

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahlab Blida 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procèdes

Mémoire de Fin d'Etudes
En vue de l'obtention du diplôme de
MASTER EN GENIE DES PROCEDES
Spécialité : Génie de l'Environnement



THEME

**Production de la kératine et ses dérivés par le
recyclage d'agrodéchets *via* des traitements
microbiens**

Présenté par :

AHMED MESSAOUD Sara

BOUNATIRO Nesrine

LOUDDANI Selma

Encadré par :

Pr.Badis Abdelmalek

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

Avant tout nous remercions ALLAH le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous voudrions dans un premier temps remercier, notre promoteur Badis Abdelmalek, Professeur à l'université de Saad Dahleb Blida 1, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre formation.

Nous remercions également notre Co-promotrice Mme Hadjala Soumia, doctorante au sein de l'équipe de biomolécules du laboratoire de recherche de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules à l'université Saad Dahlab Blida 1 qui nous a beaucoup aidé à la réalisation de l'application et le suivi de toutes les étapes expérimentales.

Nos sincères considérations et nos vifs remerciements vont également aux membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce modeste mémoire de fin d'études.

Nous remercions tous les enseignants de notre cursus universitaire qui ont contribué à notre formation.

Nos vifs remerciements vont également, à tout le personnel du laboratoire de recherche de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules, université Saad Dahlab Blida 1 ainsi qu'à tous les laboratoires pédagogiques de département de génies des procédés à l'université Saad Dahlab Blida 1.

Nous remercions également toute l'équipe pédagogique de l'université de Saad Dahlab Blida-1 et les intervenants professionnels responsables de notre formation

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents.

À ma merveilleuse mère au cœur bienveillant et une personne pas comme les autres au monde, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Je lui dois une fière chandelle. Et à l'homme le meilleur et le plus pur du monde, mon cher père J'espère toujours rester fidèle aux valeurs morales que Vous m'avez apprises.

A mes chers frères et ma sœur.

A ma tante, et oncles, Pour l'affection, la tendresse et l'amour dont vous m'avez toujours entouré, Pour l'encouragement sans limites que vous ne cessez de manifester.

A tous mes amies et ma binôme NESRINE et mes collègues plus

Particulièrement les étudiants de génie de l'environnement

Souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés Ensemble.

A toute personne qui occupe une place dans mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui ont participé à ma réussite

Sara

Dédicaces

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 côtés 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 mes chères sœurs MERIEM ET WISSAM 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 ma binôme et mon amie SARA 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 à tous ceux que j'aime.

A mes collègues plus particulièrement les étudiants de génie de l'environnement.

A toute personne qui occupe une place dans mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui ont participé à ma réussite

Nesrine

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie

A mes chères sœurs et frères, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protégé et vous garde.

A mes très chers amis je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de succès et de bonheur.

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

Selma

ملخص:

يركز هذا العمل على المساهمة في استعادة المخلفات الزراعية من خلال إنتاج منتجات ذات قيمة مضافة عالية.

ريش الدواجن، المكون من أكثر من 90% من البروتينات من نوع الكراتين، تمت إذابته وتحلله جرثومياً لإنتاج تحلل الكراتين. تم جمع الريش من المسالخ بمنطقة البلدية وغسلها بالماء والمنظفات ثم جفف عند 170 درجة مئوية للتخلص من الروائح الكريهة والمخلفات.

تم الحصول على محلل الكراتين بواسطة سلالات من جنس العسوية التي تم تربيتها في وسط مغمور، يحتوي على مسحوق ريش كمصدر وحيد للكربون والنيتروجين، تم تحضينه عند 37 درجة مئوية لمدة ثلاثة (3) أيام. يتم تقدير إنتاج الإنزيم بمعايرة نشاط الكيراتيناز. أظهرت النتائج أعطت فعالية أفضل وصلت إلى 437.2 وحدة / مل بعد اليوم الثالث من التخمير. CP22 المتحصل عليها أن السلالة

إن التحلل المائي الذي تم الحصول عليه غني بالأحماض الأمينية الأساسية، ولا سيما سلاسل السيستين والبيبتيد القصيرة، مما أدى إلى تطبيق ناجح في مستحضرات التجميل لتصنيع الشامبو الذي يعتمد على تحلل الكراتين. المنتج النهائي يتوافق مع التحكم الميكروبيولوجي والفيزيائي الكيميائي لمختبر فينوس (البلدية).

الكلمات المفتاحية: هيدروليبستي، كراتين، سلالة بكتيرية، نفايات زراعية، تطبيق تجميلي، شامبو

Résumé :

Le présent travail porte sur une contribution à la valorisation des agrodéchets en produisant des produits de haute valeur ajoutée dont les plumes de volailles, constituées de plus de 90% de protéines de type kératine, ont été solubilisées et hydrolysées par voie bactériologique pour la production de l'hydrolysate de kératine. Les plumes ont été collectées à partir d'abattoir de la région de Blida et lavées puis séchées à 170 °C afin d'éliminer les odeurs désagréables et les résidus. L'hydrolysate de kératine a été obtenu par des souches de genre *Bacillus* qui sont cultivées en milieu submergé, contenant la farine de plume comme seule source de carbone et d'azote, incubée à 37 °C pendant trois jours. La production de l'enzyme est estimée par le dosage de l'activité kératinase.

Les résultats obtenus ont révélé que la souche CP22 a donné une meilleure activité atteignant 437.2 U/mL au bout du troisième jour de fermentation. L'hydrolysate obtenu est riche en acides aminés essentiels, en particulier la cystéine et de courtes chaînes peptidiques, ce qui a amené à une application réussite en cosmétique pour la fabrication d'un shampoing à base d'hydrolysate de kératine. Le produit fini est conforme selon le contrôle microbiologique et physicochimique du laboratoire VENUS (Blida).

Mots clés : Hydrolysate, Kératine, Souche bactérienne, Agrodéchets, Application cosmétique, Shampoing.

Abstract:

This work focuses on a contribution to the recovery of agro-waste by producing high value-added products whose poultry feathers, made up of more than 90% of keratin-type proteins, have been solubilized and hydrolyzed bacteriologically for the production of keratin hydrolysate. The feathers were collected from slaughterhouses in the Blida region and washed and then dried at 170 °C to remove unpleasant odors and residue. The keratin hydrolysate was obtained by strains of the *Bacillus* genus which are cultured in a submerged medium, containing feather meal as the sole source of carbon and nitrogen, incubated at 37 °C for three days. The production of the enzyme is estimated by assaying the keratinase activity. The results obtained revealed that the CP22 strain gave better activity reaching 437.2 U/mL after the third day of fermentation. The obtained hydrolysate is rich in essential amino acids, in particular cysteine and short peptide chains, which has led to a successful application in cosmetics for the manufacture of a shampoo based on keratin hydrolysate. The finished product complies with the microbiological and physicochemical control of the VENUS laboratory (Blida).

Keywords: Hydrolysate, Keratin, Bacterial strain, Agro-waste, Cosmetic application, Shampoo.

Liste des figures

2.1 Préparation de shampoing.....	27
3.1 Histogramme de dosage enzymatique.....	34

Liste des tableaux

Partie bibliographique

1.1. Comparaison de la composition en acides aminés entre les kératines de cheveux humains, des plumes, et de la laine.....	7
1.2. Une comparaison entre - et -kératine basée sur leur structure et leur distribution	9
2.1. Pourcentage des acides aminés dans les fibres kératiniques des plumes de Poulet	14
3.1- Producteurs notables de kératinases microbiennes.....	20

Partie expérimentale

Tableau 2.1 : les ingrédients du shampoing et leurs quantités.....	26
Tableau 3.1 : Résultats de la caractérisation de la farine de plumes et la kératine.....	30
Tableau 3.2 : Composition d'hydrolysate de la kératine issu de l'activité bactérienne des souches locales (souche S13 étudiée par notre équipe de LCSNBioMol, Université Blida 1).	33
Tableau 3.3 : Résultats de dosage enzymatiques.....	33
Tableau 3.4 : Comparaison des activités kératinolitiques.....	35
Tableau 3.5 : Résultats du contrôle microbiologique de produit fini et HK.....	36
Tableau 3.6 : Résultats du contrôle organoleptique de produit fini.....	37
Tableau 3.7 : Résultats du contrôle physico-chimique des produits semi finis et finis.....	38

Liste des abréviations

COV : Composés Organiques Volatils

DO : Densité Optique

FAO : The Food and Agriculture Organization / L'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture

FI : Filment Intermédiaire

HCL : Chlorure d'Hydrogène

KDa : kilodalton

K₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de potassium

KH₂PO₄ : Phosphate de potassium monobasique

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

NaCl : Chlorure de Sodium

NaOH : Hydroxyde de Sodium

NH₄Cl : Chlorure d'Ammonium

Nm : Nanomètre

pH : potentiel Hydrogène

PM : Poids moléculaire

Prion PrPSC : Prion protéine scrapie

SSF : Solid state fermentation / Fermentation à l'état solide

Tris : Trisaminomethane

TCA : Acide Trichloroacétique

Sommaire

Résumé\abstract\ملخص

Remerciements

Table des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction Générale.....1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur la kératine et ses applications

1.1. Histoire de kératine.....4

1.2. Définition de la kératine.....5

1.3. Le rôle de la kératine.....5

1.4. Structure de la kératine.....5

1.5. Source de kératine.....6

1.5.1. Kératine de cheveu.....6

1.5.2. Kératine de plume.....6

1.5.3. Kératine d'ongle.....8

1.5.4. Kératine de bec.....8

1.5.5. Kératine de corne.....8

1.5.6. Kératine de la laine.....8

1.6. Type de kératine.....8

1.6.1. Alpha kératine (α -kératine).....8

1.6.2. Bêta kératines (β -kératine).....9

1.7. Diverses méthodes utilisées pour la production de kératine et dégradation.....9

1.7.1. Hydrolyse des kératines par des cultures bactériennes.....9

1.7.2. Production de kératine par hydrolyse alcaline.....10

1.7.3. Fermentation à l'état solide (SSF) pour la dégradation de kératine.....10

1.8. Domaines d'application de la kératine.....10

1.8.1. Domaine médicale.....10

1.8.2. Domaine cosmétique.....	11
1.8.3. Domaine environnementale.....	12
1.8.4. Domaine pharmaceutique.....	12

Chapitre 2: Les plumes de volaille, agrodéchets riche en kératine

2.1. Définition de plume de volaille.....	13
2.2. Composition de plume.....	13
2.3. La production mondiale de volaille.....	14
2.4. Les déchets de plumes.....	15
2.5. Valorisation des plumes de volailles.....	15

Chapitre 3 : Kératinases, mise en application en industrie cosmétique, pharmaceutique et agroalimentaire

