

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

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : génie de l'environnement.

Intitulé du mémoire

**Extraction de kératine et optimisation de
la production des Kératinases par
hydrolyse de plumes de volaille par une
souche locale.**

Présenté par :

Mahieddine Sarah.

Encadré par :

Pr. Badis Abdelmalek

Année Universitaire 2020/2021.

Résumé :

Les plumes de volailles sont constituées de plus de 90% de protéines dures de nature kératiniques. Ces agro déchets renferment des sous-produits de classes importantes vu leurs richesses nutritives, il est donc intéressant de les valoriser.

Le présent travail porte sur une contribution à la valorisation des plumes de volailles par voie microbiologique, en utilisant une souche isolée à partir du compostage de plumes de volailles ; pour la production de kératinase, une enzyme d'intérêt industriel, à savoir : alimentation animale, industrie pharmaceutique et cosmétique. En effet, l'étude est axée sur l'extraction de kératine de plumes de volailles ensuite l'isolement des souches kératinolytiques et la caractérisation de la production de kératinase en milieu de fermentation liquide, à l'échelle laboratoire et les conditions physico-chimiques optimales de cette enzyme.

Les résultats obtenus en rapport avec l'extraction de la kératine en utilisant le DMSO et l'acétone a donné un rendement de 14%, jugé faible par rapport à d'autres techniques d'extraction qui peuvent arriver à 75%.

La souche est cultivée en milieu submergé ou la seule source de carbone est la farine de plume avec une variation des sources d'azotes organiques et inorganiques ainsi que le volume d'inoculum, pH et température.

La production de l'enzyme est estimée par le dosage de l'activité kératinolytique. Les résultats obtenus ont révélé que la souche CP22 a donné une activité atteignant 67,7 U/ml au bout de 3 jours d'incubation.

L'étude des optima de pH et de température d'incubation a montré que la kératinase produite par la souche CP22 a un pH optimum égal à pH=8 et une température optimale de 37°C.

De notre travail il ressort que la souche CP22 est considérée comme performante dans la production de la kératinase.

Mots clés : Kératine, Kératinases, microorganismes kératinolytiques, Plumes de volailles, Farine de plumes.

Abstract :

Poultry feathers are made up of more than 90% hard proteins of the keratin nature. These agro-wastes contain by-products of important classes because of their nutritional richness, so it is interesting to value them.

This work concerns a contribution to the microbiological upgrading of poultry feathers, using a strain isolated from poultry feather composting; for the production of keranase, an enzyme of industrial interest, namely: animal feed, pharmaceutical and cosmetic industry

the study focused on the extraction of keratin from poultry feathers then the isolation of keratinolytic strains and the characterization of the production of keratinase in liquid fermentation medium, at the laboratory scale and the optimal physicochemical conditions of this enzyme.

The results obtained in relation to the extraction of keratin using DMSO and acetone gave a yield of 14%, considered low compared to other extraction techniques that can reach 75%.

This strain is grown in a submerged environment or the only source of carbon is feather flour with a variation of organic and inorganic nitrogen sources as well as inoculum volume, pH and temperature.

The production of the enzyme is estimated by the determination of keratinytic activity. The results showed that CP22 had an activity of up to 67.7 U/ml after 3 days of incubation.

The study of pH and incubation temperature optima showed that the keranase produced by strain CP22 has an optimum pH equal to pH=8 and an optimum temperature of 37°C.

Keywords: Keratin, Keratinoids, Keratinocyte microorganisms, Poultry feathers, Feather flour.

ملخص

ريش الدواجن يتكون من اكثر من 90% من البروتينات الصلبة ذات طبيعة كيراتينية ، هذه النفايات الزراعية تحوي مواد ثانوية ذات اهمية كبيرة نظرا لقيمها الغذائية العالية و منه فمن المهم استغلالها و أعطائها قيمة

عملنا هذا يسعى لتثمين ريش الدواجن عبر سبل ميكروبيولوجية باستعمال عينة معزولة بطرق تهدف لانتاج " الكيراتيناز " (انزيم ذو اهمية صناعية (صناعة اكل الحيوانات ، الصناعات الصيدلية و التجميلية ...))

ركزت الدراسة على استخراج الكيراتين من ريش الدواجن ثم عزل الانسجة المنتجة للكيراتين و معاينة تطور إنتاجه في وسط تخمر سائل على مستوى مخبري و في ظروف فيزيوكيميائية مناسبة لهذا الانزيم

وكانت النتائج التي تم الحصول عليها فيما يتصل باستخراج الكيراتين باستخدام DMSO والأسيتون بمثابة مردود بنسبة 14% ، وهو ما يعتبر منخفضاً مقارنة بتقنيات الاستخراج الأخرى التي يمكن أن تصل إلى 75%.

هذه العينات تدرس في وسط مغمر اين المصدر الوحيد للكربون هو " طحين الريش " مع تغير لحجم الوسط ، مصادر الازوت العضوية و الغير عضوية ، درجة الحرارة و الحموضة

انتاج الانزيم يقدر عن طريق تحديد النشاط الكيراتيني . اظهرت النتائج ان نشاط العينة CP22 يصل الى 67,7 U/ml في غضون ثلاث ايام

دراسة الشروط المناسبة للانتاج اظهرت ان الانزيم تم انتاجه من قبل العينة في درجة حموضة 8 = pH و درجة حرارة تقدر ب C°37

الكلمات المفتاحية: كيراتين . كيراتيناز . اجسام مجهرية . كيراتيني . ريش الدواجن . طحين الريش

Remerciements

Au terme de la réalisation de ce mémoire je tiens en premier lieu à exprimer mes profonds et sincères remerciements :

Au bon Dieu de m'avoir donné la force et le courage de mener à terme ce modeste travail et d'aller au bout de mes objectifs.

Je tiens à présenter toute ma gratitude et mes vifs remerciements à Monsieur **Badis Abdelmalek** qui a accepté la responsabilité de superviser ce travail, pour son aide, ses conseils, sa disponibilité, ces précieux encouragements, sa patience et sa confiance. Sans lui ce travail n'aurait jamais pu se concrétiser et n'aurait vu le jour.

Je remercie **Madame Cheurfa** pour avoir eu l'amabilité d'examiner notre travail et Monsieur **Benmamaar** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

A mademoiselle **Larid Ilhem** pour son aide constante et ses judicieux conseils.

A Monsieur **Bouras Omar**, un enseignant unique, pour qui je voue un profond respect et une profonde admiration pour sa bienveillance et ses conseils qui ont éclairé mon chemin et contribué à mon épanouissement au sein de l'université mais aussi dans ma vie.

A Madame **Ammi-Baazize Djamil**a sincère gratitude et reconnaissance.

A Madame **Zermane Faiza** et Monsieur **Cheknane Omar** remerciements chaleureux pour leurs aide appui et encouragements.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, ses encouragements reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude pour les valeurs nobles, l'éducation, le soutien permanent et l'amour inconditionnel que tu nous portes mon petit frère et moi.

A mon père pour son affection et ses encouragements.

A mon petit frère Mahfoudh, pour son amour, sa générosité et son soutien indéfectible tout au long de notre vie.

A mes grands-parents, mes oncles et tantes maternels et paternels pour l'affection, la tendresse et l'amour dont vous m'avez toujours entouré.

A la mémoire de mon oncle de cœur Mr Ammi Mohamed.

A mes amis (Ahlem, Narimane et Riadh) pour leur présence, leur soutien, leurs encouragements et leur compréhension. Je vous suis reconnaissante pour tous les moments de bonheur que nous avons vécus.

Puisse dieu vous donner longue vie, bonne santé et réussite.

Liste des figures

Figure 1 : Images d'analyse par le microscope à balayage (MEB) de la plume de poulet.....	5
Figure 2 : Les sept types de plumes rencontrés chez les oiseaux.....	6
Figure 3 : Diagramme schématique de la production d'aliments pour animaux à partir de plumes de poulet.....	11
Figure 4 : Les structures des FI de la kératine α (a) un modèle boule et bâton de la chaîne polypeptidique (b) dessin schématique de la formation de filaments intermédiaires.....	13
Figure 5 : Structure des filaments β kératine (a) un modèle boule et bâton de la chaîne polypeptidique et illustration du feuille plissée β (b) dessin schématique de la formation des filaments β kératines.....	14
Figure 6 : (A) schéma représentant le mode d'action des kératinase sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures (B) représentation schématique des ponts disulfure entre les résidus de cystéines.....	23
Figure 7 : Diagramme montrant les étapes d'extraction et purification de kératine.....	30
Figure 8 : Les plumes collectées.....	30
Figure 9 : Farine de plumes.....	31
Figure 10 : La masse de plumes utilisée dans la partie expérimentale.....	32
Figure 11 : Chauffage à 80°C et agitation de mélange DMSO avec farine de plume.....	32
Figure 12 : Filtration sous vide pendant 20 à 30 minutes.....	32
Figure 13 : Précipitation de la kératine après refroidissement.....	33
Figure 14 : Récupération de la kératine pure.....	34
Figure 15 : Poudre de kératine.....	37
Figure 16 : Analyse de la kératine par ATR-IRTF.....	38
Figure 17 : Effet de différentes sources d'azote organique sur la production de kératinase par la souche.....	39
Figure 18 : Effets des différentes sources d'azote inorganique sur la production de kératinase par la souche.....	40
Figure 19 : Effets de la variation des températures sur la production de kératinase par la souche.....	41
Figure 20 : Effets de la variation du pH sur la production de Kératinases par la souche.	42
Figure 21 : Effets de la variation du volume d'inoculum sur la production de kératinase par la souche.....	43
Figure 22 : Effets de la variation de la quantité de la source de carbone sur la production de kératinase par la souche locale.....	44

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les caractéristiques structurales d' α et β kératine.....	13
Tableau 2 : Solubilité de la kératine α et β	15
Tableau 3 : Composition en acides aminés (résidus pour 100 résidus) des matières kératiniques représentatives d' α et β kératine.....	16
Tableau 4 : Comparaison de la composition en acides aminés entre les kératines des cheveux humains, des plumes et de la laine.....	17
Tableau 5 : Diversité des micros organismes kératinolytiques et certaines propriétés biochimiques de kératinase.....	24
Tableau 6 : Effet de différentes sources d'azote organique sur la production de Kératinases par la souche.....	39
Tableau 7 : Effets des différentes sources inorganiques d'azote sur la production de Kératinases par la souche.....	40
Tableau 8 : Effets de variation de température sur la production de kératinases par la souche...	41
Tableau 9 : Effets de la variation du pH sur la production de kératinase par la souche locale...	41
Tableau 10 : Effets de la variation du volume d'inoculum sur la production de Kératinases par la souche locale.....	42
Tableau 11 : Effets de la variation de la quantité de la source de carbone sur la production de kératinase par la souche locale.....	43

Liste des abréviations

DMSO Diméthylsulfoxyde.

HCl Acide Chlorhydriques

NaOH Hydroxyde de sodium

NaCl Chlorure de sodium

CO(NH₄)₂ Carbonate d'ammonium

K₂HPO₄ Hydrogénophosphate de potassium

KH₂PO₄ Phosphate de potassium monobasique

MgCl₂ Chlorure de magnésium

(NH₄)₂SO₄ Sulfate d'ammonium

NH₄Cl Chlorure d'ammonium

KNO₃ Nitrate de potassium

NH₄NO₃ Nitrate d'ammonium

Tris Trisaminométhane

TCA Acide Trichloroacétique

CH₄ Methane

% Pourcentage

G Gramme

Kg Kilogramme

KDa KiloDalton

Da Dalton

Min Minute

H Heure

mL Millilitre

L Litre

M Molaire

N Normal

°C Degré celsius

Cm centimetre

ATR Reflexion Totale Atténué

IRTF Infra Rouge Transformée de Fourier.

Sommaire

Résumé/Abstract/ملخص

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Listes des abréviations

Introduction générale	1
Revue de littérature	3
Chapitre 1 : valorisation des plumes de volailles	3
1.1 Déchets de volailles	3
1.2 Les plumes de volailles	3
1.2.1 Morphologie de la plume	3
1.2.2 Types de plumes	5
1.2.3 Propriétés des plumes	7
1.2.3.1 Analyses biochimiques	7
1.2.3.1.1 Matière volatile	7
1.2.3.1.2 Les cendres	7
1.2.3.1.3 Carbone fixe	7
1.2.3.1.4 Teneur en humidité	7
1.2.3.1.5 Protéines brutes	7
1.2.3.1.6 Matières grasses brutes	8
1.2.3.1.7 Fibres brutes	8
1.2.3.2 Durabilité chimique	8
1.2.3.3 Propriétés mécaniques	9
1.3 Valorisation des plumes de volailles	9
1.3.1 Production de bioénergie	9
1.3.1.1 Production de biodiesel	9
1.3.1.2 Production de biogaz	9
1.3.2 Applications électriques et électroniques	9

1.3.2.1 Les électrodes des plumes carbonisées	9
1.3.2.2 Les circuits imprimés à partir de plumes.....	10
1.3.3 Applications pharmaceutiques	10
1.3.4 Farines de plumes	10
Chapitre 2 : la kératine	12
2.1 Généralités	12
2.2 Types de kératine	12
2.2.1 Différences structurales.....	12
2.2.2 Biochimies de kératine α et β	14
2.2.2.1 Solubilité	14
2.2.2.2 Composition en acides aminés	15
2.3 Les sources de kératine	16
2.4 La kératine des plumes	17
2.5 Biodégradation et gestion des déchets de kératine	17
2.6 Applications industrielles de la kératine.....	18
2.6.1 L'industrie cosmétique	18
2.6.2 L'industrie pharmaceutique	19
2.6.3 La kératine comme engrais	19
2.6.4 Autres applications de la kératine	20
Chapitre 3 : enzymes kératinolytiques	21
3.1 Généralités	21
3.2 Sources microbiennes de kératinase	21
3.3 Bactéries kératinolytiques	21
3.4 Mode d'action des kératinase	22
3.5 Caractères moléculaires et biochimiques des kératinase	23
3.6 Physiologies de la production de kératinase	24
3.7 Conditions physiochimiques optimales	25
3.8 Applications industrielles de kératinase	25
3.8.1 Elimination des déchets kératiniques	25
3.8.2 Farines de plume pour l'alimentation animale	26
3.8.3 Farine de plume comme fertilisant	26

3.8.4 Autres applications	26
Partie expérimentale.....	29
Matériel et méthodes	29
1 Origine de la souche.....	29
2 Extractions de la kératine	30
2.1 Procédé d'extraction de la kératine.....	30
2.1.1 Préparation de la matière kératinique	30
2.1.1.1 Les plumes de poulets.....	30
2.1.1.2 Lavage des plumes et préparation de la farine	31
2.1.1.3 Extraction et purification de la kératine	31
3 Caractérisation de la kératine par IRTF	34
4 Productions de kératinase dans des cultures sous agitation	34
5 Dosage enzymatique	35
5.1 Optimisation des conditions de culture pour la production des kératinase	35
5.1.1 Effets des sources d'azote organiques et inorganiques sur la production de kératinase	36
5.1.2 Effets de la température sur la production de kératinase	36
5.1.3 Effets du pH sur la production de kératinase.....	36
5.1.4 Effets de volume d'inulum sur la production de kératinase.....	36
5.1.5 Effets de la différence de la quantité de source de carbone sur la production de kératinases.....	36
Résultat et discussions	37
Résultats	37
1 Extraction de kératine.....	37
2 Caractérisation de la kératine par ATR-IRTF	37
3 Optimisations des conditions de culture pour la production de kératinase	39
3.1 Effets des différentes sources d'azote organiques sur la production de kératinase	39
3.2 Effets des différentes sources inorganiques d'azote sur la production de kératinase	40
3.3 Effets de la variation de température sur la production de kératinase.....	41
3.4 Effets de la variation du pH sur la production de kératinase	41
3.5 Effet de la variation du volume d'inulum sur la production de kératinase.....	42
3.6 Effets de la variation de la quantité de la source de carbone sur la production de kératinases.....	43

Discussion.....	44
Conclusion et perspectives	48
Références bibliographiques.	
Annexes.	

