



UNIVERSITÉ DES SCIENCES AGRICOLES ET MÉDECINE
VÉTÉRINAIRE DE
BUCAREST



FACULTÉ DE BIOTECHNOLOGIES

THÈSE DE DOCTORAT

**SYSTÈMES BIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUE DE
DÉGRADATION DES PRODUITS EN CUIR NATUREL**

Doctorant: DUMITRU MIOARA ANCUȚA

**Coordinateur scientifique:
*Prof. Univ. Dr. Ing. Ștefana JURCOANE***

**BUCAREST
2019**

RÉSUMÉ

SYSTÈMES BIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUE DE DÉGRADATION DES PRODUITS EN CUIR NATUREL

Coordinateur scientifique: Prof. Univ. Dr. Ing Ștefana JURCOANE

Doctorant: DUMITRU Mioara Ancuța

Mots-clés: *système biologique, dégradation naturelle des fourrures, protéinase, collagenase, kératine, lipase, carbone organique, biofertilisateur, agriculture biologique, déchets de fourrure naturels, identification de micro-organismes, hydrolyse enzymatique, biodégradation.*

L'industrie du cuir produit chaque année des tonnes de déchets considérés comme extrêmement dommageables pour l'environnement. Les restes solides générés par l'industrie du cuir contiennent comme élément de base la protéine, mais en raison des substances utilisées dans le traitement, ils deviennent très difficiles à pourrir, restant comme déchets ou incinérant produisant aussi la pollution de l'environnement ambiant.

Aujourd'hui, le secteur de la biotechnologie nous permet d'utiliser ces déchets comme substrat microbien pour la production d'enzymes. Les enzymes obtenues peuvent avoir des utilisations multiples et peuvent couvrir divers besoins industriels. La peau étant un matériau à base de carbone organique, riche en protéines peut être utilisé pour améliorer le sol dans l'azote et les substances minérales, ce qui peut conduire à une bonne croissance et le développement des cultures dans l'agriculture biologique.

Le but de la recherche était d'obtenir une préparation enzymatique utilisée pour la dégradation des agresseurs naturels.

Les objectifs de recherche étaient les:

L'isolement des micro-organismes avec efficacité dans la dégradation accélérée des déchets de l'industrie du cuir

Obtenir un produit enzymatique (hydrolysé) qui peut être utilisé comme biofertilisateur dans l'agriculture biologique.

Les expériences ont été menées dans des conditions de laboratoire, à la Faculté des Biotechnologies appartenant à l'Université des Sciences Agronomiques et de Médecine Vétérinaire de Bucarest.

Afin de mener des expériences de biodégradation, plusieurs types de fourrure et de cuir avec du chrome provenant de secteurs industriels ont été testés.

Des morceaux de cuir et de fourrure naturelle de moutons, bronzés au chrome, ainsi que des morceaux de cuir et de fourrure organiques, matériaux mis à disposition par l'Institut du cuir de Bucarest, ont été mis au travail.

Pour le dépistage des micro-organismes, l'isolement et la sélection ont été pris en compte par des méthodes microbiologiques courantes.

Le matériel biologique utilisé dans la biodégradation de la fourrure naturelle se composait de trois souches bactériennes qui ont été isolées à la suite de la dégradation de certains morceaux de fourrure et de cuir tanné au chrome de l'Institut du cuir de Bucarest.

La thèse est structurée en deux parties comme suit :

La première partie de la thèse comprend des données de la littérature sur le sujet de la thèse présentée est structurée en deux chapitres.

Le chapitre I présente des généralités concernant les systèmes biologiques pour la dégradation des produits en cuir, ainsi que des aspects de la composition des produits en cuir naturel. Il existe également des données sur la description détaillée des technologies de dégradation biologique des restes de fourrures naturelles appliqués à l'industriel.

Le chapitre II présente les systèmes biochimiques pour la dégradation des produits en cuir naturel ainsi que la description du système enzymatique impliqué dans la dégradation des fourrures.

La deuxième partie de la thèse consiste en les contributions initiales faites au cours de la recherche.

Le thème de la recherche a été poursuivi :

L'isolement, la sélection, la caractérisation, l'identification et l'essai de micro-organismes efficaces dans la dégradation accélérée des déchets de l'industrie du cuir;

- Expérimentation de la biodégradabilité des principaux composants des articles naturels de cuir bronzés à fourrure;

Obtenir un produit fermenté qui peut être utilisé comme biofertilisateur pour les cultures céréalières et légumineuses.

Le chapitre III contient des informations sur l'isolement et la caractérisation des souches microbiennes capables de dégrader les fourrures, les matériaux et les méthodes utilisés dans les expériences de laboratoire sur la sélection, l'identification et la culture des souches sélectionnées, ainsi que des résultats et des discussions sur l'obtention de matériel biologique et son identification.

