laboratoire qui consiste à repiquer ces souches en tubes sur gélose inclinée PDA. Après 7 jours d'incubation à 30°C, les cultures sont conservées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (UI-HAQ et *al.*, 2002). Un repiquage s'est effectué tous les deux mois sur le même milieu afin d'assurer la préservation de la vitalité de la souche (TAKAHASHI et *al.*, 2008 ; PATIDAR et *al.*, 2007).



### 3. Test d'activité protéolytique

Les souches revivifiées ont été ensemencées sur milieu de culture sélectif ; lait gélosé à 20% d'agar (annexe 2) par une touche centrale (de quelques spores), puis incubées dans des étuves à différentes températures : 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C et 60°C pendant 7 jours.

Ce test d'activité protéolytique est basé sur la diffusion des protéases secrétées par ces souches fongiques dans le milieu de culture, et la dégradation de la caséine du lait autour de la colonie. Ce fait s'explique par l'observation directe d'un halo translucide (anneau de protéolyse) autour de la colonie fongique avec un diamètre proportionnel à la quantité des protéases libérées. L'activité est significative si le diamètre de l'halo est supérieur ou égal à 3 mm.

En effet, des mesures quotidiennes de l'halo pour chaque souche ont été effectuées afin de bien suivre le développement de l'activité.

Chaque opération (repiquage et mesure) a été réalisée en deux répétitions. Toutes les moisissures qui ont développé une zone d'hydrolyse sont observées au microscope optique (type : *Motic*, objectif x40 et x100) dans le but de les identifier.

### 4. Méthodes d'identification

Les souches protéolytiques les plus performantes ont été soumises à une identification macroscopique (caractères cultureux) et microscopique (caractères morphologiques) selon BOTTON et *al.* (1990). Cette étude a été réalisée en deux répétitions.

#### 4.1. Identification macroscopique

L'identification macroscopique des moisissures sélectionnées a été réalisée par un examen à l'œil nu des cultures sur milieux gélosés PDA (OTTAVIANI et *al.*, 1988 ; BOTTON et *al.*, 1999).

Cet examen permet de déterminer les caractères cultureux suivants :

#### Sur la surface

- La vitesse de croissance.
- La texture et la couleur du thalle.

- La forme, le contour et le relief des colonies.
- Formation de gouttelettes ou pas.

#### **Sur le revers**

- Couleur et pigmentation.
- Incrustation dans la gélose (BOTTON et *al.*, 1990).

### **4.2. Identification microscopique**

L'examen microscopique a été effectué par un prélèvement soigneux d'un petit fragment de la flore fongique (quelques spores et un fragment mycélien à la marge du thalle), à l'aide d'une anse du platine stérile. Ce fragment a été ensuite transféré sur une lame, en lui ajoutant comme diluant du lactophénol-bleu coton (annexe 3), l'observation microscopique a été réalisée au microscope optique (objectif x40 et x100).

Ce type d'identification est basé sur l'étude morphologique du 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).

## **5. Méthodes de fermentation**

La fermentation a été réalisée dans un milieu liquide à base de plumes de poulet, dans le but d'évaluer l'activité protéolytique développée par les souches fongiques retenues d'après les diamètres de leurs zones d'hydrolyse.

### **5.1. Préparation du milieu de culture**

Le milieu de culture a été préparé à partir des déchets de plumes de poulet. Les plumes utilisées dans ce travail sont celles qui recouvrent les poulets et délimitent leurs contours. Elles sont de couleur blanche, issues d'un poulailler local.

#### **5.1.1. Préparation des plumes**

Le processus de préparation de plumes a passé par les étapes suivantes :  
Nettoyage des déchets par élimination des saletés et lavage successifs à l'eau de robinet, (la dernière étape de lavage se fait à l'eau distillée).

Ensuite, séchage dans un four à 150°C pendant 5 min, puis pesée, découpage en petits morceaux et stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 20 min (BELMESSIKH, 2011).

### **5.1.2. Milieu liquide à base de plumes**

Les cultures submergées de chaque souche sélectionnée ont été réalisées sur bouillon de plumes contenant : NaCl (0,5 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,3 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4 g/L), FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0,01 g/L), CaCO<sub>3</sub> (1 g/L), MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0,2 g/L) et plumes (4g/L). Le pH du bouillon a été ajusté à 7,5 avant la répartition dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 50 ml du bouillon de plumes par erlen, puis stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 20min.

## **5.2. Préparation de l'inoculum**

### **5.2.1. Préparation des suspensions sporales**

Elle a été effectuée par récupération des spores à partir des cultures de moisissures sur milieu PDA en boîtes de Pétri ; en ajoutant une solution stérile d'eau physiologique (annexe 4), à raison de 10 ml/boîte de Pétri pour chaque souche cultivée sur ce milieu. À l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose afin d'obtenir des suspensions sporales fongiques. Cette étude a été réalisée en double.

### **5.2.2. Dénombrement des spores**

Des dilutions successives ont été réalisées afin de préparer les gammes étalons pour chaque souche. Le comptage des spores de ces gammes a été estimé par dénombrement sur cellule de *Malassez* sous microscope optique (type : *Motic*), grossissement (x40).

La lecture photométrique de chaque dilution à 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (type : *Jenway6300*) permet d'établir la courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction du nombre de spores des moisissures. Un ml de la suspension sporales contenant 10<sup>7</sup> spores/ml a été utilisé comme inoculum. Ce dernier a été préparé par référence aux courbes d'étalonnage de chaque souche (annexe 5).

### 5.3. Conduite de la fermentation

Chaque souche de moisissure sélectionnée a été inoculée avec 1 ml de sa suspension sporale dans un erlenmeyer contenant le bouillon de production (figure2). Ces erlenmeyers sont incubés à 30°C sous agitation à 150 rpm dans un incubateur agitateur (type : *Edison*) pendant 7 jours. Les expérimentations sont réalisées en double.

Après fermentation, les bouillons de culture ont été filtrés à travers le papier Whatman n°1 préalablement séché et pesé. Le filtrat clair ainsi obtenu représente l'extrait enzymatique brut. Il a été congelé pour les dosages protéolytiques.

A la fin des fermentations, les paramètres (pH et activité protéolytique) sont estimés.

## 6. Dégradation des déchets de plumes

La dégradation des plumes a été évaluée par la mesure du poids sec de ces déchets restant dans le bouillon de culture après incubation. Pour cela, les papiers filtre de chaque souche contenant le reste des plumes ont été séchés dans une étuve à 60°C pendant 20 heures. Elles sont ensuite mis dans un dessiccateur pour éliminer l'humidité, puis pesées jusqu'à poids constant. Les résultats ont été exprimés en pourcentage par rapport au poids initial (considéré 100%) des déchets des plumes.

## 7. Méthode de dosage enzymatique

L'activité de la protéase alcaline dans l'extrait enzymatique brut a été dosée par la méthode décrite par LENOIR et AUBERGER (1977) (BELMESSIKH, 2011) et modifiée par MECHAKRA et al. (1999).

### 7.1. Principe

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines en libérant des peptides simples et des acides aminés libres qui se trouvent dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA, ce qui permet de récupérer les fragments solubles dans le filtrat. La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines, sa présence dans le filtrat est traduite en activité protéasique par un dosage colorimétrique à l'aide du réactif de *Folin-Ciocalteu*.

Celui-ci réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

## 7.2. Réaction enzymatique

L'activité protéolytique est déterminée par utilisation de la caséine comme substrat, vue les avantages qu'elles présentent : la non-toxicité, la richesse en acides aminés aromatiques, la disponibilité et l'approvisionnement facile ; en plus elles sont pratiquement solubles dans les tampons (MECHAKRA *et al.*, 1999).

Le mélange réactionnel a été préparé par addition de :

- Extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage..... 1 ml
- Tampon Tris-HCl (0,2M / 0,1 M), pH 8 .....1,5 ml
- Substrat (solution de caséine 2,5% dans le citrate de sodium à 0,02 M) 2,5 ml

Après agitation, l'incubation de ce mélange se fait à 40°C pendant 30 min, puis la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid (4%). Par la suite, il a été laissé reposer 30 min dans un bain de glace (BEYNON et OLIVER, 2004 ; WU *et al.*, 2006 ; DEVI *et al.*, 2008) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (SANDHYA *et al.*, 2005). Le mélange a été après filtré sur papier Whatman n°1.

Par ailleurs, les témoins ont été parallèlement préparés dans les mêmes conditions en dénaturant l'enzyme ; c'est-à-dire en ajoutant le TCA avant le substrat.

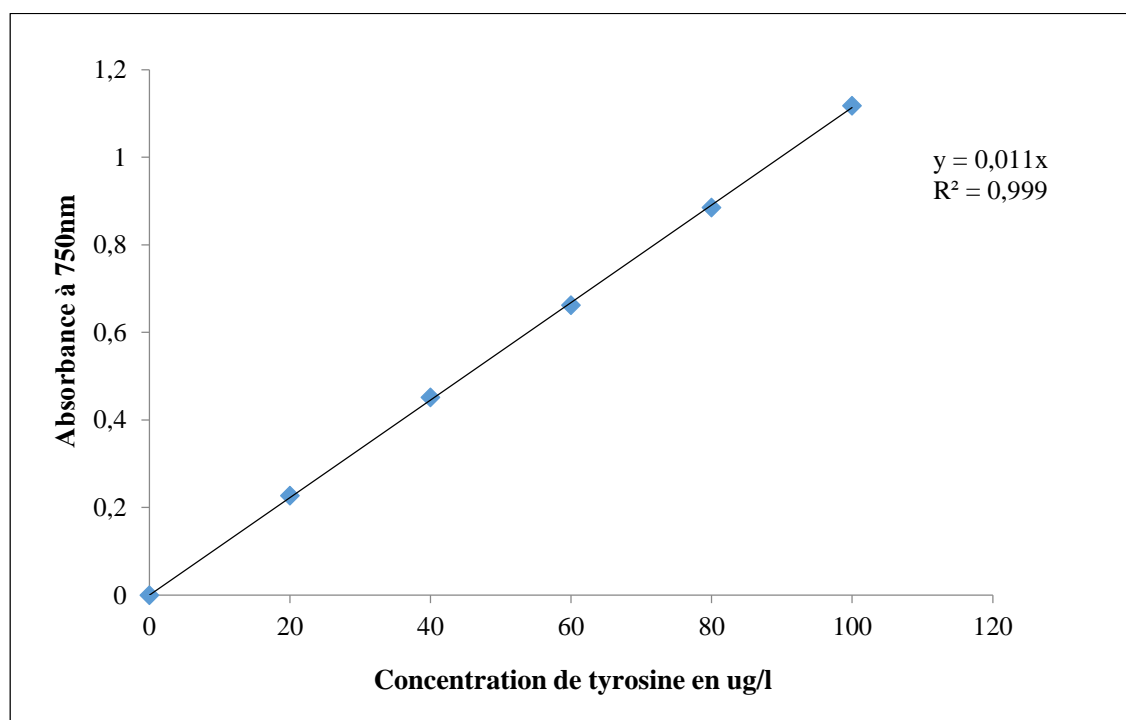
## 7.3. Protocole de dosage

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'ANSON (1938), en suivant ces étapes :

- Prendre 0,5 ml du filtrat et le mélanger avec 2,5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 2% dans le NaOH (0,1N), agiter et incuber 15 min à température ambiante, puis ajouter 0,25 ml du réactif de *Folin-Ciocalteu* dilué au 1/4<sup>ème</sup>.

- Les mélanges ont été bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 min (SUMANTHA *et al.*, 2006 ; PARANTHAMAN *et al.*, 2009).

L'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750 nm ; l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage (figure 3), établie préalablement dans les mêmes conditions en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 µg/ml (annexe 6). Une unité d'activité protéolytique (U) est définie comme étant la quantité de protéase qui libère 1 µg de tyrosine pendant 1 h de temps par 1 ml de cet enzyme. Chaque dosage est effectué en double.



