



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE SAAD DAHLEB – BLIDA 1**

**Faculté des sciences  
Département chimie**

***MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLOME DE MASTER EN CHIMIE***

*Spécialité : chimie des produits naturels*

**Présenté par**

**DOUIDI Aya**

**DEHRI Hadjer**

Thème

**Criblage et sélection des bactéries kératinolytique  
isolées d'algue rouge : Etude chimique de la  
biomolécule cible de nature protéinique.**

**Devant le jury composé de**

**M. EL HATTAB M.**

**USDB-1**

**Président**

**M. ZAHI. M.R.**

**USDB-1**

**Examineur**

**M. BADIS A.**

**USDB-1**

**Promoteur**

**Promotion : 2020**

# *Remerciement*

Nos remerciements vont avant tout, à DIEU tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donné durant toutes ces longues années d'études afin que nous puissions arriver à ce stade. Et enchallah aller encore plus loin dans un accomplissement personnel et professionnel.

Nous tenons aussi à présenter nos sincères remerciements à notre encadreur le Pr.BADIS A. et a Mr.EDDOUAOUDA K. pour la confiance qu'il nous on accordée en Acceptant cet encadrement, Pour leur disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire, pour leur aide,, et surtout pour leur patience dans la correction de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont aux membres du jury ,pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail en acceptant de l'examiner et d'enrichir le débat par leurs propositions.

Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire : nos amis pour leurs conseils, nos proches pour leur soutien.

# *Dédicaces*

*Cette thèse est dédiée à :*

*Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études.*

*A ma grande sœur pour son affection et son soutien*

*A mes beaux frères pour leur aide, leur générosité et leur disponibilité*

*A mon cher mari pour son soutien avec de toutes ses forces et ses encouragements, jour et nuit et il n'a pas laissé mes mains un instant.*

*A mes petits anges neveux et nièces*

*Et à toute ma famille maternelle et paternelle*

*A mes très chères amies en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de succès et de bonheur*

*A mon chère amie aussi mon binôme **aya** qui a supporté mes crises de stress, qui m'a apporté son aide à chaque instant, et avec qui j'ai partagé mes plus beaux éclats de rire, tu es ma meilleure*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci*

***Hadjer***

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail à mes très chers parents, rien au monde ne pourrait compenser tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et bien être, afin que je puisse poursuivre mes études et réaliser mes objectifs. Mon plus vif espoir est de vous voir à mes cotés le plus long possible. Je vous dois tout, veuillez trouver dans ce modeste travail, le témoignage de mes profonds sentiments. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

*A ma chère sœur MOUNA et mon petit frère MONCEF  
qui m'ont donné, l'amour et le courage de surmonter toutes les épreuves. merci de m'avoir soutenu dans le pire et dans le bon, je vous souhaite une vie plein de bonheur et que dieu vous protège et vous garde .*

*A la mémoire de mon GRAND-PERE  
J'aurais tant aimé que tu sois présents, que Dieu ait ton âmes dans sa sainte miséricorde*

*A ma binôme et mon amie HADJER  
merci pour les année et les bon moments qu'on a passé ensemble, pour ton aide et ton bon humour, et pour ton soutien dans les moment difficile ; bon courage pour la suite je te souhaite que du bonheur.*

*A toute ma famille et A tous ceux que j'aime.*

**AYA**

## المخلص

كل عام، يتم التخلص من ملايين الأطنان من نفايات الريش من قِبل صناعات الدواجن. أما الريش فيحرق أو يُملأ بالأراضي، مما يؤدي إلى استهلاك الطاقة والتلوث البيئي. ويمثل الريش 5-7% من إجمالي وزن الدجاج، وأصبح أحد الملوثات الرئيسية بسبب طبيعته الصعبة وتتكون الريشة، التي لا يمكن ذلها والتي يصعب تحللها، من 90% من الكراتين. ونتيجة لذلك، يمكن أن يكون مصدرا جيدا للبيبتيدات والأحماض الأمينية والمعادن لاستخدامها في مختلف المجالات الصناعية والبيئية.

وتستهلك الأساليب التقليدية لتدهور أداء الريش كمية كبيرة من الطاقة وتقلل من الجودة الإجمالية للبروتينات. ومع ذلك، فإن تدهور الكراتين من قبل بكتيريا الكراتين يمكن أن يكون حلا فعالا لتحسين الريش في المنتجات الغنية بالأحماض الأمينية الأساسية.

وفي هذا السياق، نركز على دراسة شاملة تتناول: الطحالب البحرية، والبكتريا البحرية المتصلة بالطحالب، وأساليب وتقنيات عزل السلالات البكتيرية الكراتينية، وتحسين إنتاج ووصف إنزيمات الكراتينيك (أو الكيراتيناز) وتطبيقاتها الصناعية والبيئية. وقد استكملت هذه الدراسة بتلخيص عام للعمل السابق.

**الكلمات المفتاحية:** البكتيريا البحرية - الفرز - نشاط التحلل الكيراتيني - الجزيء الحيوي - الدراسة الكيميائية

## **Abstract**

Annually, millions of tons of feather waste are discarded by the poultry industries. The feathers are land filled or incinerated, resulting in energy consumption and environmental pollution. Feathers consists 5-7% of the total weight of chickens and have become one of the main pollutants due to their recalcitrant. Feather, insoluble and hardly degradable, consists of 90% keratin. Therefore, it can be a good source of peptides, amino acids and minerals for use in various industrial and environmental fields.

Traditional methods of feather degradation consume a large amount of energy and reduce the overall quality of protein. However, the degradation of keratin by keratinolytic bacteria can represent an effective solution for the enhancement of feathers in products rich in essential amino acids.

In this context, we are focusing on an in-depth study dealing with: marine algae, marine bacteria linked to algae, methods and techniques for the isolation of keratinolytic bacterial strains, optimization of the production and characterization of keratinolytic enzymes (or keratinases) and their industrial and environmental applications. This study was completed by a general synthesis of previous work.

**Key words:** Marine bacteria - Screening - Keratinolytic activity - Biomolecule – Chemical study.

## Résumé

Chaque année, des millions de tonnes de déchets de plumes sont rejetés par les industries avicoles. Les plumes sont mises en décharge ou incinérées, ce qui entraîne une consommation d'énergie et une pollution de l'environnement. Les plumes représentent 5 à 7% du poids total des poulets et sont devenues l'un des principaux polluants en raison de leur nature récalcitrante. La plume, insoluble et difficilement dégradable, est constituée de 90% de kératine. Par conséquent, elle peut être une bonne source de peptides, d'acides aminés et de minéraux à utiliser dans divers domaines industriel et environnemental.

Les méthodes traditionnelles de dégradation des plumes consomment une grande quantité d'énergie et réduisent la qualité globale des protéines. Cependant, la dégradation de la kératine par les bactéries kératinolytiques peut représenter une solution efficace pour la valorisation des plumes en produits riches en acides aminés essentiels.

Dans ce contexte, nous nous focalisons sur une étude approfondie traitant: les algues marines, les bactéries marines liées aux algues, les méthodes et les techniques d'isolement des souches bactériennes kératinolytiques, l'optimisation de la production et la caractérisation des enzymes kératinolytiques (ou kératinases) et leurs applications industrielle et environnementale. Cette étude est achevée par une discussion générale sur les travaux antérieurs.

**Mots clés :** Bactéries marines – Criblage – Activité kératinolytique – Biomolécule – Etude chimique .

---

---

## Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction général.....	01

### **Chapitre I : les microorganismes marins kératinolytiques (les bactéries marines)**

I.1 Généralité sur les algues marines.....	03
I.1.1 Définition et caractérisation.....	03
I.1.2. Classification des algues marines.....	04
I.1.2.1. Les algues vertes (Chlorophycées).....	04
I.1.2.2. Les algues brunes (Phéophycées).....	05
I.1.2.3. Les algues rouges (Rhodophycées).....	05
I.1.2.4. Les Cyanobactéries.....	07
I.1.3. Composition chimique.....	07
I.1.4. Facteur de répartition des algues.....	08
I.2. Généralité sur les bactéries marines.....	09
I.2.1. Définition.....	09
I.2.2. Mode de vie des bactéries aquatiques.....	09
I.2.2.1. Les différents types trophiques.....	09
I.2.2.2. Entre attachement et vie sous forme libre.....	10
I.2.2.3. Cohabitation entre bactéries et autres organismes.....	11
I.3. Relation algue-bactérie.....	12
I.3.1. Interaction algue-bactérie.....	12
I.3.2. Intérêt des bactéries associées aux algues.....	14



---

---

## Chapitre II : les protéases kératinolytiques

II.1. Les protéases .....	15
II.1. Définition.....	15
II.1.2. Origines des protéases.....	16
II.1.2.a. Protéases végétales.....	16
II.1.2.b. Protéases animales.....	17
II.1.2.c. Protéases microbiennes.....	17
II.1.3. Classification des protéases.....	17
II.1.3.1 Selon la réaction protéolytique.....	18
II.1.3.1.a. Exopeptidases.....	18
II.1.3.1.b. Endopeptidases.....	18
II.1.3.2. Selon le mécanisme catalytique.....	19
II.1.3.3. Selon la relation structurale.....	19
II.2. Les substrats kératiniques.....	20
II.2.1.Définition.....	20
II.2.2. Structure et classification des kératine.....	20
II.2.3. Sources kératinolytiques.....	21
II.2.3.1. Les plumes .....	22
II.2.3.2. Les cheveux.....	23
II.2.3.3. La laine.....	23
II.2.3.4. Les cornes.....	23
II.2.4.Valorisation des déchets de plume.....	23
II.3. Kératinase.....	24
II.3.1. Définition.....	24
II.3.2. Propriétés des kératinases.....	24

---

II.3.2.1. pH et température.....	24
II.3.2.2. Poids moléculaire.....	24
II.3.2.3. Spécificités du substrat.....	24
II.3.3. Mode d'action des kératinases sur la Kératine.....	25
II.3.4. Sources.....	26
II.3.4.1. Les champignons.....	26
II.3.4.2. Les bactéries.....	27
II.3.5. Applications des kératinases.....	28
II.3.5.1. Traitement des déchets kératiniques.....	29
II.3.5.1.a. Production de farine de plumes pour alimentation animale.....	29
II.3.5.2.b. Production de farine de plumes pour engrais.....	29
II.3.5.2. Hydrolysat kératinique pour la production de biogaz.....	30
II.3.5.3. Fabrication de bioplastiques.....	30
II.3.5.4. Ajout de kératinases aux détergents.....	30
II.5.5.5. Application des kératinases dans l'industrie du cuir et du textile.....	31
II.3.5.6. Applications pharmaceutiques des kératinases.....	31
II.3.5.6.a. Traitement des cors et des callosités par les kératinases.....	31
II.3.5.6.b. Traitement de l'acné.....	31

### **Chapitre III : Discussion générale**

III.1.Facteurs affectant la production de kératinase.....	33
III.2.Caractérisation des kératinases.....	38
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>42</b>
<b>Références.....</b>	<b>44</b>

## Liste des abréviations

**%** : pourcentage

**°C** : degré Celsius

**ATP**: adénosine triphosphate

**CO<sub>2</sub>**: dioxyde de Carbone

**g** : gramme

**h** : heure

**j** : jour

**kDa** : kilo Dalton

**Kg** : kilogramme

**l** : litre

**L.B** : luria bertani

**m** : mètre

**mg** : milligramme

**min** : minute

**ml** : millilitre

**MO**: Matière Organique

**MOD:** Matière Organique Dissoute

**MOP:** Matière Organique Particulaire

**N<sub>2</sub> :** diazote

**Na Cl :** chlorure de sodium

**ph :** potentiel hydrogène

**RMN:** résonance magnétique nucléaire

**rpm :** révolution par minute

**SM:** spectroscopie de masse

**tr :** tours

**U :** unité enzymatique

## Liste des figures

<b>Chapitre I :</b> .....	<b>03</b>
<b>Figure 1 :</b> Appareil végétatif des algues marines.....	<b>03</b>
<b>Figure 2:</b> Algue verte ( <i>Codium tomentosum</i> ).....	<b>04</b>
<b>Figure 3 :</b> Algue brune ( <i>Fucus vesiculosus</i> ).....	<b>05</b>
<b>Figure 4:</b> Algue rouge ( <i>Dilsea carnosa</i> ).....	<b>06</b>
<b>Figure 5 :</b> Présentation schématique des styles de vie complexes des bactéries aquatiques sur des surfaces.....	<b>11</b>
<b>Figure 6 :</b> Représentation schématique de surface macro-algues associés par différent colonisées.....	<b>13</b>
<b>Figure 7 :</b> L'ensemble des interactions bénéfiques (en vert) et préjudiciables (en rouge) entre les macro-algues et les bactéries.....	<b>14</b>
<b>Chapitre II :</b> .....	<b>15</b>
<b>Figure 8:</b> Répartition du marché mondial des enzymes.....	<b>15</b>
<b>Figure 9 :</b> Classification des protéases.....	<b>18</b>
<b>Figure 10 :</b> Illustration schématique de la structure de la kératine. Diverses liaisons inter et intramoléculaires (liaisons hydrogène, ioniques, disulfure).....	<b>20</b>
<b>Figure 11 :</b> Hélice droite et les Liaisons hydrogène dans une hélice $\alpha$ .....	<b>21</b>
<b>Figure 12 :</b> Structure en feuillet $\beta$ .....	<b>21</b>
<b>Figure 13 :</b> (a) mode d'action des kératinase sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures, (b) des ponts disulfures entre les résidus de cystéines.....	<b>25</b>
<b>Figure 14 :</b> Stratégie générale suivie dans la production de kératinase.....	<b>26</b>
<b>Figure 15 :</b> Applications multiples des hydrolysats de kératinase et de kératinase dans divers domaines industriels.....	<b>29</b>

**Chapitre III :.....32**

**Figure 16 : Comparaison entre la co-culture (composée de 2 souches) et une culture d'une seule espèce. ....38**

## Liste des tableaux

<b>Chapitre I :</b> .....	<b>03</b>
<b>Tableau 1:</b> Les pigments correspondants aux trois divisions d'algues.....	<b>06</b>
<b>Tableau 2 :</b> les polysaccharides et teneur en protéines de différentes macro-algues.....	<b>08</b>
<b>Chapitre II:</b> .....	<b>15</b>
<b>Tableau 3 :</b> Les principales classes d'enzymes.....	<b>16</b>
<b>Tableau 4 :</b> Classification des protéases.....	<b>19</b>
<b>Tableau 5 :</b> Concentration des acides aminés en gramme par kg de plumes.....	<b>22</b>
<b>Tableau 6 :</b> Liste des micro-organismes dégradant la kératine.....	<b>27</b>
<b>Chapitre III :</b> .....	<b>32</b>
<b>Tableau 7:</b> Optimisation des paramètres affectant la production de kératinase.....	<b>37</b>
<b>Tableau 8 :</b> Diversité des microorganismes kératinolytiques et propriétés de leurs kératinases.....	<b>41</b>

# **Introduction**



---

## Introduction générale

La grande diversité des organismes marins offrent une source riche de plusieurs composés naturels bioactifs avec diverses activités biologiques. L'intérêt de ces organismes et de leurs métabolites se situe dans tous les domaines des biotechnologies. Les molécules identifiées peuvent aussi constituer des modèles moléculaires pour l'élaboration de nouveaux produits, notamment en santé humaine ou pour l'environnement [1, 2].

Par ailleurs, les propriétés bioactives des algues marines qui occupent une place importante dans le milieu marin avec plus de 1200 espèces appartenant à tous les niveaux évolutifs. Beaucoup d'espèces d'algues marines viennent souvent accompagnées de plusieurs souches bactériennes [3]. Les réactions métaboliques impliquant les enzymes permettent aux différentes cellules d'effectuer les fonctions pour lesquelles elles existent.

Les enzymes sont employées dans divers domaines, la raison pour laquelle la valeur du marché global des enzymes connaît une croissance ininterrompue depuis plusieurs années. La majorité des enzymes actuellement utilisées en industrie sont de la classe des hydrolases. Elles peuvent être réparties en deux groupes principaux: les carbohydrases les protéases. Ces derniers représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et utilisé en biotechnologie industrielle. En effet, ce groupe d'hydrolase couvre 65 % du marché mondial des enzymes. Toutefois, la part des protéases dans ce marché revient aux protéases alcalines d'origine microbienne [4].

Les kératinases sont une classe particulière d'enzymes protéolytiques (ou protéases) caractérisées par une capacité de dégradation de substrats de kératine insoluble tels que les ongles, les cheveux, la laine et les plumes. Les microorganismes producteurs de kératinases sont ubiquitaires (algues marines, sédiment, eaux usées, sol pollué, déchets de volailles, ..) [5].

Les plumes sont des co-produits des usines de traitement de la volaille atteignant environ 7 millions de tonnes par an. Elles sont insolubles et difficilement dégradables. La mise en décharge ou l'incinération entraîne une consommation d'énergie et une pollution de l'environnement. La kératine représente environ 90% du poids de la plume représentant environ 5% à 7% du poids du poulet [6].