La phase d'isolement des micro-organismes a été réalisée par le compostage de fragments de cuir et de fourrure bronzés avec du chrome de l'Institut du cuir de Bucarest.

Pour l'isolement et l'identification des bactéries avec l'activité protéolytique, des morceaux de fourrure avec la peau bronzée de chrome, venant de différents types d'animaux ont été laissés à compostés dans le sol avec le pH 7,2 pendant 3 mois; dans le sol de fourrure composté, un échantillon a été prélevé, à partir duquel ils ont isolé

dans une première phase 90 colonies, en appliquant des techniques microbiologiques communes.

Grâce à la culture de colonies isolées, dans des environnements à base de caséine il a été constaté (ce à quoi on pouvait s'attendre, compte tenu de la teneur en protéines de la fourrure), qu'autour des colonies isolées a été observé l'apparition d'un halo opalescent indiquant l'activité de protéase des micro-organismes isolés.

Sur la base de la taille du halo observé autour des colonies isolées, après le développement sur les environnements agatisés (contenant en caséine), trois souches microbiennes appelées: DA7, DA10, DA13, qui ont ensuite été passés et maintenus sur la jalousie agarisée et stocké à 4°C.

Les 3 souches microbiennes sélectionnées ont été identifiées avec le système BIOLOG, le système d'identification microbienne, comme étant des souches bactériennes. Après les tests, il a été conclu que les trois souches sélectionnées et identifiées sont les suivantes :

Brevundimonas diminuta (DA7),

Bacillus thuringiensis (DA10),

Bacillus cereus (DA13)

Les souches sélectionnées et identifiées ont été cultivées dans le système submergé, en vue d'obtenir une préparation enzymatique partiellement purifiée, éventuellement utilisée dans la dégradation biochimique des déchets de fourrure et de cuir de l'industrie textile; Le produit enzymatique obtenu a également été testé pour l'activité colagenazole, keratinolytic et lipolycy, étant donné la culture et la sélection des souches sur les environnements de culture contenant des morceaux de fourrure et de cuir naturel.

Après les tests, il est constaté que la meilleure activité enzymatique a été enregistrée par la souche DA10, suivie par la souche DA13, à un pH de 7,0.

Le chapitre IV de l'article comprend des expériences sur l'obtention d'une préparation enzymatique pour la biodégradation des déchets de l'industrie du cuir, les matériaux et les méthodes d'analyse et de contrôle utilisés pour déterminer les activités enzymatiques de et les résultats et les discussions sur l'optimisation des paramètres de dégradation enzymatique des produits à fourrure.

La thèse a également établi un flux pour obtenir une préparation enzymatique, en utilisant dans la fermentation les trois souches bactériennes, sélectionnées et caractérisées, au cours de la recherche effectuée dans la période doctorale.

D'après l'analyse des résultats présentés au chapitre 4, on peut conclure que la fourrure naturelle peut être utilisée comme source de carbone, avec des valeurs significatives de production d'enzymes dans le cas de souches isolées DA7, DA10, DA13 (environnement de fermentation, protéolytique, colagenolytic, kératinolytics, activités lipolytiques significatives).

Sur la base des résultats présentés dans ce chapitre, on peut conclure que:

La valeur de la concentration de fourrure naturelle déchetée et ajoutée au milieu culturel en proportion de 0,6 g% peut induire la biosynthèse des enzymes hydrolytiques, capables de dégrader les restes de fourrure et de daim avec du chrome, résultant de l'industrie textile.

Les résultats des expériences montrent que la production la plus élevée de protéase est atteinte dans le cas de la culture de souches DA10 sur le milieu minimal, à un pH 7,0, égal à 0,677 U/ml/min

Dans le même chapitre 4, l'influence de la température et du pH sur la production d'enzymes a été étudiée : collagène, kératine, lipase; les conclusions suivantes ont été tirées :

L'influence de la température sur la production de collagenase pour la souche DA7 a atteint la valeur de 0,380 U/ml, pour DA10, 0,401 U/ml, et pour DA13 la valeur était égale à 0,394 U/ml.

La température influence la production de kératine, le meilleur rendement étant à 35°C; les valeurs suivantes peuvent être observées : 0,180 U/ml pour la souche DA7, 0,248 U/ml pour la souche DA10 et 0,223 U/ml enregistre la souche DA13.

Il a été co-déclaré, que la température a également une influence sur la production de lipase. La production maximale de lipase a été obtenue avec la souche DA10 à 35°C, après une période d'incubation de 120 heures, la valeur égale à 140 U/ml

De l'étude de l'influence du pH sur l'activité de ces enzymes, on peut déterminer, à la suite des tests effectués, que le pH influence la production de lipase, avec les valeurs de 100 U/ml pour la souche DA7, 160 U/ml pour DA10 et 160 U/ml/min pour DA13 au pH neutre.

La valeur la plus élevée pour la production de kératinose est obtenue avec la souche DA10, à un pH égal à 7,0 et 120 heures d'incubation, soit 0,254 unités/ml.

