

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE DE BLIDA 1



**FACULTE DE TECHNOLOGIE
DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES**

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Option : Procédés de traitement des effluents et protection de l'environnement

THEME

*Caractérisation de deux Biosurfactants Synthétisés par une souche
bactérienne halotolérante SdK644*

PAR

HELLAL Nacima

Encadreur :

K. Eddouaouda

Maître de conférences (B), Université Blida 1.

Co- Encadreur :

B. ZENATI Attaché de recherche au CNRDPA.

Remerciements

Attaché de recherche au CNRDPA.

Avant tout je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir accordé le courage, la force et les moyens pour accomplir ce modeste travail.

Je remercie M. BADIS Abdelmalek Professeur à l'université de Blida 1, de m'avoir accueilli au sein de son équipe.

Je remercie également mon encadreur Dr Eddouaouda K. pour sa disponibilité, ses précieuses remarques et sa compréhension ; merci profondément pour les temps consacré.

Je remercie spécialement mon co-encadreur de mémoire, Monsieur ZENATI B., pour tout l'aide et le soutien de tous les instants qu'il m'a apporté, pour son encadrement scientifique très formateur et de qualité, ainsi que pour les conseils et astuces qui ont permis de me faciliter le travail ; Merci pour votre gentillesse.

Je remercie également M.LEZHAR Mouloud maître de conférences à l'université de Blida 1 qui m'a fait l'honneur de présider ce l'honorable jury.

Je remercie, vivement et profondément les membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce travail, Mme.LAARIBI Hassiba maître de conférences à l'Université de Blida 1 et Mme. TAOUALIT Najet maître assistante à l'Université de Blida 1.

Mes vifs remerciements vont, également, à Mme Zahia ainsi qu'à tous les techniciens du département de chimie sans exception pour leur aide et surtout pour leurs gentillesse.

Je remercie les techniciennes du laboratoire de recherche de Mme Houmani de nous avoir facilité l'analyse de notre échantillon par IRTF.

Enfin, il me serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ses quelques lignes l'expression de mes sincères remerciements.

Dédicaces

A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance.

A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.

A mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

Avec un énorme plaisir et une immense joie, que je dédie ce travail A :

Mes frères et mes sœurs, mon fiancé et à tous mes amis

Ainsi à toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études. J'espère que j'étais à la Hauteur de ce que vous attendez de MOI.

□ لخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة مفاعلين سطحيين تمانتاجهما من قبل سلالة بكتيرية بحرية تدعى SdK644 على ركائز نفايات ذات طبيعة مختلفة (زيت القلي HF و زيت المحركات المستعمل HMU). أظهرت النتائج ما يلي: استعمال زيت القلي اعطى كمية مهمة من المفاعل السطحي (93, HF6444 غ/ل)، بينما لم نتحصل مع زيت المحركات المستعمل الا على تركيز يساوي 0,68 غ/ل من مفاعل السطح HMU644. أشار التوصيف الفيزيو-كيميائي أن قيم التركيز الحرج (CMC) للمفاعلين السطحيين HF644 و HMU644 هي 787 مغ/ل و 1050 مغ/ل على التوالي. أظهرت الدراسة أن النشاط الاستحلابي (E24) للمفاعلين السطحيين ضد ركائز مسعورة منخفض نسبيا مقارنة بالمفاعلات السطحية الكيميائية: SDS, CTAB و Tween 80. اثبت المفاعل السطحي HF644 استقرار ملحوظ، درجات حرارة متغيرة من -18 إلى 100م° و درجة حموضة من 2 إلى 10. بالإضافة إلى درجات ملوحة أكبر من 4% تؤثر على خصائص هذا المفاعل السطحي. المفاعل السطحي HMU644 فعال في الأوساط المالحة (مستقر إلى غاية 20% من NaCl). بينما تؤثر الأوساط القاعدية و الحمضية على خصائص هذا المفاعل السطحي. أظهر تحليل FTIR أنه من المحتمل أن يكون للمفاعلين السطحيين HF644 و HMU644 هيكل دهون سكرية جد متشابهة.

كلمات البحث: مفاعل السطحي، بكتيريا بحرية، زيت القلي، زيت المحركات المستعمل، الاستقرار، توصيف.

Abstract

The objective of this work is to characterize two biosurfactants synthesized by a marine bacterium strain SdK644 grown on different types of wastes: frying oil and used motor oil, the biosurfactants were designated HF644 and HMU644 respectively. The experimental results show that: The use of frying oil has given interesting amounts of biosurfactant (4.93 g.l^{-1}), while used motor oil has provided a concentration of 0.68 g.l^{-1} . The physicochemical characterization of biosurfactants indicates that the CMC values of biosurfactants HF644 and HMU644 are respectively 787 mg.l^{-1} and 1050 mg.l^{-1} . The emulsifying activity of the two biosurfactants against hydrophobic substrates is low as compared with chemical surfactants: Tween 80, SDS and CTAB. The biosurfactant HF644 shows a very marked stability; temperatures ranging from -18 to $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and pH ranging from 2 to 10. However, the salinities greater than 4% NaCl affects on its surface activity. The biosurfactant HMU644 is effective in saline environments (stable up to 20% NaCl). Contrary, alkali and acid environments decrease the surface properties of biosurfactants. Finally, structural characterization by FTIR analysis reveals that the two biosurfactants have probably similar structures of glycolipids type.

Keywords: biosurfactant, marine bacterium, waste frying oil, used motor oil, characterization, stability.

Résumé

L'objectif de ce travail de mémoire est de caractériser deux biosurfactants synthétisés par une souche bactérienne marine SdK644, et cultivée sur des déchets de nature différente : huile de friture et huile moteur usagée. Les résultats obtenus montrent que : L'utilisation de l'huile de friture a donné une quantité en biosurfactant intéressante ($4,93 \text{ g.l}^{-1}$), Toutefois, l'utilisation de l'huile de moteur usagée a conduit à un rendement de production en biosurfactant plus faible ($0,68 \text{ g.l}^{-1}$). La caractérisation physico-chimique de biosurfactants indique que : les valeurs de la CMC de biosurfactants HF644 et HMU644 sont 787 mg.l^{-1} et 1050 mg.l^{-1} respectivement. Ainsi, L'activité émulsifiante des deux biosurfactants, contre des substrats hydrophobes, est faible par rapport aux surfactants chimiques : Tween 80, SDS et CTAB. Le biosurfactant HF644 montre une stabilité très marquée ; des températures variant de -18 à 100 °C et des pH allant de 2 à 10. Toutefois, des salinités supérieures à 4 % NaCl affecte sur ses propriétés tensioactives. Le biosurfactant HMU644 est efficace dans les milieux salins (stable jusqu'à 20 % de NaCl). Par contre, les milieux alcalins et acides affectent sur les propriétés de biosurfactant. Enfin, La caractérisation structurale par l'analyse FTIR révèle que les deux biosurfactants ont probablement des structures glycolipidiques très similaires.

Mots clés : Biosurfactant, bactérie marine, huile de friture, huile de moteur usagée, caractérisation, stabilité.

SOMMAIRE

Liste des figures.....	8
Liste des tableaux et des abréviations	9
Introduction générale	10

CHAPITRE 01 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Généralité sur les surfactants.....	13
1.2 Classification des biosurfactants.....	15
1.3. Production des biosurfactant.....	23
1.4. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance.....	23
1.5. Caractérisation structurale des biosurfactants.....	23
1.6. Propriétés physico-chimiques des biotensioactifs.....	24
1.7. Les différentes applications des biosurfactants.....	27

CHAPITRE 02 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Origine de la souche bactérienne SdK644.....	30
2.2 Production de biosurfactant	30
2.3 Extraction et purification partielle du biosurfactant.....	31
2.4 Caractérisation du biosurfactant.....	31
2.4.1 Concentration micellaire critique.....	31
2.4.2 Pouvoir émulsifiant	32
2.4.3 Caractérisation structurale du biosurfactant par IRTF.....	32
2.5 Stabilité des biosurfactants.....	33
2.5.1 Stabilité thermique.....	33
2.5.2 Stabilité chimique.....	33

CHAPITRE 03 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Production, extraction et purification partielle de biosurfactant.....	35
3.2 Caractérisation des biosurfactants HF644 et HMU644.....	38
3.2.1 Concentration micellaire critique.....	38
3.2.2. Pouvoir émulsifiante.....	40
3.2.3 Caractérisation structurale du biosurfactant par IRTF.....	42
3.3 Stabilité des biosurfactants.....	44
3.3.1 Stabilité thermique.....	44
3.3.2 Stabilité chimique.....	46

Listes des figures

Figure	Intitulé
Figure 1.1	Structure schématique d'un surfactant
Figure 1.2	Structure chimique de quelques glycolipides
Figure 1.3	Structure d'une surfactine produite par Bacillus Subtilis
Figure 1.4	Structure d'un phosphatidyle-éthanol-amine, un puissant biosurfactant produit par Acinetobactersp. R1 et R2 sont des chaînes hydrocarbonées d'acides gras
Figure 1.5	Structure d'un Emulsan synthétisé par diverses espèces d'Acinetobacter
Figure 1.6	Représentations schématiques d'une micelle de surfactant
Figure 2.1	Mesure de l'indice d'émulsification
Figure 3.1	Production de biosurfactant par la souche Sdk644 dans le milieu minimum avec (a) HF et (b) HMU comme sources de carbone
Figure 3.2	Déplacement de pétrole suite à l'application du biosurfactant brut (a) HF644, (b) HMU644 et (c) témoin eau distillée
Figure 3.3	Purification partielles des biosurfactants (a) HF644, (b) HMU644
Figure 3.4	Courbe donnant la CMC du biosurfactant HF644
Figure 3.5	Courbe donnant la CMC du biosurfactant HMU644
Figure 3.6	Pouvoir émulsifiant des surfactants sur différents substrats
Figure 3.7	Analyse par IRTF du biosurfactant HF644
Figure 3.8	Analyse par IRTF du biosurfactant HMU644
Figure 3.9	Effet de la température sur la stabilité du biosurfactant HF644
Figure 3.10	Effet de la température sur la stabilité du biosurfactant HMU644
Figure 3.11	Effet du pH sur la stabilité du biosurfactant HF644
Figure 3.12	Effet du pH sur la stabilité du biosurfactant HMU644
Figure 3.13	Effet de la salinité sur la stabilité du biosurfactant HF644
Figure 3.14	Effet de la salinité sur la stabilité du biosurfactant HMU644

Listes des tableaux

Tableau 1.1 Classement des surfactants chimiques selon leur groupe de charge, leur utilisation prospective et des exemples.

Tableau 1.2 Sources microbiennes des classes majeures des biosurfactants et réduction de la tension de surface.

Tableau 1.3 Composés chimiques éliminés par biodégradation bactérienne.

Listes des abréviations

HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
CMC	Concentration micellaire critique
C/N	Rapport carbone/ azote
EM	Eau de mer
SM	spectrométrie de masse (SM)
MMB	Milieu minéral de base
E24	Indice d'émulsification
TS	Tension de surface
DDP	Diamètre du Déplacement du pétrole
LB	Milieu Luria Bertani
SDS	Sodium Dodecyl sulfate
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide
MEL_s	Mannosylerythritolipids
IRTF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Introduction générale

La production mondiale actuelle de surfactants chimiques se chiffre à plus de 3 millions de tonnes par année [20]. La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [33,19,50,49]. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants : les tensioactifs biologiques ou *biosurfactants*.

Les biosurfactants peuvent être aussi efficaces et plus avantageux que les surfactants synthétiques. Ils sont hautement spécifiques, biodégradables, biocompatibles avec l'environnement [2], moins sensibles aux biotopes de températures, pH et salinité extrêmes [58], moins toxiques et peuvent être synthétisés en grandes quantités, sur des sources d'énergie coûteuses, comme les produits pétroliers [63], mais aussi sur des ressources renouvelables.

La recherche dans le secteur des biosurfactants est ainsi augmentée ces dernières années en raison de son utilisation potentielle dans différents secteurs, tels que l'industrie alimentaire, agriculture, pharmaceutique et pétrolière. Le développement de cette ligne de recherche est d'importance primordiale, principalement en raison du souci actuel concernant la protection de l'environnement. Ils sont non seulement utiles comme agents antibactérien, antifongiques et antiviraux, mais ont également le potentiel pour l'usage en tant que molécules immunomodulatrices importantes, agents anti-adhésifs et même dans les vaccins et la thérapie génique [13].

Cependant, les coûts de production de biosurfactants, encore assez élevés, freinent leur utilisation [28]. Les substrats de croissance pour les microorganismes producteurs de biosurfactants sont peu coûteux, mais le faible taux de production et les procédures de purification font que leurs coûts peuvent être parfois supérieurs à ceux des tensioactifs chimiques [68, 31].

Le succès de l'utilisation et la production des biosurfactants passe donc par une diminution des coûts de production. Cette diminution pourra être atteinte en optimisant les trois facteurs suivants : les rendements de production, les substrats utilisés dans leur production et les processus employés pour leur extraction et leur purification. À présent, des sophorolipides et

des Mannosylerythritol lipides (*MELs*) peuvent se produire à des rendements supérieurs à 100 g.l⁻¹. L'utilisation des substrats renouvelables et déchets peut conduire à une réduction significative de leur coût. **Makkar et Cameotra (2002)[67]** indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles d'une part pour diminuer les coûts, mais aussi pour diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles moteurs usagées...).

Dans ce contexte, deux biosurfactants synthétisés par une souche bactérienne marine sur des substrats déchets de nature différente (huile de friture et huile de moteur usagée) ont été étudiés. Le travail se subdivise en trois chapitres ; un premier chapitre visant un aperçu sur les surfactants et les biosurfactants, la classification des biosurfactants et les microorganismes producteurs, les techniques utilisées pour leur récupération et purification, leurs propriétés et les domaines de leur application. Un deuxième chapitre réservé au détail des protocoles et méthodes adoptés pour réaliser les différents essais et analyses. Un troisième chapitre consacré à la présentation des résultats, leur interprétation et discussion. Enfin, une conclusion générale résume les points essentiels aboutis de cette étude.

1.1. Généralités sur les surfactant

Les surfactants (**de l'acronyme anglais : Surface Active Agents**) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique [1].

Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures [2, 3].

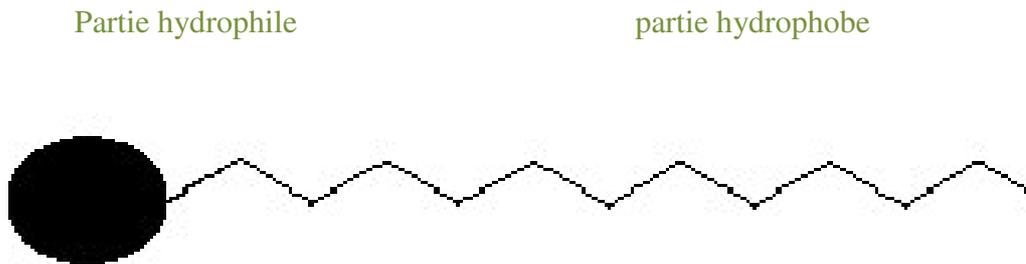


Figure 1.1 : Structure schématique d'un surfactant

Un surfactant est composé de deux parties (figure 1.1) :

- 1) Une partie qui s'accroche à l'eau : Partie hydrophile (ou encore lipophile).
- 2) Une partie qui s'accroche à l'huile : Partie lipophile (ou encore hydrophobe).

Cette dualité de structure est à l'origine de leur activité de surface, de leur micellisation et de leurs capacités de solubilisation qui rendent possible leurs applications comme étant un agent détergent, moussant, dispersant ou émulsifiant[4].

Le classement le plus couramment utilisé est basé sur la nature de la tête hydrophile et l'on y distingue quatre grandes classes :

- 1) les cationiques qui possèdent une charge positive ;
- 2) les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ;
- 3) les non ioniques, sans charge ;
- 4) les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre[5].

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du surfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification[5].

Les surfactants chimiques, provenant des industries pétrochimiques et oléo-chimiques [6], sont dans la plupart des structures monomériques incluant les quatre groupes de charge cités ci-dessous (tableau 1.1) [7] et utilisées extensivement à grande échelle dans l'industrie, en particulier dans le domaine de détergence et le nettoyage des surfaces [6].

