

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ÉT POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Génie de l'Environnement

Intitulé

**Substitution des tensioactifs chimiques
Par des tensioactifs biologiques dans les
détergents**

Présenté par

ABBAS Achwak

KHALI Fatima Zohra Yasmine

Encadré par

Pr. BADIS Abdelmalek

Doctorante TARED Amina

Année Universitaire 2023/2024

Remerciements

الحمد لله رب العالمين

Nous remercions **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nos remerciements les plus sincères vont à toute personne ayant eu la bonté et la patience de satisfaire notre curiosité et de nous aider dans notre travail par leurs précieux conseils, réponses et recommandations.

Tout ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide de notre promoteur **Mr BADIS Abdelmalek** professeur à l'université Blida 1, nous le remercions pour son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Notre attention se portera aussi plus particulièrement envers la Doctorante **Melle TARED Amina** pour son aide pratique, son soutien moral et ses engagements.

Tous les membres du jury trouvent ici l'expression de notre reconnaissance pour avoir accepté d'évaluer notre modeste travail.

Nos remerciements s'adressent par la même occasion à tous nos enseignants du département de Génie des Procédés pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve durant cinq ans d'études malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail, qu'elles voient en ces mots l'expression de notre gratitude pour leur présence, pour leur dévouement et pour l'aide inestimable qu'elles ont apportées tout au long de ce parcours. Un petit bout de chemin certes, mais un grand enrichissement.

Dédicace

Nous commençons par exprimer notre gratitude envers **ALLAH** Tout-Puissant pour nous avoir donné la force, la santé, le courage et la patience nécessaires pour accomplir ce travail. Je dédie ce mémoire de fin d'études du fond du cœur aux personnes les plus chères de ma vie :

À mes chers parents,

Je veux vous remercier du fond du cœur pour l'éducation que vous m'avez donnée. Vos sacrifices, votre dévouement et votre amour ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Vous m'avez toujours soutenu et encouragé à poursuivre mes rêves. Je suis très reconnaissant d'avoir des parents aussi formidables.

À ma sœur,

Merci d'être mes meilleurs amis, mes complices et mes partenaires de fous rires. Les moments passés ensemble sont précieux et je suis infiniment reconnaissant de vous avoir comme frère et sœur.

À mes très chères tantes et précieuses cousines, qui me donnent l'espoir de vivre et qui n'ont jamais cessé de prier pour moi, que dieu vous garde pour moi

À mes grands-parents,

Mamie tu resteras toujours dans mon cœur, et pour toi papi, je t'aimerai toujours. « RABI YARHAMHOM » je sais que vous me regardez depuis le ciel.

À mes amis et mes deux meilleures amies Ikram et Sarah,

Merci d'avoir partagé les bons moments et de m'avoir soutenu dans les moments difficiles. Votre amitié est un cadeau précieux et je suis extrêmement reconnaissant de vous avoir dans ma vie.

À mon remarquable binôme,

Merci d'avoir partagé nos idées et d'avoir travaillé avec moi. Je suis reconnaissant de t'avoir comme partenaire.

Mes sincères dédicaces pour mon professeur Mr Bouras, celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant les self-made-women et les déterminismes finiront toujours par réussir leur vie.

Pour finir, à toute la famille ABBAS et la famille DJOUAK et à tous ceux que j'aime et qui m'aiment je dédie ce mémoire.

Achwak

Dédicace

Nous tenons tout d'abord à remercier **ALLAH** tout puissant de nous avoir donné la force, la santé, le courage et la patience nécessaire à la réalisation de ce travail.

Je tiens à dédier ce mémoire de fin d'étude du fond du cœur aux plus chères personnes dans ma vie:

Chers parents,

Je tenais à vous exprimer ma profonde gratitude pour l'éducation que vous m'avez donnée. Vos sacrifices, votre dévouement et votre amour inconditionnel ont façonné la personne que je suis aujourd'hui. Vous avez toujours été là pour moi, me guidant sur le bon chemin et m'encourageant à poursuivre mes rêves.

Je sais que vous avez fait tant de sacrifices pour moi, parfois au détriment de vos propres besoins. Vos efforts et votre soutien constant ont été une source d'inspiration pour moi. Je suis si reconnaissante d'avoir des parents aussi merveilleux et aimants.

À mes grands-parents,

Merci d'avoir partagé avec moi votre sagesse, vos histoires et votre amour inconditionnel. Votre présence dans ma vie est un trésor que je chérirai toujours.

À mon frère et ma sœur,

Merci d'être mes meilleurs amis, mes complices et mes partenaires de fous rires. Les moments passés ensemble sont précieux et je suis si reconnaissante de vous avoir comme frère et sœur.

À toi ma meilleure.

Depuis toutes ces années, tu as été là pour moi, apportant du bonheur, du soutien et de précieux souvenirs. Merci d'être une amie si merveilleuse et fidèle que notre amitié continue de grandir et de briller encore de nombreuses années.

À mes amis, merci d'avoir partagé les bons moments et de me soutenir dans les moments difficiles. Votre amitié est un cadeau précieux et je suis si reconnaissante de vous avoir dans ma vie.

À mon merveilleux binôme, merci d'avoir partagé nos idées et de travailler ensemble. Je suis reconnaissante de t'avoir comme partenaire.

YASMINE

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو استخدام مادة حيوية خافضة للتوتر السطحي، مشتقة من سلالة خميرة معزولة محلياً، كعامل مطهر ورغوة ومنظف في تركيب الصابون التقليدي المصنع بعملية التصبين على البارد في وجود زيوت نباتية. بعد فترة حضانة مدتها 144 ساعة في وضع الدفعات، تم استخلاص المادة الخافضة للتوتر السطحي الحيوي بطريقتين (الترسيب الحمضي متبوعاً بالاستخلاص السائل بالسائل مع أسيتات الإيثيل/الميثانول وخلات الإيثيل والاستخلاص البارد)، بإنتاجية 10 جم/لتر و 13 جم/لتر على التوالي. يحتوي المنتج الخام على $DDP = 8$ سم، و $TS = 27.8$ ملي نيوتن/متر و $E24 = 80\%$ (مع زيت الزيتون) و 60% (مع زيت المحرك). يتميز الصابون المصنع بالمادة الخافضة للتوتر السطحي الحيوي بدرجة حموضة 10، وقوة تنظيف جيدة، ورغوة مستقرة وفعالة، وقوة مطهرة جيدة (مضاد للبكتيريا ضد جميع البكتيريا التي تم اختبارها بقطر تثبيط يتراوح بين 10 و 30 ملم) وقوة تنظيف جيدة على البقع المختلفة. في ضوء هذه الخصائص، يستحق الفاعل بالسطح الحيوي المنتج محلياً أن يكون مرشحاً جيداً في أنواع مختلفة من تركيبات المنظفات.

الكلمات المفتاحية : عامل خافض للتوتر السطحي الحيوي، خميرة، صابون، عامل رغوة، عامل تنظيف، مطهر

Abstract

The aim of this study is to use a biosurfactant, derived from a locally isolated yeast strain, as an antiseptic, foaming and detergent agent in the formulation of traditional soaps manufactured by the cold saponification process in the presence of vegetable oils. After a 144h incubation period in batch mode, the biosurfactant was extracted by two methods (acid precipitation followed by liquid-liquid extraction with ethyl acetate/methanol and ethyl acetate and cold extraction), with yields of 10g/L and 13g/L, respectively. The crude product has a $DDP = 8$ cm, a $TS=27.8$ mN/m and $E24=80\%$ (with olive oil) and 60% (with motor oil). Soaps formulated with biosurfactants are characterized by a pH of 10, good cleaning power, stable and effective foam, good antiseptic power (antibacterial against all bacteria tested with an inhibition diameter between 10 and 30 mm) and good cleaning power on various stains. In view of these characteristics, locally produced biosurfactants deserve to be a good candidate in different types of detergent formulation.

Key words: Biosurfactant, yeast, soap, foaming agent, cleaning agent, antiseptic

Résumé

L'objectif de cette présente étude est d'utiliser un biosurfactant, issu d'une souche de levure isolée localement, comme agent antiseptique, moussant et détergent dans la formulation des savons traditionnels fabriqués par le processus de saponification à froid en présence des huiles végétales. Après une période de 144 h d'incubation en mode batch, le biosurfactant est extrait par deux méthodes (précipitation acide suivie d'une extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle/ méthanol et acétate d'éthyle et extraction à froid), le rendement est de 10g /L et 13 g/L, respectivement. Le produit brut a un $DDP = 8$ cm, une $TS=27,8$ mN/m et $E24=80\%$ (avec l'huile d'olive) et 60% (avec l'huile de moteur). Les savons formulés à base de biosurfactant sont caractérisés par un pH de 10, un bon pouvoir nettoyant, une mousse stable et efficace, un bon pouvoir antiseptique (antibactérien contre tous les bactéries testés avec un diamètre d'inhibition entre 10 et 30 mm) et un bon pouvoir nettoyant sur différentes tâches. En vue de ces caractéristiques, le biosurfactant produit localement mérite d'être un bon candidat dans les différents types de formulation en détergence.

Mots clés : Biosurfactant, levure, savon, agent moussant, agent nettoyant, antiseptique

Liste des abréviations

BS : Biosurfactant

°C : Degré Celsius

CMC : Concentration micellaire critique

DDP : Test de déplacement de pétrole

E24 : Indice d'émulsification

FTIR : Infrarouge transformé de Fourier

g : Gramme

HCl : Acide chlorhydrique

HLB : Hydrophilic-Lipophilic-Balance

C/N : Rapport carbone azote

LB : Milieu Luria Bertani

L : litre

mL : Millilitre

mN/m : Milli Newton par mètre

NaOH : hydroxyde de sodium

NaCl : chlorure de sodium

pH : Potentiel Hydrogène

rpm : Rotation par minute

T : Témoin

TI : Tension interfaciale

TS : Tension de surface (tension superficielle)

YPG : Extrait de levure, peptone, glucose

µL : Microlitre

Liste des figures

Figure I.1: Structure d'un tensioactif.....	2
Figure I.2: Structure d'un rhamnolipide.....	6
Figure I.3: Structure du thé halo lipide.....	6
Figure I.4: Structure d'une molécule de sophorolipides.....	7
Figure I.5: Structure d'une molécule de lipopeptide.....	7
Figure I.6: Structure chimique d'un phospholipide.....	8
Figure I.7: Structure de la phosphatidyléthanolamine produite par la souche <i>Acinetobacter Sp.HOI-AN</i>	8
Figure I.8 : Concentration micellaire critique de BS.....	9
Figure II.9 : Milieu de culture après autoclavage.....	18
Figure II.10 : Les étapes de production de biosurfactant.....	18
Figure II.11 : Culture de production en cours d'incubation a) Shaker b) Thermocouple....	19
Figure II.12 : La biomasse de levure récupérée.....	20
Figure II.13 : Test de déplacement de pétrole. A : pétrole avec de l'eau distillée (contrôle), B : zone de déplacement de pétrole pour un biosurfactant.....	20
Figure II.14 : Mesure de la TS par le tensiomètre.....	21
Figure II.15 : Schéma récapitulatif du test d'émulsification.....	22
Figure II.16 : Schéma explicative des étapes d'extraction à froid.....	23
Figure II.17 : Représentation schématique des étapes d'extraction par solvant.....	25
Figure II.18 : La réaction de saponification.....	26
Figure II.19 : Les étapes de fabrication de savon.....	28
Figure II.20 : Les tâches testées.....	29
Figure II.21 : oxitop box pour la mesure de la DBO5.....	31
Figure II.22 : Bloc digest" macro 12 postes pour le dosage de la DCO.....	31
Figure III.23 : Aspect macroscopique de la souche de la levure codée 138.....	32
Figure III.24: a) DDP avec le biosurfactant (8 cm) - b) DDP avec le surnagent (3 cm).....	32
Figure III.25 : E24 a) huile de moteur – b) huile d'olive.....	33
Figure III.26 : Tension de surface de Biosurfactant affiché par le tensiomètre.....	34
Figure III.27 : a) Biosurfactant extrait par l'acétate d'éthyle/méthanol, b) Biosurfactant extrait par l'acétate d'éthyle.....	35
Figure III.28 : Biosurfactant après extraction à froid.....	35
Figure III.29 : Spectre IR de biosurfactant produit par la levure 138.....	36
Figure III.30 : Savons obtenus avec plusieurs formulations en présence de Bs.....	37
Figure III.31 : Les taches après lavage 1) Huile de friture 2) Huile d'olive 3) Huile de table 4) Huile de table + Huile d'olive 5) Commercial	39
Figure III.32 : Activité antibactérienne des savons fabriqués à base de biosurfactant.....	40
Figure III.33: activité antimicrobienne des savons fabriqués à base de Bs. HF (huile de friture), HT (huile de table), HT+HO (huile de table + huile d'olive).....	40

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Principaux types des biosurfactants produits par différents microorganisme...10	10
Tableau I.2 : Méthodes de récupération des biosurfactants.....12	12
Tableau I.3 : Différents domaines d'application des biosurfactants.....13	13
Tableau II.4 : Composition des savons fabriqués27	27
Tableau II.5 : Bactéries testés pour l'activité antibactérienne.....27	27
Tableau II.6 : Mesure de pH des savons.....30	30
Tableau III.7 : Pouvoir moussant.....38	38
Tableau III.8 : Détermination de tension superficielle des savons.....41	41

Table de matière

Remerciement

Dédicace

ملخص

Abstract

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Tensioactifs.....2

I.1. Définition2

I.2. Classification.....2

I.3. Propriétés.....3

I.3.1. Mouillage.....3

I.3. 2. Moussage.....3

I.3.3. Pouvoir émulsionnant.....3

I.3.4. Adsorption aux interfaces.....4

I.3.5. Auto agrégation ou micellisation.....4

II. Biosurfactants.....5

II.1. Définition.....5

II.2.Classification.....5

II.2.1. Selon le poids moléculaire.....5

II.2.1.1. Faible poids moléculaire5

II.2.1.2. Haut poids moléculaire ou polymères.....5

II.2.2. Selon la structure5

II.2.2.1. Glycolipides.....6

II.2.2.2. Lipopeptides et lipoprotéines.....7

II.2.2.3. Phospholipides.....7

II.2.2.4. Lipopolysaccharides ou polymériques8

II.2.2.5. Lipides neutres et Acides gras8

II.3. Propriétés physico-chimiques	8
II.3.1. Activité à l'interface (et à la surface)	8
II.3.2. Concentration micellaire critique	9
II.3.3. Tolérance aux conditions extrêmes de température, pH et de salinité	9
II.4. Microorganismes producteurs	9
II.5. Production des Biosurfactants	10
II.5.1. Influence de la source de carbone.....	10
II.5.2. Influence de la source d'azote	11
II.5.3. Influence des éléments minéraux et des ions du milieu de culture	11
II.5.4. Effet de pH.....	11
II.5.5. Effet de salinité.....	11
II.5.6. Effet de température	11
II.5.7. Effet de vitesse d'agitation et d'aération.....	12
II.6. Récupération des Biosurfactants	12
II.7. Applications des Biosurfactants	13
II.8. Application de Biosurfactants dans la Détergence	14
II.9. Avantages	15
II.9.1. Biodégradabilité.....	15
II.9.2. Faible toxicité	15
II.9.3. Efficacité à faible concentration	15
II.9.4. Propriétés fonctionnelles spéciales	15

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Repiquage de la souche de levure	17
II. Production de biosurfactant en mode batch.....	17
II.1. Préparation du milieu de production (extrait de levure, peptone, glucose)	17
II.2. Préparation du pré culture.....	17
II.3. Production de biosurfactant	18
III. Estimation de la biomasse produite par 1 L selon la méthode gravimétrique (Poids sec)	19
IV. Evaluation de la production de biosurfactant.....	20
IV.1. Diamètre de Déplacement de Pétrole (DDP)	20
IV.2. Mesure de la tension superficielle.....	21

VI.3. Index d'émulsifiassions E24	21
V. Récupération du biosurfactant contenu dans le surnageant.....	22
V.1. Extraction à froid.....	23
V.2. Extraction liquide – liquide	24
VI. Caractérisation structurale de biosurfactant par infrarouge	26
VII. Application de biosurfactant dans la détergence	26
VII.1. Procédé de préparation de savon	26
VII.2. Réaction de saponification.....	26
VII.3. Procédés de fabrication du savon.....	27
VII.4. Saponification à froid	27
VII.5. Propriétés physico-chimique de savon	28
VII.5.1. Mesure de pH.....	28
VII.5.2. Pouvoir moussant.....	28
VII.5.3. Pouvoir détergent.....	28
VII.5.4. Pouvoir antibactérien	30
IX. Traitement d'effluent à base de savon	30
IX.1. Demande Biochimique en Oxygène (DBO)	30
IX.2. Demande Chimique en Oxygène (DCO)	31

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Paramètres d'évaluation de la production.....	32
I.1. Diamètre de Déplacement de Pétrole (DDP)	32
I.2. Index d'émulsification (E24)	33
I.3. tension de surface (TS)	33
II. Évaluation de l'extraction du biosurfactant	34
II.1. Évaluation de l'extraction par solvant	34
II.2. Évaluation de l'extraction à froid	35
III. Caractérisation structurale de biosurfactant par l'infrarouge	35
IV. Application de biosurfactant dans la formulation des savons.....	37
IV.1. Pouvoir détergent sur les taches testées	39
IV.2. Activité antibactérienne des savons	40
IV.3. Paramètres de pollutions des effluents contenant les savons fabriqués à base de Bs	41

Conclusion générale42

Références

Introduction générale

Les surfactants biologiques font partie des biomolécules clés qui marquent le XXIème siècle avec de nombreuses recherches scientifiques quant à leur intérêt dans le monde industriel [1]. Ce sont des molécules microbiennes amphiphiles avec des parties hydrophiles et hydrophobes qui se répartissent aux interfaces liquide/liquide, liquide/gaz ou liquide/solide qui sont connues sous le nom de « Biosurfactants » [2].

