

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA-Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biotechnologie microbienne



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Isolement et sélection d'une souche
bactérienne productrice de kératinases**

Présenté par :

MECHMECHE Naïma et SADOU Houria

Soutenu le : Samedi 24 juin 2017

Devant le jury composé de :

M^{me} ARKOUB O.	MCB	Présidente
M^{me} BOUCHERBA N.	MCA	Promotrice
M^r NOURI H.	MCB	Examineur

Année universitaire : 2016/2017



Dédicaces

Je dédie cet humble travail :

A la mémoire de mon grand-père, que dieu l'accueille dans son vaste paradis

A ma chère mère qui m'a entouré d'amour, d'affection, de tendresse et qui fait tout pour ma réussite, que dieu la garde

A ma grand-mère qui m'a soutenu tous le long de mon parcours

A mes chers oncles ainsi que leurs Femmes

A mes chères tantes

A mes adorables cousins

A chers Sofiane et Djahida ainsi que leurs familles

A tous mes amis et tous ceux qui me sont très chers

A mon binôme « Houria » et toute sa famille

A tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'au cycle universitaire

A ce qui contribuer de près ou de loin à ce travail.

NAIMA.M



Dédicaces

Je dédie cet événement marquant dans ma vie :

A la mémoire de mes grand parents paternelles, que dieu les
accueille dans son vaste paradis

A mes chers grands-parents maternels

A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux

Veillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel

A mes adorables sœurs et frères ainsi que leurs femmes et
maries

A mes petits anges neveux et nièces

A mes chères tantes et oncles et à tous mes cousins

A tous mes amis et tous ceux qui me sont très chers

A mon binôme « Naima » et toute sa famille

Houria.S



Remerciements

Tout d'abord, nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude au Bon Dieu qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.

Nous voudrions exprimer nos sincères remerciements en premier lieu à notre promotrice M^{me} BOUCHERBA d'avoir accepté de nous encadrer et de nous donner la possibilité d'effectuer ce travail et pour, son aide, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion, nous la remercions vivement.

Ainsi qu'à M^{me} ARKOUB O, qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider ce jury et d'examiner ce travail.

Nous remercions les plus sincères et les plus profonds sont adressés à M^r NOURI H qui a bien voulu nous faire l'honneur d'examiner ce travail.

On tient à remercier également tous les gens qui nous ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail

Sans oublier l'ingénieur du laboratoire de Génie Biologique « Badria » pour son aide et ces conseils.



Sommaire

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....01.

Synthèse bibliographique

1. Sources de kératine.....	03.
1.1. Kératine.....	03.
1.1.1. Définition.....	03.
1.1.2. Rôle de la kératine.....	03.
1.2. Coproduits kératiniques.....	03.
2. Cas des plumes de volaille.....	04.
2.1. Production mondiale de la volaille.....	04.
2.2. Production de la volaille en Algérie.....	05.
3. Valorisations des coproduits de volaille.....	05.
3.1. Structure et kératine de plumes.....	06.
4. Kératinases.....	07.
4.1. Applications industrielles des kératinases.....	08.
4.2. Sources microbiennes des kératinases.....	09.
4.3. Genre Bacillus comme producteur de kératinases.....	10.
4.3.1. Taxonomie du genre Bacillus.....	10.
4.3.2. Caractéristiques du genre Bacillus.....	10.

Matériels et méthodes

1. Présentation du travail.....	11.
2. Prélèvement d'échantillons.....	11.
2.1.Echantillon sol.....	11.
2.2.Echantillon plumes.....	13.
3. Isolement et sélection des souches bactériennes kératinolytiques.....	14.
4. Production de kératinases.....	16.
4.1.Culture en milieu liquide.....	16.
4.2.Test d'activité kératinolytique.....	17.
4.2.1. Préparation de la solution enzymatique.....	17.
4.2.2. Préparation du substrat.....	17.
4.2.3. Incubation enzymatique.....	18.
5. Préidentification de l'isolat sélectionné.....	19.
5.1.Caractères morphologiques, biochimiques et physicochimiques.....	19.
5.1.1. Observation macroscopique.....	19.
5.1.2. Observation microscopique.....	19.
5.1.3. Mobilité.....	19.
5.1.4. Recherche de la catalase.....	19.
5.1.5. Température optimale de croissance.....	19.
5.1.6. pH optimum de croissance.....	20.
5.1.7. Etude de l'effet de concentration du sel (NaCl).....	20.
6. Suivi de l'activité kératinolytique.....	20.

Résultats et discussion

1. Isolement et purification des isolats.....	21.
2. Sélection de souches bactériennes kératinolytiques.....	22.
3. Production de kératinases.....	25.
3.1.Culture en milieu liquide.....	25.
3.2.Test de l'activité kératinolytique.....	26.
4. Préidentification de l'isolat sélectionné EP.1.....	28.
4.1.Caractères morphologiques, biochimiques et physicochimiques...	28.
4.1.1. Observations macroscopiques.....	28.
4.1.2. Observation microscopique.....	29.
4.1.3. Mobilité.....	29.
4.1.4. Recherche de la catalase.....	30.
4.1.5. Température optimale de croissance.....	31.
4.1.6. pH optimum de croissance.....	32.
4.1.7. Effet de la concentration en NaCl.....	33.
5. Test de l'activité kératinolytique en utilisant la kératine azure comme substrat.....	36
.	
Conclusion.....	37.
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Principaux producteurs de viande de volaille dans le monde (équivalent carcasse)	4
II	Cheptel poulets- Production annuelle (Nombre de têtes)	5
III	Pourcentage des acides aminés dans les fibres kératiniques des plumes de poulet	7
IV	Récapitulatif de la codification, sources d'isolement et conditions de culture	21
V	Caractères cultureux des 15 isolats	24
VI	Suivi de la croissance à 600 nm de tous les isolats à pH 8 et 7	25
VII	Comparaison des activités kératinolytiques	27
VIII	Comparaison de la température optimale de l'isolat EP.1 à quelques espèces de Bacillus	32
IX	Comparaison du pH optimum d'EP.1 à quelque genre de Bacillus	33
X	Comparaison de la concentration en NaCl nécessaire pour la croissance du genre Bacillus	34
XI	Récapitulatif des caractères obtenus de l'isolat EP1	35
XII	Suivit de l'activité kératinolytique de l'isolat EP1 en utilisant la kératine de plume et la kératine azure	36
XIII	Comparaison du prix de revient de la kératine de plumes et la kératine azure	36

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Anatomie d'une plume	6
02	Les liaisons de cohésion de la kératine	7
03	Site sol de "Tala Hamza "	12
04	Site sol de «Ighil Ali»	12
05	Site de "Ihadadene Oufella"	13
06	Site de "Fenaia Il-Maten"	14
07	Plumes blanches lavée et séchées, tuerie d'El Kseur.	15
08	Farine de plume	15
09	Préculture des différents isolats bactériens.	16
10	Conduite de la culture des isolats bactériens	17
11	Kératine azur.	17
12	Solution de kératine azur.	17
13	Quelques isolats producteurs de kératinases	23
14	Quelques isolats producteurs de kératinases	26
15	Suivi de l'activité kératinolytique à 24, 48 et 72h des isolats à pH 7	26
16	Aspect de l'isolat EP.1 sur FBMS	28
17	Mise en évidence de la zone d'hydrolyse de l'isolat EP.1	28
18	Aspect de l'isolat EP.1 sur gélose nutritive	29
19	Observation microscopique de l'isolat EP.1 après coloration de Gram (Grossissement X1000)	29
20	Etat frais de l'isolat EP.1 (Grossissement X 400) (a) : Localisation de deux cellules à t=0s (b) : Localisation de deux cellules à t=6s	30
21	Formation des bulles de gaz (catalase +)	30
22	Effet de la température sur la croissance de l'isolat EP.1	31
23	Effet du pH sur la croissance de l'isolat EP.1	32
24	Effet de la concentration en NaCl sur la croissance de l'isolat EP.1	34

Liste des abréviations

Abbreviations	Signification
α	Alpha
β	Beta
DMSO	Diméthylsulfoxyd
DO	Densité optique
EC	Enzyme Commission
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FBMS	Milieu à base de farine de plumes solide
FBML	Milieu à base de farine de plumes liquide
Fig.	Figure
g	Gramme
g	Gravité
GN	Gélose Nutritive
h	Heure
LMA	Laboratoire de microbiologie appliqué
M	Molaire
mm	Millimètre
min	Minute
ml	Millilitre
MT	Million de tonnes
N	Normal
nm	Nanomètre
s	Seconde
TCA	Acide trichloracétique
Tris	Tris (hydroxy méthyl) amino méthane
UI	Unité international
UV	Ultra-violet
v	Volume

Introduction

Introduction

La pollution environnementale causée par l'utilisation industrielle des produits chimiques est toujours un sujet d'actualité. Les alternatives biologiques, compatibles avec l'environnement, sont de plus en plus privilégiées. Parmi ces alternatives, l'emploi d'enzymes industrielles est très profitable à la fois sur le plan énergétique et l'aspect environnemental (**Drouin, 2005**).

Les protéases sont parmi les enzymes hydrolytiques les plus vitales, qui sont principalement synthétisées par un groupe diversifié de microorganismes et qui représentent 60 % des ventes totales des enzymes dans le marché mondial (**Rao et al., 1998 ; Rai et al., 2010**).

Les nouvelles propriétés de ces protéases ont également révolutionné la biotechnologie avec leurs exploitations dans différentes applications comme la valorisation de certains coproduits kératiniques, tels que les plumes qui sont composées principalement de la kératine (**Oscar et al., 2015**), ces kératines ne sont pas dégradables par les enzymes protéolytiques communes telles que la trypsine, la pepsine, la papaïne. Par conséquent, les plumes peuvent constituer un problème environnemental. (**Abidi et al., 2008**).

L'utilisation de kératinases microbiennes pour la dégradation de la kératine des plumes en entités peptidiques plus petites, 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. (**Gupta et Ramnani, 2006 ; Chhimpa et al., 2016**), les kératinases peuvent être aussi utiliser dans diverses applications tels que : la détergence, la récupération de l'argent, le traitement du cuir ainsi que la médecine.

Un certain nombre de microorganismes ont été utilisés pour la production de kératinases, y compris les champignons mésophiles et les actinomycètes (**Cedrola et al., 2012 ; Laba et al., 2013 ; Sivakumar et Raveendran, 2015**). Certaines espèces de *Bacillus* sont également connues pour produire ces enzymes kératinolytiques (**Williams et al., 1990**).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'isolement, la sélection et à la préidentification d'une souche bactérienne productrice de kératinases, et le présent travail a pour intérêts :

↳ Sur le plan développement technologique :

La fabrication de la kératine « substrat analytique » à partir des plumes blanches de poulet, afin de réintroduire ce substrat dans les travaux pratiques des étudiants, on a également voulu valoriser les plumes de poulet comme milieu de culture « substrat bon marché » afin de produire des kératinases.

↳ Sur le plan recherche fondamentale :

Nous avons essayé de rechercher un isolat bactérien performant, c'est à dire ayant une activité kératinolytique élevée, par la suite nous renforcerons ce travail par d'autres techniques expérimentales qui nous permettront éventuellement de publier ce présent travail.

↳ Comme support bibliographique nous avons développé les aspects suivants : sources de kératine, production mondiale de la volaille, production de la volaille en Algérie, structure et kératine de plume, kératinases, sources microbiennes, applications industrielles et le genre *Bacillus* comme producteur de kératinases.

Pour réaliser nos objectifs, nous avons effectué le travail pratique suivant :

- ↳ Isolement des souches kératinolytiques sur milieu solide à base de farine de plumes.
- ↳ Purification des souches kératinolytiques par repiquage successif sur gélose nutritive.
- ↳ Dosage de l'activité kératinolytique des extraits enzymatiques après fermentation.
- ↳ Sélection de l'isolat le plus performant, et identification morphologique, biochimique et physicochimique de ce dernier.
- ↳ Comparaison de l'activité kératinolytique de l'isolat le plus performant sur substrat kératine de plumes et kératine azure.

Partie théorique

1. Sources de kératine

1.1. Kératine

1.1.1. Définition

Le mot « Kératine » est apparu dans la littérature aux environs de l'année 1850. La kératine vient du mot « Kera » en grec qui signifie une corne (**Rouse et Van Dyke, 2010**). En effet les kératines représentent une famille des protéines fibreuses insolubles produites dans certaines cellules épithéliales des vertébrés supérieurs (reptiles, oiseaux, et mammifères) (**Jacques, 2003 ; Brandelli et al., 2010**), connues sous le nom des scléroprotéines (**Kunert, 1989**).

En fonction de leurs teneurs en soufre, les kératines sont regroupées en kératines dures (ongles, plumes, poils et sabots) et en kératines molles (peau et cals) (**Scott et Untereiner, 2004 ; Habbeche, 2014 ; Su et al., 2017**).

1.1.2. Rôle de la kératine

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

1.2. Coproduits kératiniques

La kératine produite est utilisée par de nombreux êtres vivants comme élément de structure et elle garantit une peau imperméable ; elle représente 85 % des protéines cellulaires tels que les cheveux, la laine, les plumes, les ongles et les cornes. (**Bragulla et Homberger, 2009**).