**Figure 2 :** Courbe d'étalonnage de la tyrosine

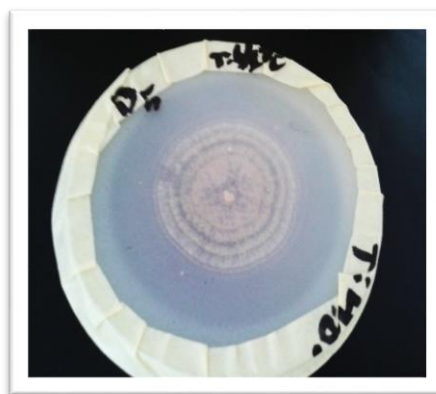
# *Chapitre 03*

## *Résultats et Discussions*

## 1. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Le choix de la substance protéique employée comme substrat pour la production des protéases est très important. Pour cet effet, le milieu utilisé comme milieu sélectif pour la mise en évidence de l'activité protéolytique chez 22 souches de moisissures, était le lait gélosé à 20% d'agar (CLARKE et STEEL, 1966). Ce milieu présente plusieurs avantages tels que la simplicité de préparation, la variété, la richesse en protéines et le faible cout (SMITH et *al.*, 1952).

Les souches protéolytiques sont reconnues par la formation des halos translucides au tour des colonies.



**Figure 3 :** Formation d'un halo translucide au tour de la colonie.

Les résultats obtenus après incubation sur le milieu sélectif ont démontré que la plupart des souches ayant une activité protéolytique. Cette observation démontre clairement que, d'une part, ces moisissures revivifiées sont capables d'hydrolyser la caséine (protéine) du lait qui donne des acides aminés solubles utilisables, et d'autre part, que les enzymes responsables de cette hydrolyse sont sécrétées dans le milieu extérieur. Ces résultats permettant de considérer ces souches comme des moisissures productrices de protéases exocellulaires, ce qui représente un point très positif pour leur production et leur caractérisation.

Chaque souche protéolytique est capable de générer une zone de protéolyse de diamètre supérieure à 3 mm. Le diamètre de l'halo est proportionnel soit à la quantité de protéases libérées par les colonies, soit à la diffusion des enzymes sécrétées dans le milieu pendant le temps d'incubation.



Les diamètres des zones de croissance et d'hydrolyse de chaque souche après 7 jours d'incubation à différentes températures (35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C et 60°C) sont représentés dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** Mise en évidence de l'activité protéolytique sur le milieu lait gélosé à 20% d'agar chez la totalité des souches testées.

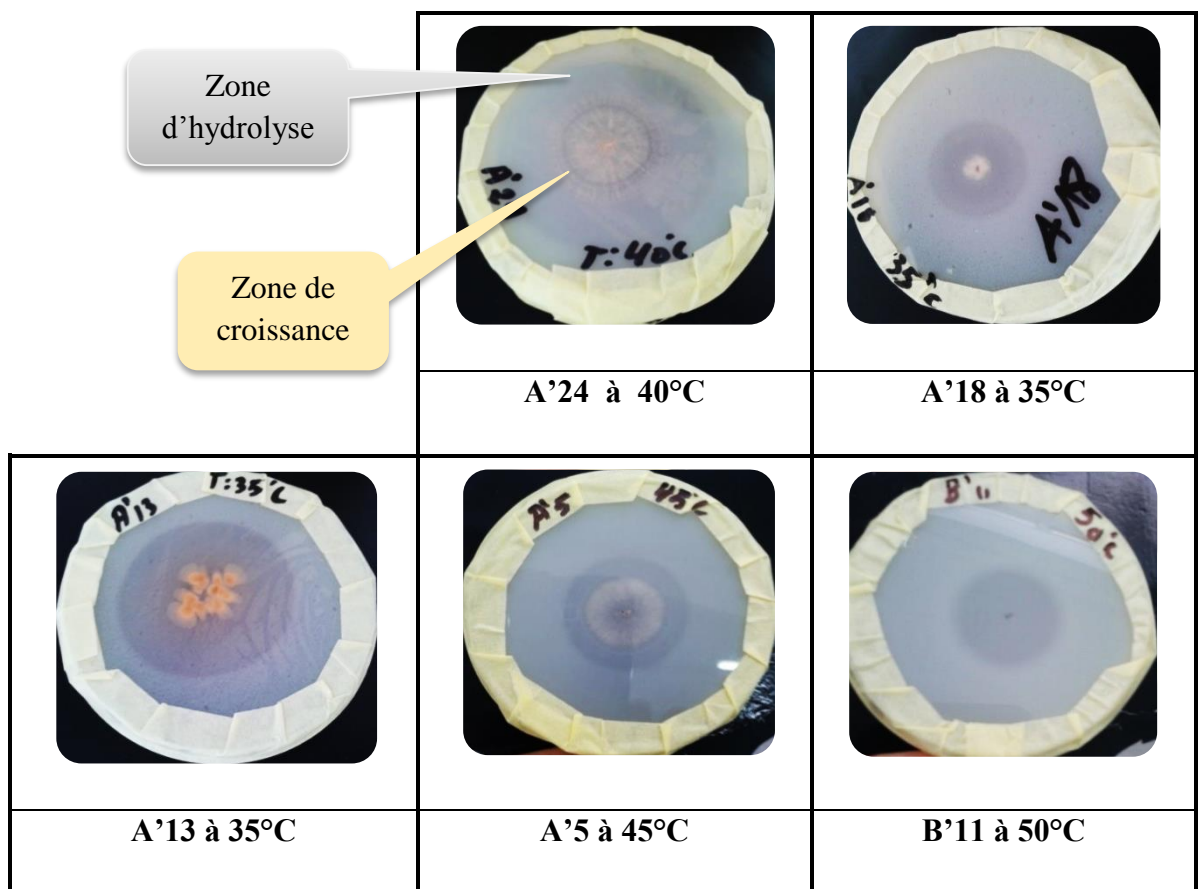
Température Code de la souche	Diamètre de la colonie (mm) après 7 jours d'incubation						Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm) après 7 jours d'incubation					
	35°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	35°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C
<b>A'35</b>	3	1	3	3	4	2	7	0	7	3	0	0
<b>A'24</b>	13	18	2	1	4	2	2	16	12	10	13	11
<b>A'18</b>	8	2	3	4	3	0	10	7	5	7	2	0
<b>A'13</b>	8	2	2	2	3	2	13	0	6	9	5	7
<b>A'5</b>	45	20	5	1	3	1	11	8	12	10	8	6
<b>A3</b>	4	6	3	1	1	0	0	0	2	0	0	0
<b>B'11</b>	3	1	4	2	4	1	4	4	13	16	15	13
<b>B'2</b>	55	6	3	2	2	1	5	10	15	16	14	5
<b>B'</b>	5	2	1	1	2	1	7	4,5	5	6	4	5
<b>B8</b>	2	1	5	3	3	2	6	3	7	6	2,5	6
<b>C'16</b>	2	3	1	1	2	1	0	0	0	2	0	1
<b>C'9</b>	7	1	1	1	2	1	4	0	3	0	1	0
<b>C'4</b>	3	1	5	9	3	1	4	0	12	14	6	3
<b>C15</b>	22	9	2	1	1	1	7	6	5,5	3	2	0
<b>D'8</b>	1	5	4	1	2	1	0	0	6	5	0	6
<b>D'2</b>	6	1	3	1	2	1	13	5	6	9	6	3

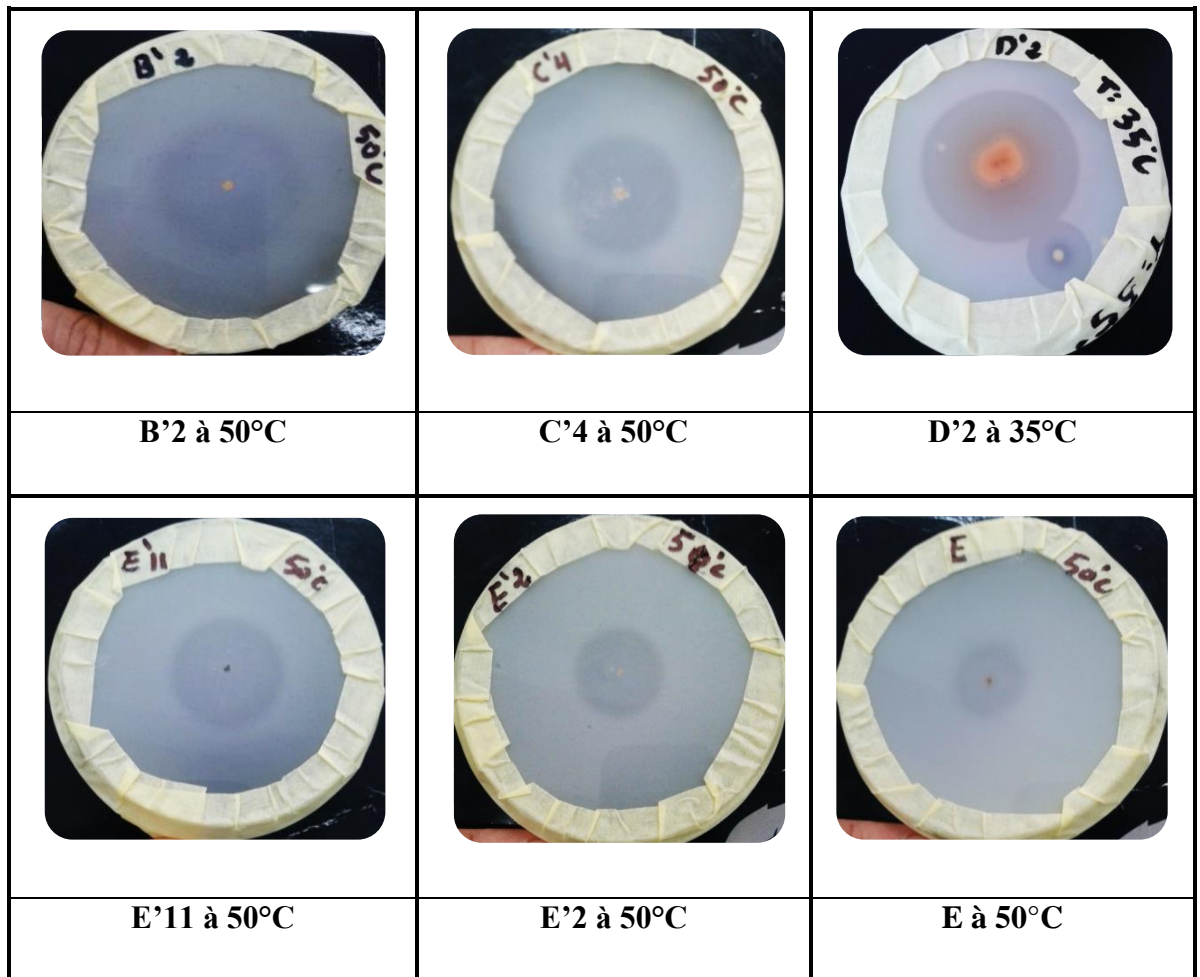
<b>D5</b>	60	42	4	7	4	5	3	7	5,5	4	1	1
<b>D2</b>	45	1	2	1	1,5	2	7	0	0	0	0	1
<b>D</b>	63	50	3	13	2	1	2	3	4	1	0	0
<b>E'11</b>	7	1	2	2,5	4	3	10	5	8	13	10	12
<b>E'2</b>	2	2	1	3	1	1	8	4,5	9	12	10	9
<b>E</b>	20	22	22	3	4	2	2	3	8	12	10	6

**Remarque :** 0 : Absence d'activité protéolytique.  
Les colonnes colorées sont les 11 souches sélectionnées.

La comparaison des diamètres de croissance et d'hydrolyse a permis de retenir 11 souches parmi les 22 testées pour la suite du travail ; à savoir l'identification et la fermentation.

Les souches sélectionnées sont : A'24, A'18, A'13, A'5, B'11, B'2, C'4, D'2, E'11, E'2 et E, elles sont caractérisées par des zones d'hydrolyse, dont le diamètre varie de 8 à 16 mm (figure 4).