Les biosurfactants sont produits par divers microorganismes et possèdent des structures et caractéristiques différentes selon les microorganismes producteurs [3]. Ces caractéristiques permettent à ces biomolécules de jouer un rôle clé dans les domaines de l'émulsification, la formation de mousse, la détergence et la dispersion, qui les rend très recommandés dans diverses industries [2].

De nos jours, la prise de conscience publique des risques environnementaux liés aux surfactants synthétiques est en hausse, la production mondiale des surfactants est estimée à 18,82 millions de tonnes en 2023 à 21,35 millions de tonnes d'ici 2028, avec un TCAC de 2,55 % au cours de la période de prévision (2023-2028). Par conséquent, la demande de biosurfactants (ecofriendly), capables de remplacer les détergents pour la lessive, est favorisée pour la préparation de savons, shampoings et liquides de lavage [4].

L'objectif principal de ce présent travail est de produire un tensioactif biologique (biosurfactant) en utilisant une souche levurienne à fort potentiel de production isolée localement afin de réaliser une application environnementale en détergence. Cette production est en cours à l'échelle du laboratoire, au sein de laboratoire de recherche de chimie des substances Naturelle et de biomolécules, Université de Saad Dahlab Blida 1.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

I. Tensioactifs

I.1. Définition

Les tensioactifs ont été découverts et utilisés depuis très longtemps, le sulfate de sodium est le premier tensioactif synthétique qui a été développé au début du XX^{ème} siècle. Depuis lors, de nombreux autres tensioactifs ont été développés et utilisés dans une variété de produits.

Dans ce contexte, les tensioactifs naturels, tels que les savons à base d'huiles végétales ont été également utilisés depuis des siècles. Aujourd'hui, il y a une prise de conscience croissante de l'importance de choisir des tensioactifs respectueux de l'environnement pour réduire leur impact sur la nature. C'est pourquoi les tensioactifs biologiques fabriqués à partir de matières premières renouvelables gagnent en popularité dans l'industrie des produits de nettoyage. C'est génial de voir comment les connaissances et les innovations évoluent pour créer des produits plus durables et respectueux de l'environnement.

Les tensioactifs (appelés en anglais surfactants, abréviation de surface active agents) sont des agents de surface qui peuvent être des molécules synthétiques, naturelles ou bien synthétiques d'origine naturelle [5]. Ils se composent de deux parties de polarités distinctes :

- ✓ L'une constituée d'une chaîne hydrocarbonée aliphatique, linéaire ou ramifiée, ou aromatique ou encore alkyl aromatique qui présente un caractère hydrophobe ou lipophile (ayant une affinité avec les corps gras),
- ✓ L'autre présente un caractère hydrophile constituée par un ou plusieurs groupements polaires, ioniques ou non ioniques (ayant une affinité avec l'eau).

Cette double affinité pour les phases aqueuses et apolaires fait de ces molécules des substances dites amphiphiles qui peuvent être schématisées comme suit [6] :

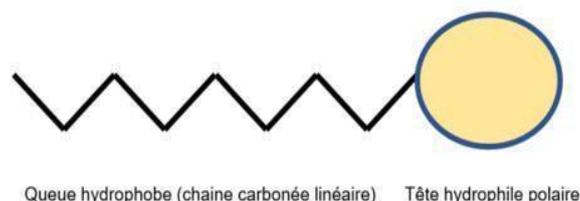


Figure I.1: Structure d'un tensioactif.

La partie hydrophile d'un tensioactif peut porter une charge négative ou positive ou à la fois positive et négative, ou neutre [6].

I.2. Classification

Les Tensioactifs peuvent être classés en fonction de :

- ✓ La nature de leurs têtes hydrophile : non ioniques, anioniques, cationiques ou amphotères.
- ✓ La longueur de la partie lipophile : agents mouillants, détergents, émulsionnants ou adoucissants, etc...
- ✓ Leurs origines : naturelles ou synthétiques [7].

Principalement les tensioactifs sont classés selon la polarité de leurs têtes hydrophiles, nous distinguons :

Tensioactifs anioniques dont la partie polaire s'ionise négativement dans l'eau. Nous distinguons : les carboxylates, les sulfates, les esters de l'acide phosphorique.

Tensioactifs cationiques sont caractérisés par une partie hydrophile chargée positivement. Le plus souvent ce sont des sels d'ammonium quaternaires tri méthyles ou des sels de pyridinium [7].

Tensioactifs non ioniques : ni la tête hydrophile, ni la queue hydrophobe ne portent de charge électrique. Le groupe hydrophile peut être une chaîne poly oxyde d'éthylène, en général fixée sur une fonction alcool ou amine [8].

Tensioactifs zwitterioniques, ou amphotères : possèdent sur la partie hydrophile à la fois une charge positive et une charge négative. Ce type de tensioactifs peut alors aisément devenir cationique ou anionique selon le pH de la solution dans laquelle ils sont solubilisés [7].

I.3. Propriétés

Grâce à leur structure les tensioactifs s'adsorbent majoritairement à la surface ou aux interfaces des solides en leur conférant les propriétés suivantes :

I.3.1. Mouillage

Comme le tensioactif diminue la tension interfaciale entre le liquide et le solide en facilitant son étalement, il permettrait donc d'augmenter la vitesse de pénétration dans les substances poreuses. Ainsi donc la présence d'un tensioactif diminuerait la tension superficielle (la cohésion est faible) et entraînerait donc un bon étalement et un meilleur mouillage [9].

I.3.2. Moussage

D'autre part, ils améliorent le moussage, ils facilitent la dispersion d'un gaz (air) dans un liquide. Cette adsorption compense l'augmentation de surface due à la formation des bulles [10].

I.3.3. Pouvoir émulsionnant

Ce phénomène d'adsorption fait également baisser la tension interfaciale. Il permet de disperser et de maintenir en suspension un liquide dans un autre liquide non miscible [9].

I.3.4. Adsorption aux interfaces

Les molécules tensioactives ont tendance à migrer vers les interfaces, en particulier air-liquide et par conséquent abaisser la tension superficielle des liquides.

Cet effet a des répercussions pratiques très nombreuses : On parlera alors de techno fonction car les tensioactifs facilitent certains procédés industriels et améliorent la qualité des produits obtenus. Cette diminution de tension de surface est responsable de deux phénomènes : la dispersion et le mouillage [11].

Les molécules du surfactant présentes aux interfaces entre l'air et l'eau diminuent la tension superficielle de la solution et stabilisent les mousses. Selon le type et la concentration du surfactant, il est possible de diminuer la tension superficielle des solutions aqueuses de 72 mN/m (valeur pour l'eau) à 30 mN/m [12].

I.3.5. Auto agrégation ou micellisation

Autre propriété fondamentale, les tensioactifs ont la capacité de s'associer jusqu'à une certaine concentration limite appelée CMC.

La micelle est une structure de type polymère d'association dans laquelle les molécules tensioactives possèdent une énergie libre plus faible qu'en solution.

Cette propriété de micellisation des tensioactifs est responsable du phénomène de solubilisation qui varie en fonction de l'importance relative de leurs parties hydrophobe et hydrophile (HLB).

Lorsqu'un surfactant est introduit dans l'environnement, il y aura toujours une contamination par ce surfactant et il est donc peu bénéfique lorsque le composé lui-même porte préoccupation pour l'environnement. Ainsi, il est crucial de prendre en compte la toxicité du surfactant et de ses éventuels produits de dégradation lors de la sélection du surfactant pour le nettoyage des sols. Grâce à l'emploi massif de surfactants dans les détergents, la toxicité de ces substances a été assez bien étudiée. La toxicité des différents types de surfactants pour de nombreuses espèces est présentée par [13]. En comparaison avec les surfactants synthétiques, on peut s'attendre à une toxicité plus faible de la plupart des biosurfactants.

Deux facteurs principaux expliquent l'effet toxique des surfactants sur les bactéries : altération des membranes cellulaires en interaction avec les lipides et réaction des molécules de surfactant avec les protéines indispensables au bon fonctionnement cellulaire [13].

C'est la raison pour laquelle, depuis quelques années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les chercheurs ont commencé à s'intéresser à des surfactants fabriqués par des organismes vivants : les tensioactifs biologiques ou biosurfactants.

Ce sont des tensioactifs similaires à ceux de leurs homologues chimiques, mais avec l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et efficaces à des températures, des pH et des salinités extrêmes.

II. Biosurfactants

II.1. Définition

Les biosurfactants désignent une variété de molécules amphiphiles synthétisées par les plantes, les animaux (y compris les humains) et les micro-organismes. Ensemble ces sources totalisent environ 2000 substances amphiphiles d'origine biologique, déjà répertoriées dans la littérature [14, 15, 16,17].

Bien que ces composés puissent être produits par divers organismes vivants, leur obtention à partir de micro-organismes est facilitée par leur cycle de croissance plus court par rapport aux plantes et aux animaux. Cela fait des surfactants microbiens une option prometteuse pour des applications commerciales [14,18].

Ces biosurfactants jouent un rôle physiologique crucial pour les micro-organismes, remplissant diverses fonctions telles que la motilité, l'interaction cellule-cellule, la différenciation cellulaire, l'adhésion au substrat, la protection contre les éléments toxiques et une force ionique élevée, en plus de servir de source de carbone et d'énergie. Ils illustrent la capacité de la nature à s'adapter et à évoluer selon les circonstances imposées aux organismes vivants, la partie hydrophile des biosurfactants est composée d'esters, d'hydroxydes, de phosphates et de groupes carboxyles de peptides et de protéines, ou de glucides comme les monosaccharides, oligosaccharides et polysaccharides. En revanche, la fraction hydrophobe se compose d'acides gras saturés ou insaturés, d'acides gras hydroxylés ou d'alcools gras [15,19].

II.2. Classification

Les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique et leur poids moléculaire.

II.2.1. Selon le poids moléculaire

Faible poids moléculaire : Sont très mobiles à l'interface et ils sont efficaces pour diminuer les tensions de surface et interfaciale. En conséquence, ils recouvrent rapidement l'interface huile-eau fraîchement créée pendant l'émulsification. Dans cette catégorie, nous avons principalement les monoglycérides, les lécithines et les lyso lécithines, les glycolipides et les saponines, les alcools gras et les acides gras [20].

Haut poids moléculaire ou polymères: Connus comme bio émulsifiants qui sont plus efficaces à stabiliser le complexe huile-eau émulsion sans une réduction importante de la tension de surface. Ils contiennent des groupes de protéines ou des lipopolysaccharides et des polysaccharides (hydrocolloïdes) [20].

II.2.2. Selon la structure

Les biosurfactants sont classés en cinq principales catégories : Glycolipides, lipopeptides et lipoprotéines, phospholipides, lipopolysaccharides ou polymériques, lipides neutres.

II.2.2.1. Glycolipides

Ils se composent d'hydrates de carbone associés à une longue chaîne d'acides aliphatiques ou hydroxy aliphatiques. Parmi les glycolipides les plus étudiés figurent les rhamnolipides, les tréhalose lipides et les sophorolipides[21,22].

- **Rhamnolipides** : Ces biosurfactants sont constitués d'une ou deux molécules de rhamnose liées à une ou deux molécules d'acide β -hydroxydécanoïque. Ce sont les biosurfactants les plus largement étudiés, et qui sont principalement produits par l'espèce *Pseudomonas Aeruginosa*[23].

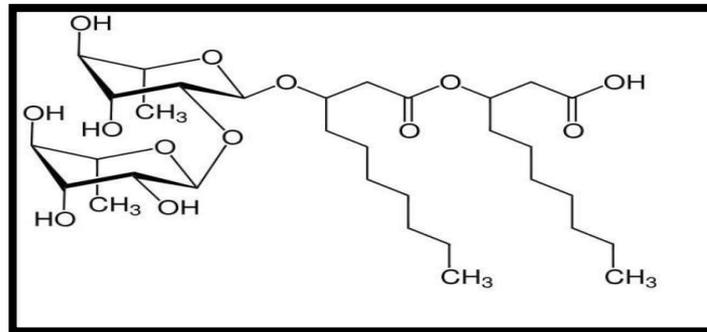


Figure I.2 : Structure d'un rhamnolipide

- **Tréhalose lipides** : Ils peuvent être de nature non ionique ou anionique et sont composés d'un disaccharide de tréhalose lié aux positions C-6 et C-6' à une longue chaîne d'acide gras par une liaison ester, souvent comprenant de l'acide mycolique. L'acide mycolique est fréquemment présent dans les glycolipides de la paroi cellulaire des *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Corynebacterium*. Les tréhalose lipides produits par différents micro-organismes varient en fonction de la taille et de la structure de l'acide mycolique, du nombre de carbones et du degré d'insaturation[23].

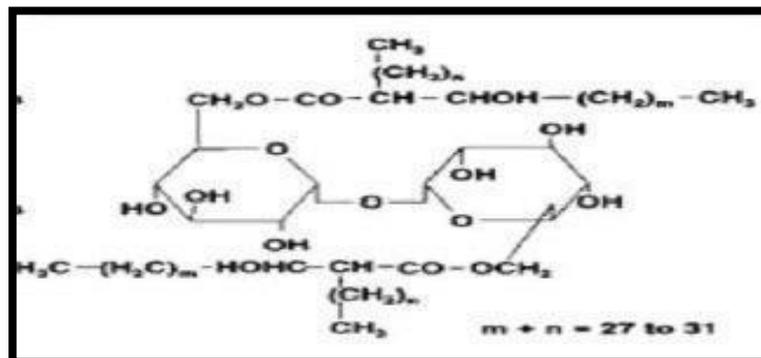


Figure I.3 : Structure du thé halo lipide [23].

- **Sphospholipides** : Ils sont principalement produits par des levures telles que *Torulopsis Bombicola*, *T. petrophilum* et *T. apicola*. Ils consistent en la liaison de

deux molécules de sophorose à une longue chaîne d'acides gras. En général les sphospholipides sont composés d'un mélange de macro lactones et d'acides. La nature des acides gras présents dans les sophorolipides varie en fonction du type de substrat organique hydrophobe utilisé par la levure lors de sa croissance [24].

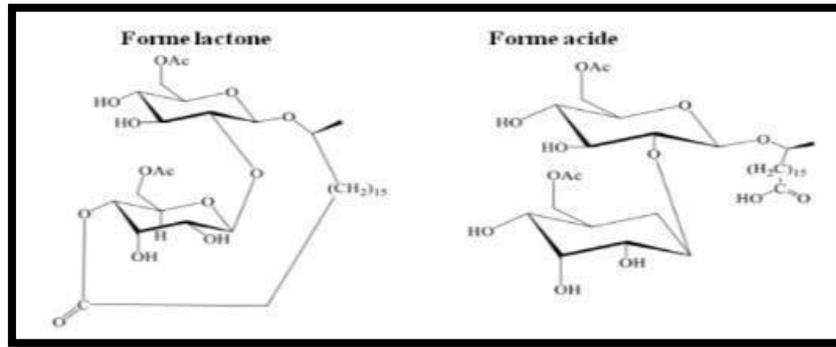


Figure I.4 : Structure d'une molécule de sophorolipides [24].

II.2.2.2. Lipopeptides et lipoprotéine

Ils sont hautement remarquables en raison de leur activité de surface élevée [25] et de leur potentiel antibiotique contre une variété de bactéries, d'algues, de champignons et de virus. Ils se composent d'un lipide lié à une chaîne polypeptidique [26].

Parmi ces biosurfactants, la surfactine (un lipopeptide cyclique) produite par *Bacillus subtilis*, est l'un des plus puissants.