✚ Laine

La laine fait partie de la famille des fibres protéiques, elle est composée d'environ 97 % de kératine, 2 % de lipides et 1 % de sels minéraux (**Elie, 2008**).

✚ Cheveux

Les cheveux sont implantés obliquement dans le cuir chevelu ; la tige du cheveu est entièrement kératinisée (65-95 % des protéines du cheveu) (**Mitu, 2004**).

Plumes

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

2. Cas des plumes de volaille

2.1. Production mondiale de la volaille

En 2014, la production mondiale de viande de volaille a été estimée à 110,5 millions de tonnes (MT), soit une augmentation de 3,9 % par rapport à 2013. Les perspectives agricoles de la FAO montrent que l'on peut s'attendre à une progression de la production de volailles de 1,8 % par an de 2015 à 2024, tandis que la production de toutes viandes confondues augmenterait seulement de 1,3 % par an. La filière volaille deviendrait alors, d'ici 2020, la première production de viandes dans le monde (134,5 MT en 2023), où les États-Unis conserveraient leur place de premier producteur mondial de volailles, devant la Chine comme indiqué dans le tableau I. (FAO, 2015).

Tableau I: Principaux producteurs de viande de volailles dans monde (équivalent carcasse) (Food Outlook FAO., 2015 ; Commission européenne, 2015).

	Production 2014 en MT	Evolution 2014/2013	Prévisions de production 2015 en MT
États Unis	20,3	+ 1,5 %	20,7
Chine	18,5	+ 0,5 %	18,5
L'Union européenne	14,1	+ 2,6 %	13,5
Brésil	13,3	+ 2,9 %	13,6
Russie	3,7	+ 3,9 %	3,8
Inde	2,5	+ 1,9 %	2,6
Monde	110,5	+ 3,9 %	112,1

2.2. Production de la volaille en Algérie

L'élevage du poulet de chair a depuis longtemps retenu l'attention de tous les pays. Cette spéculation à cycle de production très court a été souvent utilisée pour répondre aux besoins croissants en protéines animales. L'Algérie essaie d'augmenter sa production avicole par un programme d'intensification de l'élevage aviaire. Sachant que la production annuelle de poulet de chair en Algérie est de 253 000 tonnes selon la FAO 2009 (**Food Outlook FAO., 2015 ; Commission européenne, 2015**).

L'Algérie figure dans les toutes premières places de l'élevage du poulet des pays du grand Maghreb (**tableau II**) avec 124 millions de têtes de poulets en 2007, est en 2^{ème} Place derrière le Maroc avec 140 000 000 têtes, il représente 34,71 % du cheptel de la région (**Nouad, 2011**).

Tableau II : Cheptel poulets- Production annuelle (Nombre de têtes) (Nouad, 2011).

(x 1 000)	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Algérie	110 000	120 000	125 000	125 000	125 000	125 000	124 000
Libye	25 000	25 000	25 000	25 000	25 000	25 000	25 000
Maroc	137 000	137 000	137 000	137 000	137 000	140 000	140 000
Mauritanie	4 100	4 200	4 200	4 200	4 200	4 200	4 200
Tunisie	61 417	62 000	62 000	64 000	64 000	62 000	64 000
Total	337 517	348 200	353 200	355 200	355 200	356 200	357 200
% Algérie	32.59%	34.46%	35.39%	35.19%	35.19%	35.09%	34.71%

3. Valorisations des coproduits de volaille

Les principaux coproduits générés dans les usines de transformation de la volaille sont les plumes, le sang, les résidus de désossage, les pattes et les viscères. Il est à noter que les quantités de plumes annuelles provenant de l'abattage de volaille représentent plus de 250 000 tonnes de plumes humides (**Boucherba, 2014**).

Ces matériaux représentent une quantité massive de déchets solides qui devraient être correctement gérés pour éviter les dommages environnementaux et la perte de matières premières importantes pour l'industrie alimentaire et comme ressources biologiques (Jayathilakan, 2012).

3.1. Structure et kératine de plumes

La plume est composée d'un axe central nommé le rachis, creux à sa base et plein dans sa partie principale. Elle porte des barbes, insérées en deux séries de part et d'autre de l'axe dans un seul plan et enchevêtrées par des barbules perpendiculaires, qui ne peuvent pas être observées à l'œil nu. (Fig. 01) ces derniers sont accrochés les uns aux autres grâce à des crochets (Kock, 2006).

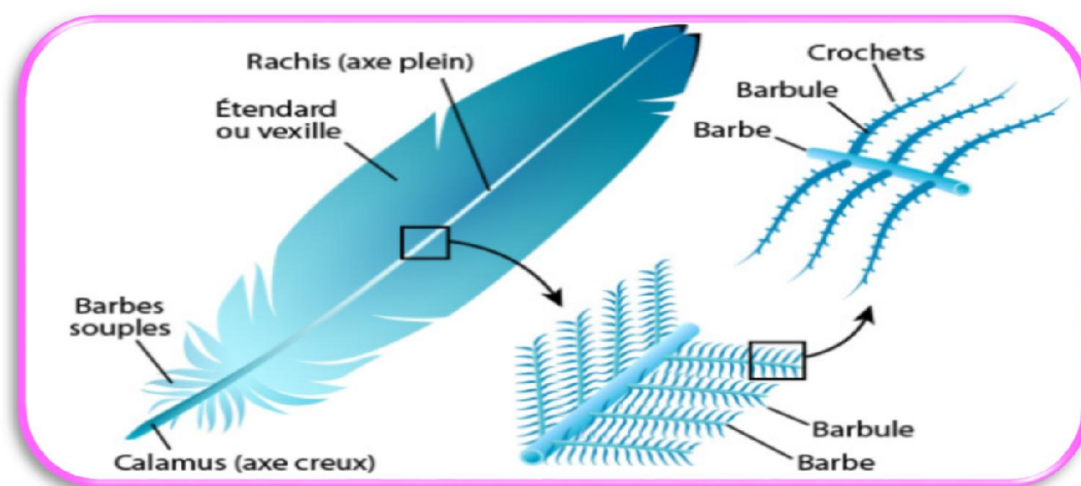


Fig. 01 : Anatomie d'une plume (Saha, 2013).

Les plumes ont des structures très spéciales qui distinguent les oiseaux des autres animaux et des fonctions physiologiques importantes les plumes se composent de kératine (de 91 %), de lipides 1%, et d'eau (8 %) (Kock, 2006).

La kératine de plume est une protéine particulière. Elle a une teneur élevée en cystéine (Tableau III), un acide aminé soufré qui est à l'origine de la formation des ponts disulfures, créant un réseau tridimensionnel compact engendrant une grande stabilité (Fig. 02) (Saravanane et Dhurai, 2012).

4.1. Applications industrielles des kératinases

L'application des kératinases dans l'environnement ainsi que dans le secteur de la biotechnologie a été bien étudiée (**Pandey et al., 2017**), citant les applications suivantes :

Détergence

L'emploi d'enzymes dans les détergents est l'application la plus répandue de toutes les technologies enzymatiques (**Drouin, 2005**) ; environ 89 % des enzymes de détergent sont des protéases alcalines (**Gupta et Ramnani, 2006**).

Les kératinases peuvent contribuer à l'élimination des surfaces kératiniques qui sont souvent rencontrées dans la blanchisserie, comme les cols des chemises (**Gupta et Ramnani, 2006**). De plus, les kératinases sont utilisés dans le nettoyage des canalisations bouchées par des déchets kératiniques (**Farag et Hassan, 2004**).

Récupération de l'argent

Les protéases alcalines jouent un rôle crucial dans le bioprocédé des films photographiques usés pour la récupération d'argent ; ces pellicules contiennent du polyester comme matière de base, enveloppée par une couche de gélatine et une couche d'argent (1,5 à 2 % par unité de masse). Cet argent est récupéré en brûlant ces pellicules, ce qui provoque une pollution environnementale indésirable, et pour remédier, des protéases alcalines sont mises en place pour la récupération en continu de l'argent à partir de ces films photographiques en décomposant la couche de gélatine qui est difficile à dégrader par d'autres protéases (**Fujiwara, 1989 ; Shankar et al., 2010**).

Traitement de cuir

Le tannage est un procédé chimique, consistant à transformer les peaux en les rendant plus durables et plus souples (**Deré, 2007**).

Les méthodes conventionnelles dans le traitement de cuir utilisent du sulfure d'hydrogène et d'autres produits chimiques ce qui cause les pollutions environnementales. Ainsi, pour ces raisons environnementales, le traitement du cuir utilise une approche enzymatique ce qui il lui offre plusieurs avantages (diminue les coûts, améliore la qualité du produit final) (**Andersen, 1998 ; Gupta et al., 2002**).

Autres applications

Autres applications potentielles des kératinases, c'est la digestion anaérobie des déchets de volaille pour produire du gaz naturel comme combustible (**Brutt et Ichida, 1999**).




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

4.2. Sources microbiennes des kératinases

Les kératinases sont produites par les bactéries, les Actinomycètes et les moisissures. Parmi toutes les sources de kératinases, la source bactérienne est dominante il s'agit d'espèces appartenant au genre *Bacillus*, particulièrement :

Bacillus. licheniformis et *Bacillus subtilis* sont les producteurs les plus efficaces des kératinases (**Thys et al., 2004 ; Gupta et al., 2013**).

Cependant, les kératinases ont été produites aussi par :

-  D'autres souches bactériennes tel que *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Lysobacter*, *Nesterenkonia*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, et *Meiothermus* (**Gupta et Ramnani, 2006 ; Daroit et Brandelli, 2014**).
-  Les Actinomycètes du genre *Thermoactinomyces* (**Ignatova et al., 1999 ; Gousterova et al., 2005**) et *Actinomadura keratinilytica* (**Habbeche, 2014**).
-  Des champignons : *Trichophyton* (**Asahi, et al., 1985**), *Microsporium* (**Kunert, 1989**).

4.3. Genre *Bacillus* comme producteur de kératinases

4.3.1. Taxonomie du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est ubiquiste dans la nature, il appartient à la famille des bacillaceae, ordre des bacillales, classe des bacilli, phylum des firmicutes. (Zhang et al., 2009).

La classification taxonomique des bactéries du genre *Bacillus* a été auparavant classé selon leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques ainsi que leur capacité à sporuler (Bron et al., 1999) alors qu'aujourd'hui la classification se base sur l'analyse comparative des séquences de base de L'ARN ribosomal 16S (Maughan et Auwera, 2011).

4.3.2. Caractéristiques du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène de bactéries en forme de bâtonnets droit ou légèrement incurvées, à Gram positif avec des extrémités arrondies à l'exception de *Bacillus cereus* qui possède des extrémités carrées.

Ces bactéries sont immobiles ou mobiles par des flagelles péritriches, aérobies ou anaérobies facultatifs, elles sont capables de former des endospores résistantes à différentes conditions défavorables et sont catalase positive, elles sont capables de se développer sur des milieux ordinaires ainsi que la composition du milieu de culture et les conditions d'incubations influent sur leurs morphologie (De Vos et al., 2009).

Partie expérimentale

1. Présentation du travail

Notre travail de recherche est réalisé entre le 06 février et le 25 mai 2017 au niveau du Laboratoire Pédagogique « Génie Biologique », et au sein du Laboratoire de Recherche « Microbiologie Appliquée » (LMA).

2. Prélèvement d'échantillons

Deux types d'échantillons : sol et plumes ont été collectés en février 2017 à partir de quatre sites de la wilaya de Bejaia.

2.1. Echantillon sol

Les échantillons sont prélevés au niveau du sol de deux poulaillers amendés avec des fientes et déchets de plumes de poulets, ces derniers engendrent une activité microbienne accrue, en l'occurrence, une activité kératinolytique. Ces types d'environnements sont utilisés dans plusieurs travaux comme source de kératinases (Pandian *et al.*, 2012 ; Paul *et al.*, 2013 ; Govarthanan *et al.*, 2015 ; Yusuf *et al.*, 2016).

Ces échantillons sont prélevés aléatoirement après élimination approximativement de 03 centimètres du sol de surface dans 05 points différents et distants, par la suite on a réalisé un échantillon aliquote en mélangeant l'ensemble des prélèvements, le sol (10 g) est mis en suspension dans 90 ml d'eau distillée stérile.

Concernant les sites de prélèvement, il s'agit : d'un site à « Tala Hamza » (**Fig. 03**) et un site à « Ighil Ali » (**Fig. 04**).