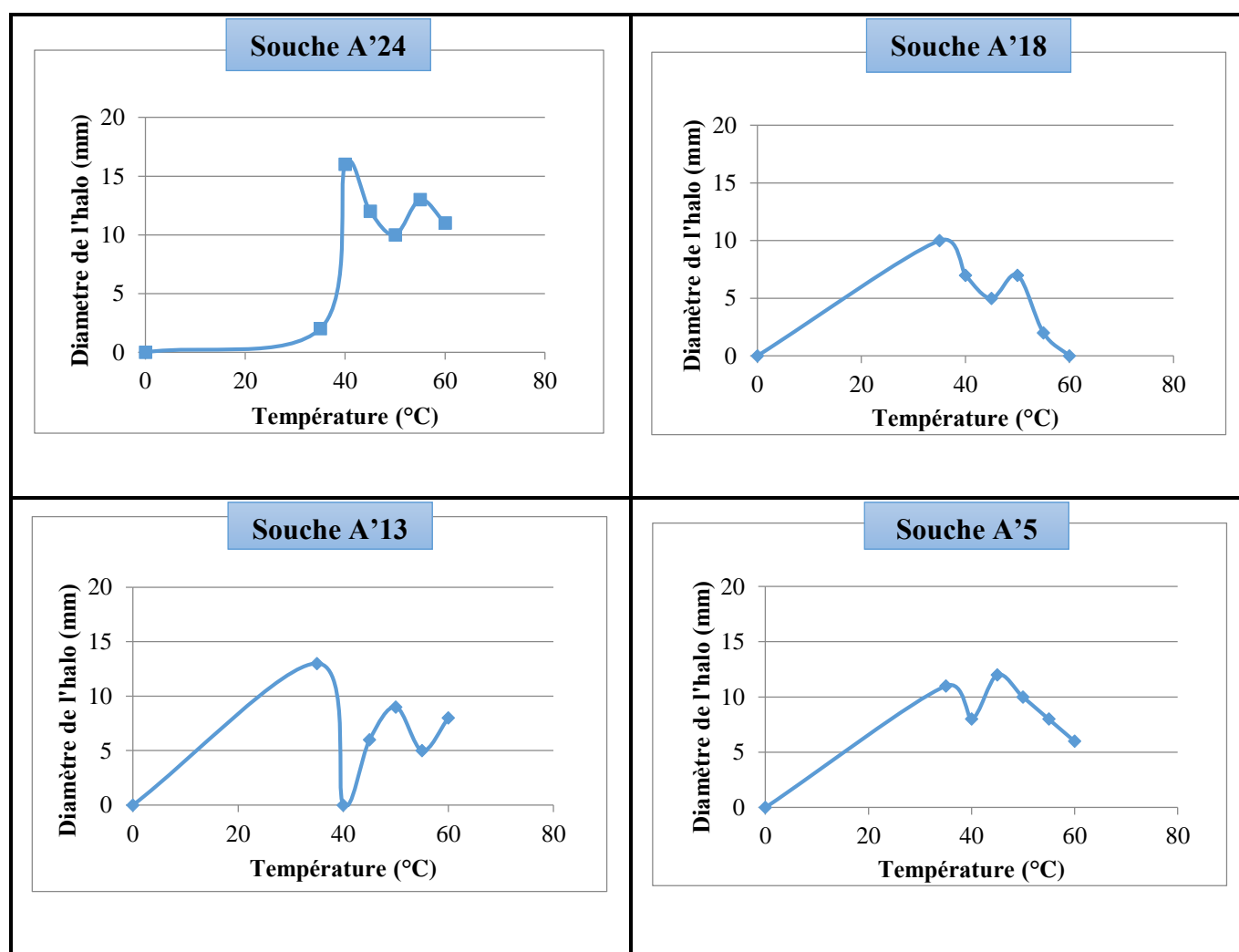


**Figure 4 :** Représentation de la zone de croissance et la zone d'hydrolyse chez les 11 souches retenues.

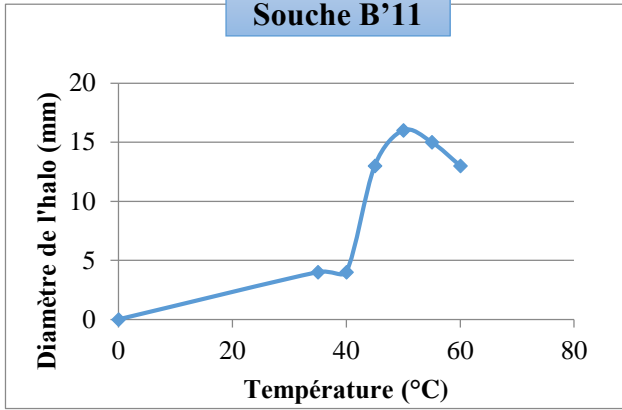
Il est à noter que même en absence d'une activité protéolytique exocellulaire, on observe un envahissement du milieu par les moisissures. Ceci indique une utilisation des sucres totaux présents dans le lait comme source de carbone et d'énergie ou par la production d'une activité protéolytique endocellulaire (DEBANANDA *et al.*, 2009).

## 2. Effet de la température sur la production de protéases

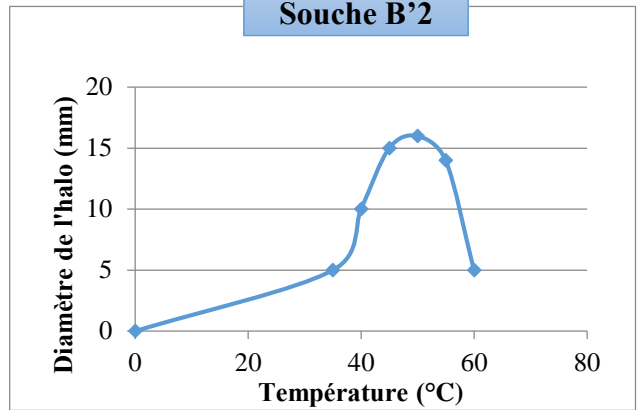
Auparavant, la température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (CAI *et al.*, 2008). Afin de déterminer la température optimale pour la production de protéases pour les 11 souches sélectionnées, des graphes du développement du diamètre de l'halo (représentant la sécrétion des protéases) en fonction de la variation de la température ont été établis dans la figure 5.



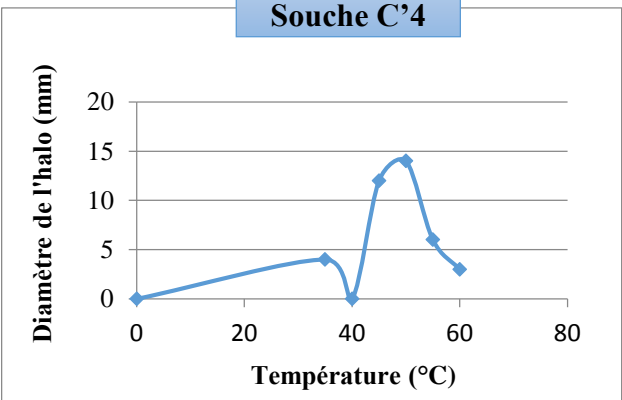
**Souche B'11**



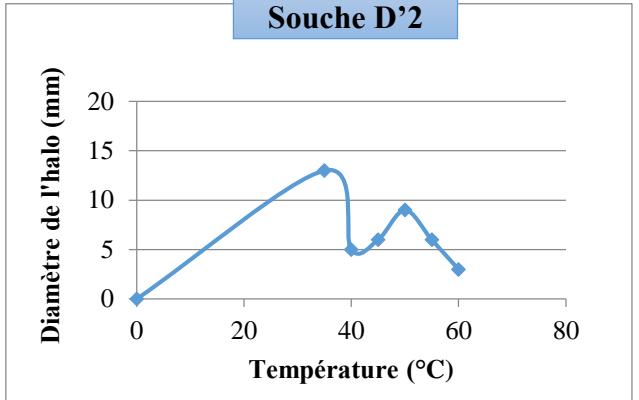
**Souche B'2**



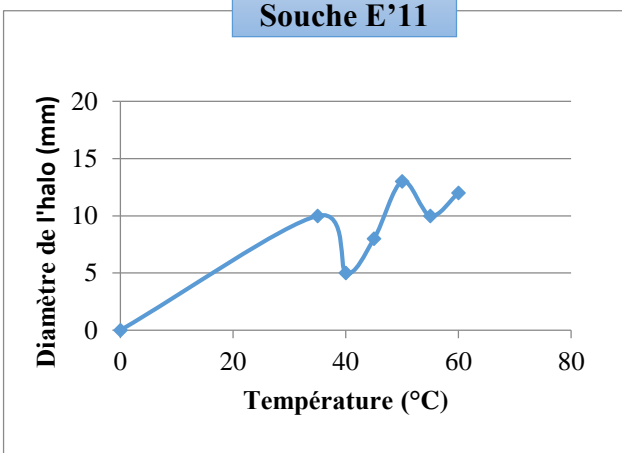
**Souche C'4**



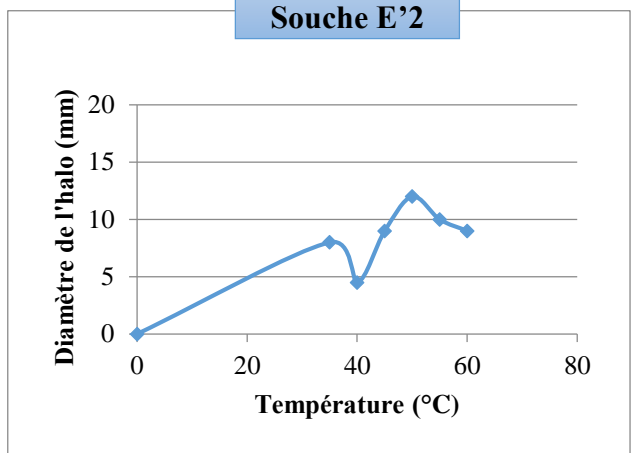
**Souche D'2**

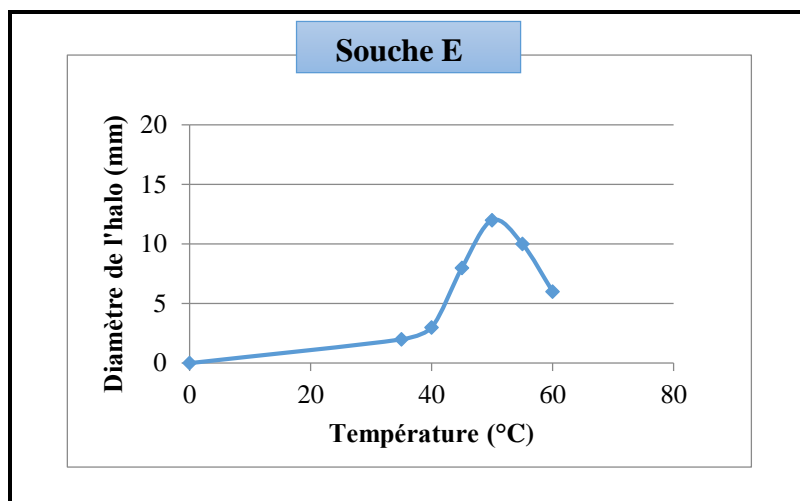


**Souche E'11**



**Souche E'2**





**Figure 5 :** Courbes représentant l'effet de la température sur l'activité protéolytique chez les 11 souches sélectionnées.

A partir de ces graphes, on observe que les espèces A'24, A'18, A'13, A'5 et D'2 présentent une éventuelle diminution de la production de protéases à partir de la température 40°C, avec des optima de croissance de 35 à 45°C. En effet, les protéases de ces souches ne sont probablement pas des protéases thermostables.

Au contraire, les autres moisissures (B'11, B'2, C'4, E'11, E'2 et E) présentent une augmentation de la production à partir de la température 40°C, avec un maximum observé dans un intervalle de 45°C à 50°C (chez la plupart de ces souches), ces optima sont comparables à ceux observés précédemment par FAZOUANE et *al.* (2010). Mais au-delà de celles-ci la production de l'enzyme diminue de façon considérable. Ceci pourrait laisser dire que ces souches sécrètent bien des protéases thermostables et qu'elles sont thermotolérantes ou thermophiles car elles peuvent croître à haute température ( $\geq 50^\circ\text{C}$ ) (BOTELLA et *al.*, 2005) ; la souche E'11 est un bon exemple. Pour cela, les protéases de ces moisissures sont actives à différentes températures (35-60°C) dans le milieu gélosé à 20% d'agar.