Figure I.5 : Structure d'une molécule de lipopeptide [26].

II.2.2.3. Phospholipides

Les phospholipides se composent d'un groupement alcool et phosphate associé à une chaîne lipidique [27]. Bien qu'ils soient présents dans les émulsions d'huile, leur rôle va au-delà de cette simple fonction.

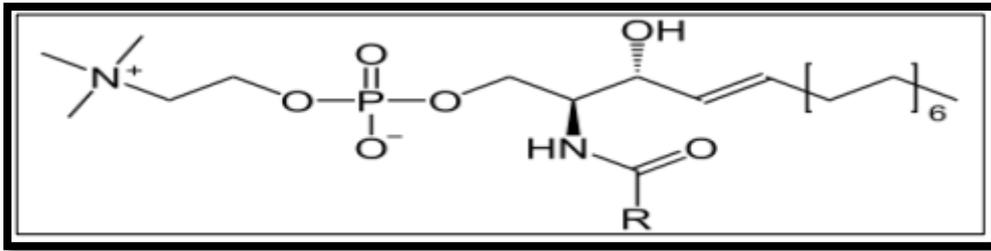


Figure I.6 : Structure chimique d'un phospholipide [26].

I.2.2.4. Lipopolysaccharides ou polymériques

Les biosurfactants polymères de haut poids moléculaire ont un squelette de trois ou quatre sucres répétés avec des acides gras attachés aux sucres. Ils sont produits par les bactéries Gram-négatives [28].

II.2.2.5. Lipides neutres et Acides gras

Ces biosurfactants sont produits par plusieurs bactéries et levures. La figure 7 montre une structure d'un biosurfactant (phosphatidyléthanolamine) qui a été produit par la souche

Acinetobacter Sp.HOI-N [22].

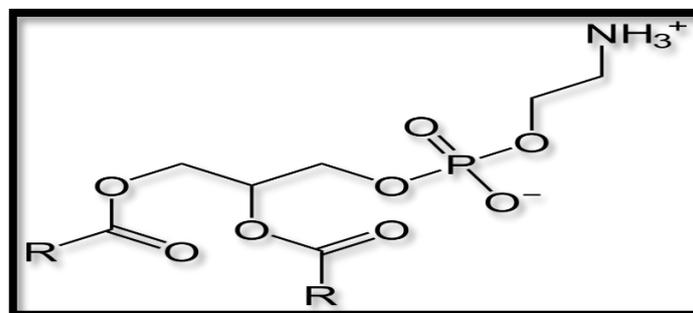


Figure I.7 : Structure de la phosphatidyléthanolamine produit par la souche *Acinetobacter*

sp.HOI-AN. [22].

II.3. Propriétés physico-chimiques

Les biosurfactants ont des caractéristiques spéciales liées à leur composition chimique :

II.3.1. Activité à l'interface (et à la surface)

Abaissement de la tension superficielle représente la force qui se manifeste à la surface d'un liquide à cause de l'attraction entre ses molécules, empêchant ainsi la rupture de cette surface [30]. Et l'abaissement de la tension interfaciale désigne la force requise pour briser la surface entre deux liquides qui ne se mélangent pas [29,30]. En présence d'un biosurfactant issu de la souche *Bacillus sp.*, certains chercheurs ont montré que la diminution de la tension interfaciale (TI) eau/pétrole brut était entre 12,5 et 0,05 mNm^{-1} . Également, le biosurfactant produit par *Bacillus licheniformis* TT 42 a abaissé la TS de l'eau à 28 mNm^{-1} et la TI (eau/pétrole brut) jusqu'à 0,05 mNm^{-1} à 80 °C. [31].

Selon [32] un biosurfactant efficace peut diminuer la tension superficielle de l'eau de 72 mN/m à 35 mN/m, ainsi que la tension interfaciale (tension entre les liquides polaires et non polaires) entre l'eau et la n-hexadécane de 40 mN/m à 1 mN/m.

En comparaison avec les surfactants chimiques, les biosurfactants ont réussi à réduire de manière plus efficace la tension interfaciale [33].

II.3.2. Concentration micellaire critique

Les biosurfactants ont une caractéristique importante : ils peuvent former des groupes de molécules appelés micelles. Ces micelles sont comme des petites boules dans lesquelles les molécules hydrophobes se cachent à l'intérieur tandis que les molécules hydrophiles se trouvent à l'extérieur. Elles mesurent environ 3 nanomètres de diamètre [34,35].

La concentration de biosurfactant à laquelle les micelles commencent à se former s'appelle la concentration micellaire critique (CMC). C'est essentiellement la quantité maximale de biosurfactant que l'on peut dissoudre dans de l'eau avant que les micelles ne se forment. Avant d'atteindre la CMC, les molécules de biosurfactant restent dissoutes dans l'eau. Une fois la CMC dépassée, les molécules supplémentaires forment des micelles, tandis que la quantité dissoute reste constante, sauf si les conditions comme la température, le pH ou les électrolytes changent, ce qui peut modifier la CMC et favoriser la formation d'autres structures [36,37].

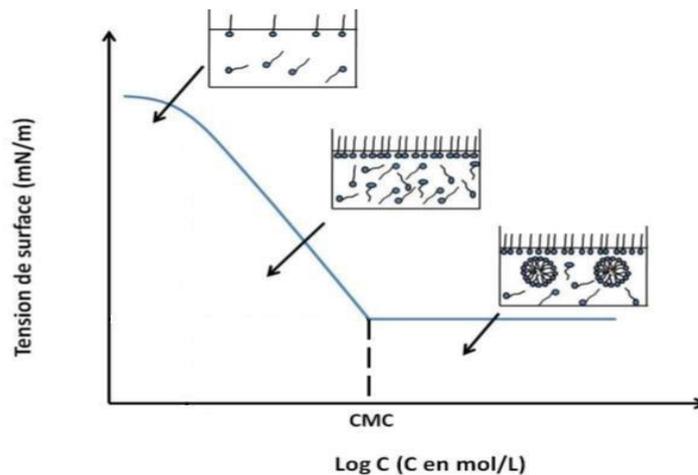


Figure I.8 : Concentration micellaire critique de BS [37]

II.3.3. 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 et des valeurs de pH allant de 2 à 12.

Ils tolèrent également une concentration de NaCl allant jusqu'à 30% [38]. Alors que 2 % de NaCl suffise pour inactiver les tensioactifs synthétiques [39] 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% [40,41].

II.4. Microorganismes producteurs

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes qui se développent en aérobiose dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures [42,43]. Ces organismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries (Tableau I.1) Les plantes, les animaux ou les humains sont également capables d'en produire [44] .

Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible [44,45].

Tableau I.1 : Principaux types de biosurfactants produits par différents microorganismes [46,47].

Microorganismes	Type des biosurfactant
<i>P. fluorescens</i>	Lipopeptidique
<i>Serratia marcescens</i>	prodigiosine
<i>P. mosselii F01</i>	Glycolipidique
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactine
<i>Bacillus velezensis</i>	Péptido Lipides
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPCL	Rhamnolipides
<i>Rhodococcus Sp.33</i>	Polysaccharides
<i>Rhodococcus Sp. ST5</i>	Glycolipides
<i>Candida bombicola starmarella</i>	Sophorolipids
<i>Pseudozyma spp</i>	Mannosyl-erythritol

II.5. Production des Biosurfactants

La plupart des biosurfactants sont fabriqués par des microorganismes qui se développent de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, telles que les hydrates de carbone, les huiles ou les hydrocarbures.

Il s'agit généralement de levures, de champignons ou de bactéries.

L'étude des levures *Candida bombicola* et *Candida lipolytica* est l'une des plus approfondies pour la fabrication de biosurfactants. Malgré la production de biosurfactants par de nombreuses espèces, la régulation de leur production reste mal connue, à l'exception des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*, qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées. [48]

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

II.5.1. Influence de la source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres influençant la production de biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite.

Les revues bibliographiques ont montré que des sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour produire des rhamnolipides : cependant les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles [47,49] comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive. En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes. Par exemple, une souche de *Pseudomonas aeruginosa* 19S a produit des biosurfactants sur un substrat constitué de phénanthrène ou de naphthalène [50].

II.5.2. Influence de la source d'azote

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 limitée [47, 49,51]

Pour avoir des rendements de production optimums, il est nécessaire d'avoir un rapport C/N optimum, et surtout que l'azote soit un facteur limitant pour favoriser la production de biosurfactants. Par exemple [52] ont obtenu une production maximale pour un rapport C/N variant de 16/1 à 18/1, alors qu'ils n'ont pas observé de production pour des rapports inférieurs à 11/1, où l'azote n'est pas limité.

II.5.3. Influence des éléments minéraux et des ions du milieu de culture

La limitation de la concentration des éléments minéraux et ions peut avoir aussi un effet sur la production des biosurfactants au niveau quantitatif et qualitatif.

Ainsi on peut observer une augmentation de la production en rhamnolipides en limitant l'apport en fer, en phosphate [53, 54,47] On note aussi une meilleure production de tricholipides si on limite l'apport en ions métalliques, en phosphate et en chlorure de sulfate. L'addition du fer et du manganèse dans le milieu de culture stimule la production de biosurfactants chez *Bacillus subtilis* [50,47] et *Rhodococcus* Sp.[55].

Il semblerait qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induit une augmentation de la production [56].

II.5.4. Effet du pH

[57,47] indiquent que pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactants chute rapidement. D'autres souches comme *Nocardia coryn bacteroides* sont affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0. Ishigami et al. Avaient une structure différente et s'organisent différemment. Par exemple, à un pH de 5,5, la structure était de forme lamellaire alors qu'à des pH supérieurs, des vésicules étaient formées. Le pH du milieu joue un rôle important dans la production de sophorolipides [58,59].

II.5.5. Effet de salinité

Selon [60,61] La concentration en sels influence la production des biosurfactants, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectent pas certains biosurfactants, bien qu'il soit observé une légère diminution sur les concentrations micellaires critiques.

II.5.6. Effet de température

Les biosurfactants produits par des souches thermophiles résistent à des températures élevées les propriétés physico-chimiques des biosurfactants, produits par *Bacillus sp.* A des températures supérieures à 40 °C, si bien que la tension de surface, la tension interfaciale et l'efficacité de l'émulsification restent stables après autoclavage à 120 °C pendant 15 min [55, 6]. L'augmentation de la température provoque des altérations dans la composition des biosurfactants produits chez *Arthrobacter Paraffineux* et *Pseudomonas sp.* DSM 2874 [55].

II.5.7. Effet de vitesse d'agitation et de l'aération

Chez les levures, il semble que la production des biosurfactants augmente avec l'augmentation de la vitesse d'agitation et de l'aération [55].

Les milieux culturels sont agités lors de la production. 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 [47]. La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance.

II.6. Récupération des Biosurfactants

Les caractéristiques physicochimiques des biosurfactants comme la capacité à former des micelles, facilitent leur récupération par rapport à d'autres agents secondaires. Les micelles facilitent leur récupération par rapport à d'autres métabolites secondaires. On extrait principalement les biosurfactants à partir de solvants organiques, mais la majorité d'entre eux sont toxiques. Cependant, la majorité de ces substances sont nocives ; c'est la raison pour laquelle les chercheurs les ont substituées par des solvants organiques. (Tableau I.2) [64].

Tableau I.2 : Méthodes de récupération de biosurfactants

Méthodes de récupération	Le mécanisme de séparation	Importance	Réf
Précipitation Acide	L'acide/ base modifie, pH des solutions à point isoélectrique des biosurfactants ($pH = pI$), ce qui les rend insolubles.	Peu coûteux, adapté à la récupération de biosurfactants bruts	[65]
La cristallisation	Le bouillon filtré est traité avec des solutions appropriées pour obtenir des cristaux de biosurfactants relativement insolubles sous forme précipitée	Utilisé pour la récupération initiale et la purification finale des composés	[66]
Extraction par solvant organique	Les Bs contiennent des extrémités hydrophobes qui les solubilisent dans les solvants organiques	Réutilisable, utile pour la récupération de biosurfactants bruts peu coûteux	[67]
La précipitation du sulfate d'ammonium	permet de purifier une protéine spécifique à partir d'un mélange complexe en l'isolant.	Utilisation pour extraire des biosurfactants	[65]
La centrifugation	La force centrale précipite les biosurfactants	Peu coûteux, réutilisable, pratique pour la récupération des biosurfactant brut	[6]
Le fractionnement de la mousse	L'activité de surface rend la participation des Bs dans la mousse	Haut niveau de pureté	[69]
Adsorption	Matériaux adsorbants ont adsorbé les tensioactifs et adsorbés à l'aide de solvants	Récupération en une seule étape de pureté, rapide, réutilisable	[70]
Ultrafiltration à membrane	Bs forment des micelles au-dessus de leur CMC qui sont piégées par des membranes polymériques	Récupération rapide, en une seule étape, haut niveau de pureté	[64]

Filtration à écoulement tangentiel	Une membrane laisse passer le liquide et sépare le biosurfactant	Une séparation efficace est indépendante des densités de cellules et des milieux d'aide au filtrage n'est nécessaire	[66]
Chromatographie par échange d'ions	Les Bs chargés sont attachés aux résines échangeuses d'ions	Haut niveau de pureté, rapide, Réutilisable	[71] [72]

II.7. Applications de Biosurfactant

Les biosurfactants sont des composés importants qui ont le potentiel de remplacement des tensioactifs synthétiques. Ils ont de nombreuses applications dans des secteurs industriels tels que le pétrole, les produits chimiques organiques, les produits pharmaceutiques, les cosmétiques, les aliments et les boissons, la biorestauration, la pétrochimie, la lutte biologique, etc. Les biosurfactants potentiels et leurs applications sont présentés dans (tableau I.3)

Tableau I.3 : Différents domaines d'application des biosurfactants [72]

Fonction	Champ d'application
Inhibiteur de corrosion	Environnement
Émulsifiant et dispersant	Cosmétique, peinture, produit alimentaire
Solubilisant et microémulsions	Pharmaceutique, articles de toilette
Agent mouillant et pénétrant	Pharmaceutique, industrie textile, peinture
Détergent	Nettoyants ménagers, produits de l'agriculture
Désémulsifiant	Traitement des déchets
Récupération de ressources	Récupération assistée de pétrole

II.8. Application des Biosurfactants dans la Détergence

De nos jours, la prise de conscience publique des risques environnementaux liés aux surfactants synthétiques est en hausse. Par conséquent, la demande de biosurfactants écologiques capables de remplacer les détergents pour la lessive est stimulée pour la préparation de savons, shampoings et liquides de lavage.

Le biosurfactant forme des micelles pour éliminer les taches huileuses du matériau souhaité en attirant leurs groupements hydrophiles. Le mélange détergent de surfactine et de subtilisine

a efficacement éliminé la tâche de rubisco immobilisée des surfaces hydrophiles (75%) et hydrophobes (80%) [73]

Un rhamnolipide (0,01%) a compétement éliminé les taches de marqueur du tableau blanc [74] Il a été rapporté que le biosurfactant produit par *Klebsiella spp.* RJ-03 a éliminé jusqu'à 80% de l'huile lubrifiante du tissu en coton [75]

De même, le rhamnolipide, le lipopeptide et le glycolipide ont éliminé respectivement 61,43% d'huile de tournesol, 75% d'huile de moteur, 81% de taches de thé et 86% d'huile de moteur brûlée du tissu en coton [76,77]

L'application des biosurfactants dans la formulation d'un détergent de lavage a été étudiée par [78] des variations de tensioactifs biologiques et leur mélange avec du tripolyphosphate de sodium comme adjuvant et du sulfate de sodium comme charge ont été appliqués au lavage d'un tissu en coton contaminé par des quantités connues de tâches (lait chocolaté).

Les effets de diverses formulations de bio-détergents, y compris le rapport entre les biosurfactants et l'adjuvant, ont été examinés.

La formulation présentée dans cette étude a également été comparée à un détergent standard pour l'efficacité de l'élimination des taches. Les résultats ont montré que les biosurfactants rhamnolipides sont prometteurs en tant que substituts de leurs homologues synthétiques. D'après la solidité des couleurs au lavage, la force des couleurs (K/S) et la différence de couleur (ΔE), les détergents biologiques à base de rhamnolipides ont une efficacité de lavage similaire à celle des détergents synthétiques.

Les résultats de la recherche ont également montré que le bicarbonate de sodium et le citrate de sodium peuvent remplacer les détergents à base de phosphate.

