

**UNIVERSITE DE BLIDA 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département d'Agro- alimentaire**

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et transformation des aliments

### **CRIBLAGE DES SOUCHES BACTERIENNES PRODUCTRICES DE BIOSURFACTANTS ISOLEES LOCALEMENT, OPTIMISATION DE LA PRODUCTION ET CARACTERISATION DE BIOSURFACTANTS EN VUE D'UNE APPLICATION EN AGROALIMENTAIRE**

Par

**Kamila MOKDAD**

Devant le jury composé de :

L. BOUTEKRABT	Professeur	Université Blida 1	Président
A. BADIS	Professeur	Université Blida 1	Promoteur
A. DOUMANDJI	M.C. (A)	Université Blida 1	Examinatrice
M. CHIBANE	Professeur	U.M.O. Bouira	Examineur

Blida, 04 Mars 2015



## RESUME

Dans ce travail nous avons entrepris une étude sur la production, la caractérisation et l'application en agroalimentaire d'un biosurfactant issu d'une souche thermophile isolée à partir d'un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers (région de Hassi Messaoud, sud d'Algérie).

Les résultats obtenus pour la souche performante révèlent que : **(a)** la souche thermophile 1J a montré une capacité productrice importante de biosurfactants traduite par une réduction remarquable de la tension de surface (32 mN/m), **(b)** la margine (0,5 %, v/v) et l'huile d'olive (1%, v/v) présentent les meilleures sources de carbone, **(c)** le biosurfactant de la souche 1J détient des propriétés tensioactives intéressantes ; il est très stable thermiquement dans une large gamme de température [4 à 70 °C], il présente une très bonne résistance dans les milieux acide et basique [pH = 2 à 12], également, il est efficace dans les milieux très salés (jusqu'à 250 mg/l), **(d)** l'étude phénotypique (API 50 CH) a permis d'affilier la souche 1J à l'espèce *Bacillus licheniformis* et **(e)** un rôle émulsifiant, épaississant et conservateur du biosurfactant de la souche 1J est assuré par des essais de préparation d'une sauce mayonnaise qui a prouvé des caractéristiques (physico-chimiques, organoleptiques, microbiologiques et rhéologiques) similaires à celles de la mayonnaise commerciale –SIDNA-.

**Mots clés:** bactérie thermophile, biosurfactant, margine, émulsifiant, mayonnaise

## ABSTRACT

In this work we have undertaken a study of the production, characterization and application in food manufactory of a biosurfactant produced by a thermophilic strain isolated from a sandy soil contaminated with petroleum hydrocarbons (region of Hassi Messaoud, south of Algeria).

The results show that: **(a)** the thermophilic strain 1J showed significant productive capacity of biosurfactant resulted in the low value of the surface tension (32 mN / m), **(b)** effluent from the extraction of olive oil (0.5% v/v) and olive oil (1% v/v) are the best carbon sources **(c)** the biosurfactant from 1J has interesting surfactant properties and is very thermally stable in a wide temperature range [4-70 °C], it has very good resistance in acidic and basic media [pH 2-12 ], also, it is effective in very salty environments (up to 250 mg/l), **(c)** the phenotypic study (API 50 CH) showed that strain 1J is affiliated to the genus *Bacillus licheniformis*. **(d)** Finally, a role of emulsifier thickener and preservative of the biosurfactant from strain 1J is assured by testing for preparing a mayonnaise sauce that has proven characteristics (physicochemical, organoleptic, microbiological and rheological) similar to those of commercial mayonnaise –SIDNA- .

**Keywords:** thermophilic bacteria, biosurfactant, effluent from the extraction of olive oil, emulsifier, mayonnaise.

## ملخص

في هذا العمل قمنا بإجراء دراسة لإنتاج، توصيف والتطبيق في الصناعات الغذائية لمفاعل سطحي ناتج من سلالة محبة للحرارة المرتفعة المعزولة من تربة رملية ملوثة بالهيدروكربونات البترولية (منطقة حاسي مسعود، جنوب الجزائر). وتبين النتائج المحصل عليها أن: (أ) السلالة المحبة للحرارة المرتفعة 1J أظهرت إنتاجا قويا للمفاعل السطحي معبر عنه بدرجة كبيرة من التوتر السطحي (32 mN/m). (ب) تقبل المياه الناتجة من استخراج زيت الزيتون (0.5%) و زيت الزيتون (1%) أفضل مصادر ل ل كربون لعملية الإنتاج . (ج) أظهر المفاعل السطحي المنتج خصائص هامة مثل الاستقرار الحراري في نطاق واسع من درجة الحرارة [ 4-70م°]، لديه مقاومة جيدة في الوسط الحمضي والقاعدي [الاس الهيدروجيني= 2-12]، كما أظهر فعالية في الأوساط جد مالحة . ( د ) بينت نتائج التحديد المظهري (API 50 CH) أن السلالة 1J تنتمي إلى جنس *Bacillus licheniformis* (د) وفي الأخير تم إبراز الدور للمستحلب مثن وحافظ للمفاعل السطحي للسلالة 1J عن طريق اختبار لتحضير صلصة المايونيز التي اثبتت خصائص فيزيو- كيميائية حسية ,ميكروبيولوجية و ريولوجية مماثلة لصلصة المايونيز التجارية -سيدنا-.

**الكلمات المفتاحية:** سلالة بكتيرية محبة للحرارة المرتفعة- المفاعل السطحي - المياه الناتجة من استخراج زيت الزيتون المستحلب - المايونيز

## REMERCIEMENTS

*Avant tout, je remercie **Dieu** tout puissant de m'avoir donné la force, la patience et le courage de mener à bien ce modeste travail.*

Je tiens à remercier vivement mon promoteur monsieur BADIS Abdelmalek, professeur à l'Université de Blida qui était à l'origine du choix de ce thème, pour avoir dirigé ce travail, Je lui dois beaucoup de respects, il a su se rendre disponible pour répondre à la moindre de mes incertitudes.

J'exprime ma plus profonde reconnaissance et gratitude à ma co-promotrice mademoiselle MESBAIAH Fatma el zahra, attachée de recherche au Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et l'Aquaculture, Boussmail – TIPAZA-, qui m'a aidé et orienté et pour tous les conseils précieux qu'elle m'a prodigué. Je la remercie de sa disponibilité et de sa gentillesse pour m'éclairer de ses compétences.

Mes remerciements et ma gratitude vont à Madame BOUTKRABT Lynda pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury. A madame DOUMANDJI Amel pour avoir accepté de faire part de jury pour examiner ce travail.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur CHIBANE Mohamed, professeur à l'Université d'AKLI Mohand Oulhadj de Bouira, qui a bien voulu juger ce travail en étant qu'examineur.

Je remercie le directeur et les deux personnels de la Société Industrielle de Dénaturation Nord Africaine Farida et surtout Chahinez pour leurs aides précieuses.

Mes vifs remerciements vont également à mes chers parents, mes grand parents, mes oncles et mes tantes maternelles ainsi que mes sœurs, mes beaux frères Samir et Zohir et en particulier mon fiancé Amine pour leur aide et le soutien qu'ils m'ont apporté, pour leur encouragement, patience et gentillesse, sans oublier mes deux nièces Dounia et Rahil, et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent ici ma sincère reconnaissance.

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENT

RESUME

LISTE DES ABREVIATION

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>	4
1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....		16
1.1. Biosurfactants .....		16
1.2. Classification des biosurfactants.....		16
1.3. Production des biosurfactants.....		18
1.4. Microorganismes producteurs de biosurfactants .....		20
1.5. Paramètres influençant la production de biosurfactants .....		23
1.5.1. Influence de la source de carbone.....		23
1.5.2. Influence de la source d'azote .....		24
1.5.3. Influence des éléments minéraux et des ions du milieu de culture.....		24
1.5.4. Effet du pH.....		25
1.5.5. Effet de la Salinité.....		25
1.5.6. Effet de la température .....		25
1.5.7. Vitesse d'agitation et de l'aération .....		26
1.6. Propriétés des biosurfactants .....		26
1.6. 1.Caractéristiques techniques excellentes.....		26
1.6. 2.Stabilité thermique et chimique.....		26
1.6. 3.Caractéristiques écologiques.....		26
1.7. Domaines d'application des biosurfactants.....		27
1.8. Valorisation des déchets agro-industriels pour la production des biosurfactants .....		30
2. MATERIEL ET METHODES .....		34
2.1. Origine et isolement des souches bactériennes utilisées.....		34
2. 2. Criblage des souches productrices des biosurfactants.....		34
2.3. Optimisation de la production des biosurfactants .....		35

2.3.1. Choix de la meilleure source de carbone.....	35
2.3.2. Effet de la concentration de la source de carbone.....	36
2.3.3. Choix de la meilleure source d'azote.....	36
2.3.4. Effet du pH, salinité et les oligoéléments.....	36
2.4. Extraction des biosurfactants.....	37
2.5. Caractérisation des biosurfactants.....	37
2.5.1. Caractérisation structurale des biosurfactants.....	37
2.5.2. Concentration micellaire critique.....	37
2.5.3. Pouvoir émulsifiant.....	38
2.5.4. Pouvoir antimicrobien.....	38
2.6. Etude de la stabilité des biosurfactants.....	38
2.6.1. Stabilité chimique.....	39
2.6.2. Stabilité thermique.....	39
2.7. Identification de la souche performante productrice de biosurfactants.....	39
2.8. Essai d'application du biosurfactant dans le domaine agroalimentaire.....	40
2.8.1. La technologie de la préparation des échantillons de la sauce mayonnaise.....	41
2.8.2. Propriétés organoleptiques et profil sensoriel des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés.....	45
2.8.3. Détermination des principaux indicateurs de la qualité des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés.....	45
2.8.3.1. Indicateurs physico- chimiques.....	45
2.8.3.2. Indicateurs microbiologiques.....	45
2.8.4. Caractérisation rhéologique des émulsions étudiées.....	46
3. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	47
3.1. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants.....	47
3.2. Optimisation de la production des biosurfactants.....	48
3.2.1. Effet de la source de carbone.....	49
3.2.2. Effet de la concentration de la source de carbone.....	51
3.2.3. Effet de la source d'azote.....	52
3.2.4. Effet des oligoéléments.....	55
3.2.5. Effet du pH et de la salinité.....	56
3.3. Caractérisation des biosurfactants produits par la souche 1J.....	58
3.3.1. Aspect et consistance des biosurfactants de la souche 1J.....	58



3.3.2. Analyse FTIR (Fourier Transformed InfraRed Spectroscopy).....	59
3.3.3. Détermination de la concentration micellaire critique.....	61
3.3.4. Pouvoir émulsifiant .....	62
3.3.5. Pouvoir antimicrobien .....	64
3.3.6. Etude de la stabilité des biosurfactants .....	65
3.3.6. 1. Stabilité des biosurfactants vis-à-vis la température .....	65
3.3.6. 2. Stabilité des biosurfactants vis-à-vis la salinité.....	66
3.3.6.3. Stabilité des biosurfactants vis-à-vis le pH .....	67
3.4. Identification de la souche bactérienne 1J .....	68
3.5. Essai d'application du biosurfactant dans le domaines agroalimentaire .....	70
3.5.1. L'évaluation organoleptique des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés .....	70
3.5.2. Les principaux indicateurs de la qualité des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés.....	72
3.5.2.1. Indicateurs physico- chimiques.....	72
3.5.2.2. Indicateurs microbiologiques.....	75
3.5.3. caractérisation rhéologique des émulsions étudiées.....	77
CONCLUSION GENERALE .....	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	82
APPENDICES.....	94



## LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

TS :	Tension de surface
SC :	Source de carbone
°C :	Degré Celsius
E <sub>24</sub> :	Indice d'émulsification
E. coli :	Escherichia coli
HCl :	chlorure d'hydrogène
UFC/ml	unités formant colonies par millilitre
NaOH	<u>Hydroxyde de sodium</u>
CMC	concentration micellaire critique
SDS	Sulfate Dodecyl Sodium
mN/m	Millinewton / mètre
pH	potentiel d'hydrogène
DO	densité optique
LB	Luria-Bertani
PVC	polychlorure de vinyle
C/N	Rapport Carbone sur l'azote

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 :	Schéma récapitulatif du test d'émulsion ( $E_{24}$ %)	20
Figure 1.2 :	Biosurfactants représentatifs produits par des microorganismes qui utilisent des substrats solubles et / ou insolubles dans l'eau	22
Figure 3.3 :	criblage des souches productrices de biosurfactants	47
Figure 3.4:	Influence de la source de carbone sur la production des biosurfactants par la souche 1J	49
Figure 3.5 :	Effet de la concentration de l'huile d'olive sur la production des biosurfactants par la souche 1J	51
Figure 3.6 :	Effet de la concentration de la margine sur la production des biosurfactants par la souche 1J	51
Figure 3.7 :	Effet de la source d'azote sur la production des biosurfactants par la souche 1J (SC= huile d'olive)	53
Figure 3.8 :	Effet de la source d'azote sur la production des biosurfactants par la souche 1J (SC= margine)	53
Figure 3.9 :	Effet du pH du milieu sur la production des biosurfactants par la souche 1J (SC= huile d'olive)	56
Figure 3.10:	Effet du pH du milieu sur la production des biosurfactants par la souche 1J (SC= margine)	56
Figure 3.11:	Effet de la salinité sur la production des biosurfactants par	57

	la souche 1J (SC= huile d'olive)	
Figure 3.12 :	Effet de la salinité sur la production des biosurfactants par la souche 1J (SC= margine)	58
Figure 3.13 :	Biosurfactants récupérés après extraction (A : SC=huile d'olive, B : SC=margine)	59
Figure 3.14 :	Spectres de FTIR des biosurfactants de la souche 1J	60
Figure 3.15 :	la CMC des biosurfactants produits par la souche 1J	61
Figure 3.16 :	Le pouvoir émulsifiant des deux biosurfactants	63
Figure 3.17:	Effet inhibiteur du biosurfactant produit à partir de l'huile d'olive sur les microorganismes	64
Figure 3.18:	Effet inhibiteur du biosurfactant produit à partir de la margine sur les microorganismes	64
Figure 3.19:	Effet de la température sur la stabilité des biosurfactants produits par la souche 1J	65
Figure 3.20:	Effet de la salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par la souche 1J	66
Figure 3.21 :	Effet du pH sur la stabilité des biosurfactants produits par la souche 1J	67
Figure 3.22 :	Aspect microscopique de la souche 1J	68
Figure 3.23 :	la variation du pH des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés	73

Figure 3.24 :	la variation de l'acidité titrable des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés	74
Figure 3.25 :	Evolution de la viscosité apparente des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés en fonction de la vitesse de cisaillement à T=22°C	77
Tableau 1.1 :	Principaux types de biosurfactants produits par différents microorganismes	21
Tableau 1. 2 :	Différents domaines d'application des biosurfactants	27
Tableau 2.3:	Fractions massiques des ingrédients dans les échantillons de la mayonnaise étudiés pour 250g	44
Tableau 3.4 :	Croissance bactérienne sur les différentes sources de carbone	49
Tableau 3.5 :	Croissance bactérienne sur les différentes sources d'azote (SC : huile d'olive)	52
Tableau 3. 6 :	Croissance bactérienne sur les différentes sources d'azote (SC : margine)	52
Tableau 3.7 :	Croissance bactérienne sans l'ajout d' oligoéléments	55
Tableau 3.8 :	Pouvoir émulsifiant des biosurfactants produits par la souche 1J	62
Tableau 3.9 :	Pouvoir antimicrobien des biosurfactants produits par la souche 1J	65
Tableau 3.10 :	Caractères microscopiques de la souche 1J	68

Tableau 3.11 :	Résultats des tests biochimiques après lecture de l'API CH 50	69
Tableau 3.12:	Evaluation organoleptique des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés	70
Tableau 3.13 :	Les principaux indicateurs physico-chimiques de la qualité des échantillons de la mayonnaise étudiés	72
Tableau 3. 14 :	Analyses microbiologiques des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés	76

## INTRODUCTION GENERALE

Les tensioactifs chimiques ont été utilisés dans l'industrie alimentaire pendant de nombreux siècles en tant qu'émulsifiants, moussants, mouillants ou encore dispersants [1]. En raison de leur toxicité et faible biodégradabilité, les scientifiques se sont intéressés aux surfactants produits par des organismes vivants appelés : biosurfactants.

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par certains microorganismes. Ceux-ci possèdent de nombreuses propriétés tels que la haute biodégradabilité, la non toxicité, la meilleure fonctionnalité dans des conditions extrêmes (pH acides, salinités et températures élevées, etc.) [2], Et enfin ils peuvent être produits sur des substrats renouvelables [3,4]), ce qui permet leur utilisation dans différents domaines d'application tels que l'environnement, l'industrie pétrolière, l'agronomie [5]. Ils devraient rapidement trouver leur place dans de nouveaux secteurs d'applications tels que les industries agroalimentaires, pharmaceutiques, cosmétologie ou encore le domaine médical [6] aussi bien devenir des matériaux multifonctionnels du 21<sup>ème</sup> siècle [7].

Généralement, les bactéries en dégradant les hydrocarbures, elles produisent des biosurfactants, à cet effet une collection des souches bactériennes, isolées à partir d'un sol algérien contaminé par le pétrole brut ayant montré des aptitudes à dégrader le pétrole et certains composés aromatiques, a été mise sur place afin d'investir sur le plan de la recherche appliquée dans le domaine de la biotechnologie environnementale et industrielle. Ces souches ont été isolées dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe de biomolécules au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules de l'université de Blida 1.

L'objectif de ce présent travail est d'étudier la production et la caractérisation de biosurfactants, issus d'une souche thermophile isolée localement, en vue d'une application en agroalimentaire. Les principaux facteurs affectant la production et la caractérisation de biosurfactants ont été étudiés à savoir : la nature de la souche,



la nature et la concentration de la source de carbone et la source d'azote, la stabilité physicochimique des biosurfactants vis-à-vis la température, le pH du milieu et la salinité. Ainsi qu'un essai d'application des biosurfactants en agroalimentaire comme un agent bio-émulsifiant dans la préparation de la mayonnaise a été envisagé.

Ce manuscrit s'articule autour de trois parties :

- La première partie est une recherche bibliographique permettant de consolider les connaissances de bases et le contexte de l'étude. A cet effet, de nombreux points de la thématique des biosurfactants ont été abordés.
- Seront présentés dans la deuxième partie du mémoire les principaux matériels et méthodes utilisés pour concrétiser l'expérimentation.
- La troisième partie présentera les résultats obtenus ainsi que les interprétations et discussions par rapport aux travaux réalisés dans le domaine.

Enfin, en guise de conclusion générale nous synthétisons les résultats obtenus et dégagerons les perspectives de la poursuite de ce travail de recherche.

# CHAPITRE 1

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1. Biosurfactants

Les biosurfactants (ou surfactants biologiques) sont définis comme étant des molécules amphiphiles actives aux surfaces et produites par des cellules vivantes : des levures, bactéries et champignons. Leur structure dépend du type de microorganisme, de la nature du substrat et des conditions de la production [8,9]. Ils sont capables de s'accumuler à l'interface entre deux phases non miscibles comme l'huile et l'eau, tout en réduisant la tension de surface, et par conséquent, ils permettent à celles-ci de se mélanger et de s'interagir plus facilement.

### 1.2. Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, poids moléculaire, propriétés physico-chimiques, mode d'action et origine microbienne. Généralement, le groupement hydrophile (soluble dans l'eau) est constitué par une variété de groupements fonctionnels d'acides aminés, protéines, peptides cycliques, acides carboxyliques, polysaccharides et (mono ou di) alcool gras ; et le groupement hydrophobe non polaire (soluble dans l'huile) est une chaîne hydrocarbonée aliphatique saturée ou insaturée ( $C_8$  à  $C_{22}$  : linéaire ou ramifié), un acide gras à longue chaîne, hydroxy-acide gras ou  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy-acide gras [10].

➤ Selon le poids moléculaire [11]

- Faible poids moléculaire

Sont très mobiles à l'interface et ils sont efficaces pour diminuer les tensions de surface et interfaciale. En conséquence, ils recouvrent rapidement l'interface huile-eau fraîchement créé pendant l'émulsification. Dans cette catégorie, nous avons principalement les monoglycérides, les

lécithines et les lysolécithines, les glycolipides et les saponines, les alcools gras et les acides gras.

- Haut poids moléculaire ou polymères

Connus comme bioémulsifiants qui sont plus efficaces à stabiliser le complexe huile-eau émulsion sans une réduction importante de la tension de surface. Ils contiennent les groupes de protéines ou des lipopolysaccharides et des polysaccharides (hydrocolloïdes). La molécule de protéine peut s'interpénétrer dans la phase lipidique à des degrés divers. La liaison spécifique est essentiellement électrostatique : Les groupes de tête des tensioactifs se lient à des groupes de charge opposés sur la protéine. La saturation de la liaison de tensioactifs anioniques est indépendante du pH et semble être contrôlée par les interactions hydrophobes de coopération.

- Selon la nature biochimique

Universellement, un biosurfactant typique est soit anionique ou neutre, il se compose de tête hydrophile (principalement des acides aminés, peptide ou phosphate cyclique, hydrate de carbone comme mono / disaccharides, polysaccharides) et une queue hydrophobe (essentiellement des acides gras insaturés, saturés, linéaires, ramifiés ou hydroxylés) [12, 13, 14 15]. Pour cela on distingue cinq grandes classes de biosurfactants : Les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres [16].

- Les glycolipides : sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acide hydroxyaliphatiques [16]. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides.
- Les lipopeptides : sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptide.
- Les phospholipides : sont formés de groupements alcool, phosphate et de chaîne lipidique. Healy et Bognolo [16,17] indiquent qu'ils sont présents dans tous les microorganismes.

- Les lipopolysaccharides: ou polymériques sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras. Ce sont les biosurfactants possédant la masse molaire la plus élevée.
- Les acides gras et lipides neutres: sont d'origine végétale, animale ou microbienne.

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biosurfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides [18, 13, 10].

### 1.3. Production des biosurfactants

Les microorganismes producteurs de biosurfactants se développent de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures [17, 19]. La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des conditions de croissance, de la source de carbone utilisée et du type de microorganisme.

Les diverses applications de biosurfactants nécessitent une méthode facile, rapide et fiable pour découvrir les bactéries productrices de biosurfactants. Les techniques utilisées pour évaluer la production du biosurfactant sont : le test de déplacement d'huile, l'activité hémolytique et la tension de surface et l'indice d'émulsification  $E_{24}(\%)$ .

#### -Activité hémolytique

L'hémolyse sur gélose au sang a été largement utilisée pour le criblage de bactéries productrices des biosurfactants. Cette technique a été découverte par Bernheimer et *al.* [20] elle a été déjà utilisée pour quantifier la surfactine [21] et les rhamnolipides [22]. Actuellement, de nombreux chercheurs utilisent cette technique pour la sélection de nouveaux isolats producteurs de biosurfactants [23].