SIALA et *al.* (2009) de leur côté, ont observé une production optimale de la protéase à 50°C.



### 3. Identification des souches sélectionnées




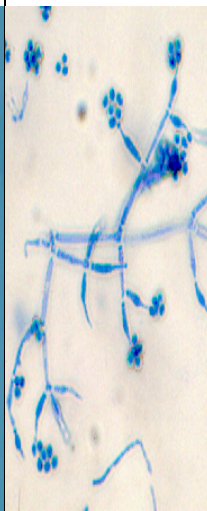


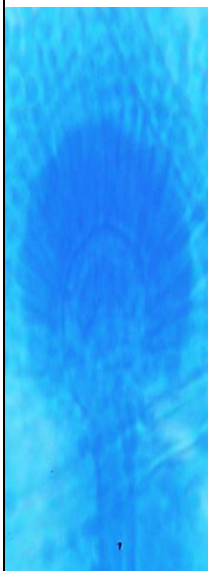
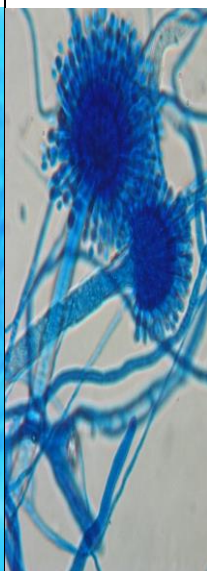



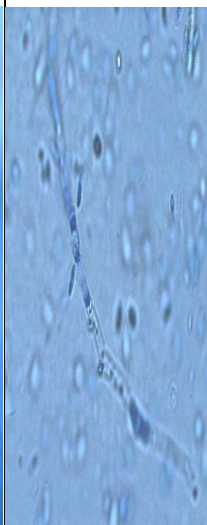
L'identification des 11 souches sélectionnées a été réalisée par macroscopie et microscopie, nous avons défini les souches fongiques protéolytiques qui sont représentées en 6 genres différents :

*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Chrysosporium* et *Scedosporium*..




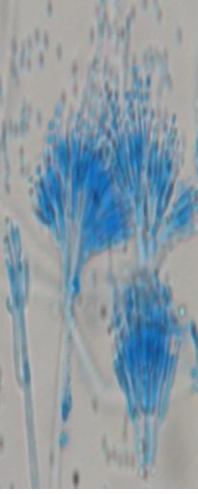


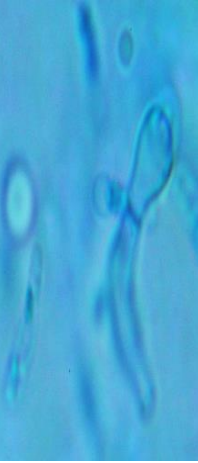
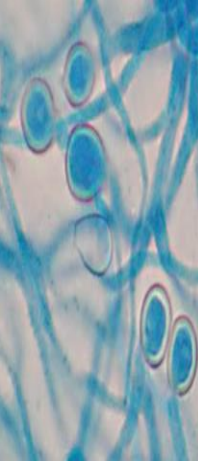



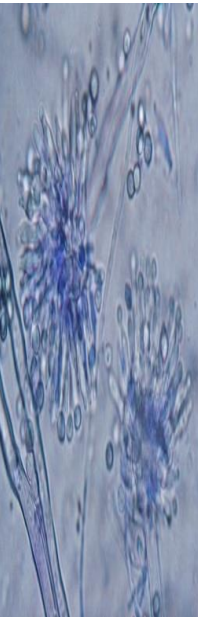
Les résultats sont représentés dans le tableau ci – dessous (tableau 4).





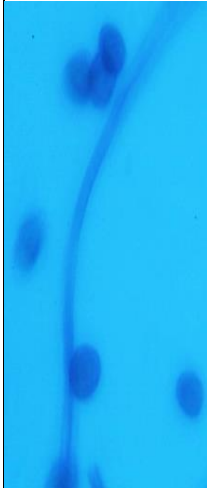

**Tableau 4 :** Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches retenues protéolytiques.


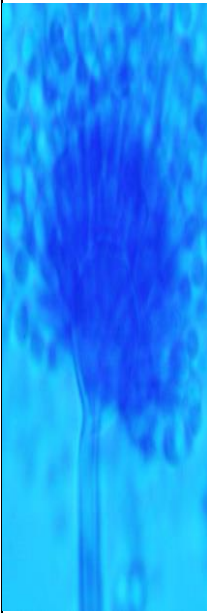
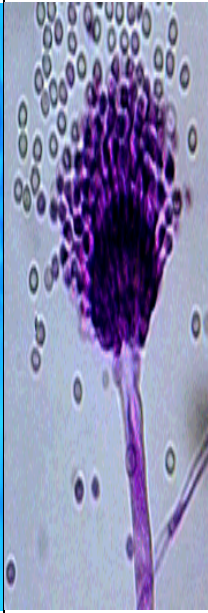
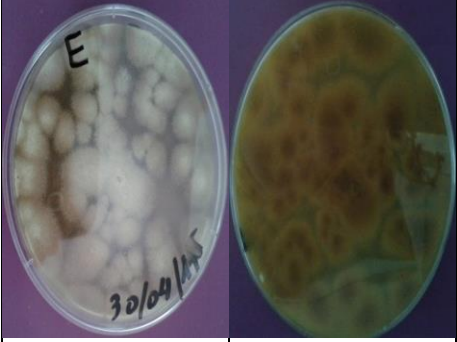
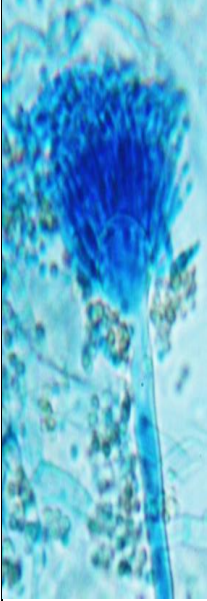

		Observation macroscopique			Observation microscopique		
Aspect Code de la souche	Surface	Revers	Description	Aspect microscopique obtenu	Photo microscopique de référence	Description	
	A'24 <i>Aspergillus sp.1</i>						<p><b>Vitesse de croissance :</b> rapide.</p> <p><b>Couleur du mycélium :</b> verte olive.</p> <p><b>Colonie :</b> simple à mycélium aérien, poudreuse et pigmentée.</p> <p><b>Revers :</b> beige marron.</p>

<p>A'18</p> <p><i>Trichoderma sp.</i></p>			<p><b>Vitesse de croissance :</b> rapide.</p> <p><b>Couleur du mycélium :</b> bleu verte à blanchâtre.</p> <p><b>Colonie :</b> simple à mycélium aérien et cotonneuse.</p> <p><b>Revers :</b> blanc crème.</p>			<p><b>Conidiophore :</b> en touffe compacte, très ramifié, irrégulièrement verticillé avec des ramifications à angle droit.</p> <p><b>Conidies :</b> réunies glomérules au sommet des phialides.</p>
<p>A'13</p> <p><i>Aspergillus sp.2</i></p>			<p><b>Vitesse de croissance :</b> moyenne.</p> <p><b>Couleur du mycélium :</b> marron cacao à verte pistaché.</p> <p><b>Colonie :</b> cratéiforme, gouttelette et pigmentée.</p> <p><b>Revers :</b> jaune à marron foncé au contour et à mycélium incrusté.</p>			<p><b>Conidiophore</b> long, hyalin, verruqueux.</p> <p><b>Vésicule :</b> sphérique.</p> <p><b>Phialides :</b> portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule.</p> <p><b>Conidies :</b> globuleuses et vert pâle.</p> <p><b>Tête aspergilaire :</b> bisériée et radiée.</p>
<p>A'5</p> <p><i>Aureobasidium sp.</i></p>			<p><b>Vitesse de croissance :</b> rapide.</p> <p><b>Couleur du mycélium :</b> blanche à jaune marron.</p> <p><b>Colonie :</b> simple à mycélium aérien, et cotonneuse.</p> <p><b>Revers :</b> beige foncé.</p>			<p><b>Thalle :</b> lisse, recouvert d'une masse visqueuse de spores.</p> <p><b>Conidies :</b> lisses, elliptiques.</p>



<p>B'11</p> <p><i>Penicillium sp</i></p>			<p><b>Vitesse de croissance :</b> rapide.</p> <p><b>Couleur du mycélium :</b> Verte grise.</p> <p><b>Colonie :</b> plate et granuleuse.</p> <p><b>Revers :</b> beige à vert.</p>			<p><b>Conidiophores :</b> simples ou ramifiés, parfois regroupés en buisson ou corémie.</p> <p><b>Phialides :</b> disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores.</p> <p><b>Conidies :</b> unicellulaire, rondes disposées en chaînes et lisse.</p>
<p>B'2</p> <p><i>Chrysosporium sp.</i></p>			<p><b>Vitesse de croissance :</b> rapide.</p> <p><b>Couleur du mycélium :</b> blanche à jaune.</p> <p><b>Colonie :</b> simple et cotonneuse.</p> <p><b>Revers :</b> jaune marron.</p>			<p>Le mycélium végétatif donne naissance à des conidies terminales ou latérales. unicellulaire, ovoïdes ou ampulliformes.</p>
<p>C'4</p> <p><i>Aspergillus sp.3</i></p>			<p><b>Vitesse de croissance :</b> moyenne.</p> <p><b>Couleur du mycélium :</b> blanche sale à jaune.</p> <p><b>Colonies :</b> petites plates et poudreuses.</p> <p><b>Revers :</b> beige jaune et incrusté.</p>			<p><b>Conidiophore :</b> lisse, sinueux et long.</p> <p><b>Vésicule :</b> globuleuse.</p> <p><b>Phialides :</b> portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule.</p> <p><b>Conidies :</b> globuleuses à légèrement elliptiques.</p> <p><b>Tête aspergilaire :</b> bisériée, en colonne évasée.</p>

<p style="text-align: center;"><b>D'2</b></p> <p style="text-align: center;"><i>Aspergillus sp.4</i></p>		<p><b>Vitesse de croissance :</b> rapide.</p> <p><b>Couleur du mycélium :</b> jaune verte.</p> <p><b>Colonie :</b> de taille moyenne, granuleuse, goutteletté et pigmentée.</p> <p><b>Revers :</b> jaune marron.</p>				<p><b>Conidiophore :</b> lisse, long.</p> <p><b>Vésicule :</b> ovale.</p> <p><b>Phialides :</b> portées par des métules insérées sur tout le pourtour de la vésicule.</p> <p><b>Conidies :</b> globuleuses, échinulées.</p> <p><b>Tête aspergilaire :</b> bisériée en colonne, courte et compacte.</p>
<p style="text-align: center;"><b>E'11</b></p> <p style="text-align: center;"><i>Scedosporium sp.</i></p>		<p><b>Vitesse de croissance :</b> Moyenne.</p> <p><b>Couleur du mycélium :</b> Verte-foncée, blanchâtre au centre.</p> <p><b>Colonies :</b> simple à hyphes plus au moins aériens.</p> <p><b>Revers :</b> vert olive, jaune au centre.</p>				<p>Les filaments mycéliens sont septés et ramifiés à angle aigu.</p> <p>Spores ovoïdes.</p>

<p>E'2</p> <p><i>Aspergillus sp. 5</i></p>		<p><b>Vitesse de croissance :</b> moyenne.</p> <p><b>Couleur du mycélium :</b> blanche à vert pistaché.</p> <p><b>Colonies :</b> moyennement élevées, séparées et poudreuses.</p> <p><b>Revers :</b> beige marron et incrusté.</p>			<p><b>Conidiophore :</b> lisse, sinueux et long.</p> <p><b>Vésicule :</b> globuleuse.</p> <p><b>Phialides :</b> portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule.</p> <p><b>Conidies :</b> globuleuses à légèrement elliptiques.</p> <p><b>Tête aspergilaire :</b> bisériée, en colonne évasée.</p>
<p>E</p> <p><i>Aspergillus sp. 6</i></p>		<p><b>Vitesse de croissance :</b> rapide.</p> <p><b>Couleur du mycélium :</b> marron cacao.</p> <p><b>Colonies :</b> simples et poudreuses.</p> <p><b>Revers :</b> marron et pigmenté.</p>			<p><b>Conidiophore :</b> lisse.</p> <p><b>Vésicule :</b> sphérique.</p> <p><b>Phialides :</b> portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule.</p> <p><b>Conidies :</b> rondes, vertes, échinulées.</p> <p><b>Tête aspergilaire :</b> bisériée en colonne, courte et compacte.</p>