3.1. Introduction.....	16
3.2. Sources de kératinases microbiennes.....	17
3.2.1. Les champignons dématophytes.....	17
3.2.2. Les actinomyces.....	18
3.2.3. Bactéries de Gram-positives et Gram-négatives.....	18
3.3. Propriétés des protéases dégradant la kératine (Kératinases).....	18
3.4. Traitement microbien de la farine de plume : Faisabilité pour des applications biotechnologiques.....	19
3.5. Écologie des micro-organismes dégradant la kératine.....	20

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Object.....	20
--------------------	-----------

1. Matériel

1.1 Matériel biologique.....	20
1.2 Matériel non biologique.....	20

2. Méthodes

2.1. Production de la farine de plume	21
2.2. Production de la kératine	22
2.3. Production de l'hydrolysate de kératine	23

2.4. Préparation et fabrication de shampoing.	25
Résultats	30
Discussion	39
Conclusion	41
Bibliographie	49
ANNEXES	48

Introduction générale

Les plumes sont des sous-produits de l'industrie de transformation de la volaille et qui sont produites en grande quantité. Dans le monde, 24 milliards de poulets sont consommés chaque année et environ 8,5 milliards de tonnes de plumes de volaille sont produites. [1]

Ces énormes déchets sont souvent incinérés, enfouis dans des décharges ou recyclés en aliments pour animaux. Cependant, ces modes d'élimination sont restreints et génèrent des gaz à effet de serre dangereux pour l'environnement. La recherche des voies de valorisations de ces déchets nobles est une nécessité pour produire des matériaux verts de bon marché, biodégradables, durables, renouvelables et disponibles en abondance. [2]

Par ailleurs, ce sont des ressources renouvelables très riches en kératine : un type de protéines rigides et fibreuses également présentes dans les phanères des animaux (cheveux, cornes, sabots et ongles). La kératine des plumes est une protéine unique qui a une haute teneur en cystéine d'environ (7 à 13%) contenant des groupes -SH responsables de la liaison soufre-soufre (disulfure) dans la kératine. [2]

La protéine de kératine obtenue à partir d'autres biomasses telles que les ongles, les cheveux, les cornes et la laine a été incorporée dans les soins capillaires et les applications cosmétiques, mais à l'échelle mondiale, les déchets de plumes de poulet sont le matériau kératiniques le plus abondant et le plus durable dans la nature qui n'a pas encore été utilisé de manière adéquate, en particulier en bio-adhésif. [2]

Bien que la nature des déchets riches en kératine tels que les plumes résiste à la dégradation par les protéases courantes, les kératines ne s'accumulent pas dans la nature, ce qui suggère qu'elles sont dégradées par les microorganismes. Des études récentes ont montré que de nombreux microorganismes sont capables de dégrader ces déchets en sécrétant des enzymes kératinolitiques et protéolytiques (kératinases). [3]

L'utilisation de kératinases microbiennes pour la dégradation de la kératine des plumes en entités peptidiques plus petites offre une approche alternative plus viable, respectueuse de l'environnement et moins coûteuse. [4]

Les abattoirs et l'industrie du tannage produisent chaque année d'immenses quantités de sous-produits riches en kératine dont les plumes de poulet sont les principales sources de kératine naturelle car elles sont composées d'environ 90% de protéines de type kératine. [2]

Cette kératine est une protéine présentant une résistance chimique élevée qui rend sa transformation difficile. Les kératinases microbiennes hydrolysent les structures de kératine rigides et forment des hydrolysats riches en acides aminés essentiels (indispensables) qui remplacent par excellence la kératine du commerce. [4]

Les travaux de l'équipe de recherche dirigée par Pr BADIS sur les biomolécules (LCSNBioMol Université Blida 1) (voir publications et brevets) ont permis de purifier des kératinases douées d'une nette activité kératinolytique dont les hydrolysats sont riches en peptides et acides aminés indispensables. Ces enzymes sont produites en culture à base de farine de plumes et sur milieux naturels riches en kératines.

A cet effet, nous envisagerons la mise au point d'une unité de production de kératine et ses dérivés en utilisant nos souches douées d'activité kératinases. Pour ce faire et via ce présent projet de fin d'étude nous allons produire en premier lieu la kératine et son hydrolysat en utilisant les plumes de volailles comme matière première par voie microbiologique et par des souches bactériennes du genre *Bacillus*. En deuxième lieu, nous viserons une application en cosmétique par une formulation d'un shampoing à base d'hydrolysat de kératine produite localement.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur la kératine et ses applications

1.1 Histoire de la découverte de la kératine :

Le mot « kératine » apparaît pour la première fois dans la littérature vers l'année 1850 pour désigner la matière qui compose les tissus durs comme les cornes et les sabots des animaux (kératine vient du grec « kera » signifiant corne). A l'époque, les kératines intriguaient les scientifiques car elles ne se comportaient pas comme les autres protéines. En particulier, les méthodes normales de dissolution des protéines étaient inefficaces pour solubiliser la kératine. Bien que des méthodes telles que la combustion et le broyage soient connues depuis un certain temps, de nombreux scientifiques et inventeurs étaient plus intéressés par la dissolution des cheveux et des cornes afin de fabriquer de meilleurs produits.

La résolution de problème d'insolubilité est venue en 1905 avec la délivrance d'un brevet américain à John Hoffmeier qui décrivait un procédé d'extraction de kératines à partir de cornes d'animaux à l'aide de chaux. Les kératines extraites ont été utilisées pour fabriquer des gels à base de kératine qui pourraient être renforcés en ajoutant du formaldéhyde. Au cours des années 1905 à 1935, de nombreuses méthodes ont été développées pour extraire les kératines en utilisant la chimie oxydative et réductrice. Ces technologies ont d'abord été appliquées aux cornes et aux sabots des animaux, mais ont également été utilisées pour extraire les kératines de la laine et des cheveux humains.

Les propriétés biologiques des extraits ont suscité un intérêt accru pour le développement de kératines pour des applications médicales, et parmi les premières inventions figuraient des poudres de kératine pour les cosmétiques, des composites et des revêtements pour médicaments. Au cours des années 1920, la recherche sur la kératine s'est déplacée vers la structure et la fonction des protéines de kératine. Plusieurs articles clés ont été publiés qui analysaient les kératines extraites par oxydation et par réduction. Les scientifiques ont rapidement conclu que de nombreuses formes différentes de kératine étaient présentes dans ces extraits et que la fibre capillaire devait être une structure complexe, pas simplement un brin de protéine. En 1934, un article de recherche clé a été publié qui décrivait différents types de kératines, se distinguant principalement par des poids moléculaires différents. Cet article fondateur a démontré qu'il existait de nombreux différents homologues de la kératine et que chacun jouait un rôle différent dans la structure et la fonction du follicule pileux. [5]

1.2 Définition de la kératine :

Le terme « kératine » désignait à l'origine la vaste catégorie de protéines insolubles qui s'associent en tant que filaments intermédiaires (FI) et forment la majeure partie des épithéliums cytoplasmiques et des structures appendiculaires épidermiques (c'est-à-dire les cheveux, la laine, les cornes, les sabots et les ongles).

Des recherches ultérieures sur ces protéines structurelles ont conduit à la classification des kératines de mammifères en deux groupes distincts en fonction de leur structure, de leur fonction et de leur régulation :

- Les kératines "dures" forment des réseaux ordonnés de FI intégrés dans une matrice de protéines riches en cystine et contribuent à la structure dure des appendices épidermiques. [5]
- Les kératines «molles» forment préférentiellement des faisceaux lâches de FI cytoplasmiques et confèrent une résilience mécanique aux cellules épithéliales. Elle fournit un moyen de défense et une fonction de protection dans l'adaptation des vertébrés vis-à-vis l'environnement extérieur. [6]

1.3 Le rôle de la kératine :

Son rôle est d'assurer une protection de l'animal (ou de l'homme) contre son environnement naturel. C'est pourquoi elle montre une grande résistance aux attaques chimiques et enzymatiques. Cette résistance est due à sa forte teneur en cystéine, un acide aminé soufré qui est à l'origine de la formation de ponts disulfures (cystine) qui créent un réseau tridimensionnel compact engendrant une grande stabilité. La présence des ponts disulfures en grand nombre, conférant une grande insolubilité dans les solvants classiques et une résistance aux attaques chimiques, fait de la kératine, une protéine particulière. [7]

1.4 Structure de la kératine :

Dans une protofibrille, les chaînes de kératine sont liées entre elles par des liaisons intercaténares de type disulfures, ioniques et hydrophobes. La présence des liaisons disulfures et hydrogènes dans la kératine lui confère une stabilité mécanique, rigidité extraordinaire et résistance à la dégradation par les enzymes protéolytiques comme la trypsine, la pepsine et la papaïne. Cependant, la présence des groupes fonctionnels réactifs, en particulier dans le squelette peptidique, les ponts disulfures (S-S), la fonction amine (-NH₂), et d'acide carboxylique (-COOH), rend la kératine chimiquement réactive dans des conditions favorables. [8]

La chaîne d'acides aminés constituant la protéine de la kératine peut varier d'un tissu à l'autre en nombre et en séquence, ainsi qu'en polarité, charge et taille, ce qui influence leurs propriétés et leur fonction. [9]

1.5 Source de kératine :

Les sources les plus riches en kératine sont les plumes, la laine, les poils, les sabots, les écailles et la couche cornée. Les différences existant entre ces matières se situent essentiellement au niveau de leur composition en acides aminés (Tableau 1). [10]

1.5.1. Kératine de cheveu :

Les cheveux humains sont des biomatériaux filamenteux naturels et constituent d'environ 80% de protéine de kératine. Cependant, l'accumulation de cheveux cause de nombreux problèmes environnementaux et sont considérés comme un déchet protéique très polluant. [10]

1.5.2. Kératine de plume :

La plume de poulet est composée d'environ 90% de kératine, qui est une protéine structurelle fibreuse et insoluble constituée de bobines hélicoïdales reliées entre elles par des liaisons disulfure. Cette caractéristique structurelle lui permet de résister aux conditions environnementales défavorables. Par conséquent, les plumes sont considérées comme un déchet biologique et causent de graves problèmes environnementaux. [10]

Tableau 1.1 : Comparaison de la composition en acides aminés entre les kératines de cheveux humains, des plumes, et de la laine [11]

Acides aminés g/100g	La laine	Les cheveux humains	Les plumes
Acide aspartique	6.4-7.0	7.09-9.3	5.42-6.7
Acide glutamique	11.3-13.4	11.56-16.6	6.9-9.7
Lysine	2.85-3.4	2.62-3.5	0.6-1.8
Arginine	3.3-7.1	3.19-7.2	1.7-4.96
Histidine	0.8-0.9	0.7-1.1	0.2-0.5
Serine	9.50-10.9	9.0-11.66	7.2-14.1
Thréonine	5.8-6.4	5.5-19.64	0.8-4.1
Tyrosine	1.96-4.1	1.2-2.5	4.6-4.15
Cystéine	5.7-11.4	7.6-12.92	5.07-7.8
Méthionine	0.4-0.59	0.4-2.49	0.1-0.41
Leucine	6.8-8.1	1.2-8.01	6.16-8.3
Valine	5.80-6.4	6.18-6.86	2.0-7.8
Phénylalanine	2.1-2.9	1.91-2.22	3.1-4.3
Glycine	8.0-9.4	5.2-6.56	7.16-16.2
Alanine	5.2-5.81	4.70-6.9	3.13-8.7
Proline	6.0-7.1	3.8-9.55	9.8-18.8
Isoleucine	3.-3.5	3.12-3.7	3.2-4.3