### -Tension de surface

Le phénomène de tension de surface peut être expliqué en termes d'énergie, c'est une mesure de l'énergie libre de surface par unité de surface nécessaire pour apporter une molécule au sein d'une phase à la surface. Augmenter la surface d'un liquide coûte de l'énergie, pour minimiser cette dernière, la plus part des liquides prennent la forme de la plus petite des surfaces. Car c'est la forme sphérique qui présente la surface la plus petite par rapport aux autres formes de volumes, en effet, la tension de surface est donnée par la relation  $\gamma = \frac{W}{\Delta A}$  ; (W : travail ou l'énergie qu'il faut fournir (à température et pression constantes) pour accroître la surface du liquide d'une quantité.  $\Delta A$  : La tension de surface s'exprime en J/m<sup>2</sup> ou mN/m).

Le criblage des microorganismes producteurs des biosurfactants repose sur la mesure de tension superficielle du milieu de croissance, un bon biosurfactant entraîne une réduction minimale de la tension superficielle.

### -Test de déplacement de pétrole

Cette technique est définie comme un test qualitatif de criblage des souches productrices des biosurfactants. Cette méthode est basée sur la caractéristique du biosurfactant à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau. La pression de surface du biosurfactant est capable de déplacer l'huile. Les solutions contenant plusieurs biosurfactants sont incapables de former des gouttes stables et par la suite un étalement total est observé sur la surface huileuse, tandis que, les solutions dépourvues de biosurfactants vont conserver la forme déposée sur la surface huileuse. Cette méthode est facile à réaliser, simple, sensible et reproductible. Cependant, cette technique n'est pas corrélée à la réduction de la tension de surface pour confirmer sa fiabilité [24].

### -Activité émulsifiante

L'émulsification est pratiquement estimée par l'indice d'émulsification  $E_{24}$ , la méthode est résumée dans la figure 1.1.

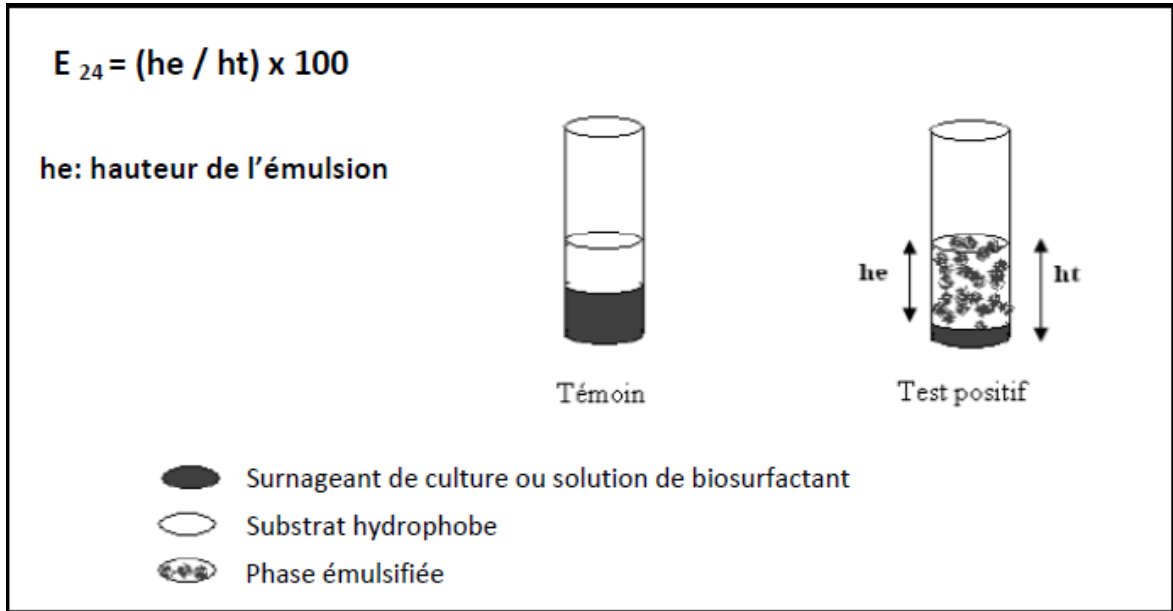


Figure 1.1 : Schéma récapitulatif du test d'émulsion ( $E_{24}$ %)

#### 1.4. Microorganismes producteurs de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie. Ces organismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries [8,9]. Les Rhamnolipides de *Pseudomonas aeruginosa*, la surfactine à partir de *Bacillus subtilis*, l'émulsan d'*Acinetobacter calcoaceticus* et sophorolipides de *Candida bombicola* sont quelques exemples d'agents tensioactifs microbiens (Figure 1.2). Quelques biosurfactants issus de différents microorganismes sont rassemblés dans le tableau 1.1.

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes comme les hydrocarbures. Elles sont donc isolées de leur milieu naturel pour être ensuite cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum.

Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple, dans le cas du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, le mélange obtenu contient quatre rhamnolipides et comme aussi rapporté par Van dyke et Abalos [25, 26], ils indiquent que sept homologues de rhamnolipides ont été identifiés dans des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Tableau 1.1 : Principaux types de biosurfactants produits par différents microorganismes [8,27].

Microorganismes	Type des biosurfactants	Références
<i>Artrobacter sp. RAG-1</i>	Hétéropolysaccharides	[28]
<i>Artrobacter sp. MIS38</i>	Peptidolipides	[29]
<i>Artrobacter sp.</i>	Lipides de tréhalose, Lipides de saccharose	[30]
<i>Bacillus licheniformis</i>	Peptidolipides	[31]
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactine	[32]
<i>Bacillus sp. AB-2</i>	Rhamnolipides	[33]
<i>Bacillus velezensis</i>	Peptidolipides	[34]
<i>Candida sphaerica</i>	Glycolipides	[35]
<i>Aspergillus ustus</i>	Glycolipoprotéines	[36]
<i>Candida bombicola</i>	Sophorolipides	[37]
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Glycolipides	[38]
<i>Ochrobactrum sp. 1C</i>	Glycolipides	[39]
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Glycopeptides	[40]
<i>Halamonas sp. ANT-3b</i>	Glycolipides	[41]

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPCL	Rhamnolipides	[42]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SH10-3B	Viscosine	[43]
<i>Rhodococcus sp. ST5</i>	Glycolipides	[44]
<i>Rhodococcus sp. 33</i>	Polysaccharides	[45]
<i>Rhodococcus sp. TA6</i>	Lipides, Glycolipides	[46]
<i>Halomonas eurihalina</i>	Exopolysaccharides	[47]
<i>Staphylococcus sp. 1<sup>E</sup></i>	Lipopeptides	[48]
<i>Brevibacterium aureum</i>	Lipopeptides	[49]
<i>Brevibacterium sp. 7G</i>	Glycolipides	[39]
<i>Nocaridiopsis lucutensis</i>	Glycolipides	[36]

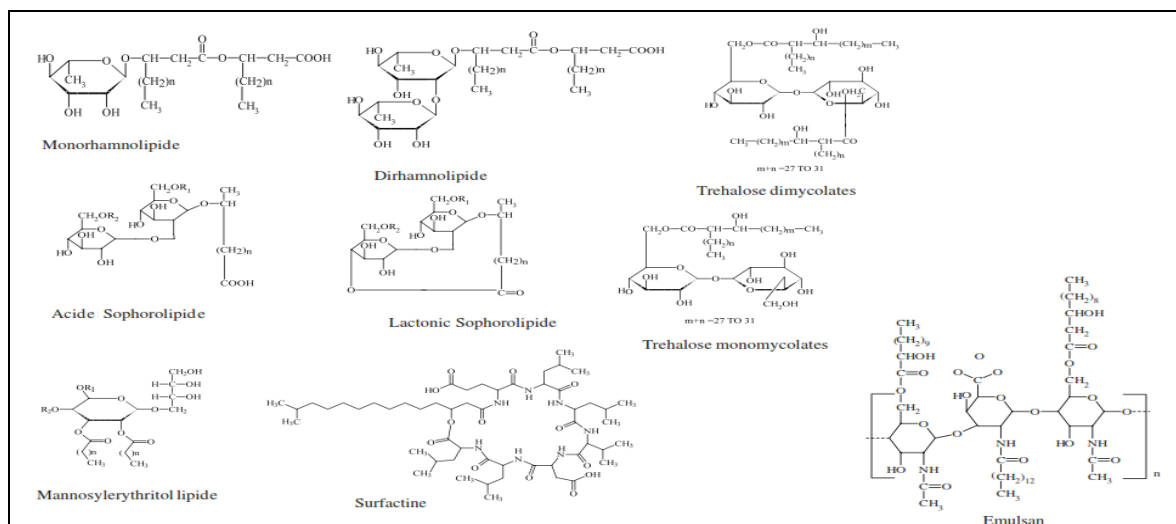


Figure 1. 2 : Biosurfactants représentatifs produits par des microorganismes qui utilisent des substrats solubles et / ou insolubles dans l'eau [12,13, 14, 15]



## 1.5. Paramètres influençant la production des biosurfactants

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

### 1.5.1. Influence de la source de carbone

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

La revue bibliographique a montré que des sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour produire des rhamnolipides : cependant les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles [3, 50] comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive. En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes. Par exemple, une souche de *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ a produit des biosurfactants sur un substrat constitué de phénanthrène ou de naphthalène [51], la production étant plus faible pour le phénanthrène que pour le naphthalène. Mata-Sandoval *et al.* [52] rapportent que les huiles végétales sont parmi les substrats qui fournissent des taux de production de rhamnolipides les plus élevés lorsqu'ils sont utilisés comme seule source de carbone et avec certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Le changement du substrat carboné altère la structure des molécules produites. En effet, Fiechter [53] indique que le remplacement du substrat initial par du sucrose entraîne la formation de glycolipides à base de sucrose au lieu de glycolipides à base de tréhalose. Il est également possible d'ajouter d'autres sources de carbone afin d'augmenter les rendements de la production.

Desai et Banat [13] indiquent qu'un ajout d'hexadécane dans le milieu constitué de D-glucose pendant la phase de croissance stationnaire provoque une augmentation du rendement.

### 1.5.2. Influence de la source d'azote

De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitée [13, 54, 55].

L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices : par exemple, la production de biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium plutôt qu'en présence de nitrates. Par contre, Robert et al. [56] indiquent que la production de biosurfactants à partir de *Pseudomonas* 44T1 cultivée sur l'huile d'olive donnait de meilleurs rendements avec du nitrate de sodium. Hommel et Ratledge [57] indiquent que la production des sophorolipides par *Candida apicola* augmente avec la concentration initiale en sulfate d'ammonium et que la proportion des deux isomères produits varie aussi avec la concentration initiale en ammonium. Des résultats semblables ont été obtenus par Lang et al. [55] à partir d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour avoir des rendements de production optimums, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N optimum, et surtout que l'azote soit un facteur limitant pour favoriser la production de biosurfactants. Par exemple, Guerra-Santos et al. [58] ont obtenu une production maximale pour un rapport C/N variant de 16/1 à 18/1, alors qu'ils n'ont pas observé de production pour des rapports inférieurs à 11/1, où l'azote n'est pas limité.

### 1.5.3. Influence des éléments minéraux et des ions du milieu de culture

La limitation de la concentration des éléments minéraux et ions peut avoir aussi un effet sur la production des biosurfactants au niveau quantitatif et qualitatif. Ainsi on peut observer une augmentation de la production en rhamnolipides en limitant l'apport en fer, en phosphate [59, 30, 13] et en magnésium [58].

On note aussi une meilleure production de tréhalolipides si on limite l'apport en ions métalliques, en phosphate et en chlorure de sulfate.

L'addition du fer et du manganèse dans le milieu de culture stimule la production de biosurfactants chez *Bacillus subtilis* [60,13] et *Rhodococcus* sp. [44]. Il semblerait qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de la production [58].

#### 1.5.4. Effet du pH

Desai et Banat [13] indiquent que pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactants chute rapidement. D'autres souches comme *Nocardia corynbacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0. Mata-Sandoval *et al.* [52] ont montré que suivant le pH, les rhamnolipides produits avaient une structure différente et s'organisaient différemment. Par exemple, à un pH de 5,5, la structure était de forme lamellaire alors qu'à des pH supérieurs, des vésicules étaient formées. Le pH du milieu joue un rôle important dans la production de sophorolipides [61,62].

#### 1.5.5. Effet de la Salinité

La concentration en sels influence la production des biosurfactants, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectent pas certains biosurfactants, bien qu'il soit observé une légère diminution sur les concentrations micellaires critiques [9, 44].

#### 1.5.6. Effet de la température

Les biosurfactants produits par des souches thermophiles résistent à des températures élevées ; les propriétés physico-chimiques des biosurfactants, produits par *Bacillus* sp. à des températures supérieures à 40 °C, si bien que la tension de surface, la tension interfaciale et l'efficacité de l'émulsification restent stables après autoclavage à 120 °C pendant 15 min [1,44].

L'augmentation de la température provoque des altérations dans la composition des biosurfactants produits chez *Arthrobacter paraffineus* [45] et *Pseudomonas* sp DSM2874 [47].

### 1.5.7. Vitesse d'agitation et de l'aération

Chez les levures, il semble que la production des biosurfactants augmente avec l'augmentation de la vitesse d'agitation et de l'aération [44]. Les milieux de culture sont agités lors de la production. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures [13]. La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance.

### 1.6. Propriétés des biosurfactants

Les biosurfactants possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ils ont plusieurs avantages :

#### 1.6. 1. Caractéristiques techniques excellentes

- Diminution de la tension interfaciale ( $\approx 0,1$  dy/cm) ;
- Diminution de la tension de surface ( $\approx 27$  dy/cm) ;
- Emulsifiants (50- 100%) ;
- Pouvoir moussant (mousse stable) ;
- CMC (concentration micellaire critique) (20- 200 mg/l) ;
- Pouvoir antibiotique ou fongicide.

#### 1.6. 2. Stabilité thermique et chimique

Plus stables que les tensio- actifs chimiques : pH (2-10), salinité (5- 20%) et température (4-100 °C).

#### 1.6. 3. Caractéristiques écologiques

- Biodégradables et non toxiques ;
- Temps de stockage long ;
- Production à partir des déchets industriels (effluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon,) en diminuant leur effet polluant et conduisant à une réduction du coût de production ;

- Biocompatibilité et digestibilité : application dans les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et les additifs alimentaires fonctionnels.

### 1.7. Domaines d'application des biosurfactants

Compte tenu de leurs propriétés, les biosurfactants sont utilisés dans de nombreux domaines (tableau 1.2).

Tableau 1. 2 : Différents domaines d'application des biosurfactants [12]

Fonction	Champ d'application
Emulsifiant et dispersant	Cosmétique, peinture, produit alimentaire
Solubilisant et micro-émulsions	Pharmaceutique, articles de toilette
Agent mouillant et pénétrant	Pharmaceutique, industrie textile, peinture
Détergent	Nettoyants ménagers, produits de l'agriculture
Agent moussant	Cosmétique, articles de toilette
Agent épaississant	Peintures
Agent séquestrant des métaux et Aide à la croissance bactérienne	Minerais, traitement des huiles usagées pour boues des stations d'épuration, fermentation
Désémulsifiant	Traitement des déchets
Dispersant	Séparation des mélanges goudron /pétrole ou goudron/eau
Récupération de ressources	Récupération assistée de pétrole

Les biosurfactants montrent un potentiel d'application dans de nombreux secteurs de l'industrie alimentaire, car ils peuvent être utilisés dans les transformations des aliments, ainsi qu'intervenir comme ingrédients de la formulation des aliments et agents antiadhésifs comme citer ci-dessous.

### 1.7.1. Ingrédients de la formulation des aliments

En plus de leur rôle évident comme agents qui diminuent la tension superficielle et interfaciale, en favorisant la formation et la stabilisation des émulsions, des agents tensioactifs microbiens peuvent avoir plusieurs fonctions en d'autres produits alimentaires. Par exemple pour contrôler l'agglomération des globules gras, de stabiliser les systèmes gazeux, d'améliorer la texture et la durée de conservation des produits contenant de l'amidon, de modifier les propriétés rhéologiques de la pâte de blé et d'améliorer la consistance et la texture des produits à base de graisse [55]. Van Haesendonck *et al.* [63] suggèrent également l'utilisation de rhamnolipides pour améliorer les propriétés de la crème au beurre, les croissants et des produits de confiserie congelés. L-rhamnose a un potentiel considérable en tant que précurseur pour les arômes, il est déjà utilisé industriellement comme précurseur de composants aromatiques de haute qualité comme Furanéol (marque de Firmenich SA, Genève). L-rhamnose est obtenu par l'hydrolyse du rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa* [64].

Dans la boulangerie et les formulations de la crème glacée, les biosurfactants agissent pour le contrôle de cohérence, ce qui retarde le rancissement et la solubilisation des huiles aromatiques; ils sont également utilisés en tant que stabilisants de la graisse et agent anti-projection lors de la cuisson de l'huile et des graisses [65]. Une amélioration de la stabilité de la pâte, de la texture, du volume et la conservation des produits de boulangerie est obtenue par l'addition des rhamnolipides [66].

Un bio-émulsifiant isolé à partir d'une souche marine d'*Enterobacter cloacae* a été décrit comme un améliorant de la viscosité, c'est un agent d'intérêt dans l'industrie alimentaire, en particulier en raison de la bonne viscosité observée à un pH acide qui permet son utilisation dans des produits contenant l'acide citrique ou de l'acide ascorbique [67].

### 1.7.2. Agents antiadhésifs

Un biosurfactant produit par *Streptococcus thermophilus* a été utilisé pour le contrôle de l'encrassement des plaques d'échangeurs de chaleur dans les pasteurisateurs car il retarde la colonisation d'autres souches de *Streptococcus* thermophiles responsables de l'encrassement [68]. Dernièrement, le biosurfactant

produit par *Lactobacillus fermentum* a été signalé pour inhiber l'infection à *Staphylococcus aureus* et le respect pour les implants chirurgicaux [69].

L'utilisation de biosurfactants produits par les souches de lactobacilles est très prometteuse une fois que ces micro-organismes naturellement présents dans la flore humaine et ont également un effet probiotique [70]. Beaucoup plus de recherches sont nécessaires pour comprendre l'apport de ces biosurfactants dans la prévention de la colonisation des agents pathogènes, les aspects biochimiques de la biosynthèse et leur caractérisation structurale.

La Surfactine a diminué la quantité de la formation de biofilms par *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *E. coli* et *Proteus mirabilis* dans des plaques de PVC [71].

Selon IRIE *et al.* [71] l'utilisation d'agents tensioactifs biologiques en combinaison avec des antibiotiques pourrait représenter une nouvelle stratégie antimicrobienne une fois que les antibiotiques sont en général moins efficaces contre les biofilms.

### 1.7.3. Agents émulsifiants

Une émulsion est un système hétérogène, constituée d'au moins un liquide immiscible intimement dispersé dans un autre sous la forme de gouttelettes, dont le diamètre dépasse en général 0,1 µm. De tels systèmes possèdent une stabilité minimale, qui peut être accentuée par des additifs tels que des agents tensioactifs. Ainsi, des émulsions stables peuvent être produites avec une durée de vie des mois et des années [72]. La compréhension de la formation, des structures et propriétés des émulsions est essentielle pour la création et la stabilisation de structures dans les aliments.

Il existe deux principaux types d'émulsion qui sont importants dans les aliments :

#### 1.7.3.1. Huile-dans-eau (O /W) :

Des gouttelettes d'huile sont mises en suspension dans une phase aqueuse continue. C'est le type le plus polyvalent des émulsions, qui sont pratiquées sous

de nombreuses formes (mayonnaises, garnitures fouettables, mélanges de crèmes de glace) et de leurs propriétés sont contrôlés à la fois les agents tensioactifs utilisés et les composants présents dans la phase aqueuse.

#### 1.7.3.2. Eau-dans-huile (W/O) :

L'émulsion, contenant le beurre, la margarine, et tartinades à base de matières grasses en général. La stabilité de ces émulsions dépend plus sur les propriétés de la graisse ou de l'huile et également le tensioactif utilisé dans la phase aqueuse.

Un lipopeptide obtenu à partir de *Bacillus subtilis* a été capable de former des émulsions stables avec l'huile de soja et de graisse de coco, ce qui suggère son potentiel en tant qu'agent émulsifiant dans les aliments [73].

Un manoprotéine de *Kluyveromyces marxianus* a été capable de former des émulsions avec l'huile de maïs qui ont été stables pendant trois mois; la levure a été cultivée sur un milieu à base de lactosérum suggérant une application potentielle comme un bioémulsifiant alimentaire [74]. Le composé riche en glucides extracellulaires de *Candida utilis* était utilisé avec succès comme agent émulsifiant dans les formulations de vinaigrette [75].

### 1.8. Valorisation des déchets agro-industriels pour la production des biosurfactants

La Production économique à grande échelle pour établir de nouvelles applications de biosurfactants demeure un défi [17]. La surfactine (98% de pureté) disponible auprès de Sigma Chemical Company coûte environ \$ 153 pour un flacon de 10 mg. En comparaison avec le coût des tensioactifs chimiques est d'environ un dollar / lb cependant lors de la prise en considération des dommages environnementaux qu'ils peuvent provoquer, le coût devient finalement beaucoup plus d'un dollar.

Une approche permettant de réduire les coûts de la production et l'augmentation du rendement est par le développement de procédés qui peut représenter 10 à 30% du coût du produit final en utilisant des matières premières à faible coût renouvelables et durables et l'optimisation du milieu de culture et les



conditions de croissance [54,74,75]. Une grande variété de matières premières alternatives est actuellement disponible en tant que nutriments pour les fermentations industrielles, à savoir divers sous-produits agricoles et déchets industriels. Les principales sources de production de biosurfactants comprennent les résidus huileux, les déchets de distillerie, les déchets de laiterie et de résidus riches en glucides. L'utilisation de tels matériaux de déchets a un double rôle, consistant à générer un produit utilisable et de réduire le coût de l'élimination des déchets. [76, 77, 78, 79, 80]

### 1.8.1. Huiles et graisses

Oliveira *et al.* [81] ont fait un dépistage pour la sélection des souches de micro-organismes capables de se croître sur des huiles de friture (tournesol et olive) et d'accumuler les biosurfactants dans les milieux de culture. *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 a été sélectionnée, montrant une production finale de rhamnolipides de 2,7 g / L et un rendement de 0,34 g de rhamnolipide / g de substrat de production.

Le Savon de stock d'huile de tournesol a été dosé en tant que source de carbone pour la production de rhamnolipides par la souche *Pseudomonas aeruginosa* LBI, ce qui donne une concentration en biosurfactant finale de 12 g / L dans l'agitateur et 16 g / L dans des expériences de bioréacteur [82].

### 1.8.2. Les déchets de laiterie (lactosérum) et de distillerie

Dubey et Juwarkar [83, 84] ont déclaré une production de biosurfactants à partir d'un milieu synthétique et des déchets industriels tels que la distillerie et du lactosérum par un isolat de boue de *Pseudomonas aeruginosa* BS2. Les déchets étaient de bons substrats pour la croissance et la prolifération des bactéries et la production de biosurfactants avec des quantités maximales de 0,9 et 0,92 g / l, respectivement, après 96 h d'incubation. Rodrigues *et al.* [85] ont sélectionné les souches du *Lactobacillus* capables de produire les biosurfactants. Les bactéries lactiques : *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus pentosus* et *Lactobacillus Coryniformis torquens* ont été choisies comme organismes de

production des biosurfactants. Ces souches qui été considérées comme les plus prometteuses et le lactosérum en tant que substrat alternatif de potentiel.