#### 4. Fermentation des souches sélectionnées

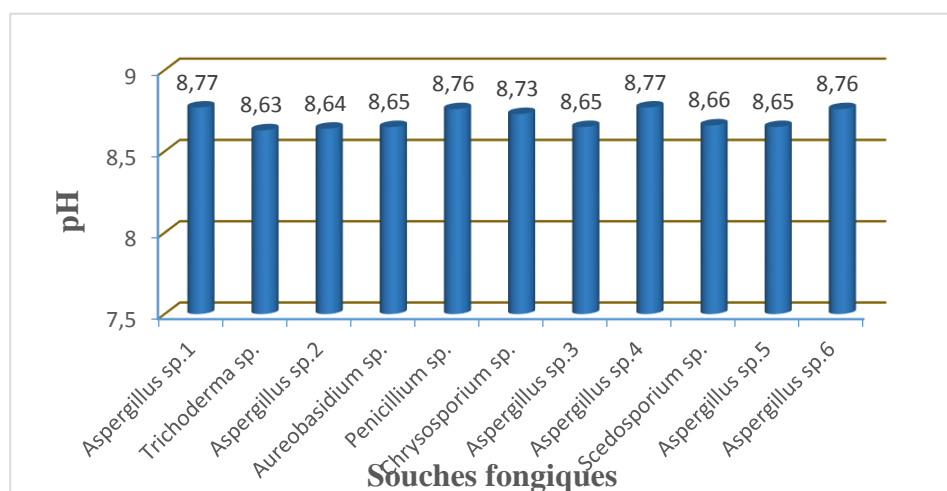
Les fermentations réalisées en erlenmeyers de 250 ml ont permis après certains jours, de récupérer les filtrats pour chaque souche fermentée afin d'extraire les protéases et réaliser le dosage enzymatique.



**Figure 6 :** Réalisation des fermentations dans des erlenmeyers de 250 ml.

##### 4.1. Résultats du pH

Les résultats du pH du filtrat des milieux de culture après fermentation sont mentionnés dans la figure 7.



**Figure 7 :** Résultats du pH pour les souches sélectionnées après fermentation.

Une simple observation de cette figure montre qu'il y a augmentation du pH du milieu, équitablement chez les 11 souches (du pH 7.5 à pH 8,...).

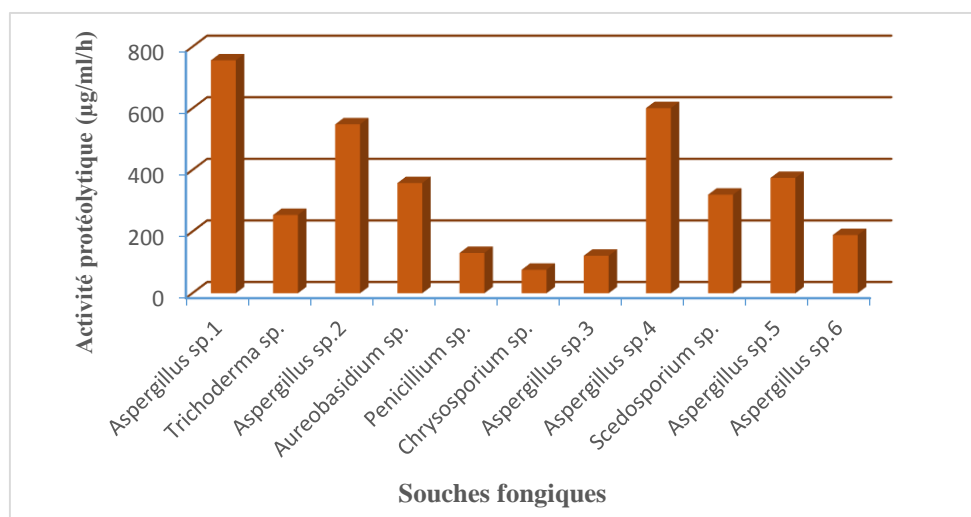
Cette tendance à augmenter le pH du milieu de culture résulte de la production d'ammoniaque ( $\text{NH}_3^+$ ) par moyen de la désamination des peptides et d'acides aminés provenant de la dégradation des protéines du milieu (WILKESMAN et KURZ, 2009). En fait, les souches inoculées ont certes utilisé les protéines de plumes comme source de carbone et d'énergie après l'action des protéases extracellulaires.

Pour cette raison, les microorganismes avec une forte capacité protéolytique rendent le milieu de culture plus alcalin que ceux qui étaient moins protéolytiques (WILKESMAN et KURZ, 2009).

Ces résultats indiquent que le pH du milieu est affecté par les processus enzymatiques. En effet, les variations du pH sont des indicateurs de changements dans les activités métaboliques.

Cela affirme que les déchets des plumes possèdent un excellent pouvoir tampon, comme c'est le cas pour la plupart des résidus environnementales (LEE et *al.*, 2010).

La figure 8 montre que la production de la protéase alcaline est maximale chez les souches ayant eu un pH maximal ( $\text{pH} \geq 8$ ).



**Figure 8 :** Résultats de l'activité protéolytique pour les souches sélectionnées après fermentation.

#### 4.2. Résultats de l'activité protéolytique

L'analyse des résultats et la comparaison des activités protéolytiques chez les différentes souches fongiques indiquent que la production de protéase alcaline obtenue par les quatre souches du genre *Aspergillus* A'24, A'13, D'2, et E'2 sur le milieu liquide à base de plume, est très importante. Ces résultats seront plus détaillés dans le tableau suivant (tableau 5) :

**Tableau 5** : Résultats du pH et de l'activité protéolytique après fermentation.

<i>Souche fermentée</i>	<i>pH</i>	<i>Activité enzymatique (U)</i>
<i>Aspergillus sp.1</i>	<b>8.76</b>	<b>756.36</b>
<i>Trichoderma sp.</i>	8.62	254.23
<i>Aspergillus sp.2</i>	<b>8.63</b>	<b>548.65</b>
<i>Aureobasidium sp.</i>	8.64	357.83
<i>Penicillium sp.</i>	8.73	121.82
<i>Chrysosporium sp.</i>	8.75	76.36
<i>Aspergillus sp.3</i>	8.64	130.91
<i>Aspergillus sp.4</i>	<b>8.77</b>	<b>601.23</b>
<i>Scedosporium sp.</i>	8.66	320.10
<i>Aspergillus sp.5</i>	<b>8.64</b>	<b>374.55</b>
<i>Aspergillus sp.6</i>	8.76	189.09

Par ailleurs, on remarque que ces quatre souches ne produisent pas la même quantité de l'enzyme ciblée ; la meilleure activité obtenue (756.36U) est produite par la souche A'24, suivie par la souche D'2 (601.23 U), puis la souche A'13(548.65 U) et la souche E'2 (374.55 U).

La souche A'5 représente un autre genre : *Aureobasidium*, elle produit une moyenne activité (375.83 U). Pareil pour la souche E'11 : *Scedosporium* (320.10 U).

Les autres souches (A'18, E, C'4, B'11 et B'2) donnent respectivement de faibles rendements en activité protéasique (254.23 U, 189.09 U, 130.91 U et 176.36 U, 121.82 U et 76.36 U).

Ces résultats permettent de considérer les plumes de poulet comme un substrat favorable pour la production des protéases vu sa richesse en protéines (91%) (GODHEJA et al., 2014), notamment par le genre *Aspergillus* et relativement par les genres *Aureobasidium sp.* Et *Scedosporium sp.*

Cependant, on n'a pas obtenu une bonne croissance. Cela pourrait s'expliquer d'un côté, par l'insuffisance nutritionnelle de ce milieu, du fait que les plumes constituent la seule source carbonée. Et de l'autre côté, peut-être par le dépassement du seuil des sels minéraux car les plumes les contiennent déjà, il y'avait alors une répression de la croissance fongique.

Ces résultats sont similaires à ceux décrits par la bibliographie ; en effet, les travaux de MEUNIER (1999) ont montré que les plumes de poulet représentent un substrat bon marché, riche en éléments nutritifs et capable de supporter la croissance de microorganismes producteurs de protéases.

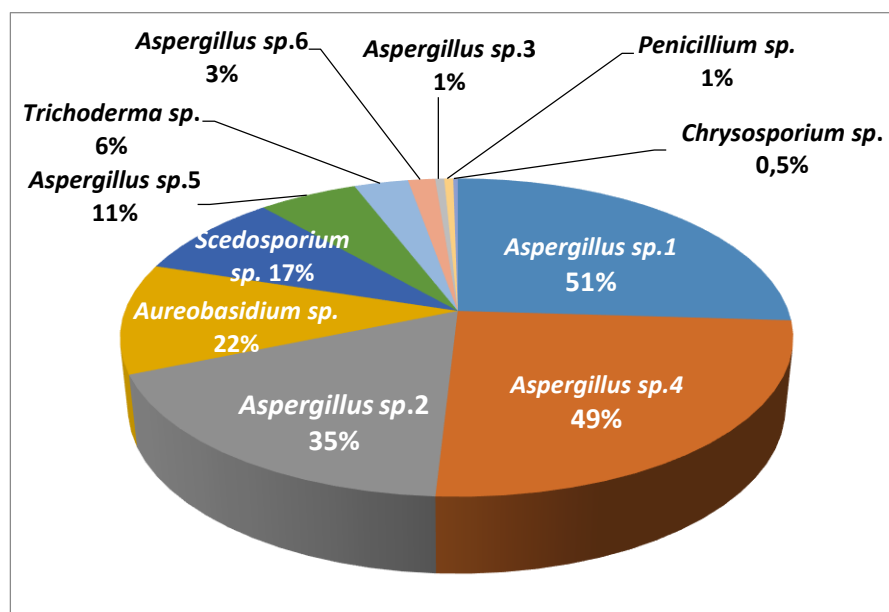
Par ailleurs, GUPTA et RAMNANI (2006) ont rapporté qu'un certain nombre de moisissures, à savoir : *Aureobasidium sp.*, *Scedosporium sp.*, ont été signalés en tant que souches protéolytiques.

Les mêmes auteurs mentionnent que les moisissures du genre *Aspergillus*, sont classées dans la littérature parmi les genres fongiques les plus importants en termes de production de protéases.

En outre, diverses souches de ce même genre sont communément décrites comme dégradeurs puissants d'une grande variété de substrats de la kératine, y compris la kératine des cheveux, de la laine et des plumes (GUPTA et RAMMANI, 2006).

## 5. Mise en évidence du pourcentage du poids dégradé (%)

Ces résultats mentionnés dans la figure 9, font apparaitre une teneur en poids de plumes dégradées très élevée (51%) chez *Aspergillus sp.1*, comparable à celle des autres souches. A savoir la souche *Aspergillus sp.4* avec un pourcentage de 49%, la souche *Aspergillus sp.2* avec 35%, la souche *Aureobasidium sp.* avec 22%, la souche *Scedosporium sp.* avec 17%.



**Figure 9 :** Pourcentage du poids de plumes dégradé par chaque souche sélectionnée après fermentation.

Par ailleurs, les autres souches (*Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.6*, *Aspergillus sp.3*, *Penicillium sp.* et *Chrysosporium sp.*) qui ont données un faible pourcentage, sont pratiquement incapables de dégrader les protéines des plumes de poulet.

Etant donné que les protéines des plumes de poulet sont des kératines. Il en résulte alors qu'on peut considérer les souches qui ont donné un pourcentage important de dégradation des plumes, comme des souches kéranolitiques.

Les activités protéolytiques obtenues après fermentation confirment les résultats du test d'activité protéolytique sur le lait gélosé, où la souche *Aspergillus sp.1* a donné le diamètre de l'halo de protéolyse le plus élevé (16mm) à température 40°C.



# *Conclusion*

## Conclusion Générale

Dans le cadre de la recherche des enzymes protéolytiques thermostables produites par des moisissures locales, vingt-deux souches de moisissures isolées à partir du sol de la région de *Hammam Debbagh (Ghelma)* ont été repiquées sur milieu PDA.