Les biosurfactants, produits principalement par des bactéries et des champignons (y compris des levures), existent rarement autant que composés cationique (sauf ceux qui contiennent un groupe amine), mais souvent comme molécules anioniques ou non ioniques [8]. Ils ont l'avantage d'être moins ou non toxique et biodégradables. Leur problème majeur réside dans leur coût de production assez élevé. Le mouvement actuel vers une industrie durable qui respecte l'environnement exige le retour à des biosurfactants pour remplacer au moins quelques surfactants chimiques [6].

1.2. Classification des biosurfactants

Outre le classement commun des surfactants et des biosurfactants selon la nature du groupement hydrophile, les biosurfactants sont différenciés essentiellement par leur composition chimique et leur origine microbienne [9,10,11,3,1,2].

De point de vue structure, ils constituent d'une partie hydrophile qui peut inclure un acide carboxylique, alcool, acide aminé ou peptide cationique ou anionique, ou un saccharide (mono, di ou poly) attachée à une partie hydrophobe constituée de chaîne d'hydrocarbures ou d'acides gras saturée ou insaturée [12, 11,13]. Il ressort de cette configuration, cinq classes majeures : les glycolipides, les lipopeptides et lipoprotéines, les phospholipides et les acides gras, les surfactants polymériques et les surfactants particuliers [11].

Les biosurfactants sont ainsi classés en deux catégories : agents de surface à faibles poids moléculaire (glycolipides et lipopeptides) généralement appelés biosurfactants, et bioémulsifiants qui sont des polymères à haut poids moléculaire [12,14].

Tableau 1.1 : classement des surfactants chimiques selon leur groupe de charge, leur utilisation prospective et des exemples [7].

Catégorie	Utilisé dans	Exemples
Sulfates anioniques ($\text{ROSO}_3^- \text{M}^+$)	Champooing, nettoyant, savons liquides, colorants de cheveux, ...	Ammonium lauryl sulfate, Sodium Dodecyl sulfate (SDS), sodium lauryl ether sulfate
Sulfonates ($\text{RSO}_3^- \text{M}^+$)	Protecteurs de tissus, mousses anti feux	acideperfluoro-octane-sulfonique, linear alkylbenzenesulfonates (LAS), perfluoro-butane-sulfonate
Phosphates ($\text{ROPO}_3^- \text{M}^+$)	Détergence	sodium tripolyphosphate
Carboxylates ($\text{RCOO}^- \text{M}^+$)	Savons, fluoro-carboxylates dans le téflon, isolation des fils électriques, papiers de cire, mousses anti feux,	Sodium stéarate, perfluoro-octanoate (PFO), perfluoro-nonanoate (PFOA),
Cationic ($\text{R}_4\text{N}^+ \text{X}^-$)	Dentifrice, cosmétiques, inhibiteurs de corrosion, antiseptiques,	Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), chlorure de benzalkonium, chlorure de cetylpyridinium
Zwitter- ioniquesouamphotériques	Augmente l'amplification de l'ADN en PCR, purification des protéines	Betaines $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$, CHAPS
Non ioniques	Champoings, crèmes et lotions	Alcoolscetyliques, Alcoolstearliques, alkylpolyglucosides, tween 80, triton X 100

1.2.1. Selon leurs compositions chimiques et microorganismes producteurs

Une variété de microorganismes principalement bactéries, champignons et levures sont capables de produire des biosurfactants de diverse composition chimique (tableau 1.1). Leur nature et la quantité produite dépendent du type de microorganisme produisant tel ou tel biosurfactant[12].

Les biosurfactants les plus étudiés sont les glycolipides et les lipopeptides [15]. Toutefois, c'est la classe des biosurfactants glycolipidiques qui a visé une attention toute particulière dans le secteur industriel aux dernières années [6].

1.2.1.1. Glycolipides

Les glycolipides représentent le groupe le plus important et le plus étudié parmi les biosurfactants produits [16,17].

Les glycolipides résultent de la combinaison d'un mono, di, tri ou tétra saccharide (glucose, mannose, galactose, rhamnose) avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acide hydroxy-aliphatique [18].

Les rhamnolipides, les trehalolipides, les sophorolipides et les mannosylerythritol-lipides sont les glycolipides les plus étudiés [16,17].

La figure 1.3 présente les structures de quelques glycolipides.

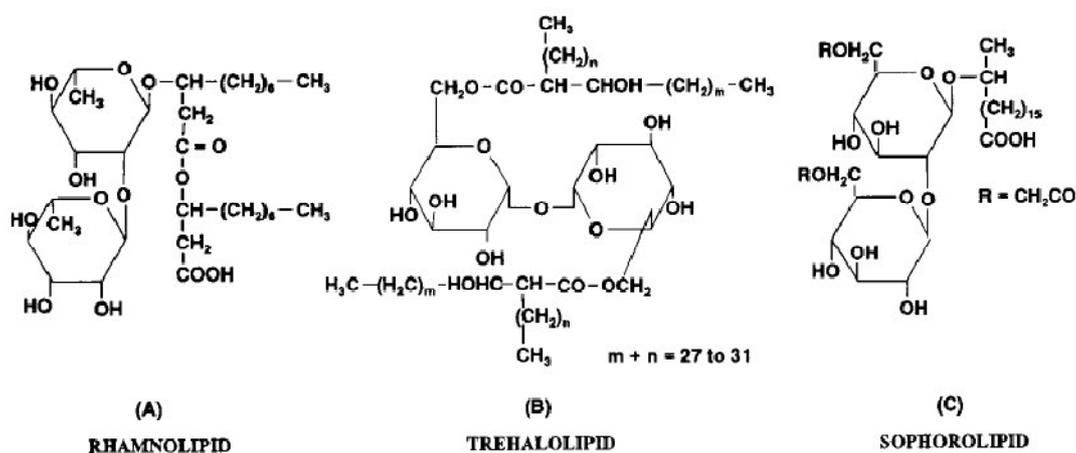


Figure 1.2 : structure chimique de quelques glycolipides [20].

Tableau 1.2 : Sources microbiennes des classes majeures des biosurfactants et réduction de la tension de surface [1 modifié].

Biosurfactant	Microorganismes	Tension de surface (mN/m)
Glycolipides		
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
	<i>Pseudomonas sp.</i>	25–30
Trehalolipides	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	32–36
	<i>Nocardia erythropolis</i>	30
	<i>Mycobacterium sp.</i>	38
Sophorolipides	<i>Torulopsis. Bombicola</i>	33
	<i>Torulopsis. Apicola</i>	30
	<i>Torulopsis. Petrophilum</i>	
Mannosylerythritollipides (MELs)	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> ^[25]	29,2
	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> ^[26]	
Lipopeptides et lipoprotéines		
Peptide-lipide	<i>Bacillus licheniformis</i>	27
Serrawettine	<i>Serratia marcescens</i>	28–33
Viscosine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26,5
Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>	27–32
Subtilisine	<i>Bacillus subtilis</i>	
Acides gras et phospholipides		
Acides gras	<i>Corynebacterium lepus</i>	30
Phospholipides	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	
Biosurfactants polymériques		
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
Mannan-lipide-protéine	<i>Candida tropicalis</i>	
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	
Carbohydrate-protein-lipid	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27
Protein PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Biosurfactants particulière		
Les vésicules des cellules microbiennes	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
Cellules entières	Variété de bactéries	

1.2.1.3. Acides gras et phospholipides

Les phospholipides sont formés de groupement alcool et phosphore et de chaîne lipidique [21] et ils sont classés selon deux groupes : glycérophospholipides et glycérophospholipides [22], tandis que les biosurfactants d'acides gras sont composés de chaînes hydrocarbonées d'acides gras saturés entre C₁₂ et C₁₄ et acides gras complexes qui contiennent des groupements hydroxyles et des alkyles ramifiées [23]. La figure 1.5 présente la structure d'un phospholipide.

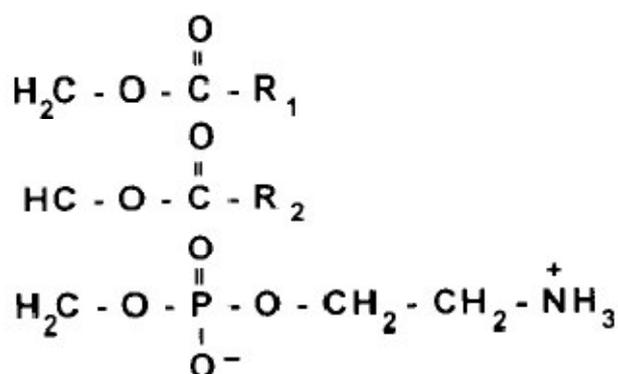


Figure 1.4 : Structure d'un phosphatidyle-éthanol-amine, un puissant biosurfactant produit par *Acinetobacter* sp. R₁ et R₂ sont des chaînes hydrocarbonées d'acides gras [20].

Plusieurs bactéries et levures produisent des grandes quantités d'acides gras et des phospholipides durant leur croissance sur des n-alcane [20]. De tels surfactants exhibent une bonne activité de surface [20,18]. Il s'est montré que la souche *Arthrobacter* AK-19 et la souche *P. aeruginosa* accumulent jusqu'à 40 à 80 % (m/m) de tels lipides quand elles sont cultivées sur l'Hexadécane et l'huile d'olive respectivement [20,18].

1.2.1.4. Biosurfactants polymériques :

Les biosurfactants polymériques sont des hétéro-polysaccharides poly-anioniques contenant à la fois des polysaccharides et des protéines [24]. Ce sont des biopolymères de poids moléculaire élevé, qui présentent une viscosité élevée et une résistance à la traction et au cisaillement [18]. Des exemples de différentes familles des biosurfactants polymériques comprennent : Emulsan, Biodispersan, Alasan, Liposan et Manno-protéine [18].

L'Emulsan est le biopolymère le plus étudié [17]. Sa structure est illustrée dans la figure 1.6.

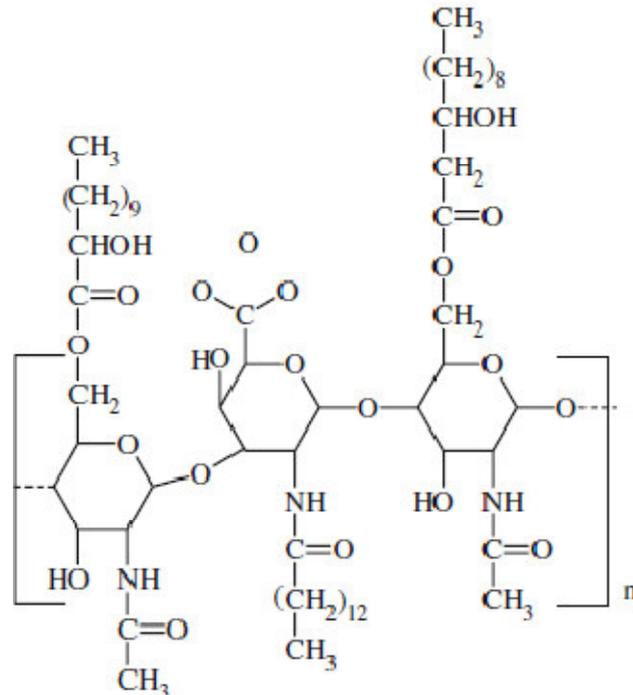


Figure 1.5 : Structure d'un Emulsan synthétisé par diverses espèces d'*Acinetobacter*[17].

Une variété de microorganismes produit des polymères à poids moléculaire élevé [16]. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG 1 produit un Emulsan RAG 1, un puissant agent émulsifiant des hydrocarbures. Biodespersan est un autre agent dispersant produit par la souche *Acinetobacter calcoaceticus* A2. Alasan fait référence à la souche *Acinetobacter radioresistens* KA-53, un biosurfactant anionique hétéropolysaccharide-protéine contenant l'alanine. Liposan est un bioémulsifiant extracellulaire synthétisé par *Candida lipolytica*. Des grandes quantités d'un Manno-protéine sont produites par l'espèce fongique *Saccharomyces cerevisiae*[20].

1.2.1.5. Biosurfactants particuliers

Quelques exemples de biosurfactants particuliers sont les vésicules membranaires extracellulaires des cellules microbiennes. Ils améliorent la biodisponibilité des hydrocarbures par formation de microémulsions [20]. L'accumulation des vésicules membranaires extracellulaires d'un diamètre de 20-50 nm et une densité spécifique de 1,158 g/cm² ont été reportées chez les cellules de la bactérie *Acinetobacter* sp. HO1-N. Les vésicules ainsi purifiées sont composées de protéines, phospholipides et lipopolysaccharides[20,18].

1.2.2. Selon leurs poids moléculaires

Les biosurfactants sont divisés en deux classes :

1.2.2.1. Composés à faible poids moléculaire

Ils comprennent les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides [25]. Ces molécules communément appelés biosurfactants réduisent efficacement les tensions de surface et interfaciales[17].

1.2.2.2. Polymères à haute poids moléculaire

On trouve dans cette classe les polysaccharides amphiphiles, les protéines lipopolysaccharides ou les lipoprotéines [17]. Ces polymères ou bioémulsifiants sont plus efficace dans la formation des émulsions stables huile dans l'eau sans diminuer suffisamment la tension de surface [17].

1.2.3. Biosurfactants, Bioémulsifiants des microorganismes marins

La diversité floristique et faunistique du milieu marin le fait l'habitat le plus riche du globe en produits naturels. Les microorganismes marins développent des capacités métaboliques et physiologiques uniques leurs permettant de s'adapter aux conditions extrêmes des environnements marins et de produire de nouvelles métabolites qui ne sont pas toujours sécrétés par des microorganismes terrestres. Ces caractéristiques du milieu marin offrent des possibilités énormes à la synthèse de nouvelles molécules telles que les biosurfactants/bioémulsifiants et d'autres produits à valeur économique.

Les microorganismes marins producteurs de biosurfactants/ bioémulsifiants reportés dans la littérature incluent : *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Enterobacter* et levures [26].

Dans la classe des glycolipides, un glucose-lipide a été produit par la bactérie *Alcaligenessp.* Ce biosurfactant inhibe la croissance des micro-algues et micro-flagelles. Un tréhalose tétra ester anionique a été produit par la souche bactérienne *Arthrobactersp.* EK 1. Le biosurfactant ainsi obtenu réduit efficacement les tensions interfaciales avec une importante activité émulsifiante. *Alcanivoraxborkumensisa* été reportée à produire un puissant surfactant composé de glucose lié avec quatre chaîne d'acides 3-hydroxydécanoïque. La souche

bactérienne marine *Halomonas* ANT-3b quant à elle, synthétise un émulsifiant glycolipidique. Cet agent de surface est constitué d'acides gras et des oses.

Dans la classe des biosurfactants lipopeptidiques, plusieurs types de lipopeptides cycliques sont synthétisés par divers membres de l'espèce *Bacillus*. Un lipopeptide synthétisé par la souche *Bacillus licheniformis* BAS50 réduit la tension de surface de l'eau de 72 à 28 mN/m associée de bonne activité antimicrobienne [27]. Ont reporté la production d'un lipopeptide par *Azotobacter chroococcum*. Le biosurfactant obtenu est capable d'émulsifier une variété d'hydrocarbures (lubrifiants, carburants et HAP). La souche *Myroides* SM1 synthétise un mélange de phospholipides et d'acides gras. Ils se sont considérés comme un agent de surface très actif.

Une variété de microorganismes synthétise des bioémulsifiants à poids moléculaire élevé. D'ailleurs, la souche *Acinetobacter calcoaceticus* RAG 1 qui produit le fameux Emulsan RAG 1 a été isolée de la mer méditerranéenne. De même, la souche *A. calcoaceticus* A2 produit un biodispersant, un bon dispersant des composés insolubles dans l'eau. *Pseudomonas nautica* synthétise un polymère extracellulaire composé de protéine, hydrate de carbone et lipide. Les *Streptomyces* sont connues de produire des bioémulsifiants constitués de protéines et de polysaccharides. *Yarrowialipolytica* est la levure la plus reportée dans la littérature et qui produit des bioémulsifiants de lipides, hydrate de carbone et protéine [26].