[79] Ont utilisé un biosurfactant produit par des isolats de *Bacillus* et de *Lactobacillus* comme antiseptique dans la formulation d'un savon local .Le savon a été fabriqué par le processus de saponification à froid en utilisant un consortium de biosurfactants formulé. Ce savon a un pH de 10 et a montré un bon pouvoir nettoyant et une bonne stabilité de la mousse. De même, le savon a montré un bon pouvoir antiseptique et désinfectant contre tous les agents pathogènes testés. Le lavage des mains est essentiel pour prévenir la transmission des maladies. La persistance des agents pathogènes dans les eaux usées a été évaluée. Le Bio produit a montré un bon pouvoir de désinfection contre tous les pathogènes testés. La valeur de la réduction sur les mains et dans les eaux usées était significativement supérieure à celle des savons de

contrôle utilisés. Ce savon pourrait être utilisé dans la prévention, la lutte et le traitement des infections bactériennes et virales.

II.9. Avantages des Biosurfactants

II.9.1. Biodégradabilité

Les biosurfactants sont biodégradables et moins toxiques que les surfactants synthétiques. Ils se décomposent facilement dans l'environnement, réduisant ainsi l'impact écologique et les risques pour la faune et la flore aquatiques.[80]

À la différence des tensioactifs synthétiques, les biosurfactants sont des substances qui se dégradent aisément dans l'environnement, ce qui les rend particulièrement appropriés pour des utilisations respectueuses de l'environnement telles que la bioremédiation des sites contaminés [81,82].

II.9.2. Faible toxicité

Bien que les données sur la toxicité des biosurfactants microbiens soient limitées, ils sont généralement considérés comme sûrs pour diverses utilisations, comme dans les produits pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et environnementaux. Cependant, pour certaines bactéries, les biosurfactants peuvent avoir un effet toxique direct en perturbant les membranes d'autres microorganismes [83, 84, 85].

Des tests ont été effectués pour évaluer cette toxicité. Par exemple, un biosurfactant produit par une souche de *Candida lipolytica* a été testé sur des plantes, des mollusques bivalves et des micro-crustacés. Aucune toxicité n'a été constatée, même à des concentrations élevées, et les plantes ont continué à se développer normalement. [86].

II.9.3. Efficacité à faible concentration

Les biosurfactants, tels que les sophorolipides et les rhamnolipides, sont efficaces à de faibles concentrations, ce qui les rend particulièrement économiques et efficaces dans les formulations de détergents. [80].

II.9.4. Propriétés fonctionnelles spéciales

Certains biosurfactants possèdent des propriétés antimicrobiennes et antifongiques, ce qui ajoute une valeur supplémentaire aux produits de nettoyage en améliorant l'hygiène et en prévenant la croissance microbienne sur les surfaces. [80].

L'iturin A, un lipopeptide antifongique puissant produit par des souches de *B. subtilis*, a été identifié comme l'une des premières activités antimicrobiennes des biosurfactants.

Dans les cellules des levures, l'iturin A dissocie la membrane du plasma en créant de petites vésicules et en agrégeant les particules intramembranaires.

De cette manière, un membre d'iturin tel que le groupe de biosurfactant peut être employé comme un agent antifongique altératif puissant [87]

On connaît la Surfactine, un lipopeptide cyclique, pour son activité biologique variée, comme l'induction de la formation des canaux ioniques, l'activité antivirale et antitumorale, ainsi que son effet anti-inflammatoire.

De plus, l'application de la surfactine à des surfaces solides avant l'infection a pour effet de diminuer la colonisation des bactéries pathogènes, comme *L. monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii* et *Salmonella enteritidis* [88]

Chapitre II

Matériel et méthodes

Nos recherches visent à produire un biosurfactant par une souche de levure isolée localement destinée à être utilisée dans la formulation de savon traditionnel pour une application en détergence.

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

Toutes les manipulations doivent être effectuées selon les conditions aseptiques habituelles en microbiologie 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 les milieux de cultures par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

La liste de verreries, équipements et réactifs est donnée dans les annexes.

I. Repiquage de la souche de levure

Le repiquage de la souche 138 issue de la collection du laboratoire de recherche de chimie de substances naturelles et de biomolécules (université Blida 1), est fait par la technique d'ensemencement en stries lâches sur le milieu Sabouraud. La colonie levurienne est prélevée à l'aide d'une anse stérile et ensemencée dans les boîtes de Pétri contenant le milieu solide. Ces boîtes sont étiquetées et déposées dans l'incubateur à 30 °C pendant 48h et après une bonne croissance ont été conservées à +4 °C pour une courte durée (4 semaines) et dans le milieu Sabouraud liquide à 30% glycérol et puis conservée à long terme à -30 °C.

II. Production de biosurfactant en mode batch

II.1. Préparation de milieu de production (extrait de levure, peptone, glucose)

- 20g peptone
- 10g extrait de levure
- 20g Glucose
- 1L eau distillée

Le pH du milieu est ajusté à 6 avec une solution de NaOH ou HCl (1 mol/L).

Le milieu de culture est rempli dans des erlenmeyers fermés hermétiquement avec du coton cardé et ont été stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

II.2. Préparation de la préculture

Dans un erlenmeyer de 250 mL, on effectue la préculture en utilisant 50 mL de milieu YPG. Une fois que le milieu YPG a été autoclavé, une colonie de levures de la souche 138 a été prélevée à l'aide d'une anse stérile et incluse dans le milieu YPG. Par la suite, on a placé les Erlenmeyers dans un incubateur (shaker) à une température de 30 °C et on les a agités (180 rpm) pendant 24 heures (Figure II.9).



Figure II.9 : Milieu de culture après autoclavage

II.3. Production de biosurfactant

La production est réalisée dans un erlenmeyer de 1 L, l'inoculation se fait à partir de préculture (5%) préparée auparavant, puis l'erlenmeyer est incubé à 30 °C sous une agitation de 180 tr/min pendant 6 jours (Figure II.10- II.11).



Figure II.10 : Les étapes de production de biosurfactant

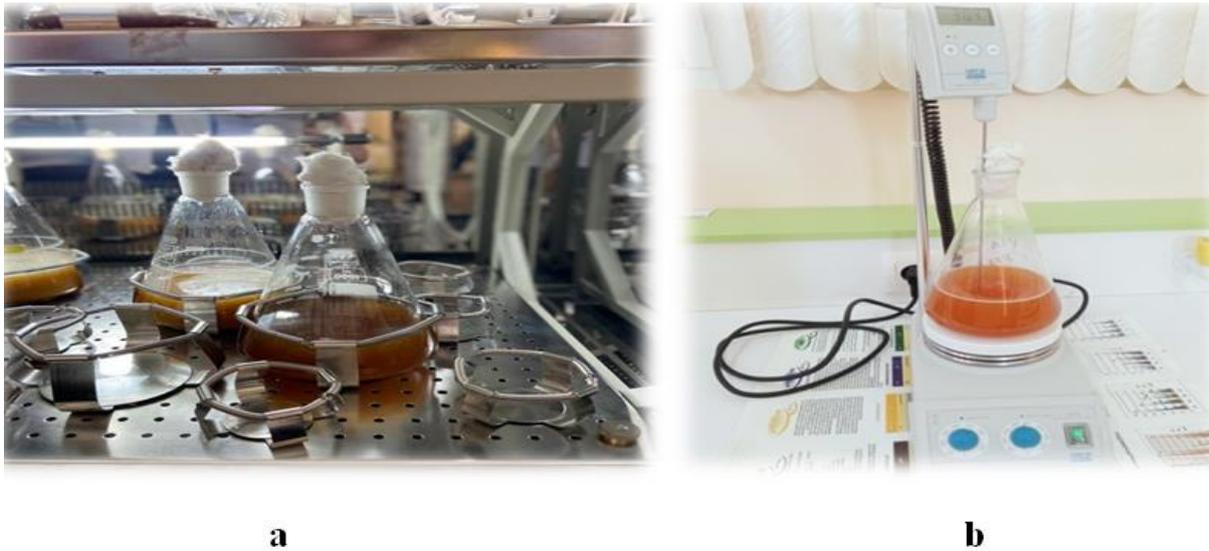


Figure II.11 : Culture de production en cours d'incubation a) Shaker b) Thermocouple

III. Estimation de la biomasse produite selon la méthode gravimétrique (poids sec)

Cette mesure a été effectuée en utilisant la méthode gravimétrique qui mesure le poids sec de la biomasse après 6 jours d'incubation. Pour ce faire, un 1L du moût de production a été centrifugé à 4500 tours par minute pendant 30 minutes. Ensuite le précipité obtenu a été récupéré dans un creuset préalablement pesé, puis séché à 30 °C pendant 24 h avant d'être re pesé [89] (Figure II.11).

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

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).



Figure II.12 : La biomasse de levure récupérée

IV. Evaluation de la production de biosurfactant

L'évaluation de notre production est déterminée par trois tests : Le déplacement de pétrole (DDP), la tension superficielle (TS) et l'index d'émulsification (E24).

Un volume de la culture levurienne a été centrifugé pendant 30 min à 4 °C puis le surnageant récupéré est utilisé pour les techniques de mesure ci-dessous :

IV.1. Diamètre de Déplacement de Pétrole (DDP)

Ce test est défini comme une méthode qualitative de détection de la présence de biosurfactants. Il est facile à réaliser, simple, sensible et applicable à la production à grande échelle. Il repose sur la capacité des biosurfactants à modifier l'angle de contact à l'interface huile-eau.:

Dans une boîte de Pétri contenant 40 mL d'eau distillée, on ajoute 100 μ L de pétrole brut, formant ainsi une mince pellicule à la surface de l'eau. Ensuite, on ajoute 100 μ L de surnageant. Si des biosurfactants sont présents dans le surnageant, le pétrole sera déplacé formant un diamètre de dégagement caractéristique mesuré diamètre (mm) [90] (Figure II.13).

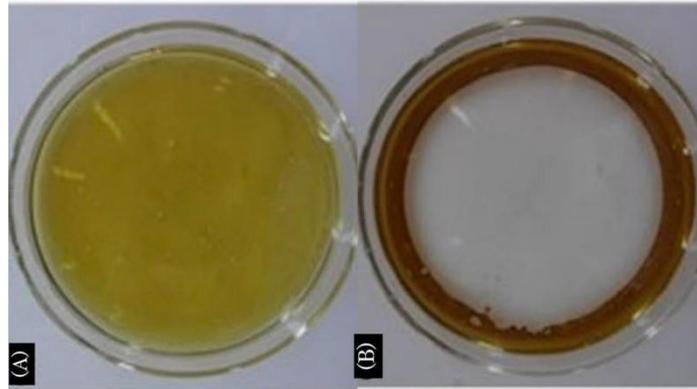


Figure II.13 : Test de déplacement de pétrole. **A :** pétrole avec de l'eau distillée (contrôle),
B : zone de déplacement de pétrole pour un biosurfactant

IV.2. Mesure de tension superficielle

La réduction de la tension superficielle est mesurée comme moyen de détection des biosurfactants sécrétés dans le milieu.

La présence de biosurfactant dans le surnageant a été confirmée par la diminution de la TS du surnageant par rapport au contrôle de témoin (eau distillée).

20 mL de culture ont été prélevés et centrifugés (4500 tr/min pendant 30 min). Le surnageant de culture est filtré à travers un papier filtre WATTMAN avant d'effectuer la mesure des activités de surface du surnageant obtenu est réalisée à l'aide d'un tensiomètre (modèle GIBERTINI TSD 132389) (Figure II.14). Toutes les mesures ont été répétées trois fois et leurs valeurs moyennes ont été prises [91].



Figure II.14 : tensiomètre

VI.3. Index d'émulsification E₂₄

L'index d'émulsification E₂₄ est une mesure utilisée pour évaluer la capacité d'un biosurfactant à former des émulsions. Cet indice représente le pourcentage de séparation de l'émulsion après 24 h. Plus l'E₂₄ est élevé, plus l'émulsion formée est stable [92].

Le test implique de mélanger 4 mL du surnageant avec 4 mL de substrat hydrophobe (huile d'olive ou huile moteur) dans des tubes à vis. Ces tubes sont ensuite agités au vortex pendant 2 minutes, puis laissés à reposer pendant 24 h dans l'obscurité. Un témoin est préparé en remplaçant le surnageant par l'eau distillée (Figure II.15).

Nous avons calculé l'indice d'émulsion (E₂₄) qui représente le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange multiplié par 100 par la formule suivante :

$$E_{24}(\%) = \frac{He}{Ht} \times 100$$

Avec :

He : Hauteur de l'émulsion formée.

Ht : Hauteur totale du mélange.

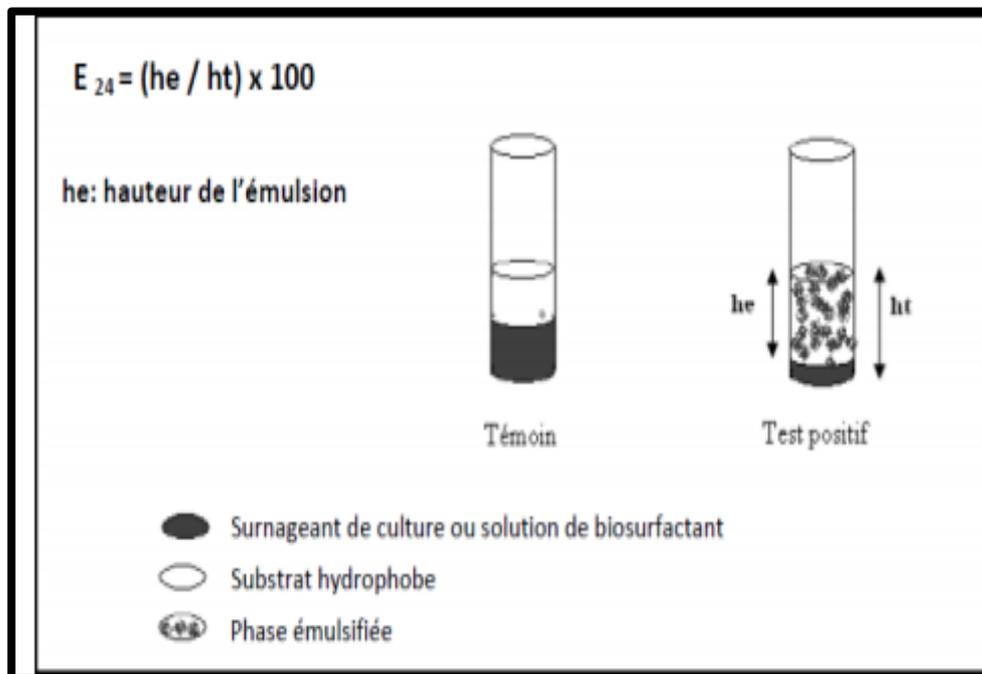


Figure II.15 : Schéma récapitulatif du test d'émulsification

V. Récupération de biosurfactant contenu dans le surnageant

Après 144 h d'incubation de la culture de production, on vient à l'étape de la centrifugation par une centrifugeuse réfrigérée de marque SIGMA. Cette étape consiste à séparer la biomasse au milieu de culture à 4500 tr/min à 4 °C et récupérer le biosurfactant à partir de surnageant par deux méthodes d'extraction.

V.1. Extraction à froid

Nous mettons un volume de surnageant (500 mL) dans un erlenmeyer de 1L et nous ajoutons de l'éthanol (500 mL) goutte à goutte (1'éthanol/surnageant, v/v) en mettant de la glace autour de l'erlenmeyer qui contient le surnageant. La solution obtenue est laissée au réfrigérateur à +4 °C pendant une nuit, par la suite elle est centrifugée au froid (à une température de +4 °C), après, le biosurfactant est récupéré par une distillation simple (Figure II.16) [93].