1.5.3. Kératine d'ongle :

L'ongle humain est un organe important du corps humain et principalement composé d'un réseau de kératine hautement réticulé, une scléroprotéine contenant de grandes quantités de soufre (3,8%) avec plusieurs liaisons disulfure. Cette structure unique se traduit par une barrière de perméabilité très efficace. [10]

1.5.4. Kératine de bec :

Le bec des oiseaux à une coquille externe de kératine dure qui se compose presque entièrement de protéines. Structuellement, la kératine du bec contient une conformation hélicoïdale avec un mélange de feuille et possède une stabilité thermique élevée. [10]

1.5.5. Kératine de corne :

La corne est le tissu animal dur et a une configuration inflexible en raison des liaisons croisées du soufre. Les composants fondamentaux de toutes les cornes sont la kératine, les acides aminés libres, les peptides, les lipides et les microéléments: calcium, aluminium, chrome, cuivre, fer, manganèse et zinc. La protéine de kératine dans la corne de l'animal est la fibre dure et son traitement est très difficile. [10]

1.5.6. Kératine de la laine :

La laine fait partie de la famille des fibres protéiques. Elle est composée d'environ 97% de kératine, les deux composés restants sont les lipides (2%) et des sels minéraux (1%). Elle est donc considérée comme une protéine fibreuse. [12]

1.6 Type de kératine :

1.6.1. α .Kératine :

L'alpha kératine se trouve dans l'épithélium de tous les vertébrés. L'hélice de la kératine alpha constitue le problème environnemental en raison de sa résistance à la dégradation par les microorganismes. Les kératines alpha en particulier sont remarquables pour leur force, leur élasticité, leur ténacité, leur insolubilité et leur flexibilité. La kératine α contient d'abondantes quantités d'acides aminés hydrophobes, à savoir la méthionine, la phénylalanine, la valine, l'isoleucine et l'alanine. Selon la teneur en soufre, cette protéine est classée en kératines dures et molles (Tableau 2). [13]

I.6.2. β -kératine :

La bêta-kératine est une protéine structurelle présente chez les reptiles et les oiseaux. La kératine β a un pourcentage élevé de cystéine et la cystéine forme facilement des liaisons disulfure, qui confèrent une rigidité et offrent une résistance accrue à la dégradation. Dans une plume mature, environ 80 à 90% de kératine β est présente. Le poids moléculaire des protéines de kératine β est généralement compris entre 10 et 14 kDa (Tableau 2). [13]

Tableau 1.2 : une comparaison entre α -kératine et β -kératine basée sur leur structure et leur distribution [14]

Caractérisation	α-kératine	β-kératine
Liaison	Liaison hydrogène intramoléculaire	Liaison hydrogène intermoléculaire
Diamètre (nm)	7-10	3-4
Caractéristiques structurelles	Matrice de filament intermédiaire	Matrice amorphe
Poids moléculaire (KDa)	40-68	10-22
Distribution	Laine, cornes, poils, ongles et sabots	Becs d'oiseaux, plumes, griffes épidermes de reptiles
Rigidité	Haute	Inferieure a l' α -kératine

1.7 Diverses méthodes utilisées pour la production de kératine et dégradation :

Ici, nous essayons de nous concentrer sur certaines méthodes importantes pour la production et la dégradation de la kératine.

1.7.1. Hydrolyse des kératines par des cultures bactériennes :

Actuellement, les enzymes bactériennes sont largement utilisées à large spectre pour la conversion et la production de déchets de volaille en aliments et engrais. Les protéines de kératine ont été séparées de plume par plusieurs modifications chimiques. Les plumes de

volaille (y compris les oiseaux) contiennent environ 90% de kératine ainsi que certains acides aminés importants comme la cystéine, la thréonine et l'arginine. [15]

1.7.2. Production de kératine par hydrolyse alcaline :

La production de kératine et leur extraction peuvent également se faire par hydrolyse alcaline. L'extraction et la production dépendent principalement de deux facteurs complémentaires différents [15] :

- les produits chimiques, car ils sont importants pour extraire des protéines cellulaires spécifiques de la cellule, du tissu ou de l'organe,
- des conditions optimales, car il est important, car il fournit tout le support idéal pour la stabilité des protéines.

1.7.3. Fermentation à l'état solide (SSF) pour la dégradation de la kératine :

Les kératinases sont les enzymes ayant une activité protéolytique pour la dégradation de la kératine. La fermentation à l'état solide (SSF) est un procédé industriel en plein essor dans le domaine de la biotechnologie et de la microbiologie ; il est principalement utilisé pour le recyclage ou le renouvellement à grande échelle des déchets biologiques.

Dans ce processus, le microorganisme se développe dans un environnement sans eau ou parfois à très faible teneur en eau. La fermentation submergée est l'analogue de la fermentation à l'état solide dans laquelle toutes les conditions naturelles sont optimisées et imitent l'environnement naturel.

Le SSF est un processus respectueux de l'environnement, contribuant de manière significative à minimiser les biopolluants et à maximiser la surface pour les industries alimentaires. [15]

1.8 Domaines d'application de la kératine :

A l'échelle industrielle, la kératine est un produit utilisé dans les domaines médicaux pharmaceutique, cosmétique, ainsi que dans les industries biotechnologiques. [16]

1.8.1. Domaine médicale :

La première étude sur l'utilisation de la kératine comme biomatériau était dans le revêtement des greffes vasculaires. Dans cette étude, la greffe revêtue a été implantée avec succès chez un chien pendant plus de 200 jours, sans thrombose.

Depuis lors, la kératine a été évalué pour son utilisation en biomédecine, comme le traitement des plaies, la régénération osseuse I 'hémostase, et récemment, la réparation des nerfs périphériques. [17]

D'ailleurs, plusieurs biomatériaux à base de kératine ont été produits pour être utilisé dans diverses applications biomédicales. Par exemple, la kératine a la capacité de fonctionner comme une matrice extracellulaire synthétique (MEC) en raison de sa biodégradabilité, de sa biocompatibilité et de sa capacité à créer des domaines de liaison de type fibronectine aux cellules afin de faciliter l'adhésion cellulaire.il a également des activités biologiques qui facilitent et soutiennent la prolifération des cellules.

Donc nombreuses sont les études qui ont exploité la kératine dans le traitement biomédical. On peut citer : l'ingénierie du tissu osseux, oculaires, régénération et cicatrisation des plaies, remplacements de peau, régénération nerveuse. [18]

1.8.2 Domaine cosmétique :

Les protéines ont rapidement été considérées comme des ingrédients utiles pour créer un environnement approprié pour une peau et des cheveux sains en raison de leur capacité lier l'eau avec la couche cornée de la peau et ses annexes. [19]

La kératine est parmi les protéines simples les plus utilisées dans divers produits cosmétique tels que les crèmes, les shampooings et les après-shampooings c'est-à-dire les produits conçus au traitement de la peau et des cheveux. Sa présence dans la cuticule du cheveu et dans la couche cornée aide à préserver l'hydratation de la peau.

La kératine avec un poids moléculaire élevé, est principalement utilisée pour les applications de soin de la peau. Il est possible de transformer la kératine en un film. Un film ou un revêtement de kératine sur la peau procure une sensation douce de kératine sur la peau procure une sensation douce.

De nos jours, des protéines associées à la kératine de différentes sources ont été développées et appliquées sous forme de micro- échafaudage en cosmétique. [16]

1.8.3 Domaine environnementale :

Au cours des dernières années, l'intérêt pour la récupération et la réutilisation de la biomasse augmente de plus en plus, en particulier la recherche des alternatives aux matières plastiques traditionnelles qui devraient être biodégradables, de haute qualité, compétitifs, respectueux de l'environnement et non toxiques. Ceci réduirait non seulement la dépendance de l'économie vis-à-vis des sources fossiles, mais contribuerait également à réduire la pollution de l'environnement en réduisant les émissions nettes de dioxyde de carbone. Parmi les sources naturelles, les matériaux à base de protéines sont largement pris en compte pour les applications biotechnologiques. [20-21]

D'où l'importance la kératine comme biopolymère avec prédominance en raison de son abondance naturelle, de ses caractéristiques structurelles, de sa non-toxicité, de sa biocompatibilité, de sa capacité de renouvellement et de son activité biologique, la kératine assure alors sa place dans les secteurs des matériaux modernes [20]. Également, la kératine est un adsorbant efficace des métaux lourds et des composés organiques volatils (COV), ce qui est utile pour la purification de l'eau et de l'air. [21]

1.8.4 Domaine pharmaceutique :

Due à la préoccupation environnementale croissante, les matériaux biosourcés tels que la kératine peut remplacer les produits pétrochimiques pour des applications pharmaceutiques. [22]

Les nanoparticules de la kératine, ainsi que les hydrogels, films et éponges à base de kératine ont été proposées comme un système d'administration des médicaments anti-inflammatoires, antitumoraux ou antibiotiques. [23]

Chapitre 2 : Les plumes de volaille, agrodéchets riche en kératine

2.1 Introduction :

Les plumes de poulet sont probablement la matière kératiniques la plus abondante dans la nature. Les kératines des plumes sont de petites protéines, de taille uniforme, avec un poids moléculaire d'environ 10 kDa. Ils sont riches en cystéine et en résidus hydrophobes et ont une conformation en feuille. On a séquencé la kératine de plumes de poulet et on a trouvé qu'elle avait 96 résidus de long contenant sept résidus de cystéine. Celles-ci étaient limitées aux régions terminales : six dans la région N-terminale et une dans la région C-terminale. Ces régions étaient presque dépourvues de structure. La partie centrale de la molécule était riche en structure R et contenait une forte proportion de résidus hydrophobes. Dans l'ensemble, la molécule était pauvre en acides aminés chargés. [24]

2.2 Composition de plume :

Les plumes de volaille sont principalement composées de kératine, une protéine fibreuse qui est également présente dans les poils, les griffes et les cornes des animaux. La kératine est riche en acides aminés soufrés, tels que la cystéine, la méthionine et la cystine. En plus de la kératine, les plumes de volaille contiennent également des lipides, de petites quantités de minéraux comme le calcium, le phosphore et le magnésium, ainsi que des traces de vitamines telles que la vitamine B12. Il est important de noter que les plumes de volaille ne sont pas destinées à la consommation humaine, car elles peuvent contenir des bactéries et des substances nocives pour la santé. Les plumes de volaille sont principalement utilisées pour produire des produits tels que des couettes, des oreillers, des coussins, des articles de décoration et des articles de décoration et des articles de mode. [25]