1.3. Production des biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures [28,29]. Ces organismes sont en général des levures, des champignons ou surtout des bactéries. Les plantes, les animaux ou les humains sont également capables d'en produire [30]. La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des conditions de croissance et de la source de carbone utilisée. On obtient souvent un bon rendement avec un substrat insoluble. Le principal rôle physiologique du tensioactif est de permettre aux micro-organismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible [31,32].

1.4. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance

Pour extraire le biosurfactant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple).

La récupération des biotensioactifs dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules). Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. ou des techniques reposant sur la précipitation du tensioactif [11]. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices.

Il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le tensioactif par un mélange de solvants (chloroforme/méthanol) comme l'ont fait (Parraet *al*, 1989) [33]. Généralement, l'acidification permet une précipitation du tensioactif. Suite à cette précipitation, une étape de centrifugation puis de lavage est nécessaire pour récupérer et purifier le tensioactif.

1.5. Caractérisation structurelle des biosurfactants

Une fois les produits (biosurfactants) sont purifiés, il faut déterminer leur structure. Parmi les différentes analyses qualitatives on utilise les plus fréquemment :

- La spectrométrie d'adsorption en lumière ultra-violette et visible (UV-Vis) qui détecte la présence de chromophore [34].
- La spectrométrie infrarouge (IR) qui détermine les groupements fonctionnels [35].
- La spectrométrie de masse (MS) qui donne le poids moléculaire, des indications sur la structure et qui, à haute résolution, fournit l'analyse élémentaire de la molécule [36].
- La résonance magnétique nucléaire à haut champs (RMN de proton et de carbone 13) indique la structure et la conformation des composés à analyser [36].

1.6. Propriétés physico-chimiques des biotensioactifs

Les biosurfactants ont de meilleures propriétés moussantes et une plus grande sélectivité. Ils sont moins sensibles aux environnements extrêmes comme la température, le pH et la salinité. Ils sont biodégradables et non ou peu toxiques ce qui rend leurs applications environnementales intéressantes.

1.6.1. Abaissement de la tension superficielle

La tension superficielle est définie comme étant la force existant à la surface d'un liquide dû à l'attraction entre les molécules qui s'opposent à la rupture de la surface. La tension superficielle s'exprime en mN/m ou en dyne/cm.

Les biosurfactants diminuent considérablement la tension superficielle de l'eau, même dans les solutions très diluées. Ceci apparaît dans l'exemple : la tension superficielle de l'eau pure est de 62,80 mN/m à 20°C et en présence d'un biosurfactant, elle peut atteindre approximativement une valeur de 30 mN/m.

L'adsorption des biosurfactants et la diminution de la tension superficielle sont responsables de la formation de mousse [37].

1.6.2. Abaissement de la tension interfaciale

La tension interfaciale est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles [38].

La tension interfaciale de l'eau contre un alcane (n-octane) est de 50.81 mN/m à 20°C et en présence d'un biosurfactant, elle diminue jusqu'à moins de 1 mN/m [37].

1.6.3. Concentration Micellaire Critique (CMC)

La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles [39].

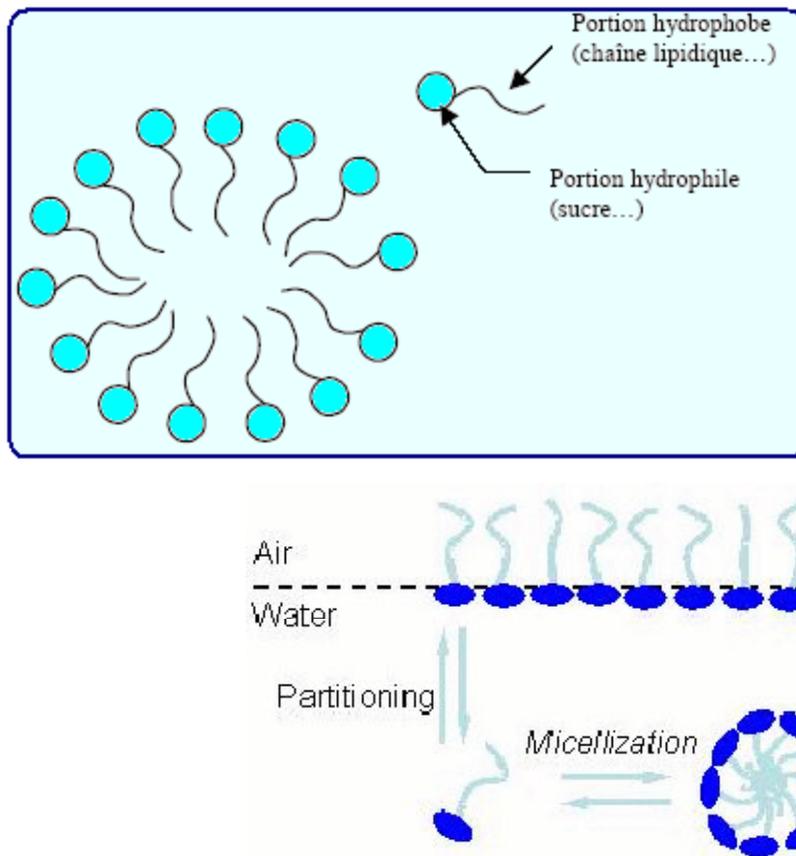


Figure 1.6 : Représentation schématiques d'une micelle de surfactant [39].

La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale (environ 30 mN.m^{-1} en solution aqueuse). Pour de nombreux tensioactifs, la tension superficielle minimale est à peu près identique mais la CMC varie en fonction de leur structure. La plupart des biosurfactants ont des CMC inférieures et des nombres d'agrégation supérieurs aux surfactants synthétiques : leur efficacité est donc meilleure [32]. Les CMC obtenues pour les biosurfactants varient de 1 à 200 mg.l^{-1} [41,42].

La CMC d'un surfactant varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou des composés organiques [43].

La variation de la taille de la région hydrophobe est un facteur important et en général, la CMC

diminue lorsque le caractère hydrophobe du surfactant augmente [44].

Haba et al. (2003) [45] indiquent que le rapport et la composition des homologues de surfactant, la présence de liaisons insaturées, la ramification et la longueur de la chaîne alkyle ou la taille de la tête hydrophile affectent la valeur de la CMC.

1.6.4. Toxicité et biodégradabilité

Des tests de toxicité réalisés par **Haba et al., (2003) [45]** ont montré que les rhamnolipides produits par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* étaient classés comme produits non irritants et non toxiques.

Il existe de nombreux travaux sur la toxicité des surfactants chimiques, mais peu de recherches ont été effectuées sur les biosurfactants[47].ont comparé la toxicité de trois surfactants chimiques et biologiques sur deux invertébrés marins (*Mysidopsis Bahia* et *Menidia Beryllina*). Ces auteurs concluent que les biosurfactants ont des toxicités intermédiaires à celles des chimiques. Par exemple, l'Emulsan qui est le biosurfactant le moins toxique de l'étude, présente une CL50 (concentration létale) supérieure à 200 mg/l. A titre de comparaison, le Triton X 100, d'origine chimique et largement utilisé dans l'industrie, a une CL50 de 2,5 à 6 mg/l.

De nombreux auteurs indiquent que les biosurfactants sont biodégradables [33,48,20,49]. Une étude réalisée par **Deschênes et al. (1996) [46]** reporte que l'UG2, le biosurfactant produit par la souche de *Pseudomonas aeruginosa* n'affectait pas l'activité microbienne globale, même à de fortes concentrations (500 µg de tensioactif/g de sol). Ces auteurs indiquent de plus que le surfactant était biodégradable. De même, **Vipulanandan et Ren (2000) [49]** ont prouvé que la biodégradation du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas* était en compétition avec la biodégradation du naphthalène. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Page et al [50]** qui expliquent le phénomène par le fait que les biosurfactants sont des sous-produits ou des constituants membranaires des micro-organismes. Il faut cependant noter que la biodégradation des tensioactifs biologiques pose un problème économique : en effet, pour éviter toute perte d'efficacité de dépollution, il est nécessaire d'augmenter les taux de tensioactifs appliqués, ce qui induit un surcoût.

1.6.5. Activité biologique

Plusieurs biosurfactants ont montré une activité contre les bactéries, champignons, algues et virus. Le lipopeptide iturin de *B. substilis* a montré une activité puissante antichampignon[51]. Les rhamnolipides inhibent la croissance des espèces nuisibles de bloom algale (*Heterosigmaakashivoet Protocentrumdentatum*) pour des concentrations variant de 0,4 à 10 mg/l [52]. Selon les travaux réalisés par **Abalose et al. [42]**, le rhamnolipide synthétisé par *P. aeruginosa* a montré une activité inhibitrice contre les bactéries : *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* et *Alcaligenes faecalis* (32 mg/ml), *Serratia marcescens*,

Mycobacterium phlei(16 mg/ml) et *Staphylococcus epidermidis*(8 mg/ml) et aussi une excellente propriété antifongique : *Aspergillus niger*(16 mg/ml),*Chaetonioglobosum*, *Penicillium crysogenum*et *Rhizoctoniasolani*(18 mg/ml).

1.7. Les différentes applications des biosurfactants

Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les biosurfactants sont aujourd'hui utilisés dans différents domaines d'application tels que :

- la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, les polluants organiques et les métaux lourds (Tableau 1.3) [53] et dans le traitement des eaux usées [54].

Tableau 1.3 : Composés chimiques éliminés par biodégradation bactérienne [2].

Composés organiques	Métaux lourds
Phénanthrène	Cadmium
Styrène	Plomb
Polychlorobiphényle	Zinc
Pétrole Brut (Heavy, Light)	Copper, et Nickel
Gaz- <i>Oil</i>	Chromium hexavalent
Diesel	Arsenic
4-Chlorophenol (4-CP)	Phenanthrenemélangé au Cadmium
Perchloroethylene (PCE)	

- l'industrie pétrolière, et particulièrement dans l'amélioration de récupération transport dans les pipelines et dans les opérations de nettoyage des bacs de stockage du pétrole [55,56].
- l'agriculture, jouant le rôle d'antagonistes empêchant la propagation de ces zoospores dans les systèmes de culture sans sol (l'hydroponique) [57].
- l'industrie alimentaire, comme additifs alimentaires, et comme améliorants dans la boulangerie et la charcuterie[3].
- l'industrie du cosmétique [58] et dans les procédés de teinture du textile [59].

- l'industrie pharmaceutique, comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales pour combattre les différentes maladies infectieuses [60].
- le secteur de haute technologie comme l'impression électronique, l'enregistrement magnétique, la micro-électronique [61]. ainsi que dans les nanotechnologies, tel que la fabrication des nanoparticules d'argent ou les tiges de NiO, etc[2].

Cependant, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms (Alasan d'*Acinetobacter*), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de *T. bombicola*), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds [62].

L'objectif principal entrepris dans ce mémoire est l'extraction, caractérisation physico-chimique et structurale de biosurfactant par des isolats bactériens isolés à partir d'un sédiment marin portuaire situé sur le littoral de la wilaya de Tipaza. Nous décrivons dans ce chapitre le matériel utilisé et la méthodologie suivie pour réaliser les différents essais et analyses.

2.1. Origine de la souche bactérienne SdK644

L'isolement, la purification et la sélection de la souche SdK644 a été réalisée antérieurement par notre co-promoteur. Le site d'isolement était un port de pêche fortement contaminé par des produits pétroliers, la matrice prélevée est le sédiment. L'isolement a permis d'obtenir une dizaine de souches bactériennes, La souche SdK644 a été retenue pour sa capacité productrice élevée de biosurfactant.

2.2. Production de biosurfactant

2.2.1. Conditions de production

La production de biosurfactant par la souche SdK644a été réalisée après une étape d'optimisation des principaux facteurs influençant [64]. Les conditions optimales de production se résument comme suit :

L'huile de friture représente la source de carbone, le NH_4Cl est utilisé comme source d'azote, le rapport C/N est fixé à 50 (g huile friture/ g NH_4Cl), le pH du milieu est ajusté à 5, la salinité est de 23 g NaCl/l et un temps de production de 3 jours.

2.2.2. Milieu de production

Le milieu de production est un milieu minimum de base dont la composition est la suivante : (g/l d'eau distillée) : 23 NaCl ; 0,4 NH_4Cl ; 0,3 KH_2PO_4 ; 0,3 K_2HPO_4 ; 0,33 MgCl_2 ; 0,05 CaCl_2 ; 0,1 extrait de levure et 1 ml des éléments traces métalliques. Le milieu est distribué dans un erlenmeyer de 5 litres avec un volume opérationnel de 2 litres et stérilisé à l'autoclave à une température de 120°C pendant 20 min. Le MMB est inoculé à raison de 2 % par une pré-culture d'une nuit de la souche SdK644 cultivée dans un milieu LuriaBertani (LB) modifié.

2.3. Extraction et purification partielle du biosurfactant

Après trois (03) jours de culture et lorsque l'activité de biosurfactant est maximale dans le milieu (cela est vérifié par le test de déplacement de pétrole), le volume entier de la culture est éliminé de la biomasse par centrifugation à une vitesse de 3900 tr/min pendant 30 min en utilisant une centrifugeuse de type SIGMA 2-6E suivie par une filtration sur papier filtre ordinaire. Le surnageant correspond au biosurfactant brut est partiellement purifié selon deux (02) protocoles :

Dans le premier protocole, nous avons tenté de précipiter le biosurfactant par acidification à pH 2 à l'aide d'une solution de HCl de 6 mol/l, une conservation au froid à + 4 °C pendant une nuit et une centrifugation à une vitesse de 3900 tr/min pendant 30 min, voire deux (02) fois [13]. Dans ces conditions, la précipitation n'a pas été lieu.

La deuxième méthode consiste à extraire le biosurfactant brut par un solvant faiblement polaire (l'acétate d'éthyle), à volumes égaux (v/v), deux fois (la phase aqueuse de la première extraction est reprise dans une deuxième extraction par le solvant). La phase organique ainsi obtenue est déshydratée de l'eau par l'ajout du sulfate de sodium anhydre Na₂SO₄, qui absorbe les traces d'humidité en formant un bloc solide. Le solvant d'extraction est éliminé par la suite par évaporation à une température de 40 °C dans un système sous vide (Rotavap de marque heidolph). Le produit obtenu de cette étape (un liquide visqueux ressemblant de l'aspect du miel) est partiellement purifié par lyophilisation. L'opération consiste à congeler le biosurfactant à une température d'environ - 20 °C pendant 2 jours puis le lyophiliser à une pression de 0,0012 mbar et température de - 59 °C [65]. Le produit final obtenu est une poudre blanche.

2.4. Caractérisation du biosurfactant

2.4.1. Concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique (CMC) est un paramètre important lors de l'évaluation de l'activité des biosurfactants. La CMC a été déterminée par la méthode de dilution en mesurant la tension superficielle à chaque dilution, puis en traçant la courbe de la tension de surface en fonction de la concentration de la solution du biosurfactant brut. La concentration du biosurfactant, au-delà de laquelle la tension de surface ne change pas, est définie comme étant la CMC.

2.4.2. Pouvoir émulsifiant

Afin d'évaluer le pouvoir d'émulsifiant des deux biosurfactants de la souche SdK644 (nommés HF644 et HMU644), ces derniers ont été testés contre sept (07) liquides hydrophobes de différentes nature à savoir : le toluène, l'hexane, l'huile d'olive, l'huile végétale, le gasoil, l'essence et le pétrole brut. Les deux (02) biosurfactants ainsi que trois (03) autres surfactants chimiques standards (Cationique : CTAB, Anionique : SDS et Non ionique : Tween 80) ont été utilisés à une concentration 1 g/l.

L'émulsification est estimée par l'indice d'émulsification E_{24} selon le protocole développé par **Cooper and Goldenberg (1987) [66]**. En effet, 4 ml de la solution de surfactant est ajoutée à 4 ml de la solution hydrophobe dans un tube à essai, le mélange est bien agité au vortex (VTX 400) à vitesse maximale pendant 2 min jusqu'à l'obtention d'une émulsion homogène, puis laisser au repos pendant 24 h avant de prendre la mesure.