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'augmentation de la population mondiale a amené une surconsommation des produits agro-alimentaire dont la viande de volaille. Dans le monde 24 milliards de poulets sont saignés chaque année et environ 8,5 milliards de tonnes de plumes sont produites. Ainsi, libérées dans l'environnement sans traitement approprié, les plumes sont devenues une source de pollution en raison de leur nature récalcitrante, entretenant de nombreux microorganismes pathogènes et émettant divers polluants tels que le protoxyde d'azote, l'ammoniac et le sulfure d'hydrogène, ce qui présente une menace à la santé publique [1].

Ainsi, dans toutes les parties du monde, tous les moyens ont été mis en œuvre afin de valoriser et recycler ces plumes de volailles. Leurs transformations en farine de plumes par chaleur humide était jusque-là la meilleure alternative, cette dernière contient des protéines alimentaires digestible pour les animaux. Cependant ce procédé présente un inconvénient, les acides aminés qui sont sensible à la chaleur tel que méthionine, lysine, tryptophane vont être dégradés. Le développement de techniques enzymatiques ou microbiologique est très attractif car il permet une hydrolyse des plumes en protéines solubles et acides aminés, c'est une méthode facile et bon marché qui peut être utilisé pour produire des acides aminés rares tel que la sérine, la cystéine et la proline [2].

Les enzymes kératinolytiques sont répandues dans la nature et peuvent être élaborées par certains micro-organismes, la plupart isolées des déchets de volailles. Ces micro-organismes comprennent des bactéries, les champignons et les actinomycètes. Ces enzymes ont la capacité de dégrader la kératine native en entités peptidique plus petites qui peuvent ensuite être absorbées par la cellule [3].

La présente étude a été réalisé dans cette optique ; valoriser ce déchet à savoir les plumes de volailles pour en faire un produit composant dans l'alimentation animale.

Les objectifs assignés à notre travail sont :

- Une extraction de kératine à partir de plumes de volailles ;
- Optimiser le milieu de production de kératinases par une souche locale.

PARTIE
REVUE DE LITTERATURE

Chapitre 01 : Valorisation des plumes de volailles.

1.1-Déchets de volailles

Actuellement, l'Algérie connaît un développement considérable, particulièrement en termes de production du poulet de chair à l'échelle industrielle. Il en découle que la quantité de déchets générée connaît aussi une augmentation proportionnelle. En effet, la viande destinée à la consommation humaine ne représente que 70% à 78% de chaque poulet, alors que le reste devient des déchets [5].

Cette industrie figure de nos jours parmi les plus polluantes. Ainsi, les solutions pour la gestion, le traitement et la valorisation représentent un enjeu majeur, immédiat et sérieux [6].

1.2-Les plumes de volailles

Les plumes de volailles représentent entre 4,5 et 6,2% en poids vif de l'animal. Elles sont classées selon la nomenclature française dans la catégorie de déchets non dangereux [7].

Elles assurent l'isolation et l'imperméabilité chez les volailles, elles permettent également à la plupart des oiseaux de voler en formant des surfaces qui donnent un élément aérodynamique dans le rôle est de soulever les ailes et la queue. La forme du corps profilée réduit la résistance de l'air pendant le vol. Chez les oiseaux aquatiques, le plumage assure la flottabilité. Par ailleurs, la couleur du plumage peut fournir un camouflage ou des motifs utilisés à des fins sexuelles ou des affichages agressifs. Cette dernière peut résulter de deux manières : Soit par la présence des pigments (mélanines, caroténoïdes ou porphyrines), soit la structure de la plume fournit une couleur irisée ou non irisée. L'étude de la morphologie et les propriétés chimiques, physiques, thermiques, mécaniques et électriques ainsi que l'analyse biochimique des plumes peuvent nous orienter vers les méthodes adéquates pour leur exploitation comme étant une source de kératine [8][9].

1.2.1- Morphologie de la plume

Les plumes sont des arrangements non homogènes d'une structure tégumentaire la plus complexe trouvée chez les vertébrés, avec des motifs de ramification hiérarchiques, ce qui leur confère une immense diversité.

La plume est formée d'un axe longitudinal inséré dans un follicule par un segment basale tubulaire appelé calamus qui est cylindrique, transparent et creux. Le calamus contient deux ouvertures : l'ombilic supérieur qui représente l'intersection entre le rachis et le calamus et l'ombilic inférieur à travers lequel la plume est nourrie pendant sa croissance. L'autre partie est le rachis, un élément central de la plume qui est situé en avant, et selon le type de plume, il est de section circulaire à rectangulaire qui se rétrécit vers la pointe de la plume.

Contrairement au calamus, le rachis n'est pas creux, mais rempli d'une moelle spongieuse composée de grandes cellules médullaires polygonales, et consiste en une alternance de couches de fibres orientées de façon opposée.

Le noyau médullaire, fabriqué à partir de kératine, montre deux niveaux de porosité, ce qui minimise le poids des plumes, notamment parce qu'il occupe une grande partie du volume du rachis. En outre, le rachis est rempli de substances mortes, de pigments et de protéines, et sa base inférieure peut comporter une plume secondaire, appelée hyporachis.

Dans les marges latérales du rachis pousse le vexille, une structure comme une lame divisée en deux parties opposées. C'est le corps visible couvrant la plus grande zone de la plume formée par un réseau compliqué de crochets entrelacés appelées les barbicelles. Ces dernières proviennent du côté aplatis du rachis et grandissent en rangées ordonnées parallèles opposées les unes aux autres et dirigées vers l'extérieur et vers le bout de la plume et ont pour rôle de relier les barbules les unes aux autres, emboîtant ainsi les barbes qui représentent l'unité principale de ramification des plumes et qui sont généralement en série alignée fusionnée dans le rachis d'une structure en forme de feuilles ou de pales et d'une morphologie caractérisée par une coupe transversale légèrement ovoïde.

Selon le type et la taille de la plume, les barbes pouvant être rigides ou flexibles et leur nombre peut varier de quelques dizaines de barbes à plusieurs centaines. Le rachis et les barbes sont des structures biologiques légères construites en kératine, utilisant le motif commun d'une coque solide et d'un intérieur cellulaire.

Chaque barbule est essentiellement une tige de cellules uniques. Basé sur le type de la plume, la morphologie des barbules peut être hautement spécialisée d'où la forme change en fonction de la partie où elles poussent. De plus, la direction ascendante dépend également de la distance sur la surface des barbes : les barbules sur le bord supérieur s'étendent perpendiculairement à l'extérieur du barbillon, mais les barbules sur le bord inférieur se produisent plus parallèlement au barbillon [10][11][12].

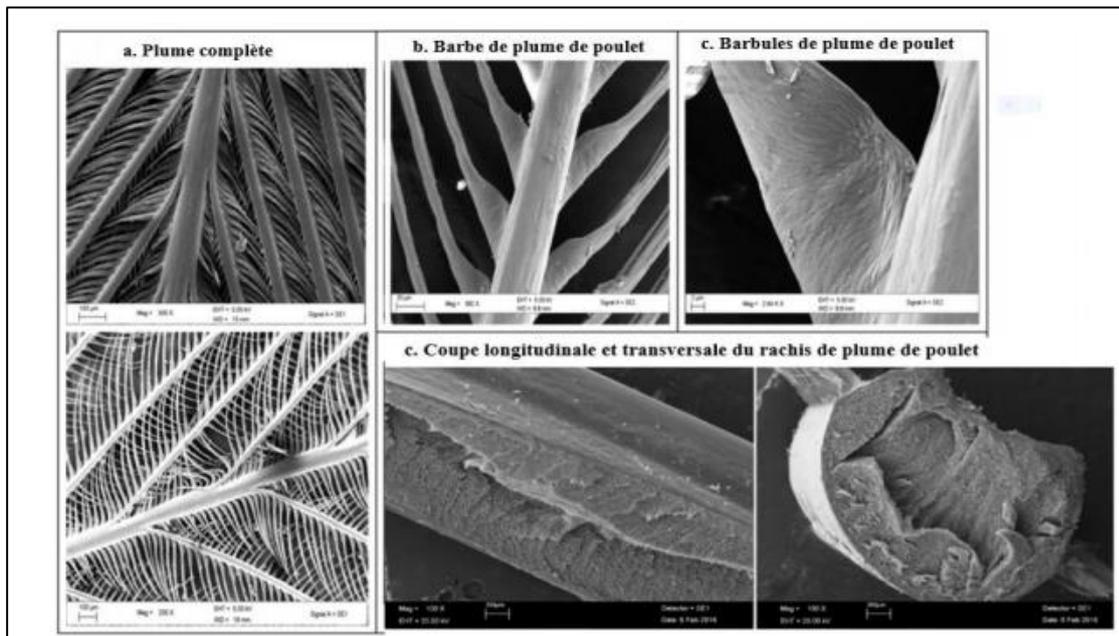


Figure 1 : Images d'analyse par le Microscopie électronique à balayage (MEB) de la plume de poulet [12]

1.2.2-Types de plumes

Au niveau macroscopique, les plumes des oiseaux varient considérablement en morphologie. On distingue deux types : les filaments, et les pennes.

Les filaments comprennent trois sous-types :

- Les plumes sétiformes ou soies : caractérisées par un rachis raide et long, afin de protéger les yeux et le visage, les barbes sont courtes et raides, et réduites en nombre. Elles sont peu couvertes de barbules, qui sont simplifiés et rigides. Le calamus est court.
- Filoplumes : Elles ont un rachis minuscule et raide, portant quelques barbes apicales, qui ont de courtes barbules non spécialisées. Un calamus court est développé à l'extrémité proximale. Elles ont une fonction sensorielle.

- Le duvet : Leur rachis est très court portant ~ 10–30 ramifications latérales de longues barbes, chacune porte une double rangée de barbules sans crochets, ainsi le calamus est court. Leur rôle est l'isolation thermique du corps (thermorégulation) et sert comme un revêtement corporel pour les oiseaux nouveau-nés.

Les quatre sous-types de plumes ont tous un axe central, le rachis en forme de plume et des barbes ramifiées latéralement. Le rachis est inséré du côté dorsal du calamus, parfois associé à un hyporachis supplémentaire et ventral. Les plumes pennées comprennent :

- Des semi-plumes : Ses barbes composées de rameaux de rachis central, d'où les barbules manquent de crochets, résultant un vexille ouvert et duveteux. Leur rôle est l'isolation thermique.
- Plumes de contour : Se compose d'un rachis central, des barbes et des barbules qui ont des crochets, formant un vexille fermé qui fournit une couverture profilée au corps.
- Les plumes caudales ou rétractées : Similaires aux plumes de contour, peuvent se déployer pour le contrôle de vol ou l'affichage.
- Les plumes des ailes ou rémiges : Forment une solide structure alaire pour un vol propulsé. Pour remplir leur fonction aérodynamique, les barbes des rémiges et des rectrices sont plus rigides et possèdent des barbules pennées entraînant un vexille fermé, duveteux proximales d'où l'hyporachis est réduit ou absent. Cependant le calamus est allongé et profondément ancré dans la peau. [13][14]



Figure 2 : Les sept types de plumes rencontrées chez les oiseaux [14].

1.2.3- Propriétés des plumes

1.2.3.1- Analyses biochimiques

1.2.3.1.1- Matière volatile

La matière volatile se compose des gaz combustibles comme le méthane, les hydrocarbures, l'hydrogène et le monoxyde de carbone ainsi que des gaz incombustibles comme le dioxyde de carbone et l'azote. Le contenu volatil moyen des plumes est très élevé (81,56%), cela indique que les plumes ont un bon point d'inflammation, éliminant la demande excessive d'oxygène pour un processus de combustion complet d'où la demande chimique en oxygène varie de 1200 à 1408g/kg.

1.2.3.1.2- Les cendres

La cendre est une impureté qui ne brûle pas, et est une mesure approximative des sels minéraux et de matières inorganiques dans les plumes.

La faible teneur en cendres des échantillons de plumes (inférieur à 1,5%) indique qu'elles pourraient être utilisées comme combustible.

1.2.3.1.3- Carbone fixe

Le carbone fixe est le combustible solide restant dans le four après la distillation de la matière volatile. Il se compose principalement de carbone mais contient également de l'hydrogène, de l'oxygène, du soufre et de l'azote non chassé avec les gaz, et donne une estimation approximative de la valeur calorifique de la biomasse. Les plumes contiennent des quantités importantes de carbone fixe (17–21%).

1.2.3.1.4 – Teneur en humidité

La teneur en humidité dans les fractions des plumes de poulet varie entre 8,8 et 12,3%, impliquant ainsi que les plumes de poulet peuvent absorber suffisamment d'eau pour éviter l'accumulation d'électricité statique.

1.2.3.1.5- Protéines brutes

Ceci a été déterminé en mesurant la teneur en azote des plumes et en le multipliant par un facteur (C) (= 6,25). Ce facteur est basé sur le fait que la plupart des protéines contiennent 16% d'azote. Le taux de protéines était déterminé en utilisant une méthode de digestion Kjeldahl.

Les plumes peuvent être valorisées comme une bonne source de matière protéique avec une teneur en protéine à 80%.

1.2.3.1.6- Matières grasses brutes

C'est une estimation de la teneur totale en matières grasses, y compris la graisse réelle (triglycérides), l'alcool, les cires, les terpènes, les stéroïdes, les pigments, les esters, les aldéhydes et d'autres lipides. Une teneur importante en matière grasse dans les plumes (environ 3%) indique une voie potentielle de valorisation de ces dernières pour la production de biodiesel.

1.2.3.1.7- Fibres brutes

Les plumes contiennent des quantités négligeables de fibres brutes : Ce qui s'explique par le fait que la biomasse des plumes, contrairement à la biomasse cellulosique, ne contient pas de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. [15]

1.2.3.2- Durabilité chimique

La durabilité ou la dégradation est une réduction d'un ou de plusieurs propriétés d'un matériau polymère en raison du contact avec un produit chimique.

✓ Durabilité chimique dans les solutions alcalines En mettant les plumes dans une solution alcaline (à la fois forte et faible), elles se sont dissoutes rapidement et complètement. Les plumes sont instables dans des environnements fortement alcalins.

✓ Durabilité chimique dans les solutions acides Les plumes ont une bonne résistance à l'acide faible mais une mauvaise résistance à l'acide fort dans lequel elles se dissolvent complètement. Les acides forts endommagent les plumes et causent des pertes de poids importantes.

✓ Durabilité chimique dans d'autres produits chimiques :

- L'eau de Javel et les détergents ne sont pas fortement alcalins ou acides et peuvent donc être utilisés en toute sécurité sur les plumes, avec un faible effet sur la structure et la ténacité de celles-ci.
- Les solutions oxydantes comme l'hypochlorite de sodium ne doivent pas être utilisées que froides et diluées, et uniquement pendant de courtes périodes.
- Le trempage dans l'eau chaude élimine certains composants des plumes tels que les composés inorganiques, le sable, les gommés et les matières colorantes [16].

1.2.3.3- propriétés mécaniques

La propriété de traction donne une idée sur la résistance de la plume et son allongement. La partie externe du corps de poulet produit les fibres les plus résistantes tandis que la partie intérieure produit les fibres les plus faibles.