Tableau 2.1 : Pourcentage des acides aminés dans les fibres kératiniques des plumes de poulet. [25]

Acide aminé	Pourcentage %	Acide aminé	Pourcentage %
Arginine	4.30	Valine	1.61
Acide aspartique	6.00	Cystéine	8.85
Glutamine	4.62	Alanine	3.44
Thréonine	4.00	Phénylamine	0.96
Serine	16.00	Méthionine	1.02
Tyrosine	1.00	Proline	12.0
Leucine	2.62	Arginine	4.00
Isoleucine	3.32	/	/

2.3 La production mondiale de volaille :

La production mondiale de volaille a considérablement augmenté ces dernières décennies, en partie en raison de la demande croissante de viande de volaille, qui est considérée comme une source de protéines maigres et abordable. Selon les données de la FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture), la production de viande de volaille dans le monde a augmenté de plus de trois fois entre 1980 et 2019, passant de 35 millions de tonnes à plus de 134 millions de tonnes (1). L'augmentation de la consommation de poulet entraîne la génération de grandes quantités de déchets qui doivent être éliminés correctement. Les plumes de poulet représentent environ 5 à 10% du poids du poulet et constituent donc une part importante des déchets de volaille. Les États-Unis, le Brésil et la Chine sont les plus grands producteurs au monde, l'Afrique du Sud, l'Égypte et le Nigéria étant les plus grands d'Afrique (Compassion in World Farming, 2013). À l'échelle mondiale, on estime que 40×10^9 kg de plumes de poulet sont produites à partir de l'abattage de plus de 58×10^9 poulets (Compassion in World Farming, 2013). En Afrique du Sud, Statistics 2013 indique la disponibilité de plus de 322 abattoirs de transformation de la viande de poulet à grande échelle. Ces activités d'aviculture ont généré plus de 258×10^6 kg de plumes. [26]

2.4 Les déchets de plumes :

Les déchets de plumes sont un problème important dans l'industrie de la volaille, et on estime que 400 millions de poulets produisent des déchets de plumes chaque année. Les plumes sont principalement composées de kératine, et elles peuvent être valorisées par différentes méthodes. Une étude caractérise les plumes de poulet et explore leur potentiel en tant que source de protéines. [27]

Cependant, les déchets de plumes sont souvent contaminés par les débris, la peau et le sang de l'industrie avicole, ce qui les rend impropres à la valorisation. Une autre étude explore la valorisation des déchets de plumes dans la production de nouveaux matériaux. L'industrie de transformation de la volaille génère de grandes quantités de déchets riches en kératine, et des solutions aqueuses ont été utilisées pour extraire la kératine des plumes de poulet. [28]

2.5 Valorisation des plumes de volailles :

Possibilités de valorisation de la plume de poulet. La plume de poulet entière, en raison de sa structure complexe, ne peut pas être transformée en fibre protéique ; cependant, ses propriétés uniques offrent des possibilités de valorisation dans de nombreuses applications. L'une de ces applications est la fabrication de composites pour les industries de la construction, de l'automobile et de l'aérospatiale. D'autres applications pourraient être l'extraction de protéines de kératine pour une utilisation dans la fabrication de cosmétiques, de papier et de pâte à papier et de plastique biodégradable. Un avantage supplémentaire est que les plumes de poulet sont un déchet abondant et renouvelable de l'industrie de la volaille. Dans l'industrie textile, les plumes de poulet pourraient offrir une alternative rentable de matière première aux fibres protéiques naturelles couramment utilisées, à savoir la laine et la soie. [29]

Chapitre 3 : Kératinases, mise en application en industrie cosmétique, pharmaceutique et agroalimentaire

3.1 Introduction :

La kératine étant une protéine insoluble, sa réutilisation devra inclure une dégradation partielle ou complète, sans détruire les acides aminés, pour fournir des options de bioraffinerie utiles pour la protéine constitutive et les acides aminés.

La dissolution et l'extraction de la kératine est un processus difficile par rapport à l'extraction d'autres polymères naturels (par exemple, le chitosane, l'amidon et le collagène). L'utilisation à grande échelle de la kératine dépend donc de l'emploi de méthodes d'extraction-décomposition relativement rapides et peu coûteuses. Les stratégies d'extraction actuelles comprennent des méthodes physiques, chimiques, physico-chimiques et biologiques. Cependant, la production d'hydrolysats de kératine par traitement chimique ou physique implique généralement l'utilisation de températures élevées et entraîne donc une dégradation des acides aminés sensibles à la chaleur, tels que la méthionine, la lysine et le tryptophane, ce qui entraîne une réduction de la valeur nutritionnelle des hydrolysats et abaisse la valeur. Une approche alternative consiste à exploiter des microbes kératinolitiques ou – peut-être mieux – des kératinases microbiennes spécifiques capables de catalyser la biodégradation de la kératine.

Les kératinases sont un groupe d'enzymes hydrolytiques capables de catalyser la dégradation de la kératine. Ces enzymes kératinolitiques sont sécrétées par différents types de microorganismes présents dans le sol, l'eau et sur diverses sources riches en kératine. [28]

Le potentiel des kératinases dans le contexte biotechnologique a acquis une reconnaissance substantielle et significative depuis le début du 21^e siècle : leur spécificité de substrat et leur capacité à attaquer des protéines structurales hautement réticulées et récalcitrantes qui résistent aux enzymes protéolytiques connues, telles que la trypsine et la pepsine, en font de précieux biocatalyseurs dans les industries traitant des matières kératiniques. [29]

L'utilisation du procédé enzymatique pour produire des hydrolysats s'est énormément développée ces dernières années car il réussit mieux à préserver les acides aminés, et il est plus sûr pour l'environnement que les autres méthodes et c'est aussi un procédé relativement doux. [30]

3.2 Sources de kératinases microbiennes :

Les dégradeurs kératinolitiques peuvent être trouvés dans divers groupes de micro-organismes: des champignons, des actinomycètes aux bactéries.

Ces micro-organismes sont fréquemment isolés d'environnements riches en kératine tels que le sol et les eaux usées associés à l'industrie avicole et aux déchets de tannerie.

Tableau 3.1 : Producteurs notables de kératinases microbiennes

	Microorganisme	Origine	type de protéase	PM (kDa)	pH	°C	Substrat
Champignons dématophytes	<i>Aspergillus niger</i>	Sol	Serine	36	7	50	Kératine
Actinobactéries	<i>Streptomyces</i> AB1	Sol	Serine	30	11.5	75	Kératine azure
Bactéries de Gram +	<i>Bacillus</i> sp	Effluent d'abattoir et d'élevage de volailles	-	32	8	37	Azokératine
Bactéries de Gram -	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	eau de mer	Métallo	34	8	60	déchets de crevettes

3.2.1. Les champignons dématophytes :

Sont parmi les dégradeurs de kératine les plus reconnus. Leur virulence et leur pathogénicité ont été liées à leur capacité à dégrader à la fois la kératine molle et dure. Cependant, en raison des risques potentiels d'infection, les applications biotechnologiques de ces champignons n'ont pas été largement explorées. Une revue complète de près de 300 espèces de champignons (pathogènes et non pathogènes) a été publiée par Błyskal (2009) détaillant leur capacité à dégrader différents substrats kératiniques. Le nombre de souches capables d'utiliser les substrats kératiniques était : poil>laine>plume>textile>colonne vertébrale de

hérisson>ongle>cal plantaire humain>sabot>corne (ibid). *Aspergillus*, *Coprinopsis*, *Doratomyces*, *Paecilomyces*, *Penicillium* et *Purpureocillium* sont les champignons non pathogènes les plus courants qui produisent des activités kératinolitiques.

3.2.2. Les actinomyces :

Sont également connus pour être une riche source de kératinase. Un certain nombre de *Streptomyces* mésophiles et de *Streptomyces* thermophiles ont produit des kératinases qui décomposent la kératine. Une autre kératinase prometteuse a été isolée de *Nocardiopsis* sp. TOA-1 et il a été démontré qu'il dégrade le substrat de kératine synthétique, ainsi que le prion de la tremblante.

3.2.3 Bactéries de Gram-positives et Gram-négatives :

Un certain nombre de bactéries **Gram-positives** et **Gram-négatives** se révèlent également être d'importants producteurs de kératinase.

Dans la catégorie **Gram positif**, les membres du genre *Bacillus* sont les plus prolifiques et les plus prolifiques des dégradeurs de la kératine. En particulier, les kératinases de *B. licheniformis* sont capables de dégrader les plumes, la laine et la peau animale et le prion PrPSC.

De la catégorie **Gram-négatif**, les kératinases produites par les membres des genres *Chryseobacterium* ou *Stenotrophomonas* ont été largement étudiées et ont montré qu'elles dégradaient les plumes, les poils d'animaux, la laine, le sabot et la corne.

Certaines **bactéries anaérobies thermophiles** ont également démontré une capacité à produire des kératinases de type sérine. *Fervidobacterium pennavorans* et *F. islandicum* ont été isolés de sources chaudes et ont produit des kératinases capables de dégrader. [31]

3.3 Propriétés des protéases dégradant la kératine (Kératinases) :

Des protéases spécifiques élaborées de manière intracellulaire ou extracellulaire par des microorganismes dégradant la kératine sont appelées kératinases ou enzymes kératinolitiques. Les enzymes ont la capacité d'agir sur des substrats compacts mieux que d'autres enzymes protéolytiques comparables ; cela distingue la kératinase des autres protéases et peptidases. La plupart des kératinases sont largement inductibles, nécessitant la kératine comme inducteur exogène. [32]

3.4 Traitement microbien de la farine de plume : Faisabilité pour des applications biotechnologiques :

La plupart des chercheurs ont convenu que la conversion microbienne des plumes (kératine) représente une biotechnologie pour améliorer l'utilisation des plumes comme protéine alimentaire. La biodégradation de la plume peut être obtenue par la culture de micro-organismes dégradant la kératine sur la plume, et l'élaboration subséquente de kératinase extracellulaire ; l'utilisation de filtrats de culture contenant la kératinase ou l'enzyme brute seule sans le micro-organisme, et l'utilisation d'enzyme purifiée seule sans le micro-organisme. [32]

3.5 Écologie des microorganismes dégradant la kératine :

Les micro-organismes dégradant la kératine sont presque omniprésents dans la nature, bien que préférentiellement (obligatoirement ou facultativement) proliférant sur les substrats kératiniques.

Les micro-organismes dégradant la kératine se développent dans différentes conditions écologiques et environnementales, et ils démontrent une large capacité à solubiliser les substrats kératiniques ainsi que d'autres substrats protéiques compacts. De manière prédominante, les micro-organismes synthétisent et exportent des protéases dans leurs substrats pour obtenir une dégradation ou une décomposition des substrats en nutriments simples assimilables. Cependant, des rapports sur les endoprotéases ou les enzymes liées aux cellules ayant une activité kératinolytique ont été documentés.