### 1.8.3. Résidus riches en glucides

Fox et Bala [86] ont démontré que les effluents de la pomme de terre étaient une source de carbone alternative appropriée pour générer des biosurfactants à partir de *B. subtilis* ATCC 21332. Ce dernier exprime une  $\alpha$ -amylase qui permet l'utilisation des déchets de la pomme de terre riches en amidon comme substrat pour la production de biosurfactants [87].

La mélasse est un sous-produit de l'industrie sucrière qui est de faible cout par rapport à d'autres sources de sucre classiques comme le saccharose ou le glucose et est riche en d'autres nutriments comme les minéraux et vitamines [88]. La mélasse et la liqueur de maïs ont été utilisées comme sources de carbone et d'azote primaires pour la production des rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* GS3; la tension interfaciale du milieu de culture contre le pétrole brut a été réduite de 21 à 0,47 mN / m [89]. Deux souches de *Bacillus subtilis* ont été capables de produire des lipopeptides en utilisant un milieu minimal supplémenté avec de la mélasse comme source de carbone [90].

### 1.8. 4. Déchets lignocellulosiques

Sont parmi le carbone organique le plus abondant sur terre [84] et ils sont les principaux composants des déchets provenant de diverses industries, la foresterie, l'agriculture et les municipalités. D'un point de vue économique, la lignocellulose est riche en résidus agricoles qui peuvent être utilisés pour produire des biomolécules utiles tels que les biosurfactants

Portilla-Rivera *et al.* [91] ont été les premiers à regarder dans la capacité de *Lactobacillus sp* à utiliser des hydrolysats hémicellulosiques de divers résidus agricoles pour la production simultanée de biosurfactants et l'acide lactique. Cette double stratégie de production fait du biosurfactant plus viable économiquement sur le marché et de réduire les effets de l'incinération des déchets sur l'environnement. Dans leurs efforts, ils ont obtenu une tension de surface réduite et un rendement en biosurfactant de 0,71 g / g de biomasse.

Une autre approche intéressante pour obtenir des résultats plus fructueux sera la co-production de biosurfactants et d'autres métabolites importants. Il ya des rapports de ces métabolites par exemple les polyhydroxyalkanoates (PHAs), de l'acide lactique et d'autres métabolites. Exemple : *Pseudomonas aeruginosa* produit des rhamnolipides et PHAs. Ces derniers ont été appliqués pour la fabrication de bouteilles, des films et des fibres en tant qu'agents d'emballage biodégradables [92]. Autre part l'utilisation de protéases microbiennes en particulier des protéases alcalines qui sont un groupe important d'enzymes industrielles répondant à des exigences de près de 60 % du marché mondial des enzymes surtout dans les formulations détergentes [93]. La plupart de ces productions d'enzymes sont confinées au genre *Bacillus* qui est connu pour être un producteur commun de biosurfactants [94, 95]. Avec de nombreuses propriétés complémentaires telles qu'une excellente détergence, le pouvoir émulsifiant, moussant et dispersant. Une utilisation concomitante de biosurfactant et protéase pourrait offrir une meilleure efficacité comme additifs détergents.

## CHAPITRE 2

### MATERIEL ET METHODES

#### 2.1. Origine et isolement des souches bactériennes utilisées

Le biotope utilisé pour isoler des souches bactériennes aérobies est un sol sableux provient d'un borbier pétrolier contaminé par les hydrocarbures de la région de Hassi-Messaoud (sud d'Algérie). Les différentes caractéristiques de ce biotope sont données en Appendice B.

Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés à différentes profondeurs (5 - 20 cm) le 13/03/2007 à 16 H 00 heures locales.

La méthode d'adaptation progressive, en utilisant le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie a permis d'isoler des souches à fort potentiel dégradatif des hydrocarbures et leurs dérivés [48]. Toutes les étapes de l'isolement ont été réalisées par Eddouaouda *et al.* [48]. (Voir Appendice C).

#### 2. 2. Criblage des souches productrices des biosurfactants

⇒ Repiquage : Le repiquage est réalisé sur milieu LB solide (voir composition en Appendice D). Après l'incubation à 45 °C pendant 24 h, les souches sont conservées à 4 °C pour une durée de 4 à 6 semaines afin de pouvoir toujours disposer des souches viables [95].

La conservation à longue durée des souches pures obtenues a été effectuée à partir d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance dont les souches sont conservées dans le bouillon LB en présence de 25% de glycérol à - 80 °C [48].

⇒ Préparation de la préculture bactérienne : Les souches conservées à 4 °C ont étéensemencées sur milieu liquide LB et puis incubées à 45 °C pendant 16 h pour avoir un bon trouble de croissance ( $DO_{600}=1$ ). Ces dernières cultures ont servi à inoculer les milieux qui seront employés pour suivre la production des biosurfactants.

⇒ Criblage des souches productrices de biosurfactants :

Quatorze souches bactériennes hydrocarbonoclastes (K2N - 7H - 7G-1M-1J-7I-7D-1C-1A''-2B''-1C''-2E- K2C- NIJ et 2C) ont été utilisées pour le criblage des souches productrices de biosurfactants.

Les expériences ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu minimum « MM » (voir composition en Appendice D), additionné de 1% du pétrole brute comme source unique du carbone et d'énergie. Ce milieu liquide est inoculé avec 1% de la préculture [96]. L'incubation s'effectue à 45 °C sous une agitation de 150 tr/min pendant 2 jours.

Le choix de la souche performante est basé sur la mesure de l'indice d'émulsification  $E_{24}(\%)$ . Nous mélangeons des volumes égaux de surnageant de la culture bactérienne et de la solution hydrophobe du pétrole brut (4 ml) dans un tube à essai, le mélange est bien agité au vortex (VTX 400) (photo en Appendice E) à une vitesse maximale pendant 2 min jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène, puis laissé au repos pendant 24 h avant de prendre la mesure [97].

⇒ Sélection de la meilleure souche productrice des biosurfactants :

Les expériences ont été réalisées selon les conditions précitées dans la section de criblage.

Le suivi de la production est basé sur la mesure de la TS du surnageant après centrifugation à 4000 tr/min pendant 20 min. La TS a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre manuelle de marque KRÜSS à  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (Appendice E). L'appareil est calibré avec de l'eau ultra pure (72 mN/m) et l'éthanol pur (22,7 mN/m) comme témoins. Avant l'utilisation, l'anneau de platine est séquentiellement lavé avec l'acétone.

## 2.3. Optimisation de la production des biosurfactants

### 2.3.1. Choix de la meilleure source de carbone

Cinq sources de carbone ont été testées à savoir : l'huile d'olive 1% (v/v), la margine 1% (v/v), l'huile de friture 1% (v/v), le lactosérum (0,5%) et les rejets de jus (0,5%) [98]. Deux types de stérilisation ont été effectués :

- Stérilisation par autoclavage à 120 °C pendant 20 min pour les rejets de jus, margine et le lactosérum;
- Stérilisation par microfiltration en utilisant un filtre seringue (0,22 µm) pour l'huile d'olive et l'huile de friture.

La présentation des sources de carbone précitées est donnée en (Appendice F).

Les milieux contenant les différentes sources de carbone ont été inoculés par la souche sélectionnée à raison de 5% (v/v) [99].

La production de biosurfactants est suivie par la mesure de la tension de surface et l'indice d'émulsification ainsi que la croissance est estimée par la mesure de la DO à 600 nm après 24h d'incubation à 45 °C sous une agitation de 150 tr/min.

### 2.3.2. Effet de la concentration de la source de carbone

Différentes concentrations de la margine et de l'huile d'olive ont été testées (0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 % v/v).

Les conditions de culture et les analyses sont les mêmes que celles indiquées dans la section 2.3.1.

### 2.3.3. Choix de la meilleure source d'azote

Quatre sources d'azote ont été utilisées à savoir : le nitrate de potassium ( $\text{KNO}_3$ ), le nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), le sulfate d'ammonium ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> et le chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ).

Les sources de carbone (huile d'olive 1% (v/v) et margine 0,5 % (v/v)) ont été additionnées séparément.

Les conditions de culture et les analyses sont les mêmes que celles indiquées dans la section 2.3.1.

### 2.3.4. Effet du pH, salinité et les oligoéléments

L'effet du pH a été déterminé en faisant varier le pH du milieu MM additionné séparément de deux sources de carbone (huile d'olive 1% (v/v) et margine 0,5 % (v/v)) et la source d'azote ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,4%(v/v)). Les valeurs du pH sont ajustées comme suit : 3, 5, 7, 9 et 11.

L'effet de la salinité a été déterminé par l'ajout de chlorure de sodium (NaCl) au milieu de production à différentes concentrations : 0, 20, 40, 60 et 80 g /l.

Afin de tester l'effet des oligoéléments présents dans le milieu de production, ces derniers ont été éliminés de la composition du milieu minimum.

Les conditions de culture et les analyses sont les mêmes que celles indiquées dans la section 2.3.1.

#### 2.4. Extraction des biosurfactants

Après 24h d'incubation de la souche performante cultivée sur milieu MM additionné par les deux meilleures sources de carbone (margine 0,5% et huile d'olive 1%) en respectant les mêmes conditions précitées. Le bouillon de culture a été centrifugé à 4000 tr/min pendant 30 min et le surnageant est ajusté à un pH =2 au moyen d'une solution d'HCl (3 N). Ensuite, il est laissé au repos pendant une nuit à 4 °C. Le précipité est récupéré par centrifugation à 4000 tr/min pendant 30 min. L'extraction a été effectuée une fois à l'aide d'acétate d'éthyle (grade analytique=99%). Le solvant a été ensuite évaporé à l'aide d'un rotavapeur de marque BÜCHI ROTAVAPOR R - 205 [85].

#### 2.5. Caractérisation des biosurfactants

##### 2.5.1. Caractérisation structurale des biosurfactants

Analyse par FTIR : L'échantillon est préparé par micropastillage KBr de 1 ou 2 mm et à une concentration d'environ 0.004% (1mg d'échantillon/250mg de KBr) en masse et soumis à une pression de 10 bars/cm<sup>2</sup>. La pastille ainsi formée est analysée à l'aide d'un appareil de marque SHIMADZU-FTIR 9800. Les spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés entre 400 et 4000 cm<sup>-1</sup> et enregistrés par un logiciel HUPER avec une résolution de 8 cm<sup>-1</sup> d'où les spectres obtenus représentent  $T = f(\nu)$  avec T : transmittance,  $\nu$  : nombre d'onde =  $1/\lambda$  exprimé en cm<sup>-1</sup>.

##### 2.5.2. Concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique (CMC) a été déterminée par la méthode de dilution en mesurant la tension superficielle à chaque dilution [100], puis en

traçant la courbe de la tension de surface en fonction de la concentration de la solution du biosurfactant brut [101]. La concentration du biosurfactant, au delà de laquelle la tension de surface n'a pas changé, a été définie comme la CMC.

### 2.5.3. Pouvoir émulsifiant

La propriété émulsifiante a également été évaluée avec le pétrole, l'huile d'olive, l'huile de soja, l'huile de tournesol et l'huile de moteur en mélangeant des volumes égaux du surnageant avec l'hydrocarbure ou l'huile. Le mélange est agité pendant 2 min à une vitesse maximale (8000 tr/min) (agitateur IKA-Mini MR) et laissé pendant 24 h au repos.

L'indice d'émulsification a été calculé d'après l'équation citée ci-dessous :

$$E_{24} = \frac{E}{E'} * 100$$

Avec E : La longueur de la couche émulsionnée

Et E' : La longueur totale du mélange

### 2.5.4. Pouvoir antimicrobien

Les espèces utilisées pour les tests antibactériens sont : *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 (Gram positif) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1544 (Gram négatif). L'activité antimicrobienne contre ces espèces bactériennes a été déterminée selon la technique de Dhiman *et al.* [102].

Chaque espèce cible a été inoculée (100 µl à 10<sup>6</sup> ufc.ml<sup>-1</sup>) par étalement sur gélose LB et un disque stérile (6 mm) immergé dans une solution de biosurfactant (dissous dans l'eau distillée à la CMC) a été déposé sur la surface du milieu. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. L'activité inhibitrice a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone claire autour du disque.

## 2.6. Etude de la stabilité des biosurfactants

L'étude de la stabilité du biosurfactant est réalisée sur un surnageant exempt de cellules bactériennes et ceci après centrifugation à 4000 tr/min pendant 30 min [39,48].



Les paramètres affectant la stabilité des biosurfactants ont été étudiés : la température, le pH et la salinité. L'évaluation de la stabilité des biosurfactants de la souche performante a été déterminée par la mesure de la tension de surface (TS).

#### 2.6.1. Stabilité chimique

Le pH du surnageant a été ajusté à différentes valeurs (2 à 12) en utilisant des solutions HCl ou NaOH. Pour examiner également l'effet de la salinité, le surnageant a été soumis à différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) : 10, 20, 50, 100, 150, 200 et 250 g/l.

#### 2.6.2. Stabilité thermique

Afin d'évaluer la thermostabilité du biosurfactant, le surnageant a été incubé à différentes températures : 4, 25, 30, 40, 70 et 120 °C pendant 24 h.

#### 2.7. Identification de la souche performante productrice des biosurfactants

L'identification phénotypique de la souche 1J est réalisée en se basant sur des études morphologiques et biochimiques. Les tests ont été réalisés en utilisant la galerie biochimique Api 50 CH (Appendice H).

Les substrats peuvent être métabolisés par plusieurs voies :

⇒ Assimilation : se traduit par une croissance du microorganisme dans la cupule quand le substrat est utilisé comme seule source de carbone présente.

⇒ Oxydation : se traduit par un changement de couleur dans la cupule, dû à une production d'acide en aérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.

⇒ Fermentation : se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.

Les tests ont été réalisés selon la méthode suivante :

##### Inoculation de la galerie :

- Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.

- Répartir environ 10 ml d'eau distillée.
- Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie.
- Incuber les galeries à la température optimum de croissance des microorganismes étudiés.

#### Lecture de la galerie :

Deux paramètres comptent pour la lecture des réactions observées :

- l'intensité (croissance ou acidification).
- la vitesse d'apparition.

La lecture des galeries doit se faire :

- à des temps d'incubation définis (24h, 48h), dépendant du microorganisme et du type de réaction étudié (fermentation ou assimilation).
- de façon semi-quantitative : on donne la note 0 aux réactions négatives et 5 aux réactions positives d'intensité maximale. Les notes 1, 2, 3 ou 4 sont données aux réactions intermédiaires (3, 4 et 5 sont considérées comme positives).
- les résultats sont notés sur les fiches de résultats comme indiqué dans l'exemple. Ils constituent le profil biochimique du microorganisme.

#### 2.8. Essai d'application du biosurfactant dans le domaine agroalimentaire

Vu les propriétés émulsifiantes intéressantes de notre biosurfactant produit par la souche 1J (Bios-1J), nous avons développé une nouvelle formule de la sauce mayonnaise avec des caractéristiques similaires à la mayonnaise commerciale.

La mayonnaise représente une émulsion de type directe, complexe, finement dispersée, stable et grasse, dans laquelle la phase dispersée est distribuée sous forme de gouttelettes fines au sein du milieu de dispersion, les deux phases étant séparées par des interfaces.

Les différentes formulations de la mayonnaise se distinguent principalement par la composition, le type du stabilisateur et de l'émulsifiant [103].

Sur cette optique nous avons procédé à la préparation d'une sauce mayonnaise à partir de deux substrats à titre d'agents émulsifiants (ces deux ingrédients sont les plus critiques pour la stabilité de la mayonnaise) :

- le premier est industriel : « Hydrostach Stabimuls MRH 301 » (composition en Appendice G4) un stabilisant de sauces avec 25-35% teneur en matière grasse de l'émulsion;
- le deuxième biologique : le biosurfactant produit par la souche 1J (Bios-1J) issu de la margine comme source de carbone qui est préféré suite à des raisons économiques comparativement à celui de l'huile d'olive.

Dans la nouvelle formule, le biosurfactant produit par la souche 1J à partir de la margine « Bios-1J-Margine » a été introduit en remplaçant le jaune d'œuf qui joue le rôle de l'émulsifiant et l'hydrostach qui est un épaississant et stabilisant de sauces. L'ajout de ce biosurfactant peut mettre le point sur son double rôle, émulsifiant et conservateur.

Parmi nos objectifs est que notre produit fini soit avant tout stable du point de vue rhéologique et microbiologique tout au long de la période de stockage. Ainsi l'obtention de bonnes propriétés sensorielles par rapport au produit de référence. Cette partie du travail a été déroulée au niveau de la Société Industrielle de Dénaturation Nord Africaine –SIDNA- Hussein dey Alger et en collaboration avec la Société Industrielle des Produits Alimentaires et Connexes « SINPAC » Khemis El Khechna.

### 2.8.1. La technologie de la préparation des échantillons de la sauce mayonnaise

#### 2.8.1.1. Préparation des échantillons

Pour cette présente étude, nous avons préparé trois (03) échantillons de la sauce mayonnaise qui diffèrent par leur contenance en agent émulsifiant, acide citrique (E 330) (régulateur d'acidité) et conservateurs (benzoate de sodium E211 et sorbate de potassium (E202)). Un 4<sup>ème</sup> échantillon a été pris comme référence « la sauce mayonnaise commerciale de marque SIDNA ».

Les échantillons ont été préparés selon une conception expérimentale à petite échelle pour une quantité de 250 g en suivant le procédé de la formule originale de la sauce mayonnaise industrielle de marque SIDNA (tableau 2. 3) :

- Echantillon 1 : eau + sucre + huile + sel + moutarde + vinaigre + Bios-1J-Margine.
- Echantillon 2 : eau + sucre+ huile + sel + moutarde + vinaigre + Bios-1J-Margine + conservateurs+ acide citrique.
- Echantillon 3 : eau + sucre + huile + sel + moutarde + vinaigre + « Hydrostach ».
- Echantillon 4 : mayonnaise commerciale « SIDNA ».

-Les ingrédients de la sauce mayonnaise SIDNA sont : Huile végétale (tournesol 55%), eau, vinaigre, hydrostach, sel, sucre, acide citrique.

-Les ingrédients ajoutés dans nos échantillons sont : le vinaigre blanc (SIDNA), sel (ENASEL), le sucre (CEVITAL), huile végétale de tournesol (CEVITAL), moutarde (SIDNA). Le benzoate de sodium, le sorbate de potassium, l'acide citrique et l'hydrostach, ont été fournis par la société de la fabrication de la mayonnaise (SIDNA).

#### 2.8.1.2. Préparation de la phase aqueuse

- On effectue un pesage initial de toutes les matières premières requises pour chaque essai.
- Les ingrédients secs tels que le sucre, le sel, la moutarde, le vinaigre, l'agent conservateur (benzoate de sodium et sorbate de potassium) et l'eau. On laisse la dispersion sous agitation pendant un certain temps pour que les ingrédients s'hydratent et se dispersent finement.

#### 2.8.1.3. Préparation de la phase huileuse

Nous avons mélangé la quantité d'huile avec l'agent émulsifiant dans le but d'assurer une bonne hydratation.

#### 2.8.1.4. Préparation de l'émulsion

On verse lentement la phase huileuse dans la phase aqueuse, sous une forte agitation en utilisant un mélangeur (Moulinex DDG141, France), pour assurer une bonne émulsification de la préparation. Le mélange devient opaque et homogène, à la fin on ajoute le vinaigre.

Après les quatre étapes de la préparation, les échantillons de la sauce mayonnaise obtenus ont été placés dans des récipients alimentaires en verres stériles avec des couvercles à fermeture hermétique et maintenus pendant 24h à une température de 4 °C avant l'analyse

Tableau 2.3: Fractions massiques des ingrédients dans les échantillons de la mayonnaise étudiés pour 250g

	Ingrédients	Quantité
Echantillon 1	Eau (figé)	90 ml
	Huile (figé)	90 ml
	Sucre (figé)	1,4 g
	Sel (figé)	1 g
	Moutarde (figé)	11,4g
	Vinaigre (figé)	5,7ml
	Bios-1J-Margine (principal)	12,5 ml
Echantillon 2	Eau (figé)	90 ml
	Huile (figé)	90 ml
	Sucre (figé)	1,4 g
	Sel (figé)	1 g
	Moutarde (figé)	11,4g
	Vinaigre(figé)	5,7ml
	Bios-1J-Margine (principal)	12,5 ml
	Benzoate de sodium (principal)	0,4g
	Acide citrique (principal)	0,4g
Sorbate de potassium (principal)	0,4g	
Echantillon 3	Eau (figé)	90 ml
	Huile (figé)	90 ml
	Sucre (figé)	1,4 g
	Sel (figé)	1 g
	Moutarde (figé)	11,4g
	Vinaigre (figé)	5,7ml
	Hydrostach (principal)	5,7 g

Avec :

Echantillon(1): Mayonnaise contenant le biosurfactant produit par la souche 1J à partir de la margine sans conservateurs ni acide citrique.

Echantillon (2) : Mayonnaise contenant le biosurfactant produit de la souche 1J à partir de la margine avec conservateurs et acide citrique.

Echantillon (3) : Mayonnaise industrielle sans conservateurs ni acide citrique.

## 2.8.2. Propriétés organoleptiques et profil sensoriel des échantillons des sauces mayonnaises étudiés

Leur but est de décrire la nature des perceptions et de quantifier leur intensité, de manière à donner une carte d'identité du produit, reproductible et compréhensible par tous. L'évaluation sensorielle a été réalisée sur des échantillons après un jour de stockage à température ambiante (25 °C).

Les analyses sensorielles, à savoir l'apparence, l'arôme, la sensation en bouche et le goût, étaient réalisées par 10 panélistes entraînés de la société de SIDNA. Les sujets ont déjà participé à des tests sensoriels sur la moutarde, les sauces salade, notamment la mayonnaise (Appendice G5).

## 2.8. 3. Détermination des principaux indicateurs de la qualité des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés

### 2.8.3.1. Indicateurs physico-chimiques

La fraction massique de l'humidité et de l'huile, ainsi que de l'acidité titrable (exprimée en acide acétique (%)), le pH dans les échantillons préparés ont été déterminés après les 24h qui suivent la formulation selon la méthode de l'AOAC [104] (Appendice G2). pour le pH et l'acidité titrable, l'opération est répétée une fois par semaine, cela en vue d'évaluer la stabilité du produit pendant une période de 30 jours.

Les analyses physico- chimiques de l'eau de distribution traitée sont données dans l'Appendice G6.

### 2.8 3.2. Indicateurs microbiologiques

A la formulation, la composition de la mayonnaise peut fournir un milieu particulièrement favorable au développement de microorganismes. Des analyses microbiologiques ont été faites afin de garantir une sécurité hygiénique et organoleptique bien déterminée (Appendice G3).

Le nombre total de germes (NTG) aérobies, levures, moisissures, coliformes totaux, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp et anaérobies sulfite-réductrices ont été déterminées selon la méthode donnée par la méthode APHA [105].

Le suivi microbiologique a été effectué au niveau du laboratoire microbiologique de « SINPAC ».

#### 2.8.4. La caractérisation rhéologique des échantillons de la sauce mayonnaise

Dans cette partie, nous proposons de caractériser le comportement rhéologique d'un produit de référence «mayonnaise de marque –SIDNA- à 55% de matière grasse» ainsi que les essais formulés.

Pour l'étude, une courbe d'écoulement (rhéogramme) en régime stationnaire a été tracée qui traduit l'évolution de la viscosité apparente (Pa.s) en fonction de la vitesse de cisaillement ( $s^{-1}$ ).