La résistance de la fibre à l'état humide est inférieure à celle de la fibre à l'état sèche. Néanmoins l'allongement à la rupture est plus élevé lorsque la fibre est à l'état humide.

La résistance et l'allongement des barbes des plumes de poulet sont similaires à celles de la laine. Cependant leur force est semblable à celle de la laine et supérieur à celle de la fibre de coton mais inférieur à celle du rachis avec un allongement plus faible à la rupture [17].

1.3- Valorisation des plumes de volailles

1.3.1- Production de bioénergie

1.3.1.1-Production de biodiesel

Les plumes de coq sont aptes à produire du biodiesel de bonne qualité avec des propriétés importantes par rapport aux plumes de poulet en raison de leur composition très compétitive en acides gras, telle que la teneur plus élevée en acide oléique qui augmente la stabilité oxydative pour un stockage plus long et diminue le point d'obturation du filtre à froid pour une utilisation dans les régions froides, et cela en utilisant la méthode de transestérification [18].

1.3.1.2- Production de biogaz

Utilisation de l'hydrolysate des plumes obtenu par la dégradation avec *Bacillus* sp. C4, une bactérie qui produit à la fois des α - et β -kératinases, comme substrat pour la production de biogaz en utilisant des boues anaérobies ou des granules de bactéries comme inoculum, a amélioré le rendement en méthane de 292 et 105%. Cependant, les granules des bactéries ont fonctionné efficacement sur le bouillon total, qui a donné 445 mL CH₄ / gVS de méthane, soit 124% de plus que celui obtenu avec le même type de l'inoculum des plumes non traitées [19].

1.3.2- Applications électriques et électroniques

1.3.2.1- Les électrodes de plumes carbonisées

Grâce à leur structure creuse, leur faible coût et la présence d' α hélice, les plumes sont idéales pour le développement des matériaux microporeux uniformes avec une superficie élevée en tant que matériaux d'électrode, qui sont également respectueux à l'environnement.

Carbonisées, les plumes ont été utilisées comme électrodes pour les supercondensateurs d'une performance excellente grâce à la présence de pores creux qui pourraient agir comme des réservoirs d'électrolytes et facilitent le transport des ions pendant la charge / décharge à grande vitesse.

1.3.2.2- Les circuits imprimés à partir de plumes

Les circuits imprimés sont l'un des composants les plus courants des déchets électroniques non biodégradables. Afin de développer des circuits imprimés biodégradables, les plumes ont été mélangées avec des résines à base d'huile de soja.

Les composites obtenus ont été utilisés pour fabriquer des circuits imprimés en gravant le cuivre et en éliminant les parties non polymérisées avec de l'hydroxyde de sodium. La résistivité volumique et superficielle était de l'ordre de 10^{15} considérée comme bonne pour les circuits imprimés [20].

1.3.3- Applications pharmaceutiques

Les graisses des plumes sont de bonnes sources de cholestérol qui est nécessaire au bon fonctionnement du corps et à la fabrication des hormones. Il pourrait être utilisé comme élément constitutif de synthèse de différents produits pharmaceutiques.

- Le cholestérol peut être un pionnier dans la production de vitamine D3. Une vitamine nécessaire pour la formation des dents et les os.
- Le cholestérol peut être un précurseur des acides biliaires qui sont essentiels dans le mélange d'hormones stéroïdes. Les stéroïdes sont utilisés pour une bonne digestion des aliments et l'absorption des graisses dans l'intestin, les syndromes de la ménopause, et ils empêchent également le gonflement des seins.
- Vu que les acides biliaires peuvent décomposer et émulsionner les graisses, le cholestérol pourrait également être utilisé comme bio-émulsifiant / biosurfactant dans l'industrie cosmétique.

1.3.4-Farine de plumes

Compte tenu de la teneur en azote et en protéines, les plumes de volailles ont un grand potentiel pour diverses utilisations.

Cependant, la mauvaise digestibilité de la farine des plumes de la part des animaux ainsi que la haute stabilité mécanique des protéines qu'elle contient et sa résistance à la dégradation par les enzymes protéolytiques courantes nécessite un traitement adéquat.

Dans ce contexte plusieurs études ont été menées citant : Pour la génération de farine de plumes, le rachis doit être dégradé par hydrolyse pour le rendre digestible. Un processus typique est le suivant : (Figure 3)

- Après leur collection à partir des usines de transformation, les plumes sont lavées à l'eau.
- Un assèchement par pression mécanique plutôt que la chaleur, est établi.
- Après élimination de l'eau, les plumes sont cuites à la vapeur humide pour l'hydrolyse sous pression pendant 1–2 h.
- Les plumes sont ensuite refroidies, séchées et broyées.
- La farine obtenue passe à travers des détecteurs de métaux, afin d'éliminer les grosses particules métalliques [21].

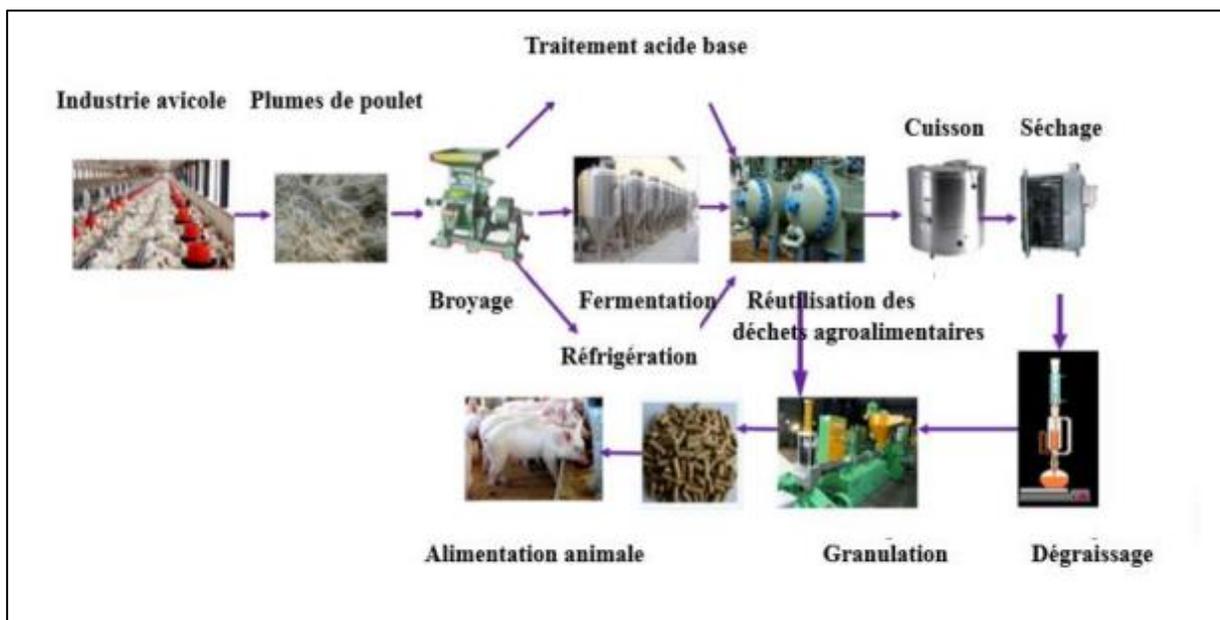


Figure 3 : Diagramme schématisé de la production d'aliments pour animaux à partir de plumes de poulet [21]

Chapitre 02 : La kératine.

2.1-Généralités

La kératine est présente chez presque tous les vertébrés. Elle est issue de la kératinisation des cellules mortes de la peau en s'accumulant dans la couche superficielle. Elle fournit un moyen de défense et une fonction de protection dans leur adaptation vis-à-vis l'environnement extérieur.

Considérée comme étant le troisième biopolymère non toxique le plus abondant dans l'environnement après la cellulose et la chitine avec des propriétés uniques de biodégradabilité et de biocompatibilité, elle a connu un grand intérêt de la part des chercheurs qui ont réalisé un massif travail en étudiant la caractérisation structurale, la composition chimique, et les propriétés biochimiques/physicochimiques.

Ceci a abouti au développement de diverses formes de kératine (gels, films, nano / microparticules), qui ont été exploitées dans divers domaines industriels (pharmaceutique, cosmétique, médical, etc.).

La kératine est une protéine fibreuse riche en soufre. C'est une molécule insoluble qui représente les principaux constituants structuraux des phanères : (cheveux, ongles, griffes, sabots, écailles, plumes, cornes, bec, etc.) [22][23][24].

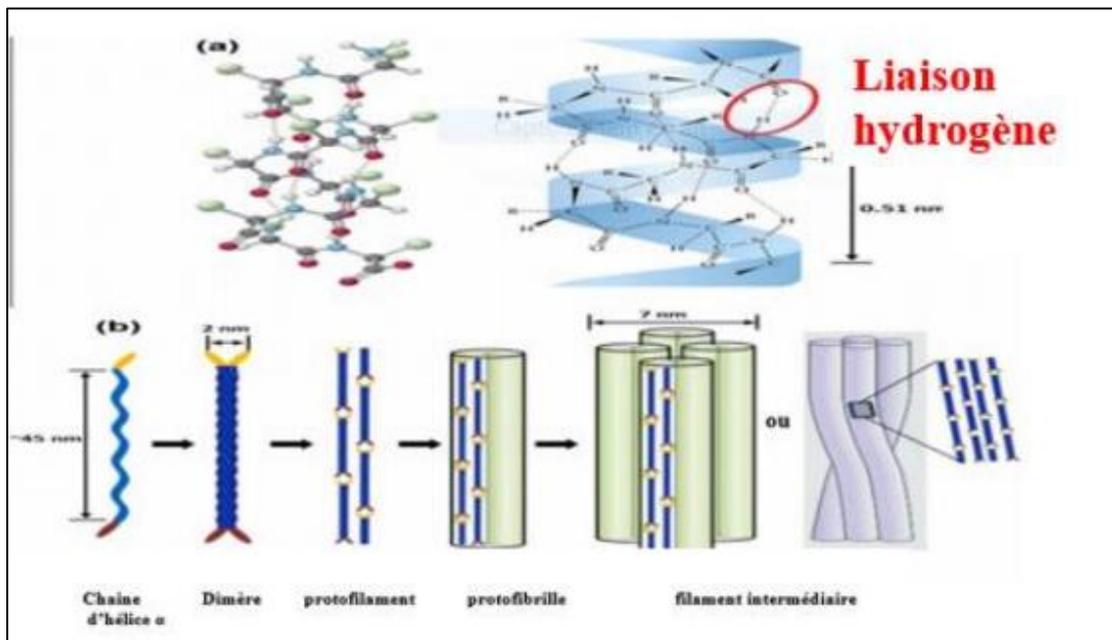
2.2- Types de kératine

2.2.1- Différences structurales

Il existe deux types de kératine, l'alpha-kératines et bêta-kératines, elles remplissent des rôles similaires mais diffèrent dans leurs structures, composition et propriétés. (Tableau 1) [25].

Tableau 1 : Les caractéristiques structurales d' α et β -kératine. [25]

	α -Kératine	β -kératine
Similitude: caractéristique structurelle	Structure à matrice filamenteuse : FI et filaments β -kératine incorporés dans une matrice amorphe. Les FI et les filaments β -kératine génèrent des diagrammes de diffraction des rayons X caractéristiques.	
Diamètres des filaments	FI : ~ 7 (nm) Basé sur une structure hélicoïdale	Filaments de β -kératine : 3–4 (nm). Basé sur une structure en feuille plissée β
Masse moléculaire	(40–68 kDa).	(10-22 kDa).
Constituants des protéines	La matrice est constituée de protéines à haute teneur en soufre et en glycine – tyrosine, alors que les FI se composent de plusieurs types de protéines.	Le filament et la matrice sont incorporés dans une seule protéine.
Rigidité	Elevée	Moins rigide que l' α kératine

**Figure 4** : : La structure des FI de la kératine α : (a) : un modèle boule et bâton de la chaîne polypeptidique, (b) : dessin schématique de la formation des filaments intermédiaires.[25]

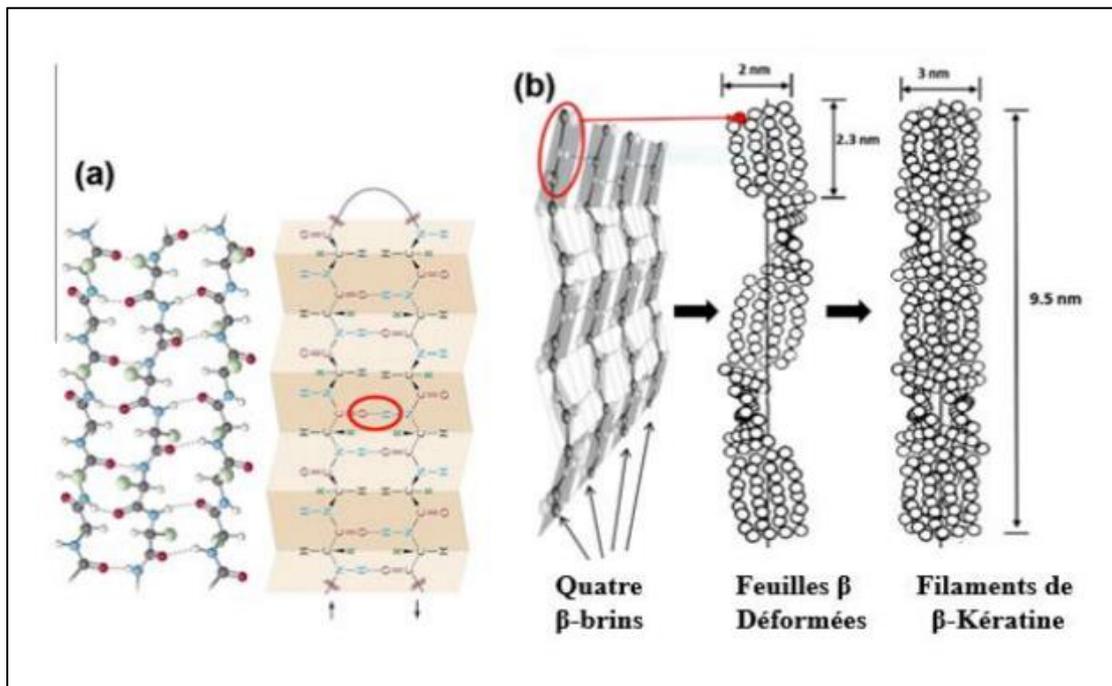


Figure 5 : Structure des filaments β -kératine : (a) : un modèle boule et bâton de la chaîne polypeptidique, et illustration du feuille plissée β . (b) : dessin schématique de la formation des filaments β -kératines [25].

2.2.2- Biochimie des kératine α et β

2.2.2.1- Solubilité

Due à la présence des réticulations disulfures intra et intermoléculaires, la kératine est insoluble dans tous les solvants tel que l'eau pure, les solutions aqueuses acides ou basiques et les solvants organiques. Par conséquent, la dissolution et l'extraction de la kératine sont difficiles par rapport à d'autres polymères naturels, tels que le collagène ou l'amidon [26].

La protéine de la kératine est soluble dans des solutions contenant des agents dénaturants, comme l'urée [27].

Plusieurs procédures de purification ont été développées pour obtenir des dérivés de kératine. Pour les α kératines, des méthodes de réduction, d'oxydation et de sulfitylose ont été utilisées, tandis que pour les β kératines le thioglycolate alcalin et une combinaison d'un réactif de rupture de liaison disulfure et d'un dénaturant protéique ont été décrits dans la littérature (Tableau 2).