---

La valorisation de la kératine de plume par les méthodes physiques et chimiques provoque la destruction de la quasi-totalité des acides aminés essentiels, et réduisant ainsi la qualité et la digestibilité de la protéine. Aussi, elles entraînent une dépense de l'énergie et contamination de l'environnement. L'utilisation de kératinases microbiennes pour la dégradation de la kératine des plumes, offre une approche alternative plus viable, plus respectueuse de l'environnement et moins coûteuse, ainsi que la mise à niveau de la valeur nutritive de la farine de plumes [7, 8].

Notre travail se focalise sur trois principaux axes :

1. La première partie est consacrée à l'étude des algues marines (définition, classification, composition chimique, facteurs de répartition,...) et des microorganismes marins notamment les bactéries.
2. La deuxième traite les propriétés des enzymes protéolytiques notamment les kératinases et leurs applications industrielle et environnementale
3. Tandis que la dernière partie est une synthèse de différents travaux antérieurs : la sélection des souches bactériennes productrices des kératinases, optimisation de leur production (nature de substrat et sa concentration, source d'azote, pH, température, salinité, les ions métalliques), caractérisation de kératinases et leurs applications.

Ce travail est achevé par une conclusion générale.

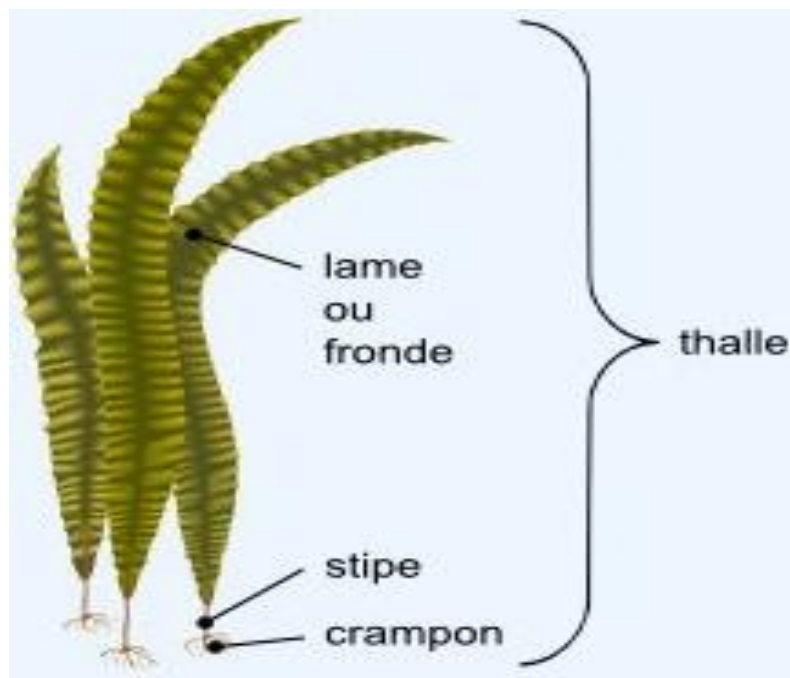
# Chapitre I

**Les micro-organismes marins kératinolytiques**  
**bactéries marines**

## I.1 Généralité sur les algues marines

### I.1.1 Définition et caractérisation

Les Algues forment un groupe des végétaux très divers comprenant des organismes autotrophes (photosynthétiques) multicellulaires mais parfois unicellulaires (vivant seules ou en colonies/chaines) et dont l'appareil végétatif relativement simple est appelé « thalle », elles ont des formes et des dimensions très variables. Certaines sont microscopiques et d'autres, peuvent être de taille macroscopique, mais elles ont toutes des caractères communs (figure 1). Les algues sont développant inféodées aux zones humides (eaux marines, saumâtres, et douces) [9]. Elles peuvent être libres ou fixées sur un support: une roche (algues épilithes), ou une plante (algues épiphytes), ou un animal (algues épibiontes) ou parfois même le sable. Le thalle présente une grande diversité de formes allant de lames simples à des structures plus complexes semblables à des tubes et leur texture est également très variée: certaines algues sont gélifiées, voir de texture cartilagineuse ou spongieuse [10,11].



**Figure 1** : Appareil végétatif des algues marines.

Les cellules des algues possèdent les mêmes éléments de structure que celles des plantes supérieures. Elles ont une paroi cellulaire partiellement cellulosique, des petits noyaux et des

plastés pigmentés ou chromatophores (comportant de la chlorophylle souvent masquée par des pigments surnuméraires qui donnent aux thalles des couleurs) [11].

Elles sont essentiellement aquatiques dans les eaux douces ou marines, et certaines vivent sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes. Les autres algues développent dans les eaux des sources thermales (algues thermophiles). Elles comprennent 20 000 à 30 000 espèces dans le monde, soit 18% du règne végétal) [12]. Les algues sont également des productrices primaires, elles sont capables de convertir l'énergie lumineuse et les éléments nutritifs en composés organiques [13]. Les algues ont aussi la capacité de libérer l'oxygène contenu dans la molécule d'eau grâce au processus de la photosynthèse. Elles contribuent au processus de la respiration des organismes marins.

### **I.1.2. Classification des algues marines**

Les algues sont classées par rapport à sa couleur en quatre grands groupes sont :

#### **I.1.2.1. Les algues vertes (Chlorophycées)**

Elles sont de formes très variées, uni-ou pluricellulaires [14]. Le thalle est de couleur typiquement vert qui correspond à la présence des chlorophylles de type a et b dominant dans les chloroplastes (figure 2) [15]. Toutefois, l'exposition prolongée à l'intensité lumineuses provoque la synthèse de pigments photoprotectants (caroténoïdes), qui confèrent aux thalles des couleurs orangées à jaunâtres et la photosynthèse permet la formation d'amidon, comme les plantes supérieures. Les algues vertes sont présentes dans tous les systèmes aquatiques depuis les milieux marins jusqu'aux eaux douces, Elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant ainsi la vie animale [16, 14].



**Figure 2:** Algue verte (*Codium tomentosum*)

### I.1.2.2. Les algues brunes (Phéophycées)

La couleur brune de ces algues résulte de la dominance du pigment xanthophylle et la fucoxanthine, qui masque les autres pigments chlorophylle a et c, b-carotène [15]. Toutes possèdent une structure pluricellulaire, mais leurs dimensions varient depuis les éléments microscopiques jusqu'aux très grands spécimens. La grande majorité des algues brunes sont marines principalement diversifiées dans les mers froides et tempérées où elles forment les grandes forêts sous marines. Dans les eaux tropicales, elles sont moins nombreuses en espèces, mais représentent les plus grands thalles et forment les populations les plus denses [14, 16].



**Figure 3 :** Algue brune (*Fucus vesiculosus*)

### I.1.2.3. Les algues rouges (Rhodophycées)

Les algues rouges sont organismes eucaryotes pluricellulaires, mais il existe quelques formes unicellulaire du royaume des végétaux, forment un groupe très diversifié [14]. Ces algues doivent leur couleur à la dominance du pigment rouges (Phycoérythrines) et bleus (Phycocyanines) qui viennent masquer la chlorophylle de type a et b-carotène. (Les proportions relatives entre les différents pigments, conjuguées avec la forme du thalle, donnent à la lumière du jour toutes les couleurs imaginables depuis le brun noirâtre jusqu'au

rose très clair en passant par les rouges pourpres et les orangés, la couleur varie en fonction de l'exposition aux rayons lumineux) [15,16].

Il existe environ 8000 espèces d'algues rouges, dont la plupart sont pluricellulaires et marines. Ceux-ci se trouvent dans les zones intertidales et subtidales à des profondeurs allant de 40 jusqu'à 250 mètres, mais il existe quelques formes unicellulaires et quelques unes vivent également en eau douce. Les algues rouges produisent des métabolites actifs plus important par rapport à des autres classes [15].



**Figure 4:** Algue rouge (*Dilsea carnosa*)

**Tableau I :** Les pigments correspondants aux trois divisions d'algues.

Divisions	Pigments	Pigment responsable de la coloration
<b>Chlorophyta</b> algue verte	Chlorophylle a, b ; $\alpha$ , $\beta$ -carotène ; xanthophylles	Chlorophylles
<b>Phaeophyta</b> algue brune	Chlorophylle a, c ; $\beta$ -carotène ; Fucoxanthine et autre Xanthophylles	Fucoxantine et xanthophylles
<b>Rhodophyta</b> algue rouge	B-phycoérythrine, phycothyanine ; chlorophylle a ; $\beta$ -carotène ; xanthophylles	Phycoérythrines et phycothyanine

#### **I.1.2.4. Les Cyanobactéries**

Les cyanobactéries ou les algues bleues montrent de nombreuses caractéristiques communes aux bactéries cependant, ils sont classés avec les algues car ils contiennent de la chlorophylle a et composés apparentés [15]. En dépit de leur nom ancien d'algues bleues, elles sont rarement bleues mais plus souvent rouges, vertes avec des reflets bleutés, violets, bruns, jaunes ou orangés [14]. Morphologiquement, les algues bleues apparaissent dans différents formes comme filamenteuses, coniques, unicellulaires, etc. et la plupart d'entre elles ont une consistance gélatineuse voire gluante en raison des mucilages qu'elles sécrètent [15, 14].

Il existe une espèce des ces algues produisent des nombreux biomolécules différentes et la plupart des composés isolés de cette algue filamenteuse ayant une activité biologique Les microalgues sont caractérisées par leur croissance rapide par division cellulaire (mitose) si les conditions physico-chimiques et nutritives sont favorable [15].

#### **I.1.3. Composition chimique**

Les algues ont des potentialités nutritionnelles très riches, ceci se justifie par: la présence d'une fraction minérale variée et une forte richesse en macroéléments et oligoéléments tels que : le sodium, le calcium, le phosphore et une richesse exceptionnelle en iode[17], par la présence de protéines en générale bien équilibrées en acides aminés et présentes en quantités non négligeables dans certaines espèces, par un contenu vitaminique varié où la plupart des vitamines sont représentées (A, B1, B12, C, D, E, acide folique B9, niacine B3, riboflavine B2, acide pantothénique B5)[17,18], par une fraction lipidique faible mais cependant, dans certaines espèces riche en acides gras polyinsaturés et enfin par leur contenu en fibres ayant des structures variées et originales différentes des fibres des végétaux terrestres.

La composition chimique des macroalgues marines varie suivant plusieurs facteurs: l'espèce, le stade de maturité, l'habitat naturel et les conditions environnementales [17,19].



**Tableau II :** Les polysaccharides et teneur en protéines de différentes macroalgues[20].

<b>Les groupes d'algue</b>	<b>Espèces d'algue</b>	<b>Teneur en protéines (%)</b>	<b>Polysaccharides</b>
Algues vertes	<i>Ulva pertusa</i>	17.5 - 26	polysaccharides complexes
	<i>Ulva rigida</i>	15 - 25	
	<i>Ulva armoricana</i>	18 - 24	
	<i>Ulva intestinalis</i>	10 - 18	
Algues brunes	<i>Fucus vesiculosus</i>	5 - 10	Alginates et fucanes
	<i>Himanthalia elongata</i>	6 - 11	
	<i>Laminaria digitata</i>	8 - 15	
	<i>Saccharina latissima</i>	6 - 11	
	<i>Undaria pinnatifida</i>	11 - 24	
Algues rouges	<i>Chondrus crispus</i>	11 - 20	Carraghénanes et agar
	<i>Palmaria palmata</i>	8 - 35	
	<i>Porphyra umbilicalis</i>	15 - 37	
	<i>Porphyra tenera</i>	33 - 47	

#### **I.1.4. Facteur de répartition des algues**

Les algues sont liées à l'eau et peuvent dès lors s'installer dans tous les types d'habitat se développant en zone humide et éclairés. On peut les retrouver en eau douce, en mer. Les algues étant photosynthétiques, elles sont dépendantes de la présence de la lumière. Aussi, les algues nécessitent d'être fixées à un substrat, par conséquent, la texture, le degré de cohésion et la nature chimique du substrat ont une importance sur la répartition spatiale des espèces [11], D'autres au contraire supportent dans les eaux des sources thermales a des températures élevées (algues thermophiles) [9].

## **I.2. Généralité sur les bactéries marines**

### **I.2.1. Définition**

Les bactéries marines occupent une place importante dans l'écologie marine représentant plus de 98% de la biomasse océanique étaient largement distribuées dans les océans, y compris dans les environnements extrêmes tels que les eaux froides des pôles. [21].

Elles sont des organismes vivants microscopiques procaryotes, c'est-à-dire des organismes unicellulaires dépourvus de noyau et elles possèdent un caractère halophile léger. Deux catégories de bactéries peuvent être distinguées : les Gram- et les Gram+ [21,22]. Alors que dans le milieu marin, les bactéries présentent un taux de croissance optimal pour des températures entre -2 °C à 25 °C et elles sont majoritairement de Gram- [22].

Les bactéries aquatiques vivent tout de leur cycle de vie ou une partie sous forme des cellules libres dans la colonne d'eau ou fixées à un substrat biologique ou non, mobiles ou immobiles, ainsi que sous forme de colonies. Chez certaines espèces, la mobilité des cellules bactériennes est possible par la nage à l'aide d'un ou plusieurs flagelles ou par glissement sur une surface solide [23].

Et présentent des propriétés physiologiques uniques, comme l'hyperthermostabilité, la barophilicité, la tolérance au sel et au pH, et colonisent de nombreux environnements, aussi bien en surface que dans les fonds abyssaux, des zones hydrothermales aux eaux polaires glacées, ainsi possède un rôle essentiel dans le recyclage de la matière organique. Dans de nombreux écosystèmes et en particuliers les écosystèmes aquatiques [21].

### **I.2.2. Mode de vie des bactéries aquatiques**

#### **I.2.2.1. Les différents types trophiques**

Les bactéries sont à l'origine de la très grande diversité des types trophiques qui existent sur la planète. Elles peuvent utiliser l'énergie lumineuse (phototrophie) ou chimique (chimiotrophie). Elles peuvent utiliser du carbone inorganique tel que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) (autotrophie) ou organique (hétérotrophie). Enfin, leur donneur d'électrons (pour la réduction de la source de carbone) peut être d'origine organique (organotrophie) ou inorganique (lithotrophie). La combinaison de ces trois caractéristiques définit le type trophique d'un organisme.

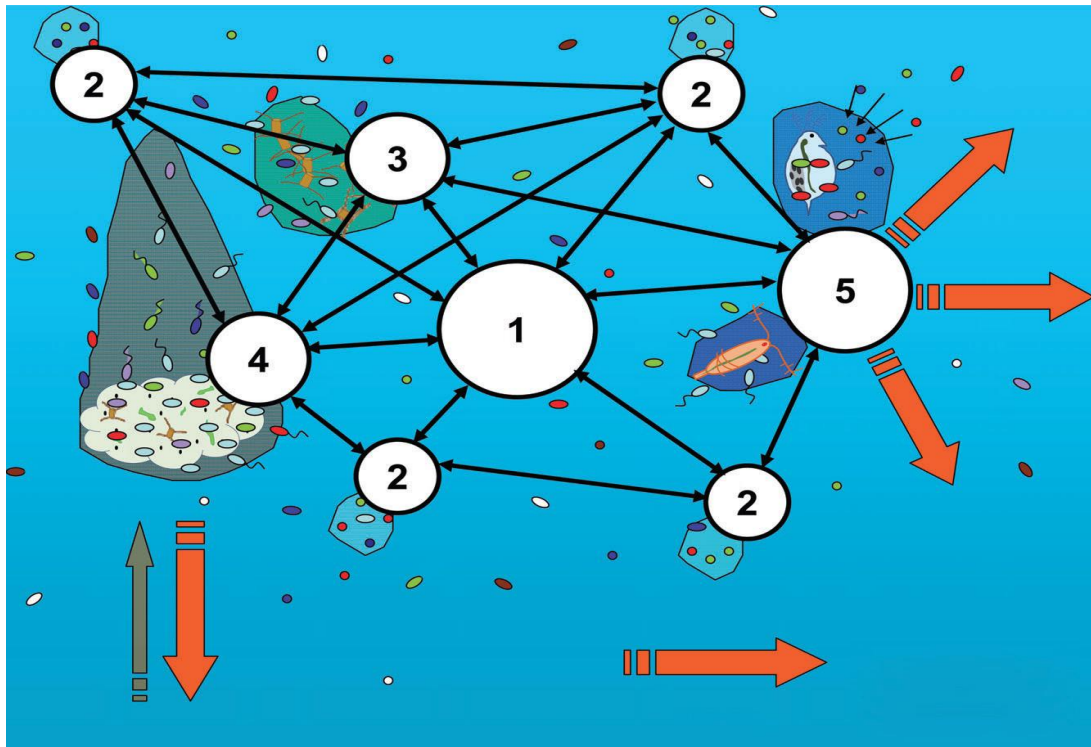
### **I.2.2.2. Entre attachement et vie sous forme libre**

Les interactions entre bactéries, agrégats et organismes de plus grande taille suggèrent que les bactéries ont mis en place des styles de vie complexes qui comprennent :

- Soit une existence exclusivement sous forme libre, avec des bactéries qui sont durant tout leur cycle de vie sous forme de cellules individualisées ;
- Soit une existence exclusivement sous forme associée à des particules vivantes ou non ;
- Soit une alternance entre ces deux styles de vie (parfois libres, parfois associées) [23].