Les mesures rhéologiques sont réalisées à l'aide d'un rhéomètre de type Couette, de marque Anton Paar Modular Compact Rehometer MCR 302 (contient deux cylindres coaxiaux, l'un est mobile et l'autre est fixe (système de mesure)), fonctionnant soit à contrainte imposée soit à vitesse de cisaillement imposée, muni d'un logiciel US 200, pour la commande et le traitement des données (Appendice E). Puisque la structure des échantillons de la mayonnaise atteint l'état le plus stable après 15-20 h, les expériences ont été effectuées la deuxième journée après la fabrication du produit. L'intervalle de variation de la vitesse de déplacement est de 0,01 à 1000  $s^{-1}$ , à une température de 22 °C, avant et après l'effet mécanique.

L'analyse statistique des données obtenues a été réalisée en utilisant le logiciel STATISTICA.



## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les souches bactériennes aérobies thermophiles utilisées dans ce travail ont été isolées à 45 °C à partir de sols contaminés par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud (sud d'Algérie) [48].

Selon la bibliographie, peu de travaux ont été réalisés à des températures supérieures à 40 °C afin de dégrader les hydrocarbures et la production de biosurfactants. Ceci montre l'importance d'utiliser des souches thermophiles dans notre cas d'étude.

#### 3.1. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants

Au total, quatorze souches bactériennes hydrocarbonoclastes (K2N -7H - K7G-1J-7I-K7D-1C-1A''-2B''-1C''-2E- K2C- NIJ et 2C) ont été choisies pour la sélection de la souche performante en utilisant le pétrole (1%) comme la seule source de carbone et d'énergie dans le milieu de production.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 3.3.

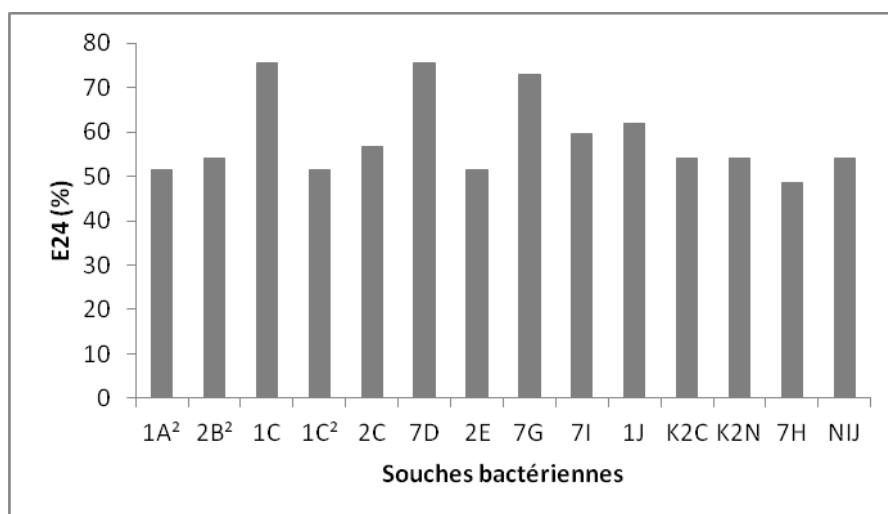


Figure 3.3 : criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants

D'après la figure 3.3, nous remarquons que quatre souches (1C, K7D, 1J et K7G) ont montré une capacité émulsifiante importante et qui ont été sélectionnées comme souches productrices de biosurfactants. La souche 1J utilisée dans cette présente étude a été sélectionnée parmi ces quatre souches en se basant sur la capacité de réduire la tension superficielle. Une souche est dite productrice de biosurfactant, si la valeur de la tension de surface est inférieure à 40 mN/m [106].

Des résultats obtenus par Bodour *et al.* [107] ont montré qu'une diminution de la tension de surface à des valeurs inférieures à 40 mN/m avec les souches suivantes : *Bacillus subtilis* N10 ( $27.3 \pm 0.2$ ), *Bacillus thuringiensis* 4G1 ( $35.6 \pm 0.14$ ), *Bacillus lichemiformis* ( $39.5 \pm 0$ ), *Bacillus subtilis* 168 ( $30.6 \pm 0.5$ ) et *Bacillus sphaericus* ( $38.1 \pm 0.7$ ).

Des souches bactériennes isolées à partir du même biotope (sols sableux de la région de Hassi-Messaoud) et qui font l'objet de la production des biosurfactants ont données des résultats très intéressants avec la réduction de la tension superficielle à des valeurs très basses (31.2 et 31 mN/m) par *Ochrobactrum* sp. 1C et *Brevibacterium* sp. 7G, respectivement [39] et 25,9 mN/m par la souche *Staphylococcus* sp. 1E [48].

### 3.2. Optimisation de la production des biosurfactants

Le type, la qualité et la quantité de la production du biosurfactant dépend fortement de : [101].

- Type de microorganisme utilisé (bactéries, levures ou champignons);
- Substrat nutritif disponible pour le développement cellulaire;
- Nature des sources de carbone et d'azote;
- Conditions de culture à savoir le pH, la température, "agitation, l'aération, la salinité et l'oxygène, la CMC, la concentration d'ions métalliques (phosphore, magnésium, fer et manganèse).

### 3.2.1. Effet de la source de carbone

La production de biosurfactants par la souche 1J a été testée en utilisant différents substrats tels que l'huile d'olive, la margine, le lactosérum, l'huile de friture, les rejets du jus d'orange (ROUIBA).

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 3.4 et le tableau 3.4.

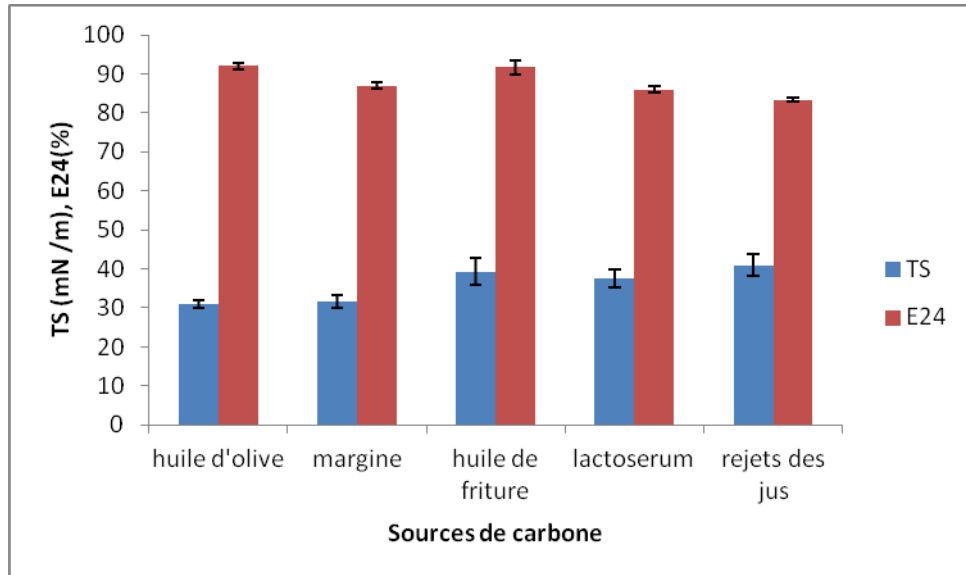


Figure 3.4: Influence de la source de carbone sur la production des biosurfactants par la souche 1J

Tableau 3.4 : Croissance bactérienne sur les différentes sources de carbone

Source de carbone	Huile d'olive	Huile de friture	Rejets de jus	Lactosérum	Margine
DO (600 nm)	0,7	1,11	0,9	1,04	0,83

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que la réduction de la tension de surface est importante en présence d'huile d'olive et de margine, car la croissance de la souche sur ces deux substrats réduit la tension superficielle jusqu'à atteindre des valeurs de 31 et 32 mN/m avec une activité émulsifiante de 93% et 88% respectivement après 24h d'incubation.

D'autre part pour la croissance bactérienne était importante sur le lactosérum, l'huile de friture et les rejets du jus d'orange, mais une faible

production de biosurfactant a été enregistrée par la souche 1J en utilisant ces substrats comme sources de carbone dans ces conditions.

Le biosurfactant le plus actif peut réduire la tension de surface de l'eau de 72 à 30 mN/m [13,123]. De cela nous pouvons conclure que l'huile d'olive et la margarine sont les deux meilleures sources de carbone et nous éliminons les autres sources.

Des résultats similaires ont été rapportés par Abousaoud *et al.* [97] où l'huile d'olive était la meilleure source de carbone pour la production de biosurfactants par la souche *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 [111]. La souche *Staphylococcus* sp. 1E utilise l'huile d'olive pour la production de biosurfactants [48].

Les huiles végétales comestibles sont les plus utilisées pour la production des biosurfactants, ce qui est le cas pour les rhamnolipides lorsqu'ils sont utilisés comme seule source de carbone et avec certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa* [46,113].

D'autres travaux ont sélectionné une variété de sources de carbone pour une meilleure production de biosurfactant : L'hexadécane a été trouvé comme une bonne source de carbone [39], l'huile de tournesol résiduelle de friture [42]. Le lactosérum peut être utilisé pour la production des biosurfactants [111,112]. Daniel *et al.* [112] ont utilisé les déchets laitiers en tant que substrats et la production de concentrations élevées de sophorolipides réalisée au moyen du procédé de culture en deux étapes pour la levure *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509.

Le choix de la source du carbone a un rôle déterminant sur le taux de la production ainsi que sur la nature du biosurfactant synthétisé [101,109]. De même Mukesh *et al.* [108] ont rapporté que l'indice d'émulsification diffère selon la nature du composé tensio-actif et le microorganisme utilisé.

La souche *Bacillus licheniformis* JF-2, cultivée dans un milieu riche en glucose produit des biosurfactants tout en réduisant la tension superficielle de l'eau à 28 mN/m [110].

Une activité maximale de production dans la plage de croissance de « DO=0,121 à 0,859 » a été observée avec l'utilisation des sources de carbone (huile d'olive, glucose, saccharose et glycérol) par *Bacillus subtilis* SK320 [114]. De faibles niveaux d'activité de production dans la plage de croissance de « DO=0,014 à

0,074 » ont été détectés lorsque cette souche est cultivée en présence de maltose, l'huile végétale, l'huile mobile et le pétrole brut [115].

### 3.2.2. Effet de la concentration de la source de carbone

L'huile d'olive et la margine ont été sélectionnées comme meilleures sources de carbone. La variation de la production des biosurfactants en fonction de la concentration de l'huile d'olive et la margine est illustrée dans les figures 3.5 et 3.6.

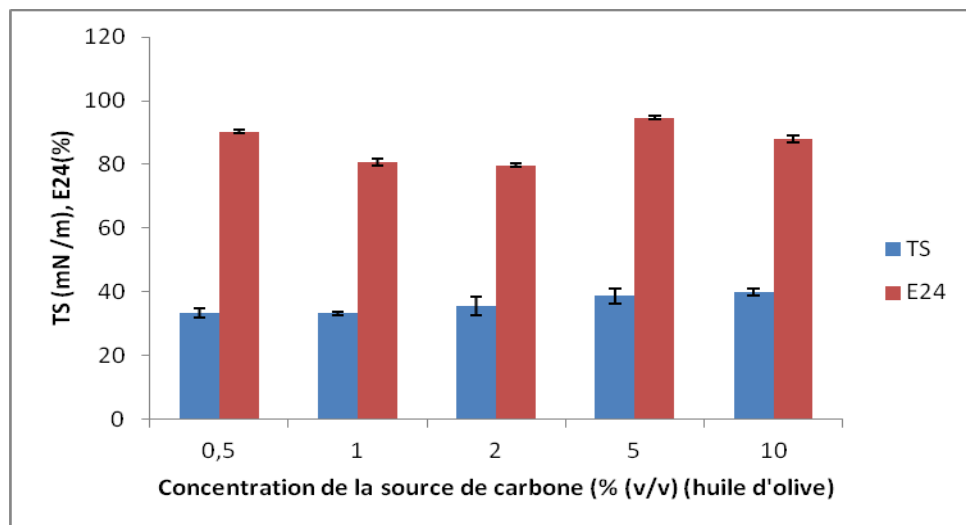


Figure 3. 5 : Effet de la concentration de l'huile d'olive sur la production des biosurfactants par la souche 1J

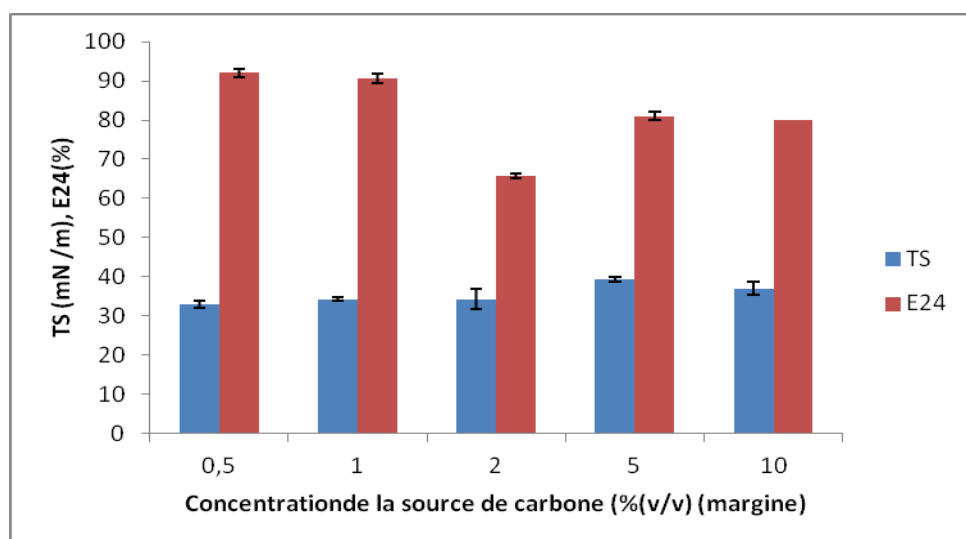


Figure 3.6 : Effet de la concentration de la margine sur la production des biosurfactants par la souche 1J

D'après les résultats obtenus, nous constatons que la production de biosurfactants par la souche 1J est maximale lorsque la concentration en huile d'olive est de 1% et de 0,5 % en margine, ce qui conduit à une réduction de la tension de surface (33 mN/m) et une bonne activité émulsifiante (80% et 92% pour les deux substrats, respectivement).

Des résultats proches ont montré qu'une production maximale de biosurfactants a été observée lors de l'utilisation de la souche *Bacillus subtilis* SK320 cultivée à 37 °C et à 120 tr/min dans le milieu de base Bushnell Hass Broth (BHB) et 0,5% d'huile d'olive (Olio di Oliva, Sasso, Milan, Italie) comme source de carbone [116].

La régulation de la production de biosurfactants par *Bacillus subtilis* SK320, cultivée sur un milieu de base contenant différents substrats, suivie d'une croissance et d'une activité de production, a été obtenue à une concentration de 0,5%, v/v. Ce qui met en valeur nos résultats obtenus en utilisant cette concentration d'huile d'olive [116].

### 3.2.3. Effet de la source d'azote

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 3.7 et 3.8 et les tableaux 3.5 et 3.6.

Tableau 3.5 : Croissance bactérienne sur les différentes sources d'azote  
(SC=huile d'olive)

Source d'azote	NH <sub>4</sub> CL	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>
DO (600 nm)	1,97	2,16	1,73	1,74

Tableau 3.6 : Croissance bactérienne sur les différentes sources (SC= margine)

Source d'azote	NH <sub>4</sub> CL	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>
DO (600 nm)	1,80	1,63	1,5	1,2

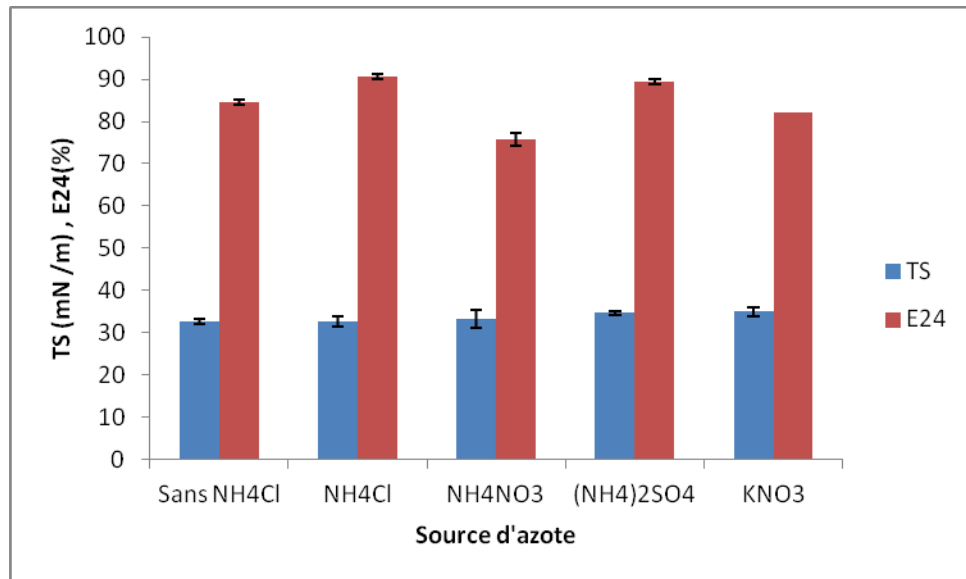


Figure 3.7 : Effet de la source d'azote sur la production des biosurfactants par la souche 1J (SC= huile d'olive)

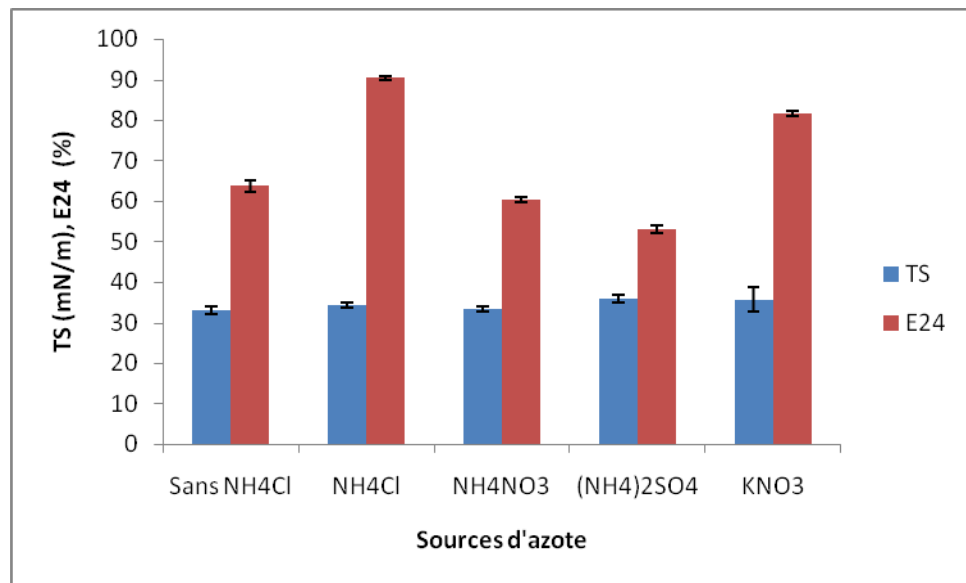


Figure 3.8 : Effet de la source d'azote sur la production des biosurfactants par la souche 1J (SC=margine)

En utilisant l'huile d'olive et la margine en tant que sources de carbone optimales, le choix de la source d'azote est un paramètre important dans la régulation de la synthèse des biosurfactants notamment par sa nature et aussi par la limitation de sa concentration dans le milieu de culture.

Les résultats obtenus montrent que la souche 1J est capable d'utiliser des sources d'azote inorganiques telles que le nitrate de potassium, le nitrate d'ammonium, le sulfate d'ammonium et le chlorure d'ammonium (tableaux 3.5 et 3.6).

En absence du chlorure d'ammonium la TS était de 32 mN/m avec l'huile d'olive et 33 mN/m avec la margine. Ce résultat confirme qu'afin d'obtenir des concentrations élevées de biosurfactants, il est nécessaire d'avoir des concentrations limitées d'azote.

Des résultats similaires ont été trouvés par Dubey et Juwarkar [111] où la limitation d'azote a augmenté la production du biosurfactant par la souche *Pseudomonas aeruginosa* BS-2 et *Ustilago maydis* [112].

La tension de surface est presque constante quelque soit la source d'azote ajoutée, mais l'activité émulsifiante est fortement affectée par la source d'azote présente dans le milieu. Les résultats montrent que lorsque l'huile d'olive est la source du carbone, un maximum d'activité émulsifiante est enregistré en présence du chlorure d'ammonium (90%) alors que cette dernière était de 77% avec le nitrate d'ammonium comme source d'azote. De même pour la margine, l'activité émulsifiante enregistrée en présence du chlorure d'ammonium (90%) alors que cette dernière était de 54% avec le sulfate d'ammonium comme source d'azote. Des résultats similaires ont été rapportés par Aboussaoud *et al.* [97].

L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries : par exemple, la production de biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium plutôt qu'en présence de nitrates. Par contre, Ruiz-Garcia *et al.* [34] indiquaient que la production de biosurfactants à partir de *Pseudomonas* sp. 44T1 cultivée sur l'huile d'olive donnait de meilleurs rendements avec du nitrate de sodium. Hommel *et al.* [57] ont indiqué que la production des sophorolipides par *Candida apicola* augmente avec la concentration initiale en sulfate d'ammonium et que la proportion des deux isomères produits varie aussi avec la concentration initiale en ammonium.



### 3.2.4. Effet des oligoéléments

La limitation de la concentration des éléments minéraux et ions peut aussi avoir un effet sur la production des biosurfactants sur le plan quantitatif et qualitatif (tableau 3.7).

Tableau 3.7 : Croissance bactérienne sans l'ajout d'oligoéléments

	Huile d'olive	Margine
DO (600 nm)	1,65	1,52

D'après le tableau 3.7, les résultats obtenus montrent que malgré l'importance de la croissance bactérienne sur la margine et l'huile d'olive sans l'ajout d'oligoéléments, car ces derniers font partie de leur composition fondamentale (1.8%) [117] mais une faible production de biosurfactants a été enregistrée par la souche 1J avec l'élimination de ces oligoéléments dans ces conditions. Cela se traduit par l'augmentation de la TS à 37 mN/m avec l'huile d'olive et 36 mN/m avec la margine. Par contre l'addition de ces éléments minéraux dans le milieu de culture a augmenté la production de biosurfactants par notre souche avec une TS de 31 mN/m avec l'huile d'olive et 32 mN/m avec la margine (section 3.2.1), ce qui explique leur effet direct en tant qu'agents stimulants dans le milieu de culture pour la production de biosurfactants.

La composition et les caractéristiques des biosurfactants sont influencées par les concentrations des ions métalliques tels que le fer, le manganèse car ils forment des co-facteurs importants de nombreuses enzymes. La surproduction de la surfactine se produit en présence de  $Fe^{2+}$  dans un milieu de sels minéraux. Les propriétés de la surfactine sont modifiées en présence de cations inorganiques [118]. L'addition du fer et du manganèse dans le milieu de culture stimule la production de biosurfactants chez *Bacillus subtilis* [119] et *Rhodococcus* sp. [41]. Par contre, il semblerait qu'une concentration limitante en

ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production du rhamnolipides [55].