Pendant ce temps, la compréhension de la base moléculaire de leur subsistance sur des substrats protéiques compacts Pendant ce temps, la compréhension de la base moléculaire de leur subsistance sur des substrats protéiques compacts reste insaisissable. [32]

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Notre étude de recherche a été réalisée au niveau du Laboratoire de Microbiologie et de Biochimie du département de Génie des Procédés (Faculté de Technologie, U-Blida1) et le laboratoire de recherche LCSNBioMol (Université Blida 1) et en collaboration avec la boîte cosmétique VENUS SAPECO d'Ouled Yaich-Blida.

1. Matériel :

1.1 Matériel biologique :

- Plumes de volailles récupérées d'un abattoir à Blida.
- Souche S13 isolée d'algue marine.
- Souche S14 isolée d'algue marine.
- Souche Cp22 isolée du compost à base de plumes.
- Souche NIJ isolée d'un sol sableux contaminé par le pétrole de la région de Hassi Messaoud (Ouargla).

1.2 Matériel non biologique :

Composé par le matériel et l'appareillage d'analyse nécessaire utilisés (voir annexes).

2. Méthodes :

Toutes les manipulations sont faites selon les conditions aseptiques usuelles dans le travail microbiologique, en utilisant un matériel stérilisé à proximité de la flamme d'un bec benzène, en passant à la flamme les orifices des tubes et des flacons et tous les instruments de manipulation (anse, pinces, spatule ...) et une stérilisation de tous les milieux de cultures par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

2.1 Production de la farine de plumes :

2.1.1 Préparation de la farine de plumes :

1. Les plumes de poulet ont été lavées avec un détergent pour éliminer les impuretés et la graisse, rincées avec beaucoup d'eau de robinet et séchées à l'air libre pendant 72h.
2. Les plumes séchées sont re-séchées pendant 2 heures dans une étuve chauffée à 170 °C.
3. Puis on sépare les fibres de la moelle épinière avec une paire de ciseaux. Ces fibres sont coupées plusieurs fois et ont une longueur moyenne de 5 mm
4. Broyer avec une meuleuse de type Moulinex.

2.1.2 Caractérisation de la farine de plume :

Cette partie a été effectuée par l'équipe de recherche de biomolécules du laboratoire CSNBioMol (université Blida 1). (Voir annexes).

Les paramètres mesurés sont : Lipides – Cendres – Protéines - Acides aminés – Carbohydrates.

2.2 Production de la kératine :

2.2.1 Extraction et purification de la kératine :

Les étapes de cette partie sont obtenues par les travaux de l'équipe du laboratoire CSNBioMol (université Blida 1). L'obtention des extraits de kératine contenant de la kératine native est difficile dans la pratique en raison de l'insolubilité de la protéine dans des solutions qui ne provoquent pas d'effets indésirables. Une méthode de solubilisation de la kératine a été développée en utilisant des solvants organiques, par exemple : diméthylsulfoxyde (DMSO).

Pour DMSO, il faut précipiter les protéines dissoutes avec de l'acétone. Cette procédure ne modifie pas la structure des protéines et est souvent utilisée par de nombreux chercheurs à l'échelle du laboratoire pour obtenir un substrat. Permettant de déterminer de l'activité kératinolitiques. [38]

- **Solubilisation de la kératine :**

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

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

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

- **Précipitation du substrat :**

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

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

- **Concentration et récupération du substrat :**

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

- **Dissolution de la kératine :**

1g de la poudre est dissout dans 20 ml de NaOH (0,05 M). Le pH est ajusté à 8 par une solution de HCl (1N), puis la solution est diluée à 200 ml avec du tampon Tris-HCl (0,05 M), puis le pH est ajusté à 8. [38]

2.3 Production de l'hydrolysate de la kératine :

2.3.1 Repiquage des souches :

Dans les conditions stériles, les quatre souches de la collection du laboratoire CSNBioMol ont été repiquées sur milieu solide LB par le prélèvement d'une colonie isolée et représentative de la souche à l'aide d'une anse en stries lâches. L'incubation est faite à 37 °C pendant 24h dans l'étuve microbiologiques en mode statique. La purification est assurée en observation microscopique à l'état frais.

2.3.2 Milieux et conditions de culture :

Milieu de repiquage et de conservation : Milieu LB (Luria Bertani)

- 10g peptone ;
- 5g extrait de levure ;
- 30g NaCl ;
- 1L d'eau distillée.

Le pH du milieu est ajusté à $7,0 \pm 0,2$ avec une solution de NaOH ou HCl (1 mol/L). Pour la préparation de LB solide, 18 g/L d'agar sont ajoutés au milieu liquide.

2.3.3 Préculture des souches bactériennes :

- ✓ Dans un erlenmeyer de 2L nous mettons : 10g de peptone - 10g de NaCl - 5g d'extrait de levure.
- ✓ Dissoute dans 1L de l'eau distillée. Le mélange est agité dans un agitateur. Le pH du milieu est ajusté à 7 et autoclavé à 120 °C pendant 20 min.

- ✓ Après refroidissement, on ensemence la souche et la cultivé sur un incubateur rotatif (150 tr/min) à 37 °C pendant 24h.

2.3.4 Culture bactérienne et production de l'hydrolysate de kératine :

La production d'hydrolysate de kératine a été réalisée dans le milieu basal dont la composition du milieu est (g/L) :

10g de la poudre de farine de plumes, 1g NH₄Cl, 1gNaCl, 0.6g K₂HPO₄, 0.8g KH₂PO₄, 0.48g MgCl₂, 0.2g extrait de levure. Le pH du milieu est ajusté à 7,5 et autoclavé à 120 °C pendant 20 min. Après refroidissement et dans des conditions stériles, 2.5 ml des inocula bactériens ont été ajoutés dans 50 ml de milieu et cultivés sur un incubateur rotatif (150 tr/min) à 37°C pendant 72h. Après incubation (72h), le bouillon fermenté a été centrifugé à 4500 tr/min pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant précédent (hydrolysate de kératine) a été filtré d'abord par papier filtre, ensuite par pompe à vide. Sous les conditions stériles, le surnageant filtré a été filtré encore une fois par le filtre à seringue 0.2 µL pour avoir éliminé tous les espèces bactériennes.

2.3.5 Dosage de l'activité enzymatique :

Le test d'activité kératinase a été réalisé par le mélange de 0.25 mL de surnageant (solution d'enzyme brute) avec 0.75 mL de solution de substrat (kératine azure) pour chaque souche sélectionnée. Ensuite, le mélange a été incubé au bain marie à 40 °C pendant 10 min. Les réactions ont été ensuite arrêtées par l'addition de 2 mL de l'acide trichloracétique 0.4M (TCA). Enfin le mélange a été centrifugé à 6000 tr/min pendant 15 min. Après centrifugation, le mélange réactionnel a été dilué 10 fois par l'eau distillé. L'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 280 nm en utilisant un spectrophotomètre Rayleigh.

Une unité (UI/mL) de l'activité kératinolytique est définie comme étant l'augmentation de la densité optique (DO₂₈₀) avec le blanc, de 0,01 par minute dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus (Cai et al. 2008). L'activité kératinolytique est calculée selon la formule ci-après :

$$U = \frac{4 \times n \times 280}{(0.01 \times 10)1}$$

D'ou :

n est le facteur de dilution ;

4 est le volume de réaction finale (ml) ;

10 est le temps d'incubation (min).

2.3.6 Caractérisation de l'hydrolysate de kératine :

Cette partie a été effectuée par l'équipe de recherche de biomolécules du laboratoire CSNBioMol (université Blida 1). (Brevet déposé). Voir annexe.

2.4 Préparation et fabrication de shampoing :

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'analyse physico-chimique et microbiologique au laboratoire VENUS SAPECO d'Ouled Yaich-Blida.

2.4.1 Contrôle microbiologique de l'hydrolysate de kératine :

Le contrôle microbiologique permet d'assurer le contrôle des produits finis, une parfaite maîtrise de la fabrication des produits non conforme. La réglementation exige la recherche des germes aérobies mésophiles totaux et des levures et moisissures. (Voir annexes).

2.4.2 Fabrication du shampoing :

2.4.2.1 Préparation de shampoing à base de l'hydrolysate de kératine :

1) Préparation des matières premières :

Eau adoucie : L'adoucissement de l'eau est un procédé de traitement initialement destiné à réduire la dureté de l'eau. Cette opération a été effectuée à l'aide d'un adoucisseur d'eau.

Autres matières premières : La préparation des autres matières premières (conformes) consiste à prendre suffisamment de chaque matière première selon la formule en mesurant les masses (en gramme) avec la balance à précision.

Tableau 2.1 : les ingrédients du shampoing et leurs quantités.

Ingrédients	Quantité
Eau adoucie	75%
Sodium Laurth Sulfat(Tension active anionique détergence mousse,netoyage) (SLS)	12%
Cocamide propyl Bétaine (Tension actif amphotère)	2%
Parfum	0.5%
Chlorure de Sodium (NaCl) (agent épaississent)	/
Formole (conservateur)	1%
Acide citrique (correcteur de pH, conservateur et antioxydant)	/
Glycol Distearate, Laureth-4, Cocamidopropyl Betaine (donne un aspect soyeux, nacré et brillant)	2%
Coco glucoside and Glyceryl oleate	3%
Dicaprylyl Ether- Lauryl Alcohol	1%
Guar hydroxypropyltrimonium chloride	0.5%
Hydrolysate de kératine	3%

2) Préparations de shampoing :

1. Remplir le bécher de préparation avec de l'eau adoucie à température ambiante.
2. Verser les matières premières selon l'ordre indiqué par la fiche technique de la préparation du shampoing Venus.
3. Mélanger les ingrédients à l'aide d'un agitateur électrique pendant 15 min.
4. A $t = 15\text{min}$ contrôler le pH et la viscosité du produit semi-fini en prenant un échantillon.
5. Si le pH est au-dessus de la norme, on ajoute une quantité d'acide citrique (selon la fourchette indiquée dans la formule).
6. Si la viscosité est au-dessous de la norme, on ajoute une petite quantité de NaCl (selon la fourchette permise par la formule).
7. Si la viscosité est au-dessus des normes, continuer l'agitation avec le turbo agitateur (jusqu'à avoir des résultats conformes).
8. Si les résultats de l'analyse contrôle qualité du produit semi-fini sont conformes aux spécifications de la fiche technique du produit, on arrête l'agitation.
9. Mettre shampoing dans des flacons et laisse décanter pendant 24h.



Photo 2.1 : Préparation de shampoing.

3) Contrôle de qualité de produit semi-fini :

Le contrôle de qualité du produit semi-fini doit passer par des tests de caractérisation organoleptique ainsi que des analyses physico-chimiques divers.