La Figure 5 représente une vision schématique des styles de vie complexes des bactéries aquatiques, qui comprennent les différentes phases suivantes :

- 1) phase de vie sous forme libre des bactéries dans l'eau environnante, qui agit comme un réservoir génétique constamment alimenté par des bactéries détachées des surfaces,
- 2) bactéries associées à des gels et microparticules, qui fournissent des nutriments et des surfaces invisibles pour l'attachement des bactéries,
- 3) regroupement bactérien autour d'organismes photosynthétiques qui apportent de fortes concentrations de matière organique labile permettant une activité et une croissance bactérienne forte,
- 4) bactéries chimiotactiques dans le panache entourant un agrégat et bactéries attachées à la surface d'agrégats. (Les agrégats, tels ceux formés lors d'efflorescences phytoplanctoniques sont typiquement appelés neige marine, apportent de la MOD et de la MOP et véhiculent rapidement les bactéries pélagiques et la MO vers les fonds),
- 5) bactéries associées à des organismes mobiles tels des abris, offrant des conditions de croissance favorable et permettant un transport passif sur de longues distances.



**Figure 5:** présentation schématique des styles de vie complexes des bactéries aquatiques sur des surfaces [23].

### I.2.2.3. Cohabitation entre bactéries et autres organismes

Les bactéries ont colonisé de très nombreux habitats abiotiques mais aussi biotiques. En ce qui concerne les habitats biotiques, de très nombreuses interactions peuvent exister entre les bactéries et les différents organismes colonisés, il est souvent nécessaire qu'elles s'attachent à leur surface. Or l'attachement est souvent corrélé à la mobilité, mais aussi au chimiotactisme ou encore à des mécanismes d'adhésion [24, 25]. En effet, de nombreux mécanismes de mobilité requièrent une surface pour que le mouvement se fasse [26].

Ainsi, il est possible d'imaginer que les bactéries capables de se déplacer sur des surfaces seront également capables d'y rester attachées de façon relativement durable et Potentiellement d'interagir avec ces surfaces qui peuvent être un organisme hôte [12].

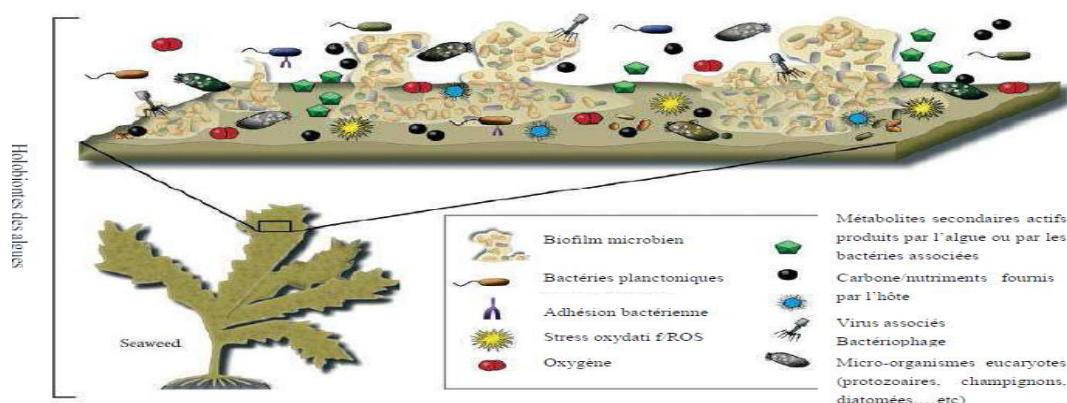
### I.3. Relation algue-bactérie

#### I.3.1. Interaction algue-bactérie

Les espèces ne peuvent pas vivre totalement isolées et subissent des contraintes abiotiques (physiques et chimiques) et biotiques conditionnant leur survie et leur développement. Chaque organisme interagit directement et indirectement avec son environnement [23]. Dans la majorité des cas, les populations bactériennes rencontrées sur les surfaces, et notamment celles des macro-algues, sont spécifiques et évolutives au cours de l'année ou même au cours des différents stades du cycle de vie de l'hôte [27,28]. Ces organismes interagissent entre eux comme une unité fonctionnelle unifiée [29], il existe un ensemble complexe d'interactions chimiques, physiques et biologiques entre l'hôte et son colonisateur microbien. Ces interactions évoluent en fonction de plusieurs facteurs en relation avec l'environnement et avec les espèces elles-mêmes [30].

Ces interactions se font au niveau de la phycosphère qui est chimiquement distincte de l'eau de mer, se caractérise par l'émission de produits extracellulaires algaux influent les organismes environnants notamment les bactéries [31].

Le mode d'action est souvent étudié pour essayer de comprendre les interactions entre bactéries et algues. Soit l'effet d'un organisme sur un autre nécessite un contact et/ou attachement, il s'agit alors d'une action directe. Soit l'effet se produit par le biais d'un composé diffusible, dans ce cas l'action est indirecte, globalement, ces interactions décrites dans la littérature portent sur la production de phytohormones et la morphogénèse des macro-algues déclenchée par les produits bactériens qui se fait par différents échanges des métabolites, et des éléments nutritifs.

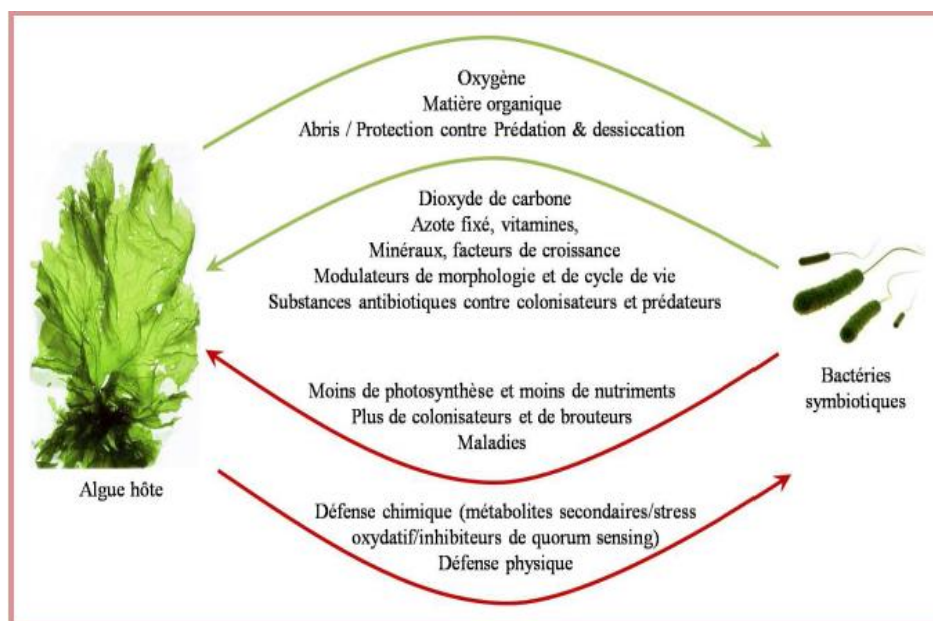


**Figure 6:** Représentation schématique de surface macro-algue associée par différents colonisateurs

Les algues marines possèdent un rôle « protecteur » de quelques souches bactériennes présentes sur la surface, qui émettent dans l'eau de mer environnante des composés chimiques faisant obstacle aux bio-salisseurs extensives des surfaces [33], elles sont aussi à l'origine de différentes sources d'énergie et de carbone, elles sont riches aussi en substances osmoprotectrices (Glycine-bétaine et Diméthyl-sulfonio-propionate –oxalate ou acétate) qui sont utilisées par plusieurs bactéries afin de challenger le stress Salin, les parties métaboliquement fonctionnelles des algues sont généralement bien armées pour résister à la pénétration par les endophytes bactériens. Par contre, les tissus des parties distales plus âgées ou abîmées sont pénétrés et détruits par des bactéries opportunistes dégradant les sucres pariétaux pour les utiliser comme source de carbone, à l'aide d'enzymes très adaptées [33].

Les interactions sont nombreuses et complexes, cependant, en simplifiant plusieurs types d'interactions soit des interactions positives (coopératives) soit des interactions négatives : Les bactéries peuvent avoir une action algicide conduisant à une inhibition voire une lyse cellulaire. Elles peuvent aussi stimuler la croissance algale influencer sur la production ou la modulation de la toxicité ou encore inhiber ou promouvoir la formation de kystes ainsi que leur survie après germination [34].

A l'inverse, les algues peuvent avoir des actions sur les bactéries, comme des activités bactéricides conduisant à une inhibition voire une lyse cellulaire ou encore la stimulation de la croissance bactérienne [35,36].



**Figure 7 :** L'ensemble des interactions bénéfiques (en vert) et préjudiciables (en rouge) entre les macro-algues et les bactéries.

### I.3.2. Intérêt des bactéries associées aux algues

D'après les études existantes sur les interactions entre les micro-organismes et algues les marine, l'étendue de la diversité des hôtes sessiles pouvant héberger une communauté microbienne distincte peut avoir un impact remarquable sur notre vue actuelle de la diversité microbienne marine [37,38].

Les métabolites secondaires produits par les micro-organismes marins ont des structures différentes et leur activité biologique est beaucoup plus forte. Autrement dit, l'étude des mécanismes impliqués dans les produits naturels résultants de la biosynthèse des bactéries marines a montré que la synthèse de nombreux composés bioactifs est stimulée par des associations bactérie-algue [39,40]. Par conséquent, ces bactéries colonisent ont tout intérêt à maintenir la santé de l'hôte qui les porte. Les bactéries présentent à la surface des macro-algues marines semblent donc jouer un rôle protecteur en émettant dans l'eau de mer environnante des composés qui aident à la prévention des salissures extensives des surfaces [32].

Ces composés sont considérés comme une ressource durable et peuvent également avoir des applications industrielles et médicales (englobent de nombreuses substances antifongiques, antibactériennes et antisalissures). Par ailleurs, les bactéries marines actives sont attribuées aux genres : *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Flavobacterium* [39].

# Chapitre II

**Les protéases kératinolytiques**



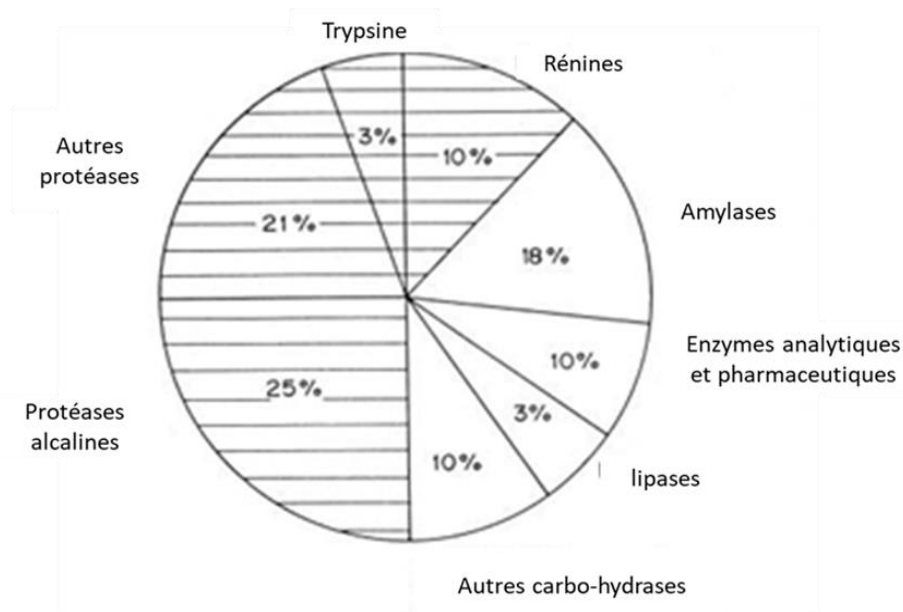
## II.1. Les protéases

### II.1.1. Définition

Le terme « protéases » définit les enzymes qui digèrent les protéines, et a été inventé par S.H. Vines, professeur de botanique à l'Université d'Oxford en 1903 [41].

Les protéases aussi appelées protéinases ou peptidases sont des enzymes hydrolytiques. Ils se trouvent dans tous les organismes vivants et comprennent un groupe notable de biocatalyseurs avec un large champ d'application en fonction de leurs caractéristiques biochimiques et de la spécificité du substrat. Ils représentent environ 60% des enzymes industrielles les plus commercialisés dans le marché mondial des enzymes [42] (Figure 8) [43]. Elles sont classées selon leur mode d'action spécifique, chaque une de ces classes principales est décrite dans le Tableau III [44].

En effet, il a été bien documenté que les protéases sont des enzymes qui peuvent catalyser l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique [45].



**Figure 8:** Répartition du marché mondial des enzymes [43].

**Tableau III** : Les principales classes d'enzymes [44].

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases	Réactions de transfert d'électrons (transfert ou d'atomes d'hydrogènes )
Transférases	Transfert de radicaux (groupements phosphates , amines, méthyle )
Hydrolases	Réactions d'hydrolyse (brise d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau.)
Lyases	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse
Isomérases	Réactions d'isomérisations (réactions où un composé est transformé en un isomère, c'est-à-dire un composé avec les mêmes atomes mais avec une structure moléculaire différente.)
Ligases	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP (adénosine triphosphate)

### II.1.2. Origines des protéases

Les protéases sont de plus en plus utilisées dans le monde industriel. Dans plusieurs procédés industriels. Toutefois, ce sont les protéases alcalines de détergence, actives et stables à des pH alcalins, qui occupent la plus grande partie [46].

Les protéases sont omniprésentes dans une grande diversité de sources telle que les micro-organismes, les animaux et les plantes [47]. Mais les sources microbiennes sont préférées pour produire ces protéases en raison de leurs avantages techniques et économiques, notamment; croissance rapide et la facilité de la manipulation génétique [48].

#### a. Protéases végétales

Les plantes produisent des composés naturels qui agissent comme une source majeure de molécules bioactives avec une large gamme de cibles biologiques [49].

L'utilisation des plantes comme source de protéases est régie par plusieurs facteurs tels que la disponibilité des terres à cultiver et l'adéquation des conditions climatiques à la croissance. De plus, la production de protéases à partir de plantes est un processus long. La papaine, la bromélaïne, les kératinases et la ficine représentent certaines des protéases d'origine végétale bien connues [43].

### **b. Protéases animales**

Les protéases d'origine animale les plus connues sont la trypsine pancréatique, la chymotrypsine, la pepsine et les présures. Ceux-ci sont préparés sous forme pure en grandes quantités. Cependant, leur production dépend de la disponibilité de bétail pour l'abattage, qui à son tour est régi par des politiques et agricoles [43].

### **c. Protéases microbiennes**

Protéases microbiennes représente la part la plus importante du marché en termes de valeur [48].

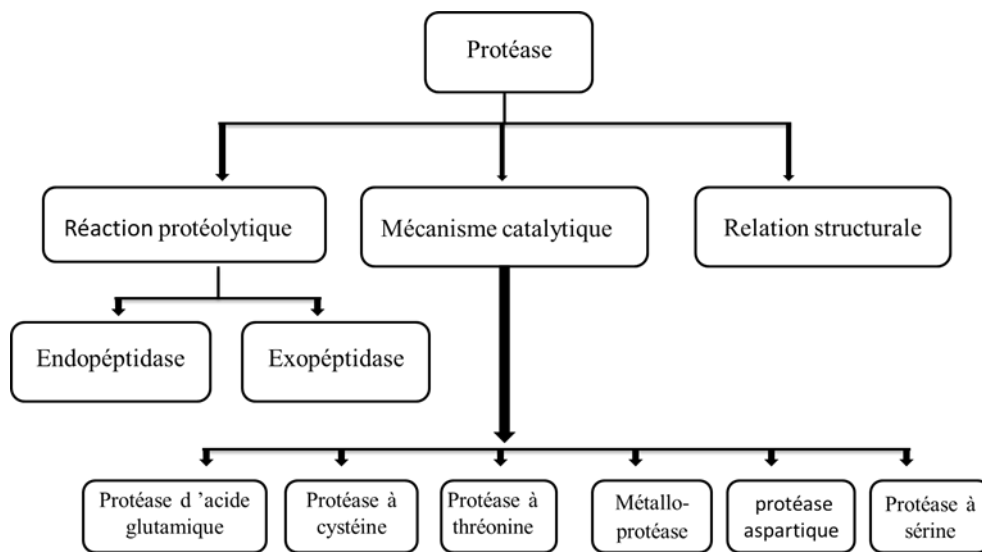
Parmi les protéases microbiennes, les protéases alcalines représentent plus de 50% de la production mondiale totale d'enzymes, ils jouent non seulement un rôle important dans les processus métaboliques des organismes, mais ont également attirés une attention particulière dans les applications de la biotechnologie industrielle en raison de leur forte spécificité, de leurs conditions de réaction douces, de leur respect de l'environnement et de leur inactivation ou contrôle facile par rapport aux catalyseurs chimiques [47].

Plusieurs espèces de micro-organismes marins, comme *Vibriosp*, *Bacillus sp*, *Pseudoalteromonas sp*, *Streptomyces sp*, *Aspergillus sp*, *Yarrowiasp*, *Alcaligenes sp* *Psiloteredo sp.* et *Actinomycete sp*, pourraient être d'un grand intérêt en tant que producteurs potentiels des protéases alcalines [47].