### 3.2.5. Effet du pH et de la salinité

Les facteurs environnementaux (pH et salinité) influencent sur la production des biosurfactants. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 3.9-12.

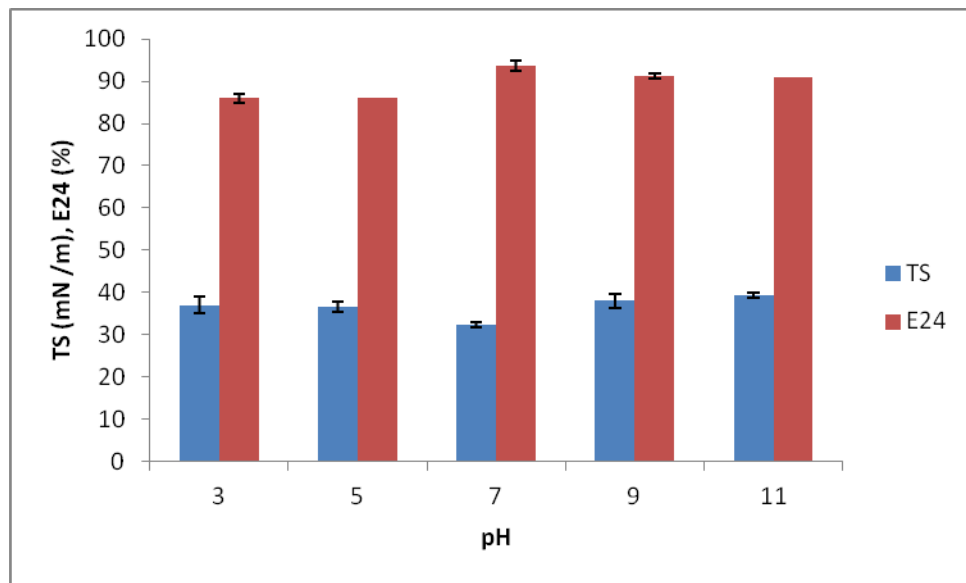


Figure 3. 9 : Effet du pH du milieu sur la production des biosurfactants par la souche 1J (SC=huile d'olive)

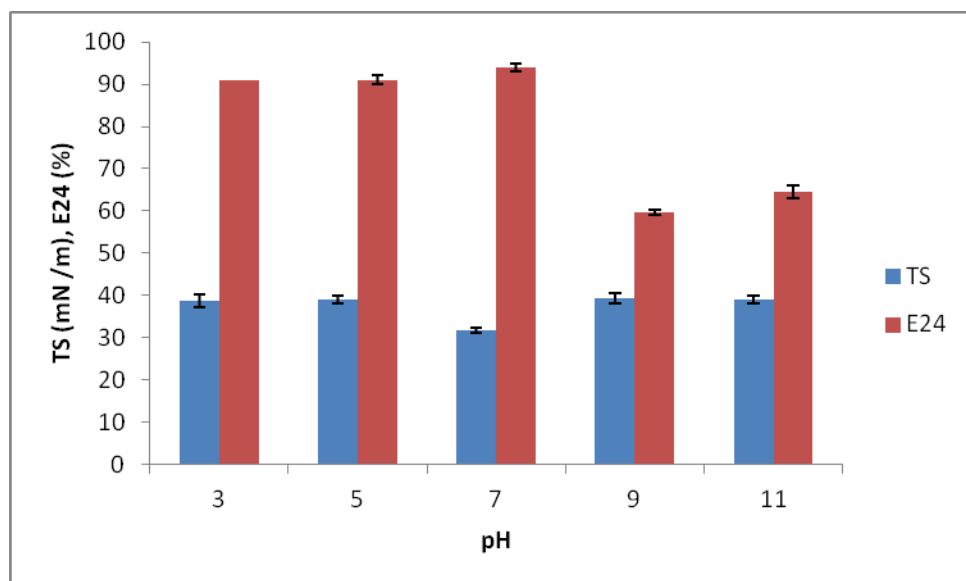


Figure 3.10: Effet du pH du milieu sur la production des biosurfactants par la souche 1J (SC= margine)

Nos résultats montrent que la production des biosurfactants est maximale lorsque le pH du milieu est neutre ou proche de la neutralité, la production de biosurfactants diminue en allant vers des pH acides ou basiques.

Desai et Banat [13] ont indiqué que pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. À des pH inférieurs ou supérieurs, la production des biosurfactants chute rapidement. D'autres souches comme *Nocardia corynbacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0. Gobbert *et al.* [120] ont montré que suivant le pH, les rhamnolipides produits avaient une structure différente et s'organisaient différemment. Par exemple, à un pH de 5,5, la structure est de forme lamellaire alors qu'à des pH supérieurs, des vésicules sont formées. Le pH du milieu joue un rôle important dans la production de sophorolipides.

La concentration en sel influence sur la production des biosurfactants, les résultats obtenus montrent que le maximum de la production est obtenu à 1% de NaCl avec l'huile d'olive comme source de carbone (TS = 32 mN /m), alors qu'avec la margine le maximum de production est obtenue lorsque la concentration de NaCl égale à 2% (TS = 30 mN /m). La relation est inversement proportionnelle, car lorsque la concentration en sel augmente, la production des biosurfactants diminue.

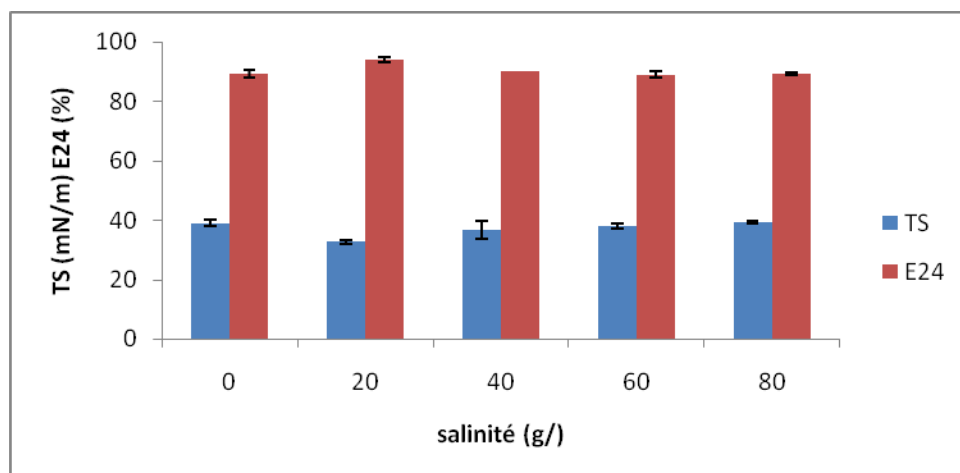


Figure 3.11: Effet de la salinité sur la production des biosurfactants par la souche 1J avec (SC= huile d'olive)

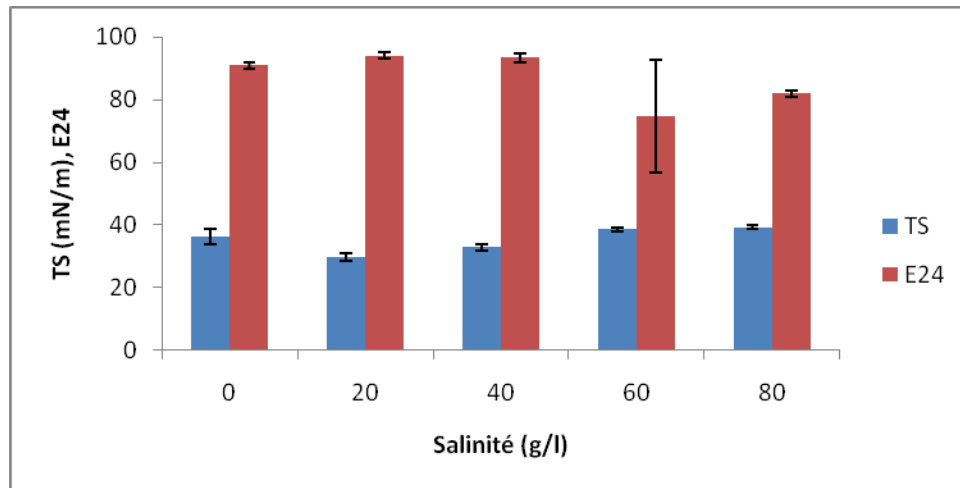


Figure 3.12 : Effet de la salinité sur la production des biosurfactants par la souche 1J (SC=margine)

La souche *Halomonas* sp. ANT3b par exemple est capable de produire un glycolipide dans un milieu de base contenant 24 g/l de NaCl et avec 2% (v/v) d'hexadécane comme source de carbone [38]. Deux souches *Halovivax* sp. A21 et *Haloarcula* sp. D21 sont capables de produire des biosurfactants en présence de 125 g/l de NaCl et 160 g/l de MgCl<sub>2</sub>. L'émulsion a été stable en présence de concentrations en NaCl allant de 100 jusqu'à 350 g/l [45].

### 3.3. Caractérisation des biosurfactants produits par la souche 1J

#### 3.3.1. Aspect et consistance des biosurfactants de la souche 1J

Les biosurfactants produits par la souche 1J diffèrent dans leur aspect. A l'œil nu on remarque qu'en utilisant l'huile d'olive comme source de carbone, le biosurfactant est un liquide visqueux d'une couleur de miel ayant une odeur caractéristique, tandis que celui produit à partir de la margine comme source de carbone est un liquide ressemblant à du caramel dans sa couleur brun foncé et sa consistance moue à température ambiante et dure dans un endroit frais ayant une odeur caractéristique (figure 3.13).

Le rendement en biosurfactant obtenu est de 1,5 g/l pour le biosurfactant produit par l'huile d'olive et 0,23 g/l pour le biosurfactant produit par la margine.

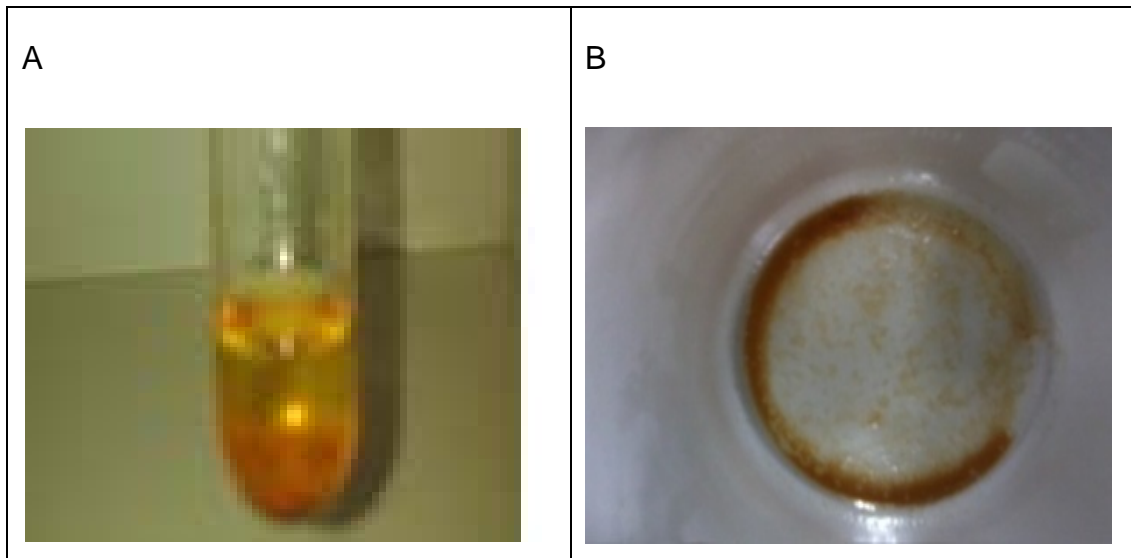


Figure 3.13 : Biosurfactants récupérés après l'extraction (A : SC = huile d'olive:  
B : SC= margine)

### 3.3.2. Analyse FTIR (Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy)

La spectroscopie d'absorption d'infrarouge permet de connaître la nature des différents groupements chimiques présents dans les biosurfactants de la souche 1J et donc de prédire leurs structures.

Les spectres obtenus pour les deux biosurfactants produits par la souche 1J en utilisant l'huile d'olive et la margine comme sources de carbone sont regroupés dans la figure suivante (figure 3.14).

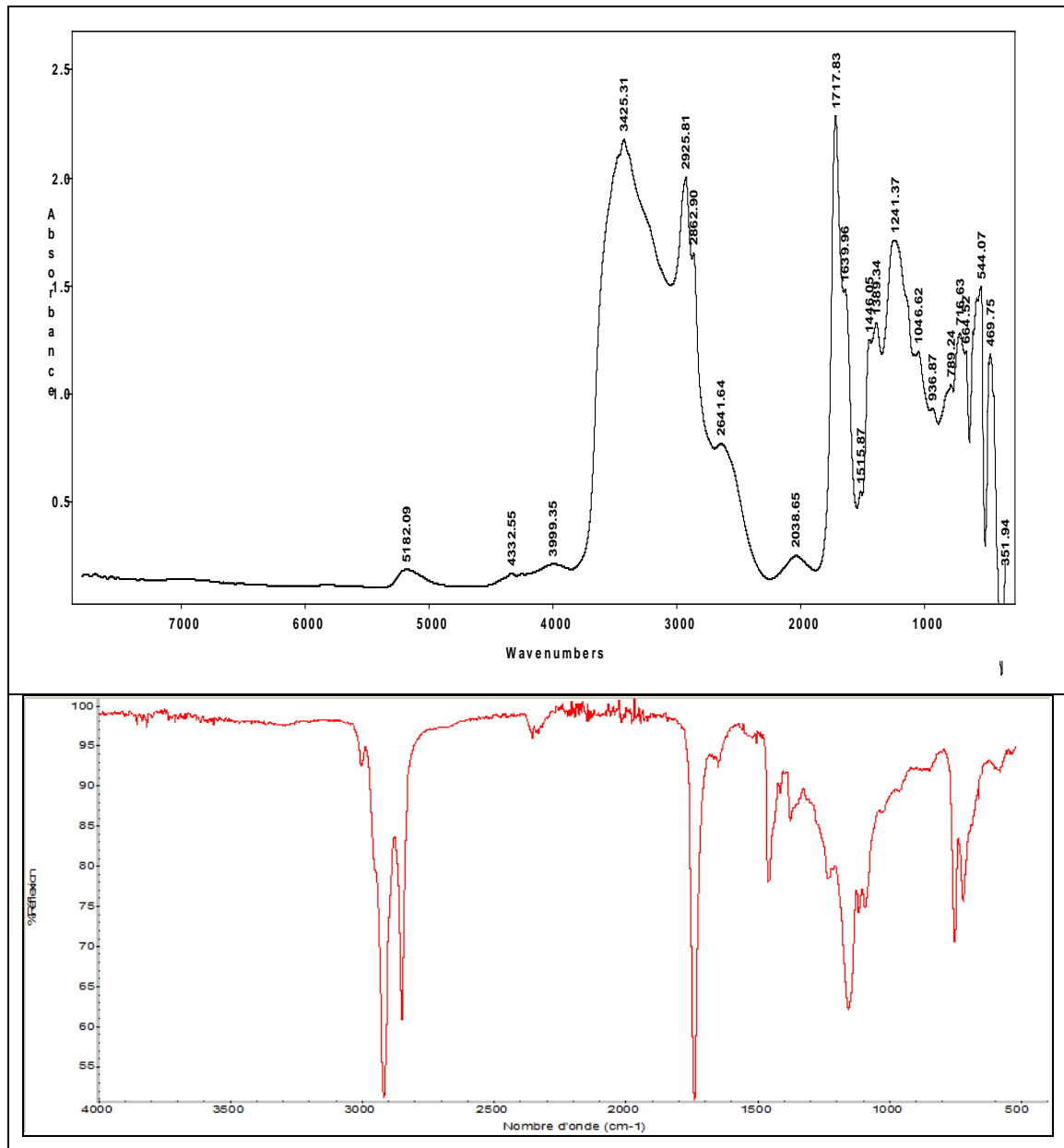


Figure 3.14 : Spectres de FTIR des biosurfactants de la souche 1J

La composition moléculaire des biosurfactants évaluée par FTIR a révélé la présence de plusieurs bandes provenant de la contribution des différents groupes fonctionnels appartenant à des lipides, des protéines et d'autres.

- La bande d'absorption de  $3425\text{ cm}^{-1}$  résulte des vibrations d'élongation des liaisons N–H dans les amides pour le biosurfactant produit en utilisant la margine comme source de carbone.

- Les bandes d'absorption de  $2922\text{ cm}^{-1}$  et  $2852\text{ cm}^{-1}$  ont été assignées à la vibration d'étirement des groupes des aliphatiques  $\text{CH}_x$  pour les deux types de biosurfactants.
- La bande de haute absorbance située à  $1717\text{ cm}^{-1}$  correspond aux vibrations d'élongation des liaisons  $\text{C}=\text{O}$  dans les esters, aldéhydes ou l'acide carboxylique. L'absorbance dans cette région signifie la présence de groupement carbonyle dans la partie peptidique de la molécule,
- Deux bandes à  $1446\text{ cm}^{-1}$  et  $1389\text{ cm}^{-1}$  sont dues à l'absorption des vibrations  $\text{CH}$  et aux déformations des groupes  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ .
- Les bandes à  $1241\text{ cm}^{-1}$  et de  $1046\text{ cm}^{-1}$  ont été affectées aux liaisons  $(\text{CO})$  et  $(\text{CN})$  qui s'étendent par vibration.

Les deux biosurfactants produits par la souche 1J peuvent être de nature glycolipidique. D'autres moyens analytiques comme la LC-MS et l'analyse RMN seront nécessaires pour confirmer l'exactitude de la nature des biosurfactants.

### 3.3.3. Détermination de la concentration micellaire critique

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.15.

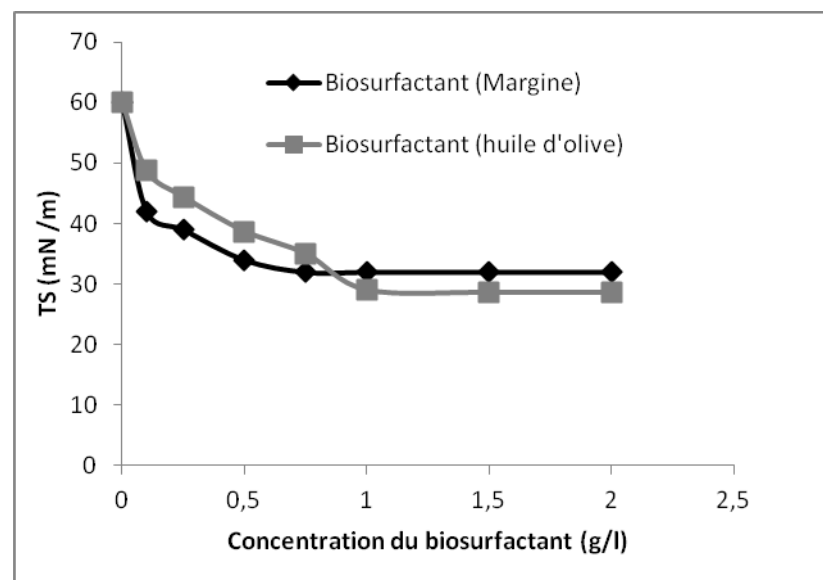


Figure 3.15 : la CMC des biosurfactants produits par la souche 1J

Les résultats expérimentaux montrent que la tension de surface garde une valeur constante ( $32 \text{ mN.m}^{-1}$ ) lorsque la concentration du biosurfactant produit en utilisant la margine comme source de carbone est supérieure ou égale à  $750 \text{ mg/l}$ . donc c'est la CMC de ce biosurfactant (=  $750 \text{ mg/l}$ ) tandis que la tension de surface reste constante ( $29 \text{ mN.m}^{-1}$ ) lorsque la concentration du biosurfactant produit en utilisant l'huile d'olive comme source de carbone est supérieure ou égale à  $1000 \text{ mg/l}$ , donc, la CMC de ce dernier biosurfactant est de  $1000 \text{ mg/l}$ .

Des résultats similaires ont été rapportés par [48], la CMC du biosurfactant de la souche *Staphylococcus haemolyticus* 1E est de  $750 \text{ mg/l}$ . cependant, des CMC faibles ont été obtenues pour des biosurfactants produits par *Ochrobactrum* sp. 1C et *Brevibacterium* sp. 7G est  $5 \text{ mg/ml}$  et  $2 \text{ mg/ml}$  respectivement [39]. La souche *B. licheniformis* MS3 produit un biosurfactant en utilisant le pétrole ( $1\% \text{ v/v}$ ) comme source de carbone, la tension de surface était  $38 \text{ mN/m}$  et la CMC du biosurfactant pur est de  $15 \text{ mg/ml}$  [122].

#### 3.3.4. Pouvoir émulsifiant

L'activité émulsifiante des biosurfactants produits par la souche 1J a été testée contre l'huile d'olive, l'huile de moteur, l'huile de tournesol, l'huile de soja et le pétrole brut. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3.8.

Tableau 3.8 : Pouvoir émulsifiant des biosurfactants produits par la souche 1J

	Bios-1J- huile d'olive <sup>(3)</sup>	Bios-1J- Margine <sup>(4)</sup>
Huile d'olive	63	70
Huile de moteur	95	60
Huile de tournesol	40	50
Huile de soja	20	10
Pétrole brut	80	80

Avec :

(3) : biosurfactant produit par la souche 1J à partir de l'huile d'olive.

(4): biosurfactant produit par la souche 1J à partir de la margine.



Les valeurs de l'activité émulsifiante, traduites par l'indice  $E_{24}$ , des biosurfactants montrent :

- une excellente activité émulsifiante est obtenue avec l'huile de moteur pour le Bios-1J- huile d'olive (95%).
- une activité émulsifiante très importante enregistrée avec le pétrole brut pour les deux biosurfactants (80%).
- une activité émulsifiante importante avec l'huile d'olive d'où nous avons enregistré 63% pour Bios-1J- huile d'olive et 70% pour Bios-1J-Margine.
- Enfin, le Bios-1J-Margine a eu une bonne émulsification avec l'huile de tournesol, ce qui va justifier notre choix de ce dernier comme ingrédient principal dans la préparation de la sauce mayonnaise.

Mukesh *et al.* [108] ont rapporté que l'indice d'émulsification diffère selon la nature du biosurfactant et du microorganisme producteur et que l'activité d'émulsification du biosurfactant produit par *Bacillus* spp., testée avec différents hydrocarbures, a montré que l'indice le plus élevé a été obtenu avec l'huile de maïs, suivi par le kérosène et l'huile de tournesol.