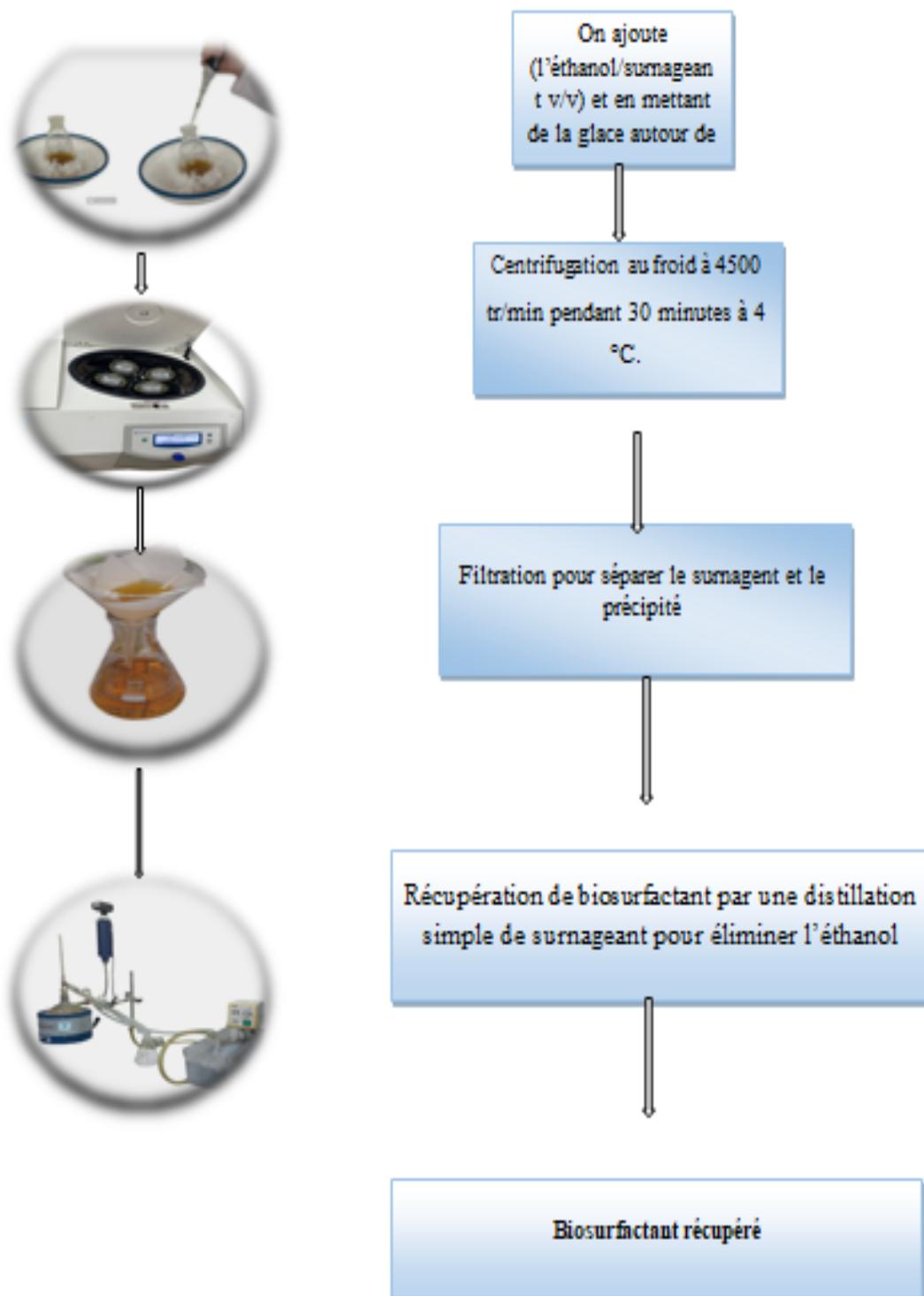


Figure II.16 : Schéma explicative des étapes d'extraction à froid

V.2. Extraction liquide – liquide

Le biosurfactant a été séparé du surnageant par une précipitation acide suivie d'une extraction liquide-liquide

- **Précipitation acide**

Le surnageant est ajusté à un pH de 2 avec une solution de HCl (5N) et laissé toute la nuit à 4 °C. Le surnageant est centrifugé par centrifugation réfrigérée à 4500 tr/min pendant 30 minutes à 4 °C.

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

Le surnageant obtenu après précipitation est extrait avec un mélange d'acétate d'éthyle et de méthanol (2:1, v/v). Le mélange est bien agité dans une ampoule à décanter et laissé pendant 24 heures. La phase organique (en haut) est récupérée et les traces d'eau sont éliminées avec du sulfate de magnésium anhydre, puis filtrée. Les solvants sont évaporés avec un évaporateur rotatif. Le biosurfactant brut obtenu est moyennement visqueux et de couleur miel.

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

Le surnageant obtenu après précipitation est directement extrait par un volume égal d'acétate d'éthyle (v/v) Ensuite, le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif[95].

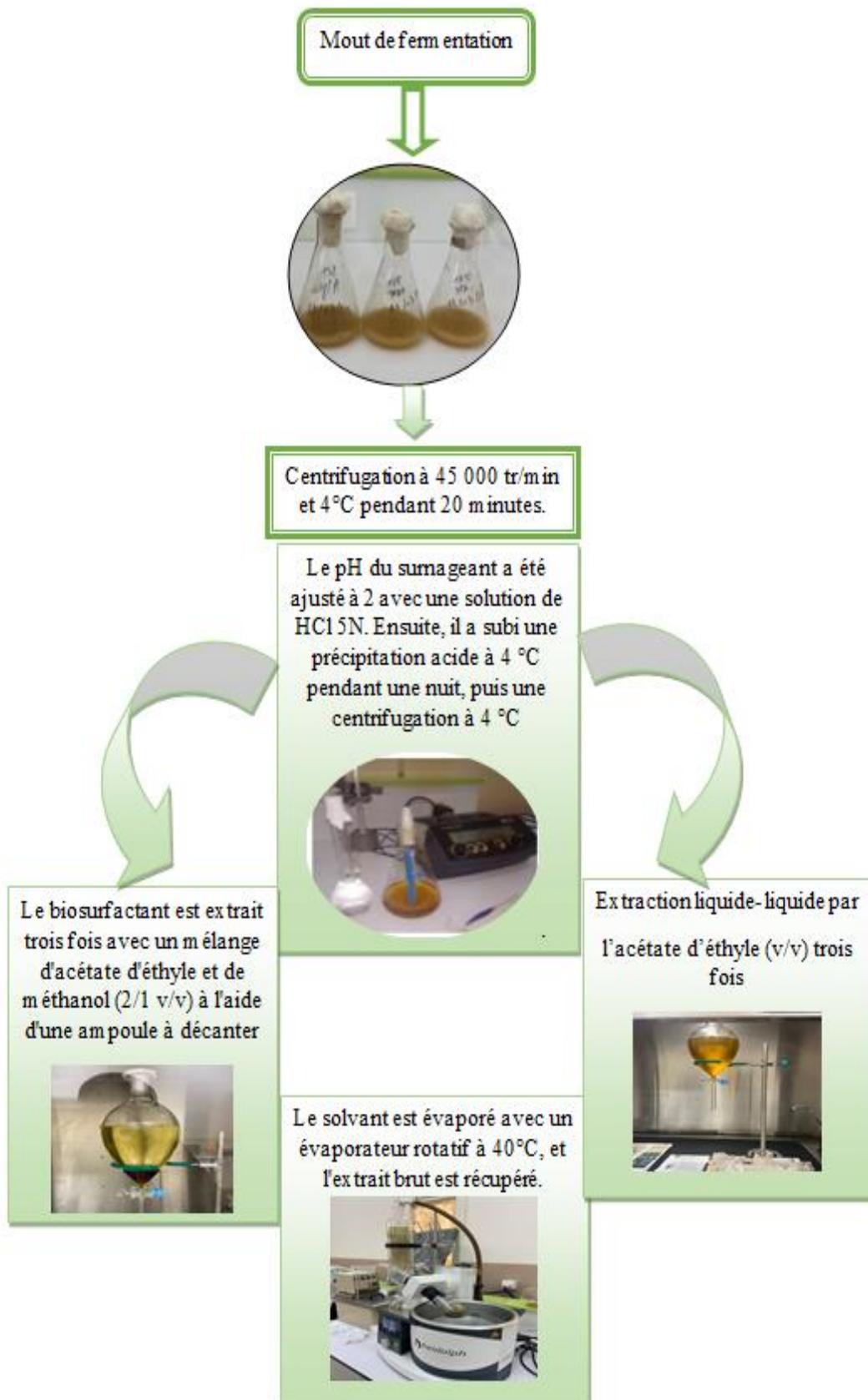


Figure II.17 : Représentation schématique des étapes d'extraction par solvant

VI. Caractérisation structurale de biosurfactant par infrarouge

Le spectre infrarouge a été obtenu 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 [95].

VII. Application de biosurfactant dans la détergence

VII.1. Procédé de préparation de savon

Les savons sont constitués d'ions carboxylates et de cations métalliques tels que les ions sodium ou potassium, et sont employés pour nettoyer diverses surfaces. Ils sont disponibles sous forme de blocs, de poudres, de paillettes ou de solutions liquides. Les savons biologiques et chimiques diffèrent par les ingrédients utilisés pour leurs fabrications [96].

VII.2. Réaction de saponification

La saponification est une réaction chimique qui transforme les triglycérides (graisses) en savon (ions carboxylates) et glycérine (glycérol), en utilisant une base alcaline comme la soude ou la potasse. Cette réaction se déroule en deux étapes : d'abord, les triglycérides sont hydrolysés pour libérer les acides gras et la glycérine, puis les acides gras sont neutralisés avec la soude. Si la saponification est bien réalisée, il ne reste aucun résidu de soude ou d'hydroxyde de sodium dans le produit final [96, 97, 98].

La réaction :



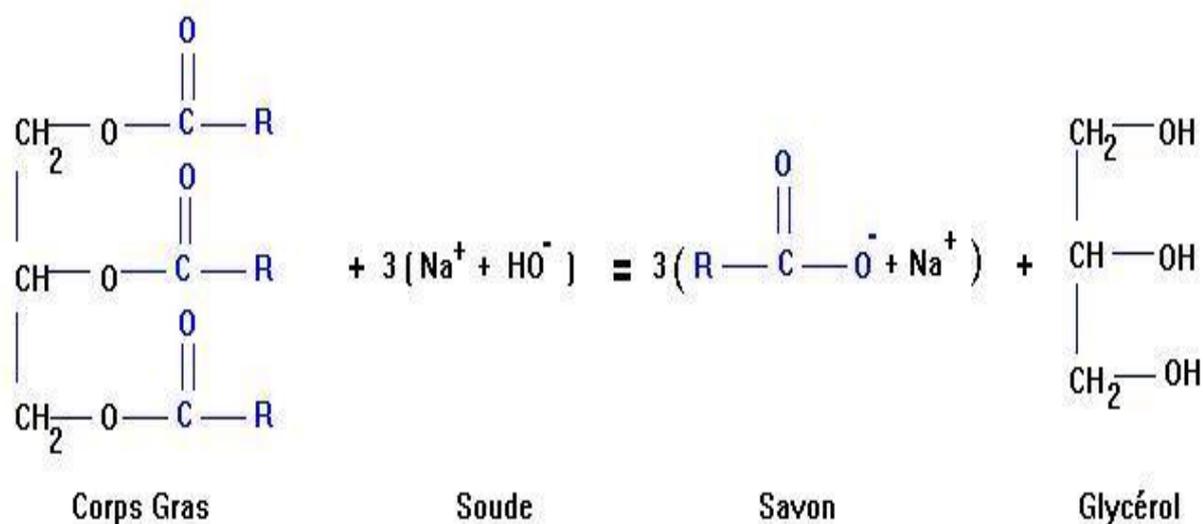


Figure II.18 : La réaction de saponification [98].

VII.3. Procédés de fabrication de savon

Dans les procédés de fabrication du savon, les mesures ont été prises selon le tableau II.4 [99]

Tableau II.4 : Indice de saponification des huiles utilisées

Huiles	Indice de saponification
Olive	0.134
Table (soja)	0.135
Friture	0.135

Tableau II.5 : La composition des savons fabriqués

Les savons	Savon 1 Huile de friture	Savon 2 huile de table	Savon 3 huile d'olive	Savon 4 Huile de table + huile d'olive	Savon 5 (commercial) Savon du marché
Formulation	<ul style="list-style-type: none"> 100g huile friture 26,9 g NaOH 	<ul style="list-style-type: none"> 100g huile de table (soja) 23,2g NaOH 	<ul style="list-style-type: none"> 100g de huile d'olive 13,4NaOH 	<ul style="list-style-type: none"> 50g Huile d'olive 50g huile de table 	<ul style="list-style-type: none"> Sodium palmitate Dioxyde de

	<ul style="list-style-type: none"> • Eau distillée • BS 	<ul style="list-style-type: none"> • Eau distillée • BS 	<ul style="list-style-type: none"> • Eau distillée • BS 	(soja) <ul style="list-style-type: none"> • NaOH 13,5 g • Eau distillé • BS 	titanium Enzymes Parfum colorant
--	---	---	---	--	--

La quantité de soude est déterminée par cette relation :

$$\text{Coefficient de saponification de l'huile} \times \text{Quantité d'huile} = \text{Quantité de NaOH}$$

VII.4. Saponification à froid

D'après les informations du (tableau II.5) ces savons ont été préparés à nécessité des huiles, NaOH et de l'eau distillée. Après avoir refroidi la solution de NaOH à température ambiante, elle a été mélangée avec chaque huiles à l'aide d'un mélangeur pour atteindre une consistance de type pudding. Le mélange a ensuite été versé dans des moules en silicone et laissé sécher pendant 24 heures. Les savons ont ensuite été retirés du moule, placés sur du papier filtre et vieillis à l'extérieur pendant 10 jours. [100].

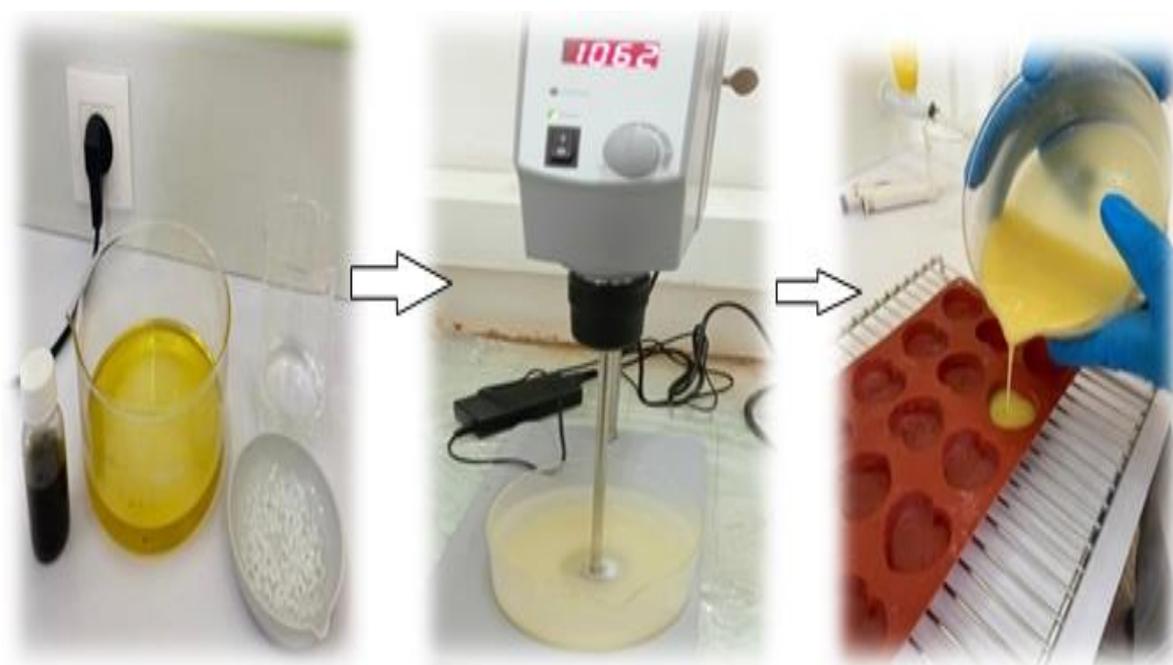


Figure II.19 : Les étapes de fabrication de savon

VII.5. Propriétés physico-chimique du savon

VII.5.1. Mesure de pH

Le principal souci actuel concernant le savon est son pH, qui mesure la concentration d'ions H^+ dans une solution et indique son acidité ou sa basicité sur une échelle de 0 à 14. La peau humaine a un pH moyen de 5,5, légèrement acide, tandis que la plupart des savons sont basiques, avec un pH supérieur à 7 [101].

Dans des cuves d'essai, 2 g de chaque savon ont été mesurés et transférés séparément dans 20 mL d'eau distillée. Les mélanges ont été homogénéisés et laissés reposer pendant 12 heures. Le pH a été mesuré avec pH-mètre. [102].

VII.5.2. Pouvoir moussant

Un (01)% de chaque solution de savon a été préparé et transféré séparément dans l'essai. Chaque solution a été homogénéisée pendant 1 minute et conservée pendant 5 minutes. Enfin, la hauteur de la mousse a été mesurée. La stabilité de la mousse a été évaluée pendant 20 minutes [102].

Une quantité égale du savon synthétisé a été dissoute dans de l'eau et la tension superficielle de chaque solution a été déterminée.

VII.5.3. Teste antitaches

Nous avons coupé les échantillons de tissu coton de couleur blanche en rectangle, et chacun d'eux était taché avec 2mL de pétrole, stylo, fraise et on les a laissé sécher toute la nuit (Figure II.20).



A) Tache de pétrole



B) Tache de fraise



C) Tache de stylo

Figure II.20 : Les tâches testées

Une fois 24h est passée et les échantillons de tissu ont été séchés, on prend nos tissus et on les lave pendant 1 min avec de l'eau.