### **II.1.3. Classification des protéases**

À la fin du XIXe siècle, le terme protéase a été introduit afin d'expliquer une enzyme qui décompose les molécules de protéines en acides aminés [50]. Selon la fonction et l'activité des protéases, elles sont classées en trois catégories (Figure 9) [50] :

- Sur la base d'une réaction protéolytique catalysée par des enzymes de protéases qui hydrolysent les liaisons peptidiques de molécules protéiques qui sont ensuite classées en exopeptidases et endopeptidases.
- Sur la base du mécanisme catalytique et de la spécificité effectuée par les protéases.
- Sur la base de caractéristiques de structure qui sont censés montrer des relations évolutives.



**Figure 9** : Classification des protéases [50].

### II.1.3.1. Selon la réaction protéolytique

Selon le Comité de nomenclature de l'Union internationale de biochimie et de biologie les peptidases sont divisées en deux classes, à savoir les exopeptidases et les endopeptidases, en fonction de leurs actions sur les substrats et leurs sites actifs [51].

#### a. Exopeptidases

L'exopeptidase peut être divisée en carboxypeptidase et aminopeptidase, qui clivent respectivement le résidu d'acide aminé de l'extrémité carboxyle libre et de l'extrémité amine libre du polypeptide [52].

#### b. Endopeptidases

La plupart des enzymes utilisées en industrie sont des endopeptidases [44]. Elles sont caractérisées par leur action préférentielle au niveau des liaisons peptidiques dans les régions internes de la chaîne polypeptidique éloignées des extrémités N et C. La présence du groupe amino ou carboxyle libre a une influence négative sur l'activité enzymatique [43].

**Tableau IV : Classification des protéases [43]**

Types de protéases	Classes et sous-classes
Exopeptidases	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aminopeptidases</li> <li>- Dipeptidyle peptidases</li> <li>- Tripeptidyle peptidases</li> <li>- Carboxypeptidases</li> <li>- Sérine carboxypptidases</li> <li>- Métallocrboxypeptidases</li> <li>- Cystéine carboxypeptidases</li> </ul>
Endopeptidase	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protéases à sérine</li> <li>- Protéases à cystéines ou protéases à thiols</li> <li>- Protéases aspartiques ou protéases acides</li> <li>- Métallo-protéases</li> <li>- protéases de thréonine</li> <li>- protéases d'acide glutamique</li> </ul>

### II.1.3.2. Selon le mécanisme catalytique

Les enzymes protéiniques sont classées selon la nature chimique du site catalytique et, par conséquent, les protéases ont été classées en six classes : protéases de cystéine, protéases de sérine, protéases de thréonine, protéases d'acide glutamique, protéases d'acide aspartique et métalloprotéases [50].

### II.1.3.3. Selon la relation structurale

Plusieurs auteurs ont proposé de regrouper les peptidases qui sont similaires à la fois dans leur structure 3D et dans leur origine d'un point de vue évolutif. Selon les similitudes structurelles et l'homologie, les protéases sont classées dans un groupe qui a un comportement commun qui les sépare des autres groupes ou familles de protéases. Chaque famille reçoit une identité spécifique qui commence par la lettre qui représente le type catalytique de peptidase qu'il contient (C pour la cystéine, A pour l'aspartique, M pour le métallo, T pour la thréonine, S pour la sérine et U pour le type inconnu) [50].

## II.2. Les substrats kératiniques

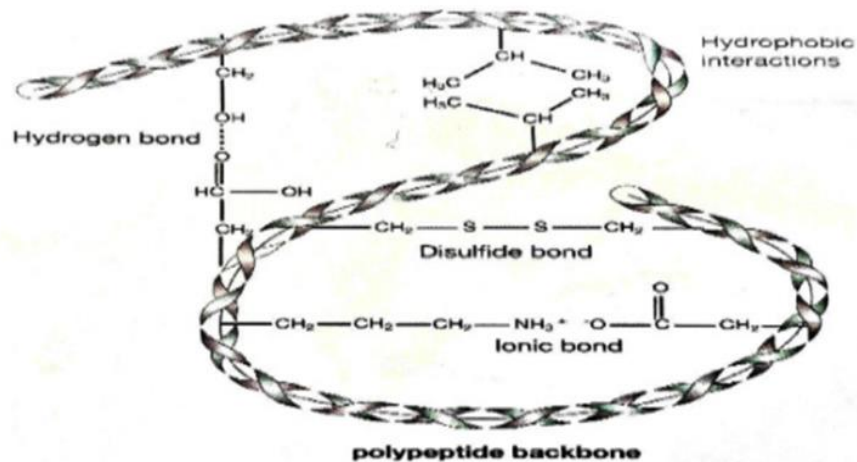
### II.2.1. Définition

La kératine est l'un des bio-polymères les plus abondants au monde. Il s'agit d'une protéine structurale insoluble, qui est le principal composant structural de la laine, des plumes, des cheveux, des sabots et des ongles [53].

Cette protéine particulière assure une résistance aux attaques chimiques et enzymatiques pour l'homme ou pour l'animal contre son environnement naturel [54].

### II.2.2. Structure et classification des kératines

Les kératines sont hélicoïdales et fibreuses, elle sont classées en tant que protéines hétérogènes en raison de leur structures en acides aminés différents, contenant une teneur élevée en résidus cystéine ([10-12%] en mole de tous les acides aminés) formant des liaisons disulfure (figure 10) [53], elles sont insolubles dans l'eau, les acides faibles, les milieux alcalins et les solvants organiques [53].



**Figure 10** : Illustration schématisée de la structure de la kératine. Diverses liaisons inter et intramoléculaires (liaisons hydrogène, ioniques, disulfure) [53].

La kératine sont des protéines dont les chaînes se présentent en hélice- $\alpha$  ( $\alpha$ -kératine) qui est principalement présente dans les matières épidermiques dites de mammifères, telles que les cheveux, la laine et la corne, ou en feuillet- $\beta$  ( $\beta$ -kératine) qui se trouve principalement chez les oiseaux et les reptiles [55]. (Figure 11 et 12) [56].

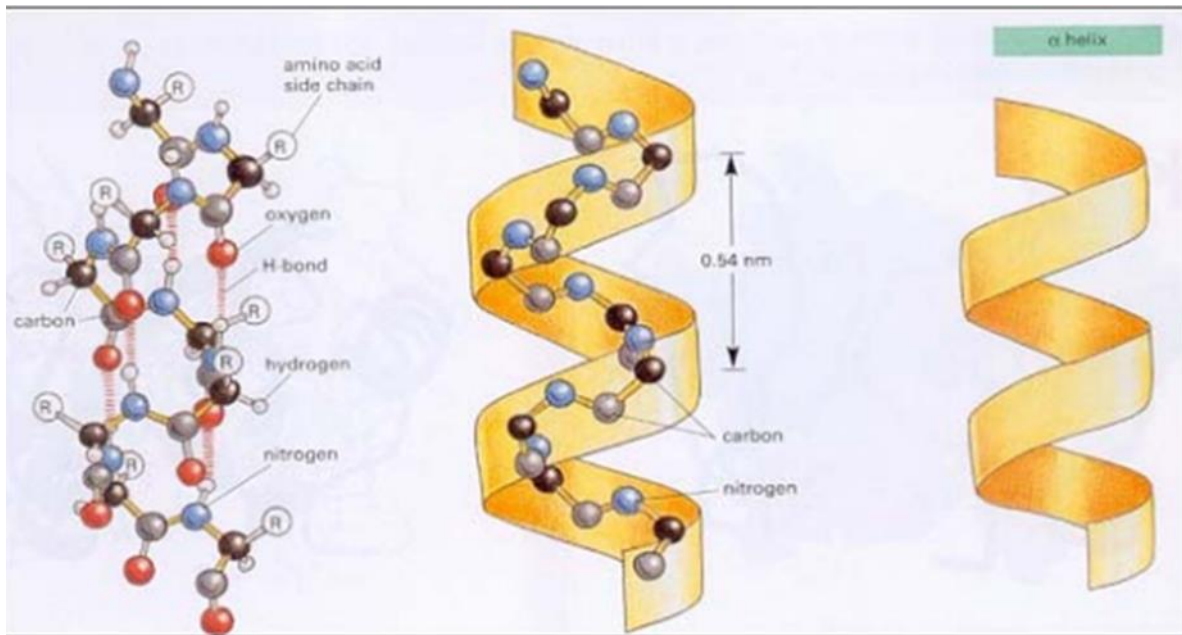


Figure 11 : Hélice droite et les Liaisons hydrogène dans une hélice  $\alpha$  [56].

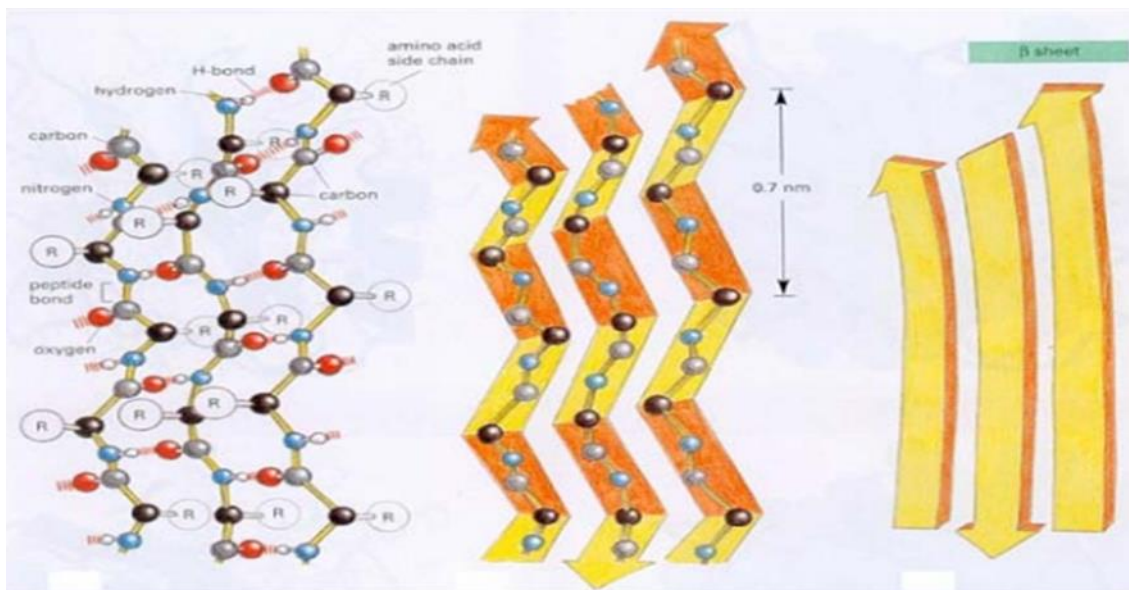


Figure 12 : Structure en feuillet  $\beta$  [56].

### II.2.3. Sources kératinolytiques

La kératine est synthétisée et utilisée par de nombreux êtres vivants comme élément de structure [57], elle garantit une peau imperméable et elle représente 85 % des protéines cellulaires tels que les cheveux, la laine, les plumes, les ongles et les cornes [59].

#### II.2.3.1. Les plumes

Les plumes sont composées principalement de 91% de kératine de type  $\beta$ -kératine, ces déchets kératiniques présentent une source très riche en protéine, en particulier en acides aminés essentiels [58].

**Tableau V:** Concentration des acides aminés en gramme par Kg de plumes [46].

Acide aminé	Concentration dans les plumes (g/Kg)
Glycine	162
Valine	20
Leucine	83
Isoleucine	43
Arginine	17
Lysine	18
Cystéine	76
Thréonine	85
Phénylalanine	43
Asparagine	67
Histidine	3
Sérine	72
Glutamine	97
Proline	188
Alanine	84



### **II.2.3.2. Les cheveux**

Environ 80% de la masse totale de la fibre capillaire est composée de kératine, 9% de lipides, 3% de mélanine et de composants mineur [60].

Les cheveux ont la plus forte teneur en cystine par rapport à d'autres sources de kératine [61].

### **II.2.3.3. La laine**

La laine est un exemple remarquable de kératine dure. Une fibre de laine propre contient environ 97% de protéines kératineuses, avec une teneur plus élevée en cystine par rapport à la kératine de plumes et de cornes [61].

### **II.2.3.4. Les cornes**

Les cornes sont composés d'un noyau d'os entouré d'une épaisse couche de kératine et d'acides aminés qui contribuent à l'assemblage alpha-hélice des protéines à faible teneur en soufre comme l'acide glutamique, l'acide aspartique, la leucine, la lysine et l'arginine [60].

La kératine de corne a de bonnes performances, telles qu'une ténacité, une rigidité et une résistance élevées [62].

### **II.2.4. Valorisation des déchets de plume**

La viande de poulet est l'une des sources importantes de protéines animales principalement consommées dans le monde. Dans le même temps, sa consommation a abouti à la création d'un nombre important de sous-produits de déchets de plumes, car près de 7% du poids corporel des poulets sont des plumes. Le nombre estimé de plumes de poulet produites chaque année dans le monde est d'environ 15 milliards de tonnes avec l'Afrique du Sud, contribuant à environ 258 millions de tonnes [63].

L'élimination des déchets de plumes cause la pollution et influencent profondément l'environnement, donc ils peuvent être une source alternative importante de protéines car 90% du poids des plumes est composé de kératine [64].

## **II.3. Kératinase**

### **II.3.1. Définition**

Les kératinases sont des enzymes kératinolytiques généralement des sérines protéases qui hydrolyse efficacement les protéines solubles (la caséine, la gélatine, l'albumine de sérum bovine et l'hémoglobine..) et insolubles que la kératine (les plumes, la laine, la soie, le collagène, l'élastine, les cornes, les cheveux et les ongles...) [65].

Elles sont produites principalement par des bactéries, des champignons, des levures et des actinomycètes [66].

### **II.3.2. Propriétés des kératinases**

Les propriétés biochimiques et physio-chimiques des kératinases de plusieurs microorganismes ont été largement étudiées . ces propriétés englobent le pH et la température optimale, la masse moléculaire et la spécificité du substrat [67].

#### **II.3.2.1. pH et température**

Le pH optimal pour les kératinases des bactéries, des champignons et des actinomycètes de neutre à alcaline . Toutefois, certaines kératinases présentent un pH alcalophilique extrême (pH 12). Pendant ce temps, la plage de température optimale est de 30 °C 80 °C [68].

#### **II.3.2.2. Poids moléculaire**

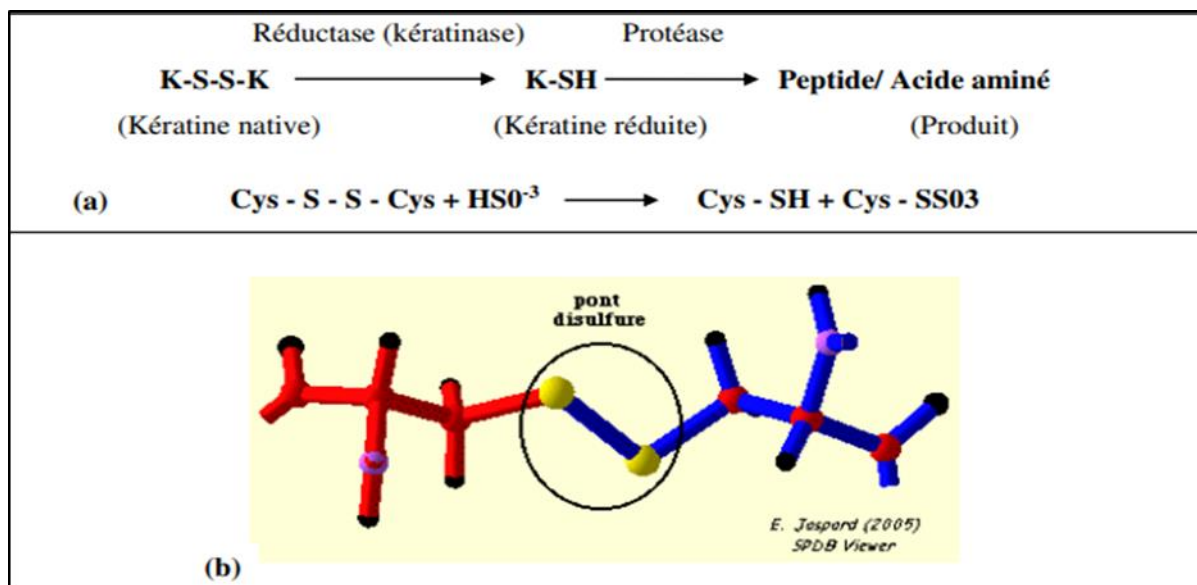
Les poids moléculaires des kératinases varient de 18 à 200 kDa. La kératinase la plus élevée (200 kDa) est produite par *Kocuria rosea* et *F. islandicum*, et la plus faible (18 kDa) est synthétisée par *S. albidoflavus* SK 1-02, alors que dans le cas des champignons pathogènes, le poids moléculaire peut atteindre 440 kDa [68].