L'indice d'émulsification (E_{24}) est défini comme étant le rapport entre la hauteur de l'émulsion (H_e) formée et la hauteur totale (H_T) du mélange. Il est exprimé en pourcentage comme l'indique la formule suivante :

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

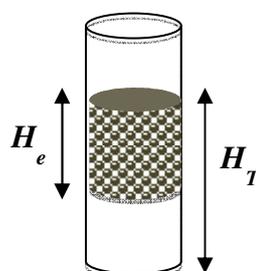


Figure 2.1 : mesure de l'indice d'émulsification.

2.4.3. Caractérisation structurale du biosurfactant par IRTF

Le biosurfactant partiellement purifié a été analysé à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque Bruker-TENSOR 27. Les spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés dans la région située entre 400 et 4000 cm^{-1} et enregistrés par un logiciel OPUS. Une goutte de biosurfactant est déposée au centre d'une pastille de bromure de potassium KBr de 1 à 2 mm d'épaisseur, préalablement préparée par compression d'une quantité d'environ 100 mg à une pression allant jusqu'à 7000 kg/cm^2 à l'aide d'une presse hydraulique.

2.5. Stabilité des biosurfactants

L'étude de la stabilité des biosurfactants a été réalisée avec des solutions à la CMC. Les paramètres affectant la stabilité de biosurfactant reportées dans la littérature sont : la température, le pH et la salinité.

En absence d'un tensiomètre sur place pour une mesure immédiate de l'activité de surface, cette dernière a été évaluée par le test de déplacement de pétrole selon le protocole cité par **Benali, 2014[64]**.

2.5.1. Stabilité thermique

La thermostabilité des biosurfactants a été réalisée par incubation des solutions de biosurfactants à différentes températures : 30, 50, 70, 100 °C pendant 1 h, à + 4°C et – 18 °C pendant 24 h et par autoclavage à 121 °C pendant 20 min. L'activité tensioactive a été mesurée après que les solutions de biosurfactants atteignent la température ambiante.

2.5.2. Stabilité chimique

2.5.2.1. Effet du pH : l'effet du pH a été déterminé en faisant varier le pH initial de la solution des biosurfactants de 2 à 12 en utilisant des solutions de HCl ou de NaOH de 1 mol/l.

2.5.2.2. Effet de la salinité : pour déterminer l'effet de la salinité, le chlorure de sodium (NaCl) a été ajouté aux solutions de biosurfactants pour se situer dans la gamme de concentration suivante : 0 - 20 - 40 - 70 - 100 - 150 et 200 g NaCl/l.

3.1 Production, extraction et purification partielle de biosurfactant

Deux sources de carbone de différentes natures ont testé dans la synthèse de biosurfactant par la souche hydrocarbonoclaste marine SdK644. La nature de source de carbone a influence considérable sur le type, la quantité et la qualité de biosurfactant produit par la suite [69,70]. Dans cette optique, deux sources de carbone non conventionnels ont été utilisé durant ce travail. L'huile de friture est considérée comme la meilleure source de carbone, parmi cinq autres substrats utilisés d'après (Benali, 2014) [64]. Elle été sollicité pour en extraire, purifier et caractériser son biosurfactant. En parallèle, nous avons tenté d'évaluer les potentialités d'un biosurfactant synthétisé par la même souche avec une autre source, de nature hydrocarbonée cette fois-ci. Il s'agit là, de l'huile moteur usagée.

Après trois jours d'incubation, le milieu minimum contenant la source de carbone (huile de friture HF ou huile moteur usagée HMU) devient blanc avec la HF comme source de carbone (comme le lait) et marron trouble avec la HMU (figure 3.1). Ce changement visuel, témoin de la production de biosurfactant a été confirmé avec un test de déplacement de pétrole comme le montre la figure 3.2.

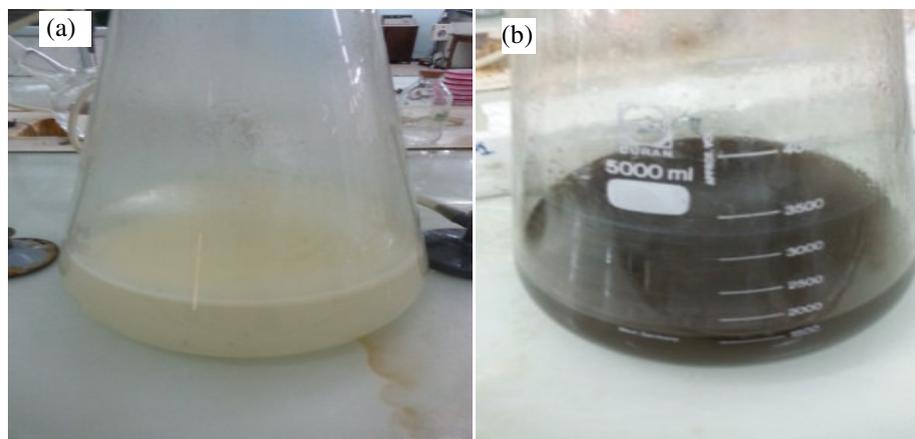


Figure 3.1 : production de biosurfactant par la souche Sdk644 dans le milieu minimum avec (a) HF et (b) HMU comme sources de carbone.



Figure 3.2: Déplacement de pétrole suite à l'application du biosurfactant brut (a) HF644, (b)HMU644 et (c) témoin eau distillée.

Les résultats de ce test montre que le surnageant HF644 possède une activité de surface supérieure à celui du HMU644. Il a permis de chasser le pétrole jusqu'aux bords de la boîte de pétri suite à la réduction des tensions interfaciales entre celui-ci et l'eau distillée.

Après extraction et purification partielle des deux biosurfactants HF644 et HMU644 à l'aide de l'acétate d'éthyle, nous avons obtenu un liquide visqueux d'une couleur jaune pour le HF644 et jaune marron pour le HMU644 (figure 3.3).

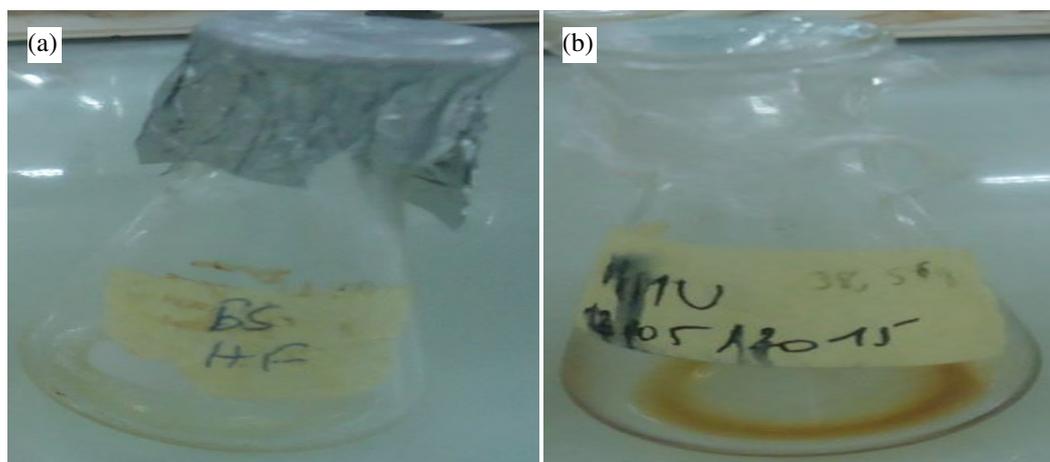


Figure 3.3 : purification partielles des biosurfactants (a) HF644, (b) HMU644.

Le rendement total d'extraction (après la première et la deuxième extraction) pour le HF644 été de 4,93 g/l. Cela donne un rendement de conversion (par rapport à l'huile de friture ; la source de carbone) de 0,25 g HF644/g HF, donc un taux de conversion de 25 %. Pour le HMU644 est nettement plus faible (0,68 g/l). Cela fait un rendement de conversion de 0,068 g HMU644/g HMU, donc un taux de conversion de 6,8 % seulement. Ces résultats montrent que les huiles végétales sont plus facilement assimilables par la bactérie par rapport aux mélanges d'hydrocarbures. **Abouseoudet al., (2008) [71]** ont trouvé que l'huile d'olive est

meilleur que l'hexadécane dans l'émulsification et la réduction de la tension de surface. Cela est expliqué par le fait que ce type de microorganismes possède une activité lipasique qui leur facilite l'assimilation des acides gras contenues dans les huiles végétales.

Le rendement de production obtenu avec notre souche bactérienne Sdk644 sur la HF (4,93 g/l) est très acceptable par rapport aux rendements obtenus cités dans la littérature. En effet, **Haba et al. (2000) [72]** avec un rendement moindre de 2,7 g/l en présence de l'huile de friture. **Abouseoudet al., (2008) [71]** ont trouvé un rendement similaire (2 g/l) avec l'huile d'olive comme source de carbone. Ainsi, **Edouaoudaet al., (2012) [73]** ont trouvé un rendement de 2,1 g/l de biosurfactant avec l'huile d'olive comme source inductrice de carbone (1 % v/v) dans un milieu riche LB.

Thavasiet al., (2011) [74] ont évalué la production de biosurfactant avec une souche de *Pseudomonas aeruginosa* en présence de la HMU et un cake de l'huile d'arachide. Ils ont achevé à un rendement plus élevé avec la deuxième source (6,45 g/l) qu'avec la HMU (4,37 g/l). **Noparatet al., (2014) [75]** ont pu aboutir à un rendement de biosurfactant de 4,52 g/l avec le cake de l'huile d'arachide.

Ferhat et al., (2011) [76] ont trouvé un rendement de production de 2,0 g/l pour une souche *Brevibacterium* sp. 7G et 2,5 g/l pour une souche *Ochrobactrum* sp. 1C en utilisant l'hexadécane à 2 % (v/v) comme source de carbone.

Wadekaret al., (2012) [77] ont obtenu un rendement de 2,8 g/l avec l'huile de friture à 5 % (m/v) et une souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 cultivée dans un milieu minéral de base. **Zhu et al., (2007) [78]** ont trouvé un rendement de 12,47 g/l d'un rhamnolipide produit par une souche *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M. Dans les mêmes conditions, le rendement de production a augmenté à 20 g/l en utilisant un bioréacteur de 50 litres. **de Lima et al., (2009) [79]** ont obtenu un rendement de 3,3 g/l avec l'huile de friture de soja à une concentration de 22 g/l et une souche de *Pseudomonas aeruginosa* PACL cultivée dans un bioréacteur de 10 litre.

de Gusmãoet al., (2010) [80] ont pu achever à un rendement de 7,0 g/l avec une souche de levure *Candida glabrata* UCP1002 cultivée avec 5 % (m/v) de graisses végétales utilisées.

3.2 Caractérisation des biosurfactants HF644 et HMU644

3.2.1 Concentration micellaire critique

Les biosurfactants sont des agents de surface, leur toute première propriété est leur tendance à migrer vers l'interface, en particulier l'interface air-liquide et en conséquence d'abaisser la tension de surface de l'eau et plus généralement la tension interfaciale entre les interfaces huiles/eau, solide/ liquide (Ferradji, 2014) [81]. La concentration du tensioactif au-delà de laquelle les micelles commencent à se former est connue en tant que la concentration micellaire critique (CMC). A cette concentration, la valeur de la TS est minimale. Pour des concentrations supérieures, la TS reste presque stable.

Les tensions de surface ont été déterminées pour différentes concentrations de biosurfactant (de 3,15 à 6300 mg/l pour le HF644 et 4,06 à 2100 pour le HMU644). Les résultats des courbes de la CMC pour le HF644 et le MHU644 sont présentés sur la figure 3.4 et 3.5 respectivement. il est à noter que ces graphes sont tracés à l'échelle logarithmique.

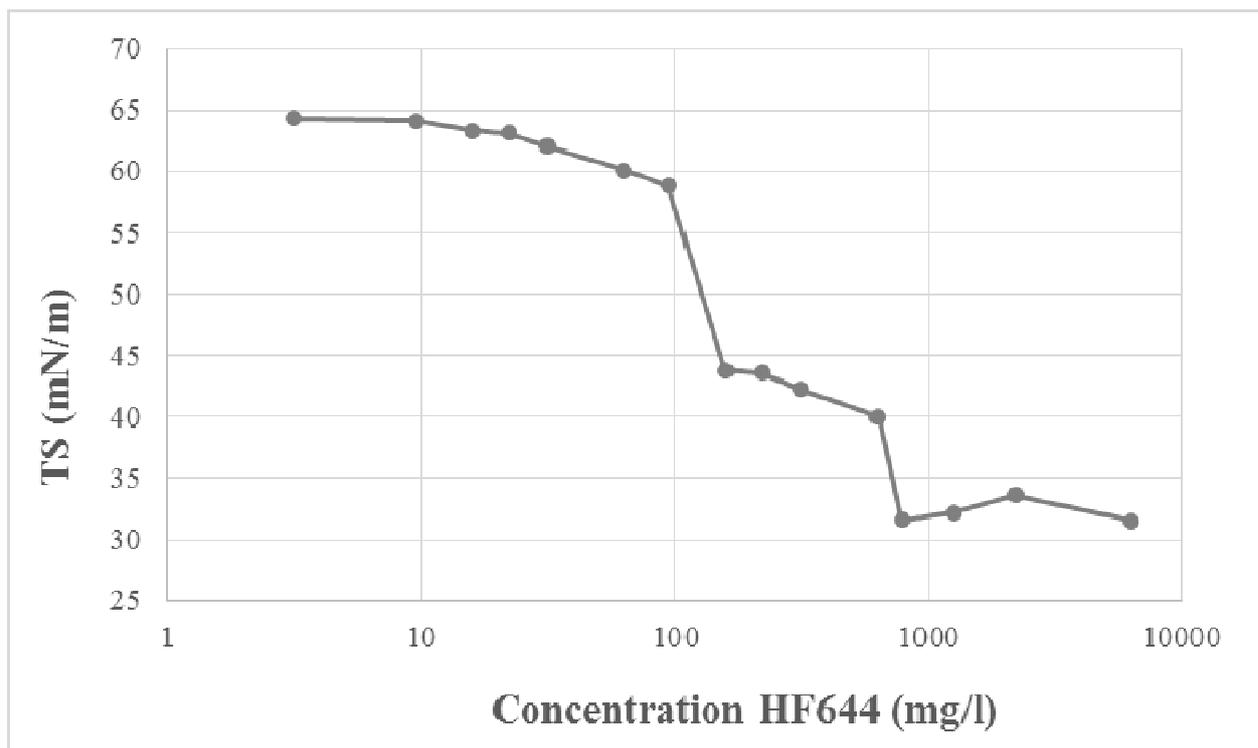


Figure 3.4 : Courbe donnant la CMC du biosurfactant HF644.

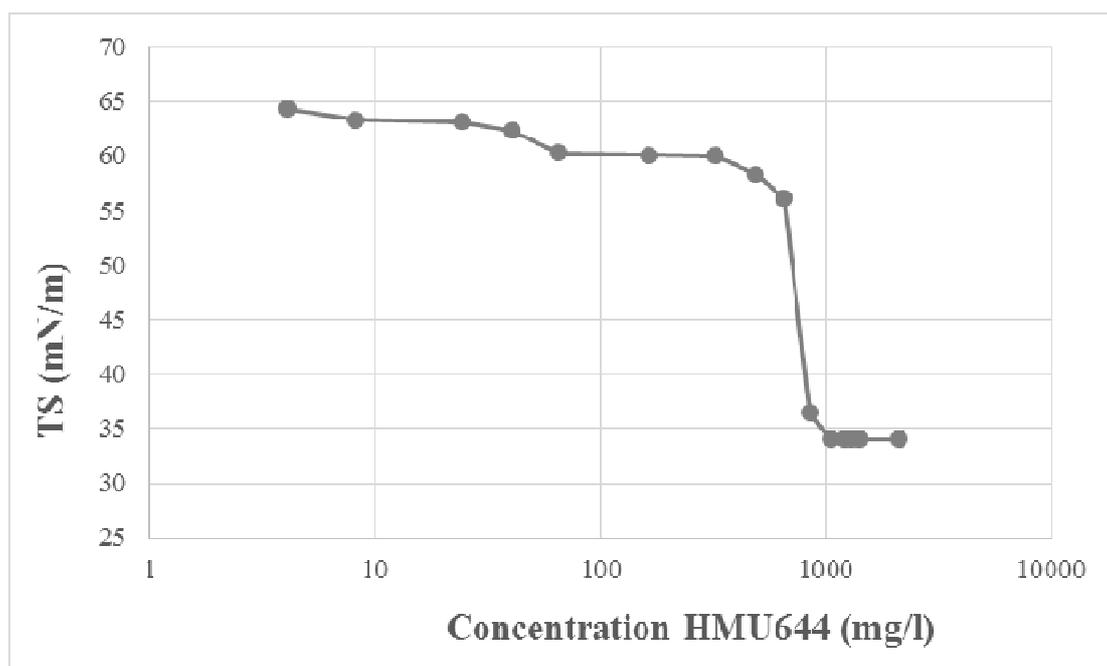


Figure 3.5 : Courbe donnant la CMC du biosurfactant HMU644.