Des tests de biodégradabilité de la fourrure naturelle ont été effectués; la concentration en carbone organique du milieu de culture a été déterminée après l'ajout de morceaux de fourrure et de tancation in cuir dans le milieu de culture des 3 souches.

La concentration de carbone organique est sensiblement réduite, résultant de l'activité microbienne qui a utilisé le carbone des morceaux de fourrure pour la production enzymatique; ainsi, la concentration organique de carbone a diminué de 35,68 % initialement à 24,63 % pour la souche DA7, 24,82 % pour la souche DA 10 et 25,75 % pour la souche DA13, après l'incubation 120 heures sur 24 des morceaux de fourrure naturelle dans l'environnement culturel.

L'analyse des données obtenues montre une augmentation de l'activité du complexe enzymatique proportionnelle à la période pendant laquelle les souches microbiennes ont été cultivées.

L'activité de production de kératinolytic la plus élevée par souches isolées était de 0,223 U/ml par rapport au témoin, produite par la souche DA10 dans les conditions

de culture données. Est présenté le flux de conditionnement et de caractérisation de la préparation enzymatique obtenue avec les trois souches sélectionnées dans la thèse:

Le flux d'obtention et de conditionnement de la préparation enzymatique a été établi, respectivement:

Après la phase de fermentation, la solution indigène séparée de la biomasse par centrifugation s'est concentrée 10 fois dans un rotavapor, sous vide, à une température de 35 degrés Celsius, puis utilisée en tant que telle dans les applications.

Après la concentration d'hydrolysate obtenue dans les travaux, il est conclu que la meilleure activité enzymatique a enregistré une souche DA10 comme suit: protéases 1,975 U/ml, colagenases 1,275 U/ml, kératine 0,911 U/ml et lipases 80 U/ml.

Afin d'augmenter la stabilité de la préparation enzymatique d'origine microbienne, le processus de lyophilisation a été utilisé.

Pour obtenir une préparation enzymatique solide avec la plus forte activité enzymatique, les deux méthodes ont été appliquées pour le même échantillon: le fluide de fermentation centrifuge (pour l'élimination de la biomasse) concentré 10 fois, à l'Héidolph rotavapor ensuite, le concentré obtenu a été lyophilisé.

La préparation enzymatisée d'enzyme s'est caractérisée en termes d'activité enzymatique après la redissolution dans 10 ml d'eau distillée, obtenant les valeurs suivantes: activité protéolytique (au pH à 7,0) à 19,75U/ml, activité colagenastique 12,5 U/ml, activité lipolytique 800 U/ml, activité keratinolytique 9 U/ml.

Dans le chapitre V de la thèse, des essais du concentré enzymatique liquide obtenu dans la thèse ont été lancés, en vue de sa récupération, comme biofertilisation dans l'agriculture biologique.

Les expériences ont consisté à tester le liquide de fermentation obtenu après la culture des souches sélectionnées sur les environnements culturels dans les quels des déchets de fourrure naturels et du cuir tanné au chrome ont été ajoutés; pendant la biosynthèse des enzymes il y avait une hydrolyse des morceaux déchiquetés de fourrure ayant pour résultat des acides aminés, des acides gras, des lipides, de la kératine, prouvées pour l'augmentation de la quantité de biomasse dans l'environnement et la détermination des activités enzymatiques.

Après la biosynthèse a été fait le filtrage de l'environnement de fermentation, la concentration 10 fois au rotavapor, puis en ajoutant dans des proportions différentes au sol de germination des graines de grain et de légumineuses.

L'expérience visait à établir une concentration propice au développement de plantes prises dans les travaux.

L'ajout de préparation enzymatique s'est avéré efficace dans la croissance et le développement des graminées et des cultures légumineuses.

Parmi les trois souches testées, *B. thuringiensis* s'est avéré le plus efficace aux tests in vitro en tant que biofertilisateur, ajoutant une concentration de 35% dans le sol de culture de graminées et de légumineuses.

Le milieu de fermentation obtenu par la culture de souches isolées ayant comme source unique de cuir de carbone et de fourrure naturelle de l'Institut du cuir de Bucarest, a été traité par filtration et concentration obtenant un produit microbiologiquement concentré, liquide, utilisé comme ajout biofertilisant dans les cultures légumières par *R. sativus*, *Triticum sp.* et *S. tuberosum*.

Dans le cas de la fertilisation *S. tuberosum* On observe que l'espèce a également une grande influence sur le développement en présence d'engrais.

Le chapitre VI de la thèse comprend les conclusions et les recommandations sur les orientations de recherche.

Les recherches menées dans la thèse ont prouvé la possibilité d'obtenir des produits enzymatiques capables de dégrader les déchets de la fourrure naturelle ainsi que leur récupération dans d'autres domaines, tels que l'obtention de biofertilisation pour les plantes.