

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA-1



Faculté des Sciences

Département de Chimie

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Science de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

Amélioration biotechnologique des propriétés des sauces émulsionnées par l'application des surfactants microbiens produits localement : Agents émulsifiants et bio-conservateur.

Présenté par :

DJAFAR CHERIF Maroua Elbatoul

BOUZIDA Ferial

EDDOUAOUDA Kamel	MCB	Président	Université de BLIDA1
FERRADJI Fatma Zahra	MCB	Examinatrice	Université de BLIDA1
BADIS Abdelmalek	Professeur	Promoteur	Université de BLIDA1
TARED Amina	Doctorante	Co-promotrice	Université de BLIDA1

Blida, 13 Juillet 2023

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout Puissant de nous avoir donné, la force, la patience, la volonté, le courage et la connaissance afin d'accomplir ce modeste travail.

La réalisation de ce travail a été possible grâce à l'association de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner notre gratitude.

Nous tenons à remercier notre promoteur **Mr Badis**, professeur à l'université Saad Dahleb – Blida 1, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à accomplir ce travail.

Nos sincères remerciements à la doctorante Mademoiselle **TARED Amina**, pour son soutien ses encouragements et son aide si précieuse.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

Nous souhaitons également adresser nos remerciements à tous les enseignants du département de Chimie, qui ont contribué à notre formation durant cinq années d'études.

Et Nous exprimons notre gratitude à tous les membres de laboratoire de recherche des substances naturelles et Biomolécules.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents

Ma très chère mère, **AZOUT KENZA** qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, je t'aime et je te souhaite une longue vie.

Mon cher père **BOUZIDA TOUFIK** qui n'a pas arrêté de m'encourager et de sacrifier pour que je puisse franchir tout obstacle durant mes années d'études, que dieu te garde en très bonne santé.

À mes chers frères **Réda, Fouad** pour leur appui, aide et encouragement.

À ma chère belle-sœur **ASMA** et à mon petit neveu **Rayan** pour leur présence et soutien.

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite de succès :

Chahrazed, Khadidja, Charihene, Amel, Insaf, Chaimaa, Alaeddin.

Sans oublier mon binôme **Batoul** pour le magnifique travail qu'on a fait durant cette année.

A toute la promotion de chimie des produits naturels 2023

MERCI

Feriel

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui a toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la flamme de mon cœur maman que j'adore. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

A mon point de force dans la vie mes frères Mehdi et Adlen,

A mes belles-sœurs

A ma chère sœur que la vie ma donner Noor ElHouda

A mes neuves Hadil, Ritej, Amina, Yasser, Aymen, Mohamed

Aux personnes qui m'ont encouragé de près ou de loin tout au long de mes études, mes chères copines.

A mon binôme Feriel pour l'agréable travail qu'on a fait ensemble.

A toute la promotion de chimie des produits naturels 2023.

Merci

ملخص

في هذا العمل أجرينا دراسة حول الغريلة، والإنتاج، والتوصيف والتطبيق في صناعة الأغذية لمفاعل حيوي من سلالة خميرة معزولة محلبيًا من ثمرة "رمان".

تم فحص سبع سلالات لإنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي على وسط YPG باستخدام الاختبارات التالية: اختبار الاستحلاب E24، اختبار إزاحة البترول DDP وقياس التوتر السطحي TS. أثبتت السلالة 138 فعاليتها ($E24 = 80\%$ ، $TS=30mN/m$ $DDP \leq 4.5$ cm

أظهرت السلالة 138 إنتاجية عالية جدًا من الفاعل بالسطح الحيوي ($R = 13$ جم / لتر)، وبالتالي أظهرت نشاطًا مضادًا للميكروبات ملحوظًا ضد جميع سلالات الاختبار المستخدمة (البكتيريا موجبة الجرام وسالبة الجرام وكذلك المبيضات البيضاء) (قطر التثبيط) المنطقة ما بين 25 و 21 مم) وهو أيضًا نشاط مثير للاهتمام للغاية كمضاد للأكسدة (نسبة تثبيط تبلغ 80.6%) تم وصف سلالة 138 بيولوجيًا جزئيًا على أنها جليكوليبيد بواسطة مقايسة رامنوز، وكروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)، والتحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء لتحويل فورييه (FT-IR)

نظرًا لخصائصها المثيرة للاهتمام (الاستحلاب، ومضادات الميكروبات، ومضادات الأكسدة، وتقليل التوتر السطحي)، تم تنفيذ استخدام المواد الخافضة للتوتر السطحي في صناعة المواد الغذائية من خلال تحضير صلصة المايونيز التي أثبتت خصائصها (الفيزيائية والكيميائية والمكروبيولوجية) مماثلة لتلك الخاصة بالمايونيز التجاري

الكلمات المفتاحية: مادة بيولوجية، خميرة، مستحلب، مضاد للميكروبات، مضاد للأكسدة

Abstract

In this work we have undertaken a study on the screening, production, characterization and application in the food industry of a biosurfactant from a yeast strain isolated locally from a fruit "pomegranate".

Seven strains were screened for the production of biosurfactants on YPG medium using the following tests: E24 emulsification test, DDP petroleum displacement test and TS surface tension measurement. Strain 138 proved to be efficient (E24 80%, TS = 30 mN/m, DDP \geq 4.5 cm)

Strain 138 showed a very high biosurfactant yield (R= 13 g/l), thus exhibiting remarkable antimicrobial activity against all the test strains used (gram-positive and gram-negative bacteria as well as candida albicans) (the diameter of the inhibition zone is between 25 and 21 mm) and also a very interesting antioxidant activity (an inhibition percentage of 80.6%)

Strain 138 biosurfactant was partially characterized as a glycolipid by rhamnase assay, thin layer chromatography (TLC), and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

Given their interesting properties (emulsifying, antimicrobial, antioxidant, reduction of surface tension) an application of biosurfactant in the food industry was carried out by the preparation of a mayonnaise sauce which proved characteristics (physic-chemical and microbiological) similar to those of commercial mayonnaise

Keywords: Biosurfactant, yeast, emulsifier, antimicrobial, antioxidant

Résumé

Dans ce travail nous avons entrepris une étude sur le criblage, la production, la caractérisation et l'application en agroalimentaire d'un biosurfactant issu d'une souche levurine isolée localement à partir d'un fruit « le grenade ».

7 souches ont été criblées pour la production des biosurfactants sur milieu YPG en utilisant les tests suivants : le test d'émulsification E24, le test de déplacement de pétrole DDP et la mesure de la tension de surface TS. La souche 138 s'est révélée performante (E24 > 80%, TS = 30 mN/m, DDP \geq 4,5 cm)

La souche 138 a montré un rendement de biosurfactant très élevés (R= 13 g/l), ainsi présente une activité antimicrobienne remarquable contre la totalité des souches tests utilisées (bactéries Gram positif et Gram négatif ainsi que *candida albicans*) (le diamètre de la zone inhibition est entre 25 et 21 mm) et aussi une activité anti oxydante très intéressante (un pourcentage d'inhibition de 80.6 %)

Le biosurfactant de la souche 138 a été partiellement caractérisé comme glycolipide par le test rhamnose, la chromatographie sur couche mince (CCM), et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

Vu leur propriétés intéressantes (émulsifiante, anti microbienne, antioxydante, réduction de la tension de surface) une application de biosurfactant en agroalimentaire a été réalisée par la préparation d'une sauce mayonnaise qui a prouvé des caractéristiques (physico-chimiques et microbiologique) similaires à celles de la mayonnaise commerciale

Mots clés : Biosurfactant, levure, émulsifiant, antimicrobienne, antioxydant

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

A : Absorbance

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMC : Concentration micellaire critique

DDP : Test de déplacement de pétrole

DPPH : 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl

E24 : Indice d'émulsion

FTIR : Infrarouge transformé de Fourier

g : Gramme.

HCl : Acide chlorhydrique

LB : Milieu Luria Bertani

MB : Milieu de base

ml : Millilitre

MM : Milieu minimal

Mm : Millimètre

mN/m : Mili Newton par mètre

NaCl : Chlorure de sodium

pH : Potentiel Hydrogène

rpm : Rotation par minute

T : Témoin

TS : Tension de surface (tension superficielle)

YPG : Extrait de levure, peptone, glucose

µL : Microlitre

Liste des figures

Figure 1: Structure d'un tensioactif	3
Figure 2: Structure d'un rhamnolipide.....	5
Figure 3: Structure du théhalolipide.....	5
Figure 4: Structure d'une molécule de sophorolipides	6
Figure 5: Structure d'une molécule de lipopeptide.....	6
Figure 6: Structure chimique d'un phospholipide.....	7
Figure 8: Variation de la tension interfaciale de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant	10
Figure 9: Domaines d'application des biosurfactants	14
Figure 10: Représentation schématique d'une cellule de levure.....	17
Figure 11: Représentation schématique des différents domaines d'utilisation des levures	21
Figure 12: Représentations schématiques d'une émulsion directe et inverse	22
Figure 13: Représentation schématique de différents types d'émulsions multiples	23
Figure 14: Murissement d'Ostwald	25
Figure 15: Crémage et Sédimentation	26
Figure 16: Floculation	26
Figure 17: Test de déplacement de pétrole.....	34
Figure 18: Tensiomètre	34
Figure 19: Représentation schématique des étapes d'extraction.....	37
Figure 20: Schéma de calcul d'un rapport frontal.....	40
Figure 21: Aspect macroscopique et microscopique de la souche 138	48
Figure 22: Cinétique de production du biosurfactant de la souche 138	49
Figure 23: Biosurfactant extrait par d'acétate d'éthyle-méthanol	50
Figure 24: Biosurfactants extrait par l'acétate	51
Figure 25: Résultat de pouvoir émulsifiant	51
Figure 26: Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de la concentration de biosurfactant.....	54
Figure 27: Dégradation du DPPH par le biosurfactant.....	55
Figure 28: Test Rhamnose sur le biosurfactant	56
Figure 29: Plaque CCM.....	57
Figure 30: Spectres IR de biosurfactants de la souche 138	59
Figure 31: Mayonnaise après 8 jours	60
Figure 32: Mayonnaise après 21 jours	60

Liste des tableaux

Tableau 1 : Microorganismes producteur de biosurfactant	8
Tableau 2 : Classification des levures	18
Tableau 3 : Composition des milieux testés.....	33
Tableau 4 : Microorganismes testée pour l'activité antimicrobienne.....	38
Tableau 5 : Ingrédients utilisés dans la préparation de la mayonnaise.....	43
Tableau 6 : Variation de la tension superficielle de surnageant des trois milieux	45
Tableau 7 : Résultats de la mesure de DDP dans les trois milieux	46
Tableau 8 : Indice d'émulsifiassions pour les trois milieux	46
Tableau 9 : cinétique de production du biosurfactant par la souche 138	49
Tableau 10 : Activité antimicrobienne de biosurfactant de la souche 138 extrait par l'acétate d'éthyle et le méthanol	52
Tableau 11 : Analyses physico-chimiques de la mayonnaise	61
Tableau 12 : Analyses microbiologiques de la mayonnaise	62

Tableau de matière

Remerciement

Dédicace

ملخص

Abstract

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	3
1 Biosurfactants.....	3
1.1 Généralité sur les surfactants	3
1.2 Définition des biosurfactants	4
1.3 Classification	4
1.3.1 Selon la structure	4
1.3.1.1 Les glycolipides	4
1.3.1.2 Les lipopeptides et lipoprotéines	6
1.3.1.3 Les phospholipides	7
1.3.1.4 Lipopolysaccharides ou polymériques	7
1.3.1.5 Les lipides neutres	7
1.3.2 Selon le poids moléculaire	7
1.3.2.1 Biosurfactants à poids moléculaire faible :.....	7
1.3.2.2 Biosurfactants à poids moléculaire élevé	7
1.4 Microorganismes producteurs	8
1.5 Propriétés physico-chimiques des biosurfactants	9

1.5.1	Activité à l'interface (et à la surface)	9
1.5.2	Concentration micellaire critique CMC	9
1.5.3	Emulsification	10
1.5.4	Biodégradabilité	11
1.5.5	Faible toxicité	11
1.5.6	Tolérance aux conditions extrêmes de température, pH et de salinité	11
1.6	Production de biosurfactants	11
1.7	Paramètres influençant la production	12
1.7.1	Influence de la source de carbone	12
1.7.2	Influence de l'azote	12
1.7.3	Conditions de culture	13
1.7.3.1	Influence du pH	13
1.7.3.2	Influence des sels minéraux	13
1.7.3.3	Influence de l'oxygène	13
1.7.3.4	Influence de la vitesse d'agitation	13
1.8	Avantage des biosurfactants	13
1.9	Application de biosurfactants	13
1.10	Application de biosurfactants dans le domaine alimentaire	14
1.10.1	Agents antimicrobiens	14
1.10.2	Agents émulsifiants	15
2	Les levures	16
2.1	Définition	16
2.2	Structure	16
2.3	Classification	17
2.4	Reproduction	19
2.4.1	Reproduction asexuée	19
2.4.1.1	Reproduction asexuée par bourgeonnement	19

2.4.1.2	Reproduction asexuée par scission-scissiparité	19
2.4.2	Reproduction sexuée	19
2.5	Intérêt en biotechnologie	20
3	Les Sauces émulsionnée.....	22
3.1	Les émulsions	22
3.1.1	Définition	22
3.1.2	Les types d'émulsions	22
3.1.3	Les émulsions simples.....	22
3.1.3.1	Sens de l'émulsion.....	22
3.1.3.2	Les émulsions multiples	23
3.1.4	Propriétés idéales.....	23
3.1.5	Phénomènes de déstabilisation d'une émulsion	24
3.1.5.1	Déstabilisation chimique	24
3.1.5.2	Déstabilisation biologique	24
3.1.5.3	Déstabilisation physique.....	24
3.1.6	Les bioémulsifiants	26
3.1.7	Mode d'action d'un surfactant/émulsifiant.....	27
3.2	Application en agro-alimentaire	28
3.2.1	La mayonnaise.....	28
	Chapitre II : MATERIEL ET METHODES.....	31
1.	Isolement des levures.....	31
1.1.	Milieux d'isolement	31
1.2.	Ensemencement	32
1.3.	Purification.....	32
1.4.	Conservation	32
2.	Criblage des souches productrices des biosurfactants	32
3.	Optimisation du milieu de production de biosurfactant	32

3.1. Test d'émulsification E24	33
3.2. Test de déplacement de pétrole DDP	33
3.3. Mesure de la tension superficielle.....	34
4. Production de biosurfactants	35
5. Cinétique de production du biosurfactant.....	35
6. Extraction du biosurfactant.....	36
7. Caractérisation du biosurfactant produit.....	38
7.1 Pouvoir émulsifiant	38
7.2 Pouvoir anti microbien.....	38
7.3 Activité antioxydante in vitro du biosurfactant	39
7.4. Test rhamnose	39
7.5. Analyse par CCM	40
7.6. Analyse par FTIR.....	41
8. Application en agro-alimentaire	41
Chapitre III : Résultats et discussion	44
1. Isolement des levures productrices de biosurfactants.....	44
2. Optimisation du milieu de production de biosurfactant	45
3. Cinétique de la production des biosurfactants	48
4. Extraction du biosurfactant.....	50
5. Caractérisation du biosurfactant	51
5.1. Pouvoir émulsifiant	51
5.2. Activité antimicrobienne des biosurfactants	52
5.3 Activité antioxydante	54
5.4. Test rhamnose	55
5.5. Analyse par CCM	56
5.6. Analyse par FTIR.....	57
6. Application en agroalimentaire	59

Conclusion générale	63
Références bibliographiques	65
Annexe	76

Introduction générale

Les surfactants (surface-active agent) sont étroitement associés à l'homme depuis longtemps, et ils continuent d'être une nécessité dans nos vies jusqu'à présent. A cause de leurs propriétés très variées (solubilisant, dispersante, détergente, émulsifiante, moussante, épaississante, stabilisante, ...), les surfactants sont très utilisés dans différents domaines tels que : détergence, alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, médical, agriculture, textile, peinture, papier, mobilisation le pétrole dans les puits de pétrole, environnemental, etc. La production mondiale des surfactants est estimée à 39,4 milliards USD en 2020 et devrait passer de 43,5 milliards de dollars en 2022 à 57,8 milliards de dollars d'ici 2028 avec un taux d'augmentation de 4.9% [1].

Cependant, la plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [2]. De ce fait, depuis plusieurs années et grâce à l'essor de la biotechnologie, la production des tensioactifs produits par les microorganismes, appelés biosurfactants, suscite un grand intérêt par les scientifiques et les industries. Ceci est dû principalement aux avantages présentés par ces biomolécules par rapport à leurs homologues chimiques, à savoir la biodégradabilité, la faible toxicité, l'efficacité dans des conditions extrêmes (pH, température et salinité) et la production en présence des ressources renouvelables [3]. La plupart des biosurfactants sont des agents extracellulaires. Ils sont excrétés par les microorganismes en croissance dans le milieu de culture à la suite de leur biosynthèse [5].

Les biosurfactants sont un groupe hétérogène de molécules amphiphiles produits généralement par des organismes vivants à savoir les bactéries, les champignons et les levures [4]. En raison de leurs propriétés très variées (antimicrobien, antioxydante, émulsifiante, moussantes, mouillantes, dispersantes, antiadhésif, anti biofilm...), les biosurfactants ont un large éventail des applications biotechnologiques dans diverses industries : pétrolière, alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, détergence, textile, peinture, mines et en nanotechnologie. Ainsi dans le domaine environnemental (remédiation des sites contaminés par les hydrocarbures) [6, 7].

Dans le secteur alimentaire, les produits formulés notamment à base aqueuse sont constamment exposés à des facteurs environnementaux tels que l'humidité, la température, le pH, l'oxygéné ou encore les microorganismes qui représentent des sources de contaminations ces derrières peuvent affecter la qualité des aliments et conduire à une détérioration anticipée et par

conséquent à une durée limitée de leur conservation et de leur utilisation. Les biosurfactants/bio-émulsifiants utilisés comme conservateurs sont donc des additifs essentiels dans la composition de la plupart des formulations alimentaires [45]. Les levures constituent un groupe important de microorganismes suscitant un intérêt grandissant de la part des scientifiques et des différents acteurs des secteurs bioalimentaire et médical [7]. Une grande variété de levures productrices des biosurfactants ont été recensées, elles appartiennent principalement aux genres suivants : *candida*, *yarrowia*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* et *trichosporon* [8,10].

L'objectif de ce présent travail est d'étudier la capacité des différentes souches de levure isolées localement à produire des biosurfactants et de caractériser le biosurfactant issu de la souche performante en vue d'une application en agroalimentaire.

Ce travail s'articule autour de trois parties :

- La première partie est une étude bibliographique pour consolider les connaissances de base et le contexte de recherche. A cet effet, de nombreux points ont été abordés : surfactants, biosurfactants, Levures, émulsions
- La deuxième partie les principaux matériels et méthodes utilisés pour réaliser les expériences : criblage des souches levuriennes productrices de biosurfactants, optimisation de milieu de culture, production de biosurfactant, récupération et caractérisation de biosurfactant et son application dans le secteur alimentaire.
- La troisième partie présentera les résultats obtenus ainsi que les interprétations et discussions.

Enfin, en terminera par une conclusion générale.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1 Biosurfactants

1.1 Généralité sur les surfactants

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles capables de s'accumuler à l'interface entre deux phases non miscibles comme l'huile et l'eau, tout en réduisant la tension de surface, et par conséquent, ils permettent à celles-ci de se mélanger et de s'interagir plus facilement [2, 11, 12].

Les surfactants sont classés en quatre types selon la nature et la charge de leur portion hydrophile: les cationiques qui possèdent une charge positive, les anioniques agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels libérant une charge négative (anion) en solution aqueuse et possèdent une tendance hydrophile plus marquée ; les non ioniques sans charge ou l'hydrophilie est apportée par des groupements fonctionnels non chargés de nature alcool, éther, ester ou amide et contenant des hétéroatomes tels que l'azote ou l'oxygène et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique, ils se comportent comme un surfactant anionique ou cationique suivant le pH du milieu où ils se trouvent [4, 13].

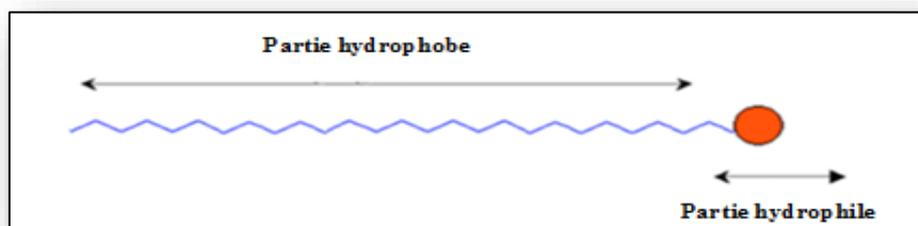


Figure 1: Structure d'un tensioactif

La production mondiale des surfactants est estimée à 39,4 milliards USD en 2020 et devrait passer de 43,5 milliards de dollars en 2022 à 57,8 milliards de dollars d'ici 2028 avec un taux d'augmentation de 4.9% [1].