Tableau 2 : Solubilité de la kératine α et β [25].

α - kératine	β -kératine
<u>Réduction</u> : par le thioglycolate de potassium dans l'urée pour obtenir 80 à 97% de kératine à partir de la corne, du sabot, des cheveux, et par électrophorèse sur gel d'amidon en fractions riches et pauvres en soufre.	Thioglycolate alcalin : par le thioglycolate de sodium dans l'absence d'oxygène à pH 11 pour obtenir 80 à 90% de kératine de plumes
<u>Oxydation</u> : en traitant la laine avec de l'acide peracétique et un alcali dilué. <u>Sulfitolyse</u> : par bisulfite de sodium avec de l'urée et un agent oxydant	<u>Sulfitolyse</u> : Combinaison d'un réactif de rupture de liaison disulfure et d'un dénaturant protéique

2.2.2.2- Composition en acides aminés

L'analyse des acides aminés a été réalisée par l'hydrolyse acide des protéines et la chromatographie d'échange d'ions automatisée. Les kératine α et β ont une teneur élevée en cystéine et une très faible teneur en histidine et en méthionine, cependant les α -kératines sont plus riches en cystéine et d'acide glutamique tandis que les β -kératines sont plus riche en alanine et en glycine, proline et sérine. (Tableau 3) [25].

Tableau 3 : Composition en acides aminés (résidus pour 100 résidus) des matières kératiniques représentatives d' α et β -kératine [25].

	Laine (représentant la α -kératine)	Rachis de plumes (représentant la β -kératine)
Alanine	5.5	8.7
Arginine	6.6	3.8
Acide aspartique (y compris l'asparagine)	6.5	5.6
Cystéine	11.4	7.8
Acide glutamique (y compris la glutamine)	11.3	6.9
Glycine	8.8	13.7
Histidine	0.8	0.2
Isoleucine	3.4	3.2
Leucine	7.8	8.3
Lysine	3.0	0.6
Méthionine	0.5	0.1
Phénylalanine	2.5	3.1
Proline	6.0	9.8
Sérine	9.6	14.1
Thréonine	6.1	4.1
Tyrosine	4.1	1.4
Valine	5.9	7.8
		Tryptophane 0.7

2.3 Les sources de Kératine

- Kératine trichocytaire : également appelée kératine dure avec une teneur élevée en soufre (~ 5%). Elle se trouve dans les structures liées à l'épiderme telles que la laine, les poils, les plumes, et les ongles ainsi que les cornes et les sabots des mammifères, des reptiles et des oiseaux. Elle contient une teneur élevée en cystéine (4–17%) et faible en glycine. Contrairement à la kératine molle, la kératine dure possède une durabilité et une résistance structurelles et agisse comme échafaudage structurel. (Tableau 4)
- Kératine épithéliale : également appelée kératine molle avec une faible teneur en soufre (~1%). Elle se trouve dans la couche cornée de la peau, et a une faible teneur en cystéine (<3%). La kératine molle stabilise les cellules de l'épithélium.

Tableau 4 : Comparaison de la composition en acides aminés entre les kératines des cheveux humains, des plumes, et de la laine [25].

Acides aminés	La laine	Les cheveux humains	Les plumes
Acide aspartique	6.4-7.0	7.09-9.3	5.42-6.7
Acide glutamique	11.3-13.4	11.56-16.6	6.9-9.7
Lysine	2.85-3.4	2.62-3.5	0.6-1.8
Arginine	3.3-7.1	3.19-7.2	1.7-4.96
Histidine	0.8-0.9	0.7-1.1	0.2-0.5
Serine	9.50-10.9	9.0-11.66	7.2-14.1
Thréonine	5.8-6.4	5.5-19.64	0.8-4.1
Tyrosine	1.96-4.1	1.2-2.5	4.6-4.15
Cystéine	5.7-11.4	7.6-12.92	5.07-7.8
Méthionine	0.4-0.59	0.4-2.49	0.1-0.41
Leucine	6.8-8.1	1.2-8.01	6.16-8.3
Valine	5.80-6.4	6.18-6.86	2.0-7.8
Phénylalanine	2.1-2.9	1.91-2.22	3.1-4.3
Glycine	8.0-9.4	5.2-6.56	7.16-16.2
Alanine	5.2-5.81	4.70-6.9	3.13-8.7
Proline	6.0-7.1	3.8-9.55	9.8-18.8
Isoleucine	3.1-3.5	3.12-3.7	3.2-4.3

2.4 - La kératine des plumes

Les kératines de plumes sont formées de la structure β -kératine qui est des polypeptides d'approximativement 100 acides aminés avec un poids moléculaires variant de 10 à 30 kDa, et quelques structures en hélice α .

Il a été constaté qu'une petite quantité d' α -kératine contribue au développement de la plume. Les β -kératines des oiseaux ont une chaîne d'acides aminés plus courte que celle des autres kératines trouvées chez les mammifères.

Par ailleurs, une étude montre que la plume comporte 9,38% d'hélice α , 47,19% de feuille β , 32,25% de β -tour et 11,18% au hasard. La kératine des plumes diffère également de la kératine de la laine dans la teneur en cystéine ; où les plumes contiennent environ 7% et la laine contient 11 à 17%.

2.5- Biodégradation et gestion des déchets de kératine

La kératine est un polymère organique biodégradable où la biodégradation est liée à de fortes liaisons covalentes et à sa réticulation prolongée au sein de sa structure causant ainsi un problème de gestion des déchets [30].

Chaque année plus de 65 millions de tonnes de déchets kératiniques sont mis en décharge ce qui est dangereux pour l'environnement [31].

Plusieurs systèmes de traitement thermique, chimique et biologique de ces déchets ont été utilisés y compris l'incinération, l'hydrolyse acide ou alcalin et thermo-hydrolyse. Néanmoins l'utilisation de ces systèmes n'est pas efficace. Cela est due aux inconvénients suivants :

- L'incinération consomme de l'énergie et génère une grande quantité de dioxyde de carbone.
- Le traitement thermique alcalin détruit certains acides aminés essentiels.

La biodégradation par les microorganismes présente plusieurs avantages, c'est un procédé sûr, rentable et diminue la production de dioxyde de carbone. Malheureusement, l'emploi des mésophiles permet la propagation de nombreux agents pathogènes humains et animaux, y compris les champignons kératolytiques qui provoquent des maladies de la peau.

D'autre part, l'utilisation de thermophiles et d'hyperthermophiles à une température élevée est plus sûre contre les agents pathogènes et les microorganismes producteurs de toxines [31].

2.6- Applications industrielles de la kératine

La kératine des plumes est une source potentielle de biomatériaux abondants, peu coûteux, respectueux à l'environnement et commerciaux, elle est d'une importance incontournable dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique, biotechnologique, médicale, ...etc [32].

2.6.1-. L'industrie cosmétique

La kératine est devenue quasi incontournable dans l'industrie cosmétique, elle rentre dans la production de divers produits tels que les crèmes et les shampoings.

Ainsi leur existence dans la cuticule des cheveux et la couche cornée aide à préserver l'hydratation de la peau tout en interagissant avec les cosmétiques [32].

Plusieurs applications ont été décrites au fil du temps citant :

- La kératine hydrolysée et la kératine capillaire hydrolysée ont été utilisées pour le traitement des cheveux. Jusqu'à 0,2% de kératine a été rapportée dans le mascara, alors que la quantité est $\approx 0,028\%$ dans les savons de bain et détergents.
- Capacité de rétention d'eau, hydratation et élasticité de la peau s'est améliorée avec l'application de la kératine.

- La kératine à haut poids moléculaire est principalement utilisée pour les soins de la peau en raison de son individualité comme filmogène et hydrophile.
- Film de kératine où le revêtement sur la peau procure une sensation douce
- L'hydrolysate de kératine (HK) affecte l'hydratation de la peau, il peut agir à la fois comme humectant et occlusifs (réduisant la perte d'eau trans-épidermique).
- HK figure dans les shampooings et après-shampooings, lotions et sérums nutritifs pour les cheveux, ainsi que les mascaras, vernis à ongles et agents de maquillage pour les yeux. Leurs effets sont de former un film protecteur, lissage de la structure des cheveux ou des ongles, réguler la consistance des produits et favoriser la formation de mousse
- . HK réduit la tension superficielle, cependant ajouté en cosmétique permet de réduire la quantité d'émulsifiant ajoutée pour stabiliser les crèmes.
- HK limite les effets d'irritation déclenchés par les agents nettoyants (tensioactifs) sur la peau, les yeux et les cheveux.
- Le haut pouvoir tampon d'HK est exploité pour stabiliser le pH des cosmétiques [32] [33] [34].

2.6.2- L'industrie pharmaceutique

Due à la préoccupation environnementale croissante, les matériaux biosourcés tels que la kératine peut remplacer les produits pétrochimiques pour des applications pharmaceutiques [35].

Les nanoparticules de la kératine, ainsi que les hydrogels, films et éponges à base de kératine ont été proposés comme un système d'administration des médicaments anti-inflammatoires, antitumoraux ou antibiotiques [36].

2.6.3- La kératine comme engrais

Une solution d'acides aminés liés au soufre tiré de la kératine est utilisée pour préparer un engrais organique qui améliore le métabolisme des plantes. La kératine représente une bonne source d'azote. Néanmoins, l'utilisation des plumes de poulet comme un biofertilisant est limitée à cause des liaisons cystéines qui les rendent difficiles à dégrader. Cependant des traitements avec des microorganismes ont été utilisés afin d'augmenter l'utilité des déchets de plumes comme un biofertilisant. [32].

2.6.4- Autres applications de la kératine

- Les matières kératiniques sont utilisées comme additifs dans la préparation du béton et de la céramique.
- HK issu des plumes est utilisé comme un complément alimentaire pour la nourriture des ruminants en raison de sa composition similaire avec la protéine de soja.

- La modification enzymatique par enrichissement en lysine conduit à une augmentation de la valeur nutritive des aliments.
- L'oxydation des matières kératiniques clive et oxyde certaines liaisons disulfures pour former des peptides hydrosolubles et cette matière est utilisée comme agent de cicatrisation des plaies.
- La composition anti-incendie est préparée à partir d'une solution de colloïde organique dérivée de l'hydrolysate des cornes et des sabots.
- La présence d'une grande quantité d'azote dans les plumes lui rend un matériau utile comme retardateur de flamme. Ainsi une haute ignifugation a été transmise aux tissus après un traitement par le retardateur de flamme à base de plumes [32]

Chapitre 03 : Enzymes kératinolytiques

3.1-Généralités

Les Kératinases représentent l'un des plus importants groupes d'enzymes protéolytiques qui ont un grand intérêt industriel et des applications dans différents secteurs, ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser les kératines efficacement que d'autres protéases. Ce sont des enzymes qui dégradent facilement la kératine des plumes, de laine et des cheveux ainsi que d'autres protéines fibreuses. Les enzymes kératinolytiques ou kératinase sont très répandues dans la nature et sont produites par un ensemble de microorganismes qui se développent sous différentes conditions écologiques et environnementales, et ils montrent une grande capacité à dégrader les substrats kératiniques [37][38].

3.2- Sources microbiennes de Kératinases

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

Par conséquent, les Kératinases microbiennes présentent une grande diversité de leurs propriétés biochimiques et biophysiques [39].

3.3-Bactéries kératinolytiques

Chez les bactéries, la dégradation de la kératine est surtout confinée aux bactéries à Grampositifs des genres *Bacillus*, *Lysobacter*, *Kocurica* et *Microbacterium*.

Néanmoins, les bactéries du genre *Bacillus spp*, sont classées dans la littérature parmi les genres bactériens les plus importants en termes de production de kératinases.

En effet, diverses souches de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* et *Bacillus cereus* ont été décrites comme kératinolytiques.

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

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

En outre, les actinomycètes du groupe *Streptomyces*, à savoir *S. fradiae*, *S. pactum*, *S. albidoflavus*, *S. thermoviolaceus SD8* et *S. graminofaciens*, et le groupe de *Thermoactinomyces*, à savoir *T. candidus*, sont communément décrit comme dégradeurs de la kératine avec une capacité d'agir sur une grande variété de substrats, y compris la kératine des cheveux, de la laine et des plumes [40].

3.4- Mode d'action des Kératinases

Le mode d'action de nombreuses enzymes kératinolytiques a été déterminé moyennant des substrats et des inhibiteurs spécifiques.

Ces enzymes attaquent principalement les ponts disulfures du substrat non soluble par clivage de ces derniers ce qui permet l'attaque des protéases extracellulaires et donne en définitive une accumulation de sulfocysteine, l'excès de soufre est oxydé en sulfite et en sulfate ou en thiosulfate qui se concentre dans le milieu réactionnel (Figure 6). Des études utilisant des substrats synthétiques ont montré que ces enzymes ont tendance à hydrolyser les liaisons peptidiques au niveau de lamine des acides aminés aromatiques et hydrophobes [41].

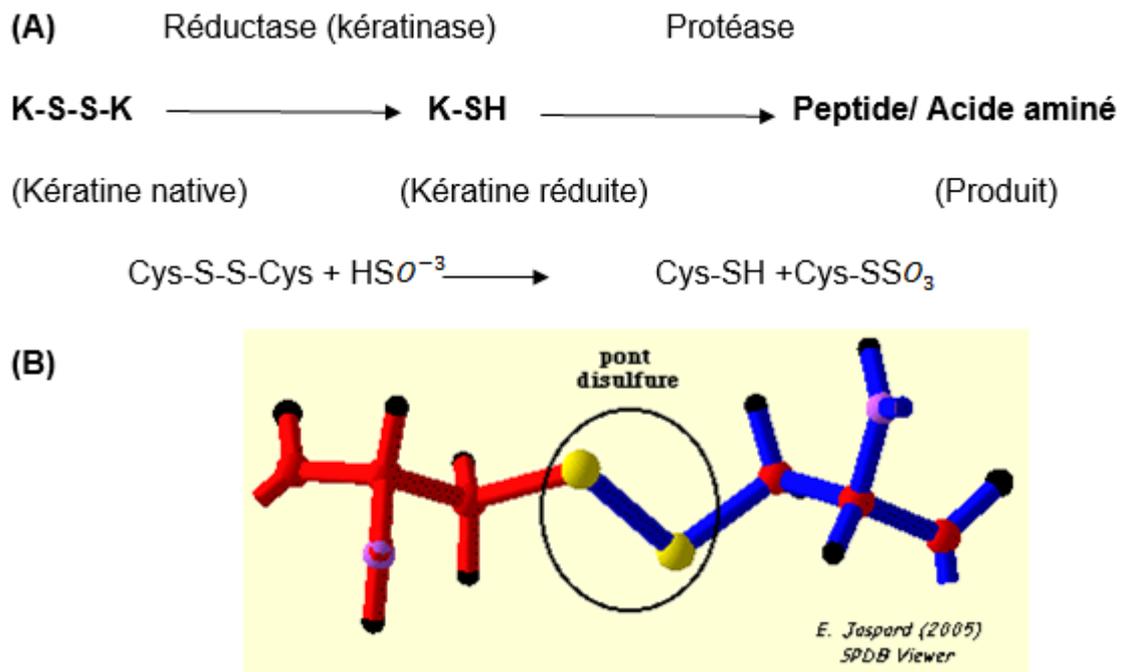


Figure 6 : **(A)** Schéma représentant le mode d'action des kératinase sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures, **(B)** Représentation schématique des ponts disulfures entre les résidus de cystéines [41].