#### **II.3.2.3. Spécificités du substrat**

Les kératinases ont une grande spécificité de substrat et sont actives contre les substrats protéiques solubles et insolubles. Parmi les protéines solubles, elles possèdent la capacité d'hydrolyser la caséine, la gélatine, l'albumine sérique bovine et l'hémoglobine, tandis que parmi les protéines insolubles, elles hydrolysent les plumes, la laine, la soie, le collagène, l'élastine, la corne, la strate cornée, les cheveux, l'azokératine et les ongles [65].

### II.3.3. Mode d'action des kératinases sur la Kératine

La kératine est produite par une variété d'organismes, à la fois intracellulaires et extracellulaires, de sorte que le mode de dégradation de la kératine est distinct d'un organisme à l'autre. Par conséquent, une variété de sous-produits sont générés par la dégradation de la kératine. La kératinase est un cocktail de deux enzymes, à savoir la disulfure réductase et l'hydrolase polypeptide, qui sont vitales pour la dégradation de la kératine. De façon générale, la dégradation de la kératine par la kératinase comporte trois étapes : dénaturation, hydrolyse et transamination. Premièrement, la liaison de disulfure présente dans la kératine est réduite de la cystine (SS) à la cystéine (SH) (Figure 13) [46], ce qui entraîne la conversion de la structure superciltree en une forme dégénérative. En outre, il est hydrolysé en polypeptide, oligopeptide et acide aminé libre par l'action catalytique du polypeptide hydrolase. Enfin, la kératine est complètement hydrolysée en ammoniac et sulfure par un procédé de transamination [67].

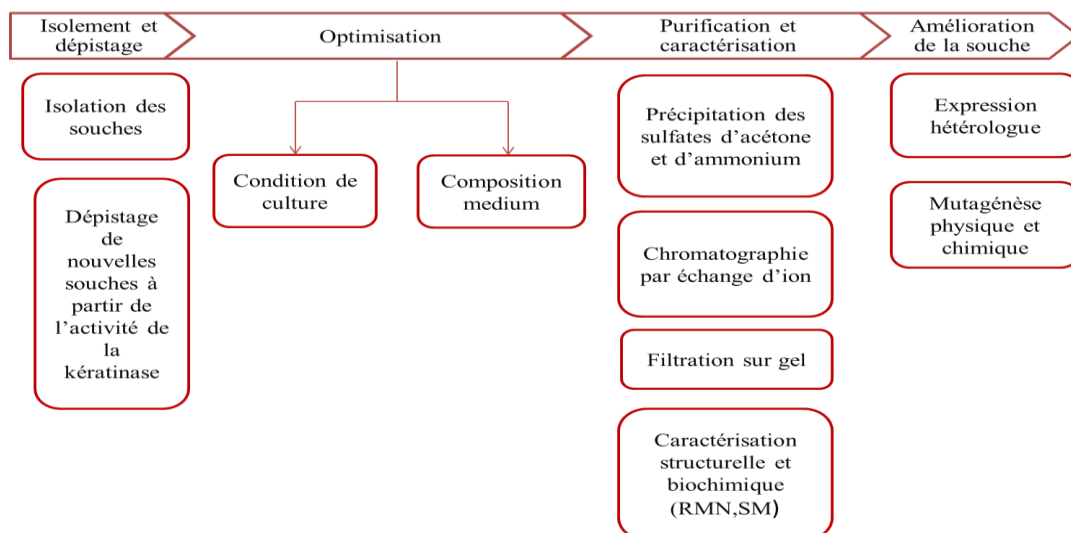


**Figure 13 :** (a) mode d'action des kératinase sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures, (b) des ponts disulfures entre les résidus de cystéines [46].

### II.3.4. Sources

Les enzymes kératinolytiques sont très répandues dans la nature et sont produites par un ensemble de micro-organismes qui se développent sous différentes conditions écologiques et environnementales, et ils montrent une grande capacité à dégrader les substrats kératiniques [46].

Les kératinases sont signalées chez diverses populations microbiennes comme les bactéries, les actinomycètes, les algues et les champignons. De toutes les sources de kératinase, les sources bactériennes sont beaucoup plus nombreuses que les champignons et les actinomycètes. Une stratégie générale suivie dans la production de kératinase est présentée dans la Figure 14 [68].



**Figure 14** : Stratégie générale suivie dans la production de kératinase [68].

#### II.3.4.1. Les champignons

Grâce au coût de production réduit, à la récupération et à la purification facile du produit, à une croissance plus rapide sur des substrats bon marché et facilement disponibles et la libération de grandes quantités d'enzymes dans le milieu de culture, les kératinases fongiques répondent à la demande des chercheurs [66].

Les résultats des méthodes de séquençage à haut débit prédisent 5,1 millions d'espèces fongiques sur terre, dont les champignons marins sont plus de 1500 espèces [69].

### II.3.4.2. Les bactéries

Les kératinases bactériennes ont suscité beaucoup d'attention de la part des chercheurs et des scientifiques en raison de leur croissance plus rapide, de leur capacité d'expansion facile, de leur meilleure production et de leur capacité spécifique à hydrolyser les substrats kératinolytiques insolubles [66].

Parmi ces bactéries on a Les bactéries marines qui sont des organismes unicellulaires constituant le microbiome marin représentant plus de 98% de la biomasse océanique. Par conséquent, multifonctionnel enzymes ont été explorées comme la kératinase [69].

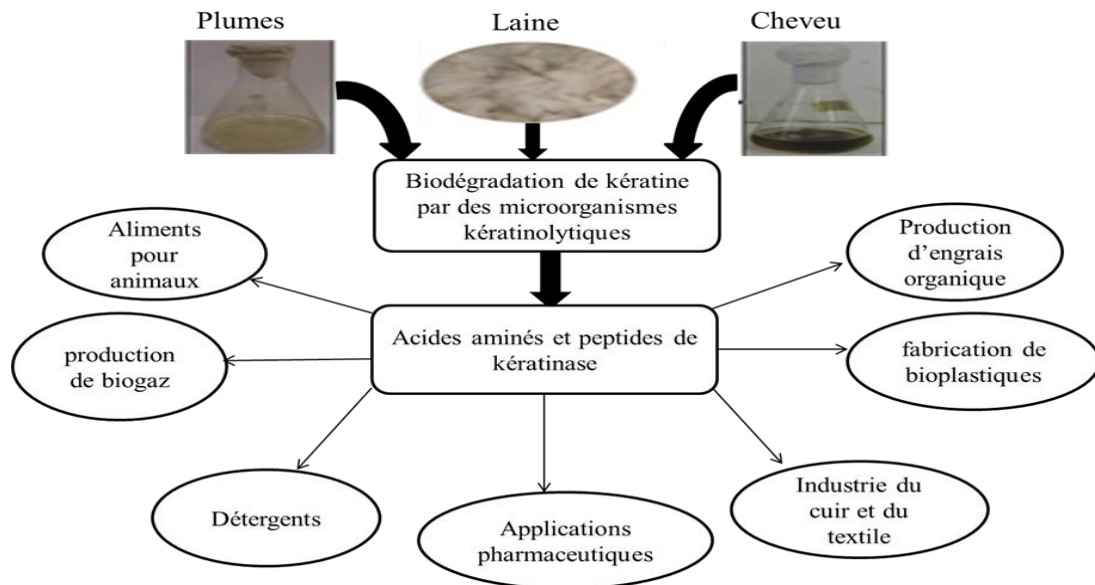
**Tableau VI:** Liste des micro-organismes dégradant la kératine [67].

Type	Microorganismes	Niche écologique	Nature de kératinase
Bactéries	Bacillus sp.	Décharge de plumes, sols, et résidus de volaille.	Sérine/ mettalo
	Bacillus amyloliquefaciens.	Sol sablonneux, humus et déchets de laine, sol riche.	Sérine
	Bacillus megaterium.	Terre de dépôt de volaille, déchets de volaille.	Sérine
	Bacillus thuringiensis. Microbacterium sp.	Décharge de plumes, Plumes décomposées.	Sérine Mettalo
	Micrococcus luteus	Déchets de volaille.	Thiol
	Pseudomonas aeruginosa.	Décharge de plumes, sols.	Mettalo

Champignons	Aspergillus sp. Aspergillus flavus. Aspergillus nige. Aspergillusfumigatus.	Terre de décharge de volaille et sol de ferme avicole.	Sérine/ mettalo	
	Acremonium sp. Acremoniumbrunnescens. Acremoniumbyssoides. Acremoniumchrysogenum. Acremoniumhyalinulum.	Echantillon de sol	Sérine	
	Chrysosporium- keratinophilum. Fusariumculmorum. Fusariumsolani.	Site de déchets pollués. Echantillon de sol.	Sérine –	
	Myrotheciumverrucaria.	Sol	Sérine	
	Penicillium sp. Penicilliumcitrinum Penicilliumchrysogenum Penicilliumpurpurogenum Penicilliummarneffeii	Sols forestiers alcalins	Sérine Sérine	
	Sporothrixschenckii	Sol et boues.	Sérine	
	Trichodermaatroviride, Trichodermaharzianum	Hematum, en décomposition Plumes.	Sérine Sérine	
	Actinomy- cètes	Actinomadurakeratinilytica.	Compost de volaille, bovinefumier	Sérine
		Nocardiosis sp.	Terre déchargée de plumes	Sérine
		Streptomyces sp. Streptomycesthermoviolaceus	Sol marin, abattage, déchetsménagers	Metallo/ sérine Sérine
		Thermoactinomycessp.	Sol	Sérine

### II.3.5. Applications des kératinases

Puisque les kératinases microbiennes sont des enzymes spécifiques et puissantes pour la dégradation de la kératine, il serait leur donner de nouvelles opportunités pour s'impliquer dans des applications biotechnologiques considérables. Ils pourraient être exploités pour l'alimentation animale, les engrais, les détergents, les cuirs et les industries textiles, applications pharmaceutiques et biomédicales. (Figure 15) montre le plus de potentiel applications multiples des kératinases microbiennes dans différents secteurs industriels [70].



**Figure 15 :** Applications multiples des hydrolysats de kératinase et de kératinase dans divers domaines industriels [70].

### II.3.5.1. Traitement des déchets kératiniques

#### a. Production de farine de plumes pour alimentation animale

Les déchets de plumes sont riches en acides aminés essentiels ; en raison de leur nature insoluble, les plumes sont résistants à la dégradation par les protéases microbiennes communes, à savoir : la trypsine, la pepsine et la papaïne. Jusqu'à ces dernières années, les plumes ont été cuites à haute température et à pression très élevée pour se transformer en farine de plumes utilisée comme additif alimentaire pour améliorer l'alimentation animale [70].

Une étude, a montré que l'utilisation de kératinase alimentaire la supplémentation peut stimuler l'immunité, la biodisponibilité des nutriments et le poids. La biodégradation des déchets de kératine par l'utilisation d'enzymes disponibles sur le marché fournissent une source légitime d'aliments riches en nutriments [67].

#### b. Production de farine de plumes pour engrais

Les farines de plumes riches en protéines générées pour l'alimentation animale peuvent être une bonne source d'azote, qui peut être utilisé comme engrais [46]. L'utilisation de ces

lois sur les engrais a un certain nombre d'avantages, il améliore non seulement la interaction plant-microbe pour la croissance des plantes, mais il peut également augmenter le sol améliorer la fertilité, améliorer la disponibilité des minéraux (N, P et K) pour les plantes, et prévenir l'érosion des sols. Par conséquent, l'utilisation de ces déchets de kératine pour la production d'engrais organiques est écologique amicale et aussi rentable [67].

#### **II.3.5.2. Hydrolysat kératinique pour la production de biogaz**

La bioconversion des déchets kératiniques en biogaz est une approche respectueuse de l'environnement et rentable pour produire beaucoup d'énergie verte qui pourrait contribuer à couvrir la demande mondiale [70].

Production de bio- hydrogène à partir de substrats de fermentation photobiologique ou hétéro -trophique la demande mondiale. Pour la production de bio- hydrogène, les déchets kératineux sont microorganismes kératinolytiques dans l'hydrolysat de kératine .En outre, la fermentation a été effectuée pour produire de l'hydrogène biologique, et gaz naturel et méthane. Conversion de sous-produits kératineux en combustibles peut répondre à l'intérêt émergent pour la conservation et le recyclage de l'énergie [67].

#### **II.3.5.3. Fabrication de bioplastiques**

Les déchets de plumes de poulet pourraient être exploités pour fabriquer le biopolymère.. La présence de kératine confer la résistance thermique, l'élasticité, la biodégradabilité et biocompatibilité pour des applications médicales et pharmaceutiques. Des recherches antérieures ont mise en œuvre des plumes de poulet dans les bioplastiques, qui biodégradabilité par rapport aux plastiques conventionnels [70].

#### **II.3.5.4. Ajout de kératinases aux détergents**

Dans les détergents, la soude caustique est un ingrédient important mais, en raison de ses effets nocifs, une alternative sûre très recherchée pourrait être réalisée par le protéases kératinolytiques. Un rapport récent suggère que kératinolytique protéase a gagné plus d'attention en raison de sa grande stabilité à plus haut les températures et le pH. De plus, il compatible avec la présence d'agents oxydants, blanchissants et chélatants et les détergents disponibles sur le marché. En outre, il est plus enlever les taches tenaces comme le sang, le curcuma, le jaune d'œuf ; à partir de vêtements [67].



### **II.5.5.5. Application des kératinases dans l'industrie du cuir et du textile**

Le processus de désherbage est l'un des grands défis dans l'industrie du cuir pour éliminer les cheveux de la peau sans endommager la structure de la peau et des cheveux. Les kératinases produites de dégradation des cheveux pourrait être appliquée de manière significative en raison de leur spécificité. Ce processus est une efficace, spécifié et économique sans menacer l'environnement par le biais de la libération des toxines, qui émergent par le traitement chimique [70].

La kératinase peut être utilisée dans le traitement de l'industrie des textiles, parce que le mélange de laine et de tissus avec des enzymes améliore la résistance à la traction et résistance à la contraction [67].

### **I.3.5.6. Applications pharmaceutiques des kératinases**

#### **a. Traitement des cors et des callosités par les kératinases**

L'hyperkératose peut être définie comme des épaisissements anormaux de la couche externe de la peau, les callosités. Ils provoquent des symptômes qui apparaissent habituellement sur la surface dorsale des doigts. L'élément principal de ces matériaux est la kératine; par conséquent, les dermatologues prescrivent divers médicaments formulés à base de kératinases pour hydrolyser des matières aussi rigoureuses. De plus, des études antérieures ont indiqué l'application de kératinases pour dissoudre les couches cornées formées de la peau [70].

#### **b. Traitement de l'acné**

Les remèdes médicaux à base de kératinases ont montré une grande efficacité pour guérir l'acné, qui est généralement matérialisée comme des glandes sébacées infectées dans la peau. La principale raison de ces cas est la formation de kératine excessive bloquant les glandes sébacées. De même, la puissance des kératinases leur donne la capacité de mettre en œuvre pour effacer la cicatrice de la plaie [70].

# Chapitre III

**Discussion générale**

## Discussion générale

Les protéases (peptidase ou enzymes protéolytiques) sont l'une des principales enzymes utilisées dans les industries. Leur fonction catalytique est d'hydrolyser les liaisons peptidiques des protéines en acides aminés libres. L'application commerciale de ces enzymes est très large, y compris leur utilisation dans les industries de détergents, de cuir, alimentaire, pharmaceutique, etc. Elles représentent environ 65% des ventes d'enzymes industrielles dans le marché mondial [71]. Les protéases sont ubiquistes ; elles se retrouvent aussi bien chez les plantes que chez les animaux et les microorganismes. Cependant, grâce à leur diversité biochimique extensive, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases.

La plume de poulet est un déchet organique qui s'est accumulé en vrac comme sous-produit de l'industrie du volaille. En général, les plumes représentent 5 à 7% du poids total des poulets matures. Annuellement, des millions de tonnes de déchet de plumes sont générées par l'industrie de la volaille dans le monde. La plupart de déchets de plumes sont enfouis ou brûlés, ce qui cause des problèmes environnementaux mondiaux tels que la pollution des ressources atmosphériques et souterraines et les rejets de protéines [72-74]. Les plumes de poulet sont riches en protéines et contiennent 90% de kératine. Les structures et les liaisons de la kératine confèrent à la kératine une stabilité mécanique élevée et une résistance à la dégradation [72,75,76].

L'inconvénient majeur des méthodes de dégradation mécanique et chimique est qu'elles nécessitent un apport énergétique élevé et provoquent des problèmes environnementaux. Ces méthodes sont également destructives pour certains acides aminés tels que la méthionine, la lysine et le tryptophane et dans la formation d'acides aminés non nutritifs tels que la lysinoalanine et la lanthionine qui conduit à une faible qualité et digestibilité des protéines. Par conséquent, les déchet de plumes qui se sont converties en complément alimentaire entraînent classiquement un aliment de mauvaise qualité qui n'est pas rentable [77- 79, 76, 74].

La biodégradation ou le traitement biologique de la kératine à l'aide de la kératinase. Elle présente un caractère prometteur en raison d'avantages importants tels que la production des peptides et des acides aminés rares et essentiels, la réduction du temps de traitement, une action biodégradable, une meilleure qualité du produit, une faible consommation d'énergie, un coût inférieur, des caractéristiques non toxiques et écologiques [80-82, 76].