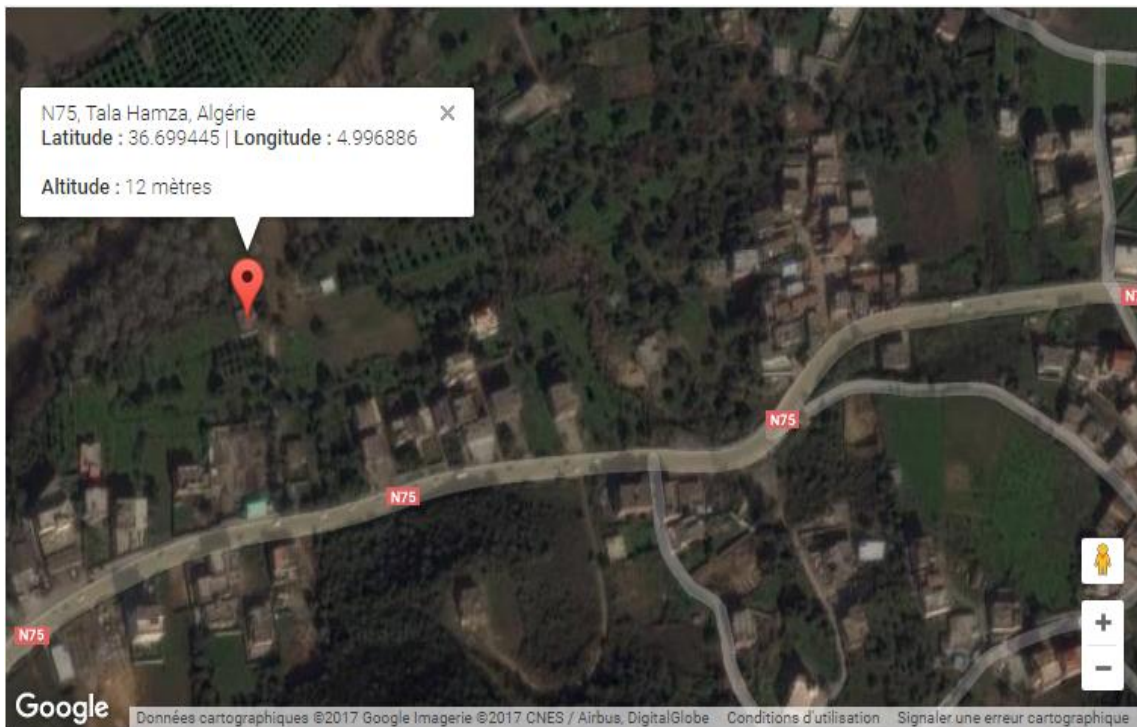


Fig. 03 : Site sol de « Tala Hamza ».

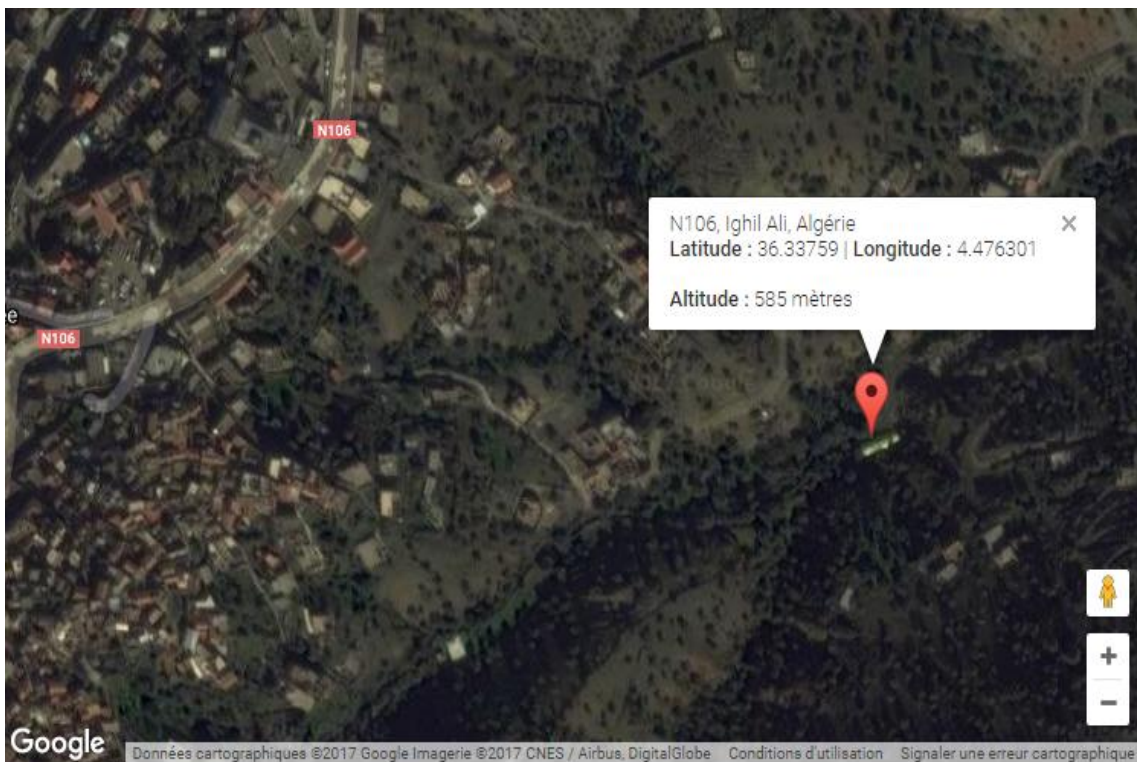


Fig. 04 : Site sol de « Ighil Ali ».

2.2. Echantillon plumes

Les plumes et les déchets de plumes constituent une source idéale de microorganismes kératinolytiques ayant une activité kératinolytique élevée favorisée par la présence de plumes en phase de dégradation, cette source est utilisée dans divers travaux comme source de kératinases (Riffel *et al.*, 2003 ; Thys *et al.*, 2004 ; Sanghvi *et al.*, 2016).

Les deux échantillons sont prélevés aléatoirement dans 5 points différents des sites de prélèvement. Les plumes et les déchets de plumes (5 g) sont mis dans 300 ml d'eau distillée stérile (Sanghvi *et al.*, 2016).

Concernant les sites de prélèvement, il s'agit : d'une ferme avicole des poules pondeuses qui se situe à « Ihadaden Ouffela » (Fig. 05) et un poulailler qui se situe à « Fenaia Il-Maten » (Fig. 06).

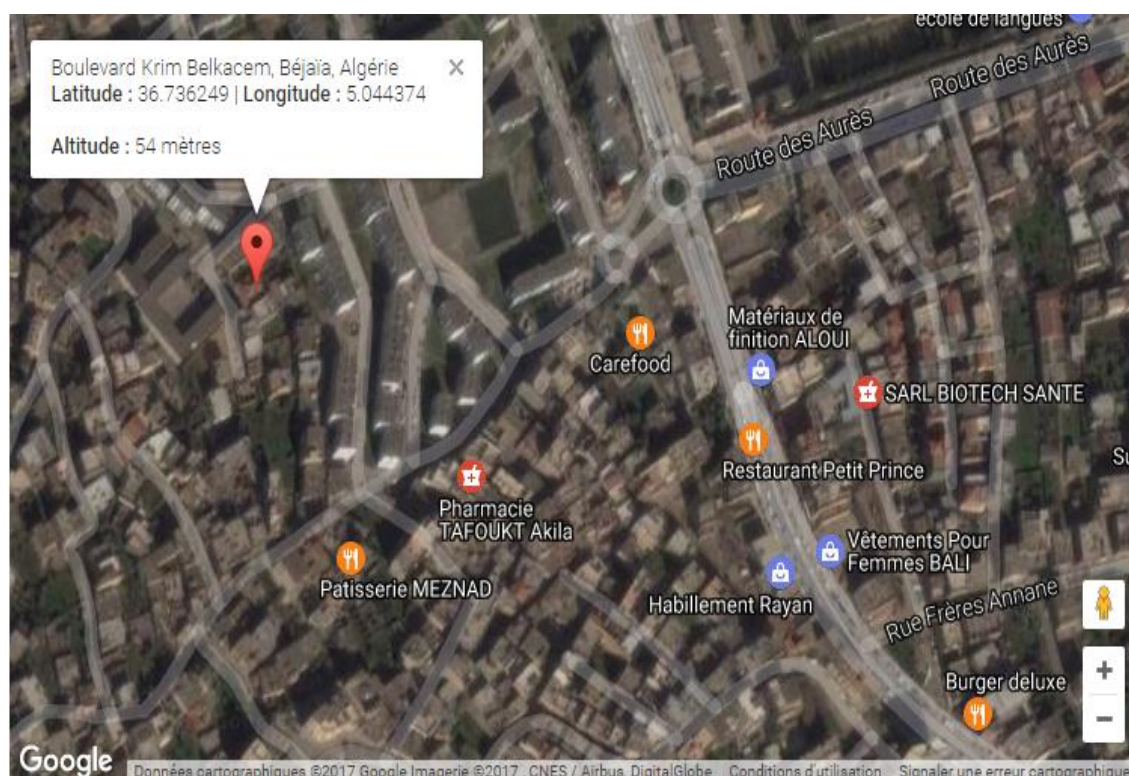


Fig. 05 : Site de « Ihadadene Oufella ».

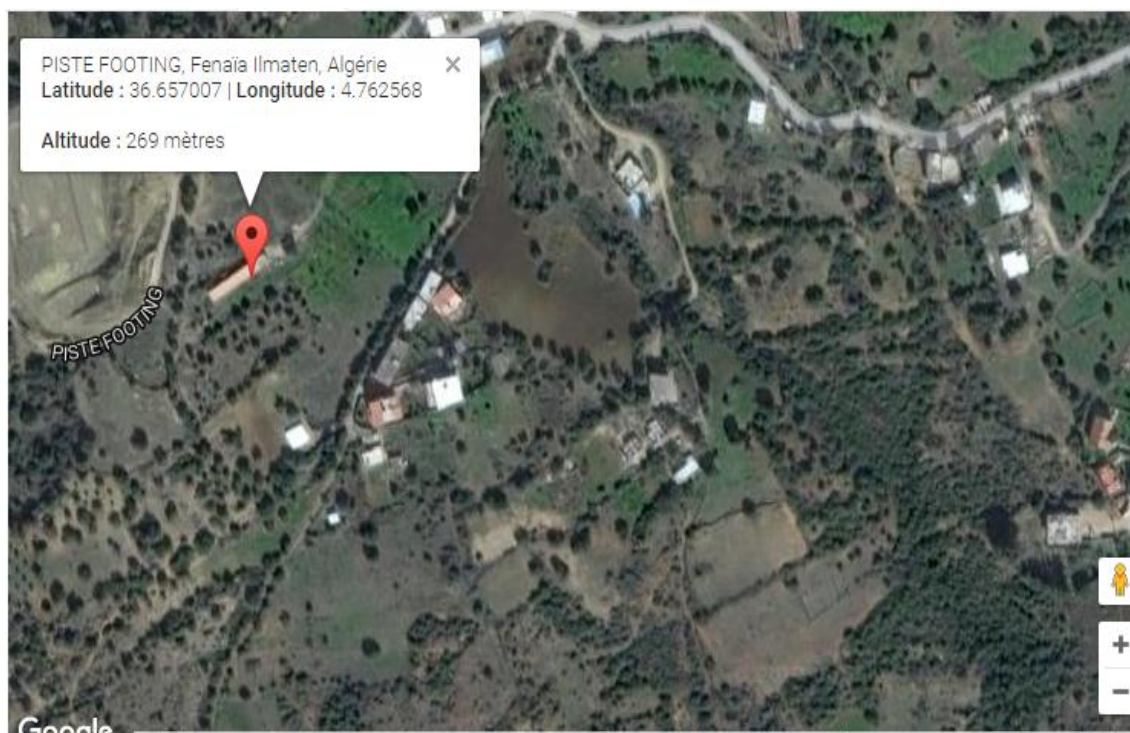


Fig. 06 : Site de « Fenaia Il-Maten ».

3. Isolement et sélection des souches bactériennes kératinolytiques

Un milieu sélectif solide à base de farine de plume (FBMS) (**Annexe II**) est employé pour l'isolement des souches kératinolytiques selon la méthode de Williams et collaborateurs (1990) et pour avoir plusieurs souches kératinolytiques le pH utilisé est de 7 et 8.

Les plumes (**Fig. 07**) sont collectées au niveau d'une tuerie située à El Kseur (Bejaia) et la farine de plume (**Fig. 08**) est préparée en plusieurs étapes :

- ✚ Les plumes ont subi plusieurs lavages à l'eau du robinet et un dernier lavage à l'eau distillée.
- ✚ Les plumes sont séchées à 150 °C pendant 05 min et sont découpées en petits morceaux.
- ✚ Les plumes sont broyées et filtrées pour éliminer les grosses particules et avoir une farine homogène (**Habbeche, 2014**).



Fig. 07 : Plumes blanches lavées et séchées, tuerie d'El Kseur.