Cependant, les surfactants d'origine chimique présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables c'est pourquoi, depuis plusieurs années, les scientifiques se sont intéressés aux surfactants produits par des organismes vivants, spécialement les microorganismes, appelés biosurfactants.

1.2 Définition des biosurfactants

Les biosurfactants sont constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di), le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés [14].

Les biosurfactants sont des surfactants naturels synthétisés par des plantes (par exemple, la saponine), les animaux (par exemple, les phospholipides, surfactants pulmonaires et les sels biliaires) et les microorganismes (par exemple : les glycolipides). Les biosurfactants dérivés de microbes présentent des propriétés tensioactives car ils diminuent la tension superficielle et ont un fort pouvoir émulsifiant [15].

1.3 Classification

Contrairement aux tensioactifs chimiques, qui sont classés selon leur structure de dissociation dans l'eau (cationique, anionique, non ionique et amphotères), les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, poids moléculaire.

1.3.1 Selon la structure

On distingue Cinq grandes classes de biosurfactants : Les glycolipides, Les lipopeptides et lipoprotéines, Les phospholipides, Les lipopolysaccharides ou polymériques, Les lipides neutres.

1.3.1.1 Les glycolipides

Ils sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxy aliphatiques. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides [16,17].

- **Les rhamnolipids** : Sont des biosurfactants dans lesquels une ou deux molécules de rhamnose sont liées à une ou deux molécules d'acide β -hydroxydécanoïque, se sont les biosurfactants les plus étudiés [14].

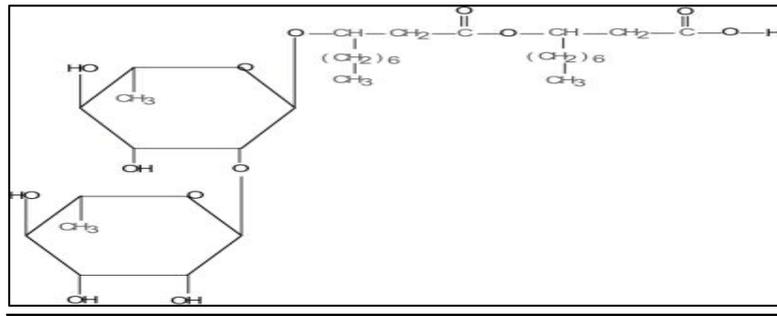


Figure 2:Structure d'un rhamnolipide

- **Les tréhalolipides :** Sont de nature non ioniques ou anioniques, et sont composées d'un disaccaride de tréhalose liées au niveau de C-6 et C-6' à une longue chaine d'acide gras par une liaison ester dans lesquels il y a l'acide mycolique. L'acide mycolique est souvent trouvé comme parti des glycolipides de la paroi des *Mycobacterium*, *Nocardia*, et *Cornyebacter*. Les tréhalolipides synthétisées par les différents microorganismes se différent par sa taille et la structure de l'acide mycolique, le nombre de carbones, et le degré de l'insaturation [14].

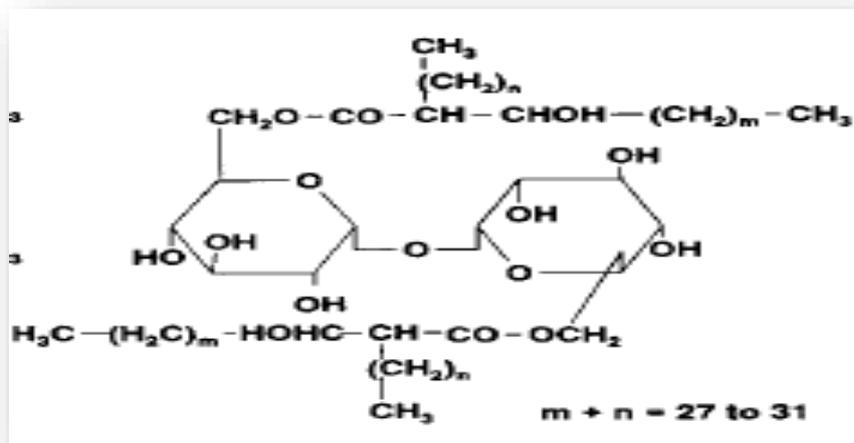


Figure 3:Structure du théhalolipide

- **Les sophorolipides**

Qui sont produites principalement par les levures comme *Torulopsisbombicola*, *T. petrophilum* et *T. apicola*, elles consistent en la liaison de deux molécules de sophorose à une longue chaîne d'acide gras [6].

Généralement, les sophorolipides sont produits par un mélange de macrolactones et d'acides. La nature des acides gras dans les sophorolipides se varie selon le type du substrat organique hydrophobe utilisé par la levure lors de leur croissance.

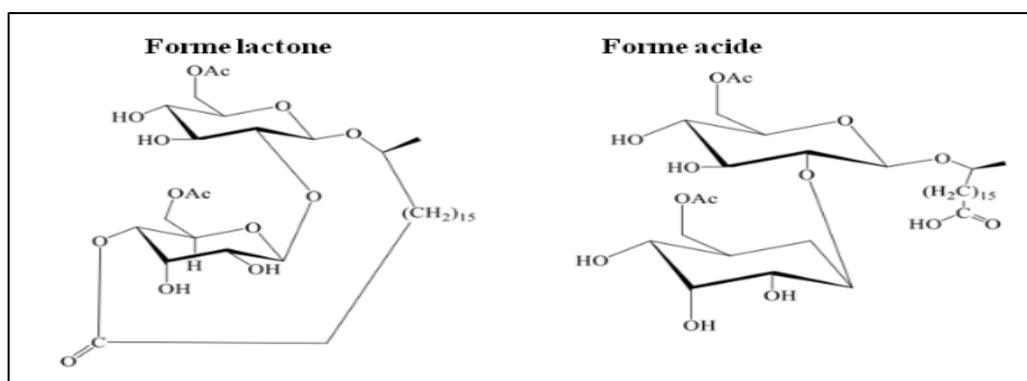


Figure 4:Structure d'une molécule de sophorolipides

1.3.1.2 Les lipopeptides et lipoprotéines

Les lipopeptides sont particulièrement intéressants en raison de leurs activités de surface élevées [18]. Et de leur potentiel antibiotique contre diverses bactéries, algues, champignons et virus. Ceux-ci consistent en un lipide attaché à une chaîne polypeptidique [19]. Parmi ces biosurfactants les plus puissants est la surfactine (lipopeptide cyclique) produit par *Bacillus subtilis*.

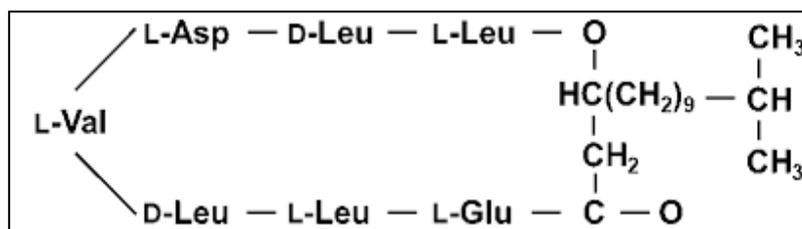


Figure 5:Structure d'une molécule de lipopeptide

1.3.1.3 Les phospholipides

Les phospholipides sont formés de groupement alcool et phosphate et de chaîne lipidique [20]. Bien qu'ils soient présents dans les émulsions dans l'huile.

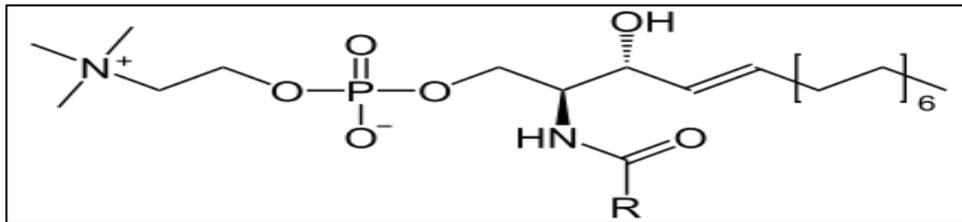


Figure 6: Structure chimique d'un phospholipide

1.3.1.4 Lipopolysaccharides ou polymériques

Les biosurfactants polymères sont des biosurfactants de haut poids moléculaire ont un squelette de trois ou quatre sucres répétés avec des acides gras attachés aux sucres. Les biosurfactants polymères les mieux étudiés sont les émulsines. L'émulsine est un émulsifiant extracellulaire soluble dans l'eau produit par les bactéries [21].

1.3.1.5 Les lipides neutres

Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités de ces tensioactifs lors de leur croissance.

1.3.2 Selon le poids moléculaire

1.3.2.1 Biosurfactants à poids moléculaire faible

Il comprend des molécules qui peuvent réduire efficacement la tension superficielle et interfaciale, tels que les glycolipides dans lesquels les glucides sont liés à un acide aliphatique à longue chaîne, lipopeptides, phospholipides.

1.3.2.2 Biosurfactants à poids moléculaire élevé

Ils sont appelés collectivement bio-émulsines ou des bio-émulsifiants qui se lient étroitement aux surfaces. Ces derniers sont des polymères amphiphiles et polyphiles qui sont généralement

plus efficaces dans les émulsions stabilisantes l'huile dans l'eau, tel que les polysaccharides, lipopolysaccharides des protéines ou lipoprotéines [22].

1.4 Microorganismes producteurs

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie [31] dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme les glucides, les huiles, les hydrocarbures et même les déchets industriels [31,10].

Cependant, la plupart des biosurfactants sont synthétisés par des microorganismes croissant sur des substrats peu hydrosolubles, principalement les alcanes linéaires.

Tableau 1: Microorganismes producteur de biosurfactant [23,41]

Biosurfactants	Microorganismes producteurs
Glycolipides	
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas sp.</i>
Tréhalolipides	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Tréhalolipides	<i>Rhodococcus sp.</i>
Sophorolipides	<i>Candida bombicola</i>
Lipopeptides, lipoprotéines	
Peptides-lipides	<i>Bacillus licheniformis</i>
Cyclopeptides	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetine	<i>Serratia marcescens</i>
Acides gras, lipides neutres et phospholipides	
Acides gras	<i>Corynebacterium lepus</i>
	<i>Candida tropicalis (mutant)</i>
Lipides neutres	<i>Nocardia erythropolis</i>
Phospholipides	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Lipopolysaccharides (Surfactants polymériques)	
Biodispersan	<i>Acinetobacter</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

1.5 Propriétés physico-chimiques des biosurfactants

De nombreuses propriétés physico-chimiques caractérisent les surfactants synthétiques ou biologiques. Les propriétés des biosurfactants par rapport à leurs homologues synthétiques rendent les plus convenables pour des applications commerciales. Ils sont caractérisés par leur activité de surface, leur biodégradabilité, leur faible toxicité et leur résistance aux conditions extrêmes du pH, température et salinité [24].

1.5.1 Activité à l'interface (et à la surface)

Une caractéristique importante d'un biosurfactant est sa capacité à réduire la tension superficielle et interfaciale. C'est une fonction essentielle des molécules amphiphiles pour la formation d'émulsions cinétiquement stabilisées. Ces molécules s'adsorbent sur les interfaces (air/liquide, liquide/liquide, solide/liquide) [25].

Un bon biosurfactant peut réduire la tension superficielle de l'eau de 72 mN/m à 35 mN/m et la tension interfaciale (tension entre liquides polaires et non polaires) d'eau et de n-hexadécane de 40 mN/m à 1 mN/m [26]. Comparés aux surfactants chimiques, les biosurfactants ont été capables de diminuer la tension interfaciale plus efficacement [27].

La surfactine est l'un des biosurfactants de surface les plus actifs. La surfactine affiche une activité de surface expressive de 72 mN/m à 27 ± 2 mN/m [28] et une tension interfaciale de $3,79 \pm 0,27$ mN/m et $0,32 \pm 0,02$ mN/m [29].

1.5.2 Concentration micellaire critique CMC

La CMC est définie comme étant la concentration minimale nécessaire pour initier la formation de micelles [30]. Avant que la CMC soit atteinte, les molécules de surfactant chimique ou biologique existent sous une forme dissoute dans la phase liquide. Une fois la CMC est dépassée, les molécules du surfactant supplémentaires formeront des micelles et la portion dissoute restera constante, tant que les conditions physico-chimiques ne varieront pas. Des changements de température, de pH ou l'ajout d'électrolytes peuvent modifier significativement la CMC [24, 31].

La CMC est un indicateur de l'efficacité d'un surfactant. Les biosurfactants efficaces ont une CMC faible. En générale, les biosurfactants sont plus efficaces et leur CMC est environ 10 à 40

fois plus faible que celle des tensioactifs chimiques, c'est-à-dire moins de surfactant est nécessaire pour obtenir une diminution maximale de la tension superficielle [13 ,31].

La tension de surface est inversement proportionnelle à la quantité de biosurfactant, des concentrations élevées de ce dernier abaissent la tension de surface jusqu'à une valeur minimale et stable, appelée concentration micellaire critique (CMC). Au-delà de la CMC, les molécules de biosurfactant s'associent en solutions aqueuses pour former des micelles à l'intérieur desquelles vont pouvoir se solubiliser une grande variété de composés insolubles dans l'eau (figure 7).

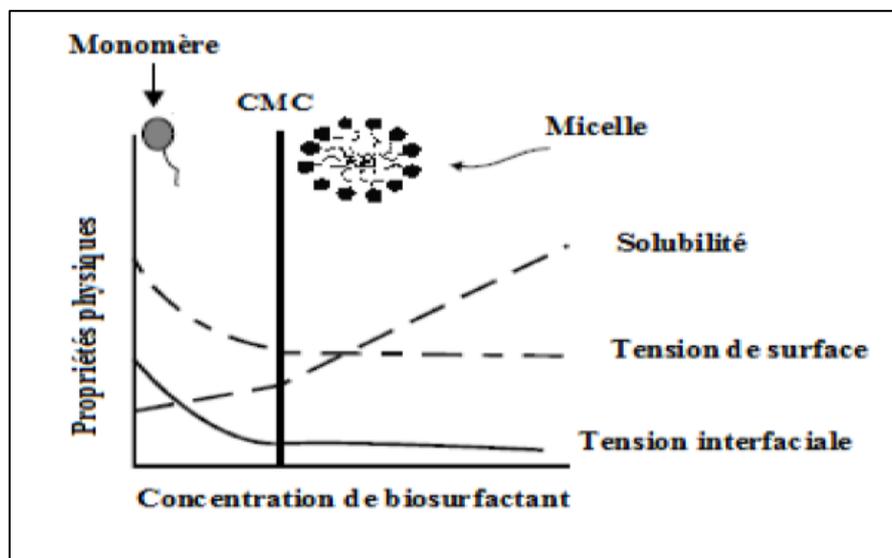


Figure 7: Variation de la tension interfaciale de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant [14]

1.5.3 Emulsification

Une émulsion est un système hétérogène constitué d'un liquide immiscible dispersé dans un autre liquide sous la forme de gouttelettes, le diamètre dont généralement dépasse 0.1 mm. Les émulsions ont une stabilité minimale. Mais, l'ajout de biosurfactants peut conduire à une émulsion qui demeure stable pendant des mois voire des années. A titre d'exemple le liposane émulsifiant synthétisé par *candida lipolytica*. A formé des émulsions stables avec des huiles comestibles pendant 3 mois [34].

1.5.4 Biodégradabilité

Contrairement aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants sont des composés facilement biodégradables et particulièrement adaptés pour des applications environnementales telles que la bioremédiation des sites contaminés [35, 36].

1.5.5 Faible toxicité

Bien que peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité des surfactants microbiens, ils sont généralement considérés comme des produits peu ou non-toxiques et par conséquent, ils sont appropriés pour des usages pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et environnementaux. Pour les espèces bactériennes, la présence de biosurfactant peut avoir un effet toxique direct. En effet, certaines espèces microbiennes produisent des biosurfactants pour leur effet antibactérien contre les autres microorganismes en perturbant ou détruisant leurs membranes [37,4, 38].

Pour cela, des études ont été réalisées sur la toxicité des biosurfactants. Un biosurfactant produit par une souche de *Candida lipolytica* a été testée sur des végétaux, des bivalves et des micro-crustacés. Aucune toxicité n'a été observée. Les graines de végétaux étaient capables de se développer même en présence de solutions très concentrées en biosurfactants [39].

1.5.6 Tolérance aux conditions extrêmes de température, pH et de salinité

Les propriétés de nombreux biosurfactants ne sont pas affectées par les facteurs environnementaux tels que la température, le pH et les taux de salinité. De nombreux biosurfactants peuvent être utilisés à des températures élevées T des valeurs de pH allant de 2 à 12. Ils tolèrent également une concentration de NaCl allant jusqu'à 30% [40]. Alors que 2 % de NaCl suffise pour inactiver les tensioactifs synthétiques [41] ont rapporté que le biosurfactant produit par *candida sphaerica* a montré une grande stabilité dans une gamme de température de 5 à 120 °C, pH de 2 à 12 et des concentrations de NaCl allant jusqu'à 20% [41,42].

1.6 Production de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme

les hydrates de carbone, les huiles ou les hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries.

Un certain nombre ces micro-organismes, (les champignons, les levures et les bactéries), se nourrissent de substances immiscibles dans l'eau ; Produisant et utilisant une substance tensioactive (biosurfactant). Parmi les bactéries, le genre *Pseudomonas* est connu pour sa capacité à produire de grandes quantités de glycolipides. Ces biosurfactants sont classés en tant que rhamnolipides

Candida bombicola et *Candida lipolytica* sont parmi les levures les plus étudiées pour la production de biosurfactants. Bien que de nombreuses espèces produisent des biosurfactants, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées [2].

1.7 Paramètres influençant la production

Le type et la quantité de biosurfactants produits varient avec la composition du milieu (source de carbone ou autres nutriments) et les conditions de culture (température, agitation, pH, etc.).

1.7.1 Influence de la source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres le plus important pour la production de biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. Les sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont également utilisées pour produire des biosurfactants. Cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles.

1.7.2 Influence de l'azote

Selon le microorganisme producteur de biosurfactant, la source d'azote peut être apportée sous différentes formes (minérale ou organique). Pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biosurfactant [43]. En outre, dans de nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitante. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices [14].

1.7.3 Conditions de culture

1.7.3.1 Influence du pH

Le pH qui est un facteur très important et qui est plus ou moins relatif à la production, c'est à dire une valeur supérieure ou inférieure à celle optimal influence la production.

1.7.3.2 Influence des sels minéraux

Il semblerait qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production.

1.7.3.3 Influence de l'oxygène

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance [43]

1.7.3.4 Influence de la vitesse d'agitation

Les milieux de culture sont agités lors de la production de biosurfactant. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures [2].

1.8 Avantage des biosurfactants

En plus de leurs propriétés citées précédemment (biodégradabilité, la non-toxicité, efficaces dans des conditions extrêmes), les biosurfactants peuvent être produits à partir des déchets industriels (effluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon) en diminuant leur effet polluant et conduisant à une réduction du cout de production. Également, ils sont aussi biocompatibles et digestibles qui permettent leurs applications dans les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et les additifs alimentaires fonctionnels [44].

1.9 Application de biosurfactants

Les applications potentielles des biosurfactants sont : l'émulsion, la séparation de phases, la mouillabilité, la formation de mousses, la solubilisation, l'inhibition de la corrosion, la

diminution de la viscosité. En outre, ils possèdent des propriétés antimicrobiennes, anti tumeur et antimycoplasique. Ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines [14,45].

- ✓ **Biotechnologie industrielle** : cosmétiques, peintures, pharmaceutique, médecine, pétrochimie, transformation alimentaire, industrie textile, solubilisation des produits agrochimiques, agroalimentaires, nettoyants ménagers, produits de l'agriculture et récupération assistée de pétrole.
- ✓ **Biotechnologie environnementale** : la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures et la dispersion des nappes de pétrole

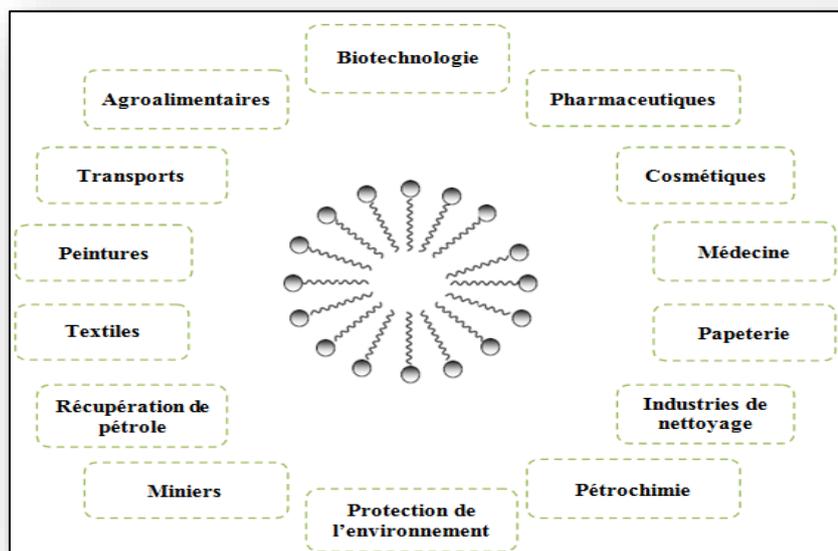


Figure 8: Domaines d'application des biosurfactants

1.10 Application de biosurfactants dans le domaine alimentaire

Les biosurfactants peuvent être utilisés comme des ingrédients polyvalents montrant des activités émulsifiantes, antiadhésive et antimicrobienne simultanée appropriée pour de multiples applications alimentaires

1.10.1 Agents antimicrobiens

L'utilisation de biosurfactants comme additifs alimentaires s'inscrit dans l'intérêt croissant des consommateurs pour les aliments naturels, biologiques et végétales nécessitant le

développement de biomolécules aux propriétés technologiques capables de réduire voire de supprimer l'utilisation de tensioactifs synthétiques [46, 47, 48].

Un biosurfactant glycolipidique produit par la levure *wickerhamomycesanomalus* CCMA0358 cultivée dans un milieu contenant du glucose (1 g/L) et de l'huile d'olive (20 g/L) comme sources de carbone a présenté une activité antimicrobienne lorsqu'il est appliqué à la concentration maximale de 2.6 mg/ml, le biosurfactant a présenté une activité antimicrobienne contre les agents pathogènes *candida albicans*, *staphylococcus epidermidis* et *streptococcus agalactiae*, avec des taux d'inhibition de 78%, 66%, 100%, respectivement [49].

Les rhamnolipides ont une activité antimicrobienne. Des auteurs ont montré que ces biosurfactants sont des agents bactériostatiques très efficaces contre *Listeria monocytogenes*, lié à la contamination alimentaire. Ces molécules ont montré un effet synergique lorsqu'il est combiné avec la Nisine, une bactériocine à large spectre.

La surfactine s'est avérée capable de réduire l'adhérence bactérienne à des surfaces de polystyrène plus efficaces que le Laury sulfate de sodium, tensio-actif chimique. En outre, les rhamnolipides purifiée, inhibent pratiquement 100% de la croissance de la souche *L. monocytogenes* adhérente [50]. Les lipopeptides sont particulièrement intéressants à raison de leurs activités de surface élevées et le potentiel antibiotique. Ces biosurfactants jouent des rôles antibiotiques, antiviraux et antis tumoraux, aussi comme les immunomodulateurs et les inhibiteurs de toxines et des enzymes spécifiques. La Surfactine, un lipopeptide cyclique, est connue pour être active dans plusieurs activités biologiques, telles que l'induction de la formation des canaux ioniques, un antiviral et antitumoral, un agent anti-inflammatoire. En outre, la surfactine présente une activité de réduction de la colonisation des bactéries pathogènes, tels que *L. monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii* et *Salmonella enteritidis*, lorsqu'il est appliqué à des surfaces solides avant l'infection [51].

1.10.2 Agents émulsifiants

Les biosurfactants peuvent stabiliser (émulsifiants) ou déstabiliser (dés émulsifiants) l'émulsion. Les biosurfactants de masse moléculaire élevée, appelés bioémulsifiants, sont en générale de meilleurs émulsifiants que les biosurfactants de faible masse moléculaire. Quelques fonctions des bio-émulsifiants dans l'industrie alimentaire comprennent : réaction de l'amidon, création d'interactions avec les protéines, création de mousse, correction de l'adhérence,

modifier la dispersion des liquides dans un autre liquide afin de formuler des solutions claires [44].

2 Les levures

2.1 Définition

Les levures sont des champignons unicellulaires immobiles présentant une structure cellulaire eucaryote, en effet leurs cellules possèdent toutes les caractéristiques des eucaryotes mais se différencient des cellules végétales ou animales par leur petite taille [52].

Il existe plus de 1500 espèces de levures alimentaires commensales ou pathogènes notamment pour le genre *candida* [53]. Sur milieux gélosés, les levures forment habituellement des colonies à surface luisantes dont la couleur est généralement crème à brunâtre et parfois rosâtre [54, 52]. Elles sont dépourvues de chlorophylles, se nourrissent par absorption et se reproduisent de façon sexuée et/ou asexuée [55]

2.2 Structure

La cellule levurienne possède une paroi épaisse de 15 à 230 nm et rigide, en plus de conférer à la cellule sa forme caractéristique et sa rigidité la paroi assure une protection physique externe et rend la cellule complètement perméable à l'eau, aux sels minéraux et aux petites molécules, elle contient aussi un noyau entouré d'une membrane nucléaire, le nombre de chromosomes varie selon les espèces un cytoplasme contenant divers organites et inclusions dont des mitochondries et une grande vacuole [56]

Chez certaines levures, on note l'existence d'une capsule constituée de phosphomannanes solubles dans l'eau (*Hansenula, pichia*), demannanes plus ou moins ramifiés (*Rhodotorula*) ou d'hétéropolysaccharides (*cryptococcus*) [52]. Lorsqu'elle vieillit, la paroi se ride, s'épaissit tandis que le cytoplasme devient granuleux [57].

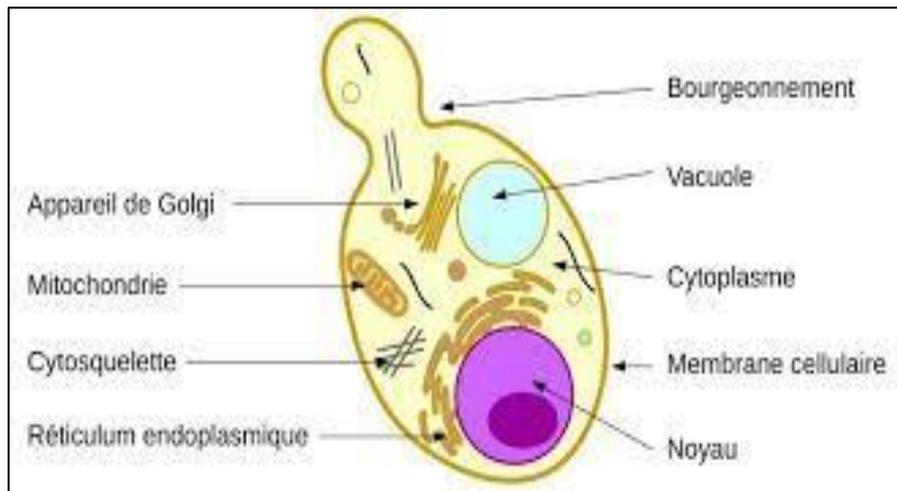


Figure 9: Représentation schématique d'une cellule de levure

2.3 Classification

La classification des levures est récapitulée dans le tableau

La classification de référence pour les levures est celle de [58] qui présente des changements importants par rapport à la classification de Lodder. Des nouveaux critères taxonomiques (composition en bases azoté de ADN, structure de la paroi et type de coenzyme) sont pris en compte. Par conséquent, les levures se divisent en 3 grandes classes (tableau 2) : Les ascomycètes, les basidiomycètes et les deutéromycètes (ou levures imparfaites).

Tableau 2 : Classification des levures [58]

Ascomycètes	Basidiomycètes	Deutéromycètes
<p>Sacchromycetaceae</p> <p>1.schizosaccharomycetoida</p> <p><i>Schizosacchomyces</i></p> <p>2.sacchromycetoidea</p> <p><i>Ambrosiozyma</i></p> <p><i>Arthroascus</i></p> <p><i>Arxiozyma</i></p> <p><i>Citeromyces</i></p> <p><i>Clavispora</i></p> <p><i>Cyniclomyces</i></p> <p><i>Debaryomyces</i></p> <p><i>Dekkera</i></p> <p><i>Guilliermonedella</i></p> <p><i>Hansenulla</i></p> <p><i>Issatchenkia</i></p> <p><i>Kluyveromyces</i></p> <p><i>Pachysolen</i></p> <p><i>Pachytichospora</i></p> <p><i>Pichia</i></p> <p><i>Sacchromyces</i></p> <p><i>Saccharomycopsis</i></p> <p><i>Schwanniiomyces</i></p> <p><i>Sporopachydermia</i></p> <p><i>Stephanoascus</i></p> <p><i>Torulaspora</i></p> <p><i>Wickerhamiella</i></p> <p><i>Wingea</i></p> <p><i>Yarrowia</i></p>	<p>Levures formant des teliospores</p> <p><i>Leucosporidium</i></p> <p><i>Rhodosporidium</i></p> <p><i>Sporidiobolus</i></p> <p>Filobasiaceae</p> <p><i>Filobasidiella</i></p> <p><i>Filobasidium</i></p> <p>Levures non classées</p> <p><i>Sterigmatosporidium</i></p>	<p>Sporobolomycetaceae</p> <p><i>Bullera</i></p> <p><i>Sporobolomyces</i></p> <p>Cryptococcaceae</p> <p><i>Aciculoconidium</i></p> <p><i>Brettanomyces</i></p> <p><i>Candida</i></p> <p><i>Cryptococcus</i></p> <p><i>Eenielle</i></p> <p><i>Fellomyces</i></p> <p><i>Kloeckera</i></p> <p><i>Malassezia</i></p> <p><i>Oosporidium</i></p> <p><i>Phaffia</i></p> <p><i>Rhodotorula</i></p> <p><i>Schizoblastosporion</i></p> <p><i>Sterigmatomyces</i></p> <p><i>Sympodiomyces</i></p> <p><i>Trichosporon</i></p> <p><i>Trigonopsis</i></p>

2.4 Reproduction

Les levures se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexué (sporulation) en fonction des conditions favorables ou défavorables du milieu [61]. On appelle levures sporogènes celles qui se reproduisent soit de façon sexuée soit de façon asexuée suivant les conditions du milieu. A l'inverse les levures asporogènes sont celles qui se reproduisent uniquement de façon asexuée [52].

2.4.1 Reproduction asexuée

Selon l'espèce de levures, cette multiplication végétative se réalise par bourgeonnement ou par scission. Elle se fait essentiellement par bourgeonnement et rarement par scissiparité.

2.4.1.1 Reproduction asexuée par bourgeonnement

Lors d'un bourgeonnement, le noyau de la cellule mère se déplace vers la paroi, s'étire et se divise en donnant naissance à un petit bourgeon à la surface de la cellule. Celui-ci croît rapidement pour donner naissance à une cellule fille qui peut ou non se détacher de la cellule-mère et bourgeonner à son tour. La cellule fille est plus petite, elle grandit jusqu'à atteindre environ un diamètre égal aux deux tiers de la cellule mère, puis donne à son tour de nouveaux bourgeons. Dans des conditions optimales de croissance, une seule levure peut ainsi donner très rapidement des millions de cellules [59].

2.4.1.2 Reproduction asexuée par scission-scissiparité

Schizosaccharomyces est le seul genre représentatif, dans ce cas le noyau s'étire et se coupe en deux. Pendant ce temps, une séparation s'amorce au niveau de la paroi, ce qui conduit à la formation de deux cellules, d'où une multiplication très lente [2].

2.4.2 Reproduction sexuée

Lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables (températures extrêmes, absence d'éléments nutritifs ...), la levure cesse de se multiplier. La cellule diploïde de levure sporule et produit alors 4 ou 8 cellules haploïdes appelées ascospores par méiose. Le noyau subit deux divisions successives et chacun des noyaux fils s'entoure de cytoplasme et la levure mère

devient un asque .il renferme 4 à 8 ascospores qui sont à l'état de vie ralentie et qui ne répondront leur vie active que lorsque les conditions de milieu seront favorables.

De tels cycles vitaux avec une reproduction sexuée permettent des changements plus rapides du point de vue de la transmission génétique contrairement à une reproduction asexuée, ce qui aboutit à des adaptations bénéfiques tout en éliminant rapidement les mutations préjudiciables [60].

2.5 Intérêt en biotechnologie

Grace à leur métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, fermentation industrielle) et dans la production des enzymes (invertase, lactase, lipase et les amylases), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation des déchets agricoles, industriels et à la production des protéines.

Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêt médical (exemple : production déprotéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B) [2,60].

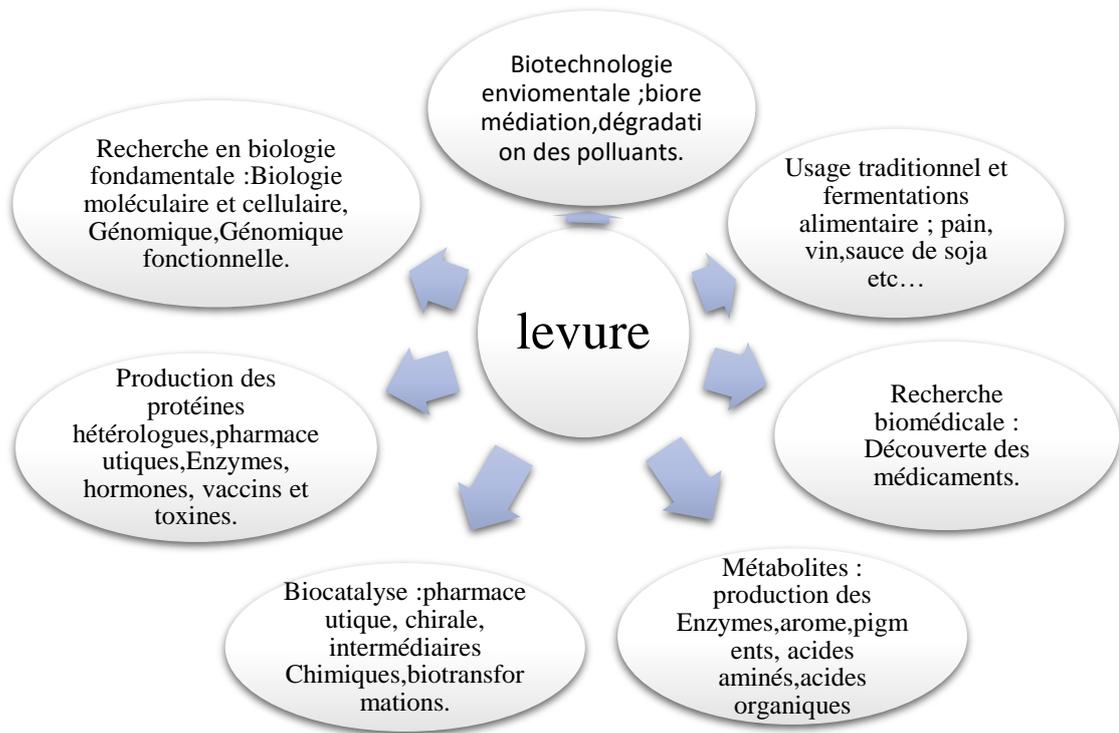


Figure 10: Représentation schématique des différents domaines d'utilisation des levures

3 Les Sauces émulsionnées

3.1 Les émulsions

3.1.1 Définition

Les émulsions sont des systèmes biphasiques hétérogènes thermodynamiquement instables [61]. Une émulsion est une préparation liquide composée de deux liquides non miscibles qui ne peuvent être dispersés pendant une longue période. Un agent émulsifiant est ajouté qui forme un film autour des globules de sorte qu'une émulsion stable est produite [62].

3.1.2 Les types d'émulsions

Les émulsions se composent généralement de deux phases : La phase hydrophile, appelée eau (E) et la phase lipophile, appelée huile (H).

- La phase hydrophile (E), également appelée phase aqueuse, contient de l'eau et Les composés.
- Phase lipophile (H), aussi appelée phase grasse, phase huileuse ou phase organique, fait d'un mélange d'ingrédients de diverses sources.

Nous distinguons Deux types d'émulsions selon la phase dispersée :

3.1.3 Les émulsions simples

3.1.3.1 Sens de l'émulsion

On différencie deux types d'émulsions selon la répartition des différentes phases employées.

Une émulsion est dite directe (notée H/E pour Huile dans Eau) lorsque la phase dispersante est hydrophile et que la phase dispersée est lipophile. Au contraire, une émulsion inverse (notée E/H pour Eau dans Huile) se caractérise par une phase dispersante lipophile et une phase dispersée hydrophile [63].

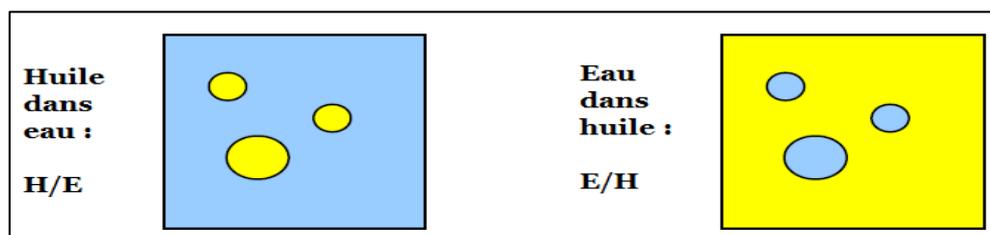


Figure 11: Représentations schématiques d'une émulsion directe et inverse [64]

3.1.3.2 Les émulsions multiples

Les émulsions doubles sont d'émulsions comportant simultanément des émulsions H/E et E/H. Conduisant soit à des émulsions eau dans huile dans eau (E/H/E) soit à des émulsions huile dans eau dans huile (H/E/H). Chaque globule dispersé dans l'émulsion double forme une structure vésiculaire contenant des compartiments aqueux simples ou multiples séparés de la seconde phase aqueuse par une phase huileuse.

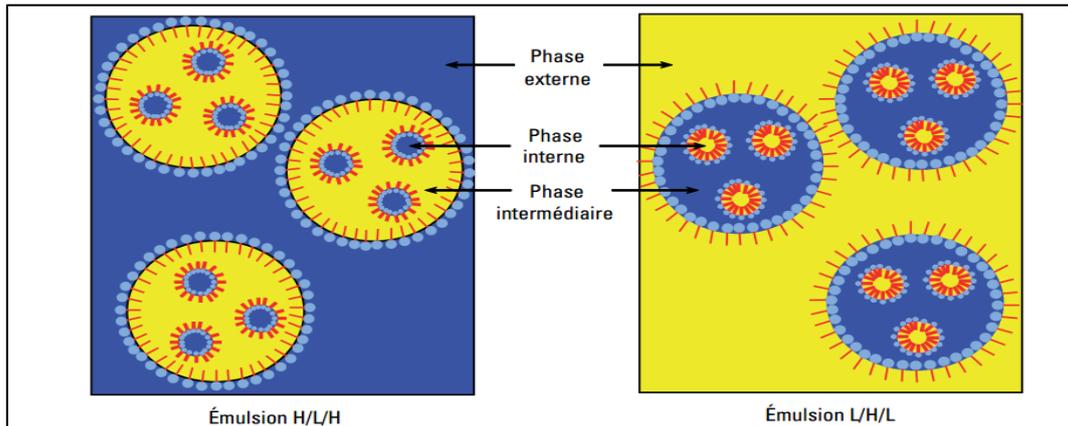


Figure 12: Représentation schématique de différents types d'émulsions multiples

3.1.4 Propriétés idéales

- Il doit consister en une dispersion uniforme de gouttelettes fines et de taille unique de la phase interne qui ne doivent pas s'agréger et si elles le font ne doivent pas coalescer pour former de grosses gouttelettes [62].
- Les gouttelettes internes ne doivent pas monter ou descendre en crème et si c'est le cas la couche de crème doit être re-dispersable [62].
- Sans inversion de phase il devrait rester dans son type d'origine [62].
- Il ne doit pas être attaqué par les microbes pendant le stockage [62].
- Il doit être stable à différentes températures [62].
- Il ne doit pas être rance ou dégradé par l'oxydation (Ex ; Huiles et graisses) [65].

3.1.5 Phénomènes de déstabilisation d'une émulsion

Les émulsions sont des systèmes métastables qui peuvent se déstabiliser, on distingue trois formes d'instabilité :

3.1.5.1 Déstabilisation chimique

Comme pour toute forme pharmaceutique, une émulsion peut être le siège d'une réaction entre le principe actif et d'autres composants de la phase grasse ou aqueuse ou encore entre le conditionnement primaire et les composants de l'émulsion, Une étude détaillée des interférences possibles entre différents composés est nécessaire pour éviter d'éventuelles incompatibilités.

3.1.5.2 Déstabilisation biologique

Les émulsions peuvent fournir un milieu nutritif idéal pour les micro-organismes, La contamination bactérienne et fongique peut entraîner une défaillance du système.

3.1.5.3 Déstabilisation physique

Une émulsion est un système métastable : ce sont des systèmes thermodynamiquement instables mais potentiellement cinétiquement stables sur une échelle de temps modérée. Ainsi, afin de tendre vers le minimum d'énergie libre du système, des phénomènes de déstabilisation de phases apparaissent, de nature réversible ou irréversible [63]. Ce minimum d'énergie est atteint lorsque l'aire minimale de contact entre les deux phases (H/E) est observée, ce qui conduit à une séparation de phases [66]. On peut alors dénombrer plusieurs types d'instabilité :

- Phénomènes conduisant à l'augmentation de la taille des gouttelettes : coalescence et mûrissement d'Ostwald
 - Phénomènes liés au mouvement des gouttelettes : crémage et floculation et Sédimentation
 - Inversion de phase
- **Le mûrissement d'Ostwald** : est un phénomène irréversible pendant lequel les plus petites gouttelettes en solution dans la phase continue se dissolvent et se déposent sur des gouttelettes plus grosses afin d'atteindre un état thermodynamiquement plus stable dans lequel le rapport surface / surface est minimisé [63].

La force motrice pour le mûrissement d'Ostwald est la différence de pression de Laplace entre petites et grandes gouttelettes. La pression plus élevée chez les plus petites gouttes les mène à migrer vers les gouttes de diamètre plus important [67].

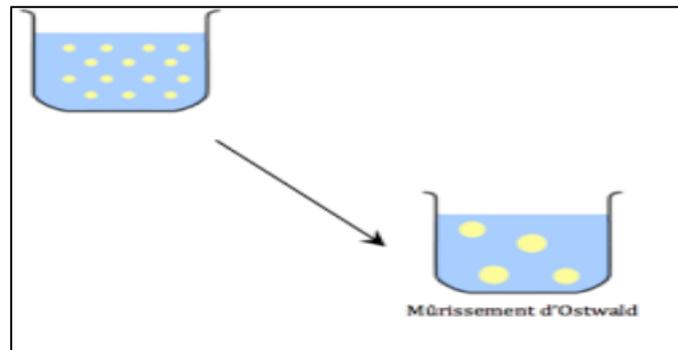


Figure 13:Murissement d'Ostwald [68]

- **Coalescence** ; La coalescence est un phénomène irréversible qui résulte de la rupture du film interfacial entre les gouttelettes de la phase dispersée. Elle engendre une réduction de la surface interfaciale, ainsi les forces qui s'exercent sur la gouttelette sont moindres, aboutissant à un état plus stable [67].

Ces interactions entre gouttelettes sont à contrôler : il s'agira de stabiliser l'interface, jouant avec les forces répulsives pour contrecarrer les forces attractives, de nature électrostatiques (tensioactifs ioniques chargés au niveau de la surface des gouttelettes) ou stériques [63].

- **Sédimentation et Crémage** ; Pour des huiles à densité moindre par rapport à celle de l'eau, un phénomène de crémage est observé. On retrouve ainsi la phase dispersée, moins dense, en haut du système. L'inverse se passe pour le phénomène de sédimentation où la phase dispersée est plus dense (phase aqueuse) [63].

Ce phénomène de crémage est contrecarré par une force, le Mouvement Brownien, qui résulte de l'agitation thermique des molécules [67].

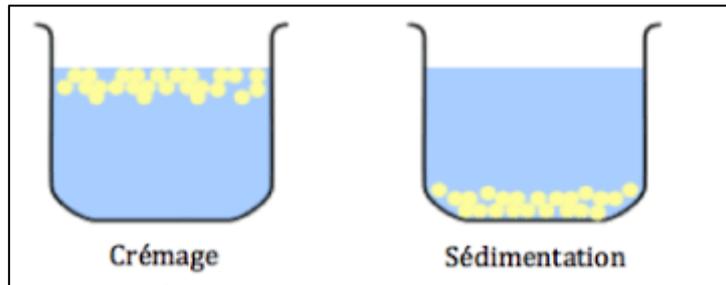


Figure 14:Crémage et Sédimentation [68]

C'est un phénomène non destructif, donc réversible si soumis à une agitation du système. On peut ainsi jouer sur la viscosité (valeur plus grande de viscosité pour la phase continue), sur le rayon de la gouttelette et sur une petite différence de densité entre l'huile et la phase aqueuse afin de ralentir le phénomène [63].

- **Floculation** : La floculation résulte de l'agrégation des gouttelettes dispersées dans la phase continue sous l'action d'interactions attractives (comme les forces de Van Der Waals ou la déplétion). Des agrégats ainsi formés sont appelés floccs dans lesquels les gouttelettes conservent leur intégrité et forment des entités séparées. Ce phénomène, tout comme le crémage et la sédimentation est non destructif et donc réversible [63].

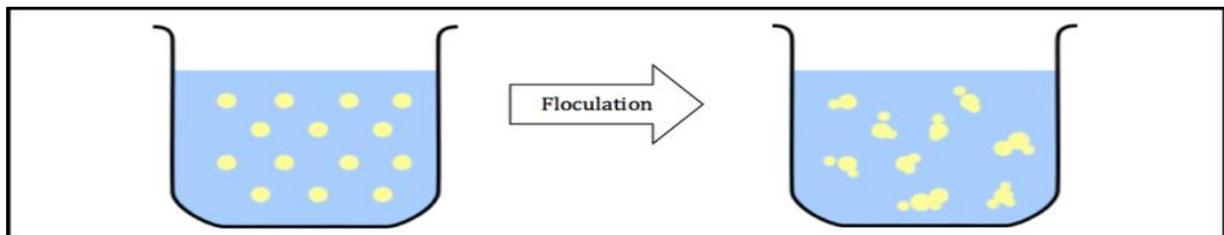


Figure 15:Floculation [68]

- **Inversion de phase** : Une inversion de phase est le passage d'une émulsion H/E à une émulsion E/H, ou inversement. Ce phénomène modifie les propriétés du produit [69].

3.1.6 Les bioémulsifiants

Les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles, qui forment des micelles et se répartissent à l'interface entre les phases fluides avec différents degrés de polarité [70].

Ils sont classés en deux groupes : les tensioactifs de bas poids moléculaire et les tensioactifs de haut poids moléculaire.

Les bioémulsifiants sont des composés de poids moléculaire élevé qui émulsifient deux liquides non miscibles même à de faibles concentrations sans réduire la tension superficielle ou interfaciale [71].

Ils sont constitués de polysaccharides, de lipopolysaccharides, de protéines, de glycoprotéines ou de lipoprotéines, qui leur confèrent un meilleur potentiel émulsifiant et une capacité à stabiliser les émulsions [71, 72].

Les biosurfactants sont considéré comme des bio-émulsifiants, ces molécules sont une alternative à l'utilisation d'agents tensioactifs chimiques.

Ils ont les mêmes caractéristiques intéressantes qu'on observe chez les surfactants synthétiques mais elles sont issues de microorganismes comme des bactéries, les levures ou des champignons. Ces microorganismes vont souvent produire un type de biosurfactants qui est propre à leur genre ou même à leur espèce [73].

3.1.7 Mode d'action d'un surfactant/émulsifiant

Dans une émulsion, les parties hydrophile et hydrophobe du tensioactif (émulsifiant) ont respectivement une affinité pour les phases hydrophile et hydrophobe de l'émulsion.

Généralement l'émulsifiant peut agir sur la stabilité d'une émulsion de trois façons :

- 1- Soit en diminuant la tension superficielle entre deux liquides, augmentant ainsi la surface de séparation, c'est le cas des tensioactifs dont les molécules forment un film à l'interface. Cette propriété est responsable des phénomènes de mouillage, de dispersion, de lavage et d'émulsification.
 - 2- En augmentant la viscosité de la composition, par exemple dans le cas du une gomme
 - 3- En agissant à la fois sur la tension superficielle et sur la viscosité, c'est ce qui se passe lorsqu'on ajoute trop de tensioactif non ionique ; une partie travaille à l'interface, pour abaisser l'interface, et l'autre partie augmente la viscosité de la phase aqueuse dispersée.
- En réduisant les tensions interfaciales, l'émulsifiant :
- réduire le travail nécessaire pour augmenter l'interface et favoriser l'émulsification.

- stabilité accrue des émulsions formées grâce à la formation d'un film de liaison.

3.2 Application en agro-alimentaire

3.2.1 La mayonnaise

La mayonnaise est une sauce qui peut être ajoutée à de nombreux aliments, tels que comme des sandwiches et des hamburgers, ou ajouter à certaines salades comme la laitue de chou et ingrédients de nombreuses autres sauces, la mayonnaise en fait a commencé en France en 1750, les plus anciennes recettes de mayonnaise datant du début du 19^{ème} siècle, et bien qu'il existe différentes méthodes de préparation, ils partagent toutes les bases : œufs, huile, vinaigre, ajout d'huile étape considérée est l'étape la plus importante et la plus difficile, car elle s'ajoute progressivement et très lentement dans un bol contenant les œufs entiers, battez-les au batteur à main.

Main ou le pouvoir de distribuer des gouttelettes d'huile et d'eau, des protéines et la lécithine agit comme un émulsifiant, donnant à la mayonnaise sa texture uniforme. La mayonnaise est une sorte d'émulsion semi-solide d'huile (phase discontinue) dans l'eau (phase continue) [74]. En raison de son pH faible et de sa teneur élevée en graisse, elle est relativement résistante à la détérioration microbienne.

Bien que les levures et les moisissures puissent causer des dommages, relativement peu d'autres organismes ont été isolés de la mayonnaise [75]. La mayonnaise est vraiment une émulsion complexe. En effet, de nombreuses transformations sont nécessaires à la formation d'une mayonnaise. Les expériences réalisées auparavant nous ont permis de comprendre de nombreux aspects de la formation de mayonnaise. D'une part, les phénomènes nécessaires à la formation de la mayonnaise, l'association d'un émulsifiant dit « tensioactif » et d'autre part la création d'une multitude de micelles.

Nous avons constaté que d'autres facteurs entrent en jeu, tels que la quantité d'huile, le vinaigre et la présence d'œufs sont nécessaires à la réussite de la mayonnaise.

Le biosurfactant peut être un bon substitut du jaune d'œuf pour réduire la quantité de graisse animale dans les aliments. Malgré l'augmentation significative de la teneur en lipides avec le remplacement total du jaune, la présence d'acides gras dans la structure hydrophobe du biosurfactant favorise cette incorporation. De plus, le jaune d'œuf, en plus de contenir du cholestérol, des graisses saturées et des triglycérides, peut contenir des substances

potentiellement toxiques, telles que des oligo-éléments et des métaux lourds, qui, à des concentrations élevées, peuvent provoquer une dépression, une hypertension, un cancer gastro-intestinal et la maladie d'Alzheimer [76,77].

En revanche, un biosurfactant peut avoir des effets bénéfiques contre les maladies cardiovasculaires, car il contient des graisses monoinsaturées dans sa structure [78]. Malgré les propriétés attractives des biosurfactants, les coûts de production élevés de ces biomolécules restent un goulot d'étranglement technologique, comme c'est le cas pour la plupart des produits biotechnologiques. D'autre part, le marché de consommation actuel s'intéresse de plus en plus à l'utilisation d'ingrédients alimentaires plus sains, ce qui pousse la recherche et l'optimisation des procédés de production et d'extraction de ces biomolécules afin de les rendre plus compétitifs en tant qu'additifs alimentaires.

Conclusion

En raison de leurs propriétés intéressantes citées précédemment, les biosurfactants attirent de plus en plus l'attention de la communauté scientifique en tant que candidats prometteurs pour le remplacement d'un certain nombre de surfactants synthétiques. La majorité des biosurfactants microbiens décrits dans la littérature sont d'origine bactérienne et les genres les plus signalés comme producteurs de biosurfactants sont *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.* Et *Arthrobacter sp.* Cependant, en raison de la nature pathogène de certains de ces organismes producteurs, l'application de ces composés est limitée, ne convenant pas à une utilisation dans quelques industries, entre autres alimentaire.

Au cours de dernières années, il y a eu une augmentation du nombre de publications dans le domaine de la production de biosurfactants issus de levures à cause de la non toxicité de la plupart de ces microorganismes. De plus, certaines levures ont un taux de conversion du substrat plus élevé, produisant des quantités plus élevées de biosurfactants que les bactéries. C'est une indication claire que ces composés s'avèrent intéressants dans plusieurs domaines et deviennent technologiquement importants. Malgré les avantages de biosurfactants, leur utilisation industrielle est encore limitée en raison des coûts impliqués dans le processus de production.

L'optimisation du processus de production est le facteur clé pour améliorer le rendement et réduire les coûts. Les estimations montrent que l'utilisation de sources renouvelables comme substrats peut réduire jusqu'à 30 % les coûts de production. Également, la récupération et/ou

purification des produits biotechnologiques représentent généralement environ 60 % des coûts de production totaux, ce qui rend la production commerciale de biosurfactants/bioémulsifiants assez coûteuse. Des méthodes de réduction des coûts par l'utilisation de substrats peu coûteux et renouvelables sont donc nécessaires. Également, Les facteurs qui influencent la production de biosurfactants, tels que les sources et concentrations de carbone et d'azote, le pH, la température, l'agitation et l'aération, le choix de la méthode d'extraction, sont également pertinents sur l'optimisation de la production et donc sur le coût de production.

Le coût actuel de production des sophorolipides par la levure *C. bombicola* varie de 2 à 5 €/kg, selon le coût du substrat et l'échelle de production, alors que le prix de marché des tensioactifs synthétiques est d'environ 2 €/kg. Certains secteurs industriels spécifiques, tels que l'alimentaire, la cosmétique et la pharmacie, les biosurfactants ont un potentiel d'application élevé et joueront probablement un rôle majeur dans un court laps de temps, en raison de leurs caractéristiques améliorées et des marges élevées et de la valeur du produit final.

De nos jours, les recherches progressent lentement vers le génie génétique grâce à l'utilisation de techniques d'ADN recombinant pour la manipulation de la production de biosurfactants. Ces études ouvrent de nouvelles perspectives pour augmenter les rendements de production et pourraient devenir l'instrument pour surmonter les limites de l'application industrielle des biosurfactants [79,80,81].

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche de chimie des substances naturelles et de biomolécules université Blida 1. La liste de verreries, équipements et réactifs est indiquée dans l'annexe.

Toutes les manipulations doivent être faites selon les conditions aseptiques usuelles dans le travail microbiologique, en utilisant un matériel stérilisé à proximité de la flamme d'un bec benzène, en passant à la flamme les orifices des tubes et des flacons, et une stérilisation de tous ce qu'est liquide par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

Les étapes de l'isolement ont été réalisées dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Recherche des Substances Naturelles et Biomolécule (Université Blida 1).

1. Isolement des levures

Les différents fruits et légume ont été dénoyautés et découpés en petits morceaux, la première étape consiste à faire un pré-enrichissement pour favoriser l'isolement des levures. Ce pré-enrichissement consiste à introduire 100 g de chaque échantillon solide dans des erlenmeyers contenant 100 ml de bouillon YPG (la composition de milieu est donnée en l'annexe) additionné au gentamicine et chloramphénicol pour inhiber la croissance bactérienne, les échantillons ainsi préparés sont homogénéisés puis placés dans un incubateur agitateur sous une agitation de 180 rpm à 30 °C pendant 18 h.

L'isolement à partir de différents échantillons a été réalisé par la méthode classique de dilutions décimales, une série de dilutions (10^{-1} à 10^{-5}) a été effectuée : 1ml de chaque préculture a été prélevé aseptiquement puis introduit dans un tube contenant 9 ml de l'eau distillée stérile, on obtient ainsi la dilution 10^{-1} et ainsi de suite.

1.1. Milieux d'isolement

Les levures sont isolées sur milieu gélosé Sabouraud (la composition de milieu est donnée en annexe 3) supplémentés de gentamicine pour inhiber la croissance bactérienne, le milieu est ajusté à un pH final de 5.6 à 25°C et stérilisé à 120 °C pendant 20 min.

1.2. Ensemencement

Après l'apparition de trouble dans les milieux de pré-enrichis, nous avons procédé à l'ensemencement en surface de milieu solide par étalement de 0.1ml de chaque dilution à l'aide d'un râteau. Les boîtes ainsi ensemencées sont incubées dans l'étuve à 30 °C pendant 48h.

1.3. Purification

Après une étude sommaire de l'aspect macroscopique des colonies. Celles qui étaient bien isolées sont repiquées sur les mêmes milieux de cultures d'isolement.

La purification est effectuée par la méthode des stries, qui consiste à tracer des stries avec l'anse contenant la levure sur la surface d'une gélose de Sabouraud neuve coulée dans des boîtes de pétri plusieurs fois jusqu'à l'obtention des souches pures.

1.4. Conservation

Les isolats de levures sont conservés sur le milieu Sabouraud aux gentamicines à 4°C afin d'éviter d'éventuelles contaminations par les bactéries, des repiquages réguliers sont effectués tous les mois pour maintenir la viabilité des souches.

2.Criblage des souches productrices des biosurfactants

Le but de ce travail consistait à isoler des levures productrices des biosurfactants. Pour ce faire, nous avons procédé à un criblage des différents isolats levuriens pour évaluer leur capacité à produire les biosurfactants, en utilisant différentes techniques tel que le test d'émulsification (E₂₄), test de déplacement de pétrole (DDP) et mesure de la tension superficielle (TS).

Dans des erlenmeyers de 250 ml on met 50 ml du milieu YPG après avoir autoclavé les milieux à 120 °C pendant 20min en transfert les colonies bien isolées dans le milieu. Les précultures sont préparées et maintenues sous incubation et agitation pendant 24h à 30 °C pour une agitation de 180 rpm.

3.Optimisation du milieu de production de biosurfactant

Trois milieux différents ont été testés dans cette étude

Tableau 3 : Composition des milieux testés

Milieu à base de sels minéraux	Milieu minimum	Milieu YPG (riche)
NaNO ₃ 3g MgSO ₄ 0.25g KH ₂ PO ₄ 0.25g Extrait de levure 2g pH = 6 Source de carbone ; huile d'olive 50 g et glucose 50g Eau distille 1000 ml	Glucose 2g Extrait de levure 2g Gasols 2% pH = 6 Eau distille 1000 ml	Extrait de levure 10g Peptone 20g Glucose 20g Eau distille 1000 ml pH = 6

3.1. Test d'émulsification E24

Il permet de vérifier la capacité à former, en présence d'un émulsifiant, une émulsion entre deux phases non miscibles une phase hydrophobe et un autre hydrophile. Alors, le test consiste à mélanger 4 ml du surnageant contenant le biosurfactant et 4 ml d'huile d'olive dans un tube à essai. Ensuite, le mélange est vortex durant 3 min, Après 24h d'incubation à température ambiante. Un témoin est préparé en remplaçant le surnageant par l'eau distillée.

L'indice d'émulsification E₂₄ est le pourcentage de la hauteur de la phase émulsionnée formée, divisée par la hauteur totale du mélange selon l'équation suivante [82].

$$E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100$$

H_t : hauteur totale de mélange (cm)

H_e : hauteur de l'émulsion formée

3.2. Test de déplacement de pétrole DDP

Ce test est défini comme un test qualitatif de criblage des souches productrices de biosurfactants facile à réaliser, simple sensible et productible est basé sur la caractéristique des biosurfactants à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau [83,84]. Le protocole est comme suit : Dans une boîte de Pétri qui contient 40ml d'eau distillée on y ajoute 100 µL de pétrole brut. Il se forme une mince pellicule à la surface de l'eau. Puis on ajoute 100 µL de surnageant, s'il y a la présence du biosurfactants dans le surnageant le pétrole sera déplacé forme un diamètre de dégagement.



Figure 16:Test de déplacement de pétrole

A : pétrole avec de l'eau distillée(contrôle), **B** : pétrole avec tensioactif chimique, **C** : pétrole avec biosurfactant

3.3. Mesure de la tension superficielle

L'abaissement de la TS est mesuré comme moyen de la détection de biosurfactants, sécrétés dans le milieu. La présence de biosurfactant dans le surnageant a été confirmée en fonction d'une diminution de la TS du surnageant par rapport à un témoin (eau distillée).

20 ml de culture ont été prélevés et centrifugés (6000tr/min pendant 30 min). Le surnageant de culture est filtré à travers un papier filtre WATTMA avant d'effectuer la mesure des activités de surface du surnageant obtenu est réalisée à l'aide d'un tensiomètre (modèle GIBERTINI TSD 132389). Toutes les mesures ont été répétées trois fois et leurs valeurs moyennes ont été prises.

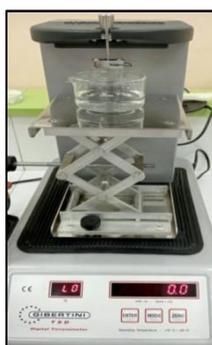


Figure 17:Tensiomètre

4. Production de biosurfactants

- **Préculture** : La levure est réactivée dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 50ml de milieu YPG liquide, puis incubée dans un incubateur agitateur pendant 24 h à 30 °C avec une agitation fixée à 180 rpm.
- **Production de biosurfactant** : La production est réalisée dans erlenmeyer de 1 L contenant 500 ml de milieu de culture optimisé, l'inoculation se fait à partir de préculture (5%) réalisée auparavant, la température est fixée à 30 °C et l'agitation est réglée à 180 rpm le pH est ajusté à 6.

5. Cinétique de production du biosurfactant

La cinétique de croissance et de production de biosurfactant a été étudiée en mesurant les paramètres suivants : la biomasse (g/l), l'indice d'émulsification E24 (%), et la tension superficielle (mN/m). Des prélèvements ont été effectués à chaque jour durant 6 jours, Les conditions opératoires sont : pH=6, T = 30°C, agitation =180rpm.

- **Estimation de la biomasse par la méthode gravimétrique (poids sec)**

Le suivi de la cinétique de croissance a été effectuée par le contrôle régulier du paramètre suivant ; Le suivi de l'évolution de la biomasse durant la période de production a été effectué par la méthode gravimétrique (Poids sec) La matière sèche a été déterminée par centrifugation de 15 ml de moût de production à 6000 rpm pendant 15 min le culot est récupéré dans un creuset préalablement tarée, puis séché à 30 °C pendant 24 h, puis pesé [85].

$$X = \frac{P_2 - P_1}{V}$$

Les valeurs de la matière sèche (X) sont obtenues par la formule suivante :

Avec : **P₂** : Poids du creuset + biomasse.

P₁ : Poids du creuset vide

V : Volume de l'échantillon prélevé

La biomasse sèche(X)est exprimée en (g/L).

6.Extraction du biosurfactant

La culture de la souche levurienne performante a été inoculée dans 1000 ml de milieu optimisé et incubé à 30 °C pendant 6 jours dans un incubateur-agitation à 180 rpm. La biomasse cellulaire a été ensuite éliminée par centrifugation à 4500 tr/min, 4 °C pendant 30 minutes. Le surnageant ainsi obtenu a été filtré. Le biosurfactant a été séparé de surnageant par deux types d'extraction liquide-liquide.

Extraction liquide-liquide avec d'acétate d'éthyle.

Extraction par précipitation acide puis extraction liquide-liquide avec un volume égal de mélange d'acétate d'éthyle-méthanol (2 :1, v/v).

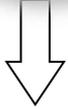
- **Extraction par acétate-d 'éthyle/méthanol**

Le pH du surnageant est ajusté à 2 en utilisant une solution HCl (5N), puis laisser une nuit à 4 °C. Le précipité formé est récupéré par centrifugation réfrigérée à 4500 tr/min pendant 30 min à 4 °C. Ensuite il a été extrait avec un volume égal de mélange d'acétate d'éthyle-méthanol (2 :1, v/v). Le mélange est bien secoué dans une ampoule à décanter puis laisser pendant 24h. La phase organique (en haut) est récupérée, pour éliminer les traces d'eau ont utilisé le sulfate de magnésium anhydre puis filtrée sur papier filtre, les solvants sont évaporés en utilisant un évaporateur rotatif à 40°C. Le biosurfactant brut récupéré est moyennement visqueux de couleur miel [86].

- **Extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle**

Le surnageant obtenu après centrifugation est extrait directement par une extraction liquide-liquide en utilisant l'acétate d'éthyle, puis le solvant est évaporé par un évaporateur rotatif à 40°C.

Mout de fermentation



Centrifugation à 45000 tr/min à 4 °C pendant 20min

Culot

Surnageant

Le pH de surnageant a été ajusté à 2 en utilisant une solution de HCl 5N puis il a subi une précipitation acide à 4 °C pendant une nuit puis subit une centrifugation à 4°C



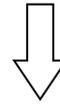
Le biosurfactant est extrait en utilisant un mélange d'acétate d'éthyle et méthanol (2/1 : v/v) trois fois à l'aide d'une ampoule à décanter



Le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C et l'extrait brut est récupéré



Mout de fermentation



Centrifugation à 45000 tr/min à 4 °C pendant 20min

Culot

Surnageant

Extraction liquide- liquide par l'acétate d'éthyle (v/v) trois fois



Le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C et l'extrait brut est récupéré

Figure 18: Représentation schématique des étapes d'extraction

7. Caractérisation du biosurfactant produit

7.1 Pouvoir émulsifiant

La propriété émulsifiante a également été évaluée avec l'huile d'olive en mélangeant des volumes égaux du surnageant avec l'huile le mélange est vortex pendant 2 min à une vitesse maximale puis laissé pendant 24 h au repos. Après les 24h écoulées l'indice d'émulsification est déterminé par la formule précédent.

7.2 Pouvoir anti microbien

Un inoculum est préparé à partir des cultures de 24 h pour chaque bactérie, mis en suspension dans l'eau distillée stérile de telle manière à obtenir une densité optique de 0.8 à 625 nm. Au total, 6 souches microbiennes pathogènes ont été testées : 2 souches bactériennes Gram (+), 3 souches bactériennes Gram (-) et une souche levurienne.

Chaque espèce bactérienne a étéensemencée à l'aide d'un écouvillon sur gélose LB et un disque stérile (9 mm) est immergé dans une solution de biosurfactant brut qui a été déposé sur la surface du milieu LB pour les bactéries et milieu OGA pour la levure, les boites ont été mises à 4°C pendant 2h pour la bonne diffusion de biosurfactant puis elles sont incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 30°C pour la levure. Le tableau illustre les souches microbiennes testées [87].

Tableau 4 : Microorganismes testés pour l'activité antimicrobienne

N°	Souches (ATCC)
01	<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 13932) Gram+
02	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATCC 23308) Gram-
03	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) Gram-
04	<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 51559) Gram+
05	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027) Gram-
06	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)

7.3 Activité antioxydante in vitro du biosurfactant

- **Essai d'élimination des radicaux libres DPPH**

L'activité d'élimination des radicaux libres DPPH du biosurfactant a été déterminée selon la méthode décrite par [119,120,121] avec quelques modifications. On prépare des solutions de biosurfactant à différentes concentrations [0.5-20 mg/ml] dans l'éthanol.

Un volume de 700 µL de biosurfactant est ajoutée à un volume 325 µL de DPPH comme source de radicaux libres. Le mélange a été agité puis incubé pendant 60 minutes dans l'obscurité à température ambiante.

L'absorbance a été mesurée à 517 nm par un spectrophotomètre UV-VISIBLE sous sa forme radicale le DPPH présente une bande d'absorption à 517 nm qui disparaît lors de la réduction par un composé antiradicalaire.

Une absorbance plus faible du mélange réactionnel indique une activité plus élevée de piégeage des radicaux libres DPPH.

Le BHA a été utilisé comme contrôle positif, l'activité de piégeage des radicaux DPPH a été calculée comme suit :

$$\% = ((A \text{ Contrôle} + A \text{ Blanc}) - (A \text{ Echantillons})) / (A \text{ Contrôle}) * 100$$

Avec : A contrôle : l'absorbance de la solution du DPPH

A Blanc : l'absorbance de la solution du biosurfactant

A Echantillons : l'absorbance de l'échantillon (biosurfactant +DPPH)

7.4. Test rhamnose

La présence de groupements glycosidiques dans la molécule a été détecté par le test rhamnose en utilisant la méthode de [88]. Un volume de 1 ml de surnageant a été ajouté à 2 ml de réactif de phénol à 5%, puis on ajoute 5 ml d'acide sulfurique pur (98%). Ensuite, une incubation à 65 °C est réalisé [89]. Un résultat positif sera indiqué par une coloration rougeâtre.

7.5. Analyse par CCM

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique qualitative qui permet de confirmer la pureté du biosurfactant. Elle est réalisée, dans un but d'analyse des composés des milieux de production. Elle permet d'évaluer et détecter les caractéristiques chimiques du biosurfactant dans le surnageant. Dans cette étude, une caractérisation de biosurfactant par chromatographie sur couche mince a été effectuée. Les phases stationnaires solides et polaires sont constituées de gel de silice. D'autre part, la phase mobile est un mélange de solvants organiques de polarités différentes.

Systèmes solvants [90]

Systèmes 1 Chloroforme/méthanol/eau (65/25/10)

Systèmes 2 Chloroforme/méthanol/acide acétique (65/15/20)

- Dépôt :

Déposer 10 μ L à 2 cm du bord inférieur de la plaque et laisser sécher la plaque.

Placer la plaque en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve pré-saturée en vapeur du système solvant approprié, l'échantillon à étudier

Progression plus ou moins capillaire de la phase mobile vers le haut de la plaque.

- Révélation :

La révélation des spots obtenus se fait par la lampe UV

Les tâches visibles sont rapidement délimitées afin de calculer les rapports

frontaux (Rf) : $Rf = X / Y$

Tel que :

X : Distance entre la ligne de dépôt et le centre de la tâche (cm).

Y : Distance entre la ligne de dépôt et le front de migration (cm).

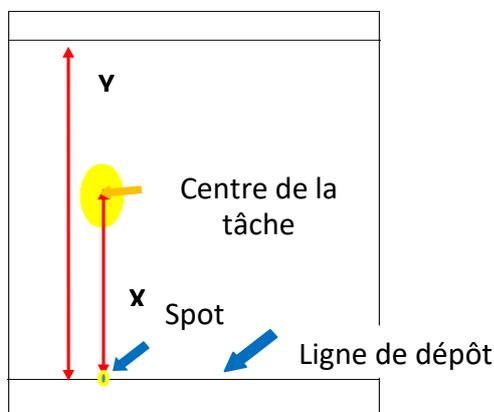


Figure 19: Schéma de calcul d'un rapport frontal

7.6. Analyse par FTIR

Les spectres infrarouges ont été obtenus en utilisant un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque THERMO SCIENTIFIC type « Nicolet Is10 », équipé d'un détecteur DTGS KBr, d'un rayonnement laser et une séparatrice XT-KBr ont été utilisés.

La spectroscopie infrarouge est utilisée pour découvrir des groupes fonctionnels et déterminer les types de liaisons chimiques présentes dans des mélanges inconnus.

8. Application en agro-alimentaire

- **Essai d'application du biosurfactant dans la Mayonnaise**

Vu les propriétés émulsifiantes, anti microbiennes, antioxydantes intéressantes de notre biosurfactant produit par la souche 138, Nous avons développé une nouvelle formule de la sauce mayonnaise avec des caractéristiques similaires à la mayonnaise commerciale .La mayonnaise représente une émulsion de type directe, complexe, finement dispersé, stable et grasse dans laquelle la phase dispersée est distribuée sous forme de gouttelettes fines au sein du milieu de dispersion, les deux phases étaient séparées par des interfaces. Les différentes formulations de la mayonnaise se distinguent principalement par la composition, le type du stabilisateur et de l'émulsifiant.

Sur cette optique nous avons procédé à la préparation d'une sauce mayonnaise à partir de biosurfactant à titre d'agent émulsifiant, bio-conservateur, et épaississant.

- **Préparation des échantillons**

Pour cette étude, Nous avons préparé trois échantillons de la sauce mayonnaise qui différent par leur contenance en jaune d'œuf et de biosurfactant et le 4 -ème échantillon a été pris comme référence « la sauce mayonnaise commerciale de marque LISIEUR ».

Les ingrédients de la sauce mayonnaise LISIEUR sont : Huile de tournesol raffiné, eau, vinaigre d'alcool, jaune d'OEUF 6%, amidon, sel, sucre, jus de citron concentré, épaississant : gomme de xanthane, Arome naturel de MOUTARDE.

Les ingrédients ajoutés dans nos échantillons sont : le vinaigre blanc, sel, sucre, moutarde, huile végétale, Biosurfactant de la souche 138.

La phase aqueuse : on mélange le vinaigre blanc (NASSAH), sel (Enasel), sucre (Cevital), moutarde (Sidna) et biosurfactant et on laisse la dispersion sous agitation pendant un certain temps pour que les ingrédients s'hydratent et se dispersent finement.

La phase huileuse : huile végétale (sim Bahia)

Préparation de l'émulsion : on verse lentement la phase huileuse dans la phase aqueuse sous une forte agitation en utilisant un mélangeur de type Moulinex pour assurer une bonne émulsification de la préparation.

Après la préparation des échantillons de la sauce mayonnaise obtenus ont été placés dans des récipients hermétique et stérile et maintenus pendant 24 h à une température de 4 °C avant l'analyse.

Tableau 5 : Ingrédients utilisés dans la préparation de la mayonnaise

Echantillons	Ingrédients	Quantité
1	Vinaigre blanc	50 ml
	Sel	1 g
	Sucre	1 g
	Moutarde	2 g
	Jaune d'œuf	20g
	Biosurfactant	0.5 ml
	Huile	720 ml
2	Vinaigre blanc	50 ml
	Sel	1 g
	Sucre	1 g
	Moutarde	2g
	Jaune d'œuf	4g
	Biosurfactant	3 ml
	Huile	500 ml
3	Vinaigre blanc	50 ml
	Sel	1 g
	Sucre	1 g
	Moutarde	2 g
	Jaune d'œuf	2g
	Biosurfactant	1 ml
	Huile	200 ml

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Isolement des levures productrices de biosurfactants

En raison de leurs propriétés intéressantes (toxicité plus faible, biodégradabilité plus élevée, émulsifiante, antioxydante, antimicrobienne, stabilité dans des conditions extrêmes de température, salinité et pH, ...), les biosurfactants attirent de plus en plus l'attention de la communauté scientifique en tant que candidats prometteurs pour le remplacement d'un certain nombre de surfactants synthétiques. La majorité des biosurfactants microbiens décrits dans la littérature sont d'origine bactérienne et les genres les plus signalés comme producteurs de biosurfactants sont *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.* Et *Arthrobacter sp.* Cependant, en raison de la nature pathogène de certains de ces organismes producteurs, l'application de ces composés est limitée, ne convenant pas à une utilisation dans quelques industries, entre autres alimentaire.

L'étude de la production de biosurfactant par les levures a augmenté ces dernières années. La production étant principalement rapportée par les genres *Candida sp.*, *Pseudozyma sp.*, *Yarrowia sp.*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* et *Kluyveromyces lactis*. Le grand avantage de l'utilisation de levures est qu'elles ne sont ni toxiques ni pathogènes, permettant l'application de leurs produits dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. De plus, certaines levures ont un taux de conversion du substrat plus élevé, produisant des quantités plus élevées de biosurfactant (10 – 300 g/l) que les bactéries [91,92,93,94,95].

Dans ce contexte, et dans un cadre de projet de recherche du laboratoire de recherche de chimie des substances naturelles et de biomolécules université Blida 1. Un isolement des levures à partir de plusieurs biotopes a été effectué (Doctorante Tared A). Au total, 167 souches de levures ont été isolées à partir de 9 types de fruits (pêche=27, grenade=38, fraise=20, abricot=8, figue=19, pomme=10, datte=9, banane=16, raisin vert=10) et un type de légumes (betterave=10).

2.Optimisation du milieu de production de biosurfactant

Plusieurs paramètres affectent la qualité et la quantité de la production de biosurfactants ; le type de microorganisme, les conditions opératoires (température, salinité, pH, agitation, aération, ...) et la composition du milieu de production : sources et concentrations de carbone et d'azote, sels minéraux, oligoéléments, etc. Afin d'améliorer la production et la qualité (propriété émulsifiante) de biosurfactant, trois milieux de culture ont été utilisés. A cet effet, sept (07) souches levuriennes ont été choisies pour sélectionner la souche performante productrice de bioémulsifiants.

[96] recommandent l'utilisation de plus d'une méthode de dépistage pour la détection des microorganismes producteurs de biosurfactants. En effet, la détection de biosurfactants dans les milieux de culture est basée sur les tests suivants : la tension de surface (TS), déplacement de pétrole (DDP) et l'indice d'émulsification (E_{24}). Les tableaux III.1, 2 et 3 regroupent les résultats des trois paramètres mesurés pour les trois milieux utilisés.

Tableau 6 : Variation de la tension superficielle de surnageant des trois milieux

Souches	MM	MB	YPG
111	37 mN/m	43 mN/m	39 mN/m
138	44 mN/m	41 mN/m	30 mN/m
145	44 mN/m	43 mN/m	30 mN/m
147	46 mN/m	46 mN/m	29 mN/m
124	38 mN/m	47 mN/m	43 mN/m
142	43 mN/m	37 mN/m	30 mN/m
156	40 mN/m	45 mN/m	39 mN/m

Tableau 7 : Résultats de la mesure de DDP dans les trois milieux

Souches	MM	MB	YPG
111	4.5 cm	2 cm	4.5 cm
138	4 cm	2 cm	4.5 cm
145	3 cm	1 cm	3 cm
147	2.5 cm	2 cm	2.5 cm
124	5 cm	1 cm	5 cm
142	3 cm	1 cm	3 cm
156	1.5 cm	2 cm	3.5 cm

Tableau 8 : Indice d'émulsifiassions pour les trois milieux

Souches	MM	MB	YPG
138	2%	1%	85.8%
142	3%	0.25%	89.33%
145	4%	5%	62.5%
147	5%	10%	12.5%
111	1%	0%	52%
124	6%	1%	50%
156	0%	2.5%	2.5%

La tension de surface est considérée comme le paramètre principal pour la détection de la production de biosurfactant. Selon [97] un microorganisme est considéré comme producteur de biosurfactant, lorsque le surnageant contenant le biosurfactant a la capacité de diminuer la tension superficielle à des valeurs inférieures à 40 mN/m. Un critère similaire, pour la détection des microorganismes producteurs de biosurfactants qui considère qu'un microorganisme est

bon producteur de composés tensioactifs si son surnageant métabolique est capable de réduire la tension superficielle de l'eau de 72 à 35 mN/m ou en dessous de cette valeur [98].

Le test de déplacement d'huile (pétrole) ne nécessite aucun équipement spécialisé. La méthode est rapide et simple qui peut être réalisée avec de petits volumes d'échantillon. Selon [99], un microorganisme est considéré comme un bon producteur de biosurfactant si son surnageant donne une DDP égale ou supérieure à 3 cm (correspond à TS = 35 mN/m). Selon ces auteurs, il y a une corrélation entre le DDP et la TS.

L'indice d'émulsifiations (E_{24}) est considéré un paramètre clé pour la sélection des souches productrices de bioémulsifiants. Un E_{24} supérieur à 50%, la souche est considérée comme bonne productrice de bioémulsifiant.

D'après les résultats obtenus, on constate que la composition du milieu de culture est de grande importance pour la production de biosurfactants. Quatre souches levuriennes (codées : 138, 142, 145 et 147) sont considérées comme des souches très efficaces pour la production de biosurfactants ($TS \leq 31$ mN/m) en utilisant le milieu YPG (tableau III.1). Cependant, ces mêmes souches sont considérées non productrices de biosurfactants en les cultivant dans les deux autres milieux (MM et MB). A titre d'exemple, le surnageant de la souche 147 a réduit la TS de 65 à 29 mN/m. Par contre, l'utilisation des deux milieux MM et MB a conduit une réduction de 65 à 43 mN/m, ce qui implique que cette souche devient non productrice de biosurfactant.

En se basant sur l'indice d'émulsification (notre objectif), trois souches (138, 142 et 145) sont considérées comme productrices de biosurfactants à caractère émulsifiant et deux souches (111 et 124) sont productrices de bioémulsifiants en utilisant le même milieu (YPG). Les deux surnageants des souches 138 et 142 ont donné des valeurs très importantes de E_{24} égales 85,8 et 89,33 % respectivement (tableau III.2). Aussi, la souche 145 a produit un biosurfactant à caractère émulsifiants intéressante (62,5 %).

Contrairement à d'autres travaux [99], nous constatons qu'il n'y a pas une corrélation entre la TS et le DDP. Par exemple, le surnageant de la souche 124 a donné une DDP intéressant de 5 cm en utilisant les milieux MM et YPG, mais des valeurs de TS sont égales 43 mN/m (YPG) et 39 mN/m (MM).

Des études antérieures ont montré que les biosurfactants peuvent être synthétisés à partir des substrats solubles (glucose, glycérol, lactose, ...), insolubles (huile d'olive, huiles végétales, hydrocarbures, ...) et déchets agroalimentaire (margine, lactosérum, ...).

Des travaux similaires ont trouvé qu'il y a la possibilité de production des biosurfactants à partir de substrats solubles [100]. Ont identifié pour la première fois un biosurfactant produit par *Y. lipolytica* IA 1055 utilisant le glucose comme source de carbone. Ces auteurs ont démontré que l'induction de la production de biosurfactant n'est pas dépendante de la présence d'un substrat insoluble. Une autre souche, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, produisant un bioémulsifiant à partir de glucose à forte activité émulsifiante (huile/eau) a été également identifié [101]. Le lactose a également été utilisé comme substrat soluble pour la production de composés à activité émulsifiante, comme la production de mannane-protéines par *Kluyveromyces marxianus* [102].

Bien qu'il soit également possible de produire des biosurfactants en présence de sources de carbone solubles dans l'eau, plusieurs études montrent que des rendements de production souvent plus élevés sont obtenus lorsque des substrats hydrophobes sont ajoutés. Un certain nombre de travaux décrivent l'importance de combiner un substrat insoluble dans l'eau avec un hydrate de carbone dans le milieu de culture [103].

Cette étude nous a permis de sélectionner une souche à fort potentiel de production de biosurfactant à caractère émulsifiant : Souche 138 isolée du grenade (fruit).



Figure 20: Aspect macroscopique et microscopique de la souche 138

3. Cinétique de la production des biosurfactants

Afin de déterminer la relation entre la croissance microbienne et la production de biosurfactant/bioémulsifiant et d'optimiser le temps de production, des mesures de la biomasse (gravimétrie), de la tension de surface et de l'activité émulsifiante ont été effectuées pendant 6 jours (tableau III.4). La souche levurienne 138 a été cultivée dans un milieu optimisé (YPG).

Tableau 9 : cinétique de production du biosurfactant par la souche 138

Jours	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	6 ^{ème} jour
Biomasse (g/L)	46	52.68	52.83	57.33
E24 (%)	50	55	57	80
TS	32	32	34.4	31.8

Les résultats obtenus indiquent que la synthèse de biosurfactant par la souche 138 commence dès le premier jour dans le milieu YPG, les valeurs de la biomasse microbienne (poids sec), de l'activité émulsifiante et de la TS sont 46 g/L, 50 % et de 32 mN/m respectivement. Aussi, nous remarquons que le temps d'incubation affecte la production de biosurfactant, ceci traduit par l'augmentation de l'activité d'émulsification. A titre d'exemple, l'activité d'émulsification passe de 57 à 80 % pour des temps d'incubation de 3 et 6 jours respectivement.

Nous remarquons qu'au bout d'un temps de 6j, la biomasse est maximale (57.33 g/L), le surnageant présente une activité émulsifiante maximale (E24 = 80%) et une valeur de TS est plus faible.

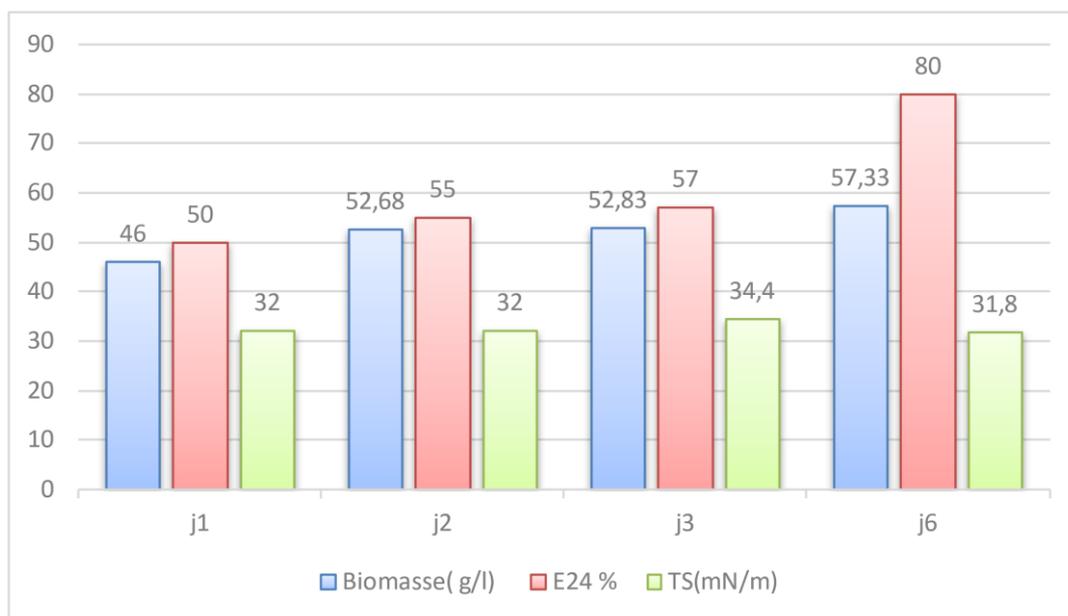


Figure 21: Cinétique de production du biosurfactant de la souche 138

4.Extraction du biosurfactant

Bien que le choix des substrats utilisés dans la production de BS présente une influence sur le processus général, la productivité et le coût du biosurfactant, l'extraction et la purification du biosurfactant pour un produit commercialisable constituent 60 à 80 % des coûts de production totaux. Ce qui rend la production commerciale de biosurfactants/bioémulsifiants assez coûteuse. Des méthodes de réduction des coûts par l'utilisation de substrats peu coûteux et renouvelables sont donc nécessaires. En général, la charge ionique (chromatographie), la solubilité (eau/solvants organiques), le poids moléculaire et l'emplacement (intracellulaire, extracellulaire, lié aux cellules) déterminent la procédure d'extraction et de purification du biosurfactant/bioémulsifiant à extraire [2,104,105,106].

Extraction par solvant : Les fractions hydrophobes de BS sont solubles dans certains solvants qui aident à l'extraction et à la séparation du produit brut. Différents solvants, (extraction par un solvant ou combinés) tels que le chloroforme, le méthanol, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane, le butanol, le pentane, l'hexane, l'acide acétique, l'éther diéthylique, l'isopropanol sont couramment utilisés pour l'extraction du BS/BE. Cependant, les solvants sont connus par leurs toxicités et leur coût élevé. Par conséquent, il est très nécessaire d'utiliser des solvants peu coûteux et moins toxiques pour la récupération du BS [107, 108,109].

- **Extraction par précipitation**

Notre produit est soluble dans le mélange acétate d'éthyle et méthanol, cette extraction permis d'obtenir un biosurfactant d'une couleur miel. La quantification des extraits bruts des biosurfactant a révélé que la souche 138 a produit un biosurfactant, avec un rendement de 13 g/L.



Figure 22:Biosurfactant extrait par d'acétate d'éthyle-méthanol

- **Extraction liquide-liquide**

Dans cette extraction, nous avons utilisé l'acétate d'éthyle seul comme solvant. Le produit obtenu est liquide visqueux de couleur marron.



Figure 23:Biosurfactants extrait par l'acétate d'éthyle

5.Caractérisation du biosurfactant

5.1. Pouvoir émulsifiant

Le test d'émulsification (E_{24}) de surnageant de souche 138 et a donné de très bons résultats : 85.8%. Une bonne stabilité d'émulsion a été observée pendant deux mois de stockage.

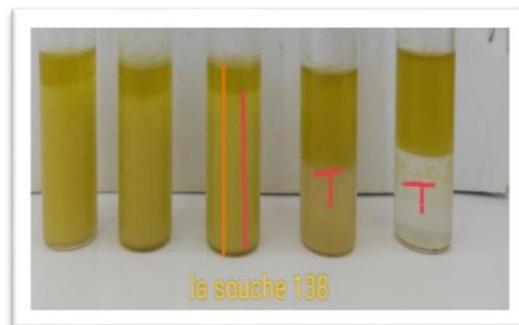


Figure 24:Résultat de pouvoir émulsifiant

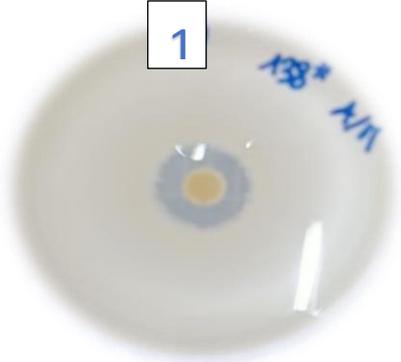
5.2. Activité antimicrobienne des biosurfactants

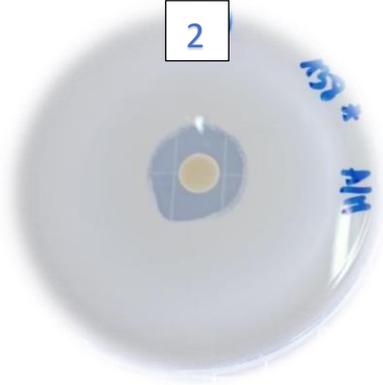
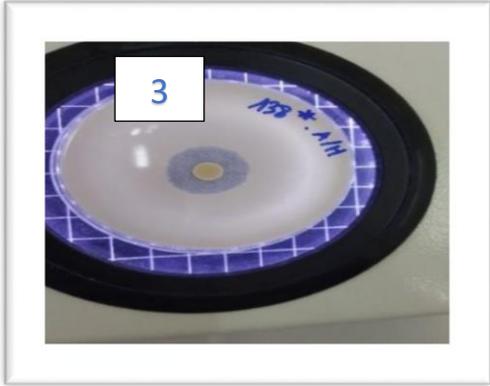
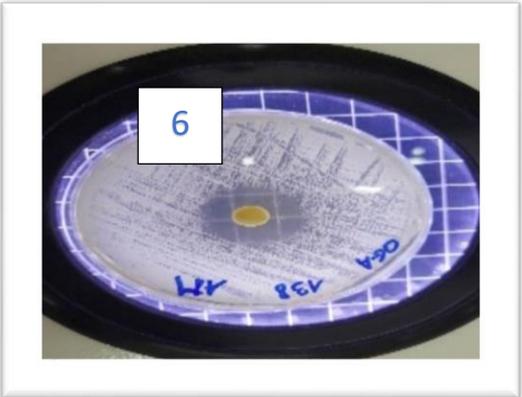
Les biosurfactants ont des propriétés antimicrobiennes intéressantes, ils sont utilisés non seulement dans l'industrie pharmaceutique mais aussi dans l'industrie alimentaire car ils peuvent être utilisés comme bioconservateurs. Plusieurs biosurfactants ont montré une activité antimicrobienne contre une variété de microorganismes.

L'activité antibactérienne des biosurfactants est attribuée particulièrement à leur nature amphiphile qui leur permet d'interagir avec différents constituants membranaires [110]. Dans ce cadre, le potentiel antimicrobien de biosurfactant produit par la souche performante a été mis en évidence contre des bactéries pathogènes Gram positif et Gram négatif, ainsi que *Candida albicans*, les résultats sont comme suit :

Le potentiel anti microbien de biosurfactant extrait par l'acétate d'éthyle et le méthanol produit par la souche 138 a été mis en évidence contre des bactéries pathogènes Gram positif : *Listeria monocytogenes* (ATCC13932), *Enterococcus faecium* (ATCC51559) et Gram négatif : *Escherichia coli* (25922), *Agrobacterium tunefaciens* (ATCC23308), *pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) et une levure pathogène : *candida albicans* (ATCC10231).

Tableau 10 : Activité antimicrobienne de biosurfactant de la souche 138 extrait par l'acétate d'éthyle et le méthanol

<p>Activité antibactérienne sur milieu LB de biosurfactant contre la souche 1 <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 13932) Gram+</p> <p>Le diamètre est de 21mm</p>	
--	--

<p>Activité antibactérienne sur milieu LB de biosurfactant contre la souche 2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATCC 23308) Gram-</p> <p>Le diamètre est de 23mm</p>	
<p>Activité antibactérienne sur milieu LB de biosurfactant contre la souche 3 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) Gram-</p> <p>Le diamètre est de 25mm</p>	
<p>Activité antibactérienne sur milieu LB de biosurfactant contre la souche 5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027) Gram-</p> <p>Le diamètre est de 23mm</p>	
<p>Activité antifongique sur milieu OGA de biosurfactant contre la souche 6 <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)</p> <p>Le diamètre est de 24mm</p>	

L'antibiogramme réalisé sur les souches pathogènes testés montre le pouvoir inhibiteur de biosurfactant produit par la souche 138, seulement où il apparaît une zone claire à cause de la diffusion des molécules du biosurfactant.

L'extrait brut de biosurfactant produit par la souche 138 a montré leur plus forte activité anti bactérienne contre *Escherichia coli* ATTC25922 ($\varphi = 25\text{mm}$), et aussi une activité similaire contre *Agrobacterium tunefaciens* (ATCC23308), *pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) : ($\varphi=23\text{mm}$) *Listeria monocytogenes* (ATCC13932) ($\varphi=21\text{mm}$) et une activité anti fongique remarquable contre : *candida albicans* (ATCC10231) ($\varphi= 25\text{mm}$).

Il a t signale que les rhamnolipides sont connus pour leur activité antimicrobienne. Des auteurs ont montré que ces biosurfactants sont des agents bactériostatiques très efficaces contre *Listeria monocytogenes*, lié à la contamination alimentaire. Ces molécules ont montré un effet synergique lorsqu'il est combiné avec la Nisine, une bactériocine à large spectre [49].

5.3Activité antioxydante

[119,120,121] L'évaluation du pouvoir antioxydant a été réalisé en utilisant la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH.

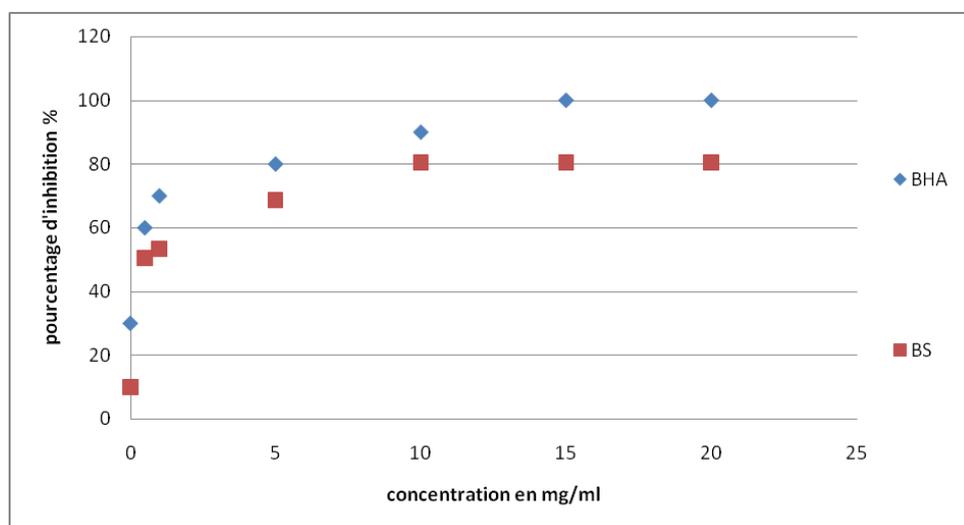


Figure 25:Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction de la concentration de biosurfactant

La réaction de DPPH avec le biosurfactant de la souche 138 à différentes concentrations allant de 0.5 à 20 mg/ml a été déterminé et comparée avec celle de synthétique BHA en tant que

contrôle positif. En effet à 10, 15, 20 mg/ml le biosurfactant a présenté un pourcentage d'inhibition de 80.6 % ce qui deux fois de celui obtenu à 0.5 mg/ml 50.6 %.

Les valeurs de IC50 de biosurfactant et le BHA ont été estimés de 0.5 mg/ml et de 0.048 mg/ml respectivement. Ces valeurs étaient inférieures à celle trouvées dans le contrôle positif BHA.

Le biosurfactant à des concentrations faibles possédait un pouvoir réducteur trois fois plus faible que le BHA, ces valeurs inférieures peuvent être causées par des tenures en groupes hydroxyle inférieures à celles présente dans le témoin.

Ces résultats indiquent que le biosurfactant obtenu à partir de souche 138 à la capacité de piéger les radicaux libres et que ces résultats suggèrent que le biosurfactant pourrait être utilisé comme antioxydant naturel alternatif.

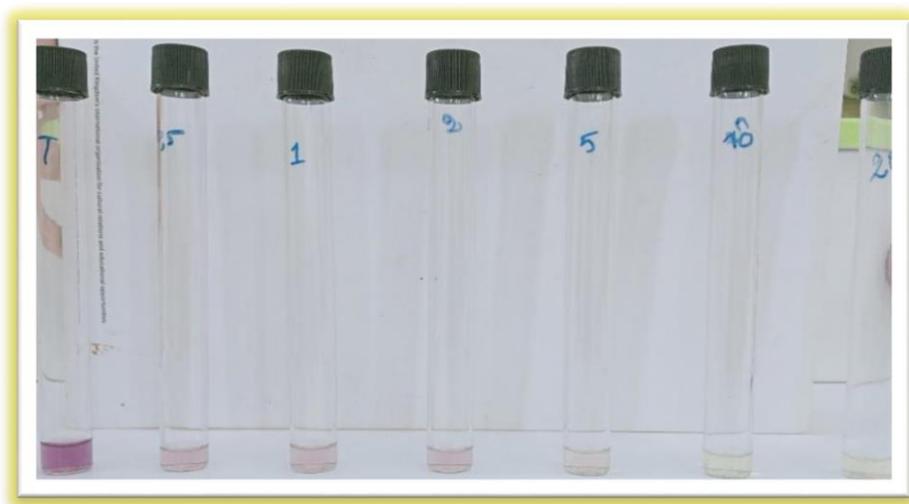


Figure 26:Dégradation du DPPH par le biosurfactant

5.4. Test rhamnose

Le test Rhamnose basé sur la méthode de [88] est positif (changement de couleur, une coloration rougeâtre) cela veut dire que le biosurfactant produits par la souche 138 peut être un glycolipide (de type rhamnolipide).

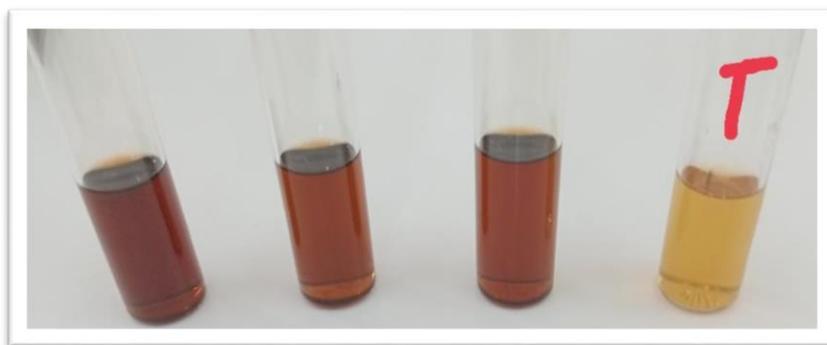


Figure 27:Test Rhamnose sur le biosurfactant

5.5. Analyse par CCM

Les deux plaques de CCM révélés par UV montrent que notre produit est en fait un mélange de différents produits, comportent à la fois des composés lipidiques et glucidique, et vu que le test Rhamnose est positif il est probablement un biosurfactant glycolipidique de type rhamnolipide, (possibilité d'une ou deux molécules de rhamnose sont liées à une ou deux molécules d'acide β -hydroxydécanoïque).

D'après [111, 112], les échantillons chromatographiés ou des extraits de biosurfactants ont été dissouts en utilisant une phase mobile de (chloroforme / méthanol / acide acétique) qui ont été séparés sur des plaques de gel de silice 60 dans un rapport (65/15/20) comme système de solvant pour la détection des glucolipide) [111], et dans un autre système : (chloroforme-méthanol-eau) par un rapport de (65/25/10) pour révéler les lipopeptides [112]. Les taches résultantes sur la CCM ont été visualisées.

Pour le système 1 : $R_f=0.68$

Pour le système 2 $R_f= 0.5$

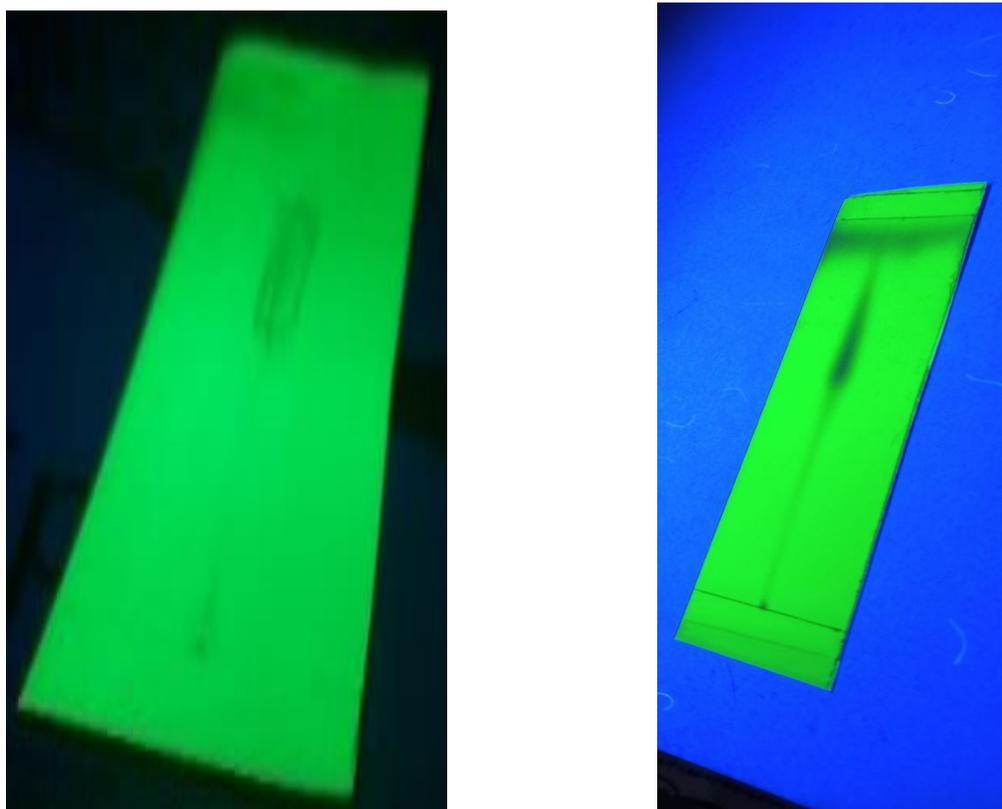


Figure 28:Plaque CCM

5.6. Analyse par FTIR

L'analyse par FTIR peut identifier les différentes liaisons chimiques existant dans le biosurfactant et par suite déduire ses groupement fonctionnels (cétones, amides, acides carboxyliques, esters, ...). A partir de ces informations on peut connaitre de quelle nature appartient le biosurfactant (nature glycolipidique, lipopeptidique, ...).

La Figure **III.10** Montre des spectres FTIR typiques enregistrés entre 400 et 4000 cm^{-1} de biosurfactant issu de la souche levurienne 138.

Les groupes fonctionnels présents dans le biosurfactant ont été déterminées par spectroscopie infrarouge FTIR (Fig **III.10**).

Les spectres montrent de larges bandes au nombre d'onde 3300 cm^{-1} qui peuvent être attribuées à des vibrations d'étirement -OH des groupes hydroxyles.

Le pic affiché à 1640 cm^{-1} indique la présence d'un carbonyle -C = O caractéristique d'un groupe ester carbonyle.

Le pic de 1280 cm^{-1} peut également être attribué au C–O.

La bande à 1394 cm^{-1} peut également être attribué au C–H des groupes CH_2 et CH_3 .

Le pic de 1060 cm^{-1} peut être attribué aux liaisons C–O–C des acides carboxyliques caractéristiques de la fonction ester dans la structure du biosurfactant.

Le pic à 1100 cm^{-1} est des liaisons C–C (alcane).

La bande à 675 cm^{-1} est due à la déformation par vibration C–H cyclique.

Les détails des spectres du biosurfactant sont caractéristiques du rhamnolipide [113, 114, 115].

Une bande près de 1400 cm^{-1} était due à la déformation par vibration $\delta(\text{CH})$,

Un pic autour de 1400 cm^{-1} était dû à l'étirement antisymétrique COO^- , et la flexion C–H des groupes CH_2 et CH_3 a été enregistrée.

Une bande d'absorption autour de 1060 cm^{-1} correspond aux vibrations du groupe –COC– dans les structures cycliques des glucides et a confirmé la présence de liaisons formées entre l'atome de carbone et les groupes hydroxyle dans les structures chimiques des anneaux de rhamnose. Ce type de spectres FTIR est caractéristique des glycolipides, par ex. d'autres biosurfactants glycolipidiques rapportés dans la littérature ont également produit des spectres d'absorption IR similaires [116]. La nature glycolipidique du biosurfactant a été confirmée en comparant les spectres IR de cette fraction avec les résultats précédents obtenus dans la littérature [117,118]. Dans l'ensemble, l'analyse des profils FTIR a confirmé que le biosurfactant issu de la souche levurienne est probablement un biosurfactant glycolipidique. Rappelons que cette nature glycolipidique a été confirmée par le test rhamnose positif.

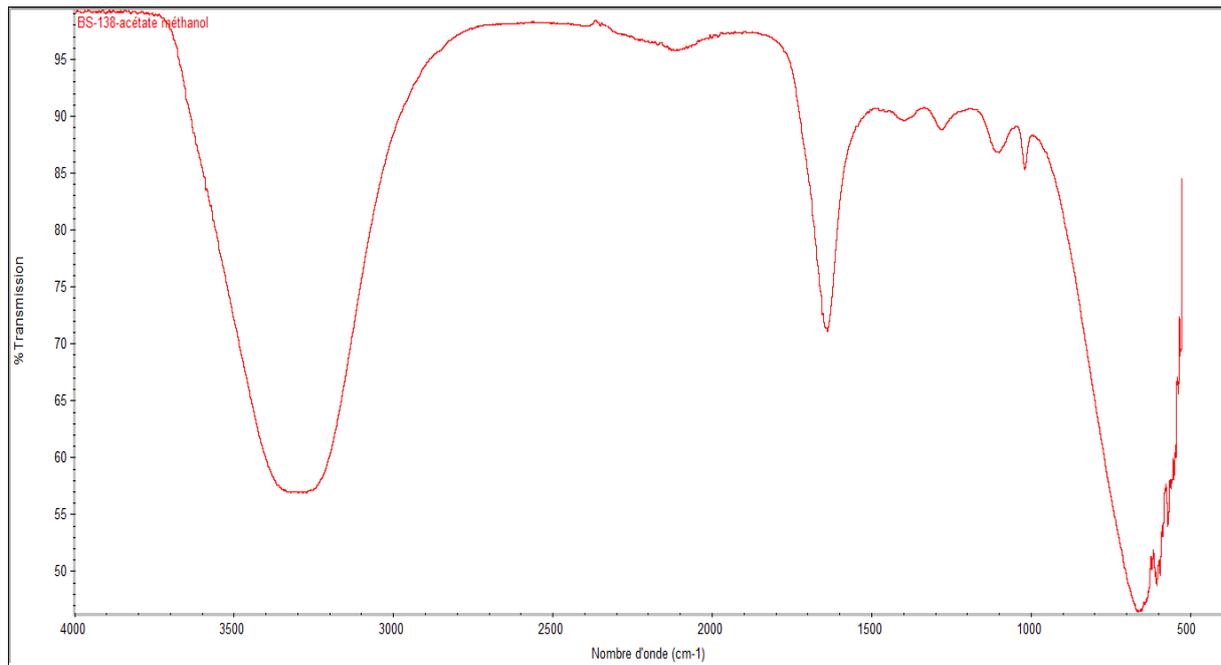


Figure 29: Spectres IR de biosurfactants de la souche 138

6. Application en agroalimentaire

Dans l'industrie alimentaire, les biosurfactants peuvent être utilisés pour le nettoyage, le traitement des surfaces de contact et formulations des émulsions, agissant comme agents antimicrobiens, antibiofilm et émulsifiants. Les biosurfactants peuvent être incorporés directement dans les formulations en tant qu'additifs ou ingrédients [46, 47]. L'utilisation de biosurfactants comme additifs alimentaires s'inscrit dans l'intérêt croissant des consommateurs pour les aliments naturels et biologiques nécessitant le développement de biomolécules aux propriétés technologiques capables de réduire voire de supprimer l'utilisation de tensioactifs synthétiques ou des composés contenant le cholestérol comme le jaune d'œuf d'où la recommandation de limiter la consommation d'œufs [48].

Dans ce cadre, nous avons essayé d'intégrer le biosurfactant, en tant qu'émulsifiant, issu de la souche 138 dans la formulation de la mayonnaise en substituant le jaune d'œuf partiellement ou complètement. Trois formulations ont été préparées : Formulation 1, 2, 3 et témoin (mayonnaise LISIEUR).

Après que la sauce mayonnaise a été réalisée nous avons observé la stabilité des échantillons 1 et 2.

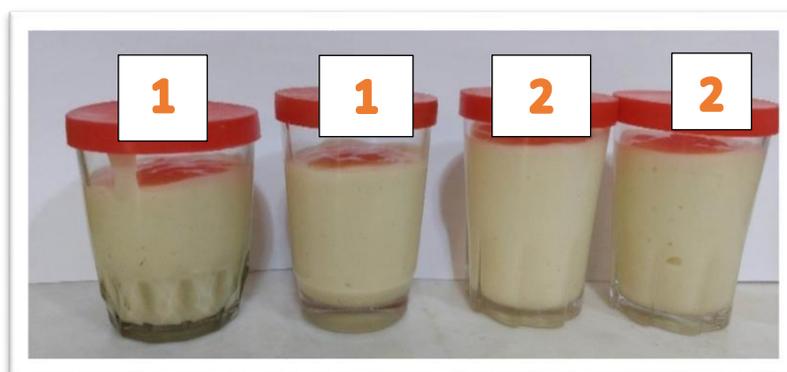


Figure 30:Mayonnaise après 8 jours

Après une semaine

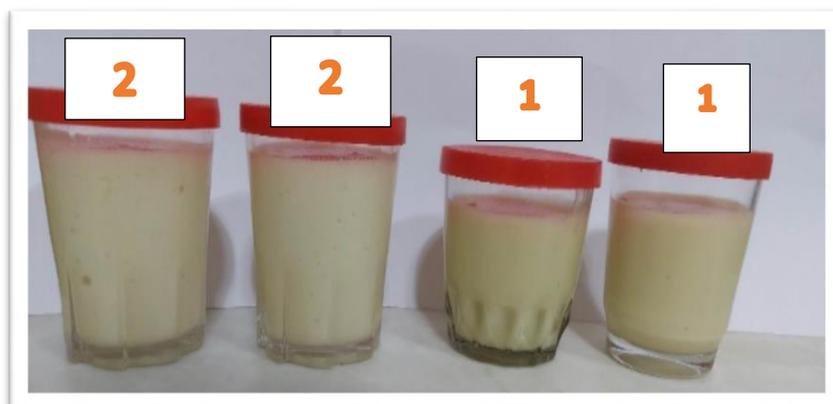


Figure 31:Mayonnaise après 21 jours

Les échantillons sont restés stable (pas de déphasage entre les phases aqueuses et huileuses). Les analyses physico-chimiques et les analyses microbiologique ont été réalisées sur l'échantillon **2** de la sauce mayonnaise.

Examen préliminaire

- **Aspect et couleur :** préparation semi liquide de couleur crème
- **Odeur :** caractéristique du produit
- **Examen macroscopique :** absence de particules étrangères

D'après l'examen préliminaire de la mayonnaise, notre émulsion de mayonnaise répond aux exigences de la mayonnaise commerciale en aspect visuel, odeur et couleur.

Indicateurs physico- chimiques

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau

Tableau 11 : Analyses physico-chimiques de la mayonnaise

Paramètre	Unité	Résultat	Normes	Références
pH	-	3.39	2.5 et 4.5	pH mètre
Acidité	%	5.7	2.5 à 6	ISO 750
Extrait sec	%	92.05	80 à 95	JORA N° 08 du 6/2/2013
Humidité	%	7.95	6 à 8	JORA N°08 du 6/2/2013
Viscosité	CPs	10800	10000 à 40000	Viscosimètre
Résidu soluble	sec %	4.84	4 à 6	ISO 2173

Le pH de la mayonnaise peut avoir un effet dramatique sur l'effet de la structure de l'émulsion, il est à noter que le pH relativement faible est un avantage du point de vue de la stabilité de la mayonnaise.

Indicateurs microbiologiques

Tableau 12 : Analyses microbiologiques de la mayonnaise

Germes recherchés	Unité	Résultats	Référence
Germes aérobies à 30°C	UFC/g	Absence	NA 1207
Entérobactéries	UFC/g	Absence	ISO 21528-1
<i>Escherichia coli</i>	UFC/g	Absence	ISO 7251
<i>Coliformes thermo-tolérants</i>	UFC/g	Absence	ISO 11290-2
<i>Staphylocoques</i> à coagulase +	UFC/g	Absence	NA15164
<i>Anaérobies sulfite-réducteurs</i>	UFC/g	Absence	NA 15176
<i>Salmonella</i>	UFC/g	Absence	NA 1203
<i>Anaérobies sulfite-réducteurs</i>	UFC/g	Absence	NA15527
Levures	UFC/g	Absence	NA761
Moisissures	UFC/g	Absence	NA761

Les analyses ont montré que la stabilité microbiologique de la mayonnaise dépend des conditions de sa préparation.

L'analyse des coliformes totaux et des levures et moisissures n'a révélé la présence d'aucun germe alors que la norme tolère 10 par gramme de la mayonnaise ceci témoigne d'un bon niveau d'hygiène pour la préparation de la mayonnaise.

L'absence de la flore microbienne dans la mayonnaise est peut-être due au pH acide, à la teneur élevée en matière grasse, sans oublier la présence du biosurfactant.

Donc notre biosurfactant a prouvé son efficacité en tant qu'agent antimicrobien et il a bien confirmé son rôle de conservateur sans ajouter des conservateurs chimiques synthétiques.

Conclusion générale

Ces dernières années le monde s'oriente vers les alternatives qui protègent l'homme et l'environnement dont la consommation des produits bio.

Les biosurfactants sont des biomolécules qui présentent un intérêt économique et environnemental à cause des différentes propriétés et applications dans de nombreux domaines industriels.

La production des biosurfactants à partir des plantes ou bien des souches bactériennes présente toujours un problème de rentabilité (rendement faible). Il est prévu que dans le futur, des souches levuriennes super-actives seront développées en utilisant des substrats renouvelables comme matière première.

Les fruits sont considérés comme milieu favorable pour la croissance et la reproduction des levures, lorsque les bonnes conditions du milieu sont réunies ces dernières sécrètent des métabolites secondaires dont des Biosurfactants.

Dans le cadre de ce présent travail, nous avons essayé d'apporter notre contribution à l'étude de criblage pour choisir la souche performante, la production, la caractérisation et l'application en agroalimentaire d'un biosurfactant issu d'une souche levurine isolée localement à partir d'un fruit « le grenade ».

La souche 138 s'est révélée performante ($E_{24} > 80\%$, $TS = 30 \text{ mN/m}$, $DDP \geq 4.5 \text{ cm}$).

La souche 138 a montré un rendement de biosurfactant très élevé ($R = 13 \text{ g/l}$), ainsi présente une activité antimicrobienne remarquable contre la totalité des souches tests utilisées (bactéries Gram positif et Gram négatif ainsi que *Candida albicans*) (le diamètre de la zone d'inhibition est entre 25 et 21 mm) et aussi une activité anti oxydante très intéressante (un pourcentage d'inhibition de 80.6 %).

Le biosurfactant de la souche 138 a été partiellement caractérisé comme biosurfactant glycolipidique par le test rhamnose, la chromatographie sur couche mince (CCM), et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR).

Vu leurs propriétés intéressantes (émulsifiante, anti microbienne, antioxydante, réduction de la tension de surface) une application de biosurfactant en agroalimentaire a été réalisée par la

préparation d'une sauce mayonnaise qui a prouvé des caractéristiques (physico-chimiques et microbiologique) similaires à celles de la mayonnaise commerciale.

A la lumière des résultats obtenus, il est souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies, à savoir :

- ✓ L'identification complète de la souche 138 par les outils de la biologie moléculaire.
- ✓ Utilisation d'autres techniques d'analyse (HPLC, LC-MS, RMN,) pour confirmer la Structure de biosurfactant issu de la souche 138.

Approfondir l'étude rhéologique afin de mieux comprendre les interactions moléculaires entre les différents composants d'une mayonnaise type

- ✓ L'application de ce biosurfactant comme agent émulsifiant, bioconservateur dans plusieurs domaines (pharmaceutique, cosmétique, ...).
- ✓ La production de biosurfactants à l'échelle industrielle.

Références bibliographiques

[1] <https://www.marketsandmarkets.com>

[2] Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S. **2000**. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. 53 :495-508.

[3] Makkar R.S., Cameotra S., Banat I.M. **2011**. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production *AMB Express* 28:1-5.

[4] Marchant R and Banat I.M. **2012**. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *trends biotechnology*. 30 :558-565

[5] A. Salihu, I Abdulkadir and Almustapha . **2009**. An investigation for potential development on biosurfactants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* Vol. 3 (5), pp. 111-117.

[6] Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Oliveira R. **2006**. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*. 32:135-142.

[7] Buzzini P., Branda E., Goretti M., Turchetti B. **2012**. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiology*. 322:217-241.

[8] Monterio A.S., Coutinho J.O.P.A., Junior A.C., Rosa C.A., Siqueira E.P., Santos V.L. **2009**. Characterization of new biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72 isolated from dairy industry effluents. *Journal of Basic Microbiology*. 49:553-563.

[9] Sen S., Borah S.N., Bora A., Deka S. **2017**. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microbial Cell Factories*. 16:95-109.

[10] Silva A.C.S.D., Santos P.N.D., Lima e Silva T.A., Silva Andraade R.F., Campos-Takaki G.M. **2018**. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. *Arquivos do Instituto Biológico*. 85:1-12.

[11] Fiechter A. **1992** "Biosurfactants: moving towards industrial application", *Tibtech*, 10, 3 – 12.

[12] West C.C. and Harwell J.H., **1992**"Surfactants and subsurface remediation", *Environ. Sci. Technol.*, 36 (12), 2324 – 2330.

[13] ShafieiZ, Abdul Hamid A, Fooladi T and yusoff W.M.W. **2014**. Surface-active components: Review. *Current Research journal of biological sciences*. 6:89-95.

[14] Desai J.D and Banat I.M. **1997**. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology Reviews*. 61:47-64.

[15] Michele Alves Sanches, Isabella Galvão Luzeiro, Ana Cláudia Alves Cortez, Érica Simplício de Souza, Patrícia Melchionna Albuquerque, Harish Kumar Chopra, and **João Vicente Braga de Souza** . **2021**. Production of Biosurfactants by Ascomycetes. *international journal of microbiology*

[16] Cooper D.G and Paddock D.A. **1984**. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied Environmental Microbiology*. 47:173-176.

[17] Inoue S. Et Itoh S. **1987**. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* microbial surfactant in Alkane fermentation, *biotechnol. Let*, vol. 4, 199-205.

[18] Kappeli O. et Finnerty W. R. **1979**. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *J. Bacteriol*, 140:707–712.

[19] Drakontis C.E., Amin S. **2020**. Biosurfactants :“Formulations, properties, and applications”. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* ;48:77–90.

[20] Wise, Willumsen P.A et Karlson U. **1997**. Screening of bacteria isolated from PAH contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* 7, 415– 423.

[21] Bognolo G. **1999** .Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152, (1-2), 41-52

[22] Bezerra KGO, Rufino RD, Luna JM, et al 2018 . Saponins and microbial biosurfactants: “potential raw materials for the formulation of cosmetics”. *Biotechnol Prog* ; 34(6):1482–93.

- [23] Nitschke M, Costa SG **2007**“biosurfactants in food industry”.Trends. Food .Sci .Tech.18:252-259.
- [24] Déziel E.,Leptine F., Milot S., Villemur R.**2000**.Mass Spectrometry monitoring of rhamnolipids from growing culture of *pseudomonas aeruginosa* strain from 57Rp.Biochimica et biophysica Acta. 485:145-155.
- [25] Pereira, J.F., Gudiña, E.J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J.A., Coutinho, J.A., Rodrigues, L.R., **2013**« Optimization and characterization of biosurfactant production by Bacillus subtilis isolates towards microbial enhanced oil recovery applications”. Fuel 111, 259-268.
- [26] Alvarez V.M., Jurelevicius D., Marques J.M., de Souza P.M., de Araújo L.V., Barros T.G., de Souza R.O., Freire D.M., « Seldin L. **2015**Bacillus amyloliquefaciens TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery ». Colloids Surf. B Biointerfaces ; 136:14–21.
- [27] Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Shibulal, B.**2014** “Biosurfactant production by Bacillus subtilis B30 and its application in enhancing oil recovery”. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.114, 324-333.)
- [28] Johnson, M. K. and Boese-Marrazzo, D., **1980**“Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*“. Infect. Immun. 29 (3), 1028 - 1033.)
- [29] Ferhat, S.,Blida,Novembre **2012** « La production de biosurfactants par des souches de Brevibacterium Et Ochrobactrum isolées localement à partir d“un sol contaminé par le petrolebrut »,
- [30] Pacwa-plociniczakM., G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S.**2011**. Environmental applications of biosurfactants : Recentadvances. International journal of MolecularSciences . 12 :633-654.
- [31] Mulligan C.N.**2009**.Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. Current opinion colloid Interface Sci 14: 372-378.
- [32] Mnif I and Ghribi D.**2015**. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. Biopolymers.104:129-147

- [33] Cirigliano, M.C. and Carman, G.M. (1984), Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 48, 747-750.
- [34] Sarubbo L.A., Farias C.B., Campos-Takaki G.M. 2007. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Current Microbiology*. 54:68-73.
- [35] Marti, M.E., Colonna, W.J., Patra, P., Zhang, H., Green, C., Reznik, G., Pynn, M., Jarrell, K., Nyman, J.A., Somasundaran, P., Glatz, C.E., Lamsal, B.P., 2014. « Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation ». *Enzyme Microb. Technol.* 55, 31- 39.
- [36] Zhi, Y., Wu, Q., Xu, Y., 2017 « Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45 ». *Sci. Rep.* 7, 1-13.
- [37] Santos, D.K.F., Meira, H.M., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., 2017 « Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent ». *Process Biochem.* 54, 20-27
- [38] Mokdad kamila, 2015, mémoire de magistère « criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants isolées localement, optimisation de la production et caractérisation de biosurfactants en vue d'une application en agroalimentaire »
- [39] Lang S. et Wullbrandt D. 1999. Rhamnose lipids biosynthesis – Microbial production and application potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 22-32.
- [40] Kebbouche-Gana S., Gana M.L., Khemili S., Fazouane –Naimi F., Bouanane N.A., Penninckx M., Hacene H. 2009. Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36:727-738.
- [41] Santos D.K.F., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. 2016. Biosurfactants : multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*. 17:401-432.
- [42] Luna J.M., Rufinrio R., L.A., Campos-Takaki G.B. 2013. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 102:202-209.

- [43] Sophie Gabet .2004. Thèse de doctorat « Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique »
- [44] Khelouialamia.2022. these de doctorat « étude d'une production d'un biosurfactant issu d'une souche bactérienne thermophile isoléelacalement à partir d'une région polluée par les hydrocarbures : application agro-alimentaire.
- [45] Banat I. M.,1995"Biosurfactants production and possible uses in microbialenhanced oil recovery and oil pollution remediation": a review. *BioresourceTechnol.* 51, 1– 12.
- [46] Nitschke and Silva. 2018. Rcent food applications of microbial surfactants,Critical reviews in food science and nutrition 58(4),631-638.
- [47] Khanna and pattnaik2019. Production and functional characterization of foof compatible biosurfactants, environmental science .
- [48] Jahan R., Bodratti A. M., TsianouM., Alexandridis P. 2020. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: physicochemical properties and applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* 275:102061. 10.1016/j.cis.2019.102061.
- [49] Karlas teixeira souzaetal 2017"New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain Wickerhamomycesanomalous CCMA0358".colloids and surfaces B:Biointerfaces. 154:373-82.
- [50] Araujo L.V., Abreu F., Lins U., Anna L.M.M.S., Nitschke M., Freire D.M.G. 2011. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion Food Research International, 44 , pp. 481–488.
- [51] Ongena M et Jacques P. 2008. Bacillus lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol, Trends Microbiol. 16 115–125.
- [52] Larpentjean-paul .1991. biotechnologie des levures.Masson, Milan Barcelone Bonn.paris.p.97.127
- [53] Lachance M.A.2012. in defense of yeast sexual life cycles : the forma asexualis – an informal proposal. *Yeast Newsletters.*61:24-25.
- [54] Bourdjoie et larpent .1996.Microbiologie alimentaire. VolII : Aliments fermentés et fermentation alimentaire. (ED).lavoisier.paris.p.523.

- [55] Kutzman et al . ,**2011**. The yeasts :a taxonomic study.5thednAmsterdam:Elsevier
- [56] Larpent-Gourgaud .**1997**. Mémento technique de microbiologie-3^{ème} Edition Ed Tec&DOC.p.1039.
- [57] LarpentJ.P.**1997**.Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire de laboratoire.leslevures.Tec et Doc. Lavoisier.p.464-472.
- [58] Kreger vanRij N.J.W.**1984**.The Yeasts : a taxonomic study.3rdednAmsterdam:Elsevier.
- [59] MadiganM.T and Martinko J.M.**2007**..Biologie des microorganismes.11^{ème} édition.pearson Education. Broek.France p.478-479.
- [60] Satyanarayana.T et kunzeG.**2009**.Yeast biotechnology :Diversityand Applications.SpringerScience,New Delhi.p.744.
- [61] Mehta RM .Dispensing Pharmacy ; third edition Published by Vallabh Prakashan , New Delhi ;2010.p.197-222
- [62] Madaan, V., A. chanana, et al. **2014**. "Emulsion Technology and Recent Trends in Emulsion Applications." International Research Journal of Pharmacy**5**(7): 533-542.
- [63] CAULLET Laurine, DOS SANTOS Alexandra , KNIPPERGeoffrey ,RUSALEN Margaux et SEIGNEURMarie "<rapport-final-emulsions-**2018**.pdf>."
- [64] Doumeix Olivier,Consulté le 1er décembre **2017**, Les émulsions
- [65] Gaud RS et al. **2008**, Indian Journal of pharmaceutical education and Research
- [66] Dupsquier M.-L., Nazari A.,FONTAINE-VIVE F.,FERNANDEZ X., GOLEBIEWSKI J., CDIEC, Université de Nice Sophia Antipolis, Formulation cosmétique, Les émulsions. surhttp://ressources.unisciel.fr/formulation_cosmetique/co/1-3.htm
- [67] Rondon villate Céline, Thèse: Étude des mécanismes de libération d'actifs nanodisperses : Application au traitement de puits, décembre **2010**. Université de Bordeaux I Disponible sur : http://ori-oai.u-bordeaux1.fr/pdf/2010/RONDON_CELINE_2010.pdf [consulté le 13 novembre 2017]
- [68] http://ressources.unisciel.fr/formulation_cosmetique/co/1-3.htm

[69]"<les_emulsion_pharmaceutique_2021.pdf>."

[70] Santos DKF, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA **2016**. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int J Mol Sci* 17(3):401

[71] Uzoigwe C, Burgess JG, Ennis CJ, Rahman PKSM **2015** Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front Microbiol* 6 :245

[72] Rosenberg E, Ron EZ **1999** High- and low-molecular mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 52(2):154–162

[73] Dubeau D. **2009**. Etude de la production de rhamnolipides par *Burkholderia*. Mémoire de master : Microbiologie appliqué. Université de Québec.

[74] Shen et al 2011 Fast and highly efficient removal of dyes under alkaline conditions using magnetic chitosan-Fe (III) hydrogel

[75] Fabian et al **2019** ASSESSMENT OF A SURFACTANT- POLYMER FORMULATION APPLIED TO THE CONDITIONS OF ONE COLOMBIAN FIELD

[76] Stadlman et al 2003 En ligne Stadelman, WJ (2003). OEUFs | Structure et composition. Encyclopédie des sciences alimentaires et de la nutrition. Cambridge, MA : Presse académique.

[77] Atmalekia, A., Sadani, M., Raofi, A., Miri, A., Bajestanie, G.S., Fakhri, Y., et al. (2020). The concentration of potentially toxic elements (PTEs) in eggs: a global systematic review, meta-analysis and probabilistic health risk assessment. *Trends in Food Sci. Technol.* 95, 1-9

[78] J. Valenzuela-Elgueta, Y. Jimenez, S. Ahualli, A.V. Delgado Electrokinetics and stability of silica/clay mixtures at high copper concentration

[79] Solaiman, D.K.Y.; Ashby, R.D.; Nuñez, A.; Foglia, T.A. **2004** Production of Sophorolipids by *Candida Bombicola* Grown on Soy Molasses as Substrate. *Biotechnol. Lett.*, 26, 1241–1245

[80] Van Bogaert INA, Saerens K, De Muynck C et al. **2007** Microbial production and application of sophorolipids. *Appl Microbiol Biotechnol* ; 76:23-34. 64.

- [81] Van Bogaert INA, De Maeseneire SL, De Schampelaire W et al. **2007** Cloning, characterization and functionality of the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (URA3) of the glycolipid-producing yeast *Candida bombicola*. *Yeast* ; 24:201-208
- [82] Badour AA Miller -maier RM **1998**. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant producing microorganisms . *Journal of Microbiologie Méthodes* 32:273-280
- [83] Stapute S.K. Bhawsar B.D Dhakephalkar P.K. Chopade .B.A.**2008** assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria
- [84] Yalouï Guellal et al 2018 “production of biosurfactants by hydrocarbons degrading bacteria isolated from Soummam watershed sediments of Béjaïa in Algeria” *Environmental Progress & Sustainable Energy*/volume 37; p 189-195
- [85] Li et De Orduna M.R.(2003).A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance . *Frontiers in Microbiology*.50:283-288
- [86] Derguine mechri Louiza 2019, thèse de doctorat, production et caractérisation des biosurfactants par des levures et des moisissures
- [87] Rafino et al **2011**, Evaluation antimicrobienne et anti-adhésive des propriétés du biosurfactant lunasan produit par *Candida spherica* UCP0995
- [88] Dubois et al **1956** colorimétrique méthode pour la détermination des sucres et des substances connexes
- [89] Tyrkovskaya O.V.Dmitrieva and Yu. Murator, “A biosurfactant producing *Pseudomonas aeruginosa* strain”. *Applied Biochemistry*. Vol 37, N°1, pp 71-75,(2001)
- [90] Kiran et al 2009 Optimisation et production d'un biosurfactant à partir du champignon marin associé à la spongia *Aspergillus ustus* MSF3
- [91] Zinjarde SS, Pant A.**2002** Emulsifiant d'origine marine à partir d'une levure marine, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol*; 42:67-73.
- [92] Sarubbo LA, Farias CBB, Campos-Takaki GM. **2007** Co-utilisation de l'huile de canola et du glucose dans la production d'un surfactant par *Candida lipolytica*. *Current Microbiology*; 54:68-73.
- [93] Amaral PFF, Lehoccky M, da Silva JM et al.**2006** Production et caractérisation d'un bioémulsifiant à partir de *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem* ; 41:1894-1898.

- [94] Sheperd R, Rockey J, Sutherland I et al. **1995** Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *J Biotechnol*; 40:207-17.
- [95] Barth G, Gaillard C. **1997** Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev*; 19:219-37.
- [96] Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. **2010**. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(2), 127–144.
- [97] Batista S B , Mounteer A H, Amorim F R, Tótola M R. **2006** Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour Technol. Apr*; 97(6): 868-75.
- [98] Sharma D, Saharan BS, Kapil S **2016**. Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria. (Eds.) Sharma D, Saharan BS, Kapil S. Springer Briefs in Microbiology Deepansh
- [99] Youssef, N.H.; Duncana, K.E. ; Naglea, D.P. ; Savagea, K.N. ; Knappb, R.M. and McInerney, M.J. **2004**. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, 56 , pp. 339-347
- [100] Sarubbo LA, Marçal MC, Neves MLC et al. **2001** Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Appl Biochem Biotechnol* ; 95:59-67
- [101] Amaral PFF, Lehocky M, da Silva JM et al. **2006** Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem* ; 41:1894-1898.
- [102] Lukondeh T, Ashbolt NJ, Rogers PL. **2003** Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as a source of yeast autolysates. *J Ind Microbiol Biotech*; 30:52-56
- [103] Zinjarde SS, Pant A. **2002** Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol* ; 42:67-73
- [104] Banat, I.M.; Satpute, S.K.; Cameotra, S.S.; Patil, R.; Nyayanit, N.V. **2014** Cost Effective Technologies and Renewable Substrates for Biosurfactants' Production. *Front. Microbiol.* , 5, 697.

- [105] Makkar RM, Cameotra SS. **1997**. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J Ind Microbiol Bioeng* 18: 37–42.
- [106] Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. **2006**. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother* 57: 609–618.
- [107] Desai JD, Banat IM. **1997**. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 47–64.
- [108] Smyth TJP, Perfumo A, Marchant R, Banat IM. **2009a**. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids: Microbiology of hydrocarbons, oils, lipids, and derived compounds. In: Kenneth N. Timmis ed. Springer.
- [109] Smyth TJP, Perfumo A, Marchant R, Banat IM. **2009b**. Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants : Microbiology of hydrocarbons, oils, lipids, and derived compounds. In Kenneth N. Timmis eds. Springer
- [110] Ben Ayed et Nasri, 2016. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-016-2132-2>
- [111] Janek et al 2013 Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2
- [112] Yalaoui guellal 2020 Biodegradation potential of crude petroleum by hydrocarbonoclastic bacteria isolated from Soummam wadi sediment and chemical-biological proprieties of their biosurfactants
- [113] Abbasi et al. 2012, Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant
- [114] Elazzazy, Abdelmoneim et Almaghrabi 2015. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia
- [115] Denge-Pulate et al., **2014**. antimicrobial and SEM studies of sophrolipids synthesied using laruhl alcohol
- [116] Heyd et al., **2008**; Development and trends of biosurfactant analysis and purification using ehamnolipids as an example

[117] Borah et al., 2016 rhamnolipid Biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to Control Stalk and Ear Rot Disease of Maize

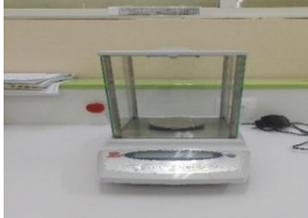
[118] Guo Liejin et al 2009 crystallite, optical and photocatalytic properties of visible-light-driven ZnIn₂S₄ photocatalysts synthesized via a surfactant-assisted hydrothermal method

[119] A.J.Kirby , R.J.Schmidt , **1997** The antioxidant activity of chinese herbs for eczema and of placebo herbs-1, J.Ethnopharmacol.56(2) 103-108.

[120] A.Sila ,A .Haddar , O. Martinez-Alvarez,A.Bougatef ,**2013** Angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysate from muscle of barbel (*barbus callensis*),J.Chem .6.

[121] H.Ben Ayed ,S .Bardaa ,D.Moalla ,M.Jridi,H.Maalej ,Z.Sahnoun ,et al .**2015**,Wound healing and in vitro antioxidant activities of lipopeptides mixture produced by *Bacillus mojavensis* A21, Process.Biochem. 50(6) 1023-1030.

Annexe

Le nom de l'appareil	Le rôle	Photo
Autoclave	Stérilisateur par la vapeur	
Incubateur agitateur	Appareil permettant de mélanger deux composants de façon homogène	
L'étuve	Utilisée pour l'incubation des cultures microbiennes	
Tensiomètre	Mesure la tension superficielle	
pH-mètre	Mesure le pH	
Centrifugeuses	Séparation de la biomasse et surnagant	
Balance analytique	Réaliser une pesée avec précision	

un spectrophotomètre UV-Visible	Mesure l'absorbance	
Évaporateur rotatif	Distiller rapidement des solvants	
un spectrophotomètre infrarouge	Analyser identifier et caractériser les espèces chimiques	
Microscope	Il permet d'observer des éléments qui ne sont pas visibles à l'œil nu	
Bain marie	Destiné au conditionnement ou à la stérilisation d'échantillons	
Vortex	Mélanger et homogénéiser	

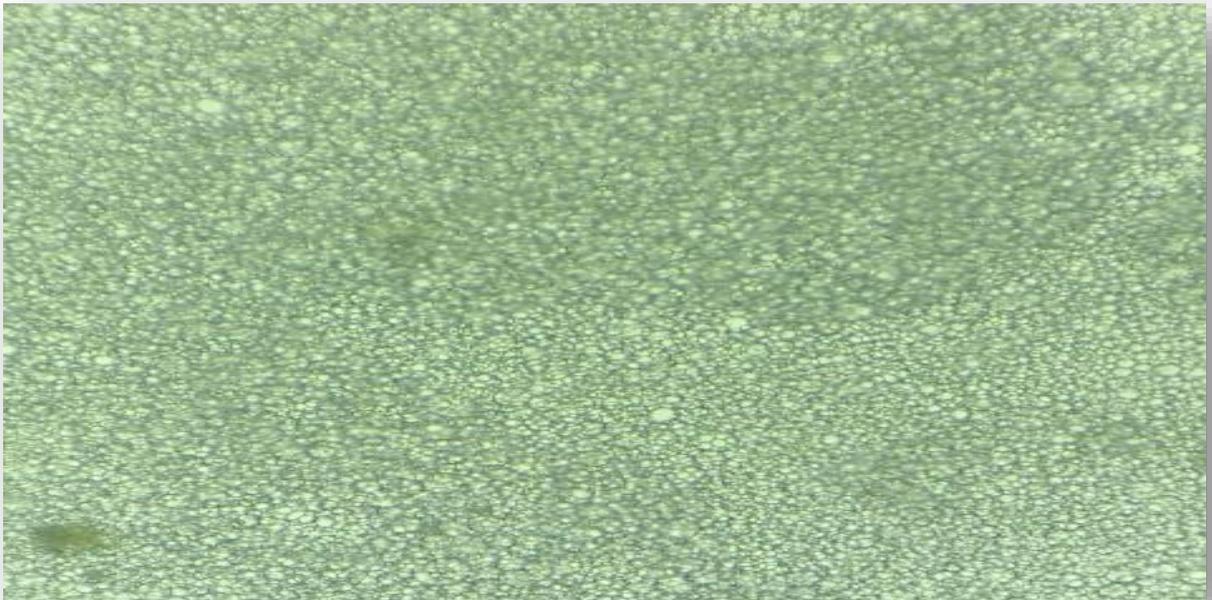
<p>Lampe UV</p>	<p>La lampe est équipée de filtres longue durée qui permettent une luminance extraordinaire de la réponse fluorescente.</p>	
-----------------	---	---

Verreries	Réactif
Pipette pasteur	Extrait de levure
Micropipette	Peptone
Bécher (50, 100, 250, 1000ml)	Glucose
Erlenmeyer (250, 300, 1000ml)	Gasoils
Ampoule à décanter (250, 500, 1000 ml)	NaNo3
Barreau magnétique	MgSO4
Tube à vis	Acétate d'éthyle
Boit de pétri en plastique et en verres	Méthanol
Support	Ethanol
Plaque CCM	Acide sulfurique H2SO4
Fiole (10, 20, 100 ml)	DPPH
Ballon (250, 500, 1000 ml)	Phénol
Anse	KH2PO4
Une plaque agitatrice	Acide chlorhydrique HCl
Lames et lamelles	Pétrole
Entonnoirs	Na ₂ SO _{4s}

La composition des milieux utilisés

Milieu sabouraud	Milieu LB	Milieu O.G. A
Dextrose 40 Mycologicol peptone 10 Agar 15 pH= 5.6 Eau distillée 1000 ml	Peptone 10g Extrait de levure 5g NaCl 10g Agar 15g Eau distillée 1000ml pH=7	Extrait de levure 5g Glucose 20g Agar 20g Oxytétracycline 0.1g Eau distillée 1000ml pH= 6

Image de l'émulsion de la mayonnaise par microscope





LABORATOIRE DE CONTRÔLE DE QUALITÉ
& DE CONFORMITÉ

Tél / Fax : 025 23 81 02 / Mobile : 0541 48 54 77
Email : altesselab@gmail.com
Adresse : Rue Zabana en face l'hôpital Frantz fanon - BLIDA

Blida le : 26.06.2023

Bulletin d'analyse physico-chimique

Numéro d'inscription au laboratoire : 111 b/23.

Client : BOUZIDA Feriel

Adresse : Blida

Nature de produit : Sauce mayonnaise.

Quantité : 1 échantillon.

Date de préparation : /

Date de Péréemption : /

Echantillon reçu ✓ prélevé le : 21.06.2023

Analysé le : 21.06.2023

Examen préliminaire :

- Aspect et couleur : Préparation semi liquide de couleur crème.
- Odeur : Caractéristique du produit.
- Examen macroscopique : Absence de particules étrangères.

Paramètre	Unité	Résultat	Références
pH à 20°C	-	3.39	pH mètre
Acidité	%	5.7	ISO 750
Extrait sec	%	92.05	JORA N° 08 du 06/02/2013
Humidité	%	7.95	JORA N° 08 du 06/02/2013
Viscosité	CPs	10800	Viscosimètre
Résidu sec soluble	%	4.84	ISO 2173

Responsable du laboratoire



Décision N°023du 14/10/2015 NIF : 28310380216013000000 RC N° :4076309A14 AI : 09059540153
RIB : 004 00199 4000016780 24

Le résultat du présent bulletin d'analyse ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse (norme 17025).



**LABORATOIRE DE CONTRÔLE DE QUALITÉ
& DE CONFORMITÉ**

Tél / Fax : 025 23 81 02 / Mobile : 0541 48 54 77
Email : altesselab@gmail.com
Adresse : Rue Zabana en face l'hôpital Frantz fanon - BLIDA

Blida le : 26.06.2023

Bulletin d'analyse microbiologique

Numéro d'inscription au laboratoire : 111 b/23.

Client : BOUZIDA Feriel

Adresse : Blida

Nature de produit : Sauce mayonnaise.

Quantité : 1 échantillon.

Date de préparation : /

Date de Péréemption ;/

Echantillon reçu ✓ prélevé le : 21.06.2023

Analysé le : 21.06.2023

Examen préliminaire :

- Aspect et couleur : Préparation semi liquide de couleur crème.
- Odeur : Caractéristique du produit.
- Examen macroscopique : Absence de particules étrangères.

Germes recherchés	Unité	Résultats	Référence
Germes aérobies à 30°C	UFC/g	Absence	NA 1207
Entérobactéries	UFC/g	Absence	ISO 21528-1
<i>Escherichia coli</i>	UFC/g	Absence	ISO 7251
Coliformes thermotolérants	UFC/g	Absence	ISO 11290-2
Staphylocoques à coagulase +	UFC/g	Absence	NA15164
Anaérobies sulfite-réducteurs	UFC/g	Absence	NA 15176
<i>Salmonella</i>	UFC/25g	Absence	NA 1203
Anaérobies sulfite-réducteurs	UFC/g	Absence	NA15527
Levures	UFC/g	Absence	NA761
Moisissures	UFC/g	Absence	NA761

Conclusion : Qualité microbiologique satisfaisante .

Responsable du laboratoire

Décision N°023 du 14/10/2015 NIF : 28310380216013000000 RC N° : 4076309A14
RIB : 004 00199 4000016780 24
Le résultat du présent bulletin d'analyse ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse (norme 17025).





DDP de la souche 138



Mayonnaise commerciale Lesieur