3.5- Caractères moléculaires et biochimique des Kératinases

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

Tableau 5 : Diversité des micro-organismes kératinolytiques et certaines propriétés biochimiques de Kératinases [39].

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

3.6-Physiologie de la production de Kératinases

Les Kératinases microbiennes, produites en présence d'un substrat kératinique (source de carbone et d'azote), sont majoritairement extracellulaires et inductibles. Toutefois, une minorité sont membranaires.

La plupart des travaux montrent que la fraction intracellulaire contient une activité disulfure réductase qui agit en synergie avec les Kératinases extracellulaires pour dégrader la kératine par réduction des ponts disulfures.

Donc, la kératinolyse se fait en deux étapes :

- La sulfitoxydation ou réduction des ponts disulfures.

- La protéolyse.

L'étape de la sulfitylyse ce fait soit en présence d'agents réducteurs (tels que sulfate de sodium, dithiotreitol (DTT) et mercaptoéthanol) ou de disulfure réductase. La coopération de l'un de ces actes avec l'activité kératinolytiques permet d'aboutir à une dégradation complète de la kératine. Cependant, la chronologie de ces événements et leurs natures exactes ne sont pas encore bien élucidée [41].

3.7 - Conditions physicochimiques optimales

Un aperçu général dans la littérature sur la stabilité du pH et de la température indique que les kératinases sont généralement actives et stables sur une large gamme de pH (5 à 13).

En effet, La plus faible valeur de pH 4 a été observée dans le cas de *Streptomyces pactum* DSM40530, et la plus élevée, pH 13 chez *Bacillus halodurans* AH-101 [41].

Par ailleurs, la plupart des Kératinases microbiennes sont des protéases alcalines ou neutres présentant un pH optimal allant de 7,5 à 9,0.

Cependant, quelques Kératinases possèdent un pH optimal alcalophile extrême supérieur à 12.

La température optimale de Kératinases varie entre 30 et 80°C.

En revanche, l'enzyme de *Chryso sporium keratinophilum* et de la bactérie thermophile *Fervidobacterium islandicum* AW ont montrés un niveau exceptionnellement élevé de la température optimale qui a atteint 90°C et 100°C, avec une demi-vie de 30 à 90 min, respectivement [42].

3.8-Applications industrielles des Kératinases

Les Kératinases de microorganismes ont attiré beaucoup d'attention dans la dernière décennie, notamment en raison de la multitude de leurs applications industrielles telles que dans les industries alimentaires animales, industrie des engrais, détergents, de la tannerie et l'industrie pharmaceutique.

En revanche, il est important de signaler que seulement les deux premiers secteurs sont actuellement exploités alors que les autres sont encore à l'échelle expérimentale [43].

3.8.1- Elimination des déchets kératiniques

Plusieurs millions de tonnes de plumes produites annuellement par l'industrie de l'élevage ce qui conduit à la pollution de l'environnement.

En effet, la structure fibreuse, insoluble et largement réticulé par du disulfure, de l'hydrogène et des liaisons hydrophobes de la β -kératine a donné à cette protéine une forte résistance à la dégradation par des protéases microbiennes communes, à savoir : la trypsine ; la pepsine et la papaïne.

Ainsi, l'importance des Kératinases dans l'élimination de la pollution causée par les déchets des industries de volaille devient de plus en plus remarquable [44].

3.8.2- Farine de plume pour l'alimentation animale

Jusqu'à ces dernières années, les plumes ont été cuites à haute température et pression et utilisées comme complément dans l'alimentation animale sous forme de farine de plumes.

Le traitement hydrothermique, en plus d'être coûteux, aboutit à la destruction de certains acides aminés essentiels, à savoir : la méthionine, la lysine et le tryptophane, ce qui donne un produit à faible digestibilité [45].

Les inconvénients du traitement à haute température ont incité les industries de production de farine de plume à utiliser des Kératinases microbiennes comme des alternatives intéressantes pour hydrolyser les plumes en aliment pour animaux riche en nutriments [46].

3.8.3- Farine de plume comme fertilisant

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

La farine de plumes étant riche en azote (15% N), source peu coûteuse et facilement disponible sert de substitut potentiel au guano. Elle fournit non seulement de l'azote pour les plantes et favorise l'activité microbienne, mais stabilise aussi les structures du sol et augmente la capacité de rétention d'eau [47].

3.8.4- Autres applications

Autres applications potentielles des Kératinases :

- La digestion anaérobie des déchets de volaille pour produire du gaz naturel comme combustible [48].

- Modification des fibres telles que la laine et la soie [49].
- Dans le domaine de la médecine et de la pharmacie elles sont employées pour l'élimination de l'acné, pour la préparation de vaccins pour la dermatophytose et comme additifs dans les agents pour éclaircir la peau car ils stimulent la dégradation de la kératine [50]

PARTIE

EXPERIMENTALE

Objectifs

Des tonnes de plumes sont produits chaque année à partir d'usines de transformation de la volaille comme déchet. Les plumes contiennent une teneur très élevée en protéines kératiniques d'environ 90 %. Les kératines sont biologiquement insolubles, récalcitrantes et biochimiquement rigides qui sont résistant à la dégradation par la plupart des protéolytique. Néanmoins une approche microbienne et biotechnologique en utilisant la kératinase est une alternative prometteuse a la valorisation de la kératine ; notre présent travail s'inscrit dans ce cadre et a pour objectifs :

- Extraction de kératine à partir de plumes de volailles ;
- Optimisation du milieu de production de kératinase par une souche locale.

Cette étude a été effectuée durant la période du mois de mars à la fin mai 2021 ; au Laboratoire de chimie des substances naturelles et biomolécules (LCSN-BioM), Faculté des sciences, Université de Blida 1.

Matériels et méthodes

Matériels

Matériel biologique : représenté par

- Les plumes de volailles ces dernières ont été récupérées auprès d'un abattoir à Blida.
- La souche locale CP22.

Matériel non biologique : consiste en tout le nécessaire de laboratoire et a été détaillé en annexe (Cf annexe 1)

Méthodes

1-Origin de la souche

La souche utilisée a été isolé en procédant au compostage, un mélange de terre et de plumes et soumis aux conditions météorologiques pendant 7 mois (de mars à octobre 2020).

2- Extraction de la kératine

2.1- Procédé d'extraction de la kératine

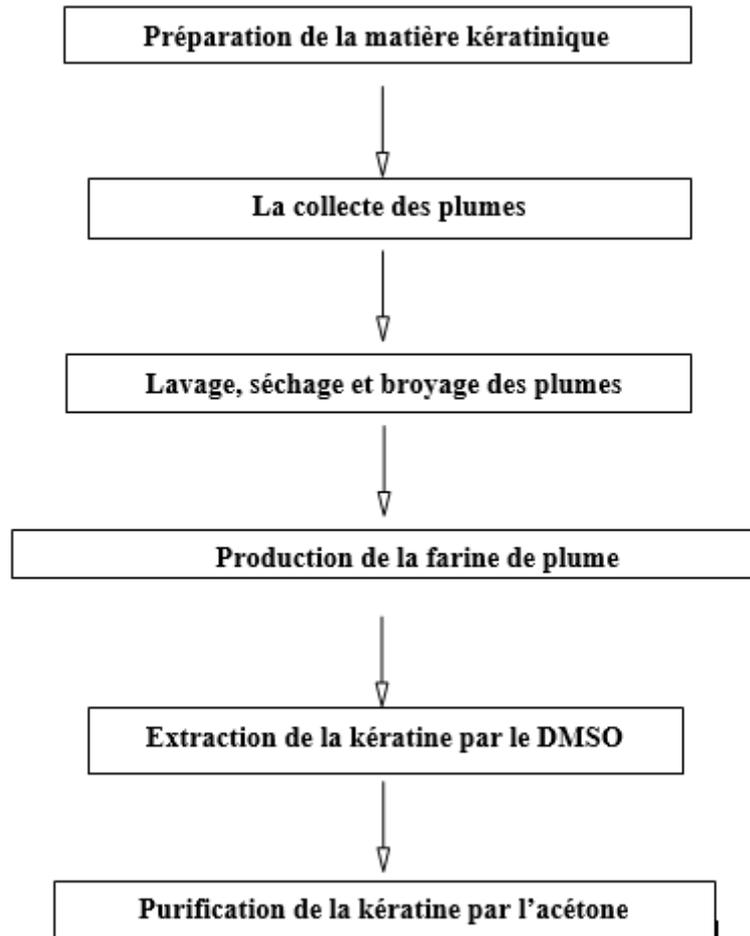


Figure 7 : Diagramme montrant les étapes d'extraction et purification de kératine.

2.1.1-Préparation de la matière kératinique

2.1.1.1- Les plumes de poulets

Les plumes sont collectées à partir d'abattoir situé dans la région de Blida.



Figure 8 : Les plumes collectées

2.1.1.2 -lavage des plumes et Préparation de la farine

- Les plumes ont été lavées au détergent, rincées à l'eau en abondance et séchées à l'air libre.
- Les plumes séchées subissent un deuxième séchage dans une étuve chauffée à 170 °C pendant 2h.
- Ensuite nous avons séparé les fibres du rachis à l'aide d'une paire de ciseaux. Ces fibres ont été coupées plusieurs fois à une longueur moyenne de 5 mm.
- Broyer à l'aide d'un broyeur et tamiser pour éliminer les grosses particules et avoir une farine homogène de diamètre 200 micro mètre.



Figure 9 : Farine des plumes

2.1.1.3-Extraction et purification de la kératine

L'obtention des extraits de kératine contenant de la kératine native est difficile dans la pratique en raison de l'insolubilité de la protéine dans des solutions qui ne provoquent pas d'effets indésirables. Une méthode de solubilisation de la kératine a été développée en utilisant des solvants organiques, par exemple : diméthylsulfoxyde (DMSO).

Pour DMSO, il faut précipiter les protéines dissoutes avec de l'acétone. Cette procédure ne modifie pas la structure des protéines et est souvent utilisée par de nombreux chercheurs à l'échelle du laboratoire pour obtenir un substrat. Permettant de déterminer de l'activité kératinolytiques.

- **solubilisation de la kératine**

Dans un ballon de 1L nous mettons 5g de farine de plumes dissoute dans 250 ml de DMSO.

Le mélange est chauffé dans un rota vapeur à 80 °C pendant 4 h après filtration sous vide pendant 20 à 30 minutes.

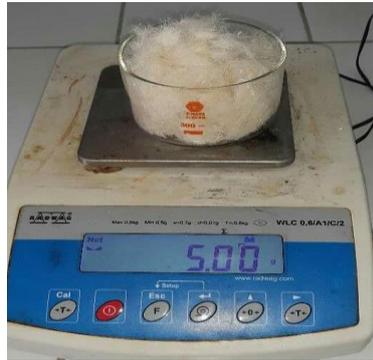


Figure 10 : La masse de plumes utilisée dans la partie expérimentale.



Figure 11 : Chauffage à 80°C et agitation de mélange DMSO avec farine de plumes.



Figure 12 : filtration sous vide pendant 20 à 30minutes.

- Une autre méthode peut -être utilisée par chauffage à reflux dans les mêmes conditions expérimentales, mais attention aux plumes qui peuvent bruler au fond du ballon. Un travail au bain marie est conseillé.

- **Précipitation du substrat**

La kératine soluble est précipitée pendant 2h par addition de 500 mL d'acétone déjà refroidi à (-80 °C) en utilisant un liquide réfrigérant (l'azote liquide).

Et il existe un autre moyen si l'azote liquide n'est pas présent dans laboratoire, nous mettons la Solution finale après l'addition de l'acétone dans réfrigérateur à 4°C pendant 72h c'est-à-dire 3 jours.

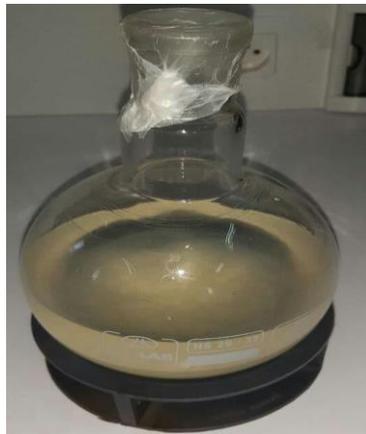


Figure 13: précipitation de la kératine après refroidissement

- **Concentration et récupération du substrat**

Le précipité est récupéré par filtration sous vide pendant 20 min, puis lavé deux fois avec l'eau distillée et séché à 50 °C jusqu'à l'obtention d'une poudre et ensuite conservée à une température ambiante jusqu'à l'analyse.



Figure 14 : récupération de la kératine pure

- **Dissolution de la kératine :**

1g de la poudre est dissout dans 20 ml de NaOH (0,05 M). Le pH est ajusté à 8 par une solution de HCl (1N), puis la solution est diluée à 200 ml avec du tampon Tris-HCl (0,05 M), puis le pH est ajusté à 8.

3- Caractérisation de la Kératine par IRTF

IRTF est une technique qui permet de déterminer les composants chimiques du produit à analyser en identifiant la variété des groupes fonctionnels qu'il contient. Elle est applicable pour une large gamme de matériaux solide, liquide ou gazeux, et pourrait être utilisé pour une analyse qualitative et quantitative. IRTF repose sur le principe d'interférence de rayonnement entre deux faisceaux qui se traduit par un signal appelé interférogramme [47].

Les groupes fonctionnels de la kératine ont été analysés par le Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Les spectres IRTF sont réalisés, pour un nombre d'onde compris entre 500 à 4000 cm^{-1} avec une résolution ($R=8$). Nous préparons le mélange de poudre à analyser en le broyant finement avec du KBr. La pastille est préparée en comprimant le mélange dans une matrice en acier. Les échantillons sont analysés à l'état solide sous forme d'une poudre.

4- Production de Kératinases dans des cultures sous agitation

La production des Kératinases a été réalisée dans le milieu basal dont la composition du milieu est (g/L):

- Poudre de farine de plumes (10 g),
- NH_4Cl (1 g),

- NaCl (1 g)
- K₂HPO₄ (0,6 g),
- KH₂PO₄ (0,8 g),
- MgCl₂ (0,48 g),
- Extrait de levure (0,2 g).

Le pH du milieu est ajusté à 7,5. Trois (03) mL des inocula bactériens ont été ajoutés dans 50 mL de milieu et cultivés sur un incubateur rotatif à agitation à 150 tr/min et 37 °C pendant 72h. Après incubation, le bouillon fermenté a été centrifugé à 4500 tr/min pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant exempt de cellules a été collecté et utilisé pour le dosage de l'activité kératinase.

5-Dosage enzymatique

L'activité enzymatique a été déterminée par la méthode de digestion à la kératine en utilisant 1% de kératine dans un tampon Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) comme substrat spécifique de cette enzyme.

Les mélanges réactionnels contiennent 1mL de solution de substrat et 1 mL de solution d'enzyme brute.

Ensuite, le mélange a été incubé à 40 °C dans un bain-marie pendant 10 min et la réaction a été interrompue en ajoutant 2,0 mL d'acide trichloroacétique 0,4-M (TCA).

Le contrôle a également été réalisé en incubant la solution d'enzyme avec 2,0 mL de TCA sans addition de kératine. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3800 tr/min pendant 30 min et l'absorbance a été mesurée à 280 nm par spectrophotomètre contre le témoin.

Une unité (U/mL) d'activité enzymatique est définie comme une augmentation de l'absorbance de 0,01 à 280 nm (A₂₈₀) par min dans les conditions d'essai calculées par l'équation suivante :

$$U = 4 \times n \times A_{280} / (0,01 \times 10) \text{ 1}$$

Où, **n** est le facteur de dilution ; 4 est le volume de réaction final (mL) ;

10 est le temps d'incubation (min).