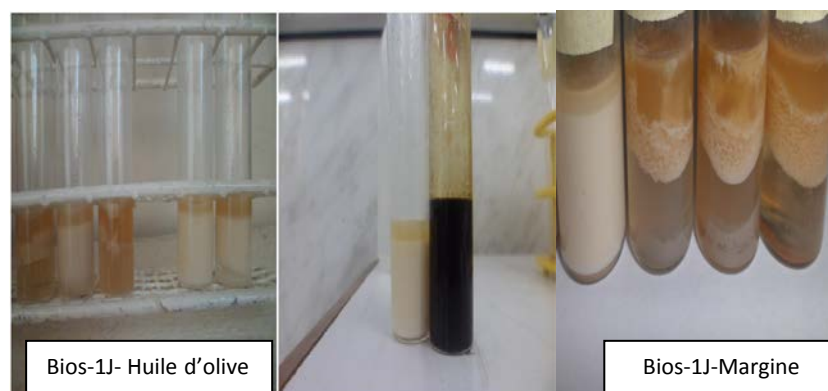


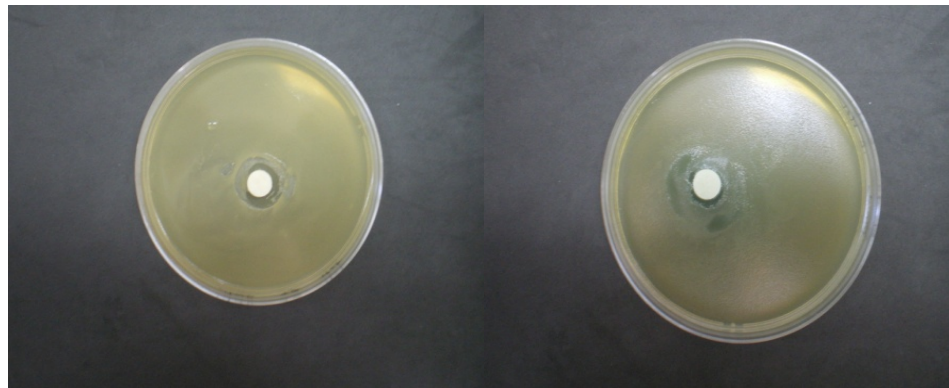
Figure 3.16 : le pouvoir émulsifiant des deux biosurfactants

Les résultats obtenus montrent la possibilité d'utiliser les deux biosurfactants comme agents émulsifiants.

Tabatabaee *et al.* [121] avaient réussi le test d'émulsification avec 23 souches de *Bacillus licheniformis* pour le kérosène, dont la capacité d'émulsification était de 70%.

### 3.3.5. Pouvoir antimicrobien

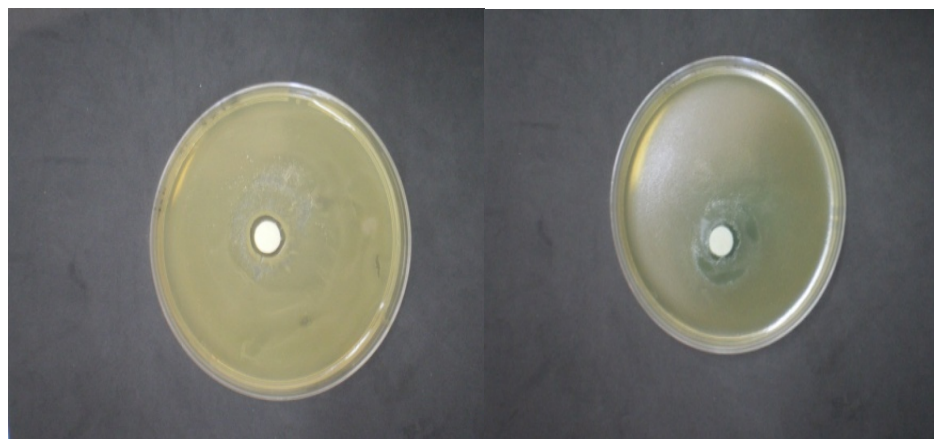
L'antibiogramme réalisé sur les espèces de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* montre le pouvoir inhibiteur des biosurfactants produits à partir de la souche 1J (figure 3.17 et 3.18). Seulement, où il apparaît une zone claire autour du disque (tableau 3.9) qui signifie l'absence de croissance dans cette zone à cause de la diffusion des molécules du biosurfactant.



*Staphylococcus aureus*

*Pseudomonas aeruginosa*

Figure 3.17: Effet inhibiteur du Bios-1J-huile d'olive sur la croissance de deux espèces cibles



*Staphylococcus aureus*

*Pseudomonas aeruginosa*

Figure 3.18: Effet inhibiteur du Bios-1J- margine sur la croissance de deux espèces cibles

Tableau 3.9 : Pouvoir antimicrobien des biosurfactants produits par la souche 1J

	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Bio-1J-huile d'olive	15	13,5
Bio-1J- margine	20	18

Une large gamme antimicrobienne des surfactants sur *Escherichia coli* et *Lactococcus lactis* a été publiée et les deux espèces étaient inhibées par le même biosurfactant [97]. Un lipopeptide produit par *Brevibacterium aureum* MSA13 a montré un large spectre d'activité contre les souches pathogènes, y compris *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis* [33].

### 3.3.6. Etude de la stabilité des biosurfactants

#### 3.3.6. 1. Stabilité des biosurfactants vis-à-vis la température

Les deux biosurfactants produits par la souche 1J présentent une excellente stabilité dans la gamme de température allant de 4 à 70 °C. Une légère augmentation de la tension de surface est observée à T= 70 °C pour le biosurfactant produit en utilisant la margine comme source de carbone.

Les résultats sont illustrés dans la figure 3.19.

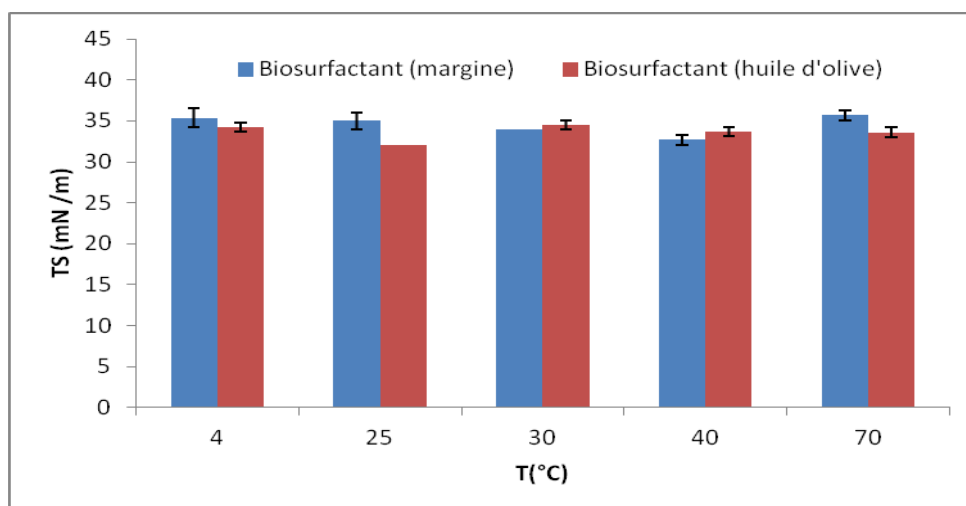


Figure 3.19: Effet de la température sur la stabilité des biosurfactants produits par la souche 1J

En comparaison avec les tensioactifs synthétiques, tels que le SDS qui présente une perte significative de l'activité d'émulsification à partir de 70 °C [98]. Ces résultats montrent que les deux biosurfactants produits sont considérés comme d'excellents produits thermostables, ce qui favorise leur utilisation dans l'industrie et sous différentes conditions de température.

Les résultats obtenus par Cameotra et Makkar [54] indiquent que l'exposition du biosurfactant produit par une souche bactérienne (désignée par isolat 1165), à des températures extrêmes [0, 4, 100 et 120 °C] n'affecte pas la stabilité thermique du biosurfactant. D'autre part, Deleu et Paquot [82] ont observé que la tension de surface conserve sa stabilité après l'exposition du biosurfactant produit par la souche *Bacillus subtilis* à une température de 100 °C.

### 3.3.6. 2. Stabilité des biosurfactants vis-à-vis la salinité

Les résultats sont illustrés dans la figure 3.20.

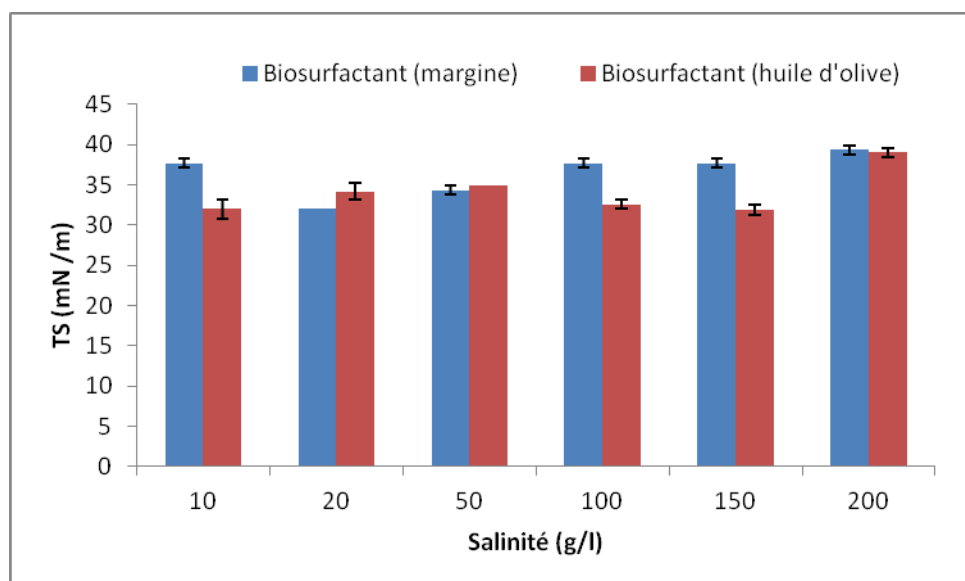


Figure 3.20: Effet de la salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par la souche 1J

Les deux biosurfactants produits par la souche 1J montrent une stabilité remarquable dans les milieux salés. Le biosurfactant synthétisé en utilisant la margine comme source de carbone est stable jusqu'à 100 g/l en sel. Une légère augmentation de la tension de surface est remarquée lorsque la concentration en sel est supérieure à 100 g/l. Par contre le biosurfactant synthétisé en utilisant

l'huile d'olive comme source de carbone garde ses propriétés tensioactives jusqu'à 150 g/l en sel.

Selon Desai et Banat [13], des concentrations en sel supérieures à 20 g/l sont suffisantes pour inactiver les tensio-actifs synthétiques. Nos résultats expérimentaux qualifient l'utilisation potentielle de biosurfactants de la souche 1J dans les domaines environnemental et industriel.

Prieto *et al.* [109] ont signalé que le biosurfactant produit par la souche *Pseudomonas aeruginosa* forme des émulsions stables à des faibles concentrations de NaCl (5 g/l). La stabilité de l'émulsion en présence de sel a été rapportée comme l'une des propriétés du biosurfactant produit par la souche *Bacillus licheniformis* JF-2 [122]. Il a été trouvé que le biosurfactant produit par *Nocardiopsis* est stable jusqu'à 80 g/l de NaCl.

### 3.3.6.3. Stabilité des biosurfactants vis-à-vis le pH

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.21.

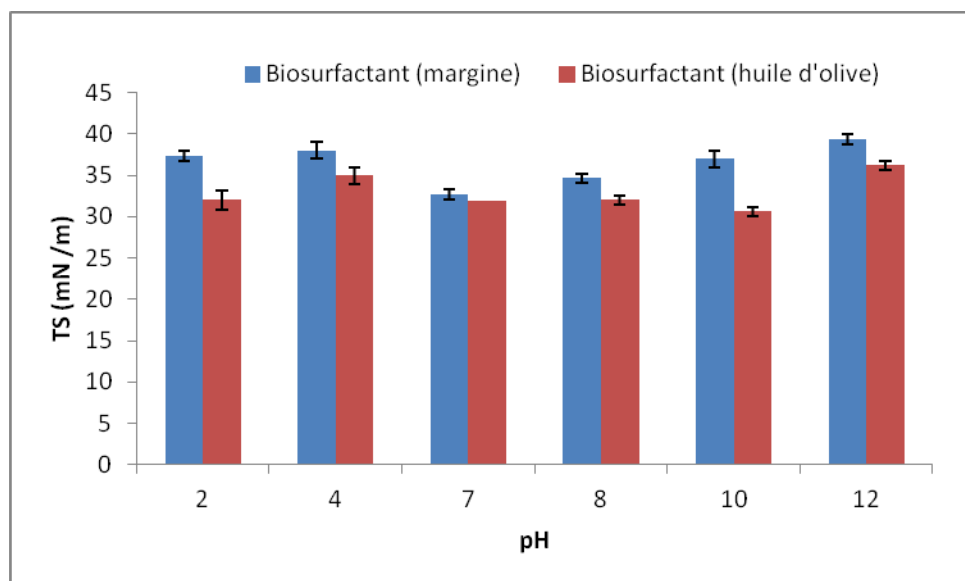


Figure 3.21 : Effet du pH sur la stabilité des deux biosurfactants produits par la souche 1J

Les résultats obtenus indiquent que ces deux biosurfactants présentent une très bonne stabilité dans les milieux acides et basiques dans une gamme de pH variant de 2 à 12. Une valeur presque constante de la tension de surface dans cet intervalle, ce qui favorise son utilisation dans l'industrie.

Haddad *et al.* [119] ont trouvé qu'un pH acide (pH = 4) influe sur l'activité de biosurfactant avec une perte de l'ordre de 8 mN/m. En variant le pH de 2 à 12, le biosurfactant produit par la souche *Staphylococcus haemolyticus* 1E garde son activité tensioactive (30 – 31,5 mN/m) [48]. Egalement, les travaux réalisés par Lee *et al.* [118] ont montré que le biosurfactant issu de la souche *Candida lipolytica* présente une bonne résistance (TS = 33,8 mN/m) dans les milieux acides (pH = 2), cependant une légère augmentation de la TS (35,1 mN/m) a été enregistrée dans les milieux alcalins (pH = 12).

#### 3.4. Identification de la souche bactérienne 1J

Les résultats des tests morphologiques et biochimiques sont représentés dans le tableau 3.10 et 3.11.

Tableau 3.10 : Caractères microscopiques de la souche 1J

Critères Souche	Après Coloration de GRAM		
	Forme	Gram	Mobilité
1J	Bacilles	Positif	Mobile

L'observation microscopique a été réalisée après la coloration de Gram (Appendice I), elle est visualisée sur la figure 3. 22.



Figure 3.22 : Aspect microscopique de la souche 1J (GX40)

Tableau 3.11 : Résultats des tests biochimiques après lecture de l'API CH 50

	Abréviations	Sucre	Après 48 h		Abréviations	Sucre	Après 48 h
0	0	Témoin	Négatif	31	SAC	D-Saccharose	Positif
1	GLY	Glycérol	Positif	32	TRE	D-Tréhalose	Positif
2	ERY	Erythritol	Négatif	33	INU	Inuline	Négatif
3	DARA	D-Arabinose	Négatif	34	MLZ	D-Mélézitose	Négatif
4	LARA	L-Arabinose	Positif	35	RAF	D-Raffinose	Négatif
5	RIB	D-Ribose	Positif	36	AMD	Amidon	Positif
6	DXYL	D-Xylose	Positif	37	GLYG	Glycogène	Positif
7	LXYL	L-Xylose	Négatif	38	XLT	Xylitol	Négatif
8	ADO	D-Adonitol	Négatif	39	GEN	Gentiobiose	Positif
9	MDX	Méthyl-βD-Xylopyranoside	Négatif	40	TUR	D-Turanose	Positif
10	GAL	D-Galactose	Positif	41	LYX	D-Lyxose	Négatif
11	GLU	D-Glucose	Positif	42	TAG	D-Tagatose	Positif
12	FRU	D-Fructose	Positif	43	DFUC	D-Fucose	Négatif
13	MNE	D-Mannose	Positif	44	LFUC	L-Fucose	Négatif
14	SBE	L-Sorbose	Négatif	45	DARL	D-Arabitol	Négatif
15	RHA	L-Rhamnose	Négatif	46	LARL	L-Arabitol	Négatif
16	DUL	Dulcitol	Négatif	47	GNT	Potassium Gluconate	Positif
17	INO	Inositol	Négatif	48	2KG	Potassium 2-CétoGluconate	Négatif
18	MAN	D-Mannitol	Positif	49	5KG	Potassium 5-CétoGluconate	Négatif
19	SOR	D-Sorbitol	Positif	31	SAC	D-Saccharose	Positif
20	MDM	Méthyl-αD-Mannopyranoside	Négatif	32	TRE	D-Tréhalose	Positif
21	MDG	Méthyl-αD-Glucopyranoside	Positif	33	INU	Inuline	Négatif
22	NAG	AcétylGlucosamine	Positif	34	MLZ	D-Mélézitose	Négatif
23	AMY	Amygdaline	Positif	35	RAF	D-Raffinose	Négatif
24	ARB	Arbutine	Positif	36	AMD	Amidon	Positif
25	ESC	Esculine	Positif	37	GLYG	Glycogène	Positif
26	SAL	Salicine	Positif	38	XLT	Xylitol	Négatif
27	CEL	D-Cellobiose	Positif	39	GEN	Gentiobiose	Positif
28	MAL	D-Maltose	Positif	40	TUR	D-Turanose	Positif
29	LAC	D-Lactose	Négatif	41	LYX	D-Lyxose	Négatif
30	MEL	D-Melibiose	Négatif	42	TAG	D-Tagatose	Positif

Selon la macro et micromorphologie, les caractères biochimiques de la souche bactérienne 1J, et surtout selon le tableau d'identification de la galerie biochimique API CH 50, la souche bactérienne 1J a été affiliée à l'espèce *Bacillus licheniformis* avec un pourcentage de similitude de 98%.

### 3.5. Essai d'application du biosurfactant dans le domaine agroalimentaire

Les analyses physico-chimiques, organoleptiques et sensorielles ont été réalisées sur les 04 échantillons de la sauce mayonnaise. Ces analyses permettront d'apprécier la qualité des produits à travers les paramètres suivants:

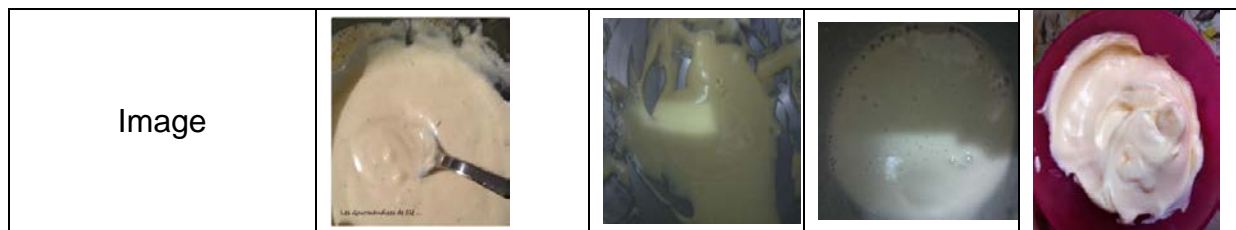
#### 3.5.1. L'évaluation organoleptique des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés

Les résultats sont illustrés dans le tableau 3.12.

Tableau 3.12: Evaluation organoleptique des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés

Echantillons Analyses organoleptiques	1	2	3	4
Aspect (visuel)	Liquide visqueux émulsionné brillant et homogène	Liquide visqueux émulsionné et homogène	Liquide moins visqueux émulsionné et homogène	Liquide visqueux émulsionné et homogène
Saveur (gustative)	Lisse Grasse et légèrement acide	Peu lisse Grasse et légèrement acide	Grasse peu lisse et légèrement acide	Grasse onctueuse et légèrement acide
Odeur (olfactive)	Caractéristique de la mayonnaise et exempte d'odeur étrangère	Caractéristique de la mayonnaise et exempte d'odeur étrangère	Franche et caractéristique de la mayonnaise	Franche et caractéristique de la mayonnaise
Couleur (visuelle)	blanc crémeux à jaune pâle	Jaune foncé	blanc crémeux à jaune pâle	Jaune clair





1 : Mayonnaise contenant le Biosurfactant produit de la souche 1J à partir de la margine comme source de carbone sans conservateurs ni acide citrique ;

2 : Mayonnaise contenant le Biosurfactant produit de la souche 1J à partir de la margine comme source de carbone avec conservateurs et acide citrique;

3 : Mayonnaise industrielle sans conservateurs ni acide citrique ;

4 : Mayonnaise commerciale « SIDNA ».

Sur la base des données de l'évaluation organoleptique, il convient de noter que les échantillons 1, 2 et 4 ne se différencient par la meilleure apparence et consistance (viscosité, homogénéité) par rapport au 3<sup>ème</sup> échantillon qui est moins visqueux, aussi que pour la texture uniforme et le goût agréable. La couleur est caractéristique de chaque échantillon.

Les émulsions de la mayonnaise préparées se distinguent par de fortes valeurs des indicateurs organoleptiques qui répondent aux exigences de la documentation technique du produit de référence « mayonnaise commerciale de marque SIDNA ». Les mayonnaises contenaient des proportions équilibrées de sel, vinaigre et assaisonnement (moutarde) qui a contribué à leur goût.

Le panel de dégustation a permis d'identifier les critères généralement utilisés pour apprécier les sauces mayonnaises qui devront servir à diverses préparations culinaires. Les critères généralement utilisés sont la couleur (jaune idéal de la mayonnaise), le goût (moins acide et moins salé), la consistance, et accessoirement l'arôme et l'odeur. Les deux critères les plus déterminants sont la saveur et la couleur, ce sont les deux paramètres qui orientent le choix d'une mayonnaise de qualité parmi un lot.

Le tableau 3.10 résume les paramètres de qualité tels que perçus par le panel de dégustation. La consistance de la mayonnaise est aussi un critère de qualité diversement apprécié. De ces résultats nous concluons que le biosurfactant de la souche 1J introduit dans la mayonnaise du premier échantillon « Bios-1J sans conservateurs ni acide citrique » a un rôle d'émulsifiant (facilite la fine dispersion de deux ou plusieurs phases non miscibles) et d'un épaississant (augmente la viscosité des phases liquides des aliments). Ces résultats seront confirmés ultérieurement dans la section 3.5.3. (caractérisation rhéologique).

### 3.5.2. Les principaux indicateurs de la qualité des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés

#### 3.5.2.1. Indicateurs physico- chimiques

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 3.13.

Tableau 3.13 : Les principaux indicateurs physico-chimiques de la qualité des échantillons de la mayonnaise étudiés

Echantillons	1	2	3	4
Analyses Physico- chimiques				
Fraction de la masse de Graisse (%)	45	45	50	55
Fraction de la masse d'extrait sec (%)	84	84	84	84

1 : Mayonnaise contenant le Biosurfactant produit de la souche 1J à partir de la margine sans conservateurs ni acide citrique ;

2 : Mayonnaise contenant le Biosurfactant produit de la souche 1J à partir de la margine avec conservateurs et acide citrique ;

3 : Mayonnaise industrielle sans conservateurs ni acide citrique ;

4 : Mayonnaise commerciale « SIDNA ».

Les résultats obtenus révèlent qu'il n'y a aucune différence significative trouvée dans la teneur des trois premiers échantillons en extrait sec et matière

grasse. Ces résultats sont en accord avec les résultats démontrés sur la fiche technique du produit de référence de la sauce mayonnaise commerciale « SIDNA » (tableau 3.13). Selon Hou-Pin *et al.* [124] la teneur en solides est de 83,44% pour une mayonnaise riche en matière grasse (73% de matière grasse).