3.1. Contrôle organoleptique :

Tout contrôle devrait débuter par une reconnaissance du produit, qui consiste à évaluer la couleur, l'odeur et l'aspect des produits grâce à deux sens que possède l'humain (la vision, l'odorat), afin de contrôler toute anomalie apparente détectable à l'œil nu ou grâce à l'odorat.

3.2. Contrôle physico-chimique :

3.2.1. Détermination du pH :

- Etalonner le pH-mètre avec deux solutions tampon, la première à pH=7, et la deuxième pH=4.
- Une fois l'appareil est étalonné, on rince les électrodes à l'eau distillée.
- Verser une quantité suffisante du shampoing dans un bécher de mesure après on a été plongé l'électrode sur environ 4 cm.
- Lire la valeur du pH sur l'écran de l'appareil.

3.2.2. Détermination de la Viscosité :

- On monte le viscosimètre, muni de son étiré de garde, sur son support.
- Remplir le bécher avec le shampoing, en faisant attention à ne pas introduire de bulles d'air.
- Monte le mobile choisi sur l'axe de l'appareil en tenant fixe cet axe et en vissant le manchon de l'assemblage.
- Abaisser l'appareil sur son support de telle sorte que le mobile soit immergé dans le produit jusqu'au bas de repère figurant sur son axe.
- Vérification de la verticalité de cet axe au moyen du niveau à bulle.
- Mettre le moteur en marche et passer à la vitesse désirée en respectant les indications du constructeur.
- Lire la valeur indiquée.

4) Contrôle de qualité de produit fini (shampoing) :

Après 24h, le shampoing repos est soumis alors à un dernier contrôle organoleptique, physico chimique et microbiologique pour savoir si le produit est conforme.

❖ **Contrôle physico-chimique :**

pH : La même méthode que le produit semi-fini.

Viscosité : La même méthode que le produit semi-fini.

5) Contrôle microbiologique :

On a suivi la même méthode que le contrôle microbiologique de l'hydrolysat de kératine sauf on remplace l'hydrolysat de kératine par le shampoing à base de l'hydrolysat de kératine (produit fini).

Résultats et discussions

3. Résultats et discussions :

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie concerne la caractérisation de la matière première (plumes de volailles) utilisée pour la production de la kératine et l'hydrolysate de kératine, d'une part et, les résultats du contrôle de qualité du produit fabriqué par cette présente application, d'autre part.

3.1 Caractérisation de la farine de plumes et de la kératine :

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Résultats de la caractérisation de la farine de plumes et la kératine.

Paramètre	Kératine	Farine de plume	Unité
Lipides	2,50	4,20	g/100g
Humidité	10,28	3,27	%
Cendres	0,53	2,39	
Protéines	17,20	24,86	g/100g
Aspartate	5.55	5.53	
Glutamate	7.31	8.34	
Asparagine	0.025	0.025	g/100g
Serine	14.39	11.75	
Glutamine	0.034	0.034	
Histidine	0.073	0.90	
Glycine	7.63	6.83	
Thréonine	4.22	4.61	
Arginine	6.94	6.97	

Alanine	3.93	3.33	g/100g
Tyrosine	0.34	2.13	
Cystine	0.27	-	
Valine	6.87	6.48	
Méthionine	0.030	0.030	
Tryptophane	0.43	0.75	
Phénylalanine	4.64	3.89	
Isoleucine	3.85	3.90	
Leucine	6.95	6.40	
Lysine	0.39	2.84	
Hydroxyproline	2.47	2.39	
Proline	10.30	10.15	
Carbohydrates	7,22	7,94	

Nous constatons après ces résultats que cette hydrolyse chimique appliquée sur la farine de plumes a influencé la composition de cette dernière. Cependant, la composition en acides aminés est presque similaire entre la farine de plumes et la kératine extraite (présence de 20 acides aminés). Le taux des protéines est faible dans la kératine ce qui signifie un rendement faible de l'extraction par voie chimique. Par comparaison entre les acides aminés de la kératine extraite et la kératine des plumes (**Tableau 1.1**) et nous remarquons une ressemblance entre les deux matières.

3.2. Caractérisation de l'hydrolysat de la kératine :

Les résultats sont représentés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 Composition d'hydrolysat de la kératine issu de l'activité bactérienne des souches locales (souche S13 étudiée par notre équipe de LCSNBioMol, Université Blida 1)

Analyses	Plumes	
	Poulet	Canard
Acides aminés libérés	Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Cys	Ala, Val, Leu, Ile, Met, Thr, Phe, Cys
Groupement SH libre (μM)	8.05 ± 0.5	7.12 ± 0.4
Quantité de protéine soluble (mg/mL)	5.86 ± 0.2	6.79 ± 0.3
Activité kératinolytique (U/mL)	8000 ± 35	6500 ± 35
% de biodegradation de la kératine	100 ± 2.5	100 ± 2.5

Après hydrolyse, une présence nette des acides aminés essentiels dans ce hydrolysat confirme l'effet positif des kératinases bactériennes dans la solubilisation des plumes (poulet et canard) ainsi que sa richesse en biomolécules aptes à remplacer la kératine dans ses fonctions fondamentales comme bioadditif notamment, en cosmétique et parapharmaceutique.

3.2.1 Dosage de l'activité kératinase :

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau 3.3 Résultats de dosage enzymatique.

	Abs	Activité enzymatique (U/ml)
S13	0.583	233.6
Cp22	1.093	437.2
S14	0.739	295.2
NIJ	0.378	151.2

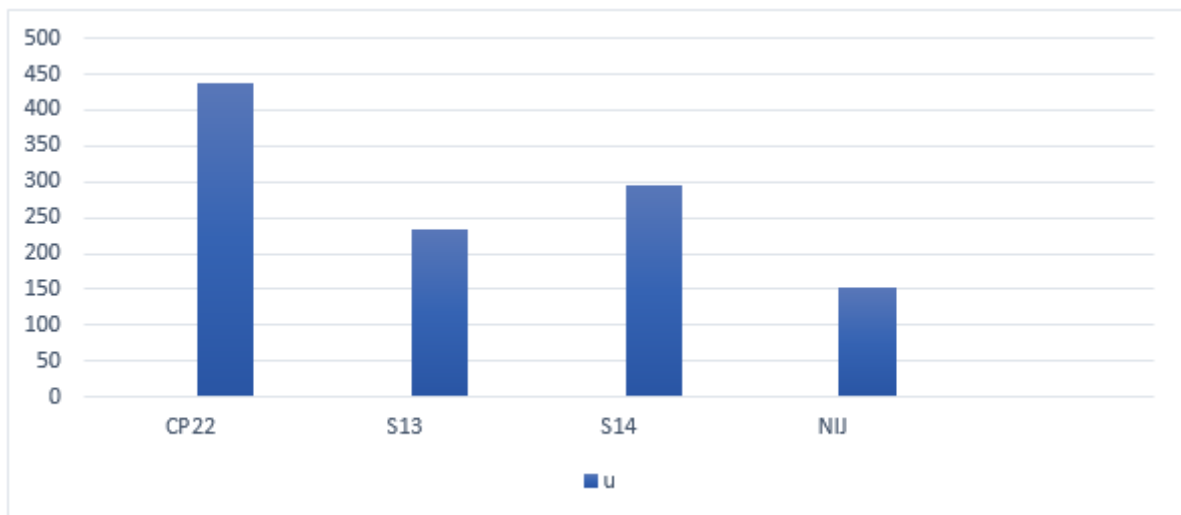


Figure 3.1 Histogramme de dosage enzymatique.

D'après les résultats mentionnés dans l'histogramme précédent, les quatre souches étudiées présentent des activités kératinases de 437.2 et 233.6 et 295.2 et 151.2 UI/ml pour les souches Cp22et S13 et S14 et NIJ, respectivement.

L'activité kératinases testée dans le milieu de fermentation liquide à base de farine de plume a montré que cette dernière augmente au cours du temps chez les quatre souches Cp22 et S14 et S13 et NIJ avec un optimum observé au cours du troisième jour. La meilleure activité kératinases est observée chez la souche Cp22 et la souche S14.

Le présent travail est comparé aux données de la littérature scientifique (Tableau 3.5).

Tableau 3.4 Comparaison des activités kératinolitiques.

Souches bactériennes	Activités kératinolitiques (U/ml)	Références
Cp22	437.2	Présent travail
S14	295.2	Présent travail
S13	233.6	Présent travail
NIJ	151.2	Présent travail
<i>Bacillus subtilis</i> KD-N2	125	[34]
<i>Bacillus sp.</i> P45	24	[35]
<i>Bacillus sp</i> PW	50	[36]
<i>Streptomyces albobriseolus</i> NGP	71.43	[37]

La comparaison du résultat de l'activité kératinolytique des souches Cp22, S14, S13, NIJ aux données de la littérature scientifique montre que ces derniers révèlent une activité kératinolytique relativement importante. Et suffisamment supérieure à celle de *Bacillus subtilis* KD-N2, *Bacillus sp.* P45, *Bacillus sp* PW et *Bacillus megatarium* D1.

Nous pouvons conclure que les quatre souches ont la possibilité d'utiliser la farine de plumes comme source de carbone et d'azote et par conséquent elles peuvent être considérées comme productrices d'enzymes de type kératinases.

3.3 Résultats du contrôle microbiologique du shampoing :

Les résultats du contrôle microbiologique de produit fini (shampoing) et l'hydrolysate de kératine (HK) sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 3.5 Résultats du contrôle microbiologique de produit fini et HK.

Paramètres	Résultats	Obtenus	Norme de laboratoire VENUS	Interprétation
	HK	Shampoing		
G A M à 30±2C°	0	0	≤ 1000mg	Conforme
Levures et Moisissures à 22-25C°	0	0	≤ 100mg	Conforme

Le contrôle microbien basé sur le comptage des produits finis, les levures et les moisissures, ainsi que les bactéries aérobies mésophiles, ont documenté leur absence, donc il est considéré conforme aux normes (NA 8287, 1999) et (NA 8285, 1990).

Dans l'industrie cosmétique, la sélection correcte des conservateurs est un facteur très important afin d'éviter tous les problèmes liés à la propagation des contaminants avec ces résultats, on peut dire que c'est effectivement un bon produit qualité microbiologique. [33]

3.4 Résultat du contrôle organoleptique :

Les résultats de l'évaluation des caractères organoleptiques de produit fini sont groupés dans le tableau suivant :

Tableau 3.6 Résultats du contrôle organoleptique de produit fini.

Paramètres de contrôle organoleptique	Résultats	obtenus	Méthodes	Spécification du Laboratoire VENUS
	Shampooing			
Couleur	Blanc		Control Visuel	Conforme
Aspect	Liquide	visqueux	Control Visuel	Conforme
Odeur	Caractéristique	au produit	Control Olfactif	Conforme

L'évaluation sensorielle des produits finis a montré que le produit présente des caractéristiques organoleptiques conformes aux spécifications données par le laboratoire VENUS.