5.1. Optimisation des conditions de culture pour la production des Kératinases

La production de Kératinases par des inocula bactériens a été étudiée en considérant à la fois les composants du milieu et les conditions de culture.

5.1.1- Effets des sources d'azote organiques et inorganiques sur la production de kératinase

La production de kératinase par la souche de bactérie isolée a également été optimisée en complétant individuellement différentes sources d'azote organiques et inorganiques.

Les sources d'azote organique telles que la peptone, l'extrait de viande, l'extrait de soja et l'extrait de levure ont été utilisées à une concentration de 0,02%.

Des sources inorganiques telles que NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_4)_2$ et NH_4Cl , à une concentration de 0,1% ont été utilisées comme sources d'azote dans les milieux.

5.1.2- Effets de la température sur la production de Kératinases

Pour déterminer la température appropriée pour la production d'enzymes, les milieux de culture ont été incubés à une température de 30 à 52 °C (30, 37, 42, 52 °C) .

5.1.3- Effets du pH sur la production de Kératinases

Pour la détermination du pH optimal pour la production de kératinase, des expériences ont été réalisées séparément à partir de 4 à 10 (4,5, 6, 7, 8, 9, 10). Le pH a été ajusté en utilisant HCl 0,1N ou NaOH 0,1N.

La production a été réalisée pendant 72h comme indiqué précédemment.

5.1.4-Effets de volume d'inoculum sur la production de Kératinases

Différents volumes d'inocula (1,2, 3, 4, 5, 6 et 7 ml) dans les milieux ont été utilisés pour déterminer les volumes d'inocula appropriés requis pour une production maximale d'enzymes.

5.1.5- Effets de la différence de la quantité de source de carbone sur la production de Kératinases

Les quantités de la farine de plume (0.2, 0.6, 1, 1.4 et 2g) ont été utilisées pour la détermination de la quantité optimale.

Résultats et Discussions

Résultats

1-Extraction de Kératine

Après séchage nous avons obtenu une poudre blanche qui correspond au substrat kératinolytique aussi appelé poudre de kératine.



Figure 15 : Poudre de kératine.

Avec un rendement d'extraction de 14%.

2-Caractérisation de la kératine par ATR-FTIR

Un module universel de réflectance totale atténuée a été utilisé pour les spectres des échantillons analysés ATR-FTIR dans une gamme de nombres d'onde comprise entre 550 cm^{-1} et 3500 cm^{-1} . Cette analyse donne une idée sur les groupements fonctionnels de cette substance de nature protéique, à savoir, les unités monomérique (acides aminés) liés par des liaisons peptidiques (caractéristiques correspondant à des groupes fonctionnels importants comme $-\text{CO}-\text{NH}-$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CNH}$, $-\text{C}-\text{H}$).

Le spectre ci-dessous représente la kératine sous analyse par ATR-IRTF.

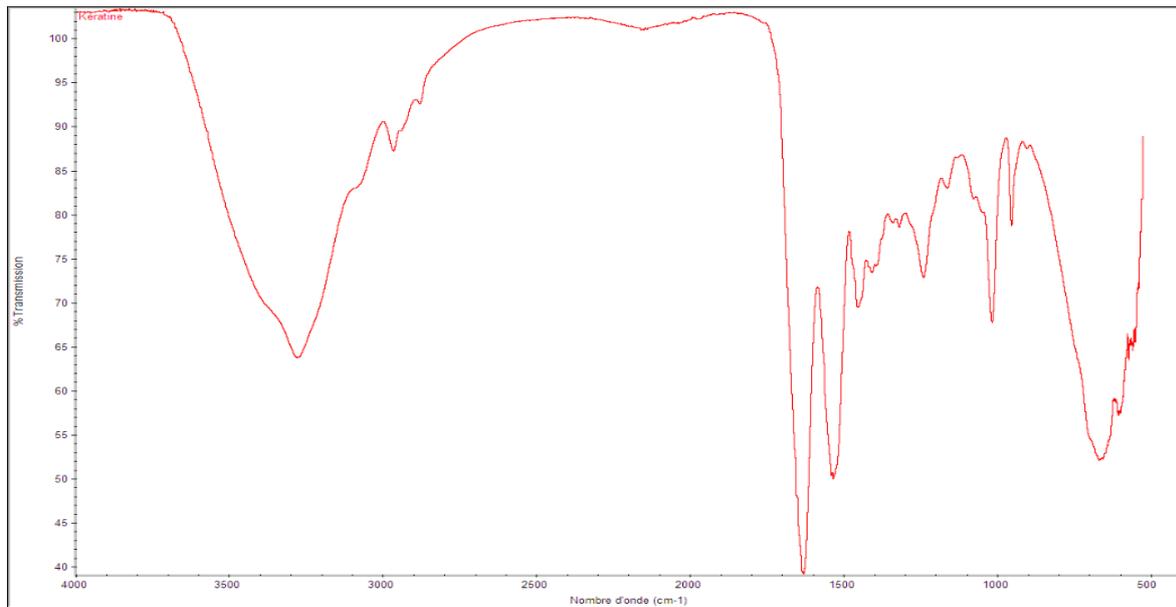


Figure 16 : Résultat d'analyse de kératine par ATR-IRTF

Une lecture attentive de ce spectre a permis de signaler les points suivants :

- Le site pic relativement large dans la région de 3300 cm^{-1} correspond à un mouvement d'étirement de -N-H et -O-H qui s'étirent à partir de la fonctionnalité amide et de l'eau absorbée.
- Le pic moins intense dans la région de région de $2900\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ signifie des vibrations d'étirement des groupes -C-H et -N-H.
- Un groupe carbonyle de la fonctionnalité amide apparaît dans la région de $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$.
- Un pic observé à 1630 cm^{-1} est attribué à la vibration d'étirement du groupe fonctionnel amide-carbonyle (-C=O).
- Le pic observé à 1230 cm^{-1} correspond à un groupe -CNH comprenant des vibrations d'étirement des groupes -C-N- et -C-C- et une vibration de flexion du groupe -N-H.
- La vibration de flexion du groupe -CH₂ se produit à 1450 cm^{-1} .
- Le pic intense et net à 1525 cm^{-1} correspond à la vibration de flexion du groupe -C-N-H.
- Les pics aigus d'intensité moyenne à 1100 et 920 cm^{-1} correspondent à la vibration d'étirement du groupe -C-N-Vibration d'étirement.
- Le pic à 990 et 580 cm^{-1} a été associé aux liaisons C-S et S-S.

Cette analyse a indiqué clairement la dominance des liaisons peptidiques dans le substrat analysé, ceci prouve la nature protéique de la kératine extraite à partir des plumes de volaille et qui mérite d'être exploitée dans la production de la kératinase.

3- Optimisation des conditions de culture pour la production des Kératinases

3.1- Effet des différentes sources d'azotes organiques sur la production de Kératinases

Le suivi de l'effet des différentes sources d'azotes organiques sur la production de Kératinases a montré que l'extrait de soja a une activité bien supérieure aux autres sources organiques.

Tableau 06 : Effet de différentes sources d'azote organique sur la production de kératinase par la souche.

Sources d'azote organique (0,02%)	Extrait de soja	Extrait de levure	Extrait de viande	Peptone
Activité (U/mL)	43,2	19,2	34,8	29,6
pH final	8,39	8,3	8,34	8,29

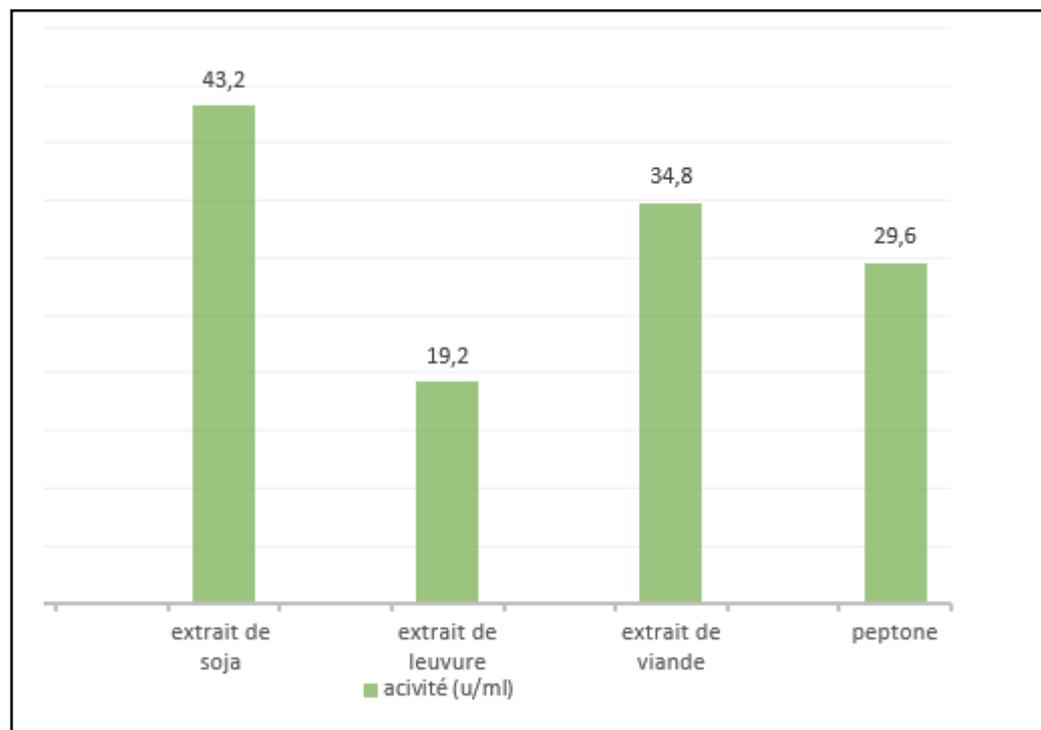


Figure 17 : Effet de différentes sources d'azote organique sur la production de kératinase par la souche.

3.2- Effet des différentes sources inorganique d'azotes sur la production de Kératinases

Concernant la source inorganique d'azote, le NH_4Cl présente la meilleure activité.

Tableau 07 : Effets des différentes sources inorganiques d'azotes sur la production de kératinases par la souche.

Azote inorganique (0,01%)	NH_4Cl	KNO_3	NH_4NO_3	$\text{CO}(\text{NH}_4)_2$	NH_4SO_4
Activité (U/mL)	43,2	19,2	32	19,6	19,6
pH final	8,39	8,59	8,45	7,3	7,84

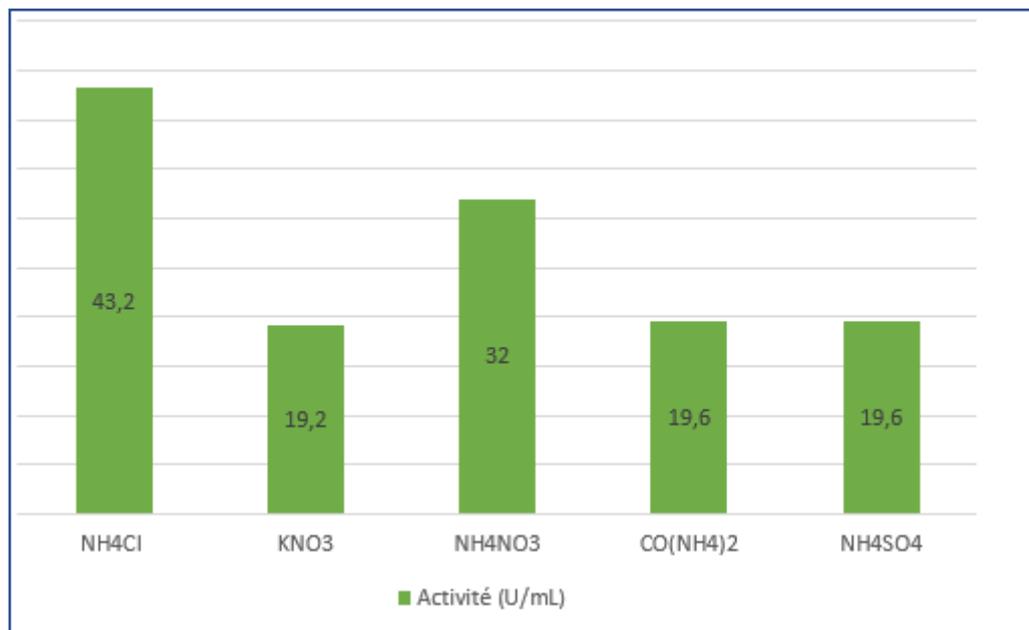


Figure 18 : Effets des différentes sources d'azotes inorganiques sur la production de Kératinases par la souche.

3.3- Effet de la variation de température sur la production de Kératinases

La température optimale a été enregistré à T= 37°C.

Tableau 08 : Effets de la variation de température sur la production de kératinases

Température D'incubation	30	37	42	52
Activité (U/mL)	8,4	43,2	6,3	5,9
pH final	7,6	8,39	6,85	7,1

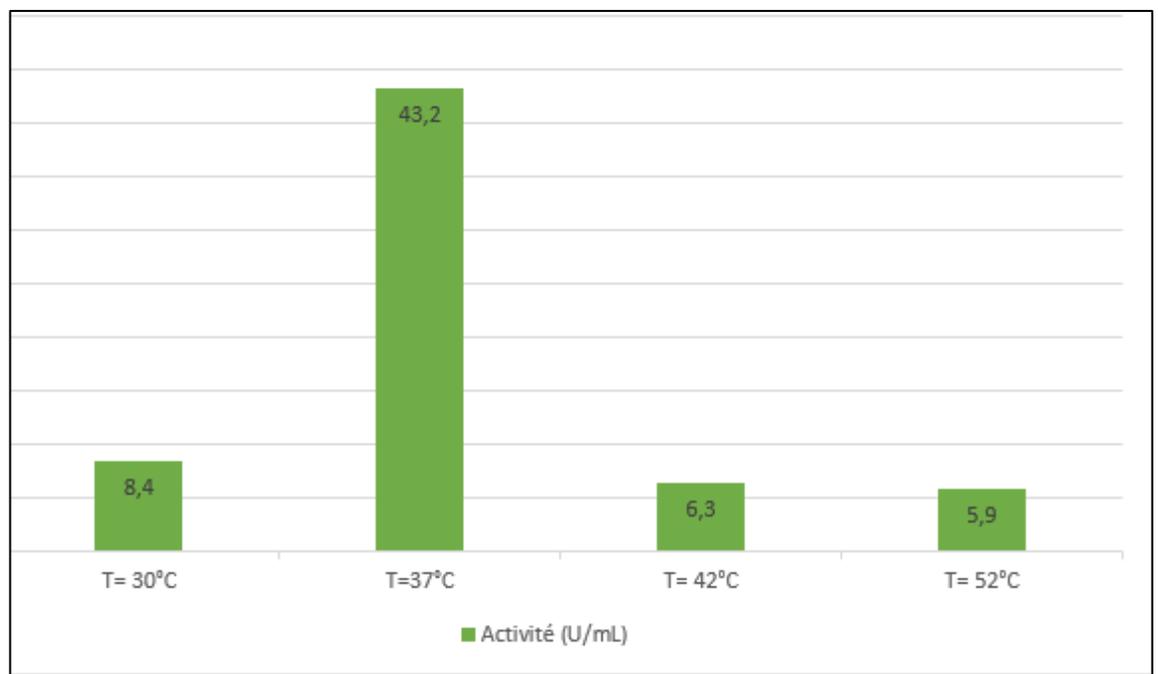


Figure 19 : Effets de la variation de température sur la production de Kératinases par la souche.