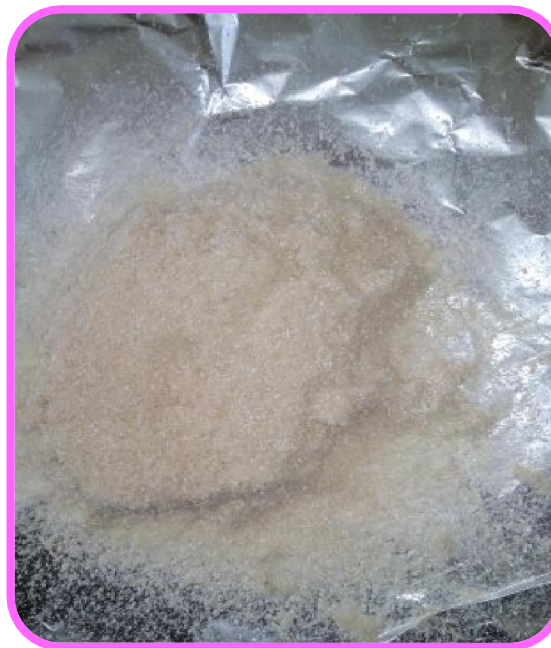


Fig. 08 : Farine de plumes.

Les échantillons du sol et de plumes préalablement préparés servent de solution mère et la préparation des dilutions consiste tout d'abord à préparer la solution d'eau physiologique stérile (**Annexe III**). Des dilutions décimales sont préparées par l'ajout successif de 01 ml de la solution précédente à 09 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-4} (**Geng et al., 2004**).

0,1 ml est déposé sur des boîtes de Petri contenant le milieu d'isolement FBMS dont les plumes broyées servent comme seule sources de carbone et d'azote pour les microorganismes kératinolytiques, les boîtes sont ensuite incubées à une température de 37 °C pendant 02 à 05 jours.

En fonction du pH et du site de prélèvement, des codes sont attribués pour chaque isolat qui a poussé sur FBMS. Les isolats sont repiqués 05 fois sur la gélose nutritive (GN) (**Annexe II**) et incubés à 37 °C pendant 24 h.

4. Production de kératinases

4.1. Culture en milieu liquide

La fermentation est réalisée dans un milieu liquide à base de farine de plumes (FBML) (**Annexe II**), dans le but de mesurer l'activité kératinolytique des isolats purifiés.

La préculture correspond à l'ensemencement de deux colonies dans des tubes à essai stériles contenant 05 ml du FBML, puis incubés dans un bain-marie agitateur à 37 °C pendant 24 à 48 h (**Fig. 09**).

La croissance bactérienne est mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Shimdzu UVmin-1240.



Fig. 09 : Préculture des différents isolats bactériens.

Des Erlen Meyer de 100 ml stériles contenant 20 ml de milieu de fermentation FBML sont inoculés à raison de 3 % (v/v) de la préculture et incubés à 37 °C pendant 24, 48 et 72 h. (**Fig. 10**).



Fig. 10 : Conduite de la culture des isolats bactériens.

4.2. Test d'activité kératinolytique

4.2.1. Préparation de la solution enzymatique

La solution enzymatique correspond au surnageant de culture récupérée après centrifugation à $6000 \times g$ pendant 20 min des cultures incubées 24, 48 et 72 h.

4.2.2. Préparation du substrat

Deux substrats sont utilisés, il s'agit d'un substrat commercial « kératine azure » (1g) (Fig. 11 et 12) et de la kératine de plume, la kératine azure est utilisée uniquement pour le dosage de l'activité kératinolytique d'un seul isolat, le plus producteur, et pour le reste des isolats la kératine des plumes est utilisée.



Fig. 11 : Kératine azur.



Fig. 12 : Solution de kératine azur.

La kératine soluble est préparée à partir de la farine de plumes (5 g) dissout dans 250 ml de diméthyle sulfo oxyde (DMSO), ensuite le mélange est chauffé dans un condenseur à reflux à 80 °C pendant 4 h. La kératine soluble est ensuite précipitée pendant 2 h par l'addition de 500 ml d'acétone déjà refroidis à (-80 °C).

Le précipité est récupéré par centrifugation à 5000 ×g pendant 20 min, ensuite lavé deux fois avec l'eau distillée et séché à 50 °C jusqu'à l'obtention d'une poudre. 1 g de ce précipité est dissout dans 20 ml de NaOH (0,05 M) (**Annexe III**). Le pH est ajusté à 8 par une solution de HCl (1N), la solution est diluée à 200 ml avec du tampon Tris-HCl (0,05 M) à pH 8. (**Annexe III**) (**Gradišar et al., 2005 ; Park et Son, 2009**).

4.2.3. Incubation enzymatique

L'incubation enzymatique est réalisée par le mélange de 01 ml du surnagent de culture avec 01 ml de la solution de kératine, ensuite L'incubation du milieu réactionnel se fait au bain-Marie à 50 °C pendant 10 min, les témoins sont préparés parallèlement dans les mêmes conditions sans surnagent de culture. Les réactions sont arrêtées par l'addition de 2 ml de TCA (0,4 M) (**Annexe III**) et l'ajout du surnagent de culture aux témoins.

Le mélange est incubé 05 min dans un bain de glace, puis centrifugé pendant 20 min à une vitesse de 5000 ×g. L'activité enzymatique est détectée par mesure de l'absorbance à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Shimdzu UVmin-1240.

Selon Cai et collaborateurs (2008), une unité (U/ml) de l'activité kératinolytique est définie comme étant l'augmentation de la DO₂₈₀ avec le blanc, de 0,01 par min dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus. L'activité est calculée selon la formule ci-après :

$$\text{Activité kératinolytique (U/ml)} = \frac{4 \times n \times A_{280}}{(0,01 \times 10)}$$

- n : Taux de dilution
- 4 : Volume réactionnel final (ml)
- 10 : Temps d'incubation (min)

5. Préidentification de l'isolat sélectionné

L'identification présomptive de l'isolat sélectionné est réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, biochimiques (De Vos *et al.*, 2009) et physicochimiques.

5.1. Caractères morphologiques, biochimiques et physicochimiques

5.1.1. Observation macroscopique

Cette observation permet de déterminer les caractères culturels tels que : la vitesse de croissance, la texture, la couleur de revers de la culture à l'œil nu ainsi que l'odeur.

5.1.2. Observation microscopique

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose, l'isolat sélectionné a été soumis à la coloration de Gram (Annexe IV).

5.1.3. Mobilité

La mobilité est déterminée par examen microscopique des colonies à l'état frais entre lame et lamelle puis observée au grossissement $\times 400$ à l'aide d'un microscope optique (OPTIKA).

5.1.4. Recherche de la catalase

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée dans laquelle sera dissocié un petit prélèvement de la colonie, cette dernière est dite catalase positive si un dégagement gazeux (effervescence) est observé et le contraire indique l'absence de catalase.

5.1.5. Température optimale de croissance

Afin de déterminer la température optimale, l'isolat sélectionné est ensemencé stérilement dans des tubes contenant 07 ml du FBML, puis incubé sous agitation réciproque à différentes températures 30 ° C, 37 ° C, 40 ° C et 45 ° C pendant 48 h, cité par Boucherba, (2011) et Habbeche, (2014).

5.1.6. pH optimum de croissance

Le pH optimum pour l'isolat sélectionné est étudié en variant le pH du milieu de culture FBML d'une unité de 01 pour une gamme de pH allant de 04 à 10, puis une incubation à la température optimale pendant 48 h sous agitation, selon Boucherba, (2011) et Habbeche (2014).

5.1.7. Etude de l'effet de concentration du sel (NaCl)

L'isolat sélectionné est ensemencé sur FBML, dont la concentration en NaCl est ajustée à 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml, le milieu témoin est à 0,5 mg/ml du FBML, suivi d'une incubation sous agitation à température et pH optimums, cité par Boucherba, (2011).

7. Suivi de l'activité kératinolytique

Après la préidentification de l'isolat EP.1 on a voulu savoir si la kératine de plumes que nous avons mises au point est meilleure que le substrat commercial « kératine azure », à cet effet nous avons suivi l'activité kératinolytique à 24 h, 48 h, 72 h et 96 h sous agitation réciproque.

Résultats et discussions

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus et leurs discussions portant sur l'isolement et la sélection d'une souche bactérienne productrice de kératinases.

1. Isolement et purification des isolats

L'isolement des souches bactériennes kératinolytiques sur milieu solide à base de farine de plume (FBMS) a permis l'obtention de 15 isolats (**Tableau IV**) après une incubation de 2 à 5 jours à 37 °C.

Tableau IV : Récapitulatif de la codification, sources d'isolement et conditions de culture.

Isolats	Sources d'isolement	pH du milieu	Durée d'incubation (jours)	Suspension bactérienne
EP.1	Plumes (Ihadadene Oufella)	8	2	10 ⁻¹
EP.2	Plumes (Ihadadene Oufella)	8	2	Solution mère
EP.3	Plumes (Ihadadene Oufella)	8	3	10 ⁻¹
EPL.3	Plumes (Ihadadene Oufella)	8	3	Solution mère
EPL7.1	Plumes (Fenaia II-Maten)	7	4	10 ⁻¹
EPL7.2	Plumes (Fenaia II-Maten)	7	2	Solution mère
EPL7.3	Plumes (Fenaia II-Maten)	7	2	10 ⁻²
ES.1	Sol (Ighil-Ali)	8	3	10 ⁻¹

ES.2	Sol (Ighil-Ali)	8	3	10 ⁻¹
ES.3	Sol (Ighil-Ali)	8	2	10 ⁻²
ESO7.1	Sol (Tala Hamza)	7	2	10 ⁻¹
ESO7.2	Sol (Tala Hamza)	7	3	10 ⁻¹
ESO7.3	Sol (Tala Hamza)	7	5	Solution mère
ESO7.4	Sol (Tala Hamza)	7	4	Solution mère
ESO7.5	Sol (Tala Hamza)	7	4	10 ⁻³

EP.1 : échantillon plumes (Ihadadene Oufella) isolat 1, pH8.

EP.2 : échantillon plumes (Ihadadene Oufella) isolat 2, pH8.

EP.3 : échantillon plumes (Ihadadene Oufella) isolat 3, pH8.

EPL.3 : échantillon plumes (2) (Ihadadene Oufella)

, isolat 3, pH8.

ES.1 : échantillon sol (Ighil-Ali) isolat 1, pH8.

ES.2 : échantillon sol (Ighil-Ali) isolat 2, pH8.

ES.3 : échantillon sol (Ighil-Ali) isolat 3, pH8.

Epl7.1 : échantillon plumes (Fenaia Il-Maten) isolat 1, pH7.

Epl7.2 : échantillon plumes (Fenaia Il-Maten) isolat 2, pH7.

Epl7.3 : échantillon plumes (Fenaia Il-Maten) isolat 3, pH7.

ESO7.1 : échantillon sol (Tala Hamza) isolat 1, pH7.

ESO7.2 : échantillon sol (Thala Hamza) isolat 2, pH7.

ESO7.3 : échantillon sol (Tala Hamza) isolat 3, pH7.

ESO7.4 : échantillon sol (Tala Hamza) isolat 4, pH7.

ESO7.5 : échantillon sol (Tala Hamza) isolat 5, pH7.

Les 15 isolats sont purifiés sur gélose nutritive (GN) par des repiquages successifs (05 fois).

2. Sélection de souches bactériennes kératinolytiques

Les résultats obtenus après incubation sur le milieu sélectif FBMS à pH 7 et pH 8 incubés pendant 02 à 05 jours à 37 °C ont démontré que les isolats possèdent une activité kératinolytique (**Fig. 13**), et des caractères cultureux distincts (**Tableau V**).

Le choix de la farine de plume comme seule source de Carbon et d'azote dans le milieu de culture (FBMS) est très important pour la croissance des souches kératinolytiques.



Isolat : EP.1



Isolat : EP.3



Isolat : ES.1



Isolat : ESO7.3



Isolat : ESO7.4



Isolat : ESO7.5

Fig. 13 : Quelques isolats producteurs de kératinases.

Tableau V : Caractères culturaux des 15 isolats

Isolats	Caractères culturaux									
	Forme du relief	Forme avec vue de dessus	Taille mm	Couleur	Aspect de la surface	Transparence	Contour	Consistance	Pigmentation	
EP.1	Bombé		2	Blanche	Lisse	Opaque	Régulier	Crémeuse	Sans	
EP.2	Plate	Ronde	1	Blanche sale	Lisse	Opaque	Régulier	Sèche	Jaune	
EP.3	Semi-bombée	Bords dentelés	2	Blanche	Rugueuse	Opaque	Irrégulier	Sèche	Jaune	
EPL.3	Plate	Ovoïde	1	Marron	Rugueuse	Opaque	Irrégulier	Crémeuse	Jaune	
ES.1	Bombé	Ronde	> 3	Blanche	Lisse	Opaque	Régulier	Crémeuse	Blanche porcelaine	
ES.2	Plate	En étoile	3	Bleu verte	Rugueuse	Opaque	Irrégulier	Sèche	Vert	
ES.3	Bombé	Ronde	> 3	Crème	Rugueuse	Translucide	Régulier	Muqueuse	Sans	
EPL7.1	Semi-bombée	En étoile	> 3	Grise	Rugueuse	Opaque	Irrégulier	Sèche	Bleu foncé	
EPL7.2	Bombé	Ronde	3	Beige	Lisse	Translucide	Régulier	Muqueuse	Marron	
EPL7.3	Plate	Ronde	2	Marron	Rugueuse	Translucide	Irrégulier	Sèche	Sans	
ESO7.1	Bombé	Ronde	2	Blanche	Brillante	Opaque	Régulier	Muqueuse	Sans	
ESO7.2	Plate	Ronde	3	Crème	Lisse	Translucide	Irrégulier	Muqueuse	Sans	
ESO7.3	Bombé	Ronde	> 3	Grise blanche	Brillante	Opaque	Irrégulier	Sèche	Gris	
ESO7.4	Plate	En étoile	> 3	Blache	Rugueuse	Opaque	Irrégulier	Sèche	Jaune	
ESO7.5	Plate	En étoile	1	Blache	Rugueuse	Opaque	Irrégulier	Crémeuse	Marron	

3. Production de kératinases

3.1. Culture en milieu liquide

Après incubation des précultures pendant 24 à 48 h, une mesure de l'absorbance à 600 nm permet de suivre la croissance des isolats dans le milieu de culture liquide à base de farine de plume (FBML), le tableau VI mentionne les résultats obtenus.