3.5 Résultats du contrôle physico-chimique :

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau comme suit :

Tableau 3.7 Résultats du contrôle physico-chimique des produits semi finis et finis.

Paramètres Physico - Chimiques	Résultats	Obtenus	Norme de Laboratoire VENUS	Interprétation
	Produit semi fini	Produit fini		
pH	4.5	4.76	4.50-5.50	Conforme
Viscosité	6000	6500	3000-7000	Conforme

Les résultats de la mesure du pH sont conformes aux normes algériennes (NA 367, 1990).

De même, la valeur de la viscosité des produits finis est conforme aux normes de laboratoire VENUS.

Discussion générale :

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet de fin d'études montrent clairement une forte possibilité de valoriser les agrodéchets locaux comme ressources naturelles dans la production des produits à valeurs ajoutées pour la société Algérienne. A cet effet, en Algérie, les déchets riches en kératines sont restés sans valorisation malgré la forte demande par l'industrie du cosmétique et parapharmaceutique des bioadditifs de type kératine et ses dérivés. Ces bioadditifs sont importés avec un chiffre d'affaire très considérable et par voie de conséquence, un marché local de production mériterait un investissement gagnant.

La dégradation des déchets agroalimentaire a été étudiée en vue de dépolluer l'environnement. La valorisation microbienne des déchets vise à produire des métabolites notamment des protéines et spécialement la kératinase.

Plusieurs études ont été réalisées pour l'extraction et la caractérisation de la kératine à partir des plumes afin de l'exploiter sous différentes formes et dans divers secteurs industriels. Par conséquence, de nombreuses méthodes et techniques ont été développées fournissant des résultats impressionnants qui peuvent être un outil de valeur et un appui scientifique pour les prochaines recherches.

Les plumes restent toujours mal gérées et peu exploitable malgré leur composition riche et leur bon marché, ce qui nécessite plus d'effort de la part des chercheurs afin de développer de nouvelles approches pour la régénération de la kératine vu les propriétés promettant qu'elle a révélé en s'appuyant sur les résultats phénoménaux atteint auparavant, ce qui nous permettra d'éliminer les déchets des plumes d'une façon bénéfique à environnement en premier lieu et au secteur industrielle en seconde lieu.

Les résultats de la recherche montrent que plusieurs travaux ont été réalisés sur l'extraction de la kératine et la production de kératinases à partir de différentes sources, notamment les plumes de volaille et les cheveux humains. Voici un résumé des principales conclusions de ces travaux :

Selon (Mahieddine), [38] a évalué l'extraction de la kératine à partir de plumes de volaille à l'aide de diméthylsulfoxyde (DMSO). Les résultats ont montré un rendement de 14% pour 10 g de plumes, ce qui est considéré comme une valeur faible.

Selon (Boubkeur et al) [39], la valorisation des plumes de volaille par la préparation de kératine et l'hydrolyse kératiniques par des souches kératinolytiques pour la fabrication de crèmes dépilatoires. Les résultats ont montré que la kératine extraite à partir des plumes de volaille était de qualité suffisante pour être utilisée dans la fabrication de crèmes dépilatoires.

Agarwal et al. [40] ont comparé quatre méthodes couramment utilisées pour l'extraction de la kératine à partir de cheveux humains et a mis en évidence des différences physiques et chimiques dans la kératine extraite. Les méthodes d'extraction testées étaient le sulfure de sodium, l'acide peracétique, l'urée et l'acide thioglycolique. Les résultats ont montré que la kératine extraite par la méthode de l'acide peracétique avait des propriétés significativement différentes des autres méthodes.

Shavanadi et al. [41] ont évalué différentes méthodes d'extraction de la kératine à partir de la laine de mouton. Les résultats ont montré que la méthode d'extraction à l'aide d'une solution de thiocyanate d'ammonium était la plus efficace pour extraire la kératine de la laine de mouton.

Selon Jin et al. [42], la souche *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 30h.

En 2020, Akram et al. [43] ont 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

Selon Correa et al. [44], la caractérisation d'une enzyme kératinolytique produite par la souche *Bacillus sp. P7* dont les résultats obtenus révèlent que cette souche a efficacement dégradé la kératine des plumes.

Globalement, ces travaux ont montré que l'extraction de la kératine peut être réalisée à partir de différentes sources, et que les propriétés de la kératine extraite peuvent varier en fonction de la méthode d'extraction utilisée.

Les travaux ont également montré que l'extraction de la kératine à partir de plumes de volaille peut être réalisée à l'aide de différentes méthodes, telles que l'hydrolyse kératiniques et l'utilisation de kératinases.

Ces résultats peuvent avoir des implications pour l'utilisation de la kératine comme bioadditifs et biomatériaux dans diverses applications industrielles, notamment, en cosmétique, parapharmaceutique, tannerie et biomédicale.

Conclusion générale

Notre contribution pour produire la kératine et ses dérivés en valorisant un agrodéchet noble qui est disponible en grande quantité en Algérie nous a permis de conclure sur les points suivants :

- Le prétraitement de plumes de volailles est une étape indispensable, car elle permet d'éliminer la graisse et les impuretés et influence favorablement les propriétés physicochimiques et mécaniques des plumes, ce qui facilite l'extraction et l'analyse de la kératine.
- Selon les résultats obtenus, les plumes de volailles constituent une source potentielle de kératine selon le taux de protéines élevé dosé par la méthode spécifique de Bradford.
- L'activité kératinolytique (kératinase) testée dans le milieu de fermentation liquide à base de farine de plume a révélé que cette dernière augmente au cours du temps chez les souches étudiées avec un optimum observé au cours du troisième jour.
- Après hydrolyse, une présence nette des acides aminés essentiels dans l'hydrolysate de kératine confirme l'effet positif des kératinases bactériennes dans la solubilisation des plumes ainsi que sa richesse en biomolécules qui sont aptes à remplacer la kératine dans ses fonctions fondamentales comme bioadditif notamment, en cosmétique et parapharmaceutique.

Concernant la préparation de shampooing à base de l'hydrolysate de kératine, il est impératif d'effectuer un contrôle des produits sur le plan organoleptique, physico-chimique et microbiologique dont les résultats que nous avons obtenus, nous permettent de déduire que :

- * Sur le plan organoleptique et physicochimique, le produit présente des propriétés organoleptiques satisfaisantes.
- * Sur le plan microbiologique, le produit est exempt de germes pathogènes et conformes aux normes.

Les résultats obtenus à travers cette étude semblent prometteurs et nous incitent à poursuivre la recherche dans cette thématique en vue de définir une ligne de conduite pour une application à l'échelle pilote puis industrielle.

Toutefois, il est intéressant de poursuivre les investigations autour des axes suivants :

- Une optimisation du milieu et des conditions de culture pour un meilleur rendement.
- Un test d'activité des souches avec d'autres substrats pour évaluer son éventuel intérêt dans d'autres applications.
- Purification et caractérisation des Kératinases produites par des souches microbiennes.
- L'étude approfondit de l'enzyme et son mécanisme d'action.
- L'étude de la production de l'enzyme à l'échelle industrielle, dans les différents domaines.

Il à noter que notre projet est déposé comme brevet et accepté comme Start up au niveau de l'Université Saad Dahlab Blida 1 d'où l'importance d'explorer notre production de l'échelle laboratoire vers l'échelle pilote puis à l'échelle industrielle.

Références bibliographiques

- [1] Purandaradas, A., S. T. M. K. B. R. G. A. D. D. K. V. . . K. P. (2018). Development and quantification of biodiesel production from chicken feather meal as a cost-effective feedstock by using green technology. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 14:133–139.
- [2] Fagbemi, O. D., S. B. . T. T. (2020). Optimization of keratin protein extraction from waste chicken feathers using hybrid pre-treatment techniques. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17:100–267.
- [3] Li, Q. (2019). Progress in microbial degradation of feather waste. *Frontiers in Microbiology*, 10:2717.
- [4] Gupta, R., . R. P. (2006). "microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70:21–33.
- [5] Rouse, J. G., . V. D. M. E. (2010). A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*, 3(2):999–1014.
- [6] Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., and Meyers, M. A. (2016b). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76:229–318.
- [7] Fraser, R., MacRae, T., and Rogers, G. (1972). *Keratins, their composition, structure and biosynthesis*. Charles C. Thomas, Springfield.
- [8] Sharma, S., Gupta, A., and Kumar, A. (2019b). Keratin: an introduction. keratin as a protein biopolymer: Extraction from waste biomass and applications. In Sharma, S. and Kumar, A., editors, *Keratin as a Protein Biopolymer: Extraction from Waste Biomass and Applications*, pages 1–18. Springer.
- [9] Bragulla, H. H. and Homberger, D. G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*, 214(4):516–559.
- [10] Kumawat, T. K., Sharma, A., Sharma, V., and Chandra, S. (2018a). Keratin waste: the biodegradable polymers. In *Keratin*. IntechOpen.

- [11] Kumawat, T. K., Sharma, A., Sharma, V., and Chandra, S. (2018a). Keratin waste: the biodegradable polymers. In *Keratin*. IntechOpen.
- [12] Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., and Meyers, M. A. (2016a). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76:229–318.
- [12] Jacques, C. (2003). Etude de la valorisation des déchets d'origines kératiniques par voie thermo-mécano-chimique en vue de l'obtention de filament continu : cas spécifique de la laine. These de doctorat, Université de Toulouse.
- [13] Kumawat, T. K., Sharma, A., Sharma, V., and Chandra, S. (2018b). Keratin waste: the biodegradable polymers. In *Keratin*. IntechOpen.
- [14] HAFID O, B. M. (2019). Optimisation et modélisation de la production de la Kératinase par la souche *Actinopolyspora* sp. These de doctorat, Université des Frères Mentouri Constantine.
- [15] Shah, A., Tyagi, S., Bharagava, R. N., Belhaj, D., Kumar, A., Saxena, G., ..., and Mulla, S. I. (2019). Keratin production and its applications: current and future perspective. In *Keratin as a Protein Biopolymer: Extraction from Waste Biomass and Applications*, pages 19–34.
- [16] Sharma, S., Gupta, A., and Kumar, A. (2019a). Keratin: An introduction. In *Keratin as a Protein Biopolymer*, pages 1–18. Springer, Cham.
- [17] Khajavi, R., Abbasipour, M., and Bahador, A. (2016). Electrospun biodegradable nanofiber scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(3).
- [18] Shavandi, A., Silva, T. H., Bekhit, A. A., and Bekhit, A. E. D. A. (2017). Keratin: dissolution extraction and biomedical application. *Biomaterials science*, 5(9):1699–1735.
- [19] Secchi, G. (2008). Role of protein in cosmetics. *Clinics in dermatology*, 26(4):321–325.
- [20] Nayak, K. K., Parkhey, P., and Mazumdar, B. (2019). Keratin-based biotechnological applications. In *Keratin as a Protein Biopolymer*, pages 201–224. Springer, Cham.