La capacité de dégradation de la kératine a été rapportée pour plusieurs souches bactériennes : *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Stenotrophomonas sp.*, *Fervidobacterium pennavorans*, *F. islandicum*, *Lysobacter sp.*, *Nesterenkonia sp.* *Kocuria sp.* *Vibrio sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Thermoanaerobacter sp.*, *Stenotrophomonas sp.* et *Chryseobacterium sp.* *Fervidobacterium sp.*, *Thermoanaerobacter sp.* et *Bacillus sp.* Le genre de *Bacillus sp.* (*Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis*) ont fait l'objet d'études approfondies en raison de leur efficacité sur la dégradation des plumes.

### III. 1.Facteurs affectant la production de kératinase

D'après certains auteurs, l'optimisation des paramètres affectant la production de kératinases pourrait améliorée 3 fois la quantité des enzymes kératinolytiques. En effet, plusieurs paramètres affectant la production de kératinases ont été étudiés : la composition du milieu de culture, sources de carbone et d'azote, le pH, la température, la salinité, l'agitation, le temps d'incubation et la concentration du substrat. Généralement, la production maximale de kératinase a été générée pendant la phase de croissance exponentielle ou à la fin de la phase stationnaire [83].

La concentration du substrat a été étudiée, et selon les résultats obtenus par [84], des concentrations supérieures à 10 g/l de substrat (laine de moutons) n'influent pas sur la production de kératinase. Aussi en présence de la souche de *B. subtilis* KD-N2, Cai et Zheng, 2009 ont enregistré une plus forte activité de kératinase à 16 g/L de cheveux humain utilisés comme substrat. En utilisant 2% de farine de plumes comme substrat, la souche *Bacillus sp.* Produit une kératinase dont son activité protéolytique était la plus élevée [85]. Cependant, en variant la concentration du substrat (plumes) de 0.25 à 2 % ,[86] ils ont observé qu'une concentration de 0.75 % entraîne une bonne production de kératinases. Un travail similaire réalisé par [87] en étudiant l'effet de la concentration de substrat (plume) sur l'activité de kératinase. Ils ont observé qu'une valeur de 1% conduit à une activité enzymatique maximale

(680 U/ml). Par contre, [88] ont utilisé une concentration de plumes de volaille de 30 g/L pour la production de kératinases, quatre souches (*licheniformis*, *B. pumilis*, *G. stearothermophilus* et *R. érythropolis*) ont été testées dans cette étude.

Les auteurs [89] ont testé plusieurs sources d'azote (peptone, extrait de boeuf, extrait de levure et NaNO<sub>3</sub>), l'extrait de levure a exercé un effet le plus significatif sur la production de protéase extracellulaire par *Bacillus* sp. C et une activité protéase spécifique plus élevée ont été obtenus (419,06 U/mg). Des rapports similaires ont décrit une production accrue de protéase en présence d'extrait de levure [90-91]. Cependant, la peptone et l'extrait de bœuf ont entraîné une réduction significative de la production d'enzymes. En revanche, le nitrate de sodium (NaNO<sub>3</sub>) n'a pas un effet significatif sur la production d'enzymes. Cependant, le NaNO<sub>3</sub> était un produit chimique stimulant pour la production de protéases par de nombreux microorganismes [92-94].

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de pH initial sur la production des enzymes kératinolytiques. Les enzymes protéolytiques de *B. mojavensis* [92] et *Bacillus* sp. RGR-14 ont généralement été produites dans un milieu neutre. Egalement, [85] ont déclaré que des pH supérieurs 7.5 entraînent une diminution de la production de kératinase en présence de *Bacillus megaterium*. De même, le travail effectué par [95] a montré qu'en présence d'une souche *Bacillus* sp, l'activité de kératinase était maximale à pH 6.8. D'après ces auteurs, des pH inférieurs à 6 conduisent à une inhibition totale de la croissance bactérienne.

Cependant, la production de protéases à caractère kératinolytique a été effectuée dans un milieu alcalin par plusieurs auteurs. La production de kératinase, produite par la souche bactérienne *Stenotrophomonas lamphella*, isolée à partir de déchets de volaille, est optimale à pH= 8, le substrat utilisé était les plumes coupées en petits morceaux [96]. Un travail similaire a été rapporté par [84] tel que la souche *Exiguobacterium* sp. DG a montré une meilleure production de kératinase avec un pH 8. En utilisant les *B. subtilis* et *B. pumilis*, [97] ont trouvé que la production optimale est obtenue dans un milieu alcalin (pH 9.5). De même, les travaux menés par [88] ont montré que la souche *B. licheniformis* a produit des enzymes protéolytiques de manière optimale (50,41 U/ml) à pH 10. Des pH supérieurs à 10 ont été également discutés (tableau VII).

La température est le facteur déterminant dans la synthèse des enzymes. Cependant, la température de synthèse optimale dépend du type des microorganismes (mésophile ou thermophile). En effet, la température optimale d'activité des kératinases est très variable. Elle s'étend généralement de 25 à 80 °C et cela dépend de l'origine du microorganisme producteur. Les résultats obtenus par [98] ont trouvé que l'incubation à 25 °C entraîne une dégradation efficace jusqu'à 52% des plumes de poulet pendant 4 jours. De même, les travaux menés par [86] ont montré que la production maximale a été observée à 35 °C en utilisant la souche *Bacillus cereus* SKH1 cultivé sur un milieu minéral supplémenté par les plumes comme substrat. [99] ont rapporté qu'une température de 45 °C a été considérée comme optimale en présence de la *B. subtilis*.

Egalement, en présence de *Bacillus* sp cultivé dans milieu minéral à base de la farine de plumes, la production de kératinase était maximale à 40 °C [85].

Cependant, ont déclaré qu'une bonne activité protéolytique a été obtenue à 55°C. Egalement, en présence des souches de *B. pumilis* et de *R. erythropolis*, [88] ont considéré qu'une température de 37 °C donne une meilleure activité protéolytique. Mais, ils ont trouvé que la production optimale de kératinase atteinte 55 °C avec la souche *G. stearothermophilus* (les plumes de volaille ont été utilisées comme substrat).

La plus part des travaux réalisés par plusieurs auteurs ont montré que le temps d'incubation pour une production importante des enzymes kératinolytiques peut varier de 2 à 7 jours. [84] ont rapporté que la production de kératinase de la souche *Exiguobacterium* sp. DG1 a augmenté jusqu'à 2 jours, au-delà, la production a diminué. Egalement, la production optimale de kératinases, produites par les souches *B. halodurans* PPKS-2 [100], *B. licheniformis* ER-15 [101] et *Chryseobacterium* sp. Kr 6 [102], a été détectée pour un temps d'incubation de 2 jours. Cependant, lorsque les plumes de poulet ont été appliquées comme seule source de carbone et d'azote (1%, p/v), la souche *Bacillus* sp. 50-3 a complètement dégradé les plumes dans un temps d'incubation de 36 h, pendant ce temps une activité kératinolytique maximale a été enregistrée, 680 U/ml [87].

Les résultats obtenus par [88] ont montré que les activités protéolytiques maximales de kératinases produites par *B. licheniformis*, *B. pumilis* et *G. stearothermophilus*, étaient de

50,41, 35,41, 9,91 U/ml après 2, 2 et 3 jours d'incubation, respectivement. Avec *R. érythropolis*, l'activité enzymatique maximale était de 33,39 U/ml après 4 jours de culture. En revanche, des temps plus longs d'incubation de 5 j [85], 7 j [103], 12 j [104] et de 15 j [105] ont été enregistrés.

La plupart des microorganismes producteurs d'enzymes sont aérobies, ils ont besoin d'oxygène pour leur croissance et leur développement. Le manque d'oxygène peut entraîner des modifications défavorables sur la composition enzymatique et la perte du produit cible, voire même inhibe l'organisme. Les besoins en oxygène lors des processus enzymatiques sont fournis par l'agitation du mélange. Le degré d'aération pour la synthèse de la kératinase varie de 120 à 220 rpm [106,107].

Dans certains cas, il a été démontré que l'utilisation d'une agitation plus élevée diminue la production d'enzyme, ce qui peut être dû à la dénaturation de l'enzyme causée par des taux d'agitation plus élevés [108]. Cependant, des taux d'agitation plus élevés (200 – 250 rpm) ont été signalés comme un bon facteur pour la production de protéases à partir de *B. amyloliquefaciens* [91] isolat AP11 [108], Il a été signalé qu'une agitation faible (100 tr/min), les substrats et les cellules bactériennes n'étaient pas correctement mélangés, et par suit abaissant ainsi l'oxygène dissous et conduisant à une production plus faible de kératinase.

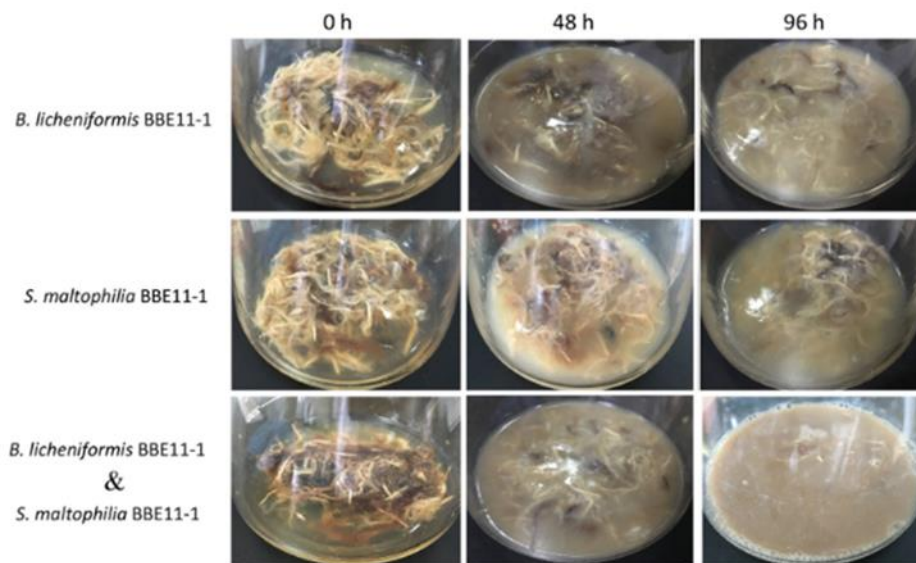
**Tableau VII** : Optimisation des paramètres affectant la production de kératinase.

<b>Souche</b>	<b>Origine</b>	<b>Substrat</b>	<b>pH</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Références</b>
Bacillus sp N1	Plume de poulet	plumes	8	37	[109]
Pseudochrobactrum IY-BUK1	Plume de poulet	plumes	7.5	30	[110]
Pseudomonas sp	Déchets de volaille	-	7	35	[103]
Streptomyces albidoflavus	Sol de déchets de volaille	plumes	10	50	[111]
Bacillus pumilus GRK	-	plumes	10	37	[112]
Thermoactinomyces sp YT06	Engrais de volaille	plumes	6	65	[106]
Melothermus	Source chaude	plumes	10	65	[113]
Bacillus sp 50-3	Matière fécales	plumes	7	37	[87]
Bacillus subtilis DP1	Déchets avicole	plumes	10	37	[114]
Bacillus amyloquelicius	-	plume	11	50	[115]
Stenotrophomonas maltophilia	-	kératine azure	10.5	50	[116]
Thermoactinomyces sp	Sol	plumes	11	80	[117]
Aspergillus niger	-	kératine azure	8	70	[118]
Geobacillus stearophilus	-	kératine azure	9	60	[119]
Bacillus sp.	Sol de déchets de volaille	-	6.8	37	[95]
Stenotrophomonas maltophilia	ferme de déchets de volaille	plumes	8	60	[120]

Une étude comparative menée par [121] sur la dégradation des plumes de volaille (50 g/l) en utilisant deux souches bactériennes séparées et en co-culture (*Bacillus licheniformis*



BBE11-1 et *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1). Les résultats obtenus ont montré que la dégradation était efficace dans le cas de la Co-culture (figure 16).



**Figure 16:** Comparaison entre la Co-culture (composée de 2 souches) et une culture d'une seule espèce [121].

### III.2. Caractérisation des kératinases

D'après la littérature, plusieurs paramètres influençant l'activité kératinolytique sont : le pH, la température, les ions métalliques, les détergents, etc. La plupart des kératinases microbiennes ont des pH optimums appartenant à la gamme de pH neutre jusqu'au pH alcalin. Toutefois, quelques kératinases possèdent des pH optimums extrêmement alcalins. D'après la littérature, les kératinases sont généralement stables sur une large gamme de pH allant de 5 à 13.

En présence de la souche *Serratia sp* isolé de déchets de volaille, [122] ont étudié la stabilité de la kératinase issue de cette souche, l'activité enzymatique était maximale à pH 7 et à température 37 °C, ils ont montré aussi que le poids moléculaire de l'enzyme purifiée est de 50 kDa.

La *Bacillus sp.* JM7, isolée à partir des eaux profondes de la mer, s'est avérée efficace pour la dégradation de 79,4% de plumes de poulet en 30 h. En effet, la kératinase Ker02562 produite par cette souche a montré une stabilité dans une large gamme de températures variant

de 30 °C à 60 °C, avec un optimum à 40 - 50 °C. Le Ker02562 était très actif à divers pH allant de 5 à 13 avec une activité maximale observée à un pH de 7 à 9 [123].

L'étude menée par [124] a montré que l'enzyme kératinolytique issue de la *Bacillus* sp. NKSP-7, a une excellente efficacité de biodégradation, de lavage et d'épilation des plumes de kératine. La kératinase purifiée (25 kDa) présente une stabilité dans une gamme de pH de 5,5 à 9,5 et de température de 20 à 60 °C pendant 8 h. L'activité optimale est obtenue à 65 °C et pH 7,5. Concernant les ions métalliques, l'efficacité catalytique a été améliorée en présence de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ . Aussi, elle a montré une stabilité à la salinité et aux détergents commerciaux.

La souche *Bacillus subtilis* DP1 isolée du sol d'une ferme avicole, produit une kératinase extracellulaire présentant une stabilité kératinolytique dans une large gamme de pH (8 - 12) et de température (20 - 50 °C) avec un optimum de pH à 7 et 37 °C. Egalement, il a été signalé que son activité enzymatique a été améliorée en présence des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  [114].

[125] ont réalisé un travail sur la caractérisation d'une enzyme kératinolytique produite par la souche *Bacillus* sp P7. Les résultats obtenus révèlent que cette souche a efficacement dégradé la kératine des plumes. La kératinase produite pendant la croissance sur un bouillon de farine de plumes avait une activité optimale à 55 °C et pH 9,0. En outre, l'enzyme a été stimulée par  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  et inhibée par  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ .

La kératinase KerP issue de la souche *B. polyfermenticus* B4 isolée d'une ferme avicole, a montré une bonne stabilité (473 U/ml) à pH 9 et  $T = 60$  °C. En outre, l'activité protéolytique pourrait être améliorée en présence des ions de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et inhibée par  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  [104].

En présence de la souche *Bacillus licheniformis* H-62, [126] ont rapporté que la kératinase produite par cette souche présente une l'activité optimale à 40 °C et pH 9.5. Tandis que la perte d'activité a été observée à des pH inférieurs à 9,0. La plume a été utilisée comme substrat (30g/l). En plus, L'EDTA, le SDS et l'urée ont augmenté l'activité enzymatique; cependant, Tween-20 présente un effet négatif.

D'après l'étude, la kératinase issue de la souche *Bacillus subtilis* S1-4 montre une stabilité enzymatique dans une large gamme de pH et de température. Les valeurs optimales ont été enregistrées à pH 10 (3700 U/mg) et 55 °C (4600 U/mg.). L'ajout des ions  $\text{Mg}^{2+}$  et

$\text{Ca}^{2+}$  améliore l'activité kératinolytique, mais elle est inhibée par  $\text{Cu}^{2+}$ . Les résultats obtenus par [127] ont montré que la souche *Streptomyces malaysiensis* produit une kératinase dont l'activité enzymatique optimale a été enregistrée à 60 °C et pH 8. Un travail similaire réalisé par [128] a décelé que la kératinase issue de la souche *Bacillus subtilis* RSE163 garde son activité dans des intervalles de pH allant de 7 à 10 et de température variant de 30 à 70 °C, l'activité optimale a été signalée à pH 9 et 60 °C. Les ions  $\text{Mn}^{2+}$  et les surfactants Triton-X et Tween-80 stimulent l'activité de l'enzyme, mais elle est inhibée par les ions  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{K}^{+}$ .

La bactérie *Bacillus cereus* KK69, isolée de déchets de volaille et cultivée dans un milieu contenant la plume de poulet comme sources de carbone et d'azote, a produit une enzyme ayant un caractère kératinolytique dont l'activité est maximale à 50 °C et pH 9.