3.4- Effets de la variation du pH sur la production de Kératinases

De pH = 4 à pH= 8 l'activité a continué à augmenter jusqu'à arriver au point optimal qui est pH= 8.

Tableau 09 Effets de la variation du pH sur la production de Kératinases par la souche locale.

pH initial	4	5	6	7	8	9	10
Activité (U/mL)	28,8	35,5	38,8	45,6	67,7	10,4	7,2
pH final	8,1	8,21	8,36	8,42	8,26	8,64	8,9

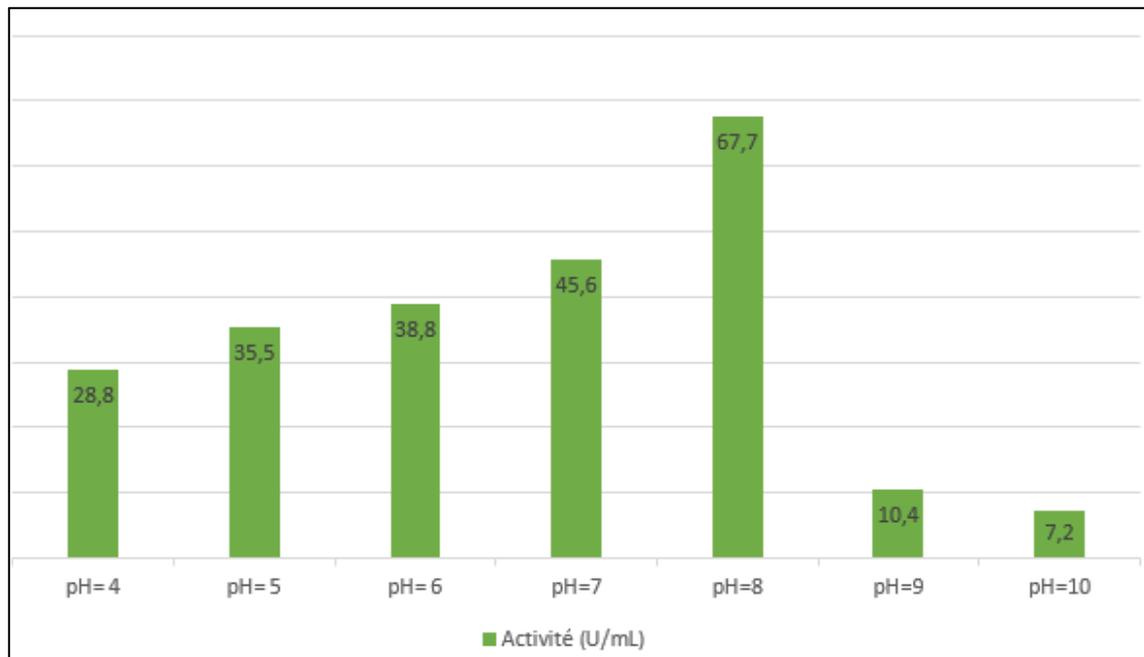


Figure 20 : Effets de la variation du pH sur la production de Kératinases par la souche.

3.5- Effets de la variation du volume d'inoculum sur la production de Kératinases

L'activité kératinolytique augmente avec l'augmentation du volume d'inoculum, le volume optimal est de 6 mL .

Tableau 10 : Effets de la variation du volume d'inoculum sur la production de Kératinases par la souche locale.

Volume D'inoculum (% , mL)	1	2	3	4	5	6	7
Activité (U/mL)	6	10,3	16,5	18,3	39	67,7	32
pH final	8,44	8,47	8,51	8,61	8,55	8,26	8,12

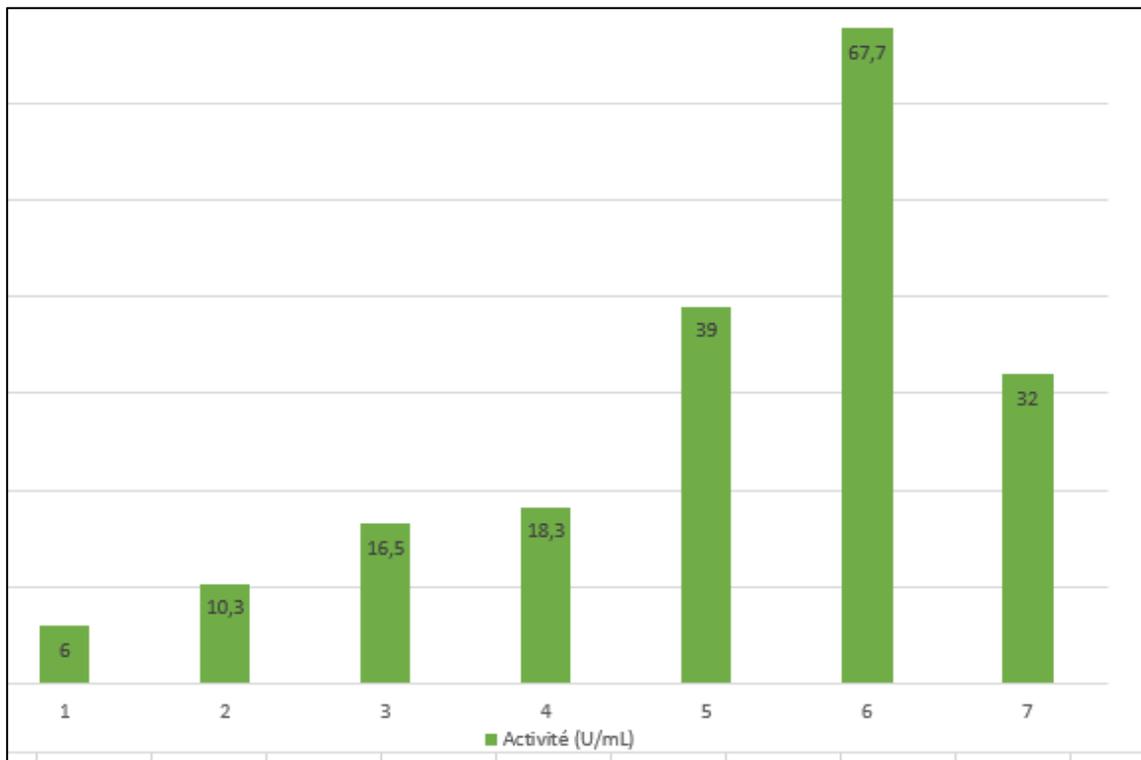


Figure 21 : Effets de la variation du volume d'inoculum sur la production de Kératinases par la souche locale.

3.6- Effets de la variation de la quantité de la source de carbone sur la production de Kératinases

La quantité optimale de farine de plume est de 1g.

Tableau 11 : Effets de la variation de la quantité de la source de carbone sur la production de Kératinases par la souche locale.

Farine de plumes (% ,g)	0.2	0.6	1	1.4	2
Activité (U/mL)	26	29	67,7	17	16,1
pH final	8,38	8,36	8,26	8,12	7,9

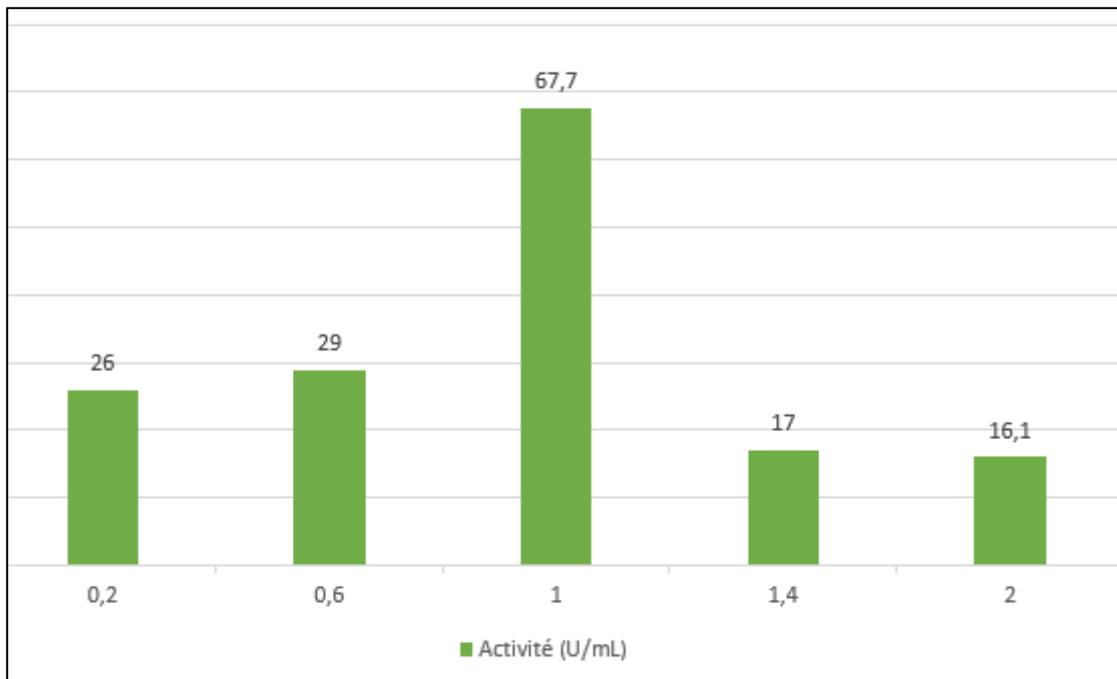


Figure 22 : Effets de la variation de la quantité de source de carbone sur la production de Kératinases par la souche locale.

Discussion

Une énorme quantité de déchets de plumes et de cuir sont générés chaque année comme sous-produit de la volaille en raison de la consommation de viande continue dans le monde entier. Globalement plus de 5 millions de tonnes de plumes sont produits chaque année à partir d'usines de transformation de la volaille comme déchet. Les plumes contiennent une teneur très élevée en protéines kératiniques d'environ 90 %. Les kératines sont biologiquement insolubles, récalcitrantes et biochimiquement rigides qui sont résistant à la dégradation par la plupart des protéolytiques. Néanmoins une approche microbienne et biotechnologique en utilisant la kératinase est une alternative prometteuse à la valorisation de la kératine [51] [52] [53].

Les résultats de notre présent travail ont révélé par rapport aux objectifs assignés :

En relation avec l'extraction de la kératine la présente étude le rendement en utilisant le DMSO est de 14%.

Yimei *et al* ont montré, qu'un rendement très élevé d'environ 75% de kératine et un taux de dissolution des plumes de canard d'environ 96,7% ont été obtenus en utilisant le 1-Butyl-3-méthylimidazolium chloride [Bmim] [Cl] comme solvant avec le sulfite de sodium et l'eau comme additifs pour faciliter la dissolution [54]. La kératine est une molécule insoluble dans la plupart

des solvants. A cet effet, plusieurs méthodes d'extraction par le clivage des liaisons disulfures intra et intermoléculaires et des liaisons hydrogènes ont été développées telle que : réduction, oxydation, sulfitolyse et traitements chimiques et / ou physiques.

Un processus d'explosion de vapeur suivi d'une extraction alcaline a été appliqué pour extraire la kératine des plumes de canard. Une explosion des plumes de canard à différentes pressions de vapeur (1,4 à 2,0 MPa) pendant 0,5 à 5 min, puis une extraction alcaline a été réalisée dans les conditions suivantes : 0,4% NaOH (solvant /matériau 20/1 (v / p), pendant 1 h à 25 °C. Un taux d'extraction des plumes de 65,78% et un rendement en kératine de 42,78% ont été obtenus pour (1,6 MPa, 1 min) [55].

Un rendement de 62 % a été obtenu en utilisant la méthode de sulfitolyse pour extraire la kératine des plumes dans les conditions suivantes : les plumes ont été mélangées avec du sulfate de sodium (10g/L) en présence du gaz N₂, puis incubées pendant 24h à 30 °C dans un agitateur incubateur réglé à une vitesse de 130 tr/min [56].

La différence de rendement peut s'expliquer par justement la différence des méthodes utilisées.

Quant à l'optimisation des conditions de culture pour la production des Kératinases ; La souche CP22 a gardé sa capacité d'hydrolyser la kératine en milieu de fermentation liquide, contenant la farine de plume de volailles comme seule source de carbone. En effet, au bout du 3ème jour de culture, il s'est avéré que la souche développe une activité kératinolytique importante, atteignant, 67.7 U/ml.

Il faut noter que la comparaison des performances de dégradation de la kératine avec d'autres recherches est difficile, en raison de la multitude de méthodes de dosage et de substrats spécifiques utilisés.

Quant à la détermination des conditions physicochimiques (pH et température) optimales de l'activité de l'enzyme produite par la souche CP22, a montré que le pH optimal se situe à pH=8. Ce résultat est conforme aux études réalisées auparavant par (Farag et Hassan, 2004 ; Kim, 2007 ; Kumar *et al.* 2008).

Il est à noter que généralement les Kératinases sont décrites comme des enzymes alcalines ou neutres avec un optimum de pH compris entre 7,5 et 9 [57].

Pour l'étude de l'effet de température sur l'activité kératinolytique, la température optimale est de 37°C.

Les kératinases en provenance d'autres champignons ou bactéries tels que *Trichoderma atroviride*. [58] ,*Doratomyces microsporus* [59], *Aspergillus oryzae*,[60], *Bacillus licheniformis* [61] ont montrées des températures optimales de 50°C.

La température optimale des Kératinases varie entre 30 et 80°C [62].

L'activité enzymatique développée par la souche CP22 est bien classée en comparaison à d'autres travaux.

En effet, elle est supérieure à *Chrysosporium tropicum* NFCCI 1884 (24.69±2.11 U/ml), *Fusarium culmorum* GPCK 3204 (22.91±0.86 U/ml) *Alternaria alternata* NFCCI 1878 (20.8±3.69) d'*Acremonium chrysogenum* NFCCI 1883 (45.11±1.59 U/ml) *Scopulariopsis stercoraria* NFCCI 1885 (34.6±3.69 U/ml) [63].

Et inférieure à *Bacillus subtilis* KD-N2 (125 U/ml) [64].

La farine de plumes se révèle donc être une source adéquate et bon marché pour la production de Kératinases.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

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

Dans ce contexte, le présent travail a pour principaux objectifs :

- Faire une extraction de kératine à partir de farine de plumes de volailles.
- Optimisation du milieu de production de kératinase par une souche locale.

L'extraction de la kératine en utilisant le DMSO et l'acétone a donné un rendement de 14%, jugé faible par rapport à d'autres techniques d'extraction qui peuvent arriver à 75%.

L'étude de l'activité enzymatique d'une souche isolée à partir d'un compostage de plumes de volailles a permis de sélectionner une souche CP22 performante développant une activité kératolytique qui a atteint 67,7 U/ml au bout du 3^{ème} jour d'incubation dans un milieu optimum composé de :

0,2g d'extrait de soja, 1g de NH₄Cl, 6mL d'inoculum et 1g de farine de plume à pH= 8 et une température de 37°C.

Il est important de signaler qu'en comparaison aux études de la littérature, la souche CP22 est considérée performante dans la production de la kératinase.

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

- Déterminer et optimiser d'autres facteurs nutritionnels et culturels tels que : les sources d'ions métalliques, agitation et aération, variation de cosubstrat.
- Purification et caractérisation de la kératinase ou des Kératinases produites par la souche CP22
 - L'étude approfondit de l'enzyme et son mécanisme d'action.
 - L'étude de la production de l'enzyme à l'échelle industrielle, dans les différents domaines.