La mise en évidence de l'activité protéasique a été réalisée sur milieu lait gélosé à 20% d'agar, à différentes températures (de 30°C à 60°C). Cette culture a révélé, que toutes les souches sont relativement capables de générer un halo de protéolyse au tour des colonies fongiques de diamètre supérieure à 3 mm, mais tous dépend de la température d'incubation. La comparaison des diamètres chez les 22 souches a permis la sélection de 11 protéolytiques, où le diamètre varie chez lesquelles de 8 à 16 mm. Le diamètre de ces zones est en fonction de la variation de la température.

Les souches retenues sont : A'24, A'18, A'13, A'5, B'11, B'2, C'4, D'2, E'11, E'2 et E. Parmi celles-ci, les souches B'11, B'2, C'4, E'11, E'2 et E, sécrètent des protéases relativement thermostables avec des optima de diamètre dans les températures 45°C à 50°C. Ces records de thermostabilité de ces enzymes permettent leur utilisation dans différents domaines industriels exigeant des processus de production à haute température tel que l'industrie des détergents.

Les 11 souches ont été soumises en première étape à une identification macroscopique ; qui est basée sur l'observation de leurs caractères cultureux sur PDA en boîtes de Pétri. En deuxième étape, une identification microscopique de ces moisissures a été réalisée afin de mettre en évidence leurs caractères morphologiques en utilisant le bleu-coton comme liquide de montage. Pour cela, ces deux étapes ont permis la détermination des genres suivants : 6 souches d'*Aspergillus*, 1 de *Trichoderma*, 1 d'*Aureobasidium*, 1 de *Penicillium*, 1 de *Chrysosporium* et 1 de *Scedosporium*.

Afin de tester la capacité des souches identifiées à dégrader les plumes de poulet, des fermentations de ces moisissures sur bouillon de plumes ont été réalisées. En fait, la mesure des pH des bouillons après fermentation, a montré qu'il y a augmentation de ce paramètre vers un pH alcalin chez toutes les souches, ce qui signifie qu'il y avait impérativement une sécrétion des protéases et alors une dégradation des plumes utilisées comme substrat de base pour la préparation du milieu de culture.

Par ailleurs, l'analyse des résultats du dosage de l'activité protéolytique a révélé que, quatre souches du genre *Aspergillus* (A'24, D'2, A'13 et E'2) ont donné des activités importantes ; dont la meilleure (756.36U) est obtenue par la souche A'24. Alors que les souches A'5 (*Aureobasidium sp.*) et E'11 (*Scedosporium sp.*) ont produit des activités moyennes, qui sont respectivement ; 375.83 U et 320.10 U. Le reste des souches (A'18, E, C'4, B'11 et B'2) a donné des activités faibles.

Le calcul du poids sec des plumes restantes après fermentation, fait apparaître une teneur en poids de plumes dégradées élevée (51%) chez *Aspergillus sp.1* et relativement importante chez les souches : *Aspergillus sp.4* (49%), *Aspergillus sp.2* (35%), *Aureobasidium sp.* (22%) et *Scedosporium sp.* (17%). Par ailleurs, les autres souches (A'18, E, C'4, B'11 et B'2) présentent une faible teneur.

En conclusion, les résultats finaux permettent la sélection de la souche A'24 : *Aspergillus sp.1*, comme étant la plus performante par rapport aux autres souches ; puisque elle est capable d'utiliser les plumes de poulet comme seule source de carbone tout en donnant un bon rendement en activité protéolytique.

De plus, étant donné que les protéines des plumes de poulet sont des kératines. Il en résulte alors, qu'on peut considérer les souches qui ont donné un pourcentage important de dégradation des plumes, comme des souches kérolytiques. En effet, les protéases produites par les souches performantes peuvent être utilisées en tannerie lors du processus du délainage.

De ce fait, les plumes de poulet représentent un substrat bon marché très favorable pour la production des protéases alcalines. Pour cela, notre travail constitue une façon innovatrice de réutiliser et valoriser ces rejets.

Au terme de poursuivre ce travail, les résultats obtenus ouvrent d'autres perspectives :

- Réaliser la même fermentation avec les souches B'11, B'2, C'4, E'11, E'2 et E, à des températures plus élevées.
- Optimiser le milieu de production pour un meilleur rendement.
- Faire une caractérisation des protéases extraites et surtout tester la thermostabilité.
- Tester l'activité de la protéase avec d'autres substrats pour évaluer son éventuel intérêt dans d'autres applications.
- Tester l'application des enzymes produites.

*Références*

*Bibliographiques*

**A**-----

**ABIDI F., AISSAOUI N., LAZAR S., MARZOUKI M., 2014.** Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease from *Aspergillus niger*. Use in Antioxidant peptides production. *J. Mater. Environ. Sci.*, 5 (5) : 1490-1499.

**AMOURA A., BAZ S., 2014.** Identification des souches fongiques productrices des protéases, isolées à partir de source chaude. Mémoire de Master. *Univ. Constantine 1*. Constantine. Algérie.

**ANWAR A., SALEEMUDDIN M., 1998.** Alkaline proteases. A review. *Biores. Technol.* 64 : 175-183.

**ANSON M.L., 1938.** The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. G. Physiol.*, 19 : 446-459.

**B**-----

**BELMESSIKH A., 2011.** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magistère. *Univ. Mentouri*. Constantine. Algérie.

**BEZAWADA J., 2010.** Production améliorée, récupération et application d'une protéase alcaline produite en utilisant les boues d'épuration comme substrat. Thèse de Doctorat. *INRS*. Univ. Québec. Canada.

**BOTELLA C., DEORY I., WEBB C., CANTERO D., BLANDINO A., 2005.** Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem. Eng. J.*, 26 : 100-106.

**BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GAUTHIER S., GUY P., LARPENT J.P., REYMOND P., SANGLIER J.J., VAYSSIER Y., VEAU P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. 2<sup>ème</sup> édition. *Masson*. Paris. pp. 16-41 : 110-428.

**BOURGEOIS C.M., MESCLE J.F., ZUCCA J., 1989.** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. *Lavoisier*. Paris. pp. 216-244.

**BOURGEOIS C.M., MESCLE J.F., ZUCCA J., 1996.** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 1. *Lavoisier*. Paris. pp. 236-246.

**BOIRON P., 1996.** Organisation et biologie des champignons. *Edition Nathan*. pp:13-80.

**BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GAUTHIER S., GUY P., LARPENT J.P., REYMOND P., SANGLIER J.J., VAYSSIER Y., VEAU P., 1999.** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. *Masson*. Paris. pp. 12-426.

**BRANDELLI A., DAROIT D.J., RIFFEL A., 2010.** Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85 : 1735-1750.

## C-----

**CAI C., LOU B., ZHENG X., 2008.** Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *J. Zhejiang. Univ. Sci.*, 9 : 60-67.

**CLARKE P.H., STEEL K.J., 1966.** Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification. *Academic press*. London. pp. 111.

**COULTOULY G., 1991.** *Génie enzymatique*. *Masson*. Paris. France. pp. 244.

## D-----

**DAVET P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. *INRA*. Paris. pp. 52-57.

**DEBANANDA S., PINTUBALA K., SUCHITRA S., SALAM N., 2009.** Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkali thermotolerant indigenous actinomycetes. *World. Appl. Sci. J.*, 7 : 907-916.

**DELGADO-JARANA J., RINCON A. M., BENITEZ T., 2002.** Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiol.*, 148 : 1305-1315.

**DEVI M.K., BANU A.R., GNANAPRABHAL G.R., PRADEEP B.V., PALANISWAMY M., 2008.** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.*, 1(7) : 1-6.

**DIARRA O., 2014.** Analyse de la cinétique de fermentation in vitro des résidus de tomates et d'orange ainsi que de deux plantes fibreuses, dans différentes sources d'azote, selon un modèle exponentiel : Mémoire de Master. *Univ. Constantine 1*. Algérie.

**E**-----

**ESSIEN J.P., UMOH A.A., AKPAN E.J., EDUOK S.I., UMOIYOHO A., 2009.** Growth keratinolytic proteinase activity and thermotolerance of dermatophytes associated with alopecia in Uyo, Nigeria. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 56 : 61-69.

**F**-----

**FAO 2012. FAO-STAT.** <http://faostat.fao.org/default.aspx>, Consulté le 15 mars 2012.  
**FAVERDIN P., 1985.** Régulation de l'ingestion des vaches laitières en début de lactation. PhD Thesis, *Inst Nat Agronom., Paris-Grignon*. Paris. France.

**FAKHFAKH-ZOUARI N., 2010.** Kératinases de *Bacillus licheniformis* RPK et *Bacillus pumilus* A1 : production, purification, caractérisation et applications biotechnologiques. Thèse de Doctorat. *Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax*. Tunisie.

**FAZOUANE-NAIMI F., MECHAKRA A., ABDELLAOUI R., NOUANI A., MAGAGI DAGA S., MAROUALZOUMA A., GAIS S., PENNINCKX M.J., 2010.** Characterization and cheese-making properties of rennet-like enzyme produced by a local Algerian isolate of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnol.*, 24 : 258-269.

**FERRERO M.A., 2000.** Protein hydrolysis : Isolation and characterization of microbial proteases. *Food Microbiol. Protocols.*, 14 : 227-232.

**FUJIWARA N., TSUMIYA T., KATADA T., HOSOBUCHI T., YAMAMOTO K., 1989.** Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme. *Process Biochem.*, 24 : 155-156.

**G**-----

**GENCKAL H., TARI C., 2006.** Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from natural habitats. *Enz. Microbiol Technol.*, 39 : 703-710.

**GLAZER A.G., NIKAIDO, H., 1995.** Fundamental of applied Microbiology, Freeman and Company. *Microbial, Biotechnol.*, Washington. pp. 256-259.

**GODHEJA J., SHEKHAR S.K., 2014.** Biodegradation of Keratin from Chicken Feathers by Fungal Species as a Means of Sustainable Development. *J. Bioremed Biodeg.*, 5 : 232.

**GRANNER D.K., MURRAY R.K., RODWELL V.W., 2008.** Biochimie de HARPER. 3<sup>e</sup> édition. *De Boeck*. Bruxelles., pp. 49-51, 483.

**GROSS R., 1956.** Water soluble compounds (non-keratins) associated with the plumage of the pigeon (*Columbia livia*). *J. Exp. Med. Sci.*, 34 : 65-70.

**GUPTA R., BEG Q.K., LORENZ P., 2002.** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59 : 15-32.

**GUPTA R., RAMNANI P., 2006.** Microbial keratinase and their prospective applications : an overview, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 70 : 21-33.

**GUPTA A., ROY I., KHARE S. K., GUPTA M. N., 2005.** Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *J. Chrom.*, 1069 : 155-161.

**GUIRAUD J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. *Dunod*, Paris. pp. 79.

**GUIRAUD J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. *Dunod*. Paris. pp. 7-330.

## H-----

**HARRIGAN W.F., MCCANCE M.E., 1976.** Laboratory methods in food and dairymicrobiology. *Academic press*. London. pp. 21-277.

**HESS J.F., FITZGERALD P.G., 2007.** Treatment of keratin intermediate filaments with sulfur mustard analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 359 : 616-621.

## J-----

**JAOUADI B., ELLOUZ-CHAABOUNI S., BEN ALI M., BEN MESSAOUD E., NAILI B.,DHOUIB A., BEJAR S., 2009.** Excellent laundry detergent compatibility and highdehairing ability of the *Bacillus pumilus* CBS alkaline proteinase (SAPB). *BiotechnolBioprocess Eng.*, 14 : 503-512.

**JOO H.S., CHANG C.S., 2005.** Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus sp.* I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Proc. Biochem.*, 40 : 1263-1270.

**JULIEN R., 2002.** Les moisissures parlons-en. *Objectif prevention.*, 25(4) : 7-8.

## K-----

**KALISZ H.M., 1988.** Microbial proteinases. *Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnol.*, 36 : 1-65.



**KIRK O., BORCHERT T.V., FUGLSANG C.C., 2002.** Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13 : 345-351.

**KUMAR D., KRISHNAVENI K., BALAKUMARAN M., RAMESH S., KALAICHELVAN P., 2012.** Production and optimization of extracellular Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* isolated from dairy effluent. *Der Pharmacia Lettre.*, 4 (1) : 98-109.