Tableau VI : Suivi de la croissance à 600 nm de tous les isolats à pH 8 et 7

pH	Isolats	Pré culture de 24 h	Pré culture de 48 h
8	EP.1	0,000	1.086
	EP.2	0,000	0,523
	EP.3	0,796	/
	EPL.3	0,868	/
	ES.1	0,656	/
	ES.2	0,000	0,835
	ES.3	0,901	/
7	Epl7.1	0,031	/
	EPL7.2	0,000	1.921
	EPL7.3	0,000	1,982
	ESO7.1	0,027	/
	ESO7.2	0,026	/
	ESO7.3	0,000	1,043
	ESO7.4	0,032	/
	ESO7.5	0,076	/

Les 15 isolats ont poussé sur FBML selon les résultats de l'absorbance à 600 nm et leurs précultures de 24 ou de 48 h ont servis pour la conduite de la culture, à savoir un ensemencement d'un milieu FBML ayant un volume de 20 ml à raison de 3 % (v/v).

3.2. Test de l'activité kératinolytique

Le suivi de l'activité kératinolytique des 15 isolats est donné dans la figure n° 14 et n° 15.

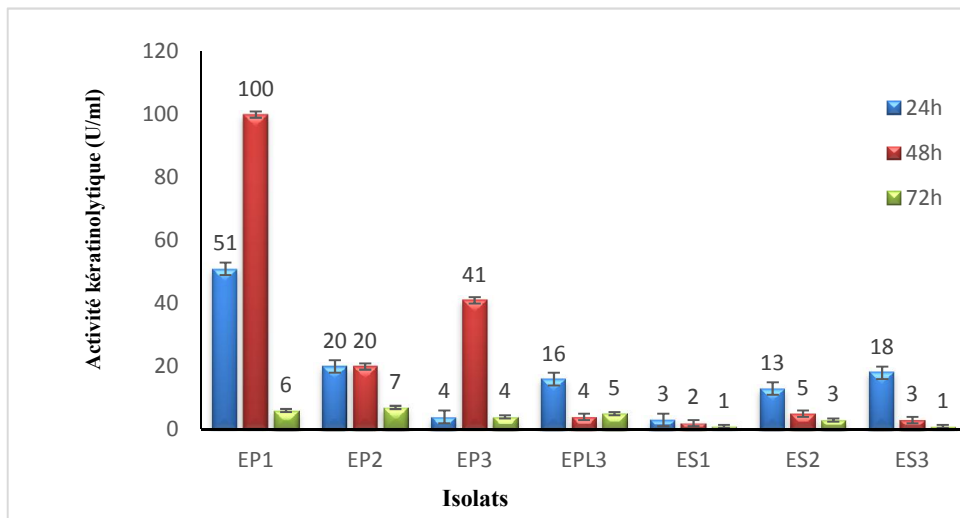


Fig. 14 : Suivi de l'activité kératinolytique à 24, 48 et 72 h des isolats à pH 8.

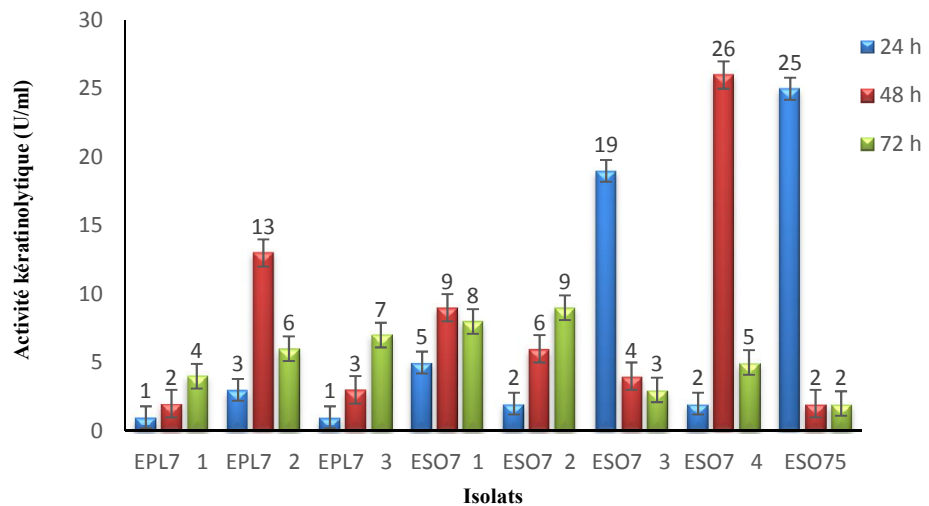


Fig. 15 : Suivi de l'activité kératinolytique à 24, 48 et 72 h des isolats à pH 7.

L'isolat EP.1 est retenu pour la préidentification, c'est un isolat performant vu qu'il présente une activité kératinolytique de 100 U/ml au bout de 48 h de fermentation, et le présent travail est comparé aux données de la littérature scientifique (**Tableau VII**).

Tableau VII : Comparaison des activités kératinolytiques.

Souches	Activités kératinolytiques (U/ml)	Références
EP.1	100	Présent travail
<i>Bacillus subtilis</i> KD-N2	125	Cai et Zheng, 2009
<i>Bacillus sp.</i> P45	24	Daroit et al., 2009
<i>B. licheniformis</i> PWD-I	30,5	Shih et Michael, 1993
<i>Bacillus sp</i> PW	50	Joshi et al., 2007
<i>Bacillus subtilis</i> P13	2,26	Pillai et al., 2011

La comparaison du résultat de l'activité kératinolytique de l'isolat EP.1 aux données de la littérature scientifique montre que ce dernier révèle une activité kératinolytique relativement importante (100 U/ml). Et suffisamment supérieure à celle de *Bacillus sp.* P45, *Bacillus licheniformis* PWD-I, *Bacillus sp* PW et *Bacillus subtilis* P13. Cependant la souche de *Bacillus subtilis* KD-N2 présente la meilleure activité kératinolytique (125 U/ml).

A cet effet la farine de plumes constitue une source adéquate pour la production de kératinases par l'isolat Ep.1.

4. Préidentification de l'isolat sélectionné EP.1

4.1. Caractères morphologiques, biochimiques et physicochimiques

La préidentification de l'isolat EP.1 qui présente une activité kératinolytique est réalisée par observation macroscopique, microscopique et variation de quelques paramètres physicochimique, ce qui permet d'orienter vers un genre bactérien.

4.1.1. Observations macroscopiques

Sur milieu FBMS, après 48 h d'incubation à 37 °C ; l'isolat EP.1 présente des colonies blanchâtres, bombées, brillantes, rondes et lisses avec un contour régulier (**Fig. 16**) caractérisé par une zone d'hydrolyse (4 mm) (**Fig. 17**).



Fig. 16 : Aspect de l'isolat EP.1 sur FBMS.

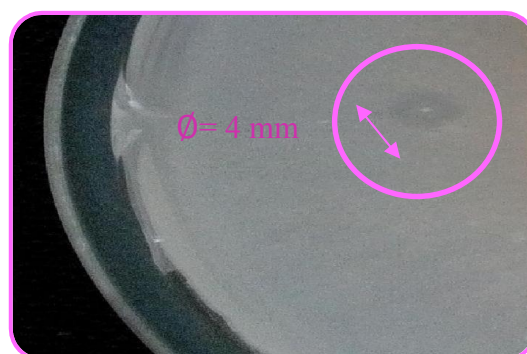


Fig. 17 : Mise en évidence de la zone d'hydrolyse de l'isolat EP.1.

Sur GN, après 24 h d'incubation à 37 °C ; l'isolat EP.1 purifié présente des petites colonies de 1 à 2 mm de diamètre, d'une couleur blanche-crème, bombées, envahissantes avec un contour régulier (**Fig. 18**).

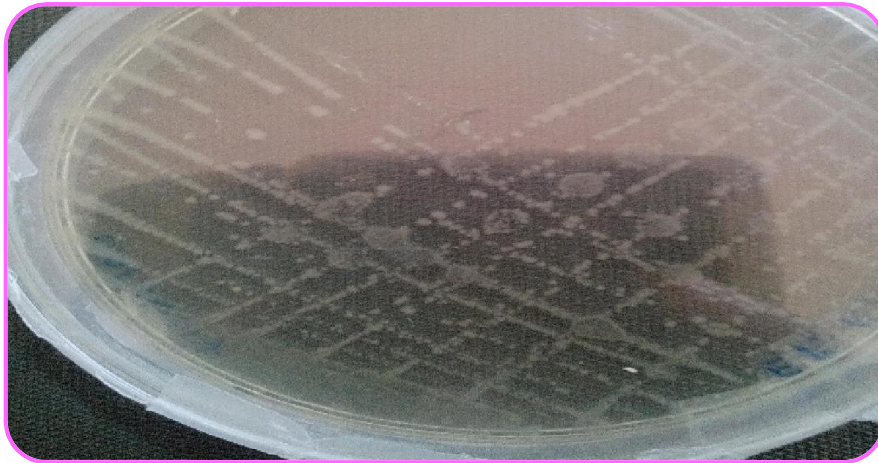


Fig. 18 : Aspect de l'isolat EP.1 sur gélose nutritive.

4.1.2. Observation microscopique

La forme des bactéries et leur affinité pour les colorants constituent la base de leur classification.

L'observation microscopique a révélé que les cellules isolées et purifiées de l'isolat EP.1 sont à Gram positif et ont une forme bâtonnet régulier (**Fig. 19**).

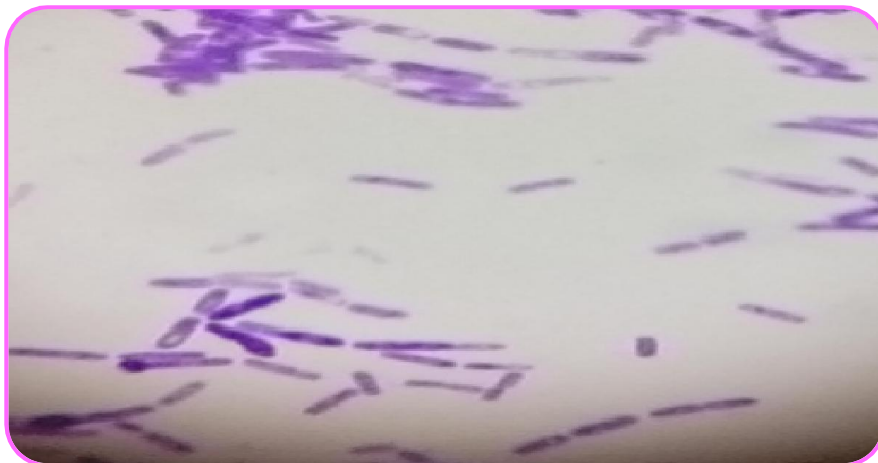
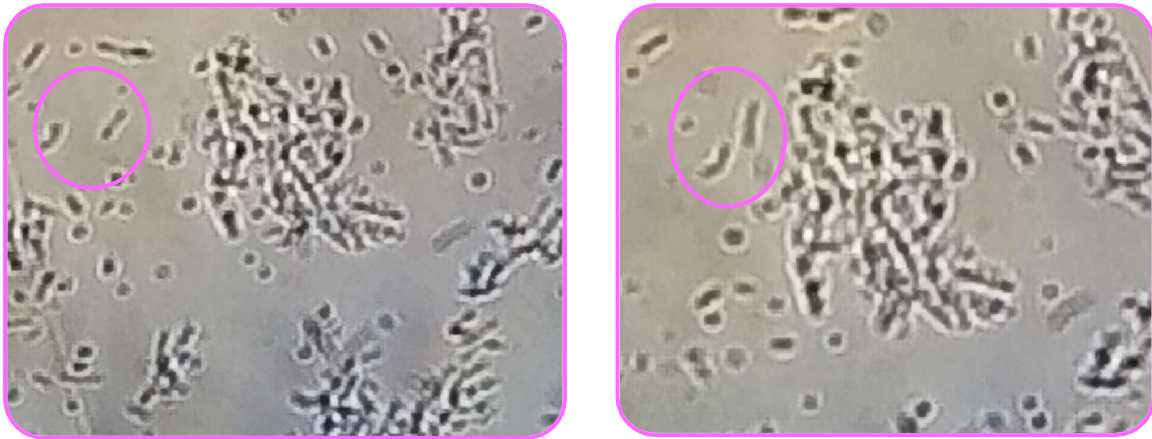


Fig. 19 : Observation microscopique de l'isolat EP.1 après coloration de Gram (Grossissement X1000).