Références Bibliographiques :

- [1] A. PURANDARADAS, T. SILAMBARASAN, K. MURUGAN, R. BABUJANARTHANAM, ARUMUGAM D. GANDHIA, KAYAL V. DHANDAPANI, D. ANBUMANI, P. KAVITHA. (2018). Development and quantification of biodiesel production from chicken feather meal as a cost-effective feedstock by using green technology. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 14:133-139.
- [2] Q. LI. (2019). Progress in Microbial Degradation of Feather Waste. *Frontiers in Microbiology*. 10:1-15.
- [3] GUPTA, R; RAMANI, P. *Appl Microbiol Biotechnol. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview*. 2006. 70.p21-33
- [4] BOUCHERBA N. (2014) Valorisation des résidus agro-industriels ; Thèse de Doctorat, Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira, Bejaïa. Pp 11-13, 17.
- [5] HAINES, Roland J. *Ferme à la fourchette une stratégie intégrale pour la salubrité des viandes en ontario*. Toronto, Imprimeur de la Reine pour l'Ontario, 2004. 654p. ISBN : 0- 7794- 6428- 1.
- [6] BOUCHERBA N. (2014) Valorisation des résidus agro-industriels ; Thèse de Doctorat, Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira, Bejaïa. Pp 11-13, 17.
- [7] SAVARY B., VINCENT R., RODRIGUEZ C., CHOLLOT A. (2004) Caractérisation des risques chimiques professionnels de la filière de gestion des déchets : Analyse à priori des risques potentiels ; Note Scientifique et Technique (NST) ; p 60.
- [8] N. REDDY, M.S. SANTOSH. (2016). Recovery and Applications of Feather Proteins. *Protein Byproducts Transformation from Environmental Burden Into Value-Added Products*. Gurpreet S. Dhillon (Eds). Academic press. 255-274.
- [9] A. DAWSON. (2015). Avian Molting. *Sturkie's Avian Physiology (Sixth Edition)*. Colin G. Scanes (Eds). Academic press. Springer. 907-917.
- [10] ELENA P. RAMOS, HERNÁNDEZ M. DJ, Q. CRUZ. C. PÉREZ (2017). Degradation of Chicken Feathers: A Review. *Indian Journal of Biotechnology*. 13(6):1-24.

[11] C. FOTH. (2020). Introduction to the Morphology, Development, and Ecology of Feathers. *The Evolution of Feathers: From Their Origin to the Present*. Christian Foth, Oliver W. M. Rauhut. (Eds). Springer. 1-11.

[12] CYNTHIA G. FLORES-HERNANDEZ, B. MURILLO-SEGOVIA, ANA L. MARTINEZ-HERNANDEZ. C. VELASCO-SANTOS. (2017). Keratin as Renewable Material to Develop Polymer Composites: Natural and Synthetic Matrices. *Handbook of Composites from Renewable Materials: Polymeric Composites*. Vijay K. Thakur, Manju K. Thakur, Michael R. Kessler (Eds). Wiley. 6:1-29.

[13] C. FOTH. (2020). Introduction to the Morphology, Development, and Ecology of Feathers. *The Evolution of Feathers: From Their Origin to the Present*. Christian Foth, Oliver W. M. Rauhut. (Eds). Springer. 1-11

[14] MICHAEL J. BENTON, D. DHOUILLY, B. JIANG, M. MCNAMARA. (2019). The Early Origin of Feathers. *Trends in Ecology & Evolution*. 34(9):856-869.

[15] TESHAY, B. SITHOL, D. RAMJUGERNATH, V. CHUNILALL. (2017). Valorisation of chicken feathers: Characterisation of chemical properties. *Waste Management*. 68: 626-635.

[16] TESHAY, B. SITHOL, D. RAMJUGERNATH, V. CHUNILALL. (2017). Valorisation of chicken feathers: Characterisation of chemical properties. *Waste Management*. 68: 626-635.

[17] T. TESHAYEAB, B. SITHOLEAC, D. RAMJUGERNATHA, T. MOKHOTHUD. (2018). Valorisation of chicken feathers: Characterisation of thermal, mechanical and electrical properties. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 9: 27-34.

[18] T. TESHAYE, B. SITHOLE, D. RAMJUGERNATH. (2017). Valorisation of chicken feathers: a review on recycling and recovery route—current status and future prospects. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 19(10):2363-2378.

[19] REGINA J. PATINVOH, E. FEUK-LAGERSTEDT, M. LUNDIN, I. S. HORVÁTH, MOHAMMAD J. TAHERZADEH. (2016). Biological Pretreatment of Chicken Feather and

Biogas Production from Total Broth. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 180(7):1401-1415.

[20] N. REDDY. (2015). Non-food industrial applications of poultry feathers. *Waste Management*. 45:91-107.

[21] S. OZDEMIR, K. YETILMEZSOY. (2020). A mini literature review on sustainable management of poultry abattoir wastes. *Journal of Material Cycles and Waste Management*. 22(1):11-21.

[22] CYNTHIA G. FLORES-HERNANDEZ, B. MURILLO-SEGOVIA, ANA L. MARTINEZ-HERNANDEZ. C. VELASCO-SANTOS. (2017). Keratin as Renewable Material to Develop Polymer Composites: Natural and Synthetic Matrices. *Handbook of Composites from Renewable Materials: Polymeric Composites*. Vijay K. Thakur, Manju K. Thakur, Michael R. Kessler (Eds). Wiley. 6:1-29.

[23] F. POURJAVAHARI, SAEIDEH O. POUR, OLIVER A.H. JONES, PETER M. SMOOKER, R. BRKLJAČA, F. SHERKAT, EWAN W. BLANCH, A. GUPTA, ROBERT A. SHANKS. (2019). Extraction of keratin from waste chicken feathers using sodium sulfide and L-cysteine. *Process Biochemistry*. 82:205-214.

[24] HYEON S. JIN, SEON Y. PARK, K. KIM, YONG J. LEE, GAE W NAM, NAM J. KANG, DONG W. LEE. (2017). Development of a keratinase activity assay using recombinant chicken feather keratin substrates. *Plos one*.12(2):1-18.

[25] B. WANG, W. YANG, J. MCKITTRICK, MARC A. MEYERS. (2016). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*. 76: 229-318.

[26] A. SHAVANDI, TIAGO H. SILVA, ADNAN A BEKHIT, A. BEKHIT. (2017). Dissolution, Extraction and Biomedical Application of Keratin. *Biomaterials Science*. 5(9): 1699-1735.

- [27] HERMANN H. BRAGULLA, DOMINIQUE G. HOMBERGER. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*. 214(4): 516-559.
- [28] S. SHARMA, A. GUPTA, A. KUMAR. (2019). Keratin: an introduction. *Keratin as a Protein Biopolymer: Extraction from Waste Biomass and Applications*. S. Sharma, A. Kumar (Eds). Springer.1-18.
- [29] M. RAJABI, MOHAMMAD A. ALI, M. MCCONNELL, J. CABRAL. (2020). Keratinous materials: Structures and functions in biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*. 110:1-22.
- [30] BASMA Y. ALASHWAL, MOHAMED S. BALA, A. GUPTA, S. SHARMA, P. MISHRA. (2020). Improved properties of keratin-based bioplastic film blended with microcrystalline cellulose: A comparative analysis. *Journal of King Saud University – Science*.32(1):853-857.
- [31] L. GUOA, L. LU, M. YIN, R. YANG, Z. ZHANG, W. ZHAOA, (2020). Valorization of refractory keratinous waste using a new and sustainable bio-catalysis, *Chemical Engineering Journal*. 397:1-11.
- [32] S. SHARMA, A. GUPTA. (2016). Sustainable Management of Keratin Waste Biomass: Applications and Future Perspectives. *Brazilian Archives of biology and technology*. 59:1-14.
- [33] N. REDDY. (2017). Miscellaneous Applications. *Keratin-based Biomaterials and Bioproducts*. N. Reddy (Eds). Smithers. 153-167.
- [34] P. MOKREJS, J. PAVLACKOVA, M. HUTTA, P. EGNER, (2017). The cosmetic and dermatological potential of keratin hydrolysate. *Journal of Cosmetic Dermatology*.16(14):1-7.
- [35] S. SHARMA, A. GUPTA, SYED M. SAUFI. GEK K. CHUA, DOO H. KIM, B. MISTRY. G. SHARMA. (2017). Characterization of keratin microparticles from feather biomass with potent antioxidant and anticancer activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 104(Pt A):189- 196.

- [36] T. POSATI, D. GIURI, M. NOCCHETTI, A. SAGNELLA, M. GARIBOLDI, C. FERRONI, G. SOTGIU, G. VARCHI, R. ZAMBONI, A. ALUIGI. (2018). Keratin-hydroxycitric acid hybrid films for drug delivery applications. *European Polymer Journal*. 105:177-185.
- [37] KIM, J.D., (2007) Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading Fungus, *Aspergillus flavus* Strain K-03. *Mycobiology*,. **35**(4): p. 219-25.
- [38] KIM, J.D (2005)., Immobilization of Keratinase from *Aspergillus flavus* K-03 for Degradation of Feather Keratin. *Mycobiology*,. **33**(2): p. 121-3.
- [39] SAHA (2009), Subhasish. Exploration of Keratinolytic Actinobacteria for the Bioconversion of Poultry Feather Waste into Poultry Feed Supplement. Thèse de doctorat en microbiologie. Inde : Bharathiadasan university. . 142p.
- [40] GUPTA, R ; RAMNANI, P (2006). *Appl Microbiol Biotechnol*. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. 70. p21-33.
- [41] BOCKLE, B; GALUNSKY, B ;MULLER, R. (1995) *Appl Environ Microbiol*. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530.. 61. p3705– 3710
- [42] SELVAM, K; VISHNUPRIYA, B.(2012) *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. Biochemical and Molecular Characterization of Microbial Keratinase and Its Remarkable Applications. . 3. 2. P267-275.
- [43] BRANDELLI, A; DAROIT, DJ; RIFFEL, A. (2009) *Appl Microbiol Biotechnol*. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. 85. p1735- 1750.

[44] GOUSTEROVA, A; BRAIKOVA, D; GOSHEV, I; CHRISTOV, P; TISHINOV, K; VASILEVA-TONKOVA, E; HAERTLE, T; NEDKOV, P.(2005) Letters in Applied Microbiology. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. 40. p335-340

[45] WANG, X; PARSONS, CM.(1997) Poultry Sci. Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meals.. 76. p491-496

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

[47] HADAS, A ; KAUTSKY, L(1994). Fertil Res. Feather meal, a semi slow release nitrogen fertilizer for organic farming.1994. 38. p165-170

[48] BRUTT, EH; ICHIDA, JM.(1999) Keratinase produced by *Bacillus licheniformis*. US Patent 5,877,000

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

[50] VIGNARDETA, C; GUILLAUME, YC; MICHEL, L; FRIEDRICH, J; MILLET, J. (2001) International Journal of Pharmaceutics. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. 224. p115-122.

[51] POOLE AJ, CHURCH JS, HUSON MG (2009) Environmentally sustainable fibers from regenerated protein. *Biomacromol* 10:1–8. doi:10.1021/bm8010648.

[52] MARTINEZ-HERNANDEZ AL, VELASCO-SANTOS CV (2012) Keratin fibers from chicken feathers: structure and advances in polymer composites. In: Dullaart R, Mousquès J (eds)

Keratin: structure, properties and applications. Nova Science Publishers, New York City, pp 149–211

[53] MEHTA RS, JHOLAPARA RJ, SAWANT CS (2014) Isolation of a novel feather-degrading bacterium and optimization of its cultural conditions for enzyme production. *Int J Pharm Pharm Sci* 6(1):194–201

[54] Y. JI, J. CHEN, J. LV, Z. LI, L. XING, S. DING. (2014). Extraction of keratin with ionic liquids from poultry feather. *Separation and Purification Technology*. 132: 577-583.

[55] Y. ZHANG, W. ZHAO, R. YANG. (2015). Steam Flash Explosion Assisted Dissolution of Keratin from Feathers. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 3(9): 2036-2042.

[56] A. SHAVANDI, TIAGO H. SILVA, ADNAN A BEKHIT, A. BEKHIT. (2017). Dissolution, Extraction and Biomedical Application of Keratin. *Biomaterials Science*. 5(9): 1699-1735.

[57] SELVAM, K; VISHNUPRIYA, B (2012). *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. Biochemical and Molecular Characterization of Microbial Keratinase and Its Remarkable Applications. 3. 2. P267-275.

[58] WEARY, PE; CANBY, CM. J (1969) *Invest Dermatol*. Further observation on the keratinolytic activity of *Trichophyton schoenleini* and *T. rubrum*. 53. p58-63.

[59] EVANS, EGV; HOSE, H (1975). *Sabouraudia* . In vitro degradation of human hair by *Hendersonula toruloidea*.. 13. p323-328.

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

[61] KUMAR, JM; LAKSHMI, A; SANGEETHA RANI, V; SAILAJA, B (2012). *Journal of research in biology*. Isolation and characterization of feather degrading bacteria from poultry waste. 2. 7. p676-682.

[62] SELVAM, K; VISHNUPRIYA, B (2012). International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. Biochemical and Molecular Characterization of Microbial Keratinase and Its Remarkable Applications. 3. 2. P267-275.

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

[64] CAI, C., ZHENG, X. (2009) Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. vol. 36 n°7, p. 875–883.

ANNEXES

Annexe 01 : Matériel et produits utilisés.

Matériels :

Flacons 250 mL

Coton cardé

Aluminium

Autoclave

Anse stérile

Bec de flambage

Incubateur agitateur

Centrifugeuse type SIGMA

Tubes à essai

pH mètre type HANNA

Thermomètre

Ciseaux

Evaporateur rotatif HEIDOLPH

Spectromètre UV/Visible.

Erlenmeyers

Agitateur magnétique

Balance numérique

Boîtes de pétrie

Pipettes

Micropipette

Produits chimiques et non chimiques :

Peptone

Extrait de levure

Extrait de soja

Extrait de Viande

Farine de Plumes

Acétone

Ethanol

DMSO

HCl

NaOH

NaCl

CO(NH₄)₂

K₂HPO₄

KH₂PO₄

MgCl₂

(NH₄)₂SO₄

NH₄Cl

KNO₃

NH₄NO₃

Tris-HCl 0.05M

TCA 0.4M

Annexe 02 : Préparation des solutions.

Solution tampon tris HCl (0,05 M) :

Trishydroxyméthylaminométhane (tris) présente une masse molaire de 121,14 g/mol a servi pour la préparation de 250 ml du tampon tris HCl à 0,05 M, par le mélange de 1,5 g de tris dans 250 ml d'eau distillé et ajusté avec l'acide chlorhydrique HCl jusqu'à l'obtention d'un pH 8.

Solution hydroxyde de sodium NaOH à (0,05 M) :

Pour la préparation de 200 ml d'hydroxyde de sodium qui présent une masse molaire de 40 g/mol, 0,4 g du NaOH sont dissouts dans 200 ml d'eau distillé suivi d'une agitation vigoureuse. Le pH est 12.

Solution hydroxyde de sodium Noah à (1N) :

On pèse 4g de NaOH (40g /mol), On le met dans un erlen Mayer contient 50 ml de l'eau distillée, on mélange un bon moment puis on remplit jusqu'à 100 ml.

Solution acide chlorhydrique à (1N) :

On prend 8.28 ml du HCl (37%) et on dilue avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 ml de la solution acide à 1N.

Solution d'acide trichloracétique TCA (0,4 M) :

L'acide trichloracétique (TCA) avec une mass molaire de 163,39 g/mol dont 16,338 Sont dissouts dans 250 ml d'eau distillé et mélangés vigoureusement.