**KUMAR A., SHARMA J., MOHANTY K. A., GROVER S. BATISH V. K., 2006.** Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *C. Biochem Physiol, Part B.*, 145 : 108-113.

## L-----

**LANIER L., JOLY P., BONDOUX P., BELLEMERE A., 1978.** Mycologie et pathologie forestière, mycologie forestière. Tome 1. *Masson*. Paris : 09-18.

**LAXMAN R.S., SONAWANE A.P., MORE S.V., RAO B.S., RELE M.V., JOGDAND V.V., DESHPANDE V.V., RAO M.B., 2005.** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Proc. Biochem.*, 40 : 3152-3158.

**LEE S.K., HWANG J.Y., CHOI S.H., KIM S.M., 2010.** Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste. *Food.Sci. Biotechnol.*, 19 (2) : 327-334.

## M-----

**MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., 2007.** Biologie des microorganismes. 11<sup>ème</sup> édition. *Pearson Education. Broek*. France. pp. 478-479.

**MECHAKRA A., AUBERGER B., REMEUF F., LENOIR J., 1999.** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments.*, 19 : 663-675.

**MEUNIER, N.E., 1999.** Valuation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. *M.Sc Thesis, INRSETE, Univ. Quebec*. Canada. pp. 1-168.

## N-----

**NICKLIN J., GRAEME-COOK K., PAGET T., KILLINGTON R., 2000.** L'essentiel en microbiologie. *Edition Berti*. pp. 210-216.

**NILEGAONKAR S.S., ZAMBARE V.P., KANEKAR P.P., DHAKEPHALKAR P.K., SARNAIK S.S., 2007.** Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCMB-326, *Bioresour Technol*, Vol. 98. pp. 1238-1245.

**O**-----

**OTENG-GYANG K., 1984.** Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chaud. *Lavoisier*. Paris. pp. 26-42.

**OTTAVIANI F., DISEGNA L., SPOLAOR D., 1988.** Yeasts and identification in food industry. *Microbiologie- Aliments- Nutrition*. 6 : 221-226.

**P**-----

**PARANTHMAN R., ALAGUSUNDARAM K., INDHUMATHI J., 2009.** Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *World J. Agric Sci.*, 5 (3) : 308-312.

**PATIDAR P., AGRAWAL D., BANERJEE T., PATIL S., 2007.** Optimisation of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Process Biochem.*, 40 : 2962-2967.

**PERRY J.J., STALEY J.T., LORY S., 2004.** Microbiologie. *Sinauer associates*. Paris. pp. 575-576.

**POOLE A.J., CHURCH J.S., HUSON M.G., 2009.** Environmentally sustainable fibers from regenerated protein, *Biomacromolecules*,. 10 : 1-8.

**R**-----

**RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S., DESHPANDE V.V., 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 : 597-635.

**REDDY L.V.A., WEE Y.J., YUN J.S., RYU H.W., 2008.** Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus sp.* RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour. Technol.*, 99 ; 2242-2249.

S-----

**SAHOO D.K., DAS A., THATOI H., MONDAL K.C., MOHAPATRA P.K., 2012.** Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by anewly isolated bacterium under submerged fermentation, Appl. *Biochem.Biotechnol.*, 167 : 1040-1051.

**SANDHYA C., SUMANTHA A., SZAKACS G., PANDEY A., 2005.** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40 : 2689-2694.

**SHARMA K.M., KUMAR R., VATS S., GUPTA A., 2014.** Production, partial purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus aryabhatai* K3. *IJAPBC.*, 3(2) : 2277-4688.

**SIALA R., SELLAMI-KAMOUN A., HAJJI M., ABID I., GHARSALLAH N., NASRI M., 2009.** Extracellular acid protease from *Aspergillusniger*11: purification and characterization. *African J. Biotechnol.*, 8 (18) : 4582-4589.

**SINSUWAN S., RODTONG S., YONGSAWATDIGUL J., 2008.** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus*sp. SK33 isolatedfromfish sauce fermentation. *Proc. Biochem.*, 43 : 185-192.

**SMITH N.R., GORDON R.E., CLARK F.E., 1952.** Aerobic spores-forming bacteria. *J. Appl. Bact.* 27 : 78-99.

**SRINUBABU G., LOKESWARI N., JAYARAJU K., 2007.** Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. *E-J. Chem.*, 4(2); 208-215.

**SYED D.G., LEE J.C., LI W.J., KIM C.J., AGASAR D., 2009.** Production, characterizationand application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*, *Bioresour.Technol.*, 100 : 1868-1871.

**SUMANTHA A., DEEPA1 P., SANDHYA C., SZAKACS G., SOCCOL C.R., PANDEY A., 2006.** Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. *Brazilian Archives Biol. Technol.*, 49 (5) : 843-851.

**SUMANTHA A., LARROCHE C. AND PANDEY A., 2006.** Microbiology and industrial biotechnology of food- grade proteases: a perspective. *Food Technol.Biotechnol.*, 44 (2) : 211-220.

**T**-----

**TAKAHASHI J.A., MONTEIRO DE CASTRO M.C., SOUZA G.G., LUCAS E.M.F., BRACARENSE A.A.P., ABREU L.M., MARRIEL I.E., OLIVEIRA M.S., FLOREANO M.B., OLIVEIRA T.S., 2008.** Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *J. med. mycol.*, 18 :198-204.

**U**-----

**UCHIKOBA T., MASE T., ARIMA K., YONEZAWA H., KANEDA M., 2001.** Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.*, 382: 1509-1513.

**URBANEK H., YIRDAW G., 1984.** Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbiol. Pol.*, 33(2) : 131.

**W**-----

**WALKER G.M., WHITE N.A., 2005.** Introduction to Fungal Physiology in Kavanagh K., Fungi: Biology and applications. *John Wiley & Sons Ltd.* England. pp. 2.

**WANG S.L., HSU W.T., LIANG T. W., YEN Y.H., WANG C.L., 2008.** Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium, *Bioresour. Technol.*, 99 : 5679-5686.

**WILKESMAN J., KURZ L., 2009.** Protease Analysis by Zymography: A review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnol.*, 3: 175-184.

**WU T.Y., MOHAMMAD A.W., JAHIM J.M.D., ANUAR N., 2006.** Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb. Technol.*, 39; 1223-1229.

# *Annexes*

### **Annexe 1 : Milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*)**

Pomme de terre .....	200 g
Glucose .....	20 g
Agar .....	15 g
Eau distillée.....	compléter jusqu'à 1000 ml

- Laver la pomme de terre non pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 1 heure.
- D'autre part, faire fondre l'agar-agar dans 500 ml d'eau distillée chaude.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Ajuster le volume à 1000 ml.
- Stériliser par autoclavage à 121°C/20 min.

### **Annexe 2 : Lait gélosé à 20% d'agar**

Lait écrémé.....	100 ml
Agar-agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

- Dissoudre l'agar-agar dans de l'eau distillée chaude.
- Agiter jusqu'à homogénéisation pour obtenir l'eau gélosée.
- Stérilisation par autoclavage à 121°C/20 min.
- Ajouter le lait écrémé stérile juste avant l'utilisation du milieu.

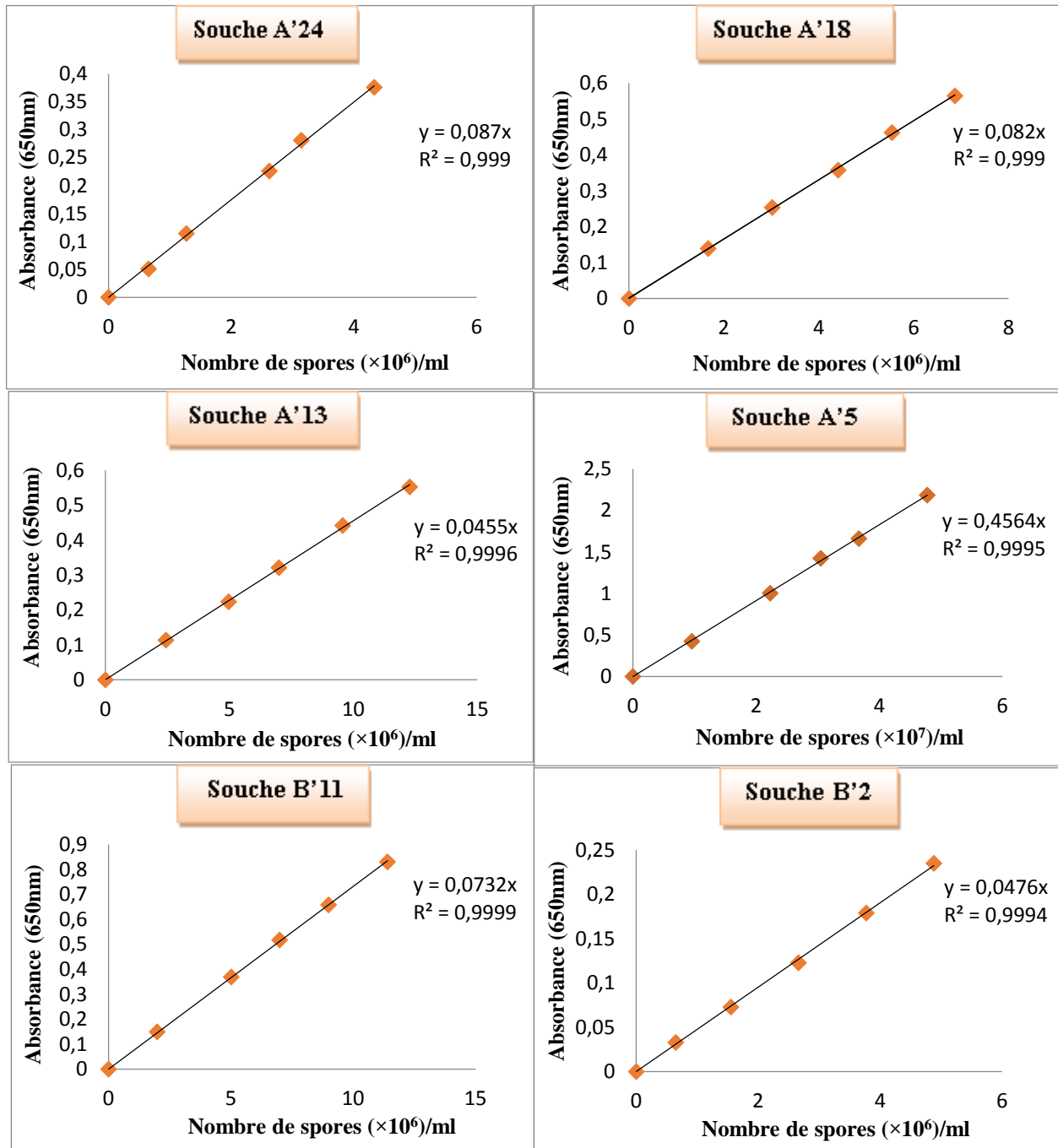
### **Annexe 3 : Lactophénol-Bleu Coton**