VII.5.4. Pouvoir antibactérien

Les souches utilisées pour déceler l'activité antibactérienne des savons font partie de quatre genres de microorganismes qui sont des souches référentielles de l'American Type Culture Collection (ATCC) (**Tableau II.6**).

Tableau II.6 : Bactéries testés pour l'activité antibactérienne

N°	Souches (ATCC)
01	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 Gram+
02	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 14110 Gram+
03	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Gram-
04	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 Gram-

Un inoculum est préparé à partir des cultures de 24h 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.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de savon est réalisée par la méthode de diffusion par disque en milieu solide. Des boîtes de Pétri contenant la gélose LB, sontensemencées à l'aide d'un écouvillon stérile par une préculture bactérienne de 24h. Dans chaque boîte, un disque de 9 mm est imbibé dans la solution de savon qui a été déposée sur la surface du milieu LB. Une seconde boîte de Pétri reçoit uniquement un disque imbibé de savon témoin.

L'ensemble est incubé durant 24h à 37 °C. L'inhibition de la croissance est traduite par l'apparition des halos clairs autour des disques et les résultats sont obtenus en mesurant le diamètre de ces zones d'inhibition.

IX. Traitement d'effluent à base de savon

IX.1. Demande Biochimique en Oxygène (DBO) : c'est la quantité d'oxygène nécessaire à la dégradation de la matière organique biodégradable d'une eau par le développement des microorganismes, pendant 5 jours à 20 °C, on parle alors de la DBO₅. Elle est très utilisée pour le suivi des effluents urbains. Elle est exprimée en mg SELON le protocole suivant :

La mesure de DBO avec le système Oxitop est basée sur le principe de pression (mesuré par différence). La mesure est faite par mesure de pression par sondes de pression électriques piézo résistantes [103].

Prendre 43.5 mL de l'échantillon dans la fiole jaugée et transvaser dans la bouteille teintée en ajoutant 3 à 4 gouttes d'inhibiteur, ensuite on introduit la tige magnétique. Insérer le creuset noir dans le goulot de la bouteille et mettre 2 postilles de KOH dans le creuset. On visse le système de mesure Oxitop directement sur la bouteille. Pour démarrer la mesure, on appuie simultanément sur les touches S et M jusqu'à ce que l'affichage marque 00. On conserve pendant 5 jours à l'obscurité et à 20 °C dans l'incubateur. Pour lire la mesure de la DBO₅, on retire la bouteille avec le système Oxitop. En appuyant sur la touche M, on lit la valeur de la DBO₅ [103].



Figure II.21 : oxitop box pour la mesure de la DBO_5

IX.2. Demande Chimique en Oxygène (DCO) : c'est la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder la matière organique (biodégradable ou non) [103].

- Mélanger le bichromate de potassium, acide sulfurique, sulfate d'argent et sulfate mercurique.
- Ajoutez l'échantillon et de l'eau distillée, puis faites bouillir 2 heures.
- Refroidir, diluer à 300 mL, ajouter la féroïenne et titrer avec du sulfate ferreux.
- Faites un essai à blanc avec de l'eau distillée. Pour titrer le sulfate ferreux, diluer du bichromate, ajouter de l'acide sulfurique, refroidir, ajoutez la féroïenne et titrer.



Figure II.22 : Bloc digest" macro 12 postes pour le dosage de la DCO

Chapitre III

Résultats et discussion

Les levures constituent un groupe important de microorganismes suscitant un intérêt grandissant de la part des scientifiques et des différents acteurs des secteurs industriels. Une grande variété de levures productrices des biosurfactants ont été recensées, elles appartiennent principalement aux genres suivants : *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* et *trichosporon* [104, 105,106].

Dans ce contexte, nous avons travaillé avec une souche de levure isolée au niveau du laboratoire de recherche de chimie des substances naturelles et de biomolécules de l'université de Blida 1 (Figure III.23).

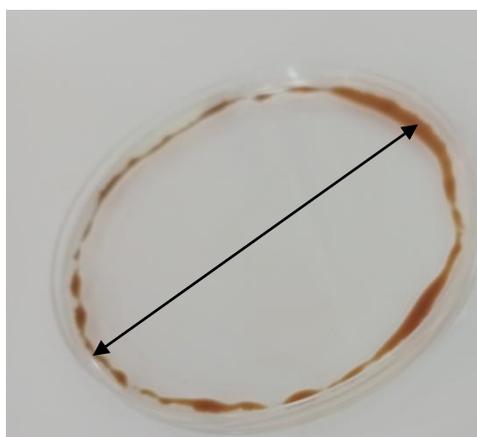


Figure III.23 : Aspect macroscopique de la souche de la levure codée 138

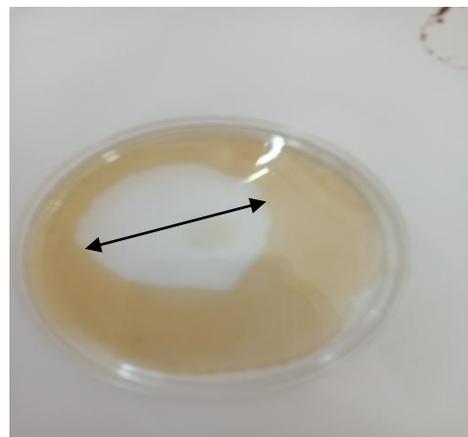
I. Les paramètres d'évaluation de la production de biosurfactant (Bs)

I.1. Diamètre de Déplacement de Pétrole (DDP)

Les résultats du test de déplacement de pétrole montrent que le biosurfactant présent dans le surnageant de culture a provoqué une zone de déplacement de pétrole visible (Figure III.24 b) ; ce qui est un indicateur de présence de biosurfactant, et suggère une activité de surface remarquable, alors que le Bs brut a donné des diamètres élevés par rapport au surnageant (Figure III.24).



a



b

Figure III.24 : a) DDP avec le biosurfactant (8 cm) - b) DDP avec le surnagent (3 cm)

Le test de déplacement de pétrole ne nécessite aucun équipement spécialisé. La méthode est rapide et simple qui peut être réalisée avec de petits volumes d'échantillon. Un micro-organisme est considéré comme un bon producteur de biosurfactant si son surnageant donne une DDP égale ou supérieure à 3 cm (correspond à $TS = 35 \text{ mN/m}$) [107]. Selon ces auteurs, il y a une corrélation entre le DDP et la TS.

I.2. Index d'émulsification (E₂₄)

L'indice d'émulsifiants (E₂₄) est considéré comme un paramètre clé pour la sélection des souches productrices de bio émulsifiants. Un E₂₄ supérieur à 50%, la souche est donc considérée comme bonne productrice de bio émulsifiant. L'index d'émulsification consiste à l'homogénéisation d'un volume de surnageant de culture avec le même volume de l'huile d'olive, huile de moteur. Les résultats obtenus indiquent que la souche 138 est productrice de biosurfactants avec un indice d'émulsification de 80% avec l'huile d'olive et 60% avec l'huile de moteur.

Vu les résultats obtenus ; nous déduisons que le biosurfactant produit dans notre cas a une bonne activité émulsifiante *vis-à-vis* l'huile d'olive et l'huile de moteur (Figure III.25).

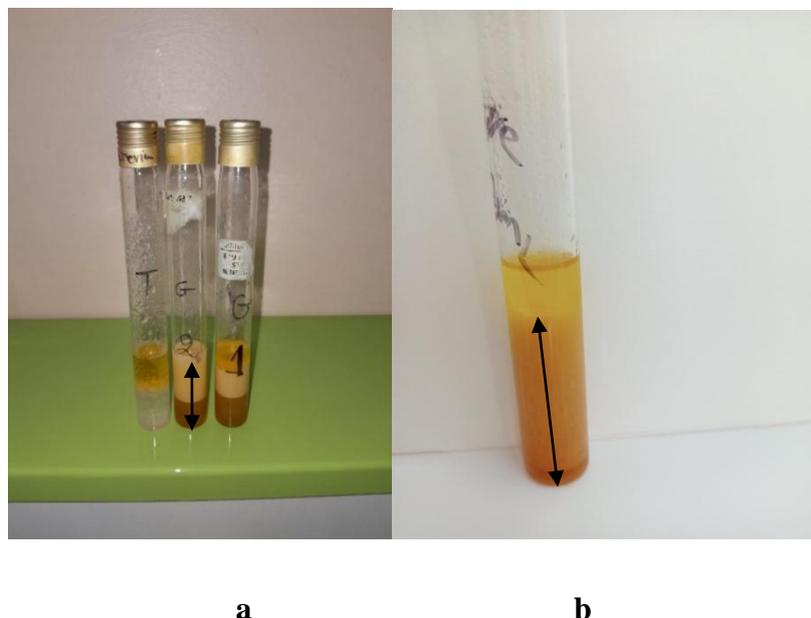


Figure III.25 : E₂₄ a) huile de moteur – b) huile d'olive

I.3. La tension de surface (TS)

Les résultats obtenus montrent que la TS du surnageant est de 30 mN/m tandis que le biosurfactant brut atteindre une valeur minimale de 27,8 mN/m.

Selon [108] 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. Donc la tension de surface est considérée comme le paramètre principal pour la détection de la production de biosurfactant.

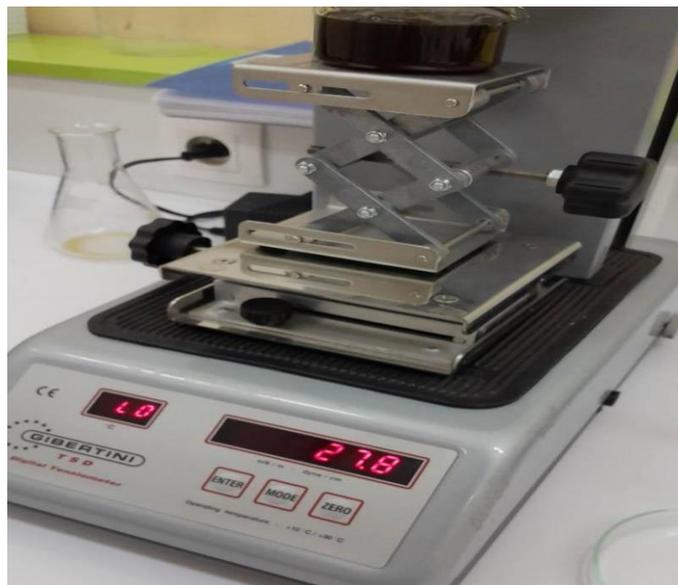


Figure III.26 : Tension de surface de Biosurfactant affiché par le tensiomètre

Calculer la biomasse :

D'après la relation :

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

On calcule les masses :

P1 : Poids du creuset vide: 90.7+ 87.5+85.9+87.8= 351.9 g/l

P2 : Poids du creuset + biomasse : 102.7+100.5+97.8+99.3=400.3 g/l

$$X = \frac{400.3 - 3351.9}{1}$$
$$= 48.4\text{g/l}$$

II. Évaluation de l'extraction du biosurfactant

II.1. Évaluation de l'extraction par solvant

Après avoir effectué l'extraction de biosurfactant par solvant d'acétate d'éthyle/méthanol, et acétate d'éthyle seule, nous avons obtenu le résultat présenté dans (la figure III.27) .



Figure III.27 : a) Biosurfactant extrait par l'acétate d'éthyle/méthanol, b) Biosurfactant extrait par l'acétate d'éthyle

L'aspect et la couleur du Bs obtenu par l'utilisation de deux types de solvants est différent, ceci est habituellement observé dans plusieurs travaux.

II.2. Évaluation de l'extraction à froid

Après avoir effectué l'extraction du biosurfactant à froid (avec de l'éthanol), nous avons obtenu le résultat présenté dans (la figure III.28).



Figure III.28 : Biosurfactant après extraction à froid

La technique d'extraction à froid par l'éthanol a donné un rendement de 13 g/L, qui est à son tour plus élevé par rapport le rendement de l'extraction par solvant (acétate d'éthyle/méthanol) 10 g/L.

III. Caractérisation structurale de biosurfactant par infrarouge

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

La Figure III.29 montre des spectres FTIR typiques enregistrés entre 400 et 4000 cm^{-1} de biosurfactant issu de la souche levurienne. Les groupes fonctionnels présents dans le biosurfactant ont été déterminés comme suit :

- La bande à 1394 cm^{-1} peut également être attribuée au C-H des groupes CH_2 et CH_3 , le pic 3295 cm^{-1} suggère la présence de vibrations d'étirement des N-H de la partie peptidique.
- En outre, le spectre indique la présence de vibrations d'étirement dans la région de transmittance de 1635 cm^{-1} (liaison amide) confirmant ainsi la présence de protéines.
- Les pics situés dans la région entre 1260 et 1025 cm^{-1} peuvent être attribués à la liaison éther C-O.
- Une vibration d'étirement vers 1060 cm^{-1} peut également être attribuée aux liaisons glycosuriques présentes dans les polysaccharides C-O-C.
- 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.

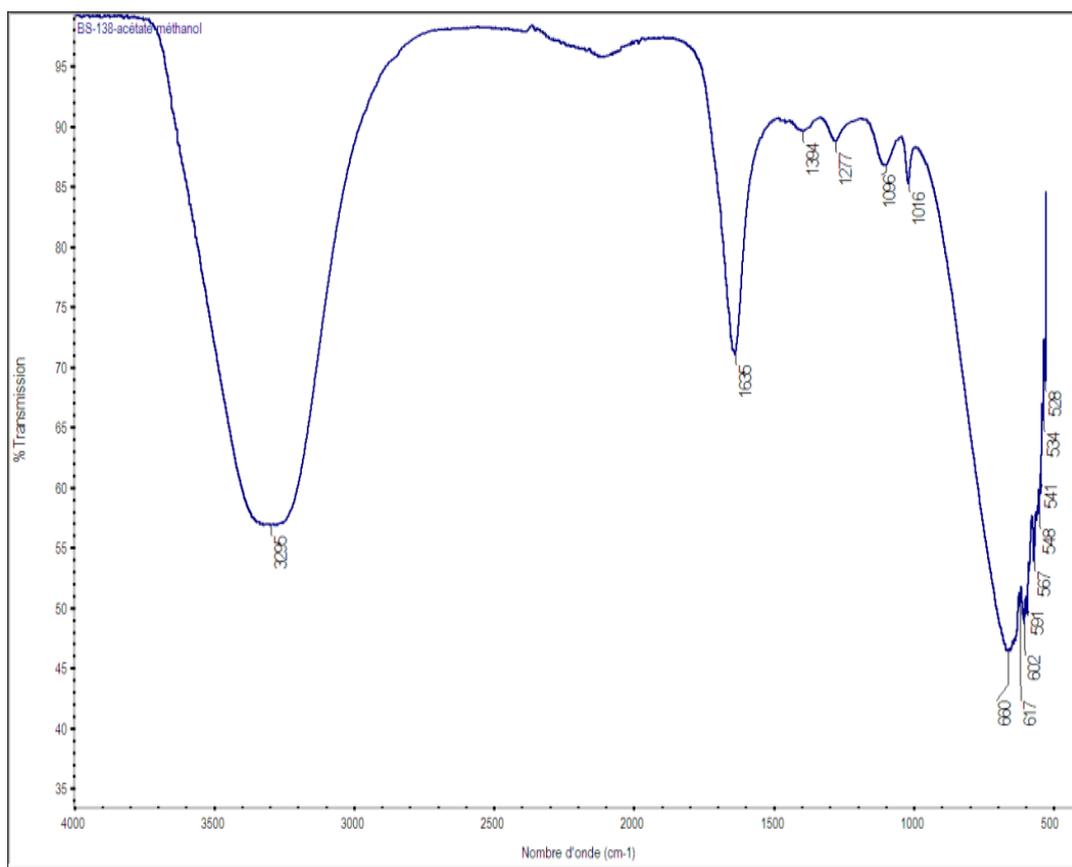


Figure III.29 : Spectre IR de biosurfactant produit par la levure 138

Une première lecture de ce spectre a révélé la présence des protéines, des glucides et des lipides, ceci a été confirmé par une analyse biochimique (travaux en cours).

IV. Application de biosurfactant dans la formulation des savons

Les savons fabriqués sont indiqués dans la figure III.30. Les paramètres mesurés sont donnés dans les Tableaux III.7-III.9.

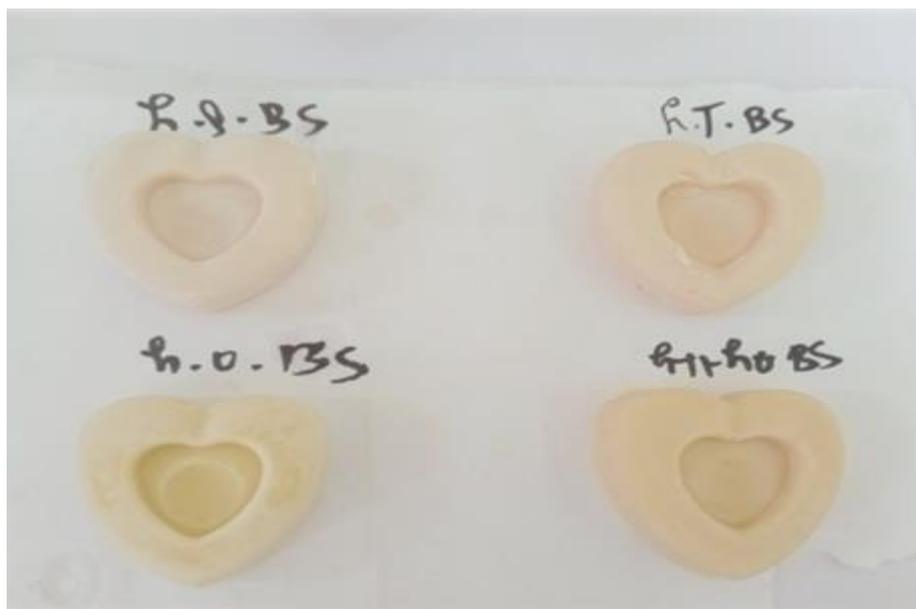


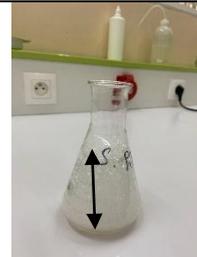
Figure III.30 : Savons obtenus avec plusieurs formulations en présence de Bs

Tableau III.7 : Mesure de pH des savons

Savons	Huile de friture	Huile d'olive	Huile de table	Huile de table +huile d'olive	Commerce
pH	10,40	10,51	10,53	10,21	10, 74

Le pH des 4 savons à base du biosurfactant, issus de la réaction de saponification est autour de 10, on remarque que leur pH est similaire au pH de savon de commerce, selon [108] qui ont trouvé le pH égal à 10 de tout le savon fabriqué du consortium de biosurfactant par le processus de saponification à froid.

Tableau III.8 : Pouvoir moussant des savons fabriqués à base de Bs

Savons	Huile de friture	Huile d'olive	Huile de table	Huile de table +huile d'olive	Savon du commerce
Hauteur de la mousse (cm)	8	5	6	10,5	2
Photo					

On remarque un grand pouvoir moussant de tous les 4 savons fabriqués à base de biosurfactant par rapport au savon commercial dont la hauteur de la mousse a persisté pendant environ deux heures et se compare favorablement à la hauteur observée dans les détergents.

La grande stabilité de la mousse pourrait être attribuée aux biosurfactants présents dans le savon car les biosurfactants sont décrits comme des agents moussants [108].

Tableau III.9 : Détermination de la tension superficielle des savons

Savons	Huile de friture	Huile d'olive	Huile de table	Huile de table +huile d'olive	Commerce
Tension de surface en mN/m	25,4	25,9	25,2	25,7	26,2

La tension superficielle d'un liquide est définie comme l'énergie nécessaire pour pénétrer la surface. Les liquides dans lesquels il existe des interactions moléculaires fortes, comme l'eau, présentent généralement des tensions superficielles élevées. Les molécules d'eau sont liées les unes aux autres en vertu d'une interaction entre les atomes d'hydrogène d'une molécule et

l'atome d'oxygène d'une autre molécule. D'une molécule et l'atome d'oxygène d'une autre - ce processus est appelé « liaison hydrogène ».

Il en résulte une sorte de « peau » à la surface du liquide. La tension superficielle de l'eau est considérablement réduite par l'ajout d'un détergent. Cela signifie que la tension superficielle est plus faible. La capacité de mouillage de l'eau est donc améliorée.

La tension superficielle obtenue pour les savons à base du consortium de biosurfactant signifie que la tension superficielle de l'eau a été réduite.

La tension superficielle des 4 savons déterminées à (25,4 ; 25,9 ; 25,2 ; 25,7 mN/m) par rapport au commerce 26,2 mN/m, s'est avérée plus faible (et meilleure) que celle des savons commerciaux de même nature et à des concentrations similaires. Ces savons sont donc efficaces. Comparé à la tension superficielle des autres savons commerciaux, ils se sont avérés meilleurs.

IV.1 Pouvoir détergent sur les tâches testées

Les résultats des lavages avec les savons formulés à base de Bs sont présentés dans la figure III.31.

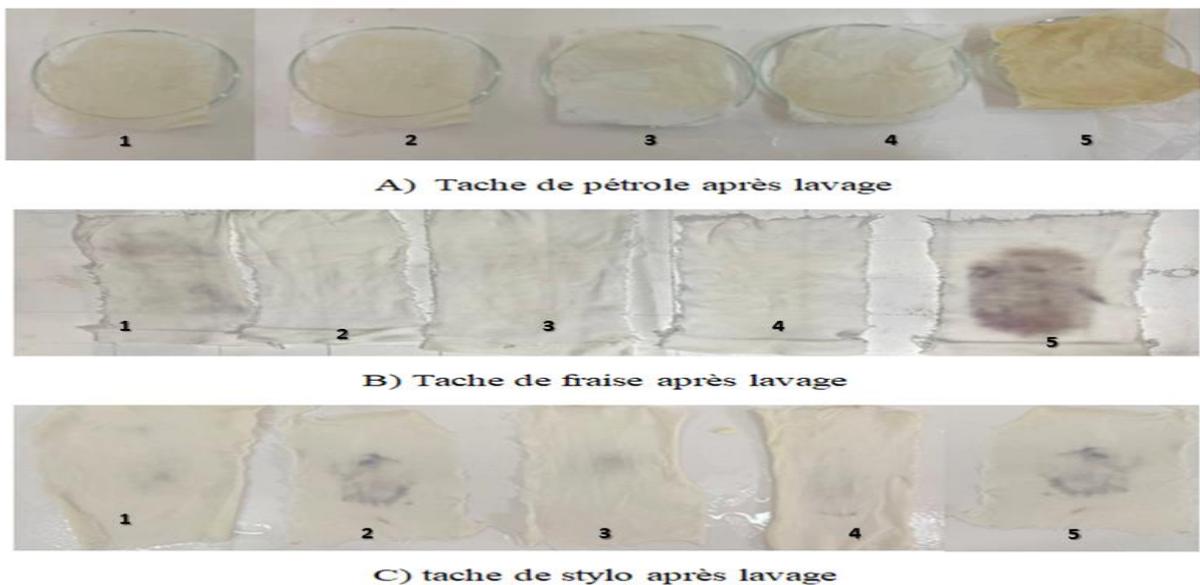


Figure III.31 : Les taches après lavage

1) Huile de friture 2) Huile d'olive 3) Huile de table 4) Huile de table + Huile d'olive 5) Commercial

La bonne aptitude au nettoyage des savons à base de biosurfactant pourraient être attribuées aux biosurfactants présents dans le savon, car les biosurfactants sont décrits comme des agents nettoyeurs.

IV.2. Activité antibactérienne des savons

Les photos de la figure III.32 montrent clairement les zones d'inhibition provoquées par les savons contre les bactéries testées.

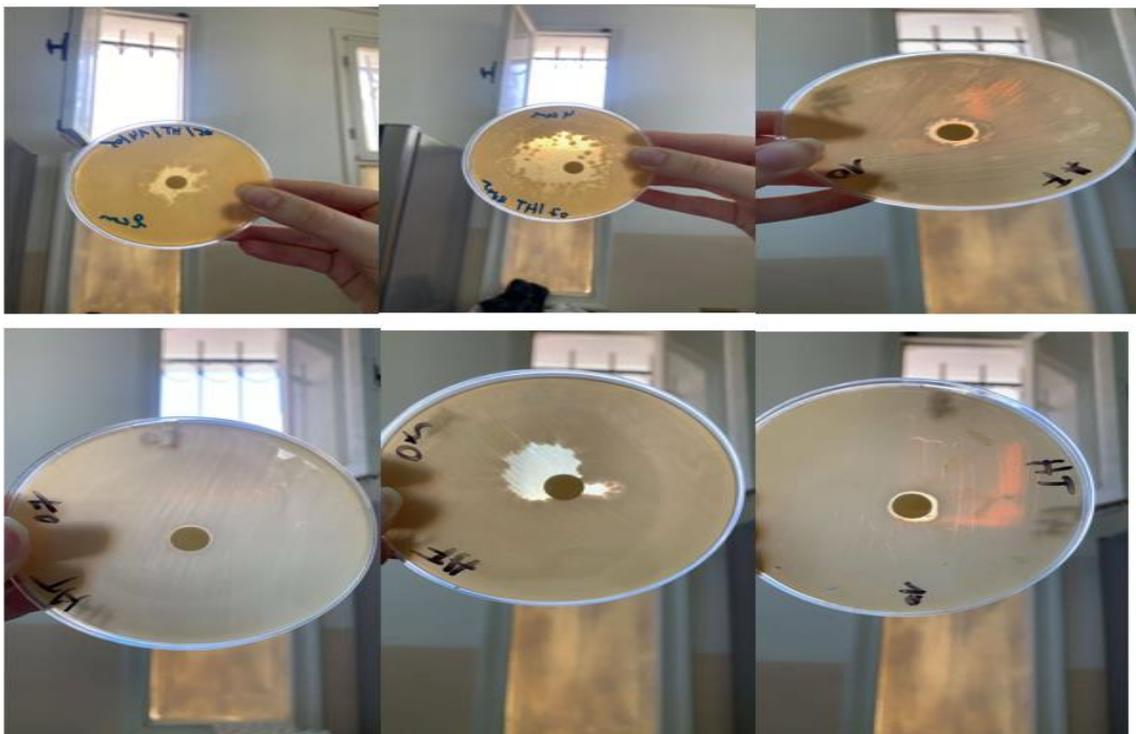


Figure III.32 : Activité antibactérienne des savons fabriqués à base de biosurfactant

L'antibiogramme réalisé sur les souches pathogènes testées montre le pouvoir inhibiteur des savons fabriqués à base de biosurfactant produit par la souche levurienne, seulement où il apparaît une zone claire à cause de la diffusion des molécules de savon.

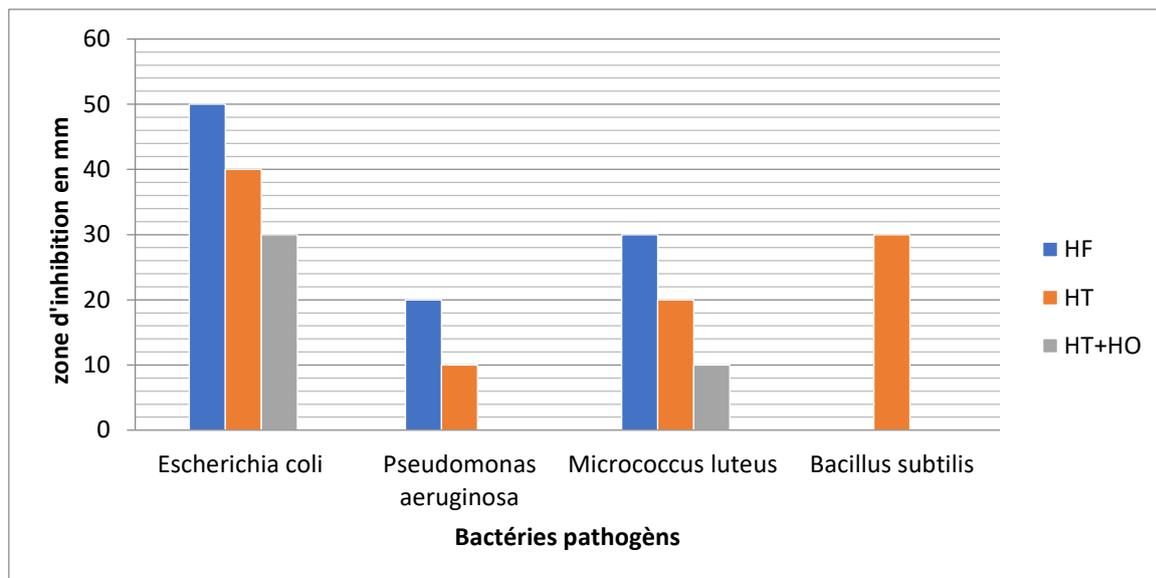


Figure III.33 : activité antimicrobienne des savons fabriqués à base de Bs. HF (huile de friture), HT (huile de table), HT+HO (huile de table + huile d’olive).

Une échelle d’estimation des diamètres des zones d’inhibition de la croissance bactérienne est utilisée pour interpréter les résultats de l’étude qualitative de l’activité antibactérienne des savons sur milieu solide. Nous pouvons constater d’après les histogrammes ci-dessus que sur les quatre souches testées : le savon avec l’huile de table a marqué un bon pouvoir antibactérien contre toutes les bactéries testées avec un diamètre d’inhibition très important avec *Escherichia coli* (50 mm), suivi avec *Bacillus subtilis* (30 mm), moyennement avec *Micrococcus luteus* (20 mm) et faible contre *Pseudomonas aeruginosa* (10mm).

IV.3. Paramètres de pollutions des effluents contenant les savons fabriqués à base de Bs

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 10.

Tableau III.10 : Les mesures de DCO et DBO₅ des effluents des savons à base de Bs

Savons	DCO mg/L	DBO ₅ mg/L
Témoin commercial	7000	150
Huile de table	7700	200
Huile de table +olive	6288	80
Huile d’olive	6800	100
Huile de friture	8800	750

D'après les valeurs indiquées dans le tableau 10, les valeurs de DCO sont élevées par rapport aux normes nationales donc l'effluent de savon nécessite un traitement physico-chimique par floculation, coagulation et flottation.

Conclusion générale

Les biosurfactants sont des biomolécules qui présentent un intérêt économique et environnemental à cause de leurs différentes propriétés et applications dans de nombreux domaines industriels. A cet effet, nous avons essayé d'apporter notre contribution à la valorisation de biosurfactant produit par une levure isolée localement en vue de ses caractéristiques en tant que agent moussant, détergent, antiseptique et antimicrobien.

La souche isolée localement à partir de fruit de grenade est une souche productrice d'un biosurfactant à caractère tensioactif, émulsifiant et antimicrobien qui d'être bien exploité dans les différents domaines industriels et environnementaux.

Le rendement de production est acceptable en raison des quantités obtenues en culture submergée en batch et dans des conditions contrôlées (pH, agitation et température).

Les méthodes d'extraction de biosurfactant jouent un rôle fondamental sur ses aspects de consistance et couleurs dont l'extrait brut a révélé des activités et pouvoirs très remarquables. Toutefois, une purification de cette bio molécule est incontournable pour des fins d'analyses et d'applications ciblées, notamment, en thérapie et en industrie pharmaceutique en tant que agent antimicrobiens.

Les savons formulés à base de biosurfactant ont un pH de 10 et ont montré un bon pouvoir nettoyant avec une tension de surface réduite et une bonne stabilité de la mousse. De même, les savons ont montré un bon pouvoir antiseptique et antibactérien contre toutes les bactéries testées (diamètre d'inhibition entre 10 mm et 50 mm) et un bon pouvoir détergent avec toutes les tâches testées. Notre biosurfactant en plus de ses caractéristiques détergentes, antiseptique a permis d'augmenter l'efficacité moussante des savons, donc le biosurfactant produit localement mérite d'être un bon candidat dans les différents types de formulation en détergence.

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

L'exploitation de cette expérience à l'échelle industrielle pour valoriser les propriétés biotechnologiques de biosurfactant issu de la souche de levure isolée localement et permettra d'en profiter davantage dans l'industrie de la détergence.

Références

- [1] Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A. and Sarubbo, L.A. (2016) Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, Article 401.
- [2] Roy, A. (2017) A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and Its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 8, Article ID: 1000248.
- [3] Adu, S.A., Naughton, P.J., Marchant, R. and Banat, I.M. (2020) Microbial Biosurfactants in Cosmetic and Personal Skincare Pharmaceutical Formulations. *Pharmaceutics*, 12, Article 1099.
- [4] <https://www.mordorintelligence.com/fr/industry-reports/surfactants-market>
- [5] TALBI. Z (2017) « EXTRACTION DE POLLUTION ORGANIQUE ET MÉTALLIQUE PAR TENSIOACTIFS BIODÉGRADABLES ET LIQUIDES IONIQUES », thèse de doctorat, Université d'Oran - Mohamed-Boudiaf.
- [6] <http://WWW.SEPPIC.com>.
- [7] René. Colson, (1974) *Surfactif en cosmétologie*. Paris : EYROLLES.
- [8] Guido. BOGNOLO (2013), *Tensioactifs non-ioniques-Mise en œuvre industrielle*.j 2265. Paris : Technique de l'ingénieur.
- [9] Estelle MAYOT, (2007), «monobactames et triazoles fluorocarbones amphiphiles: vers des systèmes catanioniques à propriétés multiples », thèse de doctorat, université henri poincaré en chimie et physicochimie moléculaires, P25.
- [10] [Becher P.; (1966)« Emulsion Theory and Practice » ; Reinhold ;New York
- [11] Israelachvili, J.N. (1992) *Intermolecular and surface forces*, 2a ed., Academic Press Ltd
- [12] Volkering, F., Breure, A. Rulkens, W. (1997).Aspects microbiologiques de l'utilisation des surfactants pour l'assainissement biologique des sols. *Biodégradation* 8 , 401-417.
- [13] R. Jahan, A.M. Bodratti, M. Tsianou, P. Alexandridis, (2020) *Adv. Colloid Interface Sci.*275102061.
- [14] R. Hausmann, C. Syldatk, in: N. Kosaric, F. Vardar-Sukan (Eds.), (2014) *Biosurfactants Production and Utilization — Processes, Technologies, and Economics*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 3.
- [15] A.Bhadani, A. Kafle, T. Ogura, M. Akamatsu, K. Sakai, H. Sakai, M. Abe,Curr. Opin. (2020) *Colloid Interface Sci.* 45 124.

- [16] Z. Liu, Z. Li, H. Zhong, G. Zeng, Y. Liang, M. Chen, Z. Wu, Y. Zhou, M. Yu, B. Shao, J. (2002) *Environ. Chem. Eng.* 5 (6) (2017) 6030, [19] S. Lang, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7 (1–2) 12.
- [17] C.N. Mulligan, S.K. Sharma, A. Mudhoo, K. Makhijani, in: C.N. Mulligan, S.K. Sharma, A. (2014), Mudhoo (Eds.), *Biosurfactants Research Trends and Applications*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 1
- [18] Healy M. G., Devine C. M. and Murphy R. (1996),; *Microbial production of biosurfactants ;, Resources, Conservation and Recycling*, 18, 41 - 57.
- [19] Cooper D.G and Paddock D.A.(1984). *Production of a biosurfactant from Torulopsis Bombicola. Applied Environmental Microbiology.* 47:173-176
- [20] Inoue S. Et Itoh S. (1987). *Sophorolipids from Torulopsis Bombicola Microbial Surfactant in Alkane fermentation, biotechnol.Lett*, vol. 4, 199-205
- [21] Desai J. Dand Banat I.M.(1997). *Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and Molecular biology Reviews.* 61:47-64.
- [22] 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.
- [24] Kappeli O. et Finnerty W. R. (1979). *Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown Acinetobacter. J. Bacteriol*, 140:707–712.
- [25] Drakontis C.E., Amin S.(2020). *Biosurfactants :“Formulations, properties, and applications”.* *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* ;48:77–90.
- [26] Wise, Willumsen P.A et Karlson U. (1997). *Screening of bacteria isolated from PAHcontaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. Biodegradation* 7,415– 423.
- [27] Bognolo G. (1999) .*Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152, (1-2), 41-52
- [28] Dziegielewska, E., Adamezak, M. (2013) ; *Evaluation of waste products in the synthesis of surfactants by yeasts ,Chem. Pap.*, 671113-1122.
- [29] Holmberg K., (2001). *Natural surfactants. Current Opinion in Colloid ; Interface Science*, 6: 148-159
- [30] Holmberg K., (2002). *Natural surfactants. Current Opinion in Colloid ; Interface Science*, 6: 148-159.
- [31] Neindre B.L., (1993). *Tensions superficielles et interfaces. Techniques del’ingénieur. Traités constants physico-chimiques.* 475 : 2-12.
- [32] *optimisation de la production d’un biosurfactant issu d’une souche bactérienne isolée localement (2018) mémoire.*

- [33] 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., (2015) « Seldin L. *Bacillus amyloliquefaciens* TBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery ». *Colloids Surf. B Biointerfaces* ; 136:14–21
- [34] [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.).
- [35] Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons
- [36] Volkering, F., Breure, A. M., van Andel, J. G., & Rulkens, W. H. (1995). Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1699-1705.
- [37]Ishigami, Y., Gama, Y., Nagahara, H., Yamaguchi, M., Nakahara, H., and Kamata, T. (1987). *Chem. Lett.*, 1987, 763–766.
- [38] Rouse J. D., Sabatini D. A., Suflita J. M. and Harwell J, H. (1994) “Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds”. *Crit.R Environ. Sci. Technol.* 24, 325-370Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. *Crit.R Environ. Sci. Technol.* 24, 325-370
- [39]Kebbouche-Gana S., Gana ML., 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.
- [40]SantosD.K.F.,Rufino R.D.,LunaJ.M.,SantosV.A.,Sarubbo.À. (2016) .Biosurfactants : multifunctional biomolecules of the 21stcentury.*International Journal of Molecular Sciences*.17:401-432
- [41] Luna J.M.,Rufinrio R., L.A.,Campos-Takaki G.B.(2013).Characterisation,surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial west by candida sphaerica UCP 0995 for form application in the petroleum industry.*colloids and surfaces B:Biointerfaces* .102:202-209.
- [42]Bognolo G. (1999) Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons,*Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152, (1-2), 41-52
- [43] Mulligan C.N., Young R.N. et GIBBS B.F. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review, *Engineering Geology*, 60,371-380.
- [44]Christofi N. et Ivshina I.B. (2002). A review:microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation, *Journal of AppliedMicrobiology*, 93, 915-929.
- [45]Fiechter A. (1992). Biosurfactants :moving towards industrial application,*Tibtech*, 10, 3-12.

- [46] Mata-Sandoval J.C, Karns J. Et Torrents A. (2000). Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides, *Environ. Sci. Technol.*, 34, (23), 4923-4930
- [46] Desai J.D et Banat I.M. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*. Vol. 61, No. 1, p. 47–64.
- [47] Banat M., Makkar R.S. et Cameotra S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 495-508.
- [48] Cameotra S.S. et Makkar R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 520-529.
- [49] Déziel E., Paquette G., Villemur R., Lépine F. et Bisailon J.-G. (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons, *Applied Environ. Microbiol.*, 62, (6), 1908-1912.
- [50] Lang S. et Wullbrandt D. (1999). Rhamnolipids Biosynthesis – Microbial production and application potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 22-32.
- [51] Guerra-Santos L.H., Kappeli O. et Fiechter A. (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 443-448
- [52] Urai, M., Aizawa, T., Anzai, H., Ogihara, J., Iwabuchi, N., Neilan, B., Couperwhite, L., Nakajima, M. et Sunairi, M. (2006) Structural Analysis of an extracellular polysaccharide produced by benzene tolerant bacterium, *Rhodococcus* Sp " 33. *Carbohydr Res*, 341 616-623
- [53] Cameotra SS, Makkar RS, Kaur J, Mehta SK (2010) « Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind » *AdvExp Med Biol*, 672261-280
- [54] Ruiz-Garcia, C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I. & Quesada, E. (2005) « *Bacillus Velez* *Ensis* Sp. nov., une bactérie productrice de tensioactifs isolée de la Rivière Velez à Malaga, sud de l'Espagne » *Int J Syst Evol Microbiol*, 55 191-195
- [55] Abu-Ruwaida A. S., Banat I. M., Haditirto et Khamis A (1991) « Nutritional Requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus* Bacterium » *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7 53-61
- [56] Arino S., Marchal R. et Vandecasteele J.P. (1996). Identification and production of rhamnolipid biosurfactant by a *Pseudomonas* species, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 162-168.
- [57] Champion J.T., Gilkey J.C., Lamparski H., Retterer J. et Miller R.M. (1995). Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effect of pH, cadmium and octadecane, *J. Environ. Qual.*, 24, 19-28.

- [58] Lang S, Wullbrandt D. (1999) Rhamnolipids-biosynthesis, microbial production and application potential, *Applied Microbiol Biotechnol.* 51 22-32
- [59] Guerra-Santos L., Kappeli O, Fiechter A. (1986) « Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors » *Applied Microbiology and Biotechnology* 24 443-448
- [60] A Boukhatem et R. Aouf (2016) « Contribution à l'étude des propriétés anti-oxydatives et de l'efficacité anti corrosion sur l'acier API 5L X52 d'une prodigiosine d'une souche de *Serratia marcescens* » Mémoire de fin d'études,
- [61] Guerra-Santos LH. Kappeli, O and Fiechter A (1984) « *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture *Microbiology* », 48 301-305
- [62] Pardhi, D. S., Panchal, R. R., Raval, V. H., Joshi, R. G., Poczaï, P., Almalki, W. H., & Rajput, K. N. (2022). Microbial surfactants: a journey from fundamentals to recent advances. *Frontiers in Microbiology*, 13, 982603.
- [63] Sen, R., and Swaminathan, T. (2005). Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. *Process Biochem.* 40, 2953–2958. doi: 10.1016/j.procbio.2005.01.014
- [64] Stanbury, P., Whitaker, A., and Hall, S. (2016). *Principles of Fermentation Technology*, 2nd Edn. Amsterdam : Elsevier Science.
- [65] Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Philip, J. C., Christofi, N., Dunbar, S. A., and Ritchkova, M. I. (2001). Recovery of Rhodococcus Surfactants Using Methyl Tertiary-butyl ether extraction. *J. Microb. Methods* 46, 149–156.
- [66] Nitschke, M., Nitschke, M., and Pastore, G. M. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresour. Technol.* 97, 336–341.
- [67] Noah, K. S., Fox, S. L., Bruhn, D. F., and Thompson, D. N. (2002). Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98–100, 803–813.
- [68] Dubey, K. V., Juwarkar, A. A., and Singh, S. K. (2005). Adsorption-desorption process using woodbase activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. *Biotechnol. Process* 21, 860–867.
- [69] Abd-Al-Hussan, G.F., Abd, F., Hussein, A.L. and Jassim, M., (2016). Extraction, purification and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *J. Kerbala Univ*, 14, pp.186-192.
- [70] Parra J L, Guinea J, Manresa M. A., Robert M., Mercade ME, Comelles F. and Bosch M. P. (1989) ;Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants "; *JAOCS*, 66 (1),, 141-145
- [71] Onaizi, S. A., He, L., and Midellberg, A. P. J. (2009). Rapid screening of surfactant and biosurfactant Surface cleaning performance. *Coll. Surf. B* 72, 68–74.

- [72]Turbekar, R., Malik, N., Dey, D., and Thakare, D. (2014). Development of rhamnolipid based white board cleaner. *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.* 2, 570–573.
- [73]Jain, R. M., Mody, K., Mishra, A., and Jha, B. (2012). Physicochemical characterization of biosurfactant and its potential to remove oil from soil and cotton cloth. *Carbohydr. Polym.* 89, 1110–1116.
- [74]Bafghi et Fazaeli poor, Bafghi, M. K., and Fazaeli Poor, M. H. (2012). Application of rhamnolipid in the formulation of a detergent. *J. Surfactants Deterg.* 15, 679–684.
- [75]Bouassida, M., Fourati, N., Ghazala, I., Ellouze-Chaabouni, S., and Ghribi, D. (2018). Potential application of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactants in laundry detergent formulations: compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Eng. Life Sci.* 18, 70–77.
- [76] .Helmy, Q., S. Gustiani, and A. T. Mustikawati. (2020)"Application of rhamnolipid biosurfactant for bio-detergent formulation." *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. Vol. 823. No. 1. IOP Publishing,
- [77]Okouakoua, F.Y., Kayath, C.A., Mokémiabeka, N.S., Elenga, V.B.N., N’goma-Mona, D.N., Lambi, N.N., Wilson, S.P.E., Malanda, C.D.B., Tsana, R., Bissoko, J.P.S., Kaya-Ongoto, M.D., Kinavuidi, D.J.K. and Nguimbi, E. (2024) Antiseptic Efficacy of A Soap Made from Biosurfactants Isolated from *Bacillus* and *Lactobacillus* against Pathogenic Bacteria. *Advances in Microbiology* 14, 31-58
- [78]Biosurfactants:Potential and Eco-Friendly Material for Sustainable Agriculture and EnvironmentalSafety—A Review
- [79] 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.
- [80]Zhi, Y., Wu, Q., Xu, Y.,(2017) « Genome and transcriptome analysis of surfactin
- [81]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
- [82]Marchant R and Banat I.M.(2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *trends biotechnology.* 30 :558-565565.
- [83]Mokdad Kamila, (2015), mémoire de magistère « criblage des souches bacteriennes productrices de biosurfactants isolées localement, optimisation de la production et caractérisation de biosurfactants en vue d'une application en agroalimentaire »
- [84] Lang S. et Willebrand D. (1999). Rhamnose Lipid Biosynthesis – Microbial production and application potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 22-32.

- [85] .KIM, Pyoung-II, RYU, Jae-Won, KIM, Young-Hwan,(2010) Production of biosurfactant lipopeptide iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum Gloeosporioides*. *Journal of microbiology and biotechnology*, vol. 20, no 1, p. 138-145.
- [86] Ongena M et Jacques P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol, *Trends Microbiol.* 16 115–125
- [87] 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)
- [88] Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). "Potential commercial applications of microbial surfactants." *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- [89] Karanth, N. G. K., Deo, P. G., & Veenanadig, N. K. (1999). "Microbial production of biosurfactants and their importance." *Current Science*, 77(1), 116-123.
- [90] Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2002). "An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), 428-434.
- [91] Techaoei, S., Leelapornpisc, P., Santiarwarn, D., & Lumyong, S. (2007)
- [92] Derguine Mechri Louiza (2019), thèse de doctorat, production et caractérisation des biosurfactants par des levures et des moisissures
- [93] Griffiths, P. R., & de Haseth, J. A. (2007). *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. John Wiley & Sons.
- [94] Allouache, B., & Issaadi, H. (2014). Etude de la glycérine et suivi de l'évolution des analyses physico-chimiques ,Thèse de Doctorat, Université de bejaia
- [95] Smail, L. E., Bournine, S., & Abdelkrim, F. (2019). Élaboration d'une lessive liquide à base de savon.
- [96] Siham, B., Benbekai, E., & Smail, L. E. (2020). Formulation et analyse d'un savon liquide pour l'hygiène intime.
- [97] Félix, S., Araújo, J., Pires, A. M., & Sousa, A. C. (2017). Soap production: A green prospective. *Waste management*, 66, 190-195.
- [98] Antonic, B., Tesikova, K., Jancikova, S., Dordevic, D., & Tremlova, B. (2020). Used palm oil as material in the soap production. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 68(2), 509-516.
- [99] Saadoudi Hadjer, A. R. (2022). Savon à base d'huile de friture usagée [Thèse doctorat, faculté des sciences et de la technologie Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi de Bordj Bou Arréridj].

- [100] Idoko, O., Emmanuel, S.A., Salau, A.A. and Obigwa, P.A. (2018) Quality Assessment on Some Soaps Sold in Nigeria. *Nigerian Journal of Technology*, 37, 1137- 1140.
- [101] Mode opératoire de l'A.N.R.H (2000)
- [102] Monteri A.S., Countinho J.O.P.A., Junior A.C., Rosa C.A., Siqueira E.P., Santos V.L. (2009). Characterization of new biosurfactant produced by *trichosporamontevidense* CLOA72 isolated from dairy industry effluents. *Journal of basic Microbiology*. 49:553-563.
- [103] Sen S., Borah S.N., Bora A., Deka S. (2017). Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula Babjee* YS3 Microbial Cell Factories. 16:95-109.
- [104] 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.
- [105] 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,
- [106] Batista S B, Munteer 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.
- [107] Sharma D, Saharan BS, Kapil S (2016). *Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria*. (Eds.) Sharma D, Saharan BS, Kapil S. Springer Briefs in Microbiology Deepansh
- [108] Okouakoua, F.Y., Kayath, C.A., Mokémiabeka, N.S., Elenga, V.B.N., N'goma-Mona, D.N., Lambi, N.N., Wilson, S.P.E., Malanda, C.D.B., Tsana, R., Bissoko, J.P.S., Kaya-Ongoto, M.D., Kinavouidi, D.J.K. and Nguimbi, E. (2024) Antiseptic Efficacy of A Soap Made from Biosurfactants Isolated from *Bacillus* and *Lactobacillus* against Pathogenic Bacteria. *Advances in Microbiology* 14, 31-58

Annexe : Appareillage et materiel utilisés

Le nom de l'appareil	Le rôle	Photo
Autoclave	Stérilisateur par la vapeur	
Incubateur agitateur	Appareil permettant de mélanger deux composants de façon homogène	
Incubateur bactériologique	Utilisée pour l'incubation des cultures microbiennes	
Tensiomètre	Mesure la tension superficielle	
pH-mètre	Mesure le pH	
Centrifugeuses	Séparation de la biomasse et surnageant	

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	
Bec benzene	Steriliser le milieu	
Vortex	Mélanger et homogénéiser	