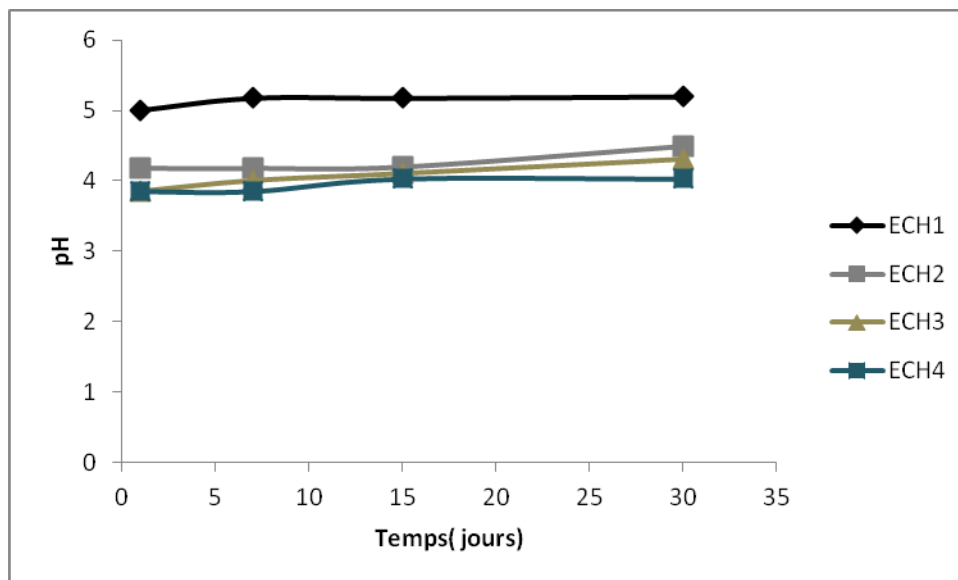


Figure 3.23 : la variation du pH des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés

Le pH de la mayonnaise peut avoir un effet dramatique sur l'effet de la structure de l'émulsion. Il est à noter que le pH relativement faible ( $\text{pH} < 4,3$ ) est un avantage du point de vue de la stabilité de la mayonnaise. Selon Maruyama *et al.* [103], la mayonnaise est stable à un pH allant de 3 à 5 et une acidité titrable allant de 0,2 à 0,5.

Les résultats obtenus montrent que la comparaison entre les quatre échantillons indique que la valeur du pH de la première mayonnaise qui contient seulement le Bios-1J est élevée par rapport au produit de référence « SIDNA ». Après 30 jours de stockage, la mayonnaise commerciale a enregistré une stabilité du pH, ainsi que pour les deux échantillons 2 et 3 à chaque période de stockage. Par contre le premier échantillon a enregistré une légère augmentation du pH pendant les 30 jours ( $\text{pH} > 5$ ) (figure 3.23). Ceci exige l'ajout de régulateurs d'acidité comme l'acide citrique.

Selon Depree et Savage [125], la viscoélasticité et la stabilité de la mayonnaise doit être à son maximum lorsque le pH est proche du point isoélectrique des protéines du

jaune d'œuf, et donc la charge sur les protéines est réduite au minimum. Si les protéines à la surface des gouttelettes étaient hautement chargées, ce qui empêcherait toute autre protéine à partir de l'absorption et également provoquer des gouttelettes pour repousser les uns les autres, ce qui empêche la floculation. Ces deux facteurs ont tendance à conduire à une émulsion avec faible viscosité et de stabilité inférieure. En outre, Maruyama *et al.* [103] ont constaté que la viscoélasticité de la mayonnaise était la plus élevée à un pH de 3,9.

Nous avons vérifié les différences du pH entre les échantillons de la mayonnaise à travers le recours à une analyse de la variance one-way anova. Les résultats montrent la présence d'une différence hautement significative ( $p=6,578 \cdot 10^{-7}$ ,  $p < 0,01\%$ ) des pH en fonction des échantillons. Le test de Tukey à travers la comparaison par paire (tableau 5 Appendice J) désigne une gradation de différence entre les pH.

D'autre part les résultats de la variation temporelle du potentiel d'hydrogène montrent l'absence d'une différence significative (test one way anova,  $p=0,863$ ,  $p > 5\%$ ) (Tableau 6 Appendice J).

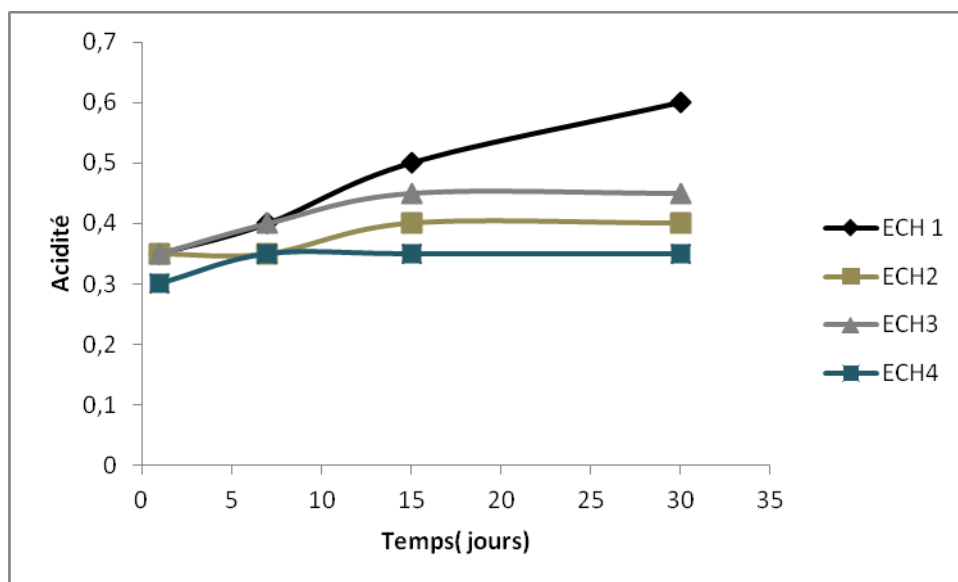


Figure 3.24 : la variation de l'acidité titrable des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés

Quant à l'acidité titrable, les mêmes résultats ont été enregistrés pour la mayonnaise du premier échantillon, car elle atteint une valeur de 0,6 qui dépasse l'intervalle de référence (0,2 à 0,5) [103] après une période de stockage de 30 jours.

Ces résultats confirment la nécessité de l'ajout des correcteurs d'acidité dans la mayonnaise témoignant ainsi l'acceptation du produit.

Selon Byrlacov *et al.* [126], les acides gras libres peuvent être produits par l'oxydation de doubles liaisons d'acides gras insaturés et les esters d'acide. Dans les stades avancés de l'oxydation des acides gras libres à faible poids moléculaire ont été développés par l'accumulation de produits de clivage acides et ont ensuite augmenté l'indice d'acidité. Cette oxydation a pu se produire à l'aide d'enzymes d'oxydation et de la présence d'une proportion d'oxygène de l'air dans l'espace et incorporé dans la mayonnaise. Comme c'est le cas avec tous les produits alimentaires contenant des matières grasses. La mayonnaise est sensible à la détérioration par l'auto-oxydation des lipides insaturés et poly-insaturés dans l'huile.

Les résultats de comparaison des valeurs moyennes d'acidité des échantillons par le test one way anova stipulent la présence d'une différence marginalement significative ( $p= 0,08236$ ), cette significativité est désignée spécialement par une différence d'acidité entre E1 et E4 (tableau7 Appendice J).

D'autre part la variation temporelle de l'acidité ne désigne pas une différence significative, les résultats sont confirmés par l'analyse de la variance (test one way anova,  $p=0,1239$ ,  $P> 5\%$ ) (tableau 8 Appendice J).

Les résultats obtenus par l'analyse statistique nous oblige à dire qu'une conservation à long terme pourra faire une différence significative vis-à-vis le pH et l'acidité.

### 3.5.2.2. Indicateurs microbiologiques

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 3.14.

Tableau 3. 14 : Analyses microbiologiques des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés

Echantillons Analyses microbiologiques	1	2	3	4	Normes
Germes aérobies mésophiles totaux	$3 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10$	10	$3 \cdot 10^5 - 10^6$ dans 1 g
Coliformes totaux	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Staphylococcus aureus	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence dans 1g
<i>Salmonella</i>	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence dans 1g
Levures et moisissures	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence dans 1g

1 : Mayonnaise contenant le Biosurfactant produit de la souche 1J à partir de la margine sans conservateurs ni acide citrique ;

2 : Mayonnaise contenant le Biosurfactant produit de la souche 1J à partir de la margine avec conservateurs avec acide citrique ;

3 : Mayonnaise industrielle sans conservateurs ni acide citrique;

4 : Mayonnaise commerciale « SIDNA ».

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

Pour les 04 échantillons de la mayonnaise, l'analyse des coliformes totaux et des levures et moisissures n'a révélé la présence d'aucun germe alors que la norme en tolère 10 par gramme de la mayonnaise. Ceci témoigne d'un bon niveau d'hygiène pour la préparation de la sauce mayonnaise. Quant à la flore aérobie mésophile totale, l'analyse a révélé respectivement moins de 30 microorganismes par gramme de mayonnaise, contre 300 par gramme de produit, tolérés par la norme.

L'absence de la flore microbienne dans les mayonnaises 2 et 4 est peut être due au pH acide, à la teneur élevée en matière grasse, sans oublier la présence des

conservateurs. Le mélange de benzoate de sodium et sorbate de potassium ayant un meilleur effet contre le développement des levures et moisissures, les acétobacters et lactobacilles que les deux composants individuellement, ajoutant les bactéries qui peuvent se prolifèrent dans les ingrédients de la mayonnaise, malgré que la première mayonnaise dépourvue de conservateurs, notre biosurfactant a prouvé son efficacité en tant qu'n agent antimicrobien, donc il a bien confirmé son rôle de « conservateur ».

### 3.5.3. Caractérisation rhéologique des émulsions étudiées

Les résultats des caractéristiques rhéologiques étudiées sont présentés dans la Figure 3.25.

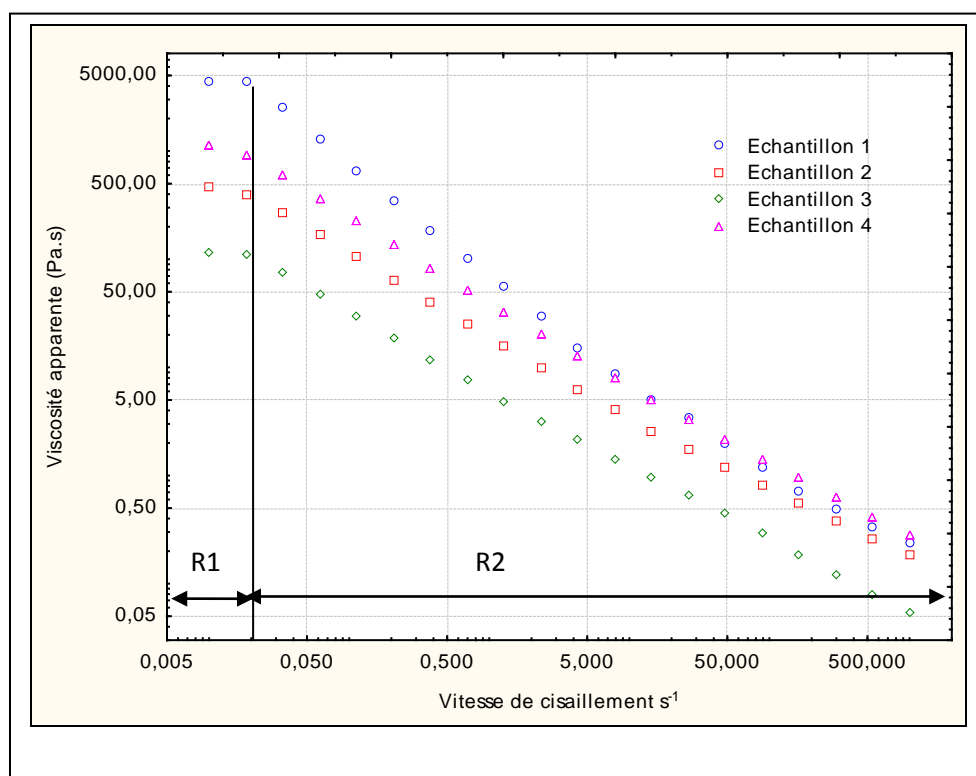


Figure 3.25 : évolution de la viscosité apparente des échantillons de la sauce mayonnaise étudiés en fonction de la vitesse de cisaillement à T= 22°C  
Avec : R1 : région Newtonienne ; R2 : région non- Newtonienne.

Le rhéogramme montre l'existence de deux comportements distincts :

-Comportement 1 :

Formation d'un pallier correspondant à la première région Newtonienne cela s'explique par une viscosité constante donc le comportement est Newtonien. Absence de contrainte seuil qui se manifeste par une viscosité infinie.

Les quatre mayonnaises sont susceptibles de subir une instabilité physique.

#### -Comportement 2 :

Au-delà d'une certaine vitesse de cisaillement ( $0,02 \text{ S}^{-1}$ ), une chute de la viscosité est enregistrée ce qui correspond à un comportement rhéofluidifiant.

#### Comportement 3 :

On note l'absence de la troisième région Newtonienne auquel cas la viscosité devient constante et à très fort cisaillement.

Nous observons que le degré de changement de la viscosité apparente dépend du gradient de la vitesse de cisaillement et de l'échantillon à analysé. De cela nous concluons que la viscosité effective des émulsions de la mayonnaise est commune dans les échantillons étudiés  $5000 \text{ Pa.s}$  à  $22^\circ\text{C}$  pour un taux de cisaillement de  $1000 \text{ s}^{-1}$ .

Les produits au repos ont un comportement liquide à cause de la région Newtonienne. Le produit qui résiste le plus à l'instabilité de la première région est l'échantillon 1 (loi de stokes).

$$V=(2r^2g \Delta\rho)/(9\eta)$$

Selon cette équation, la vitesse de cisaillement est influencée par le rayon des gouttelettes ( $r$ ), la force gravitationnelle ( $g$ ), la différence de densité entre les deux phases ( $\Delta\rho$ ) et la viscosité de la phase continue ( $\eta$ ).

En écoulement les échantillons 1, 2 et 4 se rejoignent en termes de viscosité et conservent mieux leurs propriétés sensorielles et technologiques (agitation, conditionnement,...etc.) avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement.

Nous constatons que la viscosité apparente des échantillons comparés diminue avec l'augmentation du gradient de la vitesse (vitesse de flottation), ce qui est typique pour les systèmes structurés. Par exemple, avec l'augmentation du gradient de la vitesse de  $0,01$  à  $1000 \text{ s}^{-1}$ , la viscosité apparente diminue de  $5000$  à  $0,30 \text{ Pa.s}$ . Cette diminution importante de la viscosité effective est conditionnée par



la destruction de la structure du produit. Ainsi la contrainte de cisaillement augmente et la viscosité apparente des émulsions de la mayonnaise est réduite à une certaine limite, en restant ensuite constante indépendamment des variations de la contrainte de cisaillement (la 3<sup>e</sup> région qui est absente dans notre cas). Une désintégration de la structure a eu lieu, les particules s'orientent dans la direction de l'écoulement, et la cohésion entre les particules de la phase dispersées s'affaiblie. Cette destruction de la structure du produit est conditionnée par la grandeur du gradient de la vitesse de cisaillement, ce qui est confirmé par les résultats des données rhéologiques de l'étude. Il est à noter que le gradient de la vitesse de cisaillement dépend principalement de la fréquence de rotation du dispositif de mélange.

Tandis que le troisième échantillon se démarque aux autres à l'écoulement et au repos engendrant une diminution de la viscosité de l'émulsion de la mayonnaise jusqu'à 0,05 Pa.s peut être cela est due au mal déroulement de la préparation du troisième échantillon.

En conclusion nous pouvons dire que la mayonnaise préparée à base de notre biosurfactant présente un produit de qualité rhéologique satisfaisante et très proche de celle obtenue avec la mayonnaise de référence de marque « SIDNA ».

## CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de ce présent travail, nous avons essayé d'apporter notre contribution à l'étude de la production, la caractérisation et l'application en agroalimentaire de biosurfactants issus d'une souche thermophile isolée à partir de sols contaminés de pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud (sud d'Algérie).

La première partie de l'étude s'est intéressée à un criblage des souches productrices de biosurfactants. Une souche bactérienne 1J thermophile (isolées à 45 °C) « dite performante » a été sélectionnée pour la production de biosurfactants avec un taux d'émulsification important et une baisse de la tension de surface.

Les résultats obtenus ont révélé que l'huile d'olive (1%, v/v) et la margine (0,5%, v/v) étaient les deux sources de carbone optimales avec des valeurs de la tension de surface de 31 et 32 mN /m, respectivement. Ainsi que l'azote sous forme de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  est la meilleure source d'azote pour une meilleure production.

La seconde partie de l'étude nous a permis d'évaluer l'efficacité des biosurfactants, issus de la souche 1J à partir des deux sources de carbone sélectionnées, en étudiant leurs caractéristiques physicochimiques et structurales, ainsi leurs applications en agroalimentaire. Les résultats obtenus ont montré que :

- une stabilité thermique sur une très large gamme de température (4 à 70 °C),
- les deux biosurfactants produits restent efficaces en présence d'ions  $\text{Na}^+$  (10 à 250 g/l) et pour tout l'intervalle du pH (2 à 12) ;
- la CMC était : 1000 et 750 mg l<sup>-1</sup> pour les deux biosurfactants produits par l'huile d'olive et la margine, respectivement ;
- les deux biosurfactants ont un pouvoir émulsifiant ainsi qu'une activité inhibitrice contre les espèces *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Finalement, une application de biosurfactant (Bio-1J-Margine) en agroalimentaire a été réalisée par la préparation d'une sauce mayonnaise, les résultats obtenus ont montré la possibilité d'utiliser ce dernier comme émulsifiant, épaississant et conservateur. A cet effet, les propriétés physico-chimiques, organoleptiques,

microbiologiques et rhéologiques de la mayonnaise préparée par notre biosurfactant sont similaires aux caractéristiques de la mayonnaise industrielle de marque « SIDNA ».

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

- Utilisation d'autres analyses et techniques (analyse biochimique et structurales par LC-MS et RMN) pour identifier les biosurfactants produits par la souche 1J.
- Elargir l'application de ces biosurfactants dans le domaine agroalimentaire comme émulsifiant et conservateur.
- Identification de la souche 1J par les outils de la biologie moléculaire.
- Approfondir l'étude rhéologique afin de mieux comprendre les interactions moléculaires entre les différents composants d'une mayonnaise type.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Campos, J.M., Stamford, T.L.M., Sarubbo, L.A., Luna, J.M., Rufino, R.D.; Banat, I.M., "Microbial biosurfactants as additives for food industries". *Biotechnol. Prog.*, n°29, (2013), 1097–1108.
2. Das, P., Mukherjee, S., Sen, R., "Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin". *Chemosphere*, 72, (2008) ,1229–1234.
3. Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M., "Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2011), 1-5.
4. Dziegielewska, E., Adamczak, M., "Evaluation of waste products in the synthesis of surfactants by yeasts". *Chem. Pap.*, 67, (2013) ,1113–1122.
5. Sachdev, D.P., Cameotra, S.S., "Biosurfactants in agriculture". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, (2013) ,1005–1016.
6. Chiewpattanakul, P., Phonnok, S., Durand, A., Marie, E. & Thanomsub, B.W., "Bioproduction and anticancer activity of biosurfactant produced by the dematiaceous fungus *Exophiala dermatitidis* SK80, J". *Microbiol. Biotechnol.* 20, (2010), 1664-71.
7. Marchant, R., Banat, I.M., "Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation". *Trends Biotechnol.* 11, (2012), 558–565.
8. Sobrinho, H.B.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Porto, A.L.F.; Sarubbo, L.A., "Biosurfactants: Classification, properties and environmental applications". *In Recent Developments in Biotechnology*, 1st ed.; Studium Press LLC: Houston, TX, USA, Volume 11,(2013),1–29.
9. Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R., "Microbial biosurfactants production, applications". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, (2010), 427–444.
10. Kapadia, S.G., Yagnik, B.N., "Current trend and potential for microbial biosurfactants". *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 4, (2013), 1–8.
11. Rosenberg E. and Ron E.Z., "High- and low-molecular-mass microbial surfactants", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, (1999), 2154 – 162
12. Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS., "Potential commercial applications of microbial surfactants". *Appl Microbiol Biotechnol*, 53, (2000), 495–508.

13. Desai JD, Banat IM., "Microbial production of surfactants and their commercial potential". *Microbiol Mol Biol Rev.* 61, (1997), 47–64.
14. Smyth TJP, Perfumo A, Marchant R, Banat IM., "Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology". *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, (2010a), pp 3705–3723.
15. Smyth TJP, Perfumo A, McClean S, Marchant R, Banat IM., "Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. In: Timmis KN (ed) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology". *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, (2010b), pp 3689–3704
16. Healy, M.G., Devine, C.M. et Murphy R., "Microbial production of biosurfactants. Resources, Conservation and Recycling", 18, (1996), 41-57
17. Bognolo G., "Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons Colloids and Surfaces". 152, (1999), 41-52.
18. Falatko D.F. and J.T. Novak. "Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons". *Water Environ. Res.* 64, (1992), 163-169.
19. Mulligan C.N., "Environmental application for biosurfactants", *Environmental Pollution*, 133, (2005), 183 - 198.
20. Bernheimer A. W. and Avigad L. S., "Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*". *Journal of General Microbiology.* 61, (1970), 361 - 369.
21. Moran A. C., Martinez M. A. and Sineriz F., "Quantification of Surfactin in Culture Supernatant by Hemolytic Activity". *Biotechnol Lett.* 24,(2002),177-80.
22. Johnson M. K. and Boese-Marrazzo D., "Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*". *Infect. Immun.* 29 (3), (1980),1028 - 1033.
23. Carrillo P. G., Mardaraz C.,Pitta-Alvarez S. J. and Giulietti A. M.,. "Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. J". *World Microbiol. Biotechnol.* 12,(1996), 82– 84.
24. Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K.N., Knapp R.M. and McInerney M.J., "Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production by Diverse Microorganisms", *Journal Microbiological Methods.* 56, (2004), 339 - 347.

25. Van Dyke, M.I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., and Trevors, J.T., "Pseudomonas aeruginosa UG2 rhamnolipid biosurfactant: Structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.* 39, (1993), 1071 – 1078
26. Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, Garcia F & Manresa A., "Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes". *Langmuir*, 17, (2001), 1367–1371
27. Pacwa–Plociniczak, M.; Plaza, G.A.; Piotrowska–Seget, Z.; Cameotra, S.S., "Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 13, (2011), 633–654.
28. Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C, Gutnick DL., "Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties". *Appl Environ Microbiol*, 37, (1979), 402–408.
29. Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi and T. Imanaka., "A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J. Bacteriol*, 175, (1993), 6459-6466.
30. Mulligan C N, Yong R N, Gibbs B F., "Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil". *A review. Engineering Geology*, 60(1-4), (2000), 1371–380.
31. Yakimov, M.M., Timmis, K.n., Wray V. and Fredrickson, H.L., "Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50". *Applied and Environmental Microbiology*, 61, (1995), 1706-1713.
32. Amani H, Mehrnia MR, Sarrafzadeh MH, Haghghi M, Soudi MR. "Scale up and application of biosurfactant from *Bacillus subtilis* in enhanced oil recovery". *Appl Biochem Biotechnol*, 162, (2010), 10–523.
33. Banat, I., "The isolation of a thermophilic biosurfactant-producing *Bacillus* species", *Biotechnology Letters*, 15, (1993), 591-594.
34. Ruiz-Garcia, C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I. & Quesada, E. "*Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Ve´lez in Ma´laga, southern Spain". *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, (2005), 191-195.

35. Sobrinho H.B.S., Rufino R.D., Luna J.M., Salgueiro A.A., Campos-Takaki G.M., Leite L.F.C., Sarubbo, L.A., "Utilization of two agro industrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995". *Process Biochemistry*, 43, (2008),912-917.
36. Seghal Kiran,G. Anto Thomas, T. & Selvin, J., "Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardioopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*", 78, (2010), 8-16.
37. Shin K-H, Kim K-W, Ahn Y., "Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization- biodegradation process. *J Hazard Mater*".137, (2006), 1831- 1837.
38. Bharali , S., Das , B.K., Konwar , A.J., "Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 10, (2011), 01-19.
39. Ferhat samira, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Kamel Eddouaouda, Redha Alouaoui, Ahmed Boucherit, Najla Mhirib, Nadji Moulai-Mostefa, 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), pp.1182 – 88.
40. Ries, S.M. Strobel, G.A.. "Biological properties and pathological role of a phytotoxic glycolipeptide from culture of *Corynebacterium insidiosum* ". *Plant Pathol*, 2, (1972), 133-142
41. Pepi, M., Cesaro, A., Liut, G. & Baldi, F., "An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. Ant-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid". *FEMS Microbiology Ecology*, 53, (2004),157-166.
42. Arutchelvi, J. & Doble, M., "Characterization of glycolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* CPCL isolated from petroleum-contaminated soil". *Lett Appl Microbiol*.51, (2010), 75-82.
43. Laycock, M.V., Hildebrand, P.D., Thibault, P., Walter, J.A. Wright, J.L.C. "Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. J". *Agric. Food Chem*,39,(1991), 483-489.
44. Abu-Ruwaida A. S., Banat I. M., Haditirto and Khamis A., "Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing

- Rhodococcus* Bacterium", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7, (1991), 53 - 61.
45. Urai, M., Aizawa, T., Anzai, H., Ogihara, J., Iwabuchi, N., Neilan, B., Couperwhite, I., Nakajima, M. & Sunairi, M., "Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by a benzenetolerant bacterium, *Rhodococcus* sp". 33. *Carbohydr Res*, 341, (2006), 616-623.
  46. Shavandi, M., Mohebbali, G., Haddadi, A., Shakarami, H. & Nuhi, A., "Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6". *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, 82,(2011),477-482.
  47. Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Porcel, J. & Quesada, E., "Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons". *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, (2002),347-351.
  48. Eddouaouda kamal, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Sonia Ben Younes, Slim Cherif, Samira Ferhat, Najla Mhiri, Mohamed Chamkha<sup>1</sup> 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, pp. (2012) 1 – 11.
  49. Seghal Kiran, G. Anto Thomas, T. Selvin, J. Sabarathnam, B. Lipton, A. P., " Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture", VOL 101; NUMBER 7, (2011),pages 2389-2396
  50. Cameotra SS, Makkar RS, Kaur J, Mehta SK., "Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind". *Adv Exp Med Biol*, 672, (2010), 261–280
  51. Déziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F., et Bisailon, J.G., "Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons". *App. Environ. Microbiol*, V. 62, n° 6, (June 1996), 1908–1912.
  52. Mata-Sandoval J.C., Karns J. and Torrents A., "Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipides by *Pseudomonas aeruginosa* UG2", *Microbiol. Res.*, 155, (2000), 1 - 8.
  53. Fiechter A., "Biosurfactants: moving towards industrial application", *Tibtech*,



- 10, (1992), 3 - 12.
54. Cameotra SS, Makkar RS., "Synthesis of biosurfactants in extreme conditions". *Appl Microbiol Biotechnol*, 50, (1998), 520–529
55. Lang S, Wullbrandt D., " Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential". *Applied Microbiol Biotechnol*, 51(1),1999,22-32.
56. Robert M., Mercade M.E., Bosch M.P., Parra J.L., Espuny M.J., Manresa M.A. and Guinea J., "Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T", *Biotechnology Letters*, 11, (1989), 871 - 874.
57. Hommel R.K. and Ratledge C., "Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules", In N. Kosaric (ed.), New York, N.Y., Dekker, Inc., , *Biosurfactants: production, properties, applications*. Marcel, (1993), 3 - 63.
58. Guerra-Santos L., Kappeli O. and Fiechter A., "Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors", *Applied Microbiology and Biotechnology* 24, (1986), 443– 448.
59. Guerra-Santos L.H., Kappeli, O. and Fiechter A., "*Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon sources" ,*Applied and Environmental Microbiology*, 48, (1984), 301-305
60. Cooper DG, Goldenberg BG. "Surface active agents from two *Bacillus* species". *Appl Environ Microbiol*;53, (1987)224-229.
61. Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A.; Rodrigues, L.R.M.; Teixeira, J.A.C.; Campos-Takaki, G.M., "Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995". *Curr. Microbiol*, 62, ( 2011), 1527–1534.
62. Ławniczak, L.; Marecik, R.; Chrzanowski, L. "Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation". *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 97,(2013), 2327–2339.
63. Van Haesendonck, I.P.H. and Vanzeveren, E.C.A. W.O. 2004=040984 (2004).
64. Linhardt, R.J., Bakhit, R., Daniels, L., Mayerl, F., and Pickenhagen, W., *Biotechnol. Bioeng*, 33,(1989) 365–368.
65. Kosaric, N. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4): (2001), 295–304.

66. Iyer, A., Mody, K., & Jha, B. "Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide". *Enzyme and Microbial Technology*, 38, (2006), 220-222.
67. Hood, S.K. and Zottola, E.A., *Food Control*, 6(1), (1995), 9–18.
68. Gan, B. S., Kim, J., Reid, G., Cadieux, P., & Howard, J. C., "*Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats". *Journal of Infectious Diseases*, 185(9), (2002), 1369-1372.
69. Singh, P., & Cameotra, S. S., "Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences". *Trends in Biotechnology*, 22(3), (2004), 142-146.
70. Mireles II, J. P., Toguchi, A., & Harshey, R. M., "*Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation". *Journal of Bacteriology*, 183(20), (2001), 5848-5854.
71. Irie, Y., O'Toole, G. A., & Yuk, M. H., "*Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms". *FEMS Microbiology Letters*, 250, (2005), 237-243.
72. Rodrigues, L. R., Banat, I. M., van der Mei, H. C., Teixeira, J. A., & Oliveira, R., "Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants". *Journal of Applied Microbiology*, 100(3), (2006), 470-480.
73. Dagbert, C., Meylheuc, T., & Bellon-Fontaine, M. N., "Corrosion behavior of AISI 304 stainless steel in presence of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*". *Electrochimica Acta*, 51, (2006). 5221-5227.
74. Velikonja, J., & Kosaric, N. "Biosurfactants in food applications. In N. Kosaric (Ed.), New York: Marcel Dekker" , (1993), pp. 419-446.
75. Abe, M. and Scamehorn, J.F., "Mixed Surfactant Systems", 2nd edition; New York: Marcel Dekker" ,(2005).
76. Dickinson, E. and Euston, S.R., *Adv. Colloid Interface Sci*, 42, (1992), 89–148.
77. Nitschke, M., & Pastore, G. M. "Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater". *Bioresource Technology*, 97, (2006), 336-341.
78. Lukondeh, T., Ashbolh, N. J., & Rogers, P. L., "Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of natural bioemulsifier". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30, (2003) ,715-720.

79. Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I. W., & Roller, S., "Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods". *Journal of Biotechnology*, 40, (1995), 207-217.
80. Mukherjee S, Das P, Sivapathasekaran C, Sen R., "Enhanced production of biosurfactant by a marine bacterium on statistical screening of nutritional parameters". *Bio Eng J*, 42, (2008), 254–260
81. Oliveira, J.G.; Garcia-Cruz, C.H., "Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources". *Braz. Arch. Biol. Technol*, 56, (2013),155–160.
82. Deleu M, Paquot M., "From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants". *Comptes Rendus Chimie*, 7, (2004), 641–646.
83. Dubey, K., & Juwarkar, A., "Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17, (2001),61-69.
84. Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Campos Takaki, G.M.; Sarubbo, L.A., "Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988". *Electron. J. Biotechnol*, 17, (2014), 34–38.
85. Rodrigues, L., Moldes, A., Teixeira, J., & Oliveira, R., "Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains". *Biochemical Engineering Journal*, 28, (2006),109-116.
86. Fox, S. L., & Bala, G. A., "Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates". *Bioresource Technology*, 75, (2000), 235-240.
87. Kukhar V., "Biomass - Feedstock for organic chemicals". *Kem Ind*, 58, (2009), 57–71
88. Savarino P, Montoneri E, Biasizzo M, Quagliotto P, Viscardi G, Boffa V., "Upgrading biomass wastes in chemical technology. Humic acid-like matter isolated from compost as chemical auxiliary for textile dyeing. J". *Chem Technol Biotechnol*, 82, (2007), 939–948
89. Santos, C.A.; Bezerra, M.S.; Pereira, H.S.; Santos, E.S.; Macedo, G.R., "Production and recovery of rhamnolipids using sugar cane molasses as carbon source. J". *Chem. Eng. Chem. Eng*, (2010), 4- 27.

90. Ponte Rocha M, Gomes Barreto R, Melo V, Barros Gonçalves L., "Evaluation of Cashew Apple Juice for Surfactin Production by *Bacillus subtilis* LAMI008". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 155, (2009), 63–7
91. Portilla-Rivera OM, Moldes Menduiña AB, Torrado Agrasar AM, Domínguez González JM., "Biosurfactants from grape marc: Stability study. J". *Biotechnol*, 131, (2007a), S136–S136.
92. Kukhar V., "Biomass - Feedstock for organic chemicals". *Kem Ind*, 58, (2009) 57–71.
93. Gupta R, Beg QK, Khan S, Chahuan B., "An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases". *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, (2002), 381–395
94. Makkar RS, Cameotra SS., "Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. J". *Ind Microbiol Biotechnol*, 20, (1998), 48–52.
95. Joshi S, Bharucha C, Desai AJ., "Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B". *Bioresour Technol*, 99;(2008);4603-4608.
96. Fatma Zohra Ferradji, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Soumia Rebbani, Djamila Fodil, Kamel Eddouaouda, Sami Sayadi., "Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces spp.* isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria)". *International Biodeterioration & Biodegradation* 86, (2014), pp.300-308.
97. Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. et Nabi, I., "Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*". *Desalin*, V. 223, n° 1 et 3, (March 2008), 143-151.
98. Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT., "Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases". *Annual Rev Microbiol*, 53, (1999), 315-351.
99. Mnif S., Chamkha M. and Sayadi S., "Isolation and characterization of *Halomonas sp.* strain C2SS100 a hydrocarbon degrading bacterium under hypersaline conditions". *J. Appl. Microbiol.*, 107, (2009), 785 - 794.100
100. Sarubbo LA, Marcal MC, Neves MLC., " Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95: ( 2001), 59-67.

101. Sarubbo LA, Luna JM, Campos-Takaki GM., "Production and stability studies of the bioemulsifiers obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002". *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, (2006), 400-406.
102. Dhiman, A., Nanda, A., Ahmad, S. et Narasimhan, B., "In vitro antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava*. L". *Journal of Pharm. Bioall. Scien*, V. 3, n° 2, (April 2011), 226-229
103. Maruyama K., Sakashita T., Hagura Y., Suzuki K., ".Relationship between rheology, particle size and texture of mayonnaise". *Food Sci Technol Res*, 13, (2007),1-6.
104. APHA. American Public Health Association. "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods", (1992).
105. A.O.A.C. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International Published by A.O.A.C. International Suit 4002 200 Wilson Boulevard Arlington, Virginia USA, (2000) pp. 3301-22201.
106. Bodour A. A. and Miller-Maier R. M., "Application of a Modified dropcollapsing Technique for Surfactant Quantitation and Screening of Biosurfactant-producing Microorganisms". *Journal of Microbiological Methods*. 32. (1998),273-280.
107. Bodour, A.A., Gerrero-Barajas, C. et Maier, M., "Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. Strain MTN11". *App and Env Microbiol*, 10(6), (2004),14-20.
108. Mukesh Kumar DJ, Kalaichelvan PT, Suresh Chander CR and Lohitnath T. "Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food biopreservative". *Advances in applied science research*, 3(3), (2012),1827-1831.
109. Prieto, L.M., Michelon, M., Burkert, J.F.M., Kalil, S.J., Burkert, C.A.V., "The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil". *Chemosp*, V. 71, n° 9, (April 2008), 1781-1785.

110. Javaheri M, Jenneman GE, McInerney MJ, Knapp RM., "Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2". *App Environ Microbiol*, 50, (1985), 698-700.
111. Dubey K, Juwarkar A., "Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2". *Indian Journal of Biotechnology*, 3, (2004),74-81.
112. Daniel HJ, Reuss M, Syltatk C., "Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509". *Biotechnology Letters*, 20, (1998),1153-56.
113. Mukherjee S, Das P, Sen R., "Towards commercial production of microbial surfactants". *Trend Biotech*, 24, (2006),509-515.
114. Nakayama S, Takahashi S, Hirai M, Shoda M., " Isolation of new variants of surfactin by a recombinant *Bacillus subtilis*". *App Microbiol Biotechnol*,48, (1997), 80-82.
115. Gervasio PDS, Matthias M, Jonas C: Glycerol., "A promising and abundant carbon source for industrial microbiology". *Biotech Adv*, 27, (2009) 30-39.
116. Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT., "Bacterial biocatalysts: molecular biology,three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases". *Annual Rev Microbiol*, 53, (1999)315-351.
117. COI (Conseil Oléicole International). International course on water management and irrigation of olive orchards. Limassol-Cyprus, (2008), 20 pages.
118. Lee K, Hwang SH, Ha S, Jang JH, Lim DJ, Kong JY., "Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P". *Biotechnol Biopro Eng*, 9, (2004), 267–273
119. 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.
120. Gobbert U., Lang S. and Wagner F., "Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*", *Biotechnol. Lett.*, Vol. 6, (1984), 225 - 230.

121. Tabatabaee A, Mazaheri A, Noohi A and Sajadian VA., "Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs". *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2, (2005),6-12.
122. Yakimov MM, Timmis KN, Wray V, Fredrickson HL., "Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* MS3". *Appl Environ Microbiol*, 61: (1995)1705-1713.
123. Soberón-Chávez G, Maier RM., "Biosurfactants: a General Overview. In: Soberón-Chávez G, editor. *Biosurfactants*. Springer-Verlag; Berlin, Germany", (2011), pp. 1–11.
124. Hou-Pin, S., Chuang-Ping, L., Tan-Ang, L. and Ruo-Syuan, H., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, (2010),806–812.
125. Depree J.A., Savage G.P., " Physical and flavour stability of mayonnaise". *Trends in Food Science and Technology* , 12,( 2001),157-163.
126. Byrlacov A. V., Belik E. V., Antonova N. A., Novojilov A. L., "Study of fatty acids content in the grape seed oil by gas-liquid chromatography". *Bulletin of North Caucasus State Technical University*, 2006, 3, 54-57.
127. Figarella, J et Leyral, G., "Microbiologie technique". ISSN, (2006), 363 p.

## APPENDICE A

Tableau 1 : Caractéristiques du biotope utilisé pour l'isolement des souches productrices de biosurfactants [48] :

N° Paramètres	Echantillon	01 Puits OMOZ #472	02 Puits OMKZ #32	03 Puits OMKZ#502
COT (%)		2,30	7,1	3,5
N <sub>T</sub> (‰)		0,42	1,18	0,51
COT/N <sub>T</sub>		54,7	60,1	68,6
HPT (g/kg du sol)		27,83	59,07	36,05
Conductivité (mS/cm)		17,32	13,06	13,95
pH (1 : 2,5) H <sub>2</sub> O		7,50	7,57	7,25

COT : Carbone Organique Total ; N<sub>T</sub> : Azote total *Kjeldahl*, HTP : Hydrocarbures Pétroliers Totaux

### Les étapes de l'isolement des souches productrices de biosurfactants

L'isolement est basé sur la capacité des souches à croître sur le pétrole brut (mesurer la densité optique à 600 nm). En effet, les tests de biodégradation ont été réalisés dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture (MM), 2% (p/v) de sol contaminé par le pétrole brut et 2% (v/v) de pétrole brut comme source de carbone et d'énergie. L'incubation a été réalisée à 45°C sous une agitation de 150 tr/min [48].

Afin d'obtenir une culture microbienne active, des repiquages successifs ont été effectués toutes les 48 h dans un milieu neuf. La croissance bactérienne a été suivie par :

- L'observation microscopique à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase (Olympus BX50).



- La mesure de la densité optique (DO) à 600 nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre.
- Le suivi de la disparition de la couche huileuse du pétrole durant la période d'incubation qui est réalisée par l'observation visuelle permet d'évaluer la dégradation du pétrole.

#### Composition du milieu liquide LB :

Le milieu de culture riche utilisé est le milieu Luria-Bertani (LB) dont la composition par litre est la suivante: 5 g extrait de levure, 10 g tryptone et 10 g NaCl.

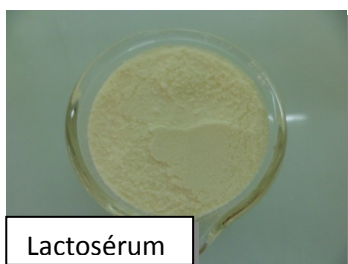
#### Composition du milieu minimum:

Le milieu de culture liquide utilisé est à base de sels minéraux, milieu minimum (MM), sa composition (g/l) est :  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,4),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,3),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,3), NaCl (10),  $\text{MgCl}_2$  (0,33),  $\text{CaCl}_2$  (0,05), extrait de levure (0,1) et 1 ml de solution d'oligoéléments contenant (par litre):  $\text{H}_3\text{BO}_4$  (0,25g),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,5g),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,5g),  $\text{NaMoO}_4$  (0,06g),  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,7g). Le pH est ajusté entre  $7,1 \pm 0,2$ . Ensuite, le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 min.

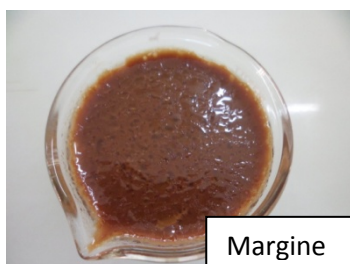
## APPENDICE B

### La présentation des sources de carbone

- Le lactosérum a été recueilli sous forme de poudre au niveau de la laiterie de Béni Tamou. Cette partie liquide est issue de la coagulation du lait. L'échantillon a été prélevé dans un sachet en plastique, puis conservé par réfrigération à 4°C.
- La margines ou eau de végétation est un effluent issu de l'extraction de l'huile d'olive à un aspect trouble, et de couleur brun-rougeâtre à noire. Ce sous produit a été recueilli au niveau de la maasra de Laajiba à la wilaya de Bouira. L'échantillon a été prélevé dans une bouteille de 5 litres en plastique, puis conservé dans un endroit frais.
- L'huile d'olive utilisée dans notre étude est de la variété Chemlal provenant de la même maasra que la margine de la campagne oléicole 2013/2014.
- Les rejets du jus d'orange que nous avons utilisé pour notre étude provenant de l'industrie ROUIBA. L'échantillon a été prélevé dans un sachet en plastique, puis conservé par réfrigération à 4°C.



Lactosérum



Margine



Rejets de jus (ROUIBA)



Huile de friture

Huile d'olive

## APPENDICE C

### Les sujets et l'environnement de la dégustation

Le panel était constitué de 10 personnes membre du personnel de l'entreprise SIDNA.

Les sujets ont été recrutés selon leur motivation et leur disponibilité cinq d'entre eux avaient déjà participé à des tests sensoriels sur de la moutarde, les sauces salade, notamment la mayonnaise. Pour cette étude, les 10 sujets ont suivi des séances préliminaires d'entraînement. Ces séances ont permis d'établir une liste consensuelle définitive de 11 descripteurs : 4 descripteurs de texture à la cuillère, 3 descripteurs de saveurs et 4 descripteurs de texture en bouche (Tableau 2).

Tableau 2: Définition et protocole de dégustation des descripteurs de texture évalués par les sujets lors de l'analyse descriptive quantitative

Descripteurs	Définition
Viscosité	Evaluation de la consistance du produit en début de mise en bouche. Le produit est déposé sur la langue et on évalue la rapidité avec laquelle il s'écoule sur les côtés de la langue. Un produit est "fluide" s'il s'écoule immédiatement et "épais" s'il reste sur la langue.
Onctueux	Un produit onctueux est un produit de texture fine (lisse), "plutôt épais" mais qui se comporte comme un produit fluide lorsque l'on applique une légère pression dessus. L'onctuosité n'est pas forcément liée au gras ; un produit non gras peut être onctueux.
Lisse	Décrit un état de surface du produit lors de sa mise en bouche. On "caresse" la surface du produit (solide ou liquide) avec la langue. Le produit est "peu lisse" si la langue perçoit de fortes inégalités en surface (sens tactile de la langue) jusqu'à "très lisse" si on ne ressent pas d'inégalités de surface.
Gras	Après avoir avalé le produit, on évalue la sensation de film gras résiduel qui tapisse la cavité buccale.

Acide	Saveur acide
Salé	Saveur salée
Brillant	Qualifie l'aspect d'une surface lisse faisant apparaitre des reflets lumineux
Crémeux	produit, au goût, une impression de moelleux, de velouté.
petit lait	Arôme de petit lait

## APPENDICE D

Tableau 4 : Composition de la galerie API 50 CH (Figarella et Leyral [127])

Bande 0-9 Tube/substrat	Bande 10-19 Tube/substrat	Bande 20-29 Tube/substrat	Bande 30-39 Tube/substrat	Bande 40-49 Tube/substrat
0 Témoin	10 GALactose	20 $\alpha$ -Methyl-D-	30 MELibiose	40 D TURanose
1 GLYcérol	11 GLUcose	Mannoside	31 SACchrose	41 D LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	21 $\alpha$ -Methyl-D-	32 TREhalose	42 D TAGatose
3 D ARAbinose	13 MANnosE	Glucoside	33 INUline	43 D FUCose
4 L ARAbinose	14 SORbosE	22N-Acetyl-	34 Melezitose	44 L FUCose
5 RIBose	15 RHAmnos	Glucosamine	35 RAFFinose	45 D ARAbitol
6 D XYLose	16 DULcitol	23 AMYgladine	36 AMIdon	46 L ARAbitol
7 L XYLose	17 INOsitol	24 ARButine	37 GLYcogène	47 GlucoNATE
8 ADOnitol	18 MANnitol	25 ESCuline	38 XYLitol	482-Keto-Gluconate
9 <i>B</i> Methyl- Xyloside	19 SORbitol	26 SALicine	39 GENtiobiose	495-Keto-Gluconate
		27 CELlobiose		
		28 MALtose		
		29 LACtose		