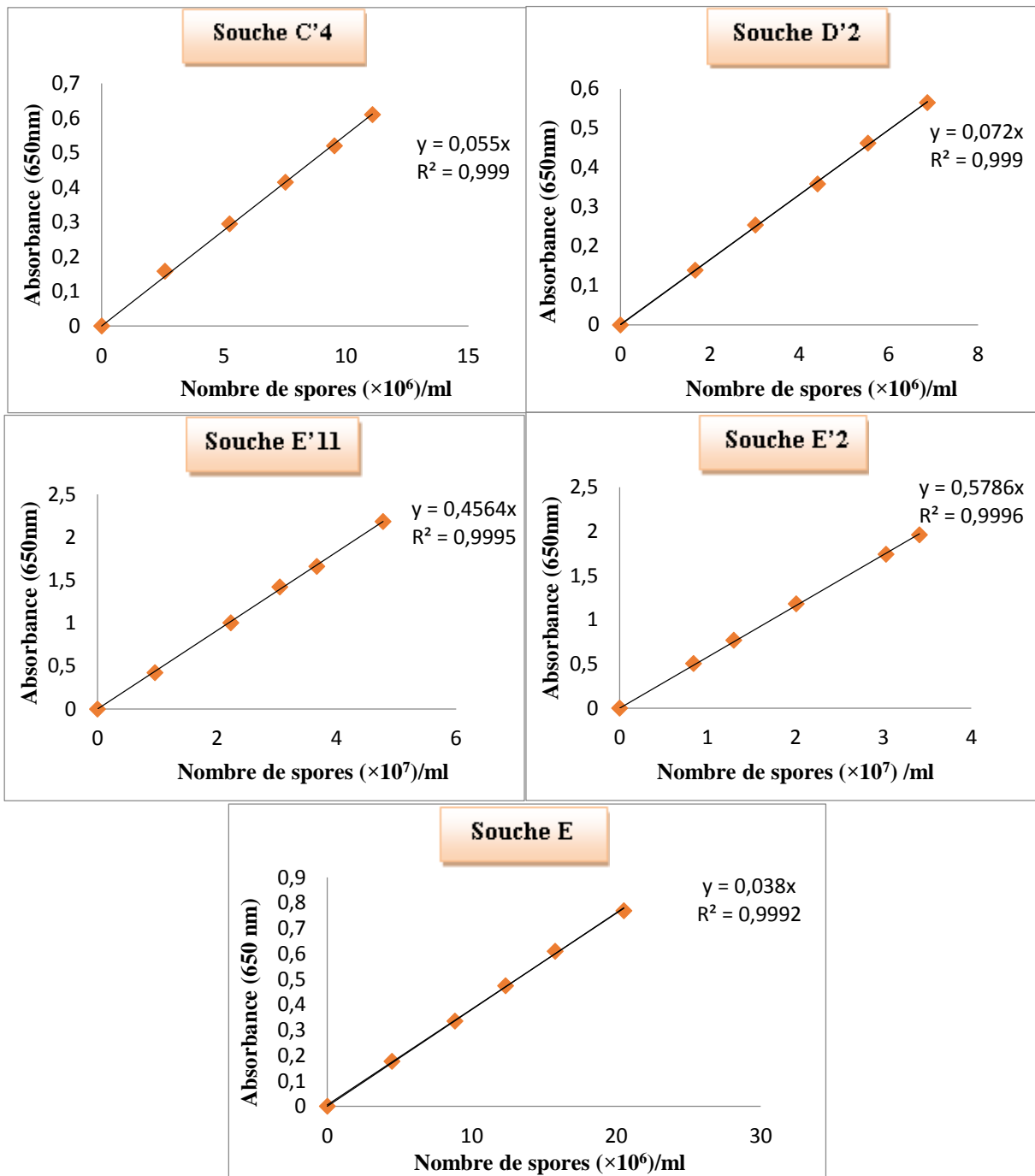
Phénol en cristaux.....	20 g
Acide lactique (commercial concentré).....	20 g
Glycérine.....	40 g
Eau bidistillée.....	20 g
Bleu de méthyle.....	0,5 g

## Annexe 4 : Eau Physiologique

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) dilué à 9 pour 1000 (= solution à 0,9% (*masse/volume*) de NaCl, soit  $9 \text{ g.l}^{-1}$ ).

## Annexe 5 : Courbes d'étalonnage des souches fongiques





## Annexe 6 : Dosage de l'activité protéolytique

### - Solutions utilisées

- Caséine 2,5% dans Citrate de Sodium (0,02 M).
- Solution mère 100  $\mu\text{g/ml}$  de Tyrosine.
- TCA 4%.
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15% dans NaOH (0,1 N).
- Folin-Ciocalteux 1/4<sup>ème</sup>.



**-Protocole suivi**

<b>Dilution</b>	<b>Blanc</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Solution mère de Tyrosine (ml)</b>	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
<b>TCA (ml)</b>	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ml)</b>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Agitation et incubation pendant 10min à T° ambiante.						
<b>Folin 1/4</b>	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Agitation vigoureuse du mélange, puis incubation 30 min à température ambiante à l'obscurité. En fin, lecture de la densité optique à 750 nm.

Une unité de protéolyse correspond à la libération de 1µg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans un ml d'échantillon (1µg/h/ml). La concentration déduite de la courbe d'étalonnage correspond à 0,5 ml d'échantillon dilué par les réactifs ajoutés au cours de la première étape.

**Activité protéolytique (µg/h/ml)**= concentration déduite de la courbe d'étalonnage x dilution x 2 (pour ramener le volume de l'échantillon à 1ml) x 2 (pour ramener le temps à 1h).

# *Résumés*

---

## Abstract

---

The objective of this study is to target the capacity of mold strains to degrade the chicken feathers. For this, twenty-two strains isolated from soil *Hammam Debbagh (Ghelma)* has got a demonstration of the proteolytic activity on agar milk medium with 20% agar. This test revealed that all strains developed proteolysis area with various diameters; including eleven (A'24, A'18, A'13, A'5, B'11, B'2, C'4, D'2, E'11, E'2 and E) which showed the larger diameters (between 8 and 16 mm). Comparing diameters latter in the various temperatures tested, revealed that B'11, B'2, C'4, E'11, E'2 and E strains gave the optimum diameter in temperature 45 °C to 50 °C. The 11 strains were selected for protéolytique has been identified macroscopically and microscopically, to get finally the determination of the following genera : 6 strains of *Aspergillus*, 1 of *Trichoderma*, 1 of *Aureobasidium*, 1 of *Penicillium*, 1 of *Chrysosporium*, and 1 of *Scedosporium*.

Thereafter, a liquid fermentation of all strains selected on medium containing poultry feathers, has been achieved. The analysis of the pH results of the fermentation filtrate showed that there was an increase (from pH 7.5 to pH 8,...) in all strains. Moreover, enzymatic assay allowed out A'24 strain (*Aspergillus sp.1*) as being the most effective for production of alkaline protease, which was used to degrade the chicken feathers with an activity of 756.36 U. This was confirmed by calculating the dry weight of the remaining feathers after fermentation, which showed a percentage of 51% in the same A'24 strain. The results of this study are very motivating. In fact, the degradation of nature feathers opens opportunities for applications in the tanning industry as natural resources. In addition, the use of chicken feathers for enzymes production can solve an environmental problem and be a good process of its recovery.

**Key words** : Mold, Protease, Identification, Liquid fermentation, Poultry feathers.

---

## ملخص

إن الهدف المسطر من خلال هذه الدراسة يتمحور حول قدرة سلالات من الفطريات على تحليل ريش الدجاج. لهذا تم عزل 22 فطر من تربة حمام دباغ (قالمة)، لإظهار النشاط البروتيني في وسط مكون من الحليب الجيلوزي بنسبة 20% من الجيلوز. أثبت هذا الإختبار أن كل الفطريات قد أظهرت مناطق تحلل بروتيني ذات أقطار مختلفة، ومن بينها 11 فطر (A'24, A'18, A'13, A'5, B'11, B'2, C'4, D'2, E'11, E'2 و E) أعطت الأقطار الأكبر حجما (من 8 إلى 16 مم). المقارنة بين هذه الأخيرة في مختلف درجات الحرارة المجربة أظهرت أن السلالات B'11, B'2, C'4, E'11, E'2 و E، قد أعطت مناطق تحلل ذات أقطار كبيرة في درجات حرارة من 45 إلى 50 درجة مئوية. السلالات البروتينية الإحدى عشرة تم اختبارها لدراساتها وتعريفها ظاهريا ومجهريا، وقد تم التوصل في الأخير إلى تحديد الأنواع التالية:

6 سلالات من نوع الرشاشيات *Aspergillus*، سلالة من نوع الترايكوديرما *Trichoderma*، سلالة من نوع ذهبية الدعامات *Aureobasidium*، سلالة من نوع البنسليوم *Penicillium*، سلالة من نوع ذهبية الابواغ *Chrysosporium* و سلالة من نوع البوغانة *Scedosporium*.

بعد ذلك، تم إجراء عملية "التخمير السائل" لكل السلالات المختارة في وسط مكون أساسا من ريش الدجاج. أظهر تحليل نتائج حموضة كل مرشح ناتج عن هذه العملية، أن هناك زيادة من 7.5 إلى 8 فما فوق لدى كل السلالات. علاوة على ذلك، سمح الفحص الأنزيمي باستخراج السلالة: (*Aspergillus sp.1: A'24*)، على أنها الأكثر فاعلية في إنتاج أنزيم البروتياز القلوي، الذي استعمل في تفكيك ريش الدجاج، مع نشاط بروتيني قدر ب 736.56 وحدة، وهذا ما تم تأكيده بعد حساب الوزن الجاف للريش المتبقي بعد عملية التخمير والذي أظهر نسبة 51% عند نفس السلالة. نتائج هذا العمل محفزة جدا.

في الواقع، إن تحليل الريش يسمح بفتح فرص لتطبيقات عديدة في مجال الدباغة باعتباره موردا طبيعيا، بالإضافة إلى ذلك، فإن استعمال ريش الدجاج لإنتاج الأنزيمات يمكن أن يعالج إحدى المشاكل البيئية ويكون عاملا جيدا في تحسينها.

**الكلمات المفتاحية:** الفطريات، البروتياز، التعريف، التخمير السائل، ريش الدجاج.

**MACHEHALEK Faiza**

**YAKHLEF Manel**

**Date de soutenance : 02/07/2014**

## Thème

### **Production de la protéase alcaline par des moisissures isolées de source thermale sur milieu à base de plumes de poulet**

## Résumé

L'objectif visé lors de cette étude, cible la capacité des souches de moisissures à dégrader les plumes de poulet. Pour cela, vingt-deux souches isolées du sol de *Hammam Debbagh (Ghelma)* ont subi une mise en évidence de l'activité protéolytique sur le lait gélosé à 20% d'agar. Ce test a révélé que toutes les souches ont donné une zone de protéolyse avec des diamètres variés ; parmi lesquelles onze (A'24, A'18, A'13, A'5, B'11, B'2, C'4, D'2, E'11, E'2 et E), ont montré les diamètres les plus élevés (entre 8 et 16 mm). La comparaison des diamètres chez ces dernières, dans les différentes températures testées, a révélé que les souches B'11, B'2, C'4, E'11, E'2 et E, ont donné des optima de diamètre dans les températures 45°C à 50°C. Les 11 souches protéolytiques ont été sélectionnées pour être identifiées macroscopiquement et microscopiquement, pour arriver finalement à déterminer les genres suivants : 6 souches d'*Aspergillus*, 1 de *Trichoderma*, 1 d'*Aureobasidium*, 1 de *Penicillium*, 1 de *Chrysosporium* et 1 de *Scedosporium*.

Par la suite, une fermentation liquide de toutes les souches sélectionnées sur milieu à base de plumes de poulet, a été réalisée. L'analyse des résultats du pH des filtrats de fermentation a montré qu'il y a augmentation (du pH 7.5 à pH 8,...) chez toutes les souches. Par ailleurs, le dosage enzymatique a permis de ressortir la souche A'24 (*Aspergillus sp.1*), comme étant la plus performante pour la production de la protéase alcaline, qui a servi à dégrader les plumes de poulet avec une activité protéasique de 756.36 U. Ceci a été confirmé par le calcul du poids sec des plumes restantes après fermentation, qui a montré un pourcentage de 51% chez la même souche A'24. Les résultats de ce travail sont très motivants. En fait, le caractère de dégradation des plumes ouvre des possibilités d'applications en tannerie comme étant des ressources naturelles. De plus, l'utilisation des plumes de poulet pour la production enzymatique, peut résoudre un problème environnemental et constituer un bon processus de sa valorisation.

## Mots-clés

Moisissures, Protéase, Identification, Fermentation liquide, Plumes de poulet.

## Laboratoire de recherche

Laboratoire de Microbiologie (RDC)

Université Des Frères Mentouri Constantine

## Jury d'évaluation

Présidente :	<b>Melle. ABDELAZIZ W.</b>	M.A. U.F.Mentouri Constantine
Rapporteur :	<b>Melle. BELMESSIKH A.</b>	M.A. U.F.Mentouri Constantine
Examinatrice :	<b>Mme. MERGOUD L.</b>	M.A. U.F.Mentouri Constantine