4.1.3. Mobilité

L'état frais des cellules de l'isolat EP.1 à partir d'une culture jeune, montre qu'elles se présentent sous forme des petits bâtonnets réguliers très mobiles (**Fig. 20**).



(a) : Localisation de deux cellules à t=0s.

(b) : Localisation de deux cellules à t=6s.

Fig. 20 : Etat frais de l'isolat EP.1 (Grossissement X 400).

4.1.4. Recherche de la catalase

Le résultat de la mise en évidence d'enzymes respiratoire (la catalase) a montré que l'isolat EP.1 produit des bulles de gaz (effervescences) (**Fig. 21**), cela veut dire que l'isolat EP.1 est catalase positive.



Fig. 21 : Formation des bulles de gaz (catalase +).

D'après ces caractères morphologiques et biochimiques étudiés, on présume que l'isolat Ep.1 appartient au genre Bacillus.

4.1.5. Température optimale de croissance

Dans le but de rechercher la température optimale de croissance, l'isolat EP.1 est incubé pendant 48 h à différentes températures : 30 °C, 37 °C, 40 °C et 45 °C. La croissance de l'isolat est mesurée à 600 nm.

Les résultats de l'effet de la température sont mentionnés dans la figure 22, cette dernière révèle que la température optimale de croissance est de 40 °C.

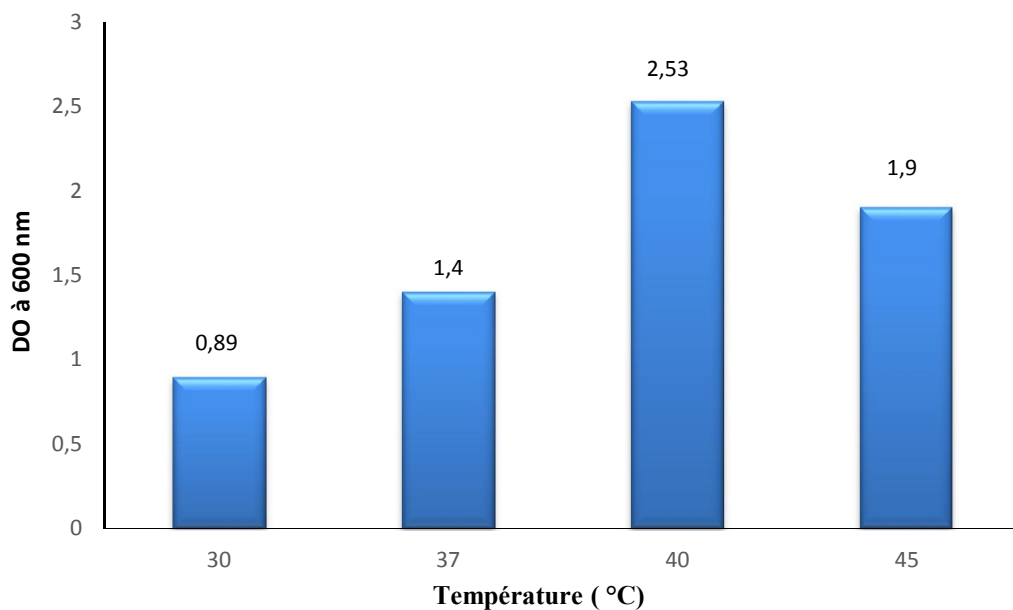


Fig. 22 : Effet de la température sur la croissance de l'isolat EP.1.

Le tableau ci-dessous montre que certaines espèces du genre *Bacillus* poussent à une température optimale de 30 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C (**Tableau VIII**) et d'après la littérature scientifique, généralement ce genre peut pousser à des températures allant de 20 °C à 70 °C (**Balaji et al., 2008**).

Tableau VIII : Comparaison de la température optimale de l'isolat EP.1 à quelques espèces de Bacillus.

Souches	Températures optimales	Références
EP.1	40 °C	Présent travail
<i>Bacillus subtilis</i> MTCC	40 °C	Balaji et al., 2008
<i>Bacillus cereus</i> 1268 <i>Bacillus licheniformis</i> 1269	40 °C	Mazotto et al., 2011
<i>Bacillus sp.</i> SCB-3	40 °C	Lee et al., 2002
<i>Bacillus subtilis</i> DP1	37 °C	Sanghvi et al., 2016
<i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	37 °C	George et al., 1995
<i>Bacillus licheniformis</i> PWD1	50 °C	Williams et al., 1990
<i>Bacillus pseudofirmis</i>	37 °C	Gassesse et al., 2003
<i>Bacillus. megaterium</i>	30 °C	Parck et al., 2009
<i>Bacillus.licheniformis</i>	40-45 °C	Lin et al., 1999

4.1.6. pH optimum de croissance

Selon les résultats de la figure 23, l'intervalle de pH permettant une meilleure croissance de l'isolat EP.1 varie entre 06 et 09 avec un optimum de croissance à 8 à une température optimale de 40 °C. A pH 4 et 5 aucune croissance n'a été observée.

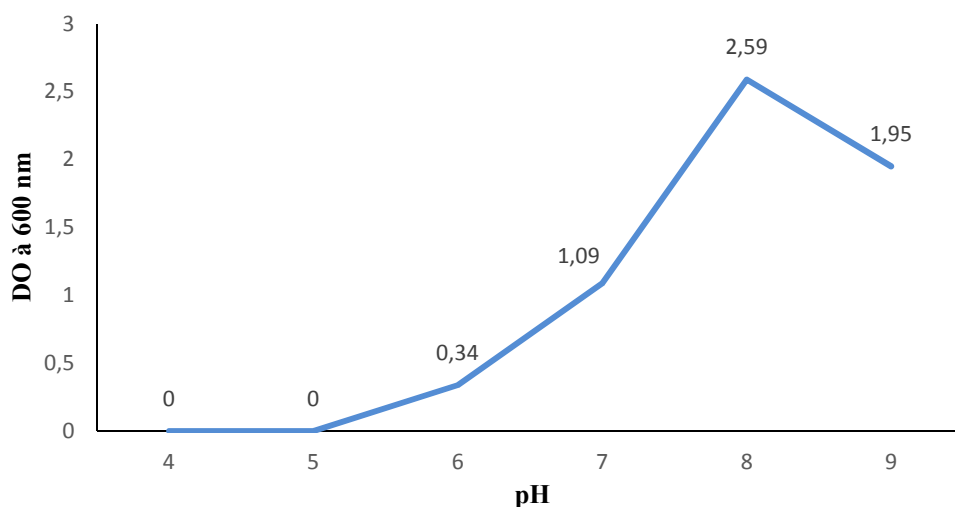


Fig. 23 : Effet du pH sur la croissance de l'isolat EP.1.

Le pH optimum de l'isolat EP.1 est de pH 8 et il est comparé à plusieurs espèces de *Bacillus* (**Tableau IX**).

Tableau IX : Comparaison du pH optimum d'EP.1 à quelque genre de *Bacillus*

Souches	pH optimum	Références
EP.1	8	Présent travail
<i>Bacillus licheniformis</i>	8	Deivasigamani et al.,2008
<i>Bacillus sp</i>	8	Atalo et Gash, 1993
<i>Bacillus licheniformis</i>	8	Cheng et al., 1995
<i>Bacillus pumilis</i>	8	Kumar et al., 2008
<i>Bacillus subtilis KS1</i>	5-9	Kim et al., 2001
<i>Bacillus licheniformis K-508</i>	7	Rozs et al., 2001 ; Manczinger et al., 2003
<i>Bacillus sp. FK 28</i>	7,5	Pissuwan et Suntornsuk, 2001
<i>Bacillus sp. FK 46</i>	9	Suntornsuk et Suntornsuk, 2003

4.1.7. Effet de la concentration en NaCl

L'évaluation de la croissance de l'isolat EP.1 en fonction de la salinité est déterminée par sa culture sur FBML ayant 0,5 mg/ml de NaCl à pH 8. La variation du NaCl est réalisée à partir de : 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml, puis une incubation à 40 °C au bout de 48 heures (**Fig. 24**).

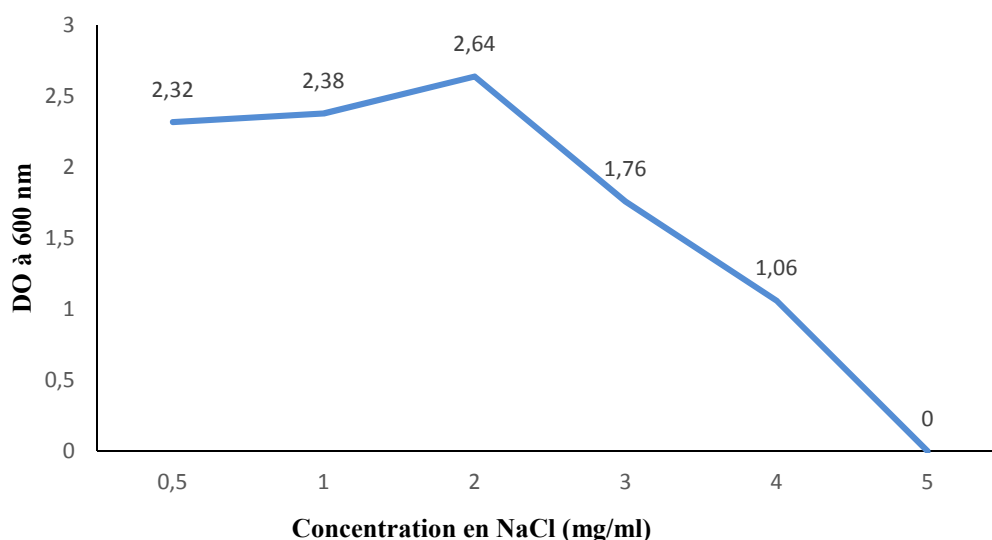


Fig. 24 : Effet de la concentration en NaCl sur la croissance de l'isolat EP.1.

Ces résultats montrent que l'isolat EP.1 présente un optimum de croissance à une concentration de 2 mg/ml après 2 jours d'incubation, au-delà la croissance diminue.

La plupart des micro-organismes ont des besoins limités en sels et sont inhibés par des teneurs en NaCl supérieures à 2 %, sauf les espèces halophiles qui se développent en milieux salins et tolèrent des teneurs en NaCl de 15 % (Bidaud, 1998).

Cet optimum a été observé chez certaines espèces de *Bacillus* telles que *Bacillus sp* et d'autres espèces de ce genre poussent à des concentrations de 0-12 % (Tableau VIII).

Tableau X : Comparaison de la concentration en NaCl nécessaire pour la croissance du genre *Bacillus*.

Souche	Concentration en NaCl (m/v)	Références
EP.1	2 %	Présent travail
<i>Bacillus sp</i>	2 %	Cherif, 2014
<i>Bacillus luteolus</i>	0-10 %	Shi et al., 2011
<i>Bacillus seohaeanensis</i>	0-10 %	Lee et al., 2006
<i>Bacillus oceanisediminis</i>	0-12 %	Donnée non mentionné
<i>Bacillus cereus</i>	5 %	Mossel et al., 1967

Le tableau XI ci-dessous résume les différentes caractéristiques de l'isolat EP.1. cet isolat est probablement affilié au genre *Bacillus*, cependant le test de sporulation doit être fait et une identification phénotypique et génotypique (séquençage de l'ARN_{16S}) doit être faite afin de s'assurer de l'affiliation de l'isolat EP.1 au genre *Bacillus*. Ce travail est en cours de réalisation.

Tableau XI : Récapitulatif des caractères obtenus de l'isolat EP1.

Propriétés	L'isolat EP.1
Couleur et forme de la colonie	Blanchâtre, bombée, ronde, lisse
Morphologie de la cellule	Bacille régulier
Coloration de Gram	+
Mobilité	+
Catalase	+
Type respiratoire	Aérobie
T° de croissance	30-45 (Optimum : 40)
Type de kératinases produite	Extracellulaires
pH de croissance	6-9 (optimum : 8)
Croissance en présence de NaCl	0,5-4 % (optimum : 2 %)

Le genre *Bacillus* est parmi les microorganismes les plus abondants dans la nature. Grâce à son omniprésence ainsi que sa diversité métabolique et génétique, il est en tête de la production de différents enzymes, substances antimicrobiennes et des insecticides (**Bron et al., 1999**). Ce genre est très exploité dans plusieurs applications biotechnologiques (**Priest, 1993**).

Les espèces de *Bacillus* produisent la kératinases, il y a eu plusieurs travaux concernant la dégradation des plumes par exemple : *Bacillus licheniformis* (**Williams et al., 1990 ; Lin et al., 1992**), *Bacillus sp.* (**Atalo et Gashe, 1993**), *Bacillus subtilis* (**Zaghloul et al., 1998**), *Bacillus pseudofirmus* (**Kojima et al., 2006**), *Bacillus Souche FK 46* (**Suntornsuk et Suntornsuk, 2003**).

6. Test de l'activité kératinolytique en utilisant la kératine azure comme substrat

Le tableau XII met en évidence l'activité kératinolytique de l'isolat EP.1 en utilisant la kératine azure et la kératine de plume comme substrat.

Tableau XII : Suivi de l'activité kératinolytique de l'isolat EP1 en utilisant la kératine de plume et la kératine azure.

Temps (h)	Activité kératinolytique (U/ml)	
	Substrat : kératine de plume	Substrat : kératine azure
24 h	62	41
48 h	117	48
72 h	32	0
96 h	0	0

Les kératinases produites par l'isolat EP.1 ont plus de spécificité vis à vis de la kératine de plume (117 U/ml) que la kératine azure, substrat commercial, (48 U/ml) ce dernier est très cher, tel que mis en évidence dans le tableau XIII où on observe une grande différence du prix entre la kératine azure avec 75 000 DA et la kératine de plumes avec 18 000 DA, cela semble avantageux pour la valorisation des plumes qui sont généralement incinérés.

Tableau XIII : comparaison du prix de revient de la kératine de plumes et la kératine azure

Substrat	Cout (DA)	Total (DA)
Kératine de plumes	• Solvants (DMSO et acétone)	14 100
	• Plumes	0
	• Techniques	3900
Kératine azure	57 000	57 000

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de la recherche de souche productrice de kératinases, quinze isolats kératinolytiques ont été obtenus à partir des plumes et du sol du poulailler collectés de quatre différentes régions à Bejaia, par la suite les isolats sont examinés pour leurs activités kératinolytiques et ils ont été sélectionnés sur le milieu solide à base de farine de plume (FBMS) comme seule source de carbone et d'azote à pH 8 et 7.

Les isolats sont par la suite mis en cultures sur milieu liquide à base de farine de plume (FBML) afin d'estimer la croissance bactérienne et de mesurer l'activité kératinolytique pour sélectionner l'isolat le plus performant.

La mesure de l'activité kératinolytique a révélé une production de kératinases de 100 U/ml après 48 h d'incubation. Sur cette base, nous avons retenu l'isolat EP.1 pour la suite des travaux.

L'étude des caractères morphologiques, biochimiques et physicochimiques de l'isolat EP.1 a permis une orientation vers le genre *Bacillus* avec une croissance optimale à pH 8, une température de 40 °C et une concentration en NaCl de 2 %.




L'étude comparative portée sur l'utilisation de la kératine de plume et la kératine azure comme substrat analytique montre une activité kératinolytique de 117 U/ml sur la kératine de plume et 48 U/ml sur la kératine azure. Ce qui suggère une spécificité des kératinases pour la kératine de plumes, à la lumière de ces résultats, on peut conclure que ce substrat peut apporter une solution prometteuse pour le test d'activité.


La kératine azure est très chère (75 000 DA), elle présente une grande différence de prix par rapport à la kératine de plumes (18 000 DA).




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

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

 **Sur le plan recherche :**

-  Identification phénotypique et génotypique via le séquençage de l'ARN 16s de l'isolat EP.1.
-  La détermination des conditions optimales de culture et de production de kératinases par la méthode des plans d'expériences.
-  Purification et caractérisation de la kératinases.

 **Sur le plan économique :**

-  Faire un inventaire des différents abattoirs industriels existant dans la wilaya de Bejaia.
-  Estimer la production de plume de volaille par jour.
-  Faire une étude technico-économique, afin de réaliser une estimation du coût de production de la kératine.

Références bibliographiques

A

- ❖ Abidi, F., Limam, F., et Nejib, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: assay as biode detergent. *Process Biochemistry*, (2008); 43 (11), 1202–1208.
- ❖ Andersen, L. Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes. (1998); United States Patent 5: 834-299.
- ❖ Asahi, M., Lindquist, R., Fukuyama, K., Apodaca, G., Epstein, WL., McKerrow, JH. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. *Biochemical Journal*, (1985); 232:139-44.
- ❖ Atalo, K., et Gashe, B. Protease production by a thermophilic *Bacillus* species (P-001A) which degrades various kinds of fibrous proteins. *Biotechnology letters*, (1993); 15 (11), 1151–1156.

B

- ❖ Balaji, S., Kumar, M. S., Karthikeyan, R., Kumar, R., Kirubanandan, S., Sridhar, R., et Sehgal, P. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a horn meal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (2008); 24 (11), 2741–2745.
 - ❖ Berrada S. (2007). Les Principaux Produits Capillaires, Novembre 2007. <http://disciplines.ac-montpellier.fr>. (Consulté le 23.05.2017).
 - ❖ Bidaud C. (1998). Biodegradation des hydrocarbures aromatiques POLYCYCLIQUES approche microbiologique et Application au Traitement d'un Sol Pollué. Thèse de doctorat en génie des procédés. Institut national polytechnique de Grenoble et de l'école nationale supérieure des mines, saint-etienne :278 p.
 - ❖ Boucherba N. (2011). Production, purification et caractérisation d'une endoxylanase produite par une souche de *Jonesia denitrificans*. Thèse de doctorat de microbiologie. Université A.Mira-bejaia, faculté des sciences de la nature et de la vie, Béjaia : 141 p.
-

- ❖ Boucherba N. (2014). Valorisation des résidus agro-industriels www.umc.edu.dz/images/polycopie_integrale.pdf. (consulté le 13/02/2017).
- ❖ Bragulla, H. H., et Homberger, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*, (2009) ; 214 (4), 516–559.
- ❖ Brandelli, A., Daroit, D. J., et Riffel, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, (2010); 85 (6), 1735–1750.
- ❖ Bron, S., Meima, R., van Dijl, J., Wipat, A., et Harwood, C. Molecular biology and genetics of *Bacillus* spp. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. ASM Press, Washington, DC, (1999); 392–416.
- ❖ Brutt, E., Ichida, J. Keratinase produced by *Bacillus licheniformis*. (1999); US Patent 5,877,000.

C

- ❖ Cai, C., et Zheng, X. Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, (2009); 36 (7), 875–883.
 - ❖ Cai, C. G., Lou, B. G., et Zheng, X. D. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *J Zhejiang Univ Sci B*, (2008) ; 9 (1), 60-67.
 - ❖ Cedrola, S. M. L., de Melo, A. C. N., Mazotto, A. M., Lins, U., Zingali, R. B., Rosado, A. S., et Vermelho, A. B. Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (2012); 28 (3), 1259–1269.
 - ❖ Cheng, S.-W., Hu, H.-M., Shen, S.-W., Takagi, H., Asano, M., & Tsai, Y.-C. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, (1995); 59 (12), 2239–2243.
 - ❖ Cherif H. (2014). Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus sp.* Et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Université Ferhat Abbas, Sétif ,177 p.
-

- ❖ Chhimpa, 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 (JBES)*, (2016); *Vol. 8*, p. 109-119.

D

- ❖ Daroit, D. J., et Brandelli, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. *Crit Rev Biotechnol*, (2014); 34 (4), 372–384.
- ❖ Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F., et Brandelli, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *International Biodeterioration et Biodegradation*, (2009) ; 63 (3), 358-363.
- ❖ Deivasigamani, B., et Alagappan, K. Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins. *Journal of Environmental Biology*, (2008); 29 (6), 933–936.
- ❖ Deré A. (2007). Essais de reconstitution d'objets médiévaux en cuir. <http://astelier-medieval-du-cuir.over-blog.com>. consulté le (29.03.2017).
- ❖ De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K. et Whitman, W. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2^e éd., The Firmicute. Springer. New York. Volume 3. 63-67.
- ❖ Drouin M. (2005). Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire présentée pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.), Institut national de la recherche scientifique, Québec, 142 p.

E

- ❖ Elie F. (2008). La laine de mouton : notions rudimentaires. <http://fred.elie.free.fr> - page 1/12. (Consulté le 18.03.2017).

F

- ❖ FAO. (2015). FAO-STAT. <http://faostat.fao.org/default.aspx>, Consulté le 21.05.2017.
-

- ❖ Farag, A. M., et Hassan, M. A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, (2004); 34 (2), 85–93.
- ❖ Food Outlook FAO., 2015; Commission européenne,2015). Situation de la production et des marchés avicoles. [En ligne] Adresse URL : www.itavi.asso.fr/download/8868. (consulté le 09.03.2017).
- ❖ Fujiwara, N., Tsumiya, T., Katada, T., Hosobuchi, T., Yamamoto, K. Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme. *Process Biochem*, (1989), 24: 155–156.

G

- ❖ Geng, J., Chiron, C., et Combrisson, J. Rapid and specific enumeration of viable Bifidobacteria in dairy products based on flow cytometry technology: A proof of concept study. *International dairy journal*, (2014); 37 (1), 1–4.
 - ❖ George, S., Raju, V., Krishnan, M., Subramanian, T., et Jayaraman, K. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Process Biochemistry*, (1995); 30 (5), 457–462.
 - ❖ Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B. A., et Mattiasson, B. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*, (2003); 32 (5), 519–524.
 - ❖ Gousterova, A., Braikova, D., Goshev, I., Christov, P., Tishinov, K., Vasileva-Tonkova, E., et Nedkov, P. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology*, (2005); 40 (5), 335–340.
 - ❖ Govarathanan, M., Selvankumar, T., Selvam, K., Sudhakar, C., Aroulmoji, V., et Kamalakannan, S. Response surface methodology based optimization of keratinase production from alkali-treated feather waste and horn waste using *Bacillus* sp. MG-MASC-BT. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, (2015); 27, 25–30.
-

- ❖ Gradišar, H., Friedrich, J., Križaj, I., et Jerala, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Applied and environmental microbiology*, (2005); 71 (7), 3420–3426.
- ❖ Gupta, R., Beg, Q., et Lorenz, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, (2002); 59 (1), 15–32.
- ❖ Gupta, R., et Ramnani, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied microbiology and biotechnology*, (2006); 70 (1), 21–33.
- ❖ Gupta, R., Sharma, R., et Beg, Q. K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, (2013); 33 (2), 216–228.

H

- ❖ Habbeche A. (2014). Purification et caractérisation d'une kératinase thermostable KERAK-29 chez une nouvelle souche d'Actinomycète. Thèse de doctorat de biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar, Faculté des sciences, Annaba : 120 p.

I

- ❖ Ignatova, Z., Gousterova, A., Spassov, G., Nedkov, P. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces*. *Can. Journal of Microbiology*. (1999); 45, 217–222.

J

- ❖ Jacques C. (2003). Etude De La Valorisation Des Déchets D'origine Keratinique Par Voie Thermo-Mecano-Chimique En Vue De L'obtention De Filaments Continus : Cas Spécifique De La Laine. Institut National Polytechnique, Toulouse, 291p.
 - ❖ Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., et Bawa, A. S. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of Food Science and Technology*, (2012); 49 (3), 278–293.
-

- ❖ Joshi, S. G., Tejashwini, M., Revati, N., Sridevi, R., et Roma, D. Isolation, identification and characterization of a feather degrading bacterium. *International journal of poultry science*, (2007); 6 (9), 689–693.

Κ

- ❖ Kim, J., Lim, W., et Suh, H. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry*, (2001); 37 (3), 287–291.
- ❖ Kock J. (2006). Physical and mechanical properties of chicken feather materials. Thèse de doctorat en génie civil et environnements. Institute de Technology, Georgia : 97 p.
- ❖ Kojima, M., Kanai, M., Tominaga, M., Kitazume, S., Inoue, A., et Horikoshi, K. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. *Extremophiles*, (2006); 10 (3), 229–235.

- ❖ Kothari, D., Rani, A., Goyal, A. Keratinases. *Indian institute of technology Guwahati*, (2017),
- ❖ Kumar, A. G., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N., et Sekaran, G. Characterization of an alkaline active – thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. *Journal of applied microbiology*, (2008); 104 (2), 411–419.
- ❖ Kunert, J. Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporum gypseum*: a comparison. *Journal of Basic Microbiology*, (1989); 29 (9), 597–604.

Ł

- ❖ Łaba, W., Choińska, A., et Rodziewicz, A. THE RELEASE OF SULFUR COMPOUNDS DURING DEGRADATION OF FEATHER KERATIN BY TWO *BACILLUS* STRAINS. *Acta Scientiarum Polonorum: Biotechnologia*, (2013); 12 (2), 29 - 40.
 - ❖ Lee, H., Suh, D., Hwang, J., et Suh, H. Characterization of a kerationlytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. *Applied biochemistry and biotechnology*, (2002); 97 (2), 123–133.
-

- ❖ Lee, J.-C., Lim, J.-M., Park, D.-J., Jeon, C. O., Li, W.-J., et Kim, C.-J. *Bacillus seohaeanensis* sp. nov., a halotolerant bacterium that contains L-lysine in its cell wall. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, (2006); 56 (8), 1893–1898.
- ❖ Lin, X., Inglis, G., Yanke, L., et Cheng, K. Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, (1999); 23 (2), 149–153.
- ❖ Lin, X., Lee, C.-G., Casale, E. S., et Shih, J. C. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Applied and environmental microbiology*, (1992), 58 (10), 3271–3275.

M

- ❖ Macedo, A. J., da Silva, W. O., Gava, R., Driemeier, D., Henriques, J. A., Termignoni, C. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*, (2005); 71 (1), 594-596.
 - ❖ Manczinger, L., Rozs, M., Vágvölgyi, C., et Kevei, F. Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (2003); 19 (1), 35–39.
 - ❖ Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S., et Brenes, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: a review. *Food Research International*, (2015); 73, 204–212.
 - ❖ Maughan, H., et Van der Auwera, G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection Genetics and Evolution*, (2011); 11 (5), 789–797.
 - ❖ Mazotto, A. M., de Melo, A. C. N., Macrae, A., Rosado, A. S., Peixoto, R., Cedrola, S. M., Rabinovitch, L. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus spp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (2011); 27 (6), 1355–1365.
 - ❖ Mitu A. (2004). Damage assessment of human hair by electrophoretical analysis of hair proteins. Thèse de doctorat, Université de Cidade de São Paulo, Brésil : 103 p.
-

- ❖ Mossel, D., Koopman, M., et Jongerius, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Applied microbiology*, (1967); 15 (3), 650–653.

N

- ❖ Nouad, M. (2011). Étude technicoéconomique de projets de valorisation/gestion de déchets liés à la filière avicole en Algérie. *Gtz-REME*. 58 p.

O

- ❖ Oscarmartínez, A., SusanA, C., Agustín, B. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding. *Food Research International*, (2015); 73; 204–212.

P

- ❖ Pandey, A., Negi, S., Ricardo, C. Soccol. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. (2017); 447–469.
 - ❖ Pandian, S., Sundaram, J., et Panchatcharam, P. Isolation, identification and characterization of feather degrading bacteria. *European Journal of Experimental Biology*, (2012); 2 (1), 274–282.
 - ❖ Park, G.T., et Son, H.-J. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium. *Microbiological research*, (2009); 164 (4), 478–485.
 - ❖ Paul, T., Halder, S. K., Das, A., Bera, S., Maity, C., Mandal, A., et Mondal, K. C. Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate *Paenibacillus woosongensis* TKB2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, (2013); 2 (1), 50–57.
 - ❖ Pillai, P., Mandge, S., et Archana, G. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. *Process Biochemistry*, (2011); 46 (5), 1110–1117.
 - ❖ Pissuwan, D., et Suntornsuk, W. Production of keratinase by *Bacillus* sp. FK 28 isolated in Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, (2001); 35, 171–178.
 - ❖ Priest, F. G. Systematics and ecology of *Bacillus* *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. *American Society of Microbiology* (1993); pp. 3–16.
-

R

- ❖ Rai, S. K., et Mukherjee, A. K. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical Engineering Journal*, (2010); 48 (2), 173–180.
- ❖ Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., et Deshpande, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, (1998); 62 (3), 597–635.
- ❖ Riffel, A., Lucas, F., Heeb, P., et Brandelli, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Archives of Microbiology*, (2003); 179 (4), 258–265.
- ❖ Rouse, J. G., et Van Dyke, M. E. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*, (2010); 3 (2), 999-1014.
- ❖ Rozs, M., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., et Kevei, F. Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. *FEMS microbiology letters*, (2001); 205 (2), 221–224.

S

- ❖ Saha, S. (2013). Exploration of keratinolytic actinobacteria for the bioconversion of poultry feather waste into poultry feed supplement.
 - ❖ Sanghvi, G., Patel, H., Vaishnav, D., Oza, T., Dave, G., Kunjadia, P., et Sheth, N. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. *International journal of biological macromolecules*, (2016); 87, 256–262.
 - ❖ Savarnane K. et Dhurai B. Exploration on amino acid content and morphological structure in chicken feather fiber. *Journal of textile and apparel, technology and management* (2012); 7. 3. p1-6.
 - ❖ Scott, J., et Untereiner, W. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Medical Mycology*, (2004); 42 (3), 239–246.
-

- ❖ Shankar, S., More, S., et Laxman, R. S. Recovery of silver from waste X-ray film by alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Kathmandu university journal of science, engineering and technology*, (2010); 6 (1), 60–69.
- ❖ Shi, R., Yin, M., Tang, S.-K., Lee, J.-C., Park, D.-J., Zhang, Y.-J., et Li, W.-J. *Bacillus luteolus* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from a salt field. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, (2011); 61 (6), 1344–1349.
- ❖ Shih, J. C. Recent Development in Poultry Waste Digestion and Feather Utilization – A Review. *Poultry science*, (1993); 72 (9), 1617–1620.
- ❖ Sivakumar, N., et Raveendran, S. Keratin degradation by bacteria and fungi isolated from a poultry farm and plumage. *British poultry science*, (2015); 56 (2), 210–217.
- ❖ Su, C., Gong, J. S., Zhang, R. X., Tao, L. Y., Dou, W. F., Zhang, D. D., ... Shi, J. S. A novel alkaline surfactant-stable keratinase with superior feather-degrading potential based on library screening strategy. *International Journal of Biological Macromolecules*, (2017); 95, 404–411.
- ❖ Suntornsuk, W., et Suntornsuk, L. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. *Bioresource Technology*, (2003); 86 (3), 239–243.

T

- ❖ Thys, R., Lucas, F., Riffel, A., Heeb, P., et Brandelli, A. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. *Letters in Applied Microbiology*, (2004); 39 (2), 181–186.

V

- ❖ Vignardeta, C., Guillaume, Y., Michel, L., Friedrich, J., Millet, J.. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *International Journal of Pharmaceutics*, (2001); 224. p115-122.

W

- ❖ Williams, C. M., Richter, C., Mackenzie, J., et Shih, J. C. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Applied and environmental microbiology*, (1990); 56 (6), 1509–1515.

Y

- ❖ Yusuf, I., Ahmad, S. A., Phang, L. Y., Syed, M. A., Shamaan, N. A., Khalil, K. A., et Shukor, M. Y. Keratinase production and biodegradation of polluted secondary chicken feather wastes by a newly isolated multi heavy metal tolerant bacterium-*Alcaligenes* sp. AQ05-001. *Journal of Environmental Management*, (2016); 183, 182–195.

Z

- ❖ Zaghloul, T. I., Al-Bahra, M., et Al-Azmeh, H. Isolation, identification, and keratinolytic activity of several feather-degrading bacterial isolates. *Applied biochemistry and biotechnology*, (1998); 70 (1), 207–213.
 - ❖ Zhang, L., Wang, Y., Dai, J., Tang, Y., Yang, Q., Luo, X., et Fang, C. *Bacillus korensis* sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from a sand soil sample in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, (2009); 59 (-7), 1787–1792.
-

Annexes

Annexe I : Matériels utilisés

- ✚ Balance (Scouttpro) (Ae ADAM AFA-120LC).
 - ✚ Bain Marie agitateur (Mettler).
 - ✚ Bain Marie (raypa).
 - ✚ Bain Marie (julabo tw 12).
 - ✚ Centrifugeuse (Sigma 2- 16K).
 - ✚ Etuve (Mettler).
 - ✚ pH-mètre (BOECO).
 - ✚ Spectrophotometre (UVmini 1240 SHIMADZU).
 - ✚ Un agitateur à mouvement réciproque (Heidolph Vibramax 100).
 - ✚ Un bain Marie agitateur (KIKA LABOURTECHNIK HS-B20digital).
-

Annexe II : Composition des milieux de cultures en (g/l), autoclavés à 121°C/16min.

↳ **Milieu de culture à Base de Farine de plumes (FBM) (Williams et al., 1990).**

● Milieu de culture FBM solide :

✚ Farine de plume	20g.
✚ K ₂ HPO ₄	1g.
✚ MgSO ₄ (7H ₂ O)	0.5g.
✚ CaCO ₃	3g.
✚ FeSO ₄ (7H ₂ O)01g.
✚ NaCl.....	0.5g.
✚ Agar.....	20g.
✚ Eau distillée.....	1l.
✚ pH.....	7,2 et 8.

● Milieu de culture FBM liquide :

✚ Farine de plume	20g.
✚ K ₂ HPO ₄	1g.
✚ MgSO ₄ (7H ₂ O)	0.5g.
✚ CaCO ₃	3g.
✚ FeSO ₄ (7H ₂ O)01g.
✚ NaCl.....	0,5g.
✚ Eau distillée.....	1l.
✚ pH.....	7,2 et 8.

↳ **Gélose nutritive (GN) :**

✚ Peptone.....	5g.
✚ Extrait de viande.....	1g.
✚ Extrait de levure.....	2g.
✚ Chlorure de sodium (NaCl).....	5g.
✚ Agar.....	14g.
✚ pH final.....	7,3±0.2.
✚ Eau destillée.....	1L.

Annexe III : Solutions et tampons préparés.

Eau Physiologique :

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) Dilué à 9 pour 1000

 NaCl09 g.

 Eau distillée.....1 L.

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

Pour la préparation de 300 ml d'hydroxyde de sodium qui présente une masse molaire de 40 g/mol, 0,6 g du NaOH sont dissouts dans 300 ml d'eau distillé suivi d'une agitation vigoureuse. Le pH est ajusté à 12.

Solution tampon tris HCl (0,05 M) :





Trishydroxyméthylaminométhane (tris) présente une masse molaire de 121,14 g/mol
a servi pour la préparation de 300 ml du tampon tris HCl à 0,05 M, par le mélange de 1,817 g du tris dans 300 ml d'eau distillé et ajusté avec l'acide chlorhydrique HCl jusqu'à l'obtention d'un pH 8.

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





L'acide trichloracétique (TCA) avec une mass molaire de 163,39 g/mol dont 26,142 sont dissouts dans 300 ml d'eau distillé et mélangés vigoureusement.

Annexe IV : Coloration de Gram

Réalisation du frottis

-  Nettoyer une lame de verre à l'éthanol/acétone.
-  Déposer sur une lame propre une goutte de suspension bactérienne.
-  Réaliser le frottis à partir du centre de la lame en décrivant un mouvement circulaire.
-  Sécher le frottis en passant la lame à la flamme du bec Bunsen (2 à 3 fois).

Réalisation de la coloration de Gram

-  Verser quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis laisser 1 minute puis éliminer l'excès de violet de gentiane avec un peu d'eau sans insister.
-  Plonger la lame 30s dans le lugole puis rincer abondamment à l'eau.
-  Rincer avec l'éthanol/acétone pendant 10s puis rincer abondamment à l'eau.
-  Plonger la lame 1 minute dans la fushsine, rincer abondamment à l'eau.

Observation microscopique

Observation au microscope optique au grossissement x100 après l'ajout d'une goutte d'huile à immersion.

Lecture des résultats

Les bactéries à Gram positif apparaissent violettes — les bactéries à Gram négatif apparaissent roses.

Annexe V : Tableau de formule

Formule	Nom IUPAC
CaCo3	Carbonate de calcium
FeSo4	Sulfate de fer
HCl	Acide chlorhydrique
K2HPo4	Monohydrogénophosphate de potassium
MgSo4	Sulfate de magnésium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium

Résumé

Quinze souches kératinolytiques ont été isolées et sélectionnées à partir des plumes de poulet et du sol des poulaillers sur milieu solide à base de farine de plumes, l'estimation de la biomasse et la mesure de l'activité kératinolytique sur milieu liquide à base de farine de plumes a permis de sélectionner l'isolat EP.1 qui est le plus producteur de kératinases (100 U/ml) au bout de 48 h.

Une pré-identification morphologique et biochimique de l'isolat EP.1 qui est sous forme bâtonnet, Gram+, mobile, catalase+ suggère qu'il peut être affilié au genre *Bacillus*. Les paramètres physicochimiques : température, pH, concentration en NaCl de l'isolat EP.1 sont optimisés par méthode classique, pour avoir une meilleure production de kératinases (117 U/ml), à un optimum de température de 40 °C, un optimum de pH de 8, et une concentration optimale en NaCl de 2 %.

Les kératinases de l'isolat EP1 ont une grande spécificité vis-à-vis la kératine des plumes (117 U/ml) en comparaison avec la kératine azurée (48 U/ml).

Mots-clés : activité kératinolytique, kératinases, isolement, sélection, farine de plumes.

Summary

Fifteen keratinolytic strains were isolated and selected from chicken feathers and poultry soil on solid feather meal medium, biomass estimation and measurement of keratinolytic activity on liquid feather meal medium allowed to select isolate EP.1 which is the most producing of keratinases (100 U/ml) after 48 hours.

A morphological and biochemical pre-identification of the isolate EP.1 which is in stick shape, Gram +, mobile, catalase + suggests that it can be affiliated to the *Bacillus* genus. The physicochemical parameters: temperature, pH, NaCl concentration of the isolate EP.1 are optimized by a conventional method, in order to have a better production of keratinases (117 U/ml) at an optimum temperature of 40 °C, an optimum pH of 8, and an optimal concentration of NaCl of 2%.

The keratinases of the isolate EP.1 have a high specificity to keratin in feathers (117 U/ml) compared to azure keratin (48 U/ml).

Keywords: keratinolytic activity, keratinases, isolation, selection, feather meal.