Les résultats expérimentaux montrent que la TS est inversement proportionnelle à la concentration du biosurfactant pour des valeurs inférieures à 787 mg/l pour HF644 et 1050 mg/l pour HMU644, au-delà, la TS garde une valeur presque constante (31,6 mN.m⁻¹ pour le biosurfactant HF644 et 34 mN.m⁻¹ pour HMU644). L'activité de surface du HF644 est donc meilleure par rapport au HMU644. Cependant, les deux valeurs obtenues sont relativement élevée par rapport aux valeurs de la CMC des biosurfactants, généralement comprises entre 1 et 200 mg/l (Mulligan, 2005) [8]. Néanmoins, ces valeurs restent faible par rapport à certains surfactants chimiques comme le SDS, dont la CMC est comprise entre 2307,2 et 2595,6 mg/l (Bahriet *al.*, 2006) [82] avec une tension de surface minimale de 35 mN/m (Bahriet *al.*, 2006 ; Luna *et al.*, 2008) [82,83].

La CMC du biosurfactant HF644 est proche à celle de quelques biosurfactants comme celui synthétisé par une souche *Staphylococcus* sp. 1E, dont la valeur est de 750 mg/l [25]. De plus, les deux biosurfactants produit par notre souche Sdk644 présentent des CMC inférieures à ceux de Ferhat *et al.*, (2011) et Gudina *et al.*, (2010). En effet, Ferhat *et al.*, (2011) [76] ont isolé deux souches productrices de biosurfactants, l'une *Ochrobactrium* sp. 1C produit un biosurfactant avec une CMC de 1500 mg/l et une TS minimale de 31 mN/m, autre *Brevibacterium* sp. 7G qui produit un biosurfactant dont la CMC est de 2000 mg/l avec une TS correspondante de 32 mN/m. Gudina *et al.*, (2010) [84] ont isolé un biosurfactant synthétisé par une bactérie *Lactobacillus paracasei* avec une CMC de 2500 mg/l et une TS

minimale de 41,8 mN/m. Ces valeurs sont plus élevées par rapport à nos valeurs avec bien une TS minimale similaire voire moins. En revanche, certains biosurfactants ont des valeurs de CMC très faibles, justifiant ainsi leur efficacité à des faibles concentrations.

Saimmaiet al., (2013) [85] ont pu produire un biosurfactant avec une CMC de 9 mg/l et une TS minimale de 26,5 mN/m synthétisée par une souche de *Leucobacterkomagatae* 183. **Ghojavandet al., (2008) [86]** ont produit un biosurfactant par une souche de *Bacillus subtilis* PTCC 1696 dans un milieu minéral avec le saccharose (10 g/l) comme unique source de carbone. La CMC de ce biosurfactant a été déterminée après deux étapes de purification. La première étape constitue une précipitation acide suivie par lyophilisation du produit, Alors que la deuxième étape consiste à extraire le biosurfactant issu de la première étape avec le méthanol et l'évaporer par la suite. Le biosurfactant de la précipitation acide a donné une CMC de 100 mg/l, tandis que le biosurfactant purifié une fois de plus par le méthanol, sa CMC a diminuée jusqu'à une valeur de 10 mg/l. La purification des biosurfactants améliore donc significativement leur CMC.

3.2.2. Pouvoir émulsifiante

Afin d'avoir une idée sur le pouvoir émulsifiant des deux biosurfactants HF644 et HMU644 vis-à-vis différents substrats, nous les avons comparés par rapport à des surfactants chimiques pures et efficaces. Les résultats sont montrés dans la figure 3.6.

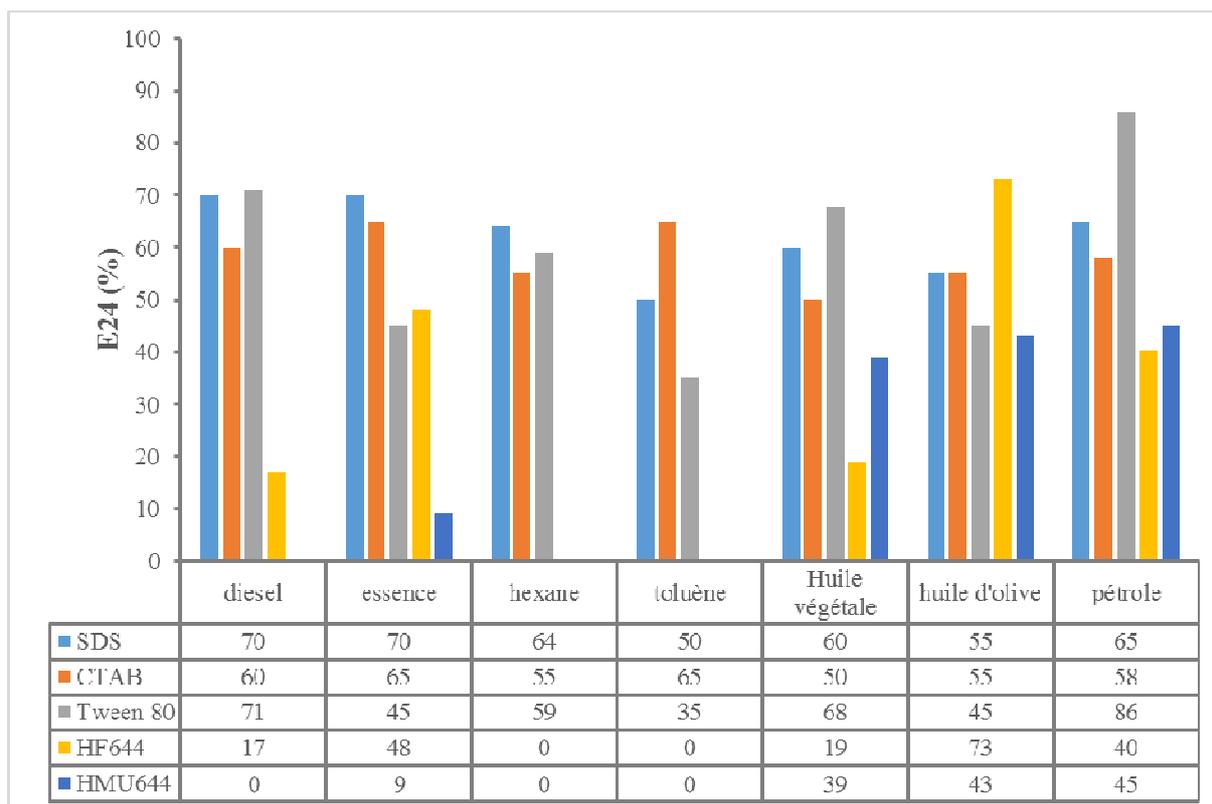


Figure 3.6 : Pouvoir émulsifiant des surfactants sur différents substrats

Les biosurfactants produit par la souche Sdk644 possèdent un bon pouvoir émulsifiant sur les huiles végétales et le pétrole. L'indice d'émulsification des biosurfactants HF644 et HMU644 sont respectivement 73% et 43% avec l'huile d'olive et 40% et 45% pour le pétrole respectivement.

En outre, l'essence constitue un bon substrat pour le HF644 (E24 de 48%) contrairement au HMU644 (E24 de 9 %).

De plus, l'activité émulsifiante est moins importante en utilisant l'huile végétale (E24 de 19% et 39% pour HF644 et HMU644 respectivement), le diesel (E24 de 17% avec le HF644). L'activité émulsifiante est nulle en utilisant des composés purs (toluène et hexadécane). Ceci nous amène à conclure que l'émulsification des substrats hydrophobes dépend fortement de la nature de biosurfactant.

D'autre part, il semblerait que les surfactants chimiques possèdent un pouvoir émulsifiant plus élevé par rapport aux deux biosurfactants. Les trois surfactants chimiques ont pu émulsifier toute la batterie des substrats testés. Généralement, les biosurfactants sont connus dans leur pour à baisser les tensions de surface plutôt que de produire des émulsions stables (c.-à-d. un E24 de plus de 50 %).

Ferradji (2014) [81], a trouvé une émulsification importante avec le pétrole comme substrat hydrophobe (E24 de 100 %). Cependant, cette activité était très faible avec l'huile d'olive (E24 de 7,14%), l'huile de soja (E24 de 9,32%), le gasoil (E24 de 5,2%) et l'essence (E24 de 14,44%).

En revanche, le biosurfactant produit par la souche *Nocardiopsis*. B4 présente un meilleur pouvoir émulsifiant avec l'huile d'olive. L'indice d'émulsion était de 80% (**khopadeet al., 2012) [13]**).

3.2.3 Caractérisation structurale du biosurfactant par IRTF

Les spectres IR des groupements fonctionnels caractéristiques des deux biosurfactants HF644 et HMU644 sont montrés dans les figures 3.7 et 3.8 respectivement.

Le traitement du spectre et l'identification des pics caractéristiques a été facilité par l'emploi d'un logiciel universel (version gratuite) Specamp-v.1.4 qui pointe sur toute bande intéressante. L'interprétation de ces pics caractéristiques a été obtenue, entre autre par la consultation de la base de données du logiciel Specamp-v.1.4 et d'une autre base numérique fournie par le lien directe : http://www.unice.fr/cdiac/animations/spectroscopie/infra_rouge/base_ir_frequences.swf [99].

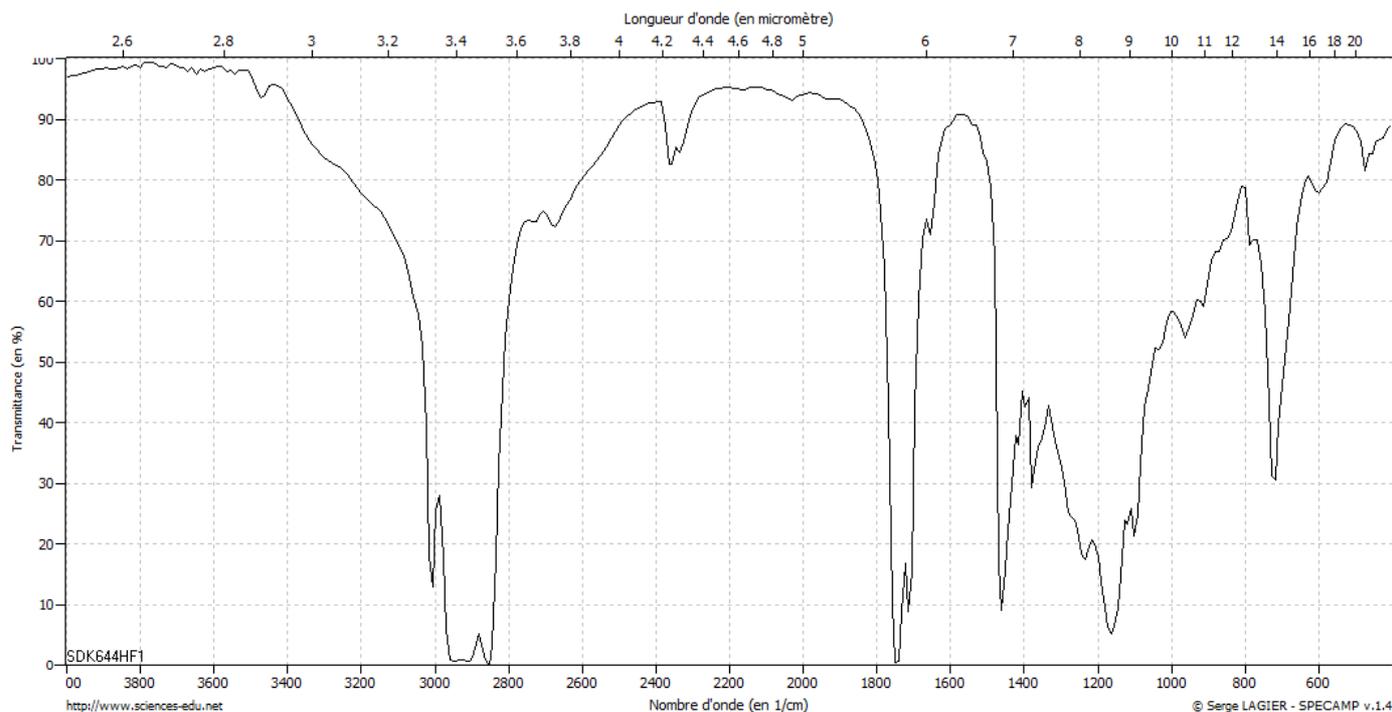


Figure 3.7: Analyse par IRTF du biosurfactant HF644.

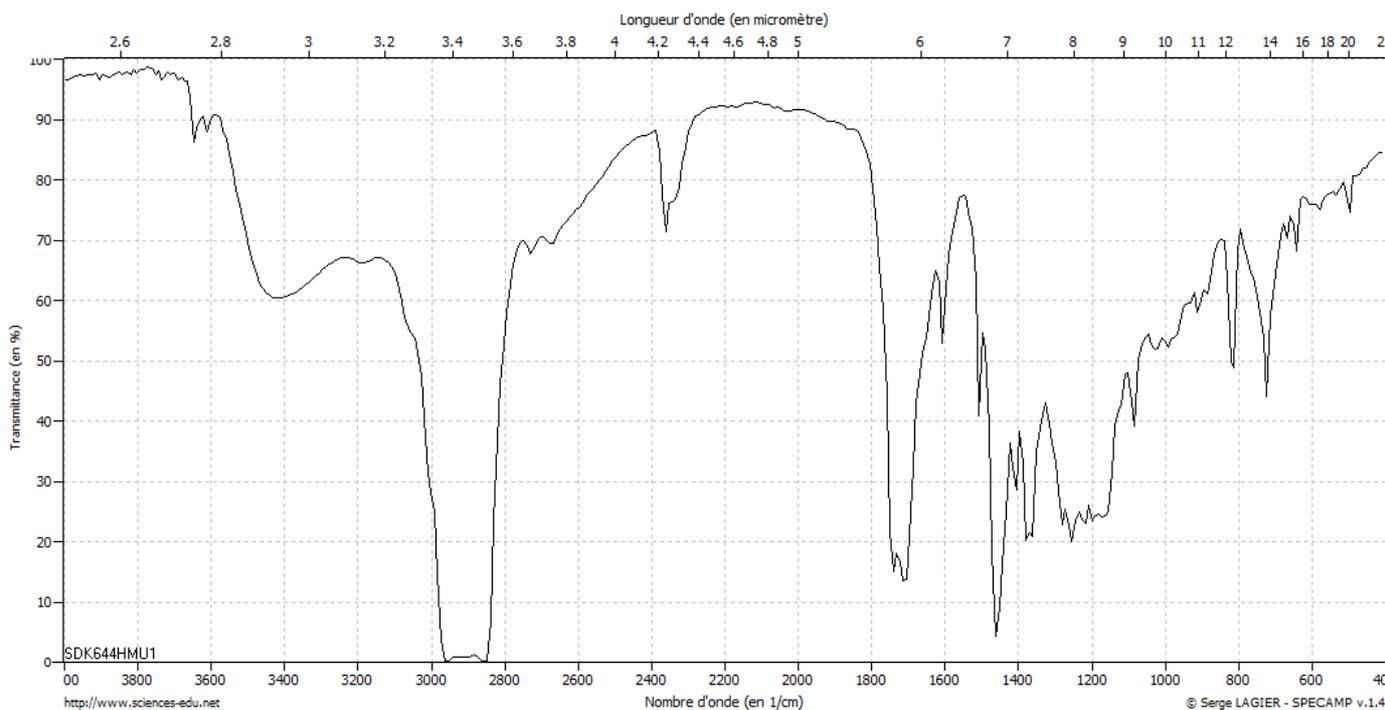


Figure 3.8 : Analyse par IRTF du biosurfactant HMU644.