- [21] Vineis, C., Varesano, A., Varchi, G., and Aluigi, A. (2019). Extraction and characterization of keratin from different biomasses. In *Keratin as a Protein Biopolymer*, pages 35–76. Springer, Cham.
- [22] Sharma, S., Gupta, A., Chik, S. M. S., Kee, C. G., Mistry, B. M., Kim, D. H., & Sharma, G. (2017). Characterization of keratin microparticles from feather biomass with potent antioxidant and anticancer activities. *International journal of biological macromolecules*, 104, 189-196.
- [23] Posati, T., Giuri, D., Nocchetti, M., Sagnella, A., Gariboldi, M., Ferroni, C., Sotgiu,* G./archi, G., Zamboni, R., and Aluigi, A. (2018). Keratin-hydroxycalcites hybrid films for drug delivery applications. *European Polymer Journal*, 105:177–185.
- [24] Poole, A. J., Church, J. S., and Huson, M. G. (2009). Environmentally sustainable fibers from regenerated protein. *Biomacromolecules*, 10(1):1–8.
- [25] Selmane, D., B. Y. (2013-2014). Contribution à la valorisation de plumes de volaire comme élément de milieu de fermentation fongique. Thèse de doctorat, Université Constantine.
- [26] Mahmoudi, N. (2016). Emergence de l'aviculture dans la steppe algérienne. Thèse de doctorat, université ENSA.
- [27] Kaboré, T. T., Hien, E. E., Zombré, P. P., Coulibaly, A. A., Houot, S. S., and Masse, D. D. (2011). Valorisation de substrats organiques divers dans l'agriculture péri-urbaine d'ouagadougou (burkina faso) pour l'amendement et la fertilisation des sols: acteurs et pratiques. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement/Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 15(2):271–286.
- [28] Lounici, H. (2012). Valorisation d'un biomatériau, le chitosane, dans le traitement des eaux de surface et dans le conditionnement des boues. Thèse de doctorat.
- [29] Saintilan, R., Merour, I., Brossard, L., Tribout, T., Dourmad, J., Sellier, P., and Gilbert, H. (2013). Génétique de l'apport alimentaire résiduel chez le porc en croissance : relations avec les caractères de production et les caractères d'excrétion d'azote et de phosphore. *Journal des sciences animales*, 91(6):2542–2554.

- [30] Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K., and Meyer, A. (2020). Enzymes microbiennes catalysant la dégradation de la kératine : classification, structure, fonction. *Progress de la biotechnologie*, 44:107607.
- [31] Purchase, D. (2016). *Microbial Keratinases: Characteristics Biotechnological Applications and Potential*. Thèse de doctorat, Department of Natural Sciences, School of Science and Technology, Middlesex University, The Burroughs, London NW4 4BT, U.K.
- [32] Onifade, A., Al-Sane, N., Al-Musallam, A., and Al-Zarban, S. (1998). Une revue: potentiels d'applications biotechnologiques des micro-organismes dégradant la kératine et de leurs enzymes pour l'amélioration nutritionnelle des plumes et autres kératines comme ressources alimentaires du bétail. *Technologie des bioressources*, 66(1):1–11.
- [33] Martini, M. C. (2011). *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*. Lavoisier
- [34] Cai, C., & Zheng, X. (2009). Optimisation du milieu pour la production de kératinase dans le substrat capillaire par un nouveau *Bacillus subtilis* KD-N2 en utilisant la méthodologie de surface de réponse. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* , 36 (7), 875-883
- [35] Daroit, DJ, Correa, APF et Brandelli, A. (2009). Potentiel kératinolytique d'un nouveau *Bacillus* sp. P45 isolé du poisson du bassin amazonien *Piaractus mesopotamicus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* , 63 (3), 358-363
- [36] Joshi, SG, Tejashwini, MM, Revati, N., Sridevi, R. et Roma, D. (2007). Isolement, identification et caractérisation d'une bactérie dégradant les plumes. *Revue internationale des sciences avicoles* , 6 (9), 689-693
- [37] Selvam, K., & Vishnupriya, B. (2012). Biochemical and molecular characterization of microbial keratinase and its remarkable applications. *Int J Pharm Biol Arch*, 3(2), 267-275
- [38] Mahieddine, s. (2021). *Extraction de kératine et optimisation de la production des Kératinases par hydrolyse de plumes de volaille par une souche locale*. Thèse de doctorat, Univ Blida1.
- [39] Boubekour soumia, A. k. (2020). *Valorisation Des Plumes De Volaille Par Préparation De Kératine Et Hydrolyse Kératinique Par Des Souches Kératinolytique : Application Fabrication Des Crèmes Dépilatoire*. Thèse de doctorat, Université Saad Dahleb-Blida.

- [40] Agarwal, V., Panicker, A. G., Indrakumar, S., & Chatterjee, K. (2019). Comparative study of keratin extraction from human hair. *International journal of biological macromolecules*, 133, 382-390.
- [41] Shavandi, A., Bekhit, AEDA, Carne, A. et Bekhit, A. (2017). Évaluation de l'extraction de la kératine de la laine par des méthodes chimiques pour l'application de biopolymères. *Journal des polymères bioactifs et compatibles*, 32 (2), 163-177.
- [42] Jin, M., Chen, C., He, X. et Zeng, R. (2019). Caractérisation d'une kératinase extrêmement stable en milieu alcalin à partir du projet de génome de *Bacillus* sp dégradant les plumes. JM7 de haute mer. *Acta Oceanologica Sinica* , 38 (2), 87-95
- [43] Akram, F., ul Haq, I., & Jabbar, Z. (2020). Production et caractérisation d'une nouvelle kératinase thermo- et détergente stable à partir de *Bacillus* sp. NKSP-7 avec des applications perceptibles dans les industries de transformation du cuir et de blanchisserie. *Journal international des macromolécules biologiques*, 164, 371-383
- [44] Corrêa, APF, Daroit, DJ, & Brandelli, A. (2010). Caractérisation d'une kératinase produite par *Bacillus* sp. P7 isolée d'un environnement amazonien. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64 (1), 1-6.

ANNEXES

Annexe 1

Matériel et consommables :

Flacons 250 mL – Erlenmeyers - Becher - Spatule – Entonnoir - Eprouvette graduée - Buchner funnel- Pissette - Tubes à essai- Barreau magnétique - Anse stérile - Coton cardé - Aluminium - Pipettes pasteurs - Micropipette de 1000 μ L - Papier filtre - Verre de montre - Boîtes de Pétri.

Appareils :

Autoclave - Bec de flambage - Incubateur - Agitateur - Réfrigérateur - Centrifugeuse type SIGMA - pH mètre type HANNA - Spectromètre UV/Visible - Balance numérique - Bain marée - Pompe sous vide

Annexe 2

Solution Hydroxyde de sodium (1N) :

Pour préparer une solution NaOH (1N), on solubilise 4 g de NaOH pur dans 100 ml d'eau distillée, suivi une agitation vigoureuse.

Solution acide chlorhydrique (1N) :

Pour préparer une solution HCL (1N), on prend 8.28 ml du HCL et on dilue avec l'eau distillé jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 ml.

Solution d'acide trichloracétique TCA (0.4M) :

On solubilise 16.338 g dans 250 ml d'eau distillé et mélangés vigoureusement.

Solution tampon tris-HCL (0.05M) :

On mélange 1.5 g de tris dans 250 ml d'eau distillé et ajusté avec HCL (1N) jusqu'à l'obtention un pH 8.

Annexe 3

Description de la méthode de Bradford : La méthode de est une méthode d'analyse spectroscopique destinée à la détermination de la concentration exacte des protéines dans la solution de la kératine.

Principe	Sensibilité	Sélectivité	Durée	Facilité
Le colorant bleu de Coomassie Chargé négativement (forme anionique) se lie aux protéines chargées positivement. et donne une couleur bleue qui absorbe à 595 nm dans le spectrophotomètre TV	1 ug / ml	Acides aminés aromatique, l'arginine, tryptophane, proline à 2 465-595nm (très utile)	15 min	La réaction de Bradford est rapide, facile et stable pendant une heure

Annexe 4

Caractérisation de l'hydrolysate de kératine :

La biodégradation des plumes de volailles a été étudiée à l'aide de plumes de poulet. Elles ont été collectées dans un abattoir local, rincées et autoclavées. La capacité des souches à croître sur un milieu à base de plumes de poulet à raison de 10 g/L comme seule source de carbone et d'azote. Il a été constaté que les souches sont capables de croître sur ce milieu de culture ainsi, de produire des kératinases permettant la dégradation et la solubilisation presque totale des plumes, après 42 h de culture. Après avoir prouvé que les souches bactériennes produisent une activité kératinolytique extracellulaire nécessaire pour la préparation d'hydrolysate protéique de plumes, les plumes entières ont ensuite été incubées séparément pendant 42 h à 37 ou à 45 °C et sous une agitation de 200 rpm avec des enzymes semi-purifiées. Après incubation, la kératine en culture a été récupérée par filtration sur papier Whatman N ° 3, lavée deux fois avec de l'eau distillée et séchée à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le pourcentage de biodégradation des plumes a été calculé à partir des différences de poids sec des plumes résiduelles des échantillons traités et des témoins (plumes sans enzymes semi-purifiées).

La concentration en protéines a été mesurée comme décrit par Bradford (voir annexes) et la libération de groupes sulfhydryles dans le milieu de culture a été estimée à 412 nm en utilisant du DTNB selon la méthode d'Ellman. En outre, la détection des acides aminés soufrés et d'autres acides aminés a été effectuée par CLHP en utilisant une colonne analytique Eurospher 100-5 C18 (300 mm x 4,6 mm, Knauer, Berlin, Allemagne) avec 50% (v/v) d'acétonitrile dans de l'acétate de sodium 10 mM (pH 4,9) comme éluant à un débit de 1 mL/min. Les acides aminés ont été détectés à une longueur d'onde de 254 nm avec un détecteur UV-Visible à barrette de Diodes.

Annexe 5

Milieux de culture :

1. Préculture de milieu LB : (Préparation au laboratoire)



2. Culture bactérienne pour la production de l'hydrolysat :



Annexe 6

Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles et des levures et moisissures :

- 1- Ensemencer en profondeur 2 boîtes Pétri stériles avec 1 ml dans chacune pour la dilution de 1/10.
- 2- Ajouter 10 à 15 ml de milieu de culture (PCA et Sabouraud) porté à une température de 44 à 48°C à chaque boîte. Bien homogénéiser pour une meilleure dispersion.
Incuber comme suit :
 - 1 boîte (dilution 1/10) à 32°C pendant 72h pour détecter les bactéries aérobies mésophiles (milieu de culture sélectif Agar Plate- Count).
 - 1 boîte (dilution 1/10) à 22°C pendant 5 jours pour détecter les levures et moisissures (milieu sélectif Agar SABOURAUD).