La quantification de l'activité kératinolytique dans différentes conditions est généralement intéressante en tant qu'élément clé de la caractérisation ultérieure de la cible. Les méthodes quantitatives permettent une détermination exacte de l'activité protéolytique en phase liquide (spectrophotométrie, fluorimétrie, radiométrie, chromatographie, électrophorèse capillaire et dosages d'immunosorbants liés à une enzyme). L'activité kératinolytique dans les extraits de protéines peut être déterminée en utilisant une variété de substrats chromogènes insolubles (les exemples sont l'azur kératine, l'azocaséine, l'azokératine, etc.). L'extrait enzymatique est généralement mélangé avec la suspension de substrat et incubé à la température appropriée. Ensuite, la centrifugation des échantillons élimine le substrat insoluble et l'absorbance à la longueur d'onde appropriée (280 nm) détecte la libération du produit (colorant)

**Tableau VII** : Diversité des microorganismes kératinolytiques et propriétés de leurs kératinases.

<b>Souche</b>	<b>Nature de kératinase</b>	<b>ph</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Poids KDa</b>	<b>Références</b>
Bacillus sp. NKSP-7	-	5.5 – 9.5	20 - 60	25	[124]
Serratia sp	-	7	37	50	[122]
Bacillus sp N1	-	8	37	-	[109]
Bacillus polyfermenticus B4	-	9	60	-	[104]
Streptomyces malaysiensis	-	8	60	27	[127]
Bacillus subtilis DP1	-	8 - 12	20 - 50	-	[114]
Bacillus subtilis strain PS03.	-	9	40	46	[129]
G.stearothermophilus AD-11	Métallokératinase	9	60	57	[119]
Bacillus amyloliquefaciens 35s	-	9	60	-	[130]
Bacillus licheniformis H-62	-	9.5	40	26	[126]
Bacillus cohnii U3	Kératinase à sérine	9	50	-	[131]
Actinomadura keratinolytic Cpt29	Kératinase à sérine	10	70	29	[132]
Brevibacillus brevis US575	Kératinase à sérine	8	40	29	[133]
Bacillus sp P7	-	9	55	-	[125]

## **Conclusion**

## Conclusion générale

Vue les quantités immense des déchets de plumes de volaille et les effets néfastes sur l'environnement, il y a une demande croissante de méthodes rentables et respectueuses de l'environnement pour la valorisation de ces déchets. Parmi lesquelles, les microorganismes kératinolytiques notamment les bactéries présentent un grand potentiel de transformer les plumes en produits utilisables dans plusieurs domaines.

D'après notre étude réalisée sur les travaux antérieurs, nous concluons que :

- Les bactéries kératinolytiques ont été isolées à partir de différents sites : eaux chaudes, sol pollué par les déchets avicoles, les déchets de plumes de poulets,...
- Plusieurs souches bactériennes ont été utilisées pour la production des enzymes kératinolytiques. Le genre *Bacillus* a un rôle important dans la biotechnologie blanc pour plusieurs raisons, la majorité des espèces sont non pathogènes, généralement reconnues comme sûres (par exemple *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, ...)
- Les plumes de poulets ont été utilisées comme sources de carbone et d'azote
- Il a été démontré que la co-culture (composée de plusieurs espèces bactériennes) conduit à une meilleure dégradation de plumes
- L'optimisation de la production des enzymes kératinolytiques a montré que :
  - Le milieu de culture à base de minéral a été plus utilisé que d'autres milieux
  - La quantité de substrat varie de 1 à 5 % (p/v)
  - Un milieu neutre à alcalin ( pH de 6.5 à 13)
  - La température d'incubation varie de 25 à 60 °C
  - Le temps d'incubation était de 1 à 7 jours
  - L'agitation varie de 150 à 200 rpm

- La caractérisation des enzymes kératinolytiques isolées a montré que :
  - Les kératinases sont plus stables dans des milieux neutres à alcalins (pH 7 à 13).
  - L'activité enzymatique optimale des kératinases extraites dépendent du type des microorganismes mésophiles ou thermophiles.
  - Le poids moléculaires varie de 18 à 280 KDa .

## **Références**



- [1] [http://www.ifmer.org/assets/documents/files/revues\\_maritime/504/9-biotechnologies-marinesGuezennec.pdf](http://www.ifmer.org/assets/documents/files/revues_maritime/504/9-biotechnologies-marinesGuezennec.pdf)
- [2] Wijesekara, I; R. Pangestuti, and S.K. Kima. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*. (2010). 84.pp14-21
- [3] Blunt, J, W.B.R.Copp, M.H.G, Munro, P, T. Northcote and M.R.Prinsep. Marine natural products. *Natural Products*. (2006).23. pp 26-78.
- [4] Bouacem Khelifa, Characterization of Isolated Bacterial Strains From North Algerian Thermal Springs: Study Of Enzymatic Properties. PhD Thesis, Haouari boumediène University of Science and Technology of Algiers (Algeria).(2016).
- [5] Azeredo, L, Lima, M, Coelho, R, Freire, d. Thermophilic protease production by *Streptomyces* sp in submerged and solid state fermentations using feather meal. *Journal of Applied Microbiology*.(2006).100.pp 641-647.
- [6] Neha, S, Alka, G and Omre, R.K. Characterization of chicken feather fibre as novel protein fiber for commercial applications. *International Journal of Tropical Agriculture*.(2015). 33. (4(part III)).pp 3373-3377.
- [7] Gupta, R, Ramnani, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied microbiology and biotechnology*.(2006).70.pp 21–33.
- [8] Chhimpia, S, Yadav, C.S, John, P.J. Isolation and identification of keratin-degrading (keratinolytic) bacteria from poultry feather dumping sites. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*.(2016).8.pp 109-119.
- [9] Morère, J.L, Pujol, R. Dictionnaire raisonné de biologie.(2002).Editions Frison Roche.pp1222.
- [10] Egan, S, Thomas, T and Kjelleberg, S. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*. (2008).11.pp 219-225.

- [11] Hind Zitouni. Nutritional recovery of marine algae from the Algerian coast in ruminant animals using chemical, biological and molecular methods. PhD Thesis. Mentouri Constantine Brothers University,(2015)
- [12] Zusman. D. R, Scott. A. E, Yang. Z & Kirby. J. R. Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nature Reviews Microbiology*.(2007).5.pp 862–872.
- [13] Gómez-Cabrera.C, Ortiz .J.C Loh.W.K.W, Ward.S. Acquisition of symbiotic dinoXagellates (Symbiodinium).juveniles of the coral *Acroporalongicyathus*.(2008).27. pp219-226.
- [14] Garon-Lardiere. S.. Structural study of parietal polysaccharides of the red alga *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). University of Western Brittany. (2004).
- [15] El Gamal, A.A. Biological importance of marine algae.*Saudi Pharmaceutical Journal*. (2010).18(1).pp 1-25.
- [16] Tarik. A . Valorisation of the algal biomass of Morocco: Pharmacological potentialities and Environmental applications, brown algae cases *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata*. Hassan II University – Casablanca. (2011).
- [17] Kaimoussi. A, Mouzdahir.A, Saih. A. Variations saisonnières des teneurs en métaux (Cd, Cu, Fe, Mn et Zn) chez l’algue *Ulva lactuca* prélevée au niveau du littoral de la ville d’El Jadida (Maroc). *Comptes Rendus Biologies*.(2004). 327.pp 361-369.
- [18] Gupta S, Abughannam N. Bioactive potential and possible health effect of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science Technology*.(2011).22.pp 31-326.
- [19] Ortiz. J, Romero. N, Robert. P, Araya . J, Lopez-Hernandez . J, Bozzo.C, Navarrete. E, Osorio. A and Rios.A.. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea Antarctica*. *Food Chem*.(2006).99.pp 98-104.
- [20] Harnedy.Pádraigín ,Richard. J and Fitz.Gerald. Bioactive Proteins, Peptides, and Amino Acids from Macroalgae. *Journal of Phycology*. (2011).2.pp 218-32.
- [21] Zhang.C, Kim.S. K. Application of marine microbial enzymes in the food and pharmaceutical industries. *Advances in Food and Nutrition Research*. 65 .pp 423–435

- [22] Léa Abi nassif. Development and characterization of alginate-based antimicrobial biomaterials for medical and marine applications. University of Western Brittany (2019).
- [23] Grossart.H.P .Ecological consequences of bacterioplanktonlifestyles: changes in concepts are needed. Environmental Microbiology Reports. (2010).2.pp 706–714.
- [24] Backhed. F, Ding. H, Wang. T, Hooper. L. V, Koh. G. Y., Nagy. A, Semenkovich. C. F & Gordon. J. I.The gut microbiota as an environmental Factor that regulates fat storage Proceedinds of the National Academy of Sciences USA.(2004).101.pp 15718–15723.
- [25] Ganesh. S, Parris. D. J, DeLong. E. F & Stewart. F. J. Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone.ISMEJ.(2014).8.pp 187–211.
- [26] Jarrell. K. F & McBride. M. J .The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. Nature Reviews Microbiology.(2008).6.pp 466–476.
- [27] Boney. A.D.A biology of marine algae. Hutchinson on Educational Ltd.London.(1965).
- [28] Ferderle M.J. and Bassler. Interspecies communication in Bacteria .Journal of clinical Microbiology .(2003).112.pp1291-1299.
- [29] Bourne. DG, Garren .M, Work .TM, Rosenberg. E,Smith .GW et Harvell. CD .Microbial disease and the coral holobiont.Trends in Microbiology. (2009).12.pp 554-562.
- [30] Goecke. F, Labes. A, Wiese.J ,Imhoff. JF . Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria .Marine Ecology Progress Series. (2010). 409.pp 267-300.
- [31] Guan. C, Guo. X, Cai. G,Zhang. H, Li. Y, Zheng. W &Zheng.T.Novelalgicidal evidence of a bacterium *Bacillus sp.* LP-10 killing *Phaeocystisglobose*, a Harmful algal bloom causing species.BiolControl .76.pp 79–86.
- [32] Hallsworth. J. E, Yakimov. M. M ,Golyshin, P. N. Limits of life in MgCl<sub>2</sub>- containing environments: chaotropicity defines the window.Environ. Microbiol. (2007).9.pp 801–813.
- [33] Stéphane La Barre and Dominique Haras. Encounters with marine bacteria.Journal de la Société de Biologie.(2007).201 (3) .pp 281-289.

- [34] Su .J. Q, Yang. X. R, Zheng. T. L, Tian. Y, Jiao.N. Z, Cai. L. Z ,Hong.H. S. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarensis*. *Harmful Algae* .(2007).6.pp 799–810.
- [35] Legrand.C, Rengefors. K, Fistarol. G. O ,Graneli. E. Allelopathy In phytoplankton-biochemical, ecological and evolutionary aspects.*Phycologia*. (2003) .42.pp 406–419.
- [36] Senhorinh. G. N. A, Ross. G. M, Scott. J. A. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics. *Phycologia*. (2015).54.pp 271–282.
- [37] Henderson. G. P, Gan, L and Jensen. G. J .3-D ultrastructure of *Ostreococcus tauri*: electron cryotomography of an entire eukaryotic cell. 2(8).p 749.
- [38] Iglesias-Rodriguez. M. D, Buitenhuis. E. T and Raven. J. A. Response to comment on “Phytoplankton calcification in a high-CO<sub>2</sub> world” .*Science*.(2008).322.p1466.
- [39] Riebesell. U, Schulz. K. G and Bellerby. R. G. J. Enhanced biological carbon consumption in a high CO<sub>2</sub> ocean. *Nature*.(2007).450.pp 545–548.
- [40] Lip.J. S ,Morono. Y, Inagaki. F and Hinrichs.K. U. Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments.*Nature*.(2008).454.pp 991–994.
- [41] Petra Philipps-Wiemann . Chapter 12 - Proteases - general aspects; Enzymes in human and animal nutrition.(2018). pp 257-266.
- [42] Lígia Maria Gonçalves Fernandes . Márcia Nieves ,Carneiro da Cunha ,Jônatas de Carvalho ,Silva Ana Lúcia Figueiredo Porto ,Tatiana Souza Porto ,Purification and characterization of a new protease *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 extracted by two-phase aqueous systems PEG / citrate. *Journal of Molecular Liquids*.(2020).
- [43] Mala B.R, Aparna M.T, Mohini S.G, Vasanti V.D. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.*Microbiology and Molecular Biology Reviews*.(1998).62. pp 597-635 .
- [44] MEUNIER N. Evaluation of the production potential of bacterial proteases from municipal sewage sludge. Master thesis. INRS-Eau.(1999). Université du Québec, Canada, volume 168.

- [45] Ahmad Homaei, Fatemeh Lavajoo, Reyhaneh Sariri. Development of marine biotechnology as a resource for new proteases and their role in modern biotechnology. *International Journal of Biological Macromolecules*. (2016). 88, pp 542-552.
- [46] Habbeche Amina . Purification and characterization of a thermostable keratin KERAK-29 in a new strain of Actinomycete .(2014). Doctoral thesis, Badji Mokhtar Annaba University..
- [47] Noora Barzkar . Marine Microbial Alkaline Protease: an efficient and indispensable tool for various industrial applications. *Journal international des macromolécules biologiques*. (2020). 161. pp 1216-1229.
- [48]. Yewande Suberu , Idowu Akande , Titilola Samuel , Adekunle Lawal , Ademola Olaniran. Optimization of protease production in native *Bacillus* species isolated from soil samples in Lagos, Nigeria, using response surface methodology. *Biocatalysis and agricultural biotechnology* (2019). 18.
- [49] Juliana Cotabarren , Daniela Lufrano , Mónica Graciela, Parisi Walter, David Obregón . Biotechnology, biomedical and agronomic applications of high stability plant protease inhibitors: a systematic review. *Plant science*. (2020). pp292.
- [50] Neha Srivastava, P.K. Mishra, S.N. Upadhyay. Proteases: an unexplored enzyme for biomass conversion; *Industrial enzymes for biofuel production* (2020). pp 159-181.
- [51] Mathieu D. Study of the production of alkaline proteases by *Bacillus licheniformis* using municipal sewage sludge as a substrate. *Memoir of Métrise. INRS-Eau Université du Québec, Canada*., 2005
- [ 52 ] ] M B Rao 1, A M Tanksale, M S Ghatge, V V Deshpande, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, volume 62, pp 597-625.
- [53] Sonia Hamiche , Sondes Mechri , Lamia Khelouia, Rachid Annane , Mohamed El Hattab, Abdelmalek Badis , Bassem Jaouadi . Purification and biochemical characterization of two *Bacillus amyloliquefaciens* S13 keratins isolated from *Zonariatournefortii* marine brown algae with potential activities of keratin biodegradation and non-depilation . *International Journal of Biological Macromolecules*.(2019).122, pp758-769.

- [54] Sandleen Feroz ,Nawshad Muhammad ,Jithendra Ratnayake ,George Dias. Keratin-based materials for biomedical applications.Bioactive materials. (2020). 5.pp 496-509.
- [55] Jingwen Qiu, Casper Wilkens, Kristian Barrett, Anne S. Meyer. Enzymes microbiennes catalysant la dégradation de la kératine : classification, structure, fonction.Progrès de la biotechnologie.(2020).44.
- [56] Mohammad M. Hassana,Christopher M, .A review of the sustainable methods in imparting shrink resistance towool fabrics.Journal of Advanced Research.(2019).pp39-60.
- [57] Hermann H.B., Dominique G.H. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia.,Journal of Anatomy.(2009). 214. pp 516-559.
- [58] Mduduzi Khumalo,Bruce Sithole,Tamrat Tesfaye. Recovery of waste chicken feathers: Optimization of the extraction of keratin from waste chicken feathers by sodium bisulfite, sodium dodecylsulfate and urea.Journal of Environmental Management.(2020).262.
- [59] Giulia Suarato ,Marco Contardi ,Giovanni Perotto ,Jose 'A. Heredia-Guerrero ,Fabrizio Fiorentini ,Luca Ceseracciu ,Cataldo Pignatelli ,Doriana Debellis ,Rosalia Bertorelli ,Athanasia Athanassiou, From fabric to fabric: Keratin wool biocomposite fibres/ polyvinylpyrrolidone recovered as artificial scaffolding platform, Science and materials engineering: C . (2020). 116 .
- [60] Célia F. Cruz Nuno G. Azoia Teresa Matamá Artur Cavaco-Paulo . Peptide-protein interactions in keratins in human hair.International Journal of Biological Macromolecules. ( 2017). 101.pp 805-814.
- [61] Alessia Patrucco ,Livia Visai ,Lorenzo Fassina ,Giovanni Magenes ,Claudio Tonin. Chapter 12 - Dies based on keratin from wool fibres and human hair. Materials for biomedical engineering. (2019).pp 375-403.
- [62] Quanbin Zhang ,Guanghua Shan ,Ping Cao ,Jia He ,Zhongshi Lin ,Yaoxiong Huang ,NingjianAo. Mechanical and biological properties of oxidized horn keratin. Materials Science and Engineering: C, (2015) .47 .pp123-134.