Les analyses par IRTF ont montré des profils relativement similaires pour les deux biosurfactants HF644 et HMU644.

D'après les travaux antérieurs nous pouvons dire qu'il y a une forte probabilité que nos biosurfactants soient des glycolipides. En effet, la composition moléculaire des biosurfactants évaluée par IRTF a révélé la présence des groupements fonctionnels suivants :

- La bande large de forme gaussienne (symétrique) située autour de 3430 cm^{-1} , observée seulement dans le spectre du HMU644 est très caractéristique des vibrations d'élongation des O-H intermoléculaires. Elle peut se retrouver entre 3200 et 3500 cm^{-1} (réf LibSpecamp 1.4). Saika *et al.*, (2012) [87] l'a trouvée à 3370 cm^{-1} . Bordoloi et Konwar (2009) [88] l'a coincée à 3443 cm^{-1} , Alors que Ferradji (2014) [81] l'a pointée à 2239 cm^{-1} . Toutefois, le biosurfactant HF644 est dissimulée de ce pic. Abouseoudet *et al.*, (2008) [71] bien qu'il a identifié un biosurfactant de type rhamnolipide.
- Les bandes très intenses positionnées entre 3000 et 2800 cm^{-1} , pour les deux biosurfactants sont dues aux vibrations d'élongation des liaisons de type C-CH, C-CH₂ et C-CH₃ [81,87,71]. Ces pics s'étalent généralement dans la région entre 3000 à 2700 cm^{-1} [71].

- Les deux pics à 1750 et 1714 cm^{-1} de fortes intensités sont des pics caractéristiques des groupements carbonyle C=O des acides carboxyliques (1700 à 1760 cm^{-1}) [89,99,87].
- Les bandes apparues à 1460 et 1380 cm^{-1} sont dues aux vibrations de déformation des liaisons –CH2 et –CH3 respectivement [99,71].
- Les pics affichés entre 1300 et 1000 cm^{-1} (1236, 1164, 1119, 1101 et 1035 cm^{-1}) sont attribués aux vibrations d'élongation des liaisons C–O affirmant la présence intense des liaisons formées entre les atomes de carbone et les groupes hydroxyles dans les structures chimiques de la partie glycoside [89].
- Les pics affichés à 963 et 912 cm^{-1} sont affectés aux vibrations (–OH dans les acides carboxyliques [81].
- Le pic apparu à 719 cm^{-1} est provoqué par le balancement de la liaison –CH2 [99].

3.3 Stabilité des biosurfactants

3.3.1 Stabilité thermique

L'effet de la température sur la stabilité des biosurfactants HF644 et HMU644 est illustré sur les figures 3.9 et 3.10.

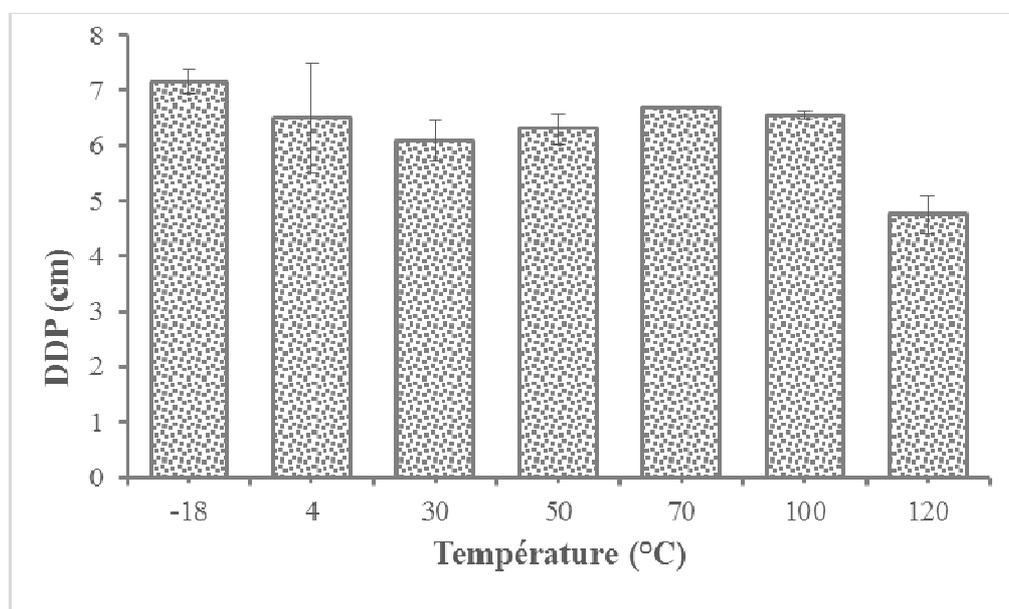


Figure 3.9 : Effet de la température sur la stabilité du biosurfactant HF644.

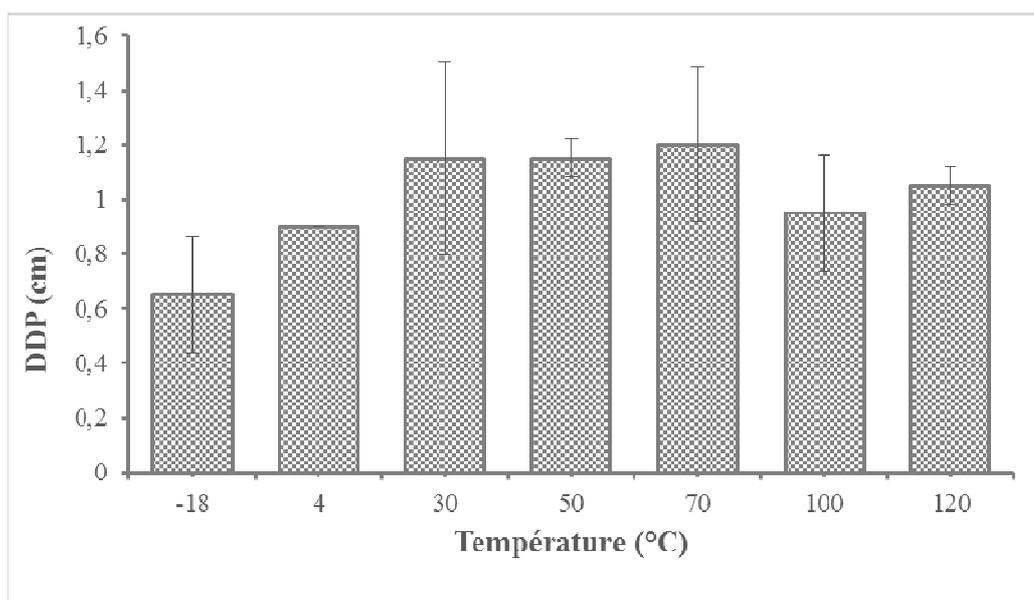


Figure 3.10 : Effet de la température sur la stabilité du biosurfactant HMU644.

Les résultats obtenus montrent que le biosurfactant HF644 est stable dans la gamme de température étudiée. L'autoclavage à une température de 120 °C pendant 20 min a légèrement réduit l'activité de surface de notre produit. À une température d'environ – 18 °C, le HF644 ne perd pas son activité. Par conséquent, la congélation du produit pour une éventuelle purification par lyophilisation est possible.

En ce qui concerne le biosurfactant HMU644, nous remarquons qu'il est moins efficace par rapport au HF644. Le DDP maximal affiché pour le HF644 est de 7,3 cm alors qu'il est à 1,4 cm pour le HMU644. L'activité de surface de ce dernier est presque constante entre 30 et 70 °C, mais elle chute rapidement en sortant de cette fourchette. Cependant le HMU est plus résistant aux fortes températures plutôt que aux températures basses.

Les résultats obtenus sur la stabilité thermique de nos biosurfactants sont satisfaisants. Le HF644 est plus stable par rapport au Bio-AB1 synthétisé par la souche *Streptomyces* sp. AB1. Ce dernier est stable à des températures entre 4 et 50 °C, mais il perd son activité à des températures supérieures. À 100 °C le produit est instable. De même, **Eddouaouda (2012) [25]** a trouvé que le biosurfactant produit par une souche 1E est stable durant l'augmentation de la température de 4 jusqu'à 55°C. Pour des températures plus élevées (70°C, 100°C) le biosurfactant est instable thermiquement.

Khopadeet al., (2012) [13] ont obtenu un biosurfactant plus stable thermiquement. En effet, ce biosurfactant, synthétisé par une *Nocardiopsis* sp. B4 cultivée sur l'huile d'olive est stable

pour une gamme de température allant de 30 jusqu'à 100°C. Des résultats similaires ont été trouvés par **Saimmaiet al., (2013) [85]** avec un biosurfactant produit par une souche marine *Inquiliinuslimosus* KB3, montrant une bonne stabilité dans toute la gamme de température allant de 4 à 120 °C.

La bonne stabilité du biosurfactant HF644 à des températures élevées le rend très utile dans les applications industrielles comme agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique où les produits sont chauffés pour garantir leur stérilité [71, 90, 13]. Ainsi, la stabilité de notre produit à une température de 4 °C permet sa conservation au froid.

3.3.2 Stabilité chimique

3.3.2.1 Effet du pH

Les résultats de l'effet du pH sur la stabilité de biosurfactant montrent que le biosurfactant HF644 est très stable dans les milieux acides et basiques. Le HF644 garde sa stabilité dans un intervalle large de pH allant de 2 à 10. À pH = 12, l'activité de surface de notre produit chute rapidement. À titre d'indication, à pH = 10 le DDP est de 5,5 cm, tandis que ce dernier diminue rapidement à pH = 12 pour atteindre une valeur minimale de 2 cm (figure 3.11).

Pour le biosurfactant HMU644, nous voyons que le DDP le plus élevé est enregistré à pH 6. À des pH voisins (4 et 7), le produit est encore stable (figure 3.12). Cependant, en s'éloignant de cette fourchette, le HMU644 perd son activité de surface et cela est plus prononcé pour des pH alcalins.

Comme il était le cas pour la stabilité thermique, le HF644 est plus stable aux variations de pH que le HMU644, avec une activité de surface plus élevée.

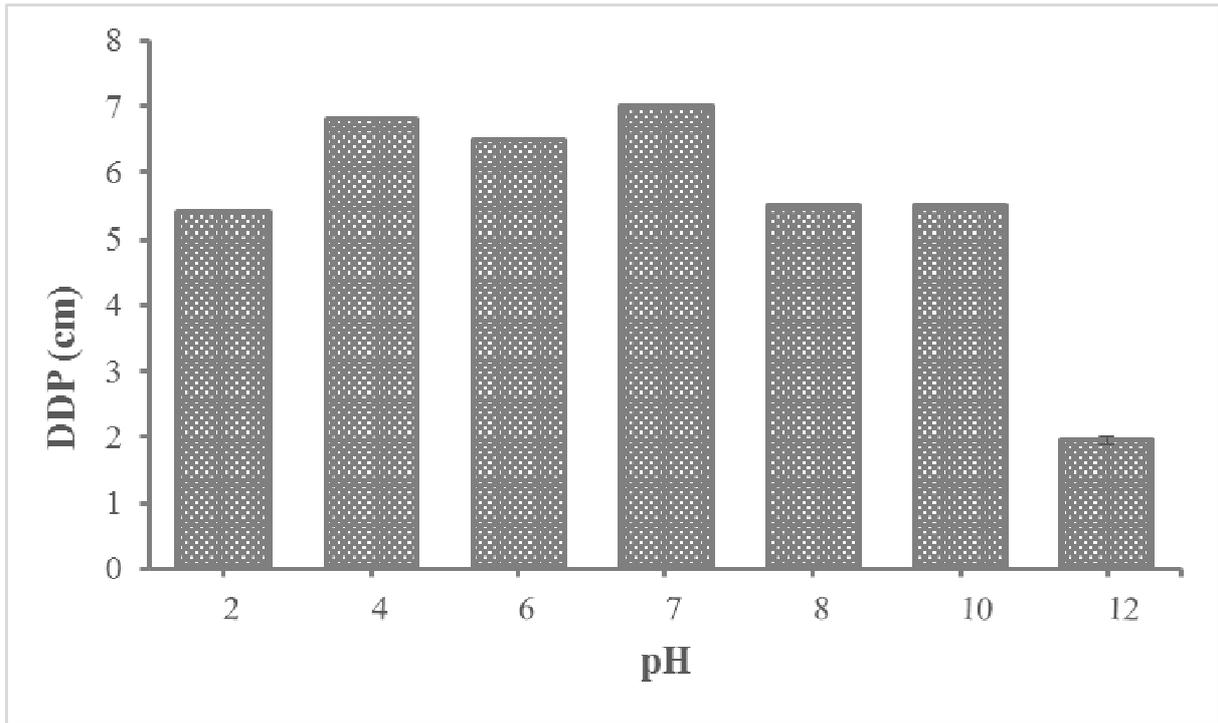


Figure 3.11 : Effet du pH sur la stabilité du biosurfactant HF644.

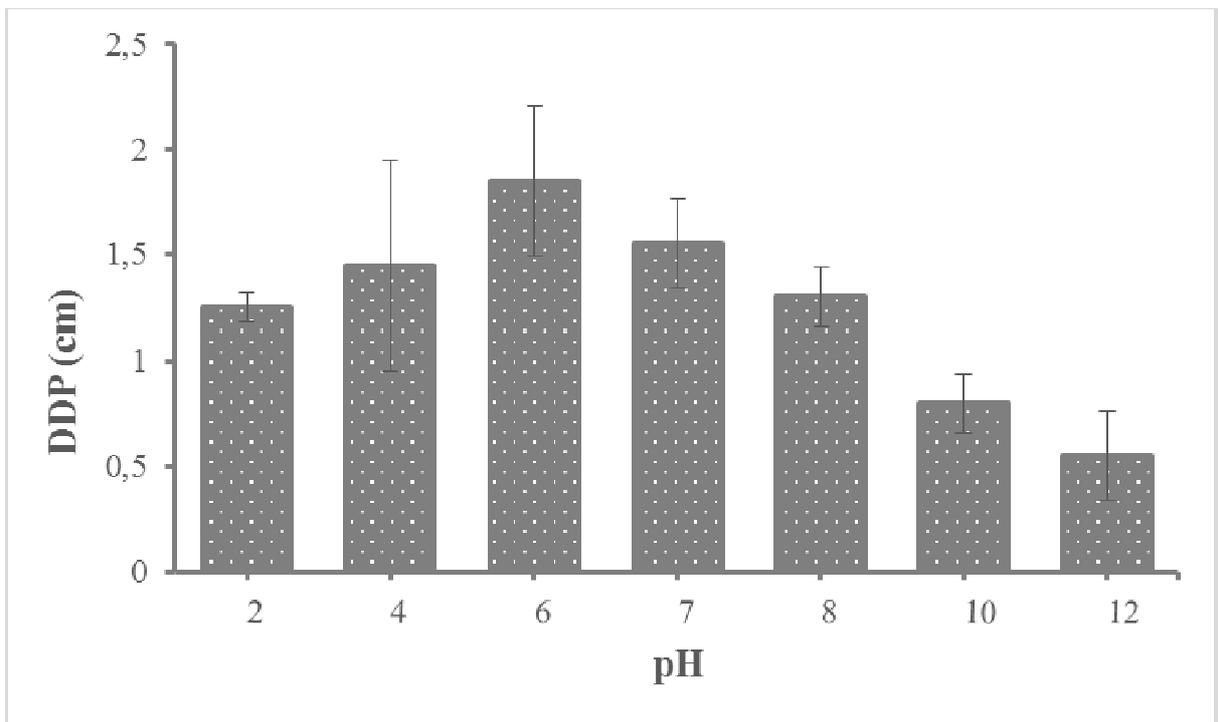


Figure 3. 12 : Effet du pH sur la stabilité du biosurfactant HMU644.

Le biosurfactant obtenu dans les travaux de **Ferradji (2014) [81]** a une stabilité aux variations de pH similaire de la nôtre. Son produit ; le Bio-AB1 est stable à des pH compris entre 2 à 11. À pH 12, le produit est instable. De même, **Eddouaouda (2012) [25]** a trouvé

que le biosurfactant produit par la souche 1E est stable dans toute la gamme de pH allant de 2 à 12. En revanche, **Haddad et al., (2009) [91]** ont trouvé qu'un pH acide (pH = 4) influe sur l'activité de biosurfactant avec une perte de l'ordre de 8 mN.m⁻¹. A un pH = 3, le biosurfactant a complètement perdu son activité (TS = 39,72 mN.m⁻¹) en raison de la précipitation du biosurfactant en milieu acide. **Biao et al., (2012) [13]** trouvent que le biosurfactant produit par la souche *Nocardiopsis* sp. B4 est stable en milieux basiques (8 à 12), mais il est moins stable en milieux acides (pH < 7). Des résultats similaires ont été reportés par **Bezza et Chirwa (2015) [92]**, qui ont constaté que le lipopeptide biosurfactant produit par *Bacillus subtilis* CN2 est stable dans tous l'intervalle de pH entre 5 et 13. À des pH inférieurs à 5, la stabilité du biosurfactant est considérablement réduite suite à la précipitation du produit. La précipitation des biosurfactants à des pH acides a été ainsi évoquée par **Khopade et al. et Abouseoudet al.** La résistance du biosurfactant HF644 à des pH acides a été constatée dès le départ lors de l'extraction de ce dernier du milieu de production. La méthode qui utilise la précipitation acide n'a été marchée avec notre produit. La stabilité des biosurfactants est influée par les variations du pH par modification de la taille et la forme des micelles formées (**Knoblich et al., 1995) [93]**.

3.3.2.2 Effet de salinité

L'effet de la salinité sur l'activité de surface des biosurfactants HF644 et HMU644 est enregistré sur les figures 3.13 et 3.14.

La stabilité du biosurfactant HF644 (à CMC) a été évaluée en présence de différentes concentrations en NaCl. Les résultats obtenus montrent que l'activité de surface du biosurfactant est stable jusqu'à une salinité de 40 g.l⁻¹ (un DDP de 5,15 cm). Des concentrations plus grandes en sel fait diminuer rapidement le DDP.

Concernant le biosurfactant HMU644, nous remarquons que sa stabilité n'est pas vraiment affectée par les concentrations en NaCl. L'augmentation de la salinité de 20 jusqu'à 200 g.l⁻¹ influe peu sur la stabilité du biosurfactant (un DDP de 1,25 à 2 % contre 1,15 à 20 % de NaCl).

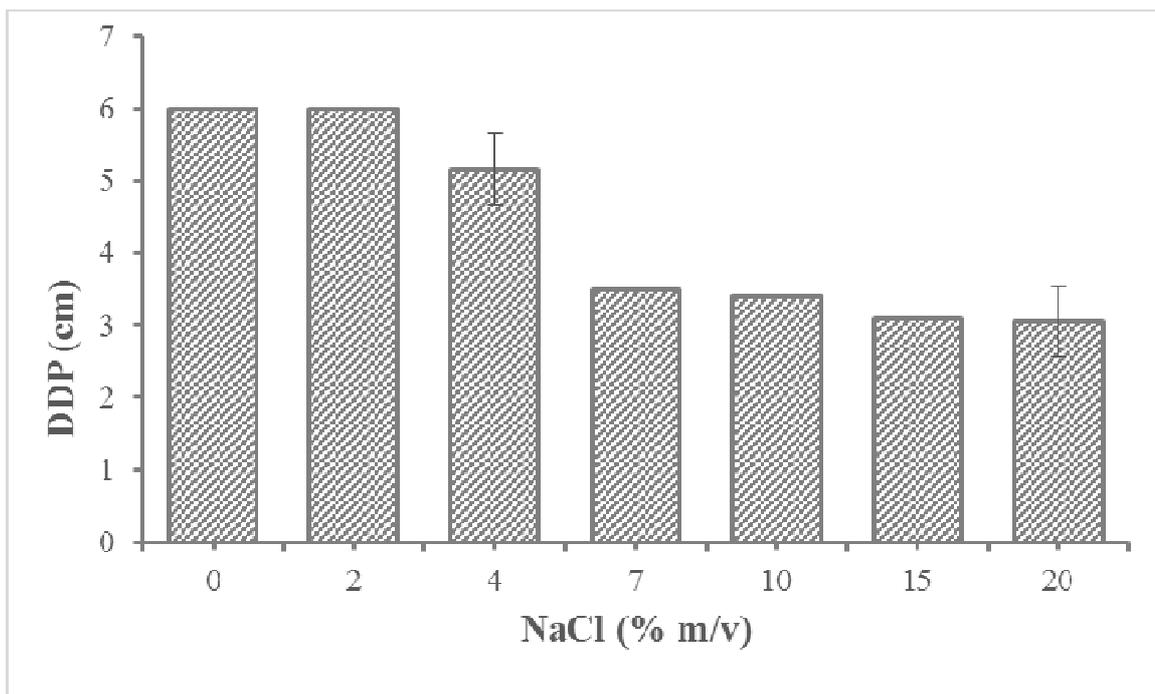


Figure 3.13 : Effet de la salinité sur la stabilité du biosurfactant HF644.

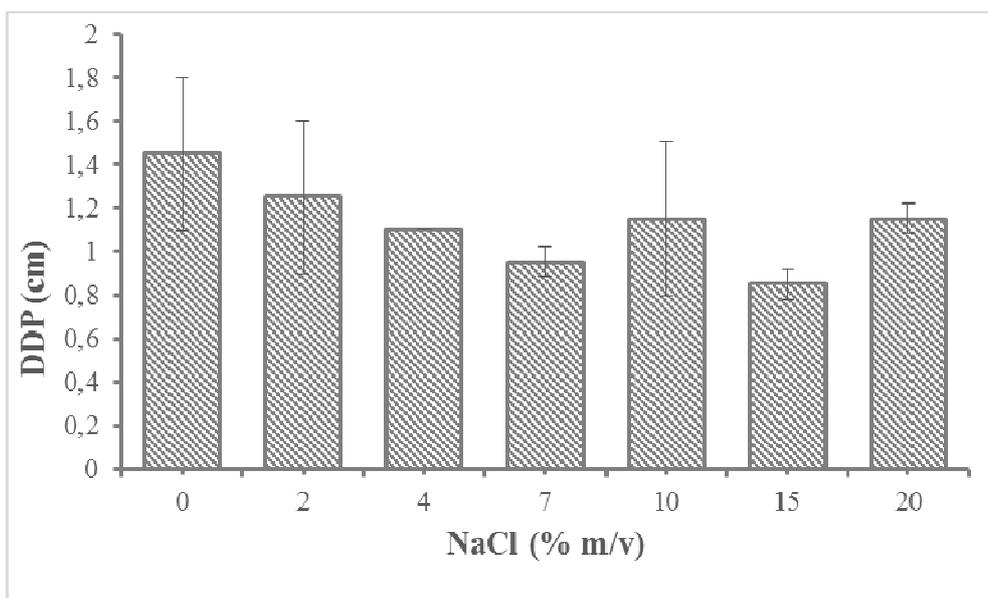


Figure 3.14 : Effet de la salinité sur la stabilité du biosurfactant HMU644.

Ces résultats illustrés sur la figure 3.13 sont similaires à ceux obtenus par **Ferradji (2014) [81]** qui a trouvé que le biosurfactant Bio-AB1 est stable à des salinités allant jusqu'à 30 g.l⁻¹. Des concentrations supérieures diminuent la tension de surface et l'E24. **JUNG et al.,(1995) [94]** ont rapporté que la présence de sels perturbait les émulsions huile/eau, affectant ainsi la tension de surface et l'indice d'émulsification. **Khopadeet al.,(2012) [13]** ont montré que le biosurfactant issu de la souche *Nocardiostrictus* B4 pouvait former des

émulsions stables jusqu'à 80 g.l⁻¹ de NaCl. De même, le biosurfactant produit par la souche *Streptomyces* sp. B3 est stable à 60 g.l⁻¹ de NaCl (E24 à 80%) [95]. Par ailleurs, certains travaux ont montré que les biosurfactants peuvent supporter des concentrations en sel allant jusqu'à 300 g.l⁻¹ de NaCl[96,97].

Comme le montre la figure 3.13, le DDP de biosurfactant HF644 reste stable jusqu'à 20% de NaCl. Cela indique également que les biosurfactants produits par les isolats Sdk644 restent efficaces avec la présence d'ions monovalents (Na⁺). Selon **Desai et Banat [11]**, des concentrations en sel (NaCl) supérieures à 2% sont suffisantes pour inhiber les tensioactifs chimiques.

Les biosurfactants HF644 et HMU644 n'ont pas été précipités dans des solutions de chlorure de sodium (jusqu'à 20%). D'après **Ferhat (2012) [98]**, Cette tolérance aux forces ioniques offre aux biosurfactants plus d'efficacité dans les industries pétrolières dont la plupart pratiquent en conditions salines très élevées.

Conclusion générale

Par la présente étude, nous avons examiné les propriétés de deux biosurfactants synthétisés par une souche bactérienne marine nommée SdK644. Les deux biosurfactants ont été obtenus à partir de deux substrats déchets de nature différente (huile de friture et huile de moteur usagée). Le but visé de la diversification de la source de carbone est d'avoir des biosurfactants avec des propriétés tension actives intéressantes. Les résultats obtenus ont montré que :

En présence d'HF, la production de biosurfactant est intéressante avec un rendement de 4,93 g.l⁻¹. Toutefois, l'utilisation d'HMU a conduit à un rendement de production en biosurfactant plus faible (0,68 g.l⁻¹). Le taux de conversion de la source de carbone d'HF est de 25% contre 6% pour l'HUM.

Le tracé de la tension de surface en fonction la concentration des biosurfactants a montré que la TS minimale du biosurfactant HF644 (31,6 mN.m⁻¹) est atteinte avec une CMC de 787 mg.l⁻¹. Le HMU644 enrichie une TS de 34 mN.m⁻¹ pour une CMC plus grande (1050 mg.l⁻¹).

Les résultats de l'analyse IRTF a révélé que les deux biosurfactants ont probablement une structure glycolipidique très similaire.

Par ailleurs, l'essai de l'activité émulsifiante montre que les deux biosurfactants HF644 et HMU644 ont un faible pouvoir émulsifiant par rapport aux surfactants chimiques Tween 80, SDS et CTAB. Parmi les six substrats hydrophobes testés (essence, diesel, pétrole, toluène, hexane, huile végétale et huile d'olive), le HF644 et le HMU644 ont agi uniquement sur le pétrole et l'huile d'olive (E24 de 73% et 43% avec l'huile d'olive et 40% et 45% pour le pétrole respectivement).

Enfin, l'étude de la stabilité thermique et chimique des biosurfactants montre que le HF644 est stable à des températures de -18 à 100 °C, des pH allant de 2 à 10 et des salinités jusqu'à 4 % NaCl. Par contre, le HMU644 est instable à des températures basses, des pH s'éloignant de la neutralité, mais il résiste aux fortes salinités (jusqu'à 20 % de NaCl).

Au vu des résultats obtenus, un nombre de perspectives de travail s'ouvre à l'horizon. Une étude complémentaire est nécessaire sur l'optimisation des paramètres affectant la production de biosurfactant en utilisant les deux sources de carbone HF et HMU. Ainsi, cela est pourrait atteindre avec le choix de la méthode d'extraction de biosurfactant donnant les meilleurs rendements.

Une caractérisation plus poussée des biosurfactants (Chromatographie sur couche mince CCM, Analyse par Chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse CL/MS, ...) est essentielle pour déterminer leur structure chimique.

Après détermination des propriétés des biosurfactants, une mise en application dans un domaine d'industrie adéquat est très intéressante.

Références bibliographiques

1. Al-Araji I.L., AbdRahman R. N. Z. R., Basri, Salleh M. A. B., Minireview : "Microbial Surfactant" .(*AsPac*) *J. Mol. Biol. Biotechnol.*, Vol. 15 No.3, p, (2007), 99-105.
2. Mulligan C. N., "Recent Advances In The Environmental Applications Of Biosurfactants", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Vol. 14, No. 5, p, (2009),372-378.
3. Prommachan O., "Production And Application Of Biosurfactant From *Bacillus* MUV4", Master of science thesis of biotechnology, Prince of songkla university, Thailand, 70 p. PDF/Nature of biosurfactants (2002).
4. Xiaoyang L., Abbott N. L., "Spatial And Temporal Control Of Surfactant Systems", *J. Colloid and Interface Science*, Vol. 339, p, (2009), 1–18.
5. WEST C.C. et HARWELL J.H., "Surfactants and subsurface remediation", *Environ.Sci. Technol.*, 36 (12) : (1992),2324-2330.
6. Marchant R et I. M. Banat., Biosurfactants: "a sustainable replacement for chemical surfactants", *BiotechnolLett.* 34: (2012),1597–1605.
7. Rebello S , A. K. Asok, S. Mundayoor, M. S. Jisha., "Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants", *Environ ChemLett.* 12: (2013),275–287.
8. Mulligan C.N, "Environmental applications for biosurfactants" ,*Environmental Pollution* 133 (2005) 183–198.
9. Kosaric N., Gray N. C. C., Cairns W. L., *In* H. J. Rehm and G. Reed (ed.). "Microbial Emulsifiers And Deemulsifiers " ,p., VerlagChemie, Deerfield Beach, Fla. *Biotechnology*, Vol. 3.(1983) 575–592.
10. Rosenberg E., "Exploiting Microbial Growth On Hydrocarbon": New Markets. *Trends Biotechnol.* Vol.11, p, (1993), 419–424.
11. Desai JD, Banat IM., "Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Reviews*", 61(1): (1997), 47-64.

12. Saharan B. S., Sahu R. K. and Sharma D., “A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives”. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, Vol. 2011: GEBJ-29, (2012), 14 pp.
13. Khopade A., Biao R., Liu X., Mahadik K., Zhang L. and Kokare C., “Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis sp.* B4”, *Desalination*, 285, (2012),198-204.
14. Franzetti A., Gandolfi I., Raimondi C., Bestetti G., Banat I. M., Smyth T. J., Papacchini M., Cavallo M., Fracchia L., “Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by *Variovoraxparadoxus 7bCT5*”. *Bioresource Technology*, 108, (2012),245-251.
15. Soberón-Chávez G. and Maier R.M., “Biosurfactants: a General Overview”. In: Soberón-Chávez G. (ed.), *Biosurfactants, Microbiology Monographs 20*, Springer-Verlag (Berlin), (2011): pp 1-11.
16. Henkel M., Müllera M. M., Küglera J. H., Lovagliob R. B., Contierob J., Syldatka Ch., Hausmann R. “Review: Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production”. *Process Biochemistry*, 47,(2012), 1207-1219.
17. P. Jacques. “Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus spp.*”.In: Soberón-Chávez G. (ed.), *Biosurfactants, Microbiology Monographs 20*, Springer-Verlag (Berlin), pp (2011), 58-83.
18. Mukherjee K. A. and Das K. ,“Microbial surfactants and their potential applications”. In: Ramkrishna S. (Ed.); *Biosurfactants. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media (New York)*, Chapter 4: Vol 625. pp,(2010), 53-64.
19. Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R. “Microbial production of biosurfactants. Resources, conservation and recycling”. 18: (1996),41-57.
20. Banat, I.M., Makkar, R.S. & Cameotra, S.S. “Potential commercial applications of microbial surfactants”, *Applied and Microbiological Biotechnology*, 53: (2000),495-508.
21. Hathout Y, Ho YP, Ryzhov V, Demirev P, Fenselau C. Kurstakins: “a new class of Lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *JNatProd*”, 63:(2000),1492-1496.

22. Laith A-A, Raja N. Z., Mahiran B. and Abu Baker S., “MINIREVIEW: Microbial Surfactant”. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, Vol. 15 (3) : (2007),99-105.
23. Pekin G, Vardar-Sukan F, N K., “Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey”. *Engineering in Life Sciences* 5, (2005), 357–362.
24. Banat I, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti M, Fracchia L, Smyth T, Marchant R., “Microbial biosurfactants production, applications and future potential”. *Applied and Microbiological Biotechnology*, 87,(2010), 427–444.
25. Eddouaouda K., « Etude de potentiel biodegradatif des souches isolées de HassiMassoude contaminate par du pétrole : criblage, biodégradation de PAH et production de bio surfactant ». Thèse de doctorat en chimie industrielle. Blida. université Saad Dahlab-Blida, 194p,(2012).
26. Satpute S. K., Banat I. M., Dhakephalkar P. K., Banpurkar A. G., Chopade B. A., “Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms”. *Biotechnology Advances*, 28, (2010), 436-450.
27. Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, Banat I M.”Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources”. *World Journal of Microbiological Biotechnology*, 24(7): (2008),917–25.
28. Bognolo G., Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152 (1-2) : (1999),41-52.
29. Mulligan C.N., Young R.N. et B.F. Gibbs., “Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil” a review, *Engineering Geology*, 60: (2001),371-380.
30. Christofi N. et I.B. Ivshina., “Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation”, *Journal of Applied Microbiology*, 93: (2002),915-929.
31. Fiechter A., Biosurfactants: moving towards industrial application, *Tibtech*, 10: (1992),3-12.
32. MATA-SANDOVAL J. C., KARNIS J. et TORRENTS A., “Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides”, *Environ. Sci. Technol.*, 34 (23) : (2000), 4923-4930.

33. Parra J.L., J. Guinea, M. A. Manresa, M. Robert, M.E. Mercadé, F. Comelles and M.P. Bosch., “Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants”. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66: (1989),141–145.
34. Spoeckner S., V. Wray, M. Nimtset S. Lang., “Glycolipids of the smut fungus *Ustilagomaydis* from cultivation on renewable resources”. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 51: (1999),33-39.
35. Peypoux F., Bonmatin J.M et Wallach J., “Recent trends in the biochemistry of surfactin”, mini review *App. Microbiol. Biotechnol.* 51. pp: (1999),553-563.
36. Daniels, C. J., J. D. Hofman, J. G. MacWilliam, W. F. Doolittle, C. R. Woese, K.R. Luehrsen, & G.E., Fox . “Sequence of 5S ribosomal RNA gene regions and their products in the archaeobacterium *Halobacteriumvolcanii*”. *Mol Gen Genet* 198: (1985),270–274.
37. Holmberg, K., Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6: (2001),148-159.
38. Neindre B.L., Tensions superficielles et interfaces. Techniques de l'ingénieur. Traités constantes physico-chimiques. 475 :(1993), 2-12.
39. Pore J., Les agents de surface. Micro-émulsion, Emulsions multiples, agent de surface. Techniques des industries des corps gras. pp: (1992),1-6.
40. Mata-Sandoval, J.C., “The influence of rhamnolipids on the bioavailability of pesticides in contaminated soils”. Ph.D. Thesis, Univ.Maryland, Collegepark, MD20742, (2000),USA.
41. Zhang Y. et R.M. Miller (1992). “ Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant)”. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10),(1992), 3276-3282.
42. Abalos A., A. Pinazo, M.R. Infate, M. Casals, F. Garcia et A. Manresa., “Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes”, *Langmuir*, 17, (5),(2001), 1367-1371.
43. Edwards D. A., Luthy R.G. et Liu Z., “Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions”, *Environ. Sci. Technol.* 25(1),(1991), 127-133.

44. Haigh S.D., "A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil", *The Science of the Total Environment*, 185,(1996),161-170.
45. Haba E., A. Pinazo, O. Jauregui, M.J. Espuny, M.R. Infante, A. Manresa., "Physicochemical characterization and antimicrobial proprieties of rhamnolids produced by *Pseudomonas aeruginosa*47T2 NCBIM 40044" *Biotechnology and Bioengineering*, 81,(2003), 316-322.
46. Descenes L., Lafrance P., Villeneuve J.-P. et Samson R., "Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46,(1996), 638-646.
47. EDWARDS K.R., LEPO J.E. et LEWIS M.A., "Toxicity comparison of biosurfactant and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species", *Marine Pollution Bulletin*, 46,(2003), 1309-1316.
48. HERMAN D.C., ARTIOLA J.F. et MILLER R.M., "Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipidbiosurfactant", *Environ. Sci. Technol.*, 29, (9),(1995), 2280-2285.
49. VIPULANANDAN C. et REN X., "Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant", *Journal of Environmental Engineering*, 126, (7), (2000),629-634.
50. Page C.A, Bonner J.S, S.A. Kanga, M.A. Mills et R.L., "AuteuriethBiosurfactantsolubilization of polycyclic-aromatic hydrocarbons", *Environmental Engineering Science*, 16(6),(1999), 465-474.
51. Besson F., Peypoux F., Michel G. and Delcambe L., "Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*", *Journal of Antibiotics* 29 (10), (1976), 1043 - 1049.
52. Wang X., Gong L., Liang S., Han X. and Zhu C. and Li y., "Algicidal activity of rhamnolipidbiosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*". *HarmfulAlgae*. 4, (2005), 433 - 443.

53. Raza Z. A., Khan M. S., Khalid Z. M., “Evaluation of Distant Carbon Sources In Biosurfactant Production By A Gamma Ray-Induced *Pseudomonas putida* Mutant”, *Process Biochemistry*, Vol. 42, p,(2007),686-692.
54. Samadi N., Abadian N., Akhavan A., Fazeli M. R., Tahzibi A., Jamalifar H., “Biosurfactant Production By The Strain Isolated From Contaminated Soil”, *J. Biol. Sci.* Vol. 7, No. 7, p,(2007), 1266-1269.
55. Banat I. M., “Biosurfactants Production And Possible Uses In Microbial Enhanced Oil Recovery And Oil Pollution Remediation”: A Review. *Bioresource Technol.* Vol. 51, p,(1995), 1–12.
56. Meylheuc T. ,Herry J. M. , Bellon-Fontaine M. N., “ Les Biosurfactants, Des Biomolécules A Forte Potentialité D'application” , *J. Sciences des aliments* Vol. 21,No. 6, p, (2001), 591-649.
57. Hultberg M., Bergstrand K. J., Khalil S., Alsanius B., “Characterisation Of Biosurfactant-Producing Strains of Fluorescent Pseudomonads In A Soilless Cultivation System”, *J. Antonie Van Leewenhoek*, 2008. Vol. 94, p,(2008), 329-334.
58. Suwansukho P., Rukachisirikul V., Kawai F., Kittikun A. H., “Production And Applications Of Biosurfactant From *Bacillus subtilis*MUV4”, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* Vol. 30, No.1, p,(2008), 87-93.
59. Savarino P., Montoneri E., Bottigliengo S., Boffa V., Guizzetti T., Perrone D., Mendichi R., “Biosurfactants From Urban Wastes As Auxiliaries For Textile Dyeing”, *Ind. &engin. Chem. Research* Vol. 48, No.8, p,(2009), 3738-3748 .
60. Rodrigues L., Banat I. M. , Teixeira J., Oliveira R. ,”Biosurfactants : Potential Applications In Medicine”, *J. Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 57, no4, pp,(2006), 609-618.
61. Marqués A.M., Pinazo A., Farfan M., Aranda F.J., Teruel J.A., Ortiz A., Manresa A., EspunyM.J,”The Physicochemical Properties And Chemical Composition Of Trehalose Lipids Produced By *Rhodococcuserythropolis*51T7”, *Chem. Phys. Lip.* Vol.158,p, (2009), 110–117.
62. Vandecasteele J. P., *Petroleum Microbiology*, Editions TECHNIP,Paris, 816 p ,(2008) .
63. Sarubbo L. A., De Luna J. M., De Campos-Takaki G. M., “Production And Stability Studies Of The Bioemulsifier Obtained From A New Strain Of *Candida glabrata*UCP

- 1002”, *Elect. J. Biotech.* Vol.9 No.4 ISSN: (July 2006), 0717-3458.
64. K. Benali., « optimisation de la production du biosurfactant par des souches bactériennes isolées à partir d'un sédiment marin portuaire contaminé par des hydrocarbures pétroliers ». Mémoire de master 2, université de Blida 1,2014.
 65. H. Yin, J. Qiang, Y. Jia, J. Ye, H. Peng, H. Qin, N. Zhang, B. He,” Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater”, *Process Biochemistry* 44, (2009), 302–308.
 66. D.G. Cooper, B.G. Goldenberg, “Surface-active agents from two *Bacillus* species”. *Appl Environ Microbiol* 53, (1987),224–229.
 67. MAKKAR R.S. et CAMEOTRA S.S., (2002), “An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 428-434.
 68. **Van Dyke M.I., H. Lee et J.T. Trevors** . « Applications of microbial surfactants” ,*Biotechnol. Adv.*, **9**: (1991)241-252.
 69. Mata-Sandoval J. C., Karns J., and Torrents A. "High-Performance Liquid Chromatography Methods for the Characterization of Rhamnolipid Mixtures Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* Ug2 on Corn Oil." *Journal of Chromatography A* 864: (1999),211-220.
 70. Syldatk C, Lang S, Matulovic U, and Wagner FZ. "Production of Four Interfacial Active Rhamnolipids from N-Alkanes or Glycerol by Resting Cells of *Pseudomonas* Sp. Dsm 2874." *ZeitschriftfürNaturforsch*, (1985) 61-67.
 71. Abouseoud, M., R. Maachi, A. Amrane, S. Boudergua, and I.Nabi. "Evaluation of Different Carbon and Nitrogen Sources in Production of Biosurfactant by *Pseudomonas Fluorescens*." *Desalination* 223 : (2008) 143-151.
 72. Haba, E. et al. “Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils”. *J. Appl. Microbiol.* 88,(2000), 379–387.
 73. Eddouaouda K, Sami Mnif, S. Ben Younes A. Badis, S. Cherif, S. Ferhat, N. Mhiri, M. Chamkha, and Sami Sayadi. "Characterization of a Novel Biosurfactant Produced by *Staphylococcus* Sp. Strain 1e with Potential Application on Bioremediation of Hydrocarbons Contaminated Sites." *Journal of Basic Microbiology* 51: (2012)1-11.

74. Thavasi R., V. R. M. S. Nambaru, S. Jayalakshmi, T. Balasubramanian, and I. M. Banat. "Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources." *Indian Journal of Microbiological Methods* 51, no. 1: (Jan–Mar 2011) 30–36.
75. P. Noparat.,S. Maneerat.,A. Saimmai, "Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of *Ochrobactrum anthropi* 2/3", *World J MicrobiolBiotechnol* 30: (2014) 865–877.
76. Ferhat Samira, Sami Mnif, AbdelmalekBadis, KamelEddouaouda, RedhaAlouaouic, Ahmed Boucherit, NajlaMhiri, NadjiMoulai-Mostefa, and Sami Sayadi. "Screening and Preliminary Characterization of Biosurfactants Produced by *Ochrobactrum* Sp. 1c and *Brevibacterium* Sp. 7g Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soils." *International Biodeterioration&Biodegradation* ,65: (2011)1182-1188.
77. S. D. Wadekar, S. B. Kale, A. M. Lali, D. N. Bhowmick,1 and A. P. Pratap, "Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source", *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 42: (2012) 249–266.
78. ZHU Y, GAN J-j, ZHANG G-l, YAO B, ZHU W-j, and MENG Q. "Reuse of Waste Frying Oil for Production of Rhamnolipids Using *Pseudomonas Aeruginosa* Zju.U1m." *Journal of Zhejiang University SCIENCE A* 8, no. 7: (2007)1514-1520.
79. C. J. B. de Lima & E. J. Ribeiro& E. F. C. Sérvulo& M. M. Resende& V. L. Cardoso, "Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* Grown in Residual Soybean Oil", *ApplBiochemBiotechnol*, 152: (2009) 156–168.
80. C. A. B. de Gusmão, R. D. Rufino, L. A. Sarubbo, "Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant", *World J MicrobiolBiotechnol*, 26: (2010)1683–1692.
81. Ferradji F., « etude des voies métaboliques de la biodégradation des hydrocarbures en vue d'une application d'un procédé de biodépollution des eaux de mer ». Thèse de doctorat en chimie industrielle. Blida .Université SAAD DAHLAB-BLIDA, (2014).
82. Mohamed A. Bahri a,*, Maryse Hoebeke b, Angeliki Grammenos b , Lisiane Delanaye b, Nicolas Vandewalle c , and Alain Seret, "Investigation of SDS, DTAB and CTAB

- micelle microviscosities by Electron Spin Resonance”, *Colloids Surf A* ,290: (2006) 206-212.
83. A. S. Luna, A. C. A. da Costa, M. M. M. Gonçalves, K. Y. M. de Almeida, “The Effects of Surfactants on the Estimation of Bacterial Density in Petroleum Samples”, *ApplBiochemBiotechnol*, 147: (2008)77–84.
84. Gudina EJ, Rocha V, Teixeira JA, Rodrigues LR. “Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20”. *LettAppl Microbiol*50: (2010) 419–424.
85. Saimmai A., S Udomsilp, and S Maneerat. “Production and Characterization of Biosurfactant from Marine Bacterium in *Quilinuslimosus* Kb3 Grown on Low-Cost Raw Materials”. *Annals of Microbiology* ,63: (2013)1327–1339.
86. H. Ghojavand, F. Vahabzadeh, E. Roayaei, A. K. Shahraki, “Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696)”, *Journal of Colloid and Interface Science* 324, (2008), 172–176.
87. Saikia R.R., S Deka, M Deka, and I M. Banat. “Isolation of Biosurfactant-Producing *Pseudomonas Aeruginosars*29 from Oil-Contaminated Soil and Evaluation of Different Nitrogen Sources in Biosurfactant Production”. *Annals of Microbiology* ,62: (2012)753–763.
88. Bordoloi, N.K., Konwar, B.K., “Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons”, *Hazard Mater Journal*, V.170, (2009), 495–505.
89. O. Pornsunthorntawe, et al., “Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil”. *Bioresource Technology*, **99**(6) p : (2008) 1589-1595.
90. Mulligan C.N., Gibbs B.F., “Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*”, *Appl. Environ. Microbiol Journal*, V.55, (1989), 3016-3019.
91. Haddad N. I. A., Ji Wang and Bozhong Mu, “Identification of a Biosurfactant Producing Strain: *Bacillus subtilis*HOB2”. *Protein & Peptide Letters*, 16: (2009), 7- 13.

92. F. A. Bezza, E. M. N. “Chirwa, Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2”, *Biochemical Engineering Journal* 101, (2015) ,168–178.
93. A. Knoblich, M. Matsumoto, R. Ishiguro, K. Murata, Y. Fujiyoshi, Y. Ishigami, M. Osman, “Electron cryo-microscopic studies on micellar shape and size of surfactin: an anionic lipopeptide”, *Colloid Surf. B* 5 ,(1995), 43–48.
94. S.Y. Jung, et al. “The glucose-dependent transactivation activity of ABF1 on the expression of the TDH3 gene in yeast”. *Curr Genet* 27(4): (1995) 312-7.
95. Khopade A., Ren B., Liu X.Y., Mahadik K., Zhang L., Kokare C., “Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3”, *Colloid and Interface Science Journal*, V.367, (2012), 311–318.
96. Rufino, R., Luna J., Campos-Takaki, G., Ferreira, S., Sarubbo, L., “Application of the Biosurfactant produced by *Candida lipolytica* in the Remediation of Heavy Metals”, *journal Chemical engineering transactions*, V. 27, (2012), 61-66.
97. Bechard J., Eastwell K.C., Sholberg P.L., Mazza G. and Skura B., “Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis*”, *Agric. Food Chem Journal*, V.46, (1998), 5355 - 5361.
98. Ferhat S., « Production de biosurfactants par des souches de *Brevibacterium* et *ochrobacterum* isolées du sol de Hassi-Messaoud contaminées par le pétrole brut ». Thèse de doctorat en chimie industrielle. Blida .Université SAAD DAHLAB-BLIDA, (2012).
99. http://www.unice.fr/cdiec/animations/spectroscopie/infra_rouge/base_ir_frequences.swf.