

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE EAU TERRE ENVIRONNEMENT

**Développement d'une nouvelle alternative aux antibiotiques
utilisés dans l'élevage de volaille à base d'une combinaison
entre : laccase - protéines de levure - acide citrique**

Par
Mona Chaali

Mémoire pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Président du jury et Examineur interne	Rajeshwar Dayal Tyagi INRS ETE
Examineur externe	Rosa Galvez Université Laval
Examineur interne	Suha Jabaji Université McGill
Directeur de recherche	Satinder Kaur Brar INRS ETE

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes sincères remerciements à ma directrice de recherche le Professeure Satinder Kaur Brar pour m'avoir intégré au sein de son équipe de recherche, pour son temps et sa patience et surtout pour son encadrement et ces judicieux conseils qui ont contribué dans le renforcement de ma connaissance.

Je remercie spécialement le Docteur Antonio Avalos Ramirez, chercheur au Centre National en Électrochimie et Environnement (CNETE) pour m'avoir accueilli au sein des laboratoires de CNETE et donné la chance de travailler parmi son équipe d'experts. Je le remercie aussi pour sa gentillesse, ses conseils et son suivi régulier.

Je remercie aussi les associés de recherche de mon équipe de recherche le Docteur Tarek Rouissi et le Docteur Joanna Lecka pour leur contribution au bon déroulement de mon travail de recherche dans les laboratoires de l'INRS ETE, pour leur disponibilité et leur précieuse aide.

Je tiens aussi à remercier le Directeur général de l'ISHÉDD (Institut Supérieur des Hautes Études en Développement Durable) Monsieur Kamal Elhaji, avec qui j'ai commencé la première partie de ma maîtrise, pour ses enseignements qui ont participé en alimentation de ma réflexion, son suivi et ses conseils.

Grand merci à l'ensemble du personnel de l'ISHÉDD

Je remercie le personnel du laboratoire pour leur professionnalisme et leur sympathie.

Et finalement, je remercie mes collègues, mes amis et ma famille pour leur soutien et leurs encouragements continus.

RÉSUMÉ

Le présent travail de recherche est porté sur le développement d'une nouvelle combinaison alimentaire qui stimule le métabolisme des volailles pour les maintenir en bonne santé et ainsi diminuer les doses d'antibiotiques qui leur sont administrés continuellement. Cette approche sera une initiative pour faire part à la grande problématique du développement de résistance chez les bactéries pathogènes. Cette combinaison contiendra l'enzyme laccase, l'acide citrique et des protéines de levure, produits actuellement au laboratoire par fermentation. Pour l'enzyme laccase, le marc de pomme est fermenté avec *Trametes versicolore*. L'acide citrique est produit par fermentation solide du marc de pomme utilisant *Aspergillus niger*. La protéine est produite par fermentation de *Saccharomyces cerevisiae* dans les boues de l'ultrafiltration du jus de pomme. Les taux de production obtenus sont : 38 Unités enzymatiques/g_{substrat sec}, 30-40 g acide citrique/kg_{substrat sec} et 35-40 g protéine/L_{substrat}. Après l'étape de production, le test de mélanisation a été réalisé afin de prouver l'efficacité de cette combinaison et son effet sur le système immunitaire des volailles. La plus importante réponse a été observée lorsque la laccase est combinée avec l'acide citrique. Les résultats ont été statistiquement significatifs (P: 0,0005 à 0,005). Concernant la seconde étape du projet, l'objectif été de passer d'une combinaison en bouillon de fermentation à un produit finalisé sous forme de poudre utilisable à grande échelle dans les fermes d'élevage de volailles. La technique utilisée pour le séchage est la technique de séchage par atomisation. Afin de réaliser une optimisation de séchage, 8 expériences ont été effectués. Nous avons obtenu les meilleurs résultats dans la 8ème expérience (72% de récupération l'activité initiale de la laccase, 99% de la concentration initiale de l'acide citrique et 86% de la concentration initiale des protéines).

Mots-clés : volaille, antibiotique, fermentation, alternatives, combinaison.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE	1
1. INTRODUCTION	3
2. REVUE DE LITTÉRATURE :	5
2.1 Consommation de la viande de volaille à l'échelle mondiale	5
2.2 Consommation au Canada :	7
2.3 Utilisation des antibiotiques dans l'élevage de volailles, relation avec la santé humaine et bio-alternatives existantes :	8
2.4 Les dangers de l'utilisation des antibiotiques promoteurs de croissances sur la santé humaine :	8
2.5 Bioalternatives aux antibiotiques promoteurs de croissance :	10
2.5.1 Les probiotiques :	10
2.5.2 Les prébiotiques :	10
2.5.3 Les symbiotiques :	11
2.5.4 Les acides organiques :	11
2.5.5 Les enzymes :	12
2.5.6 Les extraits de plantes :	12
2.5.7 Les protéines :	13
2.6 Les trois composantes de cette bio-alternative et les microorganismes producteurs	15
2.6.1 La laccase produite par <i>Trametes versicolor</i> :	15
2.6.2 Les protéines de levure produites par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : ..	16
2.6.3 L'acide citrique produit par <i>Aspergillus niger</i> :	16
3. PROBLÉMATIQUE :	19
4. OBJECTIFS DE RECHERCHE :	20
5. HYPOTHÈSES :	20
6. MATÉRIEL ET MÉTHODES:	23
6.1 Production de laccase par <i>Trametes versicolor</i> :	23
6.1.1 Culture de <i>Trametes versicolor</i> :	23
6.1.2 La fermentation à l'état solide	23
6.1.3 Extraction de la laccase et estimation de son activité enzymatique : ..	25

6.2	Production de l'acide citrique par <i>Aspergillus niger</i> :.....	25
6.2.1	Culture de l' <i>Aspergillus niger</i> :.....	25
6.2.2	La fermentation à l'état solide :	26
6.2.3	Extraction de l'acide citrique et estimation de sa concentration :	26
6.3	Production des protéines de levure par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	26
6.3.1	Culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	26
6.3.2	Fermentation à l'état liquide :.....	27
6.3.3	Extraction des protéines et estimation de la concentration :.....	28
6.4	Test de mélanisation.....	28
6.4.1	Culture de cellule de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	28
6.4.2	Préparation du milieu de fermentation pour la mélanisation :	28
6.4.3	Recomptage des cellules de levure :	29
6.4.4	Extraction et pesée de la mélanine produite par les cellules de levure :.....	29
6.5	Développement d'une formulation en poudre par la technique de séchage par atomisation :.....	30
6.5.1	Préparation des échantillons :	30
6.5.2	Le séchage par atomisation :	30
6.5.3	Analyses des poudres récoltées :.....	30
7.	RÉSULTATS ET DISCUSSION:.....	33
7.1	Production de la laccase par <i>Trametes versicolor</i> :	33
7.2	Production de l'acide citrique par <i>Aspergillus niger</i> :.....	34
7.3	Production des protéines de levure par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	35
7.4	Test de mélanisation :	36
7.5	Le séchage par atomisation :	38
8.	CONCLUSIONS :	45
	CHAPITRE 2 : ARTICLE DE RECHERCHE	53
	UN SUPPLÉMENT ALIMENTAIRE CONTENANT LA LACCASE ET L'ACIDE CITRIQUE COMME ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES UTILISÉS DANS L'ÉLEVAGE DE VOLAILLES – DÉCLENCHEUR <i>IN VITRO</i> DE LA PRODUCTION DE LA MÉLANINE.....	53
	SUPPLEMENT COMPRISING LACCASE AND CITRIC ACID AS AN ALTERNATIVE FOR ANTIBIOTIC IN POULTRY FARMING – <i>IN VITRO</i> TRIGGERS OF MELANIN PRODUCTION	55
	RÉSUMÉ.....	57

ABSTRACT	59
1. Introduction	60
2. Material and methods	61
2.1 Production of laccase	61
2.2 Microorganism	61
2.3 Solid state fermentation (SSF)	61
2.4 Enzyme extraction and activity test	61
2.5 Production of citric acid	62
2.6 Microorganism and spore solution	62
2.7 Solid state fermentation (SSF)	62
2.8 Citric acid extraction and analysis	62
2.9 Melanization test	63
2.10 Yeast cells culture	63
2.11 Test conditions	63
3. Yeast cell count	63
4. Melanin extraction and quantification	64
5. Results and discussion	65
6. Conclusion	66
7. Conflict of interest	66
8. Acknowledgements	66
9. References:	73

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Graphe représentant les pourcentages d'approvisionnement en viande dans le monde en 2012. http://www.fao.org/ag/againfo/themes/fr/meat/backgr_sources.html , janvier 2016.	5
Figure 2 : Graphe représentant l'évolution de l'élevage mondial. Source : Statistiques 2012, FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. http://www.fao.org/ag/againfo/themes/fr/meat/backgr_sources.html , janvier 2016	6
Figure 3 : Schéma explicatif de la transmission de résistance entre les bactéries modifié. Source : http://www.bbc.com/news/health-35153795 , janvier 2016.....	9
Figure 4 : Schéma représentant des alternatives biologiques aux antibiotiques promoteurs de croissances chez les volailles, réalisé par Mona Chaali, décembre 2015.	13
Figure 5 : Graphe représentant le profil d'étude de la production de la laccase	33
Figure 6 : Graphe représentant le profil d'étude de la production de l'acide citrique.....	34
Figure 7 : Graphe représentant le profil d'étude de la production des protéines de levure	35
Figure 8 : graphe représentant le nombre de cellules compté par hémacytomètre après 10 jours de fermentation pour chaque condition.	36
Figure 9 : photo des filtres Wattman après filtration des milieux de cultures pour la récupération et quantification de la mélanine produite par les cellules de levure dans chaque condition. A : milieu avec les cellules de levures seulement, B : milieu avec les cellules de levure et l'acide citrique. C : milieu avec les cellules de levure et la laccase et D : milieu avec les cellules de levure l'acide citrique et la laccase.	36
Figure 10 : graphe représentant la quantité de mélanine produite par cellule en g pour chaque condition.....	37
Figure 11 : graphe représentant le % récupération de l'activité enzymatique initiale de la laccase pour chaque expérience de séchage par atomisation.	42
Figure 12 : graphe représentant le % récupération de la concentration initiale en protéines pour chaque expérience de séchage par atomisation.	43
Figure 13 : graphe représentant le % récupération de la concentration initiale en acide citrique pour chaque expérience de séchage par atomisation.	43

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau récapitulatif contenant les alternatives biologiques et leurs propriétés bénéfiques pour les volailles.....	14
Tableau 2 : tableau représentant la caractéristiques physico-chimiques du marre de pomme.....	24
Tableau 3 : tableau représentant les caractéristiques physico-chimiques des boues d'ultrafiltration de fabrication de jus de pomme.	27
Tableau 4 : tableau représente les paramètres variés durant chaque expérience pendant le séchage par atomisation	31
Tableau 5 : tableau contenant les valeurs de p de l'analyse statistique réalisée sur l'effet de la laccase et l'acide citrique sur la production de la mélanine.	38
Tableau 6 : Tableau contenant les paramètres de séchage qui ont été variés ainsi que le poids et l'humidité de la poudre récupérée après chaque expérience de séchage.	38
Tableau 7 : Tableau contenant l'activité enzymatique avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 7%(w/v) d'amidon de maïs.....	39
Tableau 8 : Tableau contenant l'activité enzymatique de la laccase avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 12%(w/v) d'amidon de maïs.....	39
Tableau 9 : tableau contenant la concentration en protéines avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 7%(w/v) d'amidon de maïs.....	40
Tableau 10 : tableau contenant la concentration en protéines avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 12%(w/v) d'amidon de maïs.	40
Tableau 11 : tableau contenant la concentration d'acide citrique avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 7%(w/v) d'amidon de maïs.....	41
Tableau 12 : tableau contenant la concentration d'acide citrique avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 12%(w/v) d'amidon de maïs.	41

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE

1. INTRODUCTION

La viande de volaille tels que le poulet, le dindon, le canard, la pintade et l'oie est la deuxième viande la plus consommée au monde après la viande de porc (FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), 2012). Elle est également la viande la plus consommée par les québécois, (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec. Février 2011). Afin de satisfaire la demande d'une population qui ne cesse de croître, et les exigences des consommateurs en termes de goût et de qualité de produit, l'utilisation des antibiotiques comme promoteur de croissance est devenue une pratique très répandue dans l'élevage des animaux de la ferme, en particulier les volailles. Les principaux rôles de ces antibiotiques est de contrôler certaines maladies infectieuses chez l'animal, d'augmenter son poids et d'améliorer ses performances (Donoghue 2003). Ces dernières années, la surutilisation des antibiotiques a été fortement observée : actuellement il est confirmé qu'elle est à l'origine du développement et du transfert de la résistance chez plusieurs bactéries pathogènes (Toghyani, Tohidi et al. 2013). Par la crainte que cette surutilisation d'antibiotiques dans l'alimentation des volailles pourrait conduire à de graves dégâts sur la santé humaine, l'interdiction des antibiotiques comme promoteur de croissance demeure envisageable et constitue un grand défi pour la production de viande de volaille. D'où la nécessité de trouver de nouvelles méthodes ou alternatives afin de remédier à cette problématique (Gaggia, Mattarelli et al. 2010). Mon projet de recherche consiste à développer une nouvelle combinaison entre trois produits à savoir les protéines de levure, l'acide citrique et l'enzyme laccase, comme une alternative à ces antibiotiques. Lesdits produits auront des rôles bien précis et bénéfiques avec des actions complémentaires. Les protéines de levure seront utilisés comme suppléments ou additifs alimentaires et vont agir comme promoteurs de croissance naturels (Bekatorou, Psarianos et al. 2006). De son côté l'acide citrique viendra avec son effet antimicrobien et régulateur de pH à l'intérieur du système digestif (Eswaranandam, Hettiarachchy et al. 2004). Et finalement l'enzyme laccase permettra par son action oxydo-réductrice la protection des cellules de l'organisme de volaille, et ce en éliminant les composés phénoliques qui se forment lors de la digestion (Madhavi and Lele 2009), ainsi ce processus

facilitera l'assimilation des aliments. En outre, ces trois composés utilisés dans cette combinaison seront produits par fermentation des déchets de l'industrie de jus de pomme, en utilisant les trois souches suivantes : *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* et *Trametes versicolor*, ce qui donne au projet un aspect de bio-valorisation des déchets et de respect de l'environnement. L'efficacité de cette combinaison sera démontrée à travers le test de mélanisation qui sera décrite par la suite dans les chapitres suivants. L'autre objectif de mon travail sera de développer une formulation en poudre à partir de ces trois produits par la technique de séchage par atomisation (Gharsallaoui, Roudaut et al. 2007) .

2. REVUE DE LITTÉRATURE :

2.1 Consommation de la viande de volaille à l'échelle mondiale

Selon la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), la viande de volaille est la deuxième viande la plus consommée au monde après le porc. D'après des statistiques en 2012, l'approvisionnement en viande de volaille prend la deuxième place avec un faible écart après le porc.

La figure 1 ci-dessous représente le pourcentage d'approvisionnement dans le monde en termes de consommation de viande.

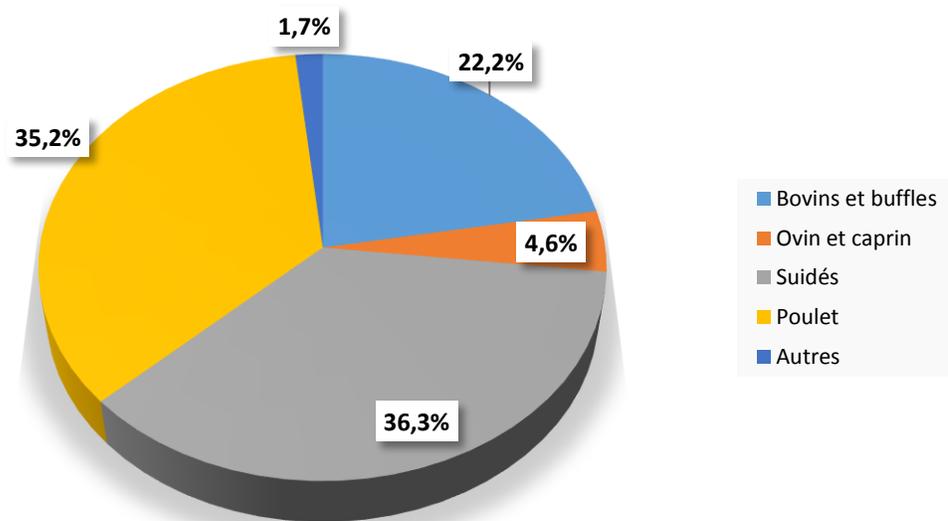


Figure 1 : Graphe représentant les pourcentages d'approvisionnement en viande dans le monde en 2012.

http://www.fao.org/ag/againfo/themes/fr/meat/backgr_sources.html, janvier 2016.

Les principaux pays consommateurs de cette viande sont : la Chine, sa consommation moyenne annuelle a été estimée en 2008 à 18,6 millions de tonnes, en deuxième position vient les États-Unis avec 16,3 millions de tonnes, suivis des pays européens avec 11,8 millions de tonnes, les pays du Moyen-Orient et du Maghreb avec 7,3 millions de tonnes et finalement le Brésil avec 7,1 millions de tonnes.

Concernant la consommation par personne, les plus grands consommateurs de viande de volaille se trouvent dans les pays développés, avec en tête les États-Unis et le Canada, où la consommation annuelle par personne atteignait près de 53 kilogrammes en 2009 aux USA. Selon le département de l'USDA (United State Département of Agriculture), la consommation de volaille continue de suivre une tendance à la hausse et passera de 45,5 kilogramme par personne en 2010 à 50 kilogramme par personne en 2020.

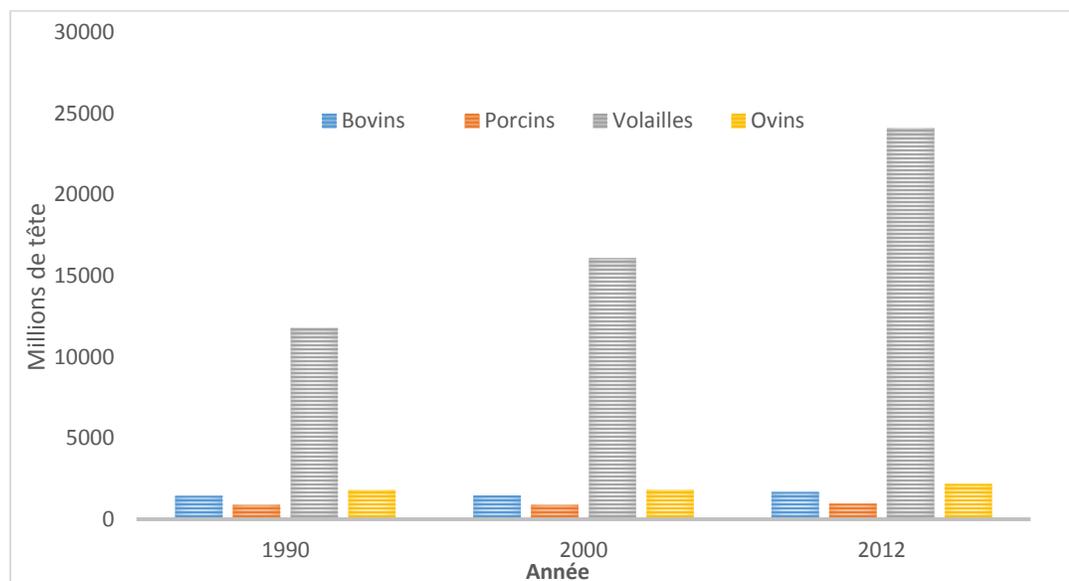


Figure 2 : Graphe représentant l'évolution de l'élevage mondial. Source : Statistiques 2012, FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. http://www.fao.org/ag/againfo/themes/fr/meat/backgr_sources.html, janvier 2016

Selon les statistiques de la FAO représentées dans la figure 2, nous constatons qu'il y a eu une évolution très importante de l'élevage mondial puisque le pourcentage de variation entre 1990 et 2012 est estimé à 104,2%, ceci est une conséquence directe de l'augmentation de la demande auprès des consommateurs de la viande de volaille.

2.2 Consommation au Canada :

D'après le (ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, février 2011), la viande de poulet est la viande la plus consommée par les canadiens avec un pourcentage de 33,6 % de la consommation totale de viande, suivie par la viande du bœuf avec 30,7 %, du porc avec 25,1 %, du dindon avec 4,9 %, de l'agneau avec 1,3 % et du veau avec 1,1 %.

En 1999, la viande de prédilection des canadiens était plutôt le bœuf (32,5 %), suivi du porc (30 %), du poulet (27,7 %) et du dindon (4,2 %). Ceci montre clairement que la viande de volaille a donc gagné des parts de marché en faveur de la viande du bœuf et du porc.

D'après les chiffres représentés ci-dessus, nous constatons que la volaille occupe une place importante dans notre consommation quotidienne. Donc, ce que peut contenir cette viande se transmet à notre organisme et peut affecter d'une manière directe ou indirecte notre santé, cette thématique sera discutée en détails dans le chapitre suivant.

2.3 Utilisation des antibiotiques dans l'élevage de volailles, relation avec la santé humaine et bio-alternatives existantes :

Les antibiotiques sont utilisés par l'industrie de volaille et de la volaille vétérinaire pour augmenter la croissance et l'efficacité alimentaire et également pour améliorer la santé et la réduction de risque de maladie chez les volailles (Donoghue 2003). L'objectif est d'assurer une protection à l'animal et renforcer son immunité et sa résistance aux microorganismes pathogènes d'une part, et lui permettre d'améliorer ses performances et d'augmenter son poids d'autre part, ceci en apportant des modifications au niveau de sa flore intestinale. (Schwarz, Kehrenberg et al. 2001) (Toghyani, Tohidi et al. 2013)

Le microbiote intestinal ou encore appelée la flore intestinale est un assortiment de microorganismes qui habitent à l'intérieur du tractus gastro-intestinal, vivant en interaction entre eux et ayant chacun un rôle défini à l'intérieur du système digestif (Sekirov, Russell et al. 2010). Cette flore intestinale est considérée comme le responsable majeur de la bonne ou mauvaise santé de l'animal, car elle est impliquée dans plusieurs fonctions biologiques intestinale telles que la défense contre les agents pathogènes, l'immunité, le développement des microvillosités intestinales, la dégradation de polysaccharides non digestibles, etc... (Cani and Delzenne 2009).

2.4 Les dangers de l'utilisation des antibiotiques promoteurs de croissances sur la santé humaine :

L'utilisation des antibiotiques a favorisé la production efficace de volaille, ce qui permet au consommateur l'achat à un coût raisonnable une viande et des œufs de haute qualité (Donoghue 2003). Sauf que cette pratique a posé une grande problématique, étant le développement et transmission de gènes de résistance chez des bactéries nocives, telles que la *Salmonelle*, *Escherichia coli* et bien d'autres (Toghyani, Tohidi et al. 2013)

La figure ci-après schématise le processus de transmission horizontale du gène de résistance entre deux bactéries, une résistante et l'autre non résistante.

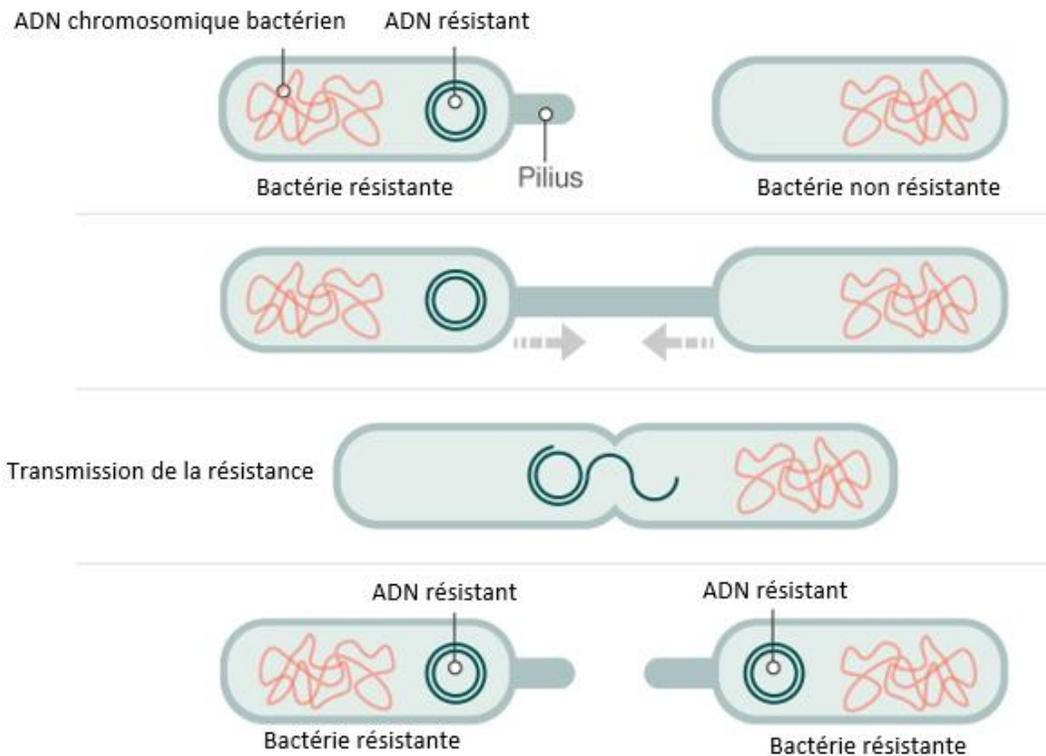


Figure 3 : Schéma explicatif de la transmission de résistance entre les bactéries modifié. Source : <http://www.bbc.com/news/health-35153795>, janvier 2016.

Par la crainte que cette surutilisation d'antibiotiques dans l'alimentation des volailles conduise à un grand problème de résistance, l'interdiction des antibiotiques comme promoteurs de croissance demeure envisageable et constitue un grand défi pour la production de viande de volaille, ce qui a engendré la nécessité de trouver des nouvelles méthodes ou alternatives afin de remédier à cette problématique. (Gaggia, Mattarelli et al. 2010)

2.5 Bioalternatives aux antibiotiques promoteurs de croissance :

Face à cette inquiétude, plusieurs études ont été menées sur des alternatives biologiques aux antibiotiques chimiques promoteurs de croissance tels que : les probiotiques, les prébiotiques, les symbiotiques, les acides organiques, les enzymes, les sources naturelles et les protéines.

2.5.1 Les probiotiques :

Les probiotiques sont définis comme «des cultures mono ou mixtes de microorganismes vivants ayant un effet bénéfique sur l'organisme hôte en améliorant les propriétés de sa flore indigène » (Fuller 1992). Autrement dit, les probiotiques sont un ou ensemble de microorganismes introduits dans le système digestif dans le but d'enrichir la flore intestinale, afin de procurer une immunité contre les agents pathogènes en minimisant ou limitant la colonisation de ses derniers dans le tractus gastro-intestinal, et au final assurer une bonne croissance de l'animal. (Griggs and Jacob 2005, Hajati and Rezaei 2010)

2.5.2 Les prébiotiques :

Dans le terme prébiotique le préfixe « pro » a été remplacé par « pré » pour exprimer un « après » ou « pour » (Gibson, Probert et al. 2004). Ils ont défini les prébiotiques comme « un ingrédient alimentaire non digestible qui avantageusement affecte l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et / ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries dans le colon ». (Schrezenmeier and de Vrese 2001). Ce sont une sorte de nourriture en forme d'oligosaccharides pour les probiotiques et la flore intestinale afin d'assurer une bonne croissance (Griggs and Jacob 2005).

2.5.3 Les symbiotiques :

Les symbiotiques sont un mélange entre les probiotiques et les prébiotiques. (Collins and Gibson 1999). Cette combinaison est très intéressante pour la survie et le bon fonctionnement des organismes probiotiques, car elle met à leur disposition les éléments nécessaires pour vivre et se développer (Fallah, Kiani et al. 2013). Les symbiotiques sont responsables de l'immunité chez les volailles (Zhang, Ma et al. 2006). D'après (Awad, Ghareeb et al. 2009), les symbiotiques peuvent conduire à une meilleure absorption des aliments par l'organisme récepteur.

Les symbiotiques ont un réel potentiel d'amélioration des performances chez les volailles (Mohnl, Acosta Aragon et al. 2007). Liong et Shah ont conclu que l'utilisation dans symbiotiques régule la concentration des acides organiques et réduit les taux de cholestérol chez les poulets (Liong and Shah 2006) (Fallah, Kiani et al. 2013).

2.5.4 Les acides organiques :

Les acides organiques sont des éléments essentiels pour le maintien de la bonne santé de l'appareil gastro-intestinal chez les poulets, car ils sont responsables de la régulation du pH à l'intérieur de leurs systèmes digestifs, afin d'améliorer le processus de la digestion des protéines. Ils ont aussi plusieurs effets bénéfiques tels que la conservation des aliments, l'amélioration de l'absorption des minéraux et le contrôle des bactéries pathogènes et non pathogènes (Abdel-Fattah, El-Sanhoury et al. 2008).

2.5.5 Les enzymes :

Les enzymes ont été définies comme des protéines spéciales capables de catalyser ou d'accélérer les réactions biochimiques (Ferket 1993). Ces réactions vont faciliter la digestion des nutriments en les décomposant en éléments plus petits et rapidement assimilables (Yang, Iji et al. 2009).

Les effets de l'ajout de ses enzymes selon Bedford, est de réduire le nombre de bactéries en augmentant le taux de digestion et de-là, limiter la quantité des éléments nutritifs disponibles pour la flore intestinale (Bedford 2000). Par conséquent, les profils bactériens de l'intestin seront modifiés et les performances des animaux seront améliorées (Ferket 2004).

2.5.6 Les extraits de plantes :

Les extraits de plantes et les huiles essentielles sont comptés parmi les éléments à effet antimicrobien (Griggs and Jacob 2005) et sont connues par leur action sur la stimulation de la digestion (Brenes and Roura 2010). Les plantes ont la capacité de réagir aux attaques microbiennes à travers un répertoire hautement coordonné de barrières défensives moléculaires, cellulaires et tissulaires à la colonisation et l'invasion des pathogènes. Quant aux huiles essentielles, ils composent des défenses redoutables contre certain composants chimiques (Taylor 2013) (Botsoglou, Yannakopoulos et al. 1997). Certaines des formes chimiques antimicrobiennes bioactives, dérivent de plantes grâce aux terpènes qui sont des composés phénoliques, des glycosides et des alcaloïdes. Le gingembre, le poivre, la coriandre, le laurier, l'origan, le romarin, la sauge, le thym, les clous de girofle, la moutarde, la cannelle, l'ail, le citron, l'écorces d'agrumes (citron vert, citron jaune, orange), et le tabac sont quelques représentants d'une très longue liste de produits de plantes ayant des propriétés antibactériennes (Hume 2011).

2.5.7 Les protéines :

Les protéines sont des promoteurs de croissance naturels. Elles sont essentielles à la formation et le développement des muscles. Leurs effets antimicrobiens est dû aux peptides bioactifs, qui sont des protéines synthétisées sous la forme de grandes prépropeptides, clivés et modifiés pour donner des produits actifs. Ils jouent un rôle important dans les fonctions physiologiques et dans la pathogenèse (Sharma, Singh et al. 2011).

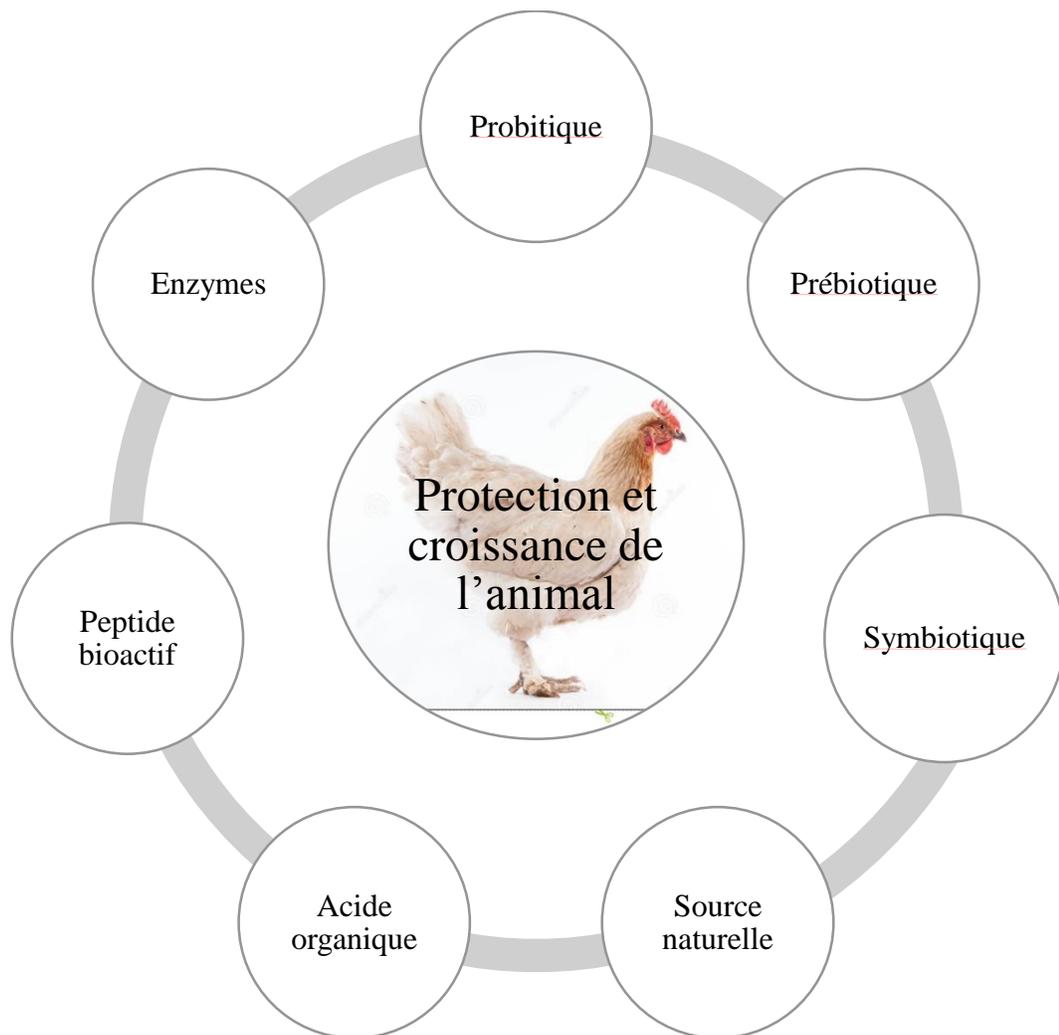


Figure 4 : Schéma représentant des alternatives biologiques aux antibiotiques promoteurs de croissances chez les volailles, réalisé par Mona Chaali, décembre 2015.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif contenant les alternatives biologiques et leurs propriétés bénéfiques pour les volailles.

Alternatives	Propriétés bénéfiques pour les volailles	Références
Enzyme	<ul style="list-style-type: none"> - Utiliser pour briser spécialement les polysaccharides non amylacés - Faciliter l'assimilation des nutriments par les microorganismes de la flore intestinale - Améliore l'assimilation des aliments 	(Yang, Iji et al. 2009)
Probiotique	<ul style="list-style-type: none"> - Modifier microflore intestinal - Stimuler le système immunitaire - Prévenir la colonisation pathogène - Améliorer les performances des volailles 	(Alloui, Szczurek et al. 2013)
Prébiotique	<ul style="list-style-type: none"> - Oligosaccharide - Nourriture pour les probiotiques et la microflore intestinales - Source de vie et stimulant des microorganismes digestifs 	(Patterson and Burkholder 2003, Hume 2011)
Symbiotique	<ul style="list-style-type: none"> - Combinaison entre les probiotiques et prébiotiques pouvant améliorer la survie de l'organisme probiotique 	(Fallah, Kiani et al. 2013)
Huiles essentielles	<ul style="list-style-type: none"> - Effets antimicrobiens grâce aux composés phénoliques - Réduire la prolifération des bactéries 	(Taylor 2013)
Acide organique	<ul style="list-style-type: none"> - Diminuer la valeur du pH à l'intérieur des intestins - Agir comme agents conservateurs - Empêcher contamination microbienne 	(Fallah 2013)
Protéines	<ul style="list-style-type: none"> - Croissance des muscles - Effet antimicrobiens grâce aux peptides bioactifs - Régulateur de l'activité des hormones 	(Joerger 2003, Sharma, Singh et al. 2011)

2.6 Les trois composantes de cette bio-alternative et les microorganismes producteurs

Le terme « bio » implique également que ses alternatives sont produites par des voies biologiques, par le biais de microorganismes (champignons et levures).

2.6.1 La laccase produite par *Trametes versicolor* :

Laccases est un enzyme contenant du cuivre qui catalysent l'oxydation d'une grande variété de substrats organiques et inorganiques, y compris les mono-, di- et les polyphénols, les amino-phénols, les méthoxy-phénols, les amines aromatiques et d'ascorbate avec la réduction à quatre électrons concomitante de l'oxygène en eau (Galhaup, Goller et al. 2002)

L'une des espèces les plus productrices de l'enzyme laccase est le champignon *Trametes versicolor*. C'est un champignon de la pourriture blanche appartenant à la famille des Polyporacées. Ils poussent généralement sur les grumes des chênes abattus ou des feuillus morts (Lorenzo, Moldes et al. 2002).

Il a été rapporté que la laccase produite par *Trametes versicolor* est particulièrement intéressante grâce à son haut potentiel d'oxydo-réduction et sa forte activité. En outre, la capacité de cette laccase à exercer son activité catalytique sur de nombreux types de composés aromatiques a été démontrée la plus élevée comparant aux laccases produites par d'autres souches (Kurniawati and Nicell 2008). Les deux principales fonctions attribuées aux laccases fongiques sont la dégradation de la lignine, conjointement avec d'autres enzymes ligninolytiques telles que les peroxydases (Brijwani, Rigdon et al. 2010).

La laccase est aussi bien connue pour son rôle dans la virulence fongique comme agent clé dans la pathogenèse contre des plantes hôtes (Brijwani, Rigdon et al. 2010).

2.6.2 Les protéines de levure produites par *Saccharomyces cerevisiae* :

Les protéines sont actuellement utilisées comme aliment pour les animaux dans le but d'améliorer leur croissance. Afin de répondre aux besoins nutritionnels, la production de protéines en grande quantité est devenue nécessaire, en particulier si leurs ressources sont renouvelables (Ravindra 2000). Pour cela, on utilise de plus en plus les protéines extraites de la biomasse microbienne cultivée comme les levures (Patelski, Berlowaska et al. 2015). Les cellules de levure sont connues par leur haute teneur en protéines (environ 60-82% de matière sèche) (Choi 2003), elles contiennent également des graisses, des glucides, des acides nucléiques, des vitamines et des minéraux, et riche en certains acides aminés essentiels tels que la lysine et méthionine, les deux qui sont limitées dans la plupart des plantes et la nourriture des animaux. (Harrison 1993, Asad, Asghar et al. 2000). Une étude a démontré que les protéines de cellules peuvent être produites en utilisant une souche de levure dont la biomasse est utilisée pour la préparation des aliments pour animaux qui est *Saccharomyces cerevisiae* (Patelski, Berlowaska et al. 2015). *Saccharomyces cerevisiae* est la levure la plus populaire et abondante. C'est une levure unicellulaire, organisme eucaryote appartenant au règne des champignons et à la famille des saccharomycètes (Moustacchi 1976).

2.6.3 L'acide citrique produit par *Aspergillus niger* :

L'acide citrique (acide 2-hydroxy-propane-1,2,3-tricarboxylique) est un constituant des plantes d'agrumes comme le citron, d'où vient son nom l'acide citrique. Il est aussi connu sous le nom d'un intermédiaire de l'acide tricarboxylique (TCA). Il est principalement utilisé comme additif et conservateur alimentaire. Il est également capable de complexer des ions de métaux lourds tels que le fer et le cuivre. De plus, plusieurs études ont démontrés l'effet antimicrobien de l'acide citrique face à des bactéries pathogènes comme *Escherichia coli* et la *Salmonelle* (Eswaranandam, Hettiarachchy et al. 2004). Par conséquent, il est aujourd'hui l'un des acides organiques produits en vrac par la fermentation; généralement produit par le champignon *Aspergillus Niger*. C'est un champignon filamenteux ascomycète de

l'ordre des Eurotiales, une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure noire (Karaffa and Kubicek 2003). Bien que de nombreux micro-organismes soient capables de produire l'acide citrique, *A. Niger* reste le principal producteur industriel. C'est une souche spécifique qui est capable de surproduire l'acide citrique. Le rendement de l'acide citrique à partir de ces souches est souvent supérieur à 70% du rendement théorique sur la source de carbone (Papagianni 2007).

3. PROBLÉMATIQUE :

Ces dernières années, l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance dans l'élevage de volaille est devenue un sujet d'inquiétude. Il s'avère que cette pratique est responsable du développement et du transfert de la résistance aux antibiotiques chez des bactéries. A force d'introduire dans l'organisme des volailles de faibles doses d'antibiotiques, il y'a eu un développement de résistance chez certaines bactéries pathogènes telles que la *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli* à l'intérieur de la microflore intestinale des volailles. Ces bactéries vont affecter la santé humaine soit par consommation directe d'une viande mal lavée ou mal cuite, ou d'une manière indirecte puisque le fumier de volaille est utilisé dans les fermes comme fertilisant qui va contaminer le sol et ces pathogènes peuvent par la suite se retrouver dans le légume, les fruits ou de l'eau consommés par l'être humain. De plus, les bactéries résistantes peuvent transférer d'une façon très facile et rapide les gènes de résistance aux antibiotiques à des bactéries non résistantes, surtout si elles (les bactéries) se retrouvent dans un milieu contenant déjà des traces de ces antibiotiques. Aussi, sans oublier la bioaccumulation de ces gènes de résistances à l'intérieur du système digestif humain. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles alternatives à l'usage de ces antibiotiques afin de préserver la santé humaine et l'environnement.

4. OBJECTIFS DE RECHERCHE :

L'objectif principal de ce projet est le développement d'une nouvelle alternative aux antibiotiques utilisés dans l'élevage de volailles à partir d'une combinaison entre l'enzyme laccase, l'acide citrique et les protéines de levure. Cette combinaison va stimuler le métabolisme des volailles pour les maintenir en bonne santé.

Les objectifs spécifiques de ce travail sont :

- La production des protéines de levure, l'enzyme laccase et de l'acide citrique par fermentation des déchets de l'industrie de jus de pomme en utilisant respectivement les souches *Saccharomyces cerevisiae*, *Trametes versicolor* et *Aspergillus niger*.
- Test de la réponse immunitaire à l'aide de test de mélanisation.
- Développement d'une formulation en poudre en utilisant la technique de séchage par atomisation

5. HYPOTHÈSES :

Les hypothèses de ce travail de recherche sont les suivantes:

- L'utilisation d'une combinaison entre trois alternatives sera plus efficace au lieu de leur utilisation séparément grâce à leurs actions complémentaires.
- Cette combinaison peut avoir un effet bénéfique et augmente le système immunitaire de l'animal.
- Le test de mélanisation a été choisi pour démontrer l'effet de cette combinaison sur le système immunitaire des volailles en mesurant la quantité de mélanine produite qui sera une réponse immunitaire aux ajouts des composés produits. De plus, c'est un test faisable, facile et réalisable dans un laboratoire de biotechnologie environnementale, rapide si compare aux tests vétérinaires et donne des résultats qui peuvent être interpréter statistiquement.

- La technique de séchage par atomisation est une technique de séchage moins coûteuse que la lyophilisation (généralement utilisée pour les produits médicaux) et très efficace si le choix et le dosage des agents protecteurs contre la chaleur sont bien appliqués, et peut être facilement mise en échelle pour une production à l'échelle industrielle.

6. MATÉRIEL ET MÉTHODES:

6.1 Production de laccase par *Trametes versicolor* :

6.1.1 Culture de *Trametes versicolor* :

Trametes versicolor a été pré-cultivé dans milieu de culture liquide PDB (Potato Dextrose Broth) dans un incubateur agitateur sous les conditions suivantes : 30 ± 1 ° C, 150 rpm (rotation per minute) pendant 7 jours. À partir de la culture liquide, le champignon a été re-cultivé dans des boîtes de pétri contenant du PDA (Potato Dextrose Agar) et incubé à 30 ± 1 ° C pendant 10 jours (Lorenzo, Moldes et al. 2002, Gassara, Brar et al. 2010).

6.1.2 La fermentation à l'état solide

Pour la fermentation à l'état solide, le marc de pomme (déchet de l'industrie de jus de pomme) a été utilisé comme substrat de fermentation pour la production de laccase par *Trametes versicolor*. (Gassara, Brar et al. 2010)

Tableau 2 : tableau représentant la caractéristiques physico-chimiques du marre de pomme

pH	4,03
Humidité %(v/w)	75 ± 0,7
Protéines	25,66 g/kg substrat sec
Glucose	28,8 g/kg substrat sec
Concentration en métaux (ppm) :	
Ca	345,28
Cu	3,10
Fe	12,58
K	1110,11
Mg	204,42
Na	60,59
Ni	0,11
P	693,69
Zn	2,39
Carbone %	17,9
Hydrogène %	8,1
Azote%	0,3
Sulfure %	0,1

Le milieu de fermentation est préparé dans des fioles de 500mL, en ajoutant 40g de marc de pomme supplémenté avec du Tween-80 à une concentration de 3 mM substrat sec, le Tween-80 servira comme inducteur pour la production de laccase. Le milieu est stérilisé dans un autoclave pendant 20 min à 121°C ±1 °C. Après stérilisation, le milieu est inoculé par prélèvement directement du mycélium de *Trametes versicolor* à partir des boites de pétri (Lorenzo, Moldes et al. 2002). Les erlenmeyers sont placés ensuite dans un incubateur pendant 15 jours à 30° C, un échantillon est prélevé toutes les 24h pour dresser la courbe de production de laccase. L'expérience a été répliquée 10 fois.

6.1.3 Extraction de la laccase et estimation de son activité enzymatique :

La laccase extracellulaire est extraite du milieu de fermentation par ajout de 10mL/g de substrat sec d'une solution tampon de phosphate de sodium à pH 4,0 concentrée à 50mM. Après macération, le mélange est mis dans un incubateur rotatif pendant 1h à 150 rpm, 30±1 °C. Ensuite le milieu est centrifugé à 4 ±1 °C pendant 20 min à 7000xg.

Le surnageant est analysé par spectrophotomètre. Dans une cuvette, 2,48 mL de solution tampon de citrate-phosphate, 480 µL de réactif ABTS (2,2-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) et 20 µL de surnageant sont mélangés. L'activité de la laccase extracellulaire est mesurée à 436 nm et à 45°C. Une unité d'activité de laccase a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 µmole d'ABTS par minute. (Lorenzo, Moldes et al. 2002, Gassara, Brar et al. 2010).

6.2 Production de l'acide citrique par *Aspergillus niger* :

6.2.1 Culture de l'*Aspergillus niger* :

Aspergillus Niger (NRRL 567 et NRRL 2001) est cultivé premièrement en milieu liquide (PDB) pendant 6 jours dans un incubateur rotatif à 30±1 °C et à 150 rpm, puis il est re-cultivé sur PDA en boîte de pétri dans un incubateur statique à 30±1 °C pendant 5 jours. Par la suite, les spores produites sont recueillies à partir des plaques de PDA, en utilisant une solution de Tween-80 solution à 0,1%. Finalement, les spores sont comptées à l'aide d'un hémocytomètre afin de pouvoir les utilisées pour l'inoculation (Dhillon, Brar et al. 2011, Dhillon, Brar et al. 2013).

6.2.2 La fermentation à l'état solide :

Pour la production de l'acide citrique, 50g de marc de pomme sont mis dans des Erlenmeyers de 500 mL et stérilisés dans un autoclave à 121 ± 1 °C pendant 20 min. Après stérilisation, 3% (v/w sec) de méthanol est ajouté comme inducteur pour la production de l'acide citrique. Ensuite, le substrat est inoculé par 10^7 spores/g substrat sec et incubé à 30 ± 1 °C pendant 5 jours dans un incubateur statique. Un échantillon est prélevé toutes les 24h (Dhillon, Brar et al. 2013). L'expérience a été répliquée 10 fois.

6.2.3 Extraction de l'acide citrique et estimation de sa concentration :

L'extraction de l'acide citrique est faite par ajout d'eau distillée (10 mL pour 1g de substrat sec). Par la suite, le tout est mélangé au vortex et centrifugé pendant 30 min à 7000xg (Dhillon, Brar et al. 2011, Dhillon, Brar et al. 2013). Le surnageant est utilisé pour l'estimation de la concentration de l'acide citrique, ceci en ajoutant à 1 mL de surnageant, 1,3 mL de pyridine et 5,3 mL de l'anhydride acétique. Après dressage d'une courbe d'étalonnage, la lecture de la concentration se fait à 420 nm au spectrophotomètre (Marier and Boulet 1958).

6.3 Production des protéines de levure par *Saccharomyces cerevisiae* :

6.3.1 Culture de *Saccharomyces cerevisiae* :

Pour la production des protéines de levure, *Saccharomyces cerevisiae* est cultivé dans un milieu de culture liquide synthétique (PDB) pendant 24h dans un incubateur rotatif à 30 ± 1 °C et 150 rpm. Ensuite, les cellules de levure contenues dans le milieu ont été comptées par hémocytomètre pour l'étape de l'inoculation (Choi and Park 2003).

6.3.2 Fermentation à l'état liquide :

Les boues d'ultrafiltration de production de jus de pomme ont servi comme substrat de fermentation pour la production de protéines de levure par *Saccharomyces cerevisiae*. Le milieu de culture a été inoculé par une pré-culture de la levure dans un milieu liquide synthétique PDB (Potato Dextrose Broth).

Tableau 3 : tableau représentant les caractéristiques physico-chimiques des boues d'ultrafiltration de fabrication de jus de pomme.

pH	3,58
Humidité %(v/w))	3 ± 1
Volatile solids g/L	6,21
Total solids g/L	54,01
Protéines g/L	24,74
Glucose g/L	28,8
Concentration en métaux (ppm) :	67,25
Ca	
Cu	0,25
Fe	9,34
K	672,56
Mg	45,63
Na	23,15
Ni	0,04
P	235,36
Zn	0,21
Carbone %	44,1
Hydrogène %	6,7
Azote%	1
Sulfure %	0,3

Pour la fermentation à l'état liquide, 100 mL de boues d'ultrafiltration de fabrication de jus de pomme sont stérilisés à l'autoclave à 121 ± 1 °C pendant 20 min, ceci après ajustement de pH à 7 à l'aide de NaOH et ajustement des solides totaux par dilution en ajoutant de l'eau distillée. Pour l'inoculation, les 100mL sont inoculés par 10^6 cellules/mL pré-cultivés dans un milieu liquide PDB (Potato Dextrose Broth), et la fermentation est maintenue à 30 ± 1 °C et 150 rpm pendant 3 jours dans un incubateur rotatif. Un échantillon est prélevé à 0, 6, 12, 24, 48 et 72 heures pour l'étude de profilage de la production (Madrera, Bedriřana et al. 2013, Patelski, Berlowska et al. 2015). L'expérience a été répliquée 10 fois.

6.3.3 Extraction des protéines et estimation de la concentration :

Le bouillon de fermentation est centrifugé à 7000xg pendant 20 min. La concentration en protéines solubles extracellulaires est estimée par analyse au spectrophotomètre. Dans une cuvette, 100 μ l de surnageant est mélangé à 2mL de solution de Bradford. Après dressage d'une courbe d'étalonnage, la lecture de la concentration se fait à 595 nm.

6.4 Test de mélanisation

6.4.1 Culture de cellule de *Saccharomyces cerevisiae* :

Les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées dans le test de mélanisation pour la production de la mélanine. Les cellules de la levure ont été cultivées premièrement sur gélose de YPD (Yeast Peptone Dextrose) en boîte de pétri et ensuite sur un milieu de culture liquide YDB pendant 24h à 25 ± 1 °C et 20 rpm. Les cellules ont été comptés après pour l'inoculation.

6.4.2 Préparation du milieu de fermentation pour la mélanisation :

Dans des erlenmeyers de 250 mL, 75 mL d'eau distillée est mélangé à 15 mM de glucose, 10 mM de MgSO₄, 29,4 mM KH₂PO₄ et 13 mM de glycine. Le milieu est

stérilisé dans un autoclave à $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min. Après stérilisation, 3,0 mM de la vitamine B1 et 1,0 mL de catéchol sont additionnés au milieu dans des conditions aseptiques (Wang, Aisen et al. 1996, Sabiiti, Robertson et al. 2014). Le test a été effectué sous 4 conditions : A: témoin avec seulement des cellules de levure ($1,0 \times 10^8$ cellules de levure), B: les cellules de levure et de l'acide citrique avec une concentration de 15g/L, C: cellules de levure et la laccase (1400 U); D: cellules de levure avec la laccase et l'acide citrique. Chaque condition a été réalisée en triplicata. Les milieux ont été incubés dans un incubateur rotatif à $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ et 150 rpm, pendant 10 jours (Sabiiti, Robertson et al. 2014). L'expérience a été répliquée 12 fois.

6.4.3 Recomptage des cellules de levure :

Après 10 jours d'incubation, les milieux ont été centrifugés à 9000xg pendant 20 min, ensuite le culot contenant les cellules de levure a été lavé et remis en solution dans 5 mL d'une solution de 1,0 M de sorbitol et 0,1 M de citrate de sodium à pH 5,0. Les cellules ont été comptées en utilisant un hémocytomètre (Wang, Aisen et al. 1996, Sabiiti, Robertson et al. 2014).

6.4.4 Extraction et pesée de la mélanine produite par les cellules de levure :

Pour extraire la mélanine, les cellules de levure ont été brisées par ultrasonication pendant 45 secondes. Les débris cellulaires ont été recueillis par centrifugation (9000xg pendant 20 min) et remis en suspension dans une solution de 4,0 M d'urée pendant 1 h à température ambiante. Encore une fois les débris cellulaires ont été recueillis par centrifugation (9000 x g pendant 20 min) et remis en suspension dans une solution de 6,0 M de HCl et par la suite les solutions ont été mises dans un bain marie à $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 h. Finalement, les solutions ont été filtrées sur papier Whatman en utilisant une pompe à vide. Pour le séchage, les filtres ont été séchés avant le pesage dans un dessiccateur pour quantifier la

mélanine produite par les cellules de levure, en adaptant le procédé utilisé par (Wang, Aisen et al. 1996, Sabiiti, Robertson et al. 2014)

6.5 Développement d'une formulation en poudre par la technique de séchage par atomisation :

6.5.1 Préparation des échantillons :

Pour le séchage par atomisation plusieurs échantillons ont été préparés pour faire une optimisation des paramètres de séchage. Les trois bouillons de fermentation : laccase, acide citrique et protéines ont été mélangés de façon à obtenir les trois composants en une seule solution (les tableaux 6, 7, 8, 9, 10,11 et 12).

6.5.2 Le séchage par atomisation :

Le modèle utilisé pour le séchage par atomisation est le modèle « Spray dryer DL410 de Yamato Scientific ». Les paramètres de séchage fixés durant toutes les expériences de séchage sont : la pression d'atomisation fixée à 0,07 MPa, La température de séchage fixée à 130° et le débit d'air de séchage fixé à 0,6 m³/min. En ce qui concerne les paramètres optimisés : le débit de passage de l'échantillon ainsi que la quantité de l'agent de protection étant l'amidon de maïs, ils ont varié comme indiqué dans le tableau suivant. Ces valeurs ont été choisies après une dizaine de tests préliminaires car nous avons eu un problème de blocage des tuyaux servant au passage de l'échantillon. À des vitesses basses et des quantités d'agent protecteur grandes, un dépôt sur les tuyaux bloquait le passage des échantillons. Le volume d'échantillon séché pour chaque expérience est de 500 mL.

6.5.3 Analyses des poudres récoltées :

Pour la mesure de l'activité de la laccase et les concentrations en acide citrique et en protéines, la poudre récoltée a été dissoute dans de l'eau distillée suivant les mêmes conditions avant le séchage. Aussi, le poids finale et l'humidité a été

mesurée pour la poudre récoltée pour chaque échantillons et après chaque expérience.

Tableau 4 : tableau représente les paramètres variés durant chaque expérience pendant le séchage par atomisation

Expérience	Débit d'échantillon mL/min	amidon de maïs %(w/v)
1	8	12
2	8	7
3	13	12
4	13	7
5	16	12
6	16	7
7	20	12
8	20	7

7. RÉSULTATS ET DISCUSSION:

7.1 Production de la laccase par *Trametes versicolor* :

Trametes versicolor a été choisi pour son grand potentiel de production de la laccase. La production maximale de l'enzyme étant 38 U / g_{substrat sec} a été atteint après 13 jours 13 jours de fermentation (Figure 5).

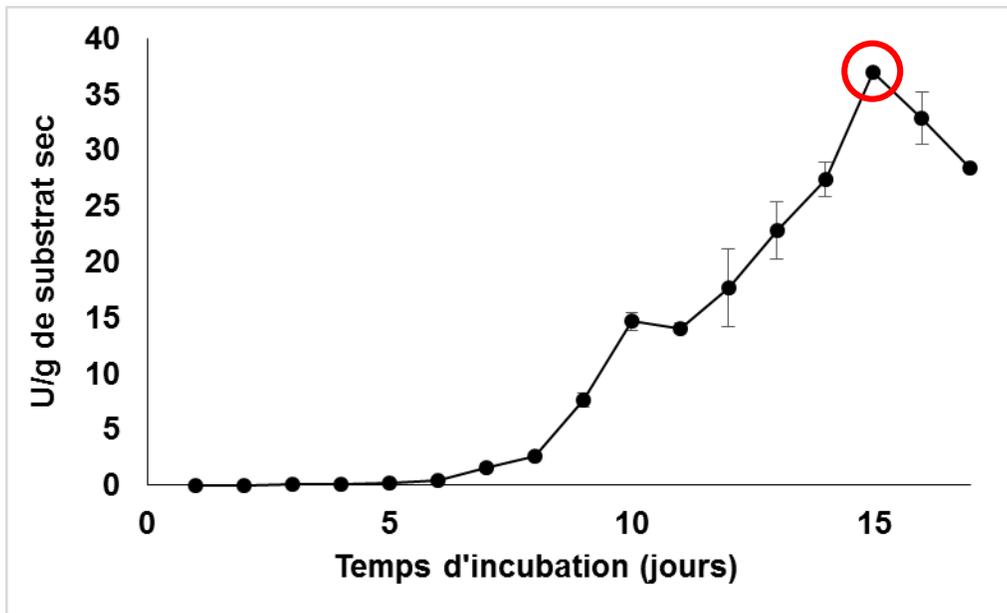


Figure 5 : Graphe représentant le profil d'étude de la production de la laccase

7.2 Production de l'acide citrique par *Aspergillus niger* :

Aspergillus niger a été choisi pour sa grande capacité de production de l'acide citrique. La figure 6 représente une étude du profil de la production d'acide citrique. Au cours de cette expérience, la production maximale de l'acide citrique a été observée à 48h de fermentation ($35,4 \pm 0,7$ g/kg substrat sec).

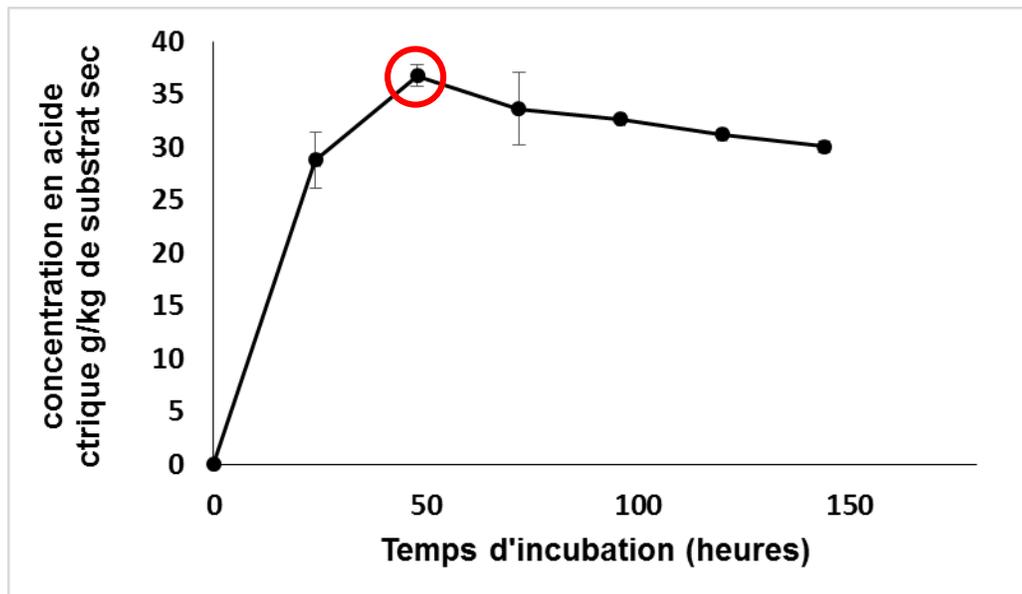


Figure 6 : Graphe représentant le profil d'étude de la production de l'acide citrique

7.3 Production des protéines de levure par *Saccharomyces cerevisiae*:

Pour la production des protéines de levure, nous avons réalisés une étude du profil de la production pendant les 72 h de la fermentation (Figure 7), ceci en prélevant un échantillon à 0h, 6h, 12h, 24h, 36, 48h et 72h. La production maximale est de 37,55 g/L de boues d'ultrafiltration de jus de pomme, elle a été obtenue après 36h de fermentation.

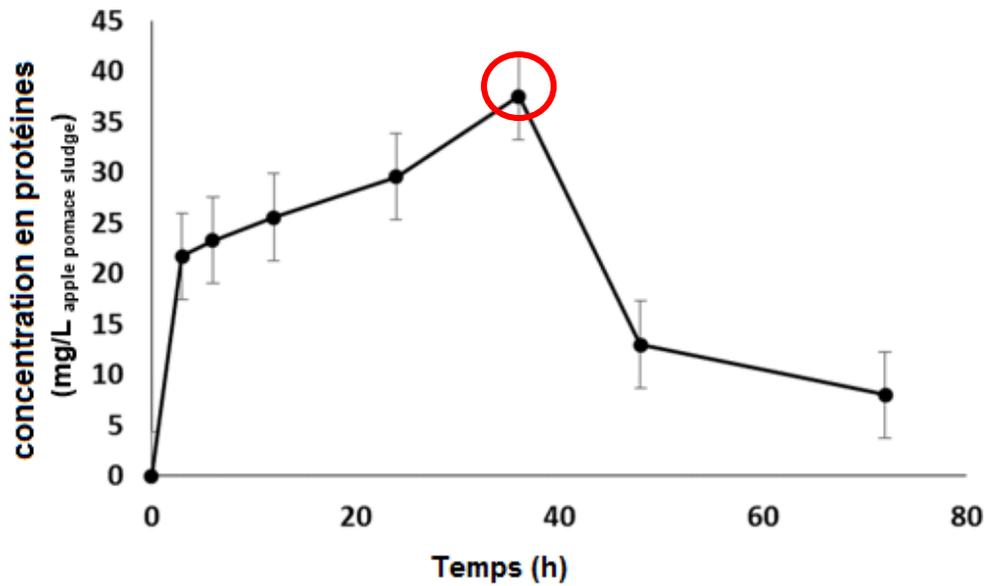


Figure 7 : Graphe représentant le profil d'étude de la production des protéines de levure

7.4 Test de mélanisation :

Après 10 jours d'incubation, le nombre de cellules de levure a été compté et la mélanine produite par chaque cellule été extraite et pesée pour la quantification. Pour le nombre de cellules, il n'y pas eu de changement entre chaque condition la croissance de levure a été pratiquement la même (le nombre de cellule compté était aux alentours de $5,5 \cdot 10^7$ cellule) ceci peut s'expliquer par l'action de l'acide citrique et la laccase qui peuvent stopper la prolifération des microorganismes (Bhatnagar, Srirangam et al. 1998).

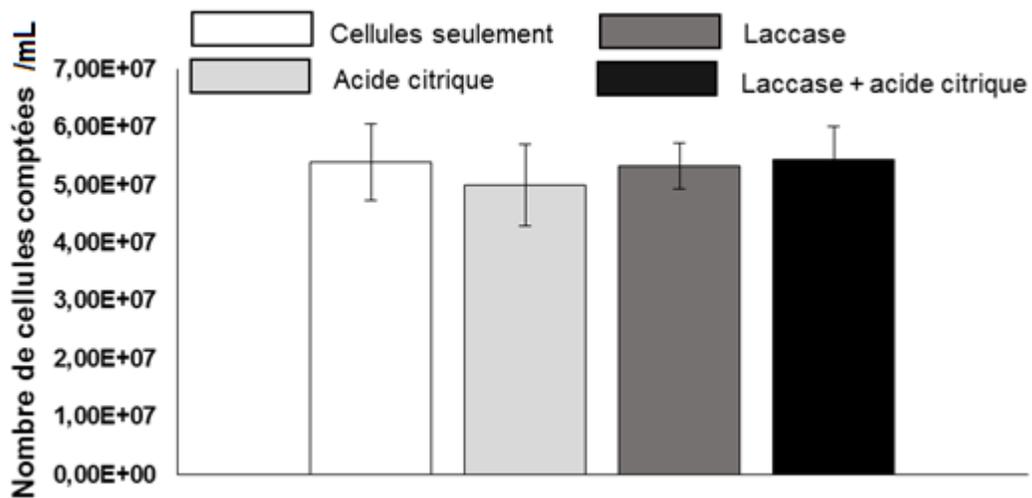


Figure 8 : graphe représentant le nombre de cellules compté par hémacytomètre après 10 jours de fermentation pour chaque condition.

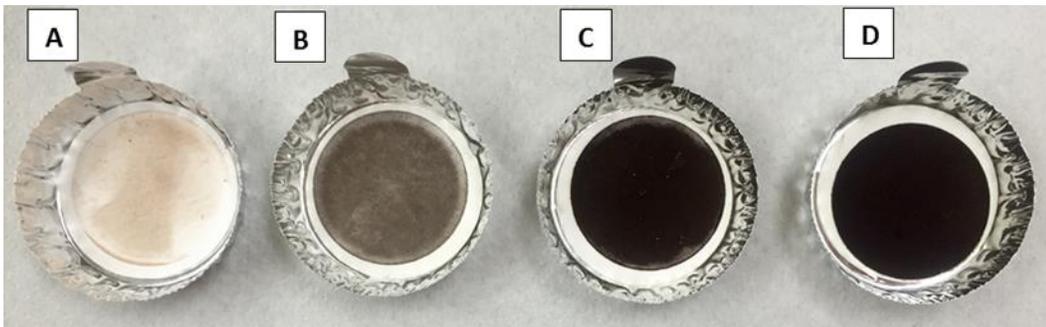


Figure 9 : photo des filtres Wattman après filtration des milieux de cultures pour la récupération et quantification de la mélanine produite par les cellules de levure dans chaque condition. A : milieu avec les cellules de levures seulement, B : milieu avec les cellules de levure et l'acide citrique. C : milieu avec les cellules de levure et la laccase et D : milieu avec les cellules de levure l'acide citrique et la laccase.

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que la quantité de mélanine produite diffère d'une condition à une autre.

Dans le milieu où nous avons mis les cellules de levure seulement, nous avons obtenu la plus faible production de la mélanine ($1,07 \cdot 10^{-10}$ g/cellule), suivi du milieu où nous avons mis les cellules avec l'acide citrique ($2,88 \cdot 10^{-10}$ g/cellule), ensuite le milieu avec les cellules de levure et la laccase ($3,70 \cdot 10^{-10}$ g/cellule) et finalement la plus grande production a été retrouvée dans la quatrième condition où nous avons mis ensemble l'acide citrique et la laccase avec les cellules de levure ($10,48 \cdot 10^{-10}$ g/cellule). Une analyse statistique a été réalisée pour la mélanine produite par les cellules dans chaque condition. Les valeurs sont statistiquement significatives.

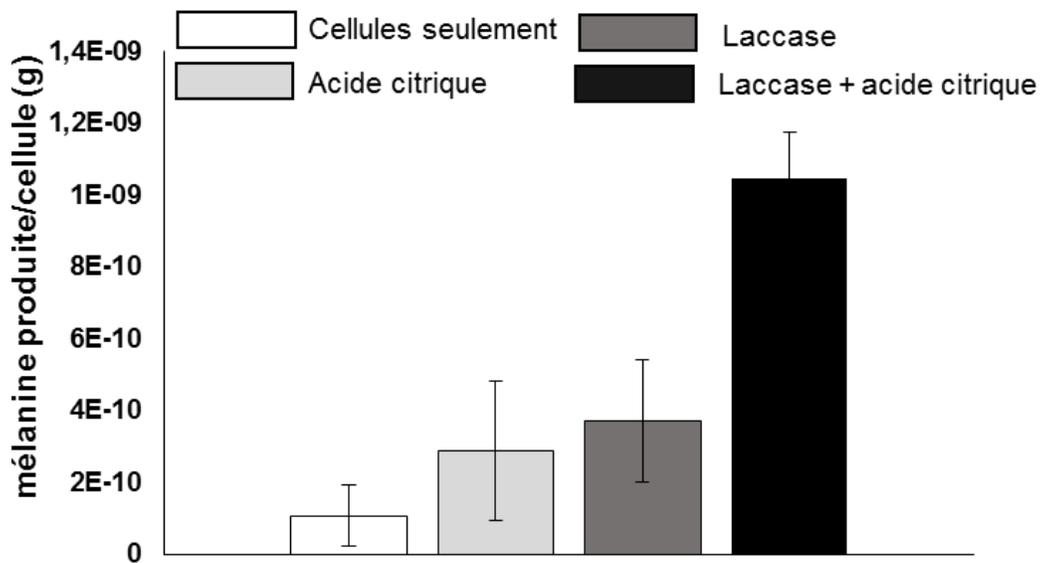


Figure 10 : graphe représentant la quantité de mélanine produite par cellule en g pour chaque condition.

Tableau 5 : tableau contenant les valeurs de p de l'analyse statistique réalisée sur l'effet de la laccase et l'acide citrique sur la production de la mélanine.

Le test bilatéral (logiciel Graph Pad)	Contrôle	Acide citrique	Laccase
	P		
Laccase + acide citrique	0.0005	0.0048	0.0054

7.5 Le séchage par atomisation :

Pour le séchage par atomisation, 500 mL du mélange de bouillon de fermentation de la laccase, les protéines de levures et l'acide citrique ont été séchés pour chaque expérience. Ci-dessous les différents résultats : poids de la poudre récupéré, sa température à la sortie, le %(v/w) d'humidité ainsi que l'activité enzymatique de la laccase, la concentration en protéines et en acide citrique avant et après le séchage et le calcul du % de récupération des concentrations initiales. Les tableaux ci-après représentent les différents paramètres qui ont été utilisés durant les expériences du séchage par atomisation, ainsi les différents résultats : poids de la poudre récupéré, sa température à la sortie, le %(v/w) d'humidité ainsi que l'activité enzymatique de la laccase, la concentration en protéines et en acide citrique avant et après le séchage et le calcul du % de récupération des concentrations initiales.

Tableau 6: Tableau contenant les paramètres de séchage qui ont été variés ainsi que le poids et l'humidité de la poudre récupérée après chaque expérience de séchage.

Échantillon	Débit d'échantillon (mL/min)	Amidon de maïs %(w/v)	Poids de poudre récupérée (g)	T à la sortie °C	Humidité % (v/w)
1	8	12	46,74	70±1	1,66
2	8	7	28,49	70±1	2,93
3	13	12	46	66±2	3,9
4	13	7	23,61	68±1	3,83
5	16	12	41,87	60±1	3,89
6	16	7	23,17	60±1	3,78
7	20	12	37,66	58±1	5,19
8	20	7	27,7	56±1	4,68

Tableau 7 : Tableau contenant l'activité enzymatique avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 7%(w/v) d'amidon de maïs.

Débit d'échantillon (mL/min)	Activité enzymatique avant séchage (U/L)	Activité enzymatique après séchage (U/L)	% récupération de l'activité initiale
8	24	10	41,67
13	24	11	45,83
16	24	14	58,33
20	24	17	70,83

Tableau 8 : Tableau contenant l'activité enzymatique de la laccase avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 12%(w/v) d'amidon de maïs.

Débit d'échantillon (mL/min)	Activité enzymatique avant séchage (U/L)	Activité enzymatique après séchage (U/L)	% récupération de l'activité initiale
8	24	11	45,83
13	24	12	50
16	24	12	50
20	24	15	62,5

Tableau 9 : tableau contenant la concentration en protéines avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 7%(w/v) d'amidon de maïs.

Débit d'échantillon (mL/min)	Concentration en protéines avant séchage (mg/L)	Concentration en protéines après séchage (mg/L)	% récupération de la concentration initiale
8	20,87	9,92	47,53
13	20,87	10,62	50,88
16	20,87	15,75	75,46
20	20,87	17,71	84,85

Tableau 10 : tableau contenant la concentration en protéines avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 12%(w/v) d'amidon de maïs.

Débit d'échantillon (mL/min)	Concentration en protéines avant séchage (mg/L)	Concentration en protéines après séchage (mg/L)	% récupération de la concentration initiale
8	20,53	8,06	39,26
13	20,53	9,85	47,98
16	20,53	10,97	53,43
20	20,53	12,2	59,43

Tableau 11 : tableau contenant la concentration d'acide citrique avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 7%(w/v) d'amidon de maïs.

Débit d'échantillon (mL/min)	Concentration d'acide citrique avant séchage (g/L)	Concentration d'acide citrique après séchage (g/L)	% récupération de la concentration initiale
8	17,32	14,99	86,55
13	17,32	15,77	91,05
16	17,32	16,28	94,00
20	17,32	16,98	98,04

Tableau 12 : tableau contenant la concentration d'acide citrique avant et après le séchage par atomisation ainsi que le % de la récupération de l'activité initiale pour les échantillons à 12%(w/v) d'amidon de maïs.

Débit d'échantillon (mL/min)	Concentration d'acide citrique avant séchage (g/L)	Concentration d'acide citrique après séchage (g/L)	% récupération de la concentration initiale
8	17,03	12,41	72,87
13	17,03	14,49	85,09
16	17,03	14,98	87,96
20	17,03	16,14	94,77

D'après les valeurs présentées dans les tableaux (6,7,8,9,10,11 et 12) nous constatons que pour les expériences réalisées avec un débit de passage de l'échantillon de 20mL/min et d'une quantité de 7%(w/v) d'amidon de maïs, nous avons obtenus les plus grandes valeurs en terme de récupération des concentrations initiales en protéines et en acide citrique ainsi que l'activité enzymatique initiale de la laccase.

Pour l'enzyme laccase, 70,83% de l'activité initiale a été récupérée. Quant aux protéines provenant de la levure, 84,85% de la concentration initiale a été récupérée. Et finalement pour l'acide citrique, 98,04% de la concentration initiale a été récupérée.

Quand la vitesse de passage de l'échantillon augmente le temps de contact de l'échantillon avec l'air de séchage et le temps de résidence dans la cuve de la machine diminue. Donc, ceci permet une moindre exposition des composants de l'échantillon à une très haute température, et delà diminuer les pertes en terme de concentrations en protéines et activité enzymatique. Les figures 11, 12 et 13 représentent les % de récupérations de l'activité enzymatique initiale de la laccase, la concentration initiale en protéines et la concentration initiale en acide citrique pour chaque expérience de séchage par atomisation.

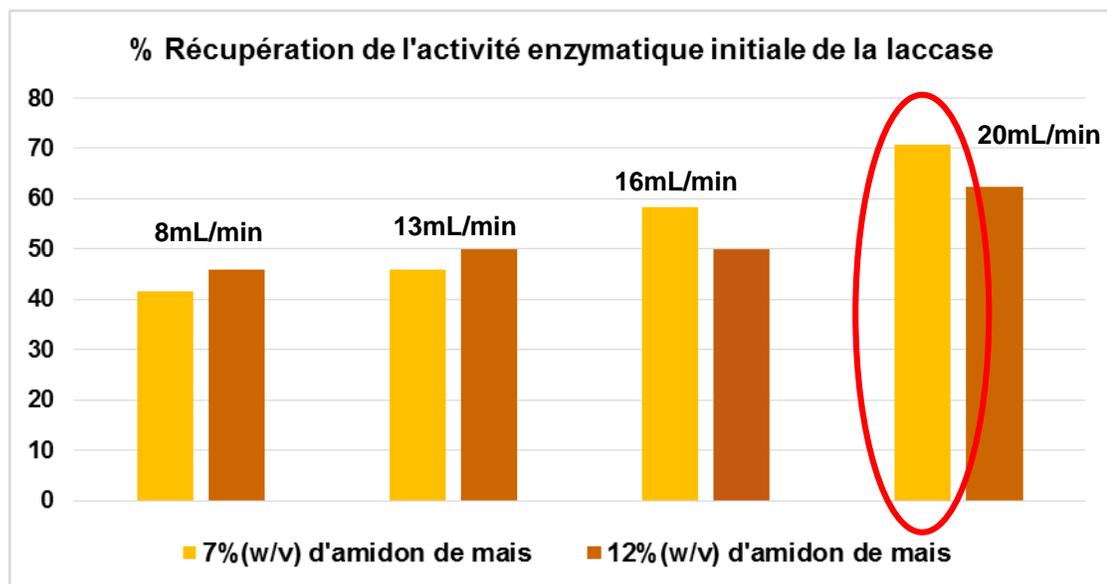


Figure 11 : graphe représentant le % récupération de l'activité enzymatique initiale de la laccase pour chaque expérience de séchage par atomisation.

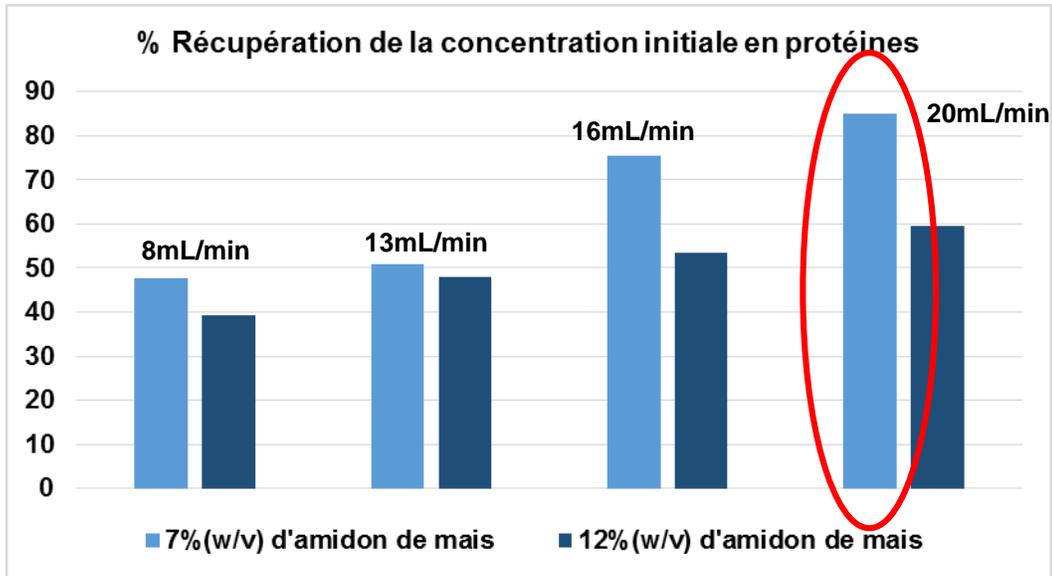


Figure 12 : graphe représentant le % récupération de la concentration initiale en protéines pour chaque expérience de séchage par atomisation.

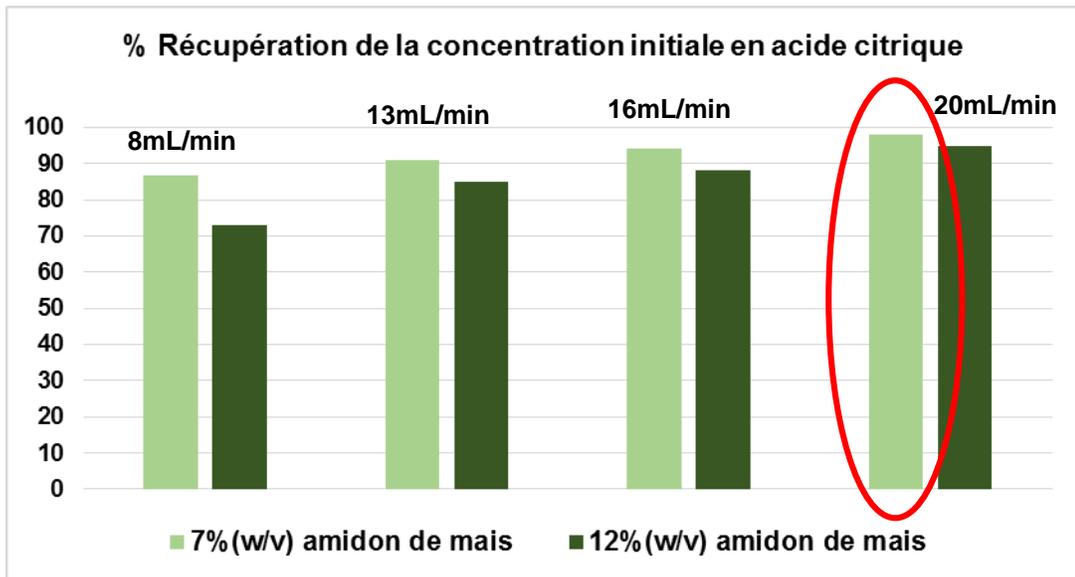


Figure 13 : graphe représentant le % récupération de la concentration initiale en acide citrique pour chaque expérience de séchage par atomisation.

8. CONCLUSIONS :

Au terme de ce travail de recherche, nous avons pu produire les trois composants de la combinaison étant : la laccase, l'acide citrique et les protéines de levure.

La production de la laccase et de l'acide citrique a été réalisée par fermentation à l'état solide ayant comme substrat le marc de pomme, et en utilisant les champignons *Trametes versicolor* et *Aspergillus niger*. Pour les protéines, la fermentation a été réalisée à l'état liquide en utilisant comme substrat les boues d'ultrafiltration du jus de pomme et comme microorganisme producteur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les deux substrats de fermentation sont des déchets provenant de l'industrie de jus de pomme. Nous avons obtenus la plus grande activité de la laccase ($38\text{U/g}_{\text{ substrat sec}}$) après 13 jours d'incubation à 30°C de la souche *Trametes versicolor*. Pour les protéines de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la production maximale ($37,55\text{mg/L}_{\text{ substrat}}$) a été obtenue après 36h d'incubation à 150 rpm et 30°C . Et l'acide citrique a été produit par *Aspergillus niger* et la production maximale a été de $35,4\text{ g/kg}_{\text{ substrat sec}}$ après 3 jours d'incubation à 30°C .

Le test de mélanisation a été réalisé pour évaluer l'effet de la combinaison sur la production de mélanine et par conséquent sur le système immunitaire. Les résultats démontrent que l'ajout extracellulaire des composants de cette combinaison peut induire les cellules à produire de la mélanine. Ainsi, en utilisant cette combinaison comme supplément dans l'alimentation des volailles, nous pourrions reproduire l'effet des antibiotiques sur l'organisme des volailles.

Le séchage par atomisation s'est avéré une technique de séchage réalisable pour des composants sensibles à la haute température comme les enzymes et les protéines (récupération de plus de 70% de l'activité enzymatique de la laccase et plus de 80% de la concentration en protéines), ceci en optimisant les paramètres de séchage par l'augmentation du débit de passage de l'échantillon qui va diminuer le temps de contact entre le liquide et l'air chaud et obtenir une moindre exposition à la chaleur. De plus, cette technique est moins coûteuse que les autres techniques actuellement utilisées pour le séchage des enzymes et des protéines comme la lyophilisation et pourrait être envisageable pour un séchage d'une grande quantité de poudre.

9. PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS :

La prochaine étape de ce projet de recherche sera une production de poudre à grande échelle, le test de l'effet de cette combinaison sur des bactéries pathogènes comme *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, etc. Et par la suite un test direct sur les animaux.

Parmi les principales recommandations que nous pouvons déduire à la fin de ces travaux de maîtrise :

1. Étude de la stabilité de la formulation (jusqu'à 12 mois).
2. Formulation mixte avec d'autres enzymes comme la lipase, la protéase et l'amylase.
3. Étude en ferme des effets de cette formulation sur les volailles (gain de poids, indicateur de croissance, système digestif...).

10. RÉFÉRENCE :

Abdel-Fattah, S., et al. (2008). "Thyroid activity, some blood constituents, organs morphology and performance of broiler chicks fed supplemental organic acids." Int. J. Poult. Sci **7**(3): 215-222.

Alloui, M. N., et al. (2013). "The Usefulness of Prebiotics and Probiotics in Modern Poultry Nutrition: a Review/Przydatność prebiotyków i probiotyków w nowoczesnym żywieniu drobiu–przegląd." Annals of Animal Science **13**(1): 17-32.

Awad, W., et al. (2009). "Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens." Poultry Science **88**(1): 49-56.

Bedford, M. (2000). "Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems." World's Poultry Science Journal **56**(04): 347-365.

Bekatorou, A., et al. (2006). "Production of food grade yeasts." Food Technology and Biotechnology **44**(3): 407-415.

Botsoglou, N. A., et al. (1997). "Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk." Journal of agricultural and food chemistry **45**(10): 3711-3716.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical biochemistry **72**(1-2): 248-254.

Brenes, A. and E. Roura (2010). "Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action." Animal Feed Science and Technology **158**(1): 1-14.

Brijwani, K., et al. (2010). "Fungal laccases: production, function, and applications in food processing." Enzyme Research **2010**.

Cani, P. D. and N. M. Delzenne (2009). "The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease." Current pharmaceutical design **15**(13): 1546-1558.

Choi, M. H. and Y. H. Park (2003). "Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage." Biomass and Bioenergy **25**(2): 221-226.

Collins, M. D. and G. R. Gibson (1999). "Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut." The American journal of clinical nutrition **69**(5): 1052s-1057s.

Dhillon, G. S., et al. (2013). "Screening of agro-industrial wastes for citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* NRRL 2001 through solid state fermentation." Journal of the Science of Food and Agriculture **93**(7): 1560-1567.

Dhillon, G. S., et al. (2011). "Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*." Biochemical Engineering Journal **54**(2): 83-92.

Donoghue, D. J. (2003). "Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns?" Poultry Science **82**(4): 618-621.

Eswaranandam, S., et al. (2004). "Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Salmonella gaminara*." Journal of Food Science **69**(3): FMS79-FMS84.

Fallah, R. (2013). "A review of the role of five kinds of alternatives to in-feed antibiotics in broiler production."

Fallah, R., et al. (2013). "A review of the role of five kinds of alternatives to in-feed antibiotics in broiler production." Journal of Veterinary Medicine and Animal Health **5**(11): 317-321.

Ferket, P. R. (1993). "Practical use of feed enzymes for turkeys and broilers." The Journal of Applied Poultry Research **2**(1): 75-81.

Ferket, P. R. (2004). Alternatives to antibiotics in poultry production: responses, practical experience and recommendations. Alltech's Annual Symposium.

Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. Probiotics, Springer: 1-8.

Gaggia, F., et al. (2010). "Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production." International Journal of Food Microbiology **141**: S15-S28.

Gassara, F., et al. (2010). "Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*." Biochemical Engineering Journal **49**(3): 388-394.

Gharsallaoui, A., et al. (2007). "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview." Food Research International **40**(9): 1107-1121.

Gibson, G. R., et al. (2004). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics." Nutr Res Rev **17**(2): 259-275.

Griggs, J. P. and J. P. Jacob (2005). "Alternatives to Antibiotics for Organic Poultry Production." The Journal of Applied Poultry Research **14**(4): 750-756.

Hajati, H. and M. Rezaei (2010). "The application of prebiotics in poultry production." International Journal of Poultry Science **9**(3): 298-304.

Hume, M. (2011). "Food safety symposium: potential impact of reduced antibiotic use and the roles of prebiotics, probiotics, and other alternatives in antibiotic-free broiler production." Poultry Science **90**: 2663-2669.

- Joerger, R. (2003). "Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages." Poultry Science **82**(4): 640-647.
- Kurniawati, S. and J. A. Nicell (2008). "Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol." Bioresource Technology **99**(16): 7825-7834.
- Liong, M. and N. Shah (2006). "Effects of a *Lactobacillus casei* synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats." Journal of dairy science **89**(5): 1390-1399.
- Lorenzo, M., et al. (2002). "Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*." Bioresource Technology **82**(2): 109-113.
- Madhavi, V. and S. Lele (2009). "Laccase: properties and applications." BioResources **4**(4): 1694-1717.
- Madrera, R. R., et al. (2013). "Production of spirits from dry apple pomace and selected yeasts." Food and Bioproducts Processing **91**(4): 623-631.
- Marier, J. and M. Boulet (1958). "Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method." Journal of dairy science **41**(12): 1683-1692.
- Mohnl, M., et al. (2007). Effect of synbiotic feed additive in comparison to antibiotic growth promoter on performance and health status of broilers. Journal of dairy science, AMER DAIRY SCIENCE ASSOC 1111 N DUNLAP AVE, SAVOY, IL 61874 USA.
- Patelski, P., et al. (2015). "Utilisation of sugar beet bagasse for the biosynthesis of yeast SCP." Journal of Food Engineering **167**: 32-37.
- Patterson, J. and K. Burkholder (2003). "Application of prebiotics and probiotics in poultry production." Poultry Science **82**(4): 627-631.
- Sabiiti, W., et al. (2014). "Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis." The Journal of clinical investigation **124**(5): 2000-2008.
- Schrezenmeir, J. and M. de Vrese (2001). "Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition." The American journal of clinical nutrition **73**(2): 361s-364s.
- Schwarz, S., et al. (2001). "Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production." International Journal of Antimicrobial Agents **17**(6): 431-437.
- Sekirov, I., et al. (2010). "Gut microbiota in health and disease." Physiological reviews **90**(3): 859-904.

Sharma, S., et al. (2011). "Bioactive peptides: a review." Int J Bioautomation **15**(4): 223-250.

Taylor, P. W. (2013). "Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents." International Journal of Antimicrobial Agents **42**(3): 195-201.

Taylor, P. W. (2013). "Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents."

Toghyani, M., et al. (2013). "Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter." African Journal of Biotechnology **9**(40): 6819-6825.

Wang, Y., et al. (1996). "Melanin, melanin" ghosts," and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*." Infection and immunity **64**(7): 2420-2424.

Yang, Y., et al. (2009). "Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics." World's Poultry Science Journal **65**(01): 97-114.

Zhang, G., et al. (2006). Efficiency of probiotics, prebiotics and synbiotics on weight increase of chickens (*Gallus Domesticus*).

Monographie de l'industrie de la volaille au Québec, réalisée par le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec en février 2011, disponible sur : <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Volaille.pdf>

Statistiques 2012, FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture), disponible sur : http://www.fao.org/ag/againfo/themes/fr/meat/backgr_sources.html

CHAPITRE 2 : ARTICLE DE RECHERCHE

UN SUPPLÉMENT ALIMENTAIRE CONTENANT LA LACCASE ET L'ACIDE CITRIQUE COMME ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES UTILISÉS DANS L'ÉLEVAGE DE VOLAILLES – DÉCLENCHEUR *IN VITRO* DE LA PRODUCTION DE LA MÉLANINE

Cet article a dû être retiré de la version électronique en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

**SUPPLEMENT COMPRISING LACCASE AND CITRIC ACID AS AN
ALTERNATIVE FOR ANTIBIOTIC IN POULTRY FARMING – *IN
VITRO* TRIGGERS OF MELANIN PRODUCTION**

Mona Chaali¹, Joanna Lecka¹, Leticia Hernandez-Galan¹, Alberto Castaneda Yanez¹,
Satinder Kaur Brar^{1*}, Antonio Avalos Ramirez², and Younes Chorfi³

¹Institut national de la recherche scientifique Centre - Eau Terre Environnement; 490 de
la Couronne; Québec (Qc); G1K 9A9, Canada

²Centre National en Électrochimie et en Technologie Environnementales; 2263 Avenue
du Collège, Shawinigan, QC G9N 6V8, Canada

³Université du Québec à Montréal; 405 Rue Sainte-Catherine Est, Montréal,
QC H2L 2C4, Canada

World Journal of Microbiology and Biotechnology