- [63] Olajumoke D.Fagbemi , Bruce Sithole ,TamratTesfaye . Optimization of extraction of keratin proteins from chicken feather waste by hybrid pretreatment techniques. Sustainable Chemistry and Pharmacy.(2020). 17.
- [64. ] Pintubala Kshetri ,Subhra Saikat Roy ,Shamj et shabam Babeeta Chanu ,ThangjamSurchandra Singh ,K. Tamreihao ,SusheelKumar Sharma ,Meraj Alam Ansari ,Narendra Prakash . Valorisation des déchets de plumes de poulet en hydrolysate de kératine bioactif par une kératinase nouvellement purifiée de Bacillus sp. RCM-SSR-102. Journal of Environmental Management (2020).273.
- [65] Satish Chandra Pandey ,VeniPande ,Diksha Sati ,SaurabhGangola ,SaurabhKumar ,Anupam Pandey ,Mukesh Samant . Chapter 13 - Microbial Keranasis: A Tool for Feather Waste Bioremediation. Intelligent Bioremediation Technologies.(2019). pp.217-253.
- [66 ] Binti Srivastava ,Madhu Khatri ,Gursharan Singh ,Shailendra KumarArya. Microbial keranases: an overview of biochemical characterization and its ecological approach for industrial applications.Journal of cleaner production. (2020). 252.
- [67] Pankaj Dipankar , Chandra Bhan . Chapter 5 - The Role of Keratin in the Bioremediation of Feathers and Hairs. Smart Bioremediation Technologies.(2019). pp 83-98.
- [68] D. Kothari ,A. Rani ,A. Goyal . 19 – Keratinases: Current developments in biotechnology and bio-engineering Production, insulation and purification of industrial products. pp 447 - 469.
- [69] S.Parte,V.L.Sirisha,J.S.D'Souza . Chapter Four - Biotechnology Applications of Marine Enzymes from Algae, Bacteria, Fungi and Sponges. Advances in Food and Nutrition Research.(2017). 80.pp 75-106.
- [70] Mohamed A. Hassan ,DeyaaAbol-Fotouh ,Ahmed M. Omer , Tamer M. Tamer, Eman Abbas. Comprehensive information on microbial keratinases and their implications in various biotechnology and industrial sectors. International Journal of Biological Macromolecules.(2020).
- [71] Sahoo. DK, Thatoi .HN, Mitra .B, et al. Advances in microbial keratinase and its potential applications. In: Patra J, Vishnuprasad C, Das G, eds. Microbial Bio-technology ,Singapore.(2017). pp105-133.

- [72] Matikevičienė, V., D. Masiliūnienė, and S. Grigiškis. Degradation Of Keratin Containing Wastes By Bacteria With Keratinolytic Activity. Proceedings of the 7th International Scientific and Practical Conference. Rēzeknes Augstskola, Rēzekne, RA Izdevniecība. (2009).
- [73] Han, M., W. Luo, Q. Gu., and X. Yu. Isolation and Characterization Of A Keratinolytic Protease From A Feather-Degrading Bacterium *Pseudomonas Aeruginosa C11*. African Journal of Microbiology Research. (2012). 6. pp 2211-2221.
- [74] Laskhmi P.J, Ch. M. K. Chitturi, and V. V. Lakshmi . Efficient Degradation of Feather by Keratinase Producing *Bacillus sp.* International Journal of Microbiology. (2013). 7.
- [75] Mazotto, A. M., R. R. R. Coelho, S. M. L. Cedrola, M.F. de Lima., S. Couri, E. P. de Souza, and A. B. Vemelho. Keratinase Production by Three *Bacillus spp.* Using Feather Meal and Whole Feather as Substrate in a Submerged Fermentation. Enzyme Research. (2011).
- [76] Mousavi, S., M. Salouti, R. Shapoury, and Z. Heidari. Research Article: Optimization of Keratinase Production for Feather Degradation by *Bacillus subtilis* Jundishapur. Journal of Microbiology. (2013). 6. p 7160.
- [77] Acda M.N. Waste chicken feather as reinforcement in cementbonded composites. Philippine Journal of Science. (2010). 139. pp 161-166.
- [78] Zerdani H.I, Faid M, and Malki A. Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus sp* in Morocco. African Journal of Biotechnology. (2004). 3. pp 67-70.
- [79] Marcondes N. R., C. L. Taira, D. C. Vandresen, T. I. E. Svidzinski, M. K. Kadowaki, and R. M. Peralta. New featherdegrading filamentous fungi. Microbial Ecology. (2008). 56. pp 13-17.
- [80] Ali, T.H., Nadia H. A., and Latifa A. M. Production, Purification and Some Properties of Extracellular Keratinase from Feathers-Degradation by *Aspergillus oryzae* NRRL-447. Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation. (2011). 6. pp 123-136.
- [81] Kanmani P, Karuppasamy P, Pothiraj C. and Venkatesan A. Studies On Lignocellulose Biodegradation of Coir Waste in Solid State Fermentation Using *Phanerocheate chrysosporium* and *Rhizopus stolonifer*. African Journal of Biotechnology. (2011). 8. pp 6880-6887.



- [82] Agrahari, S. Production Of Extracellular Keratinase Enzymes From *Bacillus Pumilis* Sn3 Isolated From Soil Sample Of Ghazipur Poultry Waste Site. Special Issue of International Journal of Sustainable Development and Green Economics (IJS DGE).(2013).2.pp 2315-4721.
- [83] Randelli. A, Daroit. D.J, Riff el. A. Biochemical features of mikroba keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*.(2010).85. pp 1735-1750.
- [84] Gumilar. J, Yusiati. L. M, Pertiwiningrum. M,Nakagawa.T, Triatmojo.S. A Novel Extracellular Keratinase From *Exiguobacterium* Sp. Dg1: Enzyme Production And Dehairing Application. *Leather and Footwear Journal*.(2017).pp 209-216.
- [85] Pandian. S, Sundaram. J, Panchatcharam. P. Isolation, identification and characterization of feather degrading bacteria.*European Journal Experimental Biology*.(2012).2(1).pp274-282.
- [86] Khodayari. S and Kafilzadeh. F. Separating Keratinase Producer Bacteria from the Soil of Poultry Farms and Optimization of the Conditions for Maximum Enzyme Production. *European Journal of Experimental Biology*.(2018).8.
- [87] Yue. X, Zhang. B, Zou1. J, Chen .W and Yang. N. Characterization of a new bacterium with high alkaline keratinase activity from *Calotes versicolor* feces.*Journal of Biotech Research*.(2017). 8.pp 83-92
- [88] Alahyaribeik.S, Davood.Sharifi.S, FTabandeh.F, Honarbakhsh.S, Ghazanfari.S. Bioconversion of chicken feather wastes by keratinolytic bacteria.*Process Safety and Environmental Protection*.(2020).13.pp 171-178.
- [89] Mursheda .A , Marzan. L. W, Akter .Y and Shimizu .K. Microbial Bioremediation of Feather Waste for Keratinase Production: An Outstanding Solution for Leather Dehairing in Tanneries.*Microbiology Insights*.(2020).13.pp 1–12.
- [90] Reddy L.V.A., Wee Y-J., Yun J-S. and Ryu H-W.Optimization of alkaline protease production by butch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches .*Bioresource Technology*.(2008). 99.pp 2242-2249.
- [91] Cheng S.-W., Wang Y.-F. and Wanga M.-L. Statistical Optimization of medium compositions for alkaline protease production by newly isolated *Bacillus*

---

amyloliquefaciens. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*.(2012).26(3). pp 225–231.

[92] Beg. Q. K, Sahai.V and Gupta.R. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochemistry*.(2003).39. pp203-209.

[93] Chi. Z, Ma. C, Wang. P and Li H. F. Optimization of medium cultivation conditions for alkaline production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* *Bioresource Technology*.(2007). 98.pp 534- 538.

[94] Rathakrishnan. P and Nagarajan .P. Optimization of the production of protease by *Bacillus cereus* with response surface methodology using groundnut shell. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*.(2013). 3(2).pp 200-209.

[95] Bharti. A and Mittal. D. Screening and Characterisation of Keratinase Enzyme Obtained From Keratin Degrading Microorganism Isolated From Sanjan Poultry Waste Dumping Soil. *European Academic Research*.(2015).2.

[96] Sharma. H. J, Nongthombam. A, Khuraijam .M, Yaiphaba .Laishram. Isolation and screening of keratinolytic bacteria from the poultry feather dumped soil of ICAR-NEH region, Imphal centre. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*.(2018).6.pp 35-38.

[97] Mursheda. A , Marzan. L. W, Akter .Y and Shimizu K. Microbial Bioremediation of Feather Waste for Keratinase Production: An Outstanding Solution for Leather Dehairing in Tanneries. *Microbiology Insights*.(2020). 13. pp 1–12.

[98] Laba .W , Żarowska. B, Chorążyk .D, Pudło .A, Piegza . .M, Kancelista.A and Kopeć W. New keratinolytic bacteria in valorization of chicken feather waste. *AMB Express* 24. (2018).8(1).p 9.

[99] Pant. G, Prakash. A, Pavani .J.V.P, Bera. S, Devirama. G.V.N.S, Kumara. A, Panchpurib. M, Prasuna. R.G. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*.(2015).9.pp 50–55.

[100] Prakash.P, Jayalakshmi. S.K, Sreeramulu, K. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain ppks-2: partial characterization and its applica"

---

on in feather degradation and dehairing of the goat skin .Applied Biochemistry and Biotechnology.(2010).160.pp 1909–1920.

[101] Tiwary, E., Gupta, R., Medium op" mi-za" on for a novel 58 kDa dimeric kera" nase from *Bacillus licheniformis* ER-15: Biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides. Bioresource Technology.(2010).101 .pp 6103–6110.

[102] Riffel. A, Lucas. F, Heeb. P, Brandelli.A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin.Archives of Microbiology .(2003). 179. pp 258–265.

[103] Prakash. B, Sourabh .Z, Rajesh. R, Mashitah .M. Y. Mohd Hasbi Ab R and Natanamurugaraj G. Isolation, Characterization and Partial Purification of Keratinase from Keratinolytic Bacteria. Scholar Journal of Applied Sciences and Research .(2018).1.p 6.

[104] Dong. Y. Z, Chang. W. S and Chen. P. T.Characterization and over expression of a novel keratinase from *Bacillus polyfermenticus* B4 in recombinant *Bacillus subtilis*. Bioresour Bioprocess.(2017).4.p 47.

[105] Laba .W, Choinska. A, Rodziewicz. A, Piegza. M . Keratinolytic abilities of *Micrococcus luteus* from poultry waste. Brazilian Journal of Microbiology.(2015).46(3). pp 691-700.

[106] Wang. L, Qian.Y, Cao. Y, Huang. Y, Chang. Z, Huang. H. Production and characterization of keratinolytic proteases by a chicken feather-degrading thermophilic strain, *Thermoactinomyces sp.YT06*.Journal of Microbiology and Biotechnology.(2017).27. pp 2190–2198.

[107] Uttangi .V, Aruna .K. Optimization of production and partial characterization of keratinase produced by *Bacillus thuringiensis* strain Bt407 isolated from poultry soil.Intenational Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.(2018).7(4).pp 596–626.

[108] Kumar .M, Kumar. R and Kumar D. M. Keratin degradation by bacterial strain isolated from poultry farm soil. Journal of Pharmacy Research.(2016).10(2).pp 113-115.

- [109] Suharti.D R Tyas and N R Nilamsari. Isolation and characterization of a newlykeratinase producing *Bacillus* sp N1 from tofuliquid waste. IOP Conf Ser: Earth Environ.Sci.(2019).
- [110] Yusuf I. Garba L, Shehu. MA, Oyiza .AM, Kabir. MR et al. Selective biodegradation of recalcitrant black chicken feathers by a newly isolated thermotolerant bacterium *Pseudochrobactrum* sp. IY-BUK1 for enhanced production of keratinase and protein-rich hydrolysates. International Microbiology.(2019).pp 1-12.
- [111] Ma. Y, Ke. X , Li. X, Shu. W, Yang .W, Liu. Y, Yan.,X, Jia.L, Yan. H.. Expression and characterization of a keratinase encoding gene gm2886 in *Streptomyces pactum* ACT12 strain. Sheng wu gong cheng xue bao.Chinese Journal of Biotechnology.(2017). 33. pp 1968–1978.
- [112] Ramakrishna Reddy. M, Sathi Reddy. K, Ranjita Chouhan. Y, Bee. H, Reddy .G . Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive.Bioresour Technol.(2017). 243.pp 254-263.
- [113] Wu. W.L, Chen. M.Y, Tu. I.F, Lin. Y.C, Eswarkumar. N, Chen. M.Y, Ho.M.C, Wu. S.H. The discovery of novel heat-stable keratinases from *Meiothermus taiwanensis* WR-220 and other extremophiles. Scientific Reports.(2017). 7. pp 1–12.
- [114] Sanghvi.G, Patel.H, Vaishnav.D, Oza.T, Dav.G, Kunjadia.P.. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. Internationa Journal Biological Macromolecules.(2016).87.pp 256- 262.
- [115] Yang. L, Wang.H, Lv. Y, Bai. Y, Luo. H, Shi. P, Huang. H, Yao. B. Construction of a rapid feather-degrading bacterium by overexpression of a highly efficient alkaline k eratinase in its parent strain *Bacillus amyloliquefaciens* K11.Journal Agric Food Chem.(2016). 64. pp 78–84.
- [116] Jankiewicz.U, Larkowska.E, Brzezinska.M.S. Production, characterization, gene cloning, and nematocidal activity of the extracellular protease from *Stenotrophomonas maltophilia* N4. Journal Biosci Bioeng. (2016).121.pp 614–618.

- 
- [117] Wang.B, Yang. W, McKittrick. J, Meyers.M.A. Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Prog Mater Sci.* (2016).76.pp 229–318.
- [118] Chen. X, Zhou. B, Xu. M, Huang. Z, Jia. G, Zhao. H, Liu. G. Prokaryotic expression and characterization of a keratinolytic protease from *Aspergillus Niger*. *Biol.*(2015). 70: 157–164.
- [119] Gegeckas. A, Gudiukaite. R, Debski. J, Citavicius. D. Keratinous waste decomposition and peptide production by keratinase from *Geobacillus stearothermophilus AD-11*. *International Journal Biological Macromolecules.*(2015). 75.pp 158–165.
- [120] Fang. Z, Zhang. J, Liu. B, Jiang. L, Du. G, Chen. J. Cloning, heterologous expression and characterization of two keratinases from *Stenotrophomonas maltophilia BBE11-1*. *Process Biochemistry.*(2014).9.pp 647–654.
- [121] Peng. Z, Mao. X, Zhang. J, Du .G and Chen. J. Effective biodegradation of chicken feather waste by co-cultivation of keratinase producing strains. *Microbial Cell Factories.*(2019).18.pp 84.
- [122] Yogananda Murthy .V. N, Murulidhara .V. N and Mariswamy .M. Production and Purification of Keratinase Enzyme from *Serratia* sp. Isolated from Poultry Wastes. *Journal of Applied Science.*(2019). 19.pp 789-796.
- [123] Jin .M, Chen. C, He. X and Zeng .R. Characterization of an extreme alkaline-stable keratinase from the draft genome of feather-degrading *Bacillus* sp. *JM7* from deep-sea. *Acta Oceanologica Sinica.*(2019). 38 .pp 78-95.
- [124] Akram .F, ul Haq. A and Jabbar. Z. Production and characterization of a novel thermo- and detergent stable keratinase from *Bacillus* sp. NKSP-7 with perceptible applications in leather processing and laundry industries. *International Journal of Biological Macromolecules.* (2020).164.pp 371-383.
- [125] Paula . A. F, Corrêa .D. J and Brandelli .D. A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. *International Biodeterioration & Biodegradation.*(2010).64.pp 1-6.

- [126] Kazzaz. A. E, Hosseinpour Feizi .Z and Korkmaz Guvenmez .H. Keratinolytic Protease Production And Characterization From *Bacillus Sp.* Isolated From Poultry Wastes. International Journal of Applied Biology And Pharmaceutical Technology.(2015) 6 .pp 63-73.
- [127] Pavani. M, Girijasankar .G, Mallika. K And G. Vidhya Sagar .Purification And Molecular Weight Determination Of Keratinase Isolated From *Streptomyces Malaysiensis*. International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. (2017).9.pp 154-158.
- [128] Gupta.R,Ramnani.v.Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Applied Microbiology and Biotechnology.(2006).70.pp 21-33.
- [129] BalaKumaran .M. D and Santhi. R. Keratinolytic Protease Production By *Bacillus Cereus Strain Ps03* Under Submerged Fermentation: Optimization And Characterization. International Journal of Applied Sciences and Biotechnology.(2016).4(3).pp 397-401.
- [130] Refaat Nassar .F, Abdelwahab Abdelhafez .A, Said El-Tayeb .T and Hashem Abu-Hussein S.Purification, Characterization and Applications of Proteases Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 35s Isolated from Soil of the Nile Delta of Egypt.British Microbiology Research Journal .(2015).6(5).pp 286-302.
- [131] Dudhgara. P.R, Sunil. B, Anjana. G. Hide dehairing and laundry detergent compatibility testing of thermostable and solvents tolerant alkaline protease from hot spring isolate *Bacillus cohniiU3*. OnLine Journal of Biological Sciences.(2015).15(3).p 152.
- [132] Habbeche. A, Saoudi. B, Jaouadi. B, Haberra. S, Kerouaz. B , Boudelaa, M, Badis. A, Ladjama. A. Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost.Journal of Bioscience and Bioengineering.(2014). 117(4).pp 413-21.
- [133] Zaráî Jaouadi, N, Rekik. H, Badis. A, Trabelsi. S, Belhoul. M, Yahiaoui.A.B, Aicha.H.B, Toumi. A, Bejar. S, Jaouadi. B. Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities.Plos One.(2013). 